

BAB IV

HASIL DAN PEMBAHASAN

A. Hasil

1. Identifikasi simplisia

Daun jambu biji yang digunakan sebagai sampel penelitian diperoleh melalui tempat budidaya jambu biji di Dusun III, Munggangsari, Kecamatan Grabag, Kabupaten Purworejo, Jawa Tengah (titik koordinat:-7.828539,109.879769) pada bulan Mei 2022. Waktu pengambilan daun dilakukan pada pagi hari dengan tujuan untuk mendapatkan senyawa aktif yang tinggi. Apabila sampel diambil pada siang hari, tanaman akan melakukan proses fotosintesis yang menyebabkan senyawa aktif yang tertarik kurang maksimal (Susilowati & Sari, 2021). Identifikasi terhadap keaslian sampel penelitian dilakukan di Laboratorium Sistematika Tumbuhan, Fakultas Biologi Universitas Gadjah Mada, Yogyakarta pada tanggal 25 Mei 2022 dengan nomor 088/S.Tb./V/2022. Bahan yang digunakan untuk determinasi adalah daun jambu biji yang sudah berbunga dari pucuk bunga kebawah dihitng sepanjang 40 cm. Hasil dari determinasi menunjukkan bahwa sampel penelitian yang digunakan adalah (*P. guajava* L.). Hasil Identifikasi tanaman jambu biji dapat dilihat pada lampiran 2.

2. Persiapan sampel

a. Pembuatan simplisia daun jambu biji

Daun jambu biji (*P. guajava* L.) yang berwarna hijau segar diambil sebanyak 5 kg. Terlebih dahulu daun segar dilakukan sortasi basah dengan tujuan untuk menghilangkan bahan pengotor dan komponen asing lainnya dengan cara dialiri dengan air mengalir lalu ditiriskan, selanjutnya dilakukan sortasi kering dengan tujuan memisahkan daun jambu biji dengan pengotor yang kemungkinan masih tertinggal pada saat sortasi basah (Simbolon, dkk., 2021). Setelah melalui tahapan tersebut, kemudian dilakukan perajangan daun.

dengan menggunakan bantuan *cutter*. Perajangan sendiri dilakukan dengan tujuan untuk memperkecil ukuran daun agar mempercepat proses pengeringan. Untuk dapat membuat ekstrak, terlebih dahulu dibuat simplisia. Dibuat simplisia daun jambu biji melalui langkah disiapkan rajangan daun jambu biji sejumlah 5 kg dan dikeringkan terlebih dahulu menggunakan bantuan oven dengan suhu 50°C. Alasan pemilihan suhu ini karena suhu pengeringan yang lebih dari 60°C dapat mengakibatkan perubahan dalam tanaman, termasuk senyawa flavonoid (Warnis et al., 2020). Proses pengeringan daun dilakukan dengan cara dibolak balik daun agar pemanasan merata selama kurang lebih 3 hari, hingga daun benar-benar kering yang ditandai dengan simplisia yang kaku serta apabila simplisia dipatahkan, akan menimbulkan suara. Selanjutnya, daun kering yang diperoleh akan diserbuk dengan alat blender. Tujuan dilakukannya penghalusan simplisia adalah untuk memperluas permukaan partikel simplisia sehingga semakin besar kontak antara permukaan partikel simplisia dengan pelarut ke dalam simplisia sehingga senyawa yang terkandung dalam simplisia akan dapat tertarik secara maksimal, serta dilakukan pengayakan dengan ayakan no 40 yang pada akhirnya diperoleh serbuk kering untuk selanjutnya diekstraksi (Simbolon, dkk., 2021).

b. Uji susut pengeringan

Sebelum dibuat ekstrak, serbuk diuji terhadap kadar lembab (*Moisture content*) menggunakan alat *Moisture balance*. Didapatkan hasil untuk susut pengeringan dari ekstrak metanol 25% sebesar 7,12 %, dari ekstrak metanol 50% sebesar 8,10%, dan dari ekstrak metanol 100% sebesar 6,12%. Hasil ini sesuai dengan nilai susut pengeringan yang tercantum di Farmakope herbal indonesia yaitu untuk serbuk daun jambu biji adalah tidak lebih dari 10% (Kemenkes, 2017).

c. Pembuatan ekstrak metanol daun jambu biji

Proses ekstraksi dalam penelitian ini menggunakan metode maserasi dengan metanol teknis sebagai pelarut yang dibuat dalam 3 variasi konsentrasi, yaitu metanol 25%, metanol 50%, dan metanol murni (100%). Maserasi dilakukan selama 3 x 24 jam. Selanjutnya dilakukan proses

remaserasi sebanyak 1 kali untuk memastikan bahwa zat aktif tidak ada yang yang tertinggal dalam ampas daun jambu biji, sehingga penarikan zat aktif dapat maksimal. Selama proses maserasi, dilakukan pengadukan setiap 4 jam yang bertujuan untuk mempercepat proses transfer senyawa dari daun jambu oleh pelarut. Hasil maserasi kemudian disaring menggunakan kain mori. Selanjutnya, hasil filtrat dilakukan pemekatan dengan bantuan penangas air. Dilakukan pengecekan suhu agar suhu tidak melebihi 50°C, dikarenakan pada suhu lebih dari 50°C senyawa yang terkandung berpotensi rusak. Hasil ekstraksi daun jambu biji dapat dilihat pada lampiran 3.

Pada penelitian ini, didapatkan hasil ekstrak kental untuk ekstrak metanol 25% sebanyak 55,4 gram dengan rendemen sebesar 18,467, untuk ekstrak kental yang didapatkan dari pelarut metanol 50% sebanyak 72,19 gram dengan rendemen sebesar 24,063%, dan hasil dari pelarut metanol murni (100%), didapatkan ekstrak kental sebanyak 107,31 gram dengan rendemen sebesar 35,770%. Rendemen ekstrak merupakan perbandingan jumlah ekstrak yang diperoleh dari suatu bahan terhadap awal berat bahan simplisia. (Suhendar et al., 2020). Nilai rendemen berkaitan dengan banyaknya kandungan bioaktif yang terkandung pada tumbuhan. Semakin tinggi rendemen ekstrak maka semakin tinggi kandungan zat yang tertarik ada pada suatu bahan baku (Senduk et al., 2020). Nilai rendemen yang diperoleh pada penelitian ini sesuai dengan teori, dimana menurut Farmakope Herbal Indonesia Edisi III, nilai rendemen ekstrak daun jambu biji adalah tidak kurang dari 12,3 % (Kemenkes, 2017). Hasil rendemen ekstrak dapat dilihat pada tabel 4.

Tabel 4. Hasil rendemen ekstrak

| Konsentrasi pelarut | Berat simplisia (gram) | Berat wadah (gram) | berat wadah+ekstrak (gram) | Berat ekstrak (gram) | Rendemen (%) |
|---------------------|------------------------|--------------------|----------------------------|----------------------|--------------|
| 25% | 300 | 156.38 | 211.78 | 55.4 | 18.467 |
| 50% | 300 | 156.66 | 228.85 | 72.19 | 24.063 |
| 100% | 300 | 156.24 | 263.55 | 107.31 | 35.770 |

Pada hasil rendemen dapat dilihat bahwa variasi konsentrasi pelarut metanol mempengaruhi hasil rendemen yang dihasilkan, dimana pelarut metanol dengan konsentrasi terendah memiliki rendemen terendah, disusul oleh pelarut metanol 50%, kemudian rendemen tertinggi diperoleh dari ekstrak metanol murni (100%), sehingga dapat dikatakan bahwa senyawa aktif yang terdapat dalam sampel daun jambu biji lebih dapat tertarik dengan menggunakan 100% metanol dibandingkan metanol yang telah diencerkan dengan air. Hal ini sejalan dengan penelitian yang dilakukan oleh (Citra,dkk., 2015) yang meneliti tentang pengaruh jenis pelarut terhadap kandungan total flavonoid dan aktivitas antioksidan ekstrak daun matoa (*Pometia pinnata*), dimana dihasilkan rendemen ekstrak metanol lebih besar dibandingkan dengan rendemen yang diperoleh menggunakan pelarut air. Metanol adalah pelarut universal yang dapat mengikat seluruh komponen kimia pada bahan alam, baik yang bersifat non polar, semi polar, maupun polar. Metanol termasuk cairan penyari yang mudah memasuki sel melewati dinding sel bahan, sehingga senyawa metabolit sekunder yang terdapat dalam sitoplasma akan terlarut dalam pelarut sehingga senyawa dapat terekstraksi dengan sempurna.

d. Uji organoleptik

Setelah dihitung rendemen dari ketiga ekstrak, kemudian dilakukan uji organoleptik menggunakan panca indra. Uji organoleptik adalah tahapan awal yang sederhana dan seobjektif mungkin. Uji ini dilakukan dengan pengamatan dari bentuk, warna, bau, dan rasa (Depkes RI, 2008). Hasil pengamatan organoleptik pada ekstrak dapat dilihat pada tabel 5.

Tabel 5. Hasil pengamatan organoleptik ekstrak metanol daun jambu biji

| Uji organoleptik | Ekstrak metanol 25% | Ekstrak metanol 50% | Ekstrak metanol 100% |
|------------------|---------------------|---------------------|----------------------|
| Bentuk | Kental | Kental | Kental |
| Warna | Coklat kehitaman | Coklat kehitaman | Coklat kehitaman |
| Bau | Khas | Khas | Khas |
| Rasa | Pahit | Pahit | Pahit |

Hasil pengujian organoleptik pada ketiga ekstrak telah memenuhi persyaratan yang tercantum dalam Farmakope Herbal Indonesia Edisi II, dimana memiliki bentuk kental, berwarna coklat kehitaman, berbau khas serta rasa pahit.

e. Uji skrining fitokimia

Skrining fitokimia merupakan salah satu cara yang dapat dilakukan untuk mengidentifikasi kandungan metabolit sekunder suatu bahan alam. Skrining fitokimia tahapan untuk memberikan gambaran mengenai kandungan senyawa tertentu dalam sampel yang akan diteliti. Skrining fitokimia yang dilakukan meliputi uji kandungan alkaloid, flavonoid, saponin, steroid dan terpenoid, serta tannin. Hasil skrining fitokimia daun jambu biji (*Psidium guajava* L.) dapat dilihat pada tabel 6. Dapat dilihat pada tabel 6, ekstrak metanol daun jambu biji dengan 3 variasi konsentrasi terbukti tidak mengandung senyawa alkaloid, tetapi positif mengandung senyawa flavonoid, saponin, steroid dan tanin.

1) Uji alkaloid

Uji alkaloid dilakukan dengan melarutkan ekstrak dengan HCL 2N. Penambahan HCl bertujuan karena alkaloid bersifat basa sehingga biasanya diekstrak dengan pelarut yang mengandung asam, sehingga digunakan HCl 2N. Pengujian alkaloid dilakukan dengan cara membagi larutan sampel menjadi 3 bagian, masing-masing larutan ditambahkan dengan 3 tetes reagen mayer, wagner dan dragendorf. Hasil positif alkaloid pada uji Mayer ditandai dengan terbentuknya endapan putih setelah sampel direaksikan dengan

reagen. Diperkirakan endapan tersebut terbentuk dari kompleks kalium-alkaloid. Larutan meyer terbentuk dari larutan merkuri(II) klorida yang ditambah dengan kalium iodida. Keduanya bereaksi membentuk endapan merah merkuri(II) iodida. Apabila kalium iodida yang ditambahkan berlebih, maka akan terbentuk kalium tetraiodomerkurat (II). Pada alkaloid, terdapat kandungan atom nitrogen yang memiliki elektron bebas berpasangan yang digunakan untuk membentuk ikatan kovalen koordinat dengan ion logam. Pada uji alkaloid dengan pereaksi Mayer, diperkirakan nitrogen pada alkaloid akan bereaksi dengan ion logam K^+ dari kalium tetraiodomerkurat (II) membentuk endapan dari kompleks kalium-alkaloid berwarna putih (Fajrin & Susila, 2019). Penambahan reagen wagner akan menghasilkan endapan berwarna coklat, yang terjadi akibat adanya reaksi ion logam K^+ dengan nitrogen yang membentuk ikatan kovalen koordinat sehingga terbentuk ikatan kalium-alkaloid (Parbuntari et al., 2018). Selanjutnya pada penambahan reagen dragendorf akan menyebabkan perubahan warna menjadi merah (jingga), hal ini dapat terjadi akibat terbentuknya ikatan kovalen koordinat antara nitrogen dan K^+ (ion logam) (Harahap & Nurbaity Situmorang, 2021). Hasil pengujian alkaloid ketiga ekstrak metanol daun jambu biji menunjukkan bahwa sampel tidak mengandung senyawa alkaloid, hal ini sesuai dengan penelitian yang dilakukan oleh (Febryana, 2020) yang mendapatkan hasil negatif.

2) Uji flavonoid

Uji flavonoid dilakukan dengan mereaksikan antara ekstrak dengan serbuk Mg dan HCL 2N, dalam proses ini, serbuk Mg dan HCL digunakan sebagai pemutus ikatan antara glikosida dan flavonoid yang menyebabkan terbentuknya garam flavium berwarna merah, jingga hingga kuning (Parbuntari et al., 2018). Hasil pengujian flavonoid pada sampel membentuk warna merah yang menandakan ekstrak mengandung senyawa flavonoid. Hasil ini sejalan dengan

penelitian yang dilakukan sebelumnya oleh Harahap & Nurbaity Situmorang (2021) yang memperoleh hasil positif flavonoid. Hasil yang didapatkan dalam uji senyawa flavonoid ini menunjukkan bahwa ketiga ekstrak metanol daun jambu biji positif mengandung senyawa flavonoid yang ditandai dengan adanya perubahan warna merah.

3) Uji saponin

Pada pengujian kandungan saponin, dilakukan dengan langkah sejumlah ekstrak dimasukkan ke dalam tabung reaksi, kemudian ditambahkan sebanyak 10 mL akuades panas, kemudian setelah cukup dingin, campuran dikocok kuat selama 10 detik. Sampel dikatakan positif mengandung saponin jika terbentuk buih setinggi 1 cm tidak kurang 10 menit dan pada penambahan 1 tetes HCl 2 N, buih tidak hilang. Pada hasil penelitian, didapatkan busa setinggi > 1 cm dan buih tidak hilang ketika ditetesi dengan HCl 2N, sehingga dapat dikatakan bahwa ketiga sampel ekstrak metanol daun jambu positif mengandung senyawa saponin, dan sejalan dengan penelitian yang dilakukan oleh (Febryana, 2020).

4) Uji steroid & triterpenoid

Pada pengujian steroid & triterpenoid, sejumlah ekstrak direaksikan dengan CH_3COOH glasial dan asam sulfat pekat hingga terjadi perubahan warna menjadi merah atau hijau, jika berwarna merah menandakan mengandung terpenoid sedangkan jika berwarna hijau positif mengandung steroid. Ketiga ekstrak menghasilkan positif mengandung steroid yang terbukti dengan perubahan warna menjadi hijau (Habibi et al., 2018).

5) Uji tannin

Uji tanin pada penelitian ini dilakukan dengan langkah mereaksikan sejumlah ekstrak dengan FeCl_3 sehingga terjadi perubahan warna menjadi hijau kebiruan, terjadinya reaksi ini karena adanya gugus fenol dalam daun jambu biji yang bereaksi dengan FeCl_3 sehingga akan terjadi perubahan warna menjadi biru atau hijau

kebiruan, dimana didapatkan hasil bahwa setelah direaksikan terbentuk warna hijau kebiruan pekat atau biru pekat sehingga dapat dikatakan bahwa daun jambu biji mengandung senyawa tanin (Muthmainnah, 2017).

Tabel 6. Hasil skrining fitokimia

| Senyawa aktif | Hasil ekstrak | | | Keterangan |
|------------------------|---------------|-------------|--------------|-----------------------------------|
| | Metanol 25% | Metanol 50% | Metanol 100% | |
| Alkaloid | | | | |
| - Mayer | - | - | - | Tidak terdapat endapan putih |
| - Wagner | + | + | + | Terdapat endapan coklat kehitaman |
| - Dragendorf | - | - | - | Tidak terdapat endapan merah bata |
| Flavonoid | + | ++ | +++ | Terbentuk warna merah |
| Saponin | ++ | + | ++ | Terbentuk busa stabil >1cm |
| Steroid & Triterpenoid | + | ++ | +++ | Terbentuk warna hijau |
| Tannin | +++ | +++ | +++ | Terbentuk warna hijau kebiruan |

Keterangan:

(+) : Lemah

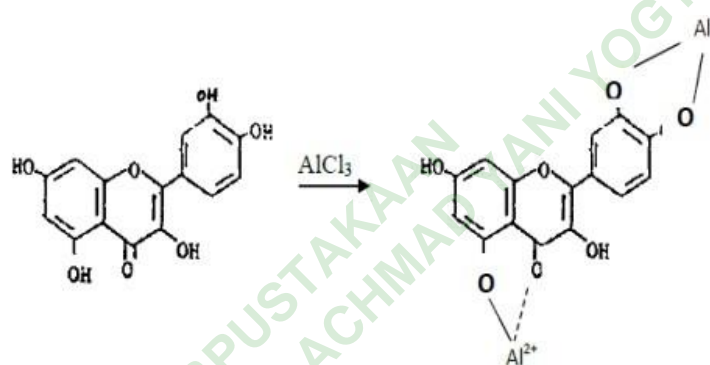
(++) : Sedang

(+++): Kuat

3. Penetapan kadar flavonoid total

Analisis kuantitatif terkait kadar flavonoid total, dilakukan dengan menggunakan metode kolorimetri menggunakan spektrofotometer UV-Visibel. Kolorimetri adalah suatu metode yang banyak digunakan sebagai cara penetapan kadar flavonoid yaitu menggunakan $AlCl_3$ sebagai pereaksi. Pada uji ini, terjadi

kompleks tahan asam antara gugus hidroksil dan keton yang bertetangga dengan pereaksi AlCl_3 dan membentuk kompleks tidak tahan asam dengan gugus orto hidroksi pada flavonoid. Oleh karena itu, pereaksi AlCl_3 digunakan untuk mendeteksi kedua gugus tersebut (D. Y. Sari et al., 2021). Pada penetapan kadar flavonoid total, kuersetin digunakan sebagai standar kurva baku sehingga kadar total flavonoid yang diperoleh dihitung sebagai kuersetin, karena kuersetin termasuk senyawa flavonoid yang paling banyak terdapat pada tumbuhan (Chotimah, 2019). Reaksi pembentukan senyawa kompleks AlCl_3 dengan kuersetin dapat dilihat pada gambar 5.



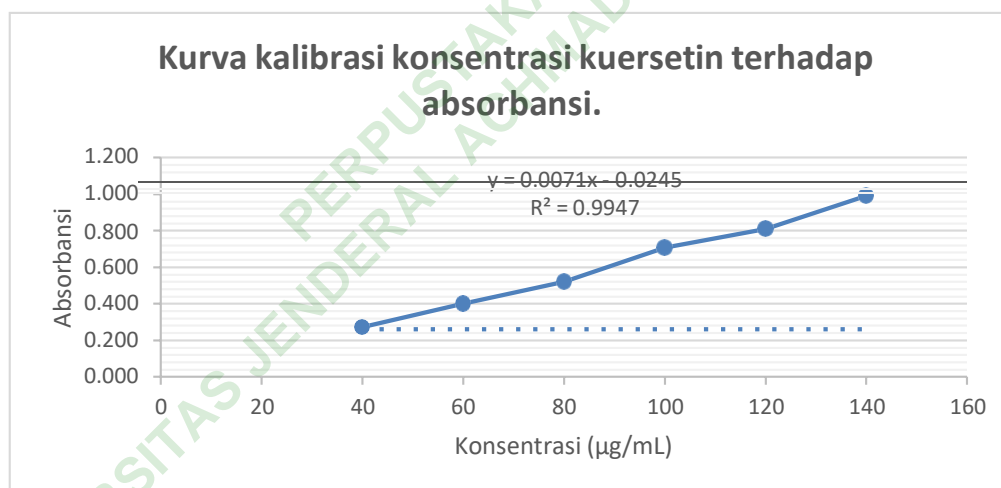
Gambar 5. Reaksi pembentukan senyawa kompleks AlCl_3 dengan kuersetin (Azizah,dkk. 2014)

Pada pengujian kadar total flavonoid, direaksikan antara sampel sejumlah 1 ml dengan AlCl_3 10% sebanyak 1 ml dan CH_3COOH 5% sebanyak 8 ml. Senyawa kompleks yang terbentuk, memerlukan waktu untuk bereaksi dengan senyawa sampai terbentuk warna yang stabil, sehingga diperlukan tahapan penentuan *operating time* untuk mendapatkan rentang waktu pada saat absorbansi kompleks antara kuersetin dengan aluminium klorida (AlCl_3) yang telah stabil. Penentuan *operating time* dilakukan menggunakan larutan standar dengan konsentrasi 1000 ppm kemudian diukur pada spektrofotometri pada panjang gelombang maksimum (350-450 nm) dengan interval pengukuran setiap 5 menit hingga diperoleh absorbansi yang stabil. Hasil *operating time* diperoleh nilai absorbansi yang stabil pada menit ke 35 dengan nilai absorbansi sebesar 0,185 (Lampiran 6).

Penentuan kadar flavonoid total dilakukan pada rentang panjang gelombang maksimal 350 - 450 nm, dimana pada penelitian ini didapatkan hasil panjang

gelombang 415 nm, yang selanjutnya digunakan untuk mengukur absorbansi dari deret baku larutan kuersetin dan juga sampel. Penentuan panjang gelombang maksimum bertujuan sebagai penentuan panjang gelombang pengukuran dimana kompleks antara kuersetin dengan $AlCl_3$ menghasilkan absorbansi yang optimal. Pengukuran pada panjang gelombang maksimum akan memberikan perubahan absorbansi terbesar untuk setiap satuan kadar, sehingga jika akan dilakukan pengukuran ulang dan replikasi akan dapat meminimalisir adanya kesalahan dalam pengukuran (Suharyanto & Prima, 2020).

Kandungan flavonoid total pada ekstrak metanol daun jambu biji berdasarkan pada kurva absorbansi dari larutan standar kuersetin. Pembuatan kurva kalibrasi kuersetin dilakukan dengan enam seri konsentrasi yaitu 40, 60, 80, 100, 120, 140 ($\mu\text{g/mL}$). Hasil kurva kalibrasi konsentrasi terhadap absorbansi kuersetin dapat dilihat pada gambar 6.



Gambar 6. Kurva kalibrasi konsentrasi kuersetin terhadap purata absorbansi

Nilai koefisien korelasi (r) menunjukkan adanya hubungan yang linear antara konsentrasi dengan absorbansi. Pada penelitian ini diperoleh nilai r sebesar 0,9947 yang dapat dikatakan linier karena hasilnya mendekati satu. Dari hasil kurva baku, diperoleh persamaan regresi yaitu $y = 0.0071x - 0.0245$ yang selanjutnya dipergunakan untuk menghitung nilai kadar flavonoid total dari sampel uji. Untuk menghitung kadar total flavonoid, dimasukkan nilai absorbansi sampel yang telah didapatkan kedalam persamaan garis linear $y = 0.0071x - 0.0245$ dengan koefisien korelasi korelasi (r) 0.9947, selanjutnya diaplikasikan ke dalam rumus yaitu kadar

terhitung (mg/mL) dikali volume (mL) dibagi berat sampel (gram). Berdasarkan rumus perhitungan tersebut, maka didapatkan hasil kadar flavonoid total ekstrak metanol daun jambu biji (konsentrasi metanol 25%) sebesar $0,583 \pm 0,008$ (% b/b). Kemudian untuk ekstrak metanol daun jambu biji (konsentrasi metanol 50%) dihasilkan kadar flavonoid total sebesar $1,245 \pm 0,004$ (% b/b). Untuk kadar flavonoid total ekstrak metanol daun jambu biji (konsentrasi metanol 100%) sebesar $4,106 \pm 0,005$ (% b/b). Berdasarkan hasil tersebut, diketahui bahwa ekstrak metanol kadar flavonoid total terbesar hingga terendah berturut-turut dihasilkan oleh ekstrak metanol dengan variasi konsentrasi 100%, 50% dan 25%. Hal ini sesuai dengan penelitian yang dilakukan oleh (F. Sari et al., 2021), bahwa daun jambu biji mengandung adanya flavonoid total.

4. Uji peredaman radikal metode DPPH

Pada metode DPPH, penurunan absorbansi larutan DPPH pada panjang gelombang maksimum menunjukkan adanya penangkapan radikal bebas oleh suatu senyawa. Penurunan absorbansi DPPH disebabkan oleh kemampuan senyawa untuk menangkap radikal bebas sehingga senyawa radikal menjadi lebih sedikit. Selain itu, perubahan warna yang terjadi juga mengindikasikan bahwa suatu sampel memiliki aktivitas antioksidan, yaitu apabila DPPH ditambahkan dengan senyawa yang bersifat antioksidan, maka warna ungu yang pekat dari DPPH akan berubah menjadi ungu pucat. Pembuatan larutan DPPH dengan konsentrasi 0,1 mM diawali dengan penimbangan sebanyak 3,9 mg serbuk DPPH, selanjutnya serbuk dilakukan pelarutan dengan metanol ad 100 ml. Pemilihan metanol sebagai pelarut dikarenakan serbuk DPPH mudah larut dengan pelarut polar seperti metanol. Pembuatan larutan induk DPPH diwajibkan untuk dilakukan di tempat yang kedap cahaya yang dapat dilakukan dengan cara labu ukur yang akan digunakan terlebih dahulu dilapisi dengan aluminium foil, sehingga larutan terhindar dari cahaya luar, sebab jika terkena cahaya maka kemungkinan larutan DPPH akan mudah rusak dan menjadi tidak stabil. Kemudian, langkah selanjutnya dilakukan skrining panjang gelombang larutan DPPH dari 400-600 nm, berdasarkan hasil skrining diperoleh bahwa panjang gelombang maksimum DPPH adalah 516 nm, hal ini sejalan dengan penelitian yang dilakukan Amin dkk., (2013), bahwa panjang gelombang

maksimum DPPH adalah 516 nm. Pengukuran panjang gelombang maksimum dimaksudkan untuk mengetahui serapan maksimum DPPH, karena jika dianalisis dengan panjang gelombang maksimum, maka akan meningkatkan kepekaan terhadap hasil absorbansi yang diperoleh. Setelah diperoleh panjang gelombang maksimum kemudian dilakukan *operating time* dengan cara dilihat nilai absorbansi dengan interval 5 menit selama 40 menit, DPPH stabil pada menit ke 25, hal ini sesuai penelitian Hidayati,dkk (2017) bahwa *operating time* DPPH adalah selama 25 menit. *Operating time* bertujuan untuk mendapatkan waktu yang tepat untuk dilakukan pengukuran absorbansi, dimana pada waktu tersebut telah terjadi reaksi yang optimal (Hidayati et al., 2017).

Pada penelitian ini, menggunakan vitamin C sebagai pembanding antioksidan, sedangkan ekstrak metanol daun jambu biji berperan sebagai sampel antioksidan alami. Standar vitamin C dibuat 10 ppm, 20 ppm, 30 ppm, 40 ppm, 50 ppm dengan induk 100 ppm yang dibuat dengan cara menimbang 2,5 mg vitamin C dan dilarutkan dalam labu ukur 25 mL dengan metanol pa sampai tanda batas pada labu. Selanjutnya vitamin C direaksikan dengan DPPH dengan cara diambil 0,2 ml setiap seri konsentrasi dan ditambahkan 3,8 ml larutan DPPH 0,1 mM, kemudian diinkubasi selama 25 menit dan dihitung serapannya pada spektrofotometri UV-Vis dengan panjang gelombang 516 nm. Selama pengerjaan, semua tabung dan gelas ukur ditutup dengan alumunium foil agar terhindar dari cahaya untuk menghindari terjadinya kerusakan. Setelah di peroleh nilai absorbansi kemudian dihitung nilai % inhibisi dan dibuat persamaan regresi liniernya dengan cara memasukkan konsentrasi sebagai x dan % inhibisi sebagai y. Persamaan regresi linier yang diperoleh dari data vitamin C adalah $y = 1.2573x + 2.8352$ dan $r = 0,9968$. Metode ini menggunakan IC_{50} sebagai parameter aktivitas antioksidan karena untuk menentukan konsentrasi senyawa antioksidan yang mampu menghambat 50% oksidasi. Nilai IC_{50} berbanding terbalik dengan aktivitas antioksidan, dimana semakin kecil nilai IC_{50} , maka semakin tinggi aktivitas antioksidannya (Lung & Destiani, 2018). Nilai IC_{50} diperoleh dengan substitusi nilai y dengan angka 50, sehingga diperoleh nilai IC_{50} vitamin C sebesar 36,681 $\mu\text{g}/\text{ml}$, dimana termasuk kedalam golongan antioksidan sangat kuat ($IC_{50} < 50 \mu\text{g}/\text{ml}$).

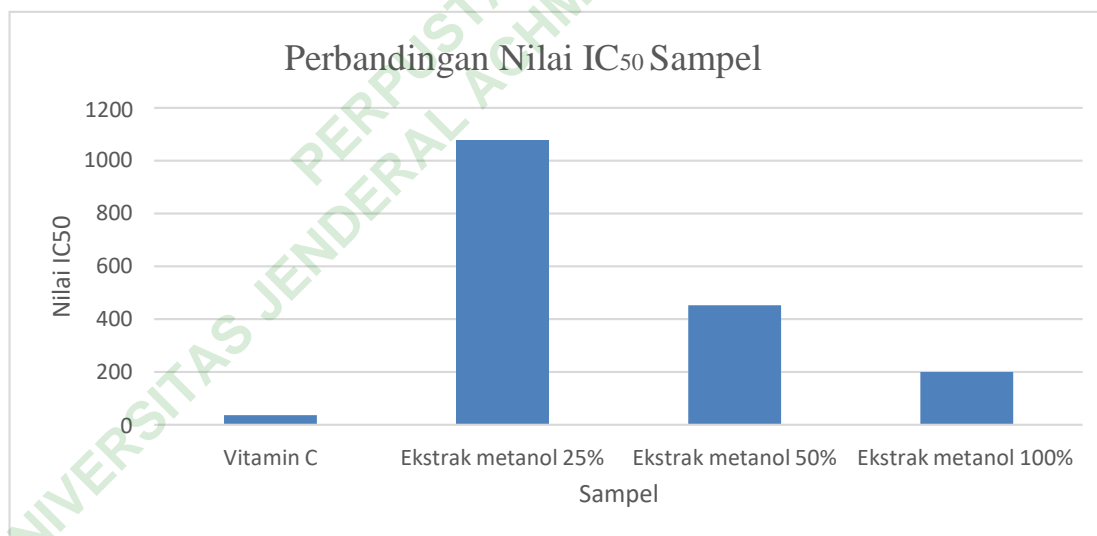
Selanjutnya, pada pengujian antioksidan sampel pada DPPH, ketiga memiliki konsentrasi yang berbeda-beda. Setiap seri konsentrasi direaksikan dengan DPPH dengan cara diambil sebanyak 0,2 ml dan dicampur dengan 3,8 ml larutan DPPH 0,1 mM, dihomogenkan dan diinkubasi selama 25 menit kemudian dibaca serapannya menggunakan Spektrofotometri UV-Vis pada panjang gelombang 516 nm. Untuk sampel ekstrak metanol 25% daun jambu biji, dibuat konsentrasi 250 ppm, 500 ppm, 750 ppm, 1000 ppm, dan 1250 ppm. Pengujian dilakukan 3 kali replikasi, dan hasil rata-rata untuk nilai IC_{50} pada ekstrak metanol 25% daun jambu biji adalah sebesar 1077,213 $\mu\text{g}/\text{ml}$, dimana pada ekstrak ini termasuk dalam kategori antioksidan sangat lemah. Selanjutnya dilakukan pengujian aktivitas antioksidan pada ekstrak metanol 50% daun jambu biji. Untuk sampel ekstrak metanol 50% daun jambu biji, dibuat konsentrasi 100 ppm, 200 ppm, 300 ppm, 400 ppm, dan 500 ppm. Pengujian dilakukan 3 kali replikasi, dan hasil rata-rata untuk nilai IC_{50} pada ekstrak metanol 50% daun jambu biji adalah sebesar 452,708 $\mu\text{g}/\text{ml}$, dimana pada ekstrak ini termasuk dalam kategori antioksidan sangat lemah. Kemudian dilakukan pengujian aktivitas antioksidan pada ekstrak metanol 100% daun jambu biji. Untuk sampel ekstrak metanol 100% daun jambu biji, dibuat konsentrasi 50 ppm, 100 ppm, 150 ppm, 200 ppm, dan 250 ppm. Pengujian dilakukan 3 kali replikasi, dan hasil rata-rata untuk nilai IC_{50} pada ekstrak metanol 100% daun jambu biji adalah sebesar 198,929 $\mu\text{g}/\text{ml}$, dimana pada ekstrak ini termasuk dalam kategori antioksidan lemah. Berdasarkan hasil perolehan nilai IC_{50} tersebut, dapat dikatakan bahwa aktivitas antioksidan pada vitamin C lebih tinggi dibandingkan ekstrak. Hal ini dikarenakan vitamin C adalah senyawa murni dari hasil isolasi yang memiliki aktivitas antioksidan sangat kuat, sedangkan ekstrak masih bercampur dengan senyawa lain yang kemungkinan memiliki khasiat yang bermacam-macam. Semakin tinggi konsentrasi, maka semakin rendah absorbansinya. Hal ini dikarenakan semakin tinggi konsentrasi ekstrak, maka semakin tinggi pula kandungan zat antioksidannya, sehingga semakin banyak DPPH yang akan dihambat oleh ekstrak tersebut dan semakin sedikit DPPH yang tersisa (Fitriani et al., 2019). Hasil nilai IC_{50} pada penelitian ini dapat dilihat pada tabel 7.

Tabel 7. Hasil IC₅₀ vitamin C dan sampel ekstrak

| Sampel | IC ₅₀ | Kategori antioksidan |
|----------------------|------------------|----------------------|
| Vitamin C | 36,681 ± 0,761 | Sangat kuat |
| Ekstrak metanol 25% | 1077,213 ± 4,570 | Sangat lemah |
| Ekstrak metanol 50% | 452,708 ± 2,326 | Sangat lemah |
| Ekstrak metanol 100% | 198,929 ± 2,086 | Lemah |

Keterangan: Nilai dinyatakan sebagai IC₅₀ ± SD

Berdasarkan tabel 7, dapat dilihat bahwa vitamin C tergolong kedalam kategori antioksidan kuat sebab memiliki nilai IC₅₀ <50 µg/ ml. Untuk ekstrak metanol daun jambu biji dengan konsentrasi metanol 25%, 50% tergolong antioksidan sangat lemah karena memiliki nilai IC₅₀ >200 µg/ ml, sedangkan ekstrak metanol daun jambu biji dengan konsentrasi pelarut metanol murni (100%) termasuk antioksidan lemah karena memiliki nilai IC₅₀ berada dalam rentang 150-200 µg/ ml. Grafik perbandingan nilai IC₅₀ antar sampel dapat dilihat pada gambar 10.

**Gambar 7. Perbandingan nilai IC₅₀ antar sampel**

Berdasarkan hasil yang diperoleh pada penelitian ini, maka menunjukkan bahwa adanya variasi konsentrasi pelarut metanol saat maserasi berpengaruh terhadap kadar flavonoid total dan aktivitas antioksidan pada sampel daun jambu biji.

5. Uji statistika

a. Uji statistika kadar flavonoid total

Keseluruhan data kadar flavonoid total dalam penelitian ini dianalisis secara statistik menggunakan bantuan software SPSS versi 27 dengan uji One Way ANOVA. Uji yang pertama dilakukan adalah uji distribusi untuk mengetahui apakah data pada sampel terdistribusi normal atau tidak menggunakan uji Shapiro-Wilk, dimana data dikatakan terdistribusi normal apabila memiliki nilai $\text{sig} > 0,05$. Pada hasil uji normalitas kadar flavonoid total ketiga sampel (ekstrak metanol 25% daun jambu biji, ekstrak metanol 50% daun jambu biji, ekstrak metanol 100% daun jambu biji) menunjukkan nilai $\text{sig} > 0,05$ sehingga data dapat dikatakan terdistribusi normal. Pengujian selanjutnya yaitu uji homogenitas menggunakan uji Levene. Uji homogenitas digunakan untuk mengetahui apakah beberapa jenis populasi yang digunakan adalah sama atau tidak. Suatu data dikatakan homogen apabila memiliki nilai $\text{sig} > 0,05$. Pada hasil uji statistik Levene's, didapatkan nilai signifikansi 0,272 untuk ketiga sampel yang berarti dapat dikatakan bahwa data tersebut homogen. Pengujian berikutnya adalah uji One Way ANOVA, yang bertujuan untuk mengetahui perbedaan pada ketiga sampel apakah berbeda signifikan atau tidak. One Way ANOVA dilakukan sebab jumlah sampel yang akan diuji lebih dari 2 kelompok sampel. One Way ANOVA dikatakan berbeda signifikan antar sampel apabila memiliki nilai $\text{sig} < 0,05$. Hasil yang diperoleh pada uji One Way ANOVA untuk ketiga sampel menunjukkan bahwa terdapat perbedaan yang signifikan antar sampel yang ditandai dengan nilai signifikansinya sebesar $< 0,001$. Data uji statistika ketiga sampel dapat dilihat pada tabel 8.

Tabel 8. Data Uji Statistika Kadar Flavonoid Total Pada Sampel

| Sampel | Uji Normalitas Data | Uji Homogenitas Varian | One way ANOVA | Uji Post Hoc Test |
|----------------------------|------------------------|------------------------------|------------------|----------------------|
| Ekstrak metanol 25% | | | | **** 0,583 |
| Ekstrak metanol 50% | * <0,055 | ** 0,272 | *** <0,001 | **** 1,244 |
| Ekstrak metanol 100% | | | | **** 4,105 |

Keterangan:

(*) : Data terdistribusi normal

(**) : Data terdistribusi homogen

(***) : Semua kelompok berbeda signifikan

(****): Terdapat perbedaan signifikan antar sampel

Hasil yang didapatkan adalah adanya pengaruh yang signifikan antar konsentrasi pelarut pada ekstrak metanol daun jambu biji dengan kadar total flavonoid, selanjutnya dilakukan uji lanjutan untuk mengetahui apakah adanya perbedaan yang lebih spesifik antara konsentrasi pelarut pada sampel dengan kadar total flavonoid. Metode yang digunakan adalah Post Hoc Test sebagai uji pembandingan ganda (*Multiple Comparison*) menggunakan uji Tukey. Dalam uji post hoc test, antar sampel dikatakan berbeda signifikan apabila diperoleh nilai berada pada kolom yang berbeda, sedangkan hasil dikatakan tidak berbeda signifikan (sama), apabila nilai yang didapatkan berada pada kolom yang sama. Pada penelitian ini, dalam uji post hoc test menunjukkan bahwa sampel memiliki perbedaan signifikan karena antar nilai berada dalam kolom yang berbeda. Hasil uji post hoc test dapat dilihat pada lampiran 11.

b. Uji statistika antioksidan

Seluruh data hasil perhitungan nilai IC_{50} dalam penelitian ini dianalisis secara statistik menggunakan aplikasi SPSS versi 27 dengan uji One Way ANOVA. Uji distribusi data dilakukan terlebih dahulu untuk mengetahui apakah data pada sampel terdistribusi normal atau tidak, menggunakan Shapiro-Wilk. Dalam uji Shapiro-Wilk, data dikatakan terdistribusi normal apabila memiliki nilai $sig > 0,05$. Pada hasil uji normalitas kadar flavonoid total keempat sampel (vitamin C, ekstrak metanol 25% daun jambu biji, ekstrak metanol 50% daun jambu biji, ekstrak metanol 100% daun jambu biji) menunjukkan nilai $sig > 0,05$ sehingga data dapat dikatakan terdistribusi normal. Pengujian selanjutnya yaitu uji homogenitas menggunakan uji Levene. Uji homogenitas digunakan untuk mengetahui apakah beberapa varian populasi adalah sama atau tidak. Data dapat dikatakan homogen apabila memiliki nilai $sig > 0,05$. Pada hasil uji statistik Levene's, didapatkan nilai $sig 0,066$ untuk keempat sampel yang berarti dapat dikatakan bahwa data tersebut homogen. Selanjutnya dilakukan uji statistik dengan menggunakan One Way Anova yang bertujuan untuk mengetahui perbedaan pada ketiga sampel apakah berbeda signifikan atau tidak. Dilakukan menggunakan uji One Way ANOVA karena jumlah sampel yang akan diuji lebih dari 2 kelompok sampel. OneWay ANOVA dikatakan berbeda signifikan antar sampel apabila memiliki nilai $sig < 0,05$. Hasil yang diperoleh pada uji One Way ANOVA untuk ketiga sampel menunjukkan bahwa terdapat perbedaan. yang signifikan antar sampel yang ditandai dengan nilai signifikansinya sebesar $< 0,001$. Data uji statistik ketiga sampel dapat dilihat pada tabel 9.

Tabel 9. Data Uji Statistika Antioksidan Pada Sampel

| Sampel | Uji Normalitas Data | Uji Homogenitas Varian | One way ANOVA | Uji Post Hoc Test |
|----------------------|---------------------|------------------------|---------------|-------------------|
| Vitamin C | | | | **** 36,681 |
| Ekstrak metanol 25% | * | ** | *** | **** 198,929 |
| Ekstrak metanol 50% | <0,055 | 0,066 | <0,001 | **** 452,707 |
| Ekstrak metanol 100% | | | | **** 1077,213 |

Keterangan:

(*) : Data terdistribusi normal

(**) : Data terdistribusi homogen

(***) : Semua kelompok berbeda signifikan

(****): Terdapat perbedaan signifikan antar sampel

Pada penelitian ini, didapatkan hasil bahwa terdapat pengaruh yang signifikan antar konsentrasi pelarut pada ekstrak metanol daun jambu biji dengan aktivitas antioksidan, maka dilakukan uji lanjutan untuk mengetahui apakah adanya perbedaan yang lebih spesifik antara konsentrasi pelarut pada sampel dengan aktivitas antioksidan. Metode yang digunakan adalah Post Hoc Test sebagai uji pembandingan ganda (*Multiple Comparison*) menggunakan uji Tukey. Dalam uji post hoc test, antar sampel dikatakan berbeda signifikan apabila diperoleh nilai berada pada kolom yang berbeda, sedangkan hasil dikatakan tidak berbeda signifikan (sama), apabila nilai yang didapatkan berada pada kolom yang sama. Pada penelitian ini, dalam uji post hoc test menunjukkan bahwa antar sampel memiliki perbedaan signifikan karena antar nilai berada dalam kolom yang berbeda. Hasil uji post hoc test dapat dilihat pada lampiran 12.

B. Pembahasan

Penelitian pengaruh variasi konsentrasi pelarut pada saat maserasi terhadap aktivitas antioksidan ekstrak metanol daun jambu biji menggunakan metode DPPH ini termasuk dalam jenis penelitian eksperimental laboratorium dengan tujuan untuk mengetahui apakah terdapat pengaruh variasi konsentrasi pelarut metanol pada saat maserasi terhadap aktivitas antioksidan dan profil senyawa fitokimia yang terkandung dalam ekstrak metanol daun jambu biji. Tahap awal dilakukannya penelitian ini adalah dengan melakukan determinasi tanaman. Determinasi tanaman adalah tahap untuk perbandingan suatu tanaman dengan tanaman yang telah dikenal sebelumnya, yang bertujuan untuk memastikan kebenaran dan keaslian identitas tanaman yang akan digunakan dalam penelitian, sehingga dapat dihindari adanya kesalahan pengambilan sampel yang akan diteliti (Diniatik, 2015). Berdasarkan hasil determinasi, dapat dibuktikan bahwa tanaman yang digunakan dalam penelitian adalah daun jambu biji (*Psidium guajava* L.).

Proses penarikan senyawa aktif pada sampel diperlukan proses ekstraksi. Metode ekstraksi pada penelitian ini adalah metode maserasi dengan menggunakan pelarut metanol. Metode maserasi dipilih karena tidak menggunakan suhu yang tinggi sehingga dapat meminimalisir kerusakan ekstrak yang disebabkan karena pemanasan (Susanty & Bachmid, 2016). Mekanisme maserasi yaitu terjadi difusi pelarut metanol ke rongga sel dinding sampel sehingga zat aktif akan larut dan dikarenakan adanya perbedaan konsentrasi antara di luar sel dengan di dalam sel maka zat aktif di dalam sel akan terdesak ke luar. Penggunaan metanol sebagai pelarut dikarenakan pelarut ini baik dalam melarutkan senyawa polar maupun non-polar sehingga sangat cocok untuk menarik senyawa metabolit sekunder yang terkandung pada sampel (Muaja et al., 2017) serta metanol memiliki sifat kepolaran yang sama dengan senyawa yang akan diambil dalam sampel daun jambu biji yaitu senyawa flavonoid, sehingga diharapkan senyawa flavonoid yang terkandung dalam daun jambu biji akan tertarik sempurna dengan pelarut metanol.

Hasil dari proses maserasi adalah berupa ekstrak kental, dimana pada penelitian ini didapatkan hasil rendemen ekstrak berurutan dari yang terbanyak sampai paling sedikit yaitu diperoleh dari ekstrak metanol 100%, 50%, kemudian

25%, hal ini sejalan dengan teori *like dissolve like* bahwa suatu pelarut akan melarutkan senyawa yang memiliki tingkat kepolaran yang sama, dimana pelarut polar akan melarutkan senyawa polar, begitu pula sebaliknya. Hasil ekstrak kental kemudian diuji kualitatif terkait kandungan senyawa aktif yang diduga berperan sebagai antioksidan, yaitu senyawa flavonoid. Pada uji kualitatif flavonoid, hasil dinyatakan dalam tingkatan intensitas warna. Pada pengujian kandungan flavonoid, hasil dikatakan positif apabila pada sampel terjadi perubahan warna menjadi larutan merah. Intensitas warna merah paling kuat berurutan yaitu diperoleh dari ekstrak metanol 100%, disusul oleh ekstrak metanol 50%, kemudian ekstrak metanol 25%. Hal ini dapat dikatakan bahwa semakin tinggi intensitas warna pada pengujian flavonoid, maka kandungan flavonoid dalam sampel akan semakin tinggi.

Sebagai pendukung data kualitatif terkait kandungan senyawa flavonoid pada daun jambu biji, dilakukan uji kuantitatif pada sampel yaitu dilakukan penentuan kadar flavonoid total yang dinyatakan dalam persen (%). Pada penentuan kadar flavonoid total, didapatkan hasil bahwa ekstrak metanol 100% memiliki kandungan flavonoid total yang lebih tinggi dibandingkan dengan ekstrak metanol 50% dan 25%. Berdasarkan hasil tersebut, dapat dikatakan bahwa konsentrasi pelarut berbanding lurus dengan kadar flavonoid total, dimana semakin tinggi konsentrasi pelarut metanol, maka semakin tinggi juga kadar flavonoid total yang terkandung. Hal ini sejalan dengan uji kualitatif yang dilakukan sebelumnya, bahwa ekstrak metanol 100% lebih banyak mengandung flavonoid daripada konsentrasi 50% dan 25%. Berdasarkan hasil uji flavonoid baik kualitatif maupun kuantitatif, dapat dikatakan bahwa kemungkinan sampel memiliki aktivitas antioksidan yang baik karena adanya kandungan senyawa aktif flavonoid. Flavonoid termasuk dalam kategori senyawa polifenol yang terdiri dari 15 atom karbon utama yang tersusun atas dua cincin benzena yang dihubungkan dengan tiga atom karbon yang juga dapat membentuk cincin pyran. Flavonoid memiliki gugus hidroksil (-OH) sehingga dapat menetralkan radikal bebas dengan cara mendonorkan atom hidrogennya sehingga menjadi molekul non radikal yang stabil (Maanari et al., 2014).

Langkah untuk membuktikan hal tersebut, dilakukan uji aktivitas antioksidan terhadap ketiga sampel menggunakan metode DPPH. Prinsip kerja metode DPPH adalah adanya ikatan antara atom hidrogen dari senyawa antioksidan dengan elektron bebas pada senyawa radikal sehingga menyebabkan radikal bebas berubah menjadi senyawa non-radikal. Hal ini ditandai dengan perubahan warna dari ungu menjadi kuning (senyawa radikal bebas tereduksi oleh adanya antioksidan). Pada penetapan aktivitas antioksidan dengan metode DPPH, digunakan parameter IC_{50} yaitu konsentrasi sampel yang dibutuhkan untuk menangkap radikal DPPH sebanyak 50% (Setiawan et al., 2018). Hasil analisis aktivitas antioksidan pada penelitian ini sebanding dengan hasil kualitatif dan kuantitatif flavonoid, dimana nilai IC_{50} pada sampel paling baik dihasilkan dari ekstrak metanol 100%, 50%, kemudian 25%. Suatu sampel dapat dikatakan memiliki aktivitas antioksidan kuat apabila memiliki nilai IC_{50} kurang dari 50. Namun, hasil yang didapatkan pada ekstrak metanol 100% termasuk dalam kategori antioksidan lemah, karena memiliki nilai IC_{50} yang lebih dari 50, kemudian untuk ekstrak metanol 50% dan 25 % termasuk dalam kategori antioksidan sangat lemah karena memiliki nilai IC_{50} lebih dari 200. Hal ini kemungkinan disebabkan karena proses remaserasi yang dilakukan pada penelitian ini tidak berulang-ulang, melainkan hanya dilakukan 1 kali selama 24 jam sehingga rendemen yang dihasilkan dari ekstrak cukup rendah. Hal ini menyebabkan senyawa bioaktif yang terkandung dalam sampel kurang tertarik dengan sempurna. Menurut penelitian yang dilakukan oleh Ningsih, dkk. (2015), lamanya waktu maserasi dan remaserasi akan dapat mempengaruhi hasil rendemen yang didapatkan sehingga semakin lama waktu maserasi dan remaserasi, maka semakin banyak senyawa aktif yang dapat tertarik.

Selain senyawa flavonoid, dalam daun jambu biji terdapat kandungan senyawa tanin yang dapat berpotensi sebagai antioksidan. Menurut penelitian yang dilakukan oleh Fithriani (2015) tanin berfungsi sebagai antioksidan sekunder, karena tanin memiliki kemampuan mengkelat ion besi dan memperlambat oksidasi. Adanya senyawa tanin dalam sampel daun jambu biji ditunjukkan pada uji kualitatif kandungan tanin, dimana ketiga sampel ekstrak memiliki kandungan tanin sangat

tinggi yang ditandai dengan perubahan warna larutan menjadi hijau kebiruan pekat setelah direaksikan. Berdasarkan hasil uji tersebut, dapat diidentifikasi bahwa kemungkinan sampel memiliki aktivitas antioksidan yang tinggi. Namun, dalam penelitian ini belum dikaji lebih dalam terkait analisa kuantitatif kandungan tanin dalam sampel.

UNIVERSITAS JENDERAL ACHMAD YANI YOGYAKARTA
PERPUSTAKAAN