

BAB IV HASIL DAN PEMBAHASAN

A. Hasil

1. Determinasi tanaman daun jambu biji

Dilakukan determinasi tanaman dengan tujuan untuk mendapatkan kebenaran tanaman yang akan diuji agar terhindar dari kesalahan pengumpulan bahan ataupun tercampurnya tanaman yang diteliti dengan tanaman lain (Klau & Hesturini, 2021). Determinasi tanaman dilakukan di B2P2TOOT Tawangmangu. Penyerahan tanaman untuk dideterminasi yaitu pada tanggal 27 Juni 2024 dengan nomor SK TL.02.04/D.XI.6/14031.839/202 (Lampiran 1). Hasil determinasi menunjukkan sampel yang akan diuji dalam penelitian ini adalah benar tanaman jambu biji (*Psidium guajava* L.).

2. Persiapan sampel

Daun jambu biji yang digunakan pada penelitian diperoleh dari kebun Kalisoro yang ada di Kecamatan Tawangmangu, Kabupaten Karanganyar, Jawa Tengah pada bulan Maret 2025. Daun jambu biji dipanen dan diperoleh sebanyak ± 7 kg. Kemudian, dilakukan sortasi basah dengan mencuci daun jambu biji menggunakan air mengalir. Selanjutnya, dilakukan proses pengeringan dengan menggunakan oven pada suhu 50°C selama 2 hari. Kemudian, daun jambu biji yang sudah kering dihaluskan dan diayak hingga diperoleh serbuk halus daun jambu biji sebesar 600 g.

3. Pembuatan ekstrak dari daun jambu biji

Pada penelitian ini, dilakukan proses ekstraksi menggunakan metode UAE. Rendemen ekstrak yang didapatkan dihitung sebagai persentase perbandingan bobot ekstrak yang dihasilkan terhadap bobot serbuk daun jambu biji yang digunakan saat diekstraksi. Berdasarkan Farmakope Herbal Indonesia yaitu tidak kurang dari 12,3% (Kementrian Kesehatan RI, 2017). Hasil nilai % rendemen menunjukkan bahwa nilai % rendemen ekstrak daun jambu biji pada

ekstrak kental daun jambu biji pada variasi waktu ekstraksi 15, 30, 45, dan 60 menit, dan 75 menit telah memenuhi persyaratan.

Tabel 5. Hasil Rendemen Tiap Variasi Waktu Ekstraksi

Waktu Ekstraksi (menit)	Berat simplisia (g)	Berat wadah + ekstrak (g)	Berat wadah kosong (g)	Berat ekstrak (g)	Rendemen (%)
15	100	98.8	83.1	15.7	15.7
30	100	129.9	115.2	14.7	14.7
45	100	126.5	105.6	20.9	20.9
60	100	97.4	83.1	14.3	14.3
75	100	131.8	115.9	15.9	15.9

4. Uji organoleptik

Dari pengujian yang dilakukan pada ekstrak daun jambu biji didapatkan sifat fisik dari seluruh variasi waktu ekstraksi daun jambu biji pada Tabel 6 yaitu ekstrak daun jambu biji berwarna coklat, berbau khas, dan memiliki tekstur yang kental.

Tabel 6. Hasil Pengujian Organoleptik

Uji	Hasil	Teori (Kementerian Kesehatan RI, 2017)
Warna	Cokelat tua	Cokelat tua
Bau	Khas daun jambu biji	Khas daun jambu biji
Tekstur	Ekstrak kental	Ekstrak kental

5. Penetapan kadar air

Kadar air dalam ekstrak sebaiknya tidak melebihi kadar yang telah disyaratkan yaitu $\leq 10\%$ (Kementerian Kesehatan RI, 2017). Penetapan kadar air ekstrak daun jambu biji seluruh variasi waktu ekstraksi diperoleh sebesar 4.38% - 6,63%. Hasil tersebut menunjukkan bahwa ekstrak tersebut telah memenuhi kadar yang telah dipersyaratkan.

Tabel 7. Hasil Pengujian Kadar Air

Waktu ekstraksi	Hasil kadar air (%)	Teori (Kementerian Kesehatan RI, 2017)	Keterangan
15	6.63		
30	4.38		
45	5.41	$\leq 10\%$	Memenuhi syarat
60	6.56		
75	4.55		

6. Uji penapisan fitokimia

Tabel 8. Hasil Uji Penapisan Fitokimia

Jenis uji	Reagen	Teori (Sari <i>et al.</i> , 2024)	Waktu ekstraksi (menit)				
			15	30	45	60	75
Alkaloid	Mayer	Endapan Putih	+	+	+	+	+
			(Terbentuk endapan putih)	(Terbentuk endapan putih)	(Terbentuk endapan putih)	(Terbentuk endapan putih)	(Terbentuk endapan putih)
	Wagner	Endapan coklat	+	+	+	+	+
			(Terbentuk endapan coklat)	(Terbentuk endapan coklat)	(Terbentuk endapan coklat)	(Terbentuk endapan coklat)	(Terbentuk endapan coklat)
	Dragendorff	Endapan jingga	+	+	+	+	+
			(Terbentuk endapan jingga)	(Terbentuk endapan jingga)	(Terbentuk endapan jingga)	(Terbentuk endapan jingga)	(Terbentuk endapan jingga)
Flavonoid	Serbuk Mg + HCl	Berwarna Merah	++	+	+	+	+
			(Perubahan warna merah)	(Perubahan warna merah)	(Perubahan warna merah)	(Perubahan warna merah)	(Perubahan warna merah)
Saponin	Akuades + HCl 2N	Buih yang stabil	+	+	+	+	+
			(Terbentuk buih yang stabil)	(Terbentuk buih yang stabil)	(Terbentuk buih yang stabil)	(Terbentuk buih yang stabil)	(Terbentuk buih yang stabil)
Tanin	Etanol + FeCl ₃ 1%	Berwarna biru kehitaman	+	+	+	++	++
			(Perubahan biru kehitaman)	(Perubahan biru kehitaman)	(Perubahan biru kehitaman)	(Perubahan biru kehitaman)	(Perubahan biru kehitaman)
Fenolik	FeCl ₃ 1% + Etanol	Berwarna ungu kehitaman	+	+	+	++	+++
			(Perubahan ungu kehitaman)	(Perubahan ungu kehitaman)	(Perubahan ungu kehitaman)	(Perubahan ungu kehitaman)	(Perubahan ungu kehitaman)
Terpenoid	Etanol + Reagen bouchardat	Berwarna jingga kecoklatan	++	+	+	+++	+
			(Perubahan jingga kecoklatan)	(Perubahan jingga kecoklatan)	(Perubahan jingga kecoklatan)	(Perubahan jingga kecoklatan)	(Perubahan jingga kecoklatan)

Keterangan : + = Terjadi perubahan warna larutan
 ++ = Warna pekat pada larutan
 +++ = Warna lebih pekat pada larutan

Pengujian penapisan fitokimia dilakukan untuk mengidentifikasi kandungan senyawa metabolit sekunder pada ekstrak, sehingga dapat menjadi gambaran terkait kandungan zat aktif dalam ekstrak (Arianta *et al.*, 2022). Hasil

pengujian menunjukkan ekstrak daun jambu biji positif mengandung alkaloid, flavonoid, fenolik, tanin, saponin, dan terpenoid. Hasil uji penapisan fitokimia dapat dilihat pada Tabel 8 dan gambar hasil dapat dilihat pada Lampiran 4.

7. Kromatografi Lapis Tipis

a. Identifikasi flavonoid

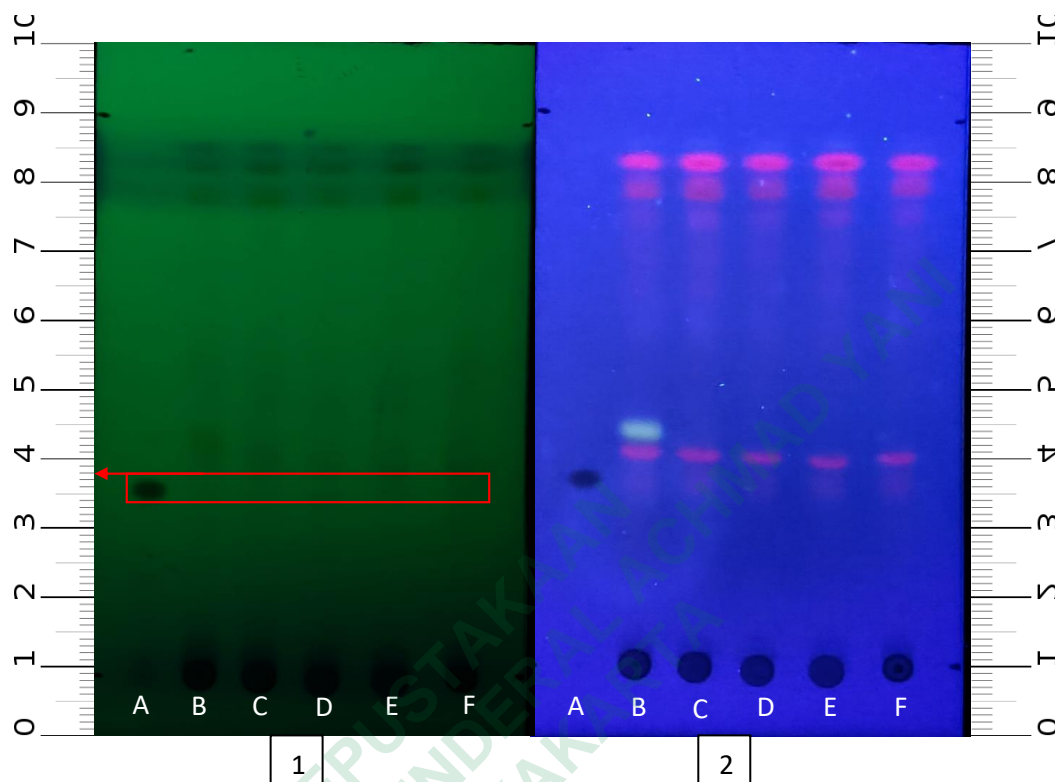
Dilakukan analisis secara kualitatif pada daun jambu biji dengan menggunakan metode Kromatografi Lapis Tipis (KLT). Adanya analisis kualitatif dengan KLT ini bertujuan untuk mengidentifikasi senyawa penanda/standar yaitu kuersetin yang terdapat pada sampel tiap variasi waktu ekstraksi daun jambu biji. Pada uji KLT dilakukan optimasi fase gerak untuk memperoleh fase gerak yang optimal dalam memisahkan senyawa pada campuran. Pada optimasi fase gerak yang dilakukan dapat dilihat pada Tabel 9.

Tabel 9. Hasil Optimasi Fase Gerak Pada KLT Uji Senyawa Flavonoid Jambu Biji

No.	Fase Gerak	Hasil
1.	Toluen: Aseton: Asam Format (6:2:2)	Standar dan sampel terlihat samar namun terjadi tailing pada sampelnya
2.	n-butanol: Asam Asetat Glisial: Akuades (6:2:2)	Sampel terelusi hingga batas atas dan tidak terjadi pemisahan
3.	n-heksan: Etil Asetat: Etanol (1:8:1)	Standar dan sampel hingga batas atas
4.	n-heksan: Etil Asetat: Etanol (3:4:3)	Standar dan sampel terelusi hingga batas atas
5.	Kloroform: Etil Asetat: Metanol: Asam Asetat (7:2:0,5:0,5)	Tidak terjadi elusi pada sampel
6.	n-heksan: Etil Asetat: Asam Format (6:4:0,2)	Standar terelusi dengan baik tetapi sampel terlihat samar namun ada sampel dengan Rf sama seperti standar

Berdasarkan hasil optimasi diperoleh fase gerak yang optimal adalah n-heksan: etil asetat: asam format (6:4:0,2 v/v/v) dengan konsentrasi standar kuersetin yang digunakan adalah 1000 ppm. Hasil uji KLT dengan fase gerak

n-heksan: etil asetat: asam format (6:4:0,2 v/v/v) untuk identifikasi senyawa flavonoid terhadap variasi waktu ekstraksi dapat dilihat pada Gambar 17.



Gambar 17. Profil KLT Variasi Waktu Ekstrak Daun Jambu Biji

Keterangan: (1) Deteksi dengan UV 254 nm, (2) Deteksi dengan UV 365 nm; (A) Kuersetin; (B) Ekstrak menit ke 15; (C) Ekstrak menit ke 30; (D) Ekstrak menit ke 45; (E) Ekstrak menit ke 60; (F) Ekstrak menit ke 75. Fase diam = silika GF₂₅₄; Fase gerak = n-heksan: etil asetat: asam format (6:4:0,2 v/v/v).

Berdasarkan hasil pada Gambar 17, terlihat secara visual terdapat bercak yang sejajar antara sampel dengan standar (kuersetin). Deteksi senyawa ditandai dengan bercak dan didapatkan nilai Rf (Retention factor) yang dapat diamati pada UV 254 dan 365 nm. Berikut adalah hasil perhitungan Rf dari bercak KLT yang tertera pada Tabel 10.

Tabel 10. Hasil Elusi Pada KLT Uji Senyawa Flavonoid

	Rf	UV 254	UV 365
Standar	0,35	Hitam	Hitam
	0,35	Kuning kehitaman	Hitam samar
15 Menit	0,387	Hitam	Merah
	0,450	Hitam	Hijau terang
	0,837	Kuning kehitaman	Merah samar
	0,9	Kuning kehitaman	Merah
	0,937	Hitam	Merah

	Rf	UV 254	UV 365
30 Menit	0,35	Kuning kehitaman	Hitam samar
	0,387	Hitam	Hijau terang
	0,837	Kuning kehitaman	Merah samar
	0,9	Kuning kehitaman	Merah
	0,937	Hitam	Merah
45 Menit	0,35	Kuning kehitaman	Hitam samar
	0,387	Hitam	Hijau terang
	0,837	Kuning kehitaman	Merah samar
	0,9	Kuning kehitaman	Merah
	0,937	Hitam	Merah
60 Menit	0,35	Kuning kehitaman	Hitam samar
	0,387	Hitam	Hijau terang
	0,837	Kuning kehitaman	Merah samar
	0,9	Kuning kehitaman	Merah
	0,937	Hitam	Merah
75 Menit	0,35	Kuning kehitaman	Hitam samar
	0,387	Hitam	Hijau terang
	0,837	Kuning kehitaman	Merah samar
	0,9	Kuning kehitaman	Merah
	0,937	Hitam	Merah

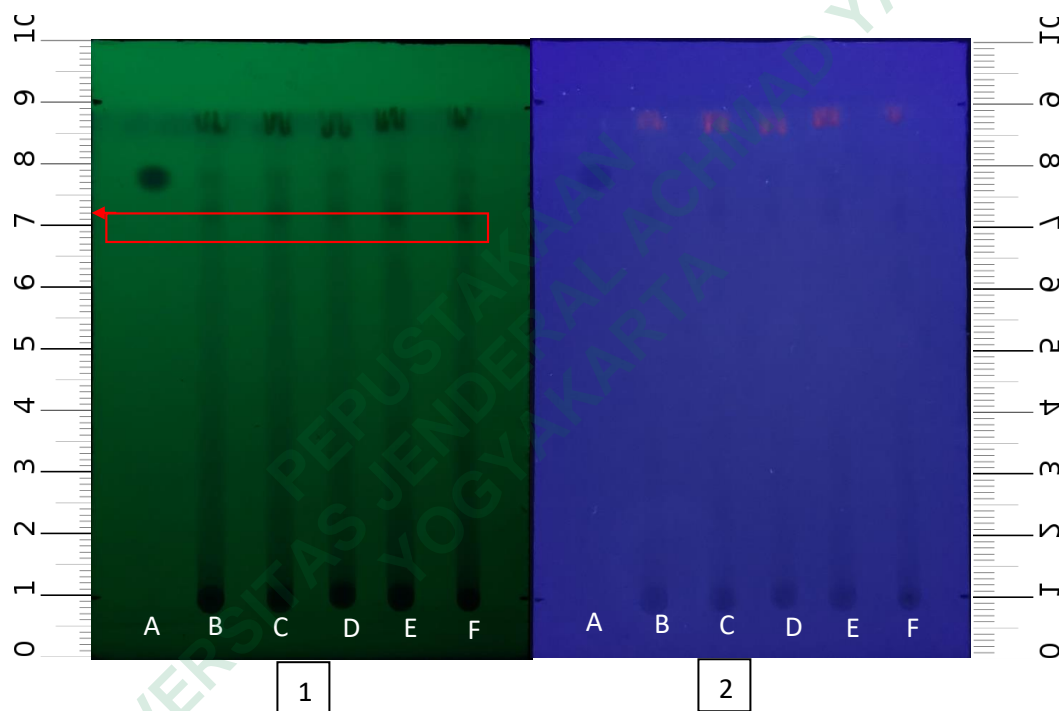
Hasil pengamatan di bawah sinar UV 254 nm menunjukkan bahwa bercak terlihat tipis dan samar kuning kehitaman pada sampel variasi waktu dan standar kuersetin terlihat berwarna hitam dengan nilai Rf 0,35. Sedangkan hasil pengamatan di bawah sinar UV 365 nm menunjukkan bahwa bercak terlihat tipis dan samar kehitaman pada sampel variasi waktu dan standar kuersetin terlihat berwarna hitam dengan nilai Rf 0,35. Hasil uji KLT menunjukkan terdapat bercak dengan nilai Rf yang berbeda dengan standar kuersetin, hal ini menunjukkan terdapat senyawa lain yang memiliki polaritas yang berbeda pada sampel.

b. Identifikasi Fenolik

Pada identifikasi ada tidaknya kandungan senyawa fenolik dapat dilakukan uji KLT. Pada optimasi fase gerak yang dilakukan dapat dilihat pada Tabel 11.

Tabel 11. Hasil Optimasi Fase Gerak Pada KLT Uji Senyawa Fenolik

No.	Fase Gerak	Hasil
1.	n-heksan: Etil Asetat: Etanol (1:8:1)	Terjadi elusi namun standar mengalami tailing
2.	Toluen: Etil Asetat: Asam Format (9:1:0,5)	Tidak terjadi elusi
3.	Kloroform: Etil Asetat: Asam Format (0,1:3,9:1) & (1:3:1)	Terjadi elusi pada standar dan sampel dan terjadi pemisahan yang baik pada kedua rasio pelarut. Namun pada rasio 1:3:1 terdapat senyawa dengan RF sama seperti standar

**Gambar 18. Profil KLT Variasi Waktu Ekstrak Daun Jambu Biji**

Keterangan: (1) Deteksi dengan UV 254 nm, (2) Deteksi dengan UV 365 nm; (A) Asam galat; (B) Ekstrak menit ke 15; (C) Ekstrak menit ke 30; (D) Ekstrak menit ke 45; (E) Ekstrak menit ke 60; (F) Ekstrak menit ke 75. Fase diam = silika GF₂₅₄; Fase gerak = kloroform: etil asetat: asam format (1:3:1 v/v/v).

Berdasarkan hasil optimasi fase gerak diperoleh fase gerak yang optimal adalah kloroform: etil asetat: asam format (1:3:1 v/v/v) dengan asam galat sebagai pembanding sampel berkonsentrasi 1000 ppm. Hasil uji KLT dengan fase gerak kloroform: etil asetat: asam format (1:3:1 v/v/v) untuk identifikasi senyawa fenolik terhadap variasi waktu ekstraksi dapat dilihat pada Gambar 18.

Berdasarkan hasil pada Gambar 18, terlihat secara visual terdapat bercak yang sejajar antara sampel dengan standar (asam galat). Deteksi senyawa ditandai dengan bercak dan didapatkan nilai Rf yang dapat diamati pada UV 254 dan 365 nm. Berikut adalah hasil perhitungan Rf dari bercak KLT yang tertera pada Tabel 12.

Tabel 12. Hasil Elusi Pada KLT Uji Senyawa Fenolik

	Rf	UV 254	UV 365
Standar	0,875	Hitam	Hitam
15	0,8	Hitam	Biru samar
	0,875	Hitam	Biru samar
	0,987	Hitam	Merah terang
30	0,8	Hitam	Biru samar
	0,875	Hitam	Biru samar
	0,987	Hitam	Merah terang
45	0,8	Hitam	Biru samar
	0,875	Hitam	Biru samar
	0,987	Hitam	Merah terang
60	0,8	Hitam	Biru samar
	0,875	Hitam	Biru samar
	0,987	Hitam	Merah terang
75	0,8	Hitam	Biru samar
	0,875	Hitam	Biru samar
	0,987	Hitam	Merah terang

Hasil pengamatan di bawah sinar UV 254 nm menunjukkan bahwa bercak terlihat tipis dan samar berwarna hitam pada sampel variasi waktu ekstraksi sedangkan bercak yang terlihat hitam dan jelas menandakan bercak dari standar asam galat dengan nilai Rf 0,875. Sedangkan hasil pengamatan di bawah sinar UV 365 nm menunjukkan bahwa bercak terlihat tipis dan samar berwarna biru pada sampel variasi waktu ekstraksi sedangkan bercak yang terlihat hitam dan jelas menandakan bercak dari standar asam galat dengan nilai Rf 0,875. Hasil uji KLT menunjukkan terdapat bercak dengan nilai Rf yang berbeda dengan standar asam galat, hal ini menunjukkan terdapat senyawa lain yang memiliki polaritas yang berbeda pada sampel

8. Penetapan kadar flavonoid total

a. Penentuan panjang gelombang kuersetin

Penetapan kadar senyawa diawali dengan menemukan panjang gelombang maksimum. Hal tersebut dikarenakan menurut Kresnadipayana & Lestari., (2017) nilai serapan sampel yang diuji harus berada pada panjang gelombang maksimum atau puncak sehingga didapatkan nilai serapan yang maksimal. Selain itu, faktor dari keadaan preparasi sampel yang berbeda, maka perlu dilakukan penetapan panjang gelombang maksimum pada penelitian ini. Hasil pengukuran panjang gelombang maksimum yang didapatkan adalah 427 nm, dimana hasil tersebut sama dengan penelitian sebelumnya milik Mustofa *et al.*, (2024).

b. Penentuan *operating time* kuersetin

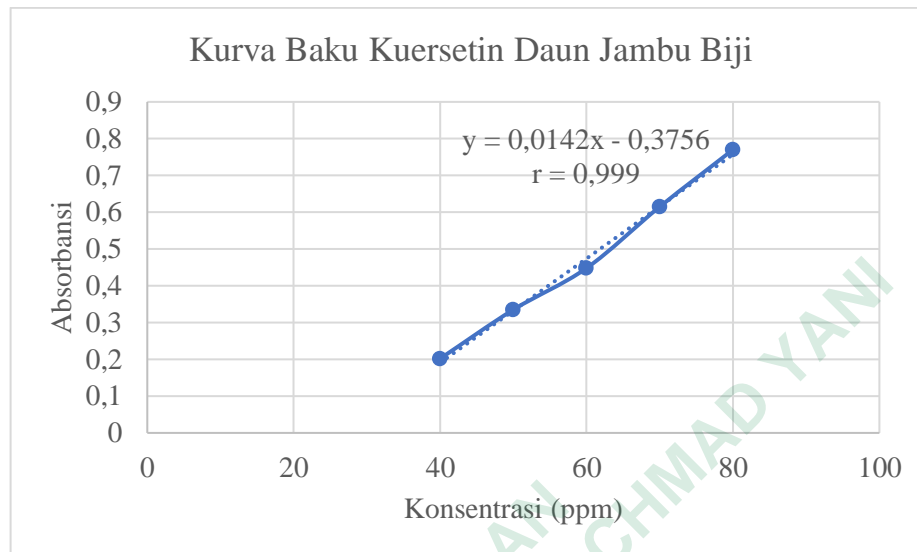
Berdasarkan jurnal milik Suharyanto & Prima., (2020) tujuan dilakukannya *operating time* adalah untuk mengetahui waktu optimal antara kuersetin dengan $AlCl_3$ agar dapat bereaksi membentuk kompleks yang sempurna. Reaksi tersebut di *operating time* pada panjang gelombang 427 nm selama 60 menit. Pada penelitian ini, didapatkan waktu yang optimal untuk larutan tetap stabil yaitu pada waktu ke 33 menit, waktu pengukuran sama dengan penelitian oleh Saputri *et al.*, (2022).

c. Penentuan kurva baku kuersetin

Penentuan kurva baku pada standar kuersetin bertujuan untuk mengetahui hubungan konsentrasi kuersetin dengan nilai absorbansinya sehingga mendapatkan persamaan regresi linear untuk mengukur suatu kadar dari nilai absorbansi yang didapatkan pada spektrofotometer UV-Vis (Saputri *et al.*, 2022). Perhitungan persamaan regresi linear didapatkan dari hubungan antara konsentrasi kuersetin (ppm) dengan absorbansinya. Hasil kurva baku kuersetin dapat diamati pada Gambar 19.

Berdasarkan pada kurva baku kuersetin yang telah dibuat, didapatkan persamaan regresi linear $y = 0,0142x - 0,3756$ dan nilai r sebesar 0,999. Persamaan regresi dari kurva baku kuersetin dapat dilanjutkan untuk

menentukan kadar flavonoid total yang terdapat pada sampel tiap variasi waktu ekstraksi.



Gambar 19. Gambar Kurva Baku Kuersetin

d. Penentuan kadar flavonoid total

Dilakukan penentuan kadar flavonoid total dengan menggunakan spektrofotometer UV-Vis yang bertujuan untuk mendapatkan kadar flavonoid yang terkandung pada sampel tiap variasi waktu ekstraksi. Berdasarkan hasil penentuan kadar flavonoid total yang terkandung dalam sampel variasi waktu tertinggi dihasilkan pada waktu 15 menit, dan dilanjutkan pada menit 75, menit 60, menit 30, dan menit 45 yang dapat dilihat pada Tabel 13.

Tabel 13. Hasil Perhitungan Kadar Flavonoid Total

Sampel Jambu Biji (menit)	Kadar Flavonoid Total (\bar{X} Flavonoid Total (mg QE/g) \pm SD)
15	55,653 \pm 0,388
30	50,441 \pm 0,430
45	44,643 \pm 0,147
60	52,014 \pm 1,164
75	52,812 \pm 0,599

9. Penetapan kadar fenolik total

a. Penentuan panjang gelombang maksimum asam galat

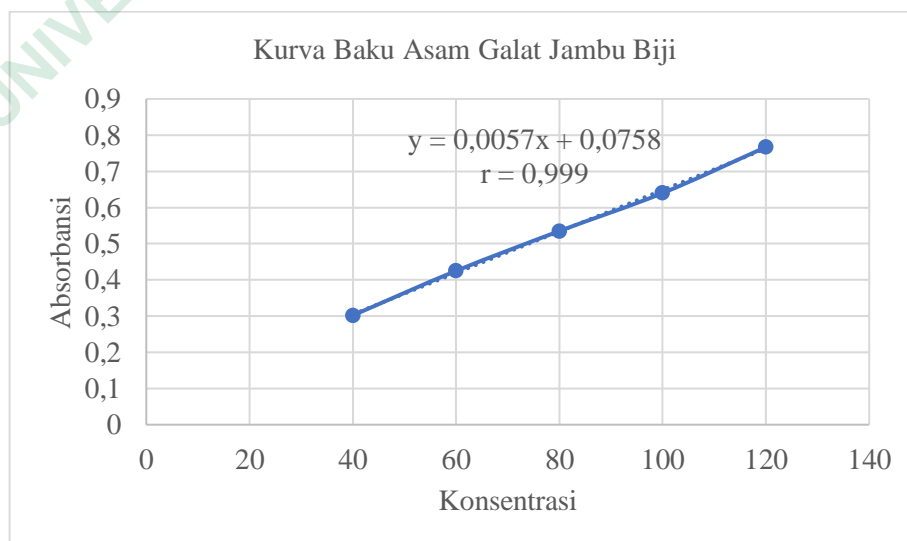
Panjang gelombang maksimum dari standar asam galat 80 ppm discanning panjang gelombangnya pada rentang 600-800 nm dengan spektrofotometer UV-Vis. Panjang gelombang maksimum yang diperoleh pada penelitian ini yaitu 768 nm. Hasil tersebut sama dalam literatur jurnal karya (Najihah *et al.*, 2018)

b. Penentuan *operating time* asam galat

Pada penelitian ini dilakukan *operating time* (OT) untuk mengetahui waktu pengukuran suatu senyawa yang dicari tetap stabil setelah direaksikan. Hasil menunjukkan didapatkan reaksi stabil pada menit ke 73 hingga akhir sehingga waktu tersebut menjadi waktu inkubasi reaksi sampel tiap variasi waktu sebelum dibaca nilai absorbansinya (Widyastuti *et al.*, 2020)

c. Penentuan kurva baku asam galat

Pada penelitian ini dibuat kurva baku standar asam galat dengan seri konsentrasi 40, 60, 80, 100, dan 120 ppm. Penentuan kurva baku pada standar asam galat bertujuan untuk mengetahui hubungan konsentrasi dengan nilai absorbansi asam galat sehingga mendapatkan persamaan regresi linear untuk mengukur suatu kadar dari nilai absorbansi hasil pembacaan dengan spektrofotometer UV-Vis (Saputri *et al.*, 2022). Hasil dari kurva baku asam galat yang telah dilakukan dapat dilihat pada Gambar 20.



Gambar 20. Grafik Kurva Baku Asam Galat

Dari kurva baku asam galat yang dibuat, didapatkan persamaan regresi linear hubungan antara konsentrasi vs absorbansi yaitu $y = 0,0057x + 0,0758$ dan nilai r sebesar 0,999. Dari persamaan regresi kurva baku asam galat dapat dilanjutkan untuk menentukan kandungan fenolik total yang terdapat pada sampel variasi waktu 15, 30, 45, 60, dan 75 menit.

d. Penentuan kadar fenolik total

Dilakukan penentuan kadar fenolik total dengan menggunakan instrumen spektrofotometer UV-Vis. Berdasarkan hasil penentuan kadar fenolik total yang terkandung dalam sampel variasi waktu tertinggi dihasilkan pada waktu 60 menit, dan dilanjutkan pada menit 45, menit 30, menit 75, dan menit 15 yang dapat dilihat pada Tabel 14.

Tabel 14. Hasil Perhitungan Kadar Fenolik Total

Sampel Jambu Biji (menit)	Kadar Fenolik Total
	(\bar{X} Fenolik Total (mg GAE/g) \pm SD)
15	208,070 \pm 5,263
30	299,298 \pm 7,797
45	334,094 \pm 5,287
60	410,702 \pm 6,963
75	250,175 \pm 5,336

10. Analisis Statistik

Data yang telah didapatkan kemudian diolah untuk dianalisis dengan menggunakan bantuan software SPSS. Didapatkan hasil analisis kadar flavonoid dan fenolik total sampel tiap variasi waktu ekstraksi dengan didapatkan hasil sebagai berikut:

a. Hasil Uji Statistik Kadar Flavonoid Total

Hasil analisis statistik pada penentuan kadar flavonoid total didapatkan bahwa data homogen dan data terdistribusi normal karena nilai signifikansi memenuhi syarat yaitu $p > 0,05$ (Lampiran 8). Dilanjutkan dengan uji parametrik menggunakan *One Way ANOVA* untuk melihat adanya perbedaan yang signifikan pada sampel tiap variasi waktu ekstraksi daun jambu biji, dengan dihasilkan nilai signifikansi $p < 0,05$. Dilanjutkan

Post Hoc Tukey untuk mengetahui ada tidaknya perbedaan yang signifikan sampel satu waktu dengan sampel variasi waktu lainnya, dengan diperoleh nilai signifikansi $p < 0,05$ (Lampiran 8). Didapatkan bahwa sampel variasi waktu ekstraksi terdapat perbedaan yang signifikan pada menit ke 15 dengan menit 30, 45, 60, 75.

Tabel 15. Hasil Uji Statistik *One Way ANOVA*

Waktu	Uji <i>One Way ANOVA</i>		
	Homogenitas	Normalitas	<i>One Way ANOVA</i>
15	0,231	0,900	0,000
30		0,638	
45		0,467	
60		0,900	
75		0,936	

Keterangan: Homogenitas = ($p > 0,05$)
 Normalitas = ($p > 0,05$)
One-Way ANOVA = Berbeda signifikan ($p < 0,05$)

Tabel 16. Hasil Uji Statistik *Post Hoc Tukey*

Menit	<i>Post Hoc Tukey</i>	
	30	45
15	0,000	0,000
	0,000	0,000
	0,002	0,002

Keterangan: *Post Hoc Tukey* = Berbeda signifikan ($p < 0,05$)

b. Hasil Uji Statistik Kadar Fenolik Total

Hasil analisis statistik pada penentuan kadar fenolik total didapatkan bahwa data homogen dan data terdistribusi normal karena nilai signifikansi memenuhi syarat yaitu $p > 0,05$ (Lampiran 12). Data dilanjutkan dengan uji parametrik menggunakan *One Way ANOVA* untuk melihat adanya perbedaan yang signifikan pada sampel tiap variasi waktu ekstraksi daun jambu biji, dengan dihasilkan nilai signifikansi $p < 0,05$. Dilanjutkan *Post Hoc Tukey* untuk mengetahui ada tidaknya perbedaan yang signifikan sampel satu waktu dengan sampel variasi waktu lainnya, dengan diperoleh nilai signifikansi $p < 0,05$ (Lampiran 12). Didapatkan bahwa sampel variasi waktu ekstraksi terdapat perbedaan yang signifikan pada menit ke 60 dengan menit 15, 30, 45, 75.

Tabel 17. Uji Statistik *One Way ANOVA*

Uji statistik <i>One Way ANOVA</i>			
Waktu	Homogenitas	Normalitas	<i>One Way ANOVA</i>
15	0,763	1,000	0,000
30		0,434	
45		0,817	
60		0,363	
75		0,157	
Keterangan: Homogenitas = (p>0.05)			
Normalitas = (p>0,05)			
<i>One-Way ANOVA</i> = Berbeda signifikan (p<0,05)			

Tabel 18. Hasil Uji *Post Hoc Tukey*

Menit		<i>Post Hoc Tukey</i>
60	15	0,000
	30	
	45	
	75	
Keterangan: <i>Post Hoc Tukey</i> = Berbeda signifikan (p<0,05)		

B. Pembahasan

Pada penelitian ini digunakan sampel daun jambu biji yang diperoleh dari kebun Kalisoro, Kecamatan Tawangmangu, Kabupaten Karanganyar, Jawa Tengah. Pemanenan sampel ini dilakukan pada waktu pagi hari, dengan tujuan untuk memperoleh kandungan senyawa simplisia yang tinggi. Jika pemanenan dilakukan pada siang hari dimana matahari yang terlalu terik dapat menurunkan kandungan senyawa pada simplisia daun jambu biji (Ernawati *et al.*, 2023). Setelah pemanenan dilakukan sortasi basah dengan tujuan untuk menghilangkan pengotor yang melekat pada bahan simplisia. Dilanjutkan proses pengeringan dengan menggunakan oven pada suhu 50°C, alasan pemilihan suhu tersebut karena cocok digunakan untuk senyawa flavonoid dan fenolik yang tidak tahan terhadap pemanasan dimana senyawa flavonoid dan fenolik diketahui dapat terdegradasi pada suhu diatas 60°C (Sari *et al.*, 2024; Dewi, *et al.*, 2021). Simplisia yang telah kering dihaluskan untuk memperkecil ukuran partikel simplisia sehingga luas permukaan partikel menjadi besar yang memudahkan dalam menarik senyawa aktif dari simplisia tersebut (Salamah *et al.*, 2017). Setelah diperoleh serbuk maka dilanjutkan proses pengayakan dengan tujuan agar diperoleh serbuk halus yang berukuran seragam.

Pada penelitian ini dilakukan ekstraksi sampel daun jambu biji dengan metode UAE. Dipilihnya ekstraksi dengan metode UAE karena memiliki keunggulan diantaranya meningkatkan penetrasi dari cairan menuju dinding sel, laju perpindahan masa lebih cepat, meningkatkan hasil ekstraksi, memerlukan pelarut yang sedikit, waktu ekstraksi yang singkat dan cocok digunakan untuk senyawa flavonoid dan fenolik (Setyantoro *et al.*, 2019). Pelarut ekstraksi yang digunakan pada penelitian ini adalah etanol 96% yang dapat menyari senyawa-senyawa yang terkandung dalam daun jambu biji yaitu senyawa flavonoid dan fenolik yang memiliki sifat polar dengan prinsip *like dissolve like* dimana senyawa polar akan tertarik pada pelarut yang memiliki sifat polar (Rachmawati *et al.*, 2020). Setelah proses ekstraksi selesai dilanjutkan proses penguapan dengan menggunakan penangas air dengan suhu terkontrol adalah 50°C, suhu tersebut

dipilih karena cocok untuk senyawa flavonoid dan fenolik yang dapat terdegradasi pada suhu 60°C (Sari *et al.*, 2024).

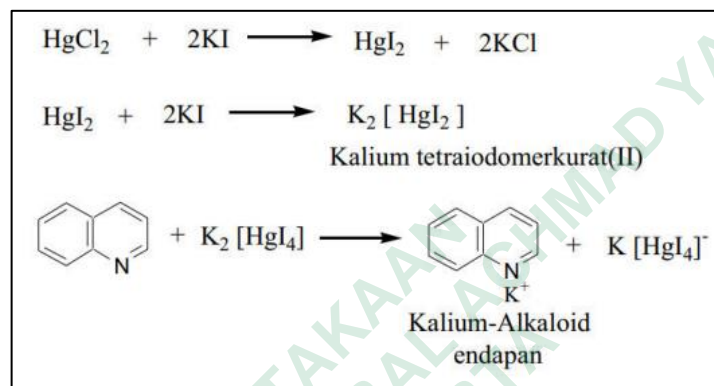
Berdasarkan hasil dari tahap ekstraksi didapatkan rendemen ekstrak variasi 45 menit lebih tinggi dari ekstrak lain yaitu sebesar 20,9% dilanjutkan 75 menit sebesar 15,9%, 15 menit sebesar 15,7%, 30 menit sebesar 14,7%, 60 menit sebesar 14,3%, persen rendemen pada ekstrak jambu biji tersebut telah memenuhi persyaratan FHI edisi II yaitu >12,3% (Kementrian Kesehatan RI., 2017). Tujuan dilakukannya perhitungan rendemen yaitu untuk mengetahui berapa banyak ekstrak yang didapatkan dari simplisia segar yang digunakan. Setelah didapatkan ekstrak kental dilanjutkan pengamatan secara organoleptik dan dilakukan pengujian kadar air. Dilakukan pengujian kadar air dalam ekstrak dimana kadar air dapat mempengaruhi kualitas ekstrak, seperti mudah terkontaminasi mikroba dan fisik ekstrak menjadi rusak, pada pengujian ini seluruh ekstrak tiap variasi waktu telah memenuhi persyaratan yaitu <10% (Kementrian Kesehatan RI., 2017). Kemudian dilanjutkan analisa kualitatif untuk membuktikan adanya senyawa yang diteliti pada daun jambu biji.

Analisis kualitatif yang digunakan pada penelitian ini yaitu dengan organoleptis, penapisan fitokimia dan pengujian KLT. Secara organoleptis ekstrak daun jambu biji memiliki tekstur kental, warna ekstrak yang kecoklatan, serta memiliki aroma khas daun jambu biji, hasil ini telah sesuai dengan literatur Farmakope Herbal Indonesia Edisi II (Kementrian Kesehatan RI, 2017). Penapisan fitokimia pada ekstrak daun jambu biji dilakukan untuk mengidentifikasi golongan senyawa yang ada dalam ekstrak tersebut. Hasil skrining fitokimia yang ditampilkan pada Tabel 8. menunjukkan bahwa ekstrak daun jambu biji mengandung alkaloid, flavonoid, fenolik, tanin, dan saponin, terpenoid di tiap variasi waktu yang digunakan.

Hasil uji skrining fitokimia sampel ekstrak daun jambu biji positif mengandung alkaloid ditandai dengan adanya endapan putih setelah diberi reagen mayer, adanya endapan coklat setelah diberi reagen wagner, serta adanya endapan jingga setelah diberi reagen dragendroff. Pada pengujian alkaloid dilakukan

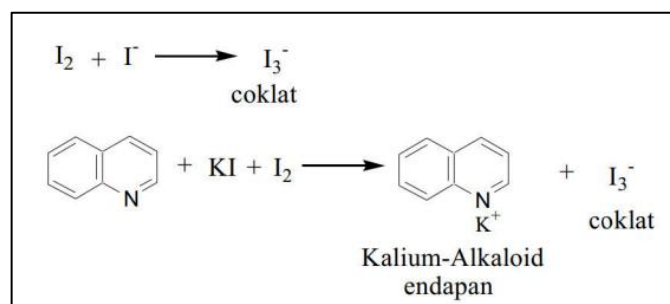
penambahan HCl sebelum ditambahkan reagen dikarenakan alkaloid bersifat basa sehingga dapat diekstrak dengan pelarut yang bersifat asam (Yasser *et al.*, 2022).

Hasil pengujian dengan reagen mayer ditunjukkan dengan adanya endapan putih (Lampiran 4). Pada uji alkaloid menggunakan reagen Mayer seperti yang terlihat pada Gambar 21, nitrogen dalam molekul alkaloid bereaksi dengan ion kalium (K^+) dari kalium tetraiodomerkurat (II), membentuk kompleks kalium-alkaloid yang mengendap sebagai hasil reaksi (Yasser *et al.*, 2022).



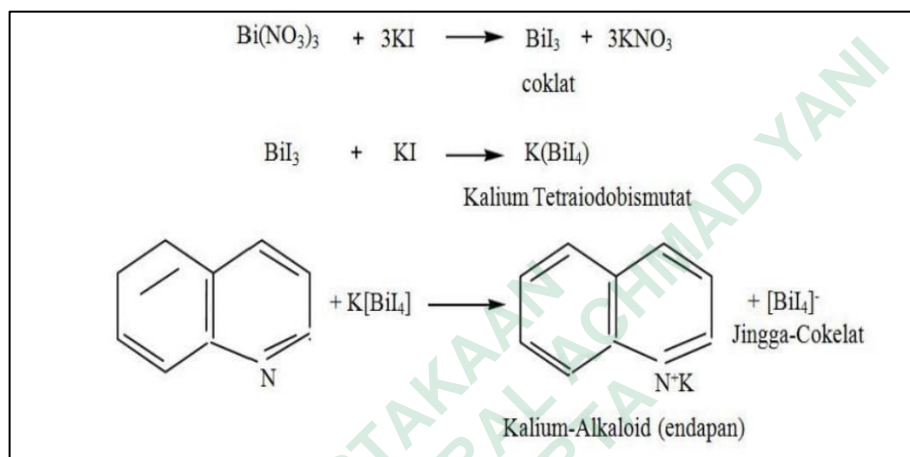
Gambar 21. Reaksi Uji Alkaloid Mayer (Yasser *et al.*, 2022)

Hasil positif pada uji alkaloid menggunakan pereaksi Wagner ditunjukkan dengan terbentuknya endapan berwarna coklat (Lampiran 4). Seperti terlihat pada Gambar 22, dalam pengujian ini iodin bereaksi dengan ion iodida (I^-) dari kalium iodida membentuk ion triiodida (I_3^-) yang memberikan warna coklat pada larutan. Selain itu, ion kalium (K^+) juga berikatan dengan atom nitrogen dalam struktur alkaloid melalui ikatan kovalen yang membentuk kompleks kalium-alkaloid dan kemudian mengendap (Yasser *et al.*, 2022).



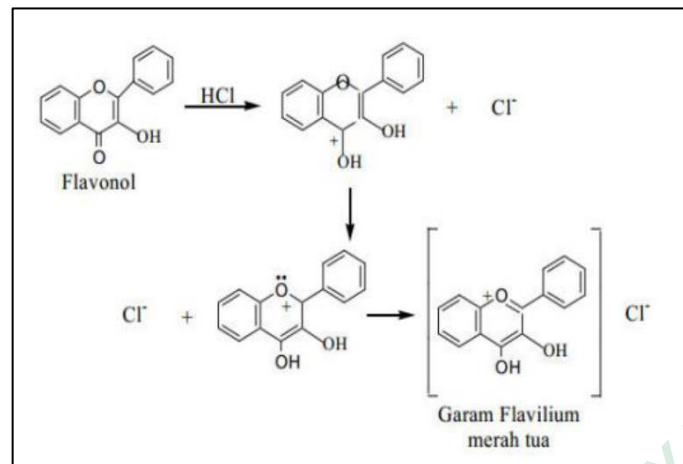
Gambar 22. Reaksi Uji Alkaloid Wagner (Yasser *et al.*, 2022)

Hasil positif uji alkaloid dengan reagen dragendorff ditunjukkan dengan perubahan warna jingga dan munculnya endapan (Lampiran 4). Pada pengujian menggunakan reagen dragendorff, seperti yang ditampilkan pada Gambar 23, nitrogen dari senyawa alkaloid bereaksi dengan ion logam K^+ dari kalium tetraiodobismutat(II), membentuk kompleks kalium-alkaloid yang kemudian mengendap (Susanti *et al.*, 2024).



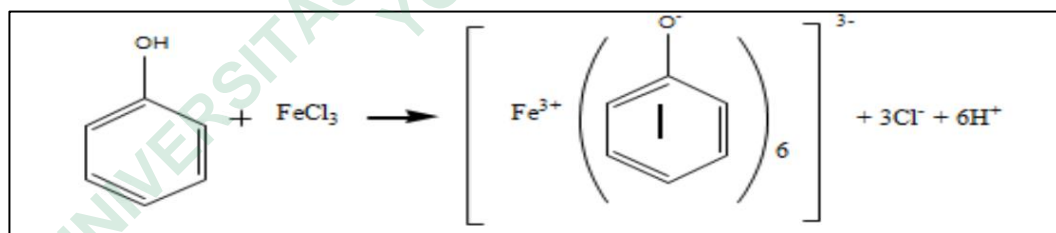
Gambar 23. Reaksi Uji Alkaloid Dragendorff (Maghfirah *et al.*, 2025)

Hasil uji skrining fitokimia menunjukkan bahwa sampel ekstrak positif mengandung flavonoid, yang ditandai dengan perubahan warna menjadi merah tua (Lampiran 4). Setelah penambahan pereaksi magnesium dan HCl seperti terlihat pada Gambar 24. Temuan ini sejalan dengan literatur, yang menyatakan bahwa reaksi positif flavonoid dengan pereaksi tersebut ditunjukkan melalui perubahan warna menjadi kemerahan, kuning, hingga jingga. Perubahan ini kemungkinan disebabkan oleh reduksi senyawa flavonoid oleh magnesium dan HCl, yang menghasilkan garam flavilium berwarna merah tua (Yasser *et al.*, 2022).



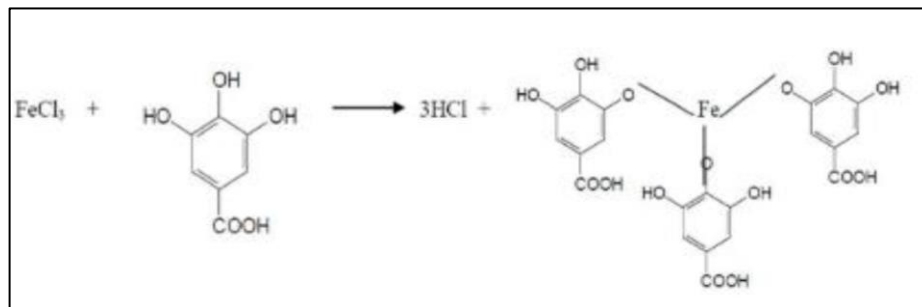
Gambar 24. Reaksi Uji Flavonoid dengan Pereaksi Serbuk Mg dan HCl (Yasser *et al.*, 2022)

Pengujian terhadap senyawa fenolik menunjukkan adanya reaksi antara senyawa fenolik dalam sampel dengan reagen FeCl₃ dengan adanya perubahan warna ungu kehitaman (Lampiran 4). Gugus hidroksil pada senyawa fenolik mendonorkan elektron kepada ion Fe³⁺ dari larutan FeCl₃ 1%, membentuk ikatan koordinasi dan menghasilkan senyawa kompleks. Kompleks ini ditandai dengan munculnya warna ungu kehitaman yang khas, yang menjadi indikator keberadaan senyawa fenolik dalam sampel (Putri *et al.*, 2018).



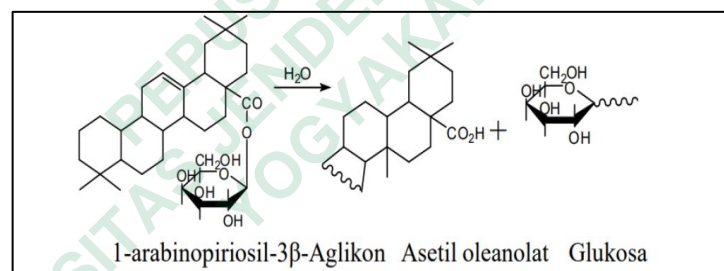
Gambar 25. Reaksi Uji Fenolik dengan FeCl₃ 1% (Putri *et al.*, 2018)

Hasil uji skrining fitokimia sampel ekstrak sampel positif mengandung tanin ditandai dengan adanya perubahan warna biru tua (Lampiran 4) jika diberi pereaksi FeCl₃ 1%. Hasil uji positif tanin dengan pereaksi FeCl₃ 1% terjadi perubahan biru, hijau atau hijau kehitaman (Abdulkadir *et al.*, 2024)



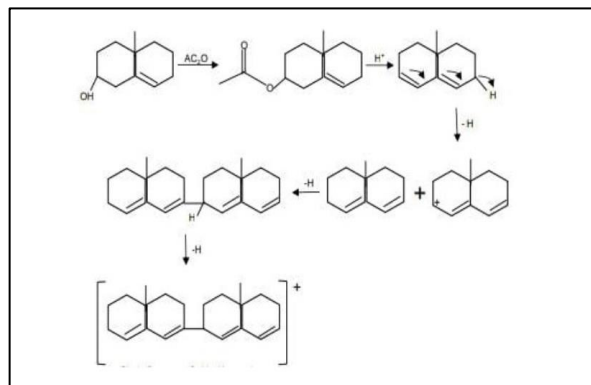
Gambar 26. Reaksi Uji Tanin dengan FeCl_3 1 % (Abdulkadir *et al.*, 2024)

Hasil uji positif terhadap saponin ditunjukkan dengan terbentuknya busa (Lampiran 4), yang menandakan adanya kandungan saponin dalam sampel. Busa tersebut tetap muncul meskipun telah ditambahkan 5 tetes HCl 2N, yang menunjukkan kestabilan senyawa saponin. Seperti terlihat pada Gambar 27, terbentuknya busa menunjukkan adanya glikosida yang mampu membentuk buih dalam air dan terhidrolisis menjadi glukosa serta senyawa lainnya (Pongsapan *et al.*, 2024).



Gambar 27. Reaksi Uji Saponin dengan Air (Pongsapan *et al.*, 2024).

Hasil uji positif terhadap terpenoid ditunjukkan dengan terbentuknya warna jingga kecoklatan (Lampiran 4). Pengujian positif adanya terpenoid pada ekstrak yang dilakukan dengan menggunakan Liebermann Bouchardat seperti pada Gambar 28 yang ditandai dengan terbentuknya warna jingga kecoklatan karena terjadi ikatan rangkap terkonjugasi melalui reaksi kondensasi (Hasan *et al.*, 2023).



Gambar 28. Reaksi Uji Terpenoid dengan Reagen Liebermann Bouchardat (Hasan *et al.*, 2023)

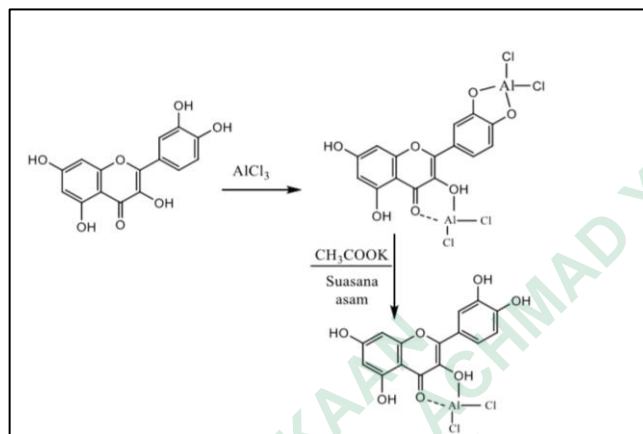
Pada penelitian ini dilakukan pengujian KLT, prinsip dari KLT yaitu distribusi dari senyawa analit berdasarkan tingkat polaritas dan afinitasnya terhadap fase diam dan fase gerak. Fase diam yang digunakan yaitu plat GF₂₅₄ yang bersifat polar. Hasil optimasi fase gerak flavonoid dengan menggunakan fase gerak n-heksan: etil asetat: asam format (6:4:0,2) yang sifatnya adalah semi polar dan optimasi fase gerak fenolik dengan fase gerak kloroform: etil asetat: asam format (1:3:1) yang sifatnya polar.

Perbedaan polaritas tersebut menyebabkan sampel dan standar terelusi yang ditandai dengan adanya hasil bercak berwarna hitam yang sangat mencolok pada standar kuersetin serta timbulnya bercak senyawa lain yang memisah. Sedangkan fase gerak fenolik menunjukkan adanya bercak yang memisah pada plat dan standar asam galat terbentuk bercak hitam. Karena sifat senyawa flavonoid adalah semi polar dan fenolik adalah polar, maka diketahui nilai R_f standar dengan sampel adalah 0,35 pada senyawa flavonoid kuersetin dan 0,875 pada senyawa fenolik asam galat yang dideteksi pada UV 254 nm dan 365 nm. Sampel yang mengandung senyawa flavonoid dan fenolik ditandai dengan hasil dengan standar kuersetin pada uji flavonoid dan asam galat pada uji fenolik dengan memiliki nilai R_f yang mirip. Selain itu juga terdapat R_f lain yang terbentuk pada fase gerak flavonoid diantaranya 0,387: 0,450: 0,837: 0,9: 0,937 pada UV 254 nm dan 365 nm yang kemungkinan adalah senyawa golongan lain, kemudian pada fase gerak fenolik terdapat R_f lain yang terbentuk diantaranya 0,8 dan 0,987 yang kemungkinan adalah senyawa golongan lain.

Pengamatan di bawah sinar UV 254 dan 365 nm menunjukkan adanya bercak yang mengindikasikan keberadaan senyawa flavonoid dan fenolik dalam sampel dan standar pada berbagai variasi waktu. Pada pengamatan dengan UV 254 nm plat akan berfluorosensi sedangkan pada sampel akan terjadi peredaman yang terlihat bercak akan berwarna hitam, sedangkan pada pengamatan dengan UV 365 nm plat akan meredam dan pada sampel akan berfluorosensi. Bercak pada sampel dan standar tampak samar, kemungkinan disebabkan oleh adanya senyawa lain yang ikut terelusi dan mengganggu hasil elusi tersebut, atau karena rendahnya jumlah ikatan rangkap dalam senyawa, sehingga mengurangi kemampuan sampel dalam berfluorosensi. Berdasarkan hasil uji Kromatografi Lapis Tipis (KLT), diketahui bahwa setiap ekstrak variasi waktu ekstraksi daun jambu biji mengandung senyawa flavonoid dan fenolik, yang ditunjukkan oleh nilai Rf yang serupa atau sejajar dengan standar kuersetin dan asam galat. Oleh karena itu, analisis kuantitatif dapat dilanjutkan tahap penetapan kadar untuk mengetahui banyaknya kandungan senyawa flavonoid dan fenolik dalam sampel.

Langkah selanjutnya adalah melakukan analisis kuantitatif untuk menentukan kadar flavonoid total pada masing-masing ekstrak. Penentuan ini menggunakan metode kolorimetri dengan reagen $AlCl_3$. Prinsip dasar metode ini adalah pembentukan kompleks antara senyawa kuersetin dan $AlCl_3$, yang menyebabkan terjadinya pergeseran panjang gelombang ke area *visible*, ditandai dengan perubahan warna larutan menjadi lebih kuning. Kompleks kuersetin- $AlCl_3$ terbentuk melalui interaksi antara gugus keton pada atom C-4 dan gugus hidroksi pada atom C-3 atau C-5 yang berdekatan, yang merupakan ciri khas struktur flavon dan flavonol. Proses ini ditunjukkan pada Gambar 29. Terbentuknya kompleks ini menyebabkan larutan mengalami pergeseran spektrum serapan ke arah panjang gelombang yang lebih tinggi di area *visible*, ditandai dengan adanya warna kuning yang lebih pekat (Lindawati & Ni'ma, 2022). Penambahan $AlCl_3$ 10% berfungsi untuk menghasilkan efek batokromik, yaitu pergeseran panjang gelombang menuju nilai yang lebih tinggi. Hal ini membuat panjang gelombang larutan standar kuersetin bergeser ke rentang UV-Visible antara 400 hingga 600 nm. Seiring berjalannya reaksi batokromik, warna larutan akan menjadi semakin pekat

(Haresmita & Pradani, 2022). Adapun penambahan kalium asetat (CH_3COOK) yaitu berfungsi untuk menstabilkan senyawa kompleks yang terbentuk (Suharyanto & Prima, 2020). Larutan kemudian diinkubasi selama *operating time* 33 menit agar reaksi antara larutan standar kuersetin dan pereaksi yang ditambahkan dapat berjalan dengan sempurna.



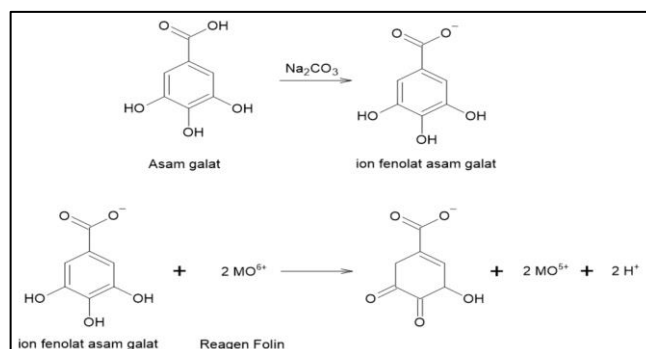
Gambar 29. Pembentukan Reaksi Senyawa Kuersetin dengan AlCl_3 (Lindawati & Ni'ma, 2022)

Penentuan kadar flavonoid total hasil ekstraksi dilakukan dengan kalibrasi menggunakan standar kuersetin dan dinyatakan dalam satuan mg *Quercetin Equivalent* (mg QE) per gram sampel. Dari kurva kalibrasi larutan standar kuersetin, diperoleh persamaan regresi linier $y = 0,0142x - 0,3756$ dengan koefisien korelasi (r) sebesar 0,999. Nilai r yang hampir mencapai 1 menunjukkan bahwa hubungan antara absorbansi dan konsentrasi sangat linear dan kuat. Artinya, semakin tinggi konsentrasi larutan standar kuersetin, semakin besar pula nilai absorbansi yang terbaca. Pada ekstrak daun jambu biji yang diekstraksi menggunakan metode UAE dengan variasi waktu, kadar total flavonoid berkisar antara 44,643 hingga 55,653 mg QE/g, seperti terlihat pada Tabel 13. Pengukuran kadar flavonoid dilakukan pada panjang gelombang 427 nm menggunakan spektrofotometer UV-Vis.

Hasil pada penelitian menunjukkan bahwa kondisi optimal yang dapat dicapai untuk memperoleh kadar total flavonoid tertinggi dari ekstrak daun jambu biji adalah pada waktu ekstraksi selama 15 menit yaitu sebesar 55,653 mg QE/g. Diikuti dengan perlakuan ekstraksi selama 75 menit 52,812 mg QE/g, 60 menit

52,014 mg QE/g, 30 menit 50,441 mg QE/g, 45 menit, yakni sebesar 44,643 mg QE/g. Hal ini mengindikasikan bahwa durasi ekstraksi yang paling efektif adalah 15 menit, dimana proses tersebut mampu menghasilkan kadar flavonoid maksimal. Jika waktu ekstraksi diperpanjang melebihi 15 menit, akan terjadi penurunan kadar flavonoid yang diekstraksi.

Penentuan kadar senyawa fenolik total secara kuantitatif dilakukan dengan menggunakan metode Folin-Ciocalteu, yang merupakan tehnik umum dan sensitif untuk analisis senyawa fenolik pada ekstrak simplisia. Reaksi yang terjadi antara asam galat dengan reagen Folin-Ciocalteu seperti pada Gambar 30, dimana reagen Folin-Ciocalteu mengoksidasi fenolat (garam alkali) atau gugus fenolik-hidroksi untuk mengurangi asam heteropoli (phosphomolybdate-phosphotungstate), yang terdapat dalam reagen Folin-Ciocalteu, menjadi kompleks molybdenum-tungsten yang berwarna hijau kebiruan. Na_2CO_3 ditambahkan karena senyawa fenolik hanya dapat bereaksi dengan reagen Folin-Ciocalteu dalam kondisi alkali sehingga proton dalam senyawa fenolik berdisosiasi menjadi ion fenolik (Agustin *et al.*, 2022). Intensitas warna biru yang dihasilkan berbanding lurus dengan konsentrasi senyawa fenolik dalam sampel, sehingga semakin tinggi kadar fenolik, maka semakin pekat warna biru yang terbentuk (Nofita *et al.*, 2020). Sebagai standar pembanding dalam analisis kandungan fenolik ini, digunakan standar asam galat. Asam galat dipilih karena merupakan senyawa fenolik alami yang stabil dan memiliki tingkat reaktivitas tinggi terhadap reagen Folin-Ciocalteu, sehingga memberikan hasil yang lebih akurat dan dapat diandalkan.



Gambar 30. Pembentukan Reaksi Asam Galat dengan Reagen Folin Ciocalteu dan Na_2CO_3 (Nofita *et al.*, 2020)

Penentuan total fenolik hasil ekstraksi dikalibrasi terhadap standar asam galat dan dinyatakan sebagai mg Gallic Acid (GAE)/g. Berdasarkan hasil pembuatan kurva baku larutan standar asam galat didapatkan regresi linier $y = 0,0057x + 0,0758$ dengan nilai $r = 0,999$. Nilai r yang diperoleh mendekati angka 1 menunjukkan bahwa persamaan regresi tersebut adalah linier. Dengan demikian, kurva baku kuersetin menunjukkan bahwa konsentrasi berbanding lurus dengan nilai absorbansi, semakin besar konsentrasi larutan baku asam galat maka semakin tinggi pula nilai absorbansi yang dihasilkan. Total fenolik pada daun jambu biji metode UAE dengan variasi waktu ekstraksi memiliki kisaran antara 208,070 – 410,702 mg GAE/g yang tercantum dalam Tabel 14. Hasil pengukuran kadar fenolik pada ekstrak variasi waktu dengan panjang gelombang 768 nm diukur menggunakan Spektrofotometer UV-Vis.

Hasil pada penelitian menunjukkan bahwa kondisi optimal yang dapat dicapai untuk memperoleh kadar total fenolik tertinggi dari ekstrak daun jambu biji adalah pada waktu ekstraksi selama 60 menit yaitu sebesar 410,702 mg GAE/g. Diikuti dengan ekstraksi selama 45 menit sebesar 334,094 mg GAE/g, 30 menit sebesar 299,298 mg GAE/g, 75 menit sebesar 250,175 mg GAE/g, 15 menit sebesar 208,070 mg GAE/g. Hal ini mengindikasikan bahwa durasi ekstraksi yang paling efektif adalah 60 menit, dimana proses tersebut mampu menghasilkan konsentrasi fenolik maksimal. Jika waktu ekstraksi diperpanjang melebihi 60 menit, justru terjadi penurunan kadar fenolik yang diekstraksi.

Hasil uji kadar flavonoid dan fenolik total daun jambu biji direpresentasikan melalui uji statistik dengan menggunakan analisis *Post Hoc Tukey* pada kadar tiap waktu ekstraksi untuk mengetahui adanya perbedaan tiap kelompok. Ditunjukkan adanya perbedaan yang signifikan antara perlakuan waktu 15 menit dengan perlakuan lainnya pada menit ke-30, 45, 60, dan 75 pada ekstraksi senyawa flavonoid. Dihasilkan nilai signifikansi berkisar antara 0,000 hingga 0,002 ($p < 0,05$) dimana terdapat perbedaan signifikan pada kadar dengan waktu ekstraksi 15 menit dengan perlakuan lainnya. Pada pengujian kadar fenolik dengan analisis *Post Hoc Tukey* diketahui adanya perbedaan waktu 60 menit dengan variasi waktu 15, 30, 45, 75 yaitu 0,000 ($p < 0,05$). Dimana terdapat perbedaan signifikan pada kadar dengan

waktu ekstraksi 60 menit dengan perlakuan lainnya. Oleh karena itu, penelitian yang telah dilakukan menunjukkan bahwa faktor waktu ekstraksi memberikan pengaruh signifikan ($p < 0,05$) terhadap total flavonoid dan fenolik ekstrak daun jambu biji. Pengujian skrining fitokimia terhadap senyawa flavonoid menunjukkan bahwa ekstraksi selama 15 menit menghasilkan intensitas warna yang lebih tinggi dibandingkan dengan waktu ekstraksi lainnya. Pola serupa juga diamati pada senyawa fenolik, di mana waktu ekstraksi selama 60 menit memberikan intensitas warna paling kuat. Peningkatan intensitas warna tersebut mencerminkan tingginya konsentrasi senyawa yang terkandung dalam ekstrak.

Hasil tersebut dapat dilihat bahwa singkatnya waktu ekstraksi dan semakin lama waktu ekstraksi, maka ekstrak dari daun jambu biji tidak menghasilkan kadar flavonoid dan fenolik total yang semakin baik, sejalan pada penelitian Sari *et al.*, 2022 bahwa akan terjadi penurunan karena adanya senyawa organik yang terurai karena efek dari gelombang ultrasonik. Fenomena ini dapat dijelaskan melalui mekanisme ekstraksi, di mana setiap bahan dan jenis pelarut memiliki titik waktu optimal untuk berinteraksi secara efektif. Ekstraksi yang berlangsung terlalu lama dapat menyebabkan pelarut mencapai kondisi jenuh, sehingga efisiensi pelarut dalam melarutkan senyawa bioaktif menurun. Selain itu, adanya proses pemanasan yang berkepanjangan dapat memicu terjadinya degradasi senyawa flavonoid dan fenolik akibat proses kavitasi dan oksidasi, yang membuat kestabilan senyawa tersebut menurun secara signifikan (Sari *et al.*, 2022). Besarnya rendemen ekstrak tersebut tidak berkorelasi dengan kadar flavonoid dan fenolik total karena efisiensi ekstraksi senyawa aktif sangat dipengaruhi oleh waktu ekstraksi yang digunakan (Sari *et al.*, 2024).