

BAB IV HASIL DAN PEMBAHASAN

A. Hasil

1. Determinasi Tanaman

Hasil determinasi tanaman yang dilakukan di Laboratorium Biologi Universitas Ahmad Dahlan menunjukkan bahwa sampel yang digunakan untuk penelitian adalah daun teh hijau dengan surat keterangan nomor 291/Lab.Bio/B/IV/2025 yang dapat dilihat pada **(Lampiran 2)**.

2. Penyiapan Sampel

Hasil sampel daun teh hijau muda dan tua yang sudah dilakukan sortasi basah, perajangan, pengeringan dan dilakukan penyerbukan dapat dilihat pada **Tabel 3 dan Lampiran 3**

Tabel 3. Hasil Sampel Daun Teh Hijau

Sampel	Berat Daun Segar (kg)	Berat Daun Kering (g)	Berat Serbuk (g)
Daun Teh Hijau Muda	2,26	471,21	465,82
Daun Teh Hijau Tua	2,50	566,91	560,53

3. Ekstraksi Sampel

Hasil rendemen ekstrak kental daun teh tua dan muda dapat dilihat pada **Tabel 4** sedangkan nilai rendemen untuk ekstrak uji alkaloid (ekstrak kering) dapat dilihat pada **Tabel 5 (Lampiran 4)**.

Tabel 4. Hasil Rendemen Ekstrak Kental Daun Teh Hijau

Sampel	Berat Ekstrak Kental (Gram)	% Rendemen	Farmakope Herbal Indonesia, (2017)
Daun Teh Hijau Muda	20,58	45,73	>10%
Daun Teh Hijau Tua	10,69	23,75	

Dilakukan tahapan lanjutan yaitu ekstraksi cair cair penetapan kadar alkaloid guna memisahkan kafein dari senyawa lainnya. Rendemen yang didapatkan dihitung sebagai presentase bobot ekstrak hasil ekstraksi cair cair yang telah diuapkan (ekstrak kering) yang dapat dilihat pada **Tabel 5**.

Tabel 5. Hasil Rendemen Ekstrak Kering Daun Teh Hijau

Sampel	Berat Ekstrak Kering (Gram)	% Rendemen
Daun Teh Hijau Muda	0,1178	11,78
Daun Teh Hijau Tua	0,1075	10,75

4. Kontrol Kualitas Ekstrak

a. Uji Organoleptik

Ekstrak kental dan ekstrak kering daun teh hijau diuji organoleptis secara objektif menggunakan panca indra manusia. Hasil pengamatan uji organoleptis dideskripsikan pada **Tabel 6 (Lampiran 3)**.

Tabel 6. Pengamatan Organoleptis

Parameter	Ekstrak Kental Daun Muda dan Tua	Ekstrak Kental (Farmakope Herbal Indonesia, 2017)	Ekstrak Kering Daun Muda dan Tua	Ekstrak Kering (Widhyani <i>et al.</i> , 2021)
Bentuk	Kental	Kental	Kristal	Kristal
Warna	Coklat kehitaman	Coklat kehitaman	Putih kehijauan	Putih kehijauan
Aroma	Tidak berbau	Tidak berbau	Tidak berbau	Tidak berbau

b. Uji Kadar Air Ekstrak

Hasil kadar air ekstrak daun teh hijau muda dan daun teh hijau tua dapat dilihat pada **Tabel 7 (Lampiran 5)**.

Tabel 7. Kadar Air Ekstrak Kental Daun Teh Hijau

Sampel	Kadar Air (%)	Farmakope Herbal Indonesia, (2017)
Daun Teh Hijau Muda	4,32	<10%
Daun Teh Hijau Tua	2,87	

5. Skrining Fitokimia

Skrining Fitokimia dilakukan untuk mengidentifikasi dan mendeteksi keberadaan senyawa - senyawa kimia tertentu dalam daun teh hijau muda dan tua. Uji ini dianalisis secara visual dengan mengamati perubahan warna yang terjadi pada sampel dengan penambahan pereaksi. Hasil skrining fitokimia dapat dilihat pada **Tabel 8 (Lampiran 6)**.

Tabel 8. Skrining Fitokimia

Identifikasi	Hasil		Teoritis
	Daun Teh Hijau Muda	Daun Teh Hijau Tua	
Alkaloid	Mayer	+	+
	Wagner	+	+
	Dragendroff	+	+
Fenolik	+	+	+
Flavonoid	+	+	+
Saponin	+	+	+
Tanin	+	+	+

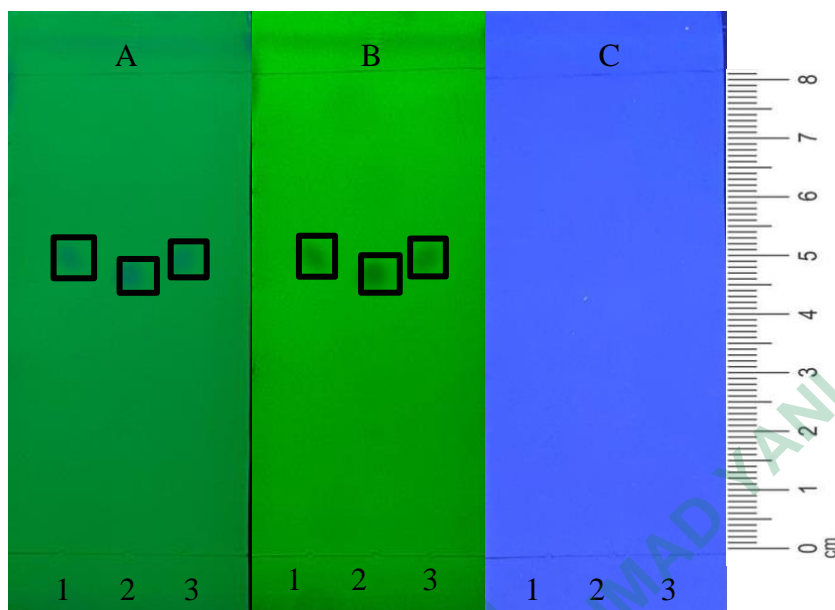
Keterangan : (+) positif : mengandung golongan senyawa

(-) negatif : tidak mengandung golongan senyawa

6. Identifikasi Senyawa Alkaloid dan Fenolik dengan KLT

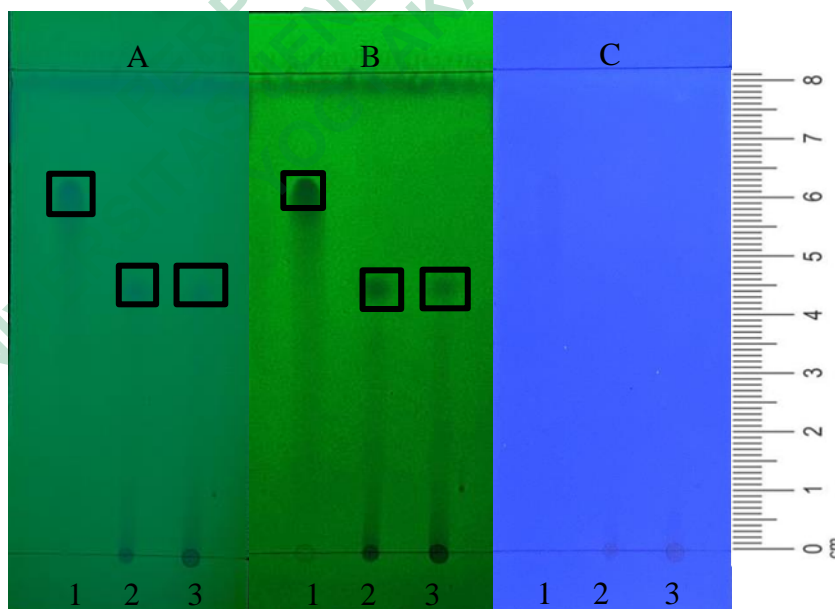
Hasil identifikasi senyawa alkaloid dan fenolik dapat dilihat pada

Gambar 13 dan **Gambar 14**. Pemisahan dilihat dengan sinar UV pada panjang gelombang 254nm dan 365 nm



Gambar 13. Identifikasi Alkaloid Ekstrak Daun Teh Hijau

Keterangan: A: Deteksi dengan sinar tampak; B: Deteksi dengan sinar UV 254nm; C: Deteksi dengan sinar UV 365nm. 1: Standar Kafein; 2: Sampel Daun Teh Muda; 3: Sampel Daun Teh Tua. Fase diam = silika gel 60 F₂₅₄; Fase gerak = Kloroform : Etanol (9:1 v/v)



Gambar 14. Identifikasi Fenolik Ekstrak Daun Teh Hijau

Keterangan: A: Deteksi dengan sinar tampak; B: Deteksi dengan sinar UV 254nm; C: Deteksi dengan sinar UV 365nm. 1: Standar Asam Galat; 2: Sampel Daun Teh Muda; 3:

Sampel Daun Teh Tua. Fase diam = silika gel 60 F₂₅₄; Fase gerak = n- heksan : Etil asetat : Etanol (1:8:1 v/v/v)

Tabel 9. Nilai Rf

Uji KLT	Analit	Nilai Rf
Alkaloid	Standar kafein	0,75
	Sampel daun teh hijau muda	0,725
	Sampel daun teh hijau tua	0,737
Fenolik	Standar asam galat	0,875
	Sampel daun teh hijau muda	0,687
	Sampel daun teh hijau tua	0,687

7. Penetapan Kadar Total Alkaloid

a. Penentuan Panjang Gelombang Maksimum Kafein

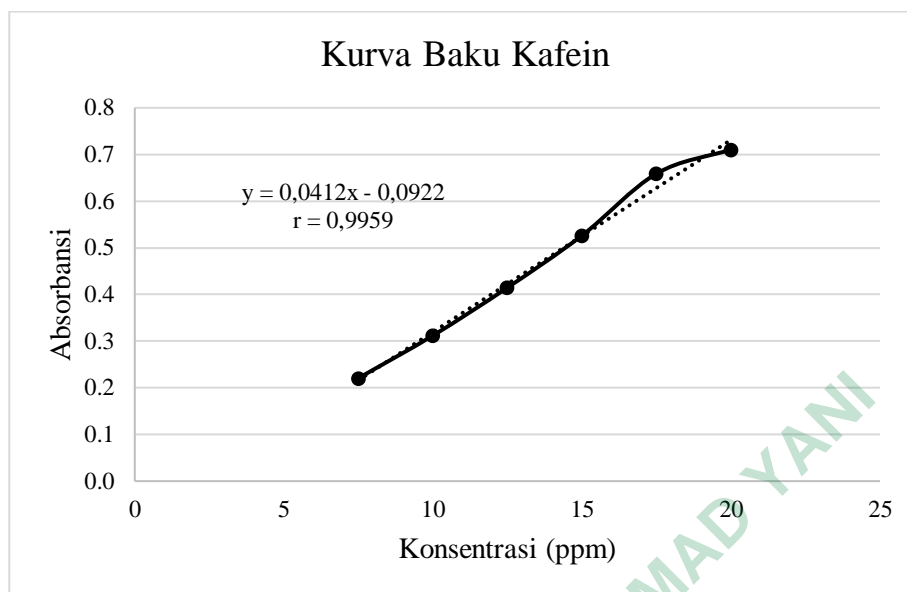
Panjang gelombang maksimum kafein yaitu pada 273 nm (**Lampiran 8**).

b. Kurva Baku Kafein

Hasil kurva baku kafein dapat dilihat pada **Tabel 10 (Lampiran 8)**.

Tabel 10. Absorbansi Kurva Baku Kafein

Konsentrasi (ppm)	Rata-Rata ± SD
7,5	0,220 ± 0,003
10	0,312 ± 0,001
12,5	0,414 ± 0,000
15	0,526 ± 0,001
17,5	0,659 ± 0
20	0,710 ± 0,000



Gambar 15. Kurva Baku Kafein

Berdasarkan kurva kalibrasi pada **Gambar 15**, hubungan linier membandingkan konsentrasi standar kafein dan absorbansi yang tercatat dijelaskan oleh persamaan $y = 0,0412x - 0,0922$, dengan nilai koefisien korelasi (r) yang diperoleh adalah 0,9959. Persamaan ini digunakan untuk menghitung jumlah total senyawa alkaloid dalam ekstrak daun teh muda dan tua. Hasil perhitungan ini dinyatakan dalam satuan ekuivalen kafein (CE) yang digunakan sebagai standar untuk mengukur kandungan alkaloid dalam sampel. Hasil kadar alkaloid total yang diperoleh dalam ekstrak daun teh muda dan tua dapat dilihat pada **Tabel 11 (Lampiran 8)**.

Tabel 11. Kadar Alkaloid Total Daun Teh Hijau

Sampel Ekstrak Kering	Replikasi	Kadar Alkaloid Total (mg CE/g)	Rata-Rata \pm SD (mg CE/g)
Daun Teh Hijau Muda	1	927,379	925,113 \pm 2,021
	2	924,466	
	3	923,495	
Daun Teh Hijau Tua	1	480,777	482,395 \pm 1,483
	2	482,718	
	3	483,689	

8. Penetapan Kadar Total Fenolik

a. Penentuan Panjang Gelombang Maksimum Asam Galat

Panjang gelombang maksimum asam galat yaitu pada 765 nm (**Lampiran 8**).

b. Penentuan *Operating time* (OT)

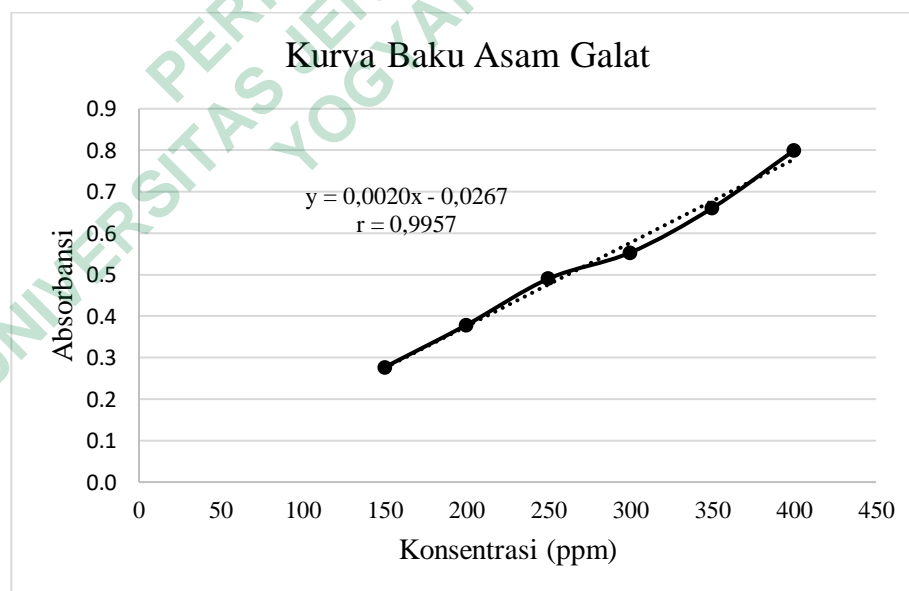
Diperoleh *operating time* selama 1 jam 41 menit (**Lampiran 8**).

c. Kurva baku asam galat

Hasil kurva baku asam galat dapat dilihat pada **Tabel 12**, **Gambar 16** dan (**Lampiran 8**)

Tabel 12. Absorbansi Kurva Baku Asam Galat

Konsentrasi (ppm)	Rata-Rata \pm SD
150	0,277 \pm 0,006
200	0,379 \pm 0,009
250	0,490 \pm 0,000
300	0,553 \pm 0,015
350	0,660 \pm 0,001
400	0,799 \pm 0,022



Gambar 16. Kurva Baku Asam Galat

Berdasarkan kurva kalibrasi pada **Gambar 16**, hubungan linier membandingkan konsentrasi standar asam galat dan absorbansi yang

tercatat dijelaskan oleh persamaan $y = 0,0020x - 0,0267$ dengan nilai koefisien korelasi (r) yang diperoleh adalah 0,9957. Persamaan ini digunakan untuk menghitung jumlah total senyawa fenolik dalam ekstrak daun teh hijau muda dan tua. Hasil perhitungan ini dinyatakan dalam satuan ekuivalen asam galat (GAE), yang digunakan sebagai standar untuk mengukur kandungan fenolik dalam sampel. Hasil kadar fenolik total yang diperoleh dalam ekstrak daun teh hijau muda dan tua dapat dilihat pada **Tabel 13 (Lampiran 8)**.

Tabel 13. Kadar Fenolik Total Daun Teh Hijau

Sampel Ekstrak Kental	Replikasi	Kadar Fenolik Total (mg GAE/g)	Rata-Rata ± SD (mg GAE/g)
Daun Teh Hijau Muda	1	176,175	176,425 ± 0,25
	2	176,425	
	3	176,675	
Daun Teh Hijau Tua	1	97,425	97,842 ± 0,382
	2	97,925	
	3	98,175	

9. Analisis Data

Pada Penelitian ini analisis data yang digunakan yaitu *software* SPSS. Hasil statistik normalitas, homogenitas, dan *T- Test independent* untuk membandingkan pengaruh daun muda dan daun tua terhadap kadar total alkaloid dan fenolik ekstrak daun teh hijau yang dapat dilihat pada **Tabel 14** dan **Tabel 15**.

Tabel 14. Analisis Data Kadar Alkaloid Total

Sampel	Uji Normalitas	Uji Homogenitas	Uji T-Test
Daun Teh Hijau Muda	0,463*	0,518**	0,000***
Daun Teh Hijau Tua	0,637*		

Keterangan :

(*) = Data terdistribusi normal ($p > 0,05$)

(**) = Data homogen ($p > 0,05$)

(***) = Data berbeda signifikan ($p < 0,05$)

Tabel 15. Analisis Data Kadar Fenolik Total

Sampel	Uji Normalitas	Uji Homogenitas	Uji T-Test
Daun Teh Hijau Muda	1*	0,442**	0,000***
Daun Teh Hijau Tua	0,637*		

Keterangan :

(*) = Data terdistribusi normal ($p > 0,05$)

(**) = Data homogen ($p > 0,05$)

(***) = Data berbeda signifikan ($p < 0,05$)

B. Pembahasan

Penelitian ini merupakan penelitian eksperimental yang bertujuan untuk mengetahui pengaruh tingkat kematangan daun terhadap kadar total alkaloid dan fenolik daun teh hijau (*Camellia sinensis* L.). Sampel daun teh hijau yang digunakan untuk penelitian ini dipanen langsung dari Perkebunan Teh Tritis, Ngargosari, Kecamatan Samigaluh, Kabupaten Kulon progo, Daerah Istimewa Yogyakarta. Pemetikan sampel daun teh dilakukan dipagi hari pukul 06.30 WIB karena suhu yang lebih rendah dan embun pagi membantu menjaga kesegaran daun, mencegah daun layu sebelum diproses, dan mengurangi oksidasi awal yang dapat memengaruhi kualitas teh (Sari *et al.*, 2021). Kriteria pemetikan daun teh muda dan tua yaitu daun teh hijau muda memiliki warna hijau muda yang terdiri dari urutan daun nomor 1 sampai 5 terhitung dari daun teratas, sedangkan untuk daun teh hijau tua memiliki warna hijau tua yang terdiri dari daun ke 6 sampai 8 dari daun teratas. Setelah sampel dipanen dilakukan determinasi terlebih dahulu di Laboratorium Biologi Universitas Ahmad Dahlan Yogyakarta. Determinasi bertujuan untuk mengetahui kebenaran tanaman yang akan digunakan untuk analisis (Susilowati *et al.*, 2016). Berdasarkan hasil determinasi sampel yang digunakan untuk penelitian adalah daun teh hijau (**Lampiran 2**).

Daun teh hijau muda dan tua yang sudah dipetik sebanyak kurang lebih 3 kg disortir dan dicuci menggunakan air mengalir. Sortasi basah dilakukan guna menghilangkan ranting pada daun dan memisahkan daun yang rusak. Kemudian pencucian bertujuan untuk menghilangkan pengotor dari sampel daun teh tersebut. Berat daun yang didapatkan setelah sortasi kurang lebih sebanyak 2,50 kg. Daun teh yang telah bersih kemudian dilakukan perajangan untuk memperkecil ukuran

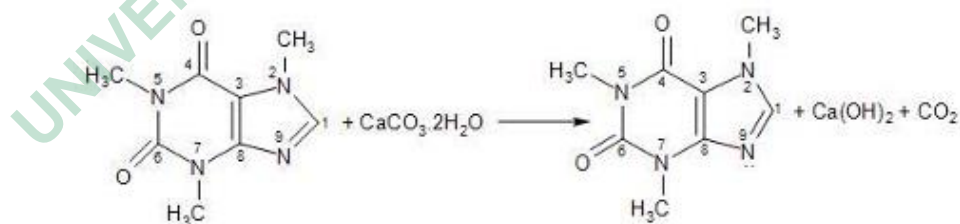
partikel dan menambah luas permukaan bahan sehingga mempercepat proses pengeringan saat dioven. Daun teh yang sudah dirajang dikering anginkan dan dioven pada suhu 50°C. Pengeringan dengan bantuan alat oven lebih menguntungkan karena proses pengeringan sampel berlangsung lebih cepat. Tujuan pengeringan adalah untuk menurunkan kadar air dalam suatu sampel untuk menghambat pertumbuhan mikroorganisme dan menghentikan aktivitas enzim penyebab terjadinya pembusukan sehingga sampel tersebut dapat disimpan pada jangka waktu lebih lama (Maleke *et al.*, 2024). Pengeringan dilakukan pada suhu 50°C untuk menjaga stabilitas senyawa aktif dan mencegah kerusakan zat akibat suhu tinggi (Fernando *et al.*, 2023). Sampel daun teh hijau muda dan tua yang telah kering dihaluskan menggunakan grinder sampai menjadi serbuk. Penghalusan simplisia bertujuan memperluas permukaan bahan terhadap pelarut, sehingga mempercepat proses ekstraksi dan memperoleh hasil yang optimal. Serbuk teh selanjutnya diayak menggunakan ayakan 20 mesh bertujuan untuk mendapatkan ukuran partikel yang seragam dan halus, mempermudah proses ekstraksi, atau untuk memisahkan material berdasarkan ukuran tertentu. Partikel dengan ukuran sama akan memiliki laju pelepasan senyawa aktif yang seragam, sehingga waktu ekstraksi menjadi lebih singkat dan hasilnya lebih konsisten (Lomovski *et al.*, 2020).

Proses ekstraksi daun teh hijau menggunakan metode ekstraksi UAE. Penggunaan metode ekstraksi UAE bertujuan untuk meningkatkan efisiensi proses ekstraksi dengan memanfaatkan prinsip kavitasi akustik, yaitu pembentukan gelembung-gelembung spontan dalam fase cair di bawah titik didihnya. Gelembung ini akan pecah dan merusak dinding sel, sehingga pelarut dapat lebih mudah menembus ke dalam bahan. Dibandingkan dengan metode ekstraksi maserasi, UAE memiliki beberapa keunggulan, antara lain peningkatan penetrasi pelarut ke dalam sel, laju perpindahan massa yang lebih cepat, hasil ekstraksi yang lebih tinggi, serta penggunaan volume pelarut yang lebih sedikit dan waktu ekstraksi yang lebih singkat (Kristina *et al.*, 2022).

Dalam penelitian ini digunakan etanol 70% sebagai pelarut, karena etanol merupakan salah satu pelarut yang bersifat polar yang dapat melarutkan senyawa

fenolik dan alkaloid yang bersifat polar juga. Perbedaan konsentrasi etanol dapat mempengaruhi kelarutan zat aktif, dimana jika pelarut yang digunakan memiliki tingkat kepolaran yang sama maka zat aktif akan terlarut dengan baik. Dalam hal ini etanol 70% lebih efektif digunakan untuk melarutkan senyawa fenolik dan alkaloid karena memiliki tingkat kepolaran yang tinggi (Suhendra *et al.*, 2019). Setelah dilakukan proses ekstraksi, ekstrak disaring menggunakan kertas saring *Whatman No. 42* kertas ini mampu menahan partikel yang sangat kecil, sehingga cocok untuk pemisahan partikel dalam berbagai proses analisis. Penyaringan bertujuan memperoleh larutan ekstrak murni tanpa partikel kasar yang dapat mempengaruhi hasil uji. Filtrat yang didapatkan kemudian diuapkan pada suhu 50°C hingga mendapatkan ekstrak kental kemudian ekstrak kental yang didapat dihitung rendemennya.

Hasil ekstrak kental yang telah didapatkan kemudian dilakukan ekstraksi kembali untuk uji penetapan kadar alkaloid dengan metode ekstraksi cair cair. Ekstraksi cair-cair hanya dilakukan pada alkaloid (kafein) karena kafein cenderung berikatan dengan polifenol, sehingga perlu dipisahkan terlebih dahulu agar hasil penetapan kadarnya akurat. Kafein terlebih dahulu diisolasi dengan menambahkan CaCO_3 ke dalam larutan ekstrak kental teh. Penambahan CaCO_3 bertujuan untuk memutuskan ikatan kafein dengan senyawa lainnya, sehingga kafein akan berada dalam basa bebas (Lestari *et al.*, 2023).



Gambar 17. Reaksi Kafein dan CaCO_3

Larutan teh hijau yang sudah ditambahkan dengan CaCO_3 ditambahkan kloroform p.a (**Gambar 17**) dan dilakukan ekstraksi dengan metode ekstraksi cair-cair. Dalam ekstraksi cair-cair dengan corong pisah dilakukan berdasarkan kepolaran atau “*like dissolve like*”, dimana suatu senyawa akan larut pada pelarut

yang kepolarannya sama. Kafein merupakan alkaloid yang bersifat non polar, sehingga memerlukan pelarut non polar yaitu kloroform. Kloroform merupakan pelarut yang cocok untuk kafein karena sifatnya yang tidak bercampur dengan pelarut sebelumnya. Pemilihan kloroform sebagai pelarut juga dikarenakan kafein mudah larut dalam kloroform, sehingga mampu membuat kafein terekstraksi lebih banyak. Proses ekstraksi menghasilkan kesetimbangan konsentrasi di dalam corong pisah sehingga menyebabkan terbentuknya dua lapisan. Perbedaan lapisan tersebut juga diakibatkan karena adanya perbedaan kepolaran. Fase kloroform yang bersifat non polar berada pada lapisan bawah karena memiliki berat jenis lebih besar. Kemudian lapisan bawah atau fase kloroform diambil dan diuapkan dengan *waterbath* sehingga kloroform akan menguap seluruhnya dan meninggalkan ekstrak kafein (Lestari *et al.*, 2023).

Dilakukannya ekstraksi dengan metode cair-cair dikarenakan senyawa kafein yang dapat larut dalam air dan kondisi sampel yang berupa larutan, sehingga sesuai dengan metode ekstraksi cair-cair (Nurhidayat, 2023). Rendemen yang didapatkan dihitung sebagai presentase bobot ekstrak hasil ekstraksi cair cair yang telah diuapkan (ekstrak kering).

Berdasarkan **Tabel 4 dan Tabel 5**, dapat dilihat bahwa rendemen ekstrak daun teh hijau muda lebih tinggi dibandingkan dengan daun teh hijau tua baik pada ekstrak kental maupun ekstrak kering yang berarti bahwa metabolit sekunder yang ada dalam daun teh hijau muda lebih banyak dibandingkan daun teh hijau tua. Rendemen daun teh hijau muda dan tua memenuhi syarat Farmakope Herbal Indonesia yaitu $> 10\%$. Semakin tinggi nilai rendemen yang dihasilkan menandakan nilai ekstrak yang didapat semakin banyak karena semakin banyak komponen zat aktif yang terekstraksi dari ekstrak (Syamsul *et al.*, 2020).

Ekstrak kental dan ekstrak kering daun teh hijau muda dan tua yang telah diperoleh selanjutnya dilakukan uji organoleptis yang bertujuan memberikan identifikasi awal ekstrak menggunakan panca indra, melalui deskripsi bentuk, bau, dan warna. Berdasarkan hasil uji organoleptis ekstrak kental teh hijau yang dapat dilihat pada **Tabel 6** memiliki karakteristik yang sama sesuai dengan Farmakope Herbal Indonesia kemudian untuk ekstrak kering memiliki karakteristik yang

sesuai dengan penelitian yang dilakukan oleh (Widhyani *et al.*, 2021). Dilakukan skrining fitokimia untuk mengidentifikasi dan mendeteksi keberadaan senyawa metabolit sekunder dalam daun teh hijau muda dan tua. Skrining fitokimia ekstrak kental daun teh melibatkan pengujian terhadap beberapa jenis senyawa utama seperti alkaloid, fenolik, flavonoid, tanin, dan saponin. Berdasarkan hasil fitokimia, ekstrak daun teh positif mengandung senyawa alkaloid, fenolik, flavonoid, tanin, dan saponin hal ini sesuai dengan penelitian yang dilakukan oleh Rahmawati *et al.*,(2022) yaitu melakukan uji skrining fitokimia senyawa metabolit sekunder daun teh hijau.

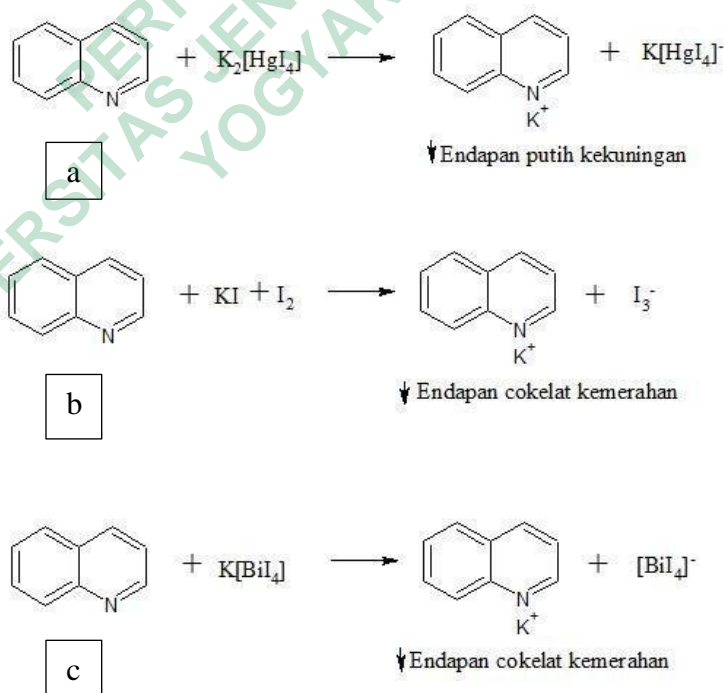
Identifikasi senyawa untuk mengetahui adanya kandungan alkaloid dalam ekstrak daun teh dilakukan secara kualitatif dengan pereaksi Wagner, Mayer, dan Dragendroff. Pada **Tabel 7** menunjukkan hasil uji kualitatif untuk tiga pereaksi tersebut mengandung alkaloid pada ekstrak daun teh hijau. Penambahan HCl pekat dalam uji kualitatif alkaloid pada ekstrak bertujuan untuk meningkatkan daya larut alkaloid yang bersifat basa membentuk suatu garam. Prinsip uji kualitatif ini didasarkan pada reaksi presipitasi akibat dari pergantian ligan antara atom nitrogen dengan sepasang elektron bebas pada alkaloid terhadap ion iodo pada pereaksi-pereaksi tersebut (Wahyuni *et al.*, 2020).

Pada pereaksi Mayer akan menghasilkan endapan putih/kuning dalam uji alkaloid pada ekstrak. Pereaksi Mayer merupakan campuran larutan raksa(II) klorida (HgCl_2) dengan larutan kalium iodida (KI) membentuk raksa(II) iodida (HgI_2). Apabila dilakukan penambahan larutan KI yang berlebih akan membentuk endapan senyawa kompleks kalium tetraiodomerkurat(II), $\text{K}_2[\text{HgI}_4]$. Pada uji Mayer, atom nitrogen dengan sepasang elektron bebas pada alkaloid bereaksi dengan kalium tetraiodomerkurat(II) membentuk endapan kompleks kalium-alkaloid (Wahyuni *et al.*, 2020).

Pereaksi Wagner merupakan larutan yang berasal dari pencampuran iodin (I_2) dengan kalium iodida (KI) yang dilarutkan dalam akuades. Hasil yang diperoleh dari uji alkaloid dari pereaksi tersebut adalah adanya endapan coklat yang berasal pembentukan ion I_3^- dari reaksi iodin (I_2) dengan ion I^- yang berasal dari KI. Hal ini disebabkan adanya ikatan antara atom nitrogen (N) yang memiliki

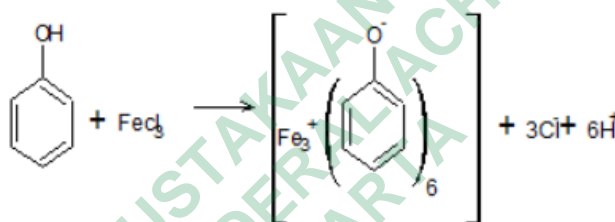
pasangan elektron bebas pada alkaloid terhadap ion logam K^+ membentuk senyawa kompleks kalium-alkaloid melalui ikatan kovalen koordinasi (Wahyuni *et al.*, 2020)

Pada uji alkaloid dengan pereaksi Dragendroff menghasilkan endapan jingga kecoklatan. Hal ini disebabkan adanya reaksi atom nitrogen pada alkaloid terhadap ion logam K^+ pada senyawa kompleks kalium tetraiodobismutat(III) membentuk kompleks kalium-alkaloid dengan ikatan kovalen koordinasi dan ion kompleks tetraiodobismutat(III), $[BiI_4]^-$. Pereaksi Dragendroff adalah campuran larutan bismut nitrat dalam asam klorida untuk mencegah terjadinya reaksi hidrolisis dengan larutan kalium iodida menghasilkan endapan hitam bismut(III) iodida (BiI_3). Apabila dilakukan penambahan berlebih larutan kalium iodida, endapan tersebut akan melarut kembali menghasilkan larutan kompleks kalium tetraiodobismutat(III), $K[BiI_4]$ (Wahyuni *et al.*, 2020). Jika dilihat dari intensitas warna yang terbentuk berdasarkan (**Lampiran 6**) antara daun teh muda dan tua memiliki intensitas warna yang sama. Reaksi identifikasi alkaloid dapat dilihat pada **Gambar 18**.



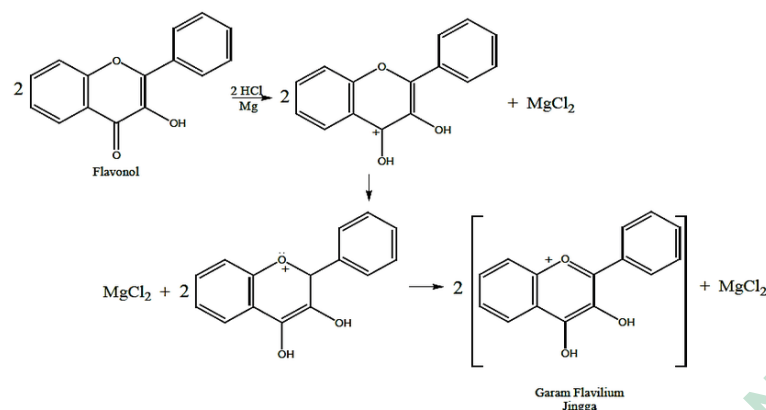
Gambar 18. Reaksi Identifikasi Alkaloid oleh Reagen (a) Mayer, (b) wagner, (c) Dragendroff (Hanifa *et al.*, 2021)

Uji senyawa fenolik dilakukan dengan penambahan FeCl_3 untuk menentukan gugus gugus fenol yang terkandung dalam sampel. Adanya senyawa fenol dapat di lihat adanya perubahan pada sampel yaitu terbentuknya warna hijau ungu, biru dan hitam (Widiawati *et al.*, 2023). Hasil uji dari **Tabel 7**. menunjukan bahwa ekstrak daun teh hijau muda dan tua mengandung senyawa fenol. Jika dilihat dari intensitas warna yang terbentuk berdasarkan (**Lampiran 6**) daun teh muda memiliki intensitas warna yang lebih pekat dibandingkan dengan daun teh tua yang menunjukkan kemungkinan lebih tinggi senyawa fenolik didaun teh muda dibandingkan daun teh tua. Reaksi yang terjadi pada uji fenolik dapat diamati pada **Gambar 19**.



Gambar 19. Reaksi Senyawa Fenolik dengan FeCl_3 (Widiawati *et al.*, 2023)

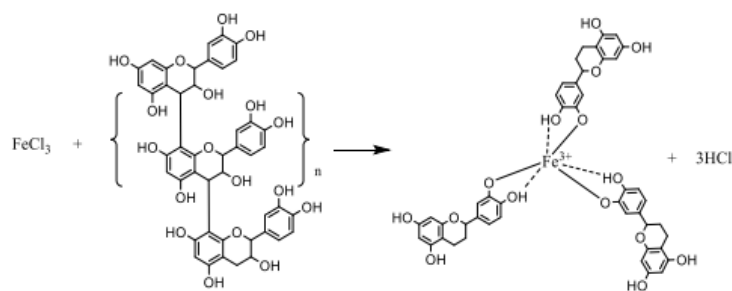
Uji flavonoid pada ekstrak daun teh hijau yaitu ditandai dengan adanya warna jingga saat diberikan Mg dan HCl. Tujuan pemberian Mg dan HCl yaitu untuk mereduksi inti benzopiron yang terdapat pada flavonoid sehingga terbentuk perubahan warna jingga (Rahmawati *et al.*, 2022). Berdasarkan uji dari **Tabel 7**, ekstrak daun teh hijau muda dan tua mengandung senyawa flavonoid. Jika dilihat dari intensitas warna yang terbentuk berdasarkan (**Lampiran 6**) antara daun teh muda dan tua memiliki intensitas warna yang sama. Reaksi yang terjadi pada uji flavonoid dapat diamati pada **Gambar 20**.



Gambar 20. Reaksi Flavonoid dengan HCl dan Logam Mg (Tandi *et al.*, 2020)

Uji saponin dengan penambahan HCl menghasilkan buih stabil yang menandakan tanaman tersebut positif mengandung senyawa saponin. Pengujian saponin saat digojok terbentuk buih karena gugus hidrofil berikatan dengan air, sedangkan gugus hidrofob berikatan dengan udara. Penambahan HCl bertujuan untuk menambah kepolaran gugus hidrofil dan buih yang terbentuk menjadi stabil (Rahmawati *et al.*, 2022). Hasil uji pada **Tabel 7**, menunjukkan daun teh hijau muda dan tua mengandung senyawa saponin. Jika dilihat dari buih yang terbentuk berdasarkan (**Lampiran 6**) antara daun teh muda dan tua memiliki buih yang sama.

Uji tanin dilakukan dengan penambahan FeCl_3 untuk menentukan apakah sampel mengandung gugus fenol. Adanya gugus fenol ditunjukkan dengan adanya perubahan warna hitam kehijauan setelah ditambahkan FeCl_3 (Rahmawati *et al.*, 2022). Berdasarkan hasil uji pada **Tabel 7** pengujian tanin dengan penambahan FeCl_3 memberikan hasil positif karena didalam sampel teh hijau terdapat senyawa polifenol salah satunya adalah tanin. Jika dilihat dari intensitas warna yang terbentuk berdasarkan (**Lampiran 6**) daun teh muda memiliki intensitas warna yang lebih pekat dibandingkan dengan daun teh tua yang menunjukkan kemungkinan lebih tinggi senyawa tanin didaun teh muda dibandingkan daun teh tua. Reaksi yang terjadi pada uji tanin dapat diamati pada **Gambar 21**.



Gambar 21. Reaksi Antara Tanin dan FeCl₃ (Tandi *et al.*, 2020)

Kromatografi Lapis Tipis merupakan salah satu jenis kromatografi yang dapat memisahkan komponen - komponen berdasarkan perbedaan tingkat kepolaran dari sampel versus pelarut fase gerak yang digunakan. Kromatografi Lapis Tipis (KLT) digunakan untuk menentukan banyaknya komponen dalam campuran, identifikasi senyawa, memantau berjalannya suatu reaksi, namun secara utama KLT digunakan untuk menentukan kemurnian serta identitas dari suatu senyawa isolate dengan parameter nilai faktor retensi atau angka *R_f* (Putri *et al.*, 2024). Pada penelitian ini dilakukan identifikasi senyawa alkaloid dan fenolik menggunakan Kromatografi Lapis Tipis (KLT). Fase gerak yang digunakan yaitu Kloroform : Etanol (9:1) v/v untuk identifikasi alkaloid dan n- heksan : etil asetat : etanol (1:8:1) v/v/v untuk identifikasi fenolik. Kombinasi larutan tersebut memiliki tingkat kepolaran yang berbeda dapat memberikan pemisahan pola yang baik. Silika gel 60F₂₅₄ digunakan sebagai fase diam yang memiliki sifat polar. Sebelum digunakan, Plat Silika gel 60F₂₅₄ diaktivasi dengan cara dipanaskan di dalam oven pada suhu 105°C selama 30 menit. Aktivasi plat KLT bertujuan untuk menghilangkan pelarut sisa pencucian dan mengaktifkan gugus silanol dan siloksan dari plat (Putri *et al.*, 2024). Standar yang digunakan sebagai pembanding adalah kafein standar untuk identifikasi alkaloid dan asam galat untuk identifikasi fenolik. Berdasarkan hasil identifikasi sampel memiliki kandungan alkaloid dan fenolik. Berdasarkan hasil intensitas warna yang terbentuk diplat hampir serupa namun nilai *R_f* nya sedikit berbeda untuk identifikasi alkaloid kemudian pada fenolik nilai *R_f* sampel sama namun berbeda dengan standar. Alkaloid memiliki nilai *R_f* sampel dan standar sekitar 0,725 kemudian untuk fenolik nilai *R_f* standar

0,875 dan R_f sampel 0,687. Pada identifikasi fenolik bercak sampel lebih rendah dari pada standar hal ini dikarenakan standar yang digunakan asam galat, namun sampel bisa mengandung flavonoid, tanin, atau senyawa fenolik lain dengan polaritas berbeda. Meskipun bercak tidak berada sejajar, adanya bercak pada sampel menunjukkan bahwa sampel mengandung senyawa fenolik, meskipun bukan asam galat secara spesifik, melainkan kemungkinan senyawa fenolik lain seperti katekin, tanin, atau flavonoid (Fadhilah *et al.*, 2021) Maka, hasil ini tetap menunjukkan adanya kandungan senyawa fenolik dalam ekstrak daun teh, meskipun tidak identik dengan asam galat.

Hasil pengamatan di bawah sinar UV 254 nm menunjukkan bahwa bercak atau noda berfluoresensi yang menandakan warna dari sampel daun teh dan standar mengandung senyawa alkaloid dan fenolik. Fluoresensi yang tampak merupakan hasil emisi cahaya yang dipancarkan oleh komponen tersebut ketika elektron tereksitasi dari tingkat dasar ke tingkat energi yang lebih tinggi dan kemudian kembali semula dengan melepaskan energi. Kemudian, hasil plat saat diamati di bawah sinar UV 365 nm tidak terlihat pada standar maupun sampel hal ini dikarenakan senyawa tidak menyerap atau tidak fluoresen di panjang gelombang tersebut (Evany, 2023).

Dilakukan uji kuantitatif untuk menetapkan jumlah alkaloid dan fenolik total ekstrak daun teh hijau menggunakan metode spektrofotometri UV-Vis. Pemilihan metode ini karena senyawa alkaloid dan fenolik memiliki gugus kromofor dan auksokrom. Penetapan kadar alkaloid (kafein) dilakukan dengan metode spektrofotometri UV-Vis. Sebelumnya, sampel diekstraksi menggunakan metode ekstraksi cair-cair dengan pelarut kloroform untuk memisahkan kafein dari matriks teh. Ekstraksi cair-cair tidak melibatkan reaksi kimia, melainkan hanya pemisahan berdasarkan perbedaan kelarutan kafein antara dua pelarut yang tidak saling bercampur. Oleh karena itu, tidak dihasilkan produk reaksi seperti perubahan warna atau endapan. Namun, hasil ekstraksi kemudian dapat dianalisis lebih lanjut menggunakan metode spektrofotometri. Hasil ekstraksi kemudian diukur absorbansinya pada panjang gelombang maksimum 273 nm dan dibandingkan dengan larutan standar untuk menghitung kadar kafein (Nurhidayat,

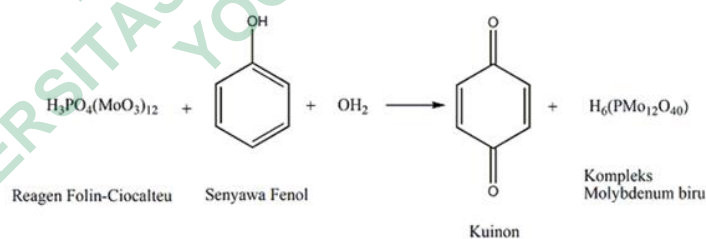
2023). Penentuan panjang gelombang maksimum bertujuan untuk memberikan kepekaan sampel yang mengandung kafein dengan maksimal. Adapun pelarut yang digunakan pada penetapan Panjang gelombang maksimum adalah aquades, selain digunakan sebagai pelarut aquades juga digunakan sebagai blanko untuk mengkalibrasi spektrofotometri UV-Vis dengan tujuan meminimalisir kesalahan penggunaan alat dalam penetapan Panjang gelombang maksimum. Metode spektrofotometri UV-Vis digunakan karena kafein menyerap kuat pada panjang gelombang antara 271–275 nm. Intensitas serapan sebanding dengan konsentrasi (*Hukum Lambert–Beer*) sehingga memungkinkan penetapan kadar kuantitatif dengan membandingkan absorbansi sampel terhadap kurva kalibrasi standar (Rupa *et al.*, 2023)

Penentuan kadar fenolik menggunakan metode *Follin- Ciocalteu*. Prinsip metode *Follin-Ciocalteu* yaitu senyawa fenolik akan mengalami oksidasi oleh reagen *Follin-Ciocalteu*, sehingga terbentuk larutan dengan warna biru. Warna biru ini timbul karena senyawa fenolik berinteraksi dengan reagen tersebut maka dapat diukur dengan spektrofotometer UV-Vis dengan panjang gelombang 600-800 nm. Peningkatan intensitas warna biru tersebut secara langsung berkaitan dengan kandungan senyawa fenolik pada sampel. Semakin banyak senyawa fenolik yang teroksidasi, semakin kuat pula warna biru yang dihasilkan (Rollando *et al.*, 2017).

Penelitian ini menggunakan asam galat sebagai pembanding karena didasarkan pada reaktivitasnya yang tinggi terhadap reagen *Follin-Ciocalteu*, yang membuatnya menghasilkan hasil yang reliabel dan asam galat juga dikenal sebagai senyawa fenolik alami yang stabil. Asam galat saat bereaksi dengan reagen *Follin-Ciocalteu* akan mengeluarkan warna kuning yang menunjukkan indikasi awal bahwa sampel mengandung senyawa fenolik. Reaksi antara senyawa fenolik dan reagen *Follin-Ciocalteu* berjalan dalam kondisi basa untuk memungkinkan disosiasi proton, yang menghasilkan ion fenolat yang dibutuhkan untuk proses oksidasi. Larutan basa yang digunakan adalah larutan natrium karbonat Na_2CO_3 yang berfungsi untuk menjaga kondisi basa yang optimal dalam campuran reaksi, memungkinkan terbentuknya ion fenolat dari senyawa fenolik

yang mengikuti reaksi dengan reagen *Follin-Ciocalteu*. Ketika reaksi berlangsung, reagen *Follin-Ciocalteu* akan berinteraksi dengan gugus hidroksil pada senyawa fenolik. Hasil dari interaksi ini adalah terbentuknya kompleks molibdenum-tungsten yang memiliki warna biru. Warna biru ini kemudian dapat dideteksi dan diukur menggunakan spektrofotometri UV-Vis (Andriani *et al.*, 2018).

Peningkatan intensitas warna biru yang terbentuk selama reaksi langsung mengindikasikan jumlah ion fenolat yang ada dalam larutan. Konsentrasi senyawa fenolik yang lebih tinggi dalam sampel menghasilkan lebih banyak pembentukan ion fenolat. Ion fenolat bertindak dengan mereduksi asam heteropoli yaitu fosfomolibdat-fosfotungstat. Proses reduksi ini menghasilkan terbentuknya kompleks molibdenum-tungsten. Kompleks ini kemudian menyebabkan warna biru dalam larutan menjadi semakin pekat (Nofita *et al.*, 2020). Kemudian dibaca absorbansi larutan pada panjang gelombang 765nm dan ditunggu reaksi berlangsung selama 1 jam 41 menit. Pemilihan panjang gelombang tersebut karena pada panjang gelombang tersebut menunjukkan tingkat serapan yang tinggi dan dipilih waktu selama 1 jam 41 menit karena pada waktu tersebut menghasilkan nilai absorbansi yang stabil. Reaksi antara asam galat dengan reagen *Follin Ciocalteu* dan Na_2CO_3 dapat dilihat pada **Gambar 22**.



Gambar 22. Reaksi Asam Galat dengan Na_2CO_3

Penetapan kadar alkaloid dan fenolik total yaitu dengan mengukur absorbansi standar kafein dan asam galat terlebih dahulu untuk mencari kurva baku yang akan digunakan untuk mencari kadar alkaloid dan fenolik ekstrak daun teh hijau muda dan tua. Selanjutnya mengukur absorbansi sampel untuk mencari kadar sesungguhnya. Pengukuran absorbansi ini dilakukan sebanyak 3x untuk memastikan keakuratan dan konsistensi data yang diperoleh. Berdasarkan **Tabel 11** dan **Tabel 13**, diperoleh rata-rata kadar alkaloid total ekstrak daun teh hijau

muda dengan dilakukan replikasi 3x sebesar $925,113 \pm 2,021$ mg CE/g sedangkan kadar fenolik total yang diperoleh sebesar $176,425 \pm 0,25$ mg GAE/g. Hasil penetapan kadar alkaloid total yang dihasilkan pada ekstrak daun teh hijau tua dengan dilakukan replikasi 3x sebesar $482,395 \pm 1,482$ mg CE/g sedangkan kadar fenolik total sebesar $97,842 \pm 0,382$ mg QE/g. Perbandingan hasil menunjukkan bahwa kadar alkaloid dan fenolik total lebih tinggi pada daun muda dibanding daun tua. Hal ini sejalan dengan pengaruh tingkat kematangan daun, di mana daun muda memiliki aktivitas fotosintesis dan metabolisme primer yang tinggi, sehingga sintesis metabolit sekunder seperti alkaloid dan senyawa fenolik lebih optimal. Sebaliknya, pada daun tua, metabolisme sekunder cenderung menurun karena sebagian senyawa dialihkan untuk pertumbuhan jaringan atau mengalami degradasi, sehingga kandungan alkaloid dan fenolik menjadi lebih rendah.

Selain itu, konsistensi hasil rendemen ekstrak, profil kromatografi lapis tipis (KLT), dan kadar alkaloid serta fenolik total mendukung kesimpulan bahwa daun muda memiliki kandungan metabolit sekunder lebih tinggi. Rendemen ekstrak daun muda lebih besar, menunjukkan kandungan metabolit sekunder daun muda lebih tinggi dibandingkan daun tua. Hasil KLT menunjukkan adanya bercak pada plat yang berarti terdapat senyawa spesifik alkaloid dan fenolik. Selain itu, penetapan kadar alkaloid dan fenolik total yang dilakukan secara replikasi menunjukkan nilai yang stabil dengan deviasi standar rendah, menegaskan bahwa data yang diperoleh konsisten dan dapat dipercaya. Hasil ini secara keseluruhan mendukung kesimpulan bahwa tingkat kematangan daun berpengaruh signifikan terhadap kandungan metabolit sekunder pada daun teh hijau.

Analisis statistik menggunakan SPSS menegaskan bahwa nilai kadar total alkaloid dan fenolik dalam daun teh hijau muda dan tua berbeda secara signifikan. Berdasarkan hasil uji *T-Test*, diperoleh nilai sig. 2-tailed 0,000 ($<0,05$), yang menunjukkan bahwa adanya perbedaan signifikan antara daun muda dan daun tua terhadap kadar total alkaloid dan fenolik daun teh hijau. Hal ini mengindikasikan bahwa pemilihan daun memiliki dampak signifikan terhadap kadar kandungan senyawa bioaktif tersebut.

Berdasarkan hasil penelitian, kadar total alkaloid dan fenolik dalam ekstrak daun teh hijau muda lebih tinggi dibandingkan dengan ekstrak daun teh hijau tua. Hal ini mengindikasikan bahwa kadar metabolit sekunder daun teh hijau muda lebih optimal dan lebih tinggi dari pada daun teh hijau tua. Hal ini selaras dengan penelitian Dellima *et al.*, (2023) yang menyatakan bahwa kadar kafein yang terdapat di bagian daun ditentukan oleh tingkat kematangan daun. Kadar kafein pada pucuk daun, daun muda, daun dewasa dan daun tua berturut-turut adalah 5,7; 7,1; 2,1; dan 2,4 mg/g. Penelitian lain menyatakan bahwa dalam daun muda yang masih segar terdapat sebanyak 3,2 mg/g kafein dan daun dewasa segar sebesar 1,8 mg/g. Kemudian pada penelitian Liu *et al.*, (2020) juga menyatakan bahwa penuaan daun teh menyebabkan penurunan kadar air dan kandungan fenolik total secara signifikan. Profil fenolik juga berubah secara signifikan menjadi lebih rendah setelah daun teh menua. Hal ini menunjukkan bahwa daun muda dan daun tua sangat berpengaruh terhadap kadar total alkaloid dan fenolik dari daun teh hijau.

Hasil penelitian ini juga dapat melengkapi kekurangan pada beberapa penelitian sebelumnya. Penelitian Dellima *et al.*, (2023) hanya meneliti daun dewasa tanpa membandingkan dengan daun muda atau tua, sehingga belum dapat menjelaskan pengaruh tingkat kematangan daun terhadap kandungan alkaloid. Selain itu, penelitian tersebut hanya berfokus pada satu jenis alkaloid yaitu kafein, tanpa menyinggung total alkaloid maupun fenolik. Demikian pula, penelitian Liu *et al.*, (2020) menunjukkan perubahan komposisi fenolik daun teh muda dan tua, seperti penurunan flavanol dan asam fenolat serta peningkatan flavonol seiring pematangan daun, namun penelitian tersebut tidak mengevaluasi kadar total fenolik maupun alkaloid sehingga kurang memberikan gambaran kuantitatif yang lengkap. Kekurangan ini dilengkapi oleh penelitian ini yang menekankan perbandingan daun muda dan tua serta analisis kuantitatif kadar total alkaloid dan fenolik.