

BAB IV

HASIL PENELITIAN DAN PEMBAHASAN

A. Hasil Penelitian

1. Determinasi tanaman

Tahap pertama yang dilakukan dalam penelitian adalah menetapkan kebenaran sampel tanaman pucuk merah (*Syzygium myrtifolium* Walp.) berkaitan dengan ciri-ciri morfologis yang ada pada tanaman pucuk merah. Berdasarkan hasil determinasi yang dilakukan di Biologi Farmasi, Fakultas Farmasi Universitas Sebelas Maret Surakarta dapat dinyatakan bahwa sampel yang digunakan dalam penelitian ini adalah benar-benar tanaman pucuk merah (*Syzygium myrtifolium* Walp.). Hasil determinasi tanaman pucuk merah dapat dilihat pada lampiran 1.

2. Pembuatan serbuk

Pada penelitian ini daun pucuk merah yang digunakan diperoleh dari Sukoharjo. Tahap pertama mengumpulkan daun pucuk merah tua dan muda, mencuci daun tua dan muda dengan air mengalir dan dikeringkan dengan oven pada suhu kurang dari 50°C, setelah daun kering kemudian dilakukan penyerbukan dengan alat penggilingan dan diayak dengan ayakan.

Tabel 1. Hasil Perhitungan rendemen simplisia

	Berat basah (gram)	Berat kering (gram)	Rendemen (%)
Daun muda	1200	520	43,33
Daun tua	730	310	42,47

Dari tabel 1 diperoleh hasil rendemen simplisia daun muda sebesar 43,33% dan simplisia daun tua sebesar 42,47%. Hasil tersebut diperoleh dari berat akhir dibagi berat awal di kali 100%.

3. Pembuatan ekstrak

Proses ekstraksi dilakukan bertujuan untuk mengambil senyawa kimia yang terkandung dalam sampel. Prinsip ekstraksi didasarkan pada perpindahan massa komponen zat yang terlarut ke dalam pelarut sehingga terjadi perpindahan pada lapisan antar muka dan berdifusi masuk ke dalam pelarut (Harborne, 1987). Pelarut yang digunakan pada penelitian ini adalah etanol 96% sebagai pelarut universal. Dalam hal penyarian, etanol memiliki kelebihan dibandingkan dengan air dan metanol. Senyawa kimia yang mampu disari dengan etanol lebih banyak daripada penyari metanol dan air (Azizah dan Salamah, 2013). Untuk mendapatkan senyawa kimia yang diinginkan digunakan metode ekstraksi yang merupakan metode penyarian zat berkhasiat atau zat aktif dari bagian tanaman dengan menggunakan pelarut yang sesuai (Yuliani dan Satu, 2012).

Metode ekstraksi yang digunakan pada penelitian ini adalah maserasi, karena metode ini lebih sederhana, mudah dan tanpa pemanasan. Karena jika menggunakan pemanasan dapat membuat kadar flavonoid berkurang.

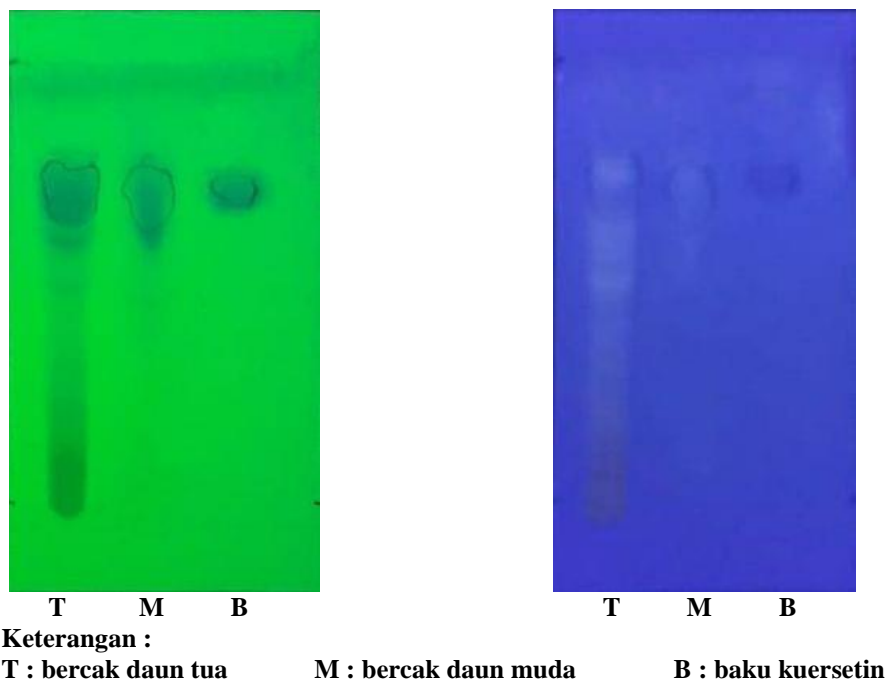
Ekstrak yang diperoleh dipekatkan dengan *rotari evaporator* sampai diperoleh ekstrak kental yang berwarna hijau tua. Kemudian dilakukan perhitungan rendemen, sehingga diperoleh rata-rata persen rendemen untuk simplisia sebesar 42,9% dan untuk rata-rata rendemen ekstrak sebesar 18,425%. Penentuan rendemen ini berfungsi untuk mengetahui kadar metabolit sekunder yang terbawa oleh pelarut (Ahmad *et al*, 2016).

Tabel 2. Hasil perhitungan rendemen ekstrak

	Berat simplisia (gram)	Berat ekstrak (gram)	Rendemen (%)
Ekstrak daun muda	300	31,1351	10,38
Ekstrak daun tua	300	79,4022	26,47

4. Uji KLT Flavonoid

Ekstrak daun pucuk merah dan pembanding (kuersetin) yang telah dilarutkan dengan etanol 96%, ditotolkan bersama-sama pada lempeng kromatografi lapis tipis (KLT) dengan dielusi menggunakan eluen yang memberikan hasil pemisahan terbaik pada KLT yaitu *n-butanol* : asam asetat : air (BAA) dengan perbandingan (4:1:5). Hasil KLT diangin-anginkan kemudian dibaca pada sinar UV 254 nm dan 366 nm, noda-noda tersebut dilingkari dan dihitung nilai Rfnya.



Gambar 1. Hasil identifikasi flavonoid secara KLT pada UV 254 nm dan 366.

Pemisahan dengan KLT menghasilkan harga Rf dari noda pertama yaitu ekstrak daun pucuk merah tua sebesar 0,76. Noda kedua yaitu ekstrak daun pucuk merah muda memiliki nilai Rf sebesar 0,76. Noda ketiga yaitu baku kuersetin memiliki nilai Rf sebesar 0,78.

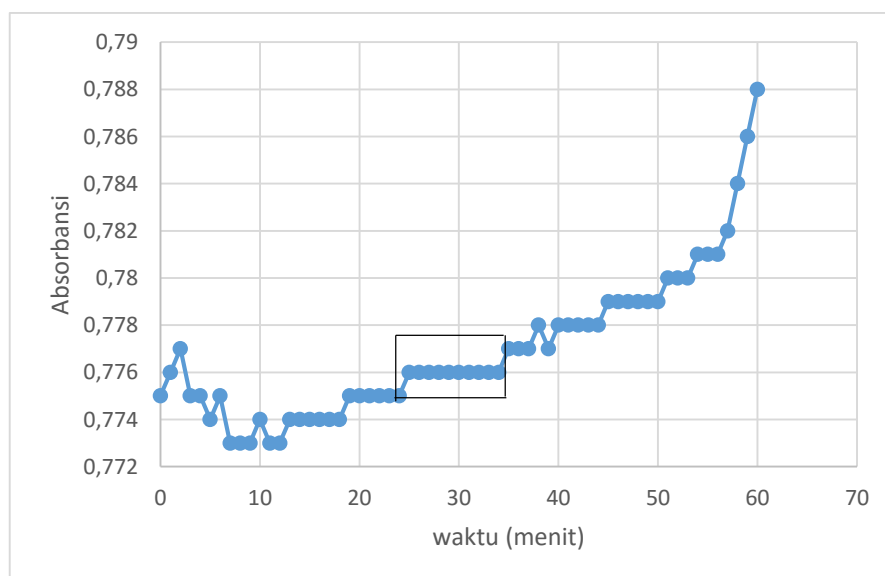
B. Penetapan kadar flavonoid total secara Spektrofotometri UV-Vis

1. Penentuan panjang gelombang maksimum

Panjang gelombang maksimum adalah panjang gelombang yang memberikan absorbansi maksimum. Penentuan panjang gelombang maksimum standar flavonoid kuersetin dilakukan pada daerah visibel yaitu pada panjang gelombang 400 – 450 nm. Pada penelitian ini dilakukan dengan menggunakan larutan standar kuersetin 100 mg/L. Panjang gelombang maksimum dalam penelitian ini adalah 424 nm yang memiliki serapan absorbansi sebesar 0,766.

2. Penentuan *operating time*

Operating time bertujuan untuk mengetahui pada menit beberapa serapan mulai stabil sehingga dapat diketahui kapan waktu yang tepat untuk dilakukan pembacaan absorbansi sampel. Waktu yang stabil yaitu pada menit ke 25 sampai menit ke 34. Pada penelitian ini *operating time* flavonoid kuersetin stabil setiap menit dari menit ke 25 sampai menit ke 34 berdasarkan literatur *operating time* flavonoid kuersetin.

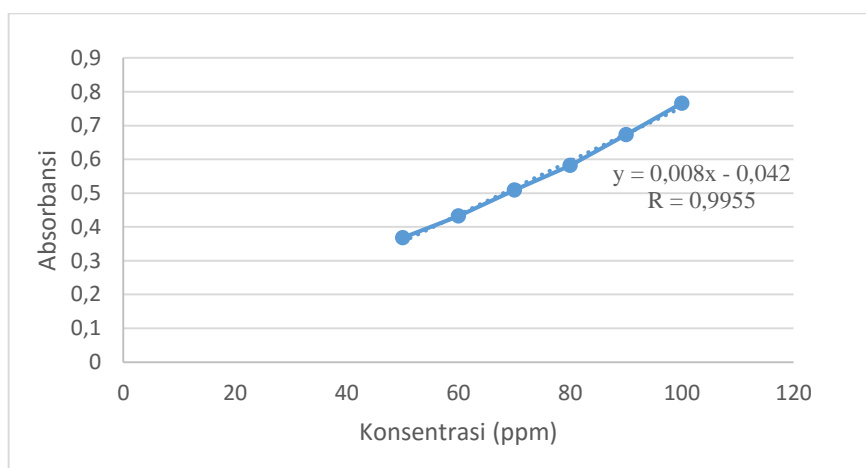


Gambar 2. Kurva hubungan waktu dan absorbansi baku kuersetin

3. Penentuan kurva baku

Kuersetin digunakan sebagai larutan standar karena kuersetin merupakan flavonoid golongan flavonol yang mempunyai gugus keto pada C-4 dan memiliki gugus hidroksil pada atom C-3 atau C-5 yang bertetangga dari flavon dan flavonol (Azizah dan Faramayuda 2014). Pengukuran serapan panjang gelombang maksimum dilakukan *running* dari panjang gelombang 400 -450 nm. Hasil *running* menunjukkan panjang gelombang maksimum standar baku kuersetin berada pada panjang gelombang 424 nm.

Penentuan kurva baku flavonoid kuersetin standar menggunakan konsentrasi 50 ppm, 60 ppm, 70 ppm, 80 ppm, 90 ppm, dan 100 ppm. Digunakan deret konsentrasi karena metode yang dipakai dalam menentukan kadar adalah metode yang menggunakan persamaan kurva baku, untuk membuat kurva baku terlebih dahulu dibuat beberapa deret konsentrasi untuk mendapatkan persamaan linear yang apat digunakan untuk menghitung persen kadar.



Gambar 3. Kurva baku kuersetin.

Dari pengukuran tersebut, dapat disimpulkan bahwa semakin tinggi konsentrasi yang digunakan maka semakin tinggi pula absorbansi yang diperoleh.

Hasil baku kuersetin yang diperoleh diplotkan antara kadar dan absorbansinya, sehingga diperoleh persamaan regresi linear yaitu $y = 0,008x - 0,042$ dengan nilai R^2 yang diperoleh sebesar 0,9955 dan nilai r adalah 0,99773. Persamaan kurva kalibrasi kuersetin dapat digunakan sebagai pembanding untuk menentukan konsentrasi senyawa flavonoid total pada ekstrak sampel.

Hasil penentuan kurva baku didapatkan $r = 0,9955$ dan absorbansi yang diperoleh dari kurva baku sebanding dengan konsentrasi, semakin tinggi konsentrasi maka semakin tinggi absorbansi sehingga diperoleh nilai r yang mendekati 1.

4. Presisi

Presisi diukur sebagai simpangan baku atau simpangan baku relatif (koefisien variasi). Presisi dapat dikatakan sebagai keterulangan atau ketertiruan. Presisi dikatakan baik bila memberikan simpangan baku relatif (RSD) atau koefisien variasi (CV) 2% atau kurang dari 2% (Riyanto,2014). Hasil perhitungan nilai RSD disajikan pada tabel berikut:

Tabel 3. Data Hasil Perhitungan Presisi

Replikasi	abs	x	Xr	(x-xr) ²	Sd	cv%
1	0,741	98,3668		0,069596		
2	0,752	99,7487		1,250125		
3	0,759	100,628		3,989966		
4	0,754	100		1,875229		
5	0,722	95,9798	98,63061	7,026794	2,740613	0,027787
6	0,723	96,1055		6,376181		
7	0,745	98,8693		0,056973		
8	0,746	98,9949		0,132707		
9	0,744	98,7437		0,012789		
10	0,745	98,8693		0,056973		
				Σ 20,84733		

Berdasarkan tabel di atas menunjukkan bahwa nilai RSD pada metode spektrofotometri UV-Vis sebesar 0,0278%, sehingga dapat disimpulkan bahwa spektrofotometri UV-Vis dalam keadaan baik. Menurut Harmita (2004), nilai RSD <2% menunjukkan presisi yang baik.

5. Akurasi

Akurasi merupakan ukuran yang menunjukkan derajat kedekatan hasil analisis dengan kadar analit yang sebenarnya. Akurasi dinyatakan sebagai persen perolehan kembali (*recovery*) analit yang ditambahkan (Riyanto, 2014). Berdasarkan data hasil perhitungan *recovery* yang diperoleh berkisar 88,53% - 96,45 %. Persen perolehan kembali ini dapat diterima karena memenuhi syarat akurasi yaitu pada rentang rata – rata persen perolehan kembali 80-120% (Harmita, 2004). Hal ini menunjukkan bahwa uji perolehan kembali untuk penetapan kadar flavonoid kuerstin pada daun pucuk merah dengan berbagai cara tersebut memiliki akurasi yang baik. Data perhitungan *recovery* terdapat pada tabel berikut.

Tabel 4. data hasil perhitungan akurasi

Konsentrasi (ppm)	Kadar Terhitung (ppm)	<i>Recovery</i> (%)	Rata-rata (%)
64	56,6583	88,53	96,02
64	63,5678	99,32	
64	64,0704	100,11	
80	76,8844	96,11	
80	77,1357	96,42	
80	77,3869	96,73	
96	91,3317	95,14	
96	91,5829	95,40	
96	92,5879	96,45	

6. LOD dan LOQ

Batas deteksi adalah sebagai konsentrasi analit terendah dalam sampel yang masih dapat dideteksi. LOD (*Limit of detection*) merupakan batas uji yang secara spesifik menyatakan apakah analit di atas atau di bawah nilai tertentu (Ganjar &

Rahman, 2007). Batas kuantifikasi atau LOQ merupakan konsentrasi analit terendah dalam sampel yang dapat ditentukan dengan presisi dan akurasi yang dapat diterima pada kondisi operasional metode yang digunakan (Ganjar & Rahman, 2007). Pada penelitian ini batas deteksi flavonoid kuersetin diperoleh adalah 0,0419 ppm dan batas kuantitasi flavonoid kuersetin yang diperoleh adalah 0,1269 ppm. Percobaan ini diperoleh nilai LOD dan LOQ yang memenuhi syarat karena konsentrasi larutan standar lebih besar dari nilai LOQ. Data perhitungan LOD dan LOQ terdapat pada tabel berikut:

Tabel 5. Data Hasil Perhitungan LOD dan LOQ

(X) ppm	Y	Y1 (a+b.x)	(Y-Y1) ²	SD	LOD	LOQ
50	0,368	0,3560	0,000144			
60	0,432	0,4356	0,00001296			
70	0,509	0,5152	0,00003844	0,000101032	0,0419	0,1269
80	0,582	0,5948	0,0001638			
90	0,673	0,6744	0,00000196			
100	0,766	0,7540	0,000144			
			$\Sigma = 0,00050516$			

7. Penetapan kadar flavonoid total pada pucuk merah

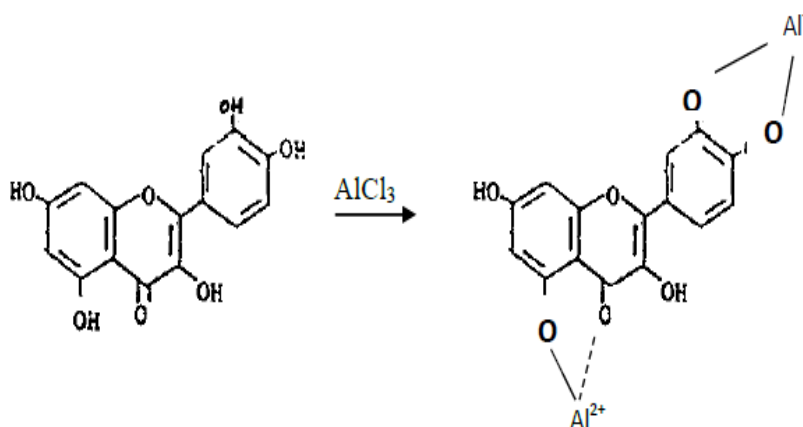
Flavonoid hampir terdapat pada semua bagian tumbuhan termasuk buah, akar, daun, dan kulit luar batang. Flavonoid merupakan senyawa alam yang berpotensi sebagai antioksidan yang dapat menangkal radikal bebas yang berperan pada timbulnya penyakit degeneratif melalui mekanisme perusakan sistem imunitas tubuh, oksidasi lipid dan protein (Rais, 2015).

Analisis kuantitatif senyawa flavonoid total dengan menggunakan spektrofotometri UV-Vis dilakukan untuk mengetahui seberapa besar kadar flavonoid total yang terkandung pada ekstrak etanol daun pucuk merah tua dan muda. Analisis flavonoid dilakukan dengan menggunakan spektrofotometri UV-

Vis karena flavonoid mengandung sistem aromatik yang terkonjugasi sehingga menunjukkan pita serapan kuat pada daerah spektrum sinar ultraviolet dan spektrum sinar tampak (Harborne, 1987).

Pengujian analisis kuantitatif dengan spektrofotometri UV-Vis digunakan larutan blanko sebagai kontrol yang berfungsi sebagai pemblank (mengkalikan nolkan) senyawa yang tidak perlu dianalisis (Basset, 1994).

Pada pengukuran senyawa flavonoid total, larutan sampel ditambahkan AlCl_3 yang dapat membentuk kompleks, sehingga terjadi pergeseran panjang gelombang ke arah *visible* (tampak) yang ditandai dengan larutan menghasilkan warna yang lebih kuning.



Gambar 4. Pembentukan senyawa kompleks quersetin-alumunium klorida

Penambahan natrium asetat yang bertujuan untuk mempertahankan panjang gelombang pada daerah *visible* (tampak) (Chang *et al*, 2002). Pelakuan inkubasi selama 28 menit sebelum pengukuran dimaksudkan agar reaksi berjalan sempurna, sehingga intensitas warna yang dihasilkan lebih maksimal (Azizah dan Faramayuda 2014).

Tabel 6. Data Hasil Perhitungan Kadar Flavonoid

Bahan Baku		Kadar Flavonoid (%)
Simplisia	Daun Muda	$0,12 \pm 0,0153$
	Daun Tua	$0,19 \pm 0,0173$
Ekstrak	Daun Muda	$0,74 \pm 0,0115$
	Daun Tua	$0,70 \pm 0,0681$

Penelitian ini diperoleh kadar flavonoid total untuk simplisia daun muda sebesar 0,12% dan simplisia daun tua sebesar 0,19%, sedangkan ekstrak daun pucuk merah muda sebesar 0,74% dan ekstrak tua sebesar 0,70%. Karena ekstrak melalui proses ekstraksi yang bertujuan untuk mengambil kandungan flavonoid kuersetin. Sedangkan pada simplisia tidak melalui proses ekstraksi sehingga kandungan flavonoid tidak tertarik sempurna oleh pelarut. Semakin tua daun maka kandungan flavonoid pada daun semakin banyak. Begitu juga sebaliknya semakin daunya muda kandungan flavonoidnya semakin sedikit. Berdasarkan analisis statistik, diperoleh bahwa simplisia daun muda dan tua pucuk merah berbeda signifikan, namun kadar flavonoid total dalam ekstrak daun muda dan daun tua pucuk merah tidak berbeda signifikan.