

BAB IV

HASIL PENELITIAN DAN PEMBAHASAN

A. Preparasi Bahan Tanaman

1. Determinasi tanaman

Determinasi merupakan tahap awal dalam penelitian yang melibatkan tanaman sebagai bahan uji. Tujuan dari determinasi tanaman adalah untuk memastikan identitas sampel dan menghindari kesalahan pengambilan sampel tanaman pucuk merah (*Syzygium myrtifolium* Walp.). Berdasarkan hasil determinasi yang dilakukan di Laboratorium Biologi, Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuana Universitas Sebelas Maret dapat dinyatakan bahwa sampel yang digunakan dalam penelitian ini adalah tanaman pucuk merah (*Syzygium myrtifolium* Walp.). Hasil determinasi tanaman pucuk merah dapat dilihat pada lampiran 1.

2. Pengumpulan bahan



(a)



(b)

Gambar 2. Daun muda (a) dan daun tua (b) tanaman pucuk merah.

(Dokumentasi Desak, 2018)

Tanaman pucuk merah yang digunakan dalam penelitian diperoleh secara acak di Karanganyar, Kabupaten Karanganyar, Jawa Tengah. Pengambilan bahan baku dilakukan dengan memilih daun yang terbaik dari tanaman. Daun muda diambil sebanyak 1200 gram dan daun tua diambil 730 gram. Pengambilan dilakukan pada pagi hari dengan tujuan untuk mempertimbangkan stabilitas kimiawi dan fisik senyawa aktif dalam simplisia terhadap panas sinar matahari. Daun yang diambil daun pucuk yang berwarna merah menyala berukuran ± 5 cm dan berwarna hijau ± 5 cm. Daun yang telah dikumpulkan kemudian dicuci bersih dengan air mengalir.

3. Hasil preparasi sampel

Daun pucuk merah yang telah dikumpulkan, dicuci bersih dengan air mengalir untuk menghilangkan pengotor yang menempel pada daun. Daun yang telah dicuci kemudian dikeringanginkan untuk menghilangkan sisa air. Selanjutnya, daun dikeringkan di oven pada suhu 50°C hingga didapatkan daun yang mudah dihancurkan. Hasil dari pengeringan ini harus dipastikan sempurna agar tidak mudah ditumbuhi jamur dan mikroorganisme. Daun yang telah kering, kemudian dilakukan penyerbukan dengan mesin penyerbuk. Penyerbukan diulang-ulang hingga didapatkan serbuk yang dapat melewati mesh 60. Proses penyerbukan dilakukan berulang-ulang agar mendapatkan ukuran partikel yang kecil sehingga luas permukaan simplisia yang bersentuhan dengan cairan penyari menjadi lebih besar dan mempermudah cairan penyari menembus simplisia. Luas permukaan yang besar akan mengoptimalkan pembasahan serbuk simplisia oleh cairan penyari sehingga hasil penyarian menjadi lebih optimal.

Tabel 1. Rendemen simplisia daun pucuk merah

Simplisia	Berat Basah (gram)	Berat Kering (gram)	Rendemen (%)
Daun Muda	1200	520	43,33
Daun Tua	730	310	42,47

4. Hasil ekstraksi

Metode ekstraksi yang dipilih pada penelitian ini adalah metode maserasi. Metode maserasi yang digunakan berdasarkan metode Kemenkes RI (2013). Metode maserasi merupakan cara cukup sederhana, mudah, dan aman digunakan untuk memisahkan senyawa yang tidak tahan terhadap pemanasan. Metode ini merupakan cara dingin dimana tidak melewati proses pemanasan, sehingga tidak merusak stabilitas dari senyawa fenolik yang ada pada daun pucuk merah. Proses maserasi dilakukan dengan merendam masing-masing 300 gram serbuk simplisia daun muda dan daun tua pucuk merah dalam etanol 96% selama 24 jam pada suhu kamar, kemudian disaring. Serbuk yang tidak tersaring selanjutnya dilakukan proses remaserasi selama 24 jam. Proses remaserasi dilakukan untuk memaksimalkan proses penyarian terhadap senyawa-senyawa yang mungkin belum tersari.

Filtrat dari proses maserasi dan remaserasi dikumpulkan kemudian diuapkan *vaccum rotary evaporator* pada suhu 50°C hingga tersisa sedikit larutan pekat. Penguapan kemudian dilanjutkan dengan menggunakan oven pada suhu 50°C hingga diperoleh rendemen ekstrak etanol daun muda pucuk merah sebesar 10,38% dan daun tua pucuk merah sebesar 26,47%. Berdasarkan tabel 2,

rendemen ekstrak daun tua lebih banyak daripada ekstrak daun muda, yang artinya kandungan senyawa dalam daun tua lebih banyak daripada daun muda.

Hasil rendemen ekstrak daun tua lebih tinggi dibandingkan dengan ekstrak daun muda. Salah satu faktor yang menyebabkan hal tersebut adalah pada daun tua pucuk merah banyak mengandung banyak klorofil yang mempunyai berat molekul kisaran 873-907 gram/ mol, sedangkan pada daun muda pucuk merah banyak mengandung antosianin yang hanya memiliki berat molekul 207,08 gram/mol (Naovi, 2017).

Tabel 2. Rendemen ekstrak daun pucuk merah

Ekstrak	Berat Simplisia (gram)	Berat Ekstrak (gram)	Rendemen (%)
Ekstrak Daun Muda	300	31,1351	10,38
Ekstrak Daun Tua	300	79,4022	26,47

5. Karakterisasi simplisia dan ekstrak

Karakterisasi simplisia bertujuan untuk menjamin keseragaman mutu simplisia agar memenuhi persyaratan standar simplisia dan ekstrak. Parameter yang digunakan pada penelitian ini adalah susut pengeringan. Pengukuran susut pengeringan dengan menggunakan *moisture balace pada suhu 105°C*. Susut pengeringan pada simplisia daun muda dan daun tua pucuk berturut-turut adalah sebesar 3,4% dan 3,1%, sedangkan pada ekstrak daun muda dan daun tua pucuk merah adalah sebesar 6,4% dan 8,3%

Penetapan susut pengeringan pada simplisia dan ekstrak merupakan salah satu persyaratan yang harus dipenuhi dalam karakterisasi tumbuhan yang

berkhasiat obat dengan tujuan dapat memberikan batas maksimal tentang besarnya senyawa yang hilang pada proses pengeringan.

Tabel 3. Susut pengeringan simplisia dan ekstrak daun pucuk merah

Sampel		Susut Pengeringan (%) \pm SD
Simplisia	Daun Muda	2,9 \pm 0,0577
	Daun Muda	2,9 \pm 0,0577
	Daun Muda	3,0 \pm 0,0577
Simplisia	Daun Tua	4,2 \pm 0,8505
	Daun Tua	5,0 \pm 0,8505
	Daun Tua	5,9 \pm 0,8505

6. Skrining fitokimia

Uji fitokimia bertujuan untuk memberikan gambaran mengenai golongan senyawa yang terkandung dalam simplisia maupun ekstrak daun pucuk merah. Hasil pemeriksaan skrining fitokimia pada simplisia maupun ekstrak menunjukkan adanya senyawa fenolik, flavonoid, tanin, dan saponin.

Tabel 4. Skrining fitokimia daun pucuk merah

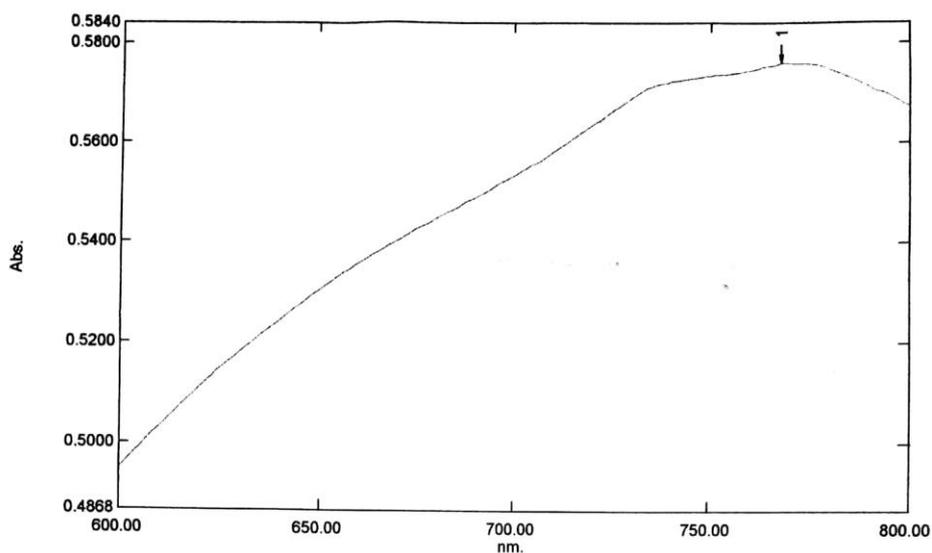
Golongan Senyawa	Hasil	
	Simplisia	Ekstrak
Alkaloid	+	+
Fenolik	+	+
Flavonoid	+	+
Tanin	+	+
Saponin	+	+

B. Perbandingan Kadar Fenolik Total Daun Muda dan Tua Tanaman Pucuk Merah

1. Optimasi metode

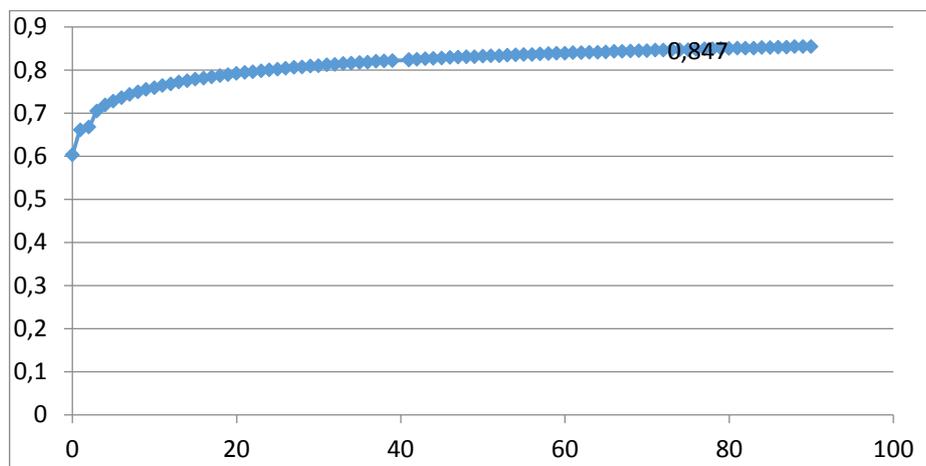
1.1 Panjang gelombang maksimum. Menurut Farmakope Herbal Indonesia (2008), panjang gelombang maksimum untuk penetapan kadar fenolik

total dengan metode Folin-Ciocalteu adalah 730 nm. *Scanning* yang telah dilakukan pada 400-800 nm didapatkan panjang gelombang maksimum 768 nm. Hasil tersebut memiliki rentan yang sangat jauh, faktor yang menyebabkan hal tersebut antara lain instrumentasi yang digunakan berbeda dan kemurnian baku asam galat yang berbeda pula.



Gambar 3. Kurva serapan asam galat.

1.2 Penentuan *operating time*. Pengukuran waktu inkubasi dilakukan dengan mereaksikan Folin-ciocalteu dengan larutan pembanding tiap 1 menit dalam jangka waktu 90 menit menggunakan spektrofotometer UV-Vis pada panjang gelombang serapan maksimum yang telah diperoleh pada pengujian sebelumnya yaitu 768 nm. Hasil *scanning* menunjukkan bahwa absorbansi stabil pada menit ke-73.



Gambar 3. Kurva hubungan waktu dan serapan asam galat.

Pemilihan waktu 90 menit untuk penentuan *operating time* dikarenakan menurut Farmakope Herbal Indonesia (2013) waktu inkubasi metode Folin-ciocalteu adalah 1 jam. Dengan memberikan rentan waktu tersebut akan dirasa cukup untuk memberikan nilai pengukuran yang stabil, karena jika waktu yang dipakai terlalu lama maka ada kemungkinan senyawa telah rusak. Tujuan penetapan *operating time* adalah untuk mendapatkan waktu pengukuran pada saat reaksi telah berjalan optimal yang ditandai dari absorbansi yang stabil, sehingga dapat memaksimalkan pengukuran. Kenaikan absorbansi secara terus-menerus dari menit ke menit tidak dapat dijadikan sebagai *operating time* karena perubahan absorbansi masih terus berjalan, sehingga pengukuran menjadi tidak maksimal jika dilakukan pada waktu tersebut. Sebaliknya ketika absorbansi mulai stabil merupakan waktu yang tepat dijadikan sebagai *operating time* (Pangestuty, 2016).

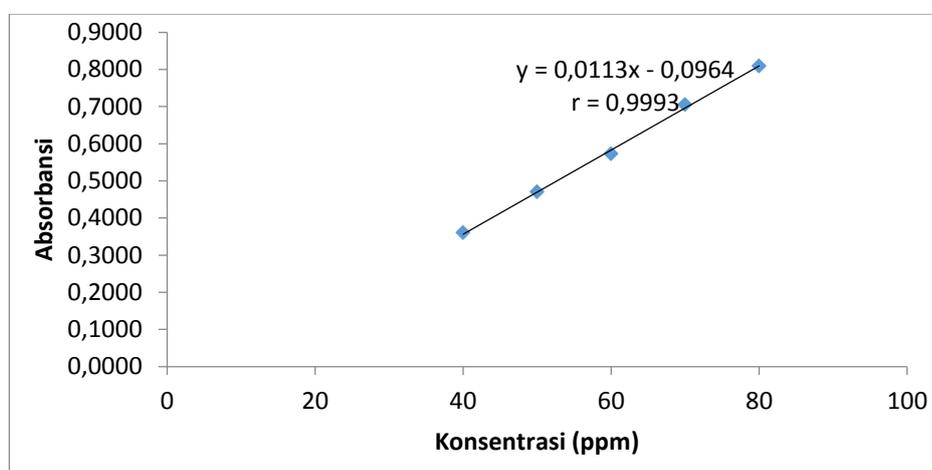
2. Pembuatan kurva baku

Pembuatan kurva baku dilakukan dengan menggunakan larutan asam galat. Larutan stok asam galat dilakukan pipetasi hingga mendapatkan baku

dengan konsentrasi 40 ppm, 50 ppm, 60 ppm, 70 ppm, dan 80 ppm. Seri konsentrasi tersebut kemudian dibaca absorbansinya pada panjang gelombang maksimum 768 nm dan waktu inkubasi selama 73 menit.

Persamaan kurva baku merupakan hubungan antara sumbu x dan sumbu y. Sumbu x dinyatakan dengan konsentrasi yang diperoleh, sedangkan sumbu y merupakan absorbansi atau serapan yang diperoleh dari hasil pengukuran.

Persamaan regresi linier dari kurva baku yang diperoleh adalah $y = 0,0113x - 0,0964$ dengan koefisien korelasi $r = 0,9993$. Harga koefisien korelasi menyatakan hubungan yang linier antara konsentrasi dengan serapan yang dihasilkan. Berdasarkan hasil r yang diperoleh bahwa koefisien korelasi memberikan hasil yang linear karena memenuhi kriteria yang dapat diterima yaitu 0,99 (Miller dkk., 2005).



Gambar 4. Grafik kurva baku asam galat

3. Validasi metode

Untuk mengetahui metode yang lebih baik untuk analisis fenolik total daun pucuk merah dilakukan validasi metode, yaitu uji linearitas, akurasi, presisi, penentuan LOD dan LOQ. Validasi terhadap suatu metode analisis menjadi faktor

penting karena hanya metode analisis yang telah dibuktikan validitasnya maka hasil pengukurannya bisa dipertanggungjawabkan dan dipergunakan sebagai landasan dalam perhitungan berikutnya (Sugihartini *et al.*, 2014).

3.1 Linearitas. Linieritas ditentukan dengan mengukur nilai absorbansi dari seri konsentrasi. Penelitian ini menggunakan baku asam galat dengan seri konsentrasi 40; 50; 60; 70; dan 80 mg/L. Berdasarkan Gambar 5, konsentrasi baku asam galat ditunjukkan oleh sumbu x, sedangkan absorbansi ditunjukkan oleh sumbu y. Kurva baku yang diperoleh pada penelitian ini yaitu a (*intercept*) adalah 0,0113x, nilai b (*slope*) adalah -0,0964, dan nilai r adalah 0,9993. Menurut Miller *et al.*, (2005) batas penerimaan nilai r atau dapat dikatakan bahwa kurab baku tersebut telah linier adalah sebesar 0,99. Berdasarkan pernyataan tersebut maka nilai r pada penelitian ini telah memenuhi syarat dan dinyatakan linier.

3.2 Akurasi.

Tabel 5. Data perhitungan *recovery*

Konsentrasi (ppm)	Absorbansi	Konsentrasi (%)	<i>Recovery</i> (%)	Rata-rata
40	0,362	40,5664	101,42	101,19%
40	0,359	40,3009	100,75	
40	0,362	40,5664	101,42	
50	0,458	49,0619	98,12	99,54%
50	0,467	49,8584	99,72	
50	0,473	50,3894	100,78	
60	0,574	59,3274	98,88	98,98%
60	0,573	59,2389	98,73	
60	0,577	59,5929	99,32	

Penentuan nilai akurasi digunakan untuk mengetahui keakuratan suatu metode pengukuran dalam analisis. Akurasi dinyatakan dengan nilai persen *recovery* analit yang dengan membuat larutan standar dengan tiga konsentrasi

berbeda. Penelitian ini menggunakan konsentrasi 40; 50; dan 60 mg/L. Menurut Harmita (2004) metode yang baik adalah metode yang memiliki nilai *recovery* antara 98% - 102%. Berdasarkan Tabel 5 tersebut, penelitian ini mempunyai nilai *recovery* (%) yang sesuai *range* di atas, sehingga dapat disimpulkan bahwa metode pada penelitian ini layak digunakan.

3.3 Presisi. Penentuan presisi dilakukan dengan menghitung nilai koefisien variasi. Koefisien variasi dihitung dengan cara membagi nilai simpangan baku dengan nilai rata – rata konsentrasi. Suatu metode dikatakan baik apabila koefisien variasinya kurang dari 2% (Harmita, 2004). Berdasarkan Tabel 7, hasil perhitungan presisi pada penelitian ini didapatkan nilai koefisien variasi yang <2%, artinya metode dapat diterima dalam penelitian ini.

Tabel 6. Data Perhitungan Presisi

Replikasi	Absorbansi	Konsentrasi (ppm)	Rata-rata (ppm)	SD	CV (%)
1	0,356	40,0354			
2	0,349	39,4159			
3	0,362	40,5664			
4	0,368	41,0973			
5	0,340	38,6195	40,1947	1,0225	0,0254
6	0,353	39,7699			
7	0,368	41,0973			
8	0,372	41,4513			
9	0,368	41,0973			
10	0,342	38,7965			

3.4 LOD dan LOQ. LOD merupakan batas konsentrasi analit dalam sampel yang masih memberikan respon signifikan, sedangkan LOQ adalah konsentrasi terendah analit yang masih memberikan hasil yang linier (Harminta, 2004). Nilai LOD dan LOQ yang diperoleh dari baku asam galat berturut-turut

adalah sebesar 2,42 ppm dan 7,32 ppm, sehingga dapat disimpulkan bahwa data pada penelitian ini dapat digunakan seluruhnya.

Tabel 7. Data LOD dan LOQ

Konsentrasi (ppm)	Absorbansi	LOD (ppm)	LOQ (ppm)
40	0,3600		
50	0,4700		
60	0,5730	2,4164	7,3225
70	0,7050		
80	0,8090		

4. Penentuan kadar fenolik total daun pucuk merah

Tabel 8. Kadar fenolik total daun pucuk merah

Sampel	Replikasi	Absorbansi	Kadar Fenolik Total (%)	Rata-Rata± SD
Simplisia	Daun Muda	1	0,2220	7,02
		2	0,2230	7,04
		3	0,2490	7,60
	Daun Tua	1	0,2650	7,97
		2	0,2720	8,12
		3	0,2910	8,53
Ekstrak	Daun Muda	1	0,4730	41,09
		2	0,4670	40,66
		3	0,5000	42,96
	Daun Tua	1	0,5280	45,11
		2	0,5410	45,98
		3	0,5610	47,25

Penentuan kadar fenolik total pada daun pucuk merah menggunakan pembandingan asam galat dan pereaksi Folin-ciocalteu pada 768 nm dan waktu inkubasi selama 73 menit. Langkah kerja penetapan kadar fenolik total dilakukan berdasarkan Farmakope Herbal Indonesia (2013). Pereaksi Folin-ciocalteu yang

mengoksidasi fenolat pada sampel serta mereduksi asam heteropoli menjadi suatu kompleks molybdeum-tungsten (Mo-W) membentuk kompleks fosfotungstat-fosfomolibdat berwarna biru. Warna biru yang terbentuk berbanding lurus dengan kadar fenolik pada sampel, semakin tua warna biru maka semakin tinggi kadar fenoliknya.

Rata-rata kadar fenolik total dihitung sebagai asam galat pada simplisia daun pucuk merah muda tua berturut turut adalah sebesar 7,22 % dan 8,20 %, sedangkan kadar fenolik total dihitung sebagai asam galat pada ekstrak daun pucuk merah muda dan tua adalah 41,57 % dan 46,11 %. Analisis statistika menggunakan metode *independent sample t-test* yang digunakan untuk menguji apakah ada perbedaan signifikan antara kadar fenolik simplisia daun muda dan daun tua pucuk merah serta kadar fenolik ekstrak daun muda dan daun tua pucuk merah. Berdasarkan hasil analisis statistik pada Lampiran 5, didapatkan hasil bahwa kadar fenolik simplisia daun tua pucuk merah lebih tinggi dan berbeda signifikan daripada daun mudanya, begitu juga pada kadar fenolik ekstrak daun tua lebih tinggi dan berbeda signifikan dengan daun mudanya.

Hasil penelitian ini didukung oleh penelitian Naovi *et al.* (2017) yang menyatakan bahwa daun tua paku laut memiliki kadar fenolik total yang lebih tinggi dibandingkan dengan daun mudanya. Hal tersebut dikarekan daun tua lebih banyak terkena sinar matahari sehingga proses metabolismenya lebih banyak daripada daun muda. Mengingat senyawa fenolik merupakan hasil metabolisme sekunder pada tumbuhan.