

BAB IV

HASIL PENELITIAN DAN PEMBAHASAN

A. Hasil identifikasi tanaman

Penelitian ini menggunakan daun jambu biji (*Psidium guajava* L). Identifikasi tanaman bertujuan untuk membuktikan bahwa tanaman yang digunakan memang benar tanaman yang dimaksud, dengan mencocokkan ciri morfologis yang terdapat pada tanaman yang diteliti dengan petunjuk identifikasi, serta menghindari kesalahan dalam pengumpulan bahan. Bagian tanaman yang digunakan untuk determinasi berupa bagian tanaman jambu biji sepanjang 10 cm dari ujung pangkal batang.

Berdasarkan hasil identifikasi tanaman yang dibuktikan dengan adanya surat keterangan dengan No. : 014656/S.Tb./VIII/2019 yang dikeluarkan oleh unit identifikasi tanaman dilakukan di Laboratorium Sistematika Tumbuhan, Fakultas Biologi, Universitas Gadjah Mada Yogyakarta. Identifikasi tanaman dapat dilihat pada Lampiran 1.

Hasil dari identifikasi yang diperoleh :

Devisi	: Tracheophyta
Sub divisi	: Spermatophytina
Kelas	: Magnoliopsida
Ordo	: Myrtales
Familia	: Myrtaceae
Genus	: <i>Psidium</i>
Spesies	: <i>Psidium guajava</i> L.
Nama lokal	: jambu biji

B. Hasil pengambilan, pengeringan, dan pembuatan serbuk daun jambu biji

Daun jambu biji yang digunakan pada penelitian ini diambil dari tanaman yang tumbuh di Karanganyar, Jawa Tengah, pada bulan Juli 2019. Bagian tumbuhan yang digunakan adalah bagian daun muda dan daun tua secara

keseluruhan. Daun jambu biji disortir, dicuci dengan air mengalir hingga bersih untuk menghilangkan kotoran yang menempel pada daun. Daun jambu biji segar yang diperoleh seberat 12000 gram. Selanjutnya, daun jambu biji yang sudah bersih dikering anginkan semalam, dimasukkan ke dalam oven dengan suhu 50°C hingga kering. Tujuan dari proses pengeringan adalah untuk menghentikan reaksi enzimatik dan mencegah tumbuhnya mikroorganisme seperti jamur dan bakteri yang dapat menyebabkan kerusakan pada sampel. Perhitungan rendemen dapat dilihat pada Lampiran 6.

Tabel 1. Hasil rendemen berat daun kering terhadap berat daun basah

Berat basah daun jambu biji (g)	Berat kering daun jambu biji (g)	Rendemen (%)
12000	2650	22,083

Setelah pengeringan, daun jambu biji digiling dan diblender menjadi serbuk halus. Kemudian diayak dengan ayakan nomor 40 dan ditimbang. Penyerbukan bertujuan untuk memperbesar luas permukaan sehingga dapat mempermudah dan mempercepat proses ekstraksi. Menurut Kumala (2007) dengan memperlebar luas permukaan maka dinding sel mulai terbuka sehingga memaksimalkan kontak antar pelarut dan sampel pada saat maserasi, sehingga memaksimalkan senyawa yang diekstrak.

Pada tahap ini juga, dilakukan pemeriksaan secara organoleptis terhadap serbuk daun jambu biji. Pemeriksaan organoleptis serbuk bertujuan untuk mengetahui bentuk fisik dari serbuk berupa bentuk, warna, bau, dan rasa. Pemeriksaan dilakukan dengan menggunakan pancaindra.

Tabel 2. Hasil pemeriksaan organoleptis serbuk daun jambu biji

Organoleptis	Hasil
Bentuk	Serbuk
Warna	Hijau tua
Bau	Khas jambu biji
Rasa	Pahit

C. Hasil penetapan kadar air serbuk daun jambu biji

Penetapan kadar air dilakukan dengan serbuk sebanyak 20 gram, dilarutkan dalam pelarut *xylene* jenuh air, dan menggunakan alat *Sterling-Bidwell*. Penetapan kadar air dilakukan untuk memberikan gambaran tingkat kelembapan serbuk yang dapat menentukan stabilitas serbuk.

Tabel 3. Hasil penetapan kadar air serbuk daun jambu biji

No.	Penimbangan (g)	Volume pada skala (ml)	Kadar air %
1	20	1,8	9
2	20	1,8	9
3	20	1,7	8,5
Rata-rata			8,83

Berdasarkan tabel 3 hasil penetapan kadar air serbuk daun jambu biji yang dilakukan 3 kali replikasi, didapatkan persentase kadar air 8,83%. Penetapan kadar air tidak boleh lebih dari 10%. Kadar air yang kurang dari 10% dapat mencegah pertumbuhan kapang dan aktivitas enzim sehingga bahan lebih awet dan kandungan zat aktifnya tidak berkurang. Perhitungan penetapan kadar air serbuk dapat dilihat pada Lampiran 4.

D. Hasil pembuatan ekstrak etanol daun jambu biji

Pembuatan ekstrak etanol 70% daun jambu biji menggunakan metode maserasi. Metode maserasi dipilih sebagai metode pembuatan ekstrak karena pengerjaannya lebih mudah dan alat yang digunakan sederhana serta efektif untuk menyari senyawa-senyawa aktif yang tidak tahan terhadap pemanasan atau senyawa yang mudah menguap. Prinsip dari metode maserasi adalah dengan cara merendam serbuk simplisia dalam cairan penyari (pelarut). Pelarut akan menembus dinding sel dan masuk ke dalam rongga sel yang mengandung zat aktif, sehingga zat aktif dapat melarut.

Pelarut yang digunakan adalah etanol 70%. Penggunaan etanol 70% dikarenakan pelarut universal yang mampu menarik senyawa polar dan nonpolar. Selain itu etanol sebagai penyari lebih selektif daripada air, dapat bercampur dengan air dan pelarut lain, dan tidak membutuhkan suhu tinggi untuk pemekatan (Pratiwi 2010).

Hasil maserasi kemudian diuapkan dengan menggunakan alat *rotary evaporator* dengan suhu 50°C dengan kecepatan 45 rpm sampai diperoleh ekstrak kental. Ekstrak kental yang dihasilkan sebanyak 185,104 gram dengan rendemen ekstrak sebesar 18,51 %. Perhitungan rendemen dapat dilihat pada Lampiran 6.

Tabel 4. Hasil rendemen ekstrak etanol daun jambu biji.

Berat serbuk (g)	Berat ekstrak (g)	Rendemen (%)
1000	185,104	18,51

Pada tahap ini juga, dilakukan pemeriksaan secara organoleptis terhadap ekstrak daun jambu biji. Pemeriksaan organoleptis ekstrak bertujuan untuk mengetahui bentuk fisik dari ekstrak berupa bentuk, warna, bau, dan rasa. Pemeriksaan dilakukan dengan menggunakan pancaindra.

Tabel 5. Hasil pemeriksaan organoleptis ekstrak daun jambu biji

Organoleptis	Hasil
Bentuk	Kental
Warna	Cokelat tua
Bau	Khas jambu biji
Rasa	Kelat

E. Hasil penetapan kadar air ekstrak etanol daun jambu biji.

Penetapan kadar air dilakukan untuk memberikan gambaran tingkat kelembapan ekstrak yang dapat menentukan stabilitas ekstrak.

Tabel 6. Hasil penetapan kadar air ekstrak etanol daun jambu biji

No.	Penimbangan (g)	Volume pada skala (ml)	Kadar air %
1	20	1,6	8
2	20	1,6	8
3	20	1,5	7,5
Rata-rata			7,8

Kadar air yang didapatkan dari ekstrak kental daun jambu biji adalah 7,8 %. Hasil ini memenuhi kriteria yang mana kurang dari 10%. Perhitungan penetapan kadar air ekstrak dapat dilihat pada Lampiran 5.

F. Hasil pembuatan fraksi-fraksi daun jambu biji

Fraksinasi bertujuan untuk menyederhanakan komponen senyawa dalam ekstrak, berdasarkan perbedaan kepolaran pelarut. Pelarut yang digunakan yaitu n-heksana, etil asetat dan air.

Pelarut n-heksana dapat melarutkan senyawa yaitu minyak atsiri, minyak lemak dan asam lemak tinggi, steroid, triterpenoid, karotenoid. Persen rendemen fraksi n-heksana yang sebesar 5,59%. Pelarut etil asetat dapat melarutkan senyawa flavonoid, alkaloid, senyawa-senyawa fenolik yaitu fenol, asam fenolat, fenil propanoid, dan antrakuinon dan xanton. Persen rendemen fraksi etil asetat yaitu

sebesar 17,69%. Air dapat melarutkan senyawa enzim, glikosida dan tanin, gula, gom, pati, protein, enzim, lilin, zat warna dan asam organik. Persen rendemen fraksi air yaitu sebesar 33,63%.

Tabel 7. Hasil rendemen fraksi-fraksi daun jambu biji.

Bobot ekstrak (g)	Bobot fraksi (g)			Rendemen (%)		
	n-heksana	Etil asetat	Air	n-heksana	etil asetat	air
10,07	0,58	1,92	3,38	5,76	19,06	33,56
10,12	0,7	1,73	3,47	6,93	17,09	34,28
10,04	0,41	1,7	3,32	4,08	16,93	33,06
Rata-rata \pm SD				5,59 \pm 1,4	17,69 \pm 1,18	33,63 \pm 0,76

Rendemen setiap pelarut berbeda karena kemampuan dari masing-masing pelarut dalam menyari senyawa yang terkandung dalam daun jambu biji berbeda. Perhitungan rendemen fraksi-fraksi daun jambu biji dapat dilihat pada Lampiran 6.

G. Hasil identifikasi golongan senyawa kimia ekstrak dan fraksi -fraksi daun jambu biji secara kualitatif

Identifikasi senyawa dalam ekstrak dan fraksi-fraksi daun jambu biji bertujuan untuk mengetahui golongan senyawa kimia yang terkandung didalamnya secara kualitatif. Identifikasi dilakukan dengan melihat adanya perubahan warna, terjadi buih atau endapan setelah diberikan pereaksi khusus dari masing-masing golongan senyawa kemudian dibandingkan dengan pustaka acuan yang ada. Identifikasi golongan senyawa kimia ekstrak etanol dan fraksi-fraksi daun jambu biji dapat dilihat pada Lampiran 7.

Tabel 8. Hasil identifikasi golongan senyawa kimia ekstrak etanol dan fraksi n-heksana daun jambu biji

Golongan senyawa	Sampel		Hasil		Pustaka
	Ekstrak etanol	Fraksi n-heksana	Ekstrak etanol	Fraksi n-heksana	
Flavonoid	Merah	Hijau	+	-	Warna merah, kuning, dan jingga pada lapisan amil alkohol (Farnsworth 1966).
Triterpenoid /steroid	Terbentuk cincin kecoklatan pada perbatasan larutan	Hijau	+	+	Positif steroid menunjukkan munculnya warna hijau-biru dan triterpenoid memberikan cincin kecoklatan atau violet pada perbatasan dua pelarut (Nugrahani <i>et al.</i> 2016).
Tanin	Hijau kehitaman	Hijau kehitaman	+	+	Biru kehitaman (tanin galat) atau hijau kehitaman (tanin katekol) (Agustina <i>et al.</i> 2016).
Saponin	Terbentuk buih	Tidak terbentuk buih	+	-	Terdapat buih (Agustina <i>et al.</i> 2016).
Alkaloid	Terbentuk endapan putih pada mayer dan endapan merah pada Dragendroff	Terbentuk endapan putih pada mayer dan endapan merah pada Dragendroff	+	+	Adanya endapan putih sampai kuning pada mayer, sedangkan endapan berwarna merah pada dragendroff (Kumoro 2015).

Berdasarkan tabel 8, didapatkan hasil identifikasi kandungan golongan senyawa kimia pada ekstrak etanol positif mengandung flavonoid, alkaloid, triterpenoid, saponin dan tanin. Pada fraksi n-heksana positif mengandung steroid, alkaloid dan tanin.

Tabel 9. Hasil identifikasi golongan senyawa kimia fraksi etil asetat dan fraksi air daun jambu biji

Golongan senyawa	Sampel		Hasil		Pustaka
	Fraksi etil asetat	Fraksi air	Fraksi etil asetat	Fraksi air	
Flavonoid	Merah	Kuning	+	+	Warna merah, kuning, dan jingga pada lapisan amil alkohol (Farnsworth 1966).
Triterpenoid /steroid	Terbentuk cincin kecoklatan	Larutan violet	+	-	Positif steroid menunjukkan munculnya warna hijau-biru dan triterpenoid memberikan cincin kecoklatan atau violet pada perbatasan dua pelarut (Nugrahani <i>et al.</i> 2016).
Tanin	Hijau kehitaman	Hijau kehitaman	+	+	Biru kehitaman (tanin galat) atau hijau kehitaman (tanin katekol) (Agustina <i>et al.</i> 2016).
Saponin	Terbentuk buih	Terbentuk buih	+	+	Terdapat buih (Agustina <i>et al.</i> 2016).
Alkaloid	Terbentuk endapan putih pada mayer dan endapan merah pada Dragendroff	Tidak terbentuk endapan putih pada mayer dan endapan merah pada Dragendroff	+	-	Adanya endapan putih sampai kuning pada mayer, sedangkan endapan berwarna merah pada dragendroff (Kumoro 2015).

Berdasarkan tabel 9, didapatkan hasil identifikasi kandungan golongan senyawa kimia pada fraksi etil asetat positif mengandung flavonoid, triterpenoid, tanin, saponin dan alkaloid. Pada fraksi air positif mengandung flavonoid tanin dan saponin.

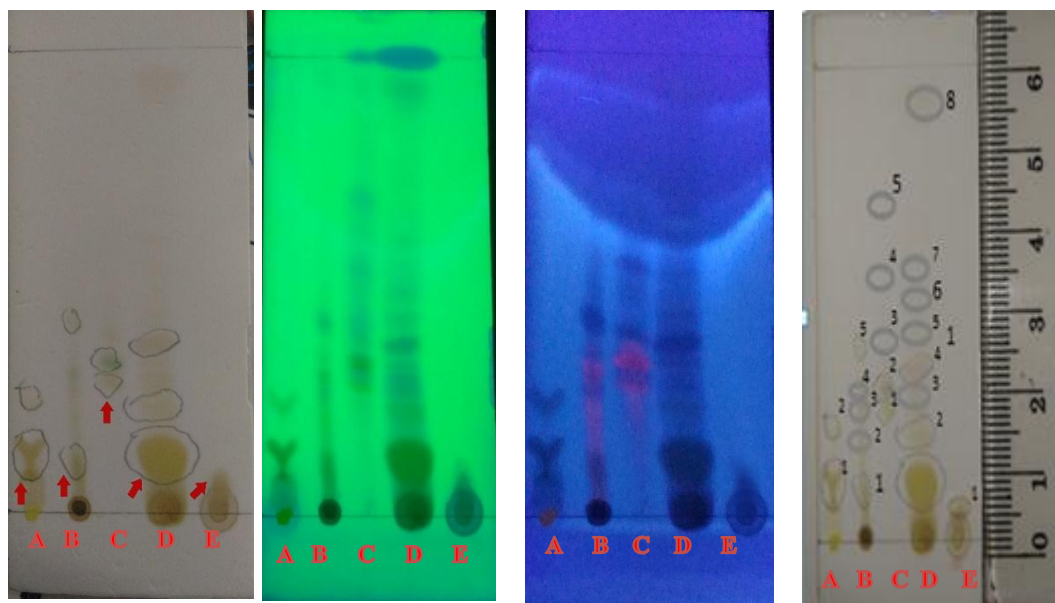
H. Hasil identifikasi golongan senyawa kimia ekstrak dan fraksi-fraksi daun jambu biji secara kromatografi lapis tipis (KLT)

Identifikasi golongan senyawa kimia ekstrak dan fraksi-fraksi daun jambu biji secara KLT menggunakan lempeng silika gel GF₂₅₄ serta menggunakan fase gerak sesuai dengan tiap golongannya. Identifikasi senyawa ini digunakan untuk mengetahui senyawa golongan yang terdapat didalam ekstrak dan fraksi-fraksi daun jambu biji yang berpotensi sebagai antikanker. Deteksi penampakan bercak menggunakan sinar UV 254 dan UV 366. Pereaksi semprot yang digunakan

adalah Sitroborat, Liebermann Burchard, FeCl_3 , dan Dragendorff. Perhitungan Rf secara rinci dapat dilihat pada Lampiran 8.

1. Hasil identifikasi golongan senyawa kimia flavonoid.

Identifikasi golongan senyawa kimia flavonoid pada ekstrak dan fraksi-fraksi daun jambu biji menggunakan fase gerak n-heksana:etil asetat:asam formiat (6:4:0,2) dan fase diam silika gel GF₂₅₄. Pemeriksaan kandungan senyawa kimia golongan flavonoid menggunakan baku pembanding adalah quercetin dan pereaksi semprot yang digunakan sitroborat. Hasil positif menunjukkan bercak berwarna kuning setelah disemprot Sitroborat.



Gambar 6. Hasil identifikasi golongan senyawa kimia flavonoid pada ekstrak dan fraksi – fraksi daun jambu biji secara KLT. Baku kuersetin (A), ekstrak etanol (B), fraksi n-heksana (C), fraksi etil asetat (D), fraksi air (E).

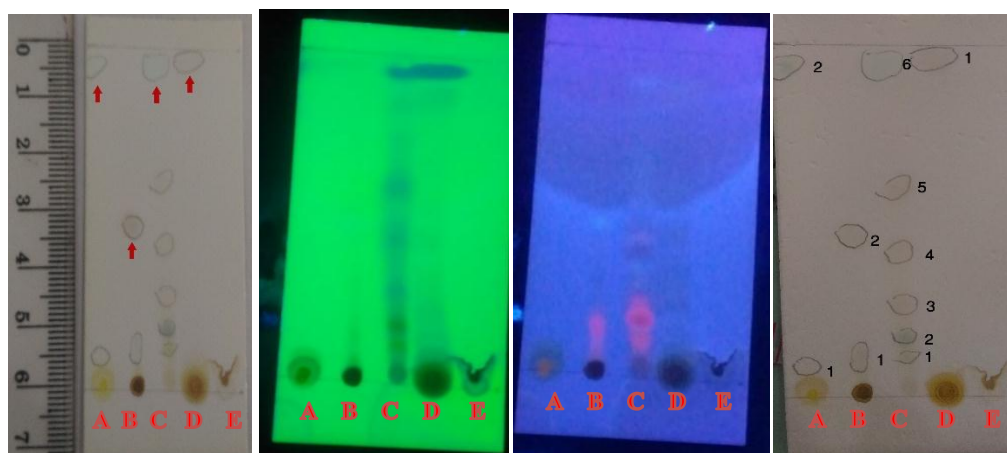
Tabel 10. Hasil identifikasi golongan senyawa kimia flavonoid pada ekstrak dan fraksi-fraksi daun jambu biji secara KLT

Sampel	Kode bercak	Rf	UV 254	UV 366	Pereaksi sitroborat	Pustaka (Depkes RI 1987)	Hasil
Kuersetin	A1	0,16	Peredaman hijau	Peredaman biru	Kuning	Kuning	+
Ekstrak	B1	0,1	Peredaman hijau	Peredaman biru	Kuning	Kuning	+
Fraksi n-heksana	C1	0,28	Peredaman biru	Floresensi merah	Hijau	Kuning	-
Fraksi etil asetat	D1	0,12	Peredaman hijau	Peredaman biru	Kuning	Kuning	+
Fraksi air	E1	0,1	Peredaman hijau	Peredaman biru	Kuning	Kuning	+

Hasil identifikasi baku kuersetin pada UV 254 menunjukkan adanya peredaman hijau, UV 366 menunjukkan bercak peredaman biru, setelah disemprot sitroborat terdapat bercak berwarna kuning dengan nilai Rf sebesar 0,16. Hasil pemeriksaan ekstrak dalam sinar UV 254 menunjukkan peredaman hijau, UV 366 menunjukkan bercak peredaman biru, setelah disemprot sitroborat terdapat bercak berwarna kuning dengan nilai Rf yaitu 0,1. Fraksi n-heksana pada UV 254 menunjukkan adanya peredaman biru, UV 366 menunjukkan bercak berfloresensi merah, setelah disemprot sitroborat terdapat bercak berwarna hijau dengan nilai Rf sebesar 0,28. Hasil identifikasi fraksi etil asetat pada UV 254 menunjukkan adanya peredaman hijau, UV 366 menunjukkan bercak peredaman biru, setelah disemprot sitroborat terdapat bercak berwarna kuning dengan nilai Rf sebesar 0,12. Hasil identifikasi fraksi air pada UV 254 menunjukkan adanya peredaman hijau, UV 366 menunjukkan bercak biru, setelah disemprot sitroborat bercak kuning. Hasil tersebut dapat disimpulkan dari identifikasi ekstrak etanol, fraksi etil asetat dan fraksi air daun jambu biji mengandung senyawa quercetin, dan senyawa golongan flavonoid. Fraksi n-heksana tidak mengandung golongan senyawa flavonoid.

2. Hasil identifikasi golongan senyawa kimia steroid/triterpenoid.

Identifikasi golongan senyawa steroid/triterpenoid pada ekstrak dan fraksi-fraksi daun jambu biji menggunakan fase gerak n-heksana:etil asetat (6:4) dan fase diam silika gel GF₂₅₄. Pemeriksaan kandungan kimia senyawa golongan steroid/triterpenoid menggunakan baku pembanding stigmasterol dan pereaksi semprot yang digunakan adalah Liebermann Burchard.



Gambar 7. Hasil identifikasi golongan senyawa kimia steroid/triterpenoid pada ekstrak dan fraksi – fraksi daun jambu biji secara KLT. Baku stigmasterol (A), ekstrak etanol (B), fraksi n-heksana (C), fraksi etil asetat (D), fraksi air (E).

Tabel 11. Hasil identifikasi golongan senyawa kimia steroid/triterpenoid pada ekstrak dan fraksi-fraksi daun jambu biji secara KLT

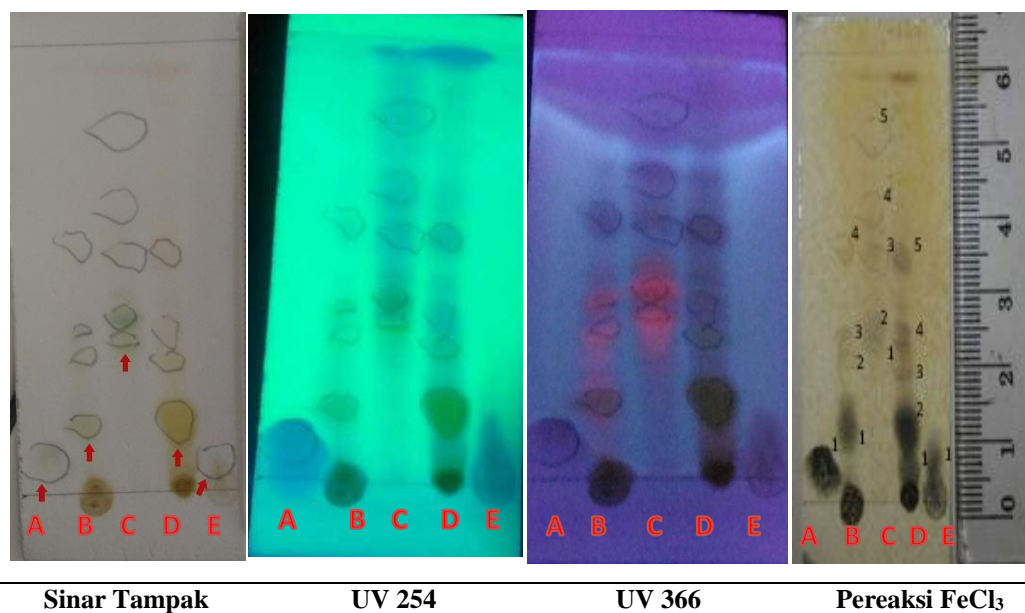
Sampel	Kode bercak	Rf	UV 254	UV 366	Pereksi Lieberman Burchard	Pustaka (Harbone 1987)	hasil
Stigmasterol	A2	0,93	Peredaman biru	Floresensi biru	Biru kehijauan	Triterpenoid merah ungu, steroid hijau-biru	+
Ekstrak etanol	B2	0,46	Peredaman	Floresensi Biru	Merah	Triterpenoid merah ungu, steroid hijau-biru	+
Fraksi n-heksana	C6	0,92	Peredaman biru	Floresensi biru	Biru kehijauan	Triterpenoid merah ungu, steroid hijau-biru	+
Fraksi etil asetat	D1	0,92	Peredaman biru	Peredaman biru	Merah	Triterpenoid merah ungu, steroid hijau-biru	+
Fraksi air	E	-	Tidak ada peredaman	Tidak berfluoresensi	Tidak terdapat bercak	Triterpenoid merah ungu, steroid hijau-biru	-

Hasil identifikasi baku stigmasterol pada UV 254 menunjukkan adanya peredaman biru, UV 366 menunjukkan bercak peredaman biru, setelah disemprot Liebermann Burchard terdapat bercak berwarna biru kehijauan dengan nilai Rf sebesar 0,93. Hasil identifikasi ekstrak etanol pada UV 254 menunjukan peredaman dan UV 366 menunjukkan bercak flouresensi biru, setelah disemprot Liebermann Burchard terdapat bercak berwarna merah dengan nilai Rf sebesar 0,46. Hasil identifikasi fraksi n-heksana pada UV 254 menunjukkan adanya

peredaman biru, UV 366 bercak flouresensi biru, setelah disemprot Liebermann Burchard terdapat bercak berwarna biru kehijauan dengan nilai Rf sebesar 0,92. Hasil identifikasi fraksi etil asetat pada UV 254 menunjukkan adanya peredaman biru, UV 366 menunjukkan bercak flouresensi biru, setelah disemprot Liebermann Burchard terdapat bercak berwarna merah dengan nilai Rf sebesar 0,92. Hasil identifikasi fraksi air pada UV 254 tidak menunjukkan adanya peredaman, UV 366 tidak menunjukkan bercak, setelah disemprot Liebermann Burchard tidak terdapat bercak, maka dalam fraksi air tidak mengandung steroid atau triterpenoid. Hasil tersebut dapat disimpulkan dari identifikasi ekstrak etanol, fraksi n-heksana, fraksi etil asetat mengandung senyawa kimia steroid/triterpenoid. Fraksi air tidak mengandung senyawa kimia steroid/triterpenoid.

3. Hasil identifikasi golongan senyawa kimia tanin.

Identifikasi golongan senyawa kimia tanin pada ekstrak dan fraksi-fraksi daun jambu biji menggunakan fase gerak n-heksana:etil asetat:asam formiat (6:4:0,2) dan fase diam silika gel GF₂₅₄. Pemeriksaan kandungan senyawa kimia golongan tanin menggunakan baku pembanding adalah asam galat dan pereaksi semprot yang digunakan untuk deteksi bercak adalah FeCl₃.



Gambar 8. Hasil identifikasi golongan senyawa kimia tanin pada ekstrak dan fraksi – fraksi daun jambu biji secara KLT. Baku asam galat (A), ekstrak etanol (B), fraksi n-heksana (C), fraksi etil asetat (D), fraksi air (E)

Tabel 12. Hasil identifikasi golongan senyawa kimia tanin pada ekstrak dan fraksi-fraksi daun jambu biji secara KLT

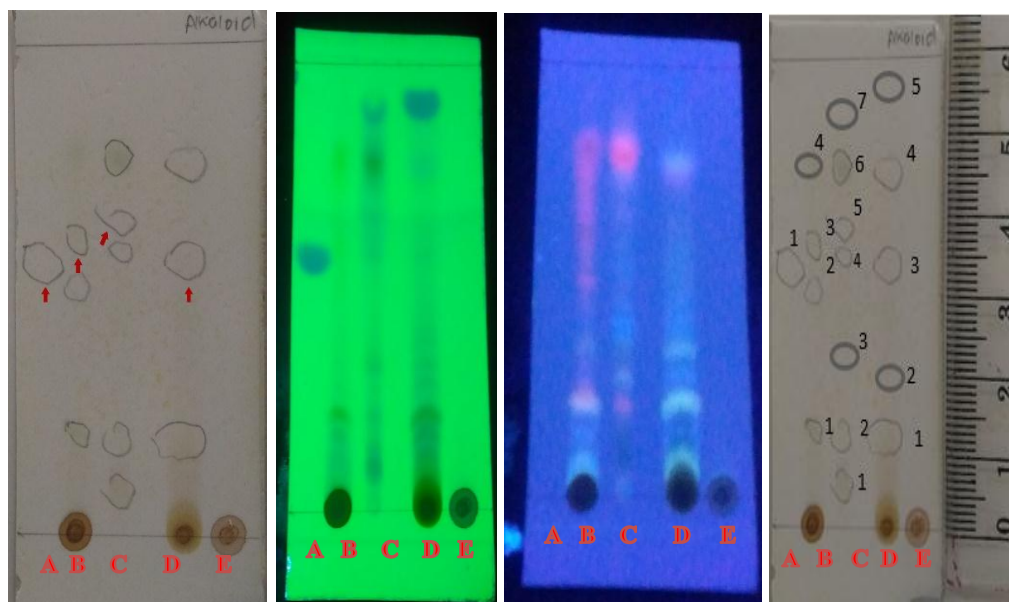
Sampel	Kode bercak	Rf	UV 254	UV 366	Pereksi FeCl_3	Pustaka (Harbone 1987)	Ket
Asam galat	A1	0,13	Peredaman biru	peredaman biru	Hijau kehitaman	Hijau kehitaman atau biru kehitaman	+
Ekstrak	B1	0,16	Peredaman hijau	Peredaman merah	Hijau kehitaman	Hijau kehitaman atau biru kehitaman	+
Fraksi n-heksana	C1	0,36	Peredaman hijau	Floresensi merah	Hijau kehitaman	Hijau kehitaman atau biru kehitaman	+
Fraksi etil asetat	D2	0,15	Peredaman hijau	Peredaman biru	Hijau kehitaman	Hijau kehitaman atau biru kehitaman	+
Fraksi air	E1	0,13	Peredaman biru	Peredaman biru	Hijau kehitaman	Hijau kehitaman atau biru kehitaman	+

Hasil identifikasi baku asam galat pada UV 254 menunjukkan adanya peredaman biru, UV 366 menunjukkan bercak perendeman biru, setelah disemprot FeCl_3 terdapat bercak berwarna hijau kehitaman dengan nilai Rf sebesar 0,13. Hasil identifikasi ekstrak etanol pada UV 254 menunjukkan adanya peredaman hijau, UV 366 menunjukkan bercak perendeman merah, setelah disemprot FeCl_3 terdapat bercak berwarna hijau kehitaman dengan nilai Rf sebesar 0,16. Hasil identifikasi fraksi n-heksana pada UV 254 menunjukkan adanya peredaman hijau, UV 366 menunjukkan bercak floresensi merah, setelah disemprot FeCl_3 terdapat bercak berwarna hijau kehitaman dengan nilai Rf sebesar 0,36. Hasil identifikasi fraksi etil asetat pada UV 254 menunjukkan adanya peredaman hijau, UV 366 menunjukkan bercak peredaman biru, setelah disemprot FeCl_3 terdapat bercak berwarna hijau kehitaman dengan nilai Rf sebesar 0,18. Hasil identifikasi fraksi air pada UV 254 menunjukkan adanya peredaman biru, UV 366 menunjukkan peredaman biru, setelah disemprot FeCl_3 terdapat bercak berwarna hijau kehitaman dengan nilai Rf sebesar 0,13. Hasil

tersebut dapat disimpulkan dari identifikasi ekstrak etanol, fraksi etil asetat, fraksi n-heksana dan fraksi air mengandung golongan senyawa kimia tanin.

4. Hasil identifikasi golongan senyawa kimia alkaloid.

Identifikasi golongan senyawa kimia alkaloid pada ekstrak dan fraksi-fraksi daun jambu biji menggunakan fase gerak Toluene:Etil asetat:Dietil amin (7:2:1) dan fase diam silika gel GF₂₅₄. Pemeriksaan kandungan senyawa kimia golongan alkaloid menggunakan baku pembanding adalah kafein dan pereaksi semprot yang digunakan untuk deteksi bercak adalah Dragendorff.



Sinar Tampak	UV 254	UV 366	Pereaksi Dragendorff
Gambar 9. Hasil identifikasi golongan senyawa kimia alkaloid pada ekstrak dan fraksi – fraksi daun jambu biji secara KLT. Baku kafein (A), ekstrak etanol (B), fraksi n-heksana (C), fraksi etil asetat (D), fraksi air (E).			

Tabel 13. Hasil identifikasi golongan senyawa kimia alkaloid pada ekstrak dan fraksi-fraksi daun jambu biji secara KLT

Sampel	Kode bercak	Rf	UV 254	UV 366	Pereksi dragendorff	Pustaka (Meiyanto 2002)	Ket
Kafein	A1	0,58	Peredaman biru	Floresensi biru	Merah	Merah bata	+
Ekstrak	B3	0,5	Peredaman biru	Floresensi Merah	Merah	Merah bata	+
Fraksi n-heksana	C4	0,58	Peredaman biru	Peredaman biru	Merah	Merah bata	+
Fraksi etil asetat	D3	0,55	Peredaman biru	Peredaman biru	Merah	Merah bata	+
Fraksi air	E	-	Tidak ada peredaman	Tidak berfloresensi	Tidak terdapat bercak	Merah bata	-

Hasil identifikasi baku kafein pada UV 254 menunjukkan adanya peredaman biru, UV 366 menunjukkan bercak floresensi biru, setelah disemprot dragendorff terdapat bercak berwarna merah dengan nilai Rf sebesar 0,58. Hasil identifikasi ekstrak etanol pada UV 254 dan UV 366 ialah menunjukkan adanya peredaman biru dan berwarna floresensi merah, disemprot Dragendorff terdapat bercak berwarna merah dengan nilai Rf sebesar 0,58. Hasil identifikasi pada fraksi n-heksana sinar UV 254 nm menunjukkan adanya peredaman biru dan UV 366 nm peredaman biru setelah disemprot dragendorff terdapat bercak berwarna merah serta nilai Rf 0,58. Hasil identifikasi fraksi etil asetat pada UV 254 menunjukkan adanya peredaman biru, UV 366 menunjukkan bercak peredaman berwarna biru, setelah disemprot dragendorff terdapat bercak berwarna merah dengan nilai Rf sebesar 0,55. Hasil identifikasi fraksi air tidak terdapat bercak pada UV 366 dan UV 254, serta tidak ada perubahan warna setelah disemprot. Sehingga dapat disimpulkan bahwa dalam fraksi air negatif mengandung alkaloid. Hasil tersebut dapat disimpulkan dari identifikasi ekstrak etanol, fraksi n-heksana dan fraksi etil asetat, mengandung kafein dan golongan senyawa kimia alkaloid.

I. Hasil uji aktivitas sitotoksik

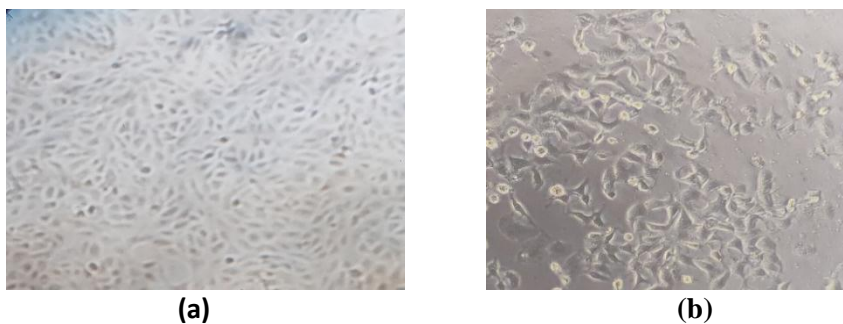
Uji sitotoksik terhadap sel MCF-7 dan sel Vero dilakukan di Laboratorium Parasitologi Fakultas Kedokteran Universitas Gadjah Mada. Uji sitotoksik adalah uji *in vitro* terhadap kultur sel yang dilakukan untuk menentukan potensi senyawa

atau ekstrak yang dapat dikembangkan sebagai obat sitotoksik. Aktivitas sitotoksik dapat dilihat dari nilai *Inhibition Concentration* (IC_{50}), menunjukkan semakin besar konsentrasi yang dapat menghambat proliferasi sel sebesar 50% sehingga dapat menunjukkan potensi ketoksikan suatu senyawa terhadap sel.

Uji sitotoksik dimulai dengan penumbuhan sel MCF-7 dalam media penumbuh. Sebelum dilakukan pengujian, mensterilisasi semua alat yang akan digunakan. Sterilisasi alat bertujuan untuk mencegah terjadinya kontaminasi karena adanya mikroorganisme pengganggu. Media penumbuh pengaktifan sel menggunakan medium berserum untuk mendapatkan jumlah sel yang cukup dengan tingkat kepadatan 70%-80% untuk dilakukan penelitian.

Medium penumbuh yang digunakan dalam kultur sel MCF-7 adalah media Dulbecco's modified Eagle's medium (DMEM). DMEM mengandung asam amino, vitamin, garam-garam anorganik, glukosa dan fenol red yang digunakan untuk pertumbuhan (Mather & Roberts 1998). Medium ini berupa buffer bikarbonat yang didesain untuk pH 7,2-7,4 pada keadaan 5% CO_2 dan 95% udara (Hogan *et al.* 1994).

FBS (*Fetal bovine serum*) sebagai serum merangsang pertumbuhan sel dan berfungsi sebagai nutrisi untuk kelangsungan hidup sel. Selain itu, terdapat Fungizone sebagai anti jamur, dan antibiotik (penicillin atau streptomycin) yang digunakan untuk mencegah terjadinya kontaminasi yang disebabkan oleh jamur atau bakteri. Penyangga ditambahkan dalam medium untuk menyeimbangkan pH, pembukaan flash menyebabkan masuknya O_2 dan meningkatkan pH. CO_2 dengan konsentrasi 5%.



Gambar 10. Hasil pengamatan sel konfluen. (a) Morfologi sel Vero. (b) Morfologi sel MCF-7

Sel diamati dibawah *microsoft inverted*. Sel Vero berbentuk lonjong dan ramping (a) dan sel MCF-7 berbentuk lonjong dan oval (b). Setelah sel konfluen, sel dikultur dengan menggunakan PBS (*Phospat Buffer Saline*) dan tripsin. PBS digunakan sebagai mengangkat sel yang mati dan larutan pencuci. PBS juga digunakan sebagai larutan pengencer, pencuci suspensi sel dan aditif sebagai media kultur sel (Sultan *et al.* 2017). Tripsin digunakan untuk melepaskan sel yang melekat dari dinding *petridisk*. Kerja tripsin di inaktivasikan dengan PBS dan media penumbuh sesuai volume awal.

Sel yang telah dipanen kemudian dilakukan perhitungan sel. Perhitungan kepadatan sel dilakukan menggunakan *heamocytometer* terdiri dari 4 ruang bilik hitung dibawah *microsoft inverted*. Sel yang dihitung adalah sel yang hidup, memiliki ciri berbentuk bulat, berwarna bening dan terdapat inti ditengahnya serta berdiri sendiri tidak bergerombol. Sel yang mati berbentuk tidak beraturan dan tidak terdapat inti ditengahnya. Perhitungan sel dimulai dari bilik kiri atas kemudian ke kanan, turun kebawah dari kanan kiri. Syarat jumlah sel setiap sumuran adalah 1×10^4 sel/100 μ l. Jumlah sel yang didapat dari perhitungan sel adalah 60×10^4 sel/ 100 μ l . jumlah suspensi sel yang diambil sebanyak 1,67 ml ditambahkan dalam 10 ml media DMEM komplite. Medium yang berisi suspensi sel didistribusikan 100 μ L ke dalam sumuran 96 *microplate*. Diinkubasi dalam inkubator CO₂ 5% selama 24 jam. Tujuan dilakukan inkubasi adalah untuk memulihkan sel setelah proses pemanenan.

Perlakuan sel MCF-7 dibagi menjadi 4 kelompok yaitu kontrol positif menggunakan Cisplatin, kontrol negatif berisi sel dan media, kontrol media berisi media saja dan sampel uji berisi sel, sampel dan media. Terdapat 4 sampel yaitu ekstrak etanol, fraksi n-heksana, fraksi etil asetat dan fraksi air daun jambu biji. Variasi konsentrasi sampel yang digunakan adalah 1000; 500; 250; 125; 62,5; 31,25; 15,625 μ g/mL. Cisplatin digunakan sebagai kontrol positif dengan variasi konsentrasi 100, 50; 25; 12,5; 6,25; 3,125; 1,5625 μ g/mL.

Cisplatin dipilih sebagai kontrol positif karena cisplatin merupakan salah satu obat kemoterapi pada pengobatan berbagai jenis kanker. Tujuan cisplatin

digunakan untuk membandingkan senyawa yang sedang diuji dengan obat tersandar. Cisplatin menghambat sel kanker dengan cara merusak DNA, menghambat mitosis, mengganggu komunikasi antar sel-sel tumor dan memicu kematian sel (Raudenska *et al.* 2019).

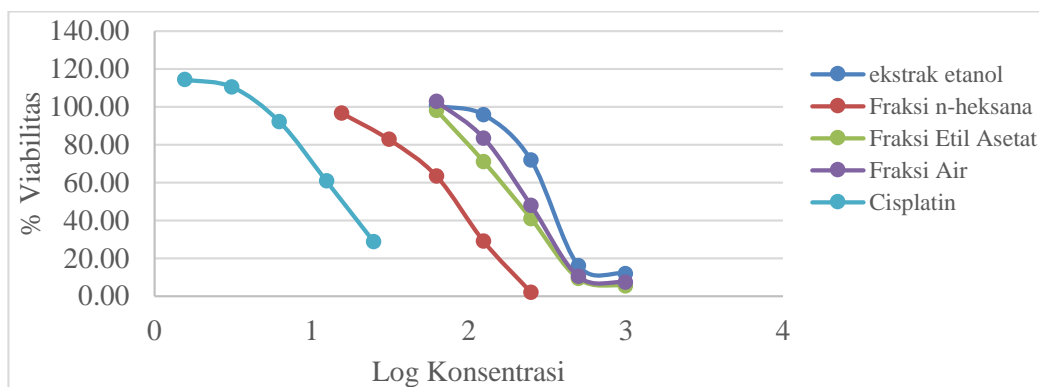
Sampel yang akan diuji dilarutkan dalam pelarut DMSO (*Dimethyl Sulfoxide*). DMSO digunakan sebagai pelarut karena merupakan pelarut yang dapat melarutkan hampir semua senyawa baik polar maupun non polar dan tidak bersifat toksik (Jamalzadeh *et al.* 2015).

Pengujaian sitotoksik ekstrak dan fraksi-fraksi daun jambu biji terhadap sel MCF-7 menggunakan metode MTT (*Microculture Tetrazolium*). Prinsip MTT (3-4,5-dimetiltiazol-2-yl)-2,5-difeniltetrazolim bromide) yaitu terjadinya reduksi garam kuning tetrazolium yang diadsorpsi dan dipecah menjadi kristal formazan oleh sistem suksinat tetrazolium reduktase yang terdapat dalam jalur respirasi sel pada mitokondria sel yang masih hidup. Kristal formazan ini memberikan warna ungu dan tidak larut dalam air (Pamilih 2009).

MTT dimasukkan ke dalam setiap sumuran lalu di inkubasi CO₂ 5% selama 4 jam. Dilihat Morfologi sel sebelum penambahan MTT dan sesudah penambahan MTT dibawah microsoft inverted, sel yang hidup akan membentuk kristal jarum warna ungu karena dapat mereduksi MTT dan sel yang mati tidak membentuk kristal formazan karena tidak dapat mereduksi MTT.

Reaksi antara MTT dengan enzim suksinat reduktase tetrazolium merupakan reaksi enzimatik yang berlangsung secara *continue* untuk menghentikan reaksi tersebut diberikan reagen stopper SDS (Sodium duodecyl sulphate) 10% dalam HCl 0,01 N didiamkan selama 24 jam pada suhu ruangan. Intensitas warna sebanding dengan jumlah sel yang hidup, sehingga jika intensitas warna ungu semakin tinggi maka jumlah sel hidup semakin banyak. Sel yang mati tidak mengalami perubahan warna. Kristal formazan yang larut dalam SDS kemudian dibaca serapannya secara spektrofotometri ELISA reader 595 nm.

Nilai absorbansi yang didapatkan, selanjutnya digunakan untuk menghitung nilai IC₅₀ dengan menggunakan Microsoft Excel (log konsentrasi vs % viabilitas).



Gambar 11. Hasil grafik interpretasi log konsentrasi vs % viabilitas sel MCF-7

Pada grafik 11. Menunjukkan persen sel hidup pada ekstrak etanol, fraksi n-heksana, fraksi etil asetat dan fraksi air daun jambu biji didapatkan semakin tinggi konsentrasi yang digunakan maka semakin kecil kehidupan sel MCF-7, sebaliknya semakin kecil konsentrasi maka semakin besar kehidupan sel MCF-7.

Tabel 14. Hasil nilai IC50 ekstrak dan fraksi-fraksi daun jambu biji terhadap sel MCF-7

Sampel Uji	Persamaan regresi linear	Nilai IC ₅₀	R
Ekstrak etanol 70%	$Y = -85,264x + 263,65$	320,440 µg/ml	0,9042
Fraksi n-heksana	$Y = -80,684x + 199,6$	71,473 µg/ml	0,9747
Fraksi etil asetat	$Y = -81,962x + 238,98$	202,163 µg/ml	0,9392
Fraksi Air	$Y = -86,346x + 256,7$	244,054 µg/ml	0,9588
Cisplatin	$Y = -73,363x + 139,64$	16,667 µg/ml	0,9307

Berdasarkan hasil diatas, nilai r merupakan koefisien korelasi yang menunjukkan hubungan linearitas atau tidaknya nilai absorbansi. Menurut Sugiyono (2018) $r = 1,00 - 0,8$ memiliki hubungan linearitas sangat kuat, $r = 0,60 - 0,79$ memiliki hubungan linearitas kuat, $r = 0,40 - 0,59$ memiliki hubungan linearitas sedang, $r = 0,2-0,39$ memiliki hubungan linearitas rendah, dan $r = 0,00 - 0,19$ memiliki hubungan linearitas sangat rendah. Koefisien korelasi memiliki nilai berkisaran antara 0 sampai dengan 1. Bila koefisien korelasi tersebut mendekati nilai 1 maka hubungan linearitas semakin kuat. Diperoleh nilai koefisien korelasi (r) ekstrak etanol, fraksi n-heksana, fraksi etil asetat dan fraksi air ($r = 0,9042, 0,9747, 0,9747, 0,9392, 0,9588$) terinterpretasi sangat kuat, hubungan antara % viabilitas sel hidup terhadap log konsentrasi sampel.

Nilai IC_{50} cisplatin lebih rendah dibandingkan ekstrak dan fraksi - fraksi daun jambu biji. Hal ini menunjukkan bahwa kemampuan cisplatin sebagai kontrol positif dalam membunuh sel MCF-7 lebih poten daripada ekstrak dan fraksi-fraksi daun jambu biji. Cara kerja cisplatin dalam menginduksi sitotoksik dengan cara merusak DNA, menghambat mitosis, mengganggu komunikasi antar sel-sel tumor dan memicu kematian sel (Raudenska *et al.* 2019) sehingga kemampuan cisplatin lebih spesifik dalam mengganggu proses terjadinya sel kanker, tetapi dengan mekanisme tersebut cisplatin juga dapat mengganggu pertumbuhan sel normal.

Menurut Prayong *et al.* 2008 senyawa dikatakan memiliki sitotoksik potensial ($IC_{50} < 100\mu\text{g/mL}$), sitotoksik moderat ($100\mu\text{g/mL} < IC_{50} < 1000\mu\text{g/mL}$) dan tidak toksik ($IC_{50} > 1000\mu\text{g/mL}$). Semakin besar nilai IC_{50} suatu senyawa maka semakin kecil aktivitas sitotoksiknya. Berdasarkan kriteria tersebut fraksi n-heksana daun jambu biji diperoleh nilai IC_{50} sebesar $71,473\ \mu\text{g/ml}$ maka memiliki aktivitas sitotoksik poten dibandingkan ekstrak etanol, fraksi etil asetat dan fraksi air daun jambu biji nilai IC_{50} sebesar $320,4401\ \mu\text{g/ml}$, $202,163\ \mu\text{g/ml}$ dan $244,054\ \mu\text{g/ml}$ yang memiliki aktivitas sitotoksik kurang poten.

Ekstrak etanol daun jambu biji dari uji KLT dan uji tabung mengandung senyawa flavonoid, tanin, triterpenoid, saponin dan alkaloid. Menurut Dwiwati (2014) ekstrak etanol 70% daun jambu biji terhadap sel kanker payudara T47D positif mengandung flavonoid, alkaloid, tanin, triterpenoid, saponin. Rendahnya sitotoksik pada ekstrak etanol disebabkan mengandung banyak senyawa polar, semipolar dan non polar yang menyebabkan kerja ekstrak dalam menghambat pertumbuhan sel kanker tidak maksimal.

Fraksi n-heksana pada penelitian ini memiliki nilai $IC_{50}\ 71,473\ \mu\text{g/mL}$ kategori sitotoksik cukup ponten. Kandungan golongan senyawa kimia pada fraksi n-heksana adalah steroid, alkaloid, dan tanin. Steroid dapat menekan pertumbuhan sel kanker dengan bertindak pada menginduksi apoptosis (Bishayee *et al.* 2011). Menginduksi apoptosis melalui penghambatan ekspresi protein Bcl-2, protein Bcl-2 merupakan protein antiapoptosis, apabila protein Bcl-2 dihambat

maka proses apoptosis pada sel kanker payudara dapat terjadi. Faktor transkripsi dari Bcl-2 adalah *nuclear factor-kappaB* (NF-kB) yang merupakan faktor transkripsi dalam peningkatan proliferasi dan inhibisi apoptosis pada sel kanker payudara, senyawa steroid memiliki kemampuan untuk menghambat aktivitas NF-kB sehingga fraksi n-heksana daun jambu biji kemungkinan bekerja pada jalur ini, Bcl-2 tidak dapat terekspresi dan akan menyebabkan kematian pada sel kanker payudara (Fitria *et al.* 2011). Pada penelitian Fitri *et al.* (2011) ekstrak etanol herba ciplukan terhadap sel MCF-7 mengandung steroid melalui penghambatan Bcl-2 serta peningkatan ekspresi p53. Pada penelitian Putram *et al.* (2017) fraksi teraktif teripang terhadap sel MCF-7 yaitu fraksi n-heksana mengandung steroid melalui menghambat mekanisme pembelahan dan memicu apoptosis.

Alkaloid dapat menekan pertumbuhan sel kanker dengan menghambat siklus sel, yaitu dengan mengikat dimer tubulin yang dapat mengganggu munculnya mikrotubul pada saat metafase, akibatnya proses mitosis sel kanker terhambat mengakibatkan sel tidak dapat berkembang biak dan menyebabkan kematian sel (Mardiyaningsih & Ismiyati 2014).

Tanin mempunyai aktivitas sebagai antiproliferasi pada sel kanker yang bekerja pada tingkat sel dengan menghambat fase “S” yaitu sintase pada saat replikasi kromosom dari siklus sel sehingga akan menyebabkan sel menjadi tidak berkembang biak, tidak tumbuh dan tidak berproliferasi dan berujung pada kematian sel (Khanbabaee & Ree 2011).

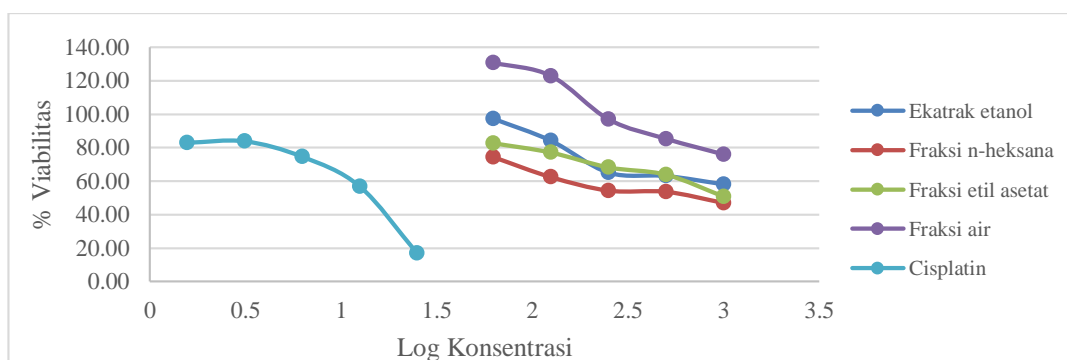
Membran sel tersusun atas dua lapis lipid atau lipid bilayer. Molekul hidrofobik dapat larut dalam membran dengan mudah. Struktur lipid bilayer memiliki sifat selektif permeable pada membran. Faktor-faktor yang mempengaruhi cepat lambatnya suatu molekul melewati membrane sel ialah kelarutan. Senyawa-senyawa yang larut dalam lemak lebih mudah menerobos masuk ke dalam membrane sel dibandingkan dengan senyawa-senyawa yang tidak larut dalam lemak. Sebagian besar membran sel tersusun atas lipida, maka senyawa-senyawa yang dapat larut dalam pelarut n-heksana dapat menembus masuk ke dalam membran sel kanker sehingga senyawa tersebut menyerang dan

menghambat proliferasi dan menginduksi apoptosis dari sel kanker payudara (Hamzah 2017).

J. Hasil uji indeks selektivitas

Indeks selektivitas adalah tingkat keamanan dari suatu senyawa yang memiliki aktivitas toksik terhadap sel kanker tetapi tidak toksik terhadap sel normal. Apabila indeks selektivitas lebih tinggi dari 3 (>3) menunjukkan bahwa obat atau ekstrak memiliki selektivitas yang tinggi dan kurang dari 3 (<3) dianggap dapat memberi toksisitas umum dan juga menyebabkan sitotoksitas pada sel normal (Sutejo *et al.* 2016).

Penelitian ini menggunakan sel vero sebagai sel normal. Sel vero merupakan sel epitel non kanker yang berasal dari organ ginjal monyet hijau Afrika. Sel vero dapat digunakan untuk mengetahui pengaruh suatu zat, toksin maupun bahan kimia terhadap sel mamalia secara molekuler. Adanya sel vero dalam penelitian ini untuk mendapatkan senyawa antikanker baru yang hanya membunuh sel kanker (selektif). Nilai absorbansi yang didapatkan, selanjutnya digunakan untuk menghitung % viabilitas sel hidup dan nilai IC_{50} dengan menggunakan Microsoft Excel (log konsentrasi vs % viabilitas).



Gambar 12. Hasil grafik interpretasi log konsentrasi vs % viabilitas sel Vero

Persentase viabilitas sel menunjukkan kehidupan sel setelah perlakuan. Berdasarkan hasil grafik diatas menunjukkan aktivitas ekstrak, fraksi n-heksana, fraksi etil asetat dan fraksi air terhadap sel Vero menunjukkan penurunan persentase kehidupan sel dengan penambahan konsentrasi. Cisplatin sebagai

kontrol positif juga menunjukkan penurunan persentasi kehidupan sel dengan penambahan konsentrasi. Hasil indeks selektivitas dapat dilihat pada tabel 16.

Tabel 15. Hasil nilai IC₅₀ ekstrak dan fraksi-fraksi daun jambu biji terhadap sel Vero

Sampel Uji	Persamaan regresi linear	Nilai IC ₅₀	R
Ekstrak etanol 70%	$Y = -32,941x + 152,55$	1297,603 µg/ml	0,9024
Fraksi n-heksana	$Y = -21,08x + 108,73$	609,531 µg/ml	0,9166
Fraksi etil asetat	$Y = -25,54x + 129,85$	1338,037 µg/ml	0,9722
Fraksi Air	$Y = -48,809x + 219,41$	2957,17 µg/ml	0,9648
Cisplatin	$Y = -52,883x + 105,13$	11,0278 µg/ml	0,8079

Selektivitas suatu obat dapat digunakan untuk mengetahui baik atau tidaknya suatu obat serta keamanannya. Oleh karena itu, maka perlu dilakukan penentuan nilai indeks selektivitas (IS). Indeks selektivitas dihitung dengan membandingkan nilai IC₅₀ sel Vero terhadap IC₅₀ sel MCF-7.

Tabel 16. Hasil uji Indeks selektivitas

	IC ₅₀ sel MCF-7	IC ₅₀ sel Vero	Indeks selektivitas
Ekstrak etanol 70%	320,440 µg/ml	1297,603 µg/ml	4,04
Fraksi n-heksana	71,473 µg/ml	609,531 µg/ml	8,52
Fraksi etil asetat	202,163 µg/ml	1338,037 µg/ml	6,6
Fraksi air	244,054 µg/ml	2957,17 µg/ml	12,11
Cisplatin	16,667 µg/ml	11,0278 µg/ml	0,67

Efek sitotoksik terhadap sel Vero berdasarkan nilai indeks selektivitas menunjukkan bahwa ekstrak etanol 70%, fraksi n-heksana, fraksi etil asetat dan fraksi air memiliki nilai indeks selektivitas (>3) memiliki selektivitas yang tinggi yang berarti merusak secara selektif sel kanker yang berbahaya tanpa mengganggu sel normal. Cisplatin memiliki indeks selektivitas $0,67 < 3$ tidak selektif terhadap sel Vero, sehingga menyebabkan toksisitas umum dan juga menyebabkan sitotoksik terhadap sel normal. Perhitungan indeks selektivitas dapat dilihat pada lampiran 15.