

**Uji Fitokimia Ekstrak n-Heksana Daun Belimbing Wuluh (*Averrhoa bilimbi* L.)**Reni Tri Febriyanti¹, Haeruddin^{2*}, La Rudi²¹Alumni Program Studi Pendidikan Kimia FKIP Universitas Halu Oleo, Kendari²Pengajar Program Studi Pendidikan Kimia FKIP Universitas Halu Oleo, Kendari(*) Corresponding author: haeruddinkmia658@gmail.com**Article History**

Received:

Revised:

Published:

Abstract

Research has been carried out "Phytochemical Test and Antioxidant Activity of n-Hexane Extract of Belimbing Wuluh Leaves (*Averrhoa bilimbi* L.)". This study aims to determine the class of secondary metabolites contained in starfruit leaves (*Averrhoa bilimbi* L.) which were extracted using n-hexane as solvent and to determine the antioxidant activity of starfruit leaves (*Averrhoa bilimbi* L.) which were extracted using n-hexane as solvent. The secondary metabolite compounds contained in starfruit leaves (*Averrhoa bilimbi* L.) were determined by the phytochemical method, while the antioxidant activity was determined by the 2,2-Diphenyl-1-Picrylhydrazine (DPPH) method. This study began with sample extraction using the soxhletation method, respectively 15 and 20 g of dried and mashed starfruit leaves, then soxhletated for 3-4 hours with n-hexane as solvent. The extraction was carried out for 7 repetitions so that the total sample of starfruit leaves extracted was 110 g. The extract resulting from soxhletation was then collected and concentrated to obtain a thick extract. The viscous extract obtained was then subjected to phytochemical tests and DPPH tests. Phytochemical test results showed that starfruit leaves extracted using n-hexane as solvent by soxhletation method only contained steroids. Starfruit leaf extract which was extracted using n-hexane solvent by soxhletation method had very weak antioxidant activity with an IC_{50} value of 3,229,213 ppm.

Keywords: Starfruit Leaves (*Averrhoa bilimbi* L.), n-Hexane, Socletasi, Phytochemicals, Antioxidants, DPPH

1. PENDAHULUAN

Bahan alam didefinisikan sebagai bahan yang berasal dari alam yang meliputi tumbuhan (hasil hutan dan budidaya pertanian), hewan (mamalia dan unggas) dan bahan mineral (bahan tambang). Tumbuhan merupakan sumber bahan alam yang paling banyak digunakan. Bahan alam pada umumnya mengacu ke senyawa metabolit sekunder (Puspitasari, 2018). Senyawa metabolit sekunder adalah senyawa kimia yang terbentuk dalam tanaman, yang merupakan senyawa-senyawa hasil biosintetik turunan dari metabolit primer yang diproduksi oleh organisme melalui metabolisme sekunder. Senyawa metabolit sekunder pada tumbuhan dapat berfungsi sebagai senyawa racun untuk pertahanan, dan zat pewarna untuk menarik spesies lain (Saputra, et al., 2018). Beberapa golongan senyawa metabolit sekunder adalah alkaloid, terpenoid, flavonoid, steroid dan lain-lain. Metabolit sekunder dalam bidang farmakologi dapat dimanfaatkan, diantaranya sebagai antioksidan, antibiotik, antikanker, dan antikoagulan darah (Mustarichie, et al., 2013). Bahan alam yang mengandung senyawa metabolit sekunder salah satunya adalah tumbuhan belimbing wuluh (*Averrhoa bilimbi* L.).

Belimbing wuluh (*Averrhoa bilimbi* L.) merupakan tumbuhan yang berasal dari Kepulauan Maluku (Thomas, 2007). Tumbuhan ini dapat hidup diketinggian 5 - 500 m di atas permukaan laut. Tumbuhan ini sering juga disebut belimbing sayur atau belimbing asam karena memiliki rasa yang cukup asam. Di beberapa daerah di Indonesia, tumbuhan ini dikenal dengan nama Limeng, Selimeng, Thilimeng (Aceh); Balimbing (Lampung); Blimbing Buloh (Bali) dan Takule (Sulawesi Tenggara, khususnya Suku Tolaki). Bagian tumbuhan belimbing wuluh yang sudah sering dimanfaatkan oleh masyarakat yaitu pada bagian daun. Daun belimbing wuluh selain digunakan sebagai penyedap rasa juga dapat digunakan sebagai obat batuk, obat kompres pada sakit gondokan, obat rematik, antidiare (Nur dan Desi, 2019); mengobati demam (Yanti dan Yulia, 2019) serta sebagai obat alternatif pada penyakit diabetes (Kumar et al., 2013). Berdasarkan pengalaman masyarakat di Sulawesi Tenggara,

daun belimbing wuluh sering dimanfaatkan sebagai obat untuk menurunkan tekanan darah pada penderita hipertensi dan obat batuk.

Data mengenai kandungan senyawa metabolit sekunder pada daun belimbing wuluh sebelumnya telah dilaporkan oleh Yanti dan Yulia (2019) dimana daun belimbing wuluh yang diekstraksi menggunakan teknik maserasi dengan pelarut metanol yang kemudian dipartisi dengan pelarut etil asetat dan n-heksana menunjukkan bahwa golongan senyawa metabolit sekunder yang terdapat dalam ekstrak daun belimbing wuluh meliputi alkaloid, flavonoid, saponin, tanin, dan steroid. Kemudian Novitri et al., (2020) juga melaporkan bahwa daun belimbing wuluh yang diekstraksi dengan pelarut etanol 70% mengandung golongan senyawa flavonoid, alkaloid, saponin, tanin, glikosida dan terpenoid. Selain itu, Hasim et al., (2019) juga melaporkan bahwa daun belimbing wuluh yang diekstraksi menggunakan teknik maserasi dengan pelarut etanol 70 % menunjukkan bahwa kandungan senyawa metabolit sekunder yang terdapat dalam ekstrak etanol daun belimbing wuluh meliputi saponin, tanin, steroid, flavonoid dan alkaloid. Adapun Aktivitas antioksidan dari ekstrak etanol daun belimbing wuluh yang dilaporkan oleh (Hasim, *et al.*, 2019) mempunyai nilai IC50 sebesar $16,99 \pm 0,12 \mu\text{g/ml}$ yang termasuk dalam tingkat kekuatan aktivitas antioksidan sangat kuat.

Informasi kandungan senyawa metabolit sekunder dan aktivitas antioksidan daun belimbing wuluh yang menggunakan teknik ekstraksi panas serta menggunakan pelarut n-heksana dalam proses ekstraksinya belum ada yang melaporkan. Mengingat kebiasaan masyarakat Sulawesi Tenggara yang mengkonsumsi daun belimbing wuluh yang diolah dengan cara panas yaitu dengan merebus daun belimbing wuluh dalam pelarut air hingga mendidih, sehingga pemilihan ekstraksi yang digunakan dalam penelitian ini adalah metode Soxhletasi dengan menggunakan n-heksana sebagai pelarutnya. Mengingat pemilihan pelarut berdasarkan kelarutan dan polaritasnya memudahkan pemisahan suatu zat aktif atau komponen dari dalam sampel (Istiqomah, 2013), dimana penggunaan pelarut metanol dan etanol dapat melarutkan senyawa-senyawa yang bersifat polar dan nonpolar sedangkan penggunaan n-heksana hanya dapat melarutkan senyawa nonpolar. Sehingga penggunaan pelarut n-heksana dalam proses ekstraksi daun belimbing wuluh diharapkan dapat mengekstrak senyawa-senyawa nonpolar dari daun belimbing wuluh yang bersifat aktif sebagai antioksidan. Berdasarkan latar belakang tersebut, maka dilakukan penelitian dengan judul Uji Fitokimia dan Aktivitas Antioksidan Ekstrak n-Heksana Daun Belimbing Wuluh (*Averrhoa bilimbi L.*). Penelitian ini tujuan untuk mengetahui golongan senyawa metabolit sekunder serta aktivitas antioksidan daun belimbing wuluh (*Averrhoa bilimbi L.*) yang diekstraksi menggunakan pelarut n-Heksana.

2. METODE PENELITIAN

2.1 Alat dan Bahan

2.1.1 Alat

Alat yang digunakan adalah blender, gelas beaker dengan berbagai ukuran, gelas ukur dengan berbagai ukuran, corong pisah, labu ukur 100 mL, gelas arloji, timbangan mettler, vacuum rotary evaporator, water bath, erlenmeyer, spatula, cawan porselin, rak tabung, tabung reaksi, pipet tetes, kuvet, dan satu set alat UV-Vis.

2.1.2 Bahan

Bahan yang digunakan untuk uji fitokimia adalah Reagen Mayer, Reagen Wagner, Reagen Dragendorff, Lieberman-Burchard, H_2SO_4 pekat, Besi (III) Klorida 10%, Asam asetat glasial, Logam Mg, FeCl_3 5%. Untuk bahan yang digunakan saat uji aktivitas antioksidan berupa DPPH, Etanol p.a, dan Asam askorbat (vitamin C).

2.2 Prosedur Kerja

2.2.1 Preparasi Sampel

Sampel daun tumbuhan belimbing wuluh yang diambil dari Puuwatu dibersihkan agar bebas dari kotoran-kotoran yang bisa saja menempel pada daun kemudian dibiarkan kering di udara pada suhu kamar, pengeringan ini bertujuan untuk mengurangi kadar air dalam sampel sampai batas dimana mikro organisme dan kegiatan enzim yang dapat menyebabkan pembusukan akan terhenti, dengan demikian sampel yang dikeringkan dapat mempunyai waktu simpan yang lama (Riansyah dkk, 2013). Setelah kering, sampel dihaluskan hingga diperoleh serbuk daun belimbing wuluh tujuannya untuk memperoleh partikel yang lebih homogen dan lebih kecil, yang mengarah ke kontak permukaan yang lebih baik dengan pelarut saat proses ekstraksi.

2.2.2 Pembuatan Pereaksi Uji Fitokimia

Pada pembuatan pereaksi uji fitokimia terdapat pereaksi mayer, pereaksi wagner, pereaksi dragendorff, dan pereaksi Lieberman-Burchard.

- a. Pereaksi Mayer, sebanyak 1,36 gram $HgCl_2$ dilarutkan dalam 60 mL aquades (larutan I). Sebanyak 5 gram KI dilarutkan dalam 100 mL aquades (larutan II). Kedua larutan (larutan I dan II) dicampur lalu diencerkan sampai 50 mL (Moelyono, 1996).
- b. Pereaksi Wagner, sebanyak 1 gram I_2 dan 2 gram KI dilarutkan dalam air hingga 50 mL (Rivai et al., 2010).
- c. Pereaksi Dragendorff, sebanyak 2,72 gram KI dilarutkan dalam 100 mL aquades, kemudian ditambahkan 1 gram $Bi(NO_3)_3$ dan 20 mL HNO_3 (Harborne, 1996).
- d. Pereaksi Liebermen-Burchard, dicampurkan 4 tetes H_2SO_4 pekat (98%) dengan 5 tetes larutan asam asetat glasial (Moelyono, 1996).

2.2.3 Ekstraksi Sampel Metode Sokletasi

Serbuk halus daun belimbing wuluh (*Averrhoa bilimbi L.*) ditimbang sebanyak 15 dan 20 g daun belimbing wuluh yang telah kering dan dihaluskan kemudian disokletasi selama 3-4 jam dengan pelarut n-heksana. Ekstraksi dilakukan sebanyak 7 kali pengulangan sehingga total sampel daun belimbing wuluh yang diekstraksi sebanyak 110 g. 50 gram. Alat sokletasi dipasang. Serbuk daun belimbing wuluh (*Averrhoa bilimbi L.*) dibungkus dengan kertas saring dan diikat dengan benang, kemudian dimasukkan ke selongsong pada alat sokhlet. Pelarut etanol sebanyak 250 mL dimasukkan kedalam labu alas bundar. Sokletasi dilakukan selama 9 jam sampai tetesan siklus berubah warna. Ekstrak yang diperoleh diuapkan pelarutnya dengan vakumrotary evaporator dan diuapkan kembali di water bath sehingga didapatkan ekstrak kental daun belimbing wuluh (Laksmiani dkk., 2020).

2.2.4 Uji Golongan Senyawa Metabolit Sekunder Ekstrak n-Heksana Daun Belimbing Wuluh (*Averrhoa bilimbi L.*)

Uji fitokimia meliputi uji alkaloid, uji flavonoid, uji saponin, uji triterpenoid, uji steroid, dan uji tanin. Uji ini dilakukan untuk mengidentifikasi senyawa metabolit sekunder yang terdapat pada ekstrak etanol daun belimbing wuluh (*Averrhoa Bilimbi L.*).

- a. Uji Alkaloid, sebanyak 1 mL ekstrak kental etanol daun belimbing wuluh (*Averrhoa bilimbi L.*) ditambahkan 10 mL kloroform amoniakal. Kloroform amoniakal dibuat dari kloroform dan amoniak pekat dengan perbandingan 9:1. Kemudian ditambahkan asam sulfat 2 N lalu dimasukkan dalam corong pisah dan dikocok kuat-kuat, dibiarkan hingga larutan terbentuk menjadi dua lapisan. Lapisan asam sulfat diambil dan dibagi 3 tabung, lalu masing-masing tabung diuji dengan: Pereaksi Mayer, terdapat endapan putih menunjukkan positif ada alkaloid. Pereaksi Wagner, terdapat endapan coklat menunjukkan positif ada alkaloid. Pereaksi Dragendrof, terdapat endapan coklat kemerahan menunjukkan positif ada alkaloid (Harborne, 1987).
- b. Uji Flavonoid, sebanyak 1 mL daun belimbing wuluh ditambahkan serbuk magnesium 0,1 mg dan 10 tetes HCl pekat (pereaksi shinoda), bila bereaksi positif akan menghasilkan larutan berwarna jingga, merah muda atau merah (Harborne, 1987).
- c. Uji Saponin, sebanyak 1 mL ekstrak etanol daun belimbing wuluh (*Averrhoa bilimbi L.*) dimasukkan dalam tabung reaksi. Kemudian ditambahkan 2 mL aquades, lalu dikocok sampai homogen. Setelah itu, dipanaskan selama 2-3 menit. Dinginkan, setelah dingin kocok dengan kuat. Adanya busa yang stabil selama 30 detik menunjukkan sampel mengandung saponin (Harborne, 1987).
- d. Uji Steroid dan Triterpenoid, sebanyak 1 mL sampel dicampurkan dengan 2 mL kloroform, 10 tetes asam asetat glasial dan 5 tetes asam sulfat pekat (pereaksi Lieberman-Burchard) Reaksi positif adanya steroid ditunjukkan dengan terbentuknya larutan berwarna biru atau hijau dan merah jingga atau ungu menunjukkan adanya triterpenoid (Harborne, 1987).
- e. Uji Tanin, sebanyak 1 mL sampel ekstrak etanol daun belimbing wuluh (*Averrhoa Bilimbi L.*) ditambahkan beberapa larutan $FeCl_3$ 5% bila bereaksi positif akan menghasilkan warna hijau, merah, ungu, atau hitam yang kuat (Harborne, 1987).

2.2.5 Uji Aktivitas Antioksidan Ekstrak n-Heksana Daun Belimbing Wuluh (*Averrhoa bilimbi L.*)

Uji antioksidan ekstrak n-heksana daun belimbing wuluh (*Averrhoa bilimbi L.*) dilakukan dengan menggunakan metode 2,2 *Diphenyl-1-Picrylhydrazil* (DPPH).

- a. Pembuatan Larutan DPPH, Pembuatan larutan DPPH berdasarkan metode yang telah dilakukan oleh Fitriyanti *et al.*, (2019). Sebanyak 19,71 mg serbuk DPPH dilarutkan dalam 100 mL etanol p.a sehingga diperoleh larutan DPPH 0,5 mM.
- b. Pembuatan Larutan Blanko DPPH, Pembuatan larutan blanko DPPH berdasarkan metode yang telah dilakukan oleh Dali, *et al.* (2017). Sebanyak 1 mL larutan DPPH 0,5 mM ditambahkan 3 mL etanol p.a. kemudian larutan dikocok sampai homogen. Selanjutnya larutan diinkubasi selama 30 menit pada suhu 37°C.
- c. Penentuan Panjang Gelombang Maksimum Larutan DPPH, Penentuan panjang gelombang maksimum larutan DPPH berdasarkan metode yang telah dilakukan oleh Fitriyanti *et al.* (2019). Larutan DPPH 0,5 mM diukur absorbansinya dengan spektrofotometer UV-Vis pada panjang gelombang 510-520 nm, Pengambilan rentang panjang gelombang tersebut didasarkan pada serapan untuk komplemen warna DPPH, yaitu ungu tua.
- d. Pembuatan Larutan Induk Ekstrak *n*-Heksana Daun Belimbing Wuluh, Pembuatan larutan Induk Ekstrak *n*-Heksana Daun Belimbing Wuluh berdasarkan metode yang telah dilakukan oleh Dali, *et al.* (2017). Larutan induk Ekstrak *n*-Heksana Daun Belimbing Wuluh dibuat dalam konsentrasi 1000 ppm, pembuatan larutan dilakukan dengan cara menimbang sebanyak 0,05 g ekstrak kental *n*-heksana daun belimbing wuluh dilarutkan dalam 50 mL etanol p.a. Kemudian larutan dikocok sampai homogen.
- e. Pembuatan Larutan Seri Ekstrak *n*-Heksana Daun Belimbing Wuluh, Larutan seri ekstrak *n*-Heksana daun belimbing wuluh dibuat dalam konsentrasi 500, 600, 700, 800, dan 900 ppm, pembuatan larutan dilakukan dengan cara memipet sebanyak 5, 6, 7, 8, dan 9 mL larutan induk ekstrak *n*-Heksana daun belimbing wuluh kemudian dimasukkan dalam labu ukur 10 mL lalu ditambahkan etanol p.a sampai tanda garis, kemudian larutan dikocok sampai homogen (Dali, *et al.*, 2017).
- f. Pembuatan Larutan Induk Vitamin C, Pembuatan larutan induk vitamin C berdasarkan metode yang telah dilakukan oleh Fitriyanti *et al.* (2019). Larutan induk vitamin C dibuat dalam konsentrasi 100 ppm, pembuatan larutan dilakukan dengan cara menimbang vitamin C sebanyak 5 mg kemudian dilarutkan dalam 50 mL etanol p.a. dalam labu takar 50 mL hingga batas tera. kemudian larutan dikocok sampai homogen sehingga didapatkan larutan 100 ppm (Fitriyanti *et al.*, 2019).
- g. Pembuatan Larutan seri Vitamin C, Pembuatan Larutan seri Vitamin C dibuat dalam konsentrasi 1, 2, 3, 4, dan 5 ppm, pembuatan larutan dilakukan dengan cara memipet sebanyak 0,1, 0,2, 0,3, 0,4 dan 0,5 mL larutan induk vitamin C kemudian dimasukkan dalam labu ukur 10 mL lalu ditambahkan etanol p.a sampai tanda tera, kemudian larutan dikocok sampai homogen (Fitriyanti *et al.*, 2019).
- h. Pengukuran absorbansi penangkapan radikal bebas dengan metode DPPH, Pengukuran absorbansi penangkapan radikal bebas dengan metode DPPH berdasarkan metode yang telah dilakukan oleh Dali, *et al.* (2017). Larutan seri sampel dan larutan seri pembanding vitamin C masing-masing dipipet sebanyak 4 mL lalu ditambahkan 1 mL DPPH 0,5 mM, kemudian larutan dikocok sampai homogen. Selanjutnya larutan diinkubasi selama 30 menit pada suhu 37°C. Absorbansi larutan masing-masing diukur pada panjang gelombang maksimum DPPH 0,5 mM yang telah diperoleh sebelumnya pada penentuan panjang gelombang maksimum larutan DPPH.

2.2.6 Analisis Data

a. Data Uji Fitikimia

Tabel 1. Hasil uji fitokimia ekstrak n-heksana daun belimbing wuluh (*Averrhoa Bilimbi L.*)

Senyawa Uji	Pereaksi/ Perlakuan	Indikator	Hasil Pengamatan	Keterangan
Alkaloid	Ekstrak + pereaksi Mayer	Positif (+) jika ada endapan putih		
	Ekstrak + pereaksi Wagner	Positif (+) jika ada endapan coklat		
	Ekstrak + pereaksi Dragendorf	Positif (+) jika ada endapan coklat kemerahan		
Flavonoid	Ekstrak + 0,01 g logam Mg + 1 mL HCl 2N	Positif (+) jika terjadi perubahan warna menjadi merah muda atau ungu		
Steroid	Ekstrak + pereaksi Lieberman- Burchard	Positif (+) jika terjadi perubahan warna menjadi hijau kebiruan; ada endapan hijau kebiruan		
Terpenoid	Ditambahkan pereaksi Liebermen- Burchard	Positif (+) jika terjadi perubahan warna ungu		
Saponin	Ekstrak + 5 mL aquades lalu dikocok kuat	Positif (+) jika terbentuk busa selama 1 menit		
Tanin	Ekstrak + 1 mL FeCl ₃ 5%	Positif (+) jika terjadi perubahan warna menjadi hijau, merah, ungu, atau hitam yang kuat		

Keterangan: (+) = teridentifikasi mengandung senyawa uji
 (-) = tidak teridentifikasi mengandung senyawa uji

(Harborne, 1987).

b. Analisis Uji Aktivitas Antioksidan

Perhitungan nilai aktivitas antioksidan dinyatakan dengan Inhibition Concentration 50% (IC₅₀), yaitu konsentrasi sampel yang dapat meredam radikal DPPH sebanyak 50%. Nilai IC₅₀ dihitung menggunakan persamaan persentase perendaman (% inhibisi) terhadap radikal DPPH, dengan persamaan sebagai berikut: (Marliani, et al., 2015).

$$\% \text{ Inhibisi} = \frac{(A_{\text{kontrol}} (\text{DPPH}) - A_{\text{sampel atau vit. C}})}{(A_{\text{kontrol}} (\text{DPPH}))} \times 100\%$$

Keterangan:

% Inhibisi = Persentase perendaman

A_{kontrol} = Absorbansi kontrol (DPPH)

A_{sampel} = Absorbansi sampel

Harga persentase inhibisi diplotkan dalam sebuah grafik. Dari grafik tersebut diperoleh persamaan garis regresi linear $y = ax \pm b$, di mana y = persentase inhibisi (%), a = intersep (titik potong kurva pada sumbu y), b = kemiringan kurva (slope), dan x = konsentrasi zat ($\mu\text{g/mL}$). Selanjutnya nilai IC₅₀ diperoleh dari nilai x setelah mengganti nilai $y = 50$ (Dali et al., 2017). Adapun klasifikasi aktivitas antioksidan dalam meredam radikal bebas ditampilkan pada Tabel 2 sebagai berikut.

Tabel 2. Klasifikasi Aktivitas Antioksidan (Molyneux, 2004).

Intensitas	IC ₅₀ (µg/mL)
Sangat kuat	Kurang dari 50
Kuat	50 sampai 100
Sedang	101 sampai 150
Lemah	151 sampai 200
Sangat lemah	Lebih dari 200

3 HASIL DAN PEMBAHASAN

3.1 Uji Fitokimia

Uji golongan senyawa metabolit sekunder ekstrak n-heksana daun belimbing wuluh (*Averrhoa bilimbi* L.) ditentukan dengan menggunakan uji fitokimia untuk mengetahui kandungan senyawa metabolit sekundernya seperti yang terlihat pada Tabel 3 sebagai berikut.

Tabel 3. Hasil uji fitokimia ekstrak n-heksana daun belimbing wuluh (*Averrhoa bilimbi* L.)

Senyawa Uji	Pereaksi/ Perlakuan	Indikator	Hasil Pengamatan	Keterangan
Alkaloid	Ekstrak + pereaksi Mayer	Positif (+) jika ada endapan putih	Tidak ada endapan putih	-
	Ekstrak + pereaksi Wagner	Positif (+) jika ada endapan coklat	Tidak ada endapan jingga	-
	Ekstrak + pereaksi Dragendorf	Positif (+) jika ada endapan coklat kemerahan	Tidak ada endapan coklat kemerahan	-
Flavonoid	Ekstrak + 0,01 g logam Mg + 1 mL HCl 2N	Positif (+) jika terjadi perubahan warna menjadi merah muda atau ungu	Terjadi perubahan warna menjadi hijau	-
Steroid	Ekstrak + pereaksi Lieberman-Burchard	Positif (+) jika terjadi perubahan warna menjadi hijau kebiruan; ada endapan hijau kebiruan	Terjadi perubahan warna menjadi hijau kebiruan	+
Triterpenoid	Ekstrak + pereaksi Lieberman-Burchard	Positif (+) jika terjadi perubahan warna ungu	Tidak terjadi perubahan warna menjadi ungu	-
Saponin	Ekstrak + 5 mL aquades lalu dikocok kuat	Positif (+) jika terbentuk busa stabil selama 1 menit	Tidak terbentuk busa stabil selama 1 menit	-
Tanin	Ekstrak + 2 mL FeCl ₃ 5%	Positif (+) jika terjadi perubahan warna menjadi kuning kecoklatan	Tidak terjadi perubahan warna menjadi kuning kecoklatan	-

Keterangan: (+) = teridentifikasi mengandung senyawa uji
 (-) = tidak teridentifikasi mengandung senyawa uji
 (Harborne, 1987).

Berdasarkan data pada Tabel 3 dapat dilihat bahwa daun belimbing wuluh yang diekstraksi menggunakan pelarut n-heksana dengan metode sokletasi, teridentifikasi hanya mengandung golongan senyawa metabolit sekunder berupa steroid. Hal ini berdasarkan hasil uji fitokimia yang telah dilakukan dengan menggunakan pereaksi Lieberman-Burchard menunjukkan terjadinya perubahan warna menjadi hijau kebiruan yang sesuai dengan indikator pengujian fitokimia. Sedangkan golongan senyawa metabolit sekunder yang lain seperti alkaloid, saponin, triterpenoid, flavonoid dan tanin dalam ekstrak n-heksana daun belimbing wuluh tidak teridentifikasi, dimana hal ini ditunjukkan dengan tidak terjadinya perubahan warna yang sesuai dengan indikator pengujian fitokimia. Hasil penelitian ini berbeda dengan hasil penelitian yang dilakukan oleh Yanti dan Yulia (2019), dimana daun belimbing wuluh yang diekstraksi menggunakan teknik maserasi dengan

pelarut metanol yang kemudian dipartisi dengan pelarut etil asetat dan n-heksana menunjukkan bahwa ekstrak metanol kasar daun belimbing wuluh mengandung alkaloid, flavonoid, saponin, polifenol, terpenoid dan steroid. Fraksi n-heksana hanya mengandung flavonoid dan steroid, fraksi etil asetat mengandung alkaloid, flavonoid, polifenol, dan steroid. Adapun fraksi metanol mengandung alkaloid, flavonoid, saponin dan steroid.

Perbedaan hasil penelitian ini kemungkinan karna adanya golongan senyawa metabolit sekunder yang rusak selama proses ekstraksi berlangsung, seperti golongan flavonoid dan tanin. Dimana, hal ini dapat terjadi karena proses ekstraksi yang berlangsung secara terus-menerus dengan cara panas dan tanpa adanya pengaturan suhu selama beberapa jam. Hal ini diperkuat oleh Mukhriani (2014) bahwa penggunaan metode sokletasi untuk mengekstraksi daun belimbing wuluh dapat menyebabkan senyawa yang bersifat termolabil dapat terdegradasi karena ekstrak yang di peroleh terus-menerus berada pada titik didih, serta diperkuat pula oleh Yuliantari, et al. (2017) bahwa komponen bioaktif seperti flavonoid, tanin, dan fenol rusak pada suhu di atas 50°C karena dapat mengalami perubahan struktur serta menghasilkan ekstrak yang rendah.

Hal lain yang dapat diduga menjadi penyebab tidak teridentifikasinya beberapa golongan senyawa metabolit sekunder dalam penelitian ini yaitu penggunaan pelarut n-heksana pada saat ekstraksi dilakukan. Dimana pelarut n-heksana merupakan pelarut nonpolar yang hanya dapat melarutkan senyawa-senyawa yang bersifat nonpolar seperti steroid sedangkan senyawa-senyawa yang bersifat polar seperti alkaloid, flavonoid serta tanin tidak dapat larut dalam pelarut ini. Hal ini diperkuat oleh Ergina, et al. (2014) bahwa berdasarkan prinsip 'like dissolve like', sehingga senyawa-senyawa yang bersifat polar yang dapat terikat dalam pelarut polar (akuades, metanol dan etanol) seperti alkaloid, flavonoid dan tanin. Sedangkan senyawa steroid cenderung bersifat nonpolar sehingga dapat terekstrak oleh pelarut nonpolar, serta diperkuat pula oleh Putri, et al. (2015) bahwa pelarut n-heksana hanya dapat mengekstrak senyawa kimia seperti lilin, lipid dan minyak yang mudah menguap. Sehingga pelarut n-heksana akan mengisolasi golongan senyawa yang bersifat non polar. Selain itu, hal ini juga sesuai dengan Senja, et al. (2014) bahwa dalam proses ekstraksi suatu bahan tanaman terdapat banyak faktor yang dapat mempengaruhi kandungan senyawa hasil ekstraksi diantaranya adalah jenis pelarut, konsentrasi pelarut, metode ekstraksi dan suhu yang digunakan untuk ekstraksi.

3.2 Uji Aktivitas Antioksidan Ekstrak Etanol Daun Belimbing Wuluh (*Averrhoa bilimbi* L.) dengan Metode DPPH

Untuk mengetahui aktivitas antioksidan ekstrak n-heksana daun belimbing wuluh (*averrhoa bilimbi* l.) dilakukan pengukuran menggunakan metode DPPH (2,2 diphenyl-1-picrylhydrazil). Metode ini digunakan untuk menentukan aktivitas antioksidan dalam sampel yang akan diuji dengan melihat kemampuannya dalam menangkal radikal bebas DPPH. Uji aktivitas antioksidan ekstrak n-heksana daun belimbing wuluh dibuat dengan menggunakan lima variasi konsentrasi dengan tiga kali pengulangan pengukuran untuk mengetahui keaktifan antioksidan sampel yang di uji. Variasi konsentrasi yang digunakan pada pengukuran ini adalah 500 ppm, 600 ppm, 700 ppm, 800 ppm, dan 900 ppm. Untuk melihat kemampuan ekstrak sebagai antioksidan digunakan vitamin C sebagai pembanding. Penggunaan Vitamin C sebagai pembanding disebabkan karena vitamin C merupakan senyawa antioksidan alami yang relatif aman dan tidak menimbulkan toksisitas (Lung dan Dika, 2017). Vitamin C dibuat dengan variasi konsentrasi 1 ppm, 2 ppm, 3 ppm, 4 ppm, 5 ppm.

Setiap variasi konsentrasi ekstrak n-heksana daun belimbing wuluh dan pembanding vitamin C ditambahkan masing-masing 1 mL larutan DPPH, deret warna yang dihasilkan dari tiap konsentrasi ekstrak n-heksana daun belimbing wuluh dari 500 ppm sampai 900 ppm warnanya semakin kuning memudar, perubahan warna ini menunjukkan bahwa ekstrak n-heksana daun belimbing wuluh mempunyai aktivitas antioksidan terhadap radikal DPPH. Hal ini diperkuat oleh (Rahmawati dkk, 2015) yang mengatakan bahwa radikal DPPH menjadi senyawa non radikal (diphenylpicrylhydrazine) akan menunjukkan perubahan warna dari ungu menjadi kuning, dimana intensitas perubahan warna DPPH berbanding lurus dengan aktivitas antioksidan untuk meredam radikal bebas.

Ekstrak diinkubasi selama 30 menit pada suhu 37oC setelah ditambahkan DPPH, yang dilakukan dengan cara menyimpan sampel ditempat gelap tanpa cahaya dikarenakan DPPH yang sensitif terhadap cahaya. Kemudian diukur absorbansinya pada panjang gelombang maksimum 516,5 nm. Dapat dilihat pada Tabel 4. Nilai absorbansi yang terbaca saat pengukuran nilai absorbansi dari ekstrak n-heksana daun belimbing wuluh untuk menetralkan senyawa DPPH.

Tabel 4 Hasil Pengukuran Absorbansi dan % Inhibisi Ekstrak n-Heksana Daun Belimbing Wuluh (*Averrhoa Bilimbi L.*)

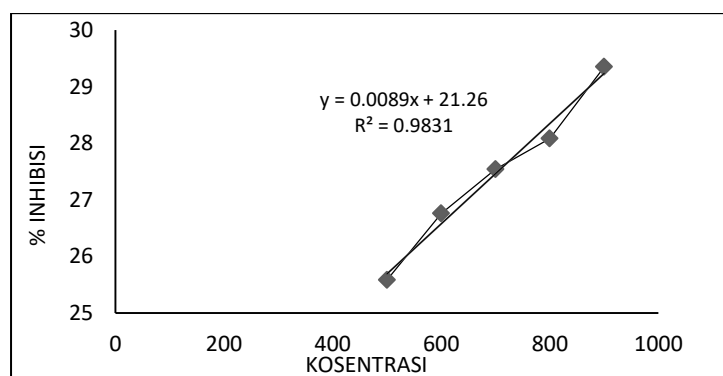
Kosentrasi (ppm)	Absorbansi 1	Absorbansi 2	Absorbansi 3	% Inhibisi 1	% Inhibisi 2	% Inhibisi 3	% Inhibisi rata-rata
500	0,690	0,686	0,677	24,9673	25,4023	26,3810	25,5835
600	0,671	0,678	0,674	27,0335	26,2723	26,7072	26,671
700	0,660	0,669	0,670	28,2296	27,2509	27,1422	27,5409
800	0,654	0,664	0,666	28,8821	27,7946	27,5772	28,0846
900	0,648	0,650	0,651	29,5345	29,3171	29,2083	29,3533

Absorbansi Blangko = 0,9196

Berdasarkan hasil data Tabel 4 dapat dilihat bahwa turunnya nilai absorbansi pada setiap ekstrak dalam variasi kosentrasi menunjukkan bahwa telah terjadi penangkapan atau peredaman terhadap radikal bebas DPPH oleh sampel yang diuji. Dimana hal tersebut menunjukkan adanya aktivitas antioksidan dari ekstrak n-heksana daun belimbing wuluh.

Dapat dilihat juga bahwa terjadi kenaikan persen Inhibisi setiap bertambahnya nilai konsentrasinya, Hal ini menunjukkan adanya hubungan antara kosentrasi sampel uji dengan peningkatan peredaman radikal bebas, semakin tinggi kosentrasi sampel maka persen Inhibisinya juga semakin besar. Hal ini diperkuat oleh Ananda (2009) yang menyatakan bahwa pemudaran warna yang terjadi akan mengakibatkan penurunan nilai absorbansi sehingga semakin rendah nilai absorbansi maka semakin tinggi % inhibisinya, dimana hal tersebut menunjukkan bahwa aktivitas antioksidannya semakin kuat karena pada kosentrasi yang tinggi kemampuan antioksidan untuk menangkap radikal bebas semakin besar, sehingga nilai absorbansi yang dihasilkan akan semakin turun.

Berdasarkan nilai absorbansi ekstrak n-heksana daun belimbing wuluh yang dapat dilihat pada data Tabel 4 Kemudian dihitung persen Inhibisi ekstrak n-heksana daun belimbing wuluh yang dihubungkan dengan kosentrasi sampel. Sehingga membentuk persamaan regresi yang dapat digunakan untuk menghitung nilai IC_{50} (*Inhibitor Consentrasion 50*) sampel yang telah diukur dengan grafik hubungan antara kosentrasi antioksidan yang direaksikan bersama DPPH dapat dilihat pada Gambar 1 Sebagai berikut.

**Gambar 1** Grafik hubungan antara kosentrasi ekstrak n-heksana daun belimbing wuluh dengan DPPH.

Berdasarkan grafik tersebut diperoleh persamaan regresi ekstrak n-heksana daun belimbing wuluh yang dapat digunakan untuk menghitung nilai IC_{50} merujuk pada analisis data, diperoleh hasil perhitungan nilai IC_{50} yaitu sebesar 3.229,213 $\mu\text{g/mL}$. Merujuk pada Molyneux (2004) tentang klasifikasi aktivitas antioksidan pada Tabel 2, hal ini menunjukkan bahwa ekstrak n-heksana daun belimbing wuluh memiliki aktivitas antioksidan yang sangat lemah.

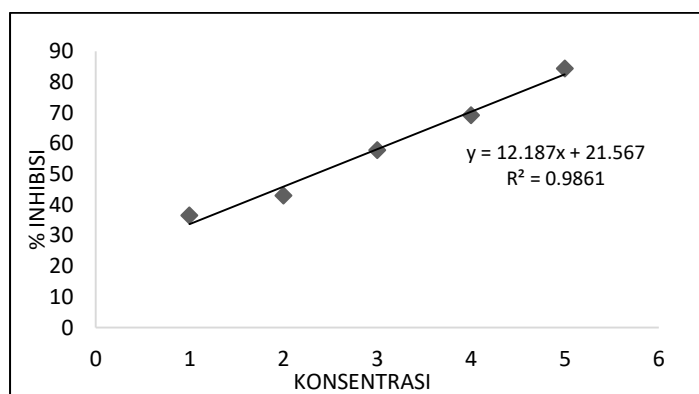
Adapun nilai absorbansi larutan pembanding vitamin C yang terbaca saat pengukuran nilai absorbansi dapat dilihat pada Tabel 5 Sebagai berikut.

Tabel 5 Hasil Pengukuran Absorbansi dan % Inhibisi Larutan Vitamin C

Kosentrasi (ppm)	Absorbansi	% Inhibisi
1	0,584	36,4526
2	0.524	42,9815
3	0.388	57,7801
4	0.284	69,0968
5	0.144	84,3307

Berdasarkan hasil data Tabel 5 dapat dilihat bahwa turunnya nilai absorbansi pada setiap ekstrak dalam variasi konsentrasi menunjukkan bahwa telah terjadi penangkapan atau peredaman terhadap radikal bebas DPPH oleh vitamin C. Selain itu, dapat dilihat juga bahwa terjadi kenaikan persen Inhibisi setiap bertambahnya nilai konsentrasinya, Hal ini menunjukkan adanya hubungan antara konsentrasi sampel uji dengan peningkatan peredaman radikal bebas, semakin tinggi konsentrasi vitamin C maka persen Inhibisinya juga semakin besar.

Berdasarkan nilai absorbansi larutan perbandingan vitamin C yang tertera pada data Tabel 5 Kemudian dihitung persen Inhibisi larutan perbandingan vitamin C yang dihubungkan dengan konsentrasinya. Sehingga membentuk persamaan regresi yang dapat digunakan untuk menghitung nilai IC_{50} larutan perbandingan vitamin C. Adapun grafik hubungan antara konsentrasi antioksidan yang direaksikan dengan DPPH dapat dilihat pada Gambar 2 Sebagai berikut.

**Gambar 2** Grafik hubungan antara konsentrasi Vitamin C dengan DPPH

Berdasarkan grafik tersebut diperoleh persamaan regresi larutan perbandingan vitamin C yang dapat digunakan untuk menghitung nilai IC_{50} . Dari hasil analisis data, diperoleh hasil perhitungan nilai IC_{50} yaitu sebesar 2,33 $\mu\text{g/mL}$. Merujuk pada Molyneux (2004) tentang klasifikasi aktivitas antioksidan pada Tabel 2, hal ini menunjukkan bahwa ini menunjukkan bahwa larutan perbandingan vitamin C memiliki aktivitas antioksidan yang sangat kuat.

Berdasarkan kedua hasil perhitungan nilai IC_{50} antara ekstrak n-heksana daun belimbing wuluh dan larutan perbandingan vitamin C, dapat dilihat bahwa ekstrak n-heksana daun belimbing wuluh yang memiliki aktivitas antioksidan jauh lebih lemah dibandingkan aktivitas antioksidan dari vitamin C. Hal ini dikarenakan vitamin C secara kimia mampu bereaksi dengan sebagian besar radikal bebas. Hal ini diperkuat oleh Wibawa, *et al.*, 2020 yang mengatakan bahwa Vitamin C mampu menetralkan stress oksidatif melalui proses donasi transfer elektron. Selain itu, vitamin C yang digunakan dalam penelitian ini dalam keadaan murni sehingga memiliki kemampuan penghambatan yang lebih besar terhadap radikal bebas (dapat menetralkan DPPH secara maksimal) (Fitriyanti, *et al.*, 2019).

Dibandingkan dengan ekstrak n-heksana daun belimbing wuluh yang masih merupakan ekstrak yang hanya teridentifikasi mengandung steroid serta bukan senyawa murni. Dilihat dari teknik ekstraksi yang dilakukan menggunakan teknik sokletasi, dimana ekstrak n-heksana daun belimbing wuluh sudah melalui tahap pemanasan yang cukup lama dan juga alat sokletasi yang digunakan tidak mempunyai pengaturan suhu, sehingga pada saat diekstraksi kemungkinan senyawa-senyawa kimia yang berpeluang sebagai antioksidan menjadi rusak dikarenakan ekstraksi pemanasan yang dilakukan tidak menggunakan pengaturan suhu maksimal sesuai titik didih pelarut yang digunakan. Hal ini diperkuat oleh Rompas, (2012) bahwa senyawa flavonoid merupakan golongan senyawa yang tidak tahan panas dan mudah teroksidasi pada suhu tinggi. Serta

penggunaan pelarut n-heksana yang hanya dapat melarutkan senyawa-senyawa yang bersifat nonpolar seperti steroid sedangkan senyawa-senyawa yang bersifat polar seperti alkaloid, flavonoid serta tanin tidak dapat larut dalam pelarut ini. Hal ini diperkuat oleh Ergina, et al. (2014) bahwa berdasarkan prinsip “like dissolve like”, sehingga senyawa-senyawa yang bersifat polar dapat terikat dalam pelarut polar seperti alkaloid, flavonoid dan tanin. Sedangkan senyawa steroid cenderung bersifat nonpolar sehingga dapat terekstrak oleh pelarut nonpolar. Sehingga kemungkinan besar inilah yang menyebabkan perbedaan aktivitas antioksidan larutan pembanding vitamin C lebih kuat dibandingkan dengan aktivitas antioksidan ekstrak n-heksana daun belimbing wuluh yang diekstraksi menggunakan metode sokletasi tergolong sangat lemah.

4 KESIMPULAN

Berdasarkan hasil penelitian ini dapat disimpulkan bahwa :

Daun belimbing wuluh (*Averrhoa bilimbi* L.) yang diekstraksi menggunakan pelarut n-heksana dengan metode sokletasi hanya positif atau teridentifikasi mengandung golongan senyawa metabolit sekunder berupa steroid. Aktivitas antioksidan dengan metode DPPH menunjukkan bahwa ekstrak n-heksana daun belimbing wuluh (*Averrhoa bilimbi* L.) memiliki nilai IC₅₀ sebesar 3.229,213 µg/mL yang tergolong dalam aktivitas antioksidan yang sangat lemah..

REFERENSI

- Ananda, A. D. 2009. Aktivitas Antioksidan dan Fungsinya The Hijau (*Camelia sinensis*) Rempah Instant. *Skripsi*. Program Studi Gizi Masyarakat dan Sumber Daya Keluarga. Fakultas Pertanian. Institut Pertanian Bogor.
- Dali, A., Haeruddin, H., Miranda, W. O. Y., & Dali, N. (2017). Uji Aktivitas Antioksidan Ekstrak Metanol Daun Pecah Beling *Strobilanthes crispus*. *Al-Kimia*, 5(2), 145-153. doi:<https://doi.org/10.24252/al-kimia.v5i2.3642>
- Ergina, E., Nuryanti, S., & Pursitasari, I. (2017). Uji Kualitatif Senyawa Metabolit Sekunder Pada Daun Palado (*Agave angustifolia*) yang Diekstraksi Dengan Pelarut Air dan Etanol. *Jurnal Akademika Kimia*, 3(3), 165-172. Retrieved from <http://jurnal.untad.ac.id/jurnal/index.php/JAK/article/view/7797>
- Fitriyanti, F., Nasrudin, N., & Rudi, L. (2020). Fitokimia Dan Aktivitas Antioksidan Kombinasi Imbang Kulit Batang Kayu Jawa (*Lannea coromandelica*) dan Rimpang Jahe Emprit (*Zingiber officinale* var. *Rubrum*). *Jurnal Pendidikan Kimia FKIP Universitas Halu Oleo*, 4(2), 102-109. doi:<http://dx.doi.org/10.36709/jpkim.v4i2.11303>
- Harborne. J. B. 1987. *Metode Fitokimia penuntun cara modern menganalisa Tumbuhan terjemahan K. Padmawinata Edisi II*. ITB Press : Bandung.
- Hasim, H., Arifin, Y. Y., Andrianto, D., & Faridah, D. N. (2019). Ekstrak Etanol Daun Belimbing Wuluh (*Averrhoa bilimbi*) sebagai Antioksidan dan Antiinflamasi. *Jurnal Aplikasi Teknologi Pangan*, 8(3), 86-93. doi:<https://doi.org/10.17728/jatp.4201>
- Istiqomah. 2013. Perbandingan Metode Ekstraksi Maserasi Dan Sokletasi Terhadap Kadar Piperin Buah Cabe Jawa (*Piperis Retrofracti Fructus*). *Skripsi*. UIN Jakarta.
- Kumar, V., Bhat, Z.A., Kumar, D., Khan, N.A., Chashoo, I.A. & Shah, M.Y. (2012). Evaluation of Antiinflammatory Potensial of Petal Extracts of Crocus Sativus “cashmerianus”. *International Journal of Phytopharmacy*, 3(1), 27-31.
- Laksmiani, N. P. L., dkk. 2020. Optimasi Metode Ekstraksi Kuersetin Dari Daun Kelor (*Moringa Oleifera* L.). *Jurnal Kimia*, 14(1).
- LUNG, J., & Destiani, D. (2017). Uji Aktivitas Antioksidan Vitamin A, C, E dengan metode DPPH. *Farmaka*, 15(1), 53-62. doi:<http://dx.doi.org/10.24198/jf.v15i1.12805>
- Marliana, S. D., Venty, S. dan Suyono. 2005. Skrining Fitokimia dan Analisis Kromatografi Lapis Tipis Komponen Kimia Buah Labu Siam (*Sechium edule* Jacq. Swartz.) dalam Ekstrak Etanol. *Jurnal Biofarmasi*, 3(1), 26-31. doi: [10.13057/biofar/f030106](https://doi.org/10.13057/biofar/f030106).
- Molyneux, P. 2004. The Use of The Stable Free Radical Diphenylpicryl-Hydrazyl (DPPH) for Estimating Antioxidant Activity. *Songklanakarinn J. Sci. Technol.* 26 (2).
- Mulyono, M. W., 1996. *Panduan Praktikum Analisis Fitokimia*. Laboratorium Farmakologi Jurusan Farmasi FMIPA. Universitas Padjajaran : Bandung.
- Mustarichie, R., Ida, M., dan Jutti, L. 2011. *Metode Penelitian Tanaman Obat : Teori dan Implementasi Penelitian Tanaman Untuk Pengobatan*. PT. Widya Padjajaran : Bandung.

- Novitri, S. A., Nurmeilis, dan Dea, R. K. 2020. Efek Antihipertensi Ekstrak Etanol Daun Belimbing Wuluh (*Averrhoa bilimbi* L.) dengan Metode Non-invasif. *Pharmaceutical and Biomedical Sciences Journal*. 2 (1).
- Nur, A., dan Desi, R. F. 2019. Identifikasi Senyawa Kimia Pada Ekstrak Etanol 70% Buah Belimbing Wuluh (*Averrhoa bilimbi* L.). *Kieraha Medical Journal*, 1(1), 1-5. doi: <http://dx.doi.org/10.33387/kmj.v1i1.1740>
- Putri, H. L., Rurini, R., dan Suratmo. 2015. Fraksi n-Heksana dari Ekstrak Metanol Daun Mangga Kasturi (*Mangifera Casturi Koesterm*) dan Uji Fitokimia. *Kimia Student Journal Universitas Brawijaya Malang*. 1(1).
- Riansyah, A., Agus, S., dan Rodiana, N. 2013. Pengaruh Perbedaan Suhu dan Waktu Pengeringan Terhadap Karakteristik Ikan Asin Sepat Siam (*Trichogaster pectoralis*) dengan Menggunakan Oven. *Jurnal Fishtech*. 2(1). doi: <https://doi.org/10.36706/fishtech.v2i1.1103>
- Rivai, Harrizul., Meliyana, dan Dian, H. 2010. Karakterisasi Ekstrak Spon Laut *Axinella carteri* Dendy Secara Fisika, Kimia Dan Fisikokimia. *Jurnal Farmasi Higea*. 2 (1). doi: <http://dx.doi.org/10.52689/higea.v2i1.10>
- Rompas, R., Edy, H., & Yudistira, A. (2012). Isolasi Dan Identifikasi Flavonoid Dalam Daun Lamun (*Syringodium Isoetifolium*). *Pharmakon*, 1(2). doi:<https://doi.org/10.35799/pha.1.2012.487>
- Saputra, T. R., Agustinus, N., dan Yunus, T. S. 2018. Penggunaan metode ekstraksi maserasi dan partisi pada tumbuhan cocor bebek (*kalanchoe pinnata*) dengan kepolaran berbeda. *Fullerene Journal Of Chemistry*. 3 (1).
- Senja, R. Y., Issusilaningtyas, E., Nugroho, A. K. dan Setyowati, E. P. (2014). Perbandingan Metode Ekstraksi dan Variasi Pelarut Terhadap Rendemen dan Aktivitas Antioksidan Ekstrak Kubis Ungu (*Brassica oleracea* L. var. *capitata* f. *rubra*). *Traditional Medicine Journal*, 19(1), 43-48.
- Thomas, A. N. S. 2007. *Tanaman Obat Tradisional 2*. Kanisius : Yogyakarta.
- Wibawa, J. C., Muhammad, Z. A., dan Lilik, H. 2010. Mekanisme Vitamin C Menurunkan Stres Oksidatif Setelah Aktivitas Fisik. *Journal of Sport Science and Education*. 5 (1).
- Yanti, S., dan Yulia, V. 2019. Skrining Fitokimia Ekstrak Daun Belimbing Wuluh (*Averrhoa Bilimbi*). *Jurnal Kesehatan Ilmiah Indonesia*. 4 (2).
- Yuliantari, N. W. A., I wayan, R. W., dan I Dewa, G. M. P. 2017. Pengaruh Suhu dan Waktu Ekstraksi Terhadap Kandungan Flavonoid dan Aktivitas Antioksidan Daun Sirsak (*Annona muricata* L.) *Jurnal Ilmiah Teknologi Pangan*. 4 (1).