

BAB IV

HASIL DAN PEMBAHASAN

Penelitian yang telah dilakukan mengenai aktivitas senyawa antioksidan pada daun mahkota dewa (*Phaleria macrocarpa* (Scheff.) Boerl.) yang telah dilakukan, maka didapatkan hasil berikut:

4.1. Ekstrak Daun Mahkota Dewa (*Phaleria macrocarpa* (Scheff.) Boerl.)

Hasil dari proses ekstraksi menggunakan 500 g simplisia dengan metode maserasi pada daun mahkota dewa (*Phaleria macrocarpa* (Scheff.) Boerl.) menggunakan pelarut metanol 2000 ml perlakuan selama empat kali remaserasi lalu disajikan pada (Tabel 4.1).

Tabel 4.1. Berat Bobot Ekstrak Kental dan Presentase Rendemen Ekstrak Metanol pada Daun Mahkota Dewa (*Phaleria macrocarpa* (Scheff.) Boerl.)

Berat simplisia	Bobot ekstrak (g)	Rendemen ekstrak(%)
500 g	129,66 g	25,93%

Tabel 4.1. menunjukkan bahwa pelarut metanol memiliki kemampuan untuk menarik suatu senyawa dari daun mahkota dewa (*Phaleria macrocarpa* (Scheff.) Boerl.) sehingga menghasilkan ekstrak kental sebanyak 129,66 g dari berat simplisia bubuk sehingga menghasilkan rendemen ekstrak sebesar 25,93%. Hasil dari rendemen ekstrak juga sangat dipengaruhi saat ekstraksi. Jika suatu nilai rendemen tinggi maka jumlah dari suatu senyawa aktif pada daun mahkota dewa (*Phaleria macrocarpa* (Scheff.) Boerl.) makin banyak. Menurut Dewatisari *et al.* (2017), Semakin besar persen dari rendemen, maka semakin baik pula komponen bioaktif yang terkandung dalam ekstrak tersebut.

Hasil rendemen daun mahkota dewa (*Phaleria macrocarpa* (Scheff.) Boerl.) yang telah didapatkan pada penelitian ini mempunyai hasil rendemen ekstrak yang lebih besar, jika dibandingkan dengan penelitian yang dilakukan oleh Ibrahim dan Rusli (2010), dimana simplisia dari daun mahkota dewa ini menggunakan tahap ekstraksi dengan menggunakan metode maserasi dan

didapatkan 250 g ekstrak daun mahkota dewa dengan bobot ekstrak 26,0 g dengan hasil rendemen ekstrak 10,4% setelah itu ekstrak kental tersebut dilakukannya fraksinasi cair-cair.

Proses maserasi dengan menggunakan pelarut metanol fungsinya menarik senyawa yang sifatnya non polar, semi polar maupun polar, pelarut metanol juga digunakan pada penelitian ini karena bersifat polar. Menurut Pratwi *et al.* (2019), menggunakan pelarut metanol dalam penelitian ini sehingga memiliki kemampuan besar diantaranya mampu menarik senyawa polar maupun non polar dan bisa mengekstrak suatu metabolit sekunder yang ada pada tumbuhan yang akan digunakan. Selanjutnya menurut Agustina (2017), keutamaan dari pelarut metanol dalam proses maserasi bahwa pelarut metanol memiliki kemampuan mengekstrak senyawa aktif lebih besar seperti sterol, alkaloid dan saponin flavonoid dan terpenoid .

4.2. Fraksi Cair-Cair Daun Mahkota Dewa (*Phaleria macrocarpa* (Scheff).Boerl).

Hasil fraksinasi dengan menggunakan metode fraksinasi cair-cair (FCC) yang telah dilakukan dalam penelitian ini dengan menggunakan pelarut n-heksan, etil asetat dan metanol air maka didapatkan hasil sebagai berikut seperti pada (Tabel 4.2.)

Tabel 4.2. Bobot Fraksi dan Presentase Rendemen Fraksi Daun Mahkota Dewa (*Phaleria macrocarpa* (Scheff).Boerl).

No	Jenis Pelarut	Bobot Fraksi (g)	Rendemen Fraksi (%)
1.	N-heksan	13,67 g	25,95%
2.	Etil Asetat	22,02 g	41,80%
3.	Metanol air	16,98 g	32,23%

Tabel hasil 4.2. pada fraksi n-heksan memiliki bobot fraksi 13,67 g hasil rendemen fraksinya 25,95 %, kemudian etil asetat memiliki bobot fraksi 22,02 g hasil rendemen fraksinya 41,80% dan fraksi metanol air bobot fraksinya 16,98 g hasil rendemen fraksi 32,23%. Tabel 4.2. terlihat bahwa fraksinasi dari daun mahkota dewa (*Phaleria macrocarpa* (Scheff.) Boerl.) didapatkan rendemen

fraksi yang banyak terdapat pada fraksi etil asetat. Menurut Hermawan *et al.* (2015), fraksinasi dalam penelitian dengan menggunakan tiga jenis pelarut yang berbeda-beda, dan memiliki fungsi masing-masing, misalnya tingkat kepolarannya pada pelarut n-heksan sifatnya non polar, etil asetat yang sifatnya semi polar dan metanol air sifatnya polar. Selanjutnya menurut Susilawati *et al.* (2011), hasil berat rendemen penelitian ini jenis pelarut yang paling bagus yaitu pada etil asetat.

4.3. Uji Aktivitas Antioksidan Fraksi Daun Mahkota Dewa (*Phaleria macrocarpa* (Scheff.) Boerl.) Dengan Metode Kromatografi Lapis Tipis

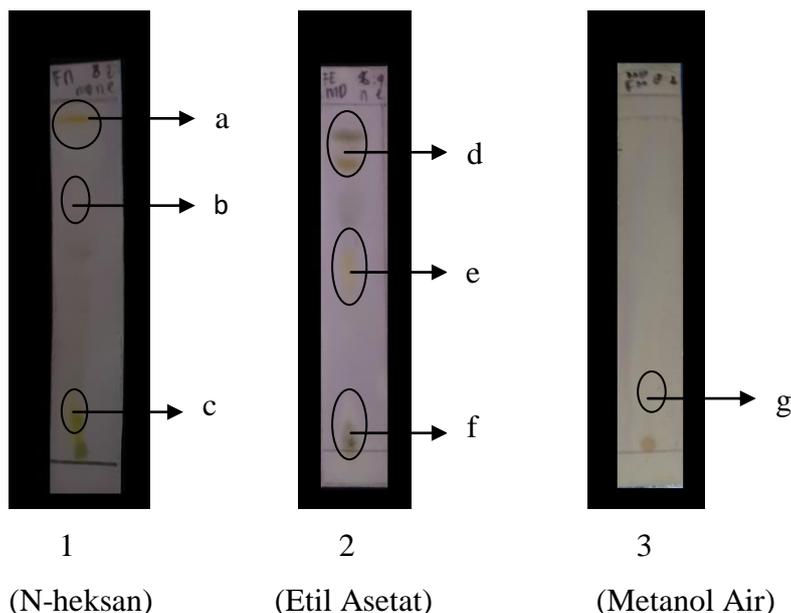
Uji aktivitas antioksidan fraksi dengan menggunakan kromatografi lapis tipis dari daun mahkota dewa (*Phaleria macrocarpa* (Scheff.) Boerl.) menggunakan plat KLT dan telah disemprot DPPH (*1,1-diphenyl-2-picrylhydrazyl*) sehingga mendapatkan bercak warna serta nilai Rf, dapat dilihat pada (Tabel 4.3.)

Tabel 4.3. Nilai Rf dan Uji Aktivitas Antioksidan dari Daun Mahkota Dewa (*Phaleria macrocarpa* (Scheff.) Boerl.).

No	Fraksi	Nilai Rf (Cm)	Aktivitas Antioksidan Fraksi	Keterangan
1.	N-heksan	0,96	+++	Kuat
		0,6	++	Sedang
		0,1	++	Sedang
2.	Etil Asetat	0,92	+++	Kuat
		0,5	++	Kuat
		0,1	+	Lemah
3.	Metanol Air	0,38	+	Lemah

Keterangan : Omale dan Nachieta (2009):

+++ : Menandakan bahwa adanya uji aktivitas antioksidan tergolong kuat setelah disemprot DPPH, ++ : Menandakan adanya uji aktivitas antioksidan tergolong sedang setelah disemprot DPPH, selanjutnya + : Menandakan aktivitas antioksidan tergolong lemah, - : Tidak ada aktivitas antioksidan.



Gambar 4.1. Profil KLT fraksi-fraksi daun mahkota dewa

Keterangan:

- a. Ditandai adanya aktivitas antioksidan memiliki noda kuning yang kuat.
 - b. Ditandai adanya aktivitas antioksidan memiliki noda kuning yang sedang.
 - c. Ditandai adanya aktivitas antioksidan memiliki noda kuning yang sedang.
 - d. Ditandai adanya aktivitas antioksidan memiliki noda kuning yang kuat.
 - e. Ditandai adanya aktivitas antioksidan memiliki noda kuning yang kuat.
 - f. Ditandai adanya aktivitas antioksidan memiliki noda kuning yang lemah
 - g. Ditandai adanya aktivitas antioksidan memiliki noda kuning yang lemah
1. Fraksi n-heksan daun mahkota dewa.
 2. Fraksi etil asetat daun mahkota dewa.
 3. Fraksi metanol daun mahkota dewa.

Hasil pada Tabel 4.3. ketiga fraksi yang memiliki nilai Rf yang berbeda-beda diantaranya pada fraksi n-heksan mempunyai nilai Rf 0,96, 0,6 dan 0,1, fraksi etil asetat mempunyai nilai Rf 0,92, 0,5 dan 0,1 dan fraksi metanol air mempunyai Rf 0,38 . Sehingga bisa dilihat dari ketiga fraksi n-heksan, etil asetat dan metanol air yang mempunyai nilai Rf yang terbesar itu pada fraksi n-heksan dibandingkan dengan fraksi etil asetat dan metanol air. Menurut Khair *et al.* (2017), jika pada suatu senyawa yang memiliki sifat kepolaran yang rendah dikatakan bahwa nilai Rf nya besar, jika disandingkan dengan sifat kepolaran yang besar maka dihasilkan nilai Rf nya rendah. Maka hal ini dapat disebabkan pada plat KLT (fase diam) sifatnya polar, jadi senyawa yang lebih polar akan tertahan pada fase diam dan nilai Rf nya akan rendah.

Gambar 4.1. terlihat bahwa pada fraksi n-heksan dan fraksi etil asetat mempunyai bercak kuning yang warnanya pekat karena ditandai dengan adanya

aktivitas antioksidan dibandingkan dengan fraksi metanol air, sehingga fraksi yang memiliki bercak kuning yang pekat setelah disemprot DPPH (*1,1-diphenyl-2-picrylhydrazyl*) artinya senyawa tersebut aktif antioksidan pada daun mahkota dewa (*Phaleria macrocarpa* (Scheff.) Boerl.) Menurut Amin (2015), dengan ditandainya bercak kuning dan latar belakang ungu di KLT setelah disemprot DPPH (*1,1-diphenyl-2-picrylhydrazyl*) maka bisa dikatakan adanya aktivitas senyawa antioksidan pada fraksi tersebut.

Metabolit sekunder yang terdapat pada fraksi n-heksan ini memiliki sifat non polar dimana dapat menarik suatu metabolit yang terdapat pada daun mahkota dewa dengan bantuan fraksi n-heksan sehingga diduga memiliki golongan senyawa seperti terpenoid. Menurut Prasetyo *et al.* (2015), metabolit sekunder yang dapat diketahui pada fraksi n-heksan ini ditunjukkan bahwa terdapat golongan terpenoid sehingga golongan senyawa tersebut sifatnya mudah larut (non polar).

Fraksi etil asetat mempunyai sifat semi polar sehingga fraksi ini mampu menarik senyawa metabolit sekunder pada tumbuhan mahkota dewa diduga memiliki golongan senyawa flavonoid, pada fraksi metanol ini mempunyai sifat polar diduga mempunyai metabolit sekunder yang berasal dari golongan senyawa alkaloid. Menurut Heni *et al.* (2015), metabolit sekunder pada fraksi etil asetat diduga memiliki golongan senyawa flavonoid dan alkaloid. Fraksi metanol memiliki golongan senyawa alkaloid dan polifenol.

Berdasarkan hasil kromatografi lapis tipis pada setiap fraksi yang aktif dapat dinyatakan lebih dari satu bercak noda diantaranya pada fraksi n-heksan dan etil asetat memiliki intensitas warna yang lebih kuat sehingga menandakan adanya senyawa bioaktif antioksidan. Sehingga perlu dilihat pada fraksi n-heksan dan etil asetat masih memiliki campuran warna lain seperti hijau karena masih memiliki klorofil atau masih ada pengotornya. Menurut Rachman *et al.* (2017), fraksi n-heksan dan etil asetat yang telah dielusi menggunakan plat kromatografi lapis tipis masih terdapat noda lain di plat tersebut kemungkinan besar masih ada pengotornya dan perlunya pemisahan dengan menggunakan kromatografi kolom.

4.4. Pemurnian Senyawa dengan Menggunakan Kromatografi Kolom Daun Mahkota Dewa

4.4.1. Pemurnian Senyawa dengan Menggunakan Kromatografi Kolom pada N-heksan

Fraksi n-heksan yang aktif dilakukan tahapan pemurnian dimana akan menggunakan metode kromatografi kolom serta dilakukan kromatografi lapis tipis untuk melihat bercak warna yang aktif pada fraksi aktif dan dapat dihitung nilai Rf pada (Tabel 4.4.)

Tabel 4.4. Nilai Rf Fraksi N-heksan dan Aktivitas Antioksidan dari Subfraksi Daun Mahkota Dewa (*Phaleria macrocarpa* (Scheff.) Boerl.)

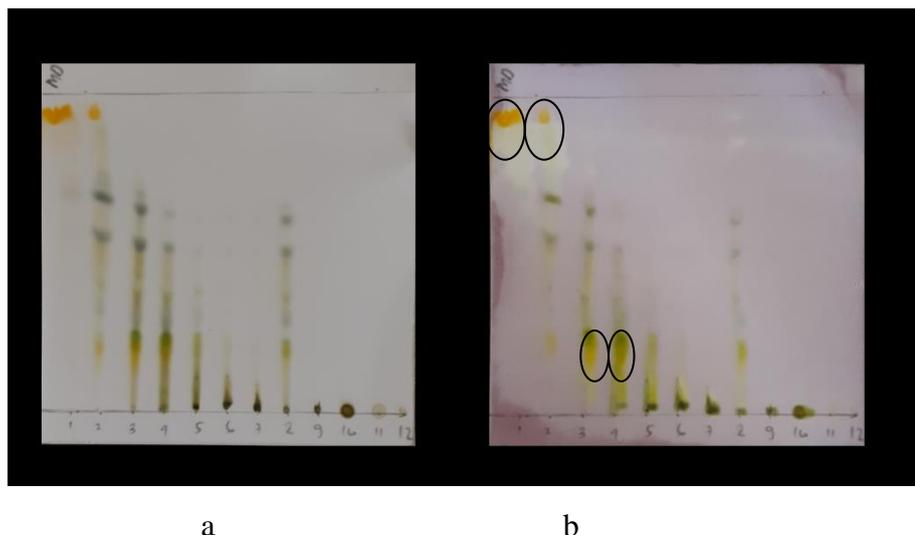
Fraksi	Sub Fraksi	Nilai Rf (cm)	Aktivitas Antioksidan	Keterangan
N-heksan	N.1	0,98	+++	Kuat
	N.2.	0,98	+++	Kuat
	N.3.	0,28	++	Sedang
	N.4.	0,28	++	Sedang

Keterangan : Omale dan Nachieta (2009):

+++ : Adanya aktivitas antioksidan yang kuat dengan bercak warna kuning pekat, ++ : Adanya aktivitas antioksidan yang sedang dengan bercak kuning., + : Adanya aktivitas antioksidan yang lemah dengan bercak kuning pucat, - : Tidak ada warna kuning.

Tabel 4.4. bahwa pada sub fraksi n-heksan daun mahkota dewa (*Phaleria macrocarpa* (Scheff.) Boerl.) yang telah ditotolkan dengan menggunakan plat kromatografi lapis tipis dengan perbandingan eluen pelarut n-heksan: etil asetat (8:2), sub fraksi N.1. dan N.2. memiliki nilai Rf yang sama yaitu 0,98 serta memiliki aktivitas antioksidan yang tergolong kuat dan pada sub fraksi N.3. dan N.4. juga memiliki nilai Rf yang sama yaitu 0,28 serta memiliki aktivitas antioksidan yang tergolong sedang.

Hasil pola dari kromatografi kolom subfraksi n-heksan dengan menggunakan eluen n-heksan:etil asetat (8:2) dilihat dengan menggunakan plat kromatografi lapis tipis dapat disajikan pada Gambar 4.2. berikut ini:



Gambar 4.2. Pola KLT pada subfraksi n-heksan eluen n-heksan:etil (8:2).

Keterangan:

- a. Subfraksi n-heksan sebelum disemprot DPPH (*1,1-diphenyl-2-picrylhydrazyl*) 0,008%
- b. Subfraksi n-heksan setelah disemprot DPPH (*1,1-diphenyl-2-picrylhydrazyl*) 0,008%

Pada Gambar 4.2. subfraksi n-heksan dengan menggunakan eluen n-heksan:etil asetat (8:2) telah didapatkan bahwa ada 12 subfraksi yang telah ditotol di plat KLT, setelah melewati tahap kromatografi kolom subfraksi 1 dikolom kembali dengan menggunakan eluen kolom n-heksan:etil asetat (9:1) hingga dapat 22 vial terlihat Lampiran 5 dan setelah dilakukan visualisasi dengan plat KLT ternyata masih belum murni, setelah dilakukan pemurnian lagi didapatkan vial no 1 sampai 12 terlihat Lampiran 5 diketahui ada antioksidan, hasil pemurnian vial 1 sampai 12 setelah dilakukan visualisasi plat KLT terlihat Lampiran 5 sehingga botol vial no 1 dan 2 didapatkan isolat N.1. dan N.2. murni sehingga bisa dilihat bahwa pada subfraksi N.1, N.2. memiliki bercak warna kuning pada plat kromatografi lapis tipis menandakan bahwa adanya aktivitas antioksidan. Menurut Nuraziza *et al.* (2017), subfraksi yang memiliki bercak warna kuning dan dilatar belakanginya warna ungu pada plat kromatografi lapis tipis yang telah disemprot DPPH (*1,1-diphenyl-2-picrylhydrazyl*) merupakan adanya aktivitas antioksidan pada subfraksi tersebut.

Subfraksi N.3. dan N.4 digabung dan dimurnikan menggunakan kromatografi kolom hingga berulang kali dikolom ternyata aktivitas antioksidannya tergolong sangat lemah, sehingga subfraksi N.3. dan N.4. tidak

bisa dilakukan penggolongan senyawa isolat murni yang dilanjutkan penentuan golongan senyawa subfraksi murni N.1. dan N.2.

4.4.2. Pemurnian Senyawa dengan menggunakan Kromatografi Kolom pada Etil Asetat

Tabel 4.5. Nilai Rf dan Aktivitas Antioksidan dari Subfraksi Daun Mahkota Dewa (*Phaleria macrocarpa* (Scheff.) Boerl.)

Fraksi	Sub Fraksi	Nilai Rf (cm)	Aktivitas Antioksidan	Keterangan
Etil Asetat	E.1.	0,92	+	Lemah
	E.2.	0,92	+	Lemah
	E.6.	0,3	+	Lemah
	E.7.	0,3	+	Lemah
	E.8.	0,3	+	Lemah
	E.11.	0,26	+	Lemah
	E.12.	0,26	+	Lemah
	E.13.	0,2	+++	Kuat

Keterangan : Omale dan Nachieta (2009):

+++ : Adanya aktivitas antioksidan yang kuat dengan bercak warna kuning pekat, + : Adanya aktivitas antioksidan yang sedang dengan bercak kuning, + : Adanya aktivitas antioksidan yang lemah dengan bercak kuning pucat dan - : Tidak ada warna kuning.

Hasil Tabel 4.5. subfraksi etil asetat daun mahkota dewa (*Phaleria macrocarpa* (Scheff.) Boerl.) telah ditotolkan dengan menggunakan plat kromatografi lapis tipis dengan perbandingan eluen pelarut n-heksan: etil asetat (6:4), sub fraksi E.1. dan E.2. memiliki nilai Rf yang sama yaitu 0,92 cm serta aktivitas antioksidannya tergolong lemah, pada E.6. E.7 E.8. juga memiliki nilai Rf yang sama yaitu 0,3 cm memiliki aktivitas antioksidan yang tergolong lemah, sub fraksi E.11. dan E.12. nilai Rf nya 0,26 cm, memiliki aktivitas antioksidan yang tergolong lemah E.13. Nilai Rf nya 0,2 cm memiliki aktivitas antioksidan yang kuat.

Berdasarkan hasil tabel 4.5. jika pada subfraksi E.1. dan E.2. memiliki nilai Rf yang sama, E.6. E.7. E.8. memiliki nilai Rf yang sama dan pada E.13 yang nilai Rf nya berbeda. Beberapa subfraksi yang memiliki keterangan

aktivitas antioksidan yang kuat dan lemah. Menurut Asra *et al.* (2019), suatu senyawa yang mempunyai nilai Rf yang lebih besar maka ditandai dengan sifat kepolarannya yang lebih rendah. Selanjutnya Purniati *et al.* (2015), Nilai Rf yang sama berarti senyawa tersebut mempunyai karakteristik yang hampir mirip, sedangkan jika nilai Rf nya beda, maka senyawa tersebut memiliki senyawa yang berbeda pula.

Pola dari kromatografi kolom subfraksi etil asetat dengan menggunakan eluen n-heksan:etil asetat (6:4) dilihat dengan menggunakan plat kromatografi lapis tipis dapat disajikan pada (Gambar 4.3.) berikut ini:



Gambar 4.3. Pola KLT pada subfraksi etil asetat eluen n-heksan:etil (6:4).

Keterangan:

- a. Subfraksi n-heksan sebelum disemprot DPPH (*1,1-diphenyl-2-picrylhydrazyl*) 0,008%
- b. Subfraksi n-heksan setelah disemprot DPPH (*1,1-diphenyl-2-picrylhydrazyl*) 0,008%

Hasil kromatografi kolom pada plat KLT Gambar 4.3. subfraksi etil asetat dielusi menggunakan perbandingan eluen n-heksan:etil asetat (6:4) sehingga didapatkan 13 subfraksi masing-masing subfraksi ditotol di plat KLT. Subfraksi 1 dan 13 menandakan aktivitas antioksidan setelah disemprot DPPH untuk itu perlu dilakukan senyawa murni, subfraksi 1 sudah murni hingga tidak dikolom lagi, untuk subfraksi 13 memiliki aktivitas antioksidan setelah dilakukan visualisasi dengan plat KLT menggunakan eluen kolom n-heksan:etil asetat (8:2) bagan pemurnian dapat dilihat pada Lampiran 6, maka diperoleh 21 vial dan ditotol menggunakan plat KLT hingga dapatlah botol no 12 terlihat pada Lampiran 6 diketahui memiliki aktivitas antioksidan yang kuat, sehingga diperoleh isolat E.2. yang murni. Sedangkan pada subfraksi yang lainnya setelah dilakukan pemurnian

berulang kali dari subfraksi E.6, E.7, E.8, E.11, E.12 setelah ditotol di plat KLT aktivitas antioksidan tergolong lemah.

4.5. Penentuan Golongan Senyawa Antioksidan Isolat Aktif Daun Mahkota Dewa (*Phaleria macrocarpa* (Scheff.) Boerl.)

Subfraksi yang murni yang telah melewati proses pemurnian dengan menggunakan kromatografi kolom diidentifikasi dengan menggunakan kromatografi lapis tipis disemprot dengan H₂SO₄ (5%) hasil yang telah didapatkan golongan senyawa 3 terpenoid dan 1 flavonoid. Sehingga nilai Rf dari golongan senyawa yang telah didapat dapat disajikan dalam bentuk (Tabel 4.6.)

Tabel 4.6. Isolat yang telah Didapatkan Nilai Rf, Warna dan Golongan Senyawa Daun Mahkota Dewa (*Phaleria macrocarpa* (Scheff.) Boerl.)

Isolat	Nilai Rf (Cm)	Warna	Golongan Senyawa
N.1.	0,5	Biru	Terpenoid
N.2.	0,96	Ungu	Terpenoid
E.1.	0,84	Ungu	Terpenoid
E.2.	0,36	Kuning jingga	Flavonoid

Hasil yang telah didapat pada Tabel 4.6. isolat murni pada subfraksi n-heksan daun mahkota dewa (*Phaleria macrocarpa* (Scheff.) Boerl.) dengan menggunakan perbandingan eluen yang berbeda-beda, seperti pada N.1. memakai eluen n-heksan (100%) sehingga didapatkan isolat murni mahkota dewa dengan nilai Rf 0,5, perubahan bercak warna menjadi biru dan didapatkan golongan senyawa jenis terpenoid. Selanjutnya isolat murni N.2. menggunakan perbandingan eluen n-heksan: etil asetat (8:2), dengan nilai Rf nya 0,96 isolat murni dari N.1. dan N.2. sama – sama tergolong terpenoid akan tetapi berbeda nilai Rf nya sehingga mendapatkan golongan senyawa terpenoid dan warna nya ungu pada kromatografi lapis tipis setelah disemprot H₂SO₄ (5%).

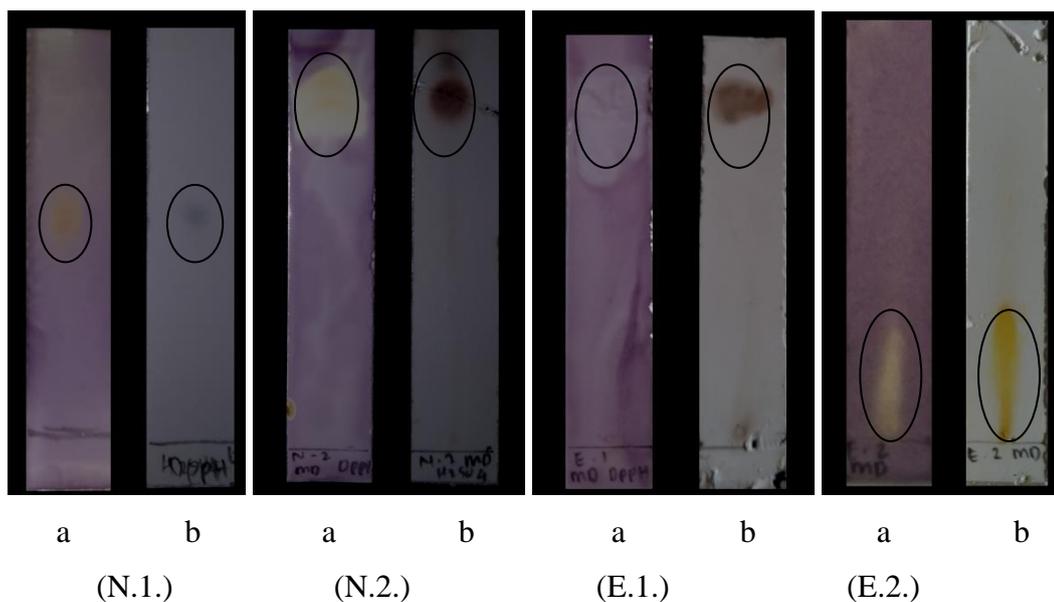
Subfraksi n-heksan ini memiliki kemampuan sebagai aktivitas antioksidan dengan nilai Rf yang berbeda- beda, sehingga N.1 dan N.2. mempunyai bercak noda tunggal pada saat elusi di plat kromatografi lapis tipis dan menunjukkan bahwa isolasi senyawa tersebut sudah murni. Menurut Kosma dan Tappang

(2012), subfraksi n-heksan yang telah dielusi menggunakan kromatografi lapis tipis jika ditandai dengan bercak noda tunggal atau satu kemungkinan besar bisa dikatakan senyawa tersebut telah murni.

Hasil pada Tabel 4.6. isolat murni pada subfraksi etil asetat daun mahkota dewa (*Phaleria macrocarpa* (Scheff.) Boerl.) memiliki perbandingan eluen yang berbeda – beda jika pada isolat murni mahkota dewa E.1. menggunakan perbandingan pelarut n-heksan : etil asetat (6:4), nilai Rf pada isolat murni daun mahkota dewa 0,84 dengan bercak warna ungu tergolong senyawa terpenoid. Isolat murni mahkota dewa selanjutnya pada subfraksi etil E.2. mempunyai nilai Rf 0,36 memiliki bercak warna kuning jingga dan golongan senyawa E.2. tergolong flavonoid dari warna yang telah didapat setelah disemprot H₂SO₄ (5%) maka kelihatan perubahan warnanya.

Eluen yang digunakan berbeda – beda saat uji kemurnian dengan kromatografi lapis tipis untuk memunculkan bercak warna yang jelas dan dapat dilihat pemisahannya dari masing-masing subfraksi, sehingga bercak yang telah ditotol secara visual sudah murni yang berpotensi sebagai senyawa antioksidan. Menurut Khair *et al.* (2017), Prinsip kerja dari kromatografi lapis tipis untuk memisahkan sehingga perlunya eluen yang baik agar mendapatkan pemisahan warna yang jelas dan bagus pada plat kromatografi lapis tipis tersebut.

Subfraksi hasil dari n-heksan dan etil asetat Gambar 4.4. yang telah melewati proses pemurnian dengan menggunakan plat kromatografi lapis tipis memiliki perbandingan elusi yang berbeda – beda, sehingga didapatkan golongan senyawa 3 terpenoid dan flavonoid yang memiliki Rf yang berbeda-beda. Gambar 4.4. berikut menunjukkan kromatografi yang telah diuji aktivitas antioksidan dengan DPPH 0,008% dan penentuan golongan senyawa dengan H₂SO₄ (5%).



Gambar 4.4: Hasil uji antioksidan dan golongan senyawa murni daun mahkota dewa (a). setelah disemprot DPPH (0,008%) (b). setelah disemprot H₂SO₄(5%).

Isolat murni pada subfraksi n-heksan mendapatkan dua isolat yaitu N.1. dan N.2. yang memiliki golongan senyawa terpenoid dimana N.1. golongan senyawa terpenoid ditandai dengan bercak warna biru dielus di plat KLT selanjutnya N.2. yang telah dielus menggunakan plat KLT dan ditandai adanya bercak warna ungu setelah disemprot H₂SO₄ (5%). Uji aktivitas antioksidan ditandai dengan bercak kuning setelah disemprot DPPH (*1,1-diphenyl-2-picrylhydrazyl*), akan tetapi yang kita ketahui subfraksi n-heksan ini mampu menarik senyawa yang sifatnya larut pada senyawa non polar. Menurut Lau dan Wuru (2018), golongan senyawa terpenoid ini setelah disemprot dengan H₂SO₄ (5%), maka perubahan warna menjadi biru merupakan golongan senyawa terpenoid ini memiliki kemampuan sebagai aktivitas antioksidan pada daun mahkota dewa (*Phaleria macrocarpa* (Scheff.) Boerl.)

Golongan senyawa jenis terpenoid mempunyai aktivitas antioksidan, terpenoid mempunyai kemampuan untuk bereaksi dengan atom hidrogen radikal bebas DPPH (*1,1-diphenyl-2-picrylhydrazyl*) membentuk senyawa yang stabil sehingga akan menghambat suatu reaksi oksidasi molekul biologis didalam tubuh kita. Menurut Novitasari *et al* (2015), golongan senyawa terpenoid berpotensi sebagai antioksidan sehingga bisa melawan stres oksidatif didalam tubuh kita

yang disebabkan oleh radikal bebas. Menurut Setyorini dan Yusnawan (2016), golongan senyawa terpenoid memiliki jalur biosintesis jalur tersebut dinamakan asam mevalonat dan *methylerythritol phosphate* (MEP).

Subfraksi etil asetat mendapatkan isolasi murni E.1 Gambar 4.4. Golongan senyawa yang didapat terpenoid yang telah melewati proses pemurnian menggunakan kromatografi kolom dengan menggunakan plat kromatografi lapis tipis melalui perbandingan elusi n-heksan: etil asetat (6:4) sehingga menampilkan bercak warna ungu pada subfraksi etil asetat. didapatkan isolat E.1 yang mempunyai nilai Rf yang berbeda dengan hasil subfraksi n-heksan, pada subfraksi etil asetat, isolat murni E.1 subfraksi etil asetat diduga tergolong senyawa terpenoid yang mempunyai bercak warna ungu setelah disemprot H₂SO₄ (5%) dan memiliki aktivitas antioksidan. Menurut Fajriaty *et al.* (2017), golongan senyawa terpenoid ditandai dengan bercak warna ungu golongan senyawa terpenoid mempunyai kemampuan sebagai antioksidan pada tumbuhan tersebut.

Senyawa murni yang tergolong terpenoid memiliki kemampuan sebagai antioksidan, golongan senyawa terpenoid ini tidak hanya terdapat di subfraksi n-heksan saja akan tetapi pada subfraksi etil asetat juga ada golongan terpenoid tersebut. Penelitian oleh Firdiyani *et al.* (2015), menjelaskan bahwa terpenoid dapat ditemukan pada etil asetat dikarenakan adanya interaksi momen dipol antara pelarut semi polar dan polar. Selanjutnya menurut Winata dan Putri (2019), golongan senyawa terpenoid dibuktikan bahwa memiliki kemampuan sebagai antioksidan, sehingga potensi dari tumbuhan mahkota dewa ini mendapatkan golongan senyawa terpenoid dari jenis pelarut n-heksan dan etil asetat.

Gambar 4.4. subfraksi etil asetat mendapatkan isolat murni lainnya seperti pada E.2 Golongan senyawa yang didapat yaitu golongan flavonoid yang telah melewati proses pemurnian menggunakan kromatografi kolom dengan menggunakan plat kromatografi lapis tipis melalui perbandingan etil asetat (100%) sehingga menampilkan bercak warna kuning jingga pada subfraksi etil asetat. Menurut Lantah *et al* (2019), bercak kuning yang telah dielusi diplat kromatografi lapis tipis ditandai bahwa golongan senyawa tersebut tergolong flavonoid, flavonoid juga berpotensi untuk antioksidan.

Golongan senyawa jenis flavonoid termasuk senyawa yang disusun oleh gugus polifenol sehingga flavonoid memiliki kemampuan sebagai antioksidan dan dimana adanya suatu gugus fungsi hidroksil yang terikat strukturnya. Flavonoid akan mendonorkan suatu elektron ke radikal bebas dan mampu menstabilkan senyawa radikal bebas DPPH tersebut. Menurut Sopiah *et al.* (2019), senyawa flavonoid ini akan membantu mendonorkan elektron terhadap radikal bebas yang diketahui berperan sebagai antioksidan. Selanjutnya penelitian Handayani *et al.* (2014), senyawa flavonoid mampu mendonorkan suatu atom hidrogen ke senyawa radikal DPPH sehingga hasil tersebut akan ternetralisasi. Menurut Arifin dan Ibrahim (2018), golongan senyawa flavonoid memiliki biosintesis yang dimana turunan dari asam asetat dengan menggunakan jalur asam shikimat

Flavonoid sebagai antioksidan memiliki peran untuk meningkatkan antioksidan endogen yang berdampak pada aktivitas ekspresi gen dan juga berperan dalam meningkatkan sintesis enzim SOD (*Superoxide Dismutase*). Menurut Sumardika dan Jawi (2012) , golongan senyawa flavonoid mempunyai peran secara tidak langsung sebagai antioksidan dari luar tubuh, diantaranya membantu kerja antioksidan endogen untuk meningkatkan ekspresi gen dan berperan penting mensintesis enzim yang memiliki aktivitas antioksidan endogen seperti SOD (*Superoxide Dismutase*).

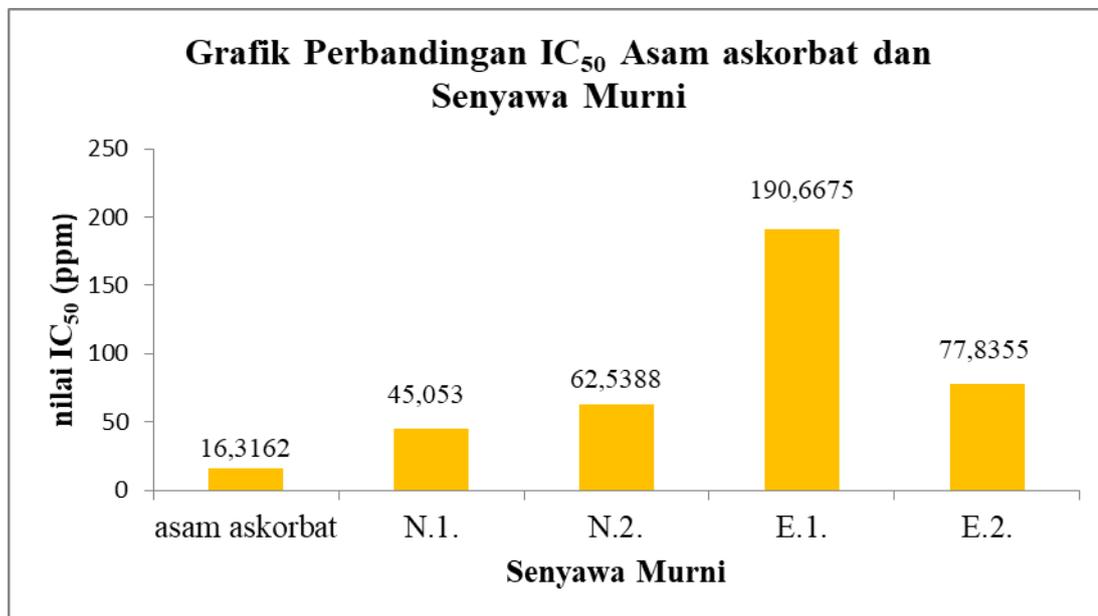
4.6. Aktivitas Antioksidan Daun Mahkota Dewa (*Phaleria macrocarpa* (Scheff.)Boerl). Menggunakan Metode DPPH

Uji aktivitas antioksidan yang telah didapatkan isolat murni N.1, N.2, E.1 dan E.2 yang telah dilakukan penggolongan senyawanya dari masing –masing isolat murni dari daun mahkota dewa (*Phaleria macrocarpa* (Scheff.) Boerl.) setelah didapatkan isolat murni N.1, N.2, E..1 dan E.2 dari setiap subfraksi daun mahkota dewa (*Phaleria macrocarpa* (Scheff.) Boerl.) maka dilanjutkan dengan menganalisis nilai IC_{50} menggunakan metode namanya metode DPPH (*1,1-diphenyl-2-picrylhydrazyl*), lalu diukur absorbansinya menggunakan spektrofotometer UV-vis dengan panjang gelombang 517 nm hingga didapatkan hasil pengukuran absorbansi dari isolat murni N.1, N.2, E.1 dan E.2 dari daun mahkota dewa pada (Tabel 4.7.) berikut ini:

Tabel 4.7. Hasil Pengukuran Absorbansi dari Daun Mahkota Dewa (*Phaleria macrocarpa* (Scheff).Boerl dengan Menggunakan Metode DPPH (*1,1-diphenyl-2-picrylhydrazyl*).

No	Senyawa	Konsentrasi (ppm)	%Inhibisi	IC ₅₀ (ppm)	Aktivitas Antioksidan
1.	Asam Askorbat	1000	58,40	16,3162	Sangat Kuat
		500	56,44		
		250	54,76		
		150	53,97		
		62,5	53,52		
2.	N.1.	1000	57,88	45,0530	Sangat Kuat
		500	55,12		
		250	53,55		
		125	52,4		
		62,5	52,79		
3.	N.2.	1000	59,90	62,5388	Kuat
		500	58,89		
		250	55,98		
		125	52,00		
		62,5	50,53		
4.	E.1.	1000	58,46	190,6675	Lemah
		500	55,06		
		250	52,32		
		125	47,07		
		62,5	45,71		
5.	E.2.	1000	58,33	77,8355	Kuat
		500	56,19		
		250	54,01		
		125	53,19		
		62,5	48,80		

Perbandingan IC_{50} asam askorbat dan senyawa murni dapat disajikan dalam bentuk (Gambar 4.5.) dibawah ini:



Gambar 4.5. Perbandingan IC_{50} asam askorbat dan senyawa murni N.1, N.2, E.1, E.2.

Keterangan: Phongpaichit *et al.* (2007) nilai IC_{50} diantaranya:

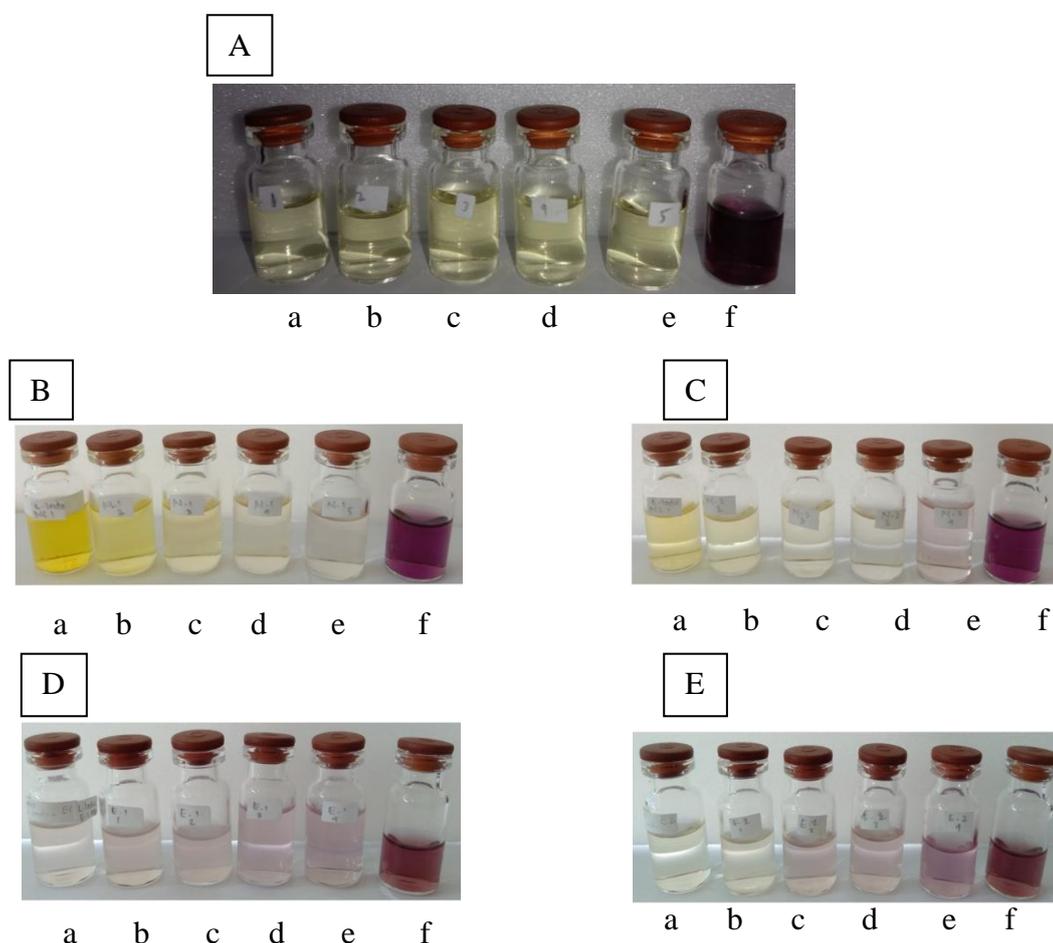
- nilai $IC_{50} > 1000$ (tidak aktif)
- IC_{50} 200-1000(sangat lemah)
- IC_{50} 150-200(lemah)
- IC_{50} 100-150(sedang)
- IC_{50} 50-100(kuat)
- $IC_{50} < 50$ (sangat kuat).

Berdasarkan hasil yang telah dilakukan adanya aktivitas antioksidan yang telah di ketahui IC_{50} Tabel 4.7. sehingga telah didapatkan subfraksi n-heksan N.1. dengan nilai IC_{50} mendapatkan 45,0530 ppm, N.2. nilai IC_{50} mendapatkan 62,5388 ppm, subfraksi etil asetat E.1 nilai IC_{50} mendapatkan 190,6675 ppm, dan E.2 nilai IC_{50} mendapatkan 77,8355 ppm.

Isolat N.1 pada subfraksi n-heksan yang telah melewati proses pengukuran absorbansi sehingga mendapatkan nilai IC_{50} mendapatkan 45,0530 ppm memiliki aktivitas antoksidan tergolong sangat kuat, isolat N.2. mendapatkan IC_{50} mencapai 62,5388 ppm aktivitas antioksidannya tergolong kuat, selanjutnya isolat E.1 subfraksi etil asetat nilai IC_{50} mendapatkan 190,6675 ppm aktivitas antioksidannya tergolong lemah disubfraksi ini dan E.2 nilai IC_{50} mendapatkan

77,8355 ppm memiliki aktivitas antioksidan yang tergolong kuat. Menurut Phongpaichit *et al* (2007), kriteria dalam penggolongan nilai IC_{50} diantaranya nilai $IC_{50} > 1000$ (tidak aktif), IC_{50} 200-1000(sangat lemah), IC_{50} 150-200(lemah), IC_{50} 100-150(sedang), IC_{50} 50-100(kuat), $IC_{50} < 50$ (sangat kuat).

Hasil senyawa asam askorbat, N.1. N.2. E.1. dan E.2. aktivitas antioksidan menunjukkan bahwa perubahan warna dari isolat larutan senyawa yang murni dengan konsentrasi 1000,500,250,125,62,5 ppm yang bervariasi dan memiliki jumlah persen inhibisi yang berbeda-beda dari setiap isolat yang murni mulai dari N.1. N.2. E.1. dan E.3.sehingga dapat disajikan dalam bentuk gambar dibawah ini dilihat pada Gambar 4.6



Gambar 4.6. Berubahnya warna dari setiap konsentrasi larutan senyawa murni. A. Senyawa asam askorbat B. isolat N.1, B. isolat N.2, C. isolat E.1, D. isolat E.2. (a). 1000 ppm (b). 500 ppm (c). 250 ppm (d). 125 ppm (e). 62,5 ppm (f). Blanko.

Gambar 4.6. menjelaskan tentang isolat murni N.1. N.2. E.1. dan E.2. terlihat pada gambar 4.6. tersebut didapatkan golongan senyawa murni jenis terpenoid dan flavonoid perubahan warna yang terjadi dari ungu menjadi kuning setelah diinkubasi selama satu jam, beberapa isolat murni mampu mengurangi kerja radikal bebas DPPH (*1,1-diphenyl-2-picrylhydrazyl*). Larutan DPPH sebagai blanko atau kontrol dari ke 4 isolat murni tersebut blanko memiliki nilai absorbansi yang berbeda – beda, berkurangnya nilai absorbansi dari tiap isolat murni. Menurut Tristantini *et al.* (2016), untuk melihat perubahan warna yang terdapat pada isolat murni tersebut masing – masing sampel diinkubasi atau didiamkan selama satu jam untuk melihat perubahannya. Sehingga elektron yang terdapat pada DPPH akan berpasang dengan isolat tersebut maka akan terjadi perubahan warna dari ungu menjadi kuning terang atau pucat.

Persen inhibisi yang telah didapat dari Tabel 4.7 menunjukkan semakin besar persen inhbisi maka semakin besar pula konsentrasi dan senyawa antioksidan yang terkandung dalam isolat . Menurut Erwin *et al.* (2013), lemah dan kuatnya suatu hasil isolat kemungkinan dipengaruhi oleh komposisi dari isolat tersebut, diduga jika kadar senyawa yang didapat banyak maka persen inhibisi yang didapat semakin besar pula.

Hasil IC_{50} dari senyawa asam askorbat didapatkan 16,3162 ppm sehingga aktivitas antioksidannya tergolong sangat kuat, asam askorbat ini digunakan dalam aktivitas antioksidan daun mahkota dewa sebagai larutan pembanding. Warna pada asam askorbat ini berwarna kuning meskipun sudah didiamkan selama satu jam warnanya tetap kuning. Menurut Purwanto *et al.* (2017), asam askorbat biasanya digunakan sebagai kontrol, berpotensi sebagai antioksidan yang larut dalam air. Sehingga asam askorbat sebagai alternatif atau pembanding dalam uji antioksidan dan didalam asam askorbat tersebut memiliki senyawa bioaktif yang sangat tinggi.

Nilai IC_{50} dari isolat N.1. N.2. dan E.2, menunjukan aktivitas antioksidan yang tergolong sangat kuat dan kuat setelah dilakukannya penentuan dari IC_{50} daun mahkota dewa menggunakan spektrofotometer. Menurut Erwin *et al.* (2013), semakin kecil nilai dari IC_{50} isolat murni maka semakin tinggi juga senyawa bioaktifnya karena memiliki potensi tinggi sebagai antioksidan.

Nilai IC_{50} yang didapatkan E.2 pada daun mahkota dewa (*Phaleria macrocarpa* (Scheff.) Boerl.) mempunyai nilai 77,8355 ppm mempunyai golongan senyawa flavonoid dan tergolong aktivitas antioksidan yang tergolong kuat. Menurut Artanti dan Lisnasari (2018), tumbuhan daun ciplukan mempunyai nilai IC_{50} 64,78 ppm yang tergolong kuat dan diketahui golongan senyawa yang terkandung didalamnya salah satunya flavonoid. Metabolisme sekunder lainnya yang ditemukan antara lain tannin dan saponin.