

BAB IV

HASIL DAN PEMBAHASAN

4.1 Hasil Ekstraksi Daun Wulukula (*Lagenaria siceraria* (Molina) Standly)

Hasil ekstraksi 250 gram sampel daun Wulukula (*Lagenaria siceraria* (Molina) Standly) menggunakan pelarut etanol memperoleh ekstrak kental sebanyak 20.81 gram dengan rendemen sebesar 8.324% . ekstrak yang dihasilkan memiliki bentuk fisik yaitu: berwarna hijau pekat dan bertekstur kental (Gambar 4.1).

Maserasi dilakukan dengan menggunakan pelarut etanol karena etanol dapat melarutkan hampir semua senyawa organik yang ada pada sampel, baik senyawa polar maupun senyawa nonpolar. Selain itu etanol memiliki titik didih yang relatif rendah yaitu 67°C, sehingga mudah diuapkan dan mengurangi resiko terurainya zat yang terkandung di dalam maserat saat penguapan pelarut. (Syarif dkk, 2015).



A.

B

**Gambar 4.1 A. Ekstrak Etano, B. Ekstrak Kental
(Foto Netry, penelitian Agustus 2019)**

4.2 Hasil Analisa Fitokimia Ekstrak Etanol Daun Wulukula

Hasil uji fitokimia ekstrak etanol daun wulukula (*Lagenaria siceraria* (Molina) Standly) asal Desa Ulupulu, Kabupaten Nagekeo dilihat pada tabel 4.1

Tabel 4.1 Hasil Uji Fitokimia Ekstrak Etanol Daun Wulukula

| Kandungan Kimia | Pereaksi | Pustaka | Hasil Uji | Ket |
|-----------------|----------------------------------|----------------------------------|-----------------------------------|-----|
| Flavonoid | + H ₂ SO ₄ | Hijau kehitaman | Hijau kehitaman | +++ |
| | + NaOH | Hijau kecoklatan | Hijau kecoklatan | +++ |
| Saponin | + Aquades | Terbentuk busa stabil 5-10 menit | Terbentuk busa selama 10 menit | +++ |
| Tanin | + FeCl ₃ | Hijau kehitaman | Tidak ada perubahan | - |
| Alkaloid | Mayer | Endapan putih | Terbentuk endapan putih kehijauan | + |
| | Wagner | Endapan coklat | Terbentuk endapan coklat pudar | + |
| | Dragendorff | Endapan jingga hingga merah | Terbentuk endapan jingga | + |
| Terpenoid | Liberman buchard | Cincin kecoklatan atau violet | Tidak ada perubahan | - |
| Steroid | Liberman buchard | Hijau kehitaman | Tidak ada perubahan | - |

Keterangan: sangat kuat (+++), lemah (+), Tidak ada (-)

Sumber: Marlina (2005),

Hasil uji fitokimia dengan mengamati perubahan warna yang terjadi ini, menunjukkan bahwa senyawa yang paling dominan terekstrak dari sampel daun wulukula dengan menggunakan pelarut etanol adalah flavonoid dan saponin hal ini dikarenakan adanya kesamaan sifat kepolaran antara senyawa flavonoid dan saponin terhadap pelarut (Supriyanto, 2017). Namun senyawa alkaloid menunjukkan hasil yang lemah hal ini diduga bahwa sampel daun Wulukula memiliki senyawa alkaloid dengan jumlah yang sedikit sehingga ketika di larutkan dengan menggunakan pelarut yang memiliki sifat kepolaran yang sama dengan senyawa alkaloid, maka alkaloid yang terekstrak dalam jumlah yang sedikit pula.

Menurut Ehsan (2013), Senyawa flavonoid dan alkaloid merupakan senyawa antioksidan aktif yang bekerja dengan cara mendonasikan atom hydrogen kepada radikal bebas, sedangkan saponin merupakan senyawa antioksidan yang tidak aktif karena memiliki nilai IC_{50} lebih besar dari 250 ppm.

4.3 Fraksinasi Ekstrak Etanol Secara Kromatografi

4.3.1 Fraksinasi melalui Kromatografi Lapis Tipis dan Kromatografi Kolom

Fraksinasi diawali dengan pengujian Kromatografi Tapis Tipis dari hasil uji diperoleh pelarut etil asetat : benzene 1 : 2 (v/v) yang menunjukkan pemisahan dengan jumlah noda terbanyak yaitu 12 noda (spot) yang terpisah secara tegas dengan jarak relative berdekatan (Gambar lampiran VI)

Menurut Yani (2011) eluen terbaik adalah eluen yang menghasilkan jumlah noda terbanyak dan terpisah. Eluen hasil kombinasi ini digunakan untuk fraksinasi senyawa pada sampel melalui kromatografi kolom.

Hasil uji kromatografi kolom menghasilkan fraksi sebanyak 32 fraksi dengan tiap fraksi menampung 3 mL. fraksi-fraksi yang dihasilkan kemudian di KLT kembali dengan menggunakan eluen etil asetat:benzene 1:2 (v/v) dan dikelompokkan berdasarkan kesamaan karakter spotnya. Dari hasil pemeriksaan melalui sinar UV diperoleh sebanyak 4 kelompok fraksi yakni fraksi A (fraksi 13 dan 14), fraksi B (fraksi 15-18), fraksi C (fraksi 19-26), dan fraksi D (fraksi 27-32) (Gambar lampiran VI).

4.3.2 Identifikasi Senyawa Hasil Isolasi pada Kromatografi Kolom

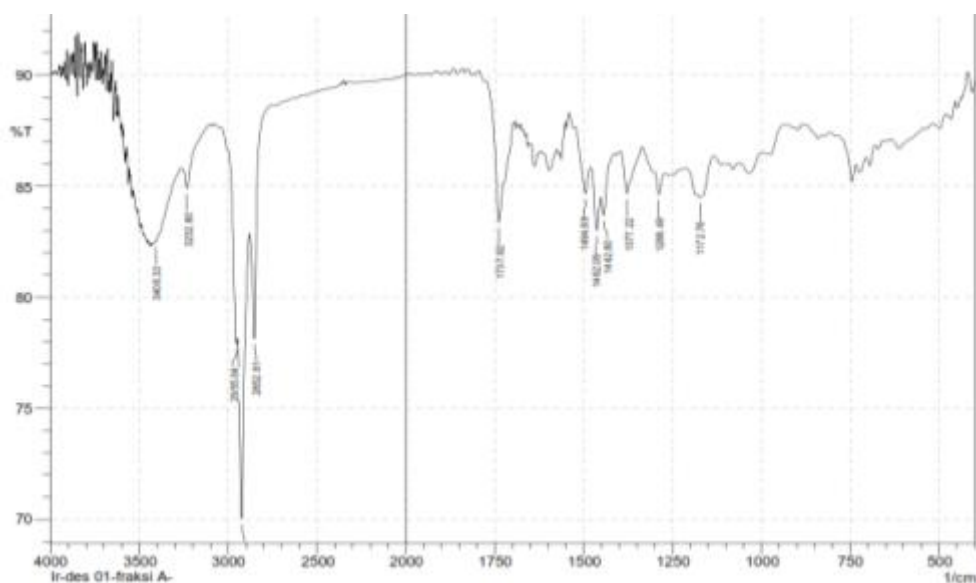
Fraksi-fraksi hasil gabungan (fraksi A, B, C, dan D) diidentifikasi menggunakan spektrofotometri UV-Vis dan spektrofotometri *infra red*. Hasil analisis spektrofotometri UV-Vis Fraksi A, dan B, masing-masing memberikan serapan pada panjang gelombang 285 nm, 295 nm. Dari hasil analisis ini maka dapat diketahui bahwa fraksi A, dan B mengandung senyawa metabolit sekunder yang mengarah pada senyawa flavonoid jenis flavonon karena menyerap sinar pada daerah 275-295 nm.

Fraksi C menghasilkan 2 pita serapan, yaitu pita I pada panjang gelombang 310 nm dan pita II pada panjang gelombang 280 nm sehingga isolate diduga mengandung senyawa flavonoid golongan (Flavon atau Flavonon).

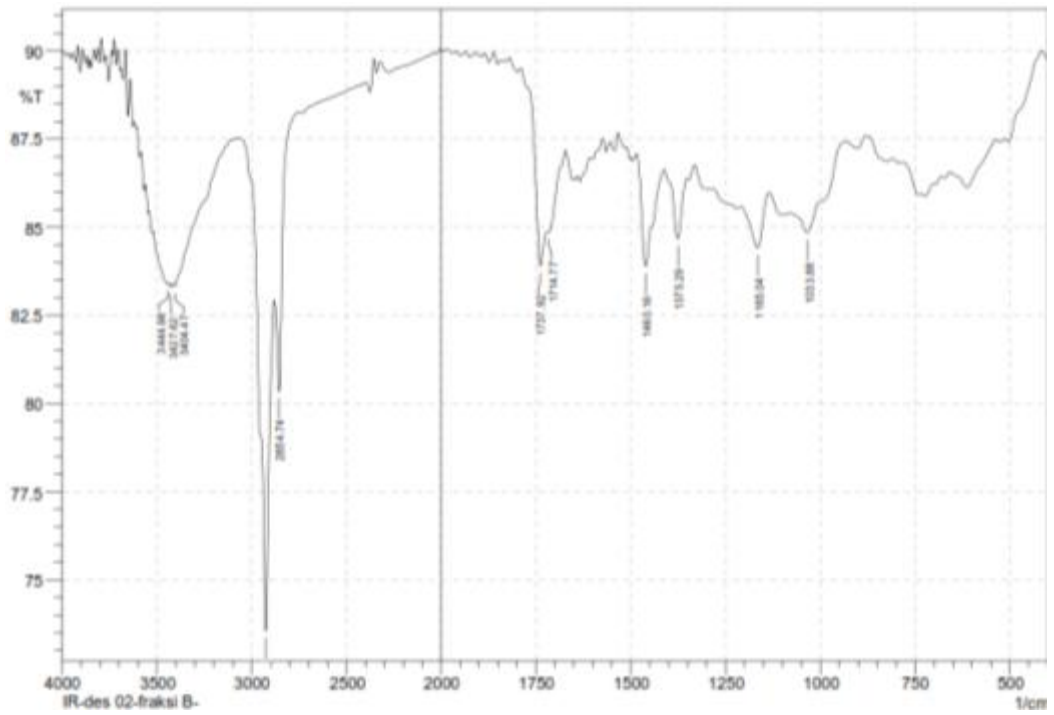
Fraksi D memiliki 2 pita serapan, pita I pada panjang gelombang 305 nm dan pita II pada panjang gelombang 295 nm. Isolat yang teridentifikasi diduga mengandung senyawa flavonoid golongan flavanon karena memberikan serapan pada panjang gelombang 300-330 nm (pita I) dan 275-295 nm (pitaII).

Hasil analisis spektrofotometer UV-Vis sampel daun Wulukula mengandung senyawa flavonoid. Hal ini disesuaikan dengan yang dikemukakan oleh Nelwadi dkk, (2013) yang mengatakan spectrum khas flavonoid memiliki rentang 230-295 nm (pitaII) dan 300-560 nm (pita I)

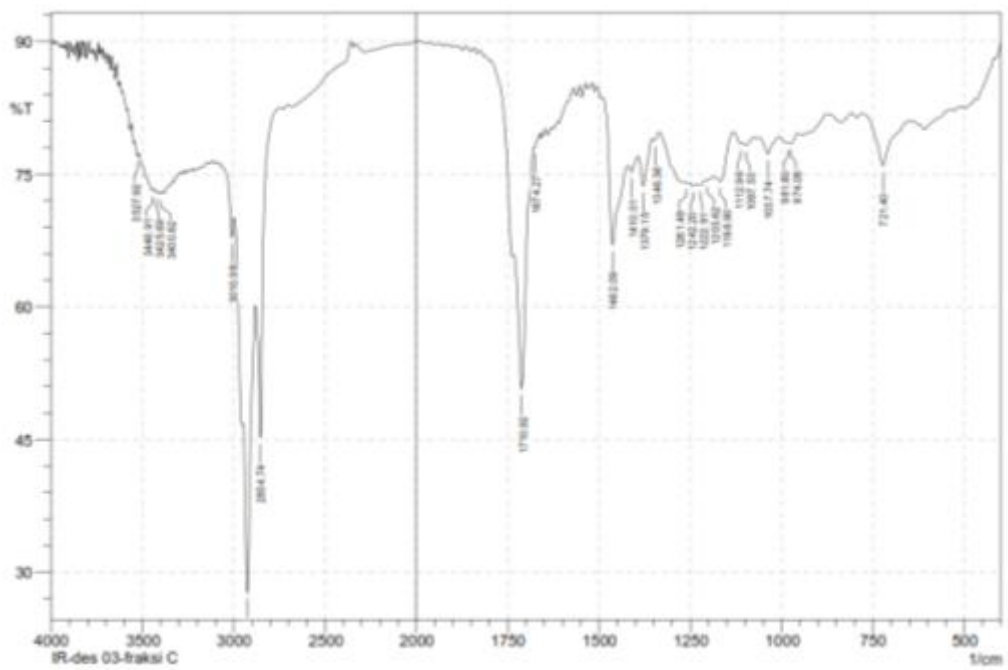
Fraksi-fraksi gabungan kemudian dikering anginkan dan diperoleh berat sampel pada masing-masing fraksi adalah 0.0331 gram (fraksi A), 0.0418 gram (fraksi B), 0.0636 gram (fraksi C), dan 0.0448 gram (fraksi D). Dengan %Rendemen masing-masing adalah 1.655%, 2.09%, 3.18%, dan 2.24%. Dan selanjutnya dilakukan analisis menggunakan spektrofotmer inframerah



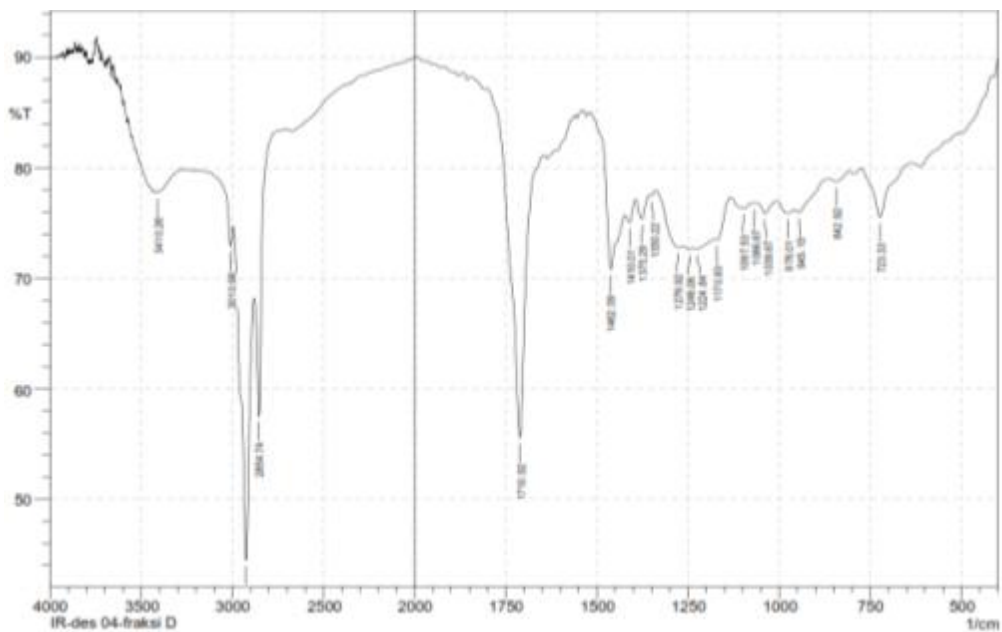
Gambar 4.2 Spektrum Inframerah Fraksi A Ekstrak Etanol Daun Wulukula



Gambar 4.3 Spektrum Inframerah Fraksi B Ekstrak Etanol Daun Wulukula



Gambar 4.4 Spektrum Inframerah Fraksi C Ekstrak Etanol Daun Wulukula



Gambar 4.5 Spektrum Inframerah Fraksi D Ekstrak Etanol Daun Wulukula

Tabel 4.2 Analisis Spektrum *Infrared* fraksi A, B, C, dan D Ekstrak Etanol Daun Wulukula

| Bilangan Gelombang cm^{-1} | | | | Pustaka Rujukan | Komponen Teridentifikasi | |
|-------------------------------------|---------|---------|---------|-----------------|--------------------------|-------------------|
| Fraksi sampel daun Wulukula | | | | | Bentuk pita | Gugus Fungsi |
| A | B | C | D | | | |
| 3408.33 | 3444.98 | 3400.62 | 3410.26 | 3500-3000* | lebar | Ulur OH |
| 3232.8 | 3404.47 | 3446.91 | | | | |
| | | 3010.98 | 3010.98 | 3100-3000 | tajam | Ulur CH aromatic |
| 2852.81 | 2854.74 | 2854.74 | 2854.74 | 2950-2800** | tajam | Ulur C-H alifatik |
| 2924.18 | 2926.11 | 2926.11 | 2926.11 | | | |
| 1737.92 | 1714.77 | 1674.27 | 1710.92 | 1870-1540*** | tajam | C=O karbonil |
| | 1737.92 | 1710.92 | | | | |
| 1442.8 | 1460.16 | 1410.01 | 1410.01 | 1400-1500** | tajam | C=C aromatic |
| 1494.88 | | 1462.09 | 1462.09 | | | |

| | | | | | | |
|---------|---------|---------|---------|------------|-------|--------------|
| 1377.22 | 1375.29 | 1346.36 | 1350.22 | 1400-1300* | tajam | C-C aromatic |
| | | 1379.15 | 1375.29 | | | |
| 1172.76 | 1033.88 | 1037.74 | 1039.67 | 1300-1000* | tajam | C-O eter |
| 1288.49 | 1165.04 | 1261.49 | 1276.92 | | | |
| | | 721.4 | 723.33 | 1000-650* | Tajam | Tekuk C-H |
| | | 981.8 | 976.01 | | | Aromatik |

*Sukadanang (2010), ** Akbar (2010)

Berdasarkan hasil analisis inframerah di atas (Fraksi A, B, C, dan D) mengandung senyawa flavonoid diduga golongan flavonon. Hal ini didukung oleh penelitian yang dilakukan oleh Akbar (2010), bahwa senyawa flavonoid golongan flavonon mempunyai karakteristik gugus fungsi OH fenol pada bilangan gelombang 3500-3000 cm^{-1} , C=C aromatic (1500-1400 cm^{-1}), C-C aromatic (1400-1300 cm^{-1}), C-O eter (1300-1000 cm^{-1}), ulur C-H aromatic (3100-3000 cm^{-1}), tekuk C-H aromatic (1000-650 cm^{-1}), ulur C-H alifatik (2950-2800 cm^{-1}), dan C=O karbonil (1870-1540 cm^{-1}).

4.4 Uji Aktivitas Antioksidan

4.4.1 Ekstrak Daun Wulukula (*Lagenaria siceraria* (Molina) Standl)

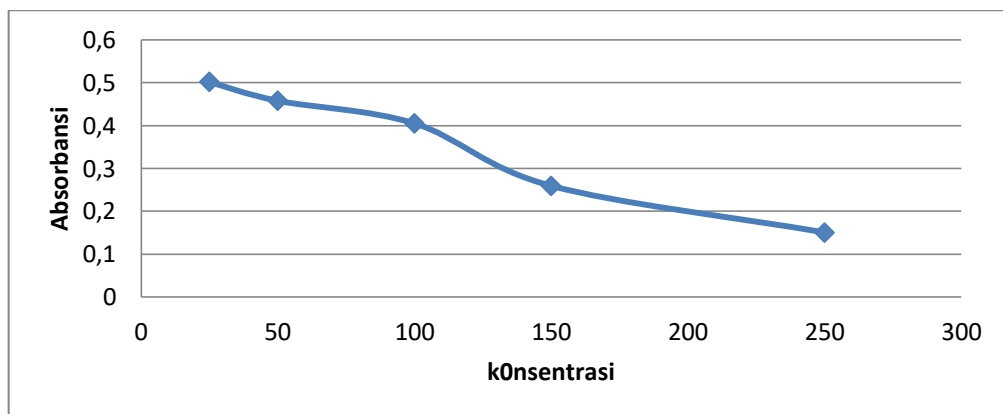
Pengukuran panjang gelombang untuk masing-masing konsentrasi diukur pada panjang gelombang 519 nm yang diperoleh dari absorbansi tertinggi pada blanko. Hasil uji aktivitas antioksidan sampel daun Wulukula yang dianalisis secara spektrofotometri UV-Vis ditunjukkan pada table 4.3:

Tabel 4.3 Hasil Analisis Aktivitas Antioksidan Ekstrak Etanol Daun Wulukula

| Konsentrasi Sampel (ppm) | Absorbansi | %Peredaman Radikal Bebas | IC ₅₀ (ppm) |
|--------------------------|------------|--------------------------|------------------------|
| 0 (Blanko) | 0.759 | 0.00 | |

| | | | |
|-----|-------|-------|-------|
| 25 | 0.502 | 33.86 | |
| 50 | 0.458 | 39.65 | |
| 100 | 0.405 | 49.01 | 96.82 |
| 150 | 0.259 | 65.87 | |
| 250 | 0.150 | 81.55 | |

Berdasarkan data pada tabel 4.3 dapat diketahui bahwa absorbansi sampel cenderung menurun seiring bertambahnya seri konsentrasi. Hasil pengukuran absorbansi sampel dinyatakan melalui grafik yang diperlihatkan pada gambar 4.6



Gambar 4.6. Grafik Hubungan Konsentrasi Terhadap Absorbansi Ekstrak Daun Wulukula

Hasil pengujian antioksidan daun Wulukula yang dilakukan ini, diperoleh data bahwa persentase penghambatan radikal bebas untuk tiap konsentrasi; 25 ppm, 50 ppm, 100 ppm, 150 ppm dan 250 ppm berturut-turut adalah 33.86%, 39.65%, 49.01%, 65.87%, dan 81.55%. Dari data ini ditemukan bahwa persentase penghambatan tertinggi terjadi pada konsentrasi 250 ppm, yakni sebesar 81.55%.

Jumlah DPPH yang ditambahkan pada sampel yaitu konstan (tetap). Pada saat larutan sampel pada masing-masing konsentrasi dipipet 4 mL dan ditambahkan 1 mL DPPH terjadi perubahan warna yaitu dari warna ungu hingga kuning. Semakin tinggi konsentrasi sampel, warna pada larutan uji semakin memudar hingga terjadi perubahan warna menjadi kuning. Penurunan intensitas warna larutan DPPH sebagai akibat terjadinya pelepasan atom hydrogen dari senyawa fenolik kepada electron yang tidak berpasangan yang terdapat pada senyawa DPPH (Elisa, 2015)

Sulandi (2013), mengungkapkan bahwa perubahan warna DPPH dari ungu menjadi kuning pada saat ditambahkan ekstrak sampel akan memperlihatkan penurunan nilai absorbansi radikal bebas DPPH. Semakin rendah nilai absorbansi maka semakin rendah pula aktivitas radikal bebas, hal ini dikarenakan aktivitas radikal bebas telah diredam secara kimiawi oleh molekul zat antioksidan. Kondisi ini secara kualitatif dapat ditunjukkan oleh penurunan intensitas warna atau perubahan warna larutan. Dan hasil penelitian yang diperoleh sesuai dengan literature yang ada, dimana ketika konsentrasi larutan uji dinaikan nilai absorbansi yang diperoleh semakin kecil.

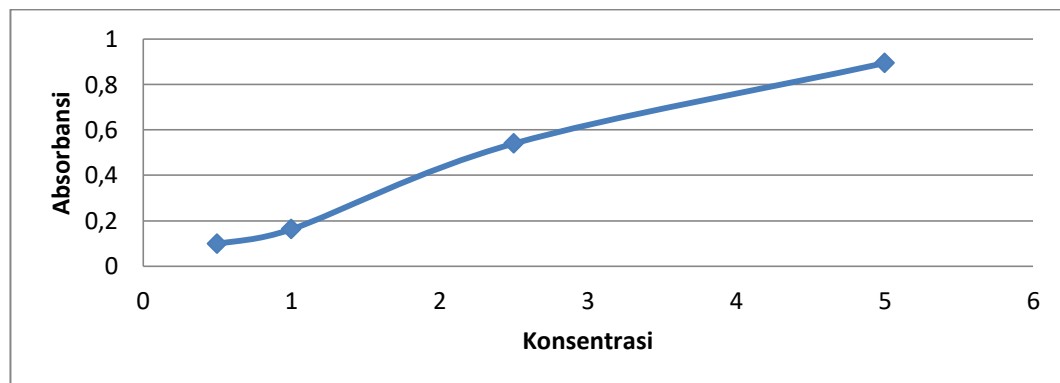
4.4.2 Vitamin C

Larutan vitamin C pada penelitian ini dibuat dengan deret konsentrasi yaitu 0.5, 1, 2.5, dan 5 (ppm). Pengujian aktivitas antioksidan vitamin C ini bertujuan agar dapat dibandingkan secara langsung dengan sampel. Dan hasil

pengukuran absorbansi dari larutan vitamin C. Hasil uji aktivitas antioksidan dianalisis secara spektrofotometri UV-Vis ditunjukkan pada table berikut:

Tabel 4.4 Hasil Analisis Aktivitas Antioksidan Larutan Vitamin C

| Konsentrasi Sampel (ppm) | Absorbansi | %Peredaman Radikal Bebas | IC ₅₀ (ppm) |
|--------------------------|------------|--------------------------|------------------------|
| 0 | 0,525 | 0,00 | |
| 0,5 | 0,473 | 9,90 | |
| 1 | 0,439 | 16,38 | 2,70 |
| 2,5 | 0,241 | 54,10 | |
| 5 | 0,055 | 89,52 | |



Gambar 4.7 Grafik Absorbansi Kontrol Vitamin C

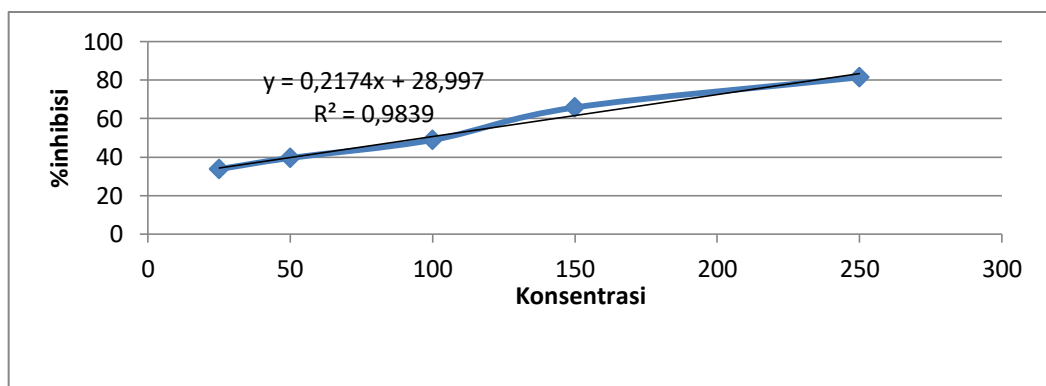
Berdasarkan Gambar dapat dilihat dengan jelas penurunan serapan dengan meningkatnya deret konsentrasi, artinya adalah dari konsentrasi terkecil 0.5 ppm menuju ke konsentrasi tertinggi yaitu 5 ppm terlihat bahwa semakin tinggi konsentrasi senyawa antioksidan akan semakin tinggi pula kemampuannya dalam mengoksidasi radikal DPPH (Shivappasad dkk, 2005). Pada saat vitamin C direaksikan dengan larutan DPPH, warna larutan berubah dari ungu menjadi kuning sehingga hal inilah yang mengakibatkan semakin menurunnya absorbansi

pada setiap konsentrasi. Semakin tinggi deret konsentrasi larutan vitamin C semakin mudah meneruskan cahaya. Kondisi ini sesuai dengan literature dimana vitamin C sebagai antioksidan alami mampu mengoksidasi radikal bebas secara maksimal, hal ini ditandai dengan uji positif yaitu berubahnya warna DPPH menjadi kuning. Hasil ini dapat diartikan bahwa kemampuan optimum dari vitamin C ini berada pada konsentrasi 5 ppm.

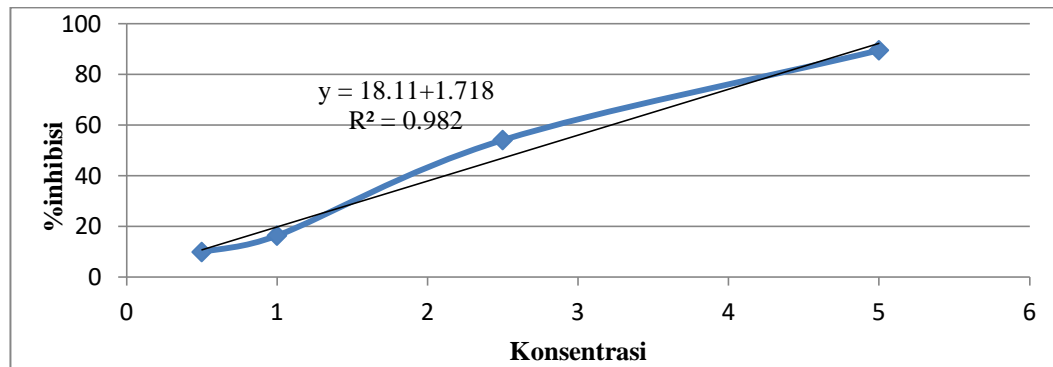
4.4.3 Pengukuran Persentasi Penghambatan

Persentasi penghambatan merupakan angka yang menunjukkan tingkat kekuatan daya antioksidan sampel uji. Secara matematis tingkat kekuatan daya antioksidan dihitung dengan rumus:

$$\% \text{ Penghambatan} = \frac{\text{abs blanko} - \text{abs sampel}}{\text{abs blanko}} \times 100\% \quad 4.1$$



Gambar 4.8 Persentase Penghambatan DPPH terhadap sampel uji ekstrak Daun Wulukula (*Lagenaria siceraria* (Molina) Standly)



Gambar 4.9 Persentase Penghambatan DPPH terhadap Vitamin C (Asam Askorbat)

Berdasarkan Gambar IV.8-IV.9 secara berturut-turut diperoleh persamaan regresi linear yaitu $Y=0.217x+28.99$ (sampel daun Wulukula), dan $Y=18.11+1.718$ (control vitamin C) dengan nilai koefisien korelasi atau R^2 untuk masing-masing sampel yaitu 0.983 dan 0.982. Berdasarkan literature, nilai R^2 yang mendekati 1 menandakan data yang diperoleh sangat baik (Hastono & Sabri, 2011). Hasil pengujian yang diperoleh apabila dibandingkan dengan literature tersebut, maka dapat dikatakan hasil pengujian sangat baik.

Berdasarkan persamaan garis lurus tersebut dapat diperoleh nilai IC_{50} dari sampel daun Wulukula serta vitamin C, secara berturut yaitu 96.82 dan 2.70. Menurut Molyneux (2004), bahwa semakin kecil nilai IC_{50} menunjukkan semakin tingginya aktivitas antioksidan. Suatu senyawa dikatakan memiliki aktivitas antioksidan sangat kuat jika nilai IC_{50} kurang dari 50 ppm, antioksidan kuat untuk IC_{50} bernilai 51-100 ppm, antioksidan sedang jika bernilai IC_{50} 101-150 ppm, antioksidan lemah jika nilai IC_{50} bernilai 151-200 ppm, sedangkan apabila nilai IC_{50} berada di atas 200 ppm maka aktivitas antioksidannya sangat lemah. Apabila nilai hasil IC_{50} pada sampel di atas dikorelasikan dengan literature yang ada, maka

sampel daun Wulukula dapat dikategorikan sebagai antioksidan alami yang tergolong kuat karena memiliki nilai IC_{50} diantara 51-100 ppm. Vitamin C tergolong sebagai antioksidan yang sangat kuat karena memiliki nilai IC_{50} dibawah 50 ppm. Hal ini sesuai yang dikemukakan Isnidar & Setyowati (2011) dimana vitamin C dalam bentuk murninya mampu mereduksi senyawa radikal bebas (DPPH).