

BAB IV

HASIL DAN PEMBAHASAN

A. Pembuatan Esktrak Etanol 95% Daun Jarak Merah

Pembuatan simplisia daun jarak merah diawali dengan memetik daun segar, dikumpulkan, lalu dicuci menggunakan air mengalir dengan tujuan untuk menghilangkan kotoran yang menempel pada daun. Daun jarak merah dikeringkan di bawah sinar matahari dengan ditutup kain hitam sampai kering. Tujuan dari pengeringan adalah untuk mendapatkan simplisia yang tidak mudah rusak dan tidak ditumbuhi jamur dalam penyimpanan jangka lama, menghemat tempat penyimpanan, serta menghentikan proses enzimatik (Himawan *et al.*, 2020). Fungsi dari kain hitam adalah untuk menyerap sinar ultraviolet yang bersifat merusak. Tambahan lagi, hal ini digunakan untuk mencegah kerusakan dan dekomposisi kandungan golongan senyawa dalam daun jarak merah oleh paparan sinar matahari. Daun yang sudah kering diserbuk menggunakan blender, dan diayak dengan ayakan mesh 60, sehingga menghasilkan serbuk simplisia yang berpartikel kecil agar pada proses maserasi (penyarian zat aktif) pelarutnya dapat menembus dinding sel dari simplisia tersebut.

Simplisia yang telah diserbukkan selanjutnya ditimbang hingga bobot mencapai 250 gram, dan dilakukan maserasi selama 5 hari menggunakan 2,5 L etanol 95% sebagai larutan penyari sambil dilakukan pengadukan sesekali. Cairan penyari dibagi menjadi 2 bagian, bagian pertama untuk maserasi

sebanyak 75% (1.875 mL), sementara bagian kedua untuk remaserasi sebanyak 25% dari total pelarut yang digunakan. Perlakuan ini bertujuan agar golongan senyawa aktif dapat tertarik secara sempurna dan didapat jumlah maserat sesuai yang dikehendaki (Nuria *et al.*, 2019).

Selanjutnya, maserat yang diperoleh dari kedua tahap dipekatan menggunakan *rotary evaporator* untuk menghilangkan pelarut yaitu etanol 95% dan menyisahkan senyawa aktif yang diinginkan pada ekstrak (Artini *et al.*, 2022). Pemekatan berlangsung pada suhu 55 °C untuk memisahkan pelarut dari ekstrak tanpa merusak atau menurunkan kualitas senyawa yang terkandung di dalamnya (Damayanti & Fitriana, 2015). Lalu dilanjutkan dengan penguapan ekstrak menggunakan *waterbath* untuk menguapkan pelarut etanol 95% yang masih tersisa dalam ekstrak hingga didapatkan ekstrak kental (Kusumawardany *et al.*, 2023). Berat ekstrak kental yang dihasilkan sebanyak 48,73 g dengan presentase rendemen 19,492%.

B. Pembuatan Fraksi *n*-heksan Ekstrak Etanol 95% Daun Jarak Merah

Fraksinasi dilakukan dengan metode fraksinasi cair-cair, metode ini merupakan pemisahan dengan menggunakan pelarut yang tidak saling bercampur (Woran *et al.*, 2021). Ekstrak kental sebanyak 10 g dilarutkan menggunakan aquadest yang telah dipanaskan, dan difraksi dengan pelarut *n*-heksan masing-masing sebanyak 50 mL dalam corong pisah, dikocok dan didiamkan hingga terbentuk dua lapisan. Terbentuknya lapisan tersebut karena perbedaan kepolaran dari kedua pelarut dimana *n*-heksan memiliki kepolaran yang lebih kecil dari aquadest (Astuti *et al.*, 2023).

Lapisan atas pada corong pisah merupakan fraksi *n*-heksan dan lapisan bawah merupakan aquadest. Hal ini karena perbedaan massa jenis kedua pelarut. Dimana, *n*-heksan memiliki massa jenis yang lebih kecil sehingga menempati lapisan atas. Sementara itu, aquadest memiliki massa jenis lebih besar sehingga berada di lapisan bawah. Perbedaan massa jenis inilah yang menyebabkan kedua pelarut membentuk dua lapisan terpisah dalam corong pisah. Fraksinasi *n*-heksan dilakukan sebanyak 5 kali untuk mengoptimalkan pemisahan berdasarkan kepolaran. Fraksi *n*-heksan yang diperoleh diuapkan menggunakan *waterbath* pada suhu 55 °C hingga memperoleh fraksi kental sebanyak 5,07 g dengan rendemen sebesar 50,7%.

C. Skrining Fitokimia Fraksi *n*-heksan Daun Jarak Merah

Identifikasi senyawa metabolit sekunder dari fraksi *n*-heksan daun jarak merah meliputi senyawa alkaloid, flavonoid, tanin, dan saponin. Adapun hasil identifikasi yang diperoleh dapat dilihat pada Tabel 2.

Tabel 2. Skrining Fitokimia Fraksi *n*-heksan Daun Jarak Merah

Metabolit sekunder	Pereaksi	Pustaka	Hasil
Alkaloid	Mayer	Endapan putih	+
	Dragendorff	jingga	+
	Bouchardat	Endapan coklat-hitam	+
Flavonoid	NaOH	Kuning	+
	H ₂ SO ₄ pekat	cokelat	+
Tanin	FeCl ₃	Warna hijau kehitaman	+
Saponin	Aquades, HCl 2 N	Terbentuk busa stabil selama 10 menit	+

Keterangan: (+) Positif; (-) Negatif

Data yang diperoleh pada Tabel 2 menunjukkan bahwa fraksi *n*-heksan daun jarak merah memiliki kandungan senyawa aktif yang bersifat sebagai antioksidan yaitu senyawa alkaloid, flavonoid, saponin dan tanin. Flavonoid berperan sebagai antioksidan dengan cara melindungi sel dari kerusakan DNA dengan membersihkan sel dari radikal bebas (Putu *et al.*, 2024). Pada pengujian flavonoid, sampel terlebih dahulu dilarutkan dalam etanol 70%, kemudian direaksikan dengan NaOH dan H₂SO₄ pekat. Penambahan NaOH ditandai dengan perubahan warna kuning kecoklatan yang disebabkan adanya senyawa kristin yang merupakan turunan dari senyawa flavon dan mengalami penguraian oleh basa menjadi molekul seperti asetofenon yang berwarna kuning karena adanya pemutusan ikatan pada struktur isoprene . Sedangkan penambahan pereaksi asam sulfat pekat menghasilkan perubahan warna cokelat. Hal ini menunjukkan terjadinya reaksi oksidasi reduksi antara H₂SO₄ pekat dan flavonoid yang menyebabkan terbentuknya senyawa kompleks (Kurnianto *et al.*, 2021).

Pada identifikasi alkaloid menunjukkan hasil positif. Prinsip dasar reaksi ini adalah reaksi pengendapan dimana terjadi pergantian ligan. Atom nitrogen yang mempunyai pasangan elektron bebas pada alkaloid dapat mengganti ion iodo dalam pereaksi-pereaksi. Pereaksi dragendorff dibuat dari campuran bismut nitrat dan kalium iodida yang dilarutkan dalam asam asetat glasial, yang kemudian bereaksi membentuk kompleks kalium tetraiodobismutat (III). Larutan pereaksi wagner mengandung iodium dan kalium iodida yang akan menghasilkan ion triiodida, yang bereaksi dengan kation alkaloid

menghasilkan endapan kompleks ionik. Pada uji alkaloid dengan reagen mayer, nitrogen pada alkaloid akan bereaksi dengan ion logam K^+ dari kalium tetraiodomerkurat (II) membentuk kompleks kalium-alkaloid yang mengendap (Jawa La et al., 2021)

Identifikasi senyawa saponin dilakukan dengan melarutkan 0,1 gram sampel ke dalam 15 mL air panas, kemudian dikocok. Hasil positif ditunjukkan dengan terbentuknya busa stabil yang bertahan selama 10 menit. Saponin adalah senyawa glikosida yang mengandung sapogenin sebagai bagian aglikonnya. Secara kimia, saponin tersusun atas dua komponen utama, yaitu glikon dan aglikon. Bagian glikon terdiri dari unit-unit gula seperti glukosa, fruktosa, atau monosakarida lainnya, sedangkan bagian aglikon merupakan komponen non-gula yang dikenal sebagai sapogenin (Mahmud *et al.*, 2025).

Identifikasi senyawa tanin ditunjukkan melalui terbentuknya warna hijau kehitaman setelah penambahan larutan $FeCl_3$ 1%, yang mengindikasikan hasil positif. Perubahan warna ini terjadi akibat interaksi antara tanin dan ion Fe^{3+} membentuk senyawa kompleks (Safitri *et al.*, 2021).

D. Uji Aktivitas Antioksidan Fraksi *n*-heksan Daun Jarak Merah

Pengujian aktivitas antioksidan dilakukan dengan menggunakan DPPH, Metode DPPH dipilih karena merupakan metode sederhana, sensitivitas tinggi, kemampuan menganalisis sampel dalam waktu singkat dan kebutuhan sampel yang sedikit untuk menguji aktivitas antioksidannya (Monangin *et al.*, 2024). Pengujian DPPH ini, didasarkan pada penurunan intensitas warna ungu akibat reduksi radikal DPPH oleh senyawa antioksidan. Perubahan intensitas warna

tersebut diukur menggunakan Spektrofotometer UV-Vis pada panjang gelombang 517,00 nm. Panjang gelombang yang digunakan dalam penelitian ini berada dalam rentang panjang gelombang maksimum yang sesuai untuk metode DPPH, yaitu antara 515 nm hingga 520 nm (Aprilianti *et al.*, 2021).

Aktivitas antioksidan dari fraksi *n*-heksan daun jarak merah dapat diamati melalui penurunan intensitas warna ungu pada larutan DPPH setelah proses reaksi berlangsung. Penurunan warna ini mengindikasikan terjadinya reaksi antara molekul DPPH dan atom hidrogen yang dilepaskan oleh senyawa dalam sampel, membentuk senyawa *2,2-Diphenyl-1-picrylhydrazyl* yang berwarna kuning. Semakin tinggi konsentrasi sampel yang digunakan, maka semakin besar kemampuannya dalam mereduksi radikal DPPH, yang ditunjukkan oleh peningkatan intensitas warna kuning. Secara kuantitatif, pengurangan warna ungu larutan DPPH dapat diukur melalui penurunan nilai absorbansi menggunakan Spektrofotometer. Dengan kata lain, semakin tinggi konsentrasi larutan uji, semakin rendah nilai absorbansi yang tercatat, yang menunjukkan aktivitas antioksidan yang semakin kuat.

Pada penelitian uji aktivitas antioksidan fraksi *n*-heksan daun jarak merah, peneliti menggunakan seri konsentrasi 25, 50, 75, 100 dan 125 ppm. Hasil pengujian aktivitas peredaman fraksi *n*-heksan daun jarak merah terhadap DPPH dapat dilihat pada Tabel 3.

Tabel 3. Hasil Pengujian Aktivitas Peredaman Fraksi *n*-heksan Daun Jarak Merah Terhadap DPPH

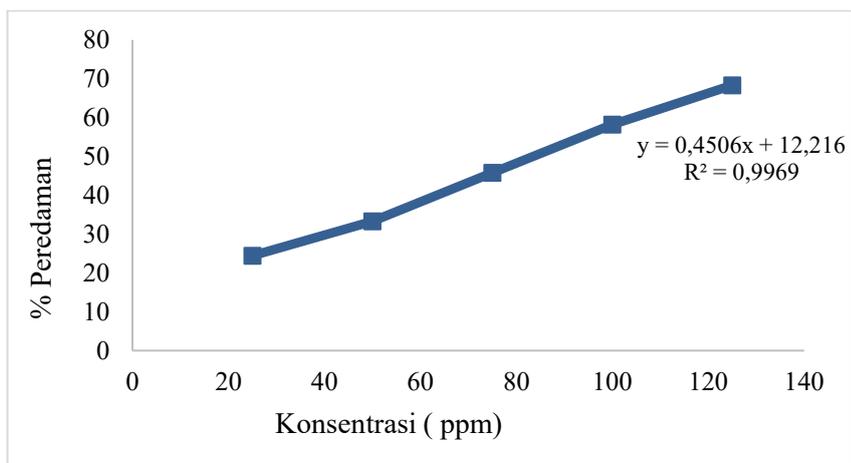
No	Konsentrasi (ppm)	Persen peredaman (%)		Rata-rata persen (%) peredaman ± SD	Persamaan regresi linear
		R1	R2		
1	25	24,312	24,549	24,431 ± 0,118	y = 0,4506x + 12,216 r ² = 0,9969
2	50	34,456	32,187	33,322 ± 1,135	
3	75	44,697	46,887	45,792 ± 1,095	
4	100	56,975	59,431	58,203 ± 1,228	
5	125	67,933	68,705	68,319 ± 0,386	

(Sumber: data primer, 2025)

Keterangan R : Replikasi

Berdasarkan Tabel 3 diperoleh persamaan regresi linear pada Tabel 3 dimana $y = 0,4506x + 12,216$ dengan koefisien korelasi (r) 0,9969. Nilai r pada persamaan regresi linear digunakan untuk mengetahui arah hubungan antara dua variabel.

Koefisien korelasi (r) memiliki rentang antara 0 hingga 1. Jika nilai $r = 0$, berarti tidak terdapat hubungan antara kedua variabel tersebut. Sebaliknya, jika $r = \pm 1$, maka hubungan antara keduanya bersifat sempurna. Pada Tabel 3 nilai r yang positif menunjukkan bahwa terdapat hubungan yang kuat dan searah antara kedua variabel. Artinya, semakin tinggi konsentrasi fraksi *n*-heksan daun jarak merah, semakin besar pula persentase daya peredamnya. Hubungan ini juga tergambarkan secara visual pada Gambar 3.



Gambar 3. Kurva hubungan konsentrasi dan Persen Peredaman Fraksi *n*-heksan Daun Jarak Merah terhadap DPPH

Hasil analisis regresi linear berupa nilai x pada Gambar 3 dimasukkan ke dalam rumus $IC_{50} = \text{antilog}(x)$. Parameter konsentrasi yang ekuivalen memberikan 50% aktivitas antioksidan dengan penangkapan radikal DPPH adalah nilai *Inhibition Concentration* (IC_{50}). Semakin kecil nilai IC_{50} maka semakin besar aktivitas antioksidan dan sebaliknya. Nilai IC_{50} fraksi *n*-heksan dapat dilihat pada Tabel 4.

Tabel 4. Nilai IC_{50} Fraksi *n*-heksan Daun Jarak Merah

Nilai IC_{50} (ppm)		Rata-rata $IC_{50} \pm SD$ (ppm)
Replikasi 1	Replikasi 2	
84,86	82,90	83,88 \pm 1,39

Berdasarkan data Tabel 4 nilai rata-rata IC_{50} fraksi *n*-heksan daun jarak merah adalah 83,88 ppm yang termasuk dalam kategori antioksidan kuat, karena berada dalam rentang 50–100 ppm, di mana senyawa dikatakan sangat kuat jika nilai $IC_{50} < 50$ ppm, kuat (50–100 ppm), sedang (100–150 ppm), lemah (150–200 ppm) dan sangat lemah jika > 200 ppm (Fatmawati *et al.*, 2023).

Kemampuan fraksi *n*-heksan daun jarak merah memiliki aktivitas penangkap radikal bebas karena adanya reduksi elektron tunggal pada radikal DPPH oleh atom hidrogen dari senyawa antioksidan. Pemberian atom hidrogen dari antioksidan akan membentuk senyawa difenilpikrilhidrazin tereduksi (DPPH-H) yang bersifat non radikal. Akibat reaksi tersebut, terjadi peningkatan senyawa kompleks non radikal dan penurunan radikal bebas DPPH (Mu'awwanah & Ulfah, 2015).

E. Hasil Pengujian Aktivitas Antioksidan Vitamin C

Pengujian antioksidan juga dilakukan pada vitamin C. Vitamin C berfungsi sebagai kontrol terhadap DPPH yang dibuat dalam 5 seri konsentrasi yaitu 1, 2, 3, 4 dan 5 ppm. Pengujiannya menggunakan metode yang sama pada fraksi *n*-heksan daun jarak merah. Hasil pengujian dapat dilihat pada Tabel 5.

Tabel 5. Hasil Pengujian Aktivitas Peredaman Vitamin C Terhadap DPPH

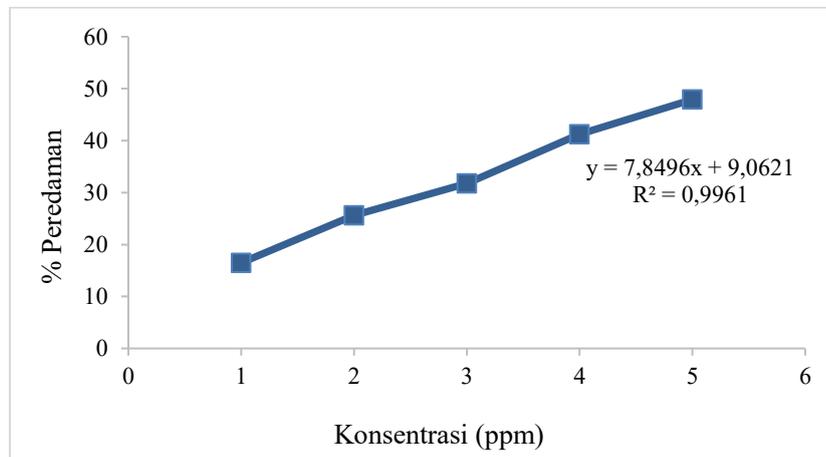
No	Konsentrasi (ppm)	Persen peredaman (%)		Rata-rata persen peredaman (%) ± SD	Persamaan regresi linear
		R1	R2		
1	1	16,806	16,159	16,483 ± 0,324	y = 7,8495x + 9,0621 r ² = 0,9961
2	2	25,366	25,882	25,624 ± 0,258	
3	3	31,472	32,088	31,780 ± 0,308	
4	4	41,631	40,868	41,250 ± 0,381	
5	5	47,450	48,385	47,918 ± 0,467	

(Sumber: data primer, 2025)

Keterangan R : Replikasi

Berdasarkan Tabel 5 diperoleh persamaan regresi linear yakni $y = 7,8495x + 9,0621$ dengan koefisien korelasi (r) 0,9961. Nilai r pada persamaan regresi linear digunakan untuk mengetahui arah hubungan antara dua variabel. Nilai r pada persamaan Tabel 5, dimana nilai r bernilai positif dapat diketahui bahwa hubungan antara dua variabel tersebut memiliki keeratan sempurna yaitu

semakin tinggi konsentrasi vitamin C maka semakin besar pula persen peredamannya. Hubungan tersebut dapat dilihat pada Gambar 4.



Gambar 4. Kurva Hubungan Konsentrasi dan Persen Peredaman Vitamin C Terhadap DPPH

Gambar 4 menunjukkan hubungan antara konsentrasi sampel dengan persen peredaman berbanding lurus, di mana semakin tinggi konsentrasi larutan sampel uji yang digunakan, maka semakin banyak kandungan antioksidan di dalamnya. Hal ini menyebabkan peningkatan kemampuan peredaman radikal bebas, yang ditunjukkan dengan meningkatnya persentase inhibisi terhadap radikal bebas.

Hasil analisis regresi linier berupa nilai x , dimasukkan ke dalam rumus $IC_{50} = \text{antilog}(x)$. Nilai *Inhibition Concentration* (IC_{50}) ialah konsentrasi yang ekuivalen memberikan 50% aktivitas antioksidan dengan penangkapan radikal DPPH (lampiran 11). Semakin kecil nilai IC_{50} maka semakin besar aktivitas antioksidan. Nilai IC_{50} vitamin C dapat dilihat pada Tabel 6.

Tabel 6. Nilai IC₅₀ Vitamin C

Nilai IC ₅₀ (ppm)		Rata-rata IC ₅₀ ± SD (ppm)
Replikasi 1	Replikasi 2	
5,25	5,18	5,22 ± 0,05

Nilai IC₅₀ tersebut mengindikasikan vitamin C berpotensi sebagai antioksidan yang sangat kuat karena nilai IC₅₀ < 50 ppm. Vitamin C digunakan sebagai senyawa pembanding karena vitamin C merupakan antioksidan sekunder yang dapat mencegah berbagai radikal bebas ekstra selular. Hal itu karena vitamin C mampu meredam radikal bebas melalui proses reduksi. Dalam proses ini, vitamin C akan teroksidasi menjadi asam dehidroaskorbat sambil memberikan elektron kepada radikal bebas, sehingga menstabilkannya (Melasasi *et al.*, 2021).