

**UJI AKTIVITAS ANTIOKSIDAN DAN PENETAPAN KADAR FENOLIK  
TOTAL FRAKSI ETIL ASETAT EKSTRAK ETANOL BUAH BUNI  
[*Antidesma bunius* L. (Spreng)] DENGAN METODE 2,2-DIFENIL-1-  
PIKRILHIDRAZIL (DPPH) DAN METODE FOLIN-CIOCALTEU**

**SKRIPSI**

Diajukan untuk Memenuhi Salah Satu Syarat  
Memperoleh Gelar Sarjana Farmasi (S.Farm.)  
Program Studi Farmasi



Oleh :

Astrid Pangestuty

NIM : 128114114

**FAKULTAS FARMASI  
UNIVERSITAS SANATA DHARMA  
YOGYAKARTA**

**2016**

**UJI AKTIVITAS ANTIOKSIDAN DAN PENETAPAN KADAR FENOLIK  
TOTAL FRAKSI ETIL ASETAT EKSTRAK ETANOL BUAH BUNI  
[*Antidesma bunius* L. (Spreng)] DENGAN METODE 2,2-DIFENIL-1-  
PIKRILHIDRAZIL (DPPH) DAN METODE FOLIN-CIOCALTEU**

**SKRIPSI**

Diajukan untuk Memenuhi Salah Satu Syarat  
Memperoleh Gelar Sarjana Farmasi (S.Farm.)  
Program Studi Farmasi



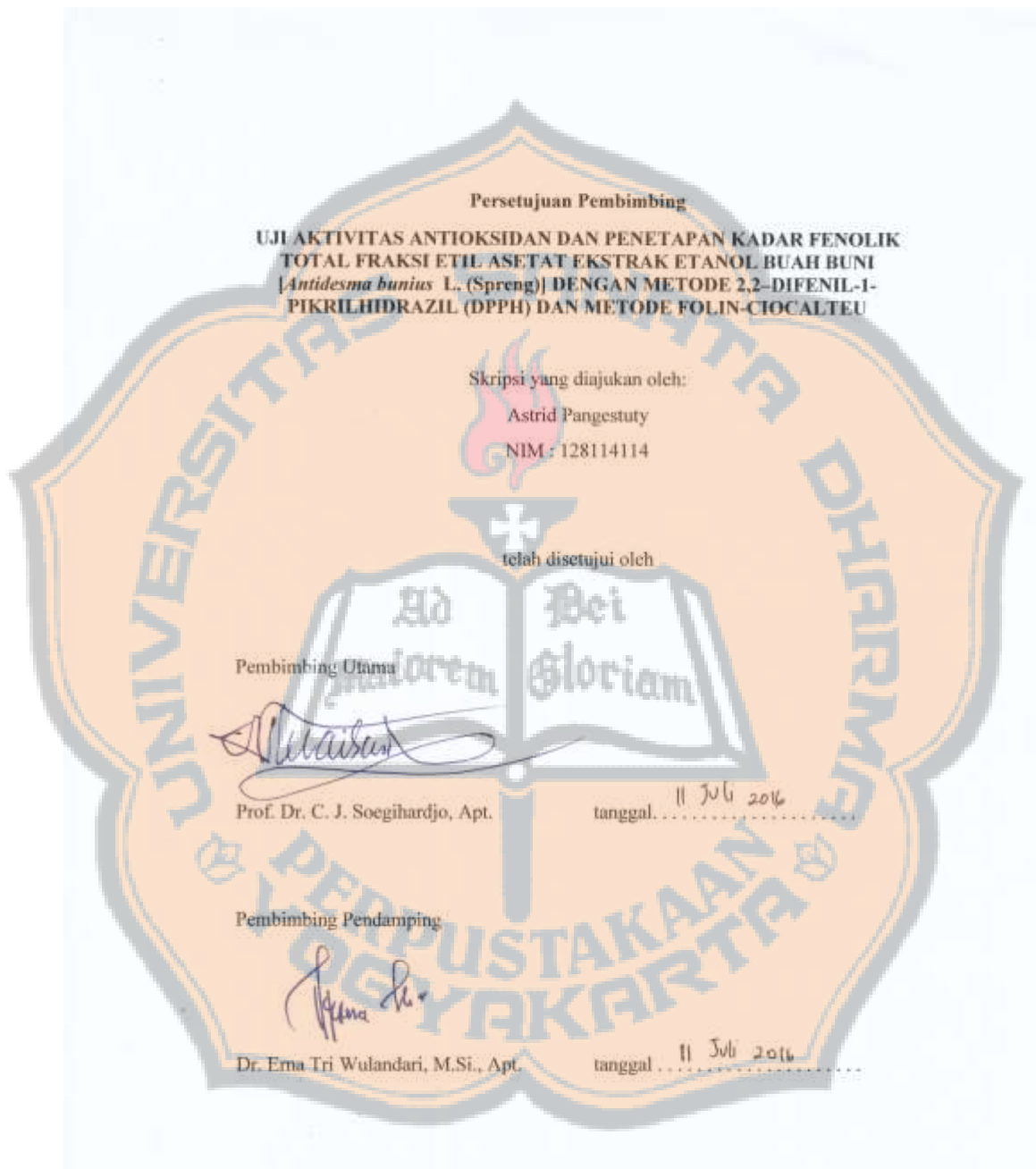
Oleh :

Astrid Pangestuty

NIM : 128114114

**FAKULTAS FARMASI  
UNIVERSITAS SANATA DHARMA  
YOGYAKARTA**

**2016**



Pengesahan Skripsi Berjudul

**UJI AKTIVITAS ANTIOKSIDAN DAN PENETAPAN KADAR FENOLIK  
TOTAL, FRAKSI ETIL ASETAT EKSTRAK ETANOL BUAH BUNI  
[*Antidesma bunius* L. (Spreng)] DENGAN METODE 2,2-DIFENIL-1-  
PIKRILHIDRAZIL (DPPH) DAN METODE FOLIN-CIOCALTEU**

Oleh :

Astrid Pangestuty

NIM : 128114114

Dipertahankan di hadapan Panitia Penguji Skripsi

Fakultas Farmasi

Universitas Sanata Dharma

pada tanggal : 23 Agustus 2016

Mengetahui

Fakultas Farmasi

Universitas Sanata Dharma

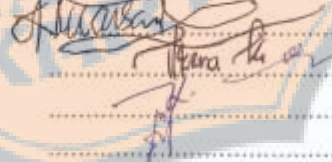
Dekan

Aris Widayati, M.Si., Ph.D., Apt.

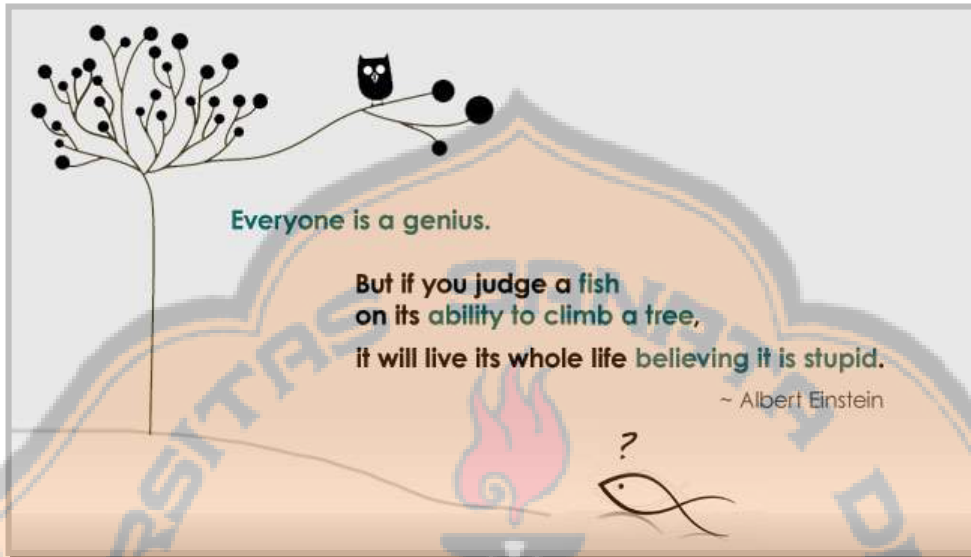
Panitia Penguji

1. Prof. Dr. C.J. Soegihardjo, Apt.
2. Dr. Erna Tri Wulandari, M.Si., Apt.
3. Dr. Yustina Sri Hartini, M.Si., Apt.
4. F. Dika Octa Riswanto, M.Sc

Tanda Tangan



HALAMAN PERSEMBAHAN



[Markus 9 : 23]

Tidak ada yang mustahil bagi orang yang percaya!

Kupersembahkan karya ini kepada :

Tuhan Yesus Kristus dan Bunda Maria, sumber kehidupan yang senantiasa menyertai, menuntun dan menguatkan setiap langkahku

Bapak dan Ibu, Eyang Uti, dan Mas Arya

Almamaterku yang kubanggakan

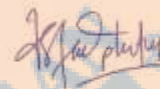
**PERNYATAAN KEASLIAN KARYA**

Saya menyatakan dengan sesungguhnya bahwa skripsi yang saya tulis ini tidak memuat karya atau bagian karya orang lain, kecuali yang telah disebutkan dalam kutipan dan daftar pustaka, sebagaimana layaknya karya ilmiah.

Apabila di kemudian hari ditemukan indikasi plagiarisme dalam naskah ini, maka saya bersedia menanggung segala sanksi sesuai peraturan perundang-undangan yang berlaku.

Yogyakarta, 23 Juni 2016

Penulis



Astrid Pangestuty

LEMBAR PERNYATAAN PERSETUJUAN PUBLIKASI KARYA ILMIAH  
UNTUK KEPENTINGAN AKADEMIS

Yang bertanda tangan di bawah ini, saya mahasiswa Universitas Sanata Dharma :

Nama : Astrid Pangestuty

Nomor Mahasiswa : 128114114

Demi pengembangan ilmu pengetahuan, saya memberikan kepada Perpustakaan Universitas Sanata Dharma karya ilmiah saya yang berjudul :

“Uji Aktivitas Antioksidan dan Penetapan Kadar Fenolik Total Fraksi Etil Asetat Ekstrak Etanol Buah Buni [*Antidesma buniae* L. (Spreng)] dengan Metode 2,2-Difenil-1-Pikrilhidrazil (DPPH) dan Metode Folin-Ciocalteu”

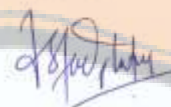
berserta perangkat yang diperlukan (bila ada). Dengan demikian saya memberikan kepada Universitas Sanata Dharma hak untuk menyimpan, mengalihkan dalam bentuk media lain, mengelolanya dalam bentuk pangkalan data, mendistribusikannya secara terbatas dan mempublikasikannya di internet atau media lain untuk kepentingan akademis tanpa perlu meminta ijin dari saya maupun memberikan royalti kepada saya selama tetap mencantumkan nama saya sebagai penulis.

Demikian surat pernyataan ini yang saya buat dengan sebenarnya.

Dibuat di Yogyakarta

Pada tanggal : 23 Agustus 2016

Yang menyatakan,



Astrid Pangestuty

## PRAKATA

Puji syukur dan terima kasih penulis haturkan kepada Tuhan Yesus Kristus dan Bunda Maria atas segala berkat dan penyertaan sehingga skripsi yang berjudul “Uji Aktivitas Antioksidan dan Penetapan Kadar Fenolik Total Fraksi Etil Asetat Ekstrak Etanol Buah Buni [*Antidesma bunius* L. (Spreng)] dengan Metode 2,2-Difenil-1-Pikrilhidrazil (DPPH) dan Metode Folin-Ciocalteu” dapat diselesaikan dengan baik oleh penulis.

Penulis menyadari bahwa selama penulisan skripsi ini penulis mendapat banyak dukungan berupa doa, dukungan, kritik dan saran yang berguna dari berbagai pihak, oleh karena itu pada kesempatan ini penulis ingin menyampaikan ucapan terima kasih kepada :

1. Ibu Aris Widayati, M.Si., Ph.D., Apt., selaku Dekan Fakultas Farmasi Universitas Sanata Dharma.
2. Bapak Prof. Dr. C. J. Soegihardjo, Apt. dan Ibu Dr. Erna Tri Wulandari, M.Si., Apt. selaku dosen pembimbing atas pendampingan, arahan serta masukan yang diberikan kepada penulis selama penyusunan proposal hingga penulisan skripsi ini terselesaikan.
3. Ibu Dr. Yustina Sri Hartini, M.Si., Apt. dan Bapak F. Dika Octa Riswanto, M.Sc. selaku Dosen Penguji atas saran dan masukan yang diberikan kepada penulis.



4. Bapak Wagiran, Mas Bimo, dan Bapak Heru yang telah membantu selama penelitian berlangsung.
5. Bapak, Ibu dan Mas Arya, keluarga terkasih atas segala doa, dukungan dan semangat yang terus diberikan kepada penulis dari awal hingga akhir penyusunan skripsi.
6. Maria Faustina, Bertha Nathania, Kristi Natalia, Prita Patricia, para sahabat tercinta yang selalu memberi dukungan, semangat, motivasi dan masukan kepada penulis.
7. Teman-teman Farmasi Sains-Teknologi B dan keluarga besar Farmasi Angkatan 2012 Universitas Sanata Dharma atas segala dukungan dan doa yang diberikan.
8. Semua pihak yang tidak bisa disebutkan satu per satu oleh penulis, atas segala bentuk dukungan yang diberikan selama proses penulisan skripsi.

Penulis menyadari bahwa di dalam penulisan skripsi ini masih terdapat banyak kekurangan mengingat keterbatasan pengetahuan dan kemampuan penulis. Oleh karena itu penulis sangat mengharapkan kritik dan saran yang membangun untuk perkembangan selanjutnya.

Penulis

**DAFTAR ISI**

	Halaman
HALAMAN JUDUL .....	i
HALAMAN PERSETUJUAN PEMBIMBING .....	ii
HALAMAN PENGESAHAN .....	iii
HALAMAN PERSEMBAHAN .....	iv
PERNYATAAN KEASLIAN KARYA .....	v
PERSETUJUAN PUBLIKASI .....	vi
PRAKATA .....	vii
DAFTAR ISI .....	ix
DAFTAR TABEL .....	xii
DAFTAR GAMBAR .....	xiii
DAFTAR LAMPIRAN .....	xiv
INTISARI .....	xv
<i>ABSTRACT</i> .....	xvi
BAB I PENGANTAR .....	1
A. Latar Belakang .....	1
1. Permasalahan .....	5
2. Keaslian penelitian .....	6
3. Manfaat penelitian .....	6
B. Tujuan Penelitian .....	7
1. Tujuan umum .....	7
2. Tujuan khusus .....	7

BAB II TINJAUAN PUSTAKA .....	8
A. Buni .....	8
B. Fenolik dan Flavonoid.....	10
C. Radikal Bebas.....	13
D. Antioksidan .....	13
E. Ekstraksi .....	16
F. Spektrofotometri .....	19
G. Kromatografi Lapis Tipis.....	21
H. Metode Uji Aktivitas Antioksidan.....	23
I. Metode Folin-Ciocalteu.....	26
J. Landasan Teori .....	27
K. Hipotesis .....	29
BAB III METODE PENELITIAN .....	30
A. Jenis dan Rancangan Penelitian .....	30
B. Variabel Penelitian .....	30
1. Variabel bebas.....	30
2. Variabel terikat.....	30
3. Variabel pengacau.....	30
4. Variabel tak terkendali .....	30
C. Definisi Operasional .....	30
D. Alat dan Bahan Penelitian .....	31
1. Bahan penelitian .....	31
2. Alat penelitian.....	32
E. Tata Cara Penelitian .....	32
1. Determinasi tanaman.....	32
2. Pengambilan buah buni.....	32
3. Pembuatan ekstrak .....	33

4. Pembuatan fraksi.....	33
5. Uji kualitatif .....	34
6. Pembuatan larutan pembanding dan larutan uji.....	34
7. Penentuan kandungan fenolik total .....	36
8. Penentuan aktivitas antioksidan fraksi etil asetat buah buni.....	37
F. Analisis Hasil.....	39
<b>BAB IV HASIL DAN PEMBAHASAN</b> .....	<b>41</b>
A. Hasil Determinasi Tanaman.....	41
B. Hasil Pengumpulan Bahan .....	41
C. Hasil Penyiapan Sampel.....	42
D. Ekstraksi Buah Buni.....	42
E. Fraksinasi Ekstrak Etanol Buah Buni.....	45
F. Uji Kualitatif Fraksi Etil Asetat.....	48
G. Penetapan Kandungan Fenolik Total Fraksi Etil Asetat .....	53
H. Uji Aktivitas Antioksidan Fraksi Etil Asetat .....	61
<b>BAB V KESIMPULAN DAN SARAN</b> .....	<b>74</b>
A. Kesimpulan .....	74
B. Saran .....	74
<b>DAFTAR PUSTAKA</b> .....	<b>75</b>
<b>LAMPIRAN</b> .....	<b>81</b>
<b>BIOGRAFI PENULIS</b> .....	<b>107</b>

## DAFTAR TABEL

	Halaman
Tabel I. Penggolongan senyawa flavonoid .....	12
Tabel II. Fase gerak yang digunakan pada KLT flavonoid.....	23
Tabel III. Nilai R <sub>f</sub> dan warna bercak uji KLT fenolik pada berbagai cara deteksi.....	50
Tabel IV. Warna bercak uji KLT flavonoid dengan berbagai cara deteksi .....	52
Tabel V. Hasil <i>scanning</i> panjang gelombang maksimum asam galat.....	57
Tabel VI. Hasil pengukuran absorbansi asam galat.....	59
Tabel VII. Kandungan fenolik total fraksi etil asetat.....	60
Tabel VIII. Hasil <i>scanning</i> panjang gelombang maksimum DPPH .....	64
Tabel IX. Hasil pengukuran % <i>IC</i> rutin .....	66
Tabel X. Hasil pengukuran % <i>IC</i> fraksi etil asetat.....	68
Tabel XI. Kriteria penerimaan CV berdasarkan konsentrasi analit .....	70
Tabel XII. Nilai <i>IC</i> <sub>50</sub> rutin dan fraksi etil asetat.....	70

## DAFTAR GAMBAR

	Halaman
Gambar 1. Struktur kerangka dasar flavonoid .....	13
Gambar 2. Kurva waktu operasional .....	21
Gambar 3. Pembentukan kompleks warna merah dalam metode deoksiribosa ..	25
Gambar 4. Reaksi DPPH dengan antioksidan .....	26
Gambar 5. Ekstrak kental etanol buah buni .....	46
Gambar 6. Fraksi etil asetat ekstrak etanol buah buni .....	49
Gambar 7. Hasil uji KLT fenolik fraksi etil asetat ( $S_1, S_2, S_3$ ) dengan pembanding rutin (P) menggunakan fase diam silika GF <sub>254</sub> dan fase gerak n-butanol : asam asetat glasial : air (5:1:4 v/v) setelah penyemprotan FeCl <sub>3</sub> ...	51
Gambar 8. Hasil uji KLT flavonoid fraksi etil asetat ( $S_1, S_2, S_3$ ) dengan pembanding rutin (P) menggunakan fase diam silika GF <sub>254</sub> dan fase gerak n-butanol : asam asetat glasial : air (5:1:4 v/v) setelah penyemprotan AlCl <sub>3</sub> ...	53
Gambar 9. Reaksi senyawa flavonoid dengan pereaksi AlCl <sub>3</sub> .....	54
Gambar 10. Pembentukan ion fenolat dalam suasana basa .....	55
Gambar 11. Reaksi asam galat dan reagen Folin-Ciocalteu .....	56
Gambar 12. Grafik optimasi OT metode Folin-Ciocalteu .....	57
Gambar 13. Struktur kimia asam galat.....	60
Gambar 14. Kurva persamaan regresi linier asam galat.....	61
Gambar 15. Grafik penentuan OT metode DPPH .....	64
Gambar 16. Donasi proton senyawa antioksidan ke DPPH .....	65
Gambar 17. Struktur kimia rutin .....	67
Gambar 18. Kurva persamaan regresi linier aktivitas antioksidan rutin .....	69
Gambar 19. Kurva persamaan regresi linier aktivitas antioksidan fraksi etil asetat.....	70

## DAFTAR LAMPIRAN

	Halaman
Lampiran 1. Surat determinasi buah buni.....	81
Lampiran 2. Gambar tanaman buah buni.....	82
Lampiran 3. Gambar buah buni.....	83
Lampiran 4. Rendemen fraksi etil asetat buah buni.....	83
Lampiran 5. Hasil uji KLT fenolik dengan penyemprotan pereaksi $FeCl_3$ .....	84
Lampiran 6. Hasil uji KLT flavonoid dengan penyemprotan pereaksi $AlCl_3$ ....	85
Lampiran 7. Data penimbangan untuk penetapan kandungan fenolik total.....	86
Lampiran 8. Optimasi penetapan kandungan fenolik total.....	87
Lampiran 9. Penetapan kandungan fenolik total.....	88
Lampiran 10. Data penimbangan untuk uji aktivitas antioksidan.....	93
Lampiran 11. Data pengenceran larutan uji aktivitas antioksidan.....	94
Lampiran 12. Optimasi uji aktivitas antioksidan.....	98
Lampiran 13. Uji aktivitas antioksidan dengan DPPH.....	101
Lampiran 14. Perhitungan $IC_{50}$ rutin dan fraksi etil asetat.....	104
Lampiran 15. Hasil uji statistik dengan program R 3.2.4.....	105
Lampiran 16. Spektra pengukuran aktivitas antioksidan fraksi etil asetat.....	106

## INTISARI

Radikal bebas merupakan senyawa yang bersifat reaktif akibat adanya elektron bebas pada strukturnya. Kecenderungan radikal bebas untuk menstabilkan diri dapat mengoksidasi komponen sel seperti lipid, protein dan DNA sehingga menginisiasi timbulnya berbagai penyakit. Pengaruh radikal bebas dapat dikurangi oleh antioksidan, dengan cara menetralkan kereaktifan radikal bebas. Beberapa antioksidan sintesis seperti *butyl hydroxy anisol* (BHA), propil galat (PG) dan *ter-butyl hydroquinone* (tBHQ) dapat memicu kanker sehingga sumber antioksidan alam dianggap lebih aman digunakan.

Menurut beberapa penelitian, buah Buni [*Antidesma bunius* L. (Spreng)] diklaim mengandung senyawa fenolik yang berefek antioksidan seperti kaemferol, kuersetin, mirisetin, asam fenolik, dan antosianin. Jumlah senyawa fenolik seringkali dikaitkan dengan aktivitas antioksidan yang dimiliki, oleh karena itu tujuan dari penelitian ini adalah menetapkan kandungan fenolik total dan mengukur aktivitas antioksidan fraksi etil asetat ekstrak etanol buah Buni menggunakan metode Folin-Ciocalteu dan metode DPPH. Etil asetat dipilih untuk melarutkan flavonoid yang sifatnya kurang polar seperti kuersetin.

Hasil penelitian menunjukkan kandungan fenolik total sebesar  $11,1462 \pm 0,1595$  mg ekuivalen asam galat per gram fraksi sedangkan aktivitas antioksidan ( $IC_{50}$ ) fraksi etil asetat ekstrak etanol buah buni sebesar  $355,5011 \pm 16,4092$   $\mu\text{g/mL}$ .

**Kata kunci** : Buni, fraksi etil asetat, antioksidan, senyawa fenolik,  $IC_{50}$



## ABSTRACT

Free radical is a very reactive compound as a result of an unpaired electron in its structure. The tendency of free radical to stabilize its structure can cause oxidation of cell components such as lipid, protein and DNA which lead to various diseases. These effects could be avoided with antioxidant by reducing free radical reactivity. Some of the synthetic antioxidant such as butyl hydroxy anisol (BHA), propyl gallic (PG) dan ter-butyl hydroquinone (tBHQ) could initiate cancer so that natural sources of antioxidant are considered safer to be used.

According to some studies, [*Antidesma bunius* L. (Spreng)] fruits called Buni was claimed to have phenolic compounds that have antioxidant activity such as kaempferol, quercetin, miricetin, fenolic acids, and anthocyanin. Total phenolic content (TPC) frequently associated with antioxidant activity, therefore the aim of this study is to establish TPC using Folin-Ciocalteu method and to determine antioxidant activity of ethyl acetate fraction from Buni fruit using DPPH assay. Ethyl acetate was used to dissolve the less polar flavonoid such as quercetin.

The result showed that antioxidant activity ( $IC_{50}$ ) of ethyl acetate fraction from Buni fruit was  $355.5011 \pm 16.4092 \mu\text{g} / \text{mL}$  while its total phenolic content was  $11.1462 \pm 0.1595 \text{ mg GAE} / \text{gram fraction}$ .

**Key words** : Buni, ethyl acetate fraction, antioxidant, phenolic compound,  $IC_{50}$

## BAB I

### PENGANTAR

#### A. Latar Belakang

Radikal bebas merupakan molekul reaktif yang dihasilkan dari berbagai proses dalam tubuh seperti metabolisme, respirasi sel, maupun reaksi peradangan. Adanya elektron bebas menyebabkan kereaktifan radikal bebas yang cenderung menstabilkan diri dengan mengikat elektron dari molekul di sekitarnya. Radikal bebas yang dihasilkan oleh tubuh adalah *reactive oxygen species* (ROS) seperti radikal superoksida, radikal peroksida, radikal nitrit oksida, dan radikal hidroksil. Tidak hanya bersumber dari tubuh saja, radikal bebas juga dapat dihasilkan dari polusi lingkungan, paparan sinar ultraviolet berlebih, radiasi sinar gamma, radiasi sinar X, bahkan asap rokok. Pada konsentrasi tinggi, radikal bebas dapat mengoksidasi komponen sel seperti asam nukleat, protein, lemak, bahkan DNA sehingga dapat menginisiasi timbulnya berbagai penyakit antara lain hipertensi, aterosklerosis, gangguan syaraf, diabetes, asma, penuaan dini (*aging*) bahkan kanker (Leong dan Shui, 2001).

Di dalam tubuh terdapat senyawa yang secara alami dibentuk dan bersifat antioksidatif. Senyawa-senyawa ini digunakan sebagai pertahanan tubuh terhadap radikal bebas. Senyawa tersebut umumnya berupa enzim-enzim antara lain superoksida dismutase (SOD), katalase, glutathion peroksidase, serta senyawa selain

enzim seperti vitamin C, vitamin E,  $\beta$ -karoten, dan asam urat . Terbatasnya jumlah enzim-enzim ini di dalam tubuh diatasi dengan mengkonsumsi asupan antioksidan tambahan yang dapat mendukung kerja antioksidan dalam mengurangi resiko timbulnya gangguan kesehatan akibat radikal bebas. Antioksidan dari luar dapat bersumber dari alam maupun hasil sintesis, namun beberapa antioksidan sintetis seperti *butyl hydroxy anisol* (BHA), propil galat (PG) dan *ter-butyl hydroquinone* (tBHQ) diketahui dapat menyebabkan mutasi DNA dan memicu kanker sehingga antioksidan alam dianggap lebih aman digunakan (Gharavi, *et al.*, 2007). Hal ini yang mendorong adanya eksplorasi terhadap antioksidan alam terutama yang berasal dari tumbuhan.

Tanaman Buni [*Antidesma bunius* L. (Spreng)] telah lama dikenal sebagai tanaman obat di kawasan Asia karena beberapa bagian dari tanaman ini yang dimanfaatkan untuk menyembuhkan penyakit. Bagian tanaman yang dapat digunakan antara lain akar, kulit batang, daun dan buah. Di negara Thailand dan Filipina, akar dan kulit batang tanaman Buni digunakan untuk mengobati disentri dan mengurangi rasa nyeri pada tubuh, sedangkan di negara China daun yang masih muda dipakai sebagai penambah rasa dalam masakan serta diolah menjadi minuman teh (Lim, 2012). Di Indonesia, buah Buni merupakan bagian tanaman yang paling banyak dimanfaatkan untuk pengobatan karena dikenal memiliki aktivitas farmakologis sebagai antidisentri, antioksidan, antikanker, antidiabetes serta memberikan efek sudorifik atau peluruh keringat. Menurut penelitian Jorjong, *et al.* (2015), senyawa antioksidan yang terdapat dalam buah buni adalah flavonol (kaemferol, kuersetin, mirisetin), asam fenolik, dan

antosianin. Selain untuk pengobatan, buah Buni juga diolah menjadi minuman seperti sirup, minuman fermentasi (*wine*), *jelly*, bahan pewarna, bahkan dapat langsung dikonsumsi karena rasanya yang asam dan manis (Belmi, *et al.*, 2014).

Buah Buni dikenal sebagai buah yang kaya nutrisi karena mengandung komponen penting seperti karbohidrat, gula, protein, mineral dan vitamin. Berdasarkan penelitian yang telah dilakukan terhadap ekstrak metanol buah Buni, diketahui kandungan di dalamnya antara lain asam organik, asam fenolik berupa asam galat, asam ferulat dan asam kafeat, serta flavonoid berupa antosianin, luteolin, rutin, resveratrol, kuersetin, prosianidin A, prosianidin B dan katekin (Butkhup dan Samappito, 2008). Senyawa fenolik telah banyak diteliti sebagai senyawa yang bertanggungjawab terhadap berbagai aktivitas biologis tanaman, salah satunya yaitu antioksidan, sehingga jumlahnya dapat berpengaruh pada kekuatan aktivitas antioksidan (Cartea, *et al.*, 2011). Flavonoid diketahui sebagai senyawa fenolik yang banyak ditemukan tersebar pada berbagai bagian tanaman, sehingga pada penelitian ini dilakukan pengukuran aktivitas antioksidan dan penetapan kandungan fenolik total buah Buni. Dalam penelitian Butkhup dan Samappito (2011) dikatakan bahwa buah Buni yang matang sempurna merupakan saat pemanenan yang paling tepat untuk memperoleh kandungan antioksidan tertinggi karena pada tahap ini senyawa yang berpotensi sebagai antioksidan jumlahnya paling tinggi selama masa perkembangan buah. Senyawa yang dimaksud antara lain prosianidin B1, prosianidin B2, (+)-katekin, (-)-epikatekin, rutin, kaemferol dan resveratrol. Oleh karena itu pada penelitian ini

digunakan buah Buni yang telah matang sempurna, yaitu buah yang berwarna merah kehitaman.

Sejauh ini penelitian terkait aktivitas antioksidan buah Buni dilakukan pada ekstrak metanol sedangkan pelarut lain belum banyak dilakukan, oleh karena itu perlu dilakukan eksplorasi terhadap pelarut selain metanol sehingga dapat diperoleh pelarut yang paling baik untuk mengekstrak antioksidan dalam buah Buni. Air, metanol, etanol, aseton dan etil asetat merupakan pelarut yang umum digunakan untuk mengekstrak flavonoid dari bahan alam (Taroreh, *et al.*, 2015). Etanol dipilih karena dapat melarutkan flavonoid dengan baik terutama flavonoid yang bersifat semipolar hingga polar, selain itu etanol merupakan pelarut yang lebih aman dibandingkan metanol. Menurut Watson (2014), pemurnian ekstrak diperlukan agar identifikasi dan kuantifikasi senyawa fenolik lebih akurat dengan cara menghilangkan senyawa yang tidak diinginkan melalui ekstraksi secara berulang. Ekstraksi cair-cair adalah metode yang banyak digunakan untuk pemurnian ekstrak berdasarkan kepolaran kedua pelarut yang dipilih. Etil asetat dipilih karena kemampuannya paling baik dalam melarutkan aglikon yang kurang polar dan aglikon termetoksilasi yang banyak ditemukan di bagian permukaan luar buah dibandingkan dengan pelarut non-polar lain (Nollet, 2000).

Metode *2,2-diphenyl-1-picrylhydrazil* (DPPH) merupakan metode yang paling umum digunakan untuk mengukur aktivitas antioksidan secara *in vitro*. Keuntungan metode ini antara lain prosedur kerjanya yang sederhana, waktu pengerjaan yang relatif cepat dibanding metode lain dan memiliki sensitivitas yang baik. DPPH merupakan

senyawa nitrogen organik yang memiliki karakteristik warna ungu dengan daerah serapan pada 515-520 nm (Locatelli *et al.*, 2009). Adanya antioksidan sebagai pendonor elektron akan berpasangan dengan elektron bebas DPPH, menyebabkan turunnya intensitas warna larutan. Turunnya absorbansi dan intensitas warna sebanding dengan jumlah elektron yang ditangkap oleh antioksidan (Bastos *et al.*, 2007).

Penetapan kandungan fenolik total dapat dilakukan dengan metode Folin-Ciocalteu atau HPLC. Pemilihan metode Folin-Ciocalteu karena metode ini sederhana, cepat dan murah namun memiliki reliabilitas yang tinggi. Reagen Folin-Ciocalteu merupakan oksidator senyawa fenolik di dalam sampel untuk menghasilkan kompleks warna biru yang diukur intensitasnya dengan spektrofotometer sinar tampak (Agustiningsih, *et al.*, 2010). Menurut Prior, *et al.* (2005), pemilihan standar penetapan fenolik total disesuaikan dengan jenis senyawa fenolik di dalam sampel namun asam galat merupakan standar yang direkomendasikan untuk mendapatkan hasil yang reliabel. Asam galat diketahui memiliki reaktivitas yang cukup tinggi terhadap reagen Folin-Ciocalteu dibandingkan dengan senyawa fenolik lainnya sehingga dapat digunakan sebagai standar dalam penetapan kadar fenolik total (Everette, *et al.*, 2010).

## 1. Permasalahan

- a. Berapa nilai aktivitas antioksidan fraksi etil asetat ekstrak etanol buah Buni melalui uji penangkapan DPPH yang dinyatakan sebagai  $IC_{50}$  ?

- b. Berapa nilai kandungan fenolik total fraksi etil asetat ekstrak etanol buah Buni melalui metode Folin-Ciocalteu yang dinyatakan sebagai massa ekuivalen asam galat?

## 2. Keaslian Penelitian

Penelitian yang pernah dilakukan terkait buah Buni yaitu penelitian yang dilakukan Lizardo, *et al.* (2015) mengenai analisis kandungan fenolik total, aktivitas peredaman radikal DPPH dan aktivitas antibakteri ekstrak etanol buah Buni yang berwarna merah dan ungu kehitaman. Hasil yang diperoleh menunjukkan kandungan fenolik total dan aktivitas antioksidan yang lebih tinggi pada buah Buni berwarna ungu kehitaman, yaitu sebesar 141,80 g CE/ 100 g dan 87,10%.

Penelitian Jorjong, Butkhup dan Samappito (2015) mengenai perbandingan aktivitas antioksidan ekstrak metanol buah Buni dari daerah timur laut Thailand yang diukur dengan metode DPPH (*2,2'-diphenyl-1-picrylhydrazyl hydrate*), ABTS (*2',2'-azinobis[3-ethylbenzothiazline-6-sulfonic acid] diammonium salt*), dan FRAP (*Ferric Reducing/Antioxidant Power Assay*) serta penetapan fenolik total menggunakan metode HPLC (*High Performance Liquid Chromatography*). Aktivitas antioksidan buah Buni yang diperoleh dari metode DPPH lebih tinggi dibandingkan dua metode lainnya yaitu sebesar 67,46 mmol ekuivalen vitamin C tiap gram buah segar.

Perbedaan penelitian ini dengan penelitian-penelitian sebelumnya adalah pada tempat pengambilan sampel, metode penetapan fenolik total dengan metode Folin-Ciocalteu, serta penggunaan fraksi etil asetat ekstrak etanol buah Buni sebagai sampel.

### 3. Manfaat penelitian

#### a. Manfaat teoritis

Memberikan informasi untuk perkembangan ilmu pengetahuan khususnya pemanfaatan buah Buni sebagai sumber antioksidan serta melengkapi bukti ilmiah mengenai aktivitas antioksidan dari fraksi etil asetat buah Buni.

#### b. Manfaat praktis

Memberikan pengetahuan bagi masyarakat mengenai potensi buah Buni sebagai sumber antioksidan alam yang dapat dimanfaatkan untuk meningkatkan kesehatan.

### B. Tujuan Penelitian

#### 1. Tujuan umum

Menguji aktivitas antioksidan dan menetapkan kandungan fenolik total dalam fraksi etil asetat ekstrak etanol buah Buni.

#### 2. Tujuan khusus

- a. Mengukur aktivitas antioksidan fraksi etil asetat ekstrak etanol buah Buni yang dinyatakan dalam  $IC_{50}$  menggunakan metode DPPH.
- b. Menetapkan kandungan fenolik total fraksi etil asetat ekstrak etanol buah Buni menggunakan metode Folin-Ciocalteu yang dinyatakan dengan massa ekuivalen asam galat.



## BAB II

### TINJAUAN PUSTAKA

#### A. Buni

##### 1. Uraian tanaman

###### a) Nama umum dan sinonim

Nama umum : buni; sinonim : *Antidesma crassifolium* (Elmer) Merr., *Antidesma dallachyanum* Baillon., *Antidesma rumphii* Tulase, *Stilago bunius* L.

###### b) Nama daerah

Buni (Indonesia), Wuni (Jawa), Burneh (Madura), Huni (Sunda), Bune, Sadipe (Makassar), dan Katakuti (Maluku).

###### c) Klasifikasi tanaman

Suku : euphorbiaceae; marga : *Antidesma* L.; jenis : *Antidesma bunius* (L.) Spreng (United States Departement of Agriculture, 2013).

###### d) Deskripsi tanaman

Tanaman Buni dapat tumbuh liar di daerah kering maupun daerah beriklim lembab di negara-negara Asia seperti India, Sri Lanka, Myanmar, Thailand, dan Indonesia. Tanaman ini dideskripsikan sebagai pohon berbatang sedang dengan tinggi mencapai 15-20 meter. Daunnya tunggal berseling, berbentuk lanset memanjang, panjang daun 9-25 cm, bentuk pertulangan menyirip. Bunganya majemuk berbentuk tandan di ujung dan

dalam ketiak dengan kelopak berbentuk cawan, bunga jantan bertangkai pendek, bunga betina bertangkai, benangsari berwarna kuning berjumlah 3-4. Buah Buni berbentuk bulat telur dengan diameter 8-10 mm, berupa buah basah berdaging, berwarna hijau saat masih muda dan merah sampai hitam saat masak. Berbiji batu yang pipih sepanjang 6-8 mm dan lebar 4.5-5.5 mm dan rusuk yang berbentuk jala (van Steenis, 1992).

e) Kandungan kimia buah Buni

Buah Buni mengandung banyak nutrisi dan senyawa-senyawa penting yang dibutuhkan oleh tubuh, seperti karbohidrat, glukosa, vitamin, mineral, dan asam organik. Menurut Butkhub dan Samappito (2008), ekstrak metanol buah Buni mengandung asam organik, asam fenolat, dan flavonoid. Asam organik yang ditemukan antara lain asam sitrat, asam benzoat, asam laktat, asam malat, asam oksalat, asam asetat, dan asam askorbat. Asam fenolik dalam ekstrak terdiri dari asam galat, asam ferulat, dan asam kafeat, sedangkan flavonoid yang ditemukan berupa antosianin, luteolin, rutin, resveratrol, kuersetin, prosianidin, dan katekin. Dalam penelitian Haripyaree *et al.*, Amelia *et al.* (2013), disebutkan bahwa ekstrak metanol buah Buni menunjukkan aktivitas antioksidan yang lebih tinggi dibandingkan buah-buahan yang lain dengan rata-rata nilai  $IC_{50}$  100,08  $\mu\text{g/mL}$ . Kandungan fenolik total (TPC) ekstrak metanol buah Buni matang sebesar 8,66 mg

ekuivalen asam galat, asam organik total (TOA) 49,36 mg/L, asam fenolik total (TPA) 76,04 mg/L dan flavonoid totalnya (TFC) sebesar 397,90 mg/L.

### **B. Fenolik dan Flavonoid**

Senyawa fenolik merupakan metabolit sekunder yang ditemukan tersebar di beberapa bagian tanaman, seperti buah, daun, dan batang. Senyawa yang digolongkan sebagai senyawa fenolik memiliki ciri khas yaitu terdapat satu atau lebih gugus hidroksil (OH) yang menempel pada struktur cincinnya. Senyawa dengan satu gugus hidroksil pada strukturnya disebut senyawa fenol, sedangkan jika gugus hidroksil lebih dari satu disebut senyawa polifenol (Hoelz, *et al.*, 2010).

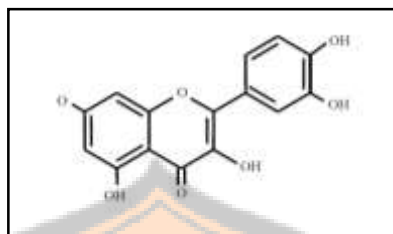
Aktivitas biologis yang dimiliki senyawa fenolik sangat luas meliputi antibakteri, antiinflamasi, antitrombotik, antivirus, hepatoprotektif, antikanker, dan anti alergi. Aktivitas-aktivitas tersebut seringkali dikaitkan dengan mekanisme kerjanya sebagai antioksidan (Hoelz, *et al.*, 2010). Mekanisme senyawa fenolik sebagai antioksidan menurut Janeiro dan Brett (2004), yaitu melalui kemampuan gugus fenol untuk berpasangan dengan radikal bebas dengan cara mendonorkan atom hidrogennya melalui transfer elektron, proses ini mengubah fenol menjadi radikal fenoksil. Radikal fenoksil ini dapat menstabilkan diri melalui proses resonansi sehingga tidak terjadi reaksi berantai pembentukan radikal.

Menurut Yordi, *et al.* (2012), senyawa fenolik bersifat esensial untuk pertumbuhan dan reproduksi tanaman, serta diproduksi sebagai respon pertahanan

terhadap patogen dan kondisi stres pada tanaman. Senyawa fenolik merupakan pemberi warna, rasa dan aroma yang spesifik pada bagian tanaman tertentu, seperti antosianin sebagai pigmen warna merah dan ungu pada anggur, eugenol sebagai pemberi aroma pada pisang, dan flavanon yang menyebabkan rasa pahit. Karakteristik kelompok senyawa ini dikenal tidak stabil dan mudah teroksidasi terutama dalam kondisi basa, kelarutannya secara umum dalam pelarut organik polar, sedangkan bentuk glikosidanya larut dalam air.

Senyawa fenolik diklasifikasikan berdasarkan jumlah dan susunan atom karbonnya menjadi flavonoid dan non-flavonoid. Flavonoid dibagi menjadi beberapa kelompok besar antara lain flavonol, flavon, flavanone dan isoflavon, sedangkan senyawa non-flavonoid terdiri dari asam fenolik, stilben, dan hidroksisinasamat. Senyawa fenolik seringkali ditemukan terkonjugasi dengan gula dan asam organik (Cartea, *et al.*, 2011). Flavonoid merupakan senyawa fenolik yang paling banyak ditemukan dalam tanaman (Yordi, *et al.*, 2012).

Flavonoid disintesis dari asam amino fenilalanin melalui jalur sintesis polipropenoid dan dapat dikenali dari ciri struktur dasarnya  $C_6-C_3-C_6$ , yaitu berupa 2 cincin aromatik  $C_6$  dan 1 cincin tengah heteroatom dengan atom O di dalamnya. Pengelompokan flavonoid berdasarkan letak gugus hidroksil yang bervariasi serta modifikasi kerangka cincin heterosiklik yang dapat berupa piron, piran, atau pirlum (Redha, 2010). Berdasarkan jumlahnya dalam tanaman, flavonol merupakan flavonoid yang paling umum ditemukan dalam tanaman (Cartea, *et al.*, 2011).



**Gambar 1. Struktur kerangka dasar flavonoid (Redha, 2010).**

**Tabel I. Penggolongan senyawa flavonoid (Evans, 2002).**

Jenis flavonoid	Contoh senyawa
Flavon	Luteolin, apigenin, tangeritin
Flavonol	Kuersetin, kaemferol, mirisetin
Flavanon	Naringenin, hesteretin
Flavan-3-ol	Katekin, epikatekin
Isoflavon	Genistein, formononetin, glisitein
Kalkon dan Xanthone	Gentisin

Menurut Halliwell dan Gutteridge, *cit.*, Widowati, *et al.* (2005), mekanisme flavonoid sebagai antioksidan yaitu mengkelat ion logam yang terlibat dalam produksi radikal bebas dan menekan pembentukan radikal bebas, salah satunya yang dihasilkan dari peroksidasi lipid, dengan cara menghambat enzim. Peranan flavonoid sebagai antioksidan digunakan sebagai perlindungan tubuh terhadap penyakit kardiovaskuler dan degenerasi sel dengan meredam radikal bebas seperti radikal superoksida dan hidroksil (Dewick, 2002). Flavonoid bersifat polar karena memiliki gugus hidroksi yang tersubstitusi gula sehingga larut dalam pelarut polar seperti air, metanol, etanol

dan aseton. Pelarut yang disarankan untuk ekstraksi flavonoid adalah campuran air dan metanol, etanol atau aseton (Markham, 1988).

### **C. Radikal bebas**

Radikal bebas adalah atom atau molekul yang tidak stabil dan sangat reaktif karena mengandung satu atau lebih elektron tidak berpasangan. Atom atau molekul radikal bebas akan bereaksi dengan molekul disekitarnya untuk memperoleh kestabilan dengan cara menarik elektron. Reaksi radikal bebas dengan molekul lain dapat berlangsung secara berkesinambungan dan menimbulkan reaksi berantai, jika berlangsung terus menerus akan menimbulkan berbagai gangguan kesehatan seperti kanker, jantung, penuaan dini serta penyakit degeneratif lainnya (Antolovich, *et al.*, 2002).

Kerusakan akibat radikal bebas disebut dengan kerusakan oksidatif pada dasarnya dapat diminimalisir oleh senyawa endogen, yaitu antioksidan yang secara alami terdapat di dalam tubuh. Namun jika jumlah radikal bebas dalam tubuh melebihi batas kemampuan proteksi antioksidan endogen, maka dibutuhkan antioksidan dari luar untuk membantu sistem pertahanan tubuh terhadap radikal bebas (Birben, *et al.*, 2012).

### **D. Antioksidan**

Antioksidan merupakan senyawa yang dapat menghambat proses oksidasi radikal bebas dengan cara menyumbangkan pasangan elektron. Reaksi oksidasi

didefinisikan sebagai suatu reaksi kimia yang mentransfer elektron dari satu zat ke oksidator, reaksi ini dapat menghasilkan radikal bebas dan memicu reaksi berantai sehingga menyebabkan kerusakan sel tubuh. Di dalam tubuh, antioksidan berperan sebagai mekanisme pertahanan terhadap radikal bebas yang beberapa diantaranya telah terdapat di dalam tubuh secara alami, seperti superoksida dismutase (SOD), glutathion peroksidase (GPx), katalase (CAT), dan glutathion-S-transferase (GST). Namun, jika pembentukan radikal bebas terus meningkat karena pengaruh eksternal, sistem pertahanan ini dapat menjadi kurang efektif sehingga diperlukan asupan antioksidan dari luar. Antioksidan yang bersifat non esensial seperti  $\alpha$ -tokoferol,  $\beta$ -karoten, vitamin C dan flavonoid dapat diperoleh dari berbagai jenis sayur dan buah-buahan (Widowati, *et al.*, 2005).

Pada prinsipnya, antioksidan berperan untuk menghentikan reaksi berantai senyawa radikal melalui mekanisme penangkapan radikal bebas yaitu dengan memberikan satu elektron untuk berpasangan dengan elektron bebas dari senyawa radikal sehingga menjadi non-radikal (Rohmatussolihat, 2009). Mekanisme penangkapan radikal bebas oleh antioksidan dibedakan menjadi mekanisme enzimatik dan non enzimatik. Antioksidan yang bekerja secara enzimatik antara lain superoksida dismutase, katalase, glutathion reduktase, dan glutathion peroksidase. Secara non enzimatik, antioksidan bekerja melalui beberapa mekanisme antara lain :

- a. Menangkap dan menghambat pembentukan radikal bebas hasil dari proses peroksidasi lipid, seperti vitamin C, vitamin E dan  $\beta$ -karoten

- b. Pengkelat logam, yaitu EDTA
- c. Kofaktor enzim antioksidan, misalnya glutathion sebagai kofaktor enzim glutathion peroksidase dan transferase (Birben, *et al.*, 2012).

Antioksidan bekerja dengan dua cara, pertama antioksidan berfungsi sebagai pemberi atom hidrogen dan disebut sebagai antioksidan primer. Senyawa ini dapat memberikan atom hidrogen secara cepat ke radikal lipid sehingga memiliki keadaan yang lebih stabil. Cara kerja antioksidan yang kedua disebut sebagai antioksidan sekunder yang dapat memperlambat laju autooksidasi dengan berbagai mekanisme di luar mekanisme pemutusan reaksi berantai (Rohmatussolihat, 2009).

Antioksidan secara umum diklasifikasikan menjadi dua, yaitu antioksidan alami dan antioksidan sintetis. Antioksidan alami banyak ditemukan pada tumbuhan seperti sayuran dan buah-buahan. Antioksidan alami lebih banyak dipilih daripada antioksidan sintetis karena dinilai lebih aman dan memiliki efek samping terhadap tubuh yang lebih sedikit. Antioksidan sintetis merupakan senyawa antioksidan hasil dari reaksi kimia. Jenis antioksidan sintetis yang banyak digunakan antara lain butil hidroksi toluen (BHT), butil hidroksi anisol (BHA), propil galat (PG), dan ter-butil hidrokuinon (TBHQ) (Sing, 2007).

Berbagai metode dapat digunakan untuk mengevaluasi aktivitas antioksidan dalam suatu tanaman, antara lain spektrofotometri menggunakan (1,1-*diphenyl-2-picrylhidrazyl*) DPPH, ABTS<sup>+</sup> (2,2 *azinobis(3-ethylbenzothialine-6 sulfonic acid)*) dan Fe<sup>3+</sup>-TPTZ (2,4,6-*tripirydyl-s-tryazine*). Metode analisis seperti HPLC dan kolorimetri



dengan reagen Folin-Ciocalteu digunakan untuk mengevaluasi kandungan fenolik total (Pisoschi, *et al.*, 2009).

### **E. Ekstraksi**

Ekstraksi merupakan proses penyarian zat berkhasiat atau zat aktif yang terdapat dalam suatu bahan alam menggunakan pelarut dan metode yang sesuai, sehingga diperoleh ekstrak (Dirjen POM, 2000). Tujuan ekstraksi bahan alam adalah menarik komponen kimia yang terdapat di dalamnya. Ekstraksi didasarkan pada perpindahan massa komponen ke dalam pelarut yang dipengaruhi oleh kelarutan komponen di dalam pelarut. Proses perpindahan massa komponen dimulai dari lapisan antar muka kemudian berdifusi ke dalam pelarut (Emilan, *et al.*, 2011).

Menurut Badan POM RI (2010), ekstrak merupakan sediaan kering, kental atau cair yang dibuat dengan penyarian simplisia menurut cara yang cocok, di luar pengaruh cahaya matahari langsung. Penyarian dapat dilakukan dengan metode maserasi, perkolasi atau penyeduhan dalam air mendidih.

Terdapat 3 proses yang terjadi selama ekstraksi berlangsung yaitu :

1. Penetrasi pelarut ke dalam sel tanaman
2. Disolusi pelarut ke dalam sel tanaman
3. Difusi zat yang terekstraksi (solut) dari dalam ke luar sel

Ketiga proses tersebut terjadi secara terus-menerus hingga tercapai kesetimbangan di dalam sel tanaman dan pelarut. Kecepatan terjadinya

kesetimbangan dipengaruhi oleh suhu, pH, ukuran partikel, serta kelarutan komponen dalam pelarut. Prinsipnya, komponen yang sifatnya polar lebih mudah larut dalam pelarut polar sedangkan komponen non polar mudah terlarut dalam pelarut non polar (Emilan, *et al.*, 2011).

Etanol merupakan pelarut yang banyak digunakan untuk ekstraksi karena selain selektif dan tidak beracun, juga dapat mencegah pertumbuhan kapang dan kuman pada konsentrasi di atas 20%, dapat bercampur dengan air serta mudah diuapkan. Etanol mampu melarutkan berbagai senyawa antara lain alkaloid, minyak atsiri, glikosida, kurkumin, kumarin, antrakinon, flavonoid, steroid, klorofil serta sedikit lemak dan tanin (Taroreh, *et al.*, 2015).

Secara umum metode ekstraksi dapat dibedakan berdasarkan energi yang digunakan dan bentuk fase bahan yang diekstraksi. Berdasarkan energi yang digunakan metode ekstraksi dibagi menjadi ekstraksi cara panas yaitu refluks, sokletasi, destilasi, infudasi, dekoksi, dan ekstraksi cara dingin meliputi maserasi dan perkolasi, sedangkan berdasarkan bentuk fasenya ekstraksi dibedakan menjadi ekstraksi cair-cair dan ekstraksi cair-padat (Emilan, *et al.*, 2011).

Maserasi adalah proses ekstraksi simplisia paling sederhana menggunakan pelarut dengan beberapa kali pengocokan atau pengadukan pada suhu kamar. Secara teknis maserasi termasuk ekstraksi dengan prinsip pencapaian kesetimbangan konsentrasi zat aktif dalam sel dan pelarut. Kelemahan metode ini adalah waktu

pengerjaan yang lama dan proses ekstraksi yang mungkin tidak berjalan sempurna (Dirjen POM, 2000).

Selama maserasi, proses perendaman dilakukan bersama dengan pengocokan secara berulang-ulang. Upaya ini menjamin kesetimbangan zat terekstraksi dalam cairan terjadi lebih cepat, sedangkan keadaan diam selama maserasi menyebabkan turunnya perpindahan zat aktif. Secara teoritis, teknik maserasi tidak dapat menghasilkan ekstraksi absolut. Semakin besar perbandingan simplisia terhadap cairan penyari, semakin banyak hasil yang diperoleh (Voight, 1994).

Perkolasi merupakan ekstraksi pada suhu ruangan menggunakan pelarut yang selalu baru. Ekstraksi dilakukan dengan menempatkan serbuk simplisia pada suatu bejana silinder yang bagian bawahnya diberi sekat berpori yang akan dialiri dengan cairan penyari sehingga diperoleh ekstrak melewati sekat tersebut dan tertampung di bagian bawah bejana. Refluks merupakan ekstraksi menggunakan pelarut pada temperatur titik didihnya yang dilakukan selama waktu tertentu menggunakan pendingin balik. Ekstraksi secara refluks dilakukan secara berulang pada residu pertama sebanyak 3-5 kali pengulangan sehingga dapat disebut sebagai ekstraksi sempurna. Sokletasi adalah metode ekstraksi cara panas menggunakan pelarut yang selalu baru dengan bantuan pendingin balik sehingga terjadi ekstraksi secara kontinu dengan jumlah pelarut yang relatif konstan. Infudasi merupakan teknik ekstraksi dalam bejana berisi massa yang akan diekstrak yang tercelup dalam penangas air pada temperatur sebesar 96-98° C dan berlangsung cepat (15-20 menit). Dekoksi merupakan

teknik ekstraksi yang hampir sama dengan infudasi yaitu menggunakan air sebagai cairan penyari dengan temperatur yang lebih rendah ( $>30^{\circ}$  C) dan waktu yang lebih lama (Dirjen POM, 2000).

#### F. Spektrofotometri UV-Vis

Spektrofotometri merupakan pengukuran absorpsi energi cahaya oleh suatu molekul pada suatu panjang gelombang tertentu untuk tujuan analisis kualitatif dan kuantitatif. Bila suatu molekul dikenakan radiasi elektromagnetik, berupa sinar ultraviolet atau sinar tampak (visibel), maka molekul tersebut akan menyerap radiasi elektromagnetik yang energinya sesuai. Interaksi antara molekul dengan radiasi elektromagnetik menghasilkan energi eksitasi atau dikenal sebagai absorbansi, yaitu perubahan energi potensial elektron dari keadaan dasar menjadi keadaan tereksitasi. Dalam hukum Lambert-Beer dinyatakan bahwa absorbansi (A), berbanding lurus dengan tebal kuvet (b) dan konsentrasi analit dalam larutan (c) namun berbanding terbalik dengan transmittan (T).

$$A = abc = \log 1/T \quad (\text{Day, 2002}).$$

Pada pengukuran kuantitatif, radiasi yang diserap oleh analit ditentukan dengan membandingkan intensitas sinar yang diteruskan dengan intensitas sinar yang diserap jika tidak ada spesies penyerap lainnya. Faktor-faktor yang perlu diperhatikan dalam melakukan analisis kuantitatif dengan spektrofotometer UV-Vis antara lain :

### 1. Penentuan waktu operasional (*operating time*)

Waktu operasional perlu ditetapkan untuk pengukuran hasil reaksi yang didahului dengan pembentukan warna, tujuannya agar diperoleh waktu pengukuran yang stabil. Penetapan waktu operasional digambarkan melalui kurva hubungan absorbansi dan waktu berikut :



**Gambar 2. Kurva waktu operasional (Gandjar dan Rohman, 2007).**

Pada awal reaksi terjadi peningkatan absorbansi hingga pada waktu tertentu, selanjutnya absorbansi akan stabil selama beberapa waktu lalu menurun seiring dengan bertambahnya waktu pengukuran. Penurunan terjadi karena berkurangnya intensitas warna larutan akibat senyawa yang sudah rusak atau terurai. Oleh karena itu pengukuran lebih baik dilakukan pada waktu operasional tercapai (Gandjar dan Rohman, 2007).

### 2. Pemilihan panjang gelombang

Panjang gelombang pengukuran ditentukan dengan melihat kurva hubungan absorbansi dengan panjang gelombang larutan baku pada konsentrasi tertentu. Panjang gelombang yang dipilih adalah panjang gelombang dengan absorbansi maksimal. Pengukuran yang dilakukan pada panjang gelombang maksimal

menguntungkan karena dapat menghasilkan linearitas antara konsentrasi dan absorbansi pengukuran, memberikan sensitivitas pengukuran yang tinggi, dan mengurangi kesalahan pada saat pengukuran ulang (Gandjar dan Rohman, 2007).

### G. Kromatografi Lapis Tipis

Kromatografi lapis tipis adalah suatu metode pemisahan yang sederhana, mudah dilakukan dan tidak membutuhkan bahan serta peralatan yang berbahaya, sehingga banyak digunakan dalam berbagai proses analisis termasuk analisis obat, kosmetik, cemaran lingkungan, makanan hingga senyawa bahan alam. Pada proses skrining metabolit sekunder dalam suatu ekstrak tanaman, diperlukan tahap pemisahan. Komponen-komponen yang diperlukan dalam KLT antara lain fase diam, fase gerak dan *developing chamber*. Fase diam berupa lapisan padat seperti kaca, plastik atau *aluminium foil* yang dilapisi dengan absorben silika, aluminium oksida atau selulosa. Fase gerak terdiri dari satu atau campuran solven sedangkan *developing chamber* digunakan sebagai tempat elusi berlangsung (Lade, *et al.*, 2014).

Pemisahan pada KLT berdasarkan prinsip *like dissolve like*, yaitu didasarkan pada kepolaran analit yang akan mempengaruhi interaksinya dengan fase diam dan fase gerak. Apabila kepolaran analit menyerupai kepolaran fase gerak maka analit akan larut dan terbawa oleh fase gerak di sepanjang permukaan fase diam melalui gaya kapiler, semakin kuat interaksi analit dengan fase gerak maka semakin jauh analit akan

terbawa. Sebaliknya, jika kepolaran analit mirip dengan fase diam maka analit akan tertinggal di fase diam karena interaksinya yang kuat sementara komponen lainnya akan terelusi. Secara kuantitatif, pemisahan diukur melalui nilai  $R_f$  atau *retardation factor*, dua senyawa dengan nilai  $R_f$  sama pada suhu, fase gerak dan fase diam yang sama dapat diprediksikan sebagai senyawa yang identik namun untuk dapat memastikan, diperlukan data pendukung lain seperti deteksi bercak pada sinar UV (Lade, *et al.*, 2014).

Penggunaan KLT untuk analisis kandungan bahan alam dilatarbelakangi oleh penggunaannya yang sederhana dan tidak membutuhkan biaya tinggi maupun instrumen seperti kromatografi cair kinerja tinggi (KCKT) maupun kromatografi gas (KG). Determinasi flavonoid secara KLT umumnya menggunakan fase diam silika dan selulosa, sedangkan sistem fase gerak yang digunakan sesuai dengan golongan flavonoid yang akan dipisahkan. Deteksi flavonoid dapat dilakukan dengan pengamatan bercak pada sinar UV 254 nm dan 366 nm karena sifatnya yang berfluoresensi. Penyemprotan bercak dengan reagen tertentu dapat memperkuat fluoresensi sehingga mempermudah pengamatan di bawah sinar UV. Reaksi gugus fungsi pada reagen dengan gugus fungsi pada flavonoid menimbulkan reaksi warna khas yang spesifik dari setiap reagen. Beberapa reagen yang digunakan untuk deteksi flavonoid antara lain : vanillin 5% HCl,  $AlCl_3$  1%, PEG,  $FeCl_3$ , dan *fast blue salt B* (Hajnos, *et al.*, 2008).

**Tabel II. Fase gerak yang digunakan pada KLT flavonoid (Hajnos, *et al.*, 2008).**

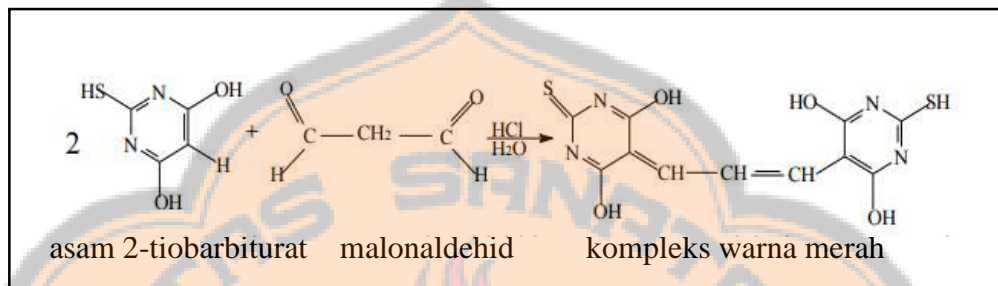
Tipe flavonoid	Fase diam	
	Silika	Selulosa
Flavonoid glikosida	Etil asetat : piridin : air : metanol (80:20:10:5) v/v	t-butanol : asam asetat : air (3:1:1); n-butanol : asam asetat : air (4:1:5) v/v
Flavonoid polar-aglikon (flavon, flavonol)	Toluen : piridin : asam formiat (36:9:5) v/v	t-butanol : asam asetat : air (3:1:1); kloroform : asam asetat : air (30:15:2) v/v
Flavonoid non polar-aglikon (isoflavon, dihidroflavonoid)	Kloroform : metanol (15:1) hingga (3:1) v/v	Asam asetat 10% - 30%

#### H. Metode Uji Aktivitas Antioksidan

Terdapat beberapa metode yang umum digunakan untuk mengukur aktivitas antioksidan yaitu metode deoksiribosa, metode DPPH (*2,2-diphenyl-1-picrylhydrazil*), metode ABTS (*2,2'-Azinobis(3-ethylbenzthiazoline)-6-sulfonic acid*), dan metode FRAP (*Ferric Reducing Antioxidant Power*). Prinsip pengukuran aktivitas antioksidan dengan metode deoksiribosa yaitu degradasi deoksiribosa oleh radikal hidroksil menghasilkan produk berupa karbonil yang dapat membentuk malonaldehid melalui pemanasan. Malonaldehid dapat dideteksi secara spektrofotometrik karena membentuk kompleks warna merah muda dengan asam tiobarbiturat (TBA). Adanya komponen dalam sampel yang dapat berikatan dengan radikal hidroksil akan mengurangi



degradasi deoksiribosa sehingga malonaldehid yang terbentuk berkurang (Kim, *et al.*, 2002).

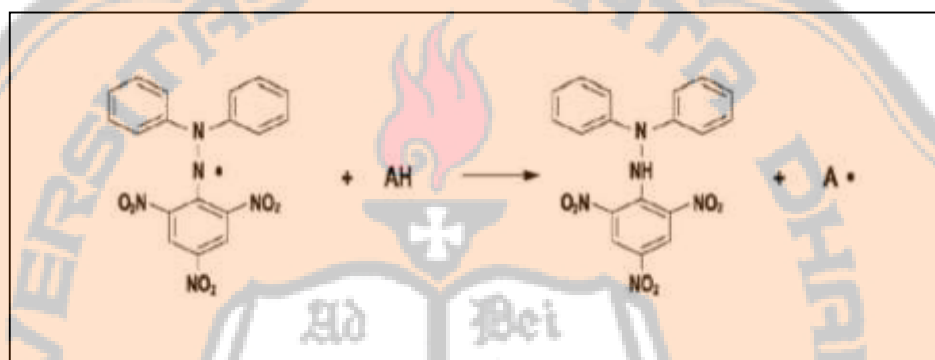


**Gambar 3. Pembentukan kompleks warna merah dalam metode deoksiribosa (Kim, *et al.*, 2002).**

Metode ABTS merupakan metode pengukuran antioksidan menggunakan radikal kation metastabil. Senyawa ABTS yang terakumulasi dihambat oleh antioksidan dan diukur secara spektrofotometri pada panjang gelombang 734 nm dengan pembanding Trolox. Metode ini banyak digunakan untuk mengukur antioksidan pada senyawa murni dan cairan tubuh. Metode FRAP didasarkan pada reduksi  $\text{Fe}^{3+}$  dalam kompleks  $\text{Fe}(\text{TPTZ})^{3+}$  menjadi kompleks  $\text{Fe}(\text{TPTZ})^{2+}$  berwarna biru oleh antioksidan pada media asam. Warna biru terukur pada panjang gelombang 593 nm dan dinyatakan sebagai milimolar ekuivalen  $\text{Fe}^{2+}$ . Metode ini digunakan untuk pengukuran antioksidan dalam plasma (Antolovich, *et al.*, 2002).

DPPH merupakan suatu radikal bebas yang banyak digunakan untuk pengujian aktivitas antioksidan karena pengerjaannya yang relatif mudah, sederhana, sensitif dan cepat dibandingkan dengan metode-metode lainnya. Prinsip kerja metode ini adalah pengukuran aktivitas antioksidan berdasarkan penurunan absorbansi DPPH yang

terukur pada panjang gelombang 517 nm sebagai akibat dari adanya suatu senyawa antioksidan. Warna ungu pekat DPPH disebabkan oleh delokalisasi elektron bebas pada molekulnya. Jika larutan DPPH dicampurkan dengan substansi yang dapat menyumbangkan atom hidrogen maka dihasilkan bentuk tereduksi dari DPPH yang disertai dengan berkurangnya intensitas warna ungu larutan (Pisoschi, *et al.*, 2009).



**Gambar 4. Reaksi DPPH dengan antioksidan (Pisoschi, *et al.*, 2009).**

Penangkapan radikal bebas oleh senyawa antioksidan menyebabkan elektron bebas DPPH menjadi berpasangan sehingga terjadi penghilangan warna yang sebanding dengan jumlah elektron yang diambil. Adanya senyawa antioksidan menyebabkan perubahan warna violet menjadi kuning. Makin kuat senyawa antioksidan, makin jelas perubahan warna yang terjadi. Perubahan intensitas warna dapat diukur secara spektrofotometri dan hasilnya dinyatakan sebagai  $IC_{50}$ , yaitu jumlah antioksidan yang diperlukan untuk menghambat 50% aktivitas DPPH (Pisoschi, *et al.*, 2009).

## I. Metode Folin-Ciocalteu

Metode Folin-Ciocalteu banyak digunakan untuk mengukur kandungan fenolik total dalam suatu bahan alam berdasarkan prinsip reaksi oksidasi dan reduksi. Reagen Folin-Ciocalteu diperoleh dari reaksi natrium tungstat ( $\text{Na}_2\text{WO}_4$ ) dan natrium molibdat ( $\text{Na}_2\text{MoO}_4$ ) untuk menghasilkan senyawa molibdotungstat ( $\text{MoW}_{11}\text{O}_{40}$ )<sup>-4</sup> yang berwarna kuning. Oksidasi senyawa fenolik yang ada dalam senyawa uji oleh molibdotungstat menghasilkan kompleks berwarna yang terukur pada panjang gelombang 745-765 nm. Reduksi elektron senyawa molibdenum atau Mo(VI) menjadi Mo(V) diduga merupakan mekanisme yang menyebabkan timbulnya warna biru pada larutan yang diukur. Terdapat beberapa kondisi yang harus diperhatikan dalam menggunakan metode ini untuk memperoleh data yang reproduksibel, antara lain (I) perbandingan volume reagen dan basa yang sesuai; (II) *operating time* dan suhu pembentukan kompleks warna; (III) pengukuran pada panjang gelombang yang tepat; (IV) penggunaan asam galat sebagai standar fenol (Prior, *et al.*, 2005).



**Mekanisme pembentukan reagen Folin-Ciocalteu (Prior, *et al.*, 2005).**

Disosiasi suatu senyawa fenolik menghasilkan anion fenolat yang dapat mereduksi reagen Folin-Ciocalteu, sehingga dapat diyakini bahwa reaksi pada metode

ini terjadi melalui transfer elektron. Terjadinya reaksi ditandai dengan perubahan warna dari kuning menjadi biru (Huang, *et al.*, 2005).

Pembentukan ion fenolat terjadi melalui disosiasi proton pada senyawa fenolik, reaksi ini hanya dapat terjadi secara optimal pada suasana basa. Larutan  $\text{Na}_2\text{CO}_3$  7,5% biasa digunakan dalam reaksi untuk menghasilkan kondisi basa. Selama reaksi berlangsung, gugus hidroksil pada senyawa fenolik bereaksi dengan reagen membentuk kompleks berwarna biru. Warna biru yang dihasilkan setara dengan konsentrasi ion fenolat, sehingga makin besar konsentrasi senyawa fenolik semakin banyak ion fenolat yang terbentuk, demikian pula dengan warna biru yang dihasilkan semakin pekat (Apsari dan Susanti, 2011).

### **J. Landasan Teori**

Antioksidan merupakan senyawa yang mampu menghentikan reaksi berantai radikal bebas di dalam tubuh sehingga resiko timbulnya berbagai penyakit dapat dihindari. Senyawa ini dapat diperoleh secara alami seperti pada tumbuh-tumbuhan, maupun secara sintetis. Eksplorasi antioksidan alam lebih banyak dilakukan karena dianggap lebih aman dan tidak menimbulkan efek samping yang merugikan. Salah satu sumber antioksidan alam yang banyak ditemukan di Indonesia adalah buah Buni dari tanaman *Antidesma bunius* L. (Spreng). Menurut beberapa penelitian, buah Buni diketahui mengandung beragam jenis nutrisi penting termasuk senyawa fenolik seperti flavonoid yang dikenal sebagai antioksidan.

Ekstraksi flavonoid berupa glikosida dan aglikon yang lebih polar dapat dilakukan dengan pelarut air, alkohol (metanol dan etanol) atau campuran keduanya, sedangkan ekstraksi flavonoid yang bersifat kurang polar menggunakan kloroform, diklorometan, dietil eter dan etil asetat. Etil asetat merupakan pelarut yang cukup baik untuk melarutkan flavonoid terutama flavonoid yang terdapat di permukaan buah (Nollet, 2000). Fraksinasi dengan metode ekstraksi cair-cair adalah proses ekstraksi berkelanjutan untuk memurnikan ekstrak sehingga didapat senyawa yang lebih spesifik. Flavonoid yang larut dalam etil asetat antara lain flavanon, isoflavon, flavon termetilasi dan flavonol (Ferreira dan Pinho, 2012). Kuersetin merupakan golongan flavonol yang ditemukan dalam buah Buni.

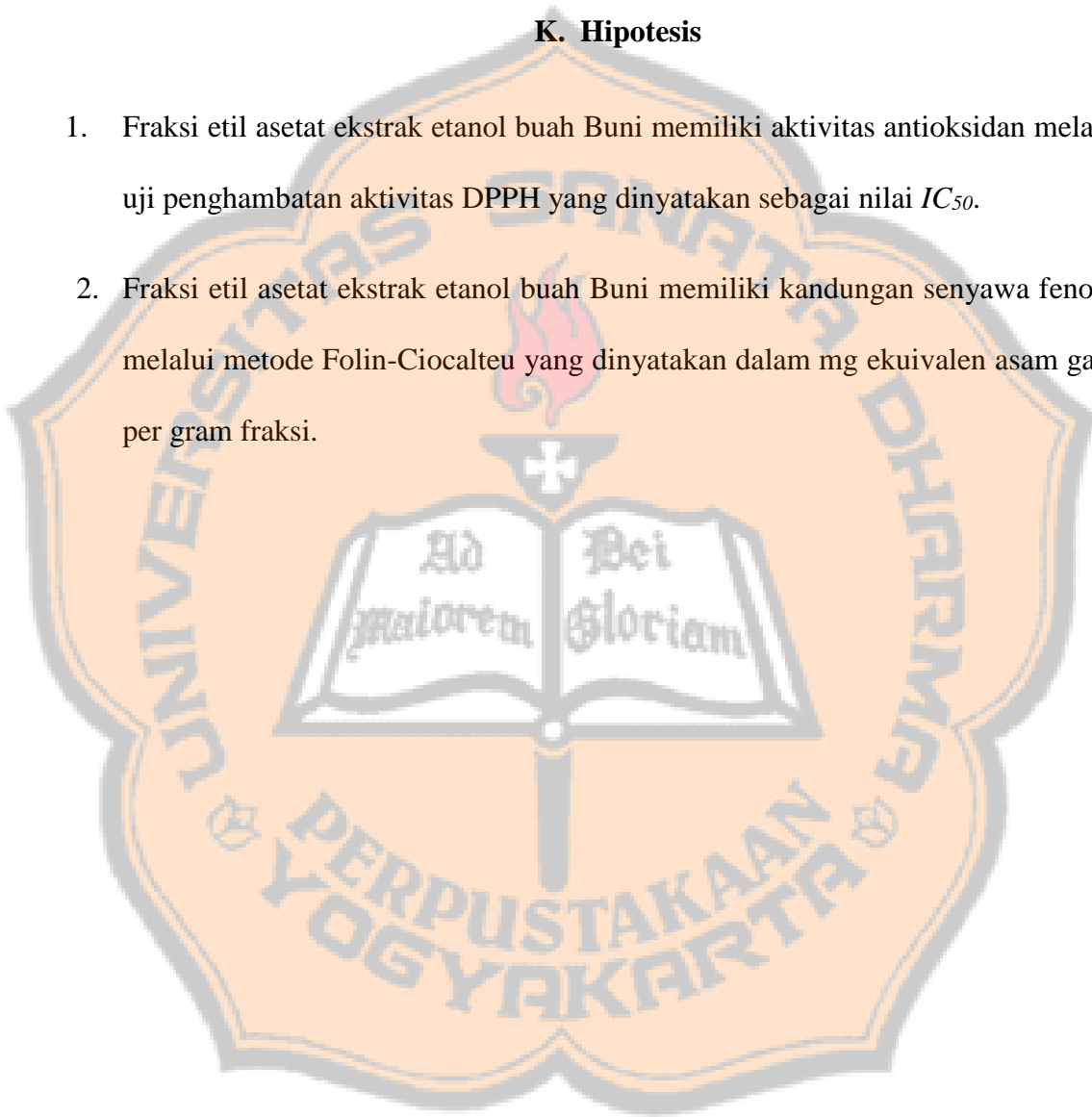
Metode DPPH digunakan untuk mengukur aktivitas antioksidan dengan cara mereaksikan DPPH dan senyawa antioksidan di dalam sampel sehingga menghasilkan penurunan intensitas warna ungu yang dibandingkan terhadap kontrol. Aktivitas antioksidan fraksi etil asetat ekstrak etanol buah Buni dinyatakan sebagai nilai  $IC_{50}$  yaitu konsentrasi fraksi yang dapat menghambat aktivitas DPPH sebesar 50%.

Pengukuran kandungan fenolik total dengan metode Folin-Ciocalteu terjadi melalui proses oksidasi senyawa fenolik oleh reagen Folin-Ciocalteu sehingga menghasilkan kompleks berwarna biru yang menggambarkan jumlah senyawa fenolik di dalam fraksi. Asam galat digunakan sebagai standar senyawa fenolik karena reaktivitasnya yang tinggi terhadap reagen Folin-Ciocalteu dan direkomendasikan sebagai standar dalam berbagai penelitian dengan metode yang sama, sehingga

kandungan fenolik total fraksi etil asetat ekstrak etanol buah Buni yang terukur dinyatakan ekuivalen dengan asam galat.

### K. Hipotesis

1. Fraksi etil asetat ekstrak etanol buah Buni memiliki aktivitas antioksidan melalui uji penghambatan aktivitas DPPH yang dinyatakan sebagai nilai  $IC_{50}$ .
2. Fraksi etil asetat ekstrak etanol buah Buni memiliki kandungan senyawa fenolik melalui metode Folin-Ciocalteu yang dinyatakan dalam mg ekuivalen asam galat per gram fraksi.



## BAB III

### METODE PENELITIAN

#### A. Jenis dan Rancangan Penelitian

Penelitian ini termasuk dalam jenis penelitian eksperimental dengan rancangan acak pola searah.

#### B. Variabel Penelitian

1. Variabel bebas dalam penelitian ini adalah konsentrasi fraksi etil asetat ekstrak etanol buah Buni.
2. Variabel terikat dalam penelitian ini adalah aktivitas penghambatan DPPH berupa % *Inhibition Concentration* (%IC).
3. Variabel pengacau terkendali dalam penelitian ini adalah tempat tumbuh tanaman dan waktu pemanenan.
4. Variabel pengacau tak terkendali adalah kondisi tanah, iklim dan curah hujan.

#### C. Definisi Operasional

1. Ekstrak etanol adalah ekstrak kental yang diperoleh dari maserasi buah Buni yang masih segar dan telah diremas-remas selama 24 jam dengan etanol 96% dan diremaserasi sebanyak dua kali selama 24 jam dengan pelarut yang sama kemudian diuapkan menggunakan *vacuum rotary evaporator* hingga diperoleh pengurangan berat ekstrak yang tetap sebesar 0,01 g.

2. Fraksi etil asetat adalah fraksi kering yang diperoleh dari proses ekstraksi cair-cair ekstrak etanol buah Buni dalam air menggunakan etil asetat. Fraksi diuapkan dengan bantuan *vacum rotary evaporator* hingga volume cairan berkurang kemudian diuapkan kembali di atas *waterbath* hingga diperoleh berat fraksi yang tetap.
3. Persen *Inhibition Contentration (%IC)* adalah persen yang menyatakan kemampuan fraksi etil asetat ekstrak etanol buah Buni untuk menghambat aktivitas radikal bebas.
4.  $IC_{50}$  adalah konsentrasi fraksi etil asetat ekstrak etanol buah Buni yang dapat menghambat aktivitas radikal bebas sebesar 50%.

#### D. Alat dan Bahan

##### 1. Bahan penelitian

Bahan bahan yang digunakan dalam penelitian antara lain buah Buni (*Antidesma bunius* L. [Spreng]) yang diperoleh dari Kampus III Universitas Sanata Dharma Yogyakarta, bahan kimia kualitas pro analisis (E.Merck) meliputi metanol, silika GF<sub>60</sub>, natrium karbonat, asam galat, n-butanol, asam asetat glasial, dan reagen Folin-Ciocalteu; bahan kimia kualitas pro analisis (Sigma Aldrich) meliputi DPPH, rutin, tanin, FeCl<sub>3</sub>, AlCl<sub>3</sub>, bahan kimia kualitas teknis meliputi n-heksana (Bratachem), etil asetat (CV. General Labora), akuades (CV. General Labora), etanol 96% (CV. General Labora) dan *aluminium foil*.



## 2. Alat penelitian

Alat-alat yang digunakan dalam penelitian ini berupa neraca analitik dengan ketelitian 0,0001 mg (Scaltec, Ohaus), *shaker*, spektrofotometer UV-Vis (Shimadzu 1800-UV), *vacuum rotary evaporator* (Buchi rotavorator), corong *Buchner*, pompa vakum, *vortex*, *waterbath* (Labo-tech, Heraeus), tabung reaksi bertutup, plat KLT, oven, mikropipet 50-200  $\mu\text{g/mL}$ , makropipet 1-10 mL (Acura, Socorex), pipa kapiler, serta alat-alat gelas (Pyrex, Iwaki).

## E. Tata Cara Penelitian

### 1. Determinasi tanaman

Buah Buni yang diteliti dideterminasi menurut pustaka acuan van Steenis (1992). Determinasi dilakukan di Kebun Tanaman Obat Fakultas Farmasi, Universitas Sanata Dharma. Proses determinasi dilakukan dengan menggunakan bagian-bagian tanaman antara lain daun, batang, buah, dan bunga.

### 2. Pengambilan buah buni

Buah buni diperoleh dari Kampus III Universitas Sanata Dharma, Yogyakarta. Pemanenan buah buni dilakukan terhadap buah yang berwarna ungu kehitaman, kulit buah dalam kondisi baik dan buah tidak jatuh ke tanah. Pemanenan buah Buni dilakukan bulan Februari 2015 pada pagi hari pukul 09.00 WIB.

### 3. Pembuatan ekstrak

Sebanyak 1000 g buah Buni hasil pemanenan dicuci beberapa kali menggunakan air mengalir kemudian diangin-anginkan hingga air sisa pencucian hilang. Buah Buni direndam dalam 1000 mL etanol 96% dan disimpan dalam tempat gelap selama 5 bulan. Buah Buni dalam etanol 96% yang telah disimpan tersebut disaring menggunakan kertas saring dengan bantuan corong Buchner dan pompa vakum. Ampas penyaringan diremas-remas hingga daging buah terkelupas kemudian diremaserasi dengan 1000 mL etanol 96% selama 24 jam, lalu disaring dengan bantuan corong Buchner dan pompa vakum. Tahap ini diulangi sebanyak satu kali dengan pelarut yang baru. Setelah itu, seluruh maserat digabungkan lalu diuapkan pelarutnya menggunakan *vacuum rotary evaporator* hingga tersisa sedikit cairan. Hasil penguapan dipanaskan di atas *waterbath* hingga diperoleh pengurangan berat ekstrak yang tetap sebesar 0,01 g. Ekstrak kental ini ditimbang dan dihitung rendemennya kemudian ditutup dengan *aluminium foil* dan disimpan di dalam desikator.

### 4. Pembuatan fraksi

Sebanyak 30,0 g ekstrak kental buah Buni dilarutkan dalam 75,0 mL akuades hangat kemudian difraksinasi dengan 100,0 mL n-heksan sebanyak 3 kali, fraksi air ditampung untuk difraksinasi menggunakan 50,0 mL etil asetat hingga diperoleh fraksi etil asetat yang jernih. Fraksi etil asetat yang telah digabungkan kemudian dipisahkan dengan *vacuum rotary evaporator* hingga tersisa sedikit

cairan lalu diuapkan kembali di atas *waterbath* hingga diperoleh berat fraksi etil asetat ekstrak etanol buah Buni yang tetap. Fraksi yang telah ditimbang dan dihitung rendemennya kemudian disimpan dalam wadah tertutup *aluminium foil* di dalam desikator.

## 5. Uji Kualitatif

- a. Uji KLT fenolik. Sebanyak 2,0  $\mu\text{L}$  larutan uji dalam metanol p.a dan standar tanin 0,5% dalam etanol masing-masing ditotolkan pada plat KLT silika GF<sub>60</sub> kemudian dielusi menggunakan fase gerak n-butanol-asam asetat glasial-air (5:1:4). Bercak diamati dengan sinar UV pada panjang gelombang 254 nm dan 366 nm kemudian disemprot dengan reagen FeCl<sub>3</sub>. Plat dibiarkan mengering lalu diamati kembali pada sinar UV 254 nm dan 366 nm. Dihitung nilai R<sub>f</sub> tanin dan sampel.
- b. Uji KLT flavonoid. Sebanyak 2,0  $\mu\text{L}$  larutan uji dalam metanol p.a ditotolkan pada plat KLT silika GF<sub>60</sub> bersama dengan standar rutin 2% dalam metanol. Plat dielusi dengan fase gerak n-butanol-asam asetat glasial-air (5:1:4). Bercak dideteksi dengan sinar UV 254 nm dan 366 nm kemudian disemprot dengan reagen AlCl<sub>3</sub>. Warna bercak larutan uji dan standar diamati pada sinar UV 254 nm dan 366 nm lalu dihitung nilai R<sub>f</sub> masing-masing standar dan sampel.

## 6. Pembuatan larutan pembanding dan larutan uji

- a. Pembuatan larutan DPPH. Sebanyak 5,0 mg DPPH dilarutkan dalam metanol p.a hingga volumenya 50 mL, kemudian diambil sebanyak 5,0 mL larutan

diencerkan dalam labu takar 25 mL sehingga diperoleh larutan DPPH dengan konsentrasi 20  $\mu\text{g/mL}$ . Larutan disimpan dalam labu takar tertutup *aluminium foil* dan harus selalu dibuat baru setiap kali pengukuran.

- b. Pembuatan larutan stok rutin. Sebanyak 5,0 mg rutin dilarutkan dengan metanol p.a dalam labu takar 50 mL sehingga diperoleh konsentrasi larutan stok 100  $\mu\text{g/mL}$ .
- c. Pembuatan larutan perbandingan. Larutan stok rutin diambil sebanyak 3,0; 4,0; 5,0; 6,0; dan 7,0 mL kemudian diencerkan dengan metanol p.a ke dalam labu takar 10 mL, sehingga diperoleh konsentrasi larutan perbandingan 30; 40; 50; 60; dan 70  $\mu\text{g/mL}$ .
- d. Pembuatan larutan uji.
- Larutan uji aktivitas antioksidan  
Sebanyak 25,0 mg fraksi etil asetat ekstrak etanol dilarutkan dalam metanol p.a hingga volume 25 mL. Larutan tersebut diambil sebanyak 1,0; 2,0; 3,0; 4,0; dan 5,0 mL kemudian diencerkan hingga volumenya 10 mL, sehingga diperoleh larutan uji dengan konsentrasi 100, 200, 300, 400, dan 500  $\mu\text{g/mL}$ .
  - Larutan uji kandungan fenolik total  
Sebanyak 6,0 mg fraksi etil asetat ekstrak etanol ditimbang kemudian dilarutkan dengan metanol p.a dalam labu takar 10 mL sehingga diperoleh konsentrasi larutan uji 600,0  $\mu\text{g/mL}$ .

- e. Pembuatan larutan asam galat. Sebanyak 25,0 mg asam galat ditimbang lalu dilarutkan dengan campuran akuades : metanol p.a (1:1) di dalam labu takar 50 mL sehingga diperoleh larutan stok konsentrasi 500  $\mu\text{g/mL}$ . Dari larutan stok diambil 1,0; 1,5; 2,0; 2,5; 3,0 mL untuk diencerkan hingga volumenya 10 mL sehingga diperoleh larutan dengan konsentrasi 50; 75; 100, 125; 150  $\mu\text{g/mL}$ .

#### 7. Penentuan kandungan fenolik total

- a. Penentuan OT (*Operating Time*). Sebanyak 0,5 mL larutan asam galat 50; 100 dan 150  $\mu\text{g/mL}$  masing-masing ditambahkan dengan 5,0 mL reagen Folin-Ciocalteu yang telah diencerkan dengan akuades (1:10 v/v), selanjutnya ditambahkan dengan 4,0 mL natrium karbonat 1 M. Setelah divortex selama 30 detik, larutan dibaca absorbansinya pada panjang gelombang 760 nm setiap 5 menit selama 60 menit.
- b. Penentuan panjang gelombang serapan maksimum. Sebanyak 0,5 mL larutan asam galat 50; 100 dan 150  $\mu\text{g/mL}$  ditambahkan dengan 5,0 mL reagen Folin-Ciocalteu yang telah diencerkan dengan akuades (1:10 v/v), selanjutnya ditambahkan dengan 4,0 mL natrium karbonat 1 M dan divortex selama 30 detik. Larutan didiamkan selama OT yang telah diperoleh selanjutnya dilakukan *scanning*  $\lambda_{\text{maks}}$  dengan mengukur absorbansi larutan pada rentang panjang gelombang 600 - 800 nm.
- c. Pembuatan kurva baku asam galat. Sebanyak 0,5 mL larutan asam galat 50, 75, 100, 125 dan 150  $\mu\text{g/mL}$  ditambah dengan 5,0 mL reagen Folin-Ciocalteu yang

telah diencerkan dengan air (1:10 v/v). Larutan selanjutnya ditambahkan dengan 4,0 mL natrium karbonat 1 M dan didiamkan selama OT. Absorbansi larutan dibaca pada  $\lambda$  maksimum terhadap blanko. Pembuatan kurva baku direplikasi sebanyak 3 kali.

- d. Estimasi kandungan fenolik total larutan uji. Diambil 0,5 mL larutan uji 600  $\mu\text{g/mL}$  ditambahkan dengan 5,0 mL reagen Folin-Ciocalteu yang telah diencerkan dengan air (1:10 v/v). Selanjutnya larutan ditambahkan dengan 4,0 mL natrium karbonat 1 M, divortex selama 30 detik dan didiamkan selama OT. Absorbansi larutan diukur pada  $\lambda$  maksimum. Kandungan fenolik total dinyatakan sebagai miligram ekuivalen asam galat dalam setiap gram fraksi etil asetat ekstrak etanol buah Buni. Pengukuran direplikasi sebanyak 3 kali.

## **8. Penentuan aktivitas antioksidan fraksi etil asetat buah buni**

- a. Penentuan *operating time* (OT). Sebanyak 0,05; 0,15; 0,20 mL larutan stok dimasukkan ke dalam 3 buah labu takar 10 mL kemudian ditambahkan dengan metanol p.a hingga batas tanda sehingga diperoleh konsentrasi larutan 5,0; 15,0; 20,0  $\mu\text{g/mL}$ . Ke dalam 3 tabung reaksi tertutup dimasukkan 3,8 mL larutan DPPH dan ditambahkan masing – masing dengan 0,2 mL larutan pembanding rutin. Selanjutnya larutan tersebut divortex selama 30 detik, setelah itu dibaca absorbansinya setiap 5 menit pada panjang gelombang 517 nm selama 1 jam.

- b. Penentuan panjang gelombang maksimum.** Pada 3 buah labu takar 10 mL, dimasukkan masing – masing 2,0; 3,0; 4,0 mL larutan stok DPPH, ditambahkan dengan metanol p.a hingga tanda batas. Larutan tersebut kemudian divortex selama 30 detik lalu dilakukan *scanning* dengan spektrofotometer UV-Vis pada panjang gelombang 400 - 700 nm.
- c. Penentuan aktivitas antioksidan**

1) Pengukuran absorbansi larutan DPPH (kontrol)

Pada tabung reaksi, dimasukkan sebanyak 3,8 mL larutan DPPH ditambahkan dengan 0,2 mL metanol p.a. Selanjutnya larutan tersebut divortex selama 30 detik dan didiamkan selama OT. Larutan tersebut dibaca absorbansinya pada panjang gelombang maksimum. Larutan ini digunakan sebagai kontrol untuk mengukur aktivitas antioksidan larutan pembanding dan larutan uji.

2) Pengukuran absorbansi larutan pembanding

Sebanyak 3,8 mL larutan DPPH dimasukkan ke dalam tabung reaksi bertutup kemudian ditambah dengan 0,2 mL larutan pembanding pada berbagai seri konsentrasi yang telah dibuat. Selanjutnya larutan tersebut divortex selama 30 detik dan diamkan selama OT. Larutan dibaca absorbansinya pada panjang gelombang maksimum. Pengerjaan direplikasi sebanyak 3 kali.

### 3) Pengukuran absorbansi larutan uji

Sebanyak 3,8 mL larutan DPPH dimasukkan ke dalam tabung reaksi bertutup, ditambahkan dengan 0,2 mL larutan uji konsentrasi 100; 200; 300; 400; 500  $\mu\text{g/mL}$ . Larutan tersebut divortex selama 30 detik lalu didiamkan selama OT dan diukur absorbansinya pada panjang gelombang maksimum. Pengerjaan dilakukan sebanyak 3 kali untuk masing-masing konsentrasi.

## F. Analisis Hasil

### 1. Uji aktivitas antioksidan

Besarnya aktivitas antioksidan dihitung dengan menggunakan rumus :

$$\%IC = \frac{\text{absorbansi kontrol} - \text{absorbansi sampel}}{\text{absorbansi kontrol}} \times 100 \%$$

Data absorbansi larutan uji dan larutan kontrol digunakan untuk menghitung  $IC_{50}$ , yaitu konsentrasi larutan uji yang dibutuhkan untuk menghambat 50% aktivitas radikal DPPH dengan menggunakan persamaan regresi linier antara masing – masing konsentrasi fraksi (sumbu x) dengan %IC (sumbu y).  $IC_{50}$  rutin dan fraksi yang diperoleh masing-masing dihitung nilai standar deviasi (SD) dan koefisien variasinya (CV).

### 2. Penentuan kandungan fenolik total

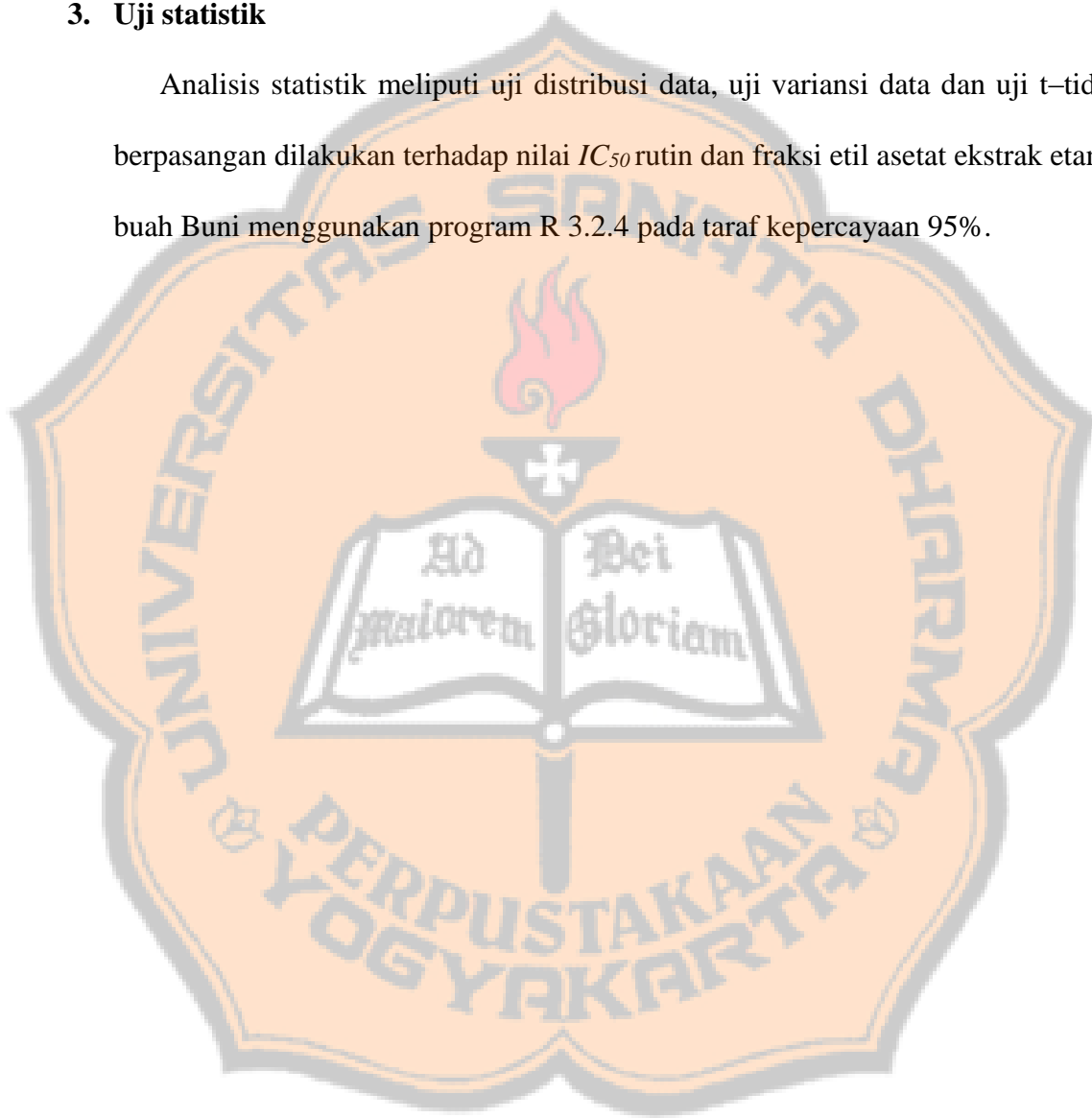
Kandungan fenolik total fraksi dinyatakan dalam mg ekuivalen asam galat dalam setiap gram fraksi etil asetat ekstrak etanol buah Buni. Nilai tersebut



didapatkan dari persamaan regresi linier asam galat dengan data absorbansi sebagai nilai  $y$ .

### 3. Uji statistik

Analisis statistik meliputi uji distribusi data, uji variansi data dan uji  $t$ -tidak berpasangan dilakukan terhadap nilai  $IC_{50}$  rutin dan fraksi etil asetat ekstrak etanol buah Buni menggunakan program R 3.2.4 pada taraf kepercayaan 95%.



## BAB IV

### HASIL DAN PEMBAHASAN

#### A. Hasil Determinasi Tanaman

Determinasi merupakan langkah awal yang dilakukan dalam suatu penelitian yang menggunakan sampel berupa tanaman. Tujuan dilakukan determinasi adalah memastikan kebenaran identitas dari tanaman yang akan digunakan dalam penelitian, sehingga tidak terjadi kesalahan pada saat pengambilan sampel tanaman. Pada penelitian ini, sampel tanaman yang digunakan adalah buah Buni [*Antidesma bunius* L. (Spreng)]. Determinasi dilakukan pada beberapa bagian tanaman antara lain batang, daun, buah dan bunga dengan acuan van Steenis (1992), di Kebun Tanaman Obat Fakultas Farmasi Universitas Sanata Dharma. Berdasarkan hasil determinasi (Lampiran 1), dinyatakan bahwa sampel tanaman yang digunakan pada penelitian ini berasal dari tanaman *Antidesma bunius* L. (Spreng).

#### B. Hasil Pengumpulan Bahan

Buah Buni yang digunakan pada penelitian diperoleh dari Kampus III Universitas Sanata Dharma pada bulan Februari 2015. Pemanenan dilakukan pada pagi hari, tujuannya untuk mendapatkan kandungan metabolit sekunder buah yang maksimal. Menurut WHO (2003), pemanenan tanaman obat dilakukan pada periode waktu atau musim tertentu yang sesuai untuk memastikan kualitas hasil panen dan

produk jadi yang dihasilkan. Waktu pemanenan ditentukan berdasarkan tahap pertumbuhan tanaman yang menghasilkan kuantitas senyawa metabolit optimal. Kriteria buah yang dipanen adalah buah yang telah matang sempurna ditunjukkan dengan kulit buah berwarna merah kehitaman, kulit buah masih utuh, serta belum jatuh ke tanah. Berdasarkan penelitian yang telah dilakukan oleh Butkhup dan Samappito (2011), kandungan antioksidan tertinggi buah Buni terdapat dalam buah yang telah matang sempurna, oleh karena itu pada penelitian ini hanya digunakan buah Buni yang berwarna merah kehitaman.

### **C. Hasil Penyiapan Sampel**

Buah Buni yang telah dipetik kemudian disortasi untuk memisahkan buah berwarna merah kehitaman dari bagian tanaman lain yang tidak diinginkan seperti daun, tangkai buah dan buah yang kondisinya tidak baik. Pencucian dilakukan dengan air mengalir untuk menghilangkan sisa-sisa kotoran yang masih menempel pada kulit buah kemudian diangin-anginkan untuk menghilangkan air sisa pencucian. Buah Buni yang telah bersih direndam dengan etanol 96% selama 5 bulan dalam wadah terlindung dari cahaya. Menurut Cooper-Driver dan Balick (1978), senyawa fenolik masih terdeteksi di dalam etanol 95% yang digunakan untuk merendam bahan segar selama sebulan. Perendaman dengan etanol 95% diketahui dapat menarik senyawa fenolik keluar sebagai akibat perubahan permeabilitas sel.

Sampel yang digunakan peneliti berupa buah utuh dan segar, bukan buah kering. Alasan yang dijadikan pertimbangan penggunaan bahan segar pada penelitian ini yaitu usaha untuk menjaga kestabilan senyawa flavonoid, yang merupakan senyawa fenolik. Perubahan senyawa penyusun flavonoid cenderung terjadi pada bahan yang dikeringkan, salah satunya perubahan bentuk glikosida menjadi bentuk aglikon teroksidasi. Bentuk aglikon ini dapat dioksidasi secara berantai membentuk polimer yang dapat menurunkan bahkan menghilangkan aktivitas antioksidan suatu tanaman (Markham, 1988). Menurut Bruneton (1999), ekstraksi senyawa fenolik dianjurkan dari bahan tanaman yang masih segar dengan pelarut alkohol seperti metanol dan etanol, atau campuran alkohol dan air.

#### **D. Ekstraksi Buah Buni**

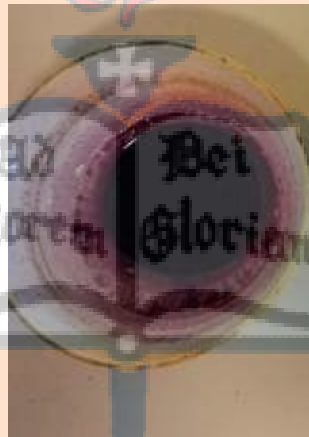
Langkah selanjutnya dalam penelitian ini adalah ekstraksi buah Buni segar yang telah disimpan. Ekstraksi merupakan proses penyarian senyawa kimia dari bahan alam atau dari dalam sel menggunakan cairan penyari dan metode yang sesuai. Prinsip ekstraksi adalah melarutkan dan menarik senyawa dari dalam sel tanaman melalui tiga tahap yaitu (I) penetrasi pelarut ke dalam sel tanaman; (II) disolusi pelarut ke dalam sel tanaman; (III) difusi bahan yang terekstraksi keluar sel (Emilan, *et al.*, 2011). Cairan penyari yang digunakan untuk ekstraksi pada penelitian ini adalah etanol 96%. Pemilihan pelarut etanol berdasarkan sifat kepolarannya yang dapat melarutkan senyawa metabolit sekunder bersifat semi polar hingga polar, termasuk senyawa

fenolik dalam buah Buni sehingga senyawa yang terekstraksi diharapkan lebih maksimal. Menurut Andersen dan Markham (2006), ekstraksi senyawa fenolik dari jaringan tumbuhan dalam bentuk glikosida dapat menggunakan pelarut metanol atau etanol pada suhu kamar dengan cara maserasi. Selain itu kelebihan etanol sebagai pelarut yaitu aman, tidak toksik, netral, dapat mencegah pertumbuhan kapang pada konsentrasi lebih dari 20%, tidak berbahaya bagi lingkungan, serta titik didihnya relatif rendah sehingga mudah diuapkan (Andersen dan Markham, 2006).

Proses ekstraksi pada penelitian ini dilakukan dengan metode maserasi, yaitu mengekstrak senyawa kimia dari suatu bahan alam dengan cara merendamnya dalam cairan penyari selama jangka waktu tertentu sehingga senyawa yang diinginkan dapat tertarik keluar dan larut di dalam cairan penyari. Maserasi dilakukan dengan bantuan *shaker* untuk membantu proses ekstraksi karena perputaran cairan penyari secara terus menerus dapat meratakan konsentrasi zat terlarut sehingga perbedaan konsentrasi di dalam sel dan cairan penyari tetap terjaga. Keuntungan maserasi sebagai metode ekstraksi adalah tidak memerlukan pemanasan sehingga tidak beresiko terjadi kerusakan senyawa dalam ekstrak, selain itu jumlah pelarut yang dibutuhkan tidak terlalu banyak dan peralatan yang dibutuhkan sederhana dibandingkan dengan metode ekstraksi lainnya.

Buah Buni yang telah direndam etanol disaring kemudian ampasnya diremaserasi sebanyak dua kali masing-masing selama 24 jam menggunakan etanol 96%. Remaserasi merupakan proses maserasi kembali menggunakan pelarut baru yang

bertujuan untuk mengekstraksi senyawa yang belum terambil selama proses maserasi sebelumnya sehingga ekstraksi lebih optimal. Hasil dari tahap maserasi berupa ekstrak kental yang diperoleh dengan cara menguapkan etanol menggunakan *vacuum rotary evaporator* hingga didapat pengurangan bobot ekstrak tetap. Prinsip penguapan menggunakan alat ini dengan menurunkan tekanan dalam sistem sehingga penguapan dapat terjadi dibawah titik didih pelarut yang sebenarnya, sehingga penguapan dapat berlangsung lebih cepat (Dave, 2010). Ekstrak yang dihasilkan dari maserasi 1000 g buah Buni segar adalah 138,41 g dengan persen rendemennya sebesar 13,841%.



**Gambar 5. Ekstrak kental etanol buah buni**

#### **E. Fraksinasi Ekstrak Etanol Buah Buni**

Etanol merupakan pelarut universal yang dapat melarutkan berbagai jenis senyawa, sehingga di dalam ekstrak etanol buah Buni, senyawa yang diinginkan masih bercampur dengan komponen lain yang tidak diinginkan. Oleh karena itu diperlukan suatu tahap untuk memisahkan senyawa yang diinginkan dari komponen-komponen lain. Tahap pemisahan yang digunakan dalam penelitian ini adalah fraksinasi dengan

metode ekstraksi cair-cair. Pada ekstraksi cair-cair digunakan dua jenis pelarut yang berbeda sifat kepolarannya. Berdasarkan prinsip *like dissolve like*, maka komponen-komponen dalam ekstrak akan terpisah berdasarkan kepolarannya. Senyawa-senyawa polar terdistribusi dalam pelarut polar sedangkan senyawa-senyawa non-polar larut dalam pelarut lainnya, dengan demikian senyawa yang terdapat dalam fraksi menjadi lebih spesifik dan lebih mudah untuk dianalisis.

Ekstrak kental etanol yang akan difraksinasi dilarutkan di dalam air hangat terlebih dahulu untuk mempermudah melarutkan ekstrak. Ekstrak etanol yang telah larut dalam air diekstraksi cair-cair menggunakan heksan sehingga fase air akan berada di atas sedangkan fase heksan berada di bawah, sesuai dengan berat jenis air yang lebih kecil. Ekstraksi dilakukan secara berulang dengan volume heksan total 300 mL dan volume setiap kali ekstraksi 100 mL, hingga dihasilkan fraksi heksan yang jernih. Berdasarkan hukum Nerst, ekstraksi secara berulang lebih efektif daripada proses ekstraksi tunggal (Bassett, *et al.*, 1991).

Pada tahap fraksinasi, digunakan dua jenis pelarut yaitu heksan dan etil asetat. Keduanya merupakan pelarut yang sama-sama bersifat non-polar, namun jika dilihat dari nilai konstanta dielektriknya, heksan merupakan pelarut yang kepolarannya lebih rendah dengan nilai konstanta dielektrik 2,0 dibandingkan dengan etil asetat dengan nilai konstanta dielektrik 6,0. Heksan digunakan dalam fraksinasi tahap pertama dengan tujuan untuk memisahkan komponen-komponen yang tidak diinginkan dengan kepolaran sangat rendah, sehingga dapat diperoleh senyawa lebih spesifik. Komponen-

komponen yang diharapkan larut dalam fraksi heksan antara lain lilin dan lemak sedangkan senyawa yang diinginkan yaitu senyawa fenolik, termasuk flavonoid, lebih banyak terdapat pada fraksi air (Ferreira dan Pinho, 2012).

Fraksi air diekstraksi menggunakan pelarut kedua, yaitu etil asetat secara berulang hingga diperoleh fraksi yang jernih. Fraksi air akan berada di bawah sedangkan fraksi etil asetat berada di atas. Pada penelitian ini fraksi yang ditampung untuk diukur aktivitas antioksidannya adalah fraksi etil asetat sedangkan fraksi air tidak digunakan. Bentuk glikosida flavonoid yang mengikat gula bersifat polar sedangkan bentuk aglikonnya lebih non polar sehingga tidak menutup kemungkinan terdapat flavonoid yang larut dalam fraksi air, namun fraksi air kali ini tidak digunakan karena pelarutnya yang sulit diuapkan sehingga beresiko ditumbuhi jamur jika disimpan dalam waktu lama. Flavonoid yang diduga larut dalam fraksi etil asetat yaitu kuersetin, senyawa ini merupakan bentuk aglikon dari glikosida rutin yang banyak ditemukan dalam berbagai jenis buah - buahan (Dewick, 2002). Berat fraksi kering etil asetat yang diperoleh sebesar 2,1863 g dengan persen rendemen sebesar 3,6438 % b/b.



**Gambar 6. Fraksi etil asetat ekstrak etanol buah buni**



## F. Uji Kualitatif Fraksi Etil Asetat

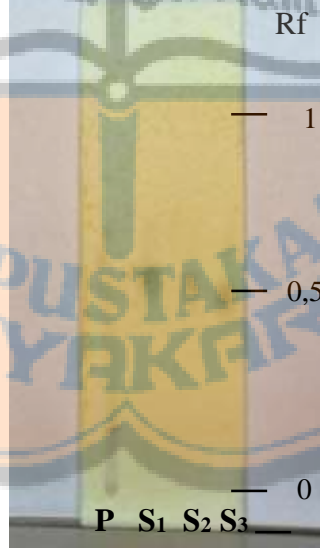
Uji kualitatif dilakukan untuk mengetahui ada atau tidaknya senyawa fenolik dan flavonoid pada fraksi etil asetat ekstrak etanol buah Buni menggunakan kromatografi lapis tipis (KLT). Penggunaan KLT dipilih sebagai metode uji kualitatif karena sifatnya lebih spesifik, dengan menggunakan senyawa pembanding sehingga dapat diketahui golongan senyawa yang terdapat dalam fraksi. Uji kualitatif yang dilakukan meliputi uji KLT senyawa fenolik menggunakan pembanding tanin dan uji KLT flavonoid dengan pembanding rutin. Deteksi bercak KLT dilakukan secara fisika, yaitu pengamatan di bawah sinar UV 254 nm dan 366 nm, dan secara kimia dengan penyemprotan suatu reagen, yaitu  $\text{FeCl}_3$  untuk mendeteksi senyawa fenolik dan  $\text{AlCl}_3$  untuk mendeteksi flavonoid. Selain itu ditentukan pula nilai  $R_f$  pembanding dan fraksi. Nilai  $R_f$  merupakan perbandingan jarak yang ditempuh eluen dan fase gerak pada plat dihitung dari titik penotolan (Lade, *et al.*, 2014).

### 1. Uji KLT fenolik

KLT fenolik bertujuan untuk mengetahui ada atau tidaknya senyawa fenolik dalam fraksi dengan membandingkannya terhadap tanin. Pemilihan tanin sebagai pembanding karena senyawa ini merupakan senyawa fenolik yang banyak dijumpai dalam tanaman. Pemisahan senyawa fenolik secara KLT dilakukan dengan fase diam silika atau selulosa dan fase gerak berupa campuran pelarut yang mengandung asam asetat atau asam formiat kemudian dideteksi menggunakan reagen besi

klorida, vanillin atau asam hidroklorat (Bruneton, 1999). Sistem KLT yang digunakan terdiri dari fase diam silika gel 60 GF<sub>254</sub> dan fase gerak campuran n-butanol : asam asetat glasial : air (5:1:4 v/v). Fraksi ditotolkan pada plat silika kemudian dielusi dengan fase gerak di dalam bejana KLT.

Deteksi bercak tanin dengan sinar UV 254 nm dan 366 nm berwarna coklat muda sedangkan bercak fraksi tidak tampak sehingga dilakukan penyemprotan FeCl<sub>3</sub>. Pengamatan bercak dapat dilakukan melalui sinar UV karena fase diam silika gel 60 GF<sub>254</sub> yang dapat berfluoresensi di bawah sinar UV pada panjang gelombang 254 nm dan 366 nm. Bagian plat yang ditutupi bercak nampak lebih gelap dibandingkan daerah sekitarnya yang berfluoresensi (Gandjar dan Rohman, 2007).



**Gambar 7.** Hasil uji KLT fenolik fraksi etil asetat (S<sub>1</sub>,S<sub>2</sub>,S<sub>3</sub>) dengan pembanding tanin (P) menggunakan fase diam silika gel 60 GF<sub>254</sub> dan fase gerak n-butanol : asam asetat glasial : air (5:1:4 v/v) setelah penyemprotan FeCl<sub>3</sub>

**Tabel III. Nilai Rf dan warna bercak uji KLT fenolik pada berbagai cara deteksi**

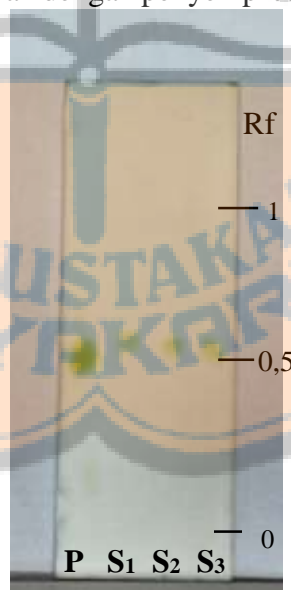
Bercak	Sebelum penyemprotan FeCl <sub>3</sub>			Setelah penyemprotan FeCl <sub>3</sub>			Rf
	Tanpa sinar UV	UV <sub>254 nm</sub>	UV <sub>366 nm</sub>	Tanpa sinar UV	UV <sub>254 nm</sub>	UV <sub>366 nm</sub>	
Tanin	coklat muda	bercak tidak nampak	hitam	biru kehitaman	bercak tidak nampak	hitam	0,70
Fraksi (S1)	bercak tidak nampak	bercak tidak nampak	hitam	biru kehitaman	bercak tidak nampak	hitam	0,59
Fraksi (S2)	bercak tidak nampak	bercak tidak nampak	hitam	biru kehitaman	bercak tidak nampak	hitam	0,59
Fraksi (S3)	bercak tidak nampak	bercak tidak nampak	hitam	biru kehitaman	bercak tidak nampak	hitam	0,57

Pada plat hasil penyemprotan dengan FeCl<sub>3</sub> (Gambar 7) terlihat warna bercak yang lebih jelas. Senyawa fenolik dapat dideteksi oleh FeCl<sub>3</sub> karena adanya interaksi ikatan kovalen koordinasi logam Fe<sup>3+</sup> sebagai atom pusat yang mengikat pasangan elektron bebas atom O pada posisi 4' dan 5' dihidroksi untuk membentuk suatu ligan berwarna biru tua (Peng, *et al.*, 2013). Bercak fraksi berwarna biru kehitaman menyerupai warna bercak tanin ketika diamati tanpa sinar UV, sedangkan pada UV 254 nm bercak fraksi tidak teramati dan pada UV 366 nm semua bercak menyerupai noda berwarna hitam. Apabila ditinjau dari warna bercak yang sama dan nilai Rf yang berbeda antara tanin dan sampel dalam satu sistem KLT yang sama, maka disimpulkan terdapat senyawa fenolik di dalam fraksi namun senyawa yang dimaksud bukan golongan tanin. Pengujian lebih lanjut

seperti skrining ataupun isolasi senyawa digunakan untuk mengetahui jenis senyawa fenolik yang terdapat dalam fraksi etil asetat.

## 2. Uji KLT flavonoid

Setelah mengetahui adanya senyawa fenolik dalam fraksi, dilakukan uji kualitatif yang kedua, yaitu KLT flavonoid. Flavonoid merupakan salah satu golongan senyawa fenolik yang banyak ditemukan dalam tumbuhan dan dipilih karena senyawa ini merupakan penyumbang aktivitas antioksidan terbesar dalam tanaman, sedangkan rutin digunakan sebagai pembanding karena senyawa ini merupakan flavonoid yang umum ditemukan pada tanaman serta aktivitas antioksidannya telah banyak diteliti sebagai antioksidan kuat (Lopez, *et al.*, 2003). Fase gerak dan fase diam yang digunakan sama seperti KLT fenolik sedangkan identifikasi flavonoid dilakukan dengan penyemprotan aluminium klorida ( $\text{AlCl}_3$ ).



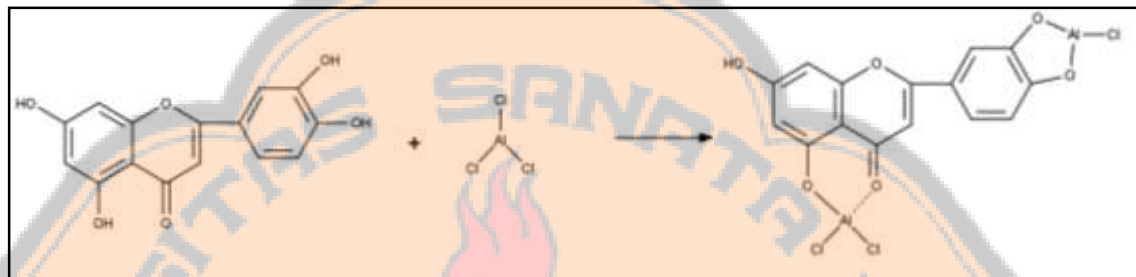
**Gambar 8.** Hasil uji KLT flavonoid fraksi etil asetat ( $S_1, S_2, S_3$ ) dengan pembanding rutin (P) menggunakan fase diam silika gel 60 GF<sub>254</sub> dan fase gerak n-butanol : asam asetat glasial : air (5:1:4 v/v) setelah penyemprotan  $\text{AlCl}_3$

**Tabel IV. Warna bercak uji KLT flavonoid dengan berbagai cara deteksi**

Bercak	Sebelum penyemprotan AlCl <sub>3</sub>			Setelah penyemprotan AlCl <sub>3</sub>			Rf
	Tanpa sinar UV	UV <sub>254 nm</sub>	UV <sub>366 nm</sub>	Tanpa sinar UV	UV <sub>254 nm</sub>	UV <sub>366 nm</sub>	
Rutin	kuning	hitam	hitam	kuning	hitam	hitam	0,61
Fraksi (S1)	kuning pucat	hitam (samar)	hitam	kuning	hitam	hitam	0,65
Fraksi (S2)	kuning pucat	hitam (samar)	hitam	kuning	hitam	hitam	0,63
Fraksi (S3)	kuning pucat	hitam (samar)	hitam	kuning	hitam	hitam	0,65

Bercak yang telah dielusi dengan fase gerak diamati di bawah sinar UV 254 nm dan 366 nm. Bercak rutin pada plat teramati dengan jelas menggunakan kedua sinar UV, sedangkan bercak dari fraksi juga teramati namun tidak terlalu jelas dibandingkan bercak rutin sehingga dilakukan penyemprotan menggunakan AlCl<sub>3</sub>. Tujuan penyemprotan AlCl<sub>3</sub> adalah untuk mendeteksi adanya senyawa flavonoid di dalam sampel. Setelah penyemprotan AlCl<sub>3</sub> diperoleh bercak rutin dan fraksi yang sama-sama berwarna kuning (Gambar 8). Warna kuning bercak dihasilkan dari reaksi antara AlCl<sub>3</sub> dengan gugus hidroksil dan keton yang bersebelahan atau dengan gugus ortohidroksi pada senyawa flavonoid membentuk kompleks flavonoid-AlCl<sub>3</sub> (Gambar 9). Nilai Rf yang dihasilkan rutin adalah 0,61 sedangkan Rf fraksi 0,65; 0,63 dan 0,65. Berdasarkan hasil pengamatan warna bercak yang sama antara rutin dan fraksi dapat disimpulkan bahwa fraksi etil asetat ekstrak

etanol buah Buni mengandung flavonoid, sedangkan jika dilihat dari nilai Rf yang tidak sama maka belum dapat dipastikan bahwa flavonoid yang terdapat dalam fraksi adalah rutin.

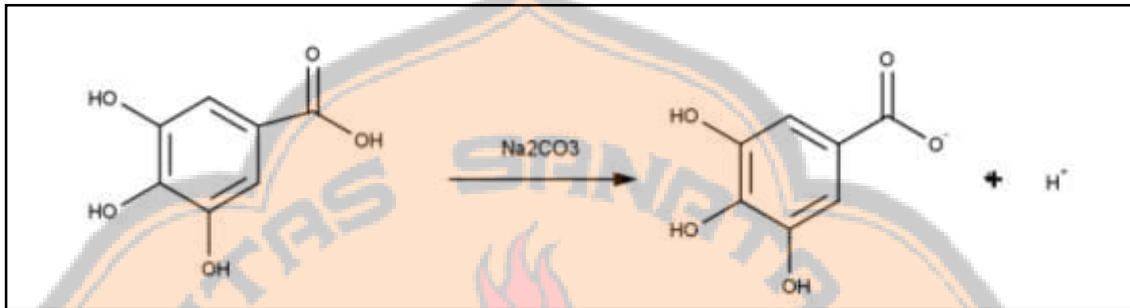


**Gambar 9. Reaksi senyawa flavonoid dengan pereaksi  $AlCl_3$  (Andersen dan Markham, 2006).**

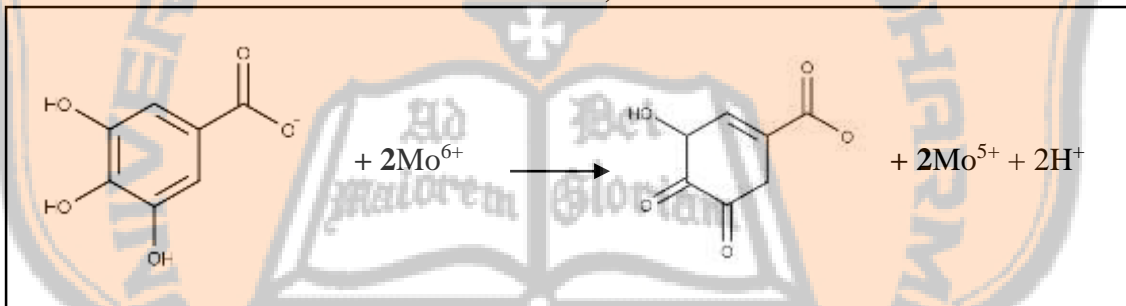
### G. Penetapan Kandungan Fenolik Total Fraksi Etil Asetat

Senyawa fenolik seringkali dikaitkan dengan aktivitas antioksidan dalam suatu tanaman terutama akibat adanya gugus hidroksil pada strukturnya. Gugus hidroksil berkontribusi sebagai penyumbang atom hidrogen ketika bereaksi dengan senyawa radikal melalui transfer elektron sehingga dapat mencegah reaksi oksidasi oleh senyawa radikal. Prinsip metode ini adalah oksidasi ion fenolat oleh reagen  $(MoW_{11}O_{40})^{-4}$  menghasilkan kompleks berwarna yang terukur panjang gelombang 760 nm. Pada saat reaksi terjadi reduksi ion molibdenum ( $Mo^{6+}$ ) menjadi  $Mo^{5+}$ , reaksi ini diduga menyebabkan perubahan warna larutan kuning menjadi biru (Prior, *et al.*, 2005). Ion fenolat dibentuk melalui disosiasi proton senyawa fenolik, reaksi ini hanya dapat terjadi dalam kondisi basa, sehingga pada penelitian ini digunakan natrium

karbonat sebagai basa. Warna biru yang dihasilkan menggambarkan jumlah kompleks yang terbentuk, sehingga semakin tinggi kandungan fenolik dalam suatu ekstrak, semakin pekat warna biru yang dihasilkan (Apsari dan Susanti, 2011).



**Gambar 10. Reaksi asam galat dan natrium karbonat (Nunes, *et al.*, 2012).**

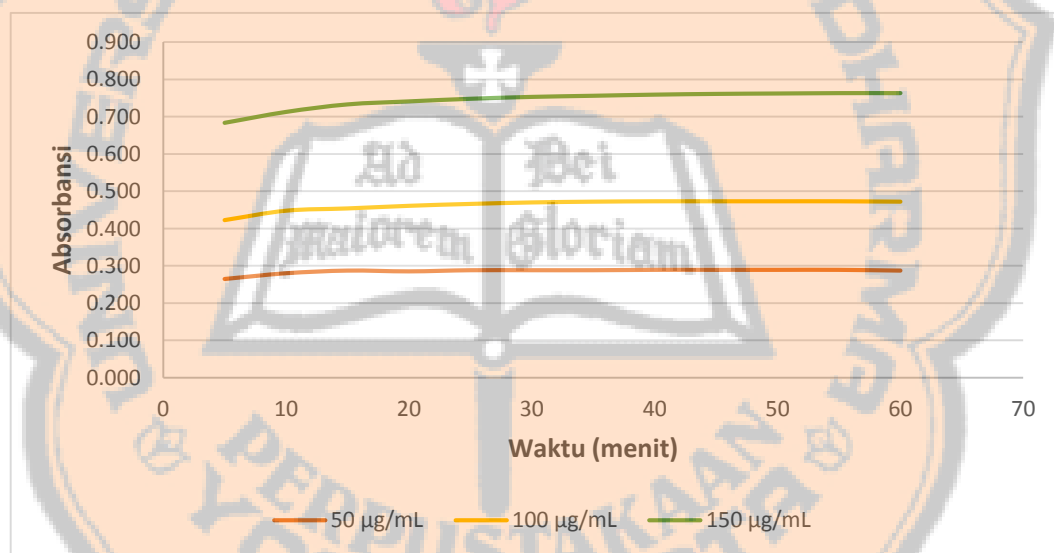


**Gambar 11. Reaksi asam galat dan reagen Folin-Ciocalteu (Nunes, *et al.*, 2012).**

#### 1. Penentuan *Operating Time* (*OT*)

Tujuan penetapan *OT* adalah mendapatkan waktu pengukuran pada saat reaksi telah berjalan optimal yang ditandai dari absorbansi yang stabil, sehingga dapat memaksimalkan pengukuran. Pengukuran *OT* untuk metode Folin-Ciocalteu diperoleh dengan cara mereaksikan asam galat pada tiga tingkat konsentrasi berbeda dengan reagen Folin-Ciocalteu dan natrium karbonat kemudian diukur pada panjang gelombang teoritis, 760 nm selama 60 menit. Penentuan *OT* reaksi

dilihat dari nilai absorbansi yang stabil selama pengukuran karena kestabilan absorbansi menggambarkan pembentukan senyawa molibdenum-tungstat, yang memberikan warna biru pada larutan, sudah optimal. Pengukuran absorbansi dilakukan pada berbagai tingkat konsentrasi yang mencakup rentang konsentrasi larutan baku asam galat. Konsentrasi seri larutan baku asam galat yang akan digunakan adalah 50-150  $\mu\text{g/mL}$  sehingga konsentrasi 50, 100 dan 150  $\mu\text{g/mL}$  dipilih untuk menentukan *OT*. Hubungan antara lamanya reaksi dengan absorbansi larutan asam galat pada tiga tingkat konsentrasi ditunjukkan pada grafik berikut :



**Gambar 12. Grafik penentuan *OT* kandungan fenolik**

Pada ketiga konsentrasi, absorbansi meningkat mulai dari menit ke-5 dengan kenaikan yang tidak terlalu signifikan, menunjukkan bahwa mulai terjadi pembentukan kompleks warna molibdenumtungstat. Semakin lama reaksi berjalan, jumlah kompleks warna yang terbentuk semakin banyak ditandai dengan kenaikan absorbansi secara terus menerus hingga pada menit ke-25. Pada rentang waktu ini



tidak dapat dijadikan sebagai *OT* karena reaksi pembentukan kompleks warna masih terus berjalan, sehingga pengukuran menjadi tidak maksimal jika dilakukan pada waktu tersebut, sebaliknya ketika absorbansi mulai stabil merupakan waktu yang tepat dijadikan sebagai *OT*. Absorbansi yang stabil menggambarkan reaksi telah berjalan optimal sehingga dapat segera dilakukan pengukuran. Berdasarkan hasil pengukuran yang diperoleh, absorbansi yang stabil terjadi pada menit ke-30 sehingga dapat disimpulkan *OT* reaksi untuk penetapan fenolik total adalah 30 menit.

## 2. Penetapan panjang gelombang maksimum

Panjang gelombang maksimum merupakan panjang gelombang yang dapat memberikan absorbansi maksimum pada saat pengukuran. Keuntungan penggunaan panjang gelombang maksimum adalah pengukuran yang lebih sensitif karena pada panjang gelombang maksimum adanya sedikit perubahan konsentrasi dapat menghasilkan perubahan absorbansi yang besar (Sambadha, 2011). Panjang gelombang maksimum metode Folin-Ciocalteu ditentukan dengan melakukan *scanning* panjang gelombang pada rentang 600-800 nm menggunakan tiga tingkat konsentrasi asam galat 50; 100 dan 150  $\mu\text{g/mL}$ . Pemilihan rentang panjang gelombang tersebut didasarkan pada panjang gelombang maksimum untuk reaksi yang sama dari penelitian Blainski, *et al.* (2013), yaitu 760 nm.

**Tabel V. Hasil *scanning* panjang gelombang maksimum asam galat**

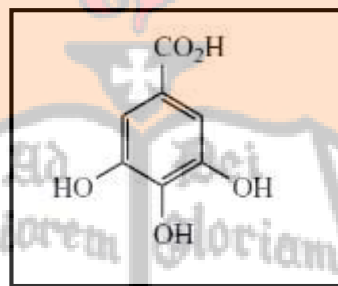
Konsentrasi asam galat ( $\mu\text{g/mL}$ )	$\lambda$ maksimum hasil pengukuran	Rata-rata $\lambda$ maksimum
50	750 nm	745 nm
100	746 nm	
150	740 nm	

Panjang gelombang maksimum yang diperoleh dari ketiga konsentrasi larutan adalah 745 nm (Tabel V). Salah satu kekurangan dari metode Folin-Ciocalteu adalah reagen yang mudah terurai terutama dalam kondisi basa sehingga digunakan reagen yang berlebih untuk menghasilkan reaksi maksimal, namun perlakuan ini juga beresiko menyebabkan larutan keruh oleh endapan sehingga dapat mempengaruhi pengukuran pada spektrofotometer (Blainski, *et al.*, 2013). Pengaruh endapan dapat diminimalisir dengan mengambil bagian supernatan larutan saja untuk diukur, sehingga endapan tetap berada di dasar tabung reaksi.

### 3. Penetapan kandungan fenolik total fraksi etil asetat buah Buni

Panjang gelombang maksimum dan *OT* yang telah diperoleh digunakan untuk menentukan persamaan regresi linier asam galat menggunakan lima seri konsentrasi, yaitu 50; 75; 100; 125; dan 150  $\mu\text{g/mL}$ . Asam galat digunakan sebagai senyawa fenolik standar untuk menetapkan kandungan fenolik total yang ada dalam fraksi etil asetat ekstrak etanol buah Buni. Pemilihan asam galat sebagai standar

karena senyawa ini terbentuk dari asam 3-dihidrosikimat melalui jalur sikimat, menghasilkan asam amino aromatik *L-phenylalanine* dan *L-tyrosine* yang menjadi bentuk dasar pada asam sinamat, kumarin, lignin dan flavonoid (Dewick, 2002). Asam galat merupakan senyawa fenolik yang dikenal memiliki aktivitas antioksidan dari tiga gugus hidroksi fenolat pada strukturnya dan banyak ditemukan dalam tanaman, termasuk dalam buah Buni (Butkhup dan Samappito, 2011).

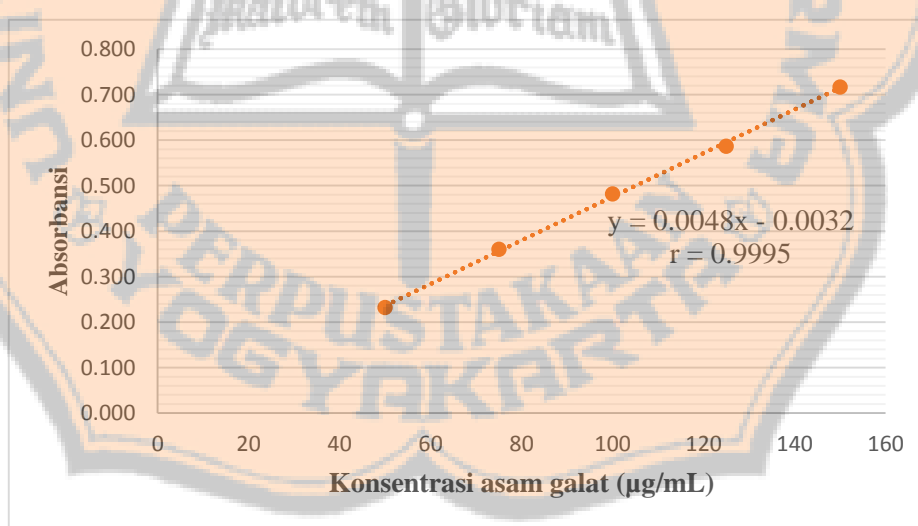


**Gambar. 13 Struktur kimia asam galat (Dewick, 2002).**

Absorbansi dan konsentrasi kelima seri larutan baku dihubungkan menjadi persamaan regresi linier yang digunakan untuk mengestimasi kandungan fenolik total dalam fraksi. Persamaan regresi linier dari tiga replikasi yang menghasilkan linearitas terbaik yaitu replikasi ketiga dengan nilai  $r = 0,9995$  (Tabel VI), kemudian dibuat kurva hubungan konsentrasi asam galat dan absorbansi larutan (Gambar 14).

**Tabel VI. Hasil pengukuran absorbansi asam galat**

Replikasi	Konsentrasi asam galat ( $\mu\text{g/mL}$ )	Absorbansi	Persamaan regresi linier
1	50	0,268	$y = 0,0050x + 0,0002$ $r = 0,9961$
	75	0,344	
	100	0,498	
	125	0,622	
	150	0,749	
2	50	0,239	$y = 0,0047x + 0,0040$ $r = 0,9989$
	75	0,369	
	100	0,475	
	125	0,585	
	150	0,724	
3	50	0,232	$y = 0,0048x - 0,0032$ $r = 0,9995$
	75	0,360	
	100	0,482	
	125	0,587	
	150	0,717	

**Gambar 14. Kurva persamaan regresi linier asam galat**

Persamaan regresi linier replikasi ketiga,  $y = 0,0048x - 0,0032$  digunakan untuk menghitung nilai kandungan fenolik total yang dinyatakan dalam mg

ekuivalen asam galat per gram fraksi. Hasil penetapan kandungan fenolik total fraksi dari tiga replikasi berturut-turut sebesar 11,2708; 10,9665 dan 11,2014 mg ekuivalen asam galat per gram fraksi dengan rata-rata  $11,1462 \pm 0,1595$  mg ekuivalen asam galat per gram fraksi dan CV yang diperoleh sebesar 1,4908% (Tabel VII). Koefisien variasi (CV) atau yang seringkali disebut dengan standar deviasi relatif merupakan ukuran yang menggambarkan presisi relatif suatu metode analisis. Semakin kecil nilai CV dari serangkaian pengukuran, maka semakin tepat metode yang digunakan (Gandjar dan Rohman, 2007). Menurut Harmita (2004), kriteria presisi secara umum terpenuhi apabila suatu metode memberikan nilai  $CV \leq 2\%$ , sehingga metode Folin-Ciocalteu pada penelitian ini memiliki presisi yang baik untuk menetapkan kandungan fenolik total dalam fraksi etil asetat ekstrak etanol buah Buni.

**Tabel VII. Kandungan fenolik total fraksi etil asetat**

Replikasi	Absorbansi	Kandungan fenolik ( $\mu\text{g/mL}$ )	Kandungan fenolik total (mg)	$x \pm \text{SD}$	CV (%)
1	0,646	135,2500	11,2708	$11,1462 \pm 0,1595$	1,4908
2	0,639	133,7917	10,9665		
3	0,642	134,4167	11,2014		

Kandungan fenolik total dalam fraksi etil asetat ekstrak etanol lebih tinggi daripada kandungan fenolik total ekstrak etanol yang hanya sebesar 0,2794 mg ekuivalen asam galat per gram fraksi, sehingga metode fraksinasi pada penelitian ini cukup efektif dalam memisahkan senyawa fenolik. Selain itu, apabila mengacu

pada penelitian Butkhup dan Samappito (2011) yang menyebutkan bahwa kandungan fenolik total ekstrak metanol buah Buni matang sebesar 8,66 mg ekuivalen asam galat per gram buah segar maka kandungan fenolik total dalam fraksi etil asetat juga lebih tinggi dari kandungan fenolik total dalam ekstrak metanol.

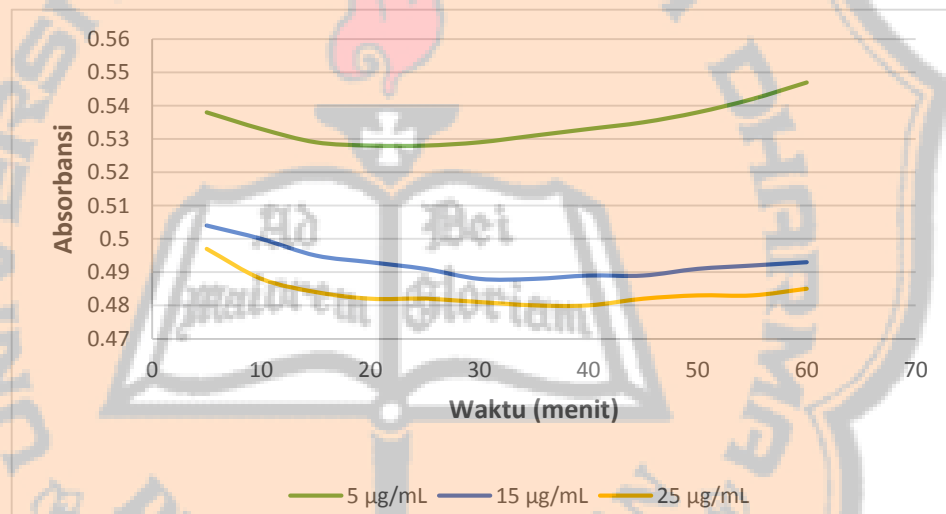
#### H. Uji Aktivitas Antioksidan Fraksi Etil Asetat Buah Buni

Pengujian aktivitas antioksidan dilakukan dengan metode DPPH, yaitu metode yang banyak dipilih karena proses pengerjaannya sederhana dan menggunakan sampel dalam jumlah sedikit namun tidak kalah sensitif dibandingkan dengan metode-metode lainnya (Pisoschi, *et al.*, 2009). Peran DPPH sebagai radikal berwarna yang akan bereaksi dengan antioksidan lalu beresonansi membentuk gugus kromofor yang panjang. Antioksidan dalam fraksi jika direaksikan dengan DPPH akan menyebabkan penghambatan aktivitas DPPH yang terlihat dari penurunan serapan larutan. Aktivitas antioksidan fraksi etil asetat diukur sebagai  $IC_{50}$  yaitu konsentrasi fraksi yang dapat menghambat 50% aktivitas DPPH.

##### 1. Penentuan *Operating Time* (*OT*)

Penentuan *OT* metode DPPH dengan cara mengukur absorbansi larutan rutin yang direaksikan dengan DPPH setiap 5 menit selama 60 menit pada panjang gelombang teoritis 517 nm. Pada waktu nilai absorbansi stabil ditetapkan sebagai *OT* reaksi. Kestabilan absorbansi menunjukkan reduksi DPPH oleh antioksidan

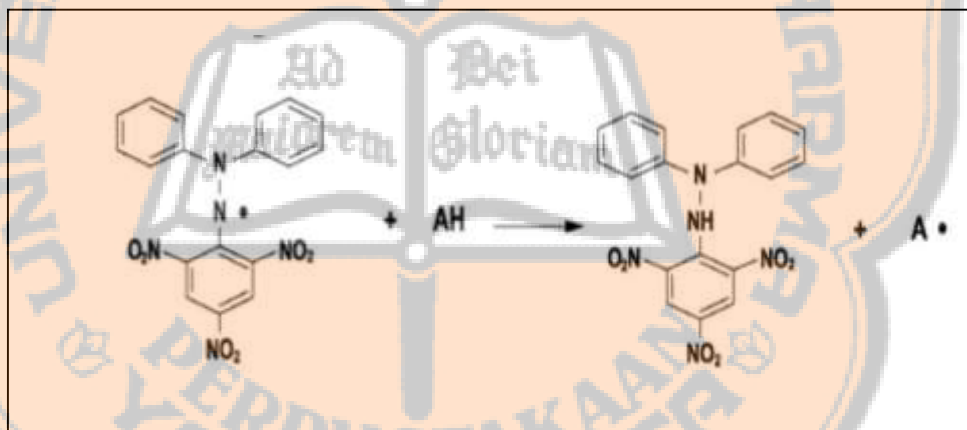
sudah sempurna, sehingga jika pengukuran dilakukan pada saat ini pengukuran bersifat lebih reproduibel. Larutan rutin sebagai standar dibuat dalam tiga konsentrasi berbeda yaitu 5,0; 15,0 dan 20,0  $\mu\text{g/mL}$  dengan tujuan untuk membandingkan *OT* yang didapat pada berbagai tingkat konsentrasi rutin. Pengukuran absorbansi larutan dilakukan setiap 5 menit sekali untuk memberikan jeda waktu reaksi berlangsung dengan pengukuran pertama dimulai 5 menit setelah penambahan rutin.



**Gambar 15. Grafik penentuan *OT* Rutin**

Berdasarkan kurva di atas, absorbansi menurun dari menit ke-5 pada ketiga konsentrasi larutan, namun kembali naik di menit ke-35 pada konsentrasi 5  $\mu\text{g/mL}$  sedangkan absorbansi dua larutan yang lain kembali naik pada menit ke-40 dan ke-45. Terdapat kesamaan pada ketiga larutan yaitu nilai absorbansi yang stabil pada menit ke-30 sehingga *OT* reaksi yang digunakan adalah 30 menit. Penurunan absorbansi menunjukkan pengurangan jumlah DPPH yang terukur akibat adanya

aktivitas penangkapan DPPH oleh senyawa antioksidan, yaitu rutin, maka semakin tinggi konsentrasi rutin makin besar penurunan absorbansi yang terjadi. Warna ungu DPPH disebabkan karena adanya delokalisasi elektron bebas pada strukturnya, ketika DPPH bereaksi dengan suatu senyawa yang dapat mendonorkan atom H maka elektron bebas akan berpasangan dan menyebabkan berkurangnya intensitas warna ungu larutan. Intensitas warna yang diukur sebanding dengan konsentrasi DPPH yang tersisa setelah bereaksi dengan antioksidan, sehingga kemampuan penangkapan radikal oleh antioksidan yang dinyatakan dalam persen *inhibitory concentration* (%IC) dapat diketahui (Pisoschi, *et al.*, 2009).



**Gambar 16. Donasi proton senyawa antioksidan ke DPPH (Pisoschi, *et al.*, 2009).**

## 2. Penentuan panjang gelombang maksimum

Setelah *OT* diperoleh, langkah selanjutnya yang dilakukan pada penelitian ini adalah menentukan panjang gelombang maksimum yang akan digunakan untuk mengukur aktivitas antioksidan rutin dan fraksi etil asetat. Pengukuran absorbansi



harus dilakukan pada panjang gelombang maksimum agar dapat memberikan hasil pengukuran yang maksimal dan mengurangi resiko kesalahan pengukuran. Panjang gelombang maksimum ditentukan dengan cara melakukan *scanning* terhadap tiga tingkat konsentrasi DPPH, yaitu 20, 30 dan 40  $\mu\text{g/mL}$  yang dilakukan pada rentang panjang gelombang 400-600 nm. Pemilihan rentang tersebut karena secara teoritis panjang gelombang maksimum untuk DPPH adalah 517 nm (Lizardo, *et al.*, 2015). Berdasarkan hasil pengukuran ketiga konsentrasi larutan (Tabel VIII), diperoleh rata-rata panjang gelombang maksimum sebesar 516 nm. Hasil yang diperoleh telah memenuhi ketentuan dalam Farmakope Indonesia IV yang menyebutkan penyimpangan panjang gelombang maksimum yang diperbolehkan sebesar 2 nm, sehingga 516 nm dapat digunakan sebagai panjang gelombang maksimum untuk pengukuran aktivitas antioksidan fraksi etil asetat buah Buni.

**Tabel VIII. Hasil *scanning* panjang gelombang maksimum DPPH**

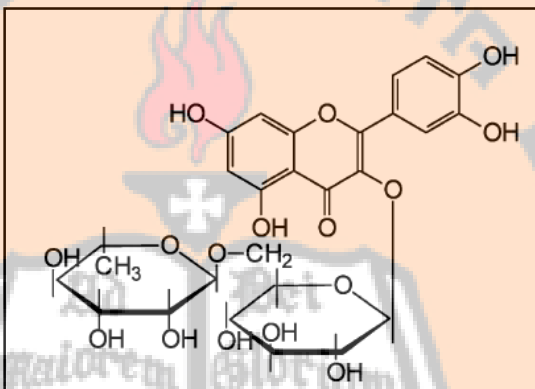
Konsentrasi larutan DPPH ( $\mu\text{g/mL}$ )	$\lambda$ maksimum hasil pengukuran	$\lambda$ maksimum yang digunakan
20	516 nm	516 nm
30	516 nm	
40	516 nm	

3. Uji aktivitas antioksidan dengan metode DPPH

(i) Pengukuran aktivitas antioksidan rutin

Pada tahap ini aktivitas antioksidan rutin perlu diukur sebelum fraksi karena rutin merupakan kontrol positif, yaitu senyawa yang telah diketahui

memiliki aktivitas antioksidan. Rutin (3',4',5,7-tetrahidroksiflavon-3 $\beta$ -D-rutinosida) atau vitamin P merupakan senyawa fenolik golongan flavonoid berupa glikosida yang sering digunakan sebagai pembanding dalam pengukuran aktivitas antioksidan karena telah banyak diteliti aktivitas antioksidannya. Gugus O-dihidroksi pada struktur rutin diasosiasikan dengan aktivitas antioksidan yang dimiliki (Lopez, *et al.*, 2003).



**Gambar 17. Struktur kimia rutin (Lopez, *et al.*, 2003).**

Pengukuran rutin dilakukan dalam lima seri konsentrasi larutan yang berbeda, kemudian diukur absorbansinya terhadap larutan blanko yang terdiri dari DPPH dan pelarut, sebagai kontrol negatif. Aktivitas antioksidan rutin yang terukur dinyatakan dalam  $IC_{50}$ , yaitu konsentrasi yang diperlukan untuk menghambat aktivitas DPPH sebesar 50%. Semakin kecil nilai  $IC_{50}$  yang dimiliki suatu senyawa berarti semakin kecil konsentrasi yang dibutuhkan untuk menghambat 50% aktivitas DPPH, sehingga makin kuat aktivitas antioksidan senyawa tersebut. Seri konsentrasi rutin dan % $IC$  yang diperoleh dihubungkan sebagai kurva sehingga diperoleh persamaan regresi linier. Berdasarkan hasil

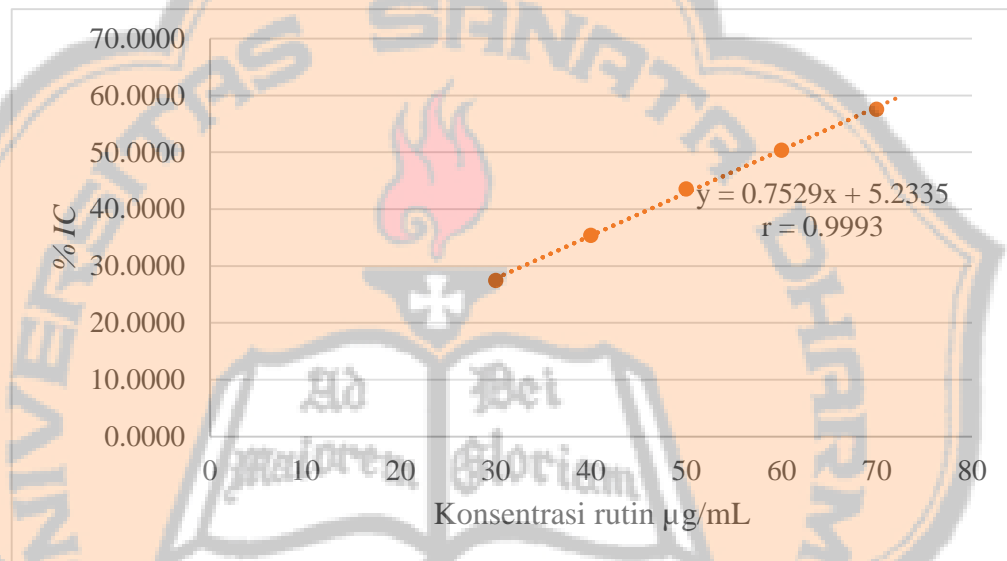
pengukuran %*IC* rutin dengan tiga kali replikasi (Tabel IX), diketahui bahwa pada konsentrasi 70 µg/mL rutin dapat menghambat aktivitas DPPH lebih dari 50%. Agar dapat mengetahui konsentrasi rutin yang diperlukan untuk menghambat 50% aktivitas DPPH maka dihitung *IC*<sub>50</sub> menggunakan persamaan regresi linier.

**Tabel IX. Hasil pengukuran %*IC* rutin**

Replikasi	Konsentrasi rutin (µg/mL)	% <i>IC</i>	Persamaan regresi linier
1	30	24,6730	$y = 0,8259x + 0,4674$ $r = 0,9990$
	40	32,5234	
	50	41,1215	
	60	49,9065	
	70	56,4486	
2	30	27,1457	$y = 0,6467x + 8,4231$ $r = 0,9963$
	40	35,3293	
	50	40,1198	
	60	48,1038	
	70	53,0938	
3	30	27,4319	$y = 0,7529x + 5,2335$ $r = 0,9993$
	40	35,4086	
	50	43,5798	
	60	50,3891	
	70	57,5875	

Persamaan regresi linier dari tiga replikasi berturut-turut adalah  $y = 0,8259x + 0,4674$  ( $r = 0,9990$ );  $y = 0,6467x + 8,4231$  ( $r = 0,9963$ );  $y = 0,7529x + 5,2335$  ( $r = 0,9993$ ) dengan linearitas terbaik pada replikasi ketiga. Persamaan regresi linier digunakan untuk menentukan nilai *IC*<sub>50</sub> rutin, dengan cara menghitung nilai  $x$  sebagai konsentrasi rutin. Nilai *IC*<sub>50</sub> rutin pada replikasi pertama, kedua dan ketiga berturut-turut adalah 59,9740; 64,2910; dan 59,4532 µg/mL dengan rata-

rata  $IC_{50}$   $61,2413 \pm 2,6536 \mu\text{g/mL}$  dan CV sebesar 4,3330%. Pada penelitian Sintayehu, *et al.* (2012) menggunakan metode yang sama  $IC_{50}$  rutin hanya sebesar  $3,53 \mu\text{g/mL}$ , sehingga aktivitas antioksidan rutin yang digunakan sebagai kontrol positif uji aktivitas antioksidan buah Buni lebih rendah.



**Gambar 18. Kurva aktivitas antioksidan rutin**

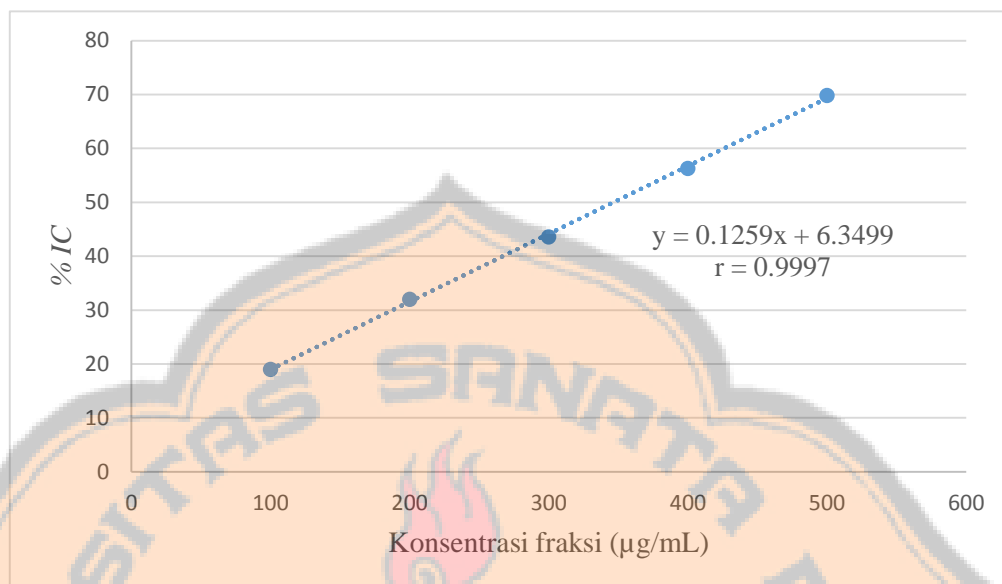
(ii) Pengukuran aktivitas antioksidan fraksi etil asetat

Aktivitas antioksidan fraksi etil asetat buah Buni diukur menggunakan tata cara yang sama seperti rutin, yaitu dengan menghitung %IC dari lima seri konsentrasi fraksi (Tabel X) dan mencari persamaan regresi linier masing-masing replikasi. Persamaan regresi linier dengan linearitas terbaik diperoleh dari replikasi ketiga (Gambar 19), yaitu  $y = 0,1259x + 6,3499$  ( $r = 0,9997$ ). Berdasarkan persamaan regresi linier dari tiap replikasi, didapat  $IC_{50}$  replikasi pertama sebesar  $374,4332 \mu\text{g/mL}$ ; replikasi kedua sebesar  $345,3674 \mu\text{g/mL}$

sedangkan replikasi ketiga 346,7045  $\mu\text{g/mL}$  dengan rata-rata  $355,5011 \pm 16,4092$   $\mu\text{g/mL}$  dan CV 4,6158%. Nilai  $IC_{50}$  fraksi etil asetat yang diperoleh jauh lebih besar daripada  $IC_{50}$  ekstrak metanol buah Buni menurut penelitian Haripyaree, *et al.* (2010) yaitu 100,08  $\mu\text{g/mL}$ , sehingga dapat disimpulkan bahawa aktivitas antioksidan fraksi etil asetat lebih lemah dibandingkan ekstrak metanol.

**Tabel X. Hasil pengukuran %IC fraksi etil asetat**

Replikasi	Konsentrasi sampel ( $\mu\text{g/mL}$ )	%IC	Persamaan regresi linier
1	100	17,5150	$y = 0,1235x + 3,7575$ $r = 0,9975$
	200	27,3952	
	300	40,2695	
	400	51,7964	
	500	67,0659	
2	100	18,8148	$y = 0,1271x + 6,1040$ $r = 0,9995$
	200	32,0000	
	300	44,0000	
	400	56,0000	
	500	70,3704	
3	100	19,0045	$y = 0,1259x + 6,3499$ $r = 0,9997$
	200	31,9759	
	300	43,5897	
	400	56,2594	
	500	69,8341	



**Gambar 19. Kurva aktivitas antioksidan fraksi etil asetat**

Kriteria penerimaan CV disesuaikan dengan konsentrasi analit yang diperiksa, yaitu semakin kecil konsentrasi analit maka semakin besar kriteria CV yang diperbolehkan (Harmita, 2004). Teori ini juga disebutkan dalam *Association of Official Analytical Chemists* (1998) bahwa rentang penerimaan CV suatu metode penelitian dipengaruhi oleh konsentrasi analit pada matriks sampel (Tabel XI). Nilai CV dalam hal ini menggambarkan keseksamaan (presisi) metode DPPH dilihat dari kesesuaian hasil serangkaian uji pada kondisi yang sama. Besarnya nilai CV rutin (4,3330%) dan fraksi etil asetat (4,6158%) disebabkan oleh hasil pengukuran kandungan fenolik total yang tidak konsisten tiap replikasinya. Ketidaktepatan hasil ini merupakan salah satu bentuk kesalahan yang terjadi dalam setiap pengukuran, yaitu kesalahan acak (*random error*). Akibat yang ditimbulkan dari kesalahan acak adalah perbedaan hasil dalam serangkaian pengukuran yang digambarkan melalui standar deviasi (SD).

Penyebab kesalahan acak ini sulit diprediksi dan dapat dihindari dengan melakukan pengukuran secara berulang (Bell, 2001). Meskipun demikian, CV yang diperoleh masih memenuhi kriteria CV yang diperbolehkan untuk konsentrasi analit dalam kisaran 0,01-0,001%, yaitu 3,7-5,3%.

**Tabel XI. Kriteria penerimaan CV berdasarkan konsentrasi analit (AOAC, 1998).**

Analit dalam matriks sampel (%)	CV (%)
100	1,3
10	1,9
1	2,7
0,01	3,7
0,001	5,3
0,0001	7,3
0,00001	11

**Tabel XII. Nilai  $IC_{50}$  rutin dan fraksi etil asetat**

Rutin			
Replikasi	Persamaan regresi linier	$IC_{50}$ ( $\mu\text{g/mL}$ )	$x \pm \text{SD}$
1	$y = 0,8093x + 0,4675$	59,9741	61,2413 $\pm$ 2,6536
2	$y = 0,6467x + 8,4230$	64,2909	
3	$y = 0,7529x + 5,2377$	59,4588	
Fraksi etil asetat			
1	$y = 0,1235x + 3,7575$	374,4332	355,5011 $\pm$ 16,4092
2	$y = 0,1271x + 6,1038$	345,3658	
3	$y = 0,1259x + 6,3499$	346,7045	

Perbandingan rata-rata  $IC_{50}$  rutin dan fraksi etil asetat ditunjukkan pada tabel XII. Berdasarkan tabel tersebut diketahui bahwa dibutuhkan konsentrasi fraksi etil asetat yang jauh lebih besar dibandingkan konsentrasi rutin untuk menghambat 50% aktivitas DPPH sehingga kekuatan antioksidan rutin lebih besar daripada fraksi etil asetat, sedangkan jika dibandingkan dengan ekstrak etanol maka aktivitas antioksidan fraksi etil asetat ekstrak etanol lebih tinggi karena  $IC_{50}$  ekstrak etanol yang lebih besar 2049,7099  $\mu\text{g/mL}$ .

Lemahnya aktivitas antioksidan yang terukur dapat disebabkan oleh beberapa faktor, yaitu oksidasi senyawa fenolik sebagai akibat dari proses ekstraksi dan perendaman dalam etanol yang terlalu lama. Kontak senyawa fenolik dengan oksigen yang terlalu lama saat proses ekstraksi dapat meningkatkan resiko oksidasi senyawa fenolik, sehingga tidak dapat terukur saat penetapan fenolik total (Maslukhah, *et al.*, 2016). Selain itu dalam hasil penelitian Cooper-Driver dan Balick (1978) dinyatakan bahan segar yang direndam dengan etanol selama sebulan memiliki senyawa fenolik lebih rendah daripada senyawa fenolik dalam bahan yang dikeringkan. Faktor penyebab lain diduga karena senyawa yang berefek antioksidan lebih banyak terbawa dalam fraksi air sehingga menyebabkan aktivitas antioksidan yang terukur menjadi rendah. Berdasarkan hasil dan teori yang diperoleh maka disimpulkan bahwa cara pengawetan buah Buni segar merupakan kelemahan dari penelitian ini

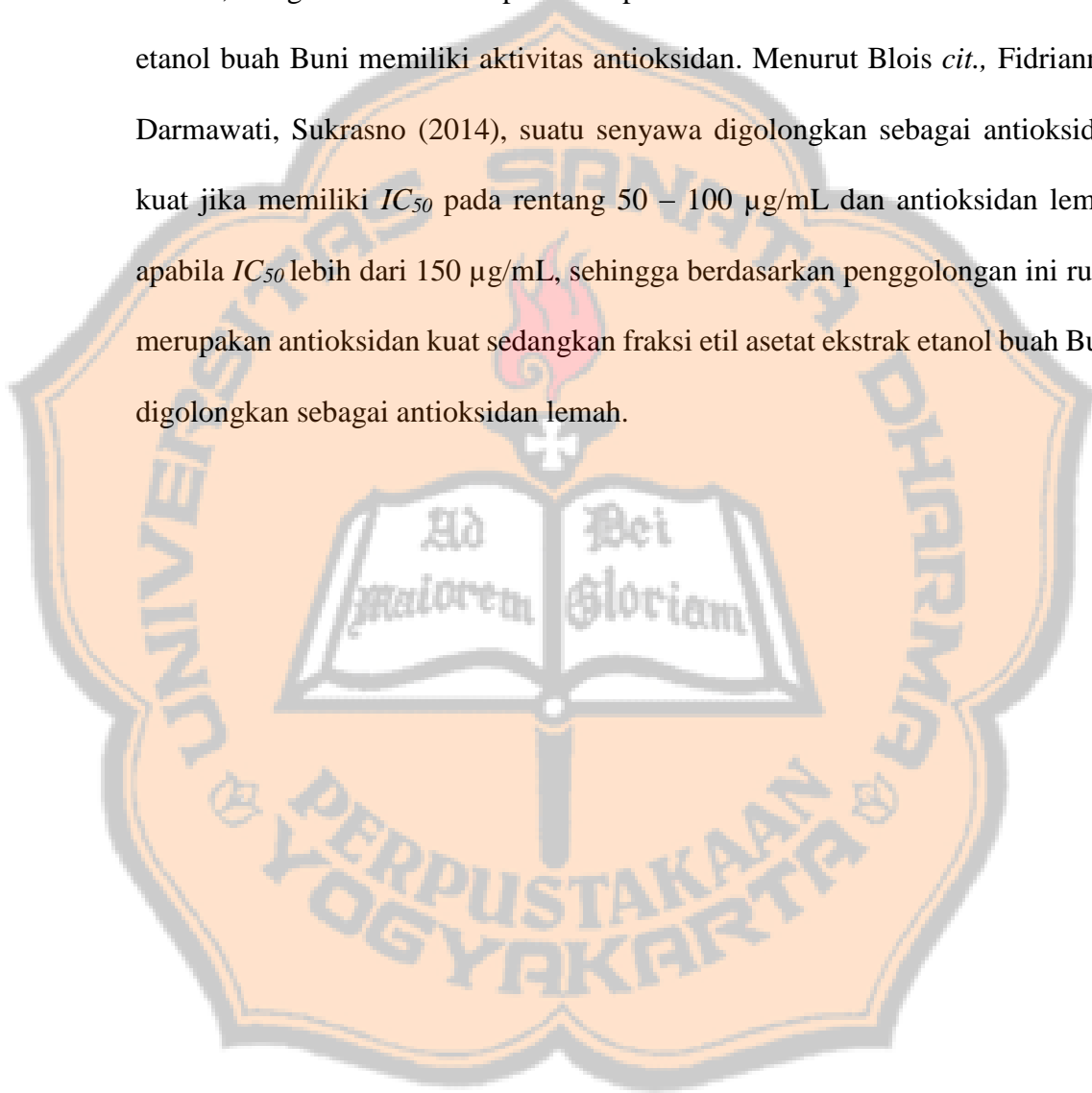


Uji statistik yang dilakukan berupa uji normalitas, uji variansi dan uji t-tidak berpasangan terhadap  $IC_{50}$  rutin dan fraksi etil asetat. Uji normalitas dilakukan untuk menentukan metode statistik yang dipilih dalam pengujian hipotesis. Jika data terdistribusi normal maka metode statistik parametrik dipilih untuk pengujian hipotesis, sedangkan metode non-parametrik digunakan jika data tidak terdistribusi normal. Normalitas data dilihat dari nilai probabilitas, jika  $p > 0,05$  maka data dikatakan terdistribusi normal, sebaliknya jika  $p < 0,05$  maka data tidak terdistribusi normal. Hasil uji normalitas  $IC_{50}$  rutin dan fraksi keduanya terdistribusi normal dengan nilai  $p$  berturut-turut 0,1857 dan 0,07793, sehingga pengujian hipotesis dilakukan dengan metode parametrik.

Uji variansi data bertujuan untuk mengetahui homogenitas dari dua kelompok data yang diperoleh. Ukuran homogenitas data dilihat dari nilai  $p$  yang diperoleh, yaitu jika  $p > 0,05$  maka variansi data homogen dan sebaliknya jika  $p < 0,05$ . Hasil uji statistik yang diperoleh  $p = 0,05097$ , sehingga dapat disimpulkan bahwa data penelitian bersifat homogen.

Uji t-tidak berpasangan merupakan metode parametrik yang dipilih untuk menguji hipotesis penelitian yang dirumuskan sebagai  $H_0$  : fraksi etil asetat ekstrak etanol buah Buni tidak memiliki aktivitas antioksidan dan  $H_1$  : fraksi etil asetat ekstrak etanol buah Buni memiliki aktivitas antioksidan.  $H_0$  diterima jika nilai  $p > 0,05$  sedangkan  $H_0$  ditolak jika  $p < 0,05$ . Uji t-tidak berpasangan dipilih karena data yang akan diolah, yaitu  $IC_{50}$  kontrol negatif dan  $IC_{50}$  fraksi etil asetat

sifatnya independen atau tidak saling berhubungan. Pengujian hipotesis dilakukan pada taraf kepercayaan 95% dengan hasil  $p = 3,012 \times 10^{-6}$  sehingga  $H_0$  ditolak, dengan demikian dapat disimpulkan bahwa fraksi etil asetat ekstrak etanol buah Buni memiliki aktivitas antioksidan. Menurut Blois *cit.*, Fidrianny, Darmawati, Sukrasno (2014), suatu senyawa digolongkan sebagai antioksidan kuat jika memiliki  $IC_{50}$  pada rentang 50 – 100  $\mu\text{g/mL}$  dan antioksidan lemah apabila  $IC_{50}$  lebih dari 150  $\mu\text{g/mL}$ , sehingga berdasarkan penggolongan ini rutin merupakan antioksidan kuat sedangkan fraksi etil asetat ekstrak etanol buah Buni digolongkan sebagai antioksidan lemah.



## BAB V

### KESIMPULAN DAN SARAN

#### A. Kesimpulan

1. Nilai aktivitas antioksidan fraksi etil asetat ekstrak etanol buah Buni dengan menggunakan metode DPPH yang dinyatakan sebagai  $IC_{50}$  sebesar  $355,5011 \pm 16,4092 \mu\text{g/mL}$ .
2. Nilai kandungan fenolik total fraksi etil asetat ekstrak etanol buah Buni yang dinyatakan dengan massa ekuivalen asam galat sebesar  $11,1462 \pm 0,1595 \text{ mg ekuivalen asam galat per g ekstrak}$ .

#### B. Saran

1. Untuk penelitian selanjutnya perlu dilakukan uji aktivitas antioksidan dan penetapan kandungan fenolik total terhadap fraksi air ekstrak etanol buah Buni.
2. Perlu dilakukan optimasi metode fraksinasi sehingga dapat dihasilkan rendemen yang lebih besar.
3. Dibutuhkan proses isolasi untuk mengetahui senyawa yang memiliki aktivitas antioksidan dalam fraksi etil asetat ekstrak etanol buah Buni.

## DAFTAR PUSTAKA

- Agustiningsih, Wildan, A., Mindaningsih, 2010, Optimasi Cairan Penyari pada Pembuatan Ekstrak Daun Pandan Wangi (*Pandanus amaryllifous* Roxb) secara Maserasi terhadap Kadar Fenolik dan Flavonoid Total, *Momentum*, 6(2), 36-41.
- Amelia, F., Afnani, G.A., Musfiroh, A., Fikriyani, A.N., Ucche, S., Mimiiek, M., 2013, Extraction and Stability Test of Anthocyanin from Buni Fruits (*Antidesma bunius* L) as an Alternative Natural and Safe Food Colorants, *J.Food Pharm.Sci.*, 49-53.
- Andersen, M.O., Markham, K.R., 2006, *Flavonoids : Chemistry, Biochemistry, and applications*, Taylor & Francis Group, USA, pp. 2-3.
- Antolovich, M., Prenzler, P.D., Patsalides, E., McDonald, S., Robards, K., 2002, Methods for Testing Antioxidant Activity, *Analyst*, 127, 183-198.
- Apsari, P.D., Susanti, H., 2011, Perbandingan Kadar Fenolik Total Ekstrak Metanol Kelopak Merah dan Ungu Bunga Rosella (*Hibiscus sabdariffa* Linn) secara Spektrofotometri, *Prosiding Seminar Nasional Home Care*, Fakultas Farmasi dan Kesehatan Masyarakat UAD, Yogyakarta.
- Association of Official Analytical Chemists, 1998, *Peer-Verified Methods Program, Manual on Policies and Procedures*, USA.
- Badan POM RI, 2010, *Acuan Sediaan Herbal*, Volume Kelima, Edisi Pertama, pp. 6-7.
- Basset, J., Denney, R.C., Jeffery, G.H., Mendham, J., 1991, *Vogel's Textbook of Quantitative Inorganic Analysis Including Elementary Instrumental Analysis*, Longman Group UK Limited, London, pp. 229.
- Bastos, D.H.M., Saldanha, L.A., Catharino, R.R., Sawaya, A.S., Cunha I.B., Carvalho, P.O., 2007, Phenolic Antioxidants Identified bt ESI-MS from Yerba Mate (*Ilex paraguariensis*) and Green Tea (*Camelia sinensis*) Extracts, *Molecules*, 12(3), 423-432.
- Bell, S., 2001, *Measurement Good Practice Guide : A Beginner's Guide to Uncertainty of Measurement*, National Physical Laboratory, UK, pp. 9-10.

- Belmi, R.M., Giron, J., Tansengco, M.L., 2014, *Antidesma bunius* (Bignay) Fruit Extract as an Organic Pesticide Against *Epilachna* spp, *Journal of Asian Scientific Research*, 4(7), 320-327.
- Birben, E., Sahiner, U.M., Sackesen, C., Erzurum, S., Kalayci, O., 2012, Oxidative Stress and Antioxiant Defense, *World Allergy Organization Journal*, pp. 9 – 10, 14.
- Blainski, A., Lopes, G.C., de Mello, J.C.P., 2013, Application and Analysis of the Folin-Ciocalteu for the Determination of the Total Phenolic Content from *Limonium brasiliense* L., *Molecules*, 18, 6852-6865.
- Bruneton, J., 1999, *Pharmacognosy : Phytochemistry Medicinal Plants*, 2nd edition, Lavoisier, Perancis, pp. 242.
- Butkhup, L., Samappito, S., 2008, Analysis on Flavonoids Contents in Mao Luang Fruits of Fifteen Cultivars (*Antidesma bunius*) Grown in Northeast Thailand, *Pakistan Journal of Biological Science*, 11(7), 996-1002.
- Butkhup, L., Samappito, S., 2011, Changes in Physiochemical Properties, Polyphenol Compounds and Antiradical Activity during Development and Ripening of Maoluang (*Antidesma bunius* L. Spreng) Fruits, *Journal Fruit Ornamental Plant Research*, 19(1), 85-89.
- Cartea, M.E., Francisco, M., Soengas, P., Velasco, P., 2011, Phenolic Compounds in Brassica Vegetables, *Molecules*, 16, 251-280.
- Cooper-Driver, G.A., Balick, M.J., 1978, Effects of Field Preservation on The Flavonoid Content of *Jessenia Bataua*, *Botanical Museum Leaflets Harvard University*, 26(8), 257-265.
- Dave, A., 2010, *Rotary Evaporation in the Kitchen*, <http://www.cookingissues.com/primers/rotovap>, diakses tanggal 18 Desember 2015.
- Day, R.A., Underwood, A.L., 2002, *Analisis Kimia Kuantitatif*, edisi ke-6, Penerbit Erlangga, Jakarta, pp. 394.
- Depkes RI, 1995, *Farmakope Indonesia*, edisi IV, Departemen Kesehatan Republik Indonesia, pp.1066.

- Dewick, P.M., 2002, *Medicinal Natural Products : A Biosynthetic Approach*, 2<sup>nd</sup> Edition, John Wiley & Sons, UK, pp. 121-122, 151.
- Direktorat Jenderal Pengawasan Obat dan Makanan RI, 2000, *Parameter Standar Umum Ekstrak Tumbuhan Obat*, Departemen Kesehatan Republik Indonesia, Jakarta, pp. 10-11.
- Emilan, T., Kurnia, A., Utami, B., Diyani, L.N., Maulana, A., 2011, *Konsep Herbal Indonesia : Pemastian Mutu Produk Herbal*, UI, pp. 10-12.
- Evans, W.C., 2002, *Trease and Evans: Pharmacognosy*, 15th edition, W.B Saunders, London, pp. 247.
- Everette, J.D., Bryant, Q.M., Green, A.M., Abbey, Y.A., Wangila, G.W., Walker, R.B., 2010, Thorough Study of Reactivity of Various Compound Classes toward the Folin-Ciocalteu Reagent, *J. Agric. Food Chem*, 58, 8139-8144.
- Ferreira, O., Pinho, S.P., 2012, Solubility of Flavonoids in Pure Solvents, *Industrial Engineering Chemical Research*, 51, 6568-6590.
- Fidrianny, I., Darmawati, A., Sukrasno, 2014, Antioxidant Capacities from Different Polarities Extracts of Cucurbitaceae Leaves Using FRAP, DPPH, Assay and Corelation with Phenolic, Flavonoid, Carotenoid Content, *Int. J. Pharm. Sci.*, Vol. 6, 858-862.
- Gandjar, I.G., Rohman, A., 2007, *Kimia Farmasi Analisis*, Pustaka Pelajar, Yogyakarta, pp. 240-242, 362, 466.
- Gharavi, N., Haggarty, S., El-Kadi, A.O.S., 2007, Chemoprotective and Carcinogenic Effects of ter-Butylhydroquinone and Its Metabolites, *Current Drug Metabolism*, 8, 1-7.
- Hajnos, M., Sherma, J., Kowalska, T., 2008, *Thin Layer Chromatography in Phytochemistry*, Taylor & Francis Group, USA, pp. 406-410.
- Harmita, 2004, Petunjuk Pelaksanaan Validasi Metode dan Cara Perhitungannya, *Majalah Ilmu Kefarmasian*, 1(3), 117-135.
- Hoelz, L.V.B., Horta, B.A.C., Araujo, J.Q., Albuquerque, M.G., Alencastro, R.B., Silva, J.F.M., 2010, Quantitative StructureActivity Relationships of Antioxidant Phenolic Compounds, *J. Chem. Pharm. Res.*, 2 (5), 291-306.

- Huang, D., Ou, B., Prior, R.L., 2005, The Chemistry Behind Antioxidant Capacity Assays, *J. Agric. Food. Chem.*, 53, 1841-1856.
- Janeiro, P., Brett, A.M.O., 2004, Catechin Electrochemical Oxidation Mechanisms, *Analytica Chimica Acta*, 518, 109-115.
- Jorjong, S., Butkhup, L., Samappito, S., 2015, Phytochemicals and Antioxidant Capacities of Mao-Luang (*Antidesma bunius* L.) Cultivars from Northeastern Thailand, *Food Chemistry*, 181, 248-255.
- Lade, B.D., Patil, A.S., Paikrao, H.M., Kale, A.S., Hire, K., 2014, A Comprehensive Working, Principles and Applications of Thin Layer Chromatography, *Research Journal of Pharmaceutical, Biological and Chemical Sciences*, 5(4), 486-491.
- Leong, L.P., Shui, G., 2001, An Investigation of Antioxidant Capacity of Fruits in Singapore Markets, *Food Chemistry*, 76, 69-75.
- Lim, T.K., 2012, *Edible Medicinal and Non Medicinal Plants*, Volume 4, Springer, New York, pp. 223.
- Lizardo, R.C.M., Mabesa, L.B., Dizon, E.I., Aquino, N.A., 2015, Functional and Antimicrobial Properties of Bignay [*Antidesma bunius* L. (Spreng)] Extract and Its Potential as Natural Preservative in a Baked Product, *International Food Research Journal*, 22(1), 88-95.
- Locatelli, M., Gindro, R., Travaglia, F., Coisson, J.D., Rinaldi, M., Arlorio, M., 2009, Study of The DPPH-Scavenging Activity : Development of a Free Software for The Correct Interpretation of Data, *Journal of Food Chemistry*, 114(9), 889-890.
- Lopez, M., Martinez, F., Del-Valle, C., Ferrit, M., Luque, R., 2003, Study of Phenolic Compounds as Natural Antioxidants by a Fluorescence Method, *Talanta*, 60, 609-616.
- Markham, K.R., 1988, *Techniques of Flavonoid Identification*, diterjemahkan oleh Padmawinata, K., hal. 15, Penerbit ITB, Bandung.
- Masluhah, Y.L., Widyaningsih, T.D., Elok, W., Wijayanti, N., Sriherfyna, F.H., 2016, Faktor Pengaruh Ekstraksi Cincau Hitam (*Mesona palustris* B.L) Skala Pilot Plant : Kajian Pustaka, *Jurnal Pangan dan Agroindustri*, 4(1), 245-252.

- Nollet, L.M.L., 2000, *Food Analysis by HPLC*, Marcel Dekker Inc., USA, pp. 787.
- Nunes, X.P., *et al.*, 2012, Biological Oxidation and Antioxidant Activity of Natural Products, *University Federal Sao Fransisco*, Brazil, pp.1-20
- Peng, Y., Zheng, Z., Sun, P., Wang, X., Zhang, T., 2013, Synthesis and Characterization of Polyphenol-Based Polyurethane, *NewJ. Chem*, 37, 729-734.
- Pisoschi, A.M., Cheregi, M.C., Danet, A.F., 2009, Total Antioxidant Capacity of Some Commercial Fruit Juices: Electrochemical and Spectrophotometrical Approaches, *Molecules*, 14, 480-493.
- Prior, R.L., Wu, X., Schaich, K., 2005, Standardized Methods for The Determination of Antioxidant Capacity and Phenolics in Foods and Dietary Supplements, *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 53, 4290-4302.
- Redha, A., 2010, Flavonoid : Struktur, Sifat Antioksidatif dan Peranannya dalam Sistem Biologis, *Jurnal Belian*, 9 (2), 196-202.
- Rohmatussolihat, 2009, Antioksidan Penyelamat Sel-Sel Tubuh Manusia, *BioTrends*, 4(1), 5-7, pp. 6-7.
- Sambadha, D.L.E., 2011, Uji Aktivitas Antioksidan menggunakan Radikal 1,1-Difenil-2-Pikrilhidrazil (DPPH) dan Penetapan Kandungan Fenolik Total Fraksi Air Ekstrak Daun Selasih (*Ocimum sanctum* L.), *Skripsi*, 79, Universitas Sanata Dharma, Yogyakarta.
- Sing, Y.Y., 2007, *Determination of Synthetic Phenolic Antioxidants in Food Items Using HPLC and Total Antioxidants Using Fia Approaches*, Thesis, 3-11, Universiti Sains Malaysia, Penang.
- Sintayehu, B., Asres, K., Raghavendra, Y., 2012. Radical Scavenging Activities of the Leaf extracts and a Flavonoid Glycoside Isolated from *Cineraria abyssinica* Sch. Bip. Exa. Rich, *Journal of Applied Science*, (2) 4,44-49.



- Taroreh, M., Raharjo, S., Hastuti, P., Murdiati, A., 2015, Ekstraksi Daun Gedi (*Abelmoschus manihot* L) Secara Sekuensial dan Aktivitas Antioksidannya, *Agritech*, 35(3), 280-286.
- United States Departement of Agriculture, 2013, *Antidesma bunius* (L.) Spreng, <http://plants.usda.gov/core/profile?symbol=ANBU3>, diakses pada 28 Januari 2015.
- van Steenis, C.G.G.J., 1992, *Flora untuk Sekolah di Indonesia*, diterjemahkan oleh Surjowinoto M., PT. Pradnya Paramita, Jakarta, pp. 35-259.
- Voight, R., 1994, *Buku Pelajaran Teknologi Farmasi*, Edisi V, Universitas Gadjah Mada Press, Yogyakarta.
- Watson, R.R., 2014, *Polyphenols in Plants : Isolation, Purification and Extract Preparation*, Elsevier Inc., USA, pp. 263.
- Widowati, W., Safitri, R., Rumumpuk, R., Siahaan, M., 2005, Penapisan Aktivitas Superoksida Dismutase pada Berbagai Tanaman, *Jurnal Kesehatan Masyarakat*, 5(1), 33-35.
- World Health Organization, 2003, *WHO Guidelines on Good Agricultural and Collection Practices (GACP) for Medicinal Plants*, WHO, Geneva, pp. 15.
- Yordi, E.G., Perez, E.M., Matos, M.J., Villares, E.U., 2012, *Nutrition, Well-Being and Health*, Intech, Shanghai, pp. 23-25.

## LAMPIRAN

## Lampiran 1. Surat determinasi buah buni

 **FAKULTAS FARMASI**  
**UNIVERSITAS SANATA DHARMA**  
(Kampus III): Paingan, Maguwoharjo, Depok, Sleman, Yogyakarta 55284  
telp. (0274) 883037, 883968 Fax. (0274) 886529-Telegram | SADHAR YOGYA  
E-mail: Farmasi@staff.usd.ac.id

---

SURAT PENGESAHAN DETERMINASI

No. : 593 /LKTO/far-USD/ 04 / 16

Telah dilakukan determinasi tanaman dengan hasil:

Spesies : [*Antidesma bunius* (L.) Spreng]  
(Buni)

Determinasi telah dilakukan secara benar sesuai dengan:

Sesuai Literatur Steenis C.G.G.J.V., 1992, *Flora: Untuk Sekolah di Indonesia*,  
Cetakan keenam, P.T. Pradnya Paramita, Jakarta, pp.35-259.

Tanaman tersebut akan digunakan dalam penelitian:

Uji Aktivitas Antioksidan dan Penetapan Kadar Fenolik Total Fraksi Etil Asetat Buah Buni  
[*Antidesma bunius* (L.) Spreng] dengan Metode 1,1-Difenil-2-Pikrilhidrazil (DPPH) dan  
Metode Folin-Ciocalteu

Oleh:

Astrid Pangesty  
128114114

Demikian surat pengesahan determinasi ini dibuat untuk dapat dipergunakan sebagaimana mestinya.

Yogyakarta, 21 Januari 2016

Mengetahui,  
Kepala Laboratorium

Determinator,

  
Agustina Setiawati, M. Sc., Apt.

  
Yohanes Dwiatmaka, M. Si.

**Lampiran 2. Gambar tanaman buah buni**



**Lampiran 3. Gambar buah buni****Lampiran 4. Rendemen fraksi etil asetat buah buni**

Ekstrak buah buni yang digunakan = 60 g

	Cawan 1 (g)	Cawan 2 (g)
Bobot cawan	46,7852	49,9940
Bobot cawan + fraksi	47,8926	51,07292
Bobot fraksi	1,1074	1,0789
Total bobot fraksi	2,1863	

Bobot fraksi etil asetat = 2,1863 g

$$\text{Rendemen fraksi etil asetat} = \frac{\text{bobot fraksi yang dihasilkan}}{\text{bobot ekstrak yang digunakan}} \times 100\%$$

$$= \frac{2,1863 \text{ g}}{60 \text{ g}} \times 100\%$$

$$= 3,6438 \%$$

**Lampiran 5. Hasil uji KLT fenolik dengan penyemprotan pereaksi  $\text{FeCl}_3$** 

Keterangan gambar :

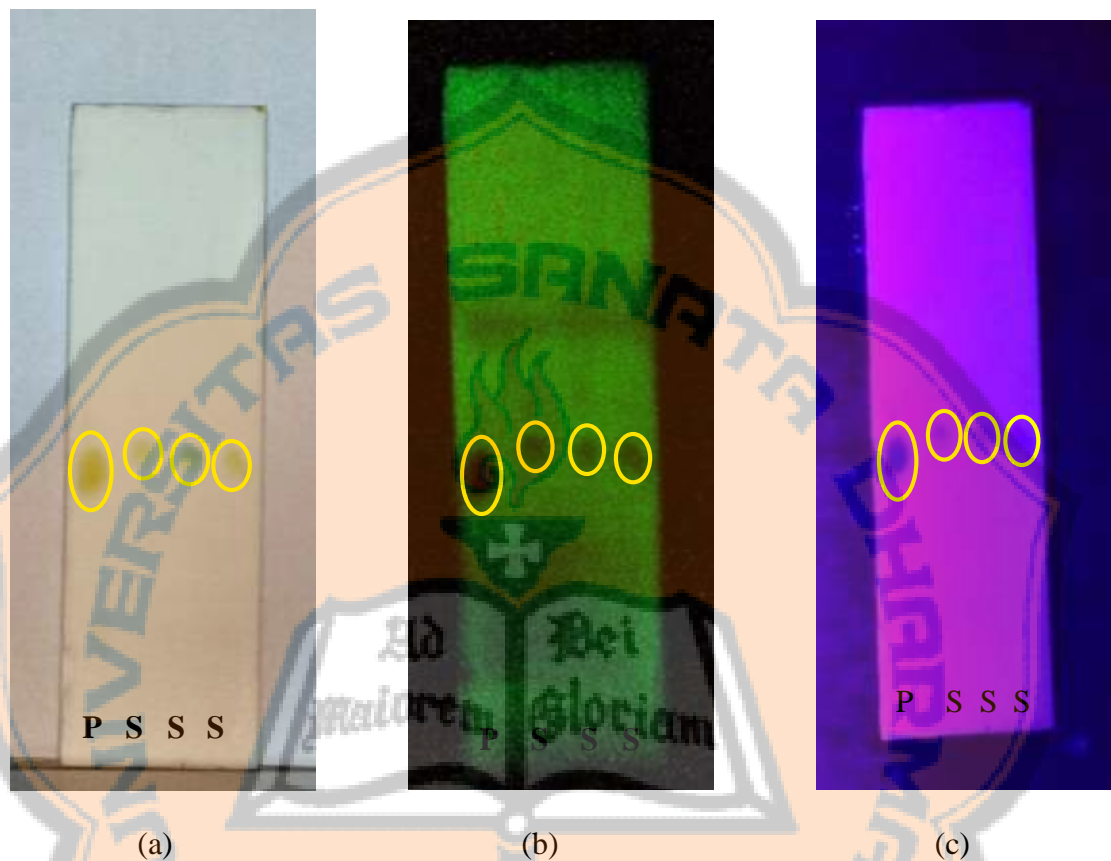
(a) : plat KLT setelah penyemprotan  $\text{FeCl}_3$  tanpa sinar UV

(b) : plat KLT setelah penyemprotan  $\text{FeCl}_3$  tampak pada UV 254 nm

P : Senyawa pembanding (tanin)

S : Fraksi etil asetat

**Lampiran 6. Hasil uji KLT flavonoid dengan penyemprotan pereaksi  $AlCl_3$**



Keterangan gambar :

- (a) : plat KLT setelah penyemprotan  $AlCl_3$  tanpa sinar UV
- (b) : plat KLT setelah penyemprotan  $AlCl_3$  tampak pada UV 254 nm
- (c) : plat KLT setelah penyemprotan  $AlCl_3$  tampak pada UV 366 nm

P : Senyawa pembanding (rutin)

S : Fraksi etil asetat

**Lampiran 7. Data penimbangan untuk penetapan kandungan fenolik total**

## 1. Penimbangan asam galat

	Replikasi 1 (g)	Replikasi 2 (g)	Replikasi 3 (g)
Bobot kertas	0,2408	0,2440	0,2466
Bobot kertas + serbuk	2,3627	2,3657	2,3681
Bobot kertas + sisa	2,2408	2,2441	2,2466
Bobot serbuk	2,1219	2,1216	2,1215

## 2. Penimbangan natrium karbonat

	Replikasi 1 (g)	Replikasi 2 (g)	Replikasi 3 (g)
Bobot kertas	0,2403	0,2435	0,2478
Bobot kertas + serbuk	0,2653	0,2684	0,2728
Bobot kertas + sisa	0,2403	0,2435	0,2478
Bobot serbuk	0,0250	0,0249	0,0250

## 3. Penimbangan sampel fraksi etil asetat

	Replikasi 1 (g)	Replikasi 2 (g)	Replikasi 3 (g)
Bobot kertas	32,8024	32,8024	32,8024
Bobot kertas + fraksi	32,8030	32,8030	32,8030
Bobot kertas + sisa	32,8024	32,8024	32,8024
Bobot fraksi	0,0060	0,0061	0,0060

### Lampiran 8. Optimasi penetapan kandungan fenolik total

#### 1. Penentuan *Operating Time* ( $\lambda = 760$ nm)

Waktu (menit)	Absorbansi larutan asam galat		
	50 $\mu\text{g/mL}$	100 $\mu\text{g/mL}$	150 $\mu\text{g/mL}$
5	0,265	0,423	0,684
10	0,280	0,448	0,713
15	0,287	0,454	0,733
20	0,285	0,461	0,741
25	0,288	0,466	0,748
30	0,288	0,470	0,753
35	0,288	0,472	0,756
40	0,289	0,473	0,759
45	0,289	0,473	0,761
50	0,289	0,473	0,762
55	0,289	0,473	0,763
60	0,287	0,472	0,763

**OT yang digunakan = 30 menit**

#### 2. Penentuan panjang gelombang maksimum

Konsentrasi ( $\mu\text{g/mL}$ )	$\lambda$ maksimum hasil pengukuran	$\lambda$ maksimum yang digunakan	$\lambda$ maksimum teoritis
50	750 nm	745 nm	760 nm
100	746 nm		
150	740 nm		



**Lampiran 9. Penetapan kandungan fenolik total**

## 1. Konsentrasi asam galat

**Replikasi 1**

$$\text{Konsentrasi stok} = \frac{0,0250 \text{ g}}{50 \text{ mL}} = 500 \mu\text{g/mL}$$

Pengenceran seri larutan :

Seri 1

$$\begin{aligned} C_1 \cdot V_1 &= C_2 \cdot V_2 \\ 500 \mu\text{g/mL} \cdot 1 \text{ mL} &= C_2 \times 10 \text{ mL} \\ C_2 &= 50 \mu\text{g/mL} \end{aligned}$$

Seri 2

$$\begin{aligned} C_1 \cdot V_1 &= C_2 \cdot V_2 \\ 500 \mu\text{g/mL} \cdot 1,5 \text{ mL} &= C_2 \cdot 10 \text{ mL} \\ C_2 &= 75 \mu\text{g/mL} \end{aligned}$$

Seri 3

$$\begin{aligned} C_1 \times V_1 &= C_2 \times V_2 \\ 500 \mu\text{g/mL} \times 2 \text{ mL} &= C_2 \times 10 \text{ mL} \\ C_2 &= 100 \mu\text{g/mL} \end{aligned}$$

Seri 4

$$\begin{aligned} C_1 \cdot V_1 &= C_2 \cdot V_2 \\ 500 \mu\text{g/mL} \cdot 2,5 \text{ mL} &= C_2 \times 10 \text{ mL} \\ C_2 &= 125 \mu\text{g/mL} \end{aligned}$$

Seri 5

$$\begin{aligned} C_1 \cdot V_1 &= C_2 \cdot V_2 \\ 500 \mu\text{g/mL} \cdot 3 \text{ mL} &= C_2 \times 10 \text{ mL} \\ C_2 &= 150 \mu\text{g/mL} \end{aligned}$$

**Replikasi 2**

$$\text{Konsentrasi stok} = \frac{0,0249 \text{ g}}{50 \text{ mL}} = 498 \mu\text{g/mL}$$

Pengenceran seri larutan :

Seri 1

$$\begin{aligned} C_1 \cdot V_1 &= C_2 \cdot V_2 \\ 498 \mu\text{g/mL} \cdot 1 \text{ mL} &= C_2 \times 10 \text{ mL} \\ C_2 &= 49,8 \mu\text{g/mL} \end{aligned}$$

Seri 2

$$\begin{aligned} C_1 \cdot V_1 &= C_2 \cdot V_2 \\ 498 \mu\text{g/mL} \cdot 1,5 \text{ mL} &= C_2 \cdot 10 \text{ mL} \end{aligned}$$

Seri 4

$$\begin{aligned} C_1 \cdot V_1 &= C_2 \cdot V_2 \\ 498 \mu\text{g/mL} \cdot 2,5 \text{ mL} &= C_2 \times 10 \text{ mL} \\ C_2 &= 124,5 \mu\text{g/mL} \end{aligned}$$

Seri 5

$$\begin{aligned} C_1 \cdot V_1 &= C_2 \cdot V_2 \\ 498 \mu\text{g/mL} \cdot 3 \text{ mL} &= C_2 \times 10 \text{ mL} \end{aligned}$$

$$C_2 = 74,7 \mu\text{g/mL} \qquad C_2 = 149,4 \mu\text{g/mL}$$

Seri 3

$$\begin{aligned} C_1 \times V_1 &= C_2 \times V_2 \\ 498 \mu\text{g/mL} \times 2 \text{ mL} &= C_2 \times 10 \text{ mL} \\ C_2 &= 99,6 \mu\text{g/mL} \end{aligned}$$

### Replikasi 3

$$\text{Konsentrasi stok} = \frac{0,0250 \text{ g}}{50 \text{ mL}} = 500 \mu\text{g/mL}$$

Pengenceran seri larutan :

Seri 1

$$\begin{aligned} C_1 \cdot V_1 &= C_2 \cdot V_2 \\ 500 \mu\text{g/mL} \cdot 1 \text{ mL} &= C_2 \times 10 \text{ mL} \\ C_2 &= 50 \mu\text{g/mL} \end{aligned}$$

Seri 4

$$\begin{aligned} C_1 \cdot V_1 &= C_2 \cdot V_2 \\ 500 \mu\text{g/mL} \cdot 2,5 \text{ mL} &= C_2 \times 10 \text{ mL} \\ C_2 &= 125 \mu\text{g/mL} \end{aligned}$$

Seri 2

$$\begin{aligned} C_1 \cdot V_1 &= C_2 \cdot V_2 \\ 500 \mu\text{g/mL} \cdot 1,5 \text{ mL} &= C_2 \cdot 10 \text{ mL} \\ C_2 &= 75 \mu\text{g/mL} \end{aligned}$$

Seri 5

$$\begin{aligned} C_1 \cdot V_1 &= C_2 \cdot V_2 \\ 500 \mu\text{g/mL} \cdot 3 \text{ mL} &= C_2 \times 10 \text{ mL} \\ C_2 &= 150 \mu\text{g/mL} \end{aligned}$$

Seri 3

$$\begin{aligned} C_1 \times V_1 &= C_2 \times V_2 \\ 500 \mu\text{g/mL} \times 2 \text{ mL} &= C_2 \times 10 \text{ mL} \\ C_2 &= 100 \mu\text{g/mL} \end{aligned}$$

## 2. Kurva baku asam galat

Replikasi	Konsentrasi asam galat ( $\mu\text{g/mL}$ )	Absorbansi	Persamaan regresi linier
1	50	0,268	$y = 0,0050x + 0,0002$ $r = 0,9961$
	75	0,344	
	100	0,498	
	125	0,622	
	150	0,749	
2	50	0,239	$y = 0,0047x + 0,0040$ $r = 0,9989$
	75	0,369	
	100	0,475	
	125	0,585	
	150	0,724	
3	50	0,232	$y = 0,0048x - 0,0032$ $r = 0,9995$
	75	0,360	
	100	0,482	
	125	0,587	
	150	0,717	

Persamaan regresi yang digunakan :  $y = 0,0048x - 0,0032$

## 3. Absorbansi fraksi etil asetat buah buni

Replikasi	Absorbansi pada $\lambda = 745 \text{ nm}$
1	0,646
2	0,639
3	0,642

## 4. Perhitungan kandungan fenolik total fraksi etil asetat

**Replikasi 1**

Bobot sampel = 0,0060 g

$$\text{Konsentrasi larutan uji} = \frac{0,0060 \text{ g}}{10 \text{ mL}} = 600 \mu\text{g/mL}$$

$$\text{Kandungan fenolik : } y = 0,0050x - 0,0032$$

$$0,646 = 0,0048x - 0,0032$$

$$x = 135,2500 \mu\text{g/mL} = 0,13525 \text{ mg/mL}$$

$$\begin{aligned} \text{Kandungan fenolik total} &= x \cdot \frac{v}{m} = 0,13525 \text{ mg/mL} \cdot \frac{0,5 \text{ mL}}{0,0060 \text{ g}} \\ &= 11,2708 \text{ mg ekuivalen asam galat per gram fraksi} \end{aligned}$$

### Replikasi 2

$$\text{Bobot sampel} = 0,0061 \text{ g}$$

$$\text{Konsentrasi larutan uji} = \frac{0,0061 \text{ g}}{10 \text{ mL}} = 610 \mu\text{g/mL}$$

$$\text{Kandungan fenolik : } y = 0,0048x - 0,0032$$

$$0,639 = 0,0048x - 0,0032$$

$$x = 133,7917 \mu\text{g/mL} = 0,1337917 \text{ mg/mL}$$

$$\begin{aligned} \text{Kandungan fenolik total} &= x \cdot \frac{v}{m} = 0,1337917 \text{ mg/mL} \cdot \frac{0,5 \text{ mL}}{0,0061 \text{ g}} \\ &= 10,9665 \text{ mg ekuivalen asam galat per gram fraksi} \end{aligned}$$

### Replikasi 3 :

$$\text{Bobot sampel} = 0,0060 \text{ g}$$

$$\text{Konsentrasi larutan uji} = \frac{0,0060 \text{ g}}{10 \text{ mL}} = 600 \mu\text{g/mL}$$

Kandungan fenolik :  $y = 0,0048x - 0,0032$

$$0,642 = 0,0048x - 0,0032$$

$$x = 134,4167 \mu\text{g/mL} = 0,1344167 \text{ mg/mL}$$

$$\text{Kandungan fenolik total} = x \cdot \frac{v}{m} = 0,1344167 \text{ mg/mL} \cdot \frac{0,5 \text{ mL}}{0,0060 \text{ g}}$$

$$= 11,2014 \text{ mg ekuivalen asam galat per gram fraksi}$$

5. Hasil penetapan kandungan fenolik total fraksi etil asetat

Replikasi	Kandungan fenolik ( $\mu\text{g/mL}$ )	Kandungan fenolik total (mg)	$x \pm \text{SD}$	CV
1	135,2500	11,2708	11,1462 $\pm$ 0,1595	1,4908%
2	133,7917	10,9665		
3	134,4167	11,2014		

**Lampiran 10. Data penimbangan untuk uji aktivitas antioksidan**

## 1. Penimbangan DPPH

	Replikasi 1 (g)	Replikasi 2 (g)	Replikasi 3 (g)
Bobot kertas	0,2412	0,2435	0,2480
Bobot kertas + serbuk	0,2462	0,2485	0,2530
Bobot kertas + sisa	0,2412	0,2435	0,2480
Bobot serbuk	0,0050	0,0050	0,0050

## 2. Penimbangan rutin

	Replikasi 1 (g)	Replikasi 2 (g)	Replikasi 3 (g)
Bobot kertas	0,2516	0,2362	0,2421
Bobot kertas + serbuk	0,2566	0,2412	0,2471
Bobot kertas + sisa	0,2517	0,2362	0,2421
Bobot serbuk	0,0049	0,0050	0,0050

## 3. Penimbangan fraksi etil asetat

	Replikasi 1 (g)	Replikasi 2 (g)	Replikasi 3 (g)
Bobot cawan	24, 5326	21, 7651	24, 3431
Bobot cawan + fraksi	24, 5576	21, 7901	24, 3681
Bobot cawan + sisa	24, 5326	21, 7651	24, 3431
Bobot fraksi	0,0250	0,0250	0,0250

**Lampiran 11. Data pengenceran larutan uji aktivitas antioksidan**

## 1. Contoh perhitungan pengenceran DPPH

$$\text{Konsentrasi larutan stok} = \frac{0,0050 \text{ g}}{50 \text{ mL}} = 100 \mu\text{g/mL}$$

Pengenceran larutan DPPH :

$$\begin{aligned} C_1 \times V_1 &= C_2 \times V_2 \\ 100 \mu\text{g/mL} \times 5 \text{ mL} &= C_2 \times 25 \text{ mL} \\ C_2 &= 20 \mu\text{g/mL} \end{aligned}$$

## 2. Pengenceran rutin

**Replikasi 1**

$$\text{Konsentrasi larutan stok} = \frac{0,0049 \text{ g}}{50 \text{ mL}} = 98,0 \mu\text{g/mL}$$

Pengenceran seri larutan rutin :

Seri 1		Seri 4	
$C_1 \cdot V_1$	$= C_2 \cdot V_2$	$C_1 \cdot V_1$	$= C_2 \cdot V_2$
$98 \mu\text{g/mL} \cdot 3 \text{ mL}$	$= C_2 \cdot 10 \text{ mL}$	$98 \mu\text{g/mL} \cdot 6 \text{ mL}$	$= C_2 \cdot 10 \text{ mL}$
$C_2$	$= 29,4 \mu\text{g/mL}$	$C_2$	$= 58,8 \mu\text{g/mL}$

Seri 2		Seri 5	
$C_1 \cdot V_1$	$= C_2 \cdot V_2$	$C_1 \cdot V_1$	$= C_2 \cdot V_2$
$98 \mu\text{g/mL} \cdot 4 \text{ mL}$	$= C_2 \cdot 10 \text{ mL}$	$98 \mu\text{g/mL} \times 7 \text{ mL}$	$= C_2 \cdot 10 \text{ mL}$
$C_2$	$= 39,2 \mu\text{g/mL}$	$C_2$	$= 68,6 \mu\text{g/mL}$

Seri 3	
$C_1 \cdot V_1$	$= C_2 \cdot V_2$
$98 \mu\text{g/mL} \cdot 5 \text{ mL}$	$= C_2 \cdot 10 \text{ mL}$
$C_2$	$= 49 \mu\text{g/mL}$

**Replikasi 2**

$$\text{Konsentrasi larutan stok} = \frac{0,0050 \text{ g}}{50 \text{ mL}} = 100 \mu\text{g/mL}$$

Pengenceran seri larutan rutin :

Seri 1		Seri 4	
$C_1 \cdot V_1$	$= C_2 \cdot V_2$	$C_1 \cdot V_1$	$= C_2 \cdot V_2$

$$100 \mu\text{g/mL} \cdot 3 \text{ mL} = C_2 \cdot 10 \text{ mL} \quad 100 \mu\text{g/mL} \cdot 6 \text{ mL} = C_2 \cdot 10 \text{ mL}$$

$$C_2 = 30 \mu\text{g/mL} \quad C_2 = 60 \mu\text{g/mL}$$

Seri 2

$$C_1 \cdot V_1 = C_2 \cdot V_2$$

$$100 \mu\text{g/mL} \cdot 4 \text{ mL} = C_2 \cdot 10 \text{ mL}$$

$$C_2 = 40 \mu\text{g/mL}$$

Seri 5

$$C_1 \cdot V_1 = C_2 \cdot V_2$$

$$100 \mu\text{g/mL} \cdot 7 \text{ mL} = C_2 \cdot 10 \text{ mL}$$

$$C_2 = 70 \mu\text{g/mL}$$

Seri 3

$$C_1 \cdot V_1 = C_2 \cdot V_2$$

$$100 \mu\text{g/mL} \cdot 5 \text{ mL} = C_2 \cdot 10 \text{ mL}$$

$$C_2 = 50 \mu\text{g/mL}$$

### Replikasi 3

$$\text{Konsentrasi larutan stok} = \frac{0,0050 \text{ g}}{50 \text{ mL}} = 100 \mu\text{g/mL}$$

Pengenceran seri larutan rutin :

Seri 1

$$C_1 \cdot V_1 = C_2 \cdot V_2$$

$$100 \mu\text{g/mL} \cdot 3 \text{ mL} = C_2 \cdot 10 \text{ mL}$$

$$C_2 = 30 \mu\text{g/mL}$$

Seri 4

$$C_1 \cdot V_1 = C_2 \cdot V_2$$

$$100 \mu\text{g/mL} \cdot 6 \text{ mL} = C_2 \cdot 10 \text{ mL}$$

$$C_2 = 60 \mu\text{g/mL}$$

Seri 2

$$C_1 \cdot V_1 = C_2 \cdot V_2$$

$$100 \mu\text{g/mL} \cdot 4 \text{ mL} = C_2 \cdot 10 \text{ mL}$$

$$C_2 = 40 \mu\text{g/mL}$$

Seri 5

$$C_1 \cdot V_1 = C_2 \cdot V_2$$

$$100 \mu\text{g/mL} \cdot 7 \text{ mL} = C_2 \cdot 10 \text{ mL}$$

$$C_2 = 70 \mu\text{g/mL}$$

Seri 3

$$C_1 \cdot V_1 = C_2 \cdot V_2$$

$$100 \mu\text{g/mL} \cdot 5 \text{ mL} = C_2 \cdot 10 \text{ mL}$$

$$C_2 = 50 \mu\text{g/mL}$$

### 3. Pengenceran sampel

#### Replikasi 1

$$\text{Konsentrasi stok} = \frac{0,0250 \text{ g}}{25 \text{ mL}} = 1000 \mu\text{g/mL}$$



Pengenceran seri larutan sampel :

Seri 1

$$\begin{aligned} C_1 \cdot V_1 &= C_2 \cdot V_2 \\ 1000 \mu\text{g/mL} \cdot 1 \text{ mL} &= C_2 \cdot 10 \text{ mL} \\ C_2 &= 100 \mu\text{g/mL} \end{aligned}$$

Seri 4

$$\begin{aligned} C_1 \cdot V_1 &= C_2 \cdot V_2 \\ 1000 \mu\text{g/mL} \cdot 4 \text{ mL} &= C_2 \cdot 10 \text{ mL} \\ C_2 &= 400 \mu\text{g/mL} \end{aligned}$$

Seri 2

$$\begin{aligned} C_1 \cdot V_1 &= C_2 \cdot V_2 \\ 100 \mu\text{g/mL} \cdot 2 \text{ mL} &= C_2 \cdot 10 \text{ mL} \\ C_2 &= 200 \mu\text{g/mL} \end{aligned}$$

Seri 5

$$\begin{aligned} C_1 \cdot V_1 &= C_2 \cdot V_2 \\ 1000 \mu\text{g/mL} \cdot 5 \text{ mL} &= C_2 \cdot 10 \text{ mL} \\ C_2 &= 500 \mu\text{g/mL} \end{aligned}$$

Seri 3

$$\begin{aligned} C_1 \cdot V_1 &= C_2 \cdot V_2 \\ 100 \mu\text{g/mL} \cdot 3 \text{ mL} &= C_2 \cdot 10 \text{ mL} \\ C_2 &= 300 \mu\text{g/mL} \end{aligned}$$

### Replikasi 2

$$\text{Konsentrasi stok} = \frac{0,0250 \text{ g}}{25 \text{ mL}} = 1000 \mu\text{g/mL}$$

Pengenceran seri larutan sampel :

Seri 1

$$\begin{aligned} C_1 \cdot V_1 &= C_2 \cdot V_2 \\ 1000 \mu\text{g/mL} \cdot 1 \text{ mL} &= C_2 \cdot 10 \text{ mL} \\ C_2 &= 100 \mu\text{g/mL} \end{aligned}$$

Seri 4

$$\begin{aligned} C_1 \cdot V_1 &= C_2 \cdot V_2 \\ 1000 \mu\text{g/mL} \cdot 4 \text{ mL} &= C_2 \cdot 10 \text{ mL} \\ C_2 &= 400 \mu\text{g/mL} \end{aligned}$$

Seri 2

$$\begin{aligned} C_1 \cdot V_1 &= C_2 \cdot V_2 \\ 100 \mu\text{g/mL} \cdot 2 \text{ mL} &= C_2 \cdot 10 \text{ mL} \\ C_2 &= 200 \mu\text{g/mL} \end{aligned}$$

Seri 5

$$\begin{aligned} C_1 \cdot V_1 &= C_2 \cdot V_2 \\ 1000 \mu\text{g/mL} \cdot 5 \text{ mL} &= C_2 \cdot 10 \text{ mL} \\ C_2 &= 500 \mu\text{g/mL} \end{aligned}$$

Seri 3

$$\begin{aligned} C_1 \cdot V_1 &= C_2 \cdot V_2 \\ 100 \mu\text{g/mL} \cdot 3 \text{ mL} &= C_2 \cdot 10 \text{ mL} \\ C_2 &= 300 \mu\text{g/mL} \end{aligned}$$

### Replikasi 3

$$\text{Konsentrasi stok} = \frac{0,0250 \text{ g}}{25 \text{ mL}} = 1000 \mu\text{g/mL}$$

Pengenceran seri larutan sampel :

Seri 1

$$\begin{aligned}C_1 \cdot V_1 &= C_2 \cdot V_2 \\1000 \mu\text{g/mL} \cdot 1 \text{ mL} &= C_2 \cdot 10 \text{ mL} \\C_2 &= 100 \mu\text{g/mL}\end{aligned}$$

Seri 4

$$\begin{aligned}C_1 \cdot V_1 &= C_2 \cdot V_2 \\1000 \mu\text{g/mL} \cdot 4 \text{ mL} &= C_2 \cdot 10 \text{ mL} \\C_2 &= 400 \mu\text{g/mL}\end{aligned}$$

Seri 2

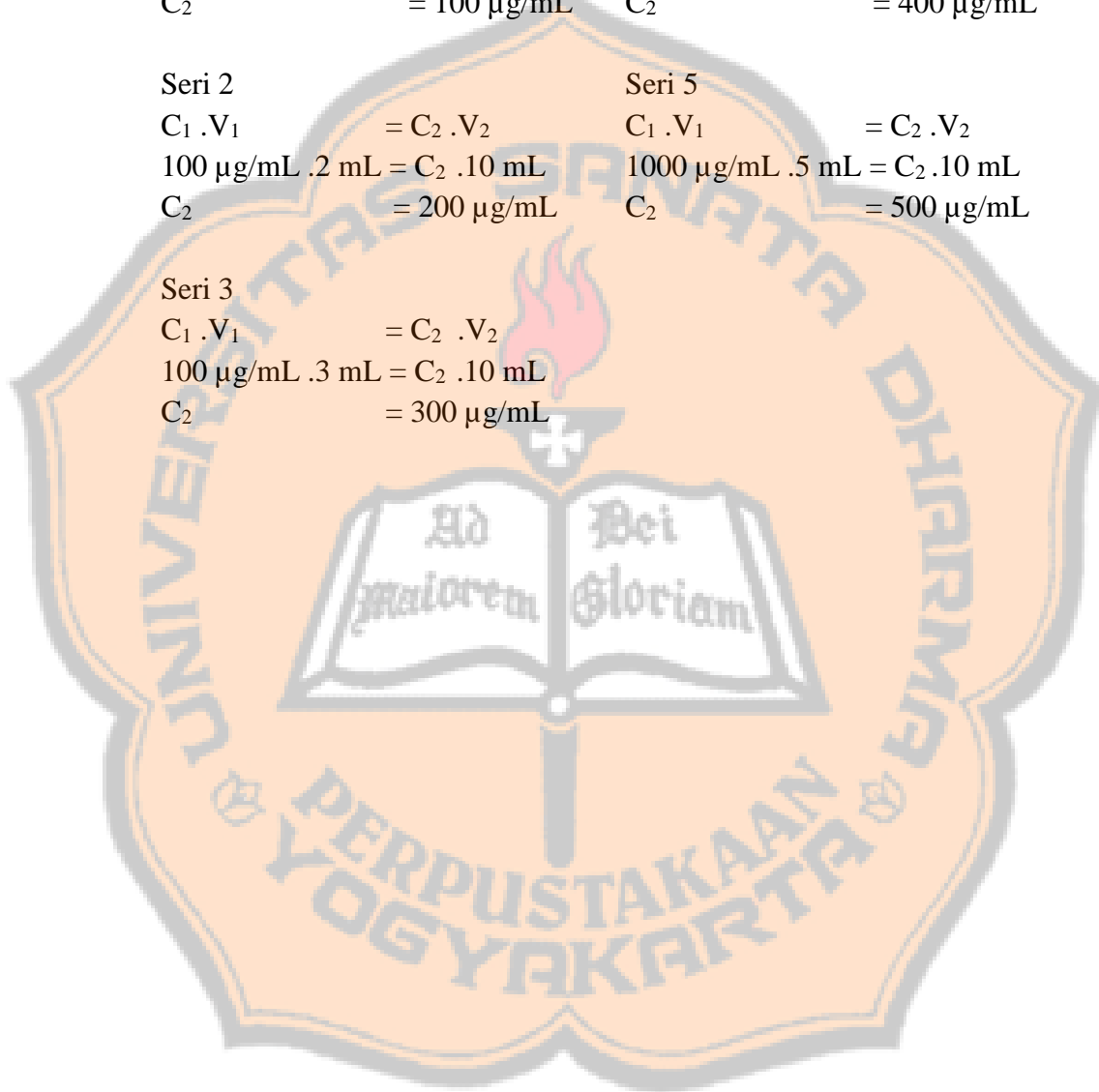
$$\begin{aligned}C_1 \cdot V_1 &= C_2 \cdot V_2 \\100 \mu\text{g/mL} \cdot 2 \text{ mL} &= C_2 \cdot 10 \text{ mL} \\C_2 &= 200 \mu\text{g/mL}\end{aligned}$$

Seri 5

$$\begin{aligned}C_1 \cdot V_1 &= C_2 \cdot V_2 \\1000 \mu\text{g/mL} \cdot 5 \text{ mL} &= C_2 \cdot 10 \text{ mL} \\C_2 &= 500 \mu\text{g/mL}\end{aligned}$$

Seri 3

$$\begin{aligned}C_1 \cdot V_1 &= C_2 \cdot V_2 \\100 \mu\text{g/mL} \cdot 3 \text{ mL} &= C_2 \cdot 10 \text{ mL} \\C_2 &= 300 \mu\text{g/mL}\end{aligned}$$



**Lampiran 12. Optimasi uji aktivitas antioksidan**1. Penentuan *Operating Time* ( $\lambda = 517 \text{ nm}$ )

Waktu (menit)	Absorbansi larutan		
	5 $\mu\text{g/mL}$	10 $\mu\text{g/mL}$	15 $\mu\text{g/mL}$
5	0,538	0,504	0,497
10	0,533	0,500	0,488
15	0,529	0,495	0,484
20	0,528	0,493	0,482
25	0,528	0,491	0,482
30	0,529	0,488	0,481
35	0,531	0,488	0,480
40	0,533	0,489	0,480
45	0,535	0,489	0,482
50	0,538	0,491	0,483
55	0,542	0,492	0,483
60	0,547	0,493	0,485

**OT yang digunakan : 30 menit**

## 2. Penentuan panjang gelombang maksimum

Konsentrasi larutan DPPH ( $\mu\text{g/mL}$ )	$\lambda$ maksimum hasil pengukuran	$\lambda$ maksimum yang digunakan	$\lambda$ maksimum teoritis
20	516 nm	516 nm	517 nm
30	516 nm		
40	516 nm		

**Lampiran 13. Uji aktivitas antioksidan dengan DPPH**

$$\% \text{ IC} = \frac{\text{absorbansi kontrol} - \text{absorbansi sampel}}{\text{absorbansi kontrol}} \times 100 \%$$

## 1. Aktivitas antioksidan rutin

Replikasi	Konsentrasi rutin (µg/mL)	Absorbansi kontrol	Absorbansi larutan uji	% IC
1	30	0,535	0,403	24,6728
	40		0,361	32,5234
	50		0,315	41,1215
	60		0,268	49,9065
	70		0,233	56,4486
2	30	0,501	0,365	27,1457
	40		0,324	35,3293
	50		0,300	40,1198
	60		0,260	48,1038
	70		0,235	53,0940
3	30	0,514	0,373	27,4320
	40		0,332	35,4086
	50		0,290	43,5798
	60		0,255	50,3891
	70		0,218	57,5875

Contoh perhitungan %IC :

## 1. Konsentrasi 30 µg/mL

$$\% \text{ IC} = \frac{0,535 - 0,403}{0,535} \times 100 \% = 24,6728\%$$

## 2. Konsentrasi 40 µg/mL

$$\% \text{ IC} = \frac{0,535 - 0,361}{0,535} \times 100 \% = 32,5234\%$$

## 3. Konsentrasi 50 µg/mL

$$\% IC = \frac{0,535-0,315}{0,535} \times 100 \% = 41,1215\%$$

4. Konsentrasi 60  $\mu\text{g/mL}$

$$\% IC = \frac{0,535-0,268}{0,535} \times 100 \% = 49,9065\%$$

5. Konsentrasi 70  $\mu\text{g/mL}$

$$\% IC = \frac{0,535-0,233}{0,535} \times 100 \% = 56,4486\%$$

2. Aktivitas antioksidan fraksi etil asetat

Replikasi	Konsentrasi sampel ( $\mu\text{g/mL}$ )	Absorbansi kontrol	Absorbansi larutan uji	%IC
1	100	0,668	0,551	17,5149
	200		0,485	27,3952
	300		0,399	40,2694
	400		0,322	51,7964
	500		0,220	67,0658
2	100	0,675	0,548	18,8148
	200		0,459	32,0000
	300		0,378	44,0000
	400		0,297	56,0000
	500		0,200	70,3703
3	100	0,663	0,537	19,0045
	200		0,451	31,9758
	300		0,374	43,5897
	400		0,290	56,2594
	500		0,200	69,8340

Contoh perhitungan %IC :

1. Konsentrasi 100  $\mu\text{g/mL}$

$$\% IC = \frac{0,668-0,551}{0,668} \times 100 \% = 17,5149\%$$

2. Konsentrasi 200  $\mu\text{g/mL}$

$$\% IC = \frac{0,668-0,485}{0,668} \times 100 \% = 27,3952\%$$

3. Konsentrasi 300  $\mu\text{g/mL}$

$$\% IC = \frac{0,668-0,399}{0,668} \times 100 \% = 40,2694\%$$

4. Konsentrasi 400  $\mu\text{g/mL}$

$$\% IC = \frac{0,668-0,322}{0,668} \times 100 \% = 51,7964\%$$

5. Konsentrasi 500  $\mu\text{g/mL}$

$$\% IC = \frac{0,668-0,220}{0,668} \times 100 \% = 67,0658\%$$

#### Lampiran 14. Perhitungan $IC_{50}$ rutin dan fraksi etil asetat

1. Rutin

Replikasi	Konsentrasi rutin ( $\mu\text{g/mL}$ )	$\%IC$	Persamaan regresi linier
1	30	24,6730	$y = 0,8259x + 0,4674$ $r = 0,9990$
	40	32,5234	
	50	41,1215	
	60	49,9065	
	70	56,4486	
2	30	27,1457	$y = 0,6467x + 8,4231$ $r = 0,9963$
	40	35,3293	
	50	40,1198	
	60	48,1038	
	70	53,0938	
3	30	27,4319	$y = 0,7529x + 5,2335$ $r = 0,9993$
	40	35,4086	
	50	43,5798	
	60	50,3891	
	70	57,5875	

**Replikasi 1**

$$y = 0,8259x + 0,4674$$

$$50 = 0,8259x + 0,4674$$

$$x = 59,9741$$

Nilai  $IC_{50} = 59,9741 \mu\text{g/mL}$

**Replikasi 2**

$$y = 0,6467x + 8,4231$$

$$50 = 0,6467x + 8,4231$$

$$x = 64,2908$$

Nilai  $IC_{50} = 64,2909 \mu\text{g/mL}$

**Replikasi 3**

$$y = 0,7529x + 5,2377$$

$$50 = 0,7529x + 5,2377$$

$$x = 59,4532$$

Nilai  $IC_{50} = 59,4588 \mu\text{g/mL}$

2. Fraksi etil asetat

Replikasi	Konsentrasi sampel ( $\mu\text{g/mL}$ )	%IC	Persamaan regresi linier
1	100	17,5150	$y = 0,1235x + 3,7575$ $r = 0,9975$
	200	27,3952	
	300	40,2695	
	400	51,7964	
	500	67,0659	
2	100	18,8148	$y = 0,1271x + 6,1040$ $r = 0,9995$
	200	32,0000	
	300	44,0000	
	400	56,0000	
	500	70,3704	
3	100	19,0045	$y = 0,1259x + 6,3499$ $r = 0,9997$
	200	31,9759	
	300	43,5897	
	400	56,2594	
	500	69,8341	

**Replikasi 1**

$$y = 0,1235x + 3,7575$$

$$50 = 0,1235x + 3,7575$$

$$x = 374,4332$$

Nilai  $IC_{50} = 374,4332 \mu\text{g/mL}$

**Replikasi 2**

$$y = 0,1271x + 6,1040$$

$$50 = 0,1271x + 6,1040$$

$$x = 345,3658$$

Nilai  $IC_{50} = 345,3658 \mu\text{g/mL}$

**Replikasi 3**

$$y = 0,1259x + 6,3499$$

$$50 = 0,1259x + 6,3499$$

$$x = 346,7045$$

Nilai  $IC_{50} = 346,7045 \mu\text{g/mL}$

3. Tabel  $IC_{50}$  rutin dan fraksi etil asetat buah buni

<b>Rutin</b>			
Replikasi	Persamaan regresi linier	$IC_{50}$ ( $\mu\text{g/mL}$ )	$x \pm \text{SD}$
1	$y = 0,8093x + 0,4675$	59,9741	$61,2413 \pm 2,6536$
2	$y = 0,6467x + 8,4230$	64,2909	
3	$y = 0,7529x + 5,2377$	59,4588	
<b>Fraksi</b>			
1	$y = 0,1235x + 3,7575$	374,4332	$355,5011 \pm 16,4092$
2	$y = 0,1271x + 6,1038$	345,3658	
3	$y = 0,1259x + 6,3499$	346,7045	



## Lampiran 15. Hasil uji statistik dengan program R 3.2.4

### 1. Uji normalitas data

```
> with(Dataset, shapiro.test(RUTIN))

      Shapiro-Wilk normality test

data:  RUTIN
W = 0.82898, p-value = 0.1857

> with(Dataset, shapiro.test(FRAKSI.ETIL.ASETAT))

      Shapiro-Wilk normality test

data:  FRAKSI.ETIL.ASETAT
W = 0.78446, p-value = 0.07793
```

### 2. Uji varian data

```
      F test to compare two variances

data:  IC50 by Kelompok
F = 0.026151, num df = 2, denom df = 2, p-value = 0.05097
alternative hypothesis: true ratio of variances is not equal to 1
95 percent confidence interval:
 0.0006705429 1.0198957564
sample estimates:
ratio of variances
 0.02615117
```

### 3. Uji T tidak berpasangan

```
      Two Sample t-test

data:  IC50 by Kelompok
t = -37.524, df = 4, p-value = 3.012e-06
alternative hypothesis: true difference in means is not equal to 0
95 percent confidence interval:
 -381.8049 -329.1974
sample estimates:
mean in group Kontrol negatif          mean in group Fraksi
                0.0000                    355.5012
```

**Lampiran 16. Absorbansi fraksi etil asetat untuk penentuan kandungan fenolik total**

**Sample Table Report** 02/16/2016 01:00:33 PM

---

File Name: D:\WUNI\FENOLIK\SAMPEL FRAKSI ASTRID\REPLIKASI FIX PRINT  
191215\REPLIKASI FIX.pho

Sample Table

	Sample ID	Type	Ex	Conc	WL745.8	Comments
1	REPLIKASI 1	Unknown		*****	0.646	
2	REPLIKASI 2	Unknown		*****	0.639	
3	REPLIKASI 3	Unknown		*****	0.642	



### BIOGRAFI PENULIS



Penulis skripsi berjudul “Uji Aktivitas Antioksidan dan Penetapan Kadar Fenolik Total Fraksi Etil Asetat Ekstrak Etanol Buah Buni [*Antidesma bunius* L. (Spreng)] dengan Metode 1,1-Difenil-2-Pikrilhidrazil (DPPH) dan Metode Folin-Ciocalteu” memiliki nama lengkap Astrid Pangestuty. Penulis lahir di Yogyakarta pada tanggal 27 Agustus 1994, merupakan anak kedua dari dua bersaudara, dari pasangan Agustinus Riyanta dan Agnes Wiratni. Pendidikan formal yang ditempuh penulis antara lain : TK Yos Sudarso Kawunganten Cilacap (1998-2000); SD Negeri 1 Kawunganten Cilacap (2000-2006); SMP Yos Sudarso Kawunganten Cilacap (2006-2009); SMA Negeri 2 Yogyakarta (2009-2012); kemudian penulis melanjutkan pendidikan S1 di Fakultas Farmasi Universitas Sanata Dharma (2012-2016). Selama masa perkuliahan, penulis aktif dalam berbagai organisasi dan kegiatan kepanitiaan baik di dalam maupun di luar lingkungan kampus antara lain menjadi anggota kaum muda-mudi gereja Stasi St. Bernadus, asisten praktikum Botani Farmasi (2014; 2015), anggota Unit Kegiatan Fakultas (UKF) Badminton (2014-2015), Koordinator Divisi Humas Komisi Pemilihan Umum Gubernur BEMF dan Ketua DPMF (2013), Koordinator Divisi Humas Donor Darah JMKI “Prove Your Love With Drop Your Blood” (2014), Koordinator Divisi Publikasi Desa Mitra III dan IV “Pola Hidup Sehat, Tekanan Darah Terkendali” (2014), dan Anggota Divisi Humas Pelayanan Kesehatan Gratis Dies Natalis ke-59 Universitas Sanata Dharma (2014).