

PLAGIAT MERUPAKAN TINDAKAN TIDAK TERPUJI

**UJI AKTIVITAS ANTIOKSIDAN MENGGUNAKAN
RADIKAL 1,1-DIFENIL-2-PIKRILHIDRAZIL (DPPH) DAN
PENETAPAN KANDUNGAN FENOLIK TOTAL
FRAKSI ETIL ASETAT EKSTRAK ETANOLIK DAUN SELASIH
(*Ocimum sanctum* L.)**

SKRIPSI

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

Program Studi Farmasi



Oleh :

Yosafat Rubbyanto Widodo

NIM : 078114051

**FAKULTAS FARMASI
UNIVERSITAS SANATA DHARMA
YOGYAKARTA
2011**

PLAGIAT MERUPAKAN TINDAKAN TIDAK TERPUJI

**UJI AKTIVITAS ANTIOKSIDAN MENGGUNAKAN
RADIKAL 1,1-DIFENIL-2-PIKRILHIDRAZIL (DPPH) DAN
PENETAPAN KANDUNGAN FENOLIK TOTAL
FRAKSI ETIL ASETAT EKSTRAK ETANOLIK DAUN SELASIH
(*Ocimum sanctum L.*)**

SKRIPSI

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

Program Studi Farmasi



Oleh :

Yosafat Rubbyanto Widodo

NIM : 078114051

**FAKULTAS FARMASI
UNIVERSITAS SANATA DHARMA
YOGYAKARTA
2011**

PLAGIAT MERUPAKAN TINDAKAN TIDAK TERPUJI

Persetujuan Pembimbing

**UJI AKTIVITAS ANTIOKSIDAN MENGGUNAKAN
RADIKAL 1,1-DIFENIL-2-PIKRILHIDRAZIL (DPPH) DAN
PENETAPAN KANDUNGAN FENOLIK TOTAL
FRAKSI ETIL ASETAT EKSTRAK ETANOLIK DAUN SELASIH
(*Ocimum sanctum* L.)**

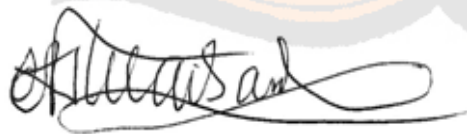
Skripsi yang diajukan oleh :

Yosafat Rubbyanto Widodo

NIM : 078114051

Telah disetujui oleh:

Pembimbing Utama



Prof. Dr. C.J. Soegihardjo, Apt.

Tanggal ...18-07-2011...

PLAGIAT MERUPAKAN TINDAKAN TIDAK TERPUJI

Pengesahan Skripsi Berjudul

UJI AKTIVITAS ANTIOKSIDAN MENGGUNAKAN
RADIKAL 1,1-DIFENIL-2-PIKRILHIDRAZIL (DPPH) DAN
PENETAPAN KANDUNGAN FENOLIK TOTAL
FRAKSI ETIL ASETAT EKSTRAK ETANOLIK DAUN SELASIH
(*Ocimum sanctum* L.)

Oleh :
Yosafat Rubbyanto Widodo
078114051

Dipertahankan di hadapan Panitia Penguji Skripsi
Fakultas Farmasi
Universitas Sanata Dharma
pada tanggal: 23 Juni 2011....

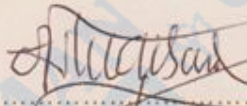
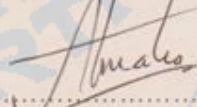
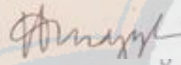
Mengetahui
Fakultas Farmasi
Universitas Sanata Dharma
Dekan

Pang Djunarko, M.Sc., Apt.

Panitia Penguji:

1. Prof.Dr.C.J.Soegihardjo,Apt.
2. Yohanes Dwiatmaka,M.Si.
3. Lucia Wiwid Wijayanti,M.Si.

Tanda tangan


.....

.....

.....

PLAGIAT MERUPAKAN TINDAKAN TIDAK TERPUJI

HALAMAN PERSEMBAHAN

Ambillah waktu untuk berpikir karena itulah sumber pengetahuan. Ambillah waktu untuk membaca karena itulah sumber hikmat. Ambillah waktu untuk bersahabat karena itulah jalan kebahagiaan. Ambillah waktu untuk mendengar karena itulah cara untuk memperoleh pengertian. Ambillah waktu mencintai karena engkau akan dicintai. Ambillah waktu untuk berdiam diri dihadirat Allah karena disitulah kesempatan kita bertemu dengan Allah secara pribadi. Ambillah waktu untuk berdoa karena itulah kekuatan terbesar yang akan kita peroleh

EFESUS 5 : 6

Kupersembahkan skripsi ini Kepada :
tuan yesus kristus
yang memberikan semua cintanya kepadaku
tanpamu aku bukan apa-apa
tuan kutulis skripsi ini sebagai surat cintaku padamu

mama, papa, dan keluarga
kalian keluarga terbaik bagiku

murid-murid sekolah igus guru kecil ku
kalian mengajarku bagaimana mengucapkan syukur ditengah
tantangan, bersukacita ditengah penderitaan
terima kasih sudah menjadi bagian dari hidupku

PLAGIAT MERUPAKAN TINDAKAN TIDAK TERPUJI

LEMBAR PERNYATAAN PERSETUJUAN

PUBLIKASI ILMIAH UNTUK KEPENTINGAN AKADEMIS

Yang bertanda tangan di bawah ini, saya mahasiswa Universitas Sanata

Dharma :

Nama : Yosafat Rubbyanto Widodo

NIM : 078114051

Demi pengembangan ilmu pengetahuan, saya memberikan kepada

Perpustakaan Universitas Sanata Dharma karya ilmiah saya yang berjudul :

“UJI AKTIVITAS ANTIOKSIDAN MENGGUNAKAN RADIKAL 1,1-DIFENIL-2-PIKRILHIDRAZIL (DPPH) DAN PENETAPAN KANDUNGAN FENOLIK TOTAL FRAKSI ETIL ASETAT EKSTRAK ETANOLIK DAUN SELASIH (*Ocimum sanctum* L.)”

beserta perangkat yang diperlukan. Dengan demikian, saya memberikan kepada Perpustakaan Universitas Sanata Dharma hak untuk menyimpan, mengalihkan dalam bentuk media lain, mengelolanya dalam bentuk pangkalan data, mendistribusikan secara terbatas, dan mempublikasikan di internet atau media lain untuk kepentingan akademis tanpa perlu meminta izin maupun memberikan royalti kepada saya selama tetap mencantumkan nama saya sebagai penulis.

Demikian pernyataan ini saya buat dengan sebenarnya.

Dibuat di Yogyakarta

Pada tanggal 22 Juli 2011

Yang menyatakan,



Yosafat Rubbyanto Widodo

PLAGIAT MERUPAKAN TINDAKAN TIDAK TERPUJI

KATA PENGANTAR

Puji syukur kepada Tuhan Yesus Kristus karena berkat dan kasihNya penulis dapat menyelesaikan skripsi yang berjudul “**Uji Aktivitas Antioksidan Menggunakan Radikal 1,1-Difenil-2-Pikrilhidrazil (DPPH) dan Penetapan Kandungan Fenolik Total Fraksi Etil Asetat Ekstrak Etanolik Daun Selasih (*Ocimum sanctum* L.)**”.

Dalam menyelesaikan skripsi ini, penulis menyadari telah mendapat banyak bantuan, dorongan dan bimbingan dari banyak pihak, baik secara langsung maupun tidak langsung. Pada kesempatan ini dengan kerendahan hati penulis menyampaikan terima kasih kepada :

1. Ipang Djunarko, M.Sc., Apt., selaku Dekan Fakultas Farmasi Universitas Sanata Dharma.
2. Prof. Dr. C.J. Soegihardjo, Apt., selaku Dosen Pembimbing yang telah memberikan bantuan dan bimbingan selama penulisan skripsi, usulan skripsi dan saat dilakukan penelitian.
3. Yohanes Dwiatmaka, M.Si., selaku Dosen Penguji yang memberikan masukan, kritik dan saran dalam penulisan skripsi.
4. Lucia Wiwid Wijayanti, M.Si., selaku Dosen Penguji yang memberikan masukan, kritik dan saran dalam penulisan skripsi.
5. Segenap laboran Laboratorium Farmakognosi-Fitokimia dan Kimia Analisis Instrumen, atas segala bantuan selama penulis melakukan penelitian di Laboratorium Farmakognosi-Fitokimia dan Kimia Analisis Instrumen.

PLAGIAT MERUPAKAN TINDAKAN TIDAK TERPUJI

6. Damianus. L. Edhi dan Andy Kurniawan, teman sekerja sekaligus sahabatku atas kerja samanya. Tanpa kalian skripsi ini tidak akan selesai.
7. Teman-teman FST 2007, atas semangat, canda tawa, dan perhatiannya yang memberikan semangat yang tidak ada habisnya.
8. Feice T Podiaro, atas kasih, perhatian, dukungan, doa, semangat dan segala masukannya.
9. Galang Mahardika, Rendy Bima Baskhara, Imanuel Christianto, dan Dicky Petrico Chandra, atas semua pelajaran bagaimana seharusnya bersukacita, berharap, dan bersemangat. Kalian anak-anak terhebat yang pernah ku temui.
10. Semua pihak yang telah memberikan bantuan dan dukungan yang tidak dapat disebut satu per satu.

Penulis menyadari dalam penulisan skripsi ini masih banyak kekurangan. Oleh karena itu, penulis menerima dengan kerendahan hati segala macam masukan dan kritikan untuk kesempurnaan skripsi ini.

Akhir kata, penulis berharap skripsi ini dapat bermanfaat untuk berbagai pihak yang membutuhkan dan menjadi sumbangan untuk perkembangan ilmu pengetahuan.

Yogyakarta, Mei 2011

Penulis

PLAGIAT MERUPAKAN TINDAKAN TIDAK TERPUJI

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.



Yogyakarta, 18 Juli 2011

Penulis

Yosafat Rubbyanto Widodo

PLAGIAT MERUPAKAN TINDAKAN TIDAK TERPUJI

DAFTAR ISI

	Halaman
HALAMAN JUDUL.....	i
HALAMAN PERSETUJUAN PEMBIMBING	ii
HALAMAN PENGESAHAN.....	iii
HALAMAN PERSEMBAHAN	iv
LEMBAR PERNYATAAN PERSETUJUAN PUBLIKASI KARYA ILMIAH UNTUK KEPENTINGAN AKADEMIS	v
KATA PENGANTAR.....	vi
PERNYATAAN KEASLIAN KARYA.....	xiii
DAFTAR ISI	ix
DAFTAR TABEL	xiv
DAFTAR GAMBAR.....	xvi
DAFTAR LAMPIRAN	xviii
INTISARI	xix
<i>ABSTRACT</i>	xx
BAB I PENGANTAR	1
A. Latar Belakang	1
B. Perumusan Masalah	5
C. Keaslian Penelitian	5
D. Manfaat Penelitian	6
E. Tujuan Penelitian	7

PLAGIAT MERUPAKAN TINDAKAN TIDAK TERPUJI

BAB II PENELAAHAN PUSTAKA	8
A. Selasih	8
1. Keterangan botani	8
2. Kandungan kimia selasih	9
3. Khasiat dan kegunaan selasih	10
B. Senyawa Fenolik	11
1. Pengertian senyawa fenolik	11
2. Senyawa fenolik dalam selasih	11
3. Sifat antioksidan senyawa fenolik	12
4. Penyarian senyawa fenolik	14
5. Penentuan kandungan senyawa fenolik total	15
C. Metode Penyarian	15
1. Pengertian penyarian	15
2. Jenis metode penyarian	16
3. Cairan penyari	18
4. Efektifitas penyarian	19
D. Antioksidan	19
1. Definisi antioksidan	20
2. Mekanisme antioksidan	21
3. Penggolongan antioksidan	22
4. Metode pengujian daya antioksidan	24
E. Metode DPPH	26

PLAGIAT MERUPAKAN TINDAKAN TIDAK TERPUJI

F. Validasi Metode Analisis	27
1. Pengertian validasi metode analisis	27
2. Parameter validasi metode	28
3. Kategori metode analisis	30
G. Landasan Teori	31
H. Hipotesis	33
BAB III METODOLOGI PENELITIAN	34
A. Jenis dan Rancangan Penelitian	34
B. Variabel	34
1. Variabel bebas	34
2. Variabel tergantung	34
3. Variabel pengacau terkendali	34
4. Variabel pengacau tidak terkendali	34
C. Definisi Operasional	34
1. Ekstrak etanolik daun selasih	34
2. Fraksi etil asetat	34
3. Persen <i>inhibition concentration</i> (%IC)	35
4. Persen <i>inhibition concentration</i> 50 (IC ₅₀)	35
D. Bahan dan Alat Penelitian	35
1. Bahan penelitian	35
2. Alat penelitian	35
E. Tatacara Penelitian	36
1. Determinasi tumbuhan	36

PLAGIAT MERUPAKAN TINDAKAN TIDAK TERPUJI

2. Pengumpulan bahan	36
3. Preparasi sampel	36
4. Pembuatan larutan pembanding dan uji	37
5. Uji pendahuluan	38
6. Optimasi metode uji aktivitas antioksidan	39
7. Uji aktivitas antioksidan	40
8. Penetapan kandungan fenolik total	41
F. Analisis Hasil	42
BAB IV HASIL DAN PEMBAHASAN	45
A. Hasil Determinasi Tumbuhan	45
B. Hasil Pengumpulan Bahan	46
C. Hasil Preparasi Sampel	48
1. Hasil ekstraksi sampel	48
2. Hasil fraksinasi sampel	53
D. Hasil Uji Pendahuluan	56
1. Uji pendahuluan aktivitas antioksidan	56
2. Uji pendahuluan senyawa fenolik	57
E. Hasil Optimasi Metode Uji Aktivitas Antioksidan	59
1. Penentuan <i>operating time</i> (OT)	59
2. Penentuan panjang gelombang maksimum	60
F. Hasil Validasi Metode Uji Aktivitas Antioksidan	61
1. Akurasi metode uji aktivitas antioksidan	63
2. Presisi metode uji aktivitas antioksidan	65

PLAGIAT MERUPAKAN TINDAKAN TIDAK TERPUJI

3. Linearitas metode uji aktivitas antioksidan	66
4. Spesifisitas metode uji aktivitas antioksidan	66
G. Hasil Penentuan Aktivitas Antioksidan dengan Radikal DPPH	68
H. Hasil Optimasi Metode Penetapan Kandungan Fenolik Total	74
1. Penentuan <i>operating time</i> (OT)	74
2. Penentuan panjang gelombang maksimum	75
I. Hasil Validasi Metode Penetapan Kandungan Fenolik Total	75
1. Akurasi metode penetapan kandungan fenolik total	76
2. Presisi metode penetapan kandungan fenolik total	77
3. Linearitas metode penetapan kandungan fenolik total	78
4. Spesifisitas metode penetapan kandungan fenolik total	78
J. Hasil Penetapan Kandungan Fenolik Total	78
BAB V KESIMPULAN DAN SARAN	82
A. Kesimpulan	82
B. Saran	82
DAFTAR PUSTAKA	83
LAMPIRAN	90
BIOGRAFI PENULIS	109

PLAGIAT MERUPAKAN TINDAKAN TIDAK TERPUJI

DAFTAR TABEL

	Halaman
Tabel I Rentang akurasi yang masih dapat diterima.....	28
Tabel II. Rentang KV yang masih dapat diterima	29
Tabel III. Parameter validasi metode	31
Tabel IV. Hasil <i>scanning</i> panjang gelombang maksimum DPPH	61
Tabel V. Hasil pengukuran absorbansi seri baku rutin yang sudah direaksikan dengan radikal DPPH	62
Tabel VI. Hasil pengukuran absorbansi seri fraksi etil asetat yang sudah direaksikan dengan radikal DPPH	63
Tabel VII. Hasil % <i>recovery</i> dan % CV uji aktivitas antioksidan rutin	64
Tabel VIII. Hasil % <i>recovery</i> dan % CV uji aktivitas antioksidan fraksi etil asetat ekstrak etanolik daun selasih	64
Tabel IX. Hasil aktivitas antioksidan rutin dengan menggunakan metode DPPH	70
Tabel X. Hasil aktivitas antioksidan fraksi etil asetat ekstrak etanolik daun selasih dengan menggunakan metode DPPH	71
Tabel XI. Hasil perhitungan IC ₅₀ rutin dan fraksi etil asetat ekstrak etanolik daun selasih	72
Tabel XII. Tingkat kekuatan antioksidan senyawa uji dengan metode DPPH (Ariyanto, 2006)	72
Tabel XIII. Hasil <i>scanning</i> panjang gelombang penetapan kandungan Fenolik total pada tiga konsentrasi asam galat	75

PLAGIAT MERUPAKAN TINDAKAN TIDAK TERPUJI

Tabel XIV. Hasil pengukuran absorbansi baku asam galat	76
Tabel XV. Hasil % recovery dan % CV pengujian fenolik total asam galat ...	77
Tabel XVI. Hasil perhitungan kandungan fenolik total	81



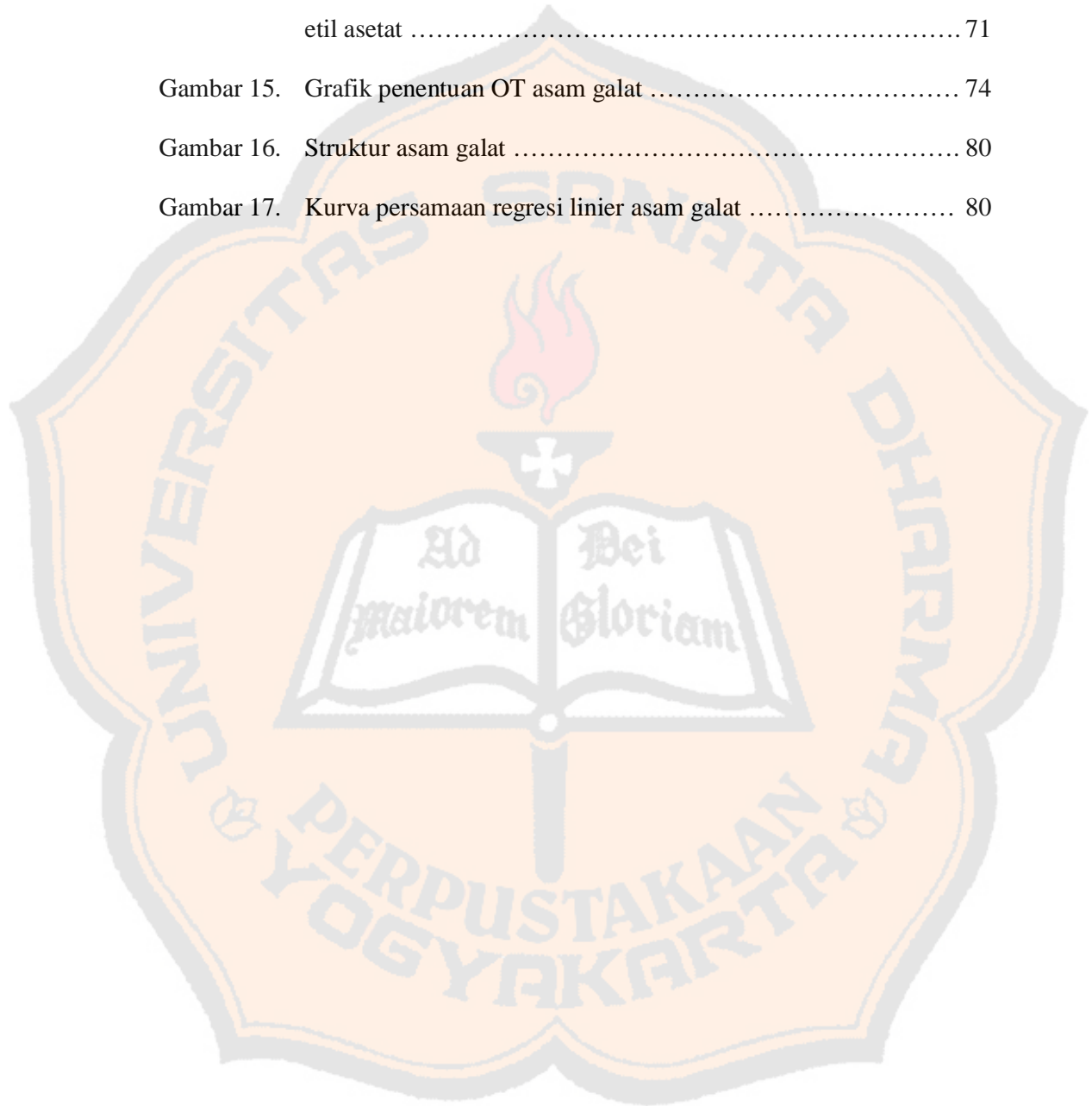
PLAGIAT MERUPAKAN TINDAKAN TIDAK TERPUJI

DAFTAR GAMBAR

	Halaman
Gambar 1. Senyawa fenolik dalam selasih (1. Eugenol, 2. Asam urosolat, 3. Karvakrol, 4. Asam rosmarinat, 5. Apigenin, 6. Sirsimaritin) (Rahman, 2011)	12
Gambar 2. Reaksi pembentukan dan penggabungan radikal fenoksil (Bruneton, 1999)	13
Gambar 3. Reaksi Radikal DPPH dengan Antioksidan (Windono <i>et al.</i> , 2001)	27
Gambar 4. Skema jalannya penelitian	44
Gambar 5. Larutan DPPH (A) dan Larutan DPPH +Rutin (B)	57
Gambar 6. Hasil uji pendahuluan uji aktivitas antioksidan (A = Larutan DPPH , B = DPPH + fraksi etil asetat ekstrak etanol daun selasih)	57
Gambar 7. Blanko (A) dan pereaksi Folin-Ciocalteau + Asam Galat (B)....	58
Gambar 8. Hasil uji pendahuluan uji fenolik (A= blanko B= pereaksi Folin- Ciocalteau + fraksi etil asetat ekstrak etanolik daun selasih)	58
Gambar 9. Grafik penentuan OT rutin	59
Gambar 10. Grafik penentuan OT etil asetat	60
Gambar 11. Resonansi DPPH dan gugus kromofor serta auksokrom yang terbentuk	68
Gambar 12. Struktur rutin	69

PLAGIAT MERUPAKAN TINDAKAN TIDAK TERPUJI

Gambar 13. Kurva persamaan regresi linier aktivitas antioksidan rutin	70
Gambar 14. Kurva persamaan regresi linier aktivitas antioksidan fraksi etil asetat	71
Gambar 15. Grafik penentuan OT asam galat	74
Gambar 16. Struktur asam galat	80
Gambar 17. Kurva persamaan regresi linier asam galat	80



PLAGIAT MERUPAKAN TINDAKAN TIDAK TERPUJI

DAFTAR LAMPIRAN

	Halaman
Lampiran 1. Surat determinasi tanaman selasih	90
Lampiran 2. Gambar tanaman selasih dari daerah Selarong (Yogyakarta)....	91
Lampiran 3. Perhitungan rendemen	92
Lampiran 4. Data penimbangan untuk uji aktivitas antioksidan	93
Lampiran 5. Data konsentrasi bahan untuk uji aktivitas antioksidan	94
Lampiran 6. <i>Scanning</i> larutan pengkoreksi untuk uji aktivitas antioksidan ...	96
Lampiran 7. Optimasi metode uji aktivitas antioksidan	98
Lampiran 8. Uji aktivitas antioksidan menggunakan radikal DPPH	101
Lampiran 9. Perhitungan nilai IC_{50} rutin dan fraksi etil asetat ekstrak etanolik daun selasih	103
Lampiran 10. Penimbangan bahan untuk uji kandungan fenolik total	104
Lampiran 11. <i>Scanning</i> kontrol larutan asam galat	104
Lampiran 12. Optimasi penentuan kandungan fenolik total	105
Lampiran 13. Penentuan kandungan fenolik total	107
Lampiran 14. Uji statistik dengan <i>PASW Statistics 18</i>	108

PLAGIAT MERUPAKAN TINDAKAN TIDAK TERPUJI

INTISARI

Antioksidan adalah senyawa yang mampu menghambat reaksi oksidasi yang diperantarai oleh radikal bebas. Selasih (*Ocimum sanctum* L.) adalah tanaman yang diketahui memiliki senyawa fenolik yang tinggi sehingga potensial sebagai sumber antioksidan. Penelitian ini bertujuan untuk mengetahui aktivitas antioksidan dari fraksi etil asetat ekstrak etanolik daun selasih (*Ocimum sanctum* L.) serta menetapkan kandungan fenolik totalnya.

Penentuan aktivitas antioksidan dari fraksi etil asetat ekstrak etanolik daun selasih dilakukan melalui uji penangkapan radikal *1,1-Diphenyl-2-Pycrylhydrazyl* (DPPH) dan dinyatakan dengan *Inhibition Concentration 50* (IC₅₀). Pada metode ini DPPH berperan sebagai radikal bebas yang diredam oleh antioksidan bahan uji. Penangkapan radikal DPPH ini menyebabkan terjadinya perubahan warna dari ungu menjadi kuning yang dapat diukur dengan spektrofotometri sinar tampak pada panjang gelombang 515,5 nm, sehingga aktivitas peredaman radikal bebas oleh sampel dapat ditentukan.

Penentuan kandungan fenolik total dilakukan dengan pereaksi Folin-Ciocalteu dan digunakan baku asam galat. Kandungan fenolik total dinyatakan dengan nilai massa ekuivalen asam galat. Pada metode Folin-Ciocalteu, terjadi reaksi reduksi oksidasi dimana senyawa fenolik akan teroksidasi dan pereaksi Folin-Ciocalteu akan tereduksi menjadi larutan berwarna biru yang dapat diukur dengan spektrofotometri sinar tampak pada panjang gelombang 750 nm.

Hasil penelitian menunjukkan bahwa fraksi etil asetat ekstrak etanolik daun selasih mempunyai IC₅₀ sebesar $26,814 \pm 0,281$ µg/mL dan kandungan fenolik total sebesar $9,422 \pm 0,783$ mg ekuivalen asam galat per gram fraksi etil asetat ekstrak etanolik daun selasih.

Kata Kunci : antioksidan, fraksi etil asetat ekstrak etanolik daun *Ocimum sanctum* L., DPPH, kandungan fenolik total

ABSTRACT

*Antioxidants are compounds that can inhibit the oxidation reactions mediated by free radicals. Holy basil (*Ocimum sanctum* L.) is a plant known to have high phenolic compounds so that potential as a source of antioxidants. This research was conducted to determine the antioxidant activity of ethyl acetate fraction from etanolic extract of holy basil leaves and to determine the total phenolic content. Determination of antioxidant activity of ethyl acetate fraction from etanolic extract of holy basil leaves through radical scavenging 1.1-Diphenyl-2-Pycrylhydrazyl (DPPH) and expressed as inhibition Concentration 50 (IC_{50}). In this method of DPPH free radicals which act as antioxidants tempered by the test material. This reaction causes the color change from purple to yellow which can be measured by visible light spectrophotometry at a wavelength of 515.5 nm, so the reduction activity of free radicals by the sample can be determined.*

Determination of total phenolic content by Folin-Ciocalteu and gallic acid standart. Total phenolic content expressed as mg equivalent gallic acid per g of ethyl acetate. In the Folin-Ciocalteu method, oxidation reduction reaction occurs in which the phenolic compounds will be oxidized and the Folin-Ciocalteu reagent would be reduced to a blue solution which can be measured by visible light spectrophotometry at a wavelength of 750 nm.

The results showed that ethyl acetate fraction from etanolic extract of holy basil leaves have IC_{50} of $26.814 \pm 0.281 \mu\text{g} / \text{mL}$ and total phenolic content of 9.422 ± 0.783 mg equivalent gallic acid per g of ethyl acetate fraction from etanolic extract of holy basil leaves.

Keywords: *antioxidant, ethyl acetate fraction from etanolic extract of *Ocimum sanctum* L, DPPH, total phenolic content*

PLAGIAT MERUPAKAN TINDAKAN TIDAK TERPUJI

BAB I

PENGANTAR

A. Latar Belakang

Polusi udara merupakan masalah utama yang sedang terjadi pada negara berkembang seperti Indonesia. Polusi udara kota-kota besar di Indonesia saat ini telah melebihi standar yang ditetapkan Organisasi Kesehatan Dunia (WHO), yaitu 50 mikrogram per meter kubik ($\mu\text{g}/\text{m}^3$) (Anonim, 2009). Polusi udara yang telah melebihi standar WHO sangat rawan dalam menimbulkan berbagai gangguan pada kesehatan. Meningkatnya polusi udara ini disebabkan karena berkembangnya industrialisasi dan meningkatnya jumlah kendaraan bermotor secara signifikan (Yazdani dan Yunus, 2009). Pada tiga dekade terakhir jumlah kendaraan bermotor meningkat dua kali lipat pada tiap sepuluh tahun di banyak negara Asia (Walsh, 1994). Kendaraan bermotor teridentifikasi meningkatkan polusi udara dan berkontribusi pada 60 % - 70 % polusi udara di perkotaan (Mayer, 1999).

Kendaraan bermotor ini menghasilkan gas buangan berupa oksida nitrogen (NO_x), oksida karbon, oksida sulfur (SO_x) dan logam berat (Kammerbauer dan Dick, 2000). Gas emisi kendaraan bermotor ini merupakan radikal bebas yang akan menimbulkan masalah kesehatan bila terpapar dalam jumlah banyak dalam tubuh manusia. Radikal bebas adalah senyawa kimia yang memiliki satu atau lebih elektron tidak berpasangan di kulit terluar sehingga sangat reaktif dan

PLAGIAT MERUPAKAN TINDAKAN TIDAK TERPUJI

mampu bereaksi dengan protein, lipid, atau DNA. Reaksi antara radikal bebas dan molekul tersebut dapat berujung pada timbulnya suatu penyakit (Tapan, 2005).

Sebenarnya dalam tubuh manusia terdapat pembasmi radikal bebas yang dikenal sebagai antioksidan endogen. Radikal bebas akan dinetralkan oleh antioksidan endogen sehingga tidak merusak sel. Contoh antioksidan endogen adalah enzim SOD (*Superoxide Dismutase*) dan Glutathion peroksidase (Pervical, 1998). Apabila jumlah radikal bebas yang terpapar terlalu banyak melebihi kapasitas antioksidan endogen maka radikal bebas yang tidak ternetralkan itu dapat menyerang sel yang sehat dan menyebabkan sel itu mengalami kerusakan struktur dan kehilangan fungsinya. Kerusakan sel yang disebabkan oleh radikal bebas memberikan kontribusi yang besar pada penuaan dan penyakit degeneratif seperti kanker, penyakit kardiovaskuler, penurunan sistem imun, dan disfungsi otak (Pervical, 1998).

Oleh karena itu, diperlukan tambahan antioksidan dari luar untuk dapat menstabilisasi atau mendeaktivasi radikal bebas sebelum menyerang sel. Antioksidan dapat berasal dari bahan alam dan sintetik (Amarowicz, Naczki dan Shahidi, 2000). Antioksidan dari bahan alam seperti tokoferol dan flavonoid lebih banyak digunakan karena lebih aman dan efek sampingnya lebih kecil dibandingkan dengan antioksidan sintetik seperti BHA (ter-butyl hidrosil anisol) dan BHT (ter-butyl hidroksi toluen) yang dapat meningkatkan terjadinya karsinogenesis (Choi, Lo, dan Han, 2004). Tetapi karena antioksidan dari bahan alam mempunyai aktivitas antioksidan yang lebih rendah dibanding dengan

PLAGIAT MERUPAKAN TINDAKAN TIDAK TERPUJI

antioksidan sintesis, maka perlu dilakukan eksplorasi antioksidan alami yang mempunyai aktivitas antioksidan yang tinggi.

Salah satu tanaman yang potensial untuk dieksplorasi aktivitas antioksidannya adalah selasih (*Ocimum sanctum* L.). Selasih secara tradisional digunakan pada Ayurveda untuk mengobati infeksi, penyakit kulit, demam, batuk, malaria, dan antidot untuk gigitan ular. Berdasarkan penelitian (Wangcharoen dan Morasuk, 2007) selasih diketahui memiliki aktivitas antioksidan dalam jumlah besar. Selain itu, selasih memiliki kandungan total fenolik yang besar, yaitu 48,93 mg/g atau lebih besar dari tanaman obat lain seperti *Desmodium gangeticum* L, *Eclipta alba* L, *Piper longum* L, *Solanum nigrum* L dan *Amaranthus caudatus* L (Veeru, Kishor, dan Meenakshi, 2009). Selasih juga banyak ditanam di Indonesia tetapi belum dimanfaatkan untuk dikonsumsi. Oleh karena itu, perlu dilakukan pengujian terhadap selasih untuk mengetahui besarnya aktivitas antioksidan serta IC_{50} nya.

Selasih mengandung banyak komponen fenolik seperti eugenol, sirsilineol, isotimusin, isotimonin, asam rosmarinat (Kelm, Nair, Strasburg, dan De Witt, 2000), orientin, dan vicenin (Vrinda dan Devi, 2001). Senyawa fenolik umumnya paling larut dalam cairan penyari yang kurang polar dari air. Pemilihan pelarut yang disarankan adalah campuran air, metanol, etanol, dan aseton (Waterman dan Mole, 1994). Pelarut yang digunakan adalah etanol 76 % berdasarkan penelitian Wangcharoen dan Morasuk (2007) yang menunjukkan penggunaan etanol 76 % menghasilkan ekstrak dengan aktivitas antioksidan paling besar, sedangkan dilakukan fraksinasi menggunakan etil asetat karena etil asetat merupakan pelarut

PLAGIAT MERUPAKAN TINDAKAN TIDAK TERPUJI

paling baik untuk aglikon flavonoid dan dianjurkan untuk proses pemurnian (Robinson, 1995). Dalam penelitian antioksidan herba ketul di dapat aktivitas antioksidan fraksi etil asetat lebih besar dari pada fraksi air (Nusarini, 2007).

Penentuan aktivitas antioksidan fraksi etil asetat ekstrak etanolik daun selasih dilakukan dengan metode *1,1-Diphenyl-2-Pyrylhydrazyl* (DPPH). Pada metode ini DPPH berperan sebagai radikal bebas yang diredam oleh antioksidan bahan uji. Reaksi ini menyebabkan terjadinya perubahan warna yang dapat diukur dengan spektrofotometri sinar tampak, sehingga aktivitas peredaman radikal bebas oleh sampel dapat ditentukan (Juniarti, Osmeli, dan Yuhernita, 2009). Metode DPPH memiliki beberapa keuntungan seperti sederhana, cepat, tidak terpengaruh oleh polaritas sampel dan tidak membutuhkan banyak reagen (Koleva, Van Baek, dan Linssen, 2001).

Pada penelitian ini juga dilakukan penentuan kandungan fenolik total. Senyawa fenolik telah diketahui memiliki berbagai efek biologis seperti aktivitas antioksidan melalui mekanisme sebagai pereduksi, penangkap radikal bebas, pengkhelat logam, peredam terbentuknya oksigen singlet serta pendonor elektron (Velioglu, 1998). Oleh karena itu, penelitian ini juga akan melihat hubungan aktivitas antioksidan dari antioksidan fraksi etil asetat ekstrak etanolik daun selasih dengan kandungan fenolik totalnya.

PLAGIAT MERUPAKAN TINDAKAN TIDAK TERPUJI

B. Perumusan Masalah

1. Berapakah nilai aktivitas antioksidan fraksi etil asetat ekstrak etanolik daun selasih dengan menggunakan radikal bebas DPPH yang dinyatakan sebagai IC_{50} ?
2. Berapakah kandungan fenolik total pada fraksi etil asetat ekstrak etanolik daun selasih yang dinyatakan dengan massa ekivalen asam galat ?

C. Keaslian Penelitian

Sejauh pengamatan penulis, penelitian tentang uji aktivitas antioksidan menggunakan radikal DPPH dan penetapan kandungan fenolik total daun selasih (*Ocimum sanctum* L.) pernah dilakukan oleh:

1. Aqil, Ahmad, dan Mehmood, 2006, dengan judul "*Antioxidant and Free Radical Scavenging Properties of Twelve Traditionally Used Indian Medicinal*". Penelitian ini menggunakan daun selasih dalam bentuk serbuk kering untuk diekstrak dengan metanol 98%. Ekstrak metanolik inilah yang kemudian dijadikan bahan uji.
2. Wangcharoen dan Morasuk, 2007 a, dengan judul "*Antioxidant Capacity and Phenolic Content of Holy Basil*". Penelitian ini menggunakan daun selasih dari pasar di Chiangmai (Thailand) dan diolah menjadi ekstrak etanolik (60%) dari daun selasih sebagai bahan ujinya.
3. Wangcharoen dan Morasuk, 2007 b, dengan judul "*Antioxidant Capacity and Phenolic Content of Some Thai Culinary Plants*". Penelitian ini menggunakan

PLAGIAT MERUPAKAN TINDAKAN TIDAK TERPUJI

ekstrak etanolik (18%, 36%, 57%, 76%, dan 95%) daun selasih sebagai bahan ujinya.

4. Gajula, Verghese, Boateng, Walker, Shackelford, Mentreddy, 2009, dengan judul “*Determination of Total Phenolics, Flavonoids, and Antioxidant and Chemopreventive Potential of Basil (Ocimum basilicum L. and Ocimum tenuiflorum L.)*”. Penelitian ini menggunakan daun selasih dari *Winfred Thomas Agricultural Research Station* (Amerika) lalu diolah menjadi serbuk kering untuk didapatkan ekstrak metanolik (80%) sebagai bahan ujinya.

Perbedaan dengan penelitian sebelumnya adalah bahwa pada penelitian ini daun selasih dipanen dari daerah Selarong, Yogyakarta (RT 1/RW 3 Pedukuhan Kentolan Lor, Kelurahan Gowasari, Kecamatan Pajangan, Kabupaten Bantul) dan dalam keadaan segar diolah untuk didapatkan fraksi etil asetat ekstrak etanolik (76%) daun selasih kemudian diuji aktivitas antioksidan menggunakan radikal DPPH dan ditetapkan kandungan fenolik totalnya.

D. Manfaat Penelitian

1. Manfaat teoritis

Penelitian ini diharap dapat memberikan sumbangan pada perkembangan ilmu pengetahuan khususnya tentang aktivitas antioksidan fraksi etil asetat ekstrak etanolik daun selasih dengan menggunakan radikal bebas DPPH dan kandungan fenolik total fraksi etil asetat ekstrak etanolik daun selasih.

2. Manfaat metodologis

Penelitian ini diharapkan dapat memberikan informasi mengenai aplikasi penggunaan metode DPPH sebagai uji antioksidan untuk bahan alam

3. Manfaat praktis

Penelitian ini diharapkan dapat memberi tambahan informasi kepada masyarakat mengenai penggunaan daun selasih sebagai sumber antioksidan alami.

E. Tujuan Penelitian

1. Mengetahui nilai aktivitas antioksidan fraksi etil asetat ekstrak etanolik daun selasih dengan menggunakan radikal bebas DPPH yang dinyatakan sebagai IC_{50} .
2. Mengetahui kandungan fenolik total pada fraksi etil asetat ekstrak etanolik daun selasih yang dinyatakan dengan massa ekuivalen asam galat.

PLAGIAT MERUPAKAN TINDAKAN TIDAK TERPUJI

BAB II

PENELAAHAN PUSTAKA

A. Selasih

1. Keterangan botani

Selasih (*Ocimum sanctum* L.) termasuk dalam famili Lamiaceae (Syamsuhidayat dan Hutapea, 1991). Selasih merupakan salah satu tanaman berkhasiat yang tidak hanya tumbuh di Indonesia tetapi juga di India, Taiwan, Cina, dan Asia Tenggara. Selasih disebut juga *tulsi*, *tulasi*, *holy basil*, *sacred basil* (Kartesz, 2010).

Deskripsi tanaman selasih adalah sebagai berikut : herba tegak, sangat harum, tinggi 0,6-1,6 m. Batang cokelat, segi empat. Daun tunggal berhadapan, bertangkai, panjang 0,5-2 cm, bulat telur, ujung dan pangkal agak meruncing, permukaan daun agak halus dan bintil-bintik kelenjar, tulang daun menyirip, tepi bergerigi, panjangnya 3,5-7,5 cm, lebar 1,5-2,5 cm, warna hijau keungu-unguan. Bunga: susunan majemuk berkarang atau tandan, terminal, 2,5-14 cm, di ketiak daun ujung, daun pelindung elip atau bulat telur, panjang 0,5-1 cm. Kelopak: 5, berlekatan berbentuk bibir, 1 membentuk bibir atas, bentuk bulat telur 2-3,5 mm, 1 bibir bawah membentuk 4 gigi, sisi luar berambut kelenjar, ungu atau hijau. Mahkota: berbibir 3 bibir atas 2 bibir bawah, panjang tabung 1,5-2 mm, cuping mahkota 3-5 mm, putih. Benang sari: 4, tersisip di dasar mahkota, 2 panjang. Putik: kepala putik bercabang dua, tidak sama. Buah: kelopak ikut menyusun buah, buah tegak dan tertekan, ujung bentuk kait melingkar, panjang kelopak buah

PLAGIAT MERUPAKAN TINDAKAN TIDAK TERPUJI

6-9 mm. Biji: tipe keras, coklat tua, gundul, waktu dibasahi segera membengkak (Sudarsono, Gunawan, Wahyuono, Donatus, Purnomo, 2002).

Deskripsi mikroskopis tanaman selasih adalah sebagai berikut: pada penampang melintang melalui tulang daun tampak epidermis atas terdiri dari satu lapis sel kecil, bentuk empat persegi panjang, warna jernih, dinding tipis, kutikula tipis dan licin. Pada pengamatan tangensial bentuk poligonal, berdinding lurus atau agak berkelok-kelok. Epidermis bawah terdiri dari satu lapis sel kecil bentuk empat persegi panjang warna jernih, dinding tipis, kutikula tipis dan licin. Rambut penutup, bengkok, terdiri dari 2-6 sel. Rambut kelenjar, pendek, terdiri dari 1 sel tangkai dan 2-4 sel kepala, bentuk bundar, tipe Lamiaceae. Jaringan palisade terdiri dari selapis sel bentuk silindrik panjang dan berisi banyak butir klorofil. Jaringan bunga karang, dinding poligonal, dinding samping lurus atau agak berkelok tipis, mengandung butir klorofil. Berkas pembuluh tipe kolateral terdapat jaringan penguat, yaitu kolenkim. Stomata tipe diasitik pada epidermis atas dan bawah (Anonim c, 1995).

2. Kandungan kimia selasih

Selasih memiliki kandungan nutrisi, yaitu : vitamin C, vitamin A, dan mineral seperti kalsium, zink, dan besi. Selasih juga banyak mengandung klorofil dan fitonutrien yang lain. Selasih memiliki kandungan protein 4,2 g; lemak 0,5 g; karbohidrat 2,3 g; kalsium 25 mg; dan fosfor 287 mg (Pattanayak, Behera, Das, dan Panda, 2010).

Daun selasih mengandung: asam kafeat, p-asam kumarat, miresin, rutin, kuersetin. Seluruh herba mengandung minyak menguap yang terdiri dari: 1,8-

PLAGIAT MERUPAKAN TINDAKAN TIDAK TERPUJI

sineol, p-simene, limonen , linalool , metilkaviol, metil sinamat, pinen, saffrol, alfa-terpinen. Selasih juga mengandung senyawa fenolik yang mempunyai aktivitas antioksidan yaitu asam rosmarinat, sirsineol, eugenol, isotimusin, isotimonin, dan juga flavonoid yang larut air yaitu, orientin dan vicienin (Kelm *et al.*, 2000). Berdasarkan penelitian (Wangcharoen dan Morasuk, 2007) selasih (*Ocimum sanctum* L.) diketahui memiliki aktivitas antioksidan dalam jumlah besar. Selain itu, selasih memiliki kandungan total fenolik yang besar, yaitu 48,93 mg/g atau lebih besar dari tanaman obat lain seperti *D gangeticum*, *E alba*, *P longum*, *S nigrum* dan *A caudatus* (Veeru *et al.*, 2009).

3. Khasiat dan kegunaan selasih

Selasih mempunyai beragam khasiat antara lain : analgesik, anthelmintik, anti bakterial, anti katarak, anti fertilitas, anti hiperlipidemi, anti inflamasi, anti lipidperoksidatif, anti oksidan, anti stress, anti tiroid, antitusif, anti ulkus, kemoprotektif, imunomodulator, radioprotektif, aktivitas hipoglikemik, aktivitas hipotensif, dan anti kanker (Dattani, 2008).

Minyak atsiri dan ekstrak etanol daun selasih mampu menghambat pertumbuhan bakteri seperti: *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli*, *Proteus vulgaris*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Bacillus cereus*, *Pseudomonas fluorescens*, *Streptococcus alfa*, dan *Bacillus subtilis*, *Mycobacterium tuberculosis*, Klebsiella, *Proteus*, *Salmonella typhi*, *Shigella*, *Vibrio cholera*, *Neisseria gonorrhoea*; dan jamur seperti: *Aspergillus flavus*, *Candida albicans*, *Rhizopus stolonifera*, dan *Penicillium digitatum* (Geeta, Vasudevan, Kedlaya, Deepa, dan Ballal, 2001).

PLAGIAT MERUPAKAN TINDAKAN TIDAK TERPUJI

Eugenol dan flavonoid mempunyai efek antioksidan, membersihkan radikal bebas dan mencegah pertumbuhan dan penyebaran kanker dengan cara memblok suplai oksigen dan nutrien. Asam ursolat mempunyai aktivitas imunomodulator dan *tissue protector*. Asam ursolat mempunyai aktivitas melawan peroksidasi lipid di mikrosomal hepar. Asam ursolat dan karnosol mempunyai aktivitas inhibisi *Nuclear Factor Kappa B* (NF-KB), menghambat aktivitas tirosinekinase dan ornitin dekarboksilase sehingga berpotensi menghambat proses angiogenesis (Siddique, Ara, Beg, dan Afzal, 2007).

B. Senyawa Fenolik

1. Pengertian senyawa fenolik

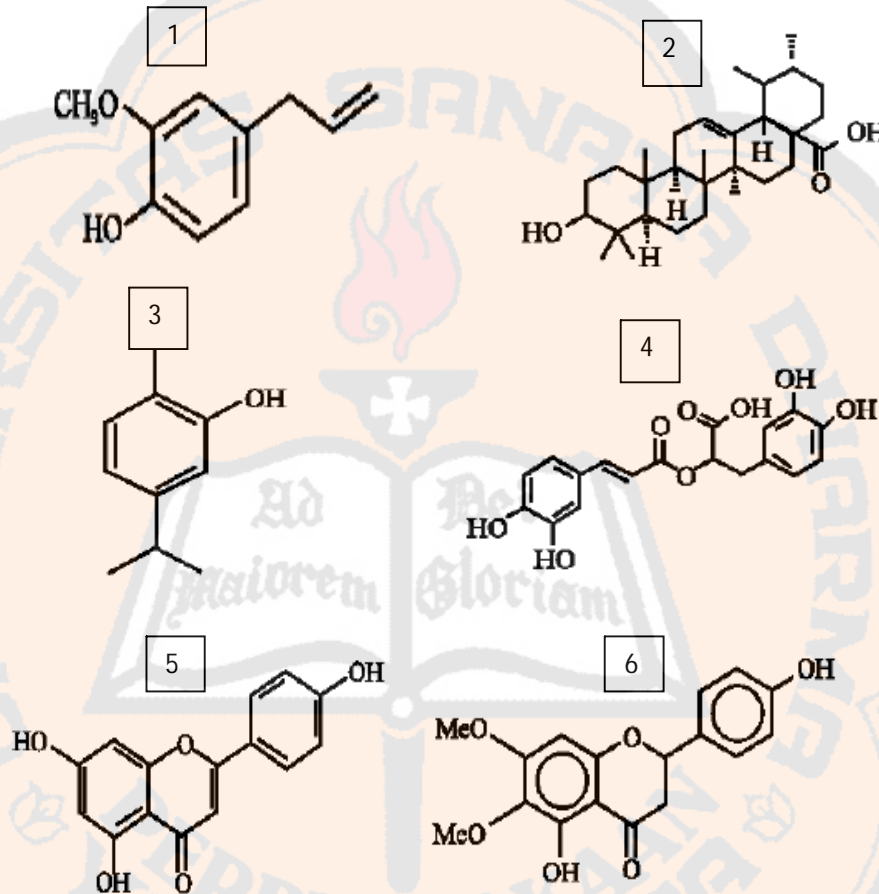
Fenol adalah senyawa dengan suatu gugus OH yang terikat pada cincin aromatik (Fessenden dan Fessenden, 1982). Fenolik merupakan metabolit sekunder yang tersebar dalam tumbuhan. Senyawa fenolik terbentuk dari jalur metabolisme asam sikimat dan fenil propanoid dengan struktur cincin aromatik yang terikat dengan satu atau lebih substituen gugus hidroksil (Pourmorad *et al*, 2006). Senyawa fenolik dalam tumbuhan dapat berupa fenol sederhana, antrakuinon, asam fenolat, kumarin, flavonoid, lignin, dan tanin (Harborne, 1987)

2. Senyawa fenolik dalam selasih

Selasih mengandung berbagai macam konstituen kimia seperti senyawa fenolik, saponin, tanin dan lemak. Senyawa fenolik yang ada dalam selasih antara lain eugenol (1-hidroksi-2 metoksi-4-alilbenzena), asam urosolat (2, 3, 4, 5, 6, 6a, 7, 8, 8a, 10, 11, 12, 13, 14b tetradekahidro-1H-pisene-4a-asam karboksilat),

PLAGIAT MERUPAKAN TINDAKAN TIDAK TERPUJI

karvakrol (5-isopropil-2-metilfenol), asam rosmarinat (3,4-dihidroksiferil-1-okso-2-propil-oksi-3-dihidroksiferil), apigenin (5-7-dihidroksi-2-(4-hidroksiferil)-4H-1-benzopiran-4-one), dan sirsimaritin (5-4-dihidroksi-6,7-dimetoksiflvon) (Rahman, 2011).



Gambar 1. Senyawa fenolik dalam selasih (1. Eugenol, 2. Asam urosolat, 3. Karvakrol, 4. Asam rosmarinat, 5. Apigenin, 6. Sirsimaritin) (Rahman, S., 2011)

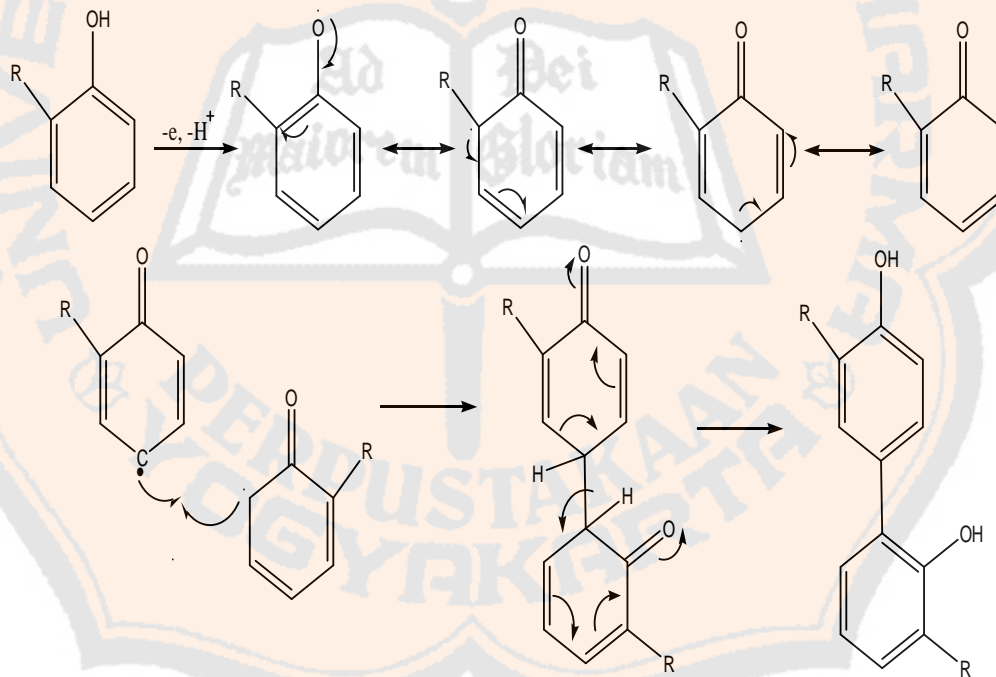
3. Sifat antioksidan senyawa fenolik

Senyawa fenolik merupakan sumber antioksidan alami yang aman digunakan sehingga menjadi senyawa bioaktif dari suatu tumbuhan. Oleh karena itu, pada perkembangan penelitian akhir-akhir ini, perhatian peneliti telah tertuju pada identifikasi tumbuhan yang memiliki aktivitas antioksidan yang dapat

PLAGIAT MERUPAKAN TINDAKAN TIDAK TERPUJI

digunakan untuk konsumsi manusia sehari-hari (Ebrahimzadeh, Pourmorad, dan Hafezi, 2007).

Mekanisme aksi senyawa fenolik sebagai antioksidan adalah melalui kemampuan gugus fenol untuk menangkap radikal bebas dengan memberikan atom hidrogennya melalui proses transfer elektron, sehingga fenol berubah menjadi radikal fenoksil (Janeiro dan Brett, 2004). Sifat antioksidan senyawa fenolik meningkat sesuai dengan reaktivitasnya sebagai donor elektron atau hidrogen dan kemampuannya dalam mengkhelat logam transisi serta kemampuan radikal derivat fenolik untuk menstabilkan dan mendelokalisasikan elektron tidak berpasangan (Rice-Evans, Miller, dan Panganga, 1997).



Gambar 2. Reaksi pembentukan dan penggabungan radikal fenoksil (Bruneton, 1999)

PLAGIAT MERUPAKAN TINDAKAN TIDAK TERPUJI

4. Penyarian senyawa fenolik

Senyawa fenolik umumnya paling larut dalam cairan penyari yang kurang polar dari air. Pemilihan pelarut yang disarankan adalah campuran air dan metanol, etanol, atau aseton (Waterman dan Mole, 1994). Golongan terbanyak dari senyawa fenolik adalah flavonoid. Flavonoid mempunyai sejumlah gugus hidroksil yang tidak tersubstitusi, atau suatu gula, maka flavonoid merupakan senyawa polar yang cukup larut dalam pelarut polar seperti etanol, metanol, butanol, aseton, dan air. Adanya gula yang terikat pada flavonoid cenderung menyebabkan flavonoid lebih mudah larut dalam air dengan demikian campuran pelarut tersebut dengan air merupakan pelarut yang lebih baik untuk glikosida. Sebaliknya, untuk senyawa yang kurang polar seperti isoflavon, flavanon, flavon, dan flavonol akan cenderung lebih mudah larut dalam pelarut seperti eter dan kloroform (Markham, 1988).

Memisahkan senyawa fenolik dari zat pengotor dalam tanaman dan memisahkan aglikon dari glikosida dapat dilakukan dengan metode fraksinasi dengan penyarian bertahap. Untuk memisahkan klorofil, lemak, dan senyawa non polar lainnya dapat digunakan fraksinasi dengan menggunakan petroleum eter. Sedangkan fraksinasi dengan menggunakan etil asetat dapat memisahkan flavonoid dengan bentuk aglikon dengan flavonoid yang terikat gula (glikosida). Berdasarkan kelarutan flavonoid yang terikat gula akan terdistribusi ke fraksi air dan flavonoid aglikon masuk ke fraksi etil asetat (Robinson, 1995).

PLAGIAT MERUPAKAN TINDAKAN TIDAK TERPUJI

5. Penentuan kandungan senyawa fenolik total

Metode Folin-Ciocalteu merupakan oksidasi atau reduksi kolorimetrik untuk mengukur semua senyawa fenolik. Pereaksi Folin-Ciocalteu merupakan larutan kompleks ion polimerik yang dibentuk dari asam fosfomolibdat dan asam heteropolifosfotungstat. Pereaksi ini terbuat dari air, natrium tungstat, natrium molibdat, asam fosfat, asam klorida, litium sulfat, dan brom (Folin dan Ciocalteu, 1944).

Dasar metode Folin-Ciocalteu adalah oksidasi gugus fenolik-hidroksil. Pereaksi ini mengoksidasi fenolat serta mereduksi asam heteropoli menjadi suatu kompleks *molybdenum-tungsten* (Mo-W). Selama reaksi berlangsung, gugus fenolik-hidroksil bereaksi dengan pereaksi Folin-Ciocalteu membentuk kompleks fosfotungstat-fosfomolibdat berwarna biru dengan struktur yang belum diketahui dan dapat di deteksi dengan spektrofotometer dalam rentang panjang gelombang 500nm – 750 nm (Jansoon, 2003).

C. Metode Penyarian

1. Pengertian penyarian

Penyarian merupakan suatu peristiwa perpindahan massa zat aktif yang semula berada di dalam sel kemudian ditarik oleh cairan penyari sehingga zat aktif larut dalam cairan penyari. Pada umumnya penyarian akan bertambah baik jika permukaan simplisia yang bersentuhan dengan penyari semakin luas (Harborne, 1987).

PLAGIAT MERUPAKAN TINDAKAN TIDAK TERPUJI

2. Jenis metode penyarian

Ada beberapa macam jenis metode penyarian, yaitu :

a. Maserasi

Maserasi merupakan cara penyarian yang sederhana. Maserasi dilakukan dengan cara merendam serbuk simplisia dalam cairan penyari sehingga cairan penyari akan menembus dinding sel dan masuk ke dalam rongga sel yang mengandung zat aktif di dalam sel dengan yang di luar sel mengakibatkan pendesakan larutan terpekat dari dalam sel ke luar sel. Peristiwa tersebut berulang sehingga terjadi keseimbangan konsentrasi antara larutan di luar sel dan di dalam sel. Dapat dilakukan modifikasi terhadap teknik maserasi, misalnya teknik remaserasi. Pada teknik ini, cairan dibagi menjadi dua kemudian seluruh serbuk simplisia dimaserasi dengan cairan penyari pertama, sesudah dienaptuangkan dan diperas, ampas dimaserasi lagi dengan cairan penyari kedua (Anonim, 1986).

Keuntungan maserasi adalah dapat diaplikasikan dalam sampel dalam jumlah sedikit, atau dengan batch tertentu (List dan Schmidt, 2000), cara pengerjaan dan peralatan yang digunakan sederhana dan mudah dilakukan. Kerugiannya adalah pengerjaannya lama dan penyariaannya kurang efektif (Anonim, 1986).

b. Perkolasi

Perkolasi merupakan cara penyarian yang dilakukan dengan mengalirkan cairan penyari melalui serbuk simplisia yang telah terbasahi. Cairan penyari akan mengalir dari atas ke bawah melalui serbuk kemudian cairan akan melarutkan zat aktif di dalam sel yang dilalui sampai mencapai keadaan jenuh. Serbuk simplisia

PLAGIAT MERUPAKAN TINDAKAN TIDAK TERPUJI

yang akan diperkolasi dibasahi terlebih dahulu dengan cairan penyari kemudian dimasukkan sedikit demi sedikit ke dalam alat perkolasi (perkolator) sambil tiap kali ditekan. Serbuk kemudian ditutup dengan kertas saring dan cairan penyari dialirkan hingga di atas permukaan serbuk masih terdapat lapisan penyari. Setelah 24 jam, kran dibuka dan diatur hingga kecepatan tetesannya adalah 1 mL permenit. Akhir proses perkolasi ditentukan dengan pemeriksaan zat secara kualitatif pada perkolat terakhir (Anonim, 1986).

Prinsip dari perkolasi sama dengan maserasi yaitu keseimbangan konsentrasi yang terdapat dalam ekstrak dengan yang terdapat dalam simplisia yang disari. Sehingga untuk memperoleh hasil ekstrak yang sempurna perlu ditambahkan pelarut baru lagi. Kelemahan metode ini yaitu waktu yang dibutuhkan cukup lama, membutuhkan pelarut yang cukup banyak. Perkolasi biasanya digunakan untuk menyari simplisia yang keras dan kompak (Seidal, 2006).

c. Infundasi

Infundasi merupakan proses penyarian yang umumnya digunakan untuk menyari zat kandungan aktif yang larut dalam air dari vahan-bahan nabati. Sari yang dihasilkan tidak stabil dan mudah tercemari oleh kapang dan kuman. Oleh karena itu, sari yang diperoleh dengan cara ini tidak boleh disimpan lebih dari 24 jam. Infundasi dibuat dengan cara menyari simplisia dengan air pada suhu 90⁰C selama 15 menit (Anonim, 1986).

d. Penyarian dengan Soxhlet

Penyarian dengan Soxhlet merupakan salah satu penyarian berkesinambungan menghasilkan ekstrak cair yang dilanjutkan dengan proses

PLAGIAT MERUPAKAN TINDAKAN TIDAK TERPUJI

penguapan. Prinsipnya uap cairan penyari naik ke atas melalui pipa samping, kemudian diembunkan kembali oleh pendingin tegak. Cairan turun ke labu melalui tabung yang berisi serbuk simplisia. Cairan penyari sambil turun melarutkan zat aktif serbuk simplisia. Karena adanya sifon maka setelah cairan mencapai permukaan sifon, seluruh cairan akan kembali ke labu (Anonim, 1986).

Keuntungan penyarian dengan Soxhlet antara lain cairan penyari yang diperlukan jumlahnya sedikit dan secara langsung hasil yang diperoleh lebih pekat, serbuk simplisia disari oleh cairan penyari yang murni maka dapat menyari zat aktif lebih banyak. Kerugian penyarian dengan Soxhlet yaitu larutan ekstrak dipanaskan secara terus menerus sehingga zat aktif yang tidak tahan pemanasan kurang cocok bila disari dengan teknik ini (Voigt, 1995).

e. Ekstraksi cair-cair

Ekstraksi cairan-cairan merupakan suatu teknik dimana suatu larutan (biasanya air) dibuat bersentuhan dengan suatu pelarut kedua (biasanya pelarut organik), sehingga menimbulkan perpindahan satu atau lebih zat terlarut ke dalam pelarut yang kedua. Pada prinsipnya, kedua pelarut yang digunakan tidak saling tercampurkan atau dengan kata lain, keduanya dapat dipisahkan. Metode ekstraksi cairan-cairan yang sering digunakan adalah menggunakan alat corong pisah, dimana kedua pelarut yang tidak saling campur dimasukkan ke dalam corong pisah dan dilakukan penggojogan selama beberapa menit (Bassett *et al.*, 1991).

3. Cairan penyari

Cairan penyari yang baik adalah pelarut yang dapat melarutkan zat aktif dari ekstrak dengan demikian ekstrak bebas dari senyawa yang tidak diinginkan.

PLAGIAT MERUPAKAN TINDAKAN TIDAK TERPUJI

Faktor yang dipertimbangkan dalam pemilihan cairan penyari adalah selektivitas, kemudahan bekerja dan proses dengan cairan tersebut, ekonomis, ramah lingkungan dan aman (Anonim, 2000). Kriteria cairan penyari yang baik adalah murah dan mudah didapat, stabil secara fisika dan kimia, netral, tidak mudah menguap atau terbakar, selektif, tidak mempengaruhi zat berkhasiat, dan diperbolehkan oleh peraturan (Anonim, 1986).

Pelarut yang diperbolehkan sesuai peraturan yang berlaku adalah air, etanol, dan campuran etanol air, methanol (dan yang segolongan), kloroform, eter, heksan, aseton (Anonim, 2000). Etanol dapat melarutkan alkaloid basa, minyak menguap, glikosida kurkumin, antrakinon, flavonoid, steroid, dammar, dan klorofil. Lemak, malam, tannin, saponin hanya sedikit larut dalam etanol. Campuran etanol dan air dapat digunakan untuk meningkatkan penyarian (Anonim, 1986).

4. Efektifitas penyarian

Keefektifan dari proses ekstraksi ini dinyatakan dalam suatu tetapan yang dikenal dengan nama koefisien distribusi (KD). Menurut Nernst, KD dapat dinyatakan sebagai rasio antara konsentrasi zat terlarut dalam pelarut pertama dan konsentrasi zat terlarut dalam pelarut kedua, dengan syarat bahwa keadaan molekulnya sama dalam kedua cairan dan temperaturnya adalah konstan (Bassett *et al.*, 1991).

Terkait dengan ekstraksi cairan-cairan, permasalahan baru muncul, yakni menentukan cara yang paling efisien untuk memindahkan suatu zat ke pelarut yang kedua. Dinyatakan bahwa satu ekstraksi tunggal sejumlah volume tertentu

PLAGIAT MERUPAKAN TINDAKAN TIDAK TERPUJI

pelarut pertama dengan menggunakan sejumlah volume tertentu pelarut kedua, hasilnya kurang efisien bila dibandingkan dengan beberapa kali ekstraksi menggunakan volume yang sama. Hal ini sesuai dengan rumus:

$$= \frac{D}{D + V}$$

Dimana D adalah koefisien distribusi antara dua pelarut, w adalah bobot zat yang tertinggal pada pelarut 1, w_1 adalah bobot zat yang terlarut pada pelarut 1, V adalah volume pelarut 1, dan v adalah volume pelarut 2, serta n adalah banyaknya ekstraksi yang dilakukan (n kali). Dari rumus tersebut, apabila jumlah ekstraksi semakin banyak (nilai n semakin besar) maka nilai w akan semakin kecil. Dengan kata lain, bobot zat yang tertinggal pada pelarut 1 semakin kecil dan zat lebih banyak yang tersari ke pelarut 2, yang artinya proses ekstraksi lebih efektif bila dibandingkan dengan satu ekstraksi tunggal (Bassett *et al.*, 1991).

D. Antioksidan

1. Definisi antioksidan

Definisi antioksidan secara umum adalah senyawa yang melawan oksidasi atau menghambat reaksi yang dipicu oleh oksigen atau peroksida. Kebanyakan senyawa ini (misalnya tokoferol) digunakan sebagai pengawet dalam berbagai produk (misalnya dalam lemak, minyak dan produk makanan untuk menunda ketengikan dan perubahan-perubahan yang tidak diinginkan, dalam karet untuk menunda oksidasi) (Huang, Ou, dan Prior, 2005).

Antioksidan juga dapat didefinisikan sebagai senyawa yang apabila dalam konsentrasi rendah berada bersama substrat yang dapat teroksidasi, dapat menunda atau menghambat oksidasi senyawa tersebut (Halliwell, 1994).

2. Mekanisme antioksidan

Secara garis besar, mekanisme penangkapan radikal bebas dapat dibedakan menjadi dua macam, yaitu secara enzimatik dan non-enzimatik. Enzim yang dapat berperan sebagai antioksidan adalah superoksid dismutase (SOD); glutathion peroksidase, katalase, tioredoksin reduktase dan peroksiredoksin (Masella, Benedetto, Vart, Filles, dan Giovanni, 2005). Secara non-enzimatik, senyawa antioksidan bekerja melalui empat cara, yaitu sebagai :

- a. Penangkap radikal bebas, misalnya vitamin C dan vitamin E.
- b. Pengkelat logam transisi, misalnya EDTA.
- c. Inhibitor enzim oksidatif, misalnya aspirin dan ibuprofen.
- d. Kofaktor enzim antioksidan, misalnya selenium sebagai kofaktor glutathion peroksidase (Huang *et al.*, 2005).

Aktivitas senyawa polifenol (flavonoid) sebagai antioksidan meliputi tiga mekanisme sebagai berikut :

- (a) Aktivitas penangkapan radikal seperti reactive oxygen species (ROS) ataupun radikal yang dihasilkan dari peroksidasi lipid seperti R', RO' dan ROO' dengan proses transfer elektron melalui atom hidrogen.
- (b) Mencegah spesies senyawa reaktif produksi katalisis transisi metal seperti reaksi melalui khelasi metal.

(c) Interaksi dengan antioksidan lainnya, seperti lokalisasi dan penggabungan dengan antioksidan lainnya (Niki dan Noguchi, 2000).

3. Penggolongan antioksidan

Antioksidan dan peredam radikal bebas biologis dapat digolongkan sebagai berikut (Grieb, 1992):

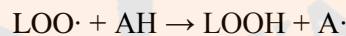
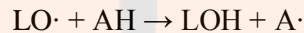
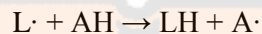
a. Berdasarkan sasaran

1) *Preventative antioxidant*

Adalah antioksidan yang dapat mencegah terbentuknya oksidan dan mencegah tertimbunnya oksidan. Misalnya : superoksida dismutase (SOD), katalase, bermacam-macam enzim peroksidase (misalnya glutathion peroksidase), dan senyawa yang mengandung gugusan sulfidril (glutathion, sistein, dan kaptopril).

2) *Chain-breaking antioxidant*

Mekanismenya sebagai berikut :



Antioksidan (AH) akan mencegah dua tahapan meliputi tahapan inisiasi terjadi ketika radikal beraksi dengan Lipid (L) dan proses propagasi (beraksi dengan alkoksi (LO·) ataupun peroksil (LOO·) (Madhavi *et al.*, 1996).

b. Berdasarkan mekanisme kerja

1) Antioksidan enzimatik

PLAGIAT MERUPAKAN TINDAKAN TIDAK TERPUJI

Misalnya : katalase (CAT), superoksida dismutase (SOD), dan glutation peroksidase (GSH-Px).

2) Antioksidan non-enzimatik

Misalnya: vitamin E (α -tokoferol), vitamin C (asam askorbat), dan β -karoten.

c. Berdasarkan sifat-sifat fisiko-kimia

1) Antioksidan hidrofilik

Antioksidan hidrofilik, yaitu antioksidan yang bekerja dalam sitosol dan cairan ekstrasel, misalnya: vitamin C, asam urat, glutation, sistein, kreatinin.

2) Antioksidan lipofilik

Antioksidan lipofilik, yaitu antioksidan yang bekerja pada membran sel (terlarut dalam lipid membran), misalnya: vitamin E, β -karoten, ubikuinol, bilirubin, protein pengikat logam (transferin, laktoferin, seruloplasmin, dan albumin).

d. Berdasarkan sumbernya

1) Antioksidan sintetis

Antioksidan sintetis merupakan antioksidan yang dibuat melalui sintesis secara kimia, contohnya: *ter-butyl hydroquinone (tBHQ)*, *butylated hydroxyanisole (BHA)*, *butylated hydroxytoluene (BHT)*, dan propil galat (PG) (Gulcin, *et al.*, 2004).

2) Antioksidan alami

Antioksidan alami merupakan antioksidan yang diproduksi langsung oleh tanaman maupun tubuh, contohnya: senyawa polifenol flavonoid, tanin, katalase

PLAGIAT MERUPAKAN TINDAKAN TIDAK TERPUJI

dan glutathion peroksidase yang bekerja dengan cara mengubah H_2O_2 menjadi H_2O dan O_2 (Pervical, 1998).

4. Metode pengujian daya antioksidan

Terdapat beberapa metode pengujian aktivitas antioksidan baik secara kualitatif maupun secara kuantitatif. Uji kualitatif untuk mengetahui apakah suatu senyawa memiliki aktivitas antioksidan dapat dilakukan dengan metode kromatografi baik kromatografi lapis tipis atau kromatografi kertas. Metode ini dapat untuk memisahkan campuran antioksidan yang kompleks sekalipun. Pereaksi semprot yang digunakan untuk mendeteksi dapat dibedakan menjadi empat kelompok, yaitu:

- a. senyawa-senyawa yang dapat membentuk warna ketika tereduksi (kalium permanganat, ferri-sianida, ferri-dipiridil, dan asam fosfomolibdat);
- b. senyawa yang dapat berikatan dengan senyawa fenol, seperti senyawa diazo pereaksi diazo magnesium sulfat aldehyd aromatik-anisaldehyd, vanilin dan peraksi Gibbs yang membentuk indofenol (akan membentuk garam berwarna dalam kondisi basa);
- c. radikal bebas stabil yang menerima radikal hidrogen dari antioksidan (1,1-difenil-2-pikrilhidrazil);
- d. senyawa-senyawa yang membentuk senyawa adisi yang berwarna (palladium klorida dan pentadium klorida) (Davidek, 1997).

Uji aktivitas antioksidan dapat dilakukan secara spektrofotometri.

Beberapa uji kuantitatif untuk mengetahui aktivitas suatu antioksidan antara lain :

PLAGIAT MERUPAKAN TINDAKAN TIDAK TERPUJI

1. Pengujian penangkapan radikal (*radical scavenging test*)

Dilakukan dengan cara mengukur penangkapan radikal sintetik dalam pelarut organik polar seperti metanol atau etanol dalam suhu kamar. Radikal sintetik yang sering digunakan adalah DPPH (1,1-difenil-2-pikrilhidrazil). Dasarnya adalah kemampuan suatu senyawa untuk menangkap radikal DPPH. DPPH memberikan warna violet pada panjang gelombang 517 nm. Penangkapan radikal bebas menyebabkan elektron menjadi berpasangan yang kemudian menyebabkan penghilangan warna yang sebanding dengan jumlah elektron yang diambil.

2. Pengujian aktivitas antioksidan dengan sistem linoleat tiosianat

Dasar : pengukuran intensitas warna kompleks feritiosianat yang terbentuk dari reaksi ion feri dengan amonium tiosiana. Ion feri terbentuk dari oksidasi ion fero oleh peroksida yang berasal dari oksidasi asam linoleat. Kompleks feritiosianat yang berwarna merah diukur absorbansinya pada panjang gelombang 490 nm. Semakin tinggi absorbansinya (warna merah yang terbentuk semakin pekat) menunjukkan semakin banyak peroksida yang terbentuk. Dengan adanya senyawa yang berperan sebagai antioksidan intensitas warna yang terbentuk semakin rendah.

3. Pengujian dengan asam tiobarbiturat

Dasar uji ini adalah reaksi malondialdehid dengan asam tiobarbiturat menghasilkan kromogen merah muda yang dapat diukur absorbansinya pada panjang gelombang 532 nm. Malondialdehid terbentuk dari asam lemak bebas tidak jenuh dengan paling sedikit mempunyai tiga ikatan rangkap. Adanya

PLAGIAT MERUPAKAN TINDAKAN TIDAK TERPUJI

senyawa yang bersifat antioksidan akan menghambat terbentuknya malondialdehid dari asam lemak bebas tidak jenuh.

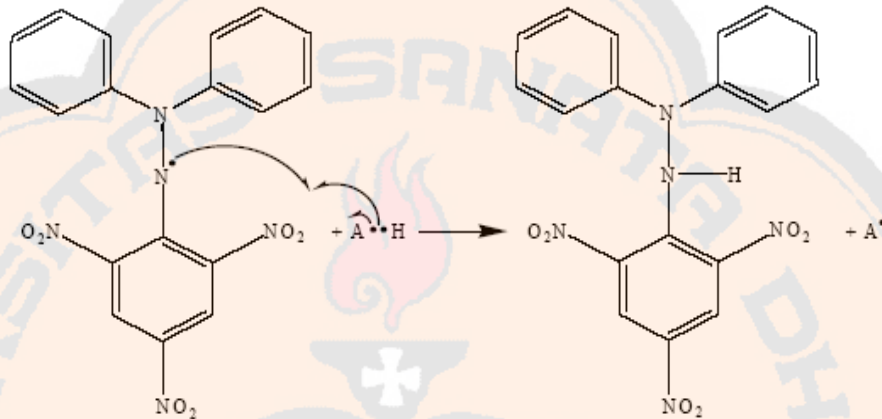
4. Pengujian dengan sistem β -karoten-linoleat

Pengujian ini dilakukan dengan mengamati kecepatan pemucatan warna β -karoten. Karotenoid dapat meredam oksigen yang reaktif menghasilkan oksigen yang lebih stabil. Energi dari oksigen tersebut dipindahkan ke senyawa karotenoid. Energi tersebut dilepaskan melalui interaksi rotasional dan vibrasional antara karotenoid dengan pelarut untuk mengembalikan karotenoid ke *ground state* (Davidek, 1997).

E. Metode *1,1-Diphenyl-2-Pycrylhydrazyl* (DPPH)

Radikal bebas yang umumnya digunakan sebagai model dalam penelitian antioksidan atau peredam radikal bebas adalah 1,1-difenil-2-pikrilhidrazil (DPPH) (Windono, 2001). Radikal DPPH adalah suatu senyawa organik yang mengandung nitrogen tidak stabil dengan absorbansi kuat pada λ max 517 nm dan berwarna ungu gelap. Setelah bereaksi dengan senyawa antioksidan, DPPH tersebut akan tereduksi dan warnanya akan berubah menjadi kuning. Perubahan tersebut dapat diukur dengan spektrofotometer, dan diplotkan terhadap konsentrasi (Molyneux, 2004). Penurunan intensitas warna yang terjadi disebabkan oleh berkurangnya ikatan rangkap terkonjugasi pada DPPH. Hal ini dapat terjadi apabila adanya penangkapan satu elektron oleh zat antioksidan, menyebabkan tidak adanya kesempatan elektron tersebut untuk beresonansi. Perubahan absorbansi akibat reaksi ini telah digunakan secara luas untuk menguji

kemampuan beberapa molekul sebagai penangkap radikal bebas (Dinis, 1994). DPPH merupakan metode yang mudah, cepat, dan sensitif untuk pengujian aktivitas antioksidan senyawa tertentu atau ekstrak tanaman, selain itu metode ini terbukti akurat, reliabel dan praktis (Koleva *et al.*, 2002).



Gambar 3. Reaksi Radikal DPPH dengan Antioksidan (Windono, 2001).

F. Validasi Metode Analisis

1. Pengertian validasi metode analisis

Validasi metode analisis merupakan serangkaian prosedur yang digunakan untuk membuktikan apakah suatu metode analisis yang kita gunakan tersebut sesuai yang kita harapkan dengan akurasi dan presisi yang memadai. Metode analisis instrument merupakan metode yang terpilih dan memadai untuk mengantisipasi persoalan analisis, yaitu sangat kecilnya kadar senyawa yang dianalisis dan kompleksnya matriks sampel yang dianalisis (Mulja dan Suherman, 1995).

PLAGIAT MERUPAKAN TINDAKAN TIDAK TERPUJI

2. Parameter validasi metode

Parameter-parameter validasi metode analisis meliputi :

a. Akurasi

Akurasi dapat diartikan sebagai kedekatan hasil analisis yang diperoleh menggunakan metode analisis tertentu dengan nilai yang sebenarnya. Hal tersebut diperoleh dengan cara membandingkan kadar terukur dari sejumlah tertentu senyawa standar yang sengaja ditambahkan ke dalam sampel dengan jumlah tertentu pula. Harga perbandingan tersebut disebut *recovery* (Anonim b, 1995).

Untuk bahan obat dengan kadar kecil, biasanya disepakati 90-110 %, akurasi untuk kadar obat yang lebih besar biasanya disepakati 95-105%, sedang untuk rentang akurasi 80-120% masih bisa diterima (Mulja dan Hanwar, 2003).

Tabel I. Rentang akurasi yang masih dapat diterima

Analit pada matrik sampel (%)	Rata-rata yang diperoleh (%)
100	98-102
>10	98-102
>1	97-103
>0,1	95-105
0,01	90-107
0,001	90-107
0,000.1 (1 ppm)	80-110
0,000.01 (100 ppb)	80-110
0,000.001 (10 ppb)	60-115
0,000.0001 (1 ppb)	40-120

(Harmita, 2004)

b. Presisi

Presisi adalah pencaran hasil yang diperoleh dari analisis berulang kali pada suatu sampel yang homogeny yang dinyatakan sebagai koefisien variansi (KV). Suatu metode dikatakan memberikan presisi yang bagus jika $KV < 2\%$, sedang

PLAGIAT MERUPAKAN TINDAKAN TIDAK TERPUJI

untuk bioanalisis KV=15-20% masih dapat diterima (Mulja dan Hanwar, 2003). Harga KV ini juga tergantung dari besar kecilnya kadar zat yang dianalisis, jenis zat yang dianalisis, dan kecanggihan alat yang digunakan untuk analisis. Untuk menentukan presisi suatu metode analisis diperlukan penentuan berulang kali dengan prosedur yang sama (Mulja dan Suherman, 1995).

Tabel II. Rentang KV yang masih dapat diterima

Analit pada matrik sampel (%)	KV (%)
>1	2,5
0,001	5
0,000.1 (1 ppm)	16
0,000.000.1 (1 ppb)	32

(Harmita, 2004).

c. Spesifisitas

Spesifisitas dapat diartikan sebagai kemampuan dari suatu metode analisis untuk mengukur keberadaan analit dalam sampel secara tepat dan spesifik. Spesifisitas memberikan gambaran derajat gangguan oleh sampel terhadap hasil pengukuran analit (Anonim b, 1995).

d. Linearitas

Linearitas dari suatu prosedur analisis merupakan kemampuan (pada rentang tertentu) untuk mendapatkan hasil uji yang secara langsung proporsional dengan konsentrasi (jumlah) analit di dalam sampel. Persyaratan data linearitas yang bisa diterima jika memenuhi nilai koefisien korelasi (r) > 0,999 (Mulja dan Suherman, 1995).

e. Sensitivitas

LOD (*Limit of Detection*) merupakan konsentrasi analit terkecil dalam sampel yang masih dapat dideteksi tetapi tidak secara kuantitatif. Penentuan LOD dengan cara membandingkan respon dari pengukuran analit terhadap respon blanko. Konsentrasi analit yang mampu memberikan respon 2-3 kali respon blanko inilah yang kemudian ditetapkan sebagai LOD (Anonim b, 1995).

LOQ (*Limit of Quantitation*) merupakan konsentrasi analit terkecil dalam sampel yang masih dapat dianalisis dengan hasil penentu kualitatif yang menuju akurasi yang memadai. Penentuan LOQ pada metode instrument dengan cara membandingkan respon dari pengukuran analit terhadap respon blanko konsentrasi analit yang mampu memberikan respon 10 kali respon blanko inilah yang ditetapkan sebagai LOQ (Anonim b, 1995).

f. Range

Range adalah interval antara kadar terendah sampai kadar tertinggi dari analit yang dapat diukur secara kuantitatif menggunakan metode analisis tertentu dan menghasilkan satuan yang sama dengan satuan yang digunakan pada hasil analisis (misal: persen, ppm) (Anonim b, 1995).

3. Kategori metode analisis

Kategori uji umum yang harus memenuhi validasi data, yaitu :

a. Kategori I

Kategori I ini meliputi metode-metode analitik yang digunakan untuk mengukur secara kuantitatif sejumlah besar komponen dari serbuk obat atau senyawa aktif (termasuk bahan pengawet) dalam sediaan obat atau senyawa alam.

PLAGIAT MERUPAKAN TINDAKAN TIDAK TERPUJI

b. Kategori II

Kategori II meliputi metode-metode analitik yang digunakan untuk penentuan kemurnian dalam serbuk obat atau penentuan senyawa degradasi dalam sediaan obat jadi.

c. Kategori III

Kategori III meliputi metode-metode analitik yang digunakan untuk penentuan sifat-sifat khusus seperti kecepatan disolusi dan pelepasan obat (Anonim b, 1995).

Parameter-parameter validasi yang harus dipenuhi pada masing-masing kategori dapat dilihat pada table III.

Tabel III. Parameter validasi metode

Parameter analitik	Kategori I	Kategori II		Kategori III
		Uji kuantitatif	Uji kualitatif	
Akurasi	Ya	Ya	*	*
Presisi	Ya	Ya	Ya	Ya
Spesifikasi	Ya	Ya	Ya	*
LOD	Tidak	Tidak	Ya	*
LOQ	Tidak	Ya	Tidak	*
Linearitas	Ya	Ya	Tidak	*
Range	Ya	Ya	*	*

* Mungkin diperlukan, tergantung sifat uji spesifik

(Anonim b, 1995).

G. Landasan Teori

Antioksidan merupakan senyawa yang dapat menetralkan atau meredam radikal bebas. Radikal bebas merupakan atom atau molekul yang memiliki satu atau lebih elektron yang tidak berpasangan yang dapat menarik elektron dari

PLAGIAT MERUPAKAN TINDAKAN TIDAK TERPUJI

senyawa lain sehingga terbentuk radikal bebas yang baru dan menyebabkan terjadinya reaksi berantai.

Peranan antioksidan sangat penting dalam meredam efek radikal bebas yang berkaitan erat dengan terjadinya penyakit degeneratif seperti tekanan darah tinggi, jantung koroner, diabetes, dan kanker yang didasari oleh proses biokimiawi dalam tubuh. Reaksi radikal bebas secara umum dapat dihambat oleh antioksidan tertentu baik alami maupun sintesis. Sebagian besar antioksidan alami berasal dari tanaman, antara lain berupa senyawa tokoferol, karotenoid, asam askorbat, fenolik, dan flavonoid.

Selasih adalah tanaman yang cukup mudah ditemukan di Indonesia terutama di Jawa. Tumbuhan ini juga banyak digunakan untuk pengobatan tradisional Ayurveda untuk mengobati infeksi, penyakit kulit, demam, batuk, malaria, dan antidot untuk gigitan ular. Berdasarkan berbagai penelitian selasih (*Ocimum sanctum* L.) diketahui memiliki aktivitas antioksidan dalam jumlah besar. Selain itu, selasih memiliki kandungan total fenolik yang besar, yaitu 48,93 mg/g. Senyawa fenolik diketahui mempunyai aktivitas antioksidan karena mampu menghambat reaksi oksidasi melalui mekanisme penangkapan radikal (*radical scavening*) dengan cara menyumbangkan satu elektron pada elektron yang tidak berpasangan dengan radikal bebas sehingga banyaknya radikal bebas dapat berkurang.

Adanya kandungan senyawa fenolik dalam selasih yang telah diketahui dapat beraktivitas sebagai antioksidan, diharapkan tanaman ini dapat beraktivitas sebagai antioksidan.

H. Hipotesis

Fraksi etil asetat ekstrak etanolik daun selasih (*Ocimum sanctum* L.) mempunyai aktivitas antioksidan menggunakan radikal bebas DPPH.



BAB III

METODOLOGI PENELITIAN

A. Jenis dan Rancangan Penelitian

Penelitian ini merupakan jenis penelitian eksperimental karena subjek uji diberi perlakuan.

B. Variabel

1. Variabel bebas berupa konsentrasi fraksi etil asetat ekstrak etanolik daun selasih.
2. Variabel tergantung berupa aktivitas antioksidan dan kandungan fenolik total fraksi etil asetat ekstrak etanolik daun selasih.
3. Variabel pengacau terkendali berupa tempat tumbuh tanaman, waktu pemanenan, umur tanaman, dan cara panen.
4. Variabel pengacau tidak terkendali berupa cahaya matahari, keadaan tanah, suhu, kelembaban udara, curah hujan, dan cuaca.

C. Definisi Operasional

1. Ekstrak etanolik daun selasih adalah sari hasil proses maserasi daun selasih dengan penyari etanol.
2. Fraksi etil asetat adalah hasil fraksinasi ekstrak etanol daun selasih dengan menggunakan pelarut etil asetat.

PLAGIAT MERUPAKAN TINDAKAN TIDAK TERPUJI

3. Persen *inhibition concentration* (%*IC*) adalah persen yang menyatakan kemampuan fraksi etil asetat ekstrak etanolik daun selasih untuk menangkap radikal DPPH.
4. Persen *inhibition concentration* 50 (*IC*₅₀) adalah nilai konsentrasi fraksi etil asetat ekstrak etanolik daun selasih yang menghasilkan penangkapan 50% radikal DPPH.

D. Bahan dan Alat Penelitian

1. Bahan penelitian

Bahan yang digunakan dalam penelitian ini adalah: daun selasih (*Ocimum sanctum* L.) yang diambil dari daerah Selarong (Yogyakarta); akuades (Laboratorium Kimia Analisis Instrumental Fakultas Farmasi Universitas Sanata Dharma); bahan kualitas *p.a.* E. Merck, yaitu: metanol, bahan kualitas *p.a.* Sigma Chem. Co., USA, yaitu: DPPH, reagen Folin-Ciocalteu, dan rutin; bahan kualitas teknis Brataco Chemica, yaitu: wasbensin dan etil asetat; bahan kualitas teknis CV. General Labora, yaitu: metanol; dan *aluminium foil*.

2. Alat penelitian

Alat yang digunakan dalam penelitian ini adalah: neraca analitik (Scaltec SBC 22, BP 160P), *vacuum rotary evaporator* (Junke & Kunkel), *waterbath* (labo-tech, Heraeus), *vortex* (Janke & Kunkel), spektrofotometer UV-Vis (Perkin Elmer Lamda 20), corong *Buchner*, *oven*, mikropipet 10-1000 μ L; 1-10 mL (Acura 825, Socorex), tabung reaksi bertutup, dan alat-alat gelas yang lazim digunakan di laboratorium analisis (Pyrex-Germany dan Iwaki).

E. Tatacara Penelitian

1. Determinasi tumbuhan

Determinasi tanaman selasih dilakukan di Laboratorium Farmakognosi-Fitokimia, Fakultas Farmasi Universitas Sanata Dharma .

2. Pengumpulan bahan

Tanaman selasih diperoleh dari daerah Selarong (Yogyakarta). Pengumpulan pada musim kemarau bulan September. Pemanenan dilakukan pada tanaman yang menjelang berbunga saat pagi hari.

3. Preparasi sampel

Daun selasih segar dicuci dengan air mengalir, diangin-anginkan, dan ditimbang sebanyak 1 kg, kemudian dihaluskan dengan blender. Ketika dihaluskan, daun tersebut ditambahkan sedikit cairan penyari (etanol 76%). Simplisia yang telah dihaluskan dituang ke dalam bejana maserasi, ditambah etanol 76% sampai terendam sempurna, dan dicampur homogen. Campuran dimaserasi pada suhu ruangan selama dua hari. Filtrat diperoleh melalui penyaringan dengan corong *Buchner*. Ampas penyaringan diremaserasi dengan etanol 76% secukupnya selama dua hari. Kemudian filtratnya dicampurkan dengan filtrat terdahulu. Campuran filtrat kemudian disaring. Lalu hasil penyaringan filtrat diuapkan pelarutnya dengan *vacuum rotary evaporator* hingga diperoleh ekstrak etanol daun selasih.

Ekstrak etanol daun selasih ditambah 300 mL air hangat dan diekstraksi cair-cair menggunakan wasbensin dengan perbandingan larutan

PLAGIAT MERUPAKAN TINDAKAN TIDAK TERPUJI

ekstrak : wasbensen (1:1 v/v), kemudian didiamkan sampai terpisah sempurna. Fase air akan berada pada bagian bawah, sedangkan fase wasbensen berada pada bagian atas.

Dari hasil partisi diperoleh dua fraksi, yaitu fraksi wasbensen dan fraksi air. Selanjutnya fraksi air diekstraksi cair-cair lagi menggunakan etil asetat dengan perbandingan larutan fraksi air : etil asetat (1:1 v/v) sehingga didapatkan fraksi air dan etil asetat. Setelah dipisahkan fraksi etil asetat diuapkan pelarutnya dengan *vacuum rotary evaporator*. Hasil fraksi tersebut kemudian ditutup dengan plastik serta *aluminium foil* lalu disimpan dalam eksikator. Lalu hasil fraksi tersebut digunakan untuk dianalisis lebih lanjut.

4. Pembuatan larutan pembanding dan uji

a. Pembuatan larutan DPPH

Sejumlah DPPH dilarutkan ke dalam metanol *p.a* sehingga diperoleh larutan DPPH dengan konsentrasi 0,4 mM. Larutan tersebut ditutup dengan aluminium foil dan harus selalu dibuat baru.

b. Pembuatan larutan pembanding

Sebanyak 2,5 mg rutin ditambahkan metanol *p.a* sampai 10,0 mL. Diambil 0,5 mL dari larutan stok rutin ditambah metanol *p.a* sampai 10,0 mL menjadi larutan intermediet. Diambil sebanyak 0,5; 1,0; 1,5; 2,0; dan 2,5 mL larutan intermediet rutin, kemudian ditambahkan metanol *p.a* sampai 10,0 mL, sehingga diperoleh konsentrasi larutan standar rutin sebesar 2,5; 5,0; 7,5; 10,0; dan 12,5 µg/mL.

PLAGIAT MERUPAKAN TINDAKAN TIDAK TERPUJI

c. Pembuatan larutan uji

i. Larutan uji untuk uji aktivitas antioksidan

Sebanyak 10,0 mg hasil fraksi etil asetat pada preparasi sampel ditimbang, lalu ditambahkan metanol *p.a* sampai 25,0 mL. Diambil 1,0 mL dari larutan stok fraksi etil asetat ditambah metanol *p.a* sampai 10,0 mL menjadi larutan intermediet. Diambil sebanyak 1,0; 2,0; 3,0; 4,0; dan 5,0 mL larutan intermediet, kemudian ditambahkan metanol *p.a* sampai 10,0 mL, sehingga diperoleh konsentrasi larutan uji sebesar 8,0; 16,0; 24,0; 32,0 dan 40,0 $\mu\text{g/mL}$.

ii. Larutan uji untuk penentuan kandungan fenolik total

Sebanyak 5,0 mg hasil fraksi air pada preparasi sampel ditimbang, lalu ditambahkan metanol *p.a* sampai 10,0 mL, sehingga diperoleh konsentrasi larutan uji sebesar 500,0 $\mu\text{g/mL}$.

d. Pembuatan larutan asam galat

Dibuat larutan asam galat dengan konsentrasi 500 $\mu\text{g/mL}$ dalam akuades : metanol *p.a.* (1:1). Diambil sebanyak 1,0; 1,5; 2,0; 2,5; dan 3,0 mL larutan tersebut, kemudian ditambahkan akuades : metanol *p.a.* (1:1) sampai 10,0 mL, sehingga diperoleh konsentrasi larutan baku asam galat sebesar 50; 75; 100; 125; dan 150 $\mu\text{g/mL}$.

5. Uji pendahuluan

a. Uji fenolik

Sebanyak 0,5 mL metanol *p.a.*, larutan pembanding asam galat 150,0 $\mu\text{g/mL}$, dan larutan uji 500,0 $\mu\text{g/mL}$ dimasukkan ke dalam 3 tabung reaksi. Lalu ditambahkan dengan 5 mL reagen Folin-Ciocalteu yang telah diencerkan dengan

PLAGIAT MERUPAKAN TINDAKAN TIDAK TERPUJI

akuades (1:10; v/v). Larutan tersebut selanjutnya ditambahkan dengan 4,0 mL Na_2CO_3 1M. Setelah 10 menit, amati warna pada larutan tersebut.

b. Uji pendahuluan aktivitas antioksidan

Sebanyak 1 mL larutan DPPH dimasukkan ke dalam masing-masing 3 labu ukur 5 mL. Ditambahkan masing-masing dengan 1 mL metanol *p.a*, larutan perbandingan rutin 7,5 $\mu\text{g/mL}$, dan larutan uji 40,0 $\mu\text{g/mL}$. Selanjutnya larutan tersebut ditambahkan dengan metanol *p.a* hingga tanda batas. Larutan tersebut kemudian divortek selama 30 detik. Setelah 30 menit, amati warna pada larutan tersebut.

6. Optimasi metode uji aktivitas antioksidan

a. Penentuan *operating time* (OT) metode uji aktivitas antioksidan

Sebanyak 1 mL larutan DPPH dimasukkan ke dalam masing-masing 3 labu ukur 5 mL, ditambahkan masing-masing dengan 1 mL larutan perbandingan rutin 2,5; 7,5; dan 12,5 $\mu\text{g/mL}$. Selanjutnya larutan tersebut ditambahkan dengan metanol *p.a* hingga tanda batas. Larutan tersebut kemudian divortek selama 30 detik. Setelah itu dibaca absorbansinya dengan spektrofotometer visibel pada panjang gelombang 517 nm selama 1 jam. Dilakukan demikian juga untuk larutan uji 8,0; 24,0; dan 40,0 $\mu\text{g/mL}$.

b. Penentuan panjang gelombang serapan maksimum (λ maksimum) metode uji aktivitas antioksidan

Pada 3 labu ukur 5 mL, dimasukkan masing-masing 0,2; 0,6; dan 1,0 mL larutan DPPH. Ditambahkan larutan tersebut dengan metanol *p.a* hingga tanda batas sehingga konsentrasi DPPH menjadi 0,016; 0,048; dan 0,080 mM. Larutan

PLAGIAT MERUPAKAN TINDAKAN TIDAK TERPUJI

tersebut kemudian divortek selama 30 detik. Diamkan selama *OT*. Lalu dilakukan *scanning* λ maksimum dengan spektrofotometer visibel pada panjang gelombang 400-600 nm.

7. Uji aktivitas antioksidan

Uji aktivitas antioksidan ditentukan dengan menggunakan metode spektrofotometri sesuai dengan penelitian Armala, M.M (2009).

a. Pengukuran absorbansi larutan kontrol

Pada labu ukur 5 mL, dimasukkan sebanyak 1 mL larutan DPPH. Ditambahkan larutan tersebut dengan metanol *p.a* hingga tanda batas. Kemudian larutan tersebut dibaca absorbansinya pada saat *OT* dan λ maksimum. Pengerjaan dilakukan sebanyak 3 kali. Larutan ini digunakan sebagai kontrol untuk menguji larutan perbandingan dan uji.

b. Pengukuran absorbansi larutan perbandingan dan uji

Sebanyak 1 mL larutan DPPH dimasukkan ke dalam masing-masing 3 labu ukur 5 mL. Ditambahkan masing-masing dengan 1 mL larutan perbandingan dan uji pada berbagai seri konsentrasi larutan perbandingan dan uji yang telah dibuat. Selanjutnya larutan tersebut ditambahkan dengan metanol *p.a* hingga tanda batas. Larutan tersebut kemudian divortek selama 30 detik dan diamkan selama *OT*. Larutan dibaca absorbansinya dengan spektrofotometer visibel pada λ maksimum. Pengerjaan dilakukan sebanyak 3 kali.

c. Validasi metode uji aktivitas antioksidan

Hasil dari prosedur 7 a dan b, divalidasi akurasi (%*recovery*), presisi (%*CV*), spesifisitas (spektra kontrol), dan linearitasnya (nilai *r*).

PLAGIAT MERUPAKAN TINDAKAN TIDAK TERPUJI

$$\% \text{Recovery} = \frac{\text{—————}}{\text{—————}} \times 100\%$$

$$\% \text{CV} = \frac{\text{————— ()}}{\text{—————}} \times 100\%$$

d. Estimasi aktivitas antioksidan

Hasil dari prosedur 7 a dan b, dihitung nilai %IC dan IC_{50} untuk rutin dan fraksi air ekstrak etanolik daun selasih.

8. Penetapan kandungan fenolik total

Kandungan fenolik total ditentukan dengan menggunakan metode spektrofotometri sesuai dengan penelitian Veeru, Kishor, dan Meenakshi (2009).

a. Pembuatan kurva baku asam galat

Sebanyak 0,5 mL larutan asam galat 50; 75; 100; 125; dan 150 $\mu\text{g/mL}$ ditambahkan dengan 5 mL reagen Folin-Ciocalteu yang telah diencerkan dengan air (1:10; v/v). Larutan selanjutnya ditambah dengan 4,0 mL Na_2CO_3 1M. Setelah 10 menit, absorbansinya dibaca pada panjang gelombang 750 nm terhadap blanko yang terdiri atas akuades : metanol *p.a.* (1:1), reagen Folin-Ciocalteu, dan larutan Na_2CO_3 1M.

b. Optimasi metode penetapan kandungan fenolik total

i. Penentuan *OT*

Sebanyak 0,5 mL larutan asam galat 50; 100; dan 150 $\mu\text{g/mL}$ ditambahkan dengan 5 mL reagen Folin-Ciocalteu yang telah diencerkan dengan air (1:10; v/v). Larutan selanjutnya ditambah dengan 4,0 mL Na_2CO_3 1M. Setelah itu dibaca absorbansinya dengan spektrofotometer visibel pada panjang gelombang 750 nm selama 30 menit.

PLAGIAT MERUPAKAN TINDAKAN TIDAK TERPUJI

ii. Penentuan λ maksimum

Sebanyak 0,5 mL larutan asam galat 50; 100; dan 150 $\mu\text{g/mL}$ ditambahkan dengan 5 mL reagen Folin-Ciocalteu yang telah diencerkan dengan air (1:10; v/v). Larutan selanjutnya ditambah dengan 4,0 mL Na_2CO_3 1M. Diamkan selama OT. Lalu dilakukan *scanning* λ maksimum dengan spektrofotometer visibel pada panjang gelombang 600-800 nm.

c. Validasi metode penetapan kandungan fenolik total

Hasil dari prosedur 8 a, divalidasi akurasi (%*recovery*), presisi (%*CV*), spesifisitas (spektra kontrol), dan linearitasnya (nilai r).

d. Estimasi kandungan fenolik total larutan uji

Diambil 0,5 mL larutan uji 500 $\mu\text{g/mL}$, lalu dimasukkan ke dalam tabung reaksi, dan dilanjutkan sebagaimana perlakuan pada pembuatan kurva baku asam galat. Kandungan fenolik total dinyatakan sebagai massa ekuivalen asam galat (mg ekuivalen asam galat per g fraksi air).

F. Analisis Hasil

Uji aktivitas antioksidan menghasilkan aktivitas penangkapan radikal DPPH yang dilaporkan sebagai %*IC* dihitung dengan rumus:

$$\frac{\text{—}}{\text{(/)}} \times 100\%$$

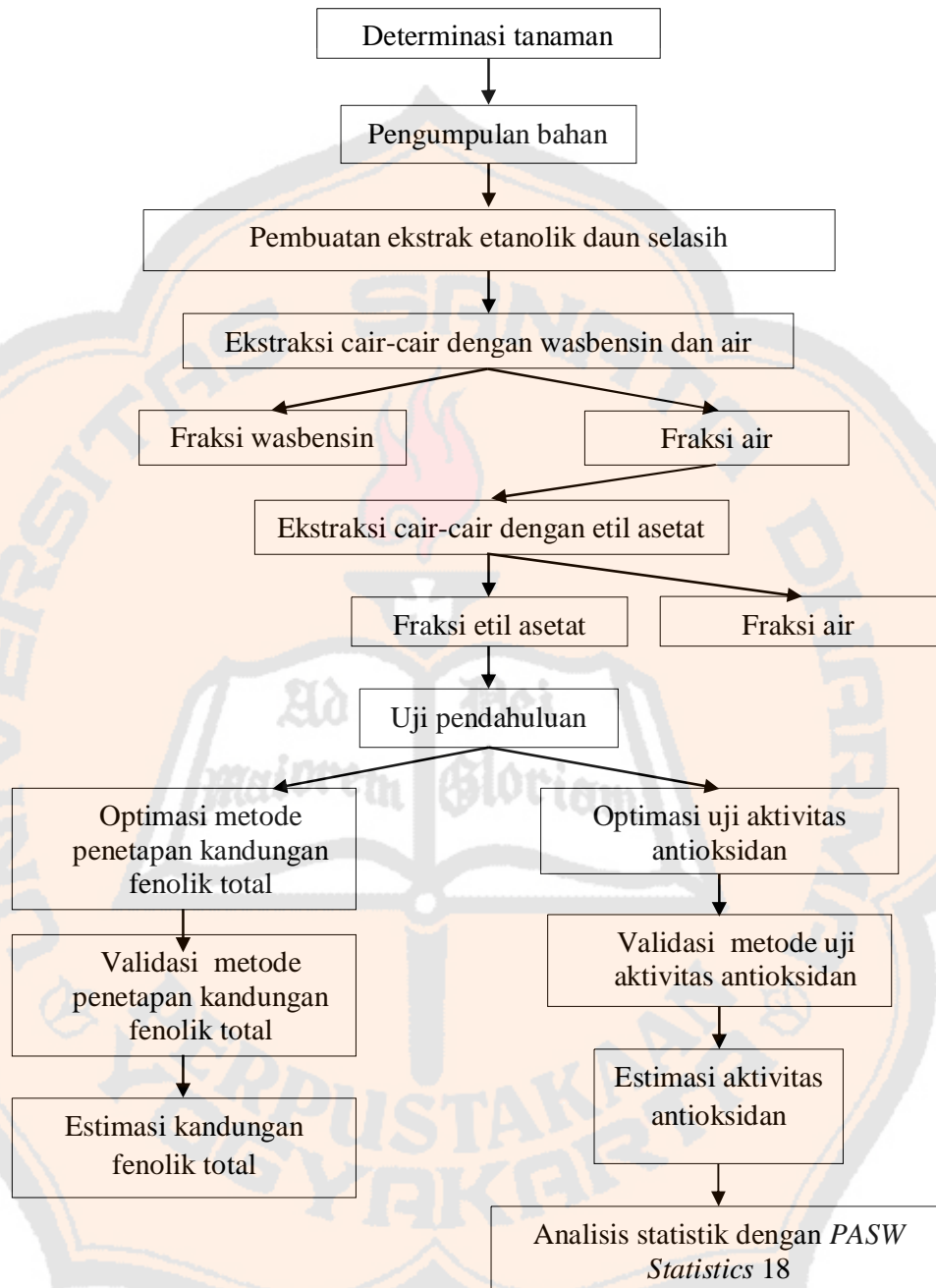
Data aktivitas tersebut dianalisis dan dihitung nilai IC_{50} menggunakan persamaan regresi linear dengan sumbu x adalah konsentrasi larutan uji maupun pembanding sedangkan sumbu y adalah %*IC*. Lalu dianalisis secara statistik untuk menentukan

PLAGIAT MERUPAKAN TINDAKAN TIDAK TERPUJI

ada atau tidak adanya perbedaan bermakna antara nilai IC_{50} larutan pembanding dengan uji.

Penetapan kandungan fenolik total menghasilkan nilai mg ekuivalen asam galat per g fraksi air. Nilai tersebut didapatkan dari analisis regresi linear dengan data kurva baku secara intrapolasi.





Gambar 4. Skema jalannya penelitian

BAB IV

HASIL DAN PEMBAHASAN

A. Hasil Determinasi Tumbuhan

Determinasi merupakan syarat pertama dalam melakukan penelitian dengan menggunakan tanaman. Determinasi dilakukan untuk memastikan kebenaran identitas tanaman yang akan digunakan serta menghindari terjadinya kesalahan dalam pengambilan sampel. Determinasi sangat penting dilakukan pada tanaman selasih (*Ocimum sanctum* L.) karena terdapat beberapa jenis tanaman dalam genus *Ocimum* seperti *Ocimum basilicum* dan *Ocimum gratissimum* yang hampir sama ciri morfologinya dengan *Ocimum sanctum* L. Menurut Singh dan Setigal (1999), tanaman dengan genus yang sama, yaitu *Ocimum* tetapi berbeda spesies memiliki kandungan kimia yang jauh berbeda. Determinasi tanaman selasih dilakukan di Laboratorium Farmakognosi-Fitokimia, Fakultas Farmasi Universitas Sanata Dharma pada tanggal 24 September 2010. Hasil determinasi tanaman selasih adalah sebagai berikut :

1b-2b-3b-4b-6b-7b-9b-10b-11b-12b-13b-14a-16a-239b-243b-244b-248b-
249b-250b-266b-267b-268b-271b...110. *Labiatae*
1a-2a-4b-6b-7b...8. *Ocimum*
8b...*O. sanctum* L.

Hasil determinasi menyatakan kebenaran tanaman yang digunakan sebagai sampel, yaitu *Ocimum sanctum* L (lampiran 1).

PLAGIAT MERUPAKAN TINDAKAN TIDAK TERPUJI

B. Hasil Pengumpulan Bahan

Daun selasih diperoleh dari daerah Selarong, RT 1/RW 3 Pedukuhan Kentolan Lor, Kelurahan Gowasari, Kecamatan Pajangan, Kabupaten Bantul, Daerah istimewa Yogyakarta dan dipanen pada tanggal 22 September 2010. Tanaman selasih yang digunakan merupakan tanaman budidaya dan bukan merupakan tanaman liar karena penggunaan tanaman liar kurang baik digunakan sebagai sumber bahan penelitian dibandingkan dengan tanaman budidaya. Penggunaan tanaman budidaya memiliki beberapa keuntungan, yaitu :

1. Terdapat kepastian bahwa semua tanaman yang dipanen adalah spesies yang sama karena bibit yang ditanam sama, sehingga meminimalkan terjadinya kesalahan pengambilan jenis tanaman.
2. Umur tanaman sama karena ditanam bersama-sama. Umur tanaman sangat penting diperhatikan karena tanaman dengan umur berbeda akan memiliki kandungan metabolit sekunder dalam jumlah yang berbeda.
3. Perlakuan dan kondisi yang diterima oleh tanaman sama. Perlakuan dan kondisi lingkungan seperti pemupukan, komposisi tanah, intensitas sinar matahari yang diterima, dan jumlah air yang diterima tanaman sangat mempengaruhi jumlah kandungan metabolit sekunder yang ada dalam tanaman. Adanya kesamaan perlakuan dan kondisi maka kandungan metabolit sekunder pada tiap tanaman relatif sama.

Untuk memperoleh jumlah kandungan metabolit yang maksimal, maka ada beberapa hal yang perlu diperhatikan pada saat pemanenan daun selasih. Pemanenan dilakukan pada musim kemarau, menjelang tanaman berbunga, serta

PLAGIAT MERUPAKAN TINDAKAN TIDAK TERPUJI

tanaman dipanen 2 jam setelah matahari terbit. Pemanenan perlu dilakukan pada musim kemarau karena pada musim kemarau intensitas sinar matahari yang diterima tanaman lebih besar dari pada saat musim hujan. Lebih banyaknya intensitas sinar matahari maka biosíntesis metabolit sekundernya juga akan lebih banyak, sehingga kandungan metabolit sekunder tanaman selasih pada musim kemarau akan lebih banyak. Pemanenan juga perlu dilakukan saat tanaman akan berbunga (umur tanaman sekitar 3 bulan) karena pada saat tanaman akan berbunga jumlah kandungan metabolit sekunder ada pada jumlah maksimal dan kandungan metabolit sekunder itu banyak tersimpan di daun. Apabila tanaman sudah berbunga maka sebagian metabolit sekunder akan ditransport ke bunga sehingga kandungan metabolit sekunder di daun berkurang. (World Health Organization, 2003). Selain itu, pemanenan juga dilakukan pada saat 2 jam setelah matahari terbit. Hal ini supaya tanaman sudah menerima sinar matahari, sehingga biosíntesis di daun sudah terjadi karena proses biosíntesis di daun memerlukan bantuan sinar matahari. Pemanenan jangan dilakukan ketika tengah hari atau saat sinar matahari terik karena senyawa antioksidan yang ada pada tanaman akan digunakan tanaman untuk melawan radiasi UV, sehingga kandungan metabolit sekunder yang berfungsi sebagai antioksidan akan berkurang. (Hakkim, Ariyazhagan, dan Boopathy, 2008).

Tanaman selasih yang sudah dipanen dimasukkan kedalam wadah tertutup yang sudah diberi air, sehingga tanaman selasih akan tetap segar ketika di preparasi. Kemudian tanaman selasih segera dibawa ke laboratorium dan dipisahkan antara bagian daun dengan bagian lainnya. Pemisahan bagian daun

PLAGIAT MERUPAKAN TINDAKAN TIDAK TERPUJI

dengan bagian lainnya harus dilakukan dengan cermat karena kandungan metabolit sekunder yang ada di daun dan bagian tanaman lain berbeda, sehingga apabila ada bagian tanaman lain ikut dipreparasi maka akan mempengaruhi hasil penelitian. Daun yang dipilih harus memiliki usia yang sama yang ditunjukkan dengan warna yang sama karena daun dengan usia yang berbeda kandungan metabolit sekundernya berbeda. Daun dipilih yang tidak terlalu tua dan tidak terlalu muda. Preparasi harus dilakukan secepat mungkin setelah pemanenan untuk menghindari terjadinya *browning*. Peristiwa *browning* ini terjadi karena adanya respon polifenol oksidase terhadap luka pada tumbuhan. Polifenol oksidase akan mengoksidasi senyawa fenolik menjadi bentuk radikal dan kemudian menjadi bentuk polimer yang digunakan untuk menutup luka. Adanya oksidasi pada senyawa fenolik maka aktivitas antioksidan senyawa fenolik itu akan berkurang. Peristiwa *browning* akan terjadi secara maksimal satu jam setelah terjadi luka. Oleh karena itu, sebaiknya preparasi sampel dilakukan kurang dari satu jam setelah pemanenan (Cheng, dan Crisosto, 1995).

C. Hasil Preparasi Sampel

1. Hasil ekstraksi sampel

Tujuan ekstraksi adalah untuk menarik komponen kimia yang terdapat dalam simplisia, sehingga senyawa fenolik yang ada dalam daun selasih dapat diambil. Ekstraksi ini didasarkan pada perpindahan massa komponen zat padat ke dalam pelarut dimana perpindahan mulai terjadi pada lapisan antar muka, kemudian berdifusi masuk ke dalam pelarut. Pada penelitian ini, sampel yang

PLAGIAT MERUPAKAN TINDAKAN TIDAK TERPUJI

diekstraksi adalah daun selasih yang masih segar. Digunakan sampel daun selasih segar karena menurut Suryaningrum (2006), aktivitas antioksidan pada sampel yang segar lebih poten dari pada sampel kering. Hal ini disebabkan karena senyawa antioksidan seperti senyawa fenolik tidak tahan terhadap panas, sinar matahari dan sinar UV, sehingga ketika sampel dikeringkan dapat menyebabkan rusaknya senyawa antioksidan yang terkandung dalam sampel dan menyebabkan menurunnya aktivitas antioksidannya. Selain itu, dengan dilakukan pengeringan akan meningkatkan potensi terjadinya *browning* (Galati, McKay, dan Tan., 2005). Oleh karena itu, untuk menjaga stabilitas senyawa antioksidan yang ada di dalam sampel maka digunakan sampel segar untuk ekstraksi.

Sebelum dilakukan ekstraksi sampel daun selasih perlu dicuci terlebih dahulu untuk menghilangkan pengotor-pengotor yang menempel pada sampel seperti tanah dan debu. Kemudian sampel daun selasih diblender untuk memperkecil ukuran partikel sehingga luas permukaannya akan menjadi luas. Luasnya permukaan sampel yang bersentuhan dengan cairan penyari maka akan memudahkan cairan penyari menembus sampel dan menyari senyawa kimia yang ada, sehingga penyarian lebih efektif.

Metode ekstraksi yang digunakan adalah maserasi. Ekstraksi dengan maserasi dilakukan dengan cara merendam sampel daun selasih dalam cairan penyari, yaitu etanol 76% selama dua hari pada temperatur kamar. Ketika proses maserasi berlangsung, cairan penyari yaitu etanol 76 % akan menembus dinding sel dan masuk ke dalam rongga sel yang mengandung senyawa kimia, senyawa kimia itu akan larut dalam cairan penyari dan cairan penyari yang sudah pekat

PLAGIAT MERUPAKAN TINDAKAN TIDAK TERPUJI

dengan senyawa kimia akan berdifusi keluar sel dan proses ini akan berulang terus sampai terjadi keseimbangan antara konsentrasi cairan di dalam dan di luar sel. Selama proses maserasi, perlu dilakukan pengadukan dengan bantuan *shaker*. Pengadukan ini berfungsi untuk meratakan cairan penyari yang sudah jenuh oleh komponen terlarut, sehingga akan terjadi gradient konsentrasi. Gradien konsentrasi perlu dijaga supaya difusi cairan penyari dapat berlangsung hingga cairan penyari jenuh. Selain itu, pengadukan juga meningkatkan kontak antara cairan penyari dengan sampel, sehingga penyarian menjadi lebih efektif. Setelah maserasi berlangsung dua hari maka dilakukan penyaringan dan filtrat yang didapat dimaserasi kembali dengan cairan penyari yang sama yaitu etanol 76%, proses ini disebut remaserasi. Remaserasi perlu dilakukan untuk memaksimalkan proses penyarian. Senyawa-senyawa yang mungkin belum tersari akibat sudah jenuhnya cairan penyari dapat tersari pada proses remaserasi ini. Selama proses maserasi dan remaserasi bejana maserasi ditutup dengan aluminium foil untuk mengurangi intensitas cahaya matahari yang masuk ke dalam bejana maserasi. Hal ini dilakukan untuk mencegah terjadinya kerusakan senyawa-senyawa akibat terpapar sinar UV.

Penelitian ini dipilih metode ekstraksi maserasi karena metode ini memiliki kelebihan dibanding metode lain yaitu prosesnya sederhana, mudah dilakukan, dan tidak proses ekstraksi dilakukan tanpa pemanasan. Proses ekstraksi sampel daun selasih ini tidak boleh menggunakan pemanasan karena senyawa fenolik merupakan senyawa yang tidak stabil. Temperatur selama ekstraksi sangat mempengaruhi stabilitas senyawa fenolik karena dapat menyebabkan degradasi

PLAGIAT MERUPAKAN TINDAKAN TIDAK TERPUJI

yang mengurangi kandungan fenolik total dan aktivitas antioksidan. Dari penelitian yang dilakukan Akowuah, Mariam, dan Chin (2009) menunjukkan bahwa aktivitas antioksidan menurun drastis apabila suhu ekstraksi lebih dari 60 °C dan hasil yang paling baik adalah untuk suhu ekstraksi kurang dari 40 °C. Oleh karena itu, ekstraksi dengan menggunakan metode maserasi sangat cocok.

Penelitian ini tidak digunakan ekstraksi dengan metode infundasi atau penyarian dengan menggunakan Soxhlet karena kedua metode ini menggunakan pemanasan yang dapat mempengaruhi stabilitas senyawa fenolik. Juga tidak dipilih metode ekstraksi perkolasi walaupun perkolasi juga tidak menggunakan pemanasan karena metode maserasi lebih sederhana dari pada perkolasi. Selain itu, metode perkolasi kurang cocok digunakan untuk sampel dari bahan segar karena pada sampel bahan segar hasil pemblanderan masih menghasilkan ukuran sampel yang cukup besar dan polidispers. Pada perkolasi cairan penyari diteteskan ke sampel dan akan bergerak turun karena gravitasi, dengan demikian maka interaksi cairan penyari dengan sampel tidak terlalu lama padahal dengan ukuran sampel yang cukup besar maka diperlukan waktu yang cukup lama untuk cairan penyari dapat menembus dinding sel. Oleh karena itu, tidak semua senyawa kimia dapat tersari dengan metode perkolasi. Sedangkan dengan metode maserasi cairan penyari berinteraksi dengan waktu yang cukup lama, sehingga cairan penyari dapat lebih banyak menyari senyawa kimia di dalam sel.

Cairan penyari yang digunakan adalah etanol 76 % karena senyawa yang akan disari adalah senyawa fenolik. Senyawa fenolik umumnya paling larut dalam cairan penyari yang kurang polar dari air. Pemilihan pelarut yang dapat digunakan

PLAGIAT MERUPAKAN TINDAKAN TIDAK TERPUJI

adalah campuran air dan metanol, etanol, dan aseton (Waterman dan Mole, 1994). Etanol dapat dengan efisien berpenetrasi ke dalam membran sehingga mendorong terekstraksinya sejumlah besar komponen endoselular (Silva, *et al*, 1998). Selain itu, etanol bersifat universal, aman dan ekonomis. Bersifat universal karena dapat melarutkan sebagian besar kandungan kimia (senyawa organik dalam sampel. Aman karena disbanding pelarut organik lain seperti metanol, etanol lebih aman bagi kesehatan dan lingkungan. Bersifat ekonomis karena etanol murah harganya. Penggunaan etanol juga dapat mencegah terjadinya *browning* karena etanol dapat mendenaturasi enzim polifenol oksidase.

Pemilihan etanol 76% sebagai cairan penyari juga didasarkan dari penelitian Wangcharoen dan Morasuk (2007) yang melakukan pengujian aktivitas antioksidan pada *Ocimum sanctum* L. dengan berbagai macam konsentrasi etanol sebagai cairan penyari. Dari hasil penelitian itu didapat hasil bahwa ekstraksi dengan etanol 76% menghasilkan ekstrak dengan daya antioksidan terbesar disbanding etanol 95%, 57%, 38%, dan 19%. Penulis tidak menemukan penelitian aktivitas antioksidan *Ocimum sanctum* L. dengan berbagai konsentrasi cairan penyari pada jenis cairan penyari yang lain seperti metanol, butanol, atau aseton sehingga tidak diketahui berapakah konsentrasi metanol, butanol, atau aseton yang dapat menyari senyawa antioksidan dengan optimal.

Setelah proses maserasi dan remaserasi selesai maka hasilnya disaring dengan menggunakan corong *Buchner* yang dibantu dengan pompa vakum untuk mempercepat proses penyaringan. Filtrat yang didapat kemudian diuapkan pelarutnya dengan menggunakan *rotary evaporator*. Menggunakan alat ini,

PLAGIAT MERUPAKAN TINDAKAN TIDAK TERPUJI

penguapan dapat terjadi dibawah titik didih pelarut karena terjadi penurunan tekanan yang disebabkan adanya pompa vakum. Penguapan perlu dilakukan dengan *rotary evaporator* karena dengan alat ini tidak memerlukan suhu yang tinggi untuk menguapkan filtrat dan stabilitas senyawa fenolik dapat dijaga. Bobot ekstrak etanolik yang didapat adalah 29,655 g dan rendemen yang didapat dari ekstrak etanolik daun selasih ini adalah 2,965 %.

2. Hasil fraksinasi sampel

Tujuan fraksinasi adalah untuk memisahkan senyawa-senyawa yang ada di dalam ekstrak, sehingga di dapat senyawa yang dituju yaitu senyawa fenolik. Etanol adalah pelarut yang universal sehingga akan banyak senyawa kimia yang lain ikut tersari seperti minyak, klorofil, karbohidrat, vitamin dan mineral. Oleh karena itu, senyawa-senyawa tersebut harus dipisahkan supaya tidak mengganggu analisis. Fraksinasi yang dilakukan menggunakan prinsip ekstraksi cair-cair yaitu pemisahan komponen kimia diantara dua fase pelarut yang tidak saling campur, dimana sebagian komponen larut pada fase pertama dan sebagian larut dalam fase kedua, lalu kedua fase yang mengandung zat terdispersi dikocok, lalu didiamkan sampai terjadi pemisahan sempurna dan terbentuk dua lapisan fase cair, dan komponen kimia akan terpisah ke dalam kedua fase tersebut sesuai dengan tingkat kepolaran.

Fraksinasi yang lebih dahulu dilakukan adalah untuk menghilangkan senyawa non polar seperti minyak, lemak dan klorofil. Senyawa non polar itu dihilangkan dengan menggunakan pelarut non polar maka fraksinasi dilakukan dengan menggunakan *wasbensin*. Ekstrak etanol daun selasih yang di dapat

PLAGIAT MERUPAKAN TINDAKAN TIDAK TERPUJI

dilarutkan dalam 100 mL air panas dan dicampur dengan 100 mL *wasbensi* di dalam corong pisah dan digojog. Ekstrak perlu dilarutkan terlebih dahulu di air karena minyak atsiri mempunyai kelarutan di etanol sebesar 1 : 5 (Sihile, 2009), dan klorofil serta karoten juga larut di etanol (Pratiwingsih, 1984), sehingga bila ekstrak etanolik langsung di fraksinasi maka minyak dan klorofil akan sukar dihilangkan dengan *wasbensi* karena tertinggal dalam etanol. Dalam corong pisah fraksi air ada di bagian bawah sedangkan fraksi *wasbensi* ada di atas. Hal ini karena bobot jenis air lebih besar dari bobot jenis *wasbensi* (b.j air adalah 0,996 dan b.j *wasbensi* adalah 0,730) (Anonim, 1995). Fraksi *wasbensi* akan mengandung senyawa non polar seperti minyak, lemak dan klorofil yang tidak digunakan sehingga fraksi *wasbensi* dibuang, sedangkan senyawa fenolik akan tertinggal dalam fraksi air.

Fraksi air yang di dapat kemudian di fraksinasi kembali dengan menggunakan etil asetat. Fraksinasi dengan etil asetat ini berfungsi untuk memisahkan senyawa fenolik yang berbentuk aglikon dan glikosida (terikat gula). Fraksi air sebanyak 100 mL dicampurkan dengan 100 mL etil asetat di dalam corong pisah dan digojok. Fraksi air akan ada di bagian bawah sedangkan fraksi etil asetat ada di bagian atas karena bobot jenis air lebih besar dari pada bobot jenis etil asetat (b.j air adalah 0,996 dan b.j etil asetat adalah 0,898) (Anonim, 1995). Fraksi air akan mengandung karbohidrat, asam amino, vitamin C, dan glikosida, sedangkan fraksi etil asetat akan mengandung senyawa fenolik aglikon dan alkaloid.

PLAGIAT MERUPAKAN TINDAKAN TIDAK TERPUJI

Pada setiap dilakukan fraksinasi proses ekstraksi cair-cair yang dilakukan diulang sebanyak 3 kali. Setiap kali dilakukan ekstraksi cair-cair masing-masing fraksi digunakan 100 mL. Ekstraksi cair dilakukan secara berulang karena menurut hukum Nerst ekstraksi berulang dengan volume kecil akan lebih efektif bila dibandingkan dengan ekstraksi tunggal dengan menggunakan volume besar (Bassett, *et al.*, 1991).

Pada penelitian ini yang digunakan adalah fraksi etil asetat. Hal ini disebabkan karena senyawa fenolik yang masuk kedalam fraksi etil asetat lebih banyak dari pada di fraksi air. Senyawa fenolik yang akan lebih larut pada etil asetat adalah eugenol, asam urosolik, karvakrol, asam rosmarinik, apigenin dan sirsimaritin. Senyawa fenolik yang masuk ke dalam fraksi air adalah orientin dan vicenin (Vrinda dan Uma, 2001). Selain itu, dari penelitian Nusarini (2007) di dapatkan hasil bahwa aktivitas antioksidan dari fraksi etil asetat lebih besar dari pada fraksi air. Setelah di dapatkan fraksi etil asetat, maka fraksi etil asetat tersebut diuapkan dengan menggunakan *rotary evaporator* untuk meminimalkan pemanasan supaya stabilitas senyawa fenolik dapat tetap terjaga. Sisa dari fraksi etil asetat itu dimasukan ke oven dengan suhu 40 C dengan bantuan kipas untuk menguapkan sisa pelarut. Fraksi etil asetat yang sudah kering dibungkus plastik kemudian ditutup dengan aluminium foil supaya tidak terkena udara dan tidak terpapar sinar UV yang dapat mendegradasi senyawa fenolik yang ada di fraksi etil asetat itu kemudian dimasukan ke desikator supaya tidak terpapar lembab dan ditumbuhi jamur atau mikrobial. Bobot fraksi etil asetat yang di dapat 1,4468 g dan rendemen fraksi etil asetat yang di dapat adalah 0,14468 %.

D. Hasil Uji Pendahuluan

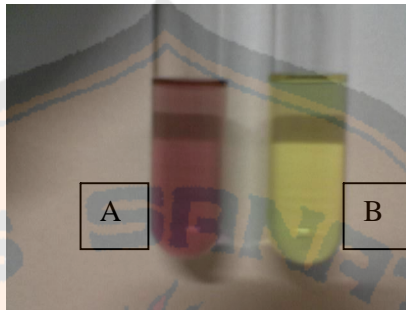
1. Uji pendahuluan aktivitas antioksidan

Tujuan uji pendahuluan aktivitas antioksidan ini adalah untuk menunjukkan adanya senyawa yang memiliki aktivitas antioksidan di dalam fraksi etil asetat ekstrak etanolik daun selasih. Uji pendahuluan perlu dilakukan sebelum dilakukan uji kuantitatif karena apabila ternyata di dalam sampel tidak terdapat senyawa yang memiliki aktivitas antioksidan maka uji kuantitatif tidak dapat dilakukan.

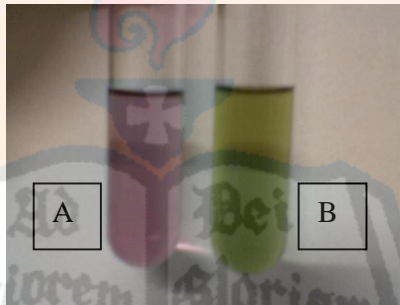
Uji pendahuluan aktivitas antioksidan dilakukan dengan menambahkan sejumlah larutan fraksi etil asetat ekstrak etanolik daun selasih ke larutan DPPH. Apabila fraksi etil asetat ekstrak etanolik memiliki senyawa yang memiliki aktivitas antioksidan maka senyawa itu akan beraksi dengan radikal DPPH dan radikal DPPH akan menangkap elektron, sehingga menyebabkan tidak adanya kesempatan elektron untuk beresonansi yang mengakibatkan berkurangnya ikatan rangkap terkonjugasi. Berkurangnya ikatan rangkap terkonjugasi menyebabkan berkurangnya intensitas warna DPPH. Jadi hasil positif pada uji ini adalah apabila terdapat penurunan intensitas DPPH dari ungu gelap menjadi ungu muda hingga kuning.

Uji ini digunakan kontrol negatif, yaitu larutan DPPH untuk menunjukkan warna larutan apabila hasil negatif (gambar 5). Sedangkan untuk kontrol positif, digunakan larutan DPPH yang ditambah rutin untuk menunjukkan warna larutan jika hasilnya positif (gambar 5). Berdasar hasil pengujian dapat dilihat adanya penurunan intensitas warna DPPH dari ungu menjadi kuning (Gambar 6). Dengan

demikian, maka hasilnya positif yang berarti dalam fraksi etil asetat ekstrak etanol daun selasih mengandung senyawa yang memiliki aktivitas antioksidan.



Gambar 5. Larutan DPPH (A) dan Larutan DPPH +Rutin (B)



Gambar 6. Hasil uji pendahuluan uji aktivitas antioksidan (A = Larutan DPPH , B = DPPH + fraksi etil asetat ekstrak etanol daun selasih)

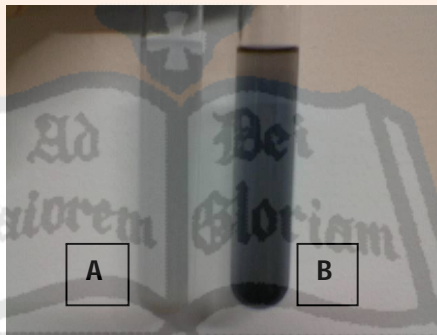
2. Uji pendahuluan senyawa fenolik

Tujuan uji pendahuluan senyawa fenolik ini adalah untuk menunjukkan adanya kandungan senyawa fenolik dalam fraksi etil asetat ekstrak etanolik daun selasih. Uji pendahuluan ini digunakan sebagai dasar dilakukan atau tidaknya uji kuantitatif kandungan total fenolik. Uji pendahuluan senyawa fenolik ini dilakukan dengan mencampurkan fraksi etil asetat ekstrak etanolik daun selasih dengan pereaksi Folin-Ciocalteu. Uji ini didasarkan pada reaksi reduksi oksidasi yaitu pada suasana basa, ion fenolat yang berasal dari senyawa fenolik mudah

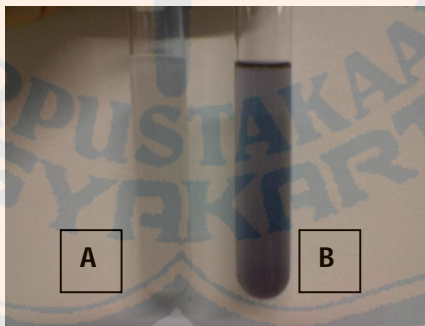
PLAGIAT MERUPAKAN TINDAKAN TIDAK TERPUJI

teroksidasi oleh asam fosfomolibdat dan juga mereduksinya menjadi produk berwarna biru. Jadi hasil positif untuk uji ini apabila terbentuk warna biru.

Uji ini digunakan kontrol negatif, yaitu pereaksi Folin-Ciocalteu untuk menunjukkan warna larutan apabila hasil negatif (gambar 7). Sedangkan untuk kontrol positif, digunakan pereaksi Folin-Ciocalteu yang ditambah asam galat untuk menunjukkan warna larutan jika hasilnya positif (gambar 7). Berdasar hasil pengujian dapat dilihat terbentuknya warna biru (Gambar 8). Dengan demikian, maka hasilnya positif yang berarti dalam fraksi etil asetat ekstrak etanol daun selasih mengandung senyawa fenolik.



Gambar 7. Blanko (A) dan pereaksi Folin-Ciocalteu + Asam Galat (B)



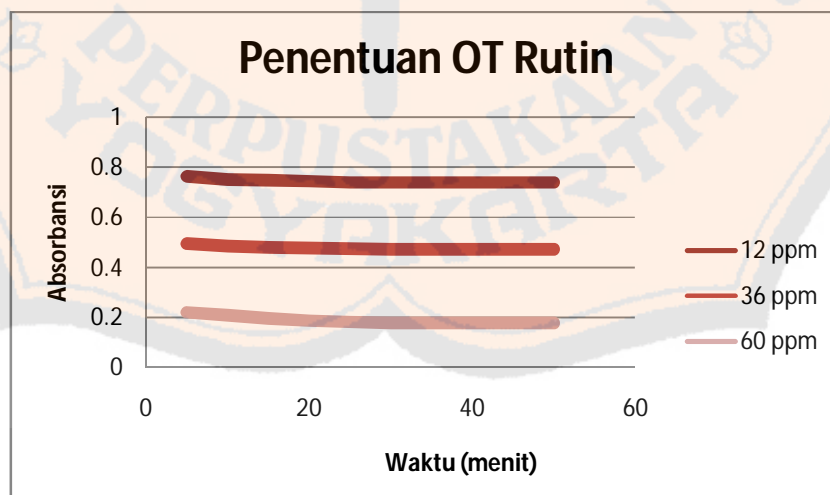
Gambar 8. Hasil uji pendahuluan uji fenolik (A= blanko B= pereaksi Folin-Ciocalteu + fraksi etil asetat ekstrak etanolik daun selasih)

E. Hasil Optimasi Metode Uji Aktivitas Antioksidan

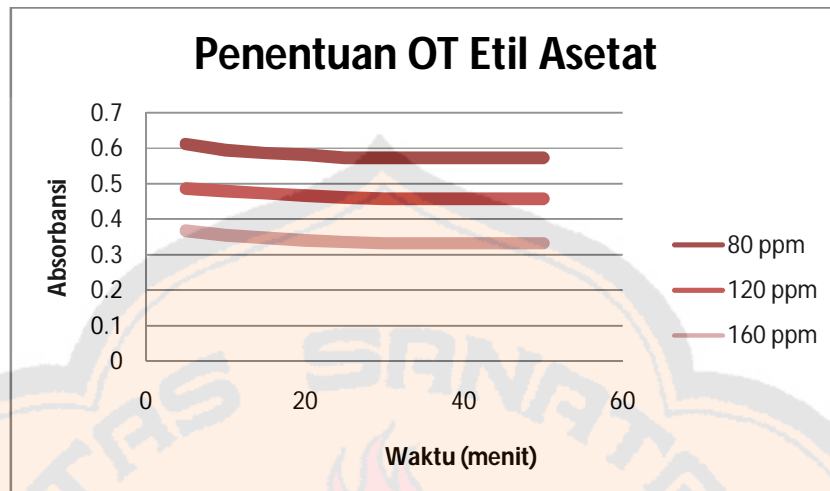
1. Penentuan *operating time* (OT)

Operating time adalah waktu dimana reaksi antara senyawa yang memiliki aktivitas antioksidan didalam larutan perbandingan dan larutan uji dengan radikal DPPH sudah berjalan sempurna yang ditandai dengan absorbansi yang stabil. Pengukuran harus dilakukan pada waktu OT karena pada saat itu absorbansinya stabil, sehingga tingkat reproduibilitas pengukuran yang tinggi pada pengukuran berulang dapat terpenuhi dan dapat meminimalkan terjadinya kesalahan dalam pembacaan absorbansi.

Penentuan OT dilakukan dengan mengukur absorbansi larutan DPPH yang sudah direaksikan dengan larutan perbandingan, yaitu rutin serta larutan DPPH yang sudah direaksikan dengan larutan uji, yaitu fraksi etil asetat ekstrak etanolik daun selasih. Pengukuran absorbansi dilakukan tiap 5 menit hingga menit ke-50. λ maks yang digunakan untuk penentuan OT adalah λ maks terorisitas, yaitu 517 nm (Dehpour, 2009).



Gambar 9. Grafik penentuan OT rutin



Gambar 10. Grafik penentuan OT etil asetat

Berdasar hasil pengukuran absorbansi dari menit ke-0 hingga menit ke-50 baik untuk larutan DPPH yang sudah direaksikan dengan larutan perbandingan maupun larutan DPPH yang sudah direaksikan dengan larutan uji pada tiga macam konsentrasi larutan menunjukkan bahwa mulai menit yang ke-30 absorbansinya sudah stabil hingga menit ke-50. Dengan demikian, dapat disimpulkan bahwa pada menit ke-30 seluruh senyawa yang memiliki aktivitas antioksidan pada larutan perbandingan dan larutan uji sudah bereaksi dengan radikal DPPH, sehingga *operating time* untuk reaksi radikal DPPH dengan larutan perbandingan dan larutan uji adalah 30 menit.

2. Penentuan panjang gelombang maksimum

Penentuan panjang gelombang maksimum ini bertujuan untuk menentukan panjang gelombang dimana larutan DPPH mempunyai serapan yang maksimum. Analisis yang dilakukan pada panjang gelombang serapan maksimum dapat memberikan perubahan serapan per satuan konsentrasi paling besar, sehingga diperoleh sensitivitas yang maksimum. Menurut Dehpour, (2009), panjang

PLAGIAT MERUPAKAN TINDAKAN TIDAK TERPUJI

gelombang teoritis radikal DPPH adalah 517 nm. Pada penelitian ini dilakukan verifikasi terhadap panjang gelombang teoritis itu karena ada perbedaan kondisi dengan penelitian yang pernah dilakukan seperti perbedaan waktu, tempat, alat analisis, dan individu yang melakukan.

Penentuan panjang gelombang maksimum dilakukan dengan menscan tiga konsentrasi larutan DPPH. *Scanning* panjang gelombang dilakukan pada panjang gelombang 400nm – 600nm.

Tabel IV. Hasil Scanning panjang gelombang maksimum DPPH

Konsentrasi larutan DPPH	λ maksimum hasil <i>scanning</i>	λ maksimum rata-rata	λ maksimum teoritis
0,016 mM	515,4 nm	515,5 nm	517 nm
0,048 mM	515,2 nm		
0,080 mM	516,0 nm		

Hasil *scanning* tiga konsentrasi larutan DPPH didapatkan hasil panjang gelombang maksimum rata-rata adalah 515,5 nm (tabel IV). Panjang gelombang ini berbeda dengan panjang gelombang maksimum teoritis DPPH, yaitu 517 nm. Hal ini diperbolehkan sesuai ketentuan yang tercantum dalam Farmakope Indonesia IV (1995), dimana batas pergeseran yang diperkenankan adalah maksimum sebesar 2 nm. Oleh karena itu, panjang gelombang maksimum yang digunakan pada penelitian ini adalah 515,5 nm.

F. Hasil Validasi Metode Uji Aktivitas Antioksidan

Validasi metode adalah serangkaian prosedur yang digunakan untuk membuktikan apakah suatu metode analisis yang digunakan sesuai dengan yang diharapkan dengan akurasi dan presisi yang memadai (Mulja dan Suherman,

PLAGIAT MERUPAKAN TINDAKAN TIDAK TERPUJI

1995). Adanya validasi metode maka hasil penelitian yang diperoleh dapat di pertanggung jawabkan. Untuk mengetahui validitas metode uji aktivitas antioksidan dengan radikal DPPH ini, maka parameter validasi yang perlu diperhatikan adalah akurasi, presisi, linearitas, dan spesifisitas metode pengujian aktivitas antioksidan ini dengan larutan pembanding, yaitu rutin dan larutan uji fraksi etil asetat ekstrak etanol daun selasih.

Perlu dibuat persamaan regresi linier antara konsentrasi rutin dan konsentrasi fraksi etil asetat ekstrak etanol daun selasih dengan absorbansi yang diperoleh dari reaksi antara radikal DPPH dengan rutin dan fraksi etil asetat ekstrak etanol daun selasih untuk dapat melakukan validasi metode.

Tabel V. Hasil pengukuran absorbansi seri baku rutin yang sudah direaksikan dengan radikal DPPH

Replikasi 1		Replikasi 2		Replikasi 3	
Konsentrasi rutin ($\mu\text{g/mL}$)	Absorbansi	Konsentrasi rutin ($\mu\text{g/mL}$)	Absorbansi	Konsentrasi rutin ($\mu\text{g/mL}$)	Absorbansi
2,4	0,754	2,5	0,776	2,4	0,764
4,8	0,607	5	0,618	4,8	0,610
7,2	0,472	7,5	0,482	7,2	0,468
9,6	0,302	10	0,314	9,6	0,293
12	0,175	12,5	0,176	12	0,174
Persamaan regresi linier A = 0,9009 B = - 0,0609 r = -0,9992 y = -0,0609 + 0,9009		Persamaan regresi linier A = 0,9244 B = - 0,06016 r = -0,9995 y = -0,06016 + 0,9244		Persamaan regresi linier A = 0,9109 B = - 0,0623 r = -0,9989 y = -0,0623 + 0,9109	

Berdasar hasil tiga persamaan regresi linier yang dihasilkan diatas dipilih satu persamaan dengan nilai r yang paling mendekati 1 atau -1. Oleh karena itu, persamaan replikasi dua yaitu $y = -0,06016 + 0,9244$ yang digunakan karena r nya

PLAGIAT MERUPAKAN TINDAKAN TIDAK TERPUJI

paling baik yaitu -0,995, sehingga persamaan ini yang digunakan untuk menghitung *recovery* dan *coefficient of variation* (CV) untuk rutin.

Tabel VI. Hasil pengukuran absorbansi seri fraksi etil asetat ekstrak etanol daun selasih sudah direaksikan dengan radikal DPPH

Replikasi 1		Replikasi 2		Replikasi 3	
Konsentrasi fraksi ($\mu\text{g/mL}$)	Absorbansi	Konsentrasi fraksi ($\mu\text{g/mL}$)	Absorbansi	Konsentrasi fraksi ($\mu\text{g/mL}$)	Absorbansi
8	0,696	8	0,697	8,18	0,696
16	0,577	16	0,575	18,32	0,580
24	0,462	24	0,459	24,48	0,460
32	0,342	32	0,336	32,64	0,335
40	0,252	40	0,256	40,8	0,253
Persamaan regresi linier $A = 0,8027$ $B = - 0,014$ $r = -0,998$ $y = -0,014 + 0,8027$		Persamaan regresi linier $A = 0,8009$ $B = - 0,014$ $r = -0,997$ $y = -0,014 + 0,8009$		Persamaan regresi linier $A = 0,8041$ $B = - 0,0138$ $r = -0,997$ $y = -0,0138 + 0,8041$	

Berdasar hasil tiga persamaan regresi linier yang dihasilkan diatas dipilih satu persamaan dengan nilai r yang paling mendekati 1 atau -1. Oleh karena itu, persamaan replikasi satu, yaitu $y = -0,014 + 0,8027$ yang digunakan karena r nya paling baik, yaitu -0,998, sehingga persamaan ini yang digunakan untuk menghitung *recovery* dan *coefficient of variation* (CV) untuk fraksi etil asetat ekstrak etanolik daun selasih.

1. Akurasi metode uji aktivitas antioksidan

Akurasi diperoleh dengan cara membandingkan kadar terukur dari sejumlah tertentu senyawa standar dengan kadar teoritis. Perbandingan kadar yang terukur dengan kadar teoritis ini disebut *recovery*. *Recovery* yang dihitung adalah untuk rutin dan fraksi etil asetat ekstrak etanolik daun selasih.

PLAGIAT MERUPAKAN TINDAKAN TIDAK TERPUJI

Tabel VII. Hasil % *recovery* dan % CV uji aktivitas antioksidan rutin

Seri baku	Konsentrasi teoritis (µg/mL)	% IC (%)	Konsentrasi terukur (µg/mL)	<i>Recovery</i> (%)	SD (%)	% CV (%)
Seri 1	2,4	18,132	2,412	100,5	1,209	1,219
	2,5	15,744	2,467	98,7		
	2,4	17,046	2,358	98,2		
Seri 2	4,8	34,093	4,826	100,5	0,723	0,716
	5	32,899	5,093	101,8		
	4,8	33,768	4,829	100,6		
Seri 3	7,2	48,751	7,043	97,8	0,458	0,466
	7,5	47,666	7,354	98,1		
	7,2	49,186	7,109	98,7		
Seri 4	9,6	67,210	9,834	102,4	0,900	0,879
	10	65,907	10,146	101,5		
	9,6	68,187	9,918	103,3		
Seri 5	12	80,999	11,919	99,3	0,480	0,484
	12,5	80,890	12,440	99,5		
	12	81,107	11,828	98,6		

Tabel VIII. Hasil % *recovery* dan % CV uji aktivitas antioksidan fraksi etil asetat ekstrak etanol daun selasih

Seri baku	Konsentrasi teoritis (µg/mL)	% IC (%)	Konsentrasi terukur (µg/mL)	<i>Recovery</i> (%)	SD (%)	% CV (%)
Seri 1	8	18,692	7,621	95,3	0,404	0,424
	8	18,575	7,420	94,8		
	8,16	18,692	7,799	95,6		
Seri 2	16	32,593	16,121	100,8	0,982	0,978
	16	32,827	16,136	100,8		
	16,32	32,243	16,169	99,1		
Seri 3	24	46,028	24,336	101,4	0,231	0,228
	24	46,379	24,421	101,8		
	24,48	6,262	24,827	101,4		
Seri 4	32	60,047	32,907	102,8	0,519	0,502
	32	60,748	33,207	103,7		
	32,64	60,864	33,846	103,7		
Seri 5	40	70,561	39,336	98,3	0,529	0,542
	40	70,093	38,921	97,3		
	40,8	70,444	39,762	97,5		

PLAGIAT MERUPAKAN TINDAKAN TIDAK TERPUJI

Berdasarkan data dari tabel VII persen *recovery* rutin ada pada rentang 97,8 % - 103,3% Hasil ini masih berada pada rentang *recovery* yang baik untuk baku sebagai analit dengan kadar sekitar 10 ppm. Nilai *recovery* yang masih bisa diterima adalah 90% - 107% (Harmita, 2004), sehingga dapat dikatakan bahwa metode ini memiliki akurasi yang baik untuk menganalisis rutin.

Berdasarkan data dari tabel VIII persen *recovery* fraksi etil asetat ekstrak etanolik daun selasih ada pada rentang 94,8 % - 103,7%. Hasil ini masih berada pada rentang *recovery* yang baik untuk baku sebagai analit dengan kadar sekitar 100 ppm. Nilai *recovery* yang masih bisa diterima adalah 90% - 107% (Harmita, 2004), sehingga dapat dikatakan bahwa metode ini memiliki akurasi yang baik untuk menganalisis fraksi etil asetat ekstrak etanolik daun selasih.

2. Presisi metode uji aktivitas antioksidan

Presisi adalah pencaran hasil yang diperoleh dari analisis berulang kali pada suatu sampel yang dinyatakan dengan *coefficient of variation* (CV). Berdasarkan data dari tabel VII didapat % CV rutin yang tertinggi adalah 1,209. Nilai ini masih masuk dalam persyaratan untuk analit dengan kadar sekitar 10 ppm, yaitu % CV 5, sehingga dapat dikatakan metode ini memiliki presisi yang baik untuk menganalisis rutin.

Berdasarkan data dari tabel VIII didapat % CV fraksi etil asetat ekstrak etanolik daun selasih yang tertinggi adalah 0,978. Nilai ini masih masuk dalam persyaratan untuk analit dengan kadar sekitar 100 ppm, yaitu % CV 5, sehingga dapat dikatakan metode ini memiliki presisi yang baik untuk menganalisis fraksi etil asetat ekstrak etanolik daun selasih.

PLAGIAT MERUPAKAN TINDAKAN TIDAK TERPUJI

3. Linearitas metode uji aktivitas antioksidan

Pada persamaan regresi linier rutin nilai koefien korelasi (r) yang didapat untuk replikasi 1 adalah 0,9992, replikasi 2 adalah 0,9995, dan replikasi 3 adalah 0,9989. Hasil ini masih lebih besar dari r tabel dengan taraf kepercayaan 95% dan *degree of freedom* (df) 3, yaitu 0,8783, sedangkan menurut Mulja dan Suherman (1995) koefisien korelasi yang dapat diterima adalah $>0,999$. Persamaan regresi linier yang digunakan, yaitu replikasi 2 mempunyai $r = 0,9995$, sehingga memenuhi persyaratan ini. Jadi metode ini memiliki linieritas yang baik untuk menganalisis rutin.

Pada persamaan regresi linier fraksi etil asetat ekstrak etanolik daun selasih nilai koefien korelasi (r) yang didapat untuk replikasi 1 adalah 0,998, replikasi 2 adalah 0,997, dan replikasi 3 adalah 0,997. Hasil ini masih lebih besar dari r tabel dengan taraf kepercayaan 95% dan *degree of freedom* (df) 3, yaitu 0,8783, sedangkan menurut Mulja dan Suherman (1995) koefisien korelasi yang dapat diterima adalah $>0,999$. Persamaan regresi linier yang digunakan yaitu replikasi 1 mempunyai $r = 0,998$, sehingga tidak memenuhi persyaratan ini karena fraksi etil asetat ekstrak etanolik daun selasih bukanlah senyawa yang murni, sehingga r yang didapat masih dapat diterima karena lebih dari r tabel. Jadi metode ini memiliki linieritas yang baik untuk menganalisis fraksi etil asetat ekstrak etanolik daun selasih.

4. Spesifisitas metode uji aktivitas antioksidan

Spesifisitas suatu metode adalah kemampuan dari suatu metode analisis untuk mengukur analit dalam sampel secara tepat dan spesifik. Pada uji aktivitas

PLAGIAT MERUPAKAN TINDAKAN TIDAK TERPUJI

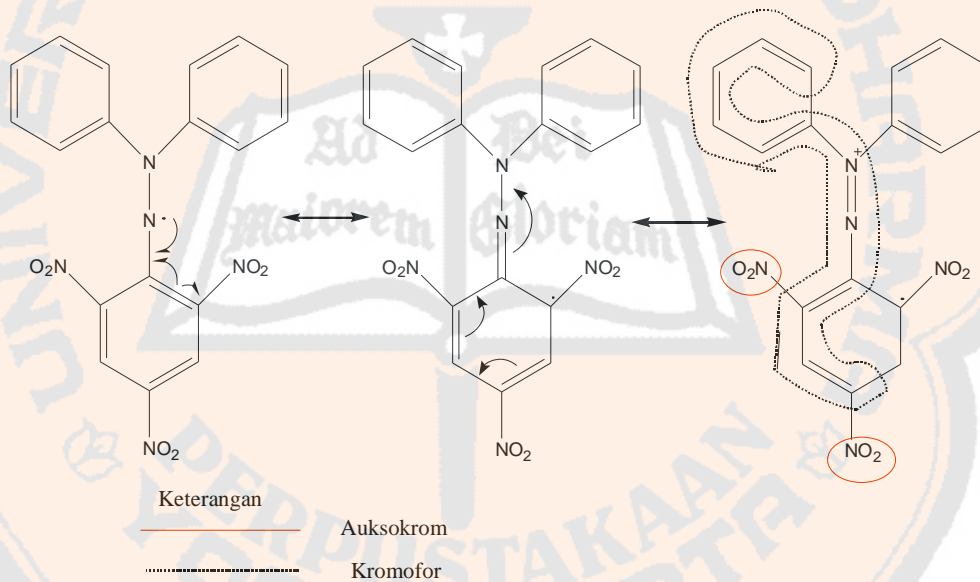
antioksidan ini pengukuran dilakukan menggunakan spektrofotometer visibel, sehingga spesifikasi metode dapat dilihat dari ada tidaknya serapan dari sampel sebelum ditambah DPPH pada panjang gelombang pengukuran yaitu 515,5 nm. Adanya serapan dari sampel akan mempengaruhi hasil pengukuran karena absorbansi yang terbaca adalah absorbansi DPPH dan juga sampel.

Berdasar hasil *scanning* pada larutan perbandingan rutin (Lampiran 6b) pada panjang gelombang 515,5 nm tidak terdapat serapan, sehingga ketika rutin direaksikan dengan radikal DPPH maka yang terbaca hanya absorbansi DPPH saja. Oleh karena itu, dapat disimpulkan bahwa metode uji aktivitas antioksidan untuk rutin memiliki spesifisitas yang baik.

Dari hasil *scanning* pada larutan uji yaitu fraksi etil asetat ekstrak etanolik daun selasih (Lampiran 6c) terdapat serapan pada panjang gelombang 515,5 nm yaitu sebesar 0,032. Serapan itu akan bertambah kecil karena pada saat pengujian larutan uji akan diencerkan lagi. Adanya serapan terjadi karena beberapa senyawa fenolik yang ada dalam larutan uji seperti asam rosmarinat dan apigenin yang memberikan serapan pada panjang gelombang yang digunakan. Asam rosmarinat mempunyai serapan maksimal di panjang gelombang 424 nm dan masih memberikan serapan hingga 600nm (Cuvelier, 1998), sedangkan apigenin mempunyai serapan maksimal di panjang gelombang 247 nm dan 352 nm dan masih memberikan serapan di daerah visibel (Bhujbal, Nanda, dan Patil, 2010). Meskipun serapan yang diberikan sangat kecil tetap akan mempengaruhi hasil pengukuran. Oleh karena itu, metode uji aktivitas antioksidan untuk fraksi etil asetat ekstrak etanolik daun selasih memiliki spesifisitas yang kurang baik.

G. Hasil Penentuan Aktivitas Antioksidan dengan Radikal DPPH

Metode DPPH adalah salah satu uji kuantitatif untuk mengetahui seberapa besar aktivitas antioksidan dari fraksi etil asetat ekstrak etanolik daun selasih. Metode DPPH memiliki beberapa keuntungan, yaitu sederhana, cepat, dan metode ini tidak terpengaruh oleh polaritas sampel (Koleva *et al.*, 2001). DPPH adalah radikal yang stabil berwarna ungu gelap yang memiliki absorbansi kuat pada panjang gelombang 517 nm (Molyneux, 2004). Warna ungu gelap ini terbentuk karena radikal DPPH mampu beresonansi sehingga terbentuk gugus kromofor yang panjang.



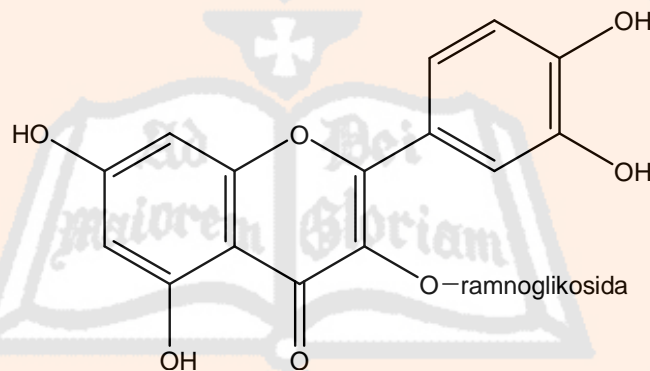
Gambar 11. Resonansi DPPH dan gugus kromofor serta auksokrom yang terbentuk

Ketika radikal DPPH bereaksi dengan dengan senyawa antioksidan, akan terjadi penangkap satu elektron oleh senyawa antioksidan sehingga menyebabkan tidak adanya kesempatan elektron itu untuk beresonansi. Dengan demikian, maka akan terjadi pengurangan gugus kromofor yang menyebabkan terjadinya

PLAGIAT MERUPAKAN TINDAKAN TIDAK TERPUJI

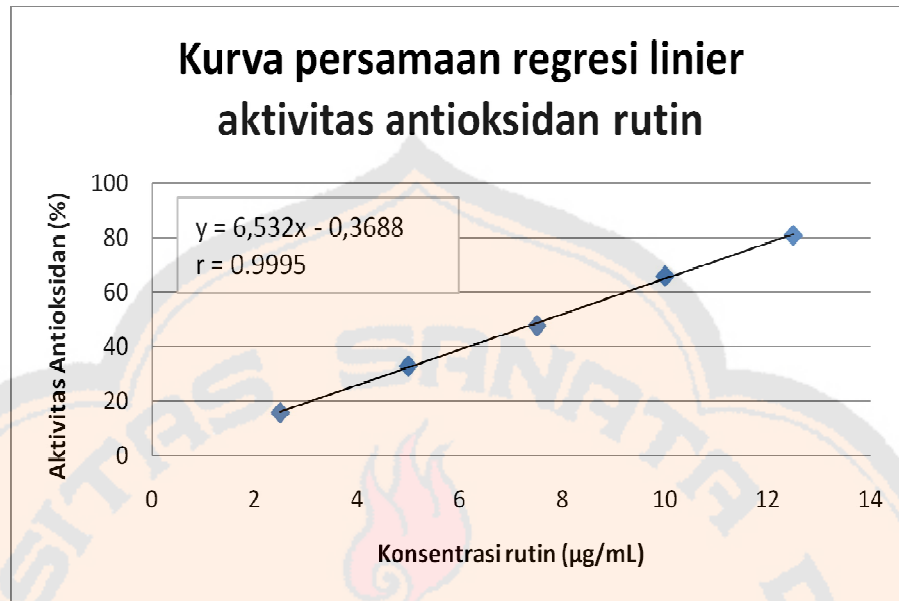
penurunan intensitas warna DPPH dari ungu gelap menjadi warna kuning. Penurunan intensitas warna tersebut diukur menggunakan spektrofotometer visibel.

Pada penelitian ini digunakan rutin sebagai pembanding dalam uji aktivitas antioksidan fraksi etil asetat ekstrak etanolik daun selasih. Digunakan rutin sebagai pembanding karena rutin termasuk flavonoid yang telah diketahui memiliki aktivitas antioksidan. Rutin menghambat radikal bebas hasil oksidasi lipid dengan cara menangkap radikal peroksi (ROO·) (Halliwell dan Gutteridge, 2000).



Gambar 12. Struktur Rutin

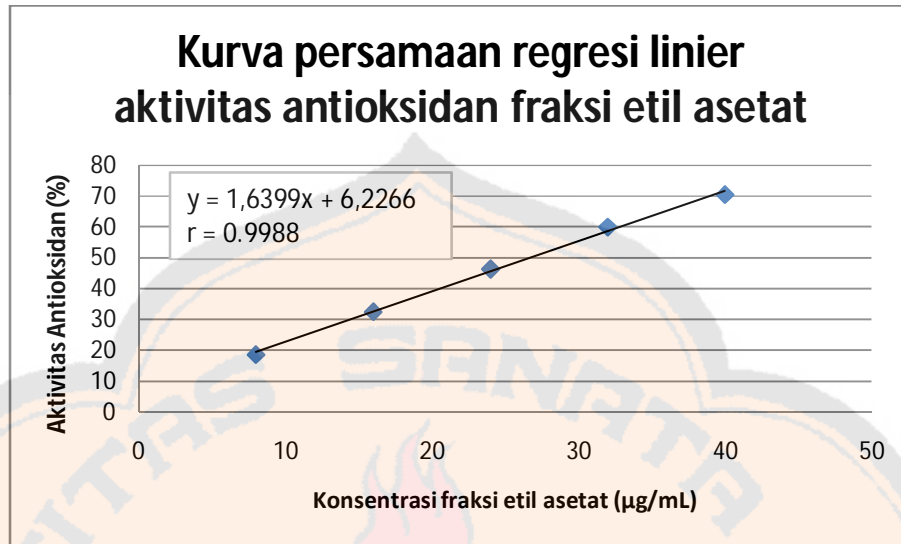
Aktivitas antioksidan dinyatakan dalam IC_{50} . IC_{50} adalah konsentrasi sampel yang menghasilkan penangkapan 50 % radikal DPPH. Untuk menghitung IC_{50} , perlu dibuat persamaan regresi linier hubungan antara konsentrasi bahan uji dengan % IC. Persamaan regresi linier dan hasil perhitungan % IC untuk rutin ditunjukkan pada tabel IX dan gambar 13 dan persamaan regresi linier dan hasil perhitungan % IC untuk fraksi etil asetat ekstrak etanolik daun selasih ditunjukkan pada tabel X dan gambar 14, sedangkan hasil IC_{50} untuk rutin dan fraksi etil asetat ekstrak etanolik daun selasih ditunjukkan pada tabel XI.



Gambar 13. Kurva persamaan regresi linier aktivitas antioksidan rutin

Tabel IX. Hasil aktivitas antioksidan rutin dengan menggunakan metode DPPH

Replikasi	Konsentrasi Rutin($\mu\text{g/mL}$)	Absorbansi	Aktivitas antioksidan (% IC)	Persamaan Regresi Linier
1	2,4	0,754	18,132	$A = 2,1817$ $B = 6,6188$ $r = 0,9992$ $y = 6,6188x + 2,1817$
	4,8	0,607	34,093	
	7,2	0,472	48,751	
	9,6	0,302	67,210	
	12	0,175	80,999	
2	2,5	0,776	15,744	$A = -0,3688$ $B = 6,532$ $r = 0,9995$ $y = 6,532x - 0,3688$
	5	0,618	32,899	
	7,5	0,482	47,666	
	10	0,314	65,907	
	12,5	0,176	80,890	
3	2,4	0,764	17,046	$A = 1,0915$ $B = 6,7729$ $r = 0,9988$ $y = 6,7729x + 1,0915$
	4,8	0,610	33,768	
	7,2	0,468	49,186	
	9,6	0,293	68,187	
	12	0,174	81,107	



Gambar 14. Kurva persamaan regresi linier aktivitas antioksidan fraksi etil asetat

Tabel X. Hasil aktivitas antioksidan fraksi etil asetat ekstrak etanolik daun selasih dengan metode DPPH

Replikasi	Konsentrasi Fraksi etil Aseta(µg/mL)	Absorbansi	Aktivitas antioksidan (% IC)	Persamaan Regresi Linier
1	8	0,696	18,692	A = 6,2266 B = 1,6399 r = 0,9988 y = 1,6399x + 6,2266
	16	0,577	32,593	
	24	0,462	46,028	
	32	0,342	60,047	
	40	0,252	70,561	
2	8	0,697	18,575	A = 6,4373 B = 1,6369 r = 0,9976 y = 1,6369x + 6,4373
	16	0,575	32,827	
	24	0,459	46,379	
	32	0,336	60,748	
	40	0,256	70,093	
3	8,18	0,696	18,692	A = 6,0635 B = 1,6192 r = 0,9979 y = 1,6192x + 6,0635
	18,32	0,580	32,243	
	24,48	0,460	46,262	
	32,64	0,335	60,864	
	40,8	0,253	70,444	

PLAGIAT MERUPAKAN TINDAKAN TIDAK TERPUJI

Tabel XI. Hasil perhitungan IC₅₀ rutin dan fraksi etil asetat ekstrak etanolik daun selasih

Bahan uji	IC ₅₀ (µg/mL)			Rata-rata (µg/mL)	SD (%)	% CV (%)
	Replikasi 1	Replikasi 2	Replikasi 3			
Rutin	7,225	7,711	7,221	7,386	0,282	3,818
Fraksi etil asetat	26,693	26,613	27,135	26,814	0,281	1,048

Berdasar hasil analisis regresi linier di dapatkan hasil rata-rata IC₅₀ rutin sebesar 7,386 ± 0,282 µg/mL dan rata-rata IC₅₀ fraksi etil asetat ekstrak etanolik daun selasih sebesar 26,814 ± 0,281 µg/mL. Semakin kecil IC₅₀ maka sampel uji tersebut memiliki keefektifan sebagai antioksidan lebih baik karena dengan konsentrasi kecil sudah dapat menimbulkan efek. Berdasar nilai IC₅₀ itu diketahui bahwa rutin memiliki aktivitas antioksidan yang lebih besar dari pada fraksi etil asetat ekstrak etanolik daun selasih. Berdasarkan tingkat kekuatan antioksidan baik rutin maupun fraksi etil asetat ekstrak etanolik daun selasih memiliki aktivitas antioksidan pada tingkat sangat kuat karena IC₅₀ keduanya kurang dari 50 µg/mL.

Tabel XII. Tingkat kekuatan antioksidan senyawa uji dengan metode DPPH (Ariyanto, 2006)

Sampel	IC ₅₀ (µg/mL)	Tingkatan aktivitas antioksidan (nilai IC ₅₀) dengan metode DPPH			
		Sangat kuat (< 50 µg/mL)	Kuat (50-100 µg/mL)	Sedang (101-150 µg/mL)	Lemah (>150 µg/mL)
Rutin	7,386	√			
Fraksi etil asetat	26,814	√			

Nilai IC₅₀ rutin dan fraksi etil asetat ekstrak etanolik daun selasih dilakukan analisis statistika dengan *PASW Statistik 18* untuk melihat signifikansi data IC₅₀

PLAGIAT MERUPAKAN TINDAKAN TIDAK TERPUJI

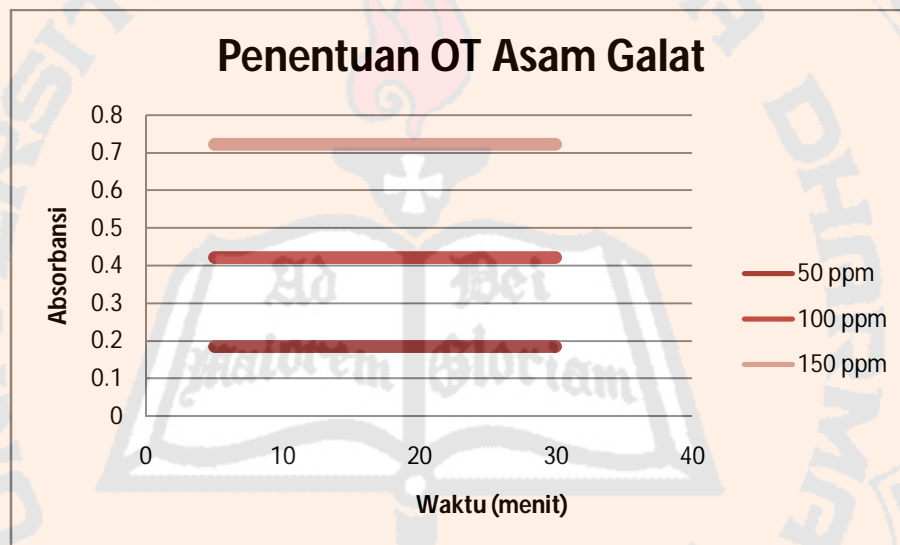
rutin dan fraksi etil asetat ekstrak etanolik daun selasih. Sebelumnya perlu dilakukan pengujian distribusi normal data %IC rutin dan fraksi etil asetat ekstrak etanolik daun selasih. Pengujian distribusi normal ini dilakukan untuk menentukan uji selanjutnya digunakan uji parametrik atau non-parametrik. Apabila data memiliki distribusi normal maka digunakan uji parametrik, sedangkan bila tidak normal maka menggunakan uji non parametrik. Pengujian distribusi normal ini menggunakan uji Kolmogorov-Smirnov. Hipotesis alternatif yang digunakan adalah data %IC berdistribusi tidak normal sedangkan hipotesis null adalah data %IC berdistribusi normal. Berdasar hasil perhitungan uji Kolmogorov-Smirnov ini didapat signifikansi 0,169. Nilai signifikansi ini lebih besar dari nilai signifikansi 0,05 (taraf kepercayaan 95%) sehingga H_{null} diterima. Oleh karena itu, dapat disimpulkan bahwa data %IC rutin dan fraksi etil asetat ekstrak etanolik daun selasih berdistribusi normal.

Uji selanjutnya digunakan uji parametrik, yaitu uji T tidak berpasangan. Uji ini dilakukan untuk mengetahui signifikansi data IC_{50} rutin dan fraksi etil asetat ekstrak etanolik daun selasih. H alternatif yang digunakan adalah IC_{50} rutin lebih kecil dari pada IC_{50} fraksi etil asetat ekstrak etanolik daun selasih, sedangkan H_{null} nya adalah IC_{50} rutin tidak lebih kecil dari pada IC_{50} fraksi etil asetat ekstrak etanolik daun selasih. Hasil perhitungan di dapatkan hasil nilai signifikansi sebesar 0,000. Bila dibandingkan dengan signifikansi yang dipilih yaitu 0,05 maka H_{null} ditolak (karena $0,000 < 0,05$), sehingga dapat disimpulkan bahwa IC_{50} rutin lebih kecil dari pada IC fraksi etil asetat ekstrak etanolik daun selasih (terdapat perbedaan bermakna).

H. Hasil Optimasi Metode Penetapan Kandungan Fenolik Total

1. Penentuan *operating time* (OT)

Operating time untuk metode ini adalah waktu dimana reaksi antara asam galat dengan reagen Folin-Ciocalteu sudah berjalan sempurna yang ditandai dengan absorbansi yang stabil. Penentuan OT dilakukan dengan mengukur absorbansi asam galat yang sudah direaksikan dengan pereaksi Folin-Ciocalteu. Pengukuran absorbansi dilakukan tiap 5 menit hingga menit ke-30.



Gambar 15. Grafik penentuan OT Asam Galat

Berdasar hasil pengukuran absorbansi dari menit ke-0 hingga menit ke-30 pada tiga macam konsentrasi asam galat yang sudah direaksikan dengan pereaksi Folin-Ciocalteu menunjukkan bahwa mulai menit yang ke-5 absorbansinya sudah stabil hingga menit ke-30. Dengan demikian, dapat disimpulkan bahwa pada menit ke-5 seluruh asam galat sudah bereaksi dengan pereaksi Folin-Ciocalteu, sehingga *operating time* untuk metode penetapan kandungan fenolik total adalah 5 menit.

PLAGIAT MERUPAKAN TINDAKAN TIDAK TERPUJI

2. Penentuan panjang gelombang maksimum

Penentuan panjang gelombang maksimum ini bertujuan untuk menentukan panjang gelombang dimana hasil reaksi antara asam galat dan pereaksi Folin-Ciocalteu mempunyai serapan yang maksimum. Menurut Zhang *et al.* (2006), panjang gelombang maksimum untuk pereaksi Folin-Ciocalteu yang direaksikan dengan senyawa fenolik adalah 750 nm.

Penentuan panjang gelombang maksimum dilakukan dengan menscan tiga konsentrasi larutan asam galat. *Scanning* panjang gelombang dilakukan pada panjang gelombang 600nm – 800nm.

Tabel XIII. Hasil scanning panjang gelombang penetapan kandungan fenolik total pada tiga konsentrasi asam galat.

Konsentrasi asam galat ($\mu\text{g/mL}$)	λ maksimum hasil <i>scanning</i>	λ maksimum rata-rata	λ maksimum teoritis
50	750	750	750
100	750		
150	750		

Berdasar hasil *scanning* tiga konsentrasi asam galat yang sudah direaksikan dengan pereaksi Folin-Ciocalteu didapatkan hasil panjang gelombang maksimum rata-rata adalah 750 nm (tabel XIII). Karena sesuai dengan teori maka panjang gelombang maksimum yang digunakan adalah 750 nm.

I. Hasil Validasi Metode Penetapan Kandungan Fenolik Total

Validasi metode penetapan kandungan fenolik total dilakukan dengan memperhatikan parameter validasi, yaitu akurasi, presisi, linearitas, dan spesifisitas metode penetapan kandungan fenolik total ini dengan larutan baku asam galat. Perlu dibuat persamaan regresi linier antara konsentrasi asam galat

PLAGIAT MERUPAKAN TINDAKAN TIDAK TERPUJI

dengan absorbansi yang diperoleh dari reaksi antara pereaksi Folin-Ciocalteu dengan asam galat untuk dapat melakukan validasi.

Tabel XIV. Hasil pengukuran absorbansi baku asam galat

Replikasi	Konsentrasi Asam galat ($\mu\text{g/mL}$)	Absorbansi	Persamaan Regresi Linier
1	52	0,306	$A = 0,0916$ $B = 0,0039$ $r = 0,9988$ $y = 0,0039x + 0,0916$
	78	0,401	
	104	0,496	
	130	0,605	
	156	0,722	
2	50	0,272	$A = 0,0654$ $B = 0,0041$ $r = 0,9998$ $y = 0,0041x + 0,0654$
	75	0,369	
	100	0,478	
	125	0,575	
	150	0,681	
3	51	0,289	$A = 0,0748$ $B = 0,0041$ $r = 0,9990$ $y = 0,0041x + 0,0748$
	76,5	0,383	
	102	0,481	
	127,5	0,589	
	153	0,704	

Berdasar hasil tiga persamaan regresi linier yang dihasilkan diatas dipilih satu persamaan dengan nilai r yang paling mendekati 1 atau -1. Dengan demikian, persamaan replikasi dua, yaitu $y = 0,0041x + 0,0654$ yang digunakan karena r nya paling baik yaitu 0,9998, sehingga persamaan ini yang digunakan untuk menghitung *recovery* dan *coefficient of variation* (CV).

1. Akurasi metode penetapan kandungan fenolik total

Akurasi diperoleh dengan cara membandingkan kadar terukur dari sejumlah tertentu senyawa standar dengan kadar teoritis. Perbandingan kadar yang terukur dengan kadar teoritis ini disebut *recovery*.

Tabel XV. Hasil % *recovery* dan % CV pengujian fenolik total asam galat

Seri baku	Konsentrasi teoritis ($\mu\text{g/mL}$)	Absorbansi	Konsentrasi terukur ($\mu\text{g/mL}$)	<i>Recovery</i> (%)	SD (%)	% CV (%)
Seri 1	52	0,306	54,974	105,7	2,499	2,427
	50	0,272	50,390	100,8		
	51	0,289	52,244	102,4		
Seri 2	78	0,401	79,333	101,7	1,858	1,866
	75	0,369	74,049	98,7		
	76,5	0,383	75,171	98,3		
Seri 3	104	0,496	103,692	99,7	1,818	1,834
	100	0,478	100,634	100,6		
	102	0,481	99,073	97,1		
Seri 4	130	0,605	131,641	101,3	1,473	1,477
	125	0,575	124,293	99,4		
	127,5	0,589	125,415	98,4		
Seri 5	156	0,722	161,641	103,6	1,966	1,940
	150	0,681	150,146	100,1		
	153	0,704	153,463	100,3		

Berdasarkan data dari tabel XIV persen *recovery* asam galat ada pada rentang 97,1 % – 105,7 % Hasil ini masih berada pada rentang *recovery* yang baik untuk baku sebagai analit dengan kadar sekitar 100 ppm. Nilai *recovery* yang masih bisa diterima adalah 90% - 107% (Harmita, 2004), sehingga dapat dikatakan bahwa metode ini memiliki akurasi yang baik

2. Presisi metode penetapan kandungan fenolik total

Berdasarkan data dari tabel XIV didapat % CV rutin yang tertinggi adalah 2,427. Nilai ini masih masuk dalam persyaratan untuk analit dengan kadar sekitar 100 ppm, yaitu % CV 5, sehingga dapat dikatakan metode ini memiliki presisi yang baik.

PLAGIAT MERUPAKAN TINDAKAN TIDAK TERPUJI

3. Linearitas metode penetapan kandungan fenolik total

Pada persamaan regresi linier asam galat nilai koefisien korelasi (r) yang didapat untuk replikasi 1 adalah 0,9988, replikasi 2 adalah 0,9998, dan replikasi 3 adalah 0,9990. Hasil ini masih lebih besar dari r tabel dengan taraf kepercayaan 95% dan *degree of freedom* (df) 3, yaitu 0,8783, sedangkan menurut Mulja dan Suherman (1995) koefisien korelasi yang dapat diterima adalah $>0,999$. Persamaan regresi linier yang digunakan, yaitu replikasi 2 mempunyai $r = 0,9998$ sehingga memenuhi persyaratan ini. Jadi metode ini memiliki linieritas yang baik.

4. Spesifisitas metode penetapan kandungan fenolik total

Hasil *scanning* pada larutan baku asam galat (Lampiran 12) pada panjang gelombang 750 nm tidak terdapat serapan, sehingga ketika asam galat direaksikan dengan pereaksi Folin-Ciocalteu maka yang terbaca hanya absorbansi hasil reaksi saja. Oleh karena itu, dapat disimpulkan bahwa metode penetapan kandungan fenolik total untuk asam galat memiliki spesifisitas yang baik, sedangkan untuk sampel, yaitu fraksi etil asetat ekstrak etanolik daun selasih (lampiran 6c) terdapat sedikit serapan. Walaupun serapan sangat kecil tetapi akan mengganggu hasil pengukuran. Oleh karena itu, metode penetapan kandungan fenolik total untuk fraksi etil asetat ekstrak etanolik daun selasih kurang memiliki spesifisitas yang baik.

J. Hasil Penetapan Kandungan Fenolik Total

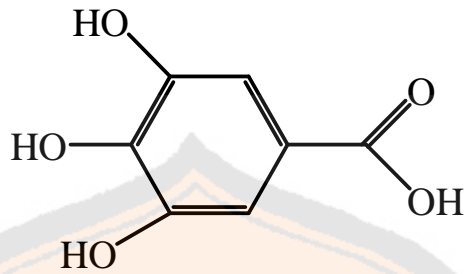
Pada penelitian ini dilakukan penetapan kandungan fenolik total untuk melihat hubungan antara aktivitas antioksidan dengan kandungan fenolik total

PLAGIAT MERUPAKAN TINDAKAN TIDAK TERPUJI

yang ada dalam fraksi etil asetat ekstrak etanol daun selasih. Senyawa fenolik telah diketahui memiliki aktivitas sebagai antioksidan dengan cara penangkapan radikal. Aktivitas senyawa fenolik sebagai antioksidan berkaitan dengan strukturnya, dimana senyawa fenolik dapat menyumbangkan hidrogen kepada radikal bebas (Gulcin *et al.*, 2004).

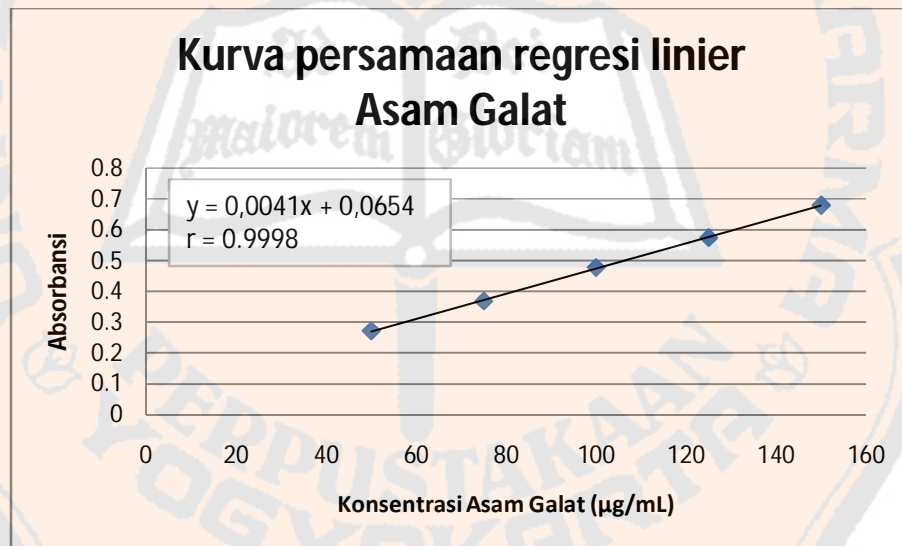
Penetapan kandungan fenolik total dilakukan dengan menggunakan metode Folin-Ciocalteu. Prinsip reaksi Folin-Ciocalteu ini adalah reaksi reduksi-oksidasi. Senyawa fenolik akan mengalami oksidasi sehingga menjadi bentuk keton sedangkan kompleks fosfotungstat-fosfomolibdat yang berasal dari pereaksi Folin-Ciocalteu ini akan mengalami reduksi, sehingga menghasilkan kompleks molybdenum blue yang berwarna biru. Reaksi ini berlangsung dalam suasana basa karena pada suasana basa senyawa fenolik akan menjadi ion fenolat yang lebih mudah teroksidasi sehingga reaksi akan berlangsung lebih cepat.

Pada penelitian ini digunakan asam galat sebagai baku untuk membuat persamaan regresi linier. Digunakan asam galat sebagai pembanding karena asam galat termasuk dalam senyawa fenolik dan memiliki aktivitas antioksidan yang kuat, karena asam galat memiliki tiga gugus hidroksi fenolik. Selain itu, asam galat juga tersedia dalam kemurniaan yang tinggi dan stabil, serta harganya yang lebih murah dibanding dengan standar yang lain.



Gambar 16. Struktur asam galat

Kandungan fenolik total dinyatakan dengan massa ekuivalen asam galat. Untuk menentukannya, perlu dibuat persamaan regresi linier antara konsentrasi asam galat dengan absorbansi yang didapat setelah direaksikan dengan pereaksi Folin-Ciocalteu. Persamaan regresi linier yang digunakan adalah persamaan yang memiliki nilai r yang mendekati 1, yaitu replikasi dua (Tabel XIV).



Gambar 17. Kurva persamaan regresi linier asam galat

Setelah didapatkan persamaan regresi linier, yaitu $y = 0,0041x + 0,0654$ dengan koefisien korelasi 0,9998, maka persamaan regresi linier itu digunakan untuk menghitung kandungan fenolik total dalam sampel.

Tabel XVI. Hasil perhitungan kandungan fenolik total

Sampel	Absorbansi	Kandungan fenolik ($\mu\text{g/mL}$)	Kandungan fenolik total (mgekivalen asam galat per g fraksi)	Rata-rata (mg ekivalen asam galat per g fraksi)	SD (%) (mg ekivalen asam galat per g fraksi)
Sampel 1 (510 $\mu\text{g/mL}$)	0,422	86,976	8,519	9,422	0,783
Sampel 2 (510 $\mu\text{g/mL}$)	0,477	100,390	9,843		
Sampel 3 (520 $\mu\text{g/mL}$)	0,488	103,073	9,904		

Berdasarkan hasil perhitungan didapatkan hasil kandungan fenolik total rata-rata pada sampel sebesar $9,422 \pm 0,783$ mg ekivalen asam galat per gram fraksi etil asetat ekstrak etanolik daun selasih.

BAB V

KESIMPULAN DAN SARAN

A. Kesimpulan

1. Nilai aktivitas antioksidan fraksi etil asetat ekstrak etanolik daun selasih dengan menggunakan radikal bebas DPPH yang dinyatakan sebagai IC₅₀ sebesar $26,814 \pm 0,281 \mu\text{g/mL}$.
2. Kandungan fenolik total pada fraksi etil asetat ekstrak etanolik daun selasih yang dinyatakan dengan massa ekuivalen asam galat sebesar $9,422 \pm 0,783 \text{ mg}$ ekuivalen asam galat per gram fraksi etil asetat ekstrak etanolik daun selasih.

B. Saran

1. Perlu dilakukan modifikasi pada preparasi sampel hingga didapatkan sampel yang tidak memberikan serapan pada panjang gelombang yang digunakan.
2. Perlu dilakukan penelitian aktivitas antioksidan dengan menggunakan metode yang lain.
3. Perlu dilakukan isolasi lebih lanjut untuk mengetahui senyawa yang memiliki aktivitas sebagai antioksidan dalam daun selasih.

PLAGIAT MERUPAKAN TINDAKAN TIDAK TERPUJI

Daftar Pustaka

- Akowuah, A., Mariam, A., Chin, S.H., 2009, The Effect of extraction temperature on Total Phenols and Antioxidant Activity of *Gynura procumbens* leaf, *Pharmacognocny magazine*, **5**, 81-85.
- Amarowicz, R., Nacz. M., dan Shahidi, F., 2000, Antioxidant Activity of Crude Tannis of canola and Rapeseat Hulls, *JAOCs*, **77**, 957-961.
- Anonim, 1986, *Sediaan Galenik*, 11-12, Departemen Kesehatan RI, Jakarta.
- Anonim, 1995 a, *Farmakope Indonesia Edisi IV*, 7, 1061, Departemen Kesehatan Republik Indonesia, Jakarta.
- Anonim, 1995 b, *The United States Pharmacopeia*, Edisi 23, 1982-1984, United States Pharmacopeia Convention, Rockville.
- Anonim, 1995 c, *Materia Medika Indonesia* Jilid VI, Departemen Kesehatan Republik Indonesia, Jakarta.
- Anonim, 2009, *Awas! Kondisi Lingkungan Buruk Pemicu Radikal Bebas*, 23-24, PDPERSI, Jakarta.
- Anonim, 2010, *Parameter Standar Umum Ekstrak Tumbuhan Obat*, 9-12, Departemen kesehatan RI, Jakarta.
- Aqil, F., Ahmad, I., dan Mehmood, Z., 2006, Antioxidant and Free Radical Scavenging Properties of Twelve Traditionally Used Indian Medicinal Plants, *Turk J Biol*, **30**, 177-183.
- Armala, M.M., 2009, Daya Antioksidan Fraksi Air Ekstrak Herba Kenikir (*Cosmos caudatus* H.B.K) dan Profil KLT, *Skripsi*, 39, Universitas Islam Indonesia, Yogyakarta.
- Bassett, J., Denney, R.C., Jeffery, G.H., dan Mendham, J., 1991, *Vogel's Textbook of Quantitative Inorganic Analysis Including Elementary Instrumental Analysis*, 165-166, Longman Group UK Limited, London.
- Bhujbal, S., Nanda, R., dan Patil, J., 2010, Structure elucidation of a flavonoid glycoside from the roots of *Clerodendrum serratum* L., *Brazilian Journal of Pharmacognosy*, **20(6)**, 1001-1002.
- Bruneton, J., 1999, *Pharmacognosie, Phytochimie, Plantes Medicinales*, 229, diterjemahkan oleh Hatton, C.K., Lavoisier Publishing, Paris.

PLAGIAT MERUPAKAN TINDAKAN TIDAK TERPUJI

- Cheng, G.W., dan Crisosto, C.H., 1995, Browning Potential, Phenolic Composition and Polyphenoloxidase Activity of Buffer Extracts of Peach and Nectarine Skin Tissue, *J. Amer. Soc. hort. sci.*, **20(5)**, 835-838.
- Choi, Y.W., Lo, S.C., and Han, S., 2004, Antioxidant activity of Crude extract and pure Compounds of *Acer ginnata* Max, *Bull korean Chem Soc*, **25**, 389-391.
- Cuvelier, M., 1998, Characterization of two concentration carnoic acid derivatives by spectrophotometry, *ECSSO2*, **1(3)**, 142
- Dattani, M., 2008, *Ocimum sanctum and Its Therapeutic Applications*, <http://www.pharmainfo.net/keywords/ocimum-sanctum>, diakses tanggal 24 November 2010.
- Davidek, 1997, *Pharmaceutical Application Of Thin Layer Chromatography*, 569, 608-611, Elsevier Publishing Company, Amsterdam, London, New York.
- Dehpour, M., 2009, Antioxidant activity of methanol extract of *Ferula assafoetida* and its essential oil composition, *Grasas Aceites*, **60(4)**, 405-412
- Dinis, G., 1994, Action of phenolic derivatives (acetoaminophen, salicylate and 5-aminosalicylate) as inhibitors of membrane lipid peroxidation and as peroxyl radical scavengers, *Archives of Biochemistry and Biophysics*, **315**, 161-169
- Ebrahimzadeh, M.A., Pourmorad, F., Hafezi, S., 2007, Antioxidant Activities of Iranian Corn Silk, *Turk J Biol*, **32(2007)**, 43-49.
- Fessenden, R.J., dan Fessenden, J.S., 1995, *Kimia Organik, Jilid II*, 199-220, diterjemahkan oleh Pujaatmaka, A.H., edisi ke 3, Penerbit Erlangga, Jakarta.
- Folin, O., dan Ciocalteu, V., 1944, On Tyrosine and Tryptophane Determination in Proteins, *J Biol. Chem.*, **73**, 627-650.
- Gajula, D., Verghese, M., Boateng, J., Walker, L.T., Shackelford, L., Mentreddy, S.R., et al., 2009, Determination of Total Phenolics, Flavonoids, and Antioxidant and Chemopreventive Potential of Basil (*Ocimum basilicum* L. and *Ocimum tenuiflorum* L.), *International Journal of Cancer Research*, **5(4)**, 130-143.
- Galati, A., McKay, A., dan Tan, S.C., 2005, Minimising Post-Harvest Losses of Carrots, *Farmnote*, **75(95)**, 2.

PLAGIAT MERUPAKAN TINDAKAN TIDAK TERPUJI

- Geeta, Vasudevan, D.M., Kedlaya, R., Deepa, S., dan Ballal, M., 2001, Activity of *Ocimum sanctum* Againsts the Enteric Pathogens, *Indian J Med Sci*, **55**, 434-438.
- Grieb, P., 1992, Antioxidant Systems Physiology and Pharmacotherapy Trends, *Materia Medica Polona Fasc*, **4(84)**, 217-222.
- Gulcin, I., Uguz, M.T., Oktay, M., Beydemir, S., dan Kufrevioglu, O.L., 2004, Evaluation of the Antioxidant and Antimicrobial Activities of Clary Sage (*Salvia sclarea* L.), *Turk. J. Agric. For.*, **28**, 25-33.
- Hakim,L.F., Arivazhagan,G., dan Boopathy,R., 2008, Antioksidant Property of Selected Ocimum Species and their secondary Metabolite Content, *Journal of Medical Plants Research*, **2(9)**, 250-257.
- Halliwell, B., 1994, Free Radicals and Antioxidant : a Personal View, *Nutr. Rev.*, **52**, 253-265.
- Halliwell, B., dan Gutteridge, J.M.C., 2000, *Free Radicals in Biology and Medicine*, 3th ed, 1-231, Oxford University Press, Inc., New York.
- Harborne, J.B., 1987, *Metode Fitokimia: Penentuan Cara Modern Menganalisis Tumbuhan*, Ed. 2, hal. 47-109, diterjemahkan oleh Padmawinata K. dan Sudiro I., ITB, Bandung.
- Harmita, 2004, *Petunjuk Pelaksanaan Validasi dan Cara Perhitungan*, 5-13, Departemen FMIPA UI, Depok.
- Huang, D., Ou, B., and Prior, R.L., 2005, The Chemistry Behind Antioxidant Capacity Assays, *J.Agric.Food Chem*, **53**, 1841-1856.
- Janeiro, P., dan Brett, A., 2004, Cathecin Electrochemical Oxidation Mechanism, *Anal. Chim. Acta*, **518**, 109-115.
- Jasson, N., 2005, *The Determination of Total Phenolic Compounds in Green Tea*, <http://folinciocalteau/method/colorimetric>, diakses tanggal 24 Oktober 2010.
- Juniarti, Osmeli,D.,dan Yuhernita, 2009, Kandungan Senyawa Kimia, Uji Toksisitas (BST) dan Antioksidan dari Ekstrak Daun Saga (*Alena precatorius* L.), *Makera, sains*, **13(1)**, 50-54.
- Kammerbauer, J., and Dick, T., 2000, Monitoring of Urban traffic emission Using Some Physiological Indicator in *Ricinus Communis* L., *Plant Environ. Cont and Toxicol*, **39**, 161-166.

PLAGIAT MERUPAKAN TINDAKAN TIDAK TERPUJI

- Kartesz, J.T., 2010, *Plant Profile: Ocimum tenuiflorum L. holy basil*, <http://plant.usda.gov/java/profile>, diakses tanggal 23 September 2010.
- Kelm, M.A., Nair, M.G., Strasburg, G.M., dan De Witt, D.L., 2000, Antioxidant and Cyclooxygenase inhibitory phenolic compound from *Ocimum sanctum* L., *Phytomedicine*, **7(1)**, 7-13.
- Koleva, I., Van Baek, T.A., dan Linssen, J.P.H., 2002, Screening of Plant Extracts For Antioxidant Activity: A Comparative Study on Three Testing Methods. *Phytochemical Analysis*, **13**, 8-17.
- List, P.H., dan Schmidt, P.C., 2000, *Phytopharmaceutical Technology*, 107, 109, CRC Press, USA.
- Madhavi, D.L., Deshpande, S.S., dan Salunkhe, D.K., 1996, *Introduction Food Antioxidant : Technological, Toxicological, and Health Perspectives*, 1-4, Marcel Dekker, Inc, New York.
- Mann, 1994, *Natural Products: Their Chemistry and Biological Significance*, 361-367, Longman Group UK Limited, London England.
- Markham, K.R., 1988, *Cara Mengidentifikasi Flavonoid*, 1-37, diterjemahkan oleh Kosasih Padmawinata, Penerbit ITB, Bandung.
- Marxen, 2007, Determination of DPPH Radical Oxidation Caused by Methanolic Extracts of Some Microalgal Species by Linear Regression Analysis of Spectrophotometric Measurements, *Sensors*, **7(2007)**, 2080-2095.
- Massela, R., Di Benedetto, R., Vart, R., Filess, C., dan Giovanni, C., 2005, Novel Mechanism of natural Antioxidant Compounds in Biological System : Involvement of Glutathione related Enzymes, *J.Nutr.Biochem*, **16**, 577-586.
- Mayer, H., 1999, Air Pollution in Cities, *Atmospheric Environment*, **33**, 4027-4037.
- Molyneux, P., 2004, The Use of The Stable Free Radical Diphenylpicrylhydrazyl (DPPH) for Estimating Antioxidant Activity, *Songklanakarinn J. Sci. Technol.*, **26(2)**, 211-219.
- Mulja, M., dan Hanwar, D., 2003, Prinsip-Prinsip Cara Berlaboratorium yang Baik, *Majalah Farmasi Airlangga*, **3(2)**, 26-28.
- Mulja, M., dan Suherman, 1995, *Analisis Instrumental*, 224-228, Airlangga University Press, Surabaya.

PLAGIAT MERUPAKAN TINDAKAN TIDAK TERPUJI

- Niki, E., dan Noguchi, N., 2000, Evaluation of Antioxidant Capacity : what Capacity is Being Measured by Which Method? *IUBMB Life*, **50**, 323-329.
- Nusarini, M.R., 2007, Uji Aktivitas Antioksidan Fraksi Etil Asetat Ekstrak Metanolik Herba Ketul (*Bidens pilosa* L.), *Skripsi*, 44, Universitas Gadjah Mada, Yogyakarta.
- Pattanayak, P., Behera, D., Das, dan Panda, K., 2010, *Ocimum sanctum* L, a Reservoir Plant for Therapeutic Application an Overview, *Phcog.Rev*, **4**, 95-105.
- Pervical, M., 1998, *Antioxidants*, Advanced Nutrition Publication, Inc, <http://acudoc.com/Antioxidants.PDF>, diakses tanggal 24 November 2010.
- Pokorny, J., 1991, Natural Antioxidant for Food Use, *Trends Food Sci. Technol.*, **2**, 223-227.
- Pourmorad, F., Hosseinimetir, S.J., dan Shahabimajid, N., 2006, Antioxidant Activity, Phenol and Flavonoid Content of Some Selected Iranian Medicinal Plant, *AJB*, **5(11)**, 1142-1145.
- Pratiwingsih, 1984, Karakterisasi Biji Saga (*Adenanthera pavonina* L.), *Skripsi*, 24, Institut Pertanian Bogor, Bogor.
- Rahman, S., Islam, R., Kamruzzaman, M., Alam, K., dan Jamal, M., 2011, *Ocimum sanctum* L. A Review of Phytochemical and Pharmacological Profile, *American Journal of Drug Discovery*, **4**, 1-15.
- Rice-Evans, C.A., Miller, N.J., dan Panganga, G., 1997, Antioxidant Properties of Phenolic Compounds, *Trends in Plant Sci*, **2**, 152-159.
- Robinson, T., 1995, *Kandungan Kimia organik Tumbuhan Tinggi*, diterjemahkan oleh Padmawinata, K., 191-217, Penerbit ITB, Bandung.
- Seidal, V., 2006, *Natural Product Isolation: Initial and Bulk Extraction*, 33, Humana Press, Totowa.
- Siddique, Y.H., Ara, G., Beg, T., dan Afzal, 2007, antigenotoxic Effect of *Ocimum sanctum* L. Extract Againsts Cyproterone Acetat Induced Genotoxic Damage in Culture Mammalian Cells, *Acta Biologica Hungarica*, **58(4)**, 397-409.
- Sihile, D., 2009, Karakterisasi minyak atsiri Jerangau (*Acorus calamus*), *Skripsi*, 53, Universitas Sumatera Utara, Medan.

PLAGIAT MERUPAKAN TINDAKAN TIDAK TERPUJI

- Silva, Lee., dan Kinghorn, 1998, *Special Problems with The Exctraction of Plants In Cannel*, R.P.J, *Natural product Isolation*, 343-351, Humana Press Inc, New Jersey.
- Singh,N.K., dan Setigal,C.B., 1999, Micropropagation of holy Bacil from Young Infflorosencens of Mature Plant, *Plant Growth Regul*, **29(5)**, 161-166.
- Sudarsono, Gunawan, D., Wahyuono, S., Donatus, I.A., dan Purnomo, 2002, *Tumbuhan obat II Hasil Penelitian, Sifat-Sifat, dan Penggunaannya*, 34-38, Pusat Studi Obat Tradisional Universitas Gadjah Mada, Yogyakarta.
- Suryaningrum, D., 2006, Uji Aktivitas Senyawa Antioksidan dari rumput Laut *Halymenia harveyana* dan *Euchema cottoni*, *Jurnal PBKP*, **1**, 51-63.
- Syamsuhidayat, S.S., dan Hutapea, J., 1991, *Inventaris Tanaman Obat Indonesia*, 420-421, Departemen Kesehatan RI, Jakarta.
- Tapan E, 2005, *Kanker, Antioksidan, dan Terapi Komplementer*, 35-46, Gramedia, Jakarta.
- Van Steenis, C.G.G.J., 1981, *Flora untuk Sekolah di Indonesia*, diterjemahkan oleh Surjowinoto,M., PT.Pradnya Paramita, Jakarta,35-360.
- Veeru, P., Kishor, M.P., dan Meenakshi, M., 2009, Screening of Medical Plan Exctracts for Antioxidant Activity, *Journal of Medicinal Plant Research*, **3(8)**, 608-612.
- Velioglo,Y.Z., 1998, Antioxidant Activity and Total Phenolics in Selected Fruits, Vegetable and Grain Product, *J.Agric.Food Chem*, **46**, 4113-4117.
- Voigt, R., 1995, *Buku Pelajaran Teknologi Farmasi*, 570-571, diterjemahkan oleh Soewandhi, S.N., Penerbit UGM, Yogyakarta.
- Vrinda,B., dan Devi,P., 2001, Radiation Protection of Luman Lymphocyte Chromosome in vitro by Orientin and Vicenin, *Mutal.Res*, **498(1-2)**, 39-46.
- Walsh, M.P., 1994, Trend in Automotive Transport : Implication for Environmental Protection, Energy Efficiency and Sustainable Development, *Paper Presented at the International Conference Toward Clean transport : Fuel Efficient and Clean Motor Vehicle, Mexico City*, 28-30.
- Wangcharoen, W., dan Morasuk, W., 2007 a, Antioxidant Capacity and Phenolic Content of Holy Basil, *Songklanakar J. Sci. Technol.*, **29(5)**, 1407-1415.

PLAGIAT MERUPAKAN TINDAKAN TIDAK TERPUJI

- Wangcharoen, W. dan Morasuk, W., 2007 b, Antioxidant Capacity and Phenolic Content of Some Thai Culinary Plants, *Mj. Int. J. Sci. Tech.*, **01(02)**, 100-106.
- Waterman,P.G., dan Mole,S., 1994, *Analysis of Phenolic Plant Metabolites*, 42-45, Blackwell Scientific, Oxford.
- Windono, 2001, Uji Peredam Radikal Bebas terhadap 1,1-Diphenyl-2-picrylhydrazyl (DPPH) dari Ekstrak Kulit Buah dan Biji Anggur (*Vitis vinifera* L.) Probolinggo Biru dan Bali, *Artocarpus, Surabaya*, **1(1)**, 34-40.
- World Health Organization, 2003, *WHO Guidelines on Good Agricultural and Collection Practices (GACP) for Medicinal Plants*, Government of the Grand Duchy of Luxembourg, 11-15.
- Yazdani, T., dan Yunus, M., 2009, Total Flavonoid and Phenolics in *Catharantus roseus* L and *Ocimum sanctum* L. as Biomarker of Urban Auto Pollution, *Caspian J. Env Sci*, **7**, 9-16.
- Zhang,Q., Zhang, J., Shen, J., Silva, A., Dennis., D.A., dan Barrow, C.J., 2006, A simple 96-well Microplate Method for Estimation of Total Polyphenol Content in Seaweeds, *J.App.Phyco*, **18**, 445-450.

PLAGIAT MERUPAKAN TINDAKAN TIDAK TERPUJI

LAMPIRAN

Lampiran 1. Surat determinasi tanaman Selasih



FAKULTAS FARMASI
UNIVERSITAS SANATA DHARMA
(KAMPUS III) Paingan Maguwoharjo, Depok, Sleman, Yogyakarta 55281
Telp. (0274) 8833037, 883968, Fax. (0274)886529 – Telegram : SADHAR YOGYA
E-Mail : Farmasi@usd.ac.id

SURAT PENGESAHAN DETERMINASI

No. /LKTO/far-USD/ /

Laboratorium Kebun Tanaman Obat Fakultas Farmasi Universitas Sanata Dharma, menyatakan bahwa telah melakukan determinasi terhadap satu contoh tanaman, dengan nama:
Ocimum sanctum L.
(selasih)

Determinasi telah dilakukan secara benar sesuai dengan:

van Steenis, C.G.G.J., 1981, Flora untuk Sekolah di Indonesia, diterjemahkan oleh Surjowinoto, M., 35-360, PT. Pradnya Paramita, Jakarta

Hingga kategori: Spesies (jenis)

Tanaman tersebut dipakai dalam penelitian:

“Uji Aktivitas Antioksidan Menggunakan Radikal 1,1-Difenil-2-Pikrilhidrazil (DPPH) dan Penetapan Kandungan Fenolik Total Fraksi Etil Asetat Ekstrak Etanolik Daun Selasih (*Ocimum sanctum* L.)”

Oleh : Yosafat Rubbyanto Widodo
Dari : Fakultas Farmasi Universitas Sanata Dharma

Herbarium disimpan Laboratorium Biologi Umum, Fakultas Farmasi Universitas Sanata Dharma, dengan nomor katalog:

Demikian surat pengesahan determinasi ini dibuat untuk dapat dipergunakan sebagai mana mestinya

Mengesahkan,
Kepala Laboratorium

Yogyakarta, 24 September 2010
Determinator

(Rini Dwiastuti, M.Sc., Apt.)
(Yohanes Dwiatmaka, M. Si.)

Lampiran 2. Gambar tanaman selasih dari daerah Selarong (Yogyakarta)



Lampiran 3. Perhitungan Rendemen

a. Rendemen ekstrak etanolik

Penimbangan

	Cawan 1 (g)	Cawan 2 (g)	Cawan 3 (g)	Cawan 4 (g)
Bobot cawan	33,1303	53,6308	46,1458	35,2202
Bobot cawan + ekstrak	38,3481	62,3580	55,1301	41,9459
Bobot ekstrak	5,2178	8,7272	8,9843	6,7257
Total bobot ekstrak	29,655			

Bobot daun selasih yang digunakan = 1000 g

$$\text{Rendemen ekstrak etanol} = \frac{\text{Bobot ekstrak}}{\text{Bobot daun}} \times 100 \%$$

$$= \frac{29,655}{1000} \times 100 \%$$

$$= 2,965 \%$$

b. Rendemen fraksi etil asetat

Penimbangan

$$\text{Bobot cawan} = 46,1458 \text{ g}$$

$$\text{Bobot cawan + fraksi} = 47,5926 \text{ g}$$

$$\text{Bobot fraksi} = 1,4468 \text{ g}$$

$$\text{Rendemen fraksi etil asetat} = \frac{\text{Bobot fraksi}}{\text{Bobot cawan}} \times 100 \%$$

$$= \frac{1,4468}{46,1458} \times 100 \%$$

$$= 0,14468 \%$$

Lampiran 4. Data penimbangan untuk pengujian aktivitas antioksidan

a. Penimbangan DPPH

	Replikasi 1 (g)	Replikasi 2 (g)
Bobot kertas	0,2493	0,2541
Bobot kertas + DPPH	0,2537	0,2580
Bobot kertas + sisa	0,2498	0,2543
Bobot DPPH	0,0039	0,0037

b. Penimbangan Rutin

	Replikasi 1 (g)	Replikasi 2 (g)	Replikasi 3 (g)
Bobot kertas	0,2572	0,2388	0,2511
Bobot kertas + Rutin	0,2598	0,2415	0,2538
Bobot kertas + sisa	0,2574	0,2390	0,2514
Bobot Rutin	0,0024	0,0025	0,0024

c. Penimbangan Fraksi etil asetat ekstrak etanol daun selasih

	Replikasi 1 (g)	Replikasi 2 (g)	Replikasi 3 (g)
Bobot cawan	22,1305	24,4251	22,6213
Bobot cawan + Fraksi	22,1405	24,4351	22,6325
Bobot fraksi	0,01	0,01	0,0102

Lampiran 5. Data konsentrasi bahan untuk pengujian aktivitas antioksidan

a. Konsentrasi DPPH

Replikasi 1

$$BM = 394,33$$

$$Mol = \frac{0,37}{394,33} = 0,00094 \text{ mmol}$$

$$M = \frac{0,00094}{10} = 0,094 \text{ mM}$$

Replikasi 2

$$BM = 394,33$$

$$Mol = \frac{0,37}{394,33} = 0,00094 \text{ mmol}$$

$$M = \frac{0,00094}{10} = 0,094 \text{ mM}$$

b. Konsentrasi Rutin

Konsentrasi larutan induk

Replikasi 1

$$\frac{240}{10} = 24 \text{ } \mu\text{g/mL}$$

Replikasi 2

$$\frac{250}{10} = 25 \text{ } \mu\text{g/mL}$$

Replikasi 3

$$\frac{240}{10} = 24 \text{ } \mu\text{g/mL}$$

Konsentrasi intermediet

Replikasi 1

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

$$240 \text{ } \mu\text{g/mL} \cdot 1 = C_2 \cdot 10$$

$$C_2 = 24 \text{ } \mu\text{g/mL}$$

Replikasi 2

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

$$250 \text{ } \mu\text{g/mL} \cdot 1 = C_2 \cdot 10$$

$$C_2 = 25 \text{ } \mu\text{g/mL}$$

Replikasi 3

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

$$240 \text{ } \mu\text{g/mL} \cdot 1 = C_2 \cdot 10$$

$$C_2 = 24 \text{ } \mu\text{g/mL}$$

PLAGIAT MERUPAKAN TINDAKAN TIDAK TERPUJI

Konsentrasi seri baku

Replikasi	Konsentrasi ($\mu\text{g/mL}$)				
	Seri baku 1	Seri baku 2	Seri baku 3	Seri baku 4	Seri baku 5
1	2,4	4,8	7,2	9,6	12
2	2,5	5	7,5	10	12,5
3	2,4	4,8	7,2	9,6	12

c. Konsentrasi Fraksi etil asetat ekstrak etanol daun selasih

Konsentrasi larutan induk

Replikasi 1

$$\text{————} = 240 \mu\text{g/mL}$$

Replikasi 2

$$\text{————} = 250 \mu\text{g/mL}$$

Replikasi 3

$$\text{————} = 240 \mu\text{g/mL}$$

Konsentrasi intermediet

Replikasi 1

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

$$240 \mu\text{g/mL} \cdot 1 = C_2 \cdot 10$$

$$C_2 = 12 \mu\text{g/mL}$$

Replikasi 2

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

$$250 \mu\text{g/mL} \cdot 1 = C_2 \cdot 10$$

$$C_2 = 12,5 \mu\text{g/mL}$$

Replikasi 3

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

$$240 \mu\text{g/mL} \cdot 1 = C_2 \cdot 10$$

$$C_2 = 12 \mu\text{g/mL}$$

Konsentrasi seri baku

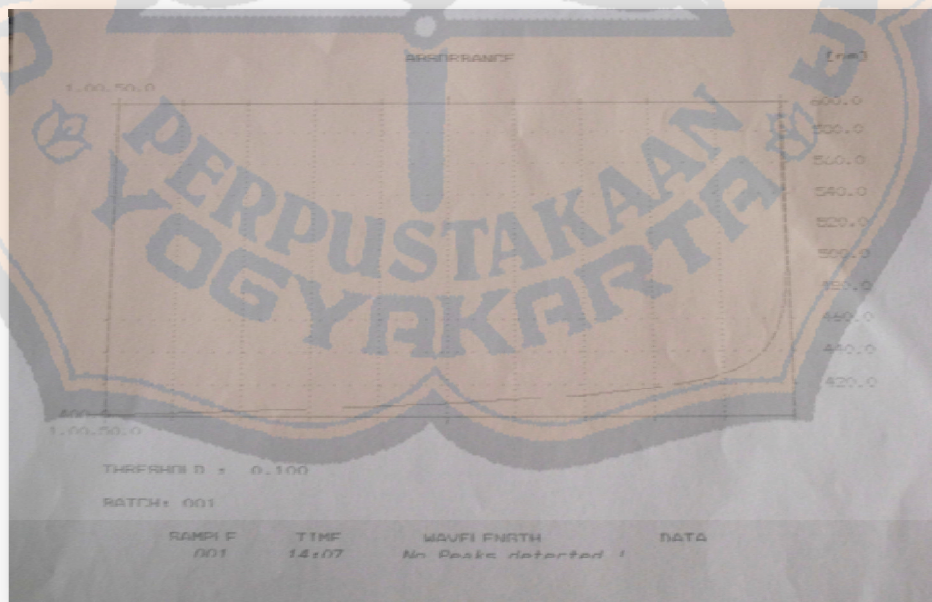
Replikasi	Konsentrasi ($\mu\text{g/mL}$)				
	Seri baku 1	Seri baku 2	Seri baku 3	Seri baku 4	Seri baku 5
1	8	16	24	32	40
2	8	16	24	32	40
3	8,16	16,32	24,48	32,64	40,8

Lampiran 6. Scanning Larutan pengkoreksi untuk pengujian aktivitas antioksidan

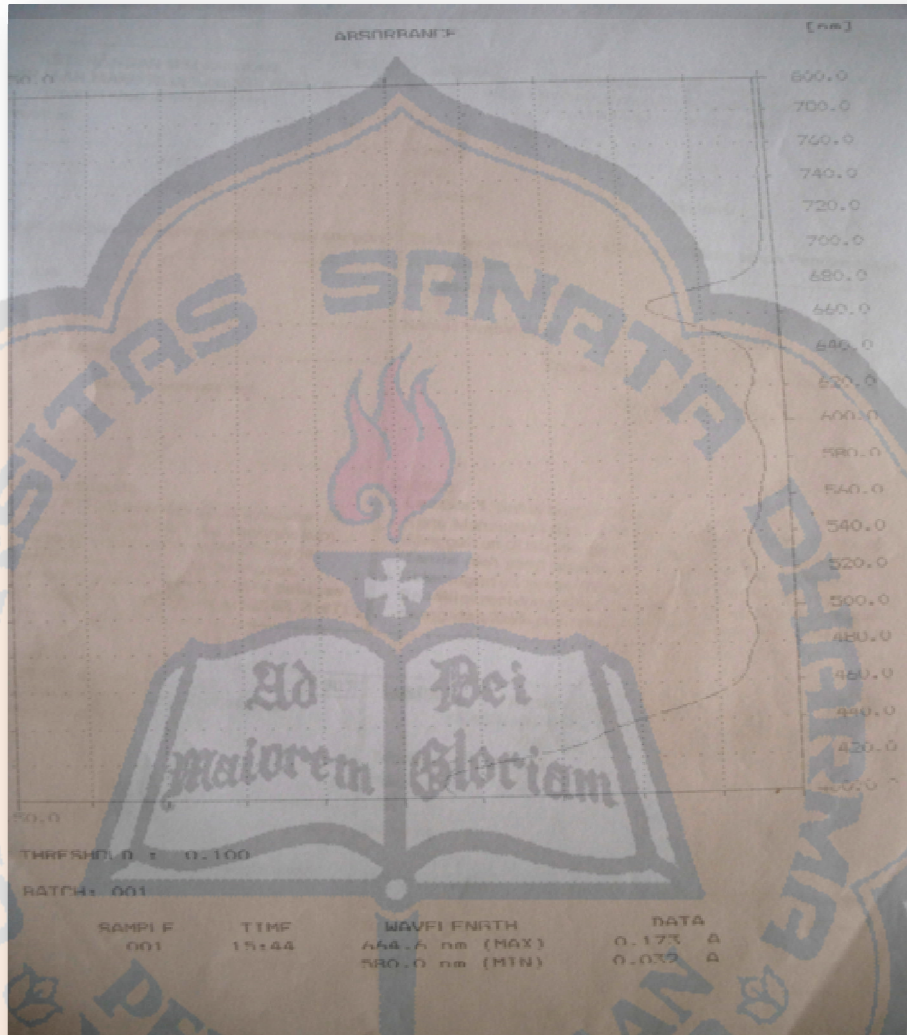
a. Scanning pelarut metanol : air (1 : 1)



b. Scanning rutin



c. Scanning Fraksi etil asetat ekstrak etanol daun selasih



Lampiran 7. Optimasi metode uji aktivitas antioksidan

1. Penentuan OT

a. Penentuan OT rutin

Waktu (menit)	Absorbansi		
	Rutin 12 µg/mL	Rutin 36 µg/mL	Rutin 60 µg/mL
5	0,764	0,496	0,222
10	0,752	0,486	0,210
15	0,749	0,483	0,197
20	0,744	0,480	0,189
25	0,740	0,478	0,183
30	0,740	0,475	0,179
35	0,740	0,475	0,179
40	0,740	0,475	0,179
45	0,740	0,475	0,179

OT yang di dapat 30 menit

b. Penentuan OT fraksi etil asetat ekstrak etanolik daun selasih

Waktu (menit)	Absorbansi		
	Fraksi 80 µg/mL	Fraksi 120 µg/mL	Fraksi 160 µg/mL
5	0,612	0,487	0,368
10	0,595	0,480	0,355
15	0,586	0,472	0,347
20	0,580	0,465	0,340
25	0,572	0,460	0,335
30	0,572	0,457	0,332
35	0,572	0,457	0,332
40	0,572	0,457	0,332
45	0,572	0,457	0,332

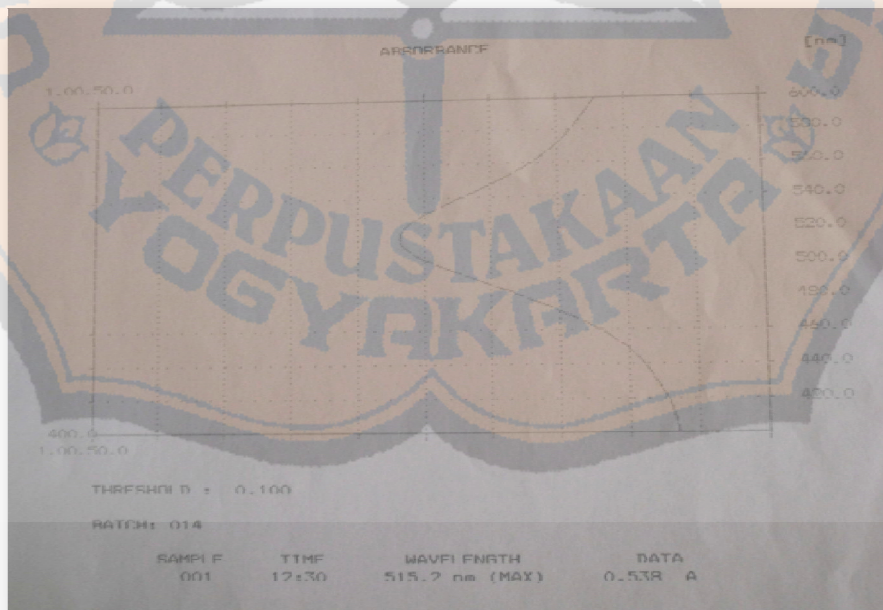
OT yang didapat 30 menit

2. Penentuan λ maksimum

a. Spektra DPPH 0,016 mM

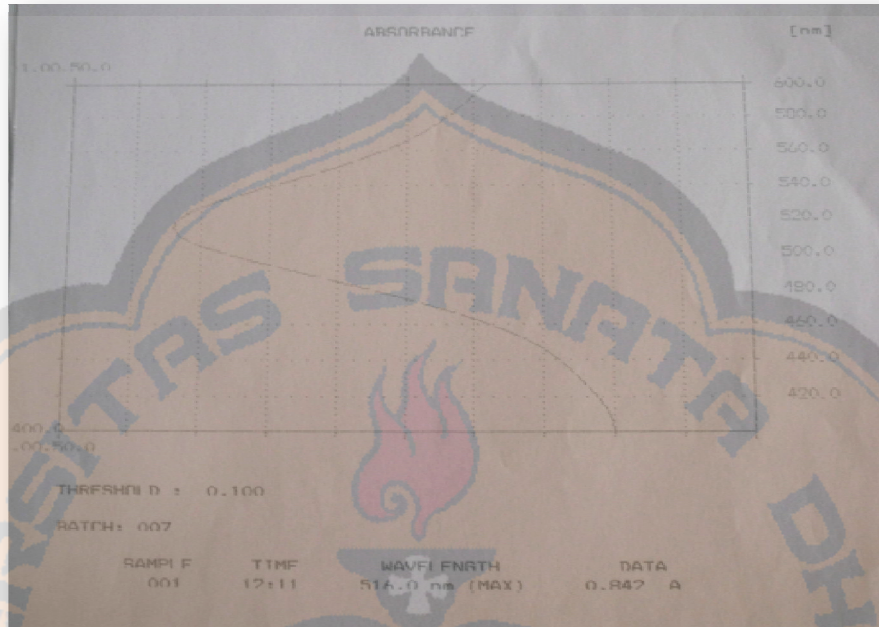


b. Spektra DPPH 0,048 mM

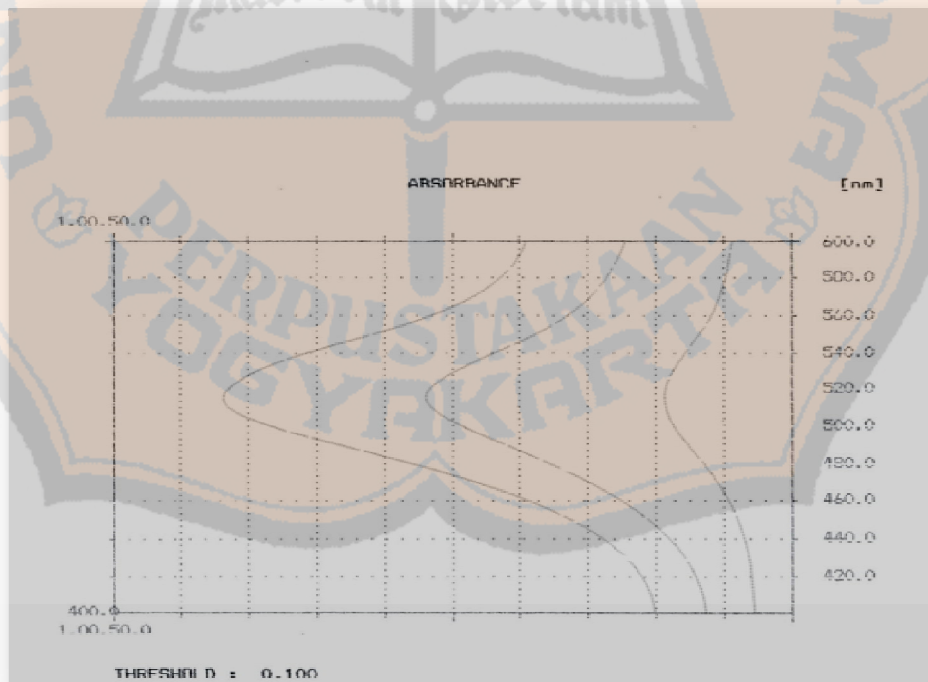


PLAGIAT MERUPAKAN TINDAKAN TIDAK TERPUJI

c. Spektra DPPH 0,080 mM



d. Plot scanning λ maksimum



Lampiran 8. Uji aktivitas antioksidan menggunakan radikal DPPH

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

1. Rutin

Persamaan regresi linier : $y = 6,6188x + 2,817$

Absorbansi kontrol : 0,921

Konsentrasi 2,5 µg/mL

$$\% \text{ IC} = \frac{0,921 - 0,7598}{0,921} \times 100\% = 18,132 \%$$

Konsentrasi 5 µg/mL

$$\% \text{ IC} = \frac{0,921 - 0,5917}{0,921} \times 100\% = 34,093 \%$$

Konsentrasi 7,5 µg/mL

$$\% \text{ IC} = \frac{0,921 - 0,4322}{0,921} \times 100\% = 48,751 \%$$

Konsentrasi 10 µg/mL

$$\% \text{ IC} = \frac{0,921 - 0,2491}{0,921} \times 100\% = 67,210 \%$$

Konsentrasi 12,5 µg/mL

$$\% \text{ IC} = \frac{0,921 - 0,1311}{0,921} \times 100\% = 80,999 \%$$

PLAGIAT MERUPAKAN TINDAKAN TIDAK TERPUJI**2. Fraksi etil asetat ekstrak etanolik daun selasih**

Persamaan regresi linier : $y = 1,6399 x + 6,2266$

Absorbansi kontrol : 0,856

Konsentrasi 8 $\mu\text{g/mL}$

$$\% \text{ IC} = \frac{\text{Absorbansi sampel}}{\text{Absorbansi kontrol}} \times 100\% = 18,692 \%$$

Konsentrasi 16 $\mu\text{g/mL}$

$$\% \text{ IC} = \frac{\text{Absorbansi sampel}}{\text{Absorbansi kontrol}} \times 100\% = 32,593 \%$$

Konsentrasi 24 $\mu\text{g/mL}$

$$\% \text{ IC} = \frac{\text{Absorbansi sampel}}{\text{Absorbansi kontrol}} \times 100\% = 46,028 \%$$

Konsentrasi 32 $\mu\text{g/mL}$

$$\% \text{ IC} = \frac{\text{Absorbansi sampel}}{\text{Absorbansi kontrol}} \times 100\% = 60,047 \%$$

Konsentrasi 40 $\mu\text{g/mL}$

$$\% \text{ IC} = \frac{\text{Absorbansi sampel}}{\text{Absorbansi kontrol}} \times 100\% = 70,561 \%$$

PLAGIAT MERUPAKAN TINDAKAN TIDAK TERPUJI**Lampiran 9. Perhitungan nilai IC50 rutin dan fraksi etil asetat ekstrak etanolik daun selasih****1. Rutin**

Persamaan regresi linier : $y = 6,6188x + 2,1817$

(y = aktivitas antioksidan, x= kadar rutin dalam $\mu\text{g/mL}$)

IC50 adalah nilai x pada saat y=50

$$50 = 6,6188x + 2,1817$$

$$x = \frac{50 - 2,1817}{6,6188} = 7,225 \mu\text{g/mL}$$

Jadi IC50 rutin adalah 7,225 $\mu\text{g/mL}$

2. Fraksi etil asetat ekstrak etanolik daun selasih

Persamaan regresi linier : $y = 1,6399x + 6,2266$

$$50 = 1,6399x + 6,2266$$

$$x = \frac{50 - 6,2266}{1,6399} = 26,693 \mu\text{g/mL}$$

Jadi IC50 fraksi etil asetat ekstrak etanolik daun selasih adalah 26,693 $\mu\text{g/mL}$

PLAGIAT MERUPAKAN TINDAKAN TIDAK TERPUJI

Lampiran 10. Penimbangan untuk uji kandungan fenolik total

1. Penimbangan Asam galat

	Replikasi 1 (g)	Replikasi 2 (g)	Replikasi 3 (g)
Bobot kertas	0,2511	0,2623	0,2571
Bobot kertas + asam galat	0,2564	0,2675	0,2642
Bobot kertas + sisa	0,2512	0,2625	0,2573
Bobot asam galat	0,0052	0,005	0,0051

2. Penimbangan Fraksi etil asetat ekstrak etanol daun selasih

	Sampel 1 (g)	Sampel 2 (g)	Sampel 3 (g)
Bobot cawan	22,1306	24,2341	23,6121
Bobot cawan + Fraksi	22,1357	24,2392	23,6173
Bobot fraksi	0,0051	0,0051	0,0052

Lampiran 11. Scanning kontrol asam galat



PLAGIAT MERUPAKAN TINDAKAN TIDAK TERPUJI

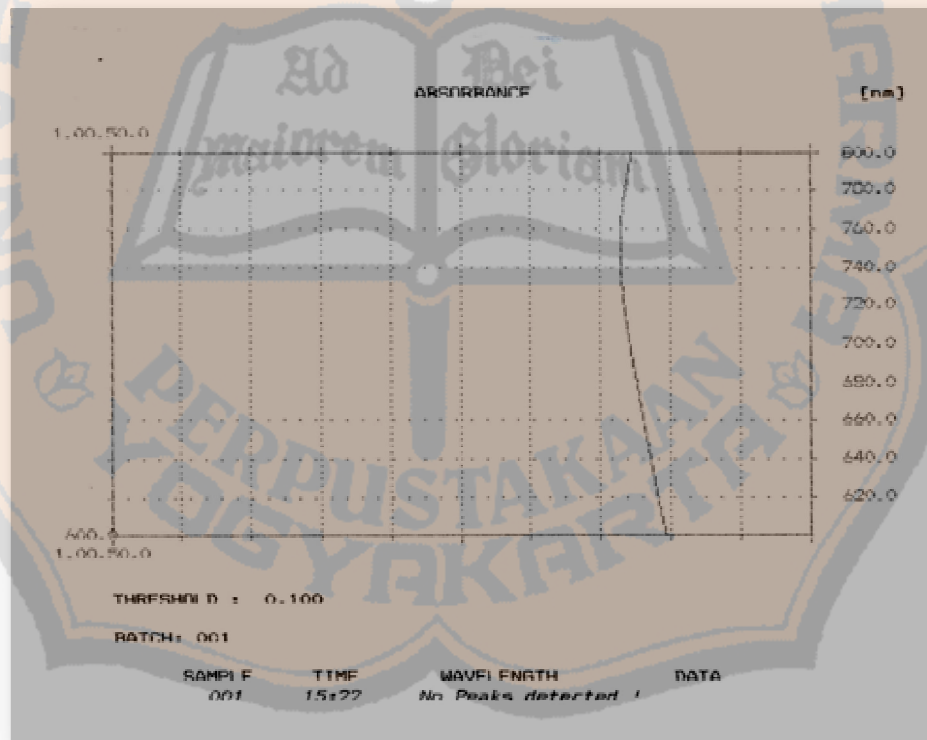
Lampiran 12. Optimasi penentuan kandungan fenolik total

1. Penentuan OT

Waktu (menit)	Absorbansi		
	Asam galat 50 $\mu\text{g/mL}$	Asam galat 100 $\mu\text{g/mL}$	Asam galat 150 $\mu\text{g/mL}$
5	0,185	0,421	0,721
10	0,185	0,421	0,721
15	0,185	0,421	0,721
20	0,185	0,421	0,721
25	0,185	0,421	0,721
30	0,185	0,421	0,721

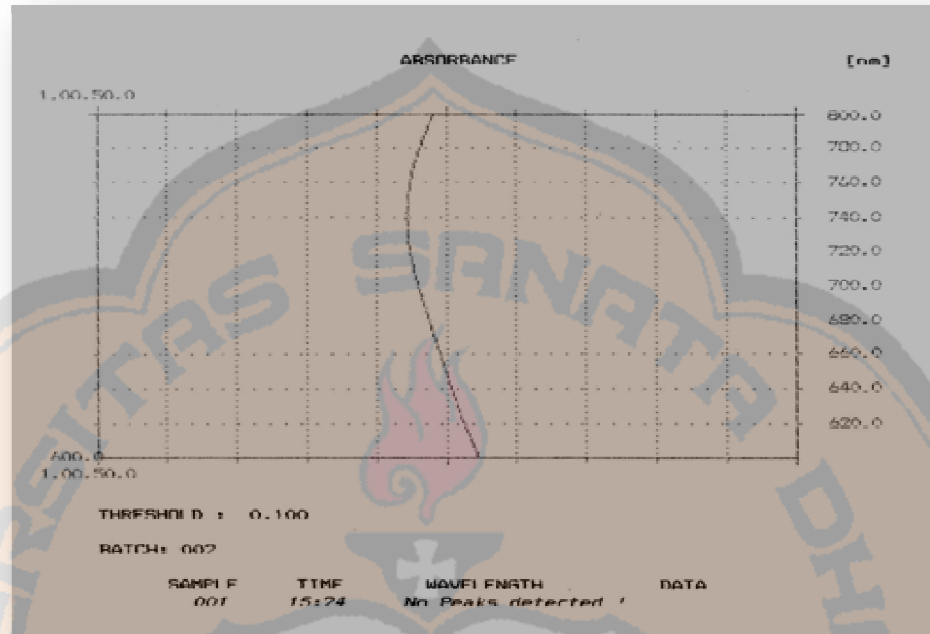
2. Penentuan λ maksimum

a. Spektra asam galat 50 $\mu\text{g/mL}$

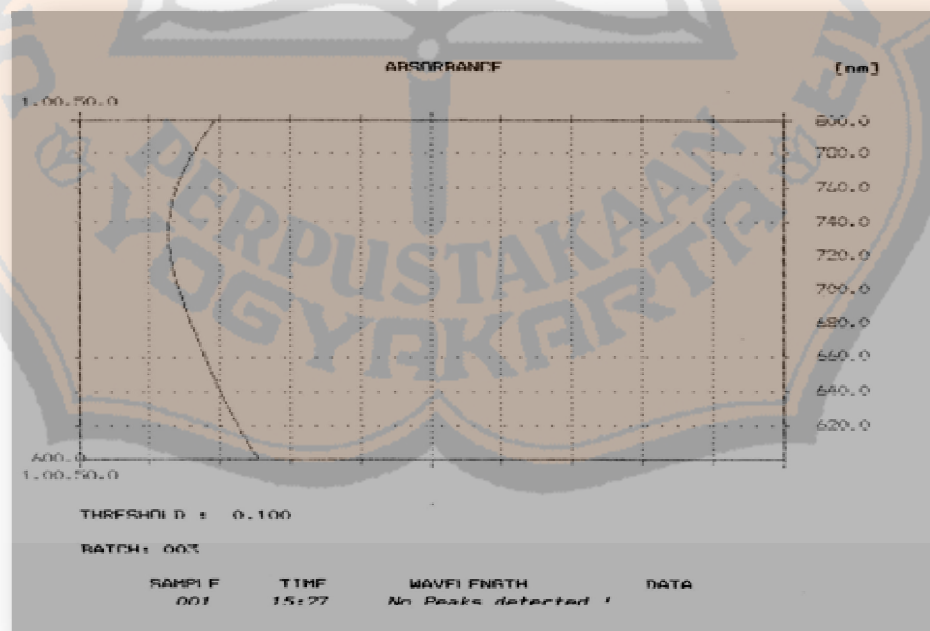


PLAGIAT MERUPAKAN TINDAKAN TIDAK TERPUJI

b. Spektra asam galat 100 $\mu\text{g/mL}$



c. Spektra asam galat 150 $\mu\text{g/mL}$



PLAGIAT MERUPAKAN TINDAKAN TIDAK TERPUJI

Lampiran 13. Penentuan kandungan fenolik total

1. Sampel 1

$$y = 0,0041x + 0,0654$$

$$0,422 = 0,004x + 0,0654$$

$$x = \frac{0,422 - 0,0654}{0,0041} = 86,976 \mu\text{g/mL}$$

Kandungan fenolik total =

$$x \cdot 0,0869 = 0,0869 \cdot 86,976 = 8,519 \text{ mg ekuivalen asam galat per g fraksi}$$

2. Sampel 2

$$y = 0,0041x + 0,0654$$

$$0,477 = 0,004x + 0,0654$$

$$x = \frac{0,477 - 0,0654}{0,0041} = 100,39 \mu\text{g/mL}$$

Kandungan fenolik total =

$$x \cdot 0,1004 = 0,1004 \cdot 100,39 = 9,843 \text{ mg ekuivalen asam galat per g fraksi}$$

3. Sampel 3

$$y = 0,0041x + 0,0654$$

$$0,488 = 0,004x + 0,0654$$

$$x = \frac{0,488 - 0,0654}{0,0041} = 103,073 \mu\text{g/mL}$$

Kandungan fenolik total =

$$x \cdot 0,103 = 0,103 \cdot 103,073 = 9,904 \text{ mg ekuivalen asam galat per g fraksi}$$

PLAGIAT MERUPAKAN TINDAKAN TIDAK TERPUJI

Lampiran 14. Uji statistik dengan PASW Statistics 18

1. Uji normalitas

Tests of Normality						
	Kolmogorov-Smirnov ^a			Shapiro-Wilk		
	Statistic	Df	Sig.	Statistic	df	Sig.
% IC rutin	.157	15	.200	.909	15	.131
% IC fraksi air	.172	15	.200	.897	15	.085

a. Lilliefors Significance Correction

*. This is a lower bound of the true significance.

2. Uji T tidak berpasangan

	Levene's Test for Equality of Variances		t-test for Equality of Means						
	F	Sig.	t	df	Sig. (2-tailed)	Mean Difference	Std. Error Difference	95% Confidence Interval of the Difference	
								Lower	Upper
IC ₅₀ Equal variances assumed	.003	.958	84.535	4	.000	-19.42667	.22981	-20.06471	-18.78862
Equal variances not assumed			84.535	4.000	.000	-19.42667	.22981	-20.06474	-18.78859

BIOGRAFI PENULIS

Yosafat Rubbyanto Widodo, penulis skripsi berjudul **Uji Aktivitas Antioksidan Menggunakan Radikal 1,1-Difenil -2- Pikrilhidrazil (DPPH) dan Penetapan Kandungan Fenolik Total Fraksi Etil Asetat Ekstrak Etanolik Daun Selasih (*Ocimum sanctum* L.)**, dilahirkan di kota Temanggung pada tanggal 27 Maret 1989 dari pasangan Bapak Daniel Utomo Widodo dan Ibu Rachel Hoo Wie Fang. Penulis telah menyelesaikan pendidikan Taman Kanak-Kanak di TK Masehi Temanggung pada tahun 1994 hingga 1995 lalu melanjutkan pendidikan dasar di SD Masehi Temanggung pada tahun 1995 hingga 2001. Penulis melanjutkan pendidikan menengah di SMP Masehi Temanggung pada tahun 2001 hingga 2004 dan SMA N 1 Temanggung pada tahun 2004 hingga 2007. Kemudian penulis melanjutkan pendidikan tinggi di Fakultas Farmasi Universitas Sanata Dharma Yogyakarta pada tahun 2007 hingga 2011. Selama menjadi mahasiswa di Fakultas Farmasi Universitas Sanata Dharma Yogyakarta, penulis pernah menjadi asisten dosen untuk mata kuliah Praktikum Spektroskopi (2009), Praktikum Farmakognosi-Fitokimia II (2010), Praktikum Analisis Sediaan Obat Tradisional (2010), Praktikum Farmasi Fisika (2010), Praktikum Botani Dasar (2011), Praktikum FTS Solid A (2011), dan Praktikum Kromatografi (2010 dan 2011).