

**DAYA ANTIOKSIDAN FRAKSI AIR EKSTRAK HERBA KENIKIR
(*Cosmos caudatus* H. B. K.) DAN PROFIL KLT**

SKRIPSI



Oleh :

MEGASUKMA MUDURI ARMALA

04613183

**PROGRAM STUDI FARMASI
FAKULTAS MATEMATIKA DAN ILMU PENGETAHUAN ALAM
UNIVERSITAS ISLAM INDONESIA
JOGJAKARTA
FEBRUARI 2009**

**DAYA ANTIOKSIDAN FRAKSI AIR EKSTRAK HERBA KENIKIR
(*Cosmos caudatus* H. B. K.) DAN PROFIL KLT**

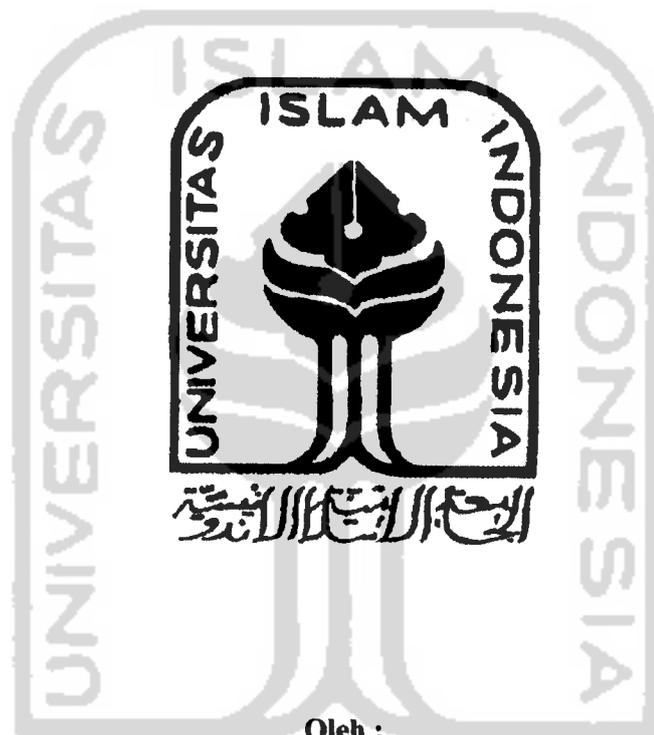
SKRIPSI

Diajukan untuk memenuhi salah satu syarat mencapai gelar Sarjana Farmasi

(S. Farm)

Program Studi Farmasi Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam

Universitas Islam Indonesia



Oleh :

MEGASUKMA MUDURI ARMALA

04613183

**PROGRAM STUDI FARMASI
FAKULTAS MATEMATIKA DAN ILMU PENGETAHUAN ALAM
UNIVERSITAS ISLAM INDONESIA
JOGJAKARTA
FEBRUARI 2009**

SKRIPSI

**DAYA ANTIOKSIDAN FRAKSI AIR EKSTRAK HERBA KENIKIR
(*Cosmos caudatus* H. B. K.) DAN PROFIL KLT**

Yang diajukan oleh:

MEGASUKMA MUDURI ARMALA

04 613 183

Telah disetujui oleh :

Pembimbing Utama,

Pembimbing Pendamping,



Dr. CJ. Soegihardjo, Apt.



Dra. Suparmi, M.Si., Apt.

SKRIPSI

**DAYA ANTIOKSIDAN FRAKSI AIR EKSTRAK HERBA KENIKIR
(*Cosmos caudatus* H. B. K.) DAN PROFIL KLT**

Oleh :

MEGASUKMA MUDURI ARMALA

04613183

Telah dipertahankan di hadapan Panitia Penguji Skripsi
Program Studi Farmasi Fakultas Matematika Dan Ilmu Pengetahuan Alam
Universitas Islam Indonesia

Tanggal :

20 Februari 2009

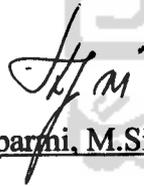
Ketua Penguji,



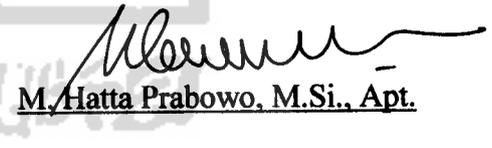
Dr. CJ. Soegihardjo, Apt.

Anggota Penguji,

Anggota Penguji,



Dra. Suparni, M.Si., Apt.

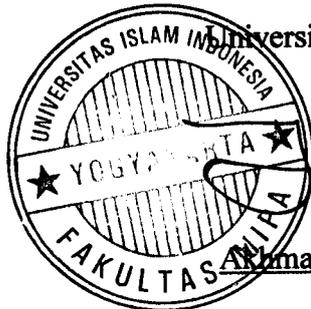


M. Hatta Prabowo, M.Si., Apt.

Mengetahui,

Dekan Fakultas Matematika Dan Ilmu Pengetahuan Alam

Universitas Islam Indonesia



Ahmad Fauzy, M.Si, Ph.D

PERNYATAAN

Dengan ini saya menyatakan bahwa dalam skripsi ini tidak terdapat karya yang pernah diajukan untuk memperoleh gelar kesarjanaan disuatu Perguruan Tinggi dan sepanjang sepengetahuan saya, juga tidak terdapat karya atau pendapat yang pernah ditulis atau diterbitkan oleh orang lain kecuali secara tertulis diacu dalam naskah ini dan diterbitkan dalam daftar pustaka.

Yogyakarta, 20 Februari 2009

Penulis,

Megasukma M. Armala



MOTTO

Segala puji bagi ALLAH, Tuhan Semesta Alam

Yang Maha Pemurah lagi Maha Penyayang

(QS. Al-Fatihah 2-3)

Tidak ada orang yang berputus asa dari rahmat Allah

kecuali orang-orang yang sesat

(QS. Al-Hijr 56)

Maka bertasbehlah dengan menyebut nama Tuhanmu Yang Maha Agung

(QS. Al-Waqi'ah 96)

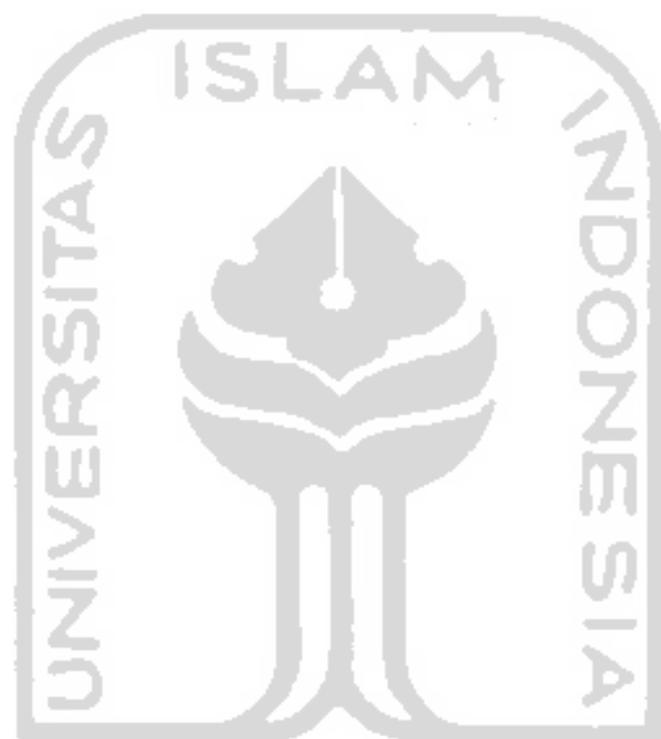
Lebih baik terlambat daripada tidak sama sekali

(Megasokma M. Armala)

Tiada kata seindah Doa dan

Tiada doa seindah Hikmah

(Sang Petualang)



جامعة الإسلام في إندونيسيا

Persembahkan

بِسْمِ اللَّهِ الرَّحْمَنِ الرَّحِيمِ

Kupersembahkan skripsi ini
ketulusan hati kepada :

Orang tuaku Tercinta...se...ndoakan, m...
menyayangiku...Terima kasih...ya...Anand...
berusaha m...y...blh baik

Nenekku tersayang..Terima kasih atas

Adikku Tersayang..makasih ya...dah bantu...ka Esa menyelesaikan
skripsi ini

Yang Tersayang dan Terkasih...Mas Denny...Terima kasih atas kasih
sayang, doa, dukungan, serta b...ingannya selama ini...Tetap Semangat
selalu untuk meraih cita-cita kita!

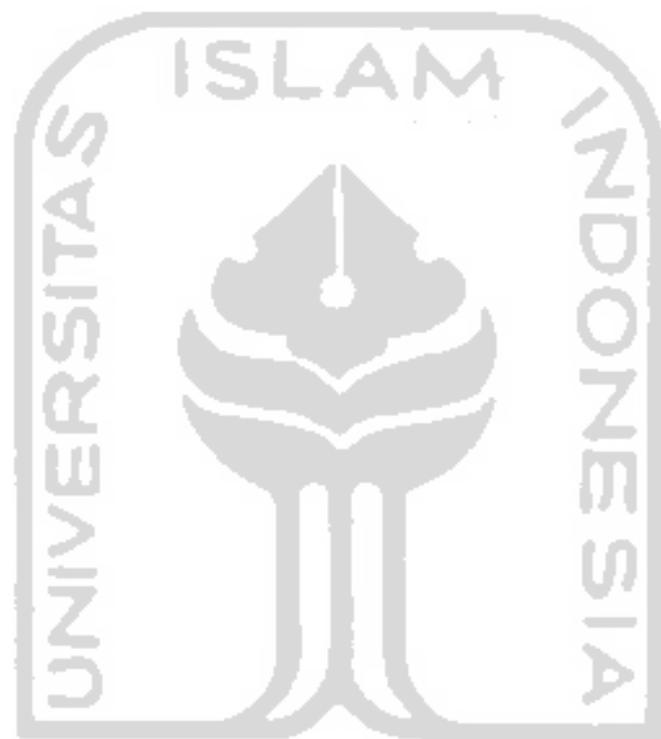
Bapak, Kakak, sekaligus Teman... ..Terima kasih atas
semuanya....

..Uban dan Niken, terima kasih atas kerjasamanya
selama ini...Amrii, Semangat!!!...Fery, terima kasih atas bantuannya yaa

..Trima kasih atas
dukungannya...Semangat!!!

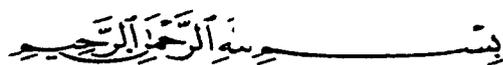
...Trima
kasih atas ilmu, persaudaraan, persahabatan yang telah Engkau berikan
Go... Fight... Win

...Semoga Tetap Berjaya



جامعة الإسلام في إندونيسيا

KATA PENGANTAR



Assalamu'alaikum Wr. Wb

Segala puji dan syukur penulis panjatkan Kehadirat Allah SWT yang telah melimpahkan rahmat, karunia serta hidayah-Nya kepada hamba-Nya selama masih dalam iman dan ikhsan.

Atas petunjuk dan ridho-Nya jualah penulis dapat menyelesaikan skripsi ini yang berjudul **DAYA ANTIOKSIDAN FRAKSI AIR HERBA KENIKIR (*Cosmos caudatus* H. B. K) DAN PROFIL KLT**. Skripsi ini wajib ditempuh oleh mahasiswa farmasi, sebagai salah satu syarat untuk menyelesaikan jenjang studi Strata 1 (S1).

Kelancaran dalam mempersiapkan dan menyelesaikan skripsi ini tidak terlepas dari bantuan berbagai pihak. Oleh karena itu, dengan rasa hormat dan terima kasih yang sebesar-besarnya penulis haturkan kepada :

1. Bapak C. J. Soegihardjo Dr., Apt dan Ibu Dra. Suparmi M.Si., Apt selaku dosen pembimbing atas segala bimbingan dan nasehat yang penulis butuhkan selama menyelesaikan skripsi ini.
2. Bapak M. Hata Prabowo M.Si., Apt selaku dosen penguji atas segala saran-sarannya.
3. Bapak Akhmad Fauzy, M.Si., Ph.D selaku Dekan Fakultas MIPA.
4. Bapak Hartanto, Bapak Ariyanto, Bapak Kuswanto dan Bapak Bibit atas bantuan dan fasilitas yang diberikan selama penelitian.
5. Bapak/Ibu Dosen, Staff dan karyawan jurusan Farmasi, Fakultas Matematika Dan Ilmu Pengetahuan Alam, Universitas Islam Indonesia.
6. Semua pihak yang telah mendukung penyusunan skripsi ini.

Semoga ALLAH SWT membalas semua jasa-jasanya yang diberikan pada penulis. Harapan penulis semoga skripsi ini dapat bermanfaat bagi setiap orang yang membacanya. Amin.

Wassalamu'alaikum Wr. Wb

Yogyakarta, 20 Februari 2009

Penulis,

Megasukma M. Armala



DAFTAR ISI

Kata Pengantar	viii
Daftar Isi	x
Daftar Tabel	xii
Daftar Gambar	xiii
Daftar Lampiran	xiv
Intisari	xv
Abstraksi	xvi
BAB I. PENDAHULUAN	1
A. Latar Belakang Masalah	1
B. Rumusan Masalah	2
C. Tujuan Penelitian	2
D. Manfaat Penelitian	2
BAB II. STUDI PUSTAKA.....	3
A. Tinjauan Pustaka	3
1. Kenikir (<i>Cosmos caudatus</i> H. B. K)	3
2. Ekstraksi.....	4
3. Oksidan dan radikal bebas	6
4. Flavonoid	7
5. DPPH (<i>1,1-Diphenyl-2-picryl-hydrazyl</i>).....	12
6. Kromatografi Laps Tipis (KLT).....	13
B. Landasan Teori	14
C. Hipotesis	15
BAB III. METODE PENELITIAN	16
A. Bahan dan Alat	16
B. Cara Penelitian	16
1. Determinasi tumbuhan	16
2. Pengumpulan bahan	17
3. Pembuatan ekstrak etanolik dan fraksi air herba kenikir	17
4. Pembuatan pereaksi	18
5. Uji kualitatif flavonoid dengan metode KLT	19

	6. Uji kualitatif saponin	19
	7. Uji kualitatif polifenol	20
	8. Penentuan aktivitas antioksidan dengan metode penangkapan radikal DPPH	20
	9. Kandungan flavonoid total ditentukan secara spektrofotometri sesuai dengan metode <i>Marinova et al.</i> 2005	21
	10. Skema alur penelitian	22
	11. Skema uji aktivitas antioksidan dengan DPPH	23
	C. Analisis Hasil	24
BAB IV.	HASIL PENELITIAN DAN PEMBAHASAN	25
	A. Hasil Determinasi Tanaman	25
	B. Hasil Pengumpulan Bahan	25
	C. Hasil Pembuatan Ekstrak Etanolik	26
	D. Identifikasi Senyawa Flavonoid dengan Metode KLT	29
	E. Hasil Penentuan Aktivitas Antioksidan dengan Metode Penangkapan Radikal DPPH	34
	F. Penentuan Kandungan Senyawa Flavonoid Total	40
BAB V.	KESIMPULAN DAN SARAN	44
	A. Kesimpulan dan Saran	44
	Daftar Pustaka	45
	Lampiran	47

DAFTAR TABEL

Tabel I.	Penafsiran Warna Bercak dari Segi Struktur Flavonoid	10
Tabel II.	Data Kromatogram Rutin Pada fase Diam Selulosa, Fase Gerak BAW (9:2:6) dengan Pereaksi Uap Amonia dan Pereaksi Semprot Sitroborat	31
Tabel III.	Data Kromatogram Ekstrak Etanolik Pada fase Diam Selulosa, Fase Gerak BAW (9:2:6) dengan Pereaksi Uap Amonia dan Pereaksi Semprot Sitroborat	32
Tabel IV.	Data Kromatogram Fraksi Air Pada fase Diam Selulosa, Fase Gerak BAW (9:2:6) dengan Pereaksi Uap Amonia dan Pereaksi Semprot Sitroborat	34
Tabel V.	Data Aktivitas Antioksidan Rutin dengan metode Penangkapan Radikal DPPH	35
Tabel VI.	Data Aktivitas Antioksidan Ekstrak Etanolik dengan metode Penangkapan Radikal DPPH	36
Tabel VII.	Data Aktivitas Antioksidan Fraksi Air dengan metode Penangkapan Radikal DPPH	38
Tabel VIII.	Tingkat kekuatan Antioksidan Senyawa Uji dengan Metode Penangkapan Radikal DPPH	39
Tabel IX.	Kadar Kuersetin dengan Absorbansinya Setelah Ditambah Pereaksi $AlCl_3$ Dalam Suasana Basa Yang Diukur Pada Panjang Gelombang 510 nm Secara Spektrofotometri	42
Tabel X.	Kadar Flavonoid Total Ekstrak Etanol dan Fraksi Air Herba Kenikir Dihitung Sebagai %b/bEK	42

DAFTAR GAMBAR

Gambar 1.	Struktur Dasar Flavonoid Beserta Penomorannya	8
Gambar 2.	Struktur DPPH	13
Gambar 3.	Skema Alur Penelitian	22
Gambar 4.	Skema Uji Aktivitas Antioksidan dengan DPPH	23
Gambar 5.	Foto Kromatogram Rutin	30
Gambar 6.	Gambar kromatogram Rutin	31
Gambar 7.	Foto Kromatogram Ekstrak Etanol	32
Gambar 8.	Gambar Komatogram Ekstrak Etanol	32
Gambar 9.	Foto Komatogram Fraksi Air	33
Gambar 10.	Gambar Komatogram Fraksi Air	33
Gambar 11.	Struktur Rutin	35
Gambar 12.	Grafik Kurva Regresi Linear Antara Kadar Rutin Dengan Rata-rata Aktivitas Antioksidannya Menggunakan Metode DPPH	36
Gambar 13.	Grafik Kurva Regresi Linear Antara Kadar Ekstrak Etanol Dengan Rata-rata Aktivitas Antioksidannya Menggunakan Metode DPPH	37
Gambar 14.	Grafik Kurva Regresi Linear Antara Kadar Fraksi Air Dengan Rata-rata Aktivitas Antioksidannya Menggunakan Metode DPPH	38
Gambar 15.	Histogram Nilai EC ₅₀ Rutin (Pembanding), Ekstrak Etanol dan Fraksi Air Pada Uji DPPH	40
Gambar 16.	Reaksi Yang Terjadi dalam Penetapan Kadar Flavonoid	41
Gambar 17.	Struktur Kuersetin	41

DAFTAR LAMPIRAN

Lampiran 1.	Surat Keterangan Determinasi	47
Lampiran 2.	Gambar Tanaman Kenikir (<i>Cosmos caudatus</i> H. B. K)	48
Lampiran 3.	Perhitungan Nilai EC_{50} Ekstrak Etanol, Fraksi Air dan Rutin	49
Lampiran 4.	Perhitungan kadar Flavonoid Total Pada Ekstrak Etanol dan Fraksi Air Herba Kenikir	50
Lampiran 5.	Data Analisis Aktivitas Antioksidan dari Rutin (Pembandingan), Ekstrak Etanol dan Fraksi Air dengan Menggunakan SPSS	53



BAB I

PENDAHULUAN

A. Latar Belakang

Siapa pun pasti ingin memiliki umur panjang plus kesehatan yang selalu prima. Berbagai usaha pun dilakukan sejak muda untuk mencapai hal ini. Sayangnya, banyak juga yang baru menyadari ketika mereka telah atau sedang mengalami proses penuaan (*aging*), saat perubahan-perubahan baik fisik maupun psikis sedang berlangsung (Anonim, 2007).

Untuk mengurangi risiko menderita berbagai penyakit di usia tua atau menjadi tua dengan kesehatan prima (*healthy aging*), para ilmuwan telah mengemukakan berbagai teori. Namun yang paling populer saat ini adalah teori radikal bebas, yaitu proses penuaan sebagai akibat kerusakan yang ditimbulkan radikal bebas (Anonim, 2007).

Radikal bebas sendiri merupakan zat berbahaya yang sangat reaktif dan bersifat merusak jaringan organ-organ tubuh hingga menimbulkan berbagai penyakit di usia tua. Untuk menetralkan radikal bebas ini, tubuh kita memerlukan antioksidan yang dapat membantu melindungi tubuh dari serangan radikal bebas dan meredakan dampak negatifnya. Dengan antioksidan, kerusakan organ tubuh dan risiko terserang berbagai penyakit di usia tua dapat dicegah (Anonim, 2007).

Perhatian besar beberapa tahun terakhir ini banyak diberikan kepada pengembangan antioksidan alamiah yang dimaksudkan untuk tujuan pengobatan preventif dan untuk industri makanan. Adanya peningkatan minat untuk mendapatkan antioksidan alami disebabkan keamanan jangka panjang dan dampak negatif dari antioksidan sintetik seperti butil hidroksi anisol (BHA) dan butil hidroksi toluen (BHT) mulai dipertanyakan (Yu *et al.*, 2002). Karena adanya kemungkinan efek samping yang merugikan, maka antioksidan tersebut tidak digunakan untuk bahan terapi dan saat ini permintaan akan antioksidan sintetik menurun (Halliwell and Gutteridge, 1999 ; Rohdiana, 2001).

Antioksidan alami dapat melindungi tubuh dari serangan radikal bebas dan mampu memperlambat terjadinya penyakit kronik yang disebabkan oleh spesies oksigen reaktif, juga sebagai penghambat oksidasi lipid yang menyebabkan ketengikan dan kerusakan makanan (Gulcin *et al.*, 2004 ; Zupko *et al.*, 2001). Berdasarkan pernyataan di atas maka penelitian terhadap antioksidan alami saat ini menjadi sangat penting.

Seperti telah diketahui dewasa ini banyak informasi tentang tanaman yang digunakan sebagai antioksidan. Berdasarkan penelitian, tanaman itu mengandung senyawa flavonoid dan senyawa lainnya. Aktivitas flavonoid yang bermanfaat untuk kesehatan antara lain: efek antioksidan, antikarsinogenik, antiproliferatif, antiangiogenik, antiinflamasi, dan antiestrogenik dengan tidak ada atau sedikit toksisitasnya (Zhang and Morris, 2003). Tanaman kenikir diketahui mengandung senyawa flavonoid. Berdasarkan keterangan di atas maka penelitian yang bertujuan untuk melihat apakah herba kenikir dapat berfungsi sebagai senyawa antioksidan layak untuk dilakukan

B. Rumusan Masalah

1. Apakah fraksi air herba kenikir mempunyai aktivitas antioksidan dengan menggunakan metode penangkapan radikal bebas DPPH ?
2. Bagaimana profil Kromatografi Lapis Tipis (KLT) senyawa flavonoid dalam ekstrak dan fraksi air herba kenikir?

C. Tujuan Penelitian

Penelitian ini bertujuan untuk mengetahui aktivitas antioksidan fraksi air ekstrak herba kenikir (*Cosmos caudatus* H. B. K) dan profil Kromatografi Lapis Tipis (KLT).

D. Manfaat Penelitian

Dengan adanya penelitian ini, diharapkan nantinya dapat memberikan informasi terutama dalam pencarian sumber-sumber senyawa antioksidan alami, pada umumnya dan khususnya fraksi air herba kenikir.

BAB II STUDI PUSTAKA

A. Tinjauan Pustaka

1. Kenikir (*Cosmos caudatus* H. B. K)

Secara umum taksonomi kenikir adalah sebagai berikut :

a. Klasifikasi

Divisi	: Spermatophyta
Sub divisi	: Angiospermae
Kelas	: Dicolyledonae
Bangsa	: Asterales
Suku	: Asteraceae
Marga	: Cosmos
Jenis	: <i>Cosmos caudatus</i> H. B. K.
Nama umum/dagang	: Kenikir
Nama daerah	: Ulam rija (Melayu), Kenikir (Jawa Tengah)

b. Morfologi

Habitus	: Perdu, tinggi 75-100 cm, bau khas.
Batang	: Tegak, segi empat, beralur membujur, bercabang banyak, muda berbutu, beruas, hijau keunguan.
Daun	: Majemuk, bersilang berhadapan, berbagi menyirip, ujung runcing, tepi rata, panjang 15-25 cm, hijau.
Bunga	: Majemuk, bentuk bongkol, di ujung batang, tangkai panjang ± 25 cm, mahkota terdiri dari 8 daun mahkota, panjang + 1 cm, merah, benang sari bentuk tabung, kepala sari coklat kehitaman, putik berambut, hijau kekuningan, merah.

Buah	: Keras, bentuk jarum, ujung berambut, masih muda hijau setelah tua coklat.
Biji	: Keras, kecil, bentuk jarum, panjang \pm 1 cm, hitam.
Akar	: Tunggang, putih.
Khasiat	: Daun <i>C. caudatus</i> berkhasiat sebagai penambah nafsu makan, obat lemah lambung dan untuk mengusir serangga. Untuk penambah nafsu makan dipakai + 100 gram daun segar <i>C. caudatus</i> , dicuci, dimakan sebagai lalap.
Kandungan kimia	: Daun <i>C. caudatus</i> mengandung saponin, flavonoid dan polifenol, di samping minyak atsiri.

Dengan adanya data yang menunjukkan bahwa di dalam herba kenikir terdapat sejumlah senyawa yang berfungsi sebagai antioksidan alami, maka tanaman ini kemungkinan besar juga memiliki efek sebagai antioksidan.

2. Ekstraksi

Penyarian merupakan kegiatan penarikan kandungan kimia yang dapat larut dengan pelarut cair sehingga terpisah dari bahan yang tidak dapat larut. Struktur kimia yang berbeda-beda akan mempengaruhi kelarutan serta stabilitas senyawa aktif terhadap pemanasan, udara, cahaya, logam berat, dan derajat keasaman. Dengan diketahuinya senyawa aktif yang dikandung akan mempermudah pemilihan pelarut dan cara ekstraksi yang tepat (Anonim, 2000).

Proses penyarian dipengaruhi oleh derajat kehalusan serbuk dan perbedaan konsentrasi. Makin besar konsentrasi, makin besar daya dorong, makin cepat penyarian. Cairan penyari harus dapat mencapai seluruh serbuk dan secara terus-menerus mendesak larutan yang memiliki konsentrasi yang lebih tinggi keluar. Cairan penyari yang baik harus memenuhi kriteria, yakni murah dan mudah diperoleh, stabil secara fisika dan kimia, bereaksi netral, tidak mudah menguap dan

tidak mudah terbakar, selektif yakni hanya menarik zat berkhasiat yang dikehendaki, dan tidak mempengaruhi zat berkhasiat (Anonim, 1986).

Metode penyarian yang digunakan tergantung dari wujud dan kandungan zat dari bahan yang akan disari. Pada umumnya penyarian akan bertambah baik bila permukaan serbuk simplisia yang bersentuhan dengan penyari semakin meluas (Harborne, 1987). Metode ekstraksi yang sering digunakan adalah maserasi, perkolasi, dan sokhletasi. Maserasi adalah proses ekstraksi simplisia menggunakan pelarut dengan beberapa kali pengocokan atau pengadukan pada temperatur kamar. Maserasi termasuk ekstraksi dengan prinsip pencapaian konsentrasi pada keseimbangan (Anonim, 2000).

Maserasi merupakan proses yang paling tepat yang mana bahan yang sudah halus memungkinkan untuk direndam dengan pelarut sampai meresap dan melunakkan susunan sel, sehingga zat-zat yang mudah larut akan melarut. Dalam proses maserasi, bahan biasanya ditempatkan dalam bejana bermulut lebar bersama pelarut yang sudah ditetapkan, bejana ditutup rapat, dan isinya diaduk berulang-ulang ke seluruh permukaan dari bahan yang sudah halus (Ansel, 1989).

Melalui usaha ini akan dijamin suatu keseimbangan konsentrasi bahan aktif yang lebih cepat ke dalam cairan. Maserasi digunakan untuk penyarian simplisia yang mengandung zat aktif yang mudah larut dalam cairan penyari. Cairan penyari yang digunakan dapat berupa air, etanol, air-etanol atau pelarut lain. Bila cairan penyari digunakan air maka untuk mencegah timbulnya kapang, dapat ditambahkan bahan pengawet pada awal penyari. Hasil penyarian dengan cara maserasi perlu dibiarkan selama waktu tertentu. Waktu tersebut diperlukan untuk mengendapkan zat-zat yang tidak diperlukan tetapi ikut terlarut dalam cairan penyari seperti malam. Keuntungan cara penyarian dengan maserasi adalah cara pengerjaan dan peralatan yang digunakan sederhana. Sementara itu, kerugiannya adalah pengerjaannya lama dan penyariannya kurang sempurna (Anonim, 1986).

Perkolasi adalah ekstraksi dengan pelarut yang selalu baru sampai hampir sempurna yang umumnya dilakukan pada temperatur kamar. Proses ini terdiri atas

tahap pengembangan bahan, tahap maserasi antara, dan tahap perkolasi yang sebenarnya berupa penetasan dan penampungan ekstrak (Anonim, 2000).

Perkolasi dilakukan dengan wadah silindris atau kerucut (perkolator), yang memiliki jalan masuk dan keluar yang sesuai. Penyari yang dimasukkan secara kontinyu akan mengalir dari atas secara lambat dan melintasi serbuk bahan. Pemasukkan pelarut yang baru memungkinkan ekstrak total (secara teoritis) karena perbedaan kadar selalu dipertahankan (Voight, 1995). Keuntungan perkolasi dibandingkan dengan maserasi adalah adanya aliran cairan penyari menyebabkan adanya pergantian larutan yang konsentrasi lebih rendah, sehingga meningkatkan derajat perbedaan konsentrasi (Anonim, 1986).

Sokhletasi adalah ekstraksi menggunakan alat sokhlet yang dilengkapi dengan pendingin balik (Anonim, 2000). Bahan yang diekstraksi berada dalam sebuah kantung ekstraksi di dalam sebuah alat yang bekerja kontinyu. Wadah gelas yang mengandung kantung diletakkan di antara labu suling dan suatu pendingin balik yang dihubungkan dengan pipa. Labu tersebut berisi pelarut, yang menguap dan mencapai ke dalam pendingin aliran balik melalui pipa, kemudian berkondensasi di dalamnya, menetes ke atas bahan yang diekstraksi dan membawa keluar bahan yang diekstraksi. Larutan berkumpul di dalam wadah gelas dan setelah mencapai tinggi maksimum, secara otomatis ditarik ke dalam labu. Dengan demikian, zat yang terekstraksi akan tertimbun melalui penguapan kontinyu dari pelarut murni. Keuntungan sokhletasi membutuhkan pelarut dalam jumlah sedikit dan perbedaan konsentrasi tetap dipertahankan karena cairan penyari mengalir secara terus-menerus. Kejelekannya memerlukan waktu yang lama dan tidak bisa digunakan untuk zat-zat yang tidak tahan panas (Voight, 1995).

3. Oksidan dan radikal bebas

Oksidan, dalam pengertian ilmu kimia adalah senyawa penerima elektron (*electron acceptor*), yakni senyawa-senyawa yang dapat menarik elektron. Radikal bebas adalah molekul yang kehilangan elektron, sehingga molekul tersebut menjadi tidak stabil dan selalu berusaha mengambil elektron dari molekul atau sel lain.

Radikal bebas dapat dihasilkan dari hasil metabolisme tubuh dan faktor eksternal seperti asap rokok, hasil penyinaran ultra violet, zat kimiawi dalam makanan dan polutan. Penyakit yang disebabkan oleh radikal bebas bersifat kronis, yaitu dibutuhkan waktu bertahun-tahun untuk penyakit tersebut menjadi nyata. Contoh penyakit yang sering dihubungkan dengan radikal bebas adalah serangan jantung dan kanker. Untuk mencegah atau mengurangi penyakit kronis karena radikal bebas diperlukan antioksidan (Anonim, 2007).

Oksidasi adalah proses elektrokimia yang menghasilkan penambahan bilangan oksidasi dari suatu atom atau beberapa atom (dalam molekul) karena kehilangan elektron.

Contoh : besi (II) dapat dioksidasi menjadi besi (III) :



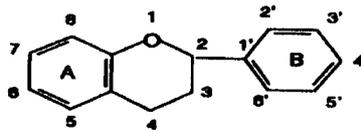
(Anonim, 2007)

Sifat radikal bebas yang mirip oksidan terletak pada kecenderungannya untuk menarik elektron. Sama halnya dengan oksidan, radikal bebas digolongkan dalam oksidan, tetapi tidak semua oksidan adalah radikal bebas. Radikal bebas lebih berbahaya dibanding oksidan yang bukan radikal dikarenakan adanya kedua sifat radikal bebas, yaitu reaktifitas tinggi karena cenderung menarik elektron dan dapat mengubah suatu molekul menjadi suatu radikal lain. Kedua sifat inilah yang pada gilirannya apabila menjumpai molekul lain akan membentuk radikal baru lagi sehingga terjadilah reaksi rantai. Daya rusak radikal bebas jauh lebih besar dibandingkan dengan oksidan biasa. Karena reaktivitasnya yang tinggi, radikal bebas tidak stabil dan sangat berumur pendek sehingga sulit dideteksi (Syahbana dan Bahalwan, 2002).

4. Flavonoid

Flavonoid merupakan suatu polifenol yang mengandung 15 atom karbon dalam inti dasarnya, yang tersusun dalam konfigurasi $C_6-C_3-C_6$. Kerangka dasar ini merupakan suatu susunan dua cincin benzena yang dihubungkan dengan rantai

alifatik tiga karbon, yang dapat atau tidak dapat membentuk cincin ketiga (Markham, 1988 ; Robinson, 1995).



Gambar 1. Struktur dasar flavanoid beserta penomorannya (Markham, 1988).

Aktivitas antioksidan yang dimiliki oleh sebagian besar flavonoid disebabkan oleh adanya gugus hidroksi fenolik dalam struktur molekulnya. Ketika senyawa-senyawa ini bereaksi dengan radikal bebas, membentuk radikal baru yang distabilisasi oleh efek resonansi inti aromatik. Dengan demikian, fase propagasi yang meliputi reaksi radikal berantai dapat dihambat (Cuvelier *et al.*, 1991).

Flavonoid merupakan senyawa penangkap radikal superoksida yang kuat, peredam oksigen singlet, dan dapat bereaksi dengan radikal peroksi yang menyebabkan terminasi reaksi berantai pada autooksida asam lemak tak jenuh. Selain itu, flavonoid dapat berfungsi sebagai penangkap radikal hidroksil yang merupakan radikal bebas yang paling reaktif (Pokorny *et al.*, 2001).

Flavonoid merupakan salah satu golongan senyawa fenol alam terbesar dan merupakan kandungan khas pada tumbuhan hijau, kecuali untuk golongan alga (Markham, 1988). Flavonoid terdapat pada semua bagian tumbuhan termasuk daun, akar, kayu, kulit, tepung sari, nektar, bunga, buah, dan biji. Hanya sedikit catatan yang melaporkan adanya flavonoid pada hewan misalnya dalam kelenjar bau berang-berang, propolis (sekresi lebah), dan di dalam sayap kupu-kupu. Hal itupun dengan anggapan bahwa flavonoid tersebut berasal dari tumbuhan yang menjadi makanan hewan tersebut dan tidak dibiosintesis di dalam tubuh mereka (Harborne, 1987).

Flavonoid banyak terdapat antara lain dalam famili Polygonaceae, Rutaceae, Leguminaceae, Umbeliferae, dan Compositae. Markham (1988) menyebutkan bahwa penyebaran flavonoid yang terbesar terdapat pada Angiospermae. Flavonoid terdapat dalam tumbuhan sebagai campuran dan jarang sekali dijumpai hanya flavonoid

tunggal dalam jaringan tumbuhan. Di samping itu, sering terdapat campuran yang terdiri atas flavonoid yang berbeda kelas (Harborne, 1987).

Klasifikasi flavonoid ditentukan oleh pola substitusi dan hidroksilasi pada atom C₃. Klasifikasi tersebut meliputi flavon, flavanon, flavonol, flavonolol, isoflavon, auron, dan khalkon (Robinson, 1995). Senyawa polifenol ini keberadaannya melimpah dalam makanan terutama terdapat dalam sayuran dan buah-buahan.

Selain terdapat sebagai glikosida, flavonoid ditemukan dalam bentuk bebas yaitu bentuk aglikon (Mabry *et al.*, 1970). Keberadaan flavonoid dalam tanaman biasanya dapat permukaan atau pada sel epidermis daun hijau. Kemungkinan senyawa ini berfungsi untuk melindungi daun dari efek radiasi sinar ultraviolet dan dapat menekan fotoperoksida lipid oleh penangkap anion superoksida yang dihasilkan selama proses peroksida dalam kloroplas. Dengan demikian, senyawa tersebut diharapkan dapat berfungsi sebagai pelindung dari radiasi sinar ultraviolet pada kulit manusia atau sebagai antioksidan alami (Harborne, 1987).

Kelarutan flavonoid berbeda-beda sesuai dengan golongan dan substitusi (Robinson, 1995). Ekstraksi flavonoid dari dalam simplisia tumbuhan dapat dilakukan dengan menggunakan pelarut polar, semi polar, maupun non polar sesuai dengan kelarutan flavonoid yang diekstraksi. Pelarut yang kurang polar (benzene, kloroform, eter) digunakan untuk mengekstraksi aglikon flavonoid seperti isoflavon dan aglikon lain, sedangkan pelarut yang lebih polar digunakan untuk glikosida flavonoid antosianin. Flavonoid merupakan senyawa polar karena mempunyai sejumlah gugus hidroksi yang tidak tersubstitusi atau suatu gula. Oleh karena itu, umumnya flavonoid cukup larut dalam pelarut polar seperti etanol, metanol, aseton, dimetilsulfoksida, dimetilformamid, dan air. Pelarut alkoholik umumnya merupakan pelarut pilihan untuk mengekstraksi semua golongan flavonoid (Markham, 1988).

Penyarian flavonoid dari tumbuh-tumbuhan didasarkan pada polaritas kandungan yang akan disari dan asal bahan. Flavonoid yang berasal dari vakuola sel umumnya bersifat hidrofilik sehingga penyarian dapat dilakukan dengan air atau pelarut-pelarut alkoholik. Jika flavonoid terdapat pada kloroplas, pelarut yang

digunakan untuk penyarian adalah pelarut-pelarut non polar sebelum dilakukan penyarian dengan alkohol. Bahan segar dapat diekstraksi dengan alkohol absolut. Bahan kering dan berkayu dapat menggunakan alkohol berair, hal ini disesuaikan dengan glikosida flavonoidnya (Harborne, 1987).

Flavonoid dapat dideteksi mudah dengan mengamati terjadinya perubahan warna sebelum dan sesudah diuapi amonia. Flavonoid merupakan senyawa golongan fenol yang bersifat asam, sehingga menimbulkan warna yang khas dengan amonia (Markham, 1988). Timbulnya warna ini disebabkan oleh pembentukan garam dan struktur kuinoid pada cincin B (Robinson, 1995).

Flavonoid merupakan senyawa fenolik sehingga jika tidak bercampur dengan pigmen lain memberikan warna yang spesifik untuk masing-masing golongan dengan adanya basa atau amonia. Flavon, flavonol dan xanton akan memberikan warna kuning sampai kuning kemerahan, antosianin berwarna lembayung hingga biru. Flavanon tidak berwarna namun akan menjadi merah jika dipanaskan. Flavanolol akan berwarna coklat hingga jingga, adanya khalkon atau auron akan menimbulkan warna merah dan lembayung yang terjadi segera dalam suasana basa (Robinson, 1995). Pada glikosida flavonoid umumnya memberikan warna khas ungu tua, yang kemudian berubah menjadi hijau kekuningan bila diuapi amonia. Penafsiran warna bercak dengan struktur flavonoid disajikan dalam tabel 1.

Tabel I. Penafsiran warna bercak dari segi struktur flavonoid (Markham, 1988)

Warna bercak dengan sinar UV		Jenis flavonoid yang mungkin
Sinar UV tanpa NH ₃	Sinar UV dengan NH ₃	
Lembayung gelap	Kuning, hijau-kuning atau hijau	a. Biasanya 5-OH flavon atau flavonol (tersulih pada 3-O dan mempunyai 4'-OH) b. Kadang-kadang 5-OH flavonon dan 4'-OH khalkon tanpa OH pada cincin B
	Perubahan warna sedikit atau tanpa Perubahan warna	a. Biasanya flavon atau flavonol tersulih pada 3-OH mempunyai 5-OH tetapi tanpa 4'-OH bebas b. Beberapa 6- atau 8-OH flavon dan Flavonol tersulih pada 3-O serta mengandung 5-OH c. Isoflavon dihidroflavonol, biflavonil dan beberapa flavanon yang mengandung 5-OH d. Khalkon yang mengandung 2'- atau 6'-OH

Tabel 1. lanjutan		
		tetapi tidak mengandung 2- atau 4-OH bebas
	Biru muda	Beberapa 5-OH flavanon
	Merah atau jingga	Khalkon yang mengandung 2- dan atau 4-OH bebas
Flouresensi biru muda	Flouresensi hijau-kuning atau hijau-biru	a. Flavon dan flavanon yang tak mengandung 5-OH, misalnya 5-OH-glikosid b. Flavonol tanpa 5-OH bebas tetapi tersulih pada 3-OH
	Perubahan warna sedikit atau tanpa perubahan warna	Isoflavon yang tak mengandung 5-OH bebas
	Flouresensi biru muda	Isoflavon yang tak mengandung 5-OH
Tak nampak	Flouresensi biru muda	Isoflavon tanpa 5-OH bebas
Kuning redup dan kuning, atau flouresensi jingga	Perubahan warna sedikit atau tanpa perubahan warna	Flavonol yang mengandung 3-OH bebas dan mempunyai atau tak mempunyai 5-OH bebas (kadang-kadang berasal dari dihidroflavonol)
Flouresensi kuning	Jingga atau merah	Auron yang mengandung 4'-OH bebas dan beberapa 2- atau 4-OH khalkon
Hijau-kuning, hijau-biru, atau hijau	Perubahan warna sedikit atau tanpa perubahan warna	a. Auron yang tak mengandung 4'-OH bebas dan flavanon tanpa 5-OH bebas b. Flavonol yang mengandung 3-OH bebas dan disertai atau tanpa 5-OH bebas
Merah jingga redup atau merah senduduk	Biru	Antasionidin 3-glikosid
Merah jambu atau flouresensi kuning	Biru	Sebagian besar antosianidin 3,5-diglikosid

Flavonoid merupakan senyawa pereduksi yang baik, menghambat banyak reaksi oksidasi. Flavonoid bertindak sebagai penampung yang baik radikal hidroksi dan superoksid. Aktivitas antioksidannya mungkin dapat menjelaskan mengapa flavonoid tertentu digunakan secara tradisional untuk mengobati gangguan fungsi hati (Robinson, 1995).

5. DPPH (*1, 1-Diphenyl-2-picryl-hydrazyl*)

DPPH adalah suatu radikal bebas organik nitrogen stabil mudah disiapkan dan banyak tersedia di pasaran, merupakan senyawa yang cocok digunakan sebagai model senyawa radikal. DPPH merupakan senyawa berwarna ungu, dan apabila bereaksi dengan senyawa peredam radikal bebas akan berubah intensitas warnanya. Kemampuannya dapat dievaluasi dengan *electron spin resonance* (EPR) atau adanya penurunan absorbansinya, terutama pada 515 nm, reaksinya diamati pada spektrofotometer (Prior *et. al.*, 2005).

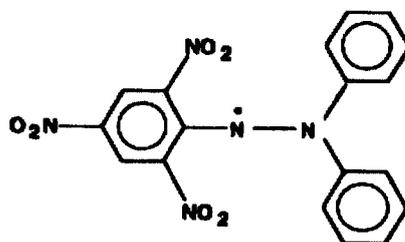
Persen penurunan proporsional kepada konsentrasi antioksidan dan konsentrasi yang menyebabkan penurunan konsentrasi DPPH sebesar 50 % disebut EC₅₀. pengujian DPPH terutama berdasarkan reaksi ET (*electron transission*) dan hidrogen atom abstraction adalah salah satu jalur lainnya (Huang *et al.*, 2005).

Keuntungan ataupun kerugian pengujian DPPH diantaranya; tes yang akan dikerjakan cepat dan sederhana dibanding metode lainnya, untuk pembacaan hasilnya hanya menggunakan UV-Vis spektrofotometer. Tetapi interpretasinya agak susah apabila pada pengujian ada komponen yang mempunyai spektrum yang tumpang tindih dengan DPPH pada 515 nm. Khususnya karetenoid akan mempengaruhi pembacaan pada spektrofotometer (Huang *et al.*, 2005).

Karetenoid termasuk golongan senyawa tetraterpenoid, sebagian senyawa terpenoid termasuk senyawa nonpolar dan karena itu dapat dipisahkan dari senyawa polar dengan mengekstraksi menggunakan pelarut seperti benzena atau eter (Robinson, 1995).

DPPH (*1, 1-Diphenyl-2-picryl-hydrazyl*) C₁₈H₁₂N₅O₆ BM : 394,3

Kristal violet larut dalam benzena, agak larut dalam petroleum eter dan alkohol (Jonas *et al.*, 1974).



Gambar 2. Struktur DPPH

6. Kromatografi Lapis Tipis (KLT)

Salah satu sistem kromatografi yang digunakan adalah kromatografi lapis tipis yang merupakan pemisahan pada lapisan tipis dengan suatu penyangga. Lapisan yang memisahkan terdiri atas partikel-partikel sebagai fase diam yang ditempatkan pada penyangga berupa lempeng gelas, logam, pelat polimer, atau lapisan lain yang cocok. Lapisan melekat pada permukaan dengan bantuan bahan pengikat, biasanya kalsium sulfat atau amilum. Lapisan ini berfungsi sebagai permukaan padat yang menyerap (Gritter *et al.*, 1991).

Pada KLT, pemisahan senyawa berdasarkan perbedaan adsorpsi atau partisi solut antara fase diam dengan fase gerak yang terjadi secara kompetitif. Kemampuan fase diam mengadsorpsi sangat bergantung pada topografi gugus aktif yang terdapat pada masing-masing komponen. Senyawa yang terikat kuat pada fase diam akan dielusi paling lama dan mempunyai nilai R_f (*Retardation factor*) yang kecil, sedangkan senyawa yang tidak terikat kuat pada fase diam akan dielusi lebih dahulu dan mempunyai nilai R_f yang besar. Bercak yang mempunyai R_f sama kemungkinan merupakan senyawa yang sama. Bilangan R_f didefinisikan sebagai jarak yang ditempuh oleh senyawa dibagi dengan jarak yang ditempuh oleh garis depan fase pengembang (Markham, 1988).

Kromatografi lapis tipis adalah metode kromatografi cair yang paling sederhana dan mempunyai beberapa kelebihan, antara lain: sampel yang digunakan sedikit; diperoleh pemisahan senyawa yang amat berbeda, seperti senyawa organik alam, senyawa organik sintetik, kompleks anorganik-organik dan bahkan ion organik;

dan waktu yang dibutuhkan singkat. Kelebihan yang lain adalah jumlah pelarut yang digunakan sangat sedikit. KLT dapat digunakan untuk dua tujuan. Pertama, untuk hasil kuantitatif, atau preparatif. Kedua, digunakan untuk menjajaki sistem pelarut dan sistem penyangga yang akan dipakai dalam kromatografi kolom atau kromatografi cair kinerja tinggi (KCKT) (Gritter *et al.*, 1991).

B. Landasan Teori

Antioksidan adalah substansi yang diperlukan tubuh untuk menetralkan radikal bebas dan mencegah kerusakan yang ditimbulkan oleh radikal bebas terhadap sel normal, protein, dan lemak. Antioksidan menstabilkan radikal bebas dengan melengkapi kekurangan elektron yang dimiliki radikal bebas (Anonim, 2007).

Radikal bebas yang mengambil elektron dari sel tubuh manusia dapat menyebabkan perubahan struktur DNA sehingga timbulah sel-sel mutan. Bila perubahan DNA ini terjadi bertahun-tahun, maka dapat menjadi penyakit kanker. Tubuh manusia, sesungguhnya dapat menghasilkan antioksidan tetapi jumlahnya sering sekali tidak cukup untuk menetralkan radikal bebas yang masuk ke dalam tubuh. Sering kali, zat pemicu yang diperlukan oleh tubuh untuk menghasilkan antioksidan tidak cukup dikonsumsi. Sebagai contoh, tubuh manusia dapat menghasilkan *glutathion*, salah satu antioksidan yang sangat kuat, hanya saja, tubuh memerlukan asupan vitamin C sebesar 1000 mg untuk memicu tubuh menghasilkan glutathione ini (Anonim, 2007).

Tanaman kenikir merupakan tanaman liar yang mudah tumbuh diberbagai tempat. Tanaman ini telah banyak dikonsumsi masyarakat Indonesia, khususnya Yogyakarta sebagai bahan makanan (sayuran). Kandungan kimia yang terdapat pada tanaman kenikir meliputi flavonoid, saponin, polifenol dan minyak atsiri. Flavonoid dan senyawa polifenol telah diketahui memiliki aktivitas antioksidan dengan cara menangkap radikal bebas.

Berdasarkan hal tersebut, diharapkan tanaman ini juga dapat beraktivitas sebagai antioksidan.

C. Hipotesis

Di dalam fraksi air herba kenikir terdapat senyawa flavonoid yang diperkirakan memiliki daya antioksidan dan dapat dideteksi dengan Kromatografi Lapis Tipis KLT).



BAB III

METODOLOGI PENELITIAN

A. Bahan dan Alat

1. Alat

Alat-alat yang digunakan pada penelitian ini yaitu : spektrofotometer U-2810 (Hitachi), *vacuum rotary evaporator* (Heidolph tipe Heizbad WB), mesin penyerbuk (Honda), timbangan analitik (Dragon 205), lampu UV 254 nm, lampu UV 366 nm, lampu visibel, bejana kromatografi, corong pisah (Pyrex), alat-alat gelas (Pyrex), desikator, gunting, kertas saring, *yellow tip*, *blue tip*, *white tip*, dan pipet tetes.

2. Bahan

Bahan yang digunakan dalam penelitian ini adalah Herba kenikir (*Cosmos caudatus* H. B. K.) yang diambil dari daerah Kaliurang, Sleman, Yogyakarta, DPPH (*1,1-diphenyl-2-picrylhydrazyl*), rutin, kuersetin, natrium nitrit, aluminium klorida, natrium hidroksida, selulosa, etanol, metanol, kloroform, etil asetat (E. Merck), aqua bidestilata (Ika Pharmindo), dan aquades (Laboratorium Biologi Farmasi, Fakultas MIPA UII).

B. Cara Penelitian

1. Determinasi tumbuhan

Determinasi tumbuhan terhadap herba kenikir dilakukan dengan panduan buku Flora of Java (*Spermatophytes only*) volume II karangan Backer dan Bakhuizen van den Brink (1965) di laboratorium Biologi Farmasi, Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam.

2. Pengumpulan bahan

Herba kenikir diambil dari Kaliurang, Sleman, Jogjakarta. Herba dipilih yang warna daun hijau, dan berbunga.

3. Pembuatan ekstrak etanolik dan fraksi air herba kenikir

Simplisia segar herba kenikir disiapkan sebanyak 4 kg. Herba dicuci bersih dan dilakukan sortasi untuk menghilangkan beberapa bagian herba yang telah rusak dan pengotor-pengotor lain seperti tanah, pasir, kerikil dan beberapa jenis tanaman lain. Setelah dicuci bersih, herba ditiriskan sampai kelihatan kering (bebas dari air pencuci). Herba dipotong kecil-kecil dan diblender untuk memperluas permukaan simplisia. Ketika diblender, ditambahkan sedikit cairan penyari (etanol) untuk mempermudah proses pengecilan ukuran simplisia menjadi halus dalam blender.

Simplisia yang telah diblender dituang ke dalam bejana maserasi, ditambah etanol sampai terendam sempurna, dan dicampur homogen. Campuran didiamkan selama dua hari sambil sesekali diaduk. Filtrat diambil melalui penyaring vakum dan ampas direndam lagi (remaserasi) dengan etanol secukupnya selama dua hari, kemudian filtratnya diambil dan dicampur dengan filtrat pertama. Filtrat dienapkan selama satu hari kemudian disaring dan diuapkan pelarutnya menggunakan *vaccum rotary evaporator* hingga diperoleh ekstrak kental etanol. Sebanyak tiga perempat bagian ekstrak etanolik herba kenikir diambil, ditambah air hangat dan dipartisi dengan kloroform dalam corong pisah dengan perbandingan volume kloroform - air (1:1, v/v). Ekstrak etanol herba kenikir dipartisi dengan kloroform sebanyak 3-4 kali, dengan penggojokan lemah selama 5 menit, kemudian didiamkan sampai terpisah sempurna. Fase air akan berada pada bagian atas, sedangkan fase kloroform berada pada bagian bawah. Dari hasil partisi diperoleh fraksi kloroform (non polar) dan fraksi air (polar).

Fraksi air yang didapat kemudian dipartisi lagi dengan etil asetat dalam corong pisah dengan perbandingan volume etil asetat - air (1:1, v/v). Partisi ini dilakukan sebanyak 3-4 kali, dengan penggojokan lemah selama 5 menit,

kemudian didiamkan sampai terpisah sempurna. Fase air akan berada pada bagian bawah, sedangkan fase etil asetat akan berada pada bagian atas. Dari hasil partisi diperoleh fraksi etil asetat (semi polar) dan fraksi air (polar). Yang diteliti lebih lanjut adalah fraksi air. Fraksi air digunakan untuk uji antioksidan dan uji kandungan flavonoid total.

4. Pembuatan pereaksi

- a. Pembuatan larutan DPPH 0,4 mM
Sebanyak 15,8 mg serbuk DPPH dimasukkan ke dalam labu takar 100 mL, lalu ditambah etanol hingga batas tanda dan divorteks untuk melarutkan serbuk DPPH.
- b. Pembuatan larutan kuersetin 8,16 mg/mL
Sebanyak 816,0 mg serbuk kuersetin dimasukkan dalam labu takar 100,0 mL, kemudian ditambah akuades hingga batas tanda.
- c. Pembuatan larutan natrium nitrit 5%
Sebanyak 5,0 g natrium nitrit dilarutkan dengan akuades secukupnya di dalam gelas beker, larutan kemudian dipindahkan ke dalam labu takar 100,0 mL, kemudian ditambah akuades hingga batas tanda.
- d. Pembuatan larutan aluminium klorida 10%
Sebanyak 5,0 g aluminium klorida dilarutkan dengan akuades secukupnya di dalam gelas beker, larutan kemudian dipindahkan ke dalam labu takar 50,0 mL, kemudian ditambah akuades hingga batas tanda.
- e. Pembuatan larutan natrium hidroksida 1 M
Sebanyak 4,0 g natrium hidroksida dilarutkan dengan akuades secukupnya di dalam gelas beker, larutan kemudian dipindahkan ke dalam labu takar 100,0 mL, kemudian ditambah akuades hingga batas tanda.
- f. Pembuatan larutan rutin 0,025%
Sebanyak 25,0 mg rutin dimasukkan dalam labu takar 100,0 mL, kemudian ditambah akuades hingga batas tanda.

5. Uji kualitatif flavonoid dengan metode Kromatografi Lapis Tipis

Disiapkan larutan ekstrak etanolik dan fraksi air herba kenikir. Larutan tersebut ditotolkan pada lempeng selulosa mikrokristal dengan pembeding rutin. Lempeng selulosa tersebut dielusi dengan fase gerak n-butanol - asam asetat 15% - air (9:2:6) v/v, fase atas. Setelah dielusi, bercak diamati pada UV 254, UV 366 nm dan sinar tampak. Selanjutnya lempeng diuapi dengan amonia dan bercak diamati kembali pada UV 254 nm, UV 366 nm dan sinar tampak. Flavonoid merupakan golongan senyawa fenol yang bersifat asam, sehingga menimbulkan perubahan warna yang khas dengan adanya amonia. Terakhir lempeng disemprot dengan pereaksi sitroborat dan dipanaskan pada suhu 100 °C selama 10 menit untuk memperkuat aktivitasnya sehingga bercak akan terlihat jelas. Bercak diamati pada UV 254 nm, UV 366 nm dan sinar tampak. Pada penyemprotan menggunakan sitroborat, adanya flavonoid akan memberikan fluoresensi kuning di bawah UV 366 nm. Warna bercak yang terlihat kemudian dibandingkan dengan pustaka untuk selanjutnya dapat diketahui ada tidaknya flavonoid yang terkandung baik dalam ekstrak etanol maupun fraksi air herba kenikir.

6. Uji kualitatif saponin

Sebanyak 100 mg serbuk simpleks ditambah dengan 10 ml air di dalam tabung reaksi, tutup dan kocok kuat-kuat selama 30 detik. Biarkan tabung reaksi dalam posisi tegak selama 30 menit. Apabila buih yang terbentuk seperti sarang lebah setinggi kurang lebih 3 cm dari permukaan cairan terbentuk, menunjukkan adanya saponin. Uji lain dilakukan dengan pipa kapiler diameter 1 mm dan panjang 12,5 mm. Larutan hasil pemanasan serbuk simpleks sebanyak 2 g dalam 10 ml air selama 30 menit dan telah disaring, dimasukkan ke dalam pipa kapiler penuh-penuh. Pipa kapiler diletakkan dalam posisi tegak, kemudian cairan dibiarkan mengalir bebas. Tinggi cairan yang tertinggal dibandingkan dengan tinggi air suling yang diperlakukan sama seperti filtrat. Bila tinggi cairan filtrat setengah atau kurang dari tinggi air suling maka adanya saponin dapat diperhitungkan.

7. Uji kualitatif senyawa polifenol

Sebanyak 2 g serbuk simpleks dipanaskan dengan air sebanyak 10 ml selama 30 menit di atas penangas air mendidih. Disaring panas-panas, setelah dingin ditambah pereaksi bsi (III) klorida sebanyak 3 tetes. Terjadinya warna hijau-biru menunjukkan adanya polifenolat. Uji diulang dengan filtrat hasil pendidihan serbuk simpleks dengan etanol 80% selama 10 menit di atas penangas air.

8. Penentuan aktivitas antioksidan dengan metode penangkapan radikal DPPH

Sebanyak 1,0 ml DPPH 0,4 mM dimasukkan ke dalam tabung reaksi, ditambah sejumlah tertentu sampel (ekstrak etanol, fraksi air dan rutin), selanjutnya ditambahkan etanol sampai volume 5,0 ml, divorteks selama 1 menit hingga tercampur sempurna dan didiamkan selama 30 menit.

Konsentrasi ekstrak yang digunakan dibuat sedemikian rupa dengan cara *trial and error* sehingga memberikan nilai EC_{50} yakni konsentrasi sampel yang mampu menangkap 50% radikal DPPH dibanding kontrol melalui suatu persamaan garis regresi linear. Setelah itu, absorbansi larutan dibaca pada panjang gelombang 517 nm. Dilakukan pula pembacaan absorbansi larutan kontrol yakni tanpa penambahan larutan uji.

Besarnya aktivitas antiradikal atau penangkapan radikal (*radical scavenging*) dihitung dengan rumus sebagai berikut :

$$\text{Persen aktivitas antioksidan} = \frac{\text{Abs.kontrol} - \text{Abs.sampel}}{\text{Abs.kontrol}} \times 100\%$$

9. Kandungan flavonoid total ditentukan secara spektrofotometri sesuai dengan metode *Marinova et al* 2005.

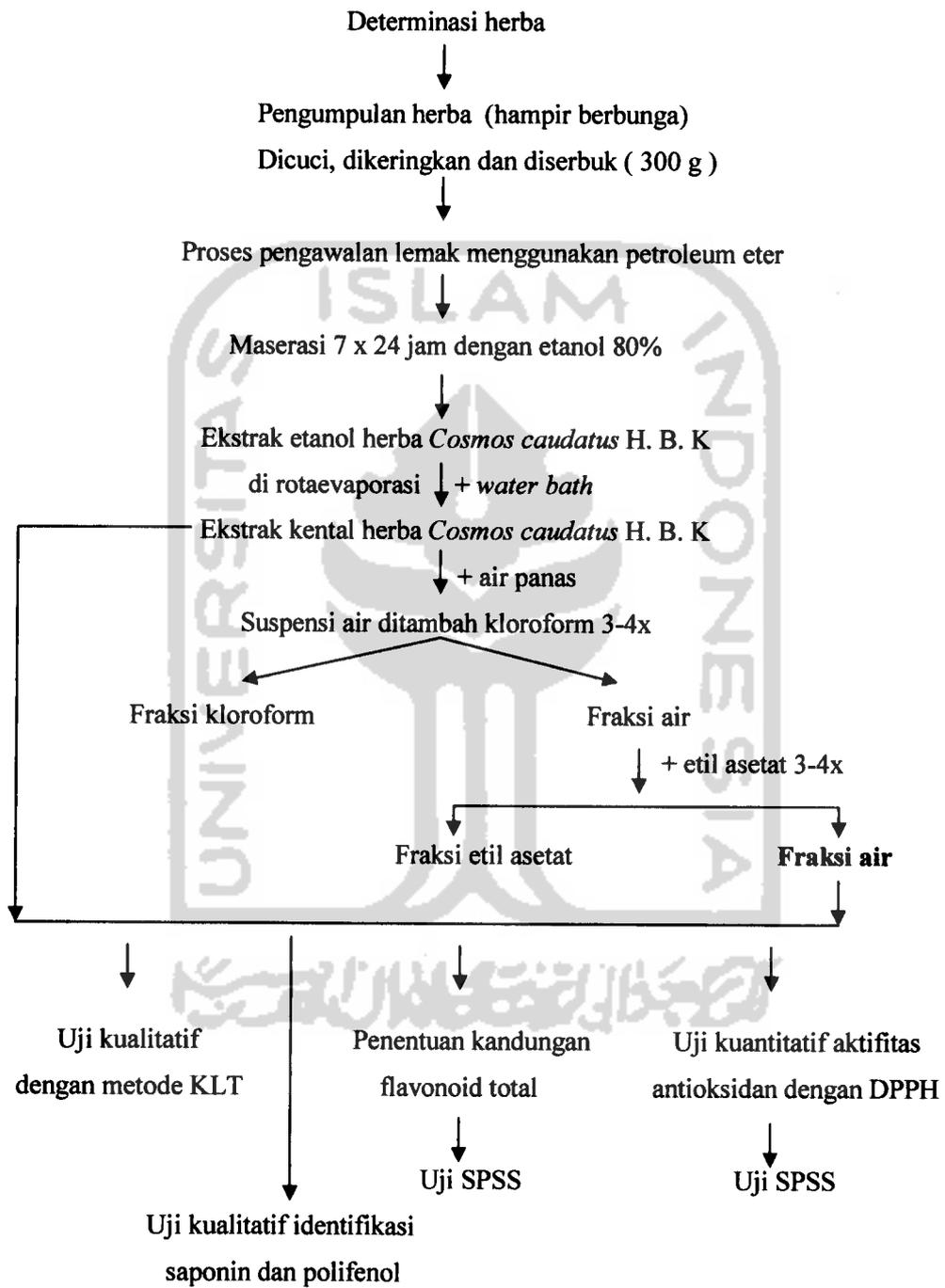
a. Pembuatan kurva baku kuersetin

Dibuat larutan induk (Li) kuersetin dengan konsentrasi 8,16 mg/ml dalam akuades. Sebanyak 100; 200; 300; 400; dan 500 μ L Li dimasukkan ke dalam labu takar 10,0 ml, ditambah 4,0 ml akuades, dan 0,30 ml larutan natrium nitrit 5% lalu dibiarkan selama 5 menit. Setelah itu, larutan ditambah dengan 0.30 ml alumunium klorida 10% dan dibiarkan selama 6 menit. Selanjutnya larutan ditambah dengan 2,0 ml natrium hidroksida 1M dan akuades sampai volume 10,0 ml. Larutan dibaca absorbansinya pada panjang gelombang 510 nm terhadap blanko (campuran seluruh pereaksi di atas tanpa kuersetin).

b. Penentuan kandungan flavonoid total dalam ekstrak etanolik dan fraksi air

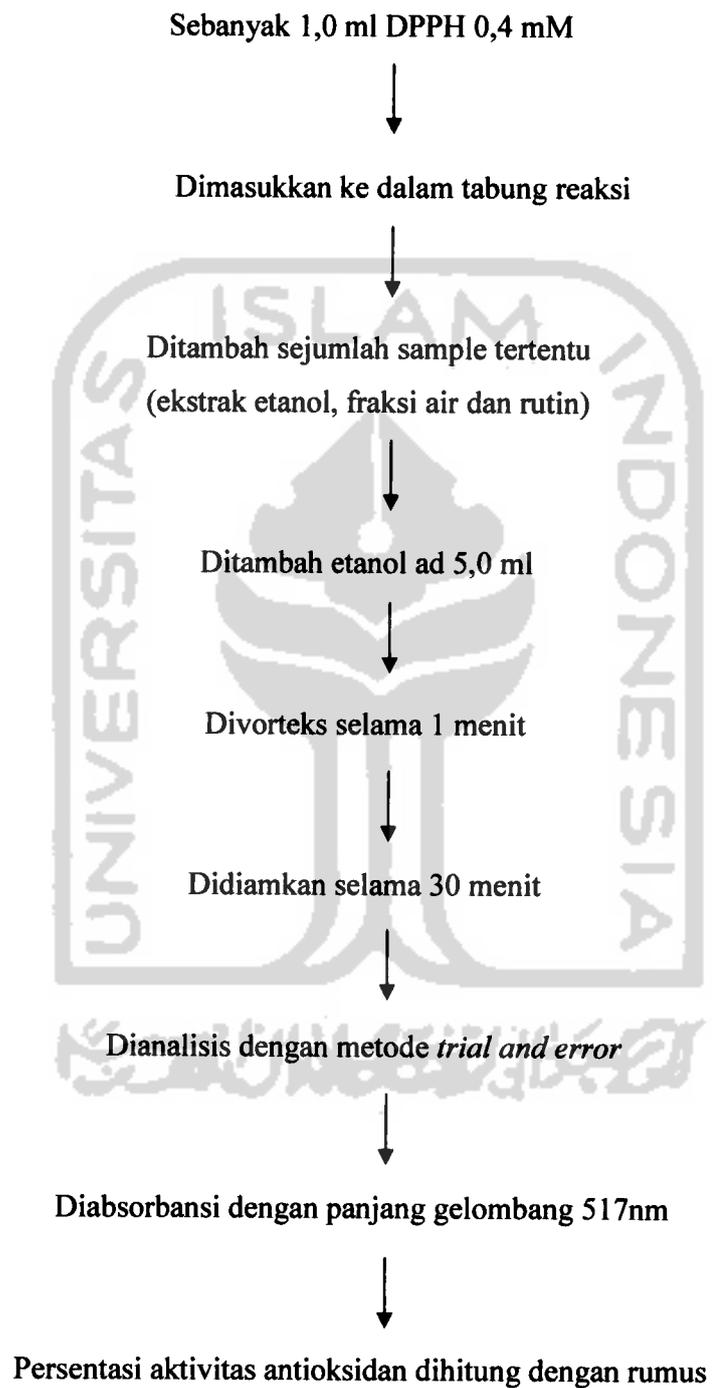
Diambil 300,0 μ l sampel ekstrak etanol 1% dan 250,0 μ l sampel fraksi air 1% masing-masing dimasukkan ke dalam labu takar 10,0 ml, dan dilanjutkan sebagaimana perlakuan pada pembuatan kurva baku. Kandungan flavonoid total dinyatakan sebagai gram ekivalen kuersetin dalam setiap 100 g berat kering ekstrak (gEK/100 g).

10. Skema alur penelitian



Gambar 3. Skema alur penelitian

11. Skema uji aktivitas antioksidan dengan DPPH



Gambar 4. Skema uji aktivitas antioksidan dengan DPPH

C. Analisis Data

Analisis data dilakukan secara diskriptif dan komperatif yaitu :

- 1) Data kromatografi berupa kromatogram hRf dan warna bercak sebelum dan sesudah disemprot pereaksi, diamati pada sinar UV 254 nm dan 366 nm maupun pada sinar tampak. Warna bercak yang terlihat kemudian dibandingkan dengan pustaka untuk selanjutnya dapat diketahui ada atau tidaknya senyawa flavonoid dalam ekstrak etanol maupun fraksi air herba kenikir.
- 2) Hasil absorbansi senyawa uji dengan absorbansi kontrol diolah menggunakan analisis regresi linier yang menyatakan hubungan antara konsentrasi senyawa uji (x) dengan aktivitas antioksidan (y) untuk mendapatkan EC_{50} .
- 3) Analisis statistika menggunakan ANOVA satu jalan dengan perangkat lunak SPSS untuk melihat signifikan antar perlakuan.



BAB IV

HASIL DAN PEMBAHASAN

A. Hasil Determinasi Tanaman

Hal pertama yang dilakukan pada penelitian ini adalah determinasi tanaman herba kenikir (*Cosmos caudatus* H. B. K.). Determinasi tanaman herba kenikir (*Cosmos caudatus* H. B. K.) dilakukan di Laboratorium Biologi Farmasi Jurusan Farmasi Fakultas MIPA Universitas Islam Indonesia pada tanggal 23 April 2007 menurut buku Flora of Java (*Spermathophytes only*) volume II karangan Backer dan Bakhuizen van Den Brink (1965) di bawah bimbingan Ibu Iyok. Tujuan dilakukannya determinasi untuk mengetahui kebenaran identitas tanaman yang digunakan dalam penelitian sehingga dapat mengurangi kemungkinan kesalahan dalam pengambilan sampel analisis fitokimia (Harborne, 1987). Hasil determinasi herba kenikir adalah sebagai berikut :

1b-2b-3b-4b-6b-7b-9b-10b-11b-12b-13b-14b-16b.....(golongan 11)

287b-289b-290b.....(familia *Compositae* = *Asteraceae*)

12a-13b-15a-14.....(*Cosmos caudatus* H. B. K)

Hasil determinasi menyatakan kebenaran tanaman, yaitu *Cosmos caudatus* H. B. K. Surat keterangan hasil determinasi herba kenikir (*Cosmos caudatus* H. B. K.) dapat dilihat pada lembar lampiran 1.

B. Hasil Pengumpulan Bahan

Herba kenikir diperoleh dari desa Candi Sariharjo, Ngaglik, Sleman, Yogyakarta pada bulan April 2008. Herba yang dipilih adalah yang segar dengan warna daun yang hijau dan tidak berwarna kuning serta sedang berbunga. Herba dipilih yang sedang berbunga karena diduga pada tahap ini kandungan senyawa kimia yang ada pada herba banyak. Warna kekuningan pada daun menunjukkan daun tersebut sudah tua (layu) atau kekurangan nutrisi. Waktu pengambilan herba yaitu pada pagi hari. Gambar herba kenikir dapat dilihat pada lampiran 2.

C. Hasil Pembuatan Ekstrak Etanolik

Pembuatan ekstrak etanolik dan fraksi air herba kenikir diperoleh dari 4 kg herba kenikir yang masih segar. Herba dipilih yang segar dengan warna daun hijau, tidak berwarna kekuningan. Warna kekuningan pada herba menandakan herba tersebut telah mengalami kekurangan nutrisi (kandungan kimianya berkurang). Dalam proses penyarian, digunakan simplisia kering herba kenikir dan bukan simplisia segar. Simplisia kering dipilih karena sifatnya lebih awet, memperpanjang masa simpan, mengurangi penurunan mutu sebelum diolah lebih lanjut, memudahkan pengangkutan, serta memiliki nilai ekonomi lebih tinggi.

Sebelum dilakukan penyarian, sebanyak 4 kg herba kenikir dicuci terlebih dahulu di tempat air yang mengalir kemudian di angin-anginkan dengan tujuan untuk mengurangi air yang ada pada herba. Setelah itu herba dikeringkan dengan menggunakan oven selama dua hari pada suhu 40 °C, kemudian herba dihaluskan menggunakan mesin giling/blender sehingga menjadi serbuk kering. Serbuk kering yang telah didapat kemudian disari dengan metode maserasi menggunakan petroleum eter (PE) dengan tujuan untuk menghilangkan zat-zat/senyawa-senyawa kimia yang tidak diinginkan seperti lipid, amilum. Penyarian dengan PE dilakukan selama 1 hari (24 jam). Satu hari setelah penyarian, dilakukan proses penyaringan untuk memisahkan serbuk herba kenikir dengan larutan PE. Proses penyaringan ini menggunakan corong *Buchner*. Serbuk kering yang telah disaring kemudian diangin-anginkan untuk menghilangkan PE dari serbuk. Proses pengeringan ini dilakukan sampai bau PE sudah benar-benar hilang.

Langkah selanjutnya yang dilakukan adalah proses ekstraksi serbuk kering herba kenikir dengan menggunakan etanol. Etanol digunakan dalam proses ini karena etanol merupakan pelarut universal. Selain itu, etanol memiliki polaritas agak tinggi dan mampu menyari sebagian besar kandungan kimia dari simplisia tersebut. Kelebihan etanol dibandingkan metanol yang polaritasnya hampir sama adalah bahwa etanol relatif aman dibandingkan metanol, karena efek toksiknya lebih rendah.

Proses penyarian yang dilakukan menggunakan metode maserasi. Penggunaan

metode maserasi pada penelitian ini karena cara pengerjaan dan peralatan yang digunakan sederhana. Selain itu, maserasi merupakan proses yang paling tepat yang mana bahan yang sudah halus memungkinkan untuk direndam dengan pelarut sampai meresap dan melunakan susunan sel, sehingga zat-zat yang mudah larut akan melarut. Sebanyak 300 g serbuk kering herba kenikir direndam dengan pelarut etanol pada bejana (elenmeyer) yang ditutup dengan kertas alumunium voil untuk menghindari penguapan pelarut etanol dan mencegah adanya kontaminan dari luar. Bejana juga disimpan pada tempat yang terlindung dari cahaya untuk mencegah terjadinya reaksi senyawa-senyawa kimia tertentu dan mencegah kontak langsung dengan sinar ultraviolet yang dapat menyebabkan kerusakan zat-zat kimia yang ada pada herba kenikir. Serbuk kering dalam bejana sering diaduk berulang-ulang pada seluruh permukaan bahan agar proses penyariannya dapat merata.

Maserasi dilakukan selama dua hari sambil diaduk-aduk. Setelah itu, dilakukan proses penyaringan menggunakan corong *Buchner* yang dilapisi dengan kertas saring. Corong *Buchner* digunakan dalam proses penyaringan karena daya saringnya lebih baik dari alat penyaring biasa. Hal ini karena, corong *Buchner* disambungkan pada pompa vakum yang akan bekerja menyedot cairan hasil penyarian dari bawah sehingga bisa didapatkan hasil penyaringan yang banyak. Selain itu, waktu yang dibutuhkan untuk penyaringan dengan corong *Buchner* bisa lebih cepat dibandingkan dengan alat penyaring biasa.

Serbuk kering atau ampas hasil penyaringan digunakan kembali untuk penyarian berikutnya. Hal ini dilakukan untuk mendapat semua senyawa-senyawa kimia yang terkandung dalam herba kenikir karena pada proses penyarian pertama, senyawa-senyawa kimia belum bisa tersari seluruhnya. Proses ini dikenal dengan istilah *remaserasi*. Perlakuan yang diberikan pada proses *remaserasi* ini sama dengan proses penyarian pertama yaitu ampas (serbuk kering) dimasukkan dalam bejana, dilarutkan dengan etanol sampai melebihi batas (di atas) permukaan serbuk, kemudian ditutup dengan kertas alumunium voil dan disimpan pada tempat yang terlindung dari cahaya. Proses *remaserasi* dilakukan selama dua hari. Setelah dua hari, kemudian dilakukan penyaringan kembali menggunakan corong *Buchner* dengan perlakuan yang sama seperti

pada proses penyarian pertama. Hasil penyaringan (filtrat) yang didapat digabungkan dengan filtrat dari penyaringan pertama. Proses penyarian ini dilakukan sebanyak 6 kali. Filtrat dari semua proses penyaringan digabungkan menjadi satu.

Langkah selanjutnya yang dilakukan adalah proses penguapan yang bertujuan untuk mendapatkan ekstrak kental (ekstrak etanolik). Dengan adanya proses penguapan yang menggunakan *rotary evaporator*, maka etanol dapat menguap sehingga yang ada pada filtrat hanyalah senyawa-senyawa kimia yang telah terekstrak. Setelah menggunakan *rotary evaporator*, proses penguapan dilanjutkan dengan pemanasan menggunakan *water bath*. Pemanasan dengan *water bath* dilakukan untuk menguapkan etanol yang masih tertinggal di filtrat pada saat menggunakan *rotary evaporator*. Ekstrak yang didapat dari hasil penguapan dengan *rotary evaporator* dimasukkan kedalam cawan porselen, kemudian dipanaskan di atas *water bath* sambil diaduk-aduk. Di atas cawan porselen diberikan kipas angin dengan tujuan agar ekstrak tidak mengalami pemanasan yang tinggi yang dapat menyebabkan kerusakan kandungan senyawa-senyawa kimia yang dimilikinya. Pemanasan dilakukan sampai bau etanol hilang dan ekstrak menjadi kering. Ekstrak kering (ekstrak etanolik) yang didapat setelah pemanasan yaitu sebanyak 43,05 g sehingga diperoleh randemen ekstrak etanolik 4,035 %. Ekstrak etanolik ini kemudian disimpan dalam eksikator untuk proses selanjutnya.

Dari ekstrak etanolik yang ada, ditimbang 10 g untuk dilakukan fraksinasi. Sepuluh gram (10 g) ekstrak etanolik dilarutkan dengan air hangat sebanyak 250 mL untuk mempermudah kelarutannya, yang selanjutnya akan difraksinasi dengan menggunakan kloroform dan etil asetat. Fraksinasi dilakukan dengan perbandingan fraksi air:kloroform 1:1 v/v. Kloroform yang digunakan sebanyak 250 ml. Pada prosesnya, campuran fraksi air dan kloroform tidak dapat dilakukan sekaligus melainkan dibagi dua karena kapasitas corong pisah yang terbatas sehingga masing-masing corong pisah mengandung 125 ml kloroform. Proses fraksinasi dilakukan dengan pengojokan yang searah dan perlahan-lahan agar larutan tidak membentuk emulsi. Hasil fraksinasi dari kedua bagian yang tadi dipisah kemudian digabung menjadi satu dan di fraksinasi kembali menggunakan kloroform. Dengan adanya fraksi air dan fraksi kloroform maka senyawa-senyawa kimia yang bersifat polar dan non polar akan terikat pada kedua fraksi

senyawa-senyawa kimia yang bersifat polar dan non polar akan terikat pada kedua fraksi ini. Senyawa-senyawa kimia yang bersifat polar akan terikat pada fraksi air dan yang bersifat non polar akan terikat pada fraksi kloroform. Setelah fraksinasi selesai maka akan terbentuk 2 lapisan. Fraksi kloroform akan berada pada bagian bawah dan fraksi air akan berada pada bagian atas. Hal ini karena d_f kloroform lebih besar dari d_f air. Fraksinasi dengan kloroform dilakukan sebanyak 5 kali. Fraksi air yang didapat kemudian di fraksinasi kembali menggunakan etil asetat dengan perbandingan yang sama yaitu 1:1 v/v. Perlakuan yang dilakukan pada fraksinasi dengan etil asetat sama dengan perlakuan pada fraksinasi dengan kloroform. Pada fraksinasi dengan etil juga akan membentuk dua lapisan. Fraksi etil asetat akan berada pada bagian atas dan fraksi air akan berada pada bagian bawah karena d_f air lebih tinggi dibanding d_f etil asetat. Fraksi air yang didapatkan kemudian dipanaskan menggunakan *water bath* dengan bantuan kipas angin sambil diaduk-aduk. Pemanasan ini bertujuan untuk menguapkan pelarut sehingga didapatkan ekstrak kental, yang kemudian ditimbang dan diperoleh fraksi air sebanyak 6,89 g. Ekstrak etanolik dan fraksi air kemudian digunakan untuk uji antioksidan dan analisis kandungan flavonoid total.

D. Identifikasi Senyawa Flavonoid dengan Metode Kromatografi Lapis Tipis

Metode kromatografi lapis tipis dapat digunakan untuk mengidentifikasi ada atau tidaknya senyawa flavonoid pada sampel yang kita teliti, dalam hal ini fraksi air herba kenikir. Pada proses ini juga dilakukan identifikasi pada ekstrak etanolik, dengan harapan dapat diketahui perbandingan senyawa flavonoid pada sampel yang masih kompleks dengan sampel yang sudah terekstraksi.

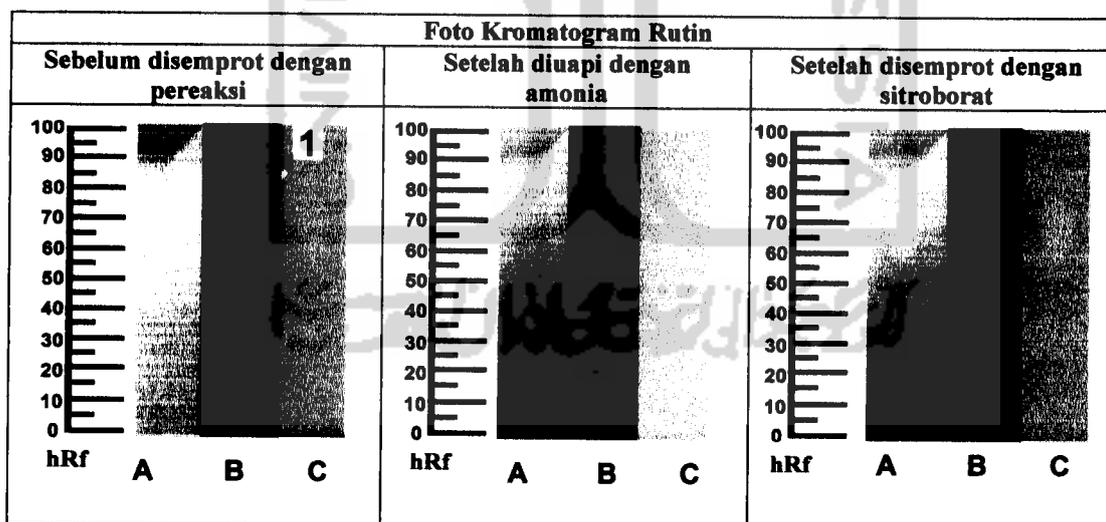
Fase diam yang digunakan adalah selulosa mikrokrystal dengan fase geraknya BAW 9 : 2 : 6. Salah satu alasan tidak digunakannya silika adalah karena pemisahannya yang tidak begitu baik. Logam berat dan kalsium yang ada pada silika dapat membentuk kompleks dengan flavonoid sehingga akan banyak flavonoid yang hilang (Harborne, 1984).

Lempeng selulosa yang sudah ditotolkan dengan sampel, diuapi dengan uap amonia untuk melihat perubahan warna yang terjadi pada bercak. Deteksi dengan uap

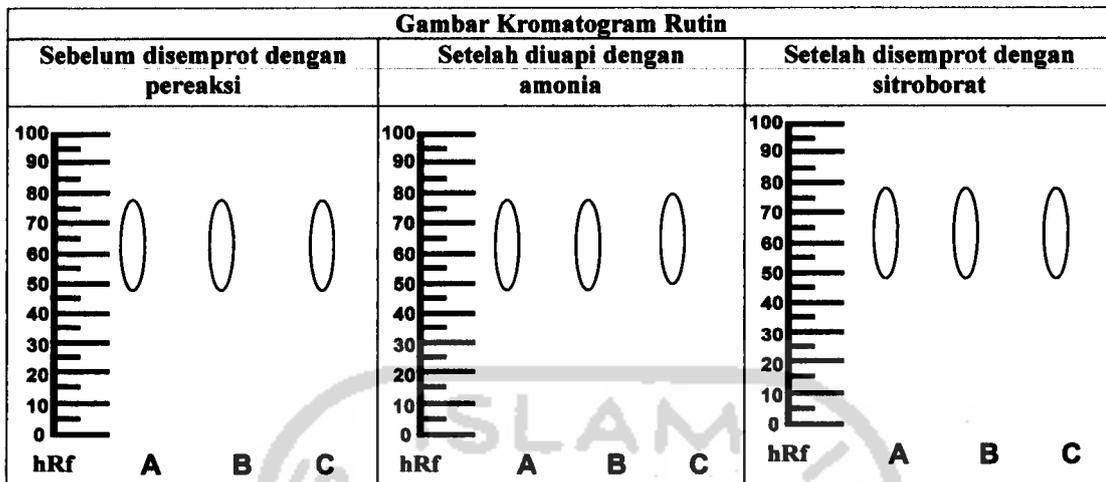
amonias bersifat reversibel dan warna bercak yang timbul cenderung cepat hilang. Oleh karena itu, pengamatan bercak pada lempeng KLT harus segera dilakukan. Setelah deteksi dengan uap amonia, lempeng KLT disemprot dengan pereaksi sitroborat. Dengan adanya pereaksi sitroborat, maka bercak flavonoid akan menunjukkan perubahan warna menjadi kuning (Harborne, 1987).

Pada uji kromatografi ini, digunakan suatu pembanding yang salah satu kegunaannya adalah untuk mengetahui apakah pereaksi yang digunakan masih bagus atau tidak. Bercak yang diperoleh, nantinya akan dibandingkan dengan data yang ada pada pustaka. Senyawa yang digunakan sebagai pembanding adalah rutin. Rutin merupakan senyawa flavonoid yang mempunyai aktivitas antioksidan kuat. Dilihat dari strukturnya, rutin mempunyai aglikon berupa flavonol. Menurut pustaka Markham, 1988, suatu flavonol akan menunjukkan perubahan warna menjadi kuning setelah diuapi dengan amonia dan setelah disemprot dengan sitroborat, yang dilihat pada UV 366 nm.

Gambar 5 dan gambar 6 berikut ini menunjukkan foto dan gambar kromatogram dari rutin sebelum dan sesudah direaksikan dengan amonia dan sitroborat.



Gambar 5. Foto kromatogram uji kualitatif flavonoid pada rutin. Keterangan = A : UV 254 nm, B : UV 366 nm, C : sinar tampak. Kondisi KLT = fase diam : selulosa, fase gerak : BAW (9:2:6), dan jarak elusi 8 cm.



Gambar 6. Gambar kromatogram uji kualitatif flavonoid pada rutin. Keterangan = A : UV 254 nm, B : UV 366 nm, C : sinar tampak. Kondisi KLT = fase diam : selulosa, fase gerak : BAW (9:2:6), dan jarak elusi 8 cm.

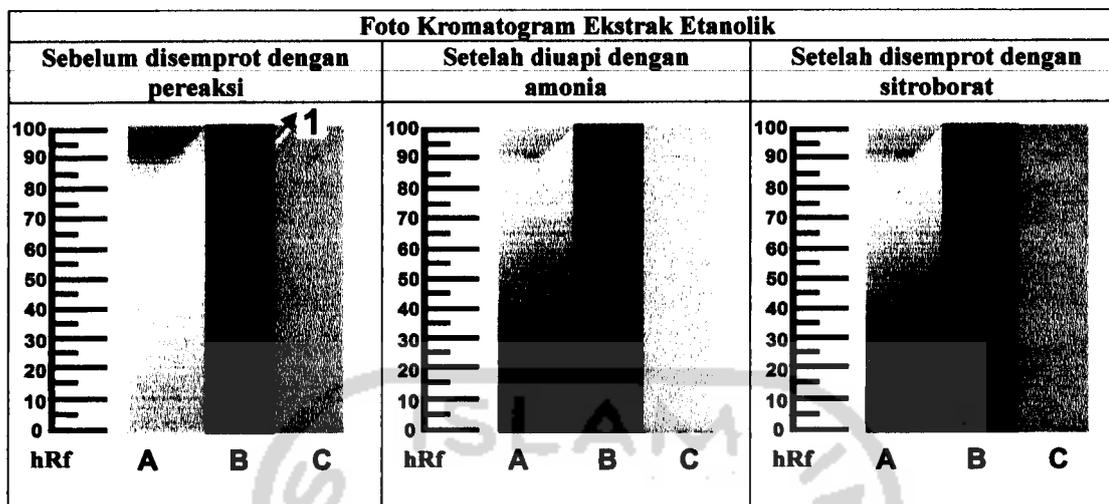
Tabel II. Data kromatogram rutin pada fase diam selulosa, fase gerak BAW (9:2:6) dengan pereaksi uap amonia dan pereaksi semprot sitroborat

No. Bercak	hRf	Sebelum diuapi amonia			Setelah diuapi amonia			Setelah disemprot sitroborat		
		UV 254	UV 366	Sinar Tam-pak	UV 254	UV 366	Sinar Tam-pak	UV 254	UV 366	Sinar Tam-pak
1	73	kuning	coklat	kuning	kuning	kuning	kuning	kuning	kuning	kuning

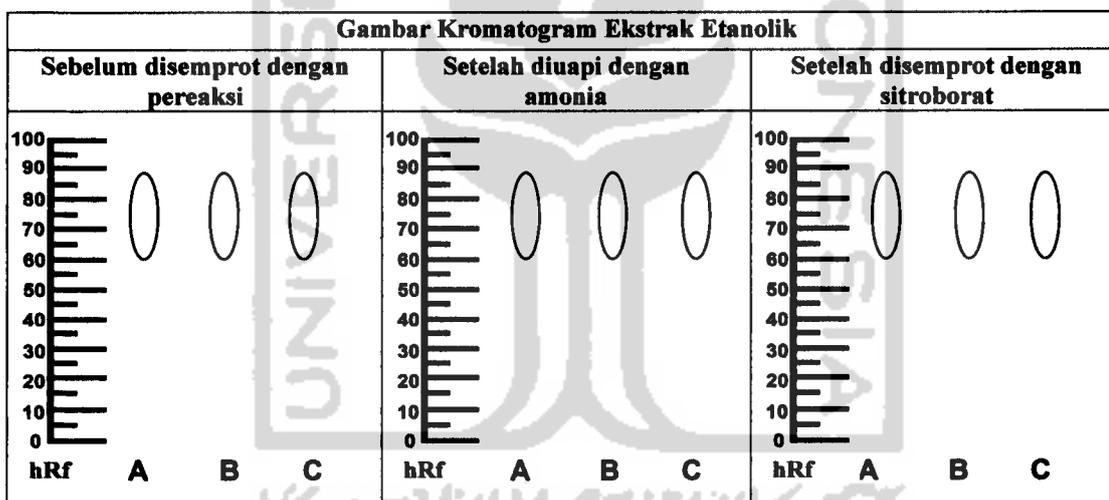
Dari data kromatogram rutin (tabel 2), menunjukkan bahwa rutin mempunyai nilai hRf 73 dan bercak yang berwarna kuning setelah diuapi dengan amonia dan disemprot dengan pereaksi sitroborat. Hasil ini sudah sesuai dengan pustaka (Markham, 1988) dan memberi bukti bahwa pereaksi yang digunakan masih bagus dan dapat digunakan untuk mengidentifikasi senyawa flavonoid pada ekstrak etanol dan fraksi air.

Identifikasi senyawa flavonoid pada ekstrak etanol bisa kita lakukan dengan melihat data yang kita peroleh setelah pengamatan pada lempeng KLT.

Berikut adalah foto kromatogram dari ekstrak etanol yang diperoleh sebelum dan setelah lempeng KLT diberi pereaksi amonia dan sitroborat (gambar 7) ; dan gambar kromatogram dari ekstrak etanol (gambar 8).



Gambar 7. Foto kromatogram uji kualitatif flavonoid pada ekstrak etanol. Keterangan = A : UV 254 nm, B : UV 366 nm, C : sinar tampak. Kondisi KLT = fase diam : selulosa, fase gerak : BAW (9:2:6), dan jarak elusi 8 cm.

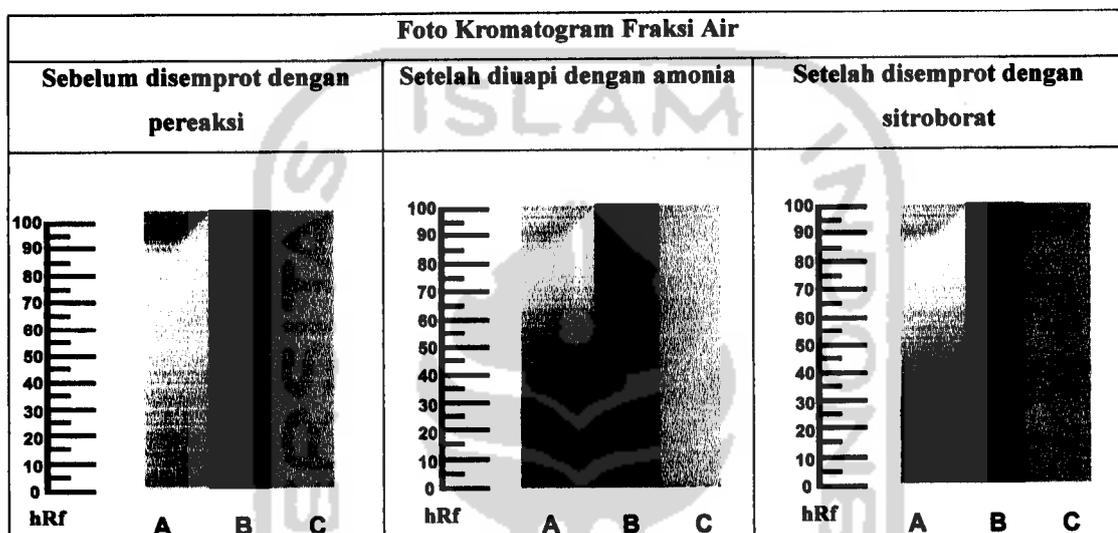


Gambar 8. Gambar kromatogram uji kualitatif flavonoid pada ekstrak etanol. Keterangan = A : UV 254 nm, B : UV 366 nm, C : sinar tampak. Kondisi KLT = fase diam : selulosa, fase gerak : BAW (9:2:6), dan jarak elusi 8 cm.

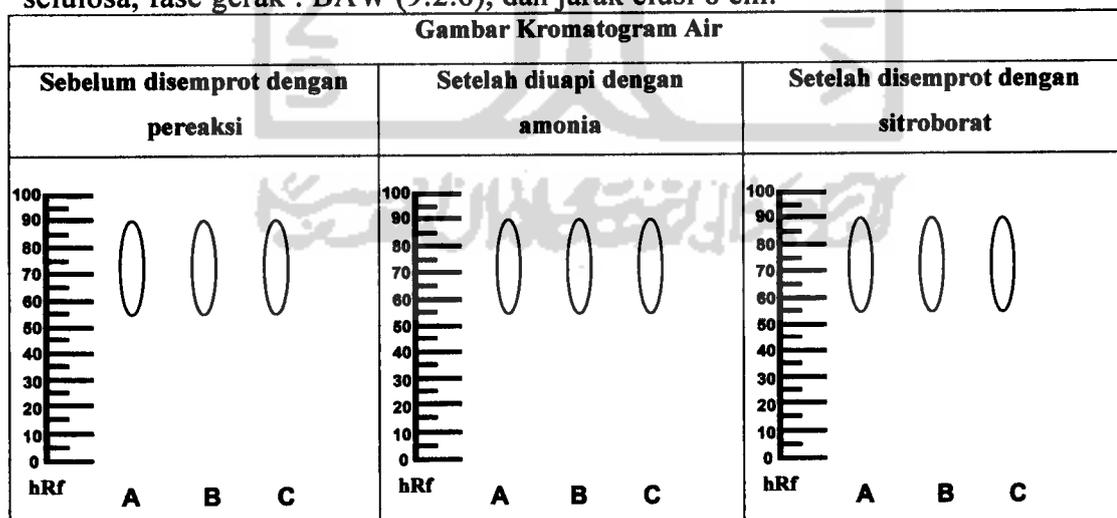
Tabel III. Data kromatogram ekstrak etanolik pada fase diam selulosa, fase gerak BAW (9:2:6) dengan pereaksi uap amonia dan pereaksi semprot sitroborat

No. Bercak	hRf	Sebelum diuapi amonia			Setelah diuapi amonia			Setelah disemprot sitroborat		
		UV 254	UV 366	Sinar Tam-pak	UV 254	UV 366	Sinar Tam-pak	UV 254	UV 366	Sinar Tam-pak
1	83	kuning	kuning	kuning	kuning	coklat	kuning	kuning	kuning	kuning

Data kromatogram ekstrak etanolik menunjukkan bahwa terdapat bercak positif sebagai flavonoid yang ditunjukkan dengan pereaksi amonia dan pereaksi sitroborat, dimana bercak terlihat berwarna kuning pada UV 366. Flavonoid yang teridentifikasi tersebut kemungkinan adalah suatu flavonoid yang mengandung 3 - OH bebas dan mempunyai atau tak mempunyai 5 - OH bebas (kadang-kadang berasal dari dihidroflavanol) (Markham, 1988).



Gambar 9. Foto kromatogram uji kualitatif flavonoid pada fraksi air. Keterangan = A : UV 254 nm, B : UV 366 nm, C : sinar tampak. Kondisi KLT = fase diam : selulosa, fase gerak : BAW (9:2:6), dan jarak elusi 8 cm.



Gambar 10. Gambar kromatogram uji kualitatif flavonoid pada fraksi air. Keterangan = A : UV 254 nm, B : UV 366 nm, C : sinar tampak. Kondisi KLT = fase diam : selulosa, fase gerak : BAW (9:2:6), dan jarak elusi 8 cm.

Tabel IV. Data kromatogram fraksi air pada fase diam selulosa, fase gerak BAW (9:2:6) dengan pereaksi uap amonia dan pereaksi semprot sitroborat.

No. Bercak	hRf	Sebelum diuapi amonia			Setelah diuapi amonia			Setelah disemprot sitroborat		
		UV 254	UV 366	Sinar Tam-pak	UV 254	UV 366	Sinar Tam-pak	UV 254	UV 366	Sinar Tam-pak
1	85	kuning	coklat	kuning	kuning	coklat	kuning	kuning	kuning	kuning

Data kromatogram fraksi air menunjukkan bahwa terdapat bercak positif sebagai flavonoid. Hal tersebut ditunjukkan dari hasil deteksi dengan amonia dan pereaksi sitroborat. Bercak positif flavonoid tersebut, bila dibandingkan dengan literatur, termasuk ke dalam golongan flavonoid yang memiliki gugus 3-OH bebas dan mempunyai atau tak mempunyai 5-OH bebas (kadang-kadang berasal dari dihidroflavanol) (Markham, 1988).

Dari hasil uji kualitatif ini dapat dilihat bahwa pada ekstrak etanol dan fraksi air mengandung senyawa flavonoid dimana perlu penelitian lebih lanjut untuk mengetahui spesifikasi dari struktur flavonoid tersebut.

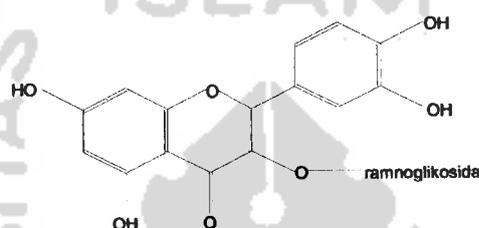
E. Hasil Penentuan Aktivitas Antioksidan dengan Metode Penangkapan Radikal DPPH

Uji aktivitas antioksidan dengan metode penangkapan radikal DPPH dimaksudkan untuk menegaskan aktivitas suatu senyawa uji (ekstrak etanol dan fraksi air herba kenikir) sebagai antioksidan karena sebagaimana diketahui bahwa aktivitas antioksidan dapat dilakukan dengan berbagai macam metode. Meskipun suatu senyawa uji menunjukkan aktifitas antioksidan yang tinggi dengan salah satu metode, tidak akan selalu memberikan hasil yang sama baiknya dengan menggunakan metode lainnya sehingga disarankan mengukur aktivitas antioksidan dengan berbagai macam metode (Takaya *et al.*, 2003).

Aktivitas antioksidan dari sampel yang dimiliki dinyatakan dengan EC_{50} . Nilai EC_{50} diperoleh dari suatu persamaan regresi linier yang menyatakan hubungan antara konsentrasi ekstrak uji dengan persen penangkapan radikal. Semakin kecil nilai EC_{50} , maka semakin aktif ekstrak / fraksi (senyawa uji) tersebut sebagai antioksidan.

Berdasarkan optimasi yang dilakukan maka, kadar DPPH yang digunakan pada penelitian ini adalah sebesar 0,4 mM.

Rutin digunakan sebagai pembanding dalam uji aktivitas antioksidan ekstrak etanol dan fraksi air herba kenikir dengan metode DPPH. Rutin merupakan flavonoid yang telah diketahui memiliki aktivitas antioksidan penangkapan radikal yang poten. Dalam uji DPPH ini, rutin akan mereduksi radikal DPPH. Rutin merupakan salah satu senyawa antioksidan alami dalam golongan fenol.



Gambar 11. Struktur rutin (Mabry et al,1970)

Tabel V. Data aktivitas antioksidan rutin dengan metode penangkapan radikal DPPH

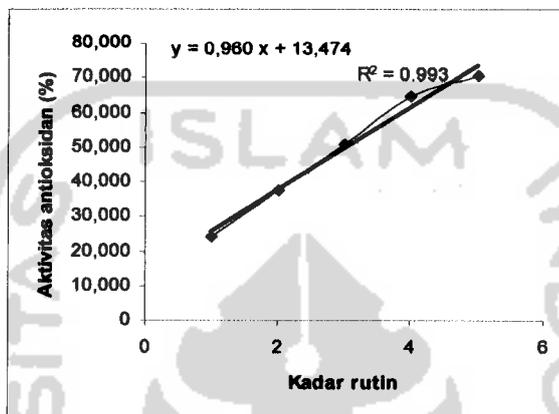
Kadar rutin (µg)	Absorbansi sampel	Aktivitas antioksidan (%)	X Aktivitas ± SD (n = 3)
12,5	0,597	23,949	24,034 ± 0,073
	0,596	24,076	
	0,596	24,076	
25	0,490	37,580	37,495 ± 0,074
	0,491	37,452	
	0,491	37,452	
37,5	0,387	50,701	50,828 ± 0,127
	0,386	50,828	
	0,385	50,955	
50	0,279	64,459	64,544 ± 0,073
	0,278	64,586	
	0,278	64,586	
62,5	0,231	70,573	70,531 ± 0,073
	0,231	70,573	
	0,232	70,446	

Persamaan garis regresi linear : $y = 0,960 x + 13,474$
 $r = 0,993$
 $EC_{50} = 7,609$ (µg/mL)
 x = konsentrasi rutin
 y = aktivitas antioksidan rata-rata rutin

Keterangan : Absorbansi kontrol 0,785

Dari tabel 5 dapat dilihat bahwa rutin mempunyai aktivitas antioksidan yang dinyatakan dengan nilai EC_{50} sebesar 7,609 $\mu\text{g/mL}$. Hal ini berarti untuk menangkap radikal DPPH sebesar 50 % diperlukan konsentrasi rutin 7,609 $\mu\text{g/mL}$.

Grafik 1 merupakan kurva regresi linear yang menyatakan hubungan antara konsentrasi rutin dengan rata-rata aktivitas antioksidannya dengan metode DPPH.



Gambar 12. Grafik kurva regresi linear antara kadar rutin dengan rata-rata aktivitas antioksidannya menggunakan metode DPPH

Aktivitas antioksidan ekstrak etanol herba kenikir dengan metode DPPH disajikan pada tabel 6. Dari analisis regresi linear diperoleh nilai EC_{50} ekstrak etanol sebesar 9,705 $\mu\text{g/mL}$. Hal ini berarti dengan konsentrasi ekstrak etanol sebesar 9,705 $\mu\text{g/mL}$, dapat menangkap radikal sebesar 50 %.

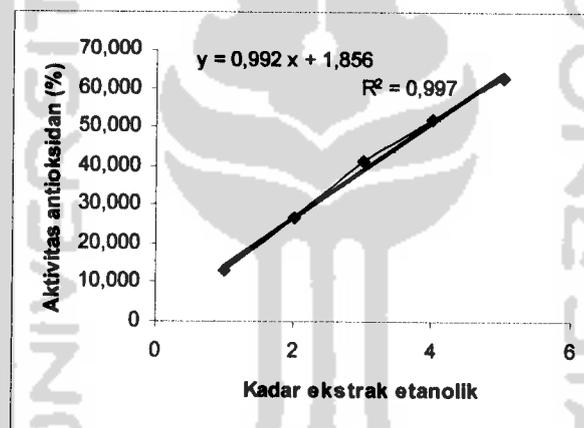
Tabel VI. Data aktivitas antioksidan ekstrak etanolik dengan metode penangkapan radikal DPPH.

Kadar ekstrak etanol (μg)	Absorbansi sampel	Aktivitas antioksidan (%)	X Aktivitas \pm SD (n = 3)
12,5	0,686	12,612	12,909 \pm 0,265
	0,683	12,994	
	0,682	13,121	
25	0,575	26,752	26,964 \pm 0,194
	0,572	27,134	
	0,573	27,006	
37,5	0,461	41,274	41,189 \pm 0,147
	0,461	41,274	
	0,463	41,019	

Tabel VI. Lanjutan			
	0,380	51,592	
50	0,378	51,847	51,805 ± 0,195
	0,377	51,975	
	0,295	62,420	
62,5	0,294	62,548	62,505 ± 0,074
	0,294	62,548	
	0,294	62,548	
Persamaan garis regresi linear : $y = 0,992 x + 1,865$			
r = 0,997			
$EC_{50} = 9,705$ (µg/mL)			
x = konsentrasi ekstrak etanol			
y = aktivitas antioksidan rata-rata ekstrak etanol			

Keterangan : Absorbansi kontrol 0,785

Grafik 2 merupakan kurva regresi linear yang menyatakan hubungan antara konsentrasi rutin dengan rata-rata aktivitas antioksidannya dengan metode DPPH.



Gambar 13. Grafik kurva regresi linear antara kadar ekstrak etanol dengan rata-rata aktivitas antioksidannya menggunakan metode DPPH

Hasil aktivitas antioksidan dari rutin dan ekstrak etanol kemudian dibandingkan dengan fraksi air. Data penentuan aktivitas antioksidan fraksi air dengan metode DPPH beserta nilainya EC_{50} -nya disajikan pada tabel 7. dari analisis regresi linear diperoleh nilai EC_{50} fraksi air sebesar 10,839 µg/mL. Hal ini berarti untuk menangkap radikal sebesar 50 % diperlukan konsentrasi fraksi air sebesar 10,839 µg/mL.

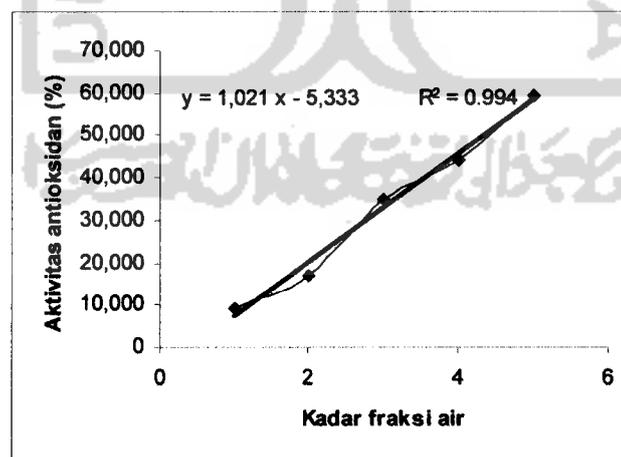
Tabel VII. Data aktivitas antioksidan fraksi air herba kenikir dengan metode penangkapan radikal DPPH

Kadar fraksi air (μg)	Absorbansi sampel	Aktivitas antioksidan (%)	X Aktivitas \pm SD (n = 3)
12,5	0,715	8,917	9,130 \pm 0,265
	0,714	9,045	
	0,711	9,427	
25	0,653	16,815	16,900 \pm 0,074
	0,652	16,943	
	0,652	16,943	
37,5	0,511	34,905	35,159 \pm 0,255
	0,509	35,159	
	0,507	35,414	
50	0,439	44,076	44,246 \pm 0,195
	0,438	44,204	
	0,436	44,459	
62,5	0,321	59,109	59,236 \pm 0,127
	0,320	59,236	
	0,319	59,363	

Persamaan garis regresi linear : $y = 1,021x - 5,333$
 $r = 0,994$
 $EC_{50} = 10,839$ ($\mu\text{g/mL}$)
 x = konsentrasi fraksi air
 y = aktivitas antioksidan rata-rata fraksi air

Keterangan : Absorbansi kontrol 0,785

Grafik 3 merupakan kurva regresi linear yang menyatakan hubungan antara konsentrasi rutin dengan rata-rata aktivitas antioksidannya dengan metode DPPH.



Gambar 14. Grafik kurva regresi linear kadar fraksi air dengan rata-rata aktivitas antioksidan menggunakan metode DPPH

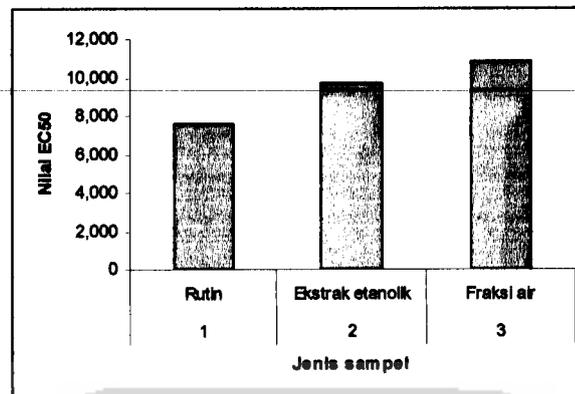
Fraksi air merupakan fraksi yang bersifat polar, jadi senyawa yang terlarut ke dalamnya adalah senyawa-senyawa yang bersifat polar juga. Dari hasil regresi linear mempunyai urutan nilai EC_{50} yaitu EC_{50} rutin sebesar 7,609 $\mu\text{g/mL}$, sementara itu ekstrak etanol dan fraksi air herba kenikir masing-masing mempunyai nilai EC_{50} 9,705 $\mu\text{g/mL}$ dan 10,839 $\mu\text{g/mL}$.

Dari nilai EC_{50} dapat diketahui bahwa ekstrak etanol dan fraksi air herba kenikir memiliki aktivitas antioksidan yang lebih kecil dari pada rutin. Secara teoritis, kandungan senyawa fenolik dan flavonoid yang bersifat polar akan larut ke fraksi polar (air). Senyawa flavonoid yang bersifat polar biasanya berada dalam bentuk glikosida, dimana aglikonnya tersubstitusi dengan gugus gula. Keberadaan gugus gula pada glikosida flavonoid menyebabkan rintangan sterik sehingga menghambat reaksi penangkapan radikal yang digambarkan dengan EC_{50} yang tinggi. Data mengenai tingkatan kekuatan antioksidan ekstrak etanol, fraksi air hasil dan rutin (pembanding) dengan metode DPPH disajikan pada tabel 8.

Tabel VIII. Tingkat kekuatan antioksidan senyawa uji dengan metode penangkapan radikal DPPH (Ariyanto, 2006).

Jenis sampel	EC_{50} ($\mu\text{g/mL}$)	Tingkatan aktivitas antioksidan (nilai EC_{50})			
		Sangat kuat (<50 $\mu\text{g/mL}$)	Kuat (50-100 $\mu\text{g/mL}$)	Sedang (101-150 $\mu\text{g/mL}$)	Lemah (>150 $\mu\text{g/mL}$)
Ekstrak etanol	9,705	√			
Fraksi air	10,839	√			
Rutin	7,609	√			

Pada tabel di atas, ekstrak etanol, fraksi air dan rutin mempunyai tingkat aktivitas antioksidan yang sama. Data EC_{50} ketiga senyawa uji disajikan dalam histogram pada gambar 23.



Gambar 15. Histogram nilai EC_{50} rutin (pembanding), ekstrak etanol dan air pada uji DPPH

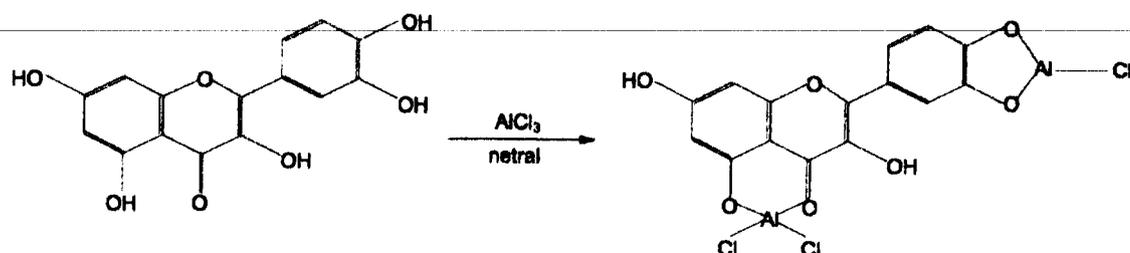
Dari nilai EC_{50} ekstrak etanol, fraksi air, dan rutin (sebagai pembanding) dilakukan analisis statistika dengan SPSS untuk melihat signifikansi antar data. Pertama, data akan kita uji dengan uji Kolmogorof-Smirnov, dimana uji ini digunakan untuk membandingkan tingkat kesesuaian sampel dengan suatu distribusi tertentu, dalam hal ini distribusi normal. Diperoleh hasil perhitungan Kolmogorof-Smirnov untuk rutin dengan signifikansi 0,579; ekstrak etanol dengan signifikansi 0,868; dan fraksi air dengan nilai signifikansi 0,570. Dari uji disimpulkan data aktivitas antioksidan mengikuti distribusi normal karena nilai signifikannya lebih besar dari 0.05 sehingga hipotesa nihil (H_0) diterima dan dapat dilakuka analisis variansi (ANOVA).

Dari hasil ANOVA dengan SPSS diperoleh nilai signifikansi untuk rutin, ekstrak etanol dan fraksi air adalah 0,000, maka H_0 ditolak (karena $0,000 < 0,05$), artinya perbedaan senyawa uji (fraksi air, ekstrak etanol, dan rutin) menunjukkan adanya perbedaan yang bermakna pada aktivitas antioksidan penangkap radikal DPPH.

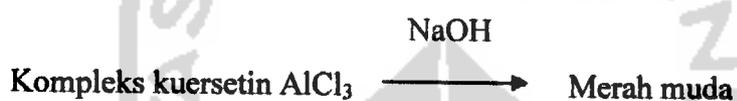
F. Penentuan Kandungan Senyawa Flavonoid Total

Penetapan kadar flavonoid total dilakukan secara spektrofotometri dengan melihat kemampuan flavonoid untuk membentuk kompleks dengan logam Al (menghasilkan warna kuning) yang selanjutnya bereaksi dengan basa kuat (NaOH) meningkat intensitas warnanya menjadi merah muda yang diukur absorbansinya pada

$\lambda 510$ nm. Reaksi yang terjadi antar senyawa flavonoid dengan logam Al pada suasana basa dilukiskan pada gambar 14.

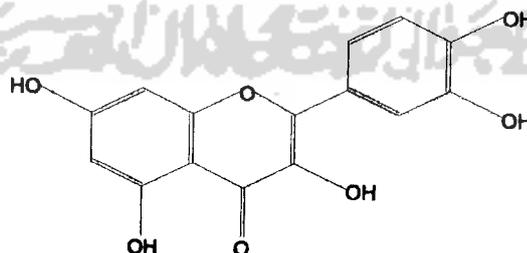


Kuersetin

Kompleks kuersetin - AlCl_3 

Gambar 16. Reaksi yang terjadi dalam penetapan kadar flavonoid

Penentuan kandungan flavonoid total bertujuan untuk mengetahui hubungan antara aktivitas antioksidan dengan kandungan flavonoidnya. Kandungan flavonoid total ditetapkan kadarnya dengan menggunakan kuersetin sebagai pembandingnya. Struktur kuersetin disajikan pada gambar 25 dan data absorbansi kandungan flavonoid totalnya setelah ditambah dengan pereaksi disajikan pada tabel 9.



Gambar 17. Struktur kuersetin

Larutan kuersetin (pembanding) dengan kadar bervariasi dan absorbansinya setelah direaksikan pereaksi $AlCl_3$ dalam suasana basa ditunjukkan pada tabel 9.

Tabel XI. Kadar kuersetin dengan absorbansinya setelah ditambah pereaksi $AlCl_3$ dalam suasana basa yang diukur pada panjang gelombang 510 nm secara spektrofotometri

Kadar kuersetin ($\mu\text{g/ml}$)	Absorbansi	Persamaan regresi linear
1	0,245	$y = 0,099x + 0,129$
2	0,309	$r = 0,996$
3	0,419	$x = \text{Kadar kuersetin } (\mu\text{g/ml})$
4	0,571	$y = \text{Absorbansi}$
5	0,634	

Persamaan regresi linear yang diperoleh dari hubungan antara kadar kuersetin dengan absorbansinya adalah $y = 0,099x + 0,129$; nilai koefisien korelasi (r) = 0,996 dan disajikan pada gambar 21. Hasil penentuan kandungan flavonoid total pada ekstrak etanol dan fraksi air disajikan pada tabel 10, dinyatakan dalam %b/b ekuivalen kuersetin dari replikasi pengukuran absorbansi sebanyak tiga kali.

Tabel X. Kadar flavonoid total ekstrak etanol dan fraksi air herba kenikir dihitung sebagai %b/b ekuivalen kuersetin

Jenis sampel	Absorbansi	Kadar (%)	X Aktivitas \pm SD
Ekstrak Etanolik 1%	0,280	0,015	$0,014 \pm 5,774 \times 10^{-04}$
	0,274	0,015	
	0,271	0,014	
Fraksi Air 1%	0,218	0,008	$0,008 \pm 0$
	0,216	0,008	
	0,215	0,008	

Kandungan senyawa flavonoid total diekspresikan dengan %b/b ekuivalen kuersetin (%b/EK) karena belum diketahui struktur kimia senyawa flavonoid yang ada pada ekstrak etanol dan fraksi air herba kenikir.

Dari tabel terlihat bahwa kadar senyawa flavonoid di dalam fraksi air lebih kecil daripada ekstrak etanol. Ekstrak etanol masih berupa senyawa kompleks,

dimana di dalamnya terlarut flavonoid dalam bentuk aglikon maupun glikosida flavonoid. Jika dihubungkan dengan aktivitas antioksidannya, maka didapatkan hubungan yaitu peningkatan kadar flavonoid total diikuti juga dengan peningkatan aktivitas antioksidan.

Dari hasil penentuan kandungan flavonoid total dapat dilakukan analisis dengan SPSS untuk melihat signifikansi data yang diperoleh. Pertama dilakukan uji Kolmogorov-Smirnov, yang mana uji ini dilakukan untuk membandingkan tingkat kesesuaian sampel dengan suatu distribusi. Dari hasil perhitungan didapatkan nilai signifikansi flavonoid total sebesar 0,573. Nilai signifikansi $> 0,05$ sehingga H_0 diterima, karena data hasil kandungan senyawa flavonoid total mengikuti distribusi normal sehingga dilanjutkan dengan analisis varian (ANOVA).

Analisis varian merupakan prosedur yang digunakan untuk menguji perbandingan rata-rata antar beberapa kelompok data. Selanjutnya dari tes ANOVA antar kedua grup sampel menghasilkan nilai signifikansi 0,000. Dari analisis ini, menunjukkan adanya perbedaan pada kandungan flavonoid total yang ada di ekstrak etanol dan fraksi air karena nilai signifikansinya lebih kecil dari 0,05.

BAB V

KESIMPULAN DAN SARAN

A. Kesimpulan

1. Fraksi air herba kenikir mengandung flavonoid
2. Ekstrak etanol dan fraksi air herba kenikir dengan menggunakan metode penangkapan radikal DDPH berturut-turut memiliki $EC_{50} = 9,705 \mu\text{g/mL}$ dan $EC_{50} = 10,839 \mu\text{g/mL}$, sementara pembanding rutin mempunyai $EC_{50} = 7,609 \mu\text{g/mL}$.
3. Kadar flavonoid total ekstrak etanol dan fraksi air herba kenikir berturut-turut sebesar 0,014% dan 0,008% b/bEK.

B. SARAN

1. Perlu dilakukan penelitian aktivitas antioksidan lebih lanjut dengan metode yang lain, seperti metode linoleat-tiosianat atau metode deoksiribosa.
2. Perlu dilakukan pemisahan dan isolasi lebih lanjut untuk mengetahui senyawa yang memiliki aktivitas sebagai antioksidan dalam herba kenikir.
3. Perlu dilakukan identifikasi lebih lanjut tentang struktur dan jenis flavonoid yang terdapat pada herba kenikir.
4. Perlu dilakukan penelitian untuk uji toksisitas ekstrak herba kenikir.

DAFTAR PUSTAKA

- Anonim, 1986, *Sediaan Generik*, hal. 2, 11-12, Departemen Kesehatan RI, Jakarta.
- Anonim, 2000, *Parameter Standar Umum Ekstrak Tumbuhan Obat*, cetakan pertama, hal. 6, 13-38, Departemen Kesehatan RI, Jakarta.
- Anonim, 2006, *Antioksidan Memerangi Radikal Bebas*, <http://www.suarapembaruan.com/News/2006/01/17/index.html> (diakses tanggal 19 Desember 2007).
- Anonim, 2007, *Antioksidan*, <http://id.wikipedia.org/wiki/Antioksidan> (diakses tanggal 21 Desember 2007).
- Ansel, C. H., 1989, *Pengantar Bentuk Sediaan Farmasi*, Edisi Keempat, hal. 607-609, UI-Press, Jakarta.
- Cos P., Calomne, M., Sindambiw, J. B., Bruyne, T. D., Cimanga, K., Pieters, L., Vlietinck, A.J., and Berghe, D.V., 2001, Cytotoxicity and lipid peroxidation-inhibiting activity of flavonoids, *Planta Med.*, 67, pp. 515-519.
- Gritter, R., Bobbit, J. M., dan Schwarting, A., 1991, *Pengantar Kromatografi* hal. 7-25, diterjemahkan oleh Padmawinata K. Ed II, Penerbit ITB, Bandung.
- Gulcin, I., Uguz, M. T., Oktay, M., Beydemir, S., and Kufrevioglu, O. I., 2004, Evaluation of the antioxidant and antimicrobial activities of Clary sage (*Salvia sclarea*, L.), *Truk I. Agric. For.*, 28, pp. 25-33
- Halliwell, B., and Gutteridge, J. M. C., 1999, *Free Radical in Biology and Medicine*, 3th ed. Pp. 1-231, 353-425, Oxford University Press, Inc., New York.
- Harborne, J. B., 1987, *Metode Fitokimia*, Penerbit ITB, Bandung, 6-7, 13-15, 72-89.
- Mabry, T. J., Markham, K. R., and Thomas, M. B., 1970, *The Systemic Identification of Flavonoid*, pp. 1-343, Springe-Verlag, New York.
- Markham, K. R., 1988, *Cara Mengidentifikasi Flavonoid*, Penerbit ITB, Bandung, 15-16, 38-41.
- Mennen, L. I., Sapinho, D., de Bree, A., Arnault, N., Bertrains, S., Galan, P., and Hercberg, S., 2004, Consume of food rich in flavonoid is related to a decreased cardiovascular risk in ahalarently healthy French women, *ASNS*, 22, pp. 923-926.

- Pokorny, J., Yanishlieva, N., and Gordon, M., 2001, *Antioxidant in food, Practical Applications*, pp. 1-123, Wood Publishing Limited, Cambridge, England.
- Prior, R. R., Wu, X., Schaich, K., 2005, Standardized Methods for The Determination Of Antioxidant Capacity and Phenolics in Food and Dietary Supplements, *J. Agric. Food Chem.*, **55**, 2698A-J.
- Robinson, T., 1995, *Kandungan Organik Tumbuhan Tingkat Tinggi*, ITB, Bandung, 191-196, 290.
- Voight, R., 1984, *Buku Pelajaran Teknologi Farmasi*, diterjemahkan oleh Soendani Noerono, cetakan pertama, Universitas Gajah Mada, Yogyakarta, 643-733.
- Zhang, S., and Morris, M. E., 2003, Effect of flavonoids biochanin a and silymarin on the p-glicoprotein-mediated transport of digoxin and vinblastin in human intestinal Caco-2 Cell, *Pharm. Res.*, **20**(8), pp. 1184-1191.
- Zou, Y., Lu, Y., and Wei, D., 2004, Antioxidant activity of flavonoid-rich extract of *Hypericum perforatum*, L., in vitro, *J. Agric. Food Chem.*, **52**, pp. 5032-5039.
- Zupko, I., Hohmann, J., Redei, D., Falkay, G., Janicsak, G., and Mathe, I., 2001, Antioxidant Activity of Leaves of salvia Species in Enzyme-Dependent and Enzyme-Independent System of Lipid Peroxidation and their Phenolic Constituents, *Planta Med.*, **6**, pp. 366-368.

Lampiran 1. Surat Keterangan Determinasi

UNIVERSITAS ISLAM INDONESIA
JURUSAN FARMASI FMIPA UII
LABORATORIUM BIOLOGI FARMASI

Alamat : Jl.Kaliurang Km 14,4 Yogyakarta
Telpon : (0274) 895920 Ext. 3033

SURAT KETERANGAN
Nomor:36/ UII/Jur Far/ det/V/2008

Yang bertanda tangan di bawah ini, Kepala Laboratorium Biologi Farmasi Jurusan Farmasi FMIPA UII menerangkan bahwa:

Nama : Megasukma M.Armala
NIM : 04613183
Pada Tanggal : 9 Mei 2008

Telah mendeterminasi 1 (satu) species tanaman dengan bimbingan Dra. Iyok Budiarti, di Laboratorium Biologi Farmasi FMIPA UII.

Tanaman tersebut: *Cosmos caudatus*, H.B.K (kenikir)

Demikian surat keterangan ini dibuat untuk dipergunakan semestinya.

Yogyakarta, 13 Mei 2008
Laboratorium Biologi Farmasi
Kepala



Pinus Jumaryatno.S.Si.,MPhil., Apt.
NIP. 986130103

Lampiran 2. Gambar tanaman kenikir (*Cosmos caudatus* H. B. K)



Lampiran 3. Perhitungan nilai EC_{50} ekstrak etanol, fraksi air dan rutin (pembanding) pada uji aktivitas antioksidan dengan DPPH.

a. Ekstrak etanol

$$\text{Diketahui : } y = 0,992x + 1,865$$

(y = aktivitas antioksidan ; x = kadar ekstrak etanol dalam $\mu\text{g}/\mu\text{l}$)

EC_{50} adalah nilai x pada saat $y = 50$

$$50 = 0,992x + 1,865$$

$$50 - 1,865$$

$$x = \frac{50 - 1,865}{0,992} = 48,523 \mu\text{g} / 5 \text{ mL}$$

Jadi, EC_{50} ekstrak etanol adalah $9,705 \mu\text{g}/\text{mL}$

b. Fraksi air

$$\text{Diketahui } y = 1,021x - 5,333$$

$$50 = 1,021x - 5,333$$

$$50 + 5,333$$

$$x = \frac{50 + 5,333}{1,021} = 54,195 \mu\text{g} / 5 \text{ mL}$$

Jadi, EC_{50} fraksi air adalah $10,839 \mu\text{g}/\text{mL}$

c. Rutin

$$\text{Diketahui : } y = 0,960x + 13,474$$

$$50 = 0,960x + 13,474$$

$$50 - 13,474$$

$$x = \frac{50 - 13,474}{0,960} = 38,048 \mu\text{g} / 5 \text{ mL}$$

Jadi, EC_{50} rutin adalah $7,609 \mu\text{g}/\text{mL}$

Lampiran 4. Perhitungan kadar flavonoid total pada ekstrak etanol dan fraksi:
herba kenikir.

- a. Ekstrak etanol 1 % dengan $y = 0,099x + 0,129$ ($y =$ absorbansi dan $x =$ kadar flavonoid ekivalen dalam $\mu\text{g } \%$)

1) Absorbansi 0,280

$$0,280 = 0,990x + 0,129$$

$$0,280 - 0,129$$

$$x = \frac{\quad}{0,099} = 0,015 \mu\text{g } \%$$

2) Absorbansi 0,274

$$0,271 = 0,990x + 0,129$$

$$0,274 - 0,129$$

$$x = \frac{\quad}{0,099} = 0,015 \mu\text{g } \%$$

3) Absorbansi 0,271

$$0,271 = 0,099x + 0,129$$

$$0,271 - 0,129$$

$$x = \frac{\quad}{0,099} = 0,014 \mu\text{g } \%$$

$$\text{Rata-rata kadar flavonoid} = \frac{0,015 + 0,015 + 0,014}{3} = 0,015 \mu\text{g } \%$$

$$\text{Kadar flavonoid total} = \frac{\text{Rata2 kadar flavonoid}}{\text{Kadar ekstrak etanolik}} \times 100 \%$$

$$= \frac{0,015 \mu\text{g} \%}{1000000 \mu\text{g} \%} \times 100 \%$$

$$= 1,5 \times 10^{-6}$$

b. Fraksi air 1 % dengan $y = 0,099x + 0,129$

1) Absorbansi 0,218

$$0,218 = 0,099x + 0,129$$

$$0,218 - 0,129$$

$$x = \frac{\quad}{0,099} = 0,008 \mu\text{g} \%$$

2) Absorbansi 0,216

$$0,216 = 0,099x + 0,129$$

$$0,216 - 0,129$$

$$x = \frac{\quad}{0,099} = 0,008 \mu\text{g} \%$$

3) Absorbansi 0,215

$$0,215 = 0,099x + 0,129$$

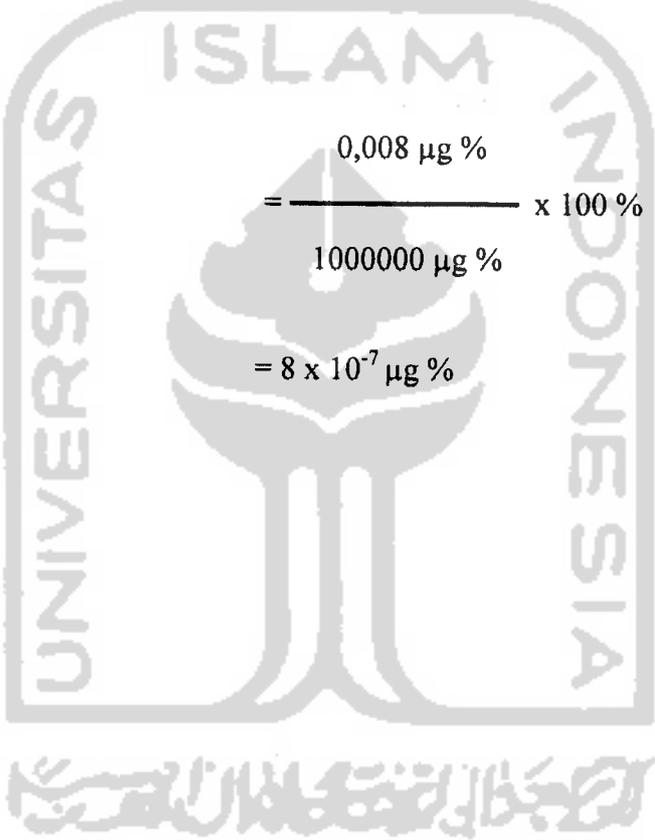
$$0,215 - 0,129$$

$$x = \frac{\quad}{0,099} = 0,008 \mu\text{g} \%$$

$$\text{Rata-rata kadar flavonoid} = \frac{0,008 + 0,008 + 0,008}{3} = 0,008 \mu\text{g} \%$$

$$\text{Kadar flavonoid total} = \frac{\text{Rata2 kadar flavonoid}}{\text{Kadar ekstrak etanolik}} \times 100\%$$

$$= \frac{0,008 \mu\text{g} \%}{1000000 \mu\text{g} \%} \times 100 \%$$

$$= 8 \times 10^{-7} \mu\text{g} \%$$


Lampiran 5. Data analisis aktivitas antioksidan dari Rutin (pembanding), ekstrak etanol dan fraksi air dengan menggunakan SPSS

a. Data analisis aktivitas antioksidan rutin (pembanding) dengan SPSS

NPar Tests

Descriptive Statistics

	N	Mean	Std. Deviation	Minimum	Maximum
rutin	15	3.00000	1.463850	1.000	5.000
persenaktivitas	15	49.48613	17.706238	23.949	70.573

One-Sample Kolmogorov-Smirnov Test

	rutin	persenaktivitas
N	15	15
Normal Parameters ^{a,b}	Mean	49.48613
	Std. Deviation	17.706238
Most Extreme Differences	Absolute	.201
	Positive	.149
	Negative	-.201
Kolmogorov-Smirnov Z	.592	.779
Asymp. Sig. (2-tailed)	.875	.579

a. Test distribution is Normal.

b. Calculated from data.

Oneway

Descriptives

	N	Mean	Std. Deviation	Std. Error	95% Confidence Interval for Mean		Minimum	Maximum
					Lower Bound	Upper Bound		
kadar 12.5	3	24.03367	.073323	.042333	23.85152	24.21581	23.949	24.076
kadar 25	3	37.48467	.073901	.042667	37.31109	37.67825	37.452	37.580
kadar 37.5	3	50.82800	.127000	.073323	50.51251	51.14349	50.701	50.955
kadar 50	3	64.54367	.073323	.042333	64.36152	64.72581	64.459	64.586
kadar 62.5	3	70.53067	.073323	.042333	70.34852	70.71281	70.446	70.573
Total	15	49.48613	17.706238	4.571731	39.68075	59.29152	23.949	70.573

Test of Homogeneity of Variances

persenaktivitas

Levene Statistic	df1	df2	Sig.
.305	4	10	.868

ANOVA

persenaktivitas

	Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
Between Groups	4389.077	4	1097.269	145451.8	.000
Within Groups	.075	10	.008		
Total	4389.152	14			

Post Hoc Tests

Multiple Comparisons

Dependent Variable: persenaktivitas

Tukey HSD

(I) rutin	(J) rutin	Mean Difference (I-J)	Std. Error	Sig.	95% Confidence Interval	
					Lower Bound	Upper Bound
kadar 12.5	kadar 25	-13.461000*	.070917	.000	-13.69439	-13.22761
	kadar 37.5	-26.794333*	.070917	.000	-27.02773	-26.56094
	kadar 50	-40.510000*	.070917	.000	-40.74339	-40.27661
	kadar 62.5	-46.497000*	.070917	.000	-46.73039	-46.26361
kadar 25	kadar 12.5	13.461000*	.070917	.000	13.22761	13.69439
	kadar 37.5	-13.333333*	.070917	.000	-13.56673	-13.09994
	kadar 50	-27.049000*	.070917	.000	-27.28239	-26.81561
	kadar 62.5	-33.036000*	.070917	.000	-33.26939	-32.80261
kadar 37.5	kadar 12.5	26.794333*	.070917	.000	26.56094	27.02773
	kadar 25	13.333333*	.070917	.000	13.09994	13.56673
	kadar 50	-13.715667*	.070917	.000	-13.94906	-13.48227
	kadar 62.5	-19.702667*	.070917	.000	-19.93606	-19.46927
kadar 50	kadar 12.5	40.510000*	.070917	.000	40.27661	40.74339
	kadar 25	27.049000*	.070917	.000	26.81561	27.28239
	kadar 37.5	13.715667*	.070917	.000	13.48227	13.94906
	kadar 62.5	-5.987000*	.070917	.000	-6.22039	-5.75361
kadar 62.5	kadar 12.5	46.497000*	.070917	.000	46.26361	46.73039
	kadar 25	33.036000*	.070917	.000	32.80261	33.26939
	kadar 37.5	19.702667*	.070917	.000	19.46927	19.93606
	kadar 50	5.987000*	.070917	.000	5.75361	6.22039

*. The mean difference is significant at the .05 level.

Homogeneous Subsets

persenaktivitas

Tukey HSD^a

rutin	N	Subset for alpha = .05				
		1	2	3	4	5
kadar 12.5	3	24.03367				
kadar 25	3		37.49467			
kadar 37.5	3			50.82800		
kadar 50	3				64.54367	
kadar 62.5	3					70.53067
Sig.		1.000	1.000	1.000	1.000	1.000

Means for groups in homogeneous subsets are displayed.

a. Uses Harmonic Mean Sample Size = 3.000.

b. Data analisis aktivitas antioksidan ekstrak etanol

NPar Tests

Descriptive Statistics

	N	Mean	Std. Deviation	Minimum	Maximum
persenaktivitas	15	39.07440	18.206819	12.612	62.548
etanolik	15	3.00000	1.463850	1.000	5.000

One-Sample Kolmogorov-Smirnov Test

		persenakt ivitas	etanolik
N		15	15
Normal Parameters ^{a,b}	Mean	39.07440	3.00000
	Std. Deviation	18.206819	1.463850
Most Extreme Differences	Absolute	.154	.153
	Positive	.144	.153
	Negative	-.154	-.153
Kolmogorov-Smirnov Z		.597	.592
Asymp. Sig. (2-tailed)		.868	.875

a. Test distribution is Normal.

b. Calculated from data.

Oneway

Descriptives

persenaktivitas

	N	Mean	Std. Deviation	Std. Error	% Confidence Interval		Minimum	Maximum
					Mean	Mean		
kadar 12	3	2.90900	.264932	.152959	12.25087	13.56713	12.612	13.121
kadar 25	3	3.96400	.194433	.112256	26.48100	27.44700	26.752	27.134
kadar 37	3	1.18900	.147224	.085000	40.82327	41.55473	41.019	41.274
kadar 50	3	1.80467	.194978	.112570	51.32032	52.28902	51.592	51.975
kadar 62	3	2.50533	.073901	.042667	62.32175	62.68891	62.420	62.548
Total	15	2.07440	18.206819	700980	28.99180	49.15700	12.612	62.548

Test of Homogeneity of Variances

persenaktivitas

Levene Statistic	df1	df2	Sig.
1.310	4	10	.331

ANOVA

persenaktivitas

	Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
Between Groups	4640.489	4	1160.122	3501.340	.000
Within Groups	.346	10	.035		
Total	4640.836	14			

Post Hoc Tests

Multiple Comparisons

Dependent Variable: persenaktivitas

Tukey HSD

(I) etanolik	(J) etanolik	Mean Difference (I-J)	Std. Error	Sig.	95% Confidence Interval	
					Lower Bound	Upper Bound
kadar 12.5	kadar 25	-14.055000*	.151941	.000	-14.55505	-13.55495
	kadar 37.5	-28.280000*	.151941	.000	-28.78005	-27.77995
	kadar 50	-38.895667*	.151941	.000	-39.39572	-38.39562
	kadar 62.5	-49.596333*	.151941	.000	-50.09638	-49.09628
kadar 25	kadar 12.5	14.055000*	.151941	.000	13.55495	14.55505
	kadar 37.5	-14.225000*	.151941	.000	-14.72505	-13.72495
	kadar 50	-24.840667*	.151941	.000	-25.34072	-24.34062
	kadar 62.5	-35.541333*	.151941	.000	-36.04138	-35.04128
kadar 37.5	kadar 12.5	28.280000*	.151941	.000	27.77995	28.78005
	kadar 25	14.225000*	.151941	.000	13.72495	14.72505
	kadar 50	-10.615667*	.151941	.000	-11.11572	-10.11562
	kadar 62.5	-21.316333*	.151941	.000	-21.81638	-20.81628
kadar 50	kadar 12.5	38.895667*	.151941	.000	38.39562	39.39572
	kadar 25	24.840667*	.151941	.000	24.34062	25.34072
	kadar 37.5	10.615667*	.151941	.000	10.11562	11.11572
	kadar 62.5	-10.700667*	.151941	.000	-11.20072	-10.20062
kadar 62.5	kadar 12.5	49.596333*	.151941	.000	49.09628	50.09638
	kadar 25	35.541333*	.151941	.000	35.04128	36.04138
	kadar 37.5	21.316333*	.151941	.000	20.81628	21.81638
	kadar 50	10.700667*	.151941	.000	10.20062	11.20072

*. The mean difference is significant at the .05 level.

Homogeneous Subsets

persenaktivitas

Tukey HSD^a

etanolik	N	Subset for alpha = .05				
		1	2	3	4	5
kadar 12.5	3	12.90900				
kadar 25	3		26.96400			
kadar 37.5	3			41.18900		
kadar 50	3				51.80467	
kadar 62.5	3					62.50533
Sig.		1.000	1.000	1.000	1.000	1.000

Means for groups in homogeneous subsets are displayed.

a. Uses Harmonic Mean Sample Size = 3.000.

c. Data analisis aktivitas antioksidan fraksi air

NPar Tests

Descriptive Statistics

	N	Mean	Std. Deviation	Minimum	Maximum
persenaktivitas	15	32.93433	18.795350	8.917	59.363
air	15	3.00000	1.463850	1.000	5.000

One-Sample Kolmogorov-Smirnov Test

		persenakt ivitas	air
N		15	15
Normal Parameters a,b	Mean	32.93433	3.00000
	Std. Deviation	18.795350	1.463850
Most Extreme Differences	Absolute	.203	.153
	Positive	.203	.153
	Negative	-.142	-.153
Kolmogorov-Smirnov Z		.785	.592
Asymp. Sig. (2-tailed)		.570	.875

a. Test distribution is Normal.

b. Calculated from data.

Oneway

Descriptives

	N	Mean	Std. Deviation	Std. Error	95% Confidence Interval for Mean		Minimum	Maximum
					Lower Bound	Upper Bound		
					persenaktivitas			
kadar 12.5	3	9.12967	.285332	.153190	8.47054	9.78879	8.917	9.427
kadar 25	3	16.90033	.073901	.042667	16.71675	17.08391	16.815	16.943
kadar 37.5	3	35.15933	.254500	.146936	34.52712	35.79155	34.905	35.414
kadar 50	3	44.24633	.194878	.112570	43.76198	44.73068	44.076	44.459
kadar 62.5	3	59.23800	.127000	.073323	58.92051	59.55149	59.109	59.363
Total	15	32.93433	18.795350	4.852938	22.52582	43.34285	8.917	59.363

Test of Homogeneity of Variances

persenaktivitas			
Levene Statistic	df1	df2	Slg.
1.103	4	10	.407

ANOVA

persenaktivitas					
	Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
Between Groups	4945.323	4	1236.331	31738.864	.000
Within Groups	.390	10	.039		
Total	4945.712	14			

Post Hoc Tests

Multiple Comparisons

Dependent Variable: persenaktivitas

Tukey HSD

(I) air	(J) air	Mean Difference (I-J)	Std. Error	Sig.	95% Confidence Interval	
					Lower Bound	Upper Bound
kadar 12.5	kadar 25	-7.770667*	.161153	.000	-8.30104	-7.24030
	kadar 37.5	-26.029667*	.161153	.000	-26.56004	-25.49930
	kadar 50	-35.116667*	.161153	.000	-35.64704	-34.58630
	kadar 62.5	-50.106333*	.161153	.000	-50.63670	-49.57596
kadar 25	kadar 12.5	7.770667*	.161153	.000	7.24030	8.30104
	kadar 37.5	-18.259000*	.161153	.000	-18.78937	-17.72863
	kadar 50	-27.346000*	.161153	.000	-27.87637	-26.81563
	kadar 62.5	-42.335667*	.161153	.000	-42.86604	-41.80530
kadar 37.5	kadar 12.5	26.029667*	.161153	.000	25.49930	26.56004
	kadar 25	18.259000*	.161153	.000	17.72863	18.78937
	kadar 50	-9.087000*	.161153	.000	-9.61737	-8.55663
	kadar 62.5	-24.076667*	.161153	.000	-24.60704	-23.54630
kadar 50	kadar 12.5	35.116667*	.161153	.000	34.58630	35.64704
	kadar 25	27.346000*	.161153	.000	26.81563	27.87637
	kadar 37.5	9.087000*	.161153	.000	8.55663	9.61737
	kadar 62.5	-14.989667*	.161153	.000	-15.52004	-14.45930
kadar 62.5	kadar 12.5	50.106333*	.161153	.000	49.57596	50.63670
	kadar 25	42.335667*	.161153	.000	41.80530	42.86604
	kadar 37.5	24.076667*	.161153	.000	23.54630	24.60704
	kadar 50	14.989667*	.161153	.000	14.45930	15.52004

*. The mean difference is significant at the .05 level.

Homogeneous Subsets

persenaktivitas

Tukey HSD ^a

air	N	Subset for alpha = .05				
		1	2	3	4	5
kadar 12.5	3	9.12967				
kadar 25	3		18.90033			
kadar 37.5	3			35.15933		
kadar 50	3				44.24633	
kadar 62.5	3					59.23600
Sig.		1.000	1.000	1.000	1.000	1.000

Means for groups in homogeneous subsets are displayed.

a. Uses Harmonic Mean Sample Size = 3.000.

d. Data analisis flavonoid total kuersetin

NPar Tests

Descriptive Statistics

	N	Mean	Std. Deviation	Minimum	Maximum
persenaktivitas	15	.43567	.153823	.244	.635
kuersetin	15	3.00000	1.463850	1.000	5.000

One-Sample Kolmogorov-Smirnov Test

	persenaktivitas	kuersetin
N	15	15
Normal Parameters ^{a,b}	Mean	.43567
	Std. Deviation	.153823
Most Extreme Differences	Absolute	.211
	Positive	.193
	Negative	-.211
Kolmogorov-Smirnov Z	.815	.592
Asymp. Sig. (2-tailed)	.519	.875

a. Test distribution is Normal.

b. Calculated from data.

Oneway

Descriptives

persenaktivitas		N	Mean	Std. Deviation	Std. Error	95% Confidence Interval for Mean		Minimum	Maximum
						Lower Bound	Upper Bound		
kadar 1	3	24500	.001000	.000577	.24252	.24748	.244	.246	
kadar 2	3	30800	.001000	.000577	.30652	.31148	.308	.310	
kadar 3	3	41800	.000000	.000000	.41900	.41900	.419	.419	
kadar 4	3	57133	.000577	.000333	.56990	.57277	.571	.572	
kadar 5	3	63400	.001000	.000577	.63152	.63648	.633	.635	
Total	15	43587	.153823	.039717	.35048	.52085	.244	.635	

Test of Homogeneity of Variances

persenaktivitas				
Levene Statistic	df1	df2	Sig.	
1.214	4	10	.384	

ANOVA

persenaktivitas					
	Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
Between Groups	.331	4	.083	124219.7	.000
Within Groups	.000	10	.000		
Total	.331	14			

Post Hoc Tests

Multiple Comparisons

Dependent Variable: persenaktivitas

Tukey HSD

(I) kuersetin	(J) kuersetin	Mean Difference (I-J)	Std. Error	Sig.	95% Confidence Interval	
					Lower Bound	Upper Bound
kadar 1	kadar 2	-.064000*	.000667	.000	-.06619	-.06181
	kadar 3	-.174000*	.000667	.000	-.17619	-.17181
	kadar 4	-.326333*	.000667	.000	-.32853	-.32414
	kadar 5	-.389000*	.000667	.000	-.39119	-.38681
kadar 2	kadar 1	.064000*	.000667	.000	.06181	.06619
	kadar 3	-.110000*	.000667	.000	-.11219	-.10781
	kadar 4	-.262333*	.000667	.000	-.26453	-.26014
	kadar 5	-.325000*	.000667	.000	-.32719	-.32281
kadar 3	kadar 1	.174000*	.000667	.000	.17181	.17619
	kadar 2	.110000*	.000667	.000	.10781	.11219
	kadar 4	-.152333*	.000667	.000	-.15453	-.15014
	kadar 5	-.215000*	.000667	.000	-.21719	-.21281
kadar 4	kadar 1	.326333*	.000667	.000	.32414	.32853
	kadar 2	.262333*	.000667	.000	.26014	.26453
	kadar 3	.152333*	.000667	.000	.15014	.15453
	kadar 5	-.062667*	.000667	.000	-.06486	-.06047
kadar 5	kadar 1	.389000*	.000667	.000	.38681	.39119
	kadar 2	.325000*	.000667	.000	.32281	.32719
	kadar 3	.215000*	.000667	.000	.21281	.21719
	kadar 4	.062667*	.000667	.000	.06047	.06486

*. The mean difference is significant at the .05 level.

Homogeneous Subsets

persenaktivitas

Tukey HSD ^a

kuersetin	N	Subset for alpha = .05				
		1	2	3	4	5
kadar 1	3	.24500				
kadar 2	3		.30900			
kadar 3	3			.41900		
kadar 4	3				.57133	
kadar 5	3					.63400
Sig.		1.000	1.000	1.000	1.000	1.000

Means for groups in homogeneous subsets are displayed.

a. Uses Harmonic Mean Sample Size = 3.000.

e. Data analisis flavonoid total ekstrak etanol dan fraksi air

NPar Tests

Descriptive Statistics

	N	Mean	Std. Deviation	Minimum	Maximum
sampel	6	1.5000	.54772	1.00	2.00
persenaktivitas	6	.01133	.003670	.008	.015

One-Sample Kolmogorov-Smirnov Test

		sampel	persenakt ivitas
N		6	6
Normal Parameters ^{a,b}	Mean	1.5000	.01133
	Std. Deviation	.54772	.003670
Most Extreme Differences	Absolute	.319	.318
	Positive	.319	.318
	Negative	-.319	-.266
Kolmogorov-Smirnov Z		.782	.779
Asymp. Sig. (2-tailed)		.573	.578

a. Test distribution is Normal.

b. Calculated from data.

Oneway

Descriptives

persenaktivitas

	N	Mean	Std. Deviation	Std. Error	% Confidence Interval for Mean		Minimum	Maximum
					Lower Bound	Upper Bound		
ekstrak etal	3	.01467	.000577	.000333	.01323	.01610	.014	.015
fraksi air	3	.00800	.000000	.000000	.00800	.00800	.008	.008
Total	6	.01133	.003670	.001498	.00748	.01518	.008	.015

Test of Homogeneity of Variances

persenaktivitas

Levene Statistic	df1	df2	Sig.
16.000	1	4	.016

ANOVA

persenaktivitas

	Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
Between Groups	.000	1	.000	400.000	.000
Within Groups	.000	4	.000		
Total	.000	5			