

**UJI AKTIVITAS ANTIOKSIDAN EKSTRAK DAN FRAKSI
BIJI SALAK PONDOH (*Salacca zalacca* (Gaertn.) Voss.)
DENGAN MENGGUNAKAN METODE DPPH**

SKRIPSI



Oleh:

NUR KHASANA H

12613234

PROGRAM STUDI FARMASI

FAKULTAS MATEMATIKA DAN ILMU PENGETAHUAN ALAM

UNIVERSITAS ISLAM INDONESIA

YOGYAKARTA

DESEMBER 2016

**UJI AKTIVITAS ANTIOKSIDAN EKSTRAK DAN FRAKSI
BIJI SALAK PONDOH (*Salacca zalacca* (Gaertn.) Voss.)
DENGAN MENGGUNAKAN METODE DPPH**

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 Yogyakarta



Oleh:

NUR KHASANA

12613234

**PROGRAM STUDI FARMASI
FAKULAS MATEMATIKA DAN ILMU PENGETAHUAN ALAM
UNIVERSITAS ISLAM INDONESIA
YOGYAKARTA
DESEMBER 2016**

HALAMAN PERSETUJUAN

SKRIPSI
UJI AKTIVITAS ANTIOKSIDAN EKSTRAK DAN FRAKSI
BIJI SALAK PONDOH (*Salacca zalacca* (Gaertn.) Voss.)
DENGAN MENGGUNAKAN METODE DPPH



Pembimbing Utama,

Pinus Jumarvatno, S.Si., M.Phil., Ph.D., Apt.

Pembimbing Pendamping,

Sista Werdvani, M.Biotech., Apt.

SKRIPSI
UJI AKTIVITAS ANTIOKSIDAN EKSTRAK DAN FRAKSI
BIJI SALAK PONDOH (*Salacca zalacca* (Gaertn.) Voss.)
DENGAN MENGGUNAKAN METODE DPPH



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

Tanggal : 19 Desember 2016



| | | |
|-----------------|---|-------------------------|
| Ketua Penguji | : Pinus Jumaryatno, S.Si., M.Phil., Ph.D., Apt. | (<i>Pinus</i>) |
| Anggota Penguji | : 1. Sista Werdyani, M.Biotech., Apt. | (<i>Sista</i>) |
| | 2. Hady Anshory T, M.Sc., Apt. | (<i>Hady</i>) |
| | 3. Dra. Suparmi, M.Si., Apt. | (<i>Suparmi</i>) |

Mengetahui

Dekan Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam
Universitas Islam Indonesia



[Signature]
Drs. Alwan, M.Sc., Ph.D

HALAMAN PERNYATAAN ORISINALITAS

PERNYATAAN

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

Yogyakarta, 19 Desember 2016

Penulis,



Nur Khasanah

HALAMAN PERSEMBAHAN

Karya ini Kupersembahkan untuk :

Kedua orangtuaku

Ibu dan Bapak yang telah memberikan kasih sayang, motivasi, dan doa tiada henti sehingga saya bisa menyelesaikan skripsi ini.

Kakaku: Mba Indri, Mas iwan, Mba Yuni, Mba Fafa, dan Mas Wasis

Selalu memberikan dukungan, nasihat saat suka maupun duka

Keponakanku: Dek Sahela dan Zahra

Penyemangat untuk selalu terus maju

Terima Kasih untuk:

Farmasi UII Kelas D 2012, Injectio, dan semua orang yang telah mendukung dan mendoakan yang tidak dapat disebutkan namanya satupersatu.

KATA PENGANTAR

بِسْمِ اللَّهِ الرَّحْمَنِ الرَّحِيمِ

Assalamu'alaikum Warrahmatullahi Wabarakatuh

Puji syukur penulis panjatkan kehadiran Allah SWT atas rahmat dan karunia yang diberikan, sehingga penulis bisa menyelesaikan skripsi yang berjudul **Uji Aktivitas Antioksidan Ekstrak dan Fraksi Biji Salak Pondoh (*Salacca zalacca* (Gaertn.) Voss) dengan Menggunakan Metode DPPH**. Penulisan skripsi ini dilakukan dalam rangka memenuhi salah satu syarat untuk mencapai gelar Sarjana Farmasi Prodi Farmasi Fakultas MIPA Universitas Islam Indonesia. Penulis menyadari bahwa, tanpa bantuan dan bimbingan dari berbagai pihak, dari masa perkuliahan sampai pada penyusunan skripsi ini, sangatlah sulit bagi penulis untuk menyelesaikan skripsi ini. Oleh karena itu, saya mengucapkan terima kasih kepada:

1. Bapak Pinus Jumaryatno, S.Si., M.Phil., Ph.D., Apt selaku Dosen Pembimbing Utama dan selaku Ketua Program Studi Farmasi FMIPA UII serta Ibu Sista Werdyani, M. Biotech., Apt selaku Dosen Pembimbing Pendamping yang telah banyak meluangkan waktu untuk memberikan bimbingan, arahan dan motivasi selama penelitian dan penyusunan skripsi ini;
2. Bapak Hady Anshory T, M.Sc., Apt dan Ibu Dra. Suparmi, M.Si., Apt selaku Dosen Penguji yang telah memberikan masukan, bimbingan, dan saran guna menyempurnakan skripsi ini;
3. Bapak Aris Perdana Kusuma M.Sc., Apt selaku Dosen Pembimbing Akademik yang telah membimbing dan memberi nasehat hingga saat ini;
4. Bapak Drs. Allwar, M.Sc., Ph.D selaku Dekan Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam, Universitas Islam Indonesia yang telah memberikan fasilitas dalam mendukung penyusunan skripsi;

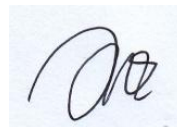
5. Bapak Riyanto dan Bapak Yon (Laboran Biologi Farmasi), Bapak Kuswandi (Laboran Kimia Farmasi) yang telah banyak membantu selama melaksanakan penelitian;
6. Teman-teman Injection Farmasi 2012, para peneliti di laboratorium Biologi Farmasi terimakasih atas ilmu dan bantuannya, serta segenap civitas akademik Program Studi Framasi Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam Universitas Islam Indonesia.

Penulis menyadari bahwa skripsi ini jauh dari sempurna, oleh karena itu kritik dan saran yang bersifat membangun penulis terima dengan segala kerendahan hati. Semoga skripsi ini dapat bermanfaat dan dapat digunakan oleh berbagai pihak yang berkepentingan serta berguna bagi ilmu pengetahuan khususnya dibidang farmasi.

Wassalamu'alaikum Warrahmatullahi Wabarakatuh

Yogyakarta, 19 Desember 2016

Penulis,



Nur Khasanah

DAFTAR ISI

| | |
|---|----------|
| HALAMAN JUDUL..... | i |
| HALAMAN PERSETUJUAN..... | ii |
| HALAMAN PENGESAHAN..... | ii |
| HALAMAN PERNYATAAN ORISINALITAS..... | iv |
| HALAMAN PERSEMBAHAN | v |
| KATA PENGANTAR | vi |
| DAFTAR ISI..... | viii |
| DAFTAR GAMBAR | xi |
| DAFTAR TABEL..... | xii |
| DAFTAR LAMPIRAN..... | xiii |
| INTISARI..... | xiv |
| ABSTRACT..... | xv |
| | |
| BAB I PENDAHULUAN | 1 |
| 1.1. Latar Belakang Masalah | 1 |
| 1.2. Rumusan Masalah..... | 3 |
| 1.3. Tujuan Penelitian..... | 3 |
| 1.4. Manfaat Penelitian..... | 3 |
| | |
| BAB II STUDI PUSTAKA | 4 |
| 2.1. Tinjauan Pustaka..... | 4 |
| 2.1.1. Tanaman Buah Salak..... | 4 |
| 2.1.2. Ekstraksi dan Metode Ekstraksi..... | 5 |
| 2.1.3. Kromatografi Lapis Tipis..... | 6 |
| 2.1.4. Fraksinasi | 7 |
| 2.1.6. Radikal Bebas, Antioksidan, dan Uji Antioksidan..... | 8 |
| 2.1.6.1. Radikal Bebas | 8 |
| 2.1.6.2. Antioksidan..... | 8 |

| | | |
|---|--|-----------|
| 2.1.6.3. | Uji Antioksidan..... | 10 |
| 2.2. | Landasan Teori | 11 |
| 2.3. | Hipotesis | 12 |
| BAB III METODE PENELITIAN | | 13 |
| 3.1. | Bahan dan Alat | 13 |
| 3.1.1. | Bahan..... | 13 |
| 3.1.2. | Alat..... | 13 |
| 3.2. | Cara Penelitian..... | 13 |
| 3.2.1. | Determinasi Tanaman Salak | 13 |
| 3.2.2. | Pembuatan Simplisia Biji Salak..... | 14 |
| 3.2.3. | Pembuatan Ekstrak Etanol Biji Salak | 14 |
| 3.2.4. | Fraksinasi | 14 |
| 3.2.5. | Identifikasi Kandungan Kimia | 15 |
| 3.2.5.1. | Identifikasi Fenol..... | 15 |
| 3.2.5.2. | Identifikasi Flavonoid..... | 15 |
| 3.2.5.3. | Identifikasi Tanin..... | 16 |
| 3.2.5.4. | Identifikasi Alkaloid..... | 16 |
| 3.2.6. | Uji Aktivitas Antioksidan | 16 |
| 3.2.6.1. | Uji Aktivitas Antioksidan Kualitatif..... | 16 |
| 3.2.6.2. | Uji Aktivitas Antioksidan Kuantitatif..... | 17 |
| 3.2.7. | Uji Total Fenol | 18 |
| 3.2.7.1. | Pembuatan Kurva Baku Pembanding Asam Galat | 18 |
| 3.2.7.2. | Penentuan Kadar Total Fenol | 19 |
| 3.3. | Analisis Hasil..... | 19 |
| BAB IV HASIL DAN PEMBAHASAN..... | | 21 |
| 4.1. | Determinasi Tanaman..... | 21 |
| 4.2. | Pembuatan Simplisia | 21 |
| 4.3. | Pembuatan Ekstrak | 22 |

| | | |
|---|---|-----------|
| 4.4. | Fraksinasi..... | 23 |
| 4.5. | Identifikasi Kandungan Kimia..... | 25 |
| | 4.5.1. Identifikasi Fenol | 26 |
| | 4.5.2. Identifikasi Flavonoid | 27 |
| | 4.5.3. Identifikasi Tanin | 27 |
| | 4.5.4. Identifikasi Alkaloid..... | 28 |
| 4.6. | Uji Aktivitas Antioksidan..... | 30 |
| | 4.6.1. Uji Aktivitas Antioksidan Secara Kualitatif | 30 |
| | 4.6.2. Uji Aktivitas Antioksidan Secara Kuantitatif | 31 |
| 4.7. | Uji Total Fenol..... | 35 |
| BAB V KESIMPULAN DAN SARAN | | 37 |
| 5.1. | Kesimpulan..... | 37 |
| 5.2. | Saran | 37 |
| DAFTAR PUSTAKA | | 38 |
| LAMPIRAN..... | | 41 |

DAFTAR GAMBAR

| | | |
|--------------------|---|----|
| Gambar 2.1 | Pohon Salak | 4 |
| Gambar 2.2 | Reaksi DPPH Dengan Antioksidan | 11 |
| Gambar 2.3 | Skema Penelitian | 20 |
| Gambar 4.1 | Serbuk Biji Salak | 22 |
| Gambar 4.2 | Ekstrak Kental Biji Salak | 23 |
| Gambar 4.3 | Hasil Fraksinasi | 24 |
| Gambar 4.4 | Hasil KLT Fenol | 26 |
| Gambar 4.5 | Hasil KLT Flavonoid | 27 |
| Gambar 4.6 | Hasil KLT Tanin | 28 |
| Gambar 4.7 | Hasil KLT Alkaloid | 29 |
| Gambar 4.8 | Hasil KLT Antioksidan Kualitatif | 30 |
| Gambar 4.9 | Grafik Hubungan Antara Konsentrasi Vitamin C Dengan Persen Aktivitas Antioksidan | 32 |
| Gambar 4.10 | Grafik Hubungan Antara Konsentrasi Ekstrak dan Fraksi Dengan Persen Aktivitas Antioksidannya. | 33 |
| Gambar 4.11 | Grafik Hubungan Kadar Asam Galat Dengan Absorbansi | 36 |

DAFTAR TABEL

| | | |
|------------------|---|----|
| Table 4.1 | Persen rendemen fraksi | 24 |
| Table 4.2 | Hasil Identifikasi Kandungan Kimia Ekstrak Etanol Biji Salak | 29 |
| Tabel 4.3 | Hasil Aktivitas Antioksidan Standar Vitamin C, Ekstrak dan Fraksi Biji Salak Menggunakan Metode DPPH | 33 |

DAFTAR LAMPIRAN

| | | |
|-------------------|--|----|
| Lampiran 1 | Hasil Determinasi..... | 42 |
| Lampiran 2 | Hasil Perhitungan Persen Rendemen Ekstrak dan Fraksi | 43 |
| Lampiran 3 | Hasil Fraksinasi..... | 45 |
| Lampiran 4 | Perhitungan Pembuatan Larutan Stok..... | 46 |
| Lampiran 5 | Panjang Gelombang DPPH..... | 50 |
| Lampiran 6 | Perhitungan Nilai IC ₅₀ | 51 |
| Lampiran 7 | Perhitungan Total Fenol..... | 57 |

Uji Aktivitas Antioksidan Ekstrak dan Fraksi Biji Salak Pondoh (*Salacca zalacca* (Gaertn.) Voss.) Dengan Menggunakan Metode DPPH

**Nur Khasanah
Prodi Farmasi**

INTISARI

Antioksidan merupakan molekul yang mampu memperlambat atau mencegah oksidasi molekul lain dengan mengikat radikal bebas sehingga mencegah berbagai penyakit seperti kanker, aterosklerosis, penyakit jantung, dan *aging*. Antioksidan dapat diperoleh dari bahan makanan terutama dari sayuran dan buah-buahan. Salah satu buah yang memiliki aktivitas antioksidan yaitu buah salak, dimana daging buah dan kulitnya dilaporkan memiliki aktivitas antioksidan sedangkan bagian biji belum diketahui. Penelitian ini bertujuan untuk mengetahui aktivitas antioksidan, mengetahui kandungan fitokimia, serta mengetahui kadar total fenol pada biji salak varietas pondoh. Ekstrak biji salak pondoh diperoleh dengan maserasi menggunakan etanol 70%, dilanjutkan fraksinasi menggunakan metode Kromatografi Cair Vakum (KCV) dengan variasi perbandingan fase gerak n-heksan 100%, n-heksan:etil asetat (3:2), n-heksan:etil asetat (2:3), etil asetat 100%, etil asetat:metanol (3:2), etil asetat:metanol (2:3), dan metanol 100%. Uji aktivitas antioksidan dilakukan menggunakan metode DPPH (*2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl*). Hasil penelitian menunjukkan nilai IC_{50} ekstrak, fraksi etil asetat 100%, etil asetat:metanol (3:2), etil asetat:metanol (2:3), dan metanol 100% berturut-turut 293,8; 173,06; 152,59; 151,99 dan 110,16 $\mu\text{g/ml}$. Identifikasi kandungan fitokimia menggunakan metode Kromatografi Lapis Tipis (KLT) menggambarkan bahwa ekstrak dan fraksi biji salak pondoh mengandung senyawa fenol, flavonoid dan tanin. Kadar fenol total ekstrak yang ditetapkan menggunakan metode Folin-Ciocalteu menunjukkan hasil sebesar 9,36 mg GAE/100 gram.

Kata kunci : Antioksidan, biji salak pondoh, DPPH, fenol total.

Antioxidant Activity Test of Extract and Fraction of Snake Fruit Seeds Varieties Pondoh (*Salacca zalacca* (Gaertn.) Voss.) With The DPPH Method

Nur Khasanah
Department of Pharmacy

ABSTRACT

Antioxidant is molecule that capable to slow down or prevent the oxidation of other molecules by tying free radicals and prevent various diseases such as cancer, atherosclerosis, heart disease, and aging. Antioxidant can be obtained from foods especially from vegetables and fruits. One of the fruits that has antioxidant activity namely snake fruit. The flesh and skin from snake fruit have been reported to have antioxidant activity but the seeds are not yet known. The aims of this research were to determine antioxidant activity, phytochemical content, and the total phenol of the seeds of snake fruit varieties pondoh. Extract of snake fruit seeds was obtained by maceration using ethanol 70%, continued by fractionation using Vacuum Liquid Chromatography (VLC) with variation of the mobile phases n-hexane 100%, n-hexane:ethyl acetate (3:2), n-hexane:ethyl acetate (2:3), ethyl acetate 100%, ethyl acetate:methanol (3:2), ethyl acetate:methanol (2:3), and methanol 100%. The antioxidant activity was evaluated using DPPH (*2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl*) method. The results showed that IC₅₀ values of extract, the fraction of ethyl acetate 100%, ethyl acetate:methanol (3:2), ethyl acetate:methanol (2:3), and the methanol 100% were 293.8; 173.06; 152.59; 151.99 and 110.16 µg/ml, respectively. Identification of phytochemical content using Thin Layer Chromatography (TLC) showed that extract and fractions of snake fruit seeds varieties pondoh contains phenolic compounds, flavonoids and tannins. Based on Folin-Ciocalteu method, total phenolic content of the extract was 9.36 mg GAE/100 gram.

Keywords : Antioxidant, seeds of snake fruits varieties pondoh, DPPH, total phenolic.

BAB I

PENDAHULUAN

1.1. Latar Belakang Masalah

Metabolisme O_2 dan proses oksidasinya pada sel-sel hidup dapat membentuk senyawa turunan O_2 yang bersifat tidak stabil dan disebut sebagai Senyawa Oksigen Reaktif (SOR) atau *Reactive Oxygen Species* (ROS)⁽¹⁾. Radikal bebas merupakan salah satu bentuk dari SOR. Radikal bebas dan SOR ini menyerang lipid, protein / enzim, karbohidrat, dan DNA dalam sel dan jaringan yang dapat menyebabkan berbagai penyakit⁽²⁾. Radikal bebas yang bereaksi dengan komponen biologis di dalam tubuh menghasilkan senyawa teroksidasi, ketika molekul DNA teroksidasi akan menyebabkan *aging* dan kanker, jika molekul protein yang teroksidasi akan terjadi reaksi inflamasi, serta oksidasi asam lemak dan kolesterol akan menyebabkan aterosklerosis, penyakit jantung, dan lesi reperfusi. Oleh karena itu, tubuh kita memerlukan suatu substansi penting yakni antioksidan⁽³⁾.

Antioksidan merupakan molekul yang mampu memperlambat atau mencegah oksidasi molekul lain dengan mengikat radikal bebas dan molekul yang sangat reaktif⁽³⁾. Sistem tubuh manusia sendiri diperkaya dengan antioksidan alami yang dapat mencegah timbulnya penyakit akibat radikal bebas atau biasanya disebut sebagai antioksidan enzimatis⁽⁴⁾. Disamping antioksidan yang enzimatis ada juga antioksidan non-enzimatis yang dapat diperoleh dari asupan bahan makanan yang banyak ditemukan dalam sayuran maupun buha-buahan, biji-bijian, serta kacang-kacangan seperti tanin, fenol-pirogalol, asam galat, flavonoid-kuersetin, rutin, kaempferol, karotenoid- α karoten, β -karoten, cryptoxanthin, likopen, lutein, zeaxanthin, vitamin A, vitamin C, dan vitamin E⁽⁵⁾. Antioksidan alami terdapat pada semua bagian tanaman seperti kayu, kulit kayu, batang, polong, daun, buah, akar, bunga, serbuk sari dan biji⁽⁶⁾.

Buah salak diketahui memiliki aktivitas antioksidan⁽⁷⁾. Buah salak memiliki bagian yang dapat dimakan sekitar 50% sedangkan sisanya limbah

berupa kulit dan biji salak. Biji salak mempunyai porsi mencapai 30% dari bobot total buah salak⁽⁸⁾. Penelitian aktivitas antioksidan terhadap daging buah dan kulit dari buah salak telah banyak dilaporkan bahkan terhadap berbagai varietas tanaman salak^(7,9), namun uji aktivitas antioksidan dari biji salak belum dilaporkan. Buah salak pondoh memiliki kandungan senyawa polifenol, flavonoid, tanin, alkaloid^(7,9), sedangkan kulitnya juga memiliki senyawa alkaloid, polifenol, flavonoid, tanin, kuinon, monoterpen dan seskuiterpen⁽¹⁰⁾. Hasil penelitian menunjukkan bahwa pada daging dan kulit salak varietas salak pondoh Yogyakarta memiliki lebih banyak senyawa polifenol seperti flavonoid dan tanin dibandingkan varietas lain⁽⁹⁾.

Hasil penelitian terhadap penapisan fitokimia simplisia dan ekstrak etanol biji salak (*Salacca zalacca* (Gaert.) Voss.) yang diambil dari perkebunan di Desa Cijambu Kabupaten Sumedang menunjukkan adanya senyawa alkaloid, tanin, kuinon, monoterpen/seskuiterpen, dan polifenol⁽¹¹⁾. Senyawa polifenol diantaranya flavonoid dan tanin diketahui memiliki aktivitas antioksidan⁽⁴⁾. Senyawa polifenol secara luas tersebar dalam makanan nabati, salah satunya pada buah-buahan seperti yang terkandung dalam semua bagian dari buah salak. Senyawa polifenol memiliki struktur dasar cincin aromatik dengan satu atau lebih gugus hidroksil, dimana gugus hidroksil inilah yang berperan dalam menetralkan radikal bebas sebagai elektron donor⁽¹²⁾. Hal ini mengarahkan pada pemikiran bahwa biji salak mampu bersifat sebagai antioksidan.

Penelitian ini dilakukan untuk mengkaji aktivitas antioksidan pada biji buah salak pondoh (*Salacca zalacca* (Gaertn.) Voss.). Salah satu metode yang dapat digunakan untuk mengukur aktivitas antioksidan yaitu metode DPPH (2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl). Uji DPPH digunakan karena secara teknis sederhana dan valid untuk mengukur sampel dengan antioksidan hidrofilik atau lipofilik⁽¹³⁾.

1.2. Rumusan Masalah

1. Bagaimana aktivitas antioksidan ekstrak dan fraksi biji salak pondoh dengan menggunakan metode DPPH ?
2. Bagaimana profil golongan senyawa yang terkandung dalam ekstrak dan fraksi biji salak pondoh ?
3. Bagaimana kadar total fenol dalam ekstrak biji salak pondoh?

1.3. Tujuan Penelitian

1. Mengetahui aktivitas antioksidan ekstrak dan fraksi biji salak pondoh dengan menggunakan metode DPPH.
2. Mengetahui profil golongan senyawa yang terkandung dalam ekstrak dan fraksi biji salak pondoh.
3. Mengetahui kadar total fenol dalam ekstrak biji salak pondoh.

1.4. Manfaat Penelitian

1. Mendapatkan informasi mengenai aktivitas antioksidan dari biji salak pondoh sehingga bisa lebih dimanfaatkan oleh masyarakat sebagai olahan minuman yang bermanfaat untuk kesehatan.
2. Menambah pengetahuan mengenai sumber antioksidan yang baru dari suatu bagian tanaman.

BAB II

STUDI PUSTAKA

2.1. Tinjauan Pustaka

2.1.1. Tanaman Buah Salak

Kedudukan tanaman salak dalam sistematika (taksonomi) tumbuhan adalah sebagai berikut⁽¹⁴⁾:

- Kingdom : Plantae (tumbuh-tumbuhan)
- Divisi : Spermatophyta (tumbuhan berbiji)
- Subdivisi : Angiospermae (berbiji tertutup)
- Kelas : Palmae (palmales)
- Famili : Arecaceaea (Palmae)
- Genus : Salacca
- Spesies : *Sallaca zalaca* (Gaertn.) Voss. Syn., *Salacca edulis* Reinw.



Gambar 2. 1 Pohon Salak⁽¹⁴⁾.

Salak termasuk tanaman monokotil (berkeping biji tunggal). Tanaman salak disebut pula *snake fruit* dan bersifat merumpun. Pada batang di bawah tanah tumbuh tunas anakan. Salak tumbuh baik di dataran rendah hingga ketinggian 500m dpl dengan tipe iklim basah. Pada kondisi lingkungan yang sesuai, tanaman mulai berbuah pada umur tiga tahun. Tanaman salak muda lebih senang hidup di tempat teduh atau di bawah naungan⁽¹⁵⁾.

Kandungan gizi dari setiap 100 gram buah salak yaitu kalori (77 kal), protein (0,40 g), karbohidrat (20,9 g), kalsium (28 g), fosfor (18 mg), besi (4,2 g), Vitamin B1 (0,04 g), Vitamin C (2 mg), dan air (98 g). Pada penelitian yang dilakukan terhadap daging buah jenis salak Bali dan salak Nglumut memiliki kadar komponen bioaktif senyawa fenolik⁽¹⁶⁾. Kulit buah salak mengandung metabolit sekunder alkaloid, polifenolat, flavonoid, tanin, kuinon, monoterpen dan seskuiterpen⁽¹⁰⁾. Biji buah salak mengandung metabolit sekunder alkaloid, tanin, kuinon, monoterpen/seskuiterpen, dan polifenolat⁽¹¹⁾.

Beberapa penelitian mengenai aktivitas antioksidan salak telah banyak dilakukan dari daging buah maupun kulit salak serta dari varietas buah salak yang berbeda. Penelitian yang dilakukan oleh Puryono *et al* menunjukkan aktivitas antioksidan yang berbeda antara varietas salak pondoh super, manggala, dan gula pasir⁽⁷⁾. Penelitian lain menunjukkan buah salak kultivar Nglumut dan Bali memiliki kadar fenolik total, kadar vitamin C dan aktivitas penangkapan radikal DPPH yang tidak berbeda nyata namun secara signifikan lebih tinggi dibanding kultivar pondoh, selain itu ekstrak etanol salak memiliki kadar fenolik total, vitamin C dan kapasitas antioksidan yang secara signifikan lebih tinggi daripada ekstrak air⁽¹⁶⁾.

Selain daging buah salak, kulit dari buah salak juga telah ditentukan aktivitas antioksidannya yaitu dari *Salacca zalacca* (Gaertner) Voss. dengan menggunakan metode peredaman radikal bebas DPPH dan vitamin C sebagai pembanding menunjukkan ekstrak etanol kulit buah salak memiliki aktivitas antioksidan dengan nilai IC₅₀ sebesar 229,27 µg/ml⁽¹⁰⁾. Bagian lain dari buah salak yang belum dilakukan diketahui aktivitas antioksidannya adalah biji, meskipun demikian penelitian terhadap biji salak telah dilakukan untuk melihat aktivitas sitotoksik, antihiperurisemia, dan aktivitas diuretik^(11,17,18).

2.1.2. Ekstraksi dan Metode Ekstraksi

Ekstraksi adalah penarikan bahan aktif dari jaringan tumbuhan dengan menggunakan pelarut yang sesuai⁽¹⁹⁾. Salah satu jenis metode ekstraksi yaitu

maserasi. Metode ekstraksi maserasi adalah proses pengekstrakan simplisia dengan menggunakan pelarut dengan beberapa kali pengocokan atau pengadukan pada temperatur ruangan (kamar). Secara teknologi termasuk ekstraksi dengan prinsip metode pencapaian konsentrasi pada keseimbangan. Maserasi kinetik berarti dilakukan pengadukan secara terus menerus. Remaserasi berarti dilakukan pengulangan penambahan pelarut setelah dilakukan penyaringan maserat pertama, dan seterusnya⁽²⁰⁾. Metode maserasi merupakan prosedur ekstraksi yang sederhana dengan merendam simplisia dalam pelarut yang sesuai (rasio simplisia pelarut 1:5 atau 1:10) dalam wadah tertutup. Metode ini cocok untuk ekstraksi awal dan dalam jumlah yang besar, tetapi prosesnya bisa sangat memakan waktu dari beberapa jam sampai beberapa minggu⁽²¹⁾.

Hasil dari proses ekstraksi disebut dengan ekstrak. Ekstrak adalah sediaan pekat yang diperoleh dengan mengekstraksi zat aktif dari simplisia nabati atau simplisia hewani menggunakan pelarut yang sesuai, kemudian semua atau hampir semua pelarut diuapkan dan massa atau serbuk yang tersisa diperlakukan sedemikian hingga memenuhi baku yang telah ditetapkan⁽¹⁹⁾. Cairan pelarut dalam proses pembuatan ekstrak adalah pelarut yang baik (optimal) untuk senyawa kandungan yang berkhasiat atau yang aktif. Faktor pertimbangan dalam pemilihan cairan penyari adalah selektivitas, kemudahan bekerja dan proses dengan cairan tersebut, ekonomis, ramah lingkungan, dan aman. Kebijakan peraturan pemerintah juga membatasi, sampai saat ini berlaku aturan bahwa pelarut yang diperbolehkan adalah air dan alkohol (etanol) serta campurannya⁽²⁰⁾. Untuk ekstraksi dari kulit, akar, bagian kayu dan biji rasio alkohol / air yang ideal adalah sekitar 7:3 atau 8:2⁽²¹⁾.

2.1.3. Kromatografi Lapis Tipis

Kromatografi Lapis Tipis (KLT) ialah metode pemisahan fisikokimia. Lapisan yang memisahkan, yang terdiri atas bahan berbutir-butir (fase diam) ditempatkan pada penyangga berupa pelat gelas, logam, atau lapisan yang cocok. Campuran yang akan dipisah berupa larutan ditotolkan berupa bercak atau pita. Setelah plat atau lapisan ditaruh di dalam bejana tertutup rapat yang berisi larutan

pengembang yang cocok (fase gerak), pemisahan terjadi selama perambatan kapiler (pengembangan). Penjerap yang paling umum dan banyak digunakan adalah silika gel. Fase gerak adalah medium angkut dan terdiri atas satu atau beberapa pelarut, yang bergerak di dalam fase diam, yaitu suatu lapisan berpori karena ada gaya kapiler. Pelarut yang digunakan hanyalah pelarut bertingkat dan bila diperlukan sistem pelarut multikomponen harus berupa campuran sesederhana mungkin maksimum tiga komponen, angka banding campuran dinyatakan dalam bagian volume sedemikian rupa sehingga volume total 100⁽²²⁾.

Bercak pemisahan pada KLT umumnya merupakan bercak yang tidak berwarna, untuk penentuan kualitatif dapat dilakukan secara kimia, fisika, maupun biologi. Secara kimia yang biasa digunakan adalah dengan mereaksikan bercak dengan suatu pereaksi melalui cara penyemprotan sehingga bercak menjadi jelas. Cara fisika yang dapat digunakan adalah pencacahan radioaktif dan fluoresensi sinar ultraviolet, mengamati lempeng di bawah lampu ultra violet yang dipasang panjang gelombang emisi 254 atau 366⁽²³⁾.

2.1.4. Fraksinasi

Fraksinasi adalah prosedur pemisahan senyawa untuk memisahkan golongan utama dari kandungan satu dengan yang lainnya. Senyawa yang bersifat polar akan masuk ke pelarut polar dan senyawa non polar akan masuk ke pelarut non polar. Metode fraksinasi yang digunakan adalah kromatografi Kolom Vakum Cair (KVC). KVC merupakan metode pemisahan yang menggunakan vakum untuk mempercepat laju aliran eluen. Metode ini sederhana, waktu pemisahan yang lebih pendek, resolusi lebih baik, kapasitas pemisahan besar. Sampel berada dalam pelarut yang sesuai kemudian diterapkan ke bagian atas kolom dan ditarik ke dalam adsorben dengan adanya vakum. Kolom dikembangkan dengan campuran pelarut yang sesuai dimulai dengan pelarut polaritas rendah kemudian secara bertahap meningkat polaritasnya⁽²⁴⁾.

2.1.6. Radikal Bebas, Antioksidan, dan Uji Antioksidan

2.1.6.1. Radikal Bebas

Radikal bebas didefinisikan sebagai spesies yang secara independen mengandung lebih dari satu elektron tidak berpasangan. Elektron tidak berpasangan membuat molekul tidak stabil dan sangat reaktif. Tidak semua senyawa oksigen reaktif merupakan radikal bebas, senyawa oksigen reaktif (SOR) yang merupakan radikal bebas yaitu radikal hidroksil ($\bullet\text{OH}$), radikal peroksil ($\text{ROO}\bullet$), alkoksil ($\text{RO}\bullet$), radikal superoksida ($\bullet\text{O}_2$). Sedangkan SOR yang bukan radikal bebas diantaranya oksigen singlet ($^1\text{O}_2$), hidrogen peroksida (H_2O_2), dan ion hipoklorit (HOCl). SOR yang berbentuk bukan radikal mempunyai reaktivitas yang lebih rendah daripada yang berbentuk radikal, namun bukan berarti SOR yang bukan radikal tidak berbahaya justru dapat memicu radikal bebas yang baru⁽¹⁾.

Sumber radikal bebas bersifat endogen maupun eksogen. Radikal bebas endogen dihasilkan dari aktivasi sel imun, inflamasi, iskemia, infeksi, kanker, penuaan sedangkan radikal bebas eksogen dihasilkan dari polusi udara dan air, asap rokok, alkohol, logam berat atau transisi (Cd, Hg, Pb, Fe, As), obat-obatan tertentu (siklosporin, takrolimus, gentamisin, bleomisin), pelarut industri, memasak (minyak yang digunakan), radiasi⁽²⁵⁾. SOR secara kimiawi merupakan molekul reaktif yang diproduksi oleh organisme hidup sebagai hasil dari metabolisme sel normal. Pada konsentrasi rendah sampai sedang berfungsi dalam proses fisiologi, namun dalam konsentrasi tinggi dapat merugikan komponen sel seperti lipid, protein, dan DNA⁽²⁶⁾.

2.1.6.2. Antioksidan

Dalam pengertian kimia, senyawa antioksidan adalah senyawa pemberi elektron (*electron donors*). Secara biologis, antioksidan merupakan suatu senyawa yang dapat menetralkan radikal bebas, sehingga resiko stres oksidatif dan kelainan degeneratif semakin berkurang⁽³⁾. Secara umum, antioksidan dikelompokkan menjadi 2 yaitu antioksidan enzimatis dan non-enzimatis. Antioksidan enzimatis

misalnya enzim superoksida dismutase (SOD), katalase, dan glutathion peroksidase. Antioksidan non-enzimatis masih dibagi dalam 2 kelompok yaitu antioksidan larut lemak dan antioksidan larut air. Antioksidan larut lemak seperti tokoferol, karotenoid, flavonoid, quinon, dan bilirubin. Sedangkan antioksidan larut air seperti asam askorbat, asam urat, protein pengikat logam, dan protein pengikat heme. Antioksidan enzimatis dan non-enzimatis tersebut bekerja sama memerangi aktivitas senyawa oksidan dalam tubuh. Terjadinya stress oksidatif dapat dihambat oleh kerja enzim-enzim antioksidan dalam tubuh dan antioksidan non-enzimatik⁽³⁾.

Senyawa-senyawa dalam tanaman yang dapat digunakan sebagai terapi antioksidan antara lain:

a. Flavonoid

Flavonoid dapat mereduksi radikal bebas, anatara lain radikal superoksida, alkoksil, peroksil, dan hidroksil. Mekanisme reaksi senyawa antioksidan ini dengan cara menekan pembentukan radikal bebas dengan cara penghambatan enzim atau dengan pengelatan ion logam yang terlibat dalam produksi radikal bebas, serta peredaman radikal bebas. Hasil penelitian menyimpulkan bahwa perbedaan struktur flavonoid mempengaruhi aktivitas antioksidannya⁽¹⁾.

b. Vitamin E

Vitamin E mampu menghambat peroksida lipid karena kemampuannya sebagai *scavenger* radikal peroksil lipid (LOO•). Disamping itu, tokoferol dapat berinteraksi dengan ubiquinol dalam melindungi lipoprotein membran sel terhadap oksidasi. Tokoferol juga dapat bereaksi terhadap molekul O₂ singlet⁽¹⁾.

c. Vitamin C

Asam askorbat merupakan antioksidan potensial terhadap radikal superoksida ($\bullet\text{O}_2$), hidrogen peroksida (H₂O₂) radikal hidroksil ($\bullet\text{OH}$), radikal peroksil (ROO•), dan oksigen singlet ($^1\text{O}_2$)⁽²⁷⁾. Mekanisme asam askorbat sebagai antioksidan didasarkan pada donor atom hidrogen pada radikal lipid, dan pelepasan molekul oksigen. Asam askorbat merupakan suatu penyumbang elektron yang sangat baik karena potensinya menurunkan satu elektron standar rendah, sehingga memungkinkan untuk menghasilkan asam askorbat semi-dehidro

yang relatif stabil. Asam dehidro-askorbat juga mudah dikonversi menjadi asam askorbat⁽²⁸⁾.

d. Asam lipoat

Bentuk teroksidasi (*3-hydroxylipoic acid*, *3-ketolipoic acid* dan *bisnorlipoic acid*) dan bentuk yang tereduksi (*dihydrolipoic acid*) dari asam lipoat bertindak sebagai antioksidan dan memiliki kemampuan untuk menangkap radikal bebas seperti radikal superoksida, radikal hidroksil, HOCL, radikal peroksil, dan oksigen singlet⁽²⁸⁾. Asam lipoat merupakan satu-satunya antioksidan yang dapat menekan aktivitas radikal bebas baik yang bersifat larut lemak maupun larut air⁽³⁾.

e. Polifenol

Polifenol merupakan antioksidan yang paling banyak di dalam makanan. Total asupannya di dalam makanan dapat mencapai 1 g/hari, angka ini jauh lebih tinggi daripada senyawa yang berasal dari bahan alam lainnya, dan merupakan antioksidan makanan. Secara perspektif, angka ini ~10 kali lebih tinggi daripada asupan vitamin C dan 100 kali lebih tinggi daripada asupan vitamin E dan karotenoid. Sumber utamanya adalah buah-buahan dan minuman dari tanaman, seperti sari buah, teh, kopi, dan anggur merah. Sayuran, sereal, coklat, dan tanaman polong kering juga berpengaruh terhadap total asupan polifenol⁽²⁸⁾.

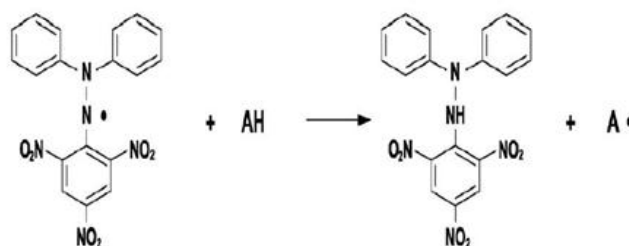
f. Karotenoid

Karotenoid tersusun atas β -karoten, likopen, lutein, zeaxanthin, dan cryptoxanthin⁽³⁾. Dalam tubuh β -karoten mempunyai dua fungsi yaitu sebagai antioksidan dan prekursor vitamin A. Sebagai antioksidan, β -karoten berperan utama dalam menghambat pembentukan radikal bebas yang diinduksi oleh radiasi dan fotosensitisasi⁽¹⁾.

2.1.6.3. Uji Antioksidan

Metode DPPH (*2,2-Diphenyl-1-picrylhydrazyl*) merupakan metode paling sederhana dan paling banyak dilaporkan untuk aktivitas antioksidan dalam makanan dan banyak tanaman obat. Prosedur ini didasarkan pada pengukuran kemampuan mengurangi antioksidan terhadap DPPH•. Ketika larutan DPPH

dicampur dengan zat yang dapat menyumbangkan atom hidrogen maka akan menimbulkan bentuk tereduksi dengan hilangnya warna ungu⁽²⁹⁾. Dalam pengujian ini kromogen ungu radikal DPPH• dikurangi dengan senyawa antioksidan menjadi hidrazin kuning pucat. Prosedur ini melibatkan pengukuran penurunan absorbansi DPPH pada panjang gelombang maksimum 518 nm yang sebanding dengan konsentrasi *scavenger* radikal bebas yang ditambahkan kedalam larutan reagen DPPH dan reaksi dapat ditunjukkan dengan hasil spektrofotometer UV-vis. Kegiatan ini dinyatakan sebagai IC₅₀ yaitu jumlah antioksidan yang diperlukan untuk mengurangi sebesar 50% konsentrasi awal DPPH•⁽³⁰⁾.



Gambar 2. 2 Reaksi DPPH dengan Antioksidan⁽³¹⁾

DPPH secara luas digunakan untuk menguji kemampuan senyawa untuk bertindak sebagai donor hidrogen. Metode DPPH digunakan secara luas dan merupakan metode yang sederhana, disamping itu reaktif radikal DPPH bereaksi lambat. Masalah dalam pengujian ini adalah kinetika reaksi antara DPPH dan antioksidan tidak linear sebagai hasil pengukuran IC₅₀.⁽³²⁾

2.2. Landasan Teori

Antioksidan non-enzimatis dapat diperoleh dalam makanan yang kita konsumsi sehari-hari seperti dalam sayuran dan buah-buahan. Antioksidan tersebut antara lain polifenol, flavonoid, vitamin C, Vitamin E, asam lemak, karotenoid, glutathione. Senyawa tersebut berfungsi menangkap senyawa oksidan serta mencegah terjadinya reaksi berantai⁽³⁾. Polifenol merupakan senyawa yang memiliki satu atau lebih cincin aromatik dengan satu atau lebih gugus hidroksil.

Senyawa polifenol diantaranya flavonoid, tanin, lignin, asam fenolat. Senyawa polifenol mempunyai struktur kimia yang ideal untuk mengikat radikal bebas karena mempunyai gugus hidroksil yang rentan untuk menyumbangkan atom hidrogen atau elektron ke radikal bebas serta diperpanjang dengan sistem aromatik terkonjugasi untuk delokalisasi elektron tidak berpasangan⁽¹²⁾.

Buah salak pada bagian daging buah dan kulit memiliki aktivitas antioksidan. Daging buah salak memiliki komponen bioaktif senyawa fenolik dan kulitnya mengandung alkaloid, polifenol, flavonoid, tanin, kuinon, monoterpen dan seskuiterpen. Bagian lain yang dapat berpotensi sebagai antioksidan adalah biji salak. Biji salak ini diketahui memiliki senyawa alkaloid, tanin, kuinon, monoterpen/seskuiterpen, dan polifenol⁽¹¹⁾. Senyawa polifenol memiliki struktur dasar cincin aromatik dengan satu atau lebih gugus hidroksil, dimana gugus hidroksil inilah yang berperan dalam menetralkan radikal bebas sebagai *electron donor*⁽¹²⁾. Senyawa fenol bersifat polar, senyawa fenol yang bersifat polar tersebut akan lebih banyak tertarik ke dalam pelarut yang bersifat polar seperti etanol dan metanol. Etanol merupakan pelarut universal yang mampu menyari senyawa non polar, semi polar dan polar sehingga ekstrak yang didapatkan merupakan campuran banyak senyawa, yang selanjutnya dapat dilakukan fraksinasi untuk memisahkan senyawa berdasarkan kepolarannya. Berdasarkan hal tersebut perlu dilakukan uji aktivitas antioksidan terhadap ekstrak dan fraksi biji salak pondoh.

2.3. Hipotesis

1. Fraksi metanol biji salak pondoh (*Sallaca zalaca* (Gaertn.) Voss) memiliki aktivitas antioksidan yang lebih tinggi daripada antioksidan ekstrak dan fraksi lainnya dengan menggunakan metode DPPH (*2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl*).
2. Ekstrak dan fraksi biji salak pondoh mengandung senyawa alkaloid, fenol, flavonoid, dan tanin.

BAB III

METODE PENELITIAN

3.1. Bahan dan Alat

3.1.1. Bahan

Bahan uji yang digunakan dalam penelitian ini yaitu biji dari buah salak (*Salacca zalacca* (Gaertn.) Voss.). Bahan kimia yang digunakan yaitu $AlCl_3$, aquades, asam galat, DPPH (*2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl*), etanol 70%, etil asetat p.a (merck), $FeCl_3$, metanol p.a (merck), n-heksan p.a (merck), natrium karbonat, plat KLT (merck), reagen Folin-Ciocalteu, reagen *Dragendorff*, silika gel 60 F₂₅₄ (merck), standar vitamin C.

3.1.2. Alat

Alat – alat gelas (pyrex), cawan porselen, chamber (camag), grinder, kertas saring, pipet tetes, pipet volum (pyrex), pisau bendo, rotary evaporator (heidolph), seperangkat alat KCV, spektrofotometer UV-Vis (shimadzu), timbangan analitik, ultrasonikator (branson), *UV portable*, *waterbath* (memmert).

3.2. Cara Penelitian

3.2.1. Determinasi Tanaman Salak

Tanaman yang digunakan pada penelitian ini adalah biji dari buah salak pondoh (*Salacca zalacca* (Gaertn.) Voss.) yang diperoleh dari salah satu perkebunan salak di daerah Turi, Sleman, Yogyakarta. Determinasi tanaman salak dilakukan di Laboratorium Sistematika Tumbuhan Fakultas Biologi Universitas Gadjah Mada.

3.2.2. Pembuatan Simplisia Biji Salak

Pembuatan simplisia dilakukan biji salak sebanyak 1 kg diperoleh dengan cara mencuci bersih biji kemudian dipotong menjadi 8 bagian dengan menggunakan pisau bendo, selanjutnya dilakukan pengeringan. Pengeringan dilakukan dalam lemari pengering selama 8 jam pada suhu 60°C, selanjutnya dihaluskan menjadi serbuk. Pembuatan serbuk biji salak dilakukan menggunakan alat *miller* dan kemudian diayak sehingga menghasilkan serbuk biji salak dengan ukuran yang homogen⁽³³⁾.

3.2.3. Pembuatan Ekstrak Etanol Biji Salak

Serbuk biji salak sebanyak 300 gram diekstraksi dengan menggunakan metode maserasi. Serbuk biji salak direndam dalam toples menggunakan pelarut etanol 70%. Perbandingan antara serbuk simplisia dengan pelarut adalah 1:10. Maserasi dilakukan pada suhu kamar selama dua hari dengan remaserasi setiap 24 jam serta dilakukan pengadukan secara berkala. Hasil ekstraksi maserasi berupa maserat, disaring dengan menggunakan kertas saring untuk memisahkan maserat dengan ampasnya. Proses penyaringan dilakukan dengan bantuan vakum untuk mempercepat penyaringan. Maserat yang telah disaring selanjutnya dipekatkan dengan menggunakan *rotary evaporator*, untuk memisahkan ekstrak cair dengan pelarutnya pada suhu 60°C, kecepatan 60 rpm, dan tekanan 175 mbar. Ekstrak yang didapat dari hasil pemekatan *rotary evaporator* diuapkan diatas *waterbath* suhu 40°C selama 3 hari untuk menghilangkan sisa-sisa pelarut yang mungkin masih ada hingga diperoleh ekstrak kental biji salak. Setelah itu dilakukan perhitungan persen rendemen dengan membandingkan jumlah simplisia dan jumlah ekstrak yang dihasilkan.

3.2.4. Fraksinasi

Sebanyak 5 gram sampel difraksinasi dengan kromatografi kolom cair vakum dengan cara ditambahkan 5 gram silika gel 60 F₂₅₄ pada sampel tersebut, kemudian dicampurkan hingga kering. Campuran tersebut dimasukan ke dalam

kolom yang telah berisi silika gel 60 F₂₅₄ sejumlah 15 gram sebagai fase diam dan dipadatkan kemudian ditutup dengan kertas saring. Selanjutnya dielusi menggunakan gradien kepolaran bertingkat yaitu n-heksan 100%, n-heksan-etil asetat (3;2), n-heksan:etil asetat (2:3), etil asetat 100%, etil asetat:metanol (3:2), etil asetat:metanol (2:3) dan metanol 100% dalam volume total masing-masing 50 ml, sehingga akan dihasilkan sebanyak 7 fraksi. Masing-masing fraksi yang diperoleh kemudian diletakan dalam lemari asam hingga pelarut menguap dan diperoleh fraksi kental.

3.2.5. Identifikasi Kandungan Kimia

3.2.5.1. Identifikasi Fenol

Sampel (ekstrak dan fraksi) ditotolkan pada fase diam silika gel 60 F₂₅₄ ukuran 6x10 cm dengan menggunakan pipa kapiler, dielusi menggunakan fase gerak kombinasi kloroform, etil asetat, dan asam asetat glasial dengan perbandingan masing-masing 5:4:1 dalam volume 10 ml. Hasil pengamatan bercak pada plat KLT positif terdapat senyawa fenol, apabila setelah disemprot dengan reagen Folin-Ciocalteu akan memberikan warna biru berlatar belakang putih dilihat menggunakan sinar tampak⁽³⁴⁾.

3.2.5.2. Identifikasi Flavonoid

Sampel (ekstrak dan fraksi) ditotolkan pada fase diam silika gel 60 F₂₅₄ ukuran 6x10 cm dengan menggunakan pipa kapiler, dielusi menggunakan fase gerak kombinasi kloroform, etil asetat, dan asam asetat glasial dengan perbandingan masing-masing 5:4:1 dalam volume 10 ml. Hasil pengamatan bercak pada plat KLT positif terdapat senyawa flavonoid, apabila setelah disemprot dengan reagen semprot AlCl₃ akan berfluorosensi hijau dibawah sinar UV₃₆₆⁽³⁴⁾.

3.2.5.3. Identifikasi Tanin

Sampel (ekstrak dan fraksi) ditotolkan pada fase diam silika gel 60 F₂₅₄ ukuran 6x10 cm dengan menggunakan pipa kapiler, dielusi dengan menggunakan fase gerak kombinasi kloroform, etil asetat, dan asam asetat glasial dengan perbandingan masing-masing 5:4:1 dalam volume 10 ml. Hasil pengamatan bercak pada plat KLT positif terdapat senyawa tanin, apabila setelah disemprot dengan reagen semprot FeCl₃ akan memberikan warna biru berlatar belakang kuning dilihat dengan sinar tampak⁽³⁴⁾.

3.2.5.4. Identifikasi Alkaloid

Sampel (ekstrak dan fraksi) ditotolkan pada fase diam silika gel 60 F₂₅₄ ukuran 6x10 cm dengan menggunakan pipa kapiler, dielusi dengan menggunakan fase gerak kombinasi kloroform, etil asetat, dan asam asetat glasial dengan perbandingan masing-masing 5:4:1 dalam volume 10 ml. Hasil pengamatan bercak pada plat KLT positif terdapat senyawa alkaloid, apabila setelah disemprot dengan reagen *Dragendorff* akan memberikan warna kuning-coklat dilihat dengan sinar tampak⁽³⁵⁾.

3.2.6. Uji Aktivitas Antioksidan

3.2.6.1. Uji Aktivitas Antioksidan Kualitatif

Sampel (ekstrak dan fraksi) ditotolkan pada plat KLT silika gel F₂₅₄, dielusi dengan menggunakan fase gerak kombinasi kloroform, etil asetat, dan asam asetat glasial dengan perbandingan masing-masing 5:4:1 dalam volume 10 ml. Hasil pengamatan bercak pada plat KLT positif terdapat senyawa yang dapat bertindak sebagai antioksidan, apabila setelah disemprot dengan DPPH akan memberikan warna kuning dilihat dengan sinar tampak.

3.2.6.2. Uji Aktivitas Antioksidan Kuantitatif

3.2.6.2.1. Pembuatan Larutan DPPH

Larutan stok DPPH 50 $\mu\text{g/ml}$ dibuat dengan cara melarutkan sebanyak 10 mg DPPH dalam labu ukur volume 200 ml menggunakan metanol p.a. Pembuatan larutan stok DPPH dilakukan di dalam ruang gelap dan menggunakan labu ukur yang dibungkus dengan aluminium foil agar terhindar dari cahaya.

3.2.6.2.2. Pembuatan Larutan Uji Ekstrak Biji Salak dan Larutan Pembeding

Larutan stok ekstrak etanol biji salak 1000 $\mu\text{g/ml}$ dibuat dengan cara menimbang sebanyak 10 mg ekstrak kental etanol biji salak pondoh dilarutkan dengan metanol p.a dalam labu 10 ml sampai tanda batas. Larutan stok standar vitamin C 1000 $\mu\text{g/ml}$ dibuat dengan cara menimbang sebanyak 10 mg vitamin C dilarutkan dengan aquades dalam labu 10 ml sampai tanda batas.

3.2.6.2.3. Penetapan Panjang Gelombang Maksimum DPPH

Penentuan panjang gelombang maksimum dilakukan dengan mereaksikan larutan kontrol berisi 2 ml larutan DPPH dan 2 ml metanol p.a. Larutan kontrol tersebut dibaca serapannya pada spektrofotometri UV-Vis dan panjang gelombang maksimum DPPH ditentukan dengan *scanning* λ maks pada panjang gelombang 400-800 nm⁽³⁶⁾.

3.2.6.2.4. Penetapan Operating Time

Penetapan *Operating time* dilakukan dengan mereaksikan Larutan DPPH sebanyak 2 ml dengan sampel sebanyak 2 ml. Larutan tersebut kemudian dibaca serapannya pada spektrofotometri UV-Vis dengan mengukur absorbansi pada panjang gelombang maksimum hingga diperoleh absorbansi yang stabil.

3.2.6.2.5. Penentuan Aktivitas Antioksidan Vitamin C

Sebanyak 2 ml standar vitamin C diambil dari masing-masing konsentrasi 0,15625 µg/ml, 0,3125 µg/ml, 0,625 µg/ml, 1,25 µg/ml, 2,5 µg/ml dicampur dengan larutan stok DPPH sebanyak 2 ml. Campuran diinkubasi selama 30 menit dalam ruang gelap dan diukur absorbansinya pada panjang gelombang maksimum dengan spektrofotometer UV-Vis.

3.2.6.2.6. Penentuan Aktivitas Antioksidan Sampel

Sebanyak 2 ml larutan sampel (ekstrak dan fraksi) diambil dari masing-masing konsentrasi 9,375 µg/ml, 18,75 µg/ml, 37,5 µg/ml, 75 µg/ml, 150 µg/ml dan dicampur dengan larutan stok DPPH sebanyak 2 ml. Campuran diinkubasi selama 30 menit dalam ruang gelap dan diukur absorbansinya pada panjang gelombang maksimum dengan spektrofotometer UV-Vis.

3.2.7. Uji Total Fenol

3.2.7.1. Pembuatan Kurva Baku Pembanding Asam Galat

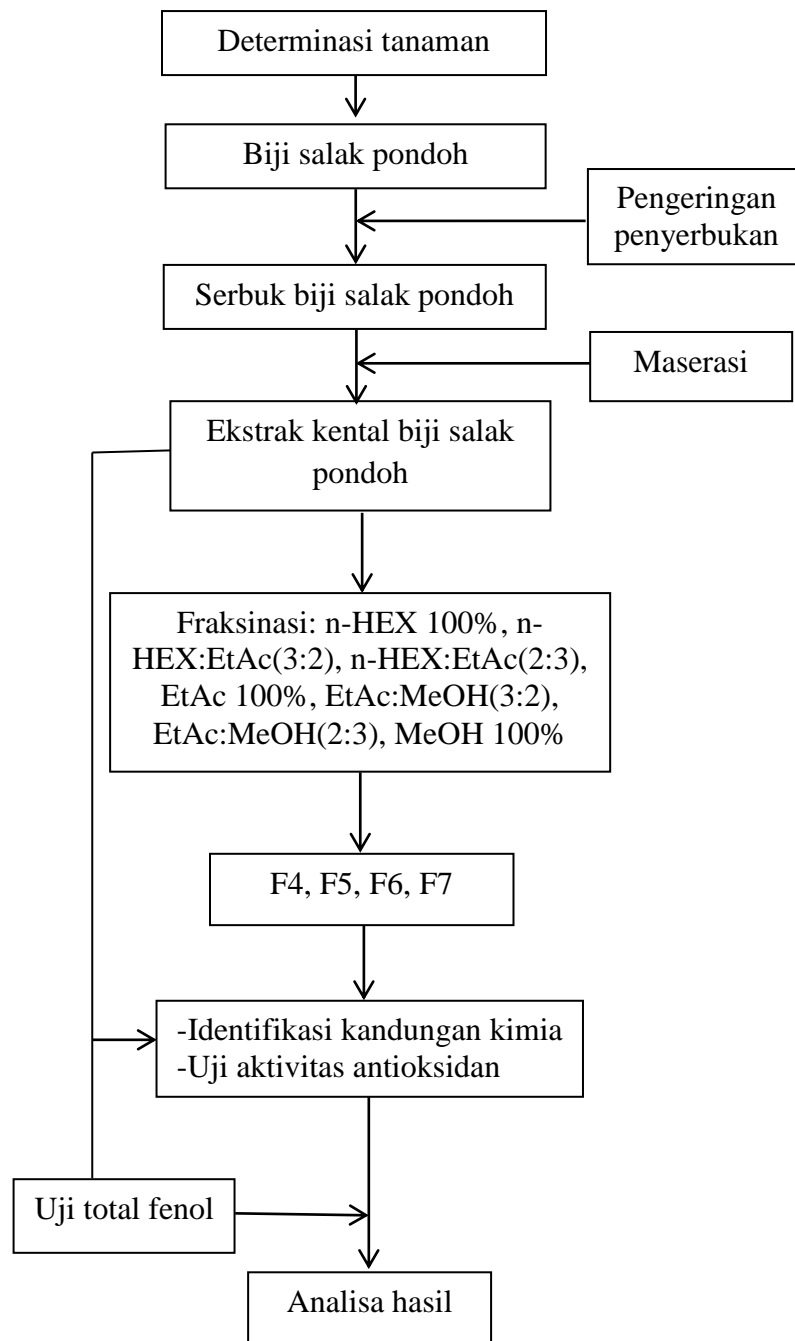
Larutan stok pembanding asam galat dibuat dalam konsentrasi 200 µg/ml dengan menimbang sejumlah 20 mg serbuk asam galat dilarutkan dengan metanol p.a dalam labu 100 ml, kemudian dibuat seri kadar 6,25 µg/ml, 12,5 µg/ml, 25 µg/ml, 50 µg/ml, 100 µg/ml. Masing-masing konsentrasi diambil 1 ml dan ditambahkan ke tabung erlenmeyer yang berisi 9 ml aquades. Sebanyak 1 ml reagen Folin-Ciocalteu ditambahkan ke dalam campuran reaksi, diikuti dengan inkubasi selama 3 menit pada suhu kamar. Selanjutnya, 10 ml 7% b/v larutan natrium karbonat ditambahkan ke dalam campuran dan diinkubasi selama 90 menit dalam ruang gelap, absorbansi diukur pada panjang gelombang 765 nm.

3.2.7.2. Penentuan Kadar Total Fenol

Sampel (ekstrak) ditentukan kadar total fenol dengan cara sampel sebanyak 1 ml ditambahkan ke tabung erlenmeyer yang berisi 9 ml aquades. Sebanyak 1 ml reagen Folin-Ciocalteu ditambahkan ke dalam campuran reaksi, diikuti dengan inkubasi selama 3 menit pada suhu kamar. Selanjutnya, 10 ml 7% b/v larutan natrium karbonat ditambahkan ke dalam campuran kemudian inkubasi selama 90 menit dalam ruang gelap. Absorbansi diukur pada panjang gelombang 765 nm. Total Fenol sampel ditentukan dengan menggunakan kurva standar nilai absorbansi yang berkorelasi dengan konsentrasi standar dari asam galat⁽³⁷⁾.

3.3. Analisis Hasil

1. Hasil identifikasi ekstrak etanol biji salak dijelaskan secara deskriptif sesuai dengan hasil yang diperoleh.
2. Aktivitas antioksidan diketahui dengan menghitung nilai IC_{50} . Persentase aktivitas antioksidan didapat dari : $[(A_{kontrol}-A_{uji}) / A_{kontrol}] \times 100 \%$ ⁽³⁸⁾. Nilai absorbansi diinterpolasi dalam kurva dari antioksidan standar yaitu vitamin C dan hasilnya dinyatakan sebagai konsentrasi yang setara. IC_{50} yang lebih rendah menunjukkan semakin tingginya efisiensi antiradikal atau memiliki kapasitas antioksidan yang tinggi⁽³⁰⁾.
3. Perhitungan kadar total fenol dihitung dengan menggunakan kurva standar nilai absorbansi yang berkorelasi dengan konsentrasi standar dari asam galat.



Gambar 2.3 Skema Penelitian

BAB IV

HASIL DAN PEMBAHASAN

4.1. Determinasi Tanaman

Langkah awal sebelum dilakukan penelitian yaitu pengumpulan sampel berupa biji buah salak pondoh yang diperoleh dari perkebunan salak di daerah Turi, Sleman, Yogyakarta. Kemudian dilakukan determinasi terhadap tanaman salak. Determinasi dari suatu tanaman dilakukan bertujuan untuk memastikan kebenaran identitas dari tanaman yang akan digunakan dalam penelitian sehingga tidak terjadi kesalahan dalam pengumpulan sampel. Bagian tanaman salak yang digunakan untuk determinasi berupa bunga, tangkai dan daun. Determinasi tanaman dilakukan di Laboratorium Sistematika Tumbuhan Fakultas Biologi Universitas Gadjah Mada. Hasil determinasi (Lampiran 1) menunjukkan tanaman yang digunakan dalam penelitian ini adalah tanaman salak spesies *Salacca zalacca* (Gaertn.) Voss.

4.2. Pembuatan Simplisia

Bagian tanaman salak yang digunakan dalam penelitian ini berupa biji. Pembuatan simplisia biji salak diperoleh dengan cara mencuci bersih biji untuk membersihkan kotoran yang menempel kemudian dipotong untuk mempercepat pengeringan dan mempermudah penyerbukan. Pengeringan dilakukan pada biji salak dengan tujuan untuk mengurangi kadar air, menghentikan reaksi enzimatik yang biasa menguraikan kandungan zat aktif, mencegah tumbuhnya mikroba, memudahkan proses pengolahan selanjutnya, dan penyimpanan dalam jangka waktu yang lebih lama⁽³⁹⁾. Penyerbukan dari biji salak bertujuan untuk memperkecil ukuran partikel sehingga memperbesar luas permukaan kontak antara simplisia dengan pelarutnya. Serbuk biji salak (Gambar 4.1) kemudian diayak untuk menghasilkan ukuran yang seragam. Serbuk biji salak yang dihasilkan adalah 445 gram dari 1 kg biji salak segar.



Gambar 4. 1 Serbuk Biji Salak

4.3. Pembuatan Ekstrak

Proses ekstraksi dilakukan dengan menggunakan metode maserasi. Metode ekstraksi maserasi adalah proses pengekstrakan simplisia dengan menggunakan pelarut dengan beberapa kali pengadukan pada temperatur ruangan (kamar). Metode ini merupakan metode ekstraksi yang sederhana dengan merendam simplisia dalam pelarut yang sesuai dalam wadah yang tertutup. Keuntungan metode ini selain sederhana dalam alat dan pengerjaan, tetapi juga dapat meminimalisir terjadinya kerusakan kandungan kimia karena tidak adanya pemanasan, setelah disaring sisanya dapat dimaserasi lagi, tetapi metode ini juga memiliki kerugian yaitu membutuhkan jumlah pelarut yang lebih banyak dan waktu yang lebih lama. Remaserasi kemudian dilakukan dengan melakukan pengulangan penambahan pelarut setelah dilakukan penyaringan maserat pertama, dan seterusnya⁽¹⁹⁾. Proses ekstraksi yang dilakukan selama dua hari dengan remaserasi setiap 24 jam ini belum dilakukannya proses standarisasi sehingga prosesnya dilihat dari kejenuhan pelarut dalam menyari senyawa. Pelarut yang telah jenuh tidak bisa menarik senyawa, sehingga dilakukan remaserasi untuk menarik senyawa yang masih belum tersari.

Remaserasi dilakukan agar memaksimalkan proses penyarian sehingga dapat diperoleh senyawa yang terkandung dalam biji salak lebih banyak. Penggunaan pelarut etanol dipilih karena lebih ekonomis dan aman. Pemilihan etanol karena pelarut etanol merupakan pelarut universal yang dapat mengikat komponen kimia yang terkandung di dalam tumbuhan baik yang bersifat non

polar, semi polar, dan polar. Selama proses perendaman, pelarut etanol akan masuk ke dalam sel melalui dinding serbuk biji salak. Adanya perbedaan tekanan di dalam dan di luar sel menyebabkan pecahnya dinding dan membran sel, sehingga metabolit sekunder yang terkandung didalam sel biji salak akan terlarut dalam etanol. Hasil ekstrak kental biji salak diperoleh sebesar 43,47 gram berwarna hitam kecoklatan, sedikit cair, dimungkinkan dalam ekstrak tersebut masih terdapat kandungan air (Gambar 4.2). Hal tersebut karena pelarut etanol 70% merupakan campuran etanol dan air sebesar 30%. Proses untuk pemekatan ekstrak yaitu dengan *rotary evaporator* menggunakan suhu 60°C, sehingga dengan menggunakan suhu tersebut air yang menguap lebih sedikit karena titik didih air lebih tinggi daripada etanol.



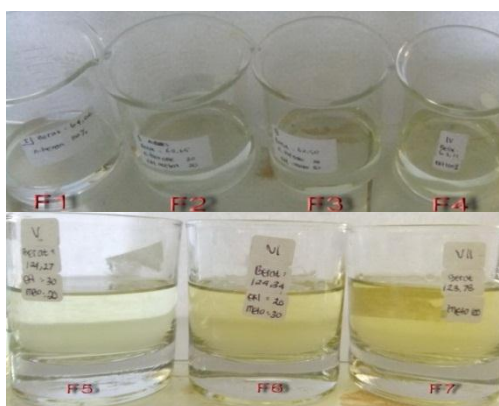
Gambar 4. 2 Ekstrak Kental Biji Salak

Hasil ekstraksi diperoleh rendemen sebanyak 14,49 %. Rendemen diperoleh dari perbandingan jumlah serbuk simplisia yang digunakan dengan jumlah ekstrak kental yang diperoleh. Rendemen berguna untuk mengetahui perolehan ekstrak kental sehingga dapat digunakan sebagai acuan penelitian selanjutnya dalam penentuan jumlah simplisia yang dibutuhkan.

4.4. Fraksinasi

Ekstrak etanol biji salak difraksinasi menggunakan kromatografi kolom cair vakum. Fraksinasi memisahkan senyawa berdasarkan kepolarannya. Fase diam yang digunakan adalah silika gel 60 F₂₅₄ dan menggunakan fase gerak

gradien kepolaran bertingkat yaitu n-heksan 100%, n-heksan:etil asetat (3:2), n-heksan:etil asetat (2:3), etil asetat 100%, etil asetat:metanol (3:2), etil asetat:metanol (2:3), dan metanol 100%. Fraksinasi menggunakan sebanyak 5 gram ekstrak yang hasilnya akan terdistribusi kedalam masing-masing 7 fraksi (Gambar 4.3) yang dihasilkan berdasarkan jenis kandungan senyawanya. Hasil fraksinasi yang diperoleh sangat sedikit dimana hasil fraksi yang terdistribusi pada keseluruhan fraksi hanya 0,43 gram dan persen rendemen keseluruhan fraksi hanya 8,61%. Hal tersebut diduga dalam 5 gram ekstrak yang digunakan didominasi oleh beratnya air yang terkandung didalam ekstrak dari hasil ekstraksi menggunakan etanol 70%. Adanya kandungan air tersebut mempengaruhi proses fraksinasi. Hasil rendemen fraksi dapat dilihat pada tabel 4.1. Hasil persen rendemen fraksi menunjukkan bahwa fraksi metanol memiliki persen rendemen terbesar yaitu 4,20%, hal ini menunjukkan senyawa yang terkandung dalam ekstrak kental etanol biji salak lebih banyak senyawa yang bersifat polar.



Gambar 4. 3 Hasil Fraksinasi F1 : Fraksi n-heksan 100%, F2: Fraksi n-heksan:etil asetat (3:2), F3: Fraksi n-heksan:etil asetat (2:3), F4: Fraksi etil asetat 100%, F5: Fraksi etil asetat:metanol (3:2), F6: Fraksi etil asetat: metanol (2:3), F7: Fraksi metanol 100%.

Tabel 4. 1 Persen rendemen fraksi

| Fraksi | Persen rendemen (%) |
|----------------------------|---------------------|
| n-heksan 100% | 0,17 |
| n-heksan:Etil Asetat (3:2) | 0,20 |
| n-heksan:Etil Asetat (2:3) | 0,20 |
| Etil Asetat 100% | 0,22 |
| Etil Asetat:Metanol (3:2) | 1,62 |
| Etil Asetat: Metanol (2:3) | 2 |
| Metanol 100% | 4,20 |

4.5. Identifikasi Kandungan Kimia

Identifikasi kandungan kimia yang terdapat dalam ekstrak biji salak dilakukan dengan menggunakan metode Kromatografi Lapis Tipis (KLT). Metode KLT dipilih karena dalam pelaksanaan dan peralatan yang digunakan lebih sederhana, identifikasi pemisahan komponen dapat dilakukan dengan pereaksi warna, fluoresensi, atau dengan radiasi dengan menggunakan sinar ultra violet⁽²³⁾. Metode pengembangan KLT dilakukan dengan cara pengembangan menaik (*ascending*), dimana plat KLT ditempatkan dalam bejana pengembang setelah terjadi penjuanan dan bercak harus berada di atas level pelarut. Selanjutnya pelarut akan mengelusi komponen senyawa dalam sampel melalui fase diam silika gel⁽⁴⁰⁾. Bercak yang dihasilkan dari pemisahan KLT merupakan bercak yang tidak berwarna, sehingga untuk penentuannya dapat diamati dibawah sinar UV dan dapat pula direaksikan dengan suatu pereaksi semprot agar bercak menjadi lebih jelas.

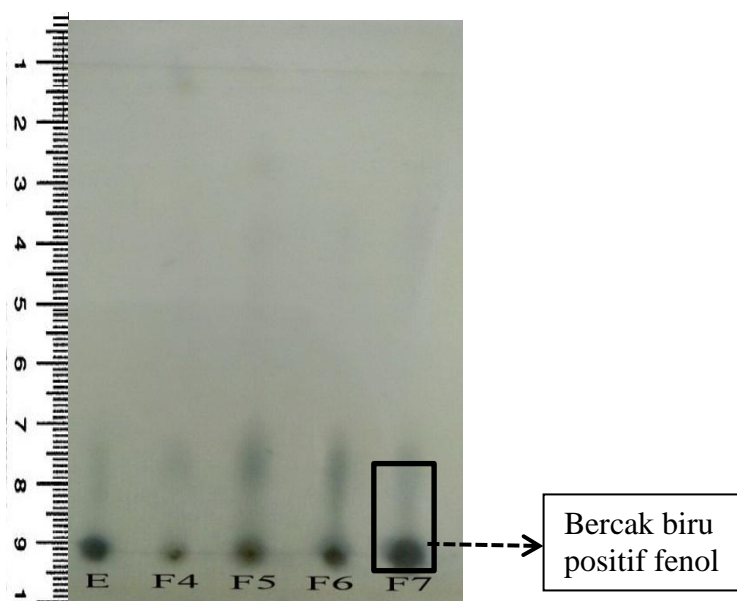
Identifikasi dilakukan secara kualitatif untuk melihat adanya senyawa fenol, flavonoid, tanin, dan alkaloid dimana senyawa-senyawa tersebut merupakan senyawa yang dapat bertindak sebagai antioksidan⁽⁴⁾. Identifikasi KLT menggunakan fase diam silika gel 60 F₂₅₄ dan fase gerak yang digunakan merupakan kombinasi kloroform, etil asetat, dan asam asetat glasial dengan perbandingan masing-masing 5:4:1. Fase gerak tersebut merupakan hasil optimasi, kemudian dimasukkan ke dalam bejana dan ditutup rapat hingga terjadi penjuanan. Pengamatan bercak terhadap ekstrak dan fraksi pada plat KLT dilakukan dengan sinar tampak, apabila bercak tidak terlihat secara sinar tampak maka selanjutnya diamati di bawah sinar UV₂₅₄ nm dan UV₃₆₆ nm, dan dilakukan pula dengan disemprot menggunakan pereaksi semprot sesuai dengan senyawa yang diidentifikasi.

Pereaksi Folin Ciocalteu digunakan untuk mengidentifikasi senyawa fenol, AlCl₃ untuk mengidentifikasi adanya senyawa flavonoid, FeCl₃ untuk mengidentifikasi senyawa tanin, dan *Dragendorff* untuk mengidentifikasi senyawa alkaloid sehingga bercak menjadi jelas⁽³⁴⁾. Identifikasi kandungan kimia dilakukan

terhadap ekstrak etanol, fraksi etil asetat 100%, etil asetat:metanol (3:2), etil asetat:metanol (2:3), dan fraksi metanol 100%. Hasil fraksi n-heksan 100%, fraksi n-heksan:etil asetat (3:2), dan fraksi n-heksan:etil asetat (2:3) tidak dimungkinkan dilakukan pengujian. Hal tersebut karena hasil fraksinasi yang diperoleh sedikit sejumlah 0,008, 0,01, dan 0,01 gram. Berikut adalah hasil dari identifikasi kandungan kimia menggunakan metode KLT ekstrak dan fraksi biji salak pondoh dengan pereaksi semprot Folin Ciocalteu, AlCl_3 , FeCl_3 , dan *Dragendorff*.

4.5.1. Identifikasi Fenol

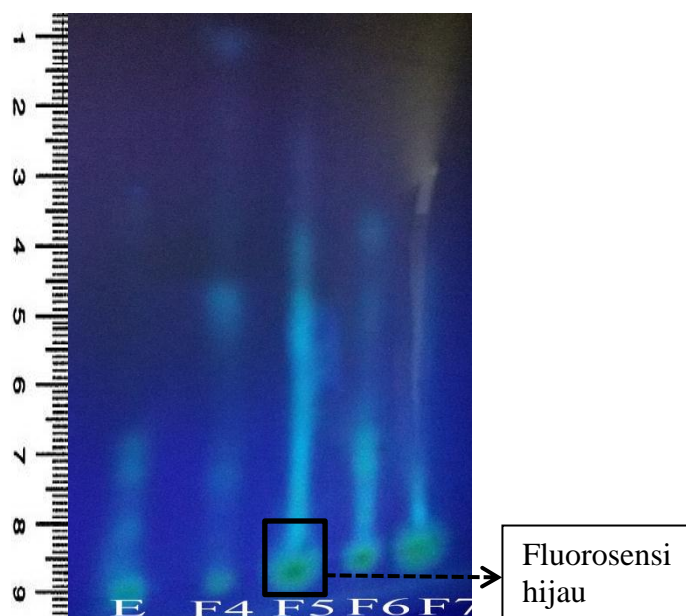
Pereaksi semprot Folin Ciocalteu digunakan untuk mengidentifikasi adanya senyawa golongan fenol, adanya senyawa fenol ditandai dengan warna biru tua berlatar belakang putih dilihat dengan sinar tampak⁽³⁴⁾. Hasil pengamatan pada plat KLT ekstrak etanol, fraksi etil asetat 100%, etil asetat:metanol (3:2), etil asetat:metanol (2:3), dan fraksi metanol 100% setelah disemprot dengan pereaksi semprot Folin Ciocalteu memberikan warna biru tua berlatar belakang putih secara sinar tampak. Hal ini menunjukkan bahwa pada ekstrak etanol, Fraksi etil asetat 100%, etil asetat:metanol (3:2), etil asetat:metanol (2:3), dan fraksi metanol 100% terdapat senyawa golongan fenol.



Gambar 4. 4 Hasil KLT Fenol : Diamati secara sinar tampak setelah disemprot dengan Folin Ciocalteu

4.5.2. Identifikasi Flavonoid

Pereaksi semprot AlCl_3 digunakan untuk mengidentifikasi adanya senyawa flavonoid, adanya senyawa flavonoid ditunjukkan dengan fluoresensi hijau pada sinar UV_{366} ⁽³⁴⁾. Hasil pengamatan pada plat KLT ekstrak etanol, fraksi etil asetat 100%, etil asetat:metanol (3:2), etil asetat:metanol (2:3), dan fraksi metanol 100% setelah disemprot dengan pereaksi semprot AlCl_3 dan diamati dibawah lampu UV_{366} terlihat berfluoresensi hijau. Hal ini menunjukkan bahwa pada ekstrak etanol, fraksi etil asetat 100%, etil asetat:metanol (3:2), etil asetat:metanol (2:3), dan fraksi metanol 100% terdapat senyawa golongan flavonoid.

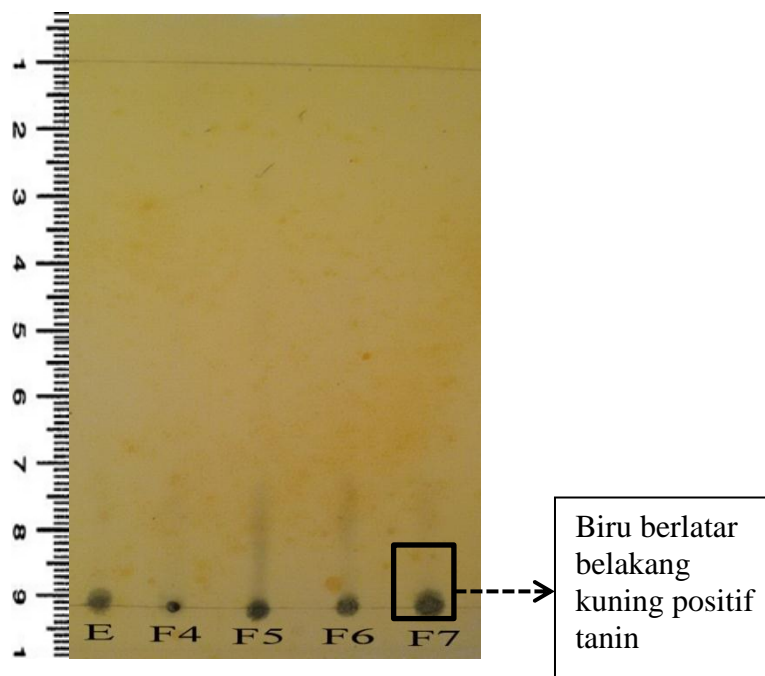


Gambar 4. 5 Hasil KLT Flavonoid Diamati dibawah sinar UV_{366} setelah disemprot dengan AlCl_3 ,

4.5.3. Identifikasi Tanin

Pereaksi FeCl_3 digunakan untuk mengidentifikasi adanya senyawa tanin yang ditandai dengan warna biru berlatar belakang kuning dilihat dengan sinar tampak⁽³⁴⁾. Hasil pengamatan pada plat KLT ekstrak etanol, fraksi etil asetat 100%, etil asetat:metanol (3:2), etil asetat:metanol (2:3), dan fraksi metanol 100% setelah disemprot dengan FeCl_3 menunjukkan warna biru berlatar belakang kuning

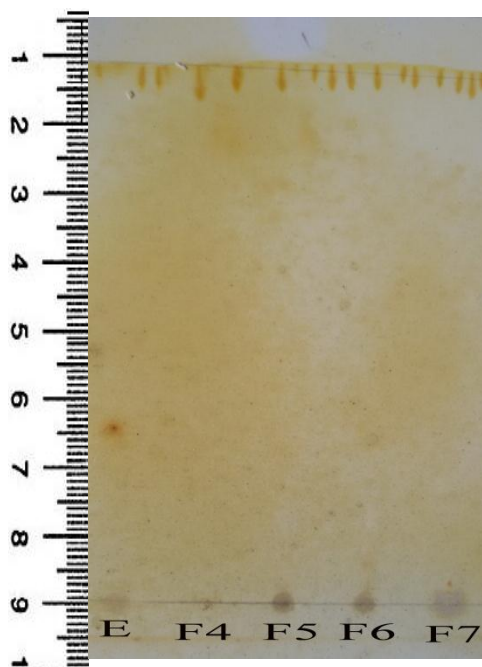
secara sinar tampak. Hal ini menunjukkan bahwa pada ekstrak etanol, fraksi etil asetat 100%, etil asetat:metanol (3:2), etil asetat:metanol (2:3), dan fraksi metanol 100% terdapat senyawa golongan tanin.



Gambar 4. 6 Hasil KLT Tanin : Diamati dengan sinar tampak setelah disemprot dengan FeCl_3

4.5.4. Identifikasi Alkaloid

Pereaksi semprot *Dragendorff* digunakan untuk mengidentifikasi adanya senyawa golongan alkaloid, adanya senyawa alkaloid ditandai dengan bercak coklat jingga berlarat belakang kuning⁽³⁴⁾. Hasil pengamatan pada plat KLT ekstrak etanol, fraksi etil asetat 100%, etil asetat:metanol (3:2), etil asetat:metanol (2:3), dan fraksi metanol 100% tidak terlihat adanya bercak coklat jingga berlarat belakang kuning. Hal ini menunjukkan bahwa pada ekstrak etanol, Fraksi etil asetat 100%, etil asetat:metanol (3:2), etil asetat:metanol (2:3), dan fraksi metanol 100% tidak terdapat senyawa golongan alkaloid.



Gambar 4. 7 Hasil KLT Alkaloid :Diamati dengan sinar tampak setelah disemprot dengan *Dragendorff*

Tabel 4. 2 Hasil Identifikasi Kandungan Kimia Ekstrak dan Fraksi Biji Salak

| Senyawa | Ekstrak Etanol (E) | Fraksi Etil Asetat 100% (F4) | Fraksi Etil Asetat:Metanol (3:2) (F5) | Fraksi Etil Asetat:Metanol (2:3) (F6) | Fraksi Metanol 100% (F7) |
|-----------|--------------------|------------------------------|---------------------------------------|---------------------------------------|--------------------------|
| Fenol | + | + | + | + | + |
| Flavonoid | + | + | + | + | + |
| Tanin | + | + | + | + | + |
| Alkaloid | - | - | - | - | - |

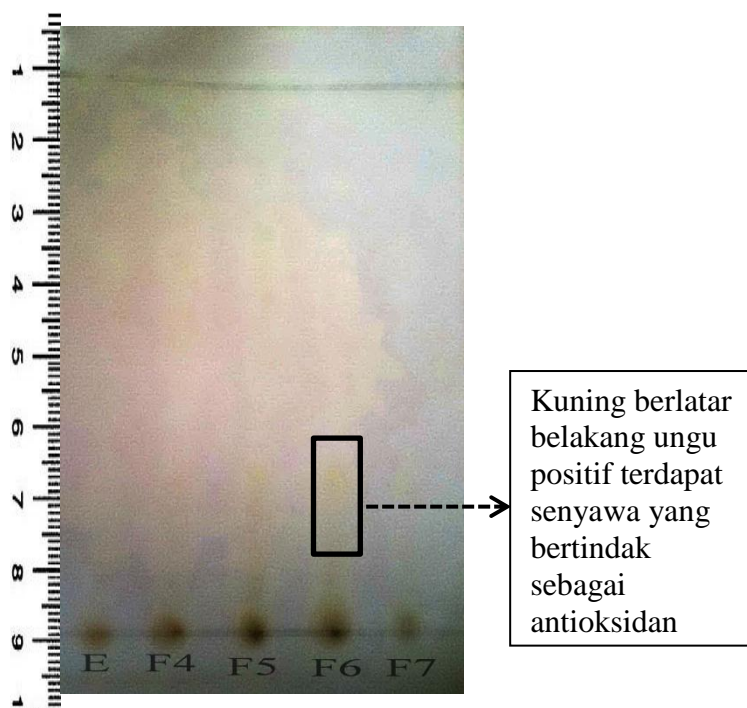
Keterangan = (+) Terdeteksi

Hasil identifikasi kandungan kimia pada ekstrak etanol, fraksi etil asetat 100%, etil asetat:metanol (3:2), etil asetat:metanol (2:3), dan fraksi metanol 100% biji salak menunjukkan bahwa dalam biji salak pondoh terdapat senyawa fenol, flavonoid, dan tanin. Hasil penelitian biji salak (*Salacca zalacca* (Gaert) Voss) lainnya oleh Purwanto dkk (2015) menunjukkan identifikasi kandungan kimia terhadap ekstrak etil asetat dan ekstrak etanol menunjukkan adanya senyawa alkaloid, tanin dan polifenolat⁽¹¹⁾.

4.6. Uji Aktivitas Antioksidan

4.6.1. Uji Aktivitas Antioksidan Secara Kualitatif

Uji aktivitas antioksidan secara kualitatif dilakukan dengan metode Kromatografi Lapis Tipis (KLT). Pereaksi semprot DPPH dilakukan untuk identifikasi secara kualitatif antioksidan, bercak senyawa yang berperan sebagai antioksidan pada plat KLT akan memberikan warna kuning cerah diamati dengan sinar tampak. Plat KLT dari ekstrak etanol, fraksi etil asetat 100%, etil asetat:metanol (3:2), etil asetat:metanol (2:3), dan fraksi metanol 100% setelah disemprot dengan DPPH memberikan warna kuning, hal ini menunjukkan adanya komponen senyawa aktif yang dapat menghambat radikal bebas DPPH.



Gambar 4. 8 Hasil KLT Antioksidan Kualitatif: Diamati dengan sinar tampak setelah disemprot DPPH.

Ekstrak dan fraksi tersebut masing-masing teridentifikasi memiliki senyawa yang dapat bertindak sebagai antioksidan diantaranya fenol, flavonoid dan tanin, tetapi diduga ekstrak dan masing-masing fraksi tersebut menarik jenis senyawa yang berbeda. Seperti senyawa flavonoid bisa dalam bentuk aglikon atau tidak terikat gula dan dalam bentuk glikosidanya. Sehingga ketika dideteksi

menggunakan deteksi yang sama yaitu DPPH, dimana metode tersebut merupakan metode umum yang sering digunakan dalam menentukan aktivitas antioksidan dengan didasarkan pada reaksi penangkapan atom hidrogen oleh DPPH, maka akan merespon dengan hasil yang sama.

4.6.2. Uji Aktivitas Antioksidan Secara Kuantitatif

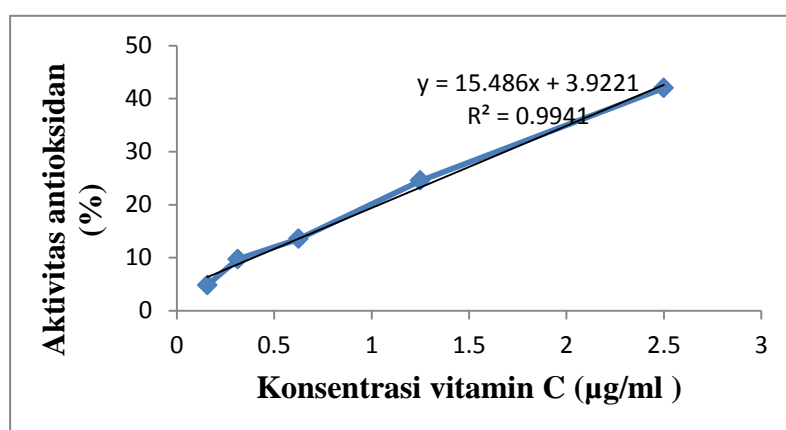
Larutan DPPH dilakukan penentuan panjang gelombang maksimum, penentuan panjang gelombang maksimum bertujuan untuk mengetahui panjang gelombang dengan nilai absorbansi maksimum. Serapan larutan diukur dengan spektrofotometri UV-Vis, pembacaan absorbansi dapat dilakukan dengan menggunakan spektrofotometri karena struktur kimia DPPH memiliki banyak ikatan rangkap terkonjugasi. Panjang gelombang maksimum didapatkan 515,5 nm dengan nilai absorbansi 0,745.

Uji aktivitas antioksidan dilakukan pada ekstrak dan fraksi biji salak dengan konsentrasi 9,375; 18,75; 37,5; 75 dan 150 µg/ml. Masing-masing konsentrasi dibaca serapannya yang sebelumnya telah ditambahkan dengan larutan DPPH dan diinkubasi selama 30 menit agar terjadi reaksi antara DPPH sebagai radikal bebas dan sampel uji sebagai senyawa antioksidan. Vitamin C digunakan sebagai pembanding dengan konsentrasi 0,15625; 0,3125; 0,625; 1,25 dan 2,5 µg/ml. Vitamin C digunakan sebagai pembanding dalam pengujian aktivitas antioksidan ini terkait dengan mekanisme kerja yang sama dengan senyawa yang terdapat dalam sampel ekstrak dan fraksi yaitu senyawa polifenol. Vitamin C dan senyawa polifenol ini bekerja sebagai antioksidan dengan cara menangkap senyawa radikal.

Ekstrak etanol, fraksi etil asetat 100%, fraksi etil asetat:metanol (3:2), fraksi etil asetat:metanol (2:3) dan fraksi metanol 100% biji salak diuji aktivitas antioksidan menggunakan metode DPPH (*2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl*). Metode DPPH digunakan karena metode tersebut sederhana, secara luas digunakan dalam pengujian aktivitas antioksidan dalam makanan dan banyak tanaman obat, dapat digunakan untuk sampel padat atau cair^(30,41). Metode DPPH didasarkan pada

pengukuran kemampuan mengurangi antioksidan terhadap radikal DPPH. Mekanisme reaksi kimia DPPH terutama didasarkan pada transfer elektron tunggal dan atom hidrogen. Radikal DPPH akan dikurangi dengan senyawa antioksidan yang ditambahkan dalam larutan dan akan berubah warna menjadi warna kuning.

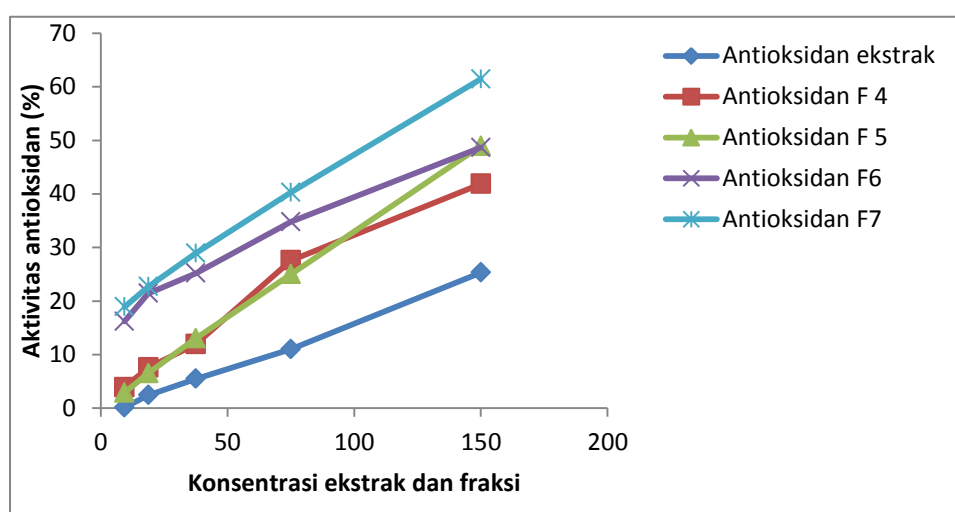
Pengukuran penurunan absorbansi pada panjang gelombang 515,5 nm sebanding dengan konsentrasi *scavenger* radikal bebas, aktivitas antioksidan dapat dinyatakan sebagai IC_{50} yaitu jumlah antioksidan yang diperlukan untuk mengurangi sebesar 50% konsentrasi awal radikal DPPH. Penurunan nilai absorbansi menunjukkan terjadinya penangkapan radikal bebas oleh sampel (vitamin C, sampel ekstrak dan fraksi biji salak). Nilai absorbansi sampel dapat dilihat pada Lampiran 6. Nilai IC_{50} didapatkan dari *plotting* terhadap persamaan regresi linier, dimana nilai x merupakan konsentrasi sampel dan nilai y merupakan persen aktivitas antioksidan sampel. Semakin kecil nilai IC_{50} , menunjukkan bahwa semakin tingginya efisiensi antiradikal atau memiliki kapasitas antioksidan yang tinggi.



Gambar 4. 9 Grafik Hubungan Antara Konsentrasi Vitamin C Dengan Persen Aktivitas Antioksidan

Hasil grafik hubungan antara konsentrasi vitamin C dengan persen aktivitas antioksidan (Gambar 4.9) menunjukkan bahwa seiring dengan kenaikan konsentrasi vitamin C maka aktivitas antioksidannya juga semakin tinggi. Nilai aktivitas antioksidan tersebut merupakan nilai rata-rata dari tiga kali replikasi.

Nilai IC_{50} vitamin C yang didapat sebesar 2,98 $\mu\text{g/ml}$, dari nilai tersebut menunjukkan bahwa besarnya konsentrasi vitamin C yang dapat menghambat 50% konsentrasi awal radikal bebas DPPH adalah pada konsentrasi 2,98 $\mu\text{g/ml}$. Konsentrasi vitamin C dalam penelitian ini adalah 1/120 kali dari konsentrasi sampel ekstrak maupun fraksi. Konsentrasi vitamin C dengan konsentrasi sampel ekstrak dan fraksi tidak bisa sama, karena nilai absorbansi harus memenuhi hukum Lambert Beer dimana absorbansi yang baik adalah 0,2-0,8. Vitamin C diperkirakan bukan pembanding yang sebanding dengan antioksidan dalam sampel ekstrak dan fraksi karena hasil nilai absorbansi maupun IC_{50} vitamin C berbeda jauh dengan sampel ekstrak dan fraksi.



Gambar 4. 10 Grafik Hubungan Antara Konsentrasi Ekstrak dan Fraksi Dengan Persen Aktivitas Antioksidannya.

Tabel 4. 3 Hasil Aktivitas Antioksidan Standar Vitamin C, Ekstrak dan Fraksi Biji Salak Menggunakan Metode DPPH

| Senyawa | Persamaan Regresi Linier | IC_{50} |
|---------------------------------------|--------------------------|-------------------------|
| Standar Vitamin C | $Y = 15,486x + 3,9221$ | 2,98 $\mu\text{g/ml}$ |
| Ekstrak Etanol (E) | $Y = 0,1756x - 1,354$ | 293,8 $\mu\text{g/ml}$ |
| Fraksi Etil Asetat 100% (F4) | $Y = 0,2736x + 2,666$ | 173,06 $\mu\text{g/ml}$ |
| Fraksi Etil Asetat:Metanol (3:2) (F5) | $Y = 0,3253x + 0,3661$ | 152,59 $\mu\text{g/ml}$ |
| Fraksi Etil Asetat:Metanol (2:3) (F6) | $Y = 0,2222x + 16,335$ | 151,99 $\mu\text{g/ml}$ |
| Fraksi Metanol 100% (F7) | $Y = 0,2993x + 17,06$ | 110,16 $\mu\text{g/ml}$ |

Hasil grafik hubungan antara konsentrasi ekstrak dan fraksi biji salak pondoh dengan persen aktivitas antioksidan (Gambar 4.10) menunjukkan bahwa seiring dengan kenaikan konsentrasi ekstrak dan fraksi biji salak pondoh maka aktivitas antioksidannya juga semakin tinggi. Nilai aktivitas antioksidan tersebut merupakan nilai rata-rata dari tiga kali replikasi. Ekstrak etanol, fraksi etil asetat 100%, etil asetat:metanol (3:2), etil asetat:metanol (2:3), dan fraksi metanol 100% biji salak pondoh memiliki nilai IC_{50} berturut-turut sebesar 293,8; 173,06; 152,59; 151,99; 110,16 $\mu\text{g/ml}$, dari nilai tersebut menunjukkan bahwa besarnya konsentrasi ekstrak dan fraksi biji salak pondoh yang dapat menghambat 50% konsentrasi awal radikal bebas DPPH adalah pada konsentrasi 293,8; 173,06; 152,59; 151,99; 110,16 $\mu\text{g/ml}$.

Fraksi metanol memiliki nilai IC_{50} lebih kecil yaitu 110,16 $\mu\text{g/ml}$ bila dibandingkan dengan ekstrak etanol yaitu 293,8 $\mu\text{g/ml}$. Semakin kecil nilai IC_{50} menunjukkan semakin tinggi efisiensi antiradikal atau memiliki aktivitas antioksidan yang tinggi. Nilai IC_{50} ekstrak yang lebih tinggi mungkin dapat disebabkan karena di dalam ekstrak tersebut mengandung komponen senyawa yang lebih banyak sehingga senyawa-senyawa tersebut diduga dapat berkompetisi dan atau berinteraksi satu sama lain yang dapat mengurangi efek antioksidan. Fraksi metanol dengan nilai IC_{50} lebih kecil karena senyawa-senyawa yang berada di dalam fraksi telah dipisahkan berdasarkan kepolarannya, memungkinkan senyawa tersebut berinteraksi secara sinergis sehingga berperan besar terhadap aktivitas antioksidannya. Senyawa-senyawa yang dapat bertindak sebagai antioksidan tersebut dapat diketahui dari hasil penapisan fitokimia antara lain fenol, flavonoid, dan tanin. Fraksi metanol mampu menarik jenis senyawa-senyawa fenol, flavonoid dan tanin dengan sifat yang lebih polar. Kelarutan senyawa fenol, flavonoid, dan tanin dapat dipengaruhi oleh gugus hidroksil pada senyawa polifenol, selain itu juga dapat diduga karena pengaruh gugus yang mengikat pada senyawa flavonoid seperti gula sehingga lebih bersifat polar.

Hasil IC_{50} baik ekstrak maupun fraksi biji salak pondoh sangat jauh bila dibandingkan dengan nilai IC_{50} dari vitamin C. Hasil penelitian Puryono dkk (2015) tentang aktivitas antioksidan daging buah salak dari varietas buah salak

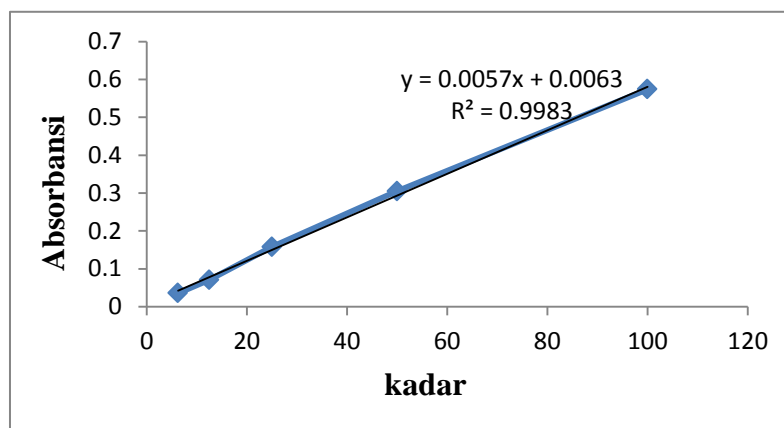
pondoh super, yang diperoleh dari daerah Pronojiwo Kabupaten Lumajang dengan menggunakan metode DPPH memiliki nilai IC_{50} sebesar $68,27 \mu\text{g/ml}^{(7)}$. Hasil penelitian lain oleh Arviani dan Parnanto (2013), menunjukkan daging buah dari salak pondoh yang diperoleh dari Sleman memiliki aktivitas antioksidan dengan menggunakan metode DPPH sebesar $107,30$ (ekuivalen $\mu\text{mol vit C/ g db}^{(16)}$).

Penelitian aktivitas antioksidan tidak hanya dilakukan terhadap daging buah salak tetapi juga terhadap kulit buah salak. Kulit buah salak (*Salacca zalacca* (Gaertner) Voss) dari Kampung Jambu Sumedang Jawa Barat diuji menggunakan metode DPPH memiliki nilai IC_{50} sebesar $229,27 \mu\text{g/ml}^{(10)}$. Semua bagian dari buah salak yaitu daging buah, kulit, dan biji memiliki aktivitas antioksidan, namun berbeda aktivitas antioksidan setiap bagian. Aktivitas antioksidan yang tinggi ditunjukkan pada bagian daging buah salak dibandingkan bagian kulit dan bagian biji salak^(7,10). Hal ini diperkirakan lebih banyak senyawa yang dapat bertindak sebagai antioksidan terdapat pada bagian daging buahnya daripada bagian kulit dan bagian biji salak. Jumlah kandungan metabolit sekunder dalam setiap bagian tanaman adalah berbeda, kondisi lingkungan dapat mempengaruhi produksi metabolit sekunder yaitu pengaruh parameter abiotik seperti suhu, cahaya, pH, dan kelembaban⁽⁴²⁾.

4.7. Uji Total Fenol

Ekstrak etanol biji salak pondoh dilakukan uji total fenol menggunakan metode Folin Ciocalteu. Metode Folin-Ciocalteu merupakan metode yang didasarkan pada kekuatan mengurangi gugus hidroksil fenolik dan tidak spesifik tetapi mendeteksi semua fenol dengan berbagai sensitivitas. Polifenol dalam ekstrak tumbuhan akan bereaksi dengan reagen redoks tertentu (reagen Folin-Ciocalteu) membentuk kompleks warna biru yang dapat diukur dengan spektrofotometri UV-Vis. Sebagai pembanding kandungan total fenol dalam ekstrak etanol biji salak pondoh digunakan asam galat. Hasil pengekstrakan senyawa fenol dapat dipengaruhi oleh tipe pelarut dengan variasi polaritasnya, waktu ekstraksi dan suhu, serta perbandingan antara simplisa dengan pelarut

seperti komposisi kimia dan karakteristik simplisia. Pemilihan pelarut seperti air, aseton, etil asetat, alkohol (metanol, etanol dan propanol) dan campurannya akan mempengaruhi hasil dari senyawa fenol yang diekstraksi⁽⁴³⁾. Berikut adalah kurva baku asam galat:



Gambar 4. 11 Grafik Hubungan Kadar Asam Galat Dengan Absorbansi

Dari kurva baku asam galat dihasilkan persamaan $y = 0,0057x + 0,0063$. Kadar total fenol ekstrak etanol biji salak pondoh didapatkan dengan memasukan nilai absorbansi sampel ke dalam persamaan kurva baku asam galat. Hasil kadar total fenol ekstrak etanol biji salak pondoh adalah 9,36 mgGAE/100 gram sampel. Hal ini berarti dalam 100 gram ekstrak etanol biji salak pondoh setara dengan 9,36 mg asam galat. Hasil dari penetapan kadar total fenol dalam ekstrak biji salak pondoh dengan menggunakan Folin Ciocalteu ini memberikan perkiraan kasar dari total senyawa fenol yang ada dalam ekstrak. Senyawa polifenol merespon secara berbeda tergantung dari jumlah gugus fenol yang dimiliki. Selain itu kelarutan senyawa polifenol terutama tergantung pada gugus hidroksil, ukuran molekul dan panjang hidrokarbon⁽⁴⁴⁾.

BAB V

KESIMPULAN DAN SARAN

5.1. Kesimpulan

1. Ekstrak etanol, fraksi etil asetat 100 %, fraksi etil asetat:metanol (3:2), fraksi etil asetat:metanol (2:3) serta fraksi metanol 100% biji salak pondoh (*Salacca zalacca* (Gaert.) Voss.) memiliki aktivitas antioksidan dengan nilai IC₅₀ masing-masing sebesar 293,8 µg/ml, 173,06 µg/ml, 152,59 µg/ml, 151,99 µg/ml, 110,16 µg/ml.
2. Hasil dari identifikasi kandungan fitokimia menunjukkan bahwa ekstrak etanol, fraksi etil asetat 100%, fraksi etil asetat:metanol (3:2), fraksi etil asetat:metanol (2:3) dan fraksi metanol 100% memiliki kandungan kimia fenol, flavonoid, dan tanin.
3. Kadar total fenol yang terkandung dalam ekstrak biji salak pondoh sebesar 9,36 mgGAE/100 gram sampel.

5.2. Saran

1. Perlu diteliti lebih lanjut dengan melakukan uji aktivitas antioksidan menggunakan metode lain agar dapat diketahui dengan perbandingan metode.
2. Perlu diteliti lebih lanjut dengan melakukan fraksinasi dalam jumlah sampel yang lebih banyak sehingga mendapatkan rendemen fraksi lebih banyak dan dapat diuji total fenol keseluruhan fraksi.
3. Perlu dilakukan pengujian kadar total senyawa lain yang mampu bertindak sebagai antioksidan.

DAFTAR PUSTAKA

- (1) Suhartono, E dan Setiawan, B., 2006, *Radikal Bebas, Antioksidan dan Penyakit*, Pustaka Buana, Banjarbaru, p.13.
- (2) Singh, RP., Sharad, S., Kapur, S., 2004, Free Radicals and Oxidative Stress In Neurodegenerative Diseases: Relevance Of Dietary Antioxidants, *Journal Indian Academy of Clinical Medicine*, 5(3):219.
- (3) Winarsi, H., 2011, *Antioksidan Alami dan Radikal Bebas Potensi dan Aplikasinya Dalam Kesehatan*, Kanisius, Yogyakarta, p.19,32,78-81.
- (4) Sen, S., Chakraborty, R., Sridhar, C., Reddy, YSR., De, B., 2010, Free Radicals, Antioxidants, Diseases and Phytomedicines: Current Status and Future Prospect, *International Journal Pharmaceutical Sciences Review and Research*, 3(1):94.
- (5) Nidhi, S and Gaurav, S., 2012, Antioxidants From Natural Source : Ray Of Hope For Oxidative Damage, *Journal of pharmaceutical and scientific innovation*, 1(4):15.
- (6) Hala, MA., 2013, Comparative Antioxidant Activity Study of Some Edible Plants Used Spices in Egypt, *Journal of American Science*, 7(1):1118-1121.
- (7) Puryono, RI., Puspitasari, E., Ningsih, IY., 2015, Uji Aktivitas Antioksidan dari Berbagai Varietas Ekstrak Buah Salak (*Salacca zalacca* (Gaertn.) Voss Varieties using DPPH, *Artikel Ilmiah Hasil Penelitian Mahasiswa*; 4-5.
- (8) Rukmana, HR., 2008, *Bertanam Buah-buahan di Pekarangan*, Kanisius, Yogyakarta, p.52.
- (9) Sahputra, FM., 2008, Potensi Ekstrak Kulit dan Daging Buah Salak Sebagai Antidiabetes, *Skripsi*, Program Studi Biokimia FMIPA Institut Pertanian Bogor, Bogor, p.1-10.
- (10) Fitrianiingsih, SP., Lestari, F., Aminah, S., 2012, Uji Efek Antioksidan Ekstrak Etanol Kulit Buah Salak [*Salacca zalacca* (Gaertner) Voss] dengan Metode Peredaman DPPH, *Prosiding Sains, Teknologi dan Ilmu Kesehatan*, 4(1):51.
- (11) Purwanto, N., Rismawati, E., Sadiyah, esti R., 2015, Uji Sitotoksik Ekstrak Biji Salak, *Prosiding SPeSIA Prodi Farmasi Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam*; 616-22
- (12) Dai, J and Mumper, RJ., 2010, Plant Phenolics: Extraction, Analysis and Their Antioxidant and Anticancer Properties, *Molecules*, 15(10):7325-26.
- (13) Ndhlala, AR., Moyo, M., Van, Staden J., 2010, Natural Antioxidants: Fascinating or Mythical Biomolecules?, *Molecules*, 15(10):6908-10.
- (14) Rukmana, R., 2007, *Salak Prospek Agribisnis dan Usaha Tani*, Kanisius, Yogyakarta, p.18-19.
- (15) Sunarjono, DHH., 2008, *21 Jenis Tanaman Buah*, Penebar Swadaya, Jakarta, p.79.
- (16) Ariviani, S dan Parnanto, NHR., 2013, Kapasitas Antioksidan Buah Salak (*salacca edulis* Reinw.) Kultivar Pondoh, Nglumut dan Bali Serta Korelasinya Dengan Kadar Fenolik Total dan Vitamin C, *Agritech*, 33(3):330.

- (17) Priyatno, LHA., Sukandar, EY., Ibrahim, S., Adnyana, IK., 2012, Antihyperuricemic Effect Of Ethanol Extract of Snake Fruit (*Salacca edulis Reinw.*) var. Bongkok on Wistar Male Rat, *Journal of Food Science and Engineering*, 2:271–6.
- (18) Latuconsina, NH dan Citraningtyas, G., 2014, Uji Efektivitas Diuretik Ekstrak Etanol Biji Salak (*Salacca zalacca* varietas *zalacca* (gaert .) Voss) Pada Tikus Putih Jantan Galur Wistar (*Rattus norvegicus*). *Jurnal Ilmiah – Universitas Sam Ratulangi*, 3(3):176–81.
- (19) Anonim, *Farmakope Indonesia*, 1995, 4th ed, Departemen Kesehatan Direktorat Jenderal Pengawasan Obat dan Makanan, Jakarta, p.7.
- (20) Anonim, *Parameter Standar Umum Ekstrak Tumbuhan Obat*, 1st ed, Departemen Kesehatan RI, Direktorat Pengawasan Obat, Jakarta, p.10-11.
- (21) Mahdi, S and Altikriti, Y., 2011, *Extraction Of Natural Products*, UPPSALA Universitas, Swedia, p.1–7.
- (22) Stahl, E., 1985, *Analisis Obat Secara Kromatografi dan Mikroskopi*, ITB, Bandung, p.3-8.
- (23) Gandjar, IG dan Rohman, A., 2012, *Kimia farmasi Analisis*, 10th ed, Pustaka Pelajar, Yogyakarta: Pustaka Pelajar, p.362 .
- (24) Xu, R., Ye, Y., Zhao, W., 2010, *Introduction To Natural Products Chemistry*, CRC Press, London, p.15.
- (25) Pham-Huy, LA., He, H., Pham-Huy, C., 2008, Free Radicals, Antioxidants In Disease and Health, *International Journal of Biomedical Science*, 4(2):90.
- (26) Al-Dalaen., SM and Al-Qitait., AI, 2014, Review Article: Oxidative Stress Versus Antioxidants, *American Journal of Bioscience and Bioengineering*, 2(5):60.
- (27) Bhattacharya, M and Chakraborty, S., 2015, Free Radicals and Naturally Occurring Antioxidants, *Journal of Pharmacognosy and Phytochemistry* ;3(3):3–5.
- (28) Syamsudin, 2013, *Nutrasetikal*, Graha Ilmu, Jakarta, p.66-72.
- (29) Prior, R., Wu, X., Schaich, K., 2005, Standarized Methods For the Determination of Antioxidant Capacity and Phenolics In Foods and Dietary Supplements, *Journal of Agricultural Food Chemistry*, 53(10):4296.
- (30) Boligon, AA., Machado, MM., Athayde, ML., 2014, Technical Evaluation of Antioxidant Activity, *Medicinal Chemistry*, 4(7):517–8.
- (31) Pisoschi, AM., Cheregi, MC., Danet, AF., 2009, Total Antioxidant Capacity Of Some Commercial Fruit Juices: Electrochemical and Spectrophotometrical Approaches, *Molecules*, 14(1):482.
- (32) Panda, SK, 2012, *Assay Guide Comparison for Enzymatic and Non-Enzymatic Antioxidant Activities with Special Reference to Medical Plants*, Department of Biotechnology, North Orissa University, Baripada, Odisha, India., p.388.
- (33) Putra, YMP., 2014, *Warga Sleman Kembangkan Kopi Bubuk dari Biji Salak*. Republika; Available from: <http://www.republika.co.id/berita/nasional/daerah/14/10/17/ndkibm-warga-sleman-kembangkan-kopi-bubuk-dari-biji-salak>. diakses pada tanggal 16 Maret 2016 pukul 10.50 wib.

- (34) Harborne, JB., 1984, *Metode Fitokimia Penuntun Cara Modern Menganalisis Tumbuhan*, ITB, Bandung, p.49,53,105,259.
- (35) Wagner, H and Bladt, S., 2009, *Plant Drug Analysis A Thin Layer Chromatography Atlas*. 2nd ed. Springer, London, p.6,22, 353.
- (36) Molyneux, P., 2004, The Use of the Stable Free Radical Diphenylpicrylhydrazyl (DPPH) for Estimating Antioxidant Activity, *Songklanakarin Journal of Science and Technology*, 26(2);212.
- (37) Priftis, A., Stagos, D., Konstantinopoulos, K., Tsitsimpikou, C., Spandidos, D a., Tsatsakis, AM., Manolis N, T., Demetrios, K., 2015, Comparison Of Antioxidant Activity Between Green and Roasted Coffee Beans Using Molecular Methods, *Molecular Medicine Reports*, 12(5):7293–302.
- (38) Doughari, JH., 2012, *Phytochemicals: Extraction Methods, Basic Structures and Mode Of Action As Potential Chemotherapeutic Agents*, Department of Microbiology, School of Pure and Applied Sciences, Federal University of Technology, Nigeria, p.1-32.
- (39) Prasetyo dan Inorihah, E., 2013, *Pengelolaan Budidaya Tanaman Obat-Obatan (Bahan Siplisia)*, Bengkulu: Badan Penerbitan Fakultas Pertanian UNIB, p.19 .
- (40) Gandjar, IG dan Rohman, A., 2012, *Analisis Obat Secara Spektrofotometri dan Kromatografi*, 1st ed, Yogyakarta: Pustaka Pelajar, p.347.
- (41) Shalaby, EA and Shanab, SMM., 2013, Antioxidant Compounds, Assays of Determination and Mode of Action, *African Journal of Pharmacy and Pharmacology*, 7(10):528–39.
- (42) Deduke, C., Timsina, B., Piercey-normore, MD., 2012, *Effect of Environmental Change on Secondary Metabolite Production in Lichen-Forming Fungi*, Internatinal Perpectives Glob Environ Chang, p.197–230.
- (43) Khoddami, A., Wilkes, MA., Roberts, TH., 2013, Techniques For Analysis of Plant Phenolic Compounds, *Molecules*, 18(2):2328–75.
- (44) Mohammedi, Z and Atik, F., 2011, Impact of Solvent Extraction Type on Total Polyphenols Content and Biological Activity From *Tamarix Aphylla* (L.) Karst, *International Journal of Pharma Bio Sciences*, 2(1):609–14.

LAMPIRAN

Lampiran 1 Hasil Determinasi



UNIVERSITAS GADJAH MADA
FAKULTAS BIOLOGI
LABORATORIUM SISTEMATIKA TUMBUHAN
Jalan Teknika Selatan Sekip Utara Yogyakarta 55281 Telpn (0274) 6492262/6492272; Fax: (0274)580839

SURAT KETERANGAN
Nomer : 0806/S.Tb. / IV / 2016

Yang bertanda tangan dibawah ini, Kepala Laboratorium Sistematika Tumbuhan Fakultas Biologi UGM, menerangkan dengan sesungguhnya bahwa,

Nama : Nur Khasanah
 NIM. : 12613234
 Asal instansi : Fakultas MIPA – UII Yogyakarta

telah melakukan identifikasi tumbuhan dengan hasil sebagai berikut,

| NO. | FAMILIA | GENUS | SPESIES | NAMA DAERAH |
|-----|------------------------|----------------|--|-------------|
| 1 | Arecaceaea (Palmae) | <i>Salacca</i> | <i>Salacca zalacca</i> (Gaertn.) Voss. Syn., <i>Salacca edulis</i> Reinw. | Salak |

identifikasi tersebut dibantu oleh Dr. Purnomo, M.S.
Demikian surat keterangan ini diberikan untuk dapat dipergunakan seperlunya.

Mengetahui,
Dekan Fakultas Biologi
Universitas Gadjah Mada



Prof. Dr. Suwarno Hadisusanto, S.U.
NIP. 195411161983031002

Yogyakarta, 18 April 2016

Kepala Laboratorium
Sistematika Tumbuhan
Fakultas Biologi UGM



Dr. Purnomo, M.S.
NIP. 195504211982031005

Lampiran 2 Hasil Perhitungan persen Rendemen Ekstrak dan Fraksi

1. Persen Rendemen Ekstrak Etanol

Total serbuk biji salak = 300 g

$$\begin{aligned} \text{Jumlah ekstrak dalam cawan} &= (\text{jumlah ekstrak} + \text{cawan}) - \text{cawan} \\ &= 194,0331 \text{ g} - 150,56 \text{ g} \\ &= 43,47 \text{ g} \end{aligned}$$

% Rendemen Ekstrak Etanol Biji Salak =

$$\frac{\text{Bobot ekstrak etanol biji salak}}{\text{Bobot serbuk biji salak}} \times 100 \% = \frac{43,47}{300} \times 100 \% = 14,49 \%$$

2. Persen Rendemen Fraksi

Total ekstrak etanol biji salak = 5 g

A. Jumlah fraksi n-heksan dalam cawan = (jumlah fraksi + cawan) – cawan

$$\begin{aligned} &= 64,068 \text{ g} - 64,06 \text{ g} \\ &= 0,008 \text{ g} \end{aligned}$$

% Rendemen fraksi n-heksan =

$$\frac{\text{Bobot fraksi n-heksan biji salak}}{\text{Bobot ekstrak etanol biji salak}} \times 100 \% = \frac{0,0083}{5} \times 100 \% = 0,116 \%$$

B. Jumlah fraksi n-heksan:etil asetat (3:2) dalam cawan = (jumlah fraksi + cawan) – cawan

$$\begin{aligned} &= 63,661 \text{ g} - 63,651 \text{ g} \\ &= 0,010 \text{ g} \end{aligned}$$

% Rendemen Fraksi n-heksan:etil asetat (3:2) =

$$\frac{\text{Bobot fraksi n-heksan:etil asetat (3:2) biji salak}}{\text{Bobot ekstrak etanol biji salak}} \times 100 \% = \frac{0,010}{5} \times 100 \% = 0,2 \%$$

C. Jumlah fraksi n-heksan:etil asetat (2:3) dalam cawan = (jumlah fraksi + cawan) – cawan

$$\begin{aligned} &= 62,510 \text{ g} - 62,50 \text{ g} \\ &= 0,010 \text{ g} \end{aligned}$$

% Rendemen Fraksi n-heksan:etil asetat (2:3) =

$$\frac{\text{Bobot fraksi n-heksan:etil asetat (2:3) biji salak}}{\text{Bobot ekstrak etanol biji salak}} \times 100 \% = \frac{0,010}{5} \times 100 \% = 0,2 \%$$

D. Jumlah fraksi etil asetat dalam cawan = (jumlah fraksi + cawan) – cawan

$$\begin{aligned} &= 63,132 \text{ g} - 63,121 \text{ g} \\ &= 0,011 \text{ g} \end{aligned}$$

% Rendemen Fraksi etil asetat =

$$\frac{\text{Bobot fraksi etil asetat biji salak}}{\text{Bobot ekstrak etanol biji salak}} \times 100\% = \frac{0,011}{5} \times 100\% = 0,22 \%$$

E. Jumlah fraksi etil asetat:metanol (3:2) dalam cawan = (jumlah fraksi +cawan) – cawan
 = 124,351 g – 124,27 g
 = 0,081 g

% Rendemen Fraksi etil asetat:metanol (3:2) =

$$\frac{\text{Bobot fraksi etil asetat:metanol (3:2) biji salak}}{\text{Bobot ekstrak etanol biji salak}} \times 100\% = \frac{0,081}{5} \times 100\% = 1,62 \%$$

F. Jumlah fraksi etil asetat:methanol (2:3) dalam cawan = (jumlah fraksi +cawan) – cawan
 = 124,48 g – 124,38 g
 = 0,1 g

% Rendemen Fraksi etil asetat:metanol (2:3) =

$$\frac{\text{Bobot fraksi etil asetat:metanol (2:3) biji salak}}{\text{Bobot ekstrak etanol biji salak}} \times 100\% = \frac{0,1}{5} \times 100\% = 2 \%$$

G. Jumlah fraksi metanol dalam cawan = (jumlah fraksi +cawan) – cawan
 = 123,99 g – 123,78 g
 = 0,21 g

% Rendemen Fraksi metanol =

$$= \frac{\text{Bobot fraksi metanol biji salak}}{\text{Bobot ekstrak etanol biji salak}} \times 100\% = \frac{0,21}{5} \times 100\% = 4,2 \%$$

3. Pembuatan larutan reagen semprot

A. DPPH 50 µg/ml dalam 25 ml

$$\frac{50 \mu g}{ml} = \frac{\mu g}{25 ml} = 1250 \mu g$$

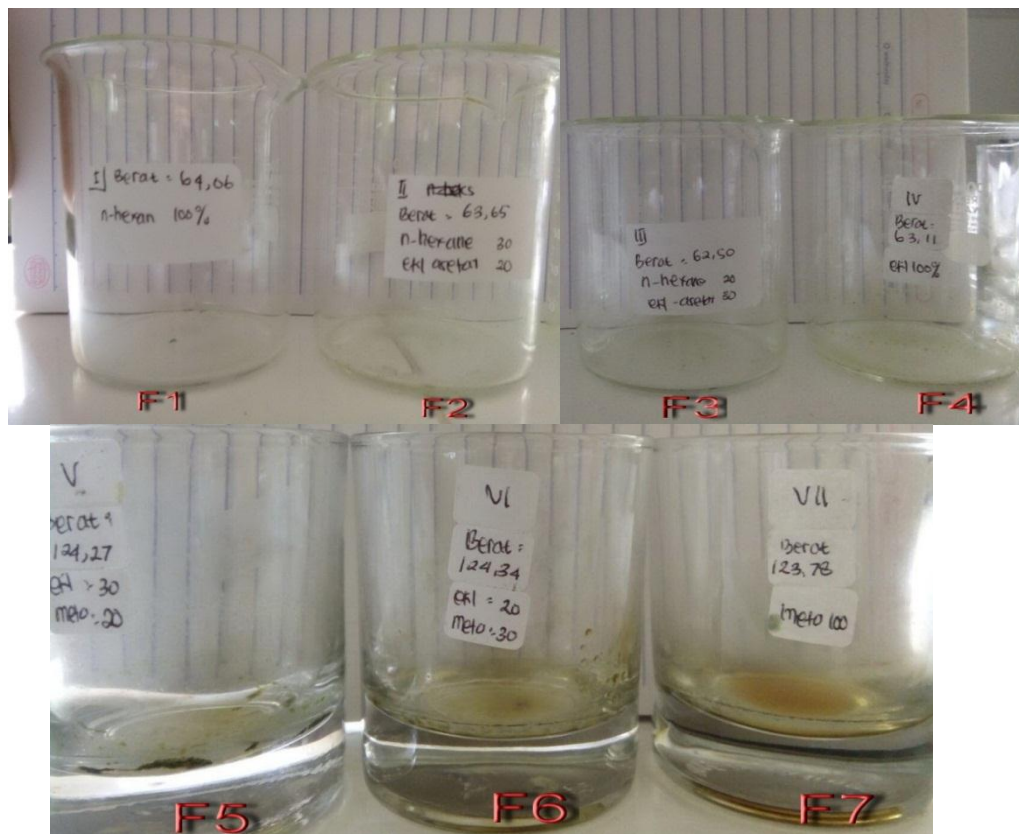
$$= 1,25 \text{ mg}$$

Ditimbang serbuk DPPH sebanyak 1,25 mg dilarutkan dengan metanol p.a dalam labu 25 ml sampai tanda batas.

B. AlCl₃ 5 %

Ditimbang sebanyak 1,25 gram AlCl₃ dilarutkan dengan aquades dalam labu 25 ml sampai tanda batas.

Lampiran 3 Hasil Fraksinasi



Keterangan:

- F1 : Fraksi n-heksan 100%
- F2: Fraksi n-heksan:etil asetat (3:2)
- F3: Fraksi n-heksan:etil asetat (2:3)
- F4: Fraksi etil asetat 100%
- F5: Fraksi etil asetat:metanol (3:2)
- F6: Fraksi etil asetat: metanol (2:3)
- F7: Fraksi metanol 100%

Lampiran 4 Perhitungan Pembuatan Larutan Stok

A. Perhitungan pembuatan larutan stok DPPH 50 µg/ml

50 µg/ml dalam 200 ml

$$\frac{50 \mu g}{ml} = \frac{\mu g}{200 ml} = 10000 \mu g$$

$$= 10 mg$$

Ditimbang sebanyak 10 mg DPPH dilarutkan dengan metanol p.a dalam labu 200 ml sampai tanda batas

B. Perhitungan pembuatan larutan stok standar vitamin C 1000 µg/ml

1000 µg/ml dalam 10 ml

$$\frac{1000 \mu g}{ml} = \frac{\mu g}{10 ml} = 10000 \mu g$$

$$= 10 mg$$

Ditimbang sebanyak 10 mg vitamin C dilarutkan dengan aquades dalam labu 10 ml sampai tanda batas

C. Perhitungan seri kadar standar vitamin C

Dibuat seri kadar vitamin C 0,15625; 0,3125; 0,625; 1,25; 2,5 µg/ml.

- Dari larutan stok 1000 µg/ml diencerkan menjadi larutan stok 100 µg/ml

$$M_1 \cdot V_1 = M_2 \cdot V_2$$

$$1000 \mu g/ml \cdot V_1 = 100 \mu g/ml \cdot 10 ml$$

$$V_1 = 1 ml$$
- Dari larutan stok 100 µg/ml diencerkan menjadi 10 µg/ml

$$M_1 \cdot V_1 = M_2 \cdot V_2$$

$$100 \mu g/ml \cdot V_1 = 10 \mu g/ml \cdot 10 ml$$

$$V_1 = 1 ml$$
- Dari 10 µg/ml diencerkan menjadi 2.5 µg/ml

$$M_1 \cdot V_1 = M_2 \cdot V_2$$

$$10 \mu g/ml \cdot V_1 = 2,5 \mu g/ml \cdot 10 ml$$

$$V_1 = 2,5 ml$$
- Dari 2,5 µg/ml diencerkan menjadi 1,25 µg/ml

$$M_1 \cdot V_1 = M_2 \cdot V_2$$

$$2,5 \mu g/ml \cdot V_1 = 1,25 \mu g/ml \cdot 10 ml$$

$$V_1 = 5 ml$$
- Dari 1.25 µg/ml diencerkan menjadi 0,625 µg/ml

$$M_1 \cdot V_1 = M_2 \cdot V_2$$

$$1,25 \mu\text{g/ml} \cdot V_1 = 0,625 \mu\text{g/ml} \cdot 10 \text{ ml}$$

$$V_1 = 5 \text{ ml}$$

- Dari 0,625 $\mu\text{g/ml}$ diencerkan menjadi 0,3125 $\mu\text{g/ml}$

$$M_1 \cdot V_1 = M_2 \cdot V_2$$

$$0,625 \mu\text{g/ml} \cdot V_1 = 0,3125 \mu\text{g/ml} \cdot 10 \text{ ml}$$

$$V_1 = 5 \text{ ml}$$

- Dari 0,3125 $\mu\text{g/ml}$ diencerkan menjadi 0,15625 $\mu\text{g/ml}$

$$M_1 \cdot V_1 = M_2 \cdot V_2$$

$$0,3125 \mu\text{g/ml} \cdot V_1 = 0,15625 \mu\text{g/ml} \cdot 10 \text{ ml}$$

$$V_1 = 5 \text{ ml}$$

D. Perhitungan pembuatan larutan stok ekstrak dan fraksi

- Larutan stok ekstrak biji salak 1000 $\mu\text{g/ml}$

1000 $\mu\text{g/ml}$ dalam 10 ml

$$\frac{1000 \mu\text{g}}{\text{ml}} = \frac{\mu\text{g}}{10 \text{ ml}} = 10000 \mu\text{g}$$

$$= 10 \text{ mg}$$

Ditimbang sebanyak 10 mg ekstrak kental etanol biji salak dilarutkan dengan metanol p.a dalam labu 10 ml sampai tanda batas

- Larutan stok fraksi etil asetat, etil asetat:metanol (3:2), etil asetat:metanol (2:3), dan fraksi metanol dibuat dalam 1000 $\mu\text{g/ml}$

1000 $\mu\text{g/ml}$ dalam 10 ml

$$\frac{1000 \mu\text{g}}{\text{ml}} = \frac{\mu\text{g}}{10 \text{ ml}} = 10000 \mu\text{g}$$

$$= 10 \text{ mg}$$

Ditimbang masing-masing sebanyak 10 mg fraksi etil asetat, etil asetat:metanol (3:2), etil asetat:metanol (2:3), dan fraksi metanol biji salak dilarutkan dengan metanol p.a dalam labu 10 ml sampai tanda batas

E. Perhitungan seri kadar ekstrak dan fraksi biji salak.

Ekstrak dan fraksi dibuat dalam seri kadar yang sama yaitu 9,375; 18,75; 37,5; 75, 150 $\mu\text{g/ml}$.

- Dari larutan stok 1000 $\mu\text{g/ml}$ diencerkan 150 $\mu\text{g/ml}$

$$M_1 \cdot V_1 = M_2 \cdot V_2$$

$$1000 \mu\text{g/ml} \cdot V_1 = 150 \mu\text{g/ml} \cdot 10 \text{ ml}$$

$$V_1 = 1,5 \text{ ml}$$

- Dari larutan 150 $\mu\text{g/ml}$ diencerkan menjadi 75 $\mu\text{g/ml}$

$$M_1 \cdot V_1 = M_2 \cdot V_2$$

$$150 \mu\text{g/ml} \cdot V_1 = 75 \mu\text{g/ml} \cdot 10 \text{ ml}$$

$$V_1 = 5 \text{ ml}$$

- Dari larutan 75 $\mu\text{g/ml}$ diencerkan menjadi 37,5 $\mu\text{g/ml}$

$$M_1 \cdot V_1 = M_2 \cdot V_2$$

$$75 \mu\text{g/ml} \cdot V_1 = 37,5 \mu\text{g/ml} \cdot 10 \text{ ml}$$

$$V_1 = 5 \text{ ml}$$

- Dari larutan stok 37,5 $\mu\text{g/ml}$ diencerkan menjadi larutan stok 18,75 $\mu\text{g/ml}$

$$M_1 \cdot V_1 = M_2 \cdot V_2$$

$$37,5 \mu\text{g/ml} \cdot V_1 = 18,75 \mu\text{g/ml} \cdot 10 \text{ ml}$$

$$V_1 = 5 \text{ ml}$$

- Dari larutan stok 18,75 $\mu\text{g/ml}$ diencerkan menjadi larutan stok 9,375 $\mu\text{g/ml}$

$$M_1 \cdot V_1 = M_2 \cdot V_2$$

$$18,75 \mu\text{g/ml} \cdot V_1 = 9,375 \mu\text{g/ml} \cdot 10 \text{ ml}$$

$$V_1 = 5 \text{ ml}$$

F. Perhitungan pembuatan larutan stok standar asam galat 200 $\mu\text{g/ml}$

200 $\mu\text{g/ml}$ dalam 100 ml

$$\frac{200 \mu\text{g}}{\text{ml}} = \frac{\mu\text{g}}{100 \text{ ml}} = 20000 \mu\text{g}$$

$$= 20 \text{ mg}$$

Ditimbang sebanyak 20 mg asam galat dilarutkan dengan metanol p.a dalam labu 100 ml sampai tanda batas.

G. Perhitungan seri kadar standar asam galat

Dibuat seri kadar standar asam galat 6,25; 12,5; 25, 50, 100 $\mu\text{g/ml}$

- Dari larutan stok 200 $\mu\text{g/ml}$ diencerkan menjadi 100 $\mu\text{g/ml}$

$$M_1 \cdot V_1 = M_2 \cdot V_2$$

$$200 \mu\text{g/ml} \cdot V_1 = 100 \mu\text{g/ml} \cdot 5 \text{ ml}$$

$$V_1 = 2,5 \text{ ml}$$

- Dari larutan stok 100 $\mu\text{g/ml}$ diencerkan 50 $\mu\text{g/ml}$

$$M_1 \cdot V_1 = M_2 \cdot V_2$$

$$100 \mu\text{g/ml} \cdot V_1 = 50 \mu\text{g/ml} \cdot 10 \text{ ml}$$

$$V_1 = 5 \text{ ml}$$

- Dari larutan stok 50 $\mu\text{g/ml}$ diencerkan 25 $\mu\text{g/ml}$

$$M_1 \cdot V_1 = M_2 \cdot V_2$$

$$50 \mu\text{g/ml} \cdot V_1 = 25 \mu\text{g/ml} \cdot 10 \text{ ml}$$

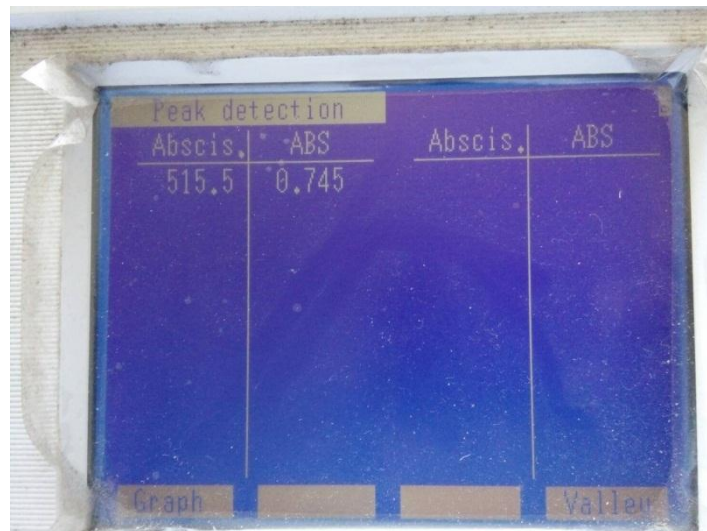
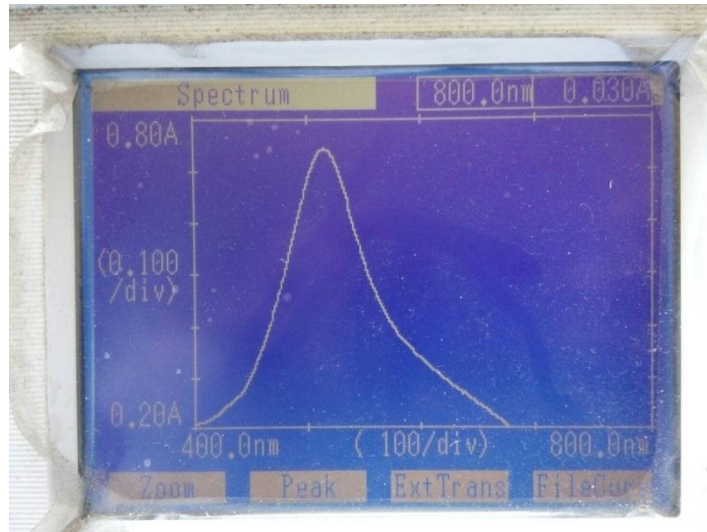
$$V_1 = 5 \text{ ml}$$

- Dari larutan stok 25 $\mu\text{g/ml}$ diencerkan 12,5 $\mu\text{g/ml}$

$$M_1 \cdot V_1 = M_2 \cdot V_2$$
$$25 \mu\text{g/ml} \cdot V_1 = 12,5 \mu\text{g/ml} \cdot 10 \text{ ml}$$
$$V_1 = 5 \text{ ml}$$

- Dari larutan stok 12,5 $\mu\text{g/ml}$ diencerkan 6,25 $\mu\text{g/ml}$

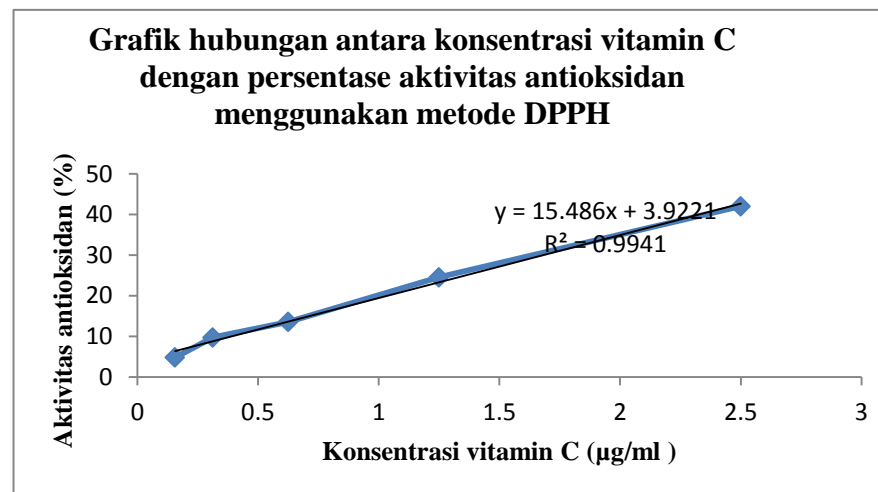
$$M_1 \cdot V_1 = M_2 \cdot V_2$$
$$12,5 \mu\text{g/ml} \cdot V_1 = 6,25 \mu\text{g/ml} \cdot 10 \text{ ml}$$
$$V_1 = 5 \text{ ml}$$

Lampiran 5 Panjang Gelombang DPPH

Lampiran 6 Perhitungan Nilai IC₅₀

A. Perhitungan IC₅₀ vitamin C

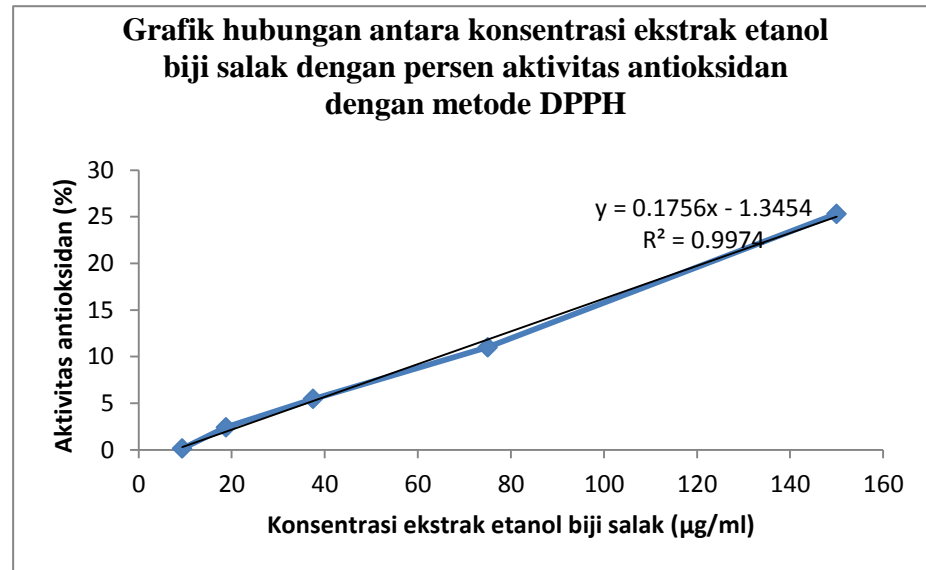
| Blanko | | | Blanko rata-rata |
|--------|-------|-------|------------------|
| 1 | 2 | 3 | |
| 0,471 | 0,479 | 0,481 | 0,477 |
| 0,471 | 0,479 | 0,481 | 0,477 |
| 0,471 | 0,479 | 0,481 | 0,477 |
| 0,471 | 0,479 | 0,481 | 0,477 |
| 0,471 | 0,479 | 0,481 | 0,477 |



| Kadar (µg/ml) | Absorbansi | | | aktivitas antioksidan (%) | aktivitas antioksidan (%) | aktivitas antioksidan (%) | Rata-rata aktivitas antioksidan (%) | IC50 1 (µg/ml) | IC50 2 (µg/ml) | IC50 3 (µg/ml) | Rata-rata IC50 (µg/ml) | SD | RSD |
|---------------|------------|-------|-------|---------------------------|---------------------------|---------------------------|-------------------------------------|----------------|----------------|----------------|------------------------|------|-----|
| | 1 | 2 | 3 | | | | | | | | | | |
| 0,15625 | 0,455 | 0,453 | 0,454 | 4,612 | 5,031 | 4,821 | 4,821 | 2,810 | 3,064 | 3,064 | 2,979 | 0,15 | 4,9 |
| 0,3125 | 0,432 | 0,43 | 0,43 | 9,433 | 9,853 | 9,853 | 9,713 | | | | | | |
| 0,625 | 0,405 | 0,414 | 0,418 | 15,094 | 13,207 | 12,368 | 13,556 | | | | | | |
| 1,25 | 0,348 | 0,367 | 0,365 | 27,044 | 23,060 | 23,480 | 24,528 | | | | | | |
| 2,5 | 0,269 | 0,28 | 0,281 | 43,605 | 41,299 | 41,090 | 41,998 | | | | | | |

B. Perhitungan IC₅₀ ekstrak etanol biji salak

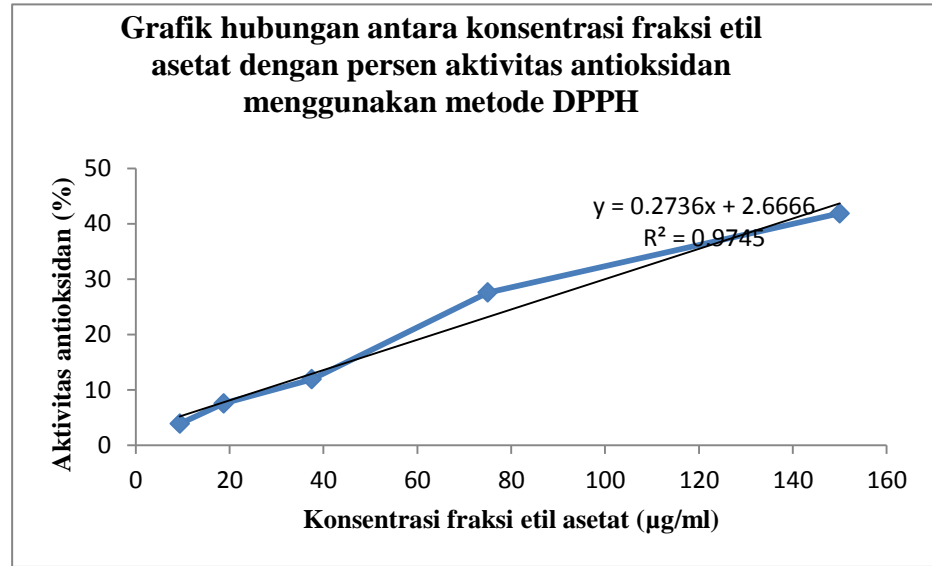
| Blanko | | | Blanko rata-rata |
|--------|-------|-------|------------------|
| 1 | 2 | 3 | |
| 0,749 | 0,742 | 0,745 | 0,745 |
| 0,749 | 0,742 | 0,745 | 0,745 |
| 0,749 | 0,742 | 0,745 | 0,745 |
| 0,749 | 0,742 | 0,745 | 0,745 |
| 0,749 | 0,742 | 0,745 | 0,745 |



| Kadar (µg/ml) | Absorbansi | | | Aktivitas antioksidan (%) | Aktivitas antioksidan (%) | aktivitas antioksidan (%) | Rata-rata persen aktivitas antioksidan (%) | IC ₅₀ 1 (µg/ml) | IC ₅₀ 2 (µg/ml) | IC ₅₀ 3 (µg/ml) | Rata-rata IC ₅₀ (µg/ml) | SD | RSD |
|---------------|------------|-------|-------|---------------------------|---------------------------|---------------------------|--|----------------------------|----------------------------|----------------------------|------------------------------------|-------|------|
| | 1 | 2 | 3 | | | | | | | | | | |
| 9,375 | 0,743 | 0,747 | 0,743 | 0,313 | -0,223 | 0,313 | 0,134 | 273,258 | 324,542 | 283,593 | 293,798 | 27,12 | 0,09 |
| 18,75 | 0,725 | 0,731 | 0,726 | 2,728 | 1,923 | 2,593 | 2,415 | | | | | | |
| 37,5 | 0,694 | 0,711 | 0,709 | 6,887 | 4,606 | 4,874 | 5,456 | | | | | | |
| 75 | 0,646 | 0,674 | 0,67 | 13,327 | 9,570 | 10,107 | 11,001 | | | | | | |
| 150 | 0,545 | 0,577 | 0,548 | 26,878 | 22,584 | 26,475 | 25,313 | | | | | | |

C. Perhitungan IC₅₀ Fraksi etil asetat

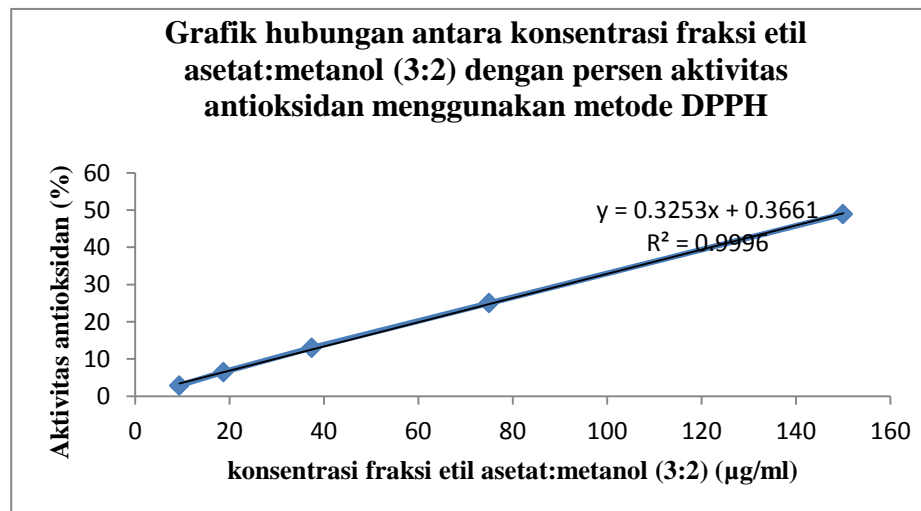
| Blanko | | | Blanko rata-rata |
|--------|-------|-------|------------------|
| 1 | 2 | 3 | |
| 0,749 | 0,742 | 0,745 | 0,745 |
| 0,749 | 0,742 | 0,745 | 0,745 |
| 0,749 | 0,742 | 0,745 | 0,745 |
| 0,749 | 0,742 | 0,745 | 0,745 |
| 0,749 | 0,742 | 0,745 | 0,745 |



| Kadar (µg/ml) | Absorbansi | | | aktivitas antioksidan (%) | aktivitas antioksidan (%) | aktivitas antioksidan (%) | Rata-rata aktivitas antioksidan (%) | IC ₅₀ 1 (µg/ml) | IC ₅₀ 2 (µg/ml) | IC ₅₀ 3 (µg/ml) | Rata-rata IC ₅₀ (µg/ml) | SD | RSD |
|---------------|------------|-------|-------|---------------------------|---------------------------|---------------------------|-------------------------------------|----------------------------|----------------------------|----------------------------|------------------------------------|------|------|
| | 1 | 2 | 3 | | | | | | | | | | |
| 9,375 | 0,719 | 0,718 | 0,712 | 3,533 | 3,667 | 4,472 | 3,890 | 170,264 | 175,206 | 173,716 | 173,062 | 2,53 | 1,46 |
| 18,75 | 0,694 | 0,69 | 0,683 | 6,887 | 7,423 | 8,363 | 7,558 | | | | | | |
| 37,5 | 0,66 | 0,665 | 0,644 | 11,449 | 10,778 | 13,595 | 11,940 | | | | | | |
| 75 | 0,542 | 0,54 | 0,537 | 27,280 | 27,549 | 27,951 | 27,593 | | | | | | |
| 150 | 0,428 | 0,438 | 0,434 | 42,576 | 41,234 | 41,771 | 41,860 | | | | | | |

D. Perhitungan IC₅₀ fraksi etil asetat:metanol (3:2)

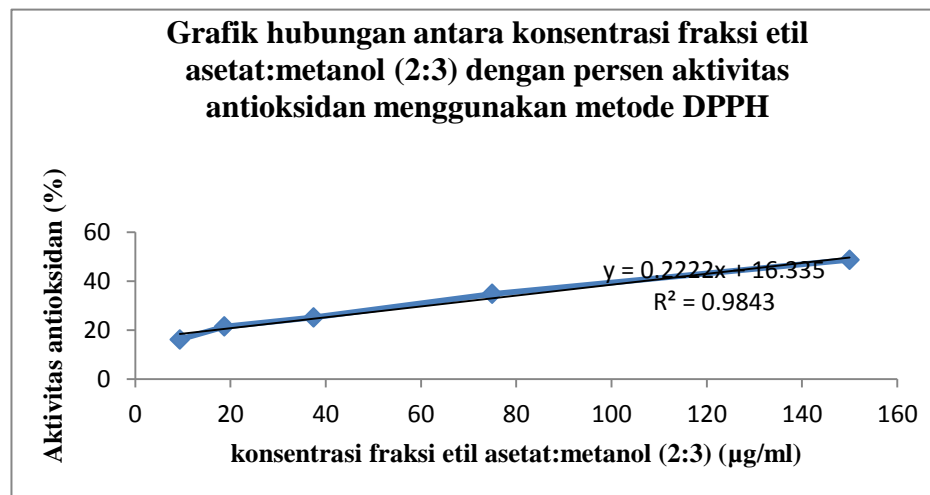
| Blanko | | | Blanko rata-rata |
|--------|-------|-------|------------------|
| 1 | 2 | 3 | |
| 0,718 | 0,712 | 0,721 | 0,717 |
| 0,718 | 0,712 | 0,721 | 0,717 |
| 0,718 | 0,712 | 0,721 | 0,717 |
| 0,718 | 0,712 | 0,721 | 0,717 |
| 0,718 | 0,712 | 0,721 | 0,717 |



| Kadar (µg/ml) | Absorbansi | | | aktivitas antioksidan (%) | aktivitas antioksidan (%) | aktivitas antioksidan (%) | Rata-rata aktivitas antioksidan (%) | IC ₅₀ 1 (µg/ml) | IC ₅₀ 2 (µg/ml) | IC ₅₀ 3 (µg/ml) | Rata-rata IC ₅₀ (µg/ml) | SD | RSD |
|---------------|------------|-------|-------|---------------------------|---------------------------|---------------------------|-------------------------------------|----------------------------|----------------------------|----------------------------|------------------------------------|-------|-------|
| | 1 | 2 | 3 | | | | | | | | | | |
| 9,375 | 0,698 | 0,693 | 0,698 | 2,649 | 3,347 | 2,649 | 2,882 | 153,733 | 154,863 | 149,170 | 152,589 | 3,014 | 1,975 |
| 18,75 | 0,675 | 0,674 | 0,662 | 5,857 | 5,997 | 7,670 | 6,508 | | | | | | |
| 37,5 | 0,627 | 0,626 | 0,618 | 12,552 | 12,691 | 13,807 | 13,017 | | | | | | |
| 75 | 0,545 | 0,537 | 0,531 | 23,988 | 25,104 | 25,941 | 25,011 | | | | | | |
| 150 | 0,367 | 0,372 | 0,359 | 48,814 | 48,117 | 49,930 | 48,953 | | | | | | |

E. Perhitungan IC₅₀ fraksi etil asetat:metanol (2:3)

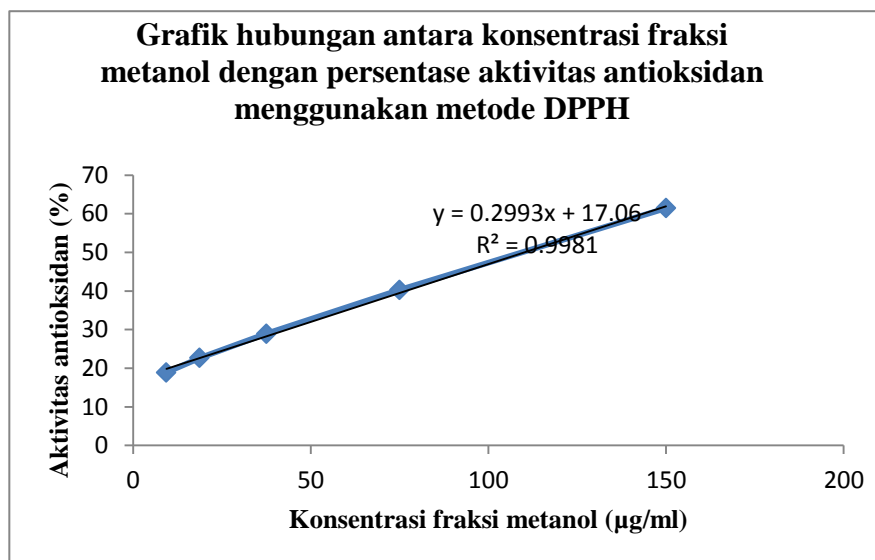
| Blanko | | | Blanko rata-rata |
|--------|-------|-------|------------------|
| 1 | 2 | 3 | |
| 0,642 | 0,643 | 0,644 | 0,745 |
| 0,642 | 0,643 | 0,644 | 0,745 |
| 0,642 | 0,643 | 0,644 | 0,745 |
| 0,642 | 0,643 | 0,644 | 0,745 |
| 0,642 | 0,643 | 0,644 | 0,745 |



| Kadar (µg/ml) | Absorbansi | | | aktivitas antioksidan (%) | aktivitas antioksidan (%) | aktivitas antioksidan (%) | Rata-rata aktivitas antioksidan (%) | IC ₅₀ 1 (µg/ml) | IC ₅₀ 2 (µg/ml) | IC ₅₀ 3 (µg/ml) | Rata-rata IC ₅₀ (µg/ml) | SD | RSD |
|---------------|------------|-------|-------|---------------------------|---------------------------|---------------------------|-------------------------------------|----------------------------|----------------------------|----------------------------|------------------------------------|------|------|
| | 1 | 2 | 3 | | | | | | | | | | |
| 9,375 | 0,617 | 0,624 | 0,633 | 17,218 | 16,279 | 15,071 | 16,189 | 155,54 | 142,227 | 158,221 | 151,997 | 8,56 | 5,63 |
| 18,75 | 0,585 | 0,588 | 0,584 | 21,511 | 21,109 | 21,645 | 21,422 | | | | | | |
| 37,5 | 0,562 | 0,566 | 0,545 | 24,597 | 24,060 | 26,878 | 25,178 | | | | | | |
| 75 | 0,479 | 0,485 | 0,494 | 35,733 | 34,928 | 33,720 | 34,794 | | | | | | |
| 150 | 0,391 | 0,363 | 0,394 | 47,540 | 51,296 | 47,137 | 48,658 | | | | | | |

F. Perhitungan IC₅₀ fraksi metanol

| Blanko | | | Blanko rata-rata |
|--------|-------|-------|------------------|
| 1 | 2 | 3 | |
| 0,642 | 0,643 | 0,644 | 0,745 |
| 0,642 | 0,643 | 0,644 | 0,745 |
| 0,642 | 0,643 | 0,644 | 0,745 |
| 0,642 | 0,643 | 0,644 | 0,745 |
| 0,642 | 0,643 | 0,644 | 0,745 |

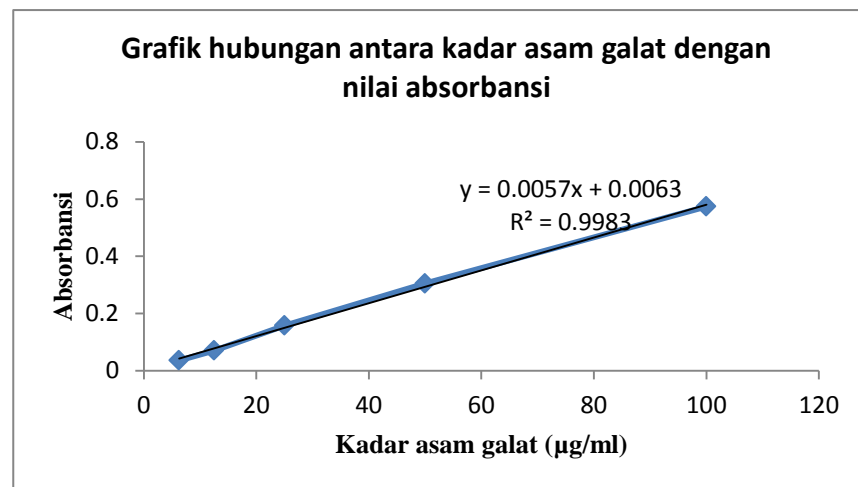


| Kadar (µg/ml) | Absorbansi | | | aktivitas antioksidan (%) | aktivitas antioksidan (%) | aktivitas antioksidan (%) | Rata-rata aktiivtas antioksidan (%) | IC ₅₀ 1 (µg/ml) | IC ₅₀ 2 (µg/ml) | IC ₅₀ 3 (µg/ml) | Rata-rata IC ₅₀ (µg/ml) | SD | RSD |
|---------------|------------|-------|-------|---------------------------|---------------------------|---------------------------|-------------------------------------|----------------------------|----------------------------|----------------------------|------------------------------------|------|------|
| | 1 | 2 | 3 | | | | | | | | | | |
| 9,375 | 0,609 | 0,595 | 0,609 | 18,291 | 20,169 | 18,291 | 18,917 | 114,731 | 108,485 | 107,277 | 110,164 | 4,00 | 3,63 |
| 18,75 | 0,579 | 0,567 | 0,583 | 22,316 | 23,926 | 21,779 | 22,674 | | | | | | |
| 37,5 | 0,53 | 0,529 | 0,53 | 28,890 | 29,025 | 28,890 | 28,935 | | | | | | |
| 75 | 0,453 | 0,441 | 0,441 | 39,221 | 40,831 | 40,831 | 40,295 | | | | | | |
| 150 | 0,301 | 0,284 | 0,277 | 59,615 | 61,896 | 62,835 | 61,449 | | | | | | |

Lampiran 7 Perhitungan Total Fenol

A. Kurva baku asam galat

| Kadar | Absorbansi 1 | Absorbansi 2 | Absorbansi 3 | Rata-rata absorbansi |
|-------|--------------|--------------|--------------|----------------------|
| 6,25 | 0,037 | 0,035 | 0,036 | 0,036 |
| 12,5 | 0,073 | 0,07 | 0,072 | 0,071 |
| 25 | 0,158 | 0,159 | 0,158 | 0,158 |
| 50 | 0,305 | 0,305 | 0,304 | 0,305 |
| 100 | 0,572 | 0,574 | 0,575 | 0,574 |



B. Perhitungan kadar total fenol ekstrak etanol biji salak pondoh dengan excel

| Sampel | Bobot sampel (mg) | Volume sampel (ml) | Fp | Absorbansi sampel (As) | Konsentrasi sampel (µM) | Total fenol (µmol Gallic Acid Equivalence/g ekstrak) | Total Fenol (µmol Gallic Acid Equivalence/g ekstrak) | SD rerata | CV rerata | Total Fenol (mg Gallic Acid Equivalence/g ekstrak) |
|--------|-------------------|--------------------|----|------------------------|-------------------------|--|--|-----------|-----------|--|
| K1 | 10,0 | 10 | 10 | 0,036 | 5,21 | 52,10 | | | | |
| K2 | 10,0 | 10 | 10 | 0,04 | 5,91 | 59,12 | 55,03 | 3,65 | 6,64 | 9,362 |
| K3 | 10,0 | 10 | 10 | 0,037 | 5,38 | 53,85 | | | | |

C. Perhitungan kadar total fenol ekstrak biji salak pondoh

$$\begin{aligned}y &= 0,0057x + 0,0063 \\0,0376 &= 0,0057x + 0,0063 \\&= 5,5029 \mu\text{M GAE/ml (konsentrasi sampel)}\end{aligned}$$

Total fenol ($\mu\text{mol GAE/g ekstrak}$)

$$\begin{aligned}&= (\text{konsentrasi sampel} \times \text{volume sampel} \times \text{faktor pengenceran}) / \text{bobot sampel} \\&= (5,5029 \times 10 \times 10) / 10 \\&= 5,5029 \mu\text{mol GAE/g ekstrak} \\&= 5,5029 \times 10^{-6} \text{ M}\end{aligned}$$

Total fenol (mg GAE/g ekstrak)

Mr vitamin C = 170,12

$$\begin{aligned}\text{Molar} &= \frac{\text{Massa}}{\text{Mr}} + \frac{1000}{v} \\5,5029 \times 10^{-6} &= \frac{\text{Massa}}{170,12} + \frac{1000}{1000} \\&= 9,3615 \times 10^{-4} \text{ gram} \\&= 9,36 \text{ mg GAE/g ekstrak}\end{aligned}$$

