

**STUDI AKTIVITAS ANTIOKSIDAN EKSTRAK ETANOL
DAN FRAKSI ETIL ASETAT DAUN ILER (*Coleus
scutellarioides* (L.) Benth) DENGAN METODE DPPH**

SKRIPSI



SRI LUSIANA

22613040

**PROGRAM STUDI FARMASI PROGRAM SARJANA
FAKULTAS MATEMATIKA DAN ILMU PENGETAHUAN ALAM
UNIVERSITAS ISLAM INDONESIA
YOGYAKARTA**

2026

**STUDI AKTIVITAS ANTIOKSIDAN EKSTRAK ETANOL
DAN FRAKSI ETIL ASETAT DAUN ILER (*Coleus
scutellarioides* (L.) Benth) DENGAN METODE DPPH**

SKRIPSI

Untuk memenuhi salah satu syarat mencapai gelar Sarjana Farmasi (S.Farm.)



SRI LUSIANA

22613040

**PROGRAM STUDI FARMASI PROGRAM SARJANA
FAKULTAS MATEMATIKA DAN ILMU PENGETAHUAN ALAM
UNIVERSITAS ISLAM INDONESIA
YOGYAKARTA**

2026

PERSETUJUAN PENDADARAN

**STUDI AKTIVITAS ANTIOKSIDAN EKSTRAK ETANOL
DAN FRAKSI ETIL ASETAT DAUN ILER (*Coleus
scutellarioides* (L.) Benth) DENGAN METODE DPPH**



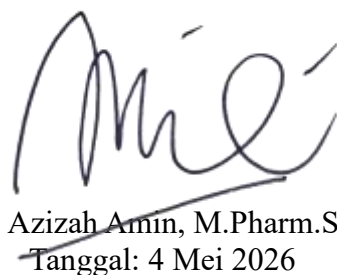
untuk dipertahankan di hadapan Panitia Penguji Skripsi
Program Studi Farmasi Program Sarjana
Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam
Universitas Islam Indonesia

Pembimbing Utama,



(apt. Anami Riasiri, M.Pharm.Sci.)
Tanggal: 4 Mei 2026

Pembimbing Pendamping,



(apt. Azizah Amin, M.Pharm.Sci.)
Tanggal: 4 Mei 2026

SKRIPSI

STUDI AKTIVITAS ANTIOKSIDAN EKSTRAK ETANOL DAN FRAKSI ETIL ASETAT DAUN ILER (*Coleus scutellarioides* (L.) Benth) DENGAN METODE DPPH

Yang diajukan oleh:

SRI LUSIANA
22613040

Telah lolos uji etik penelitian

dan dipertahankan di hadapan Panitia Penguji Skripsi

Program Studi Farmasi Program Sarjana

Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam

Universitas Islam Indonesia

Tanggal: 21 Mei 2026

PEMBIMBING

Utama : apt. Anami Riastri, M.Pharm.Sci.

Pendamping : apt. Azizah Amin, M.Pharm.Sci.

PENGUJI

Ketua : Dr. apt. Arba Pramundita Ramadani, S.Farm., M.Sc.

Anggota : 1. apt. Fitra Romadhonsyah, M.Pharm.Sci.

2. apt. Anami Riastri, M.Pharm.Sci.

3. apt. Azizah Amin, M.Pharm.Sci.

Mengetahui,

Plt. Dekan Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam

Universitas Islam Indonesia



apt. Saepudin, S.Si., M.Si., Ph.D.



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 secara tertulis diacu dalam naskah ini dan diterbitkan dalam daftar pustaka.

Yogyakarta, 8 Juni 2026
Penulis,



Handwritten signature of Sri Lusiana.

(Sri Lusiana)

KATA PENGANTAR

Puji syukur saya panjatkan kepada Allah SWT, karena atas berkat dan rahmat-Nya, saya dapat menyelesaikan skripsi ini. Penulisan skripsi ini dilakukan dalam rangka memenuhi salah satu syarat untuk mencapai gelar Sarjana Farmasi Prodi Farmasi Fakultas MIPA Universitas Islam Indonesia. Saya menyadari bahwa, tanpa bantuan, dan bimbingan dari berbagai pihak, dari masa perkuliahan sampai pada penyusunan skripsi ini, sangatlah sulit bagi saya untuk menyelesaikan skripsi ini. Oleh karena itu, saya mengucapkan terima kasih kepada:

1. apt. Anami Riastri, M.Pharm.Sci. dan apt. Azizah Amin, M.Pharm.Sci. selaku dosen pembimbing skripsi yang telah dengan sabar memberikan bimbingan, arahan, masukan, serta dukungan selama proses penyusunan skripsi ini. Berkat ilmu, waktu, dan perhatian yang telah diberikan, sehingga saya dapat menyelesaikan penelitian dan penulisan skripsi ini dengan baik.
2. Dr. apt. Arba Pramundita Ramadani, S.Farm., M.Sc. dan apt. Fitra Romadhonsyah, M.Pharm.Sci. selaku dosen penguji skripsi yang telah memberikan saran, kritik, dan masukan yang sangat berharga demi penyempurnaan skripsi ini.
3. apt. Yulianto, S.Farm., M.P.H. selaku dosen pembimbing akademik yang senantiasa memberikan arahan, motivasi, dan dukungan selama menempuh pendidikan di Program Studi Farmasi.
4. Seluruh dosen dan tenaga kependidikan Program Studi Farmasi, Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam, Universitas Islam Indonesia, yang telah memberikan ilmu, bimbingan, serta bantuan administratif selama masa perkuliahan sehingga dapat berjalan dengan baik.
5. Seluruh laboran dan staf Laboratorium Terpadu Universitas Islam Indonesia, khususnya laboran Laboratorium Kimia Farmasi (Yuliana Safitri, A.Md.), Biologi Farmasi (Riyanto, A.Md. dan Yon Haryanto, S.TP.), serta Pengujian Obat, Makanan, dan Kosmetik (Bibit Cahya Karunia, S.Si.) yang telah membantu dan mendukung proses penelitian dengan penuh dedikasi dan profesionalisme.

6. Kedua orang tua tercinta, Bapak Ujo Suparjo dan Ibu Saromah, kakak tersayang Teni Anisa dan Dadan Indra Lesmana, serta seluruh keluarga besar yang selalu memberikan doa, dukungan, kasih sayang, dan semangat yang tiada henti.
7. Ni'matun Syahida dan Shabira Risqa Ramadhan selaku rekan seperjuangan dalam penelitian “Riset Antioksidan Daun Iler” yang selalu memberikan dukungan, kebersamaan, dan semangat dalam menghadapi berbagai tantangan selama proses penelitian.
8. Risma Aditya Permatasari, Fira Danisswara, Dwi Nur Fadillah, dan Nadia Mutiara Joantina yang telah menjadi sahabat dan tempat berbagi selama masa perkuliahan, serta selalu memberikan dukungan dan kebersamaan hingga penyusunan tugas akhir ini.

Akhir kata, saya berharap semoga Allah SWT berkenan membalas segala kebaikan semua pihak yang telah membantu. Semoga skripsi ini membawa manfaat bagi pengembangan ilmu dan pengetahuan.

Yogyakarta,



(Sri Lusiana)

DAFTAR ISI

SAMPUL.....	1
HALAMAN JUDUL	1
PERSETUJUAN PENDADARAN	i
HALAMAN PENGESAHAN	ii
HALAMAN PERNYATAAN ORISINALITAS	iii
KATA PENGANTAR.....	iv
DAFTAR ISI.....	vi
DAFTAR GAMBAR.....	viii
DAFTAR TABEL	ix
DAFTAR LAMPIRAN	x
DAFTAR SINGKATAN.....	xi
INTISARI	xii
ABSTRACT.....	xiii
BAB I PENDAHULUAN.....	1
1.1 Latar Belakang Penelitian	1
1.2 Rumusan Masalah	2
1.3 Tujuan Penelitian	3
1.4 Luaran Penelitian	3
1.5 Integrasi dengan Nilai Keislaman	3
1.6 Manfaat Penelitian	4
BAB II KAJIAN PUSTAKA	5
2.1 Radikal Bebas.....	5
2.2 Antioksidan	6
2.3 Tanaman Iler (<i>Coleus scutellarioides</i> (L.) Benth)	7
2.4 Fenolik dan Flavonoid	11
2.5 Ekstrasi	13
2.6 Fraksinasi Kromatografi Cair Vakum (KCV).....	14
2.7 Kromatografi Lapis Tipis (KLT)	15
2.8 Uji Antioksidan	16
2.9 Landasan Teori.....	18
2.10 Hipotesis.....	18
2.11 Kerangka Konsep Penelitian	19

BAB III METODE PENELITIAN	20
3.1 Bahan Penelitian.....	20
3.2 Alat Penelitian.....	20
3.3 Cara Kerja Penelitian	21
3.4 Analisis Hasil	29
3.5 Alur Penelitian	32
BAB IV HASIL DAN PEMBAHASAN	33
4.1 Ekstraksi dan Fraksinasi Daun Iler.....	33
4.2 Identifikasi Kandungan Senyawa Ekstrak Etanol dan Fraksi Etil Asetat dengan Kromatografi Lapis Tipis (KLT)	35
4.3 Kadar Total Fenolik Ekstrak Etanol dan Fraksi Etil Asetat Daun Iler	38
4.4 Kadar Total Flavonoid Ekstrak Etanol dan Fraksi Etil Asetat Daun Iler	40
4.5 Aktivitas Antioksidan Ekstrak Etanol dan Fraksi Etil Asetat Daun Iler	41
BAB V KESIMPULAN DAN SARAN	44
5.1 Kesimpulan.....	44
5.2 Saran	44
DAFTAR PUSTAKA	45
LAMPIRAN.....	54

DAFTAR GAMBAR

Gambar 2.1	Mekanisme pembentukan superoksida	5
Gambar 2.2	Daun Iler (<i>Coleus scutellarioides</i> (L.) Benth.).....	8
Gambar 2.3	Struktur kuersetin	9
Gambar 2.4	Aktivasi jalur Nrf2 oleh kuersetin	10
Gambar 2.5	Struktur Fenol	12
Gambar 2.6	Struktur Flavonoid	13
Gambar 2.7	Kromatografi Cair Vakum.....	15
Gambar 2.8	Reaksi DPPH	17
Gambar 2.9	Kerangka Konsep Penelitian.....	19
Gambar 3.1	Alur Penelitian	32
Gambar 4.1	Profil Kromatografi Lapis Tipis Senyawa Fenolik Daun Iler	35
Gambar 4.2	Profil Kromatografi Lapis Tipis Senyawa Flavonoid Daun Iler	36

DAFTAR TABEL

Tabel 2.1 Perbandingan Penelitian Terdahulu Daun Iler	11
Tabel 4.1 Kadar Air Simplisia dan Serbuk Daun Iler	33
Tabel 4.2 Rendemen Ekstrak Etanol dan Fraksi Etil Asetat Daun Iler	34
Tabel 4.3 Identifikasi Kandungan senyawa Daun Iler Menggunakan KLT.....	37
Tabel 4.4 Kadar Total Fenolik Daun Iler	39
Tabel 4.5 Kadar Total Flavonoid Daun Iler	40
Tabel 4.6 Aktivitas Antioksidan Daun Iler	41

DAFTAR LAMPIRAN

Lampiran 1. Hasil Uji Determinasi Daun Iler	54
Lampiran 2. Simplisia Daun Iler	56
Lampiran 3. Serbuk Daun Iler	56
Lampiran 4. Ekstrak Etanol dan Fraksi Etil Asetat Daun Iler	56
Lampiran 5. Kadar Air Simplisian dan Serbuk Daun Iler	57
Lampiran 6. Rendemen Ekstrak Etanol Daun Iler	57
Lampiran 7. Rendemen Fraksi Etil Asetat Daun Iler	58
Lampiran 8. Identifikasi Senyawa Metabolit Sekunder Ekstrak Etanol dan Fraksi Etil Asetat Daun Iler	59
Lampiran 9. Panjang Gelombang Maksium Asam Galat	60
Lampiran 10. Operating Time Asam Galat	61
Lampiran 11. Uji Kadar Total Fenolik Ekstrak Etanol dan Fraksi Etil Asetat Daun Iler	65
Lampiran 12. Panjang Gelombang Maksimum Kuersetin	67
Lampiran 13. Operating Time Kuersetin	68
Lampiran 14. Uji Kadar Total Flavonoid Ekstrak Etanol dan Fraksi Etil Asetat Daun Iler	70
Lampiran 15. Panjang Gelombang Maksimum DPPH	72
Lampiran 16. Operating Time DPPH	73
Lampiran 17. Uji Aktivitas Antioksidan Ekstrak Etanol dan Fraksi Etil Asetat Daun Iler	76

DAFTAR SINGKATAN

Akt	Protein kinase B
ABTS	2,2'-azino-bis(3-ethylbenzothiazoline-6-sulfonic acid)
AlCl₃	Aluminium Chloride
AMPK	AMP-activated Protein Kinase
ARE	Antioxidant Response Element
B2P2TOOT	Balai Besar Penelitian dan Pengembangan Tanaman Obat dan Obat Tradisional
BHA	Butylated Hydroxyanisole
BHT	Butylated Hydroxytoluene
CAT	Catalase
DNA	Deoxyribonucleic acid
DPPH	2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl
FeCl₃	Ferric Chloride
FRAP	Ferric Reducing Antioxidant Power
G6PD	Glucose-6-Phosphate Dehydrogenase
GAE	Gallic Acid Equivalent
GPx	Glutathione Peroxidase
GR	Glutathione Reductase
GSH	Glutathione
HPLC	High Performance Liquid Chromatography
H₂O₂	Hydrogen Peroxidase
IC₅₀	Inhibitory Concentration 50%
Keap1	Kelch-like ECH-Associated Protein 1
KCV	Kromatografi Cair Vakum
KLT	Kromatografi Lapis Tipis
LC-MS	Liquid Chromatography-Mass Spectrometry
MAPK	Mitogen-Activated Protein Kinase
NADPH	Nicotinamide Adenin Dinucleotide Phosphate Hydrogen
NF- κB	Nuclear Factor Kappa B
Nrf2	Nuclear Factor erythroid 2-related factor 2
PG	Propyl Gallate
PI3K	Phosphoinositide 3-Kinase
QE	Quercetin Equivalent
RNS	Reactive Nitrogen Species
ROS	Reactive Oxygen Species
sMaf	Small Musculoaponeurotic Fibrosarcoma Protein
SOD	Superoxide Dismutase
TBHQ	Tert-Butylhydroquinone
UAE	Ultrasound-Assisted Extraction
Ub	Ubiquitin
UV	Ultraviolet
UV-Vis	Ultraviolet-Visible Spectrophotometry

STUDI AKTIVITAS ANTIOKSIDAN EKSTRAK ETANOL DAN FRAKSI ETIL ASETAT DAUN ILER (*Coleus scutellarioides* (L.) Benth) DENGAN METODE DPPH

SRI LUSIANA

Program Studi Farmasi Program Sarjana

INTISARI

Latar belakang: Stres oksidatif akibat radikal bebas dapat memicu berbagai penyakit degeneratif. Daun iler (*Coleus scutellarioides* (L.) Benth) diketahui mengandung senyawa fenolik dan flavonoid yang berpotensi sebagai antioksidan alami.

Tujuan: Mengetahui kandungan senyawa fenolik dan flavonoid, menentukan kadar fenolik dan flavonoid, mengevaluasi aktivitas antioksidan ekstrak etanol dan fraksi etil asetat daun iler dengan metode DPPH.

Metode: Serbuk simplisia daun iler diekstraksi menggunakan sonikasi dengan etanol 96% dan difraksinasi dengan kromatografi cair vakum (n-heksan dan etil asetat). Identifikasi senyawa menggunakan KLT, sedangkan analisis kuantitatif meliputi penetapan total kadar fenolik dan flavonoid, dan uji antioksidan dengan metode DPPH untuk menentukan nilai IC_{50} .

Hasil: Ekstrak etanol dan fraksi etil asetat menghasilkan rendemen 11,86% dan 38,98%, keduanya mengandung senyawa fenolik dan flavonoid. Kadar total fenolik dan flavonoid fraksi etil asetat ($6,37 \pm 0,04$ mg GAE/g; $3,16 \pm 0,03$ mg QE/g) lebih tinggi dibanding ekstrak etanol ($3,79 \pm 0,11$ mg GAE/g; $1,26 \pm 0,03$ mg QE/g). Aktivitas antioksidan fraksi etil asetat sebesar (IC_{50} $34,59 \pm 0,21$ ppm) juga lebih kuat dibanding ekstrak etanol (IC_{50} $39,30 \pm 1,62$ ppm).

Kesimpulan: Ekstrak etanol dan fraksi etil asetat daun iler mengandung fenolik dan flavonoid. Fraksi etil asetat memiliki kadar total fenolik dan flavonoid yang lebih tinggi, serta aktivitas antioksidan lebih kuat dibandingkan ekstrak etanol.

Kata kunci: antioksidan, *Coleus scutellarioides*, DPPH, flavonoid, fenolik, stres oksidatif.

STUDY OF ANTIOXIDANT ACTIVITY OF ETHANOL EXTRACT AND ETHYL ACETATE FRACTION OF ILER LEAVES (*Coleus scutellarioides* (L.) Benth) USING THE DPPH METHODE

SRI LUSIANA

Pharmacy Undergraduate Program

ABSTRACT

Background: Oxidative stress caused by free radicals can trigger various degenerative diseases. Iler leaves (*Coleus scutellarioides* (L.) Benth) are known to contain phenolic compounds and flavonoids that have potential as natural antioxidants.

Objective: To determine the content of phenolic compounds and flavonoids, to measure the levels of phenolic compounds and flavonoids, and to evaluate the antioxidant activity of ethanol extracts and ethyl acetate fractions of Iler leaves using the DPPH method.

Methods: Powder made from extracted iler leaves using sonication with 96% ethanol and fractionated by vacuum liquid chromatography (n-hexane and ethyl acetate). Compound identification was performed using TLC, while quantitative analysis included the determination of total phenolic and flavonoid content, and an antioxidant assay using the DPPH method to determine the IC₅₀ value.

Results: The ethanol extract and ethyl acetate fraction yielded 11.86% and 38.98%, respectively, both containing phenolic and flavonoid compounds. The total phenolic and flavonoid contents of the ethyl acetate fraction ($6,37 \pm 0,04$ mg GAE/g; $3,16 \pm 0,03$ mg QE/g) were higher than those of the ethanol extract ($3,79 \pm 0,11$ mg GAE/g; $1,26 \pm 0,03$ mg QE/g). The antioxidant activity of the ethyl acetate fraction (IC₅₀ $34,59 \pm 0,21$ ppm) was also stronger than that of the ethanol extract (IC₅₀ $39,30 \pm 1,62$ ppm).

Conclusion: Ethanol extracts and ethyl acetate fractions of Iler leaves contain phenolic compounds and flavonoids. The ethyl acetate fraction has higher total phenolic and flavonoid content, as well as stronger antioxidant activity, compared to the ethanol extract.

Keywords: Antioxidant, *Coleus scutellarioides*, DPPH, flavonoid content, phenolic content, oxidative stress.

BAB I

PENDAHULUAN

1.1 Latar Belakang Penelitian

Perubahan lingkungan, kemajuan teknologi, dan gaya hidup yang tidak sehat meningkatkan penyakit degeneratif seperti diabetes, jantung, dislipidemia, obesitas, dan kanker, yang semakin diperparah oleh tingginya paparan radikal bebas (Purnamasari, 2018). Akumulasi radikal bebas dalam tubuh dapat memicu stres oksidatif dan berpotensi menimbulkan kerusakan pada sel, mempercepat penuaan, serta meningkatkan risiko timbulnya berbagai penyakit (Boccellino, 2023). Antioksidan berperan dalam membantu mencegah maupun menangani penyakit kronis dengan cara menetralkan radikal bebas melalui donor elektron, sehingga reaksi oksidatif pada biomolekul dapat dihambat (Losada-Barreiro dkk., 2022). Kandungan fenolik dan flavonoid pada tanaman diketahui berkontribusi terhadap karakteristik antioksidan alami (Kiss dkk., 2025). Tanaman Iler (*Coleus scutellarioides* (L.) Benth) merupakan anggota *family Lamiaceae* yang banyak dibudidayakan sebagai tanaman hias dan juga berpotensi sebagai tanaman obat karena mengandung senyawa bioaktif, terutama flavonoid dengan kuersetin sebagai senyawa identitas, yang diketahui berperan dalam memberikan aktivitas antioksidan. Bagian daun berperan penting dalam aktivitas farmakologinya antara lain sebagai imunomodulator yang berperan dalam meningkatkan daya tahan tubuh (Qalbi dkk., 2017).

Beberapa penelitian sebelumnya melaporkan bahwa daun iler mengandung berbagai senyawa bioaktif yang berpotensi sebagai antioksidan. Analisis yang dilakukan oleh Sukmawati dkk. (2019) menunjukkan bahwa ekstrak etanol daun iler mengandung senyawa kuersetin yang berperan sebagai antioksidan. Penelitian lain oleh Putri & Widhiastuti (2023) melakukan ekstraksi daun iler menggunakan metode maserasi dengan pelarut etanol 96% melaporkan bahwa ekstrak yang diperoleh memiliki kadar fenolik total sebesar 0,5659 mg GAE/g serta kadar flavonoid total sebesar 1,0398 mg QE/g. Selain itu, Suryati dkk. (2018) melakukan ekstraksi sampel dengan metode maserasi bertingkat kemudian dilanjutkan dengan proses fraksinasi padat-cair menggunakan etil asetat, sehingga diperoleh kadar

fenolik total sebesar 3,3 mg/L GAE. Verawati dkk. (2016) juga melaporkan bahwa serbuk daun iler di ekstraksi menggunakan pelarut etanol melalui metode maserasi, kemudian dilakukan fraksinasi menggunakan pelarut etil asetat, memiliki kandungan flavonoid total sebesar 9,63 mg QE/g, yang berperan dalam aktivitas antioksidan. Aktivitas antioksidan daun iler juga telah banyak diteliti menggunakan metode DPPH. Moelyono dkk. (2016) mengekstraksi dengan metode maserasi menggunakan pelarut etanol 70%, kemudian dilakukan fraksinasi menggunakan etil asetat dengan metode fraksinasi cair-cair, diperoleh aktivitas antioksidan dari ekstrak etanol sebesar 80,23 ppm dan 54,20 ppm pada fraksi etil asetat.

Penelitian-penelitian sebelumnya pada daun iler umumnya menggunakan metode maserasi, sedangkan metode *Ultrasound-Assisted Extraction* (UAE) diketahui memiliki beberapa keunggulan dibandingkan metode konvensional seperti, waktu ekstraksi yang lebih singkat, dan penggunaan pelarut yang lebih sedikit (Lopeda-Correa dkk., 2022). Utami dkk. (2020) melaporkan bahwa metode UAE menghasilkan kadar flavonoid lebih tinggi (0,62%) dibandingkan maserasi (0,41%) pada ekstrak etanol daun iler, menunjukkan keunggulan sonikasi dalam mengekstraksi senyawa bioaktif. Sementara itu, pada tahap fraksinasi, kromatografi cair vakum (KCV) terbukti menghasilkan pemisahan lebih spesifik dibandingkan fraksinasi cair-cair. Pada studi benalu batu, fraksinasi cair-cair hanya menghasilkan tiga sub fraksi (Khumaidi dkk., 2020), sedangkan KCV mampu menghasilkan delapan sub fraksi hingga diperoleh isolat flavonoid tunggal (Ritna dkk., 2016). Oleh karena itu, penelitian ini menggunakan UAE sebagai metode ekstraksi dan KCV sebagai metode fraksinasi untuk mengevaluasi kandungan senyawa fenolik dan flavonoid, kadar total fenolik dan flavonoid, serta aktivitas antioksidan ekstrak etanol dan fraksi etil asetat daun iler.

1.2 Rumusan Masalah

1. Bagaimana kandungan senyawa fenolik dan flavonoid pada ekstrak etanol dan fraksi etil asetat daun iler (*Coleus scutellarioides* (L.) Benth) berdasarkan analisis kromatografi lapis tipis?
2. Bagaimana kadar total fenolik dan flavonoid ekstrak etanol dan fraksi etil asetat daun iler (*Coleus scutellarioides* (L.) Benth)?

3. Bagaimana aktivitas antioksidan ekstrak etanol dan fraksi etil asetat daun iler (*Coleus scutellarioides* (L.) Benth) menggunakan metode DPPH?

1.3 Tujuan Penelitian

1. Mengetahui kandungan senyawa fenolik dan flavonoid pada ekstrak etanol dan fraksi etil asetat daun iler (*Coleus scutellarioides* (L.) Benth) menggunakan metode kromatografi lapis tipis.
2. Mengetahui kadar total fenolik dan flavonoid pada ekstrak etanol dan fraksi etil asetat daun iler.
3. Mengetahui aktivitas antioksidan ekstrak etanol dan fraksi etil asetat daun iler (*Coleus scutellarioides* (L.) Benth) menggunakan metode DPPH.

1.4 Luaran Penelitian

Temuan penelitian disajikan dalam bentuk artikel ilmiah yang dipublikasikan pada jurnal bereputasi, baik nasional maupun internasional.

1.5 Integrasi dengan Nilai Keislaman

Pada Al-Quran surat Abasa ayat 27-31, Allah Subhanahu wa Ta'ala berfirman:

فَأَنْبَتْنَا فِيهَا حَبًّا (٢٧) وَعِنَبًا وَقَضْبًا (٢٨) وَزَيْتُونًا وَنَخْلًا (٢٩) وَحَدَائِقَ غُلْبًا (٣٠) وَفَاكِهَةً وَأَبًّا (٣١)

Artinya: “Lalu, Kami tumbuhkan padanya biji-bijian; anggur, sayur-sayuran; zaitun, pohon kurma; kebun-kebun (yang) rindang; buah-buahan, dan rerumputan.

Ayat ini menggambarkan kekuasaan Allah SWT dalam menumbuhkan berbagai tanaman yang menjadi sumber makanan, obat, dan kehidupan bagi manusia. Ayat ini juga menjadi seruan bagi ilmuwan muslim untuk merenungkan tanda-tanda kebesaran Allah dalam ciptaan - Nya. Oleh karena itu, penelitian tanaman obat terhadap daun iler bukan sekedar upaya ilmiah, melainkan juga bentuk tadabbur (perenungan) terhadap ayat-ayat kauniyah (tanda-tanda kekuasaan Allah di alam semesta).

1.6 Manfaat Penelitian

1. Bagi Peneliti

Memberikan pengalaman langsung dalam proses ekstraksi, fraksinasi, serta pengujian aktivitas antioksidan dengan metode DPPH. Menambah keterampilan peneliti dalam melakukan analisis fitokimia, khususnya penetapan kadar flavonoid dan fenolik.

2. Bagi Masyarakat

Memberikan informasi ilmiah bahwa daun iler dapat dimanfaatkan sebagai sumber antioksidan alami. Menjadi dasar pemanfaatan tanaman obat tradisional untuk pencegahan penyakit degeneratif.

3. Bagi Peneliti Selanjutnya

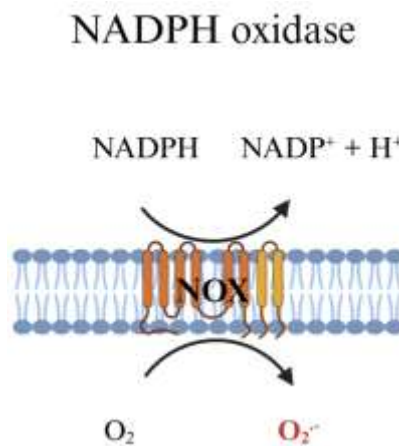
Dapat dijadikan referensi untuk penelitian lanjutan, seperti isolasi senyawa aktif spesifik dari daun iler. Menjadi dasar dalam pengembangan formulasi sediaan.

BAB II

KAJIAN PUSTAKA

2.1 Radikal Bebas

Radikal bebas adalah atom, molekul, atau ion yang memiliki elektron tidak berpasangan sehingga sangat tidak stabil dan reaktif (Gulcin, 2025). Kelompok utama radikal bebas dalam sistem biologis meliputi *reactive oxygen species* (ROS) dan *reactive nitrogen species* (RNS) (Phaniendra dkk., 2015). Radikal bebas terbentuk melalui beberapa mekanisme utama yaitu, melalui pemecahan ikatan kovalen secara homolitik akibat energi tinggi sehingga masing-masing atom dalam ikatan tersebut membawa satu elektron, kehilangan satu elektron dari molekul normal sehingga molekul tersebut menjadi tidak stabil, kemudian adanya penambahan satu elektron yang mengakibatkan ketidak seimbangan struktur kimia (Natzir & Syamsul, 2024). Dalam jumlah normal, ROS berperan dalam fungsi fisiologis sel, tetapi kelebihan ROS dapat menyebabkan kerusakan biomolekul seperti lipid, protein, dan DNA sel (Pizzino dkk., 2017). ROS dapat terbentuk melalui beberapa mekanisme, salah satunya adalah aktivasi *NADPH oxidase* (NOX).



Gambar 2.1 Mekanisme pembentukan superoksida

(Magnani & Mattevi, 2019)

Mekanisme *NADPH oxidase* (NOX) dapat dilihat pada (**Gambar 2.1**). Enzim transmembran yang menghasilkan superoksida atau hidrogen peroksida yang bergantung pada NADPH. Enzim *nicotinamide adenine dinucleotide*

phosphate oxidase (NOX) memiliki inti katalitik yang terdiri dari dua domain, yaitu dehidrogenase dan transmembran. Elektron ditransfer secara berurutan dari NADPH sitosolik ke *flavin adenine dinucleotide* (FAD) yang terikat secara non-kovalen pada domain dehidrogenase, kemudian ke heme bagian dalam dan luar pada domain transmembran, dan akhirnya ke O₂ disisi berlawanan membran sel, menghasilkan superoksida atau hidrogen peroksida (Magnani & Mattevi, 2019). Ketidak seimbangan antara oksidan dan antioksidan yang lebih banyak ke arah oksidan disebut stres oksidatif yang berkontribusi pada banyak kondisi patologis, termasuk kanker, gangguan neurologis, aterosklerosis, hipertensi, iskemia/perfusi, diabetes, sindrom gangguan pernapasan akut, fibrosis paru idiopatik, penyakit paru obstruktif kronik, dan asma (Birben dkk., 2012).

2.2 Antioksidan

Antioksidan adalah senyawa bioaktif yang mampu menghambat proses oksidasi molekul (Salehi dkk., 2018), dengan menetralkan radikal bebas melalui donasi elektron atau atom hidrogen, sehingga menjaga kestabilan molekul (Ibroham dkk., 2022). Berdasarkan sumbernya, antioksidan dibedakan menjadi endogen dan eksogen, serta secara fungsional diklasifikasikan menjadi enzimatik dan non-enzimatik (Zehiroglu & Ozturk Sarikaya, 2019). Antioksidan enzimatik terdiri atas *superoxide dismutase* (SOD), *catalase* (CAT), *glutathione reductase* (GR) dan *glutathione peroxidase* (GPx) yang bekerja langsung menetralkan *reactive oxygen species* (ROS) (Gulcin, 2025). Sementara itu, antioksidan non-enzimatik meliputi berbagai senyawa seperti vitamin C, vitamin E, karotenoid, flavonoid, dan senyawa fenolik (Maharani dkk., 2021). berdasarkan asalnya, antioksidan juga dapat dibedakan menjadi antioksidan alami dan sintetis. *Tert-butylhydroquinone* (TBHQ), *propyl gallate* (PG), *butylated hydroxyanisole* (BHA), dan *butylated hydroxytoluene* (BHT) adalah beberapa contoh antioksidan sintetis namun sejumlah penelitian menyoroti potensi risiko penggunaan antioksidan sintesis karena beberapa senyawa dilaporkan memiliki efek toksik dan bersifat karsinogenik, termasuk risiko kerusakan hati (Altemimi dkk., 2017), sedangkan antioksidan alami seperti vitamin A,C,E,K, dan beberapa senyawa mineral (Maharani dkk., 2021).

Antioksidan diklasifikasikan menjadi 3 kategori sesuai dengan mekanismenya yaitu (Mehta & Gowder, 2015):

1. Antioksidan primer: berperan dalam mencegah terbentuknya oksidan. Mereka bekerja dengan cara menghambat pembentukan radikal bebas (contoh: glutathione peroksidase, katalase, selenoprotein, transferrin, ferritin, laktoferin, karotenoid, dan lain-lain).
2. Antioksidan sekunder: berfungsi sebagai penangkap radikal oksigen reaktif. Mereka bekerja dengan menghambat inisiasi rantai dan memutus reaksi propagasi rantai (antioksidan yang menangkap radikal).
3. Antioksidan tersier: berperan dalam memperbaiki molekul yang telah teroksidasi (Seperti beberapa enzim proteolitik dan enzim yang memperbaiki DNA) melalui sumber seperti antioksidan dari makanan atau antioksidan berturut-turut.

2.3 Tanaman Iler (*Coleus scutellarioides* (L.) Benth)

Habitat tanaman iler (*Coleus scutellarioides* (L.) Benth.) pertumbuhannya optimal ditemukan di daerah berbukit yang menerima paparan sinar matahari penuh, terutama pada ketinggian 300-1800 mdpl. Secara morfologi, tanaman ini merupakan semak dengan tinggi antara 30-150 cm dan memiliki batang yang relatif rapuh (Sudrajat & Susanti, 2018). Tanaman iler memiliki sistem perakaran berbentuk akar tunggang yang ditunjukkan oleh satu batang akar utama yang membesar. Daunnya terdiri dari daun tunggal yang memiliki berbagai bentuk, mulai dari membulat, hingga melengkung seperti hati. Daun memiliki alur tipis yang bersambung di tepinya, tangkainya relatif panjang, kira-kira 3 - 4 cm, dengan berbagai warna yang berbeda. Ujung daun cenderung meruncing dan menyirip. Bunga miana berbentuk untaian berlapis-lapis dengan warna merah atau ungu yang dominan (**Gambar 2.2**) (Junita dkk., 2023). Ciri pigmen antosianin yang menonjol pada tanaman ini berkaitan erat dengan sifat antioksidannya yang kuat (Kartini dkk., 2025).

Secara taksonomi daun iler (*Coleus scutellarioides* (L.) Benth) dapat diklasifikasikan sebagai berikut (Salimi, 2021):

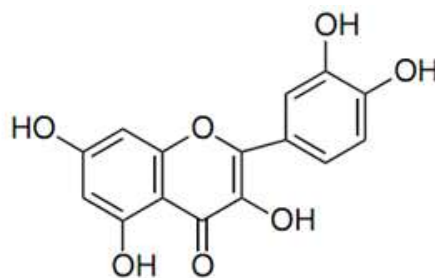
Kingdom	: Plantae
Subkingdom	: Tracheobionta

Superdivisi	: Spermatophyta
Divisi	: Magnoliophyta
Kelas	: Magnoliopsida
Sub kelas	: Asteridae
Ordo	: Lamiales
Famili	: Lamiaceae
Genus	: <i>Coleus</i>
Species	: <i>Coleus scutellarioides</i> (L) Benth
Sinonim	: <i>Coleus atropurpureus</i> (L) Benth



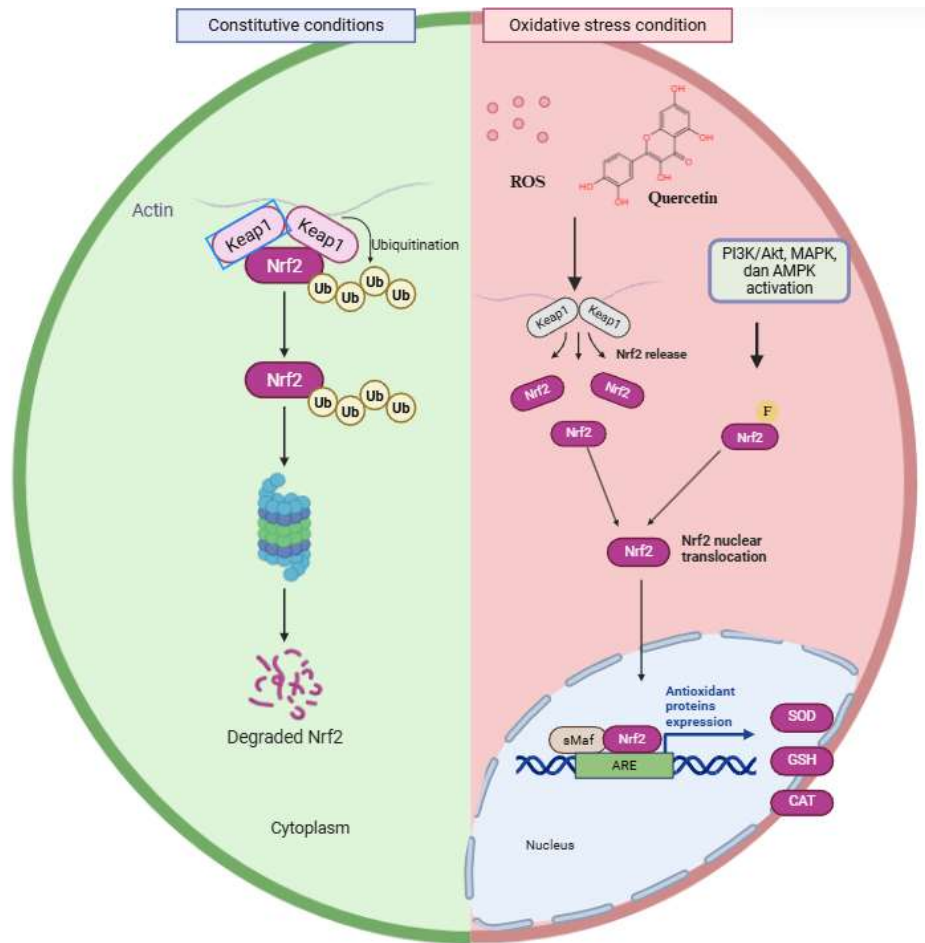
Gambar 2.2 Daun Iler (*Coleus scutellarioides* (L.) Benth.)
(Natasya dkk., 2023)

Daun Iler (*Coleus scutellarioides* (L.) Benth.) diketahui memiliki banyak aktivitas farmakologis. Ekstrak dan senyawa aktif tanaman ini memiliki sifat antimikroba, anthelmintik, antifungi, antiinflamasi, antibakteri, dan antioksidan. Aktivitas tersebut dipengaruhi oleh kandungan metabolit sekunder, antara lain flavonoid, terpenoid, alkaloid, dan tanin. Selain itu, daun iler juga telah lama dimanfaatkan secara tradisional oleh masyarakat sebagai pengobatan berbagai penyakit, seperti batuk, diabetes, wasir, luka, nyeri haid, bisul, hingga tuberkulosis. Pengolahan daun iler secara tradisional umumnya dilakukan dengan cara direbus, dipanggang, diremas, maupun dicampur dengan bahan alami lain seperti madu, daun salam, dan sambiloto (Hasanah dkk., 2023; Natasya dkk., 2023; Wakhidah & Silalahi, 2018).



Gambar 2.3 Struktur kuersetin
(Rosyidah dkk., 2023)

Kuersetin merupakan salah satu senyawa identitas pada tanaman iler termasuk dalam golongan flavonoid dan diketahui terdapat dalam ekstrak etanol daun iler (Moelyono dkk., 2016). Senyawa kuersetin merupakan flavonoid golongan flavonol yang bersifat semipolar, sehingga lebih mudah larut dan terdeteksi dalam pelarut semipolar maupun beberapa pelarut organik nonpolar dibandingkan pelarut polar. Oleh karena itu, pelarut semipolar dinilai lebih efektif untuk mengekstraksi senyawa kuersetin (Dewi dkk., 2022). Senyawa ini memiliki aktivitas antioksidan yang kuat, ditandai dengan kemampuannya mereduksi radikal bebas dan menghambat pembentukan ROS, dimana struktur aromatik dan gugus -OH pada molekulnya menjadikan kuersetin salah satu antioksidan alami yang potensial (Sukmawati dkk., 2019). Selain berperan sebagai penangkap radikal bebas secara langsung, kuersetin juga mampu meningkatkan sistem pertahanan antioksidan endogen melalui aktivasi jalur *nuclear factor erythroid 2-related factor 2* (Nrf2), yang berperan penting dalam regulasi ekspresi berbagai enzim antioksidan, seperti yang dijelaskan pada **Gambar 2.4**.



Gambar 2.4 Aktivasi jalur Nrf2 oleh kuersetin
(Ngo & Duennwald, 2022)

Pada kondisi normal, Nrf2 berikatan dengan Keap1 di sitoplasma sehingga mengalami ubiquitinasi dan degradasi. Saat terjadi stres oksidatif, ROS dan kuersetin menyebabkan Nrf2 terlepas dari Keap1, disisi lain kuersetin juga dapat mengaktifasi jalur PI3K/Akt, MAPK, dan AMPK. Nrf2 kemudian berpindah ke nukleus dan berikatan dengan ARE untuk meningkatkan ekspresi gen antioksidan seperti SOD, CAT, dan GSH (Zhang dkk., 2024). Melalui aktivasi jalur Nrf2 tersebut, enzim antioksidan yang terekspresi kemudian bekerja secara bertahap, SOD mengubah superoksida menjadi hidrogen peroksida (H_2O_2), yang selanjutnya diuraikan oleh CAT menjadi air dan oksigen, sementara GPx mereduksi hidrogen peroksida menggunakan GSH untuk mencegah pembentukan radikal yang lebih reaktif. Sistem pertahanan ini kemudian didukung oleh *glutathione reductase* (GR) dan *glucose-6-phosphate dehydrogenase* (G6PD) yang meregenerasi GSH dan NADPH untuk mempertahankan lingkungan reduktif sel (Gulcin, 2025). Secara

keseluruhan, kuersetin mengatur jalur Nrf2 dengan mengganggu regulasi negatif oleh Keap1 dan memodulasi berbagai jalur sinyal untuk mendorong respons antioksidan.

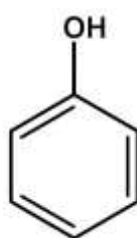
Tabel 2.1 Perbandingan Penelitian Terdahulu Daun Iler

Peneliti	Sumber simplisia	Ekstraksi	Fraaksinasi	Rendemen	Kandungan	Kadar fenolik & flavonoid	Aktivitas antioksidan (IC ₅₀)
(Putri & Widhihastuti, 2023)	-	Maserasi (etanol 96%)	-	Ekstrak: 5,8%	Flavonoid, saponin, polifenol, alkaloid, mineral, minyak atsiri	0,5659 mg GAE/g 1,0398 mg QE/g	-
(Suryati dkk., 2018)	-	Maserasi Bertingkat (n-heksan dan etil asetat)	Fraaksinasi padat cair (n-heksan dan etil Asetat)	Fraksi: 3,54%	Flavonoid, fenolik, triterpenoid, steroid	Fraksi: 3,3 mg/L GAE	Fraksi: 21,75 ppm
(Verawati dkk., 2016)	Bukit tinggi, Provinsi Sumatra Barat, Indonesia	Maserasi (etanol)	Fraaksinasi cair-cair (n-heksan, etil asetat)	Ekstrak: 22,89% Fraksi etil asetat: 17,09%	Flavonoid	Fraksi: 9,63 mg/g QE	Fraksi: 29,15 ppm
(Moelyono dkk., 2016)	Kebun percobaan di Manoko, Lembang, Jawa Barat	Maserasi (etanol 70%)	Fraaksinasi cair-cair (n-heksan dan etil asetat)	Ekstrak: 24,52% Fraksi: 19,06%	Polifenolat, flavonoid, mono & seskuiterpenoid, steroid & triterpenoid, saponin	-	Ekstrak: 80,23 ppm Fraksi: 54,20 ppm
(Afifah dkk., 2015)	Kebun di Gang Immanuel, Jalan Mangkupalas, Samarinda Seberang, Kalimantan Timur.	Maserasi (etanol 96%)	Fraaksinasi cair-cair (n-heksan dan etil asetat)	Ekstrak: 4,2% Fraksi: 0,7%	-	-	Fraksi: 33,768 ppm
(Aji dkk., 2022)	Bentiring Permai, Muara Bangkahulu, Kota Bengkulu	Maserasi (etanol 96%)	-	Ekstrak: 14,7%	-	-	Ekstrak: 54,39 ppm

2.4 Fenolik dan Flavonoid

Senyawa fenolik adalah metabolit sekunder tanaman yang memiliki struktur aromatik turunan benzena dengan satu atau lebih gugus hidroksil, dan dapat ditemukan dalam bentuk glikosida, ester, maupun metil ester (Mahardani &

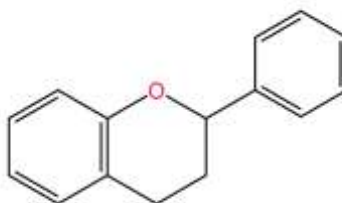
Yuanita, 2021). Senyawa ini disintesis melalui jalur asam shikimat, pentosa fosfat, dan fenilpropanoid, serta berperan sebagai antioksidan melalui pengikatan radikal bebas, penguraian produk oksidasi, serta pengkelat ion logam prooksidan. Aktivitas tersebut dipengaruhi oleh struktur kimianya, terutama derajat glikosilasi serta jumlah dan posisi gugus hidroksil (Diniyah & Lee, 2020). Fenolik memiliki banyak gugus hidroksil bersifat lebih polar sehingga larut dalam pelarut polar, sedangkan yang termetoksilasi memiliki kepolaran lebih rendah dan cenderung larut dalam pelarut semi polar (Kaczorová dkk., 2021).



Gambar 2.5 Struktur Fenol
(Susanti dkk., 2024)

Flavonoid adalah kelompok senyawa fenolik terbesar dengan struktur dasar C6-C3-C6 berupa dua cincin aromatik yang dihubungkan oleh rantai tiga karbon yang disintesis melalui jalur fenilpropanoid dengan prekursor p-kumaroil-KoA dan terbagi menjadi subkelas seperti flavon (contohnya, apigen), flavonol (quercetin), flavanon (naringenin), isoflavon (genistein), dan antosianin (cyanidin) (Amin & Assafa, 2025). Sebagai senyawa polifenol, flavonoid umumnya bersifat polar karena adanya gugus hidroksil (-OH) yang mampu membentuk ikatan hidrogen, dengan tingkat kepolaran dipengaruhi oleh jumlah gugus hidroksil dan gugus gula (Ko dkk., 2014). Gugus hidroksil (-OH) pada flavonoid dapat melepaskan proton dalam suasana basa lemah sehingga membentuk ion fenoksida, yang meningkatkan kelarutan dan mengubah struktur ionik, sehingga menyebabkan perubahan warna saat bereaksi dengan reagen tertentu (Abisola dkk., 2025). Selain itu aktivitas antioksidannya ditentukan oleh karakteristik struktur seperti gugus ortho-dihydroxy di cincin B, yang memungkinkan konjugasi ikatan rangkap C2-C3 dengan gugus oksi fungsional C4, serta gugus hidroksil di C3 dan C5 yang meningkatkan kemampuan menangkal radikal bebas ROS, baik secara langsung dengan mencegah

pembentukan ulang spesies oksigen reaktif, maupun secara tidak langsung dengan meningkatkan aktivitas enzim antioksidan dalam sel (Ulfah dkk., 2024; Widiastriani dkk., 2024).



Gambar 2.6 Struktur Flavonoid
(Widiastriani dkk., 2024)

2.5 Ekstraksi

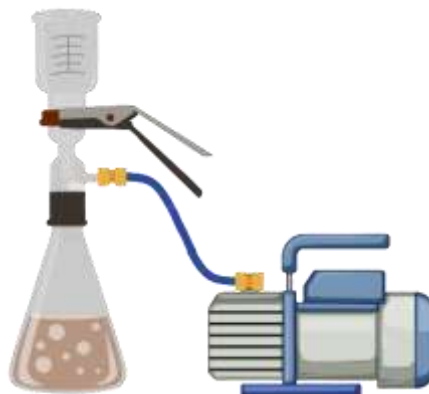
Salah satu langkah penting dalam pemanfaatan bahan alam adalah ekstraksi tanaman obat. Tahap ini bertujuan untuk memisahkan senyawa aktif atau metabolit sekunder dari jaringan tanaman. Senyawa tersebut antara lain, alkaloid, flavonoid, terpen, saponin, steroid, dan glikosida, yang masing-masing diketahui memiliki berbagai aktivitas biologis. Ekstrak merupakan hasil yang diperoleh dari proses ekstraksi bahan alam menggunakan pelarut tertentu (Abubakar & Haque, 2020). Pelarut ekstraksi memainkan peran penting dalam menentukan kualitas, kuantitas, dan selektivitas senyawa yang diekstraksi, hal ini merupakan keputusan pertama yang harus diambil ketika merancang prosedur ekstraksi (Popova & Bankova, 2023). Pemilihan pelarut didasarkan pada prinsip kesamaan sifat kimia yang dikenal sebagai hukum "*like dissolves like*" atau kesamaan polaritas (Zhang dkk., 2018). Kualitas ekstrak dipengaruhi oleh metode ekstraksi yang digunakan. Selain itu, faktor seperti efektivitas proses ekstraksi, suhu, volume pelarut, dan lama waktu ekstraksi berperan penting dalam menentukan jumlah serta kualitas senyawa yang diperoleh (Malini dkk., 2023).

Metode ekstraksi dengan *Ultrasound-Assisted Extraction* (UAE) bekerja melalui kombinasi efek termal, mekanis, dan kavitasi yang dihasilkan selama proses ekstraksi. Gelombang ultrasonik memiliki kemampuan untuk meningkatkan penetrasi pelarut ke dalam jaringan sel tanaman, yang mempercepat perpindahan massa antara pelarut dan senyawa target. Energi ultrasonik dapat merusak atau

mengganggu dinding sel, membuat isi sel lebih mudah dilepaskan ke dalam pelarut (Shen dkk., 2023). Efisiensi ekstraksi optimal, perlu diperhatikan daya ultrasonik, kadar air bahan, dan suhu proses. Pemilihan frekuensi gelombang ultrasonik sangat penting karena mempengaruhi ukuran gelembung kavitasi dan efektivitas ekstraksi. Metode UAE menggunakan frekuensi 20-100 kHz, dengan 40 kHz sebagai frekuensi paling efisien (Shi dkk., 2022). Beberapa keuntungan metode ekstraksi ini dibandingkan dengan metode konvensional seperti waktu ekstraksi yang lebih singkat, penggunaan pelarut yang lebih sedikit, menghasilkan rendemen ekstrak yang lebih tinggi, mempertahankan senyawa bioaktif yang sensitif terhadap suhu tinggi dan mengurangi degradasi senyawa tertentu (Lopeda-Correa dkk., 2022). Namun UAE juga memiliki kekurangan seperti kemungkinan kerusakan bahan akibat kavitasi, kurangnya keseragaman proses, serta efisiensi yang lebih rendah pada *ultrasonic bath* (Hlatshwayo dkk., 2025).

2.6 Fraksinasi Kromatografi Cair Vakum (KCV)

Fraksinasi adalah metode pemisahan senyawa dari suatu ekstrak dengan memanfaatkan dua jenis pelarut yang tidak saling bercampur berdasarkan kepolaran. Pelarut yang umum digunakan antara lain n-heksan, etil asetat, dan metanol, dimana n-heksan digunakan untuk menarik senyawa non polar seperti lemak, etil asetat untuk senyawa semi polar, sedangkan metanol untuk senyawa polar. Melalui proses ini dapat diketahui sifat kepolaran senyawa yang dipisahkan, karena senyawa non polar akan larut dalam pelarut nonpolar, sementara senyawa polar akan larut dalam pelarut polar (Sudarwati & Fernanda, 2019). Selain itu, fraksinasi juga merupakan proses pemisahan ekstrak tumbuhan menjadi beberapa fraksi yang kemudian dapat diproses lebih lanjut menjadi senyawa yang lebih murni (Abubakar & Haque, 2020). Kromatografi adalah teknik analisis yang digunakan untuk memisahkan campuran senyawa berdasarkan perbedaan afinitas masing-masing komponen terhadap fase diam dan fase gerak. Proses pemisahan terjadi ketika campuran senyawa dibawa oleh fase gerak melewati fase diam, sehingga setiap komponen akan terelusi dengan kecepatan yang berbeda sesuai dengan interaksi dan tingkat kepolarannya terhadap kedua fase tersebut (Coskun, 2016).



Gambar 2.7 Kromatografi Cair Vakum
(Maurya dkk., 2018)

Salah satu teknik fraksinasi yang memanfaatkan prinsip ini adalah kromatografi kolom, dimana fase diam ditempatkan didalan kolom, sedangkan fase gerak berupa pelarut atau eluen dialirkan untuk membawa komponen sampel melalui kolom. Pada beberapa metode, aliran eluen dapat dipercepat dengan bantuan tekanan vakum sehingga proses pemisahan menjadi lebih cepat dan efisien (Diasuti dkk., 2024). Pada metode kromatografi kolom vakum, prinsip pemisahan didasarkan pada mekanisme adsorpsi dan partisi antara fase diam dan fase gerak (Syafitri & Ersam, 2016). Keunggulan metode KCV dalam proses pemisahan dapat berlangsung lebih cepat akibat penggunaan tekanan vakum, biaya ekonomis, pengerjaan sederhana, senyawa lebih spesifik. Adapun keterbasan metode ini yaitu resolusi rendah sehingga hasil fraksi masih berupa campuran, konsumsi pelarut cukup besar (Afiyati & Murrukmiyadi, 2013).

2.7 Kromatoggrafi Lapis Tipis (KLT)

Metode kromatografi lapis tipis merupakan analisis yang digunakan untuk mengidentifikasi serta memisahkan senyawa. Prinsip pemisahan pada KLT berlangsung berdasarkan mekanisme adsorpsi dan partisi, yang dipengaruhi oleh interaksi senyawa dengan fase diam dan fase gerak (Mustaqimah, 2023). Pada metode ini, fase diam umumnya berupa lapisan tipis silika gel atau alumina yang dilapiskan pada plat, sedangkan fase gerak berupa pelarut atau campuran pelarut yang sesuai (Hafizah & Sunardi, 2024). Plat silika gel 60 F₂₅₄ mengandung indikator fluoresensi, sehingga pada penyinaran UV 254, plat akan berfluoresensi

sehingga noda senyawa tampak sebagai pita berwarna gelap. Sementara pada UV 366 adsorben tidak berfluoresensi sehingga latar belakang tampak gelap, sedangkan senyawa yang memiliki gugus kromofor dan ausokrom akan berfluoresensi dan terlihat sebagai pita yang bersinar (Kautsari dkk., 2020).

Hasil analisis KLT dievaluasi berdasarkan nilai *retention factor* (R_f) dan luas area noda yang terbentuk, dimana R_f menggambarkan tingkat pergerakan noda senyawa dari titik awal aplikasi pada plat KLT dan dinyatakan sebagai perbandingan antara jarak yang ditempuh noda dengan jarak total yang ditempuh oleh fase gerak (Prasetyawan dkk., 2024). Selain itu, dalam penelitian bahan alam juga dilakukan uji fitokimia sebagai metode skrining awal untuk mendeteksi keberadaan senyawa metabolit sekunder dalam tanaman. Senyawa fenolik dapat diidentifikasi menggunakan pereaksi FeCl_3 yang ditandai dengan terbentuknya bercak berwarna hitam, sedangkan flavonoid menunjukkan hasil positif kuning melalui reaksi dengan pereaksi AlCl_3 (Jonathan dkk., 2024). Kromatografi lapis tipis (KLT) memiliki beberapa kelebihan yaitu waktu analisis cepat, teknik sederhana, tidak memerlukan alat mahal, biaya rendah, dapat menganalisis beberapa sampel sekaligus, mampu mendeteksi konsentrasi rendah, serta cocok untuk senyawa organik polar maupun nonpolar. Kekurangan dari metode ini yaitu, lebih cocok untuk analisis kualitatif, hasil dapat bervariasi tergantung keterampilan operator, kurang efektif untuk campuran sangat kompleks, dan hasil dipengaruhi oleh kelembaban, suhu, serta jenis pelarut (Muhaimin dkk., 2025).

2.8 Uji Antioksidan

Pengujian aktivitas antioksidan dapat dilakukan menggunakan beberapa metode, salah satunya yaitu metode 2,2 difenil-1- pikrihidrazil (DPPH). Metode DPPH meruokan metode pengujian aktivitas antioksidan yang prinsip kerjanya didasarkan pada reaksi oksidasi dan reduksi senyawa radikal bebas DPPH dengan senyawa antioksidan (Purwanti dkk., 2019). Senyawa DPPH merupakan radikal bebas yang stabil di larutan air maupun metanol dan memiliki kemampuan menyerap cahaya secara kuat pada panjang gelombang 517 nm, sehingga sering digunakan dalam pengujian aktivitas antioksidan (Salimi, 2021). Reaksi antara DPPH dan antioksidan dapat berlangsung melalui dua mekanisme, yaitu donor atom hidrogen

rendah, serta radikal DPPH relatif mudah terdegradasi cahaya, oksigen, dan perubahan pH (Apak dkk., 2013).

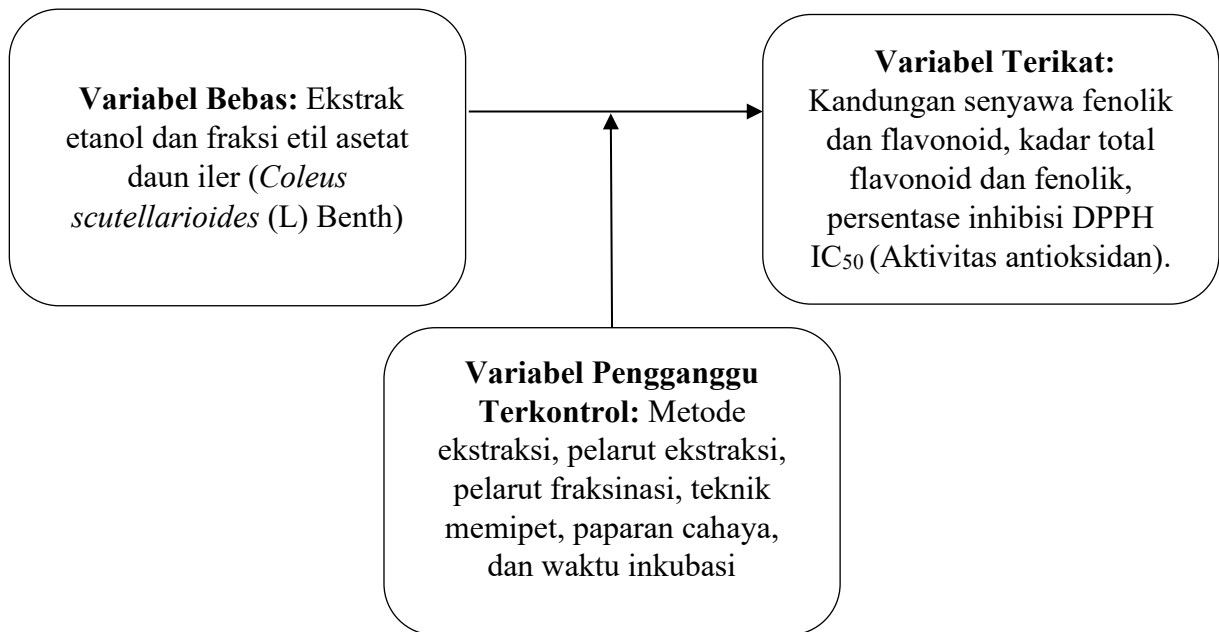
2.9 Landasan Teori

Beberapa penelitian menunjukkan bahwa daun iler mengandung senyawa flavonoid dan fenolik yang berpotensi sebagai antioksidan karena kemampuannya menangkap radikal bebas. Widhihastuti dkk. (2024) melaporkan keberadaan kedua senyawa tersebut pada ekstrak etanol, sedangkan Suryati dkk. (2018) juga menemukan senyawa fenolik dan flavonoid pada fraksi etil asetat. Kedua senyawa tersebut diketahui berperan penting dalam memberikan aktivitas antioksidan. Secara kuantitatif, Putri & Widhihastuti (2023) melaporkan kadar fenolik total 0,5659 mg GAE/g dan flavonoid total 1,0398 mg QE/g pada ekstrak etanol 96%, sementara Suryati dkk. (2018) memperoleh kadar fenolik 3,3 mg GAE/g dan Verawati dkk. (2016) melaporkan kadar flavonoid 9,63 mg QE/g pada fraksi etil asetat. Aktivitas antioksidan daun iler telah dibuktikan dengan metode DPPH, dimana ekstrak etanol dan fraksi etil asetat memiliki nilai IC_{50} masing-masing sebesar 80,23 ppm dan 54,20 ppm (Moelyono dkk., 2016). Hasil ini didukung oleh Aji dkk. (2022) yang melaporkan bahwa ekstrak etanol daun iler juga menunjukkan aktivitas antioksidan yang diuji secara spektrofotometri menggunakan metode DPPH. Penggunaan UAE dan KCV dalam penelitian ini didasarkan pada bukti bahwa UAE menghasilkan kadar flavonoid yang lebih tinggi (0,62%) dibandingkan maserasi (0,41%) (Utami dkk., 2020), dan KCV mampu menghasilkan pemisahan lebih spesifik dibandingkan fraksinasi cair-cair (Khumaidi dkk., 2020; Ritna dkk., 2016).

2.10 Hipotesis

1. Ekstrak etanol dan fraksi etil asetat daun iler mengandung senyawa fenolik dan flavonoid.
2. Fraksi etil asetat memiliki kadar total fenolik dan flavonoid lebih tinggi dibandingkan ekstrak etanol.
3. Fraksi etil asetat memiliki aktivitas antioksidan lebih kuat dibandingkan ekstrak etanol.

2.11 Kerangka Konsep Penelitian



Gambar 2.9 Kerangka Konsep Penelitian

BAB III

METODE PENELITIAN

3.1 Bahan Penelitian

Bahan yang digunakan dalam penelitian yaitu simplisia daun iler (*Coleus scutellarioides* (L.) Benth.) yang diperoleh dan dideterminasi dari Balai Besar Penelitian dan Pengembangan Tanaman Obat dan Obat Tradisional (B2P2TOOT) yang berlokasi di Tawangmangu, Karanganyar, Jawa Tengah, etanol 96% (Bratachem), serbuk silika gel 60G (Supelco), methanol teknis, etil asetat teknis, n-heksana teknis, 1-butanol (Merck), asam asetat (Merck), akuades, asam galat (Sigma-Aldrich), toluen (Supelco), etil asetat (SmartLab), asam format (Merck), kuersetin (Sigma Aldrich), besi(III) klorida (FeCl_3) (Supelco), aluminium klorida (AlCl_3) (Merck), Folin-Cicalteu (Merck), natrium karbonat (Na_2CO_3) (Merck), kalium asetat (CH_3COOK) (Merck), metanol, serbuk DPPH (2,2-difenil-1-pikrilhidrazil) (Himedia), dan serbuk asam askorbat (Merck).

3.2 Alat Penelitian

Alat yang digunakan dalam penelitian, yaitu oven (Memmert), kertas saring, plat silika gel 60 F₂₅₄ (Supelco), grinder (Wilman), *moisture analyzer* (Mettler Toledo), neraca analitik (Ohaus dan Mettler Toledo), seperangkat alat gelas (Iwaki dan Pyrex), sonikator (GT Sonic), vakum (Gast dan Rocker 300), rotary evaporator (Heidolph dan Buchi), *waterbath* (Memmert), lemari pendingin (Sharp), lemari asam (I-blush Fume Hood PJK-1800), *microtube* (Axygen), *UV-cabinet* (Camag), Mikropipet (Thermo Scientific dan Dragonlab), rak microtube, rak tabung reaksi, *vortex* (Thermo Scientific), dan spektrofotometer UV-Vis (Shimadzu UV-1780), kuvet (Quality Quartz), chamber, vial, dan botol gelap, dan *aluminium foil* (Heavy Duty).

3.3 Cara Kerja Penelitian

3.3.1 Preparasi sampel

Simplisia kering daun iler (*Coleus scutellarioides* (L.) Benth) diperoleh dan telah dideterminasi dari Balai Besar Penelitian dan Pengembangan Tanaman Obat dan Obat Tradisional (B2P2TOOT) yang berlokasi di Tawangmangu, Karanganyar, Jawa Tengah. Sampel kemudian dikeringkan menggunakan oven pada suhu 50°C selama 2 jam, dilakukan pengecekan kadar air, selanjutnya dihaluskan menggunakan *grinder*, dan disimpan dalam wadah tertutup rapat yang dilapisi aluminium foil untuk menjaga kestabilan sampel (Muadifah dkk., 2023).

3.3.2 Ekstraksi

Serbuk simplisia daun iler sebanyak 100 g dimasukkan kedalam gelas beaker berkapasitas 1000 mL, kemudian ditambahkan etanol 96% sebagai pelarut dengan perbandingan 1:10 (Triyanti dkk., 2025). Gelas beaker ditutup rapat menggunakan aluminium foil, lalu dilakukan proses ekstraksi dengan metode sonikasi selama 30 menit pada suhu 40°C dengan frekuensi gelombang 40 kHz. Setelah proses sonikasi selesai, campuran dibiarkan selama 30 menit untuk memungkinkan partikel kasar mengendap (Utami dkk., 2020). Seluruh filtrat kemudian digabungkan dan disaring kembali menggunakan kertas saring *whatman* dengan bantuan corong *buchner* dan pompa vakum. Hasil filtrat dimasukkan ke dalam labu dan dilakukan penguapan pelarut menggunakan *rotary vacuum evaporator* pada suhu 50°C, kecepatan putar 60 rpm, dengan tekanan dimulai dari 200-175 mBar hingga pelarut etanol 96% menguap. Ekstrak pekat yang diperoleh kemudian dipanaskan menggunakan *waterbath* dengan suhu sekitar 60° untuk menghilangkan sisa pelarut sehingga diperoleh ekstrak kental (Kartini dkk., 2025). Proses ekstraksi dilakukan sebanyak 7 kali dengan urutan proses dan gramasi yang sama.

3.3.3 Fraksinasi

Ekstrak kental daun iler selanjutnya difraksinasi menggunakan metode kromatografi cair vakum (KCV). Bagian dasar kolom dilapisi kertas saring terlebih dahulu, kemudian diisi dengan silika gel 60 G sebanyak 50 gram sebagai fase diam. Ekstrak kental etanol daun iler ditimbang sebanyak 5 gram kemudian diimpregnasi dengan silika gel 60 G sebanyak 10 gram menggunakan mortir dan stamper hingga

diperoleh campuran kering yang homogen. Campuran tersebut kemudian dimasukkan ke dalam kolom dan bagian atasnya ditutup kembali dengan kertas saring. Dilakukan proses elusi secara bertahap menggunakan pelarut dengan tingkat kepolaran yang meningkat, dimulai dari n-heksan dilanjutkan dengan etil asetat, masing-masing digunakan hingga eluat yang dihasilkan menjadi jernih. Setiap fraksi hasil elusi kemudian diuapkan menggunakan *rotary vacuum evaporator* pada suhu 50°C, tekanan vakum dari 350-240 mBar dan kecepatan putar 60 rpm, fraksi pekat yang diperoleh kemudian dipanaskan menggunakan *waterbath* dengan suhu sekitar 60° untuk menghilangkan sisa pelarut sehingga diperoleh fraksi etil asetat kental (Wusu dkk., 2022). Proses fraksinasi dilakukan sebanyak 9 kali dengan urutan proses dan gramasi yang sama.

3.3.4 Identifikasi senyawa dalam ekstrak dan fraksi daun iler

Analisis identifikasi komponen bioaktif pada ekstrak etanol dan fraksi etil asetat daun iler dilakukan menggunakan metode kromatografi lapis tipis (KLT). Fase diam yang digunakan adalah silika gel GF₂₅₄ pada plat berukuran 6 x 10 cm, dengan penanda garis batas sejauh 1 cm dari tepi atas dan bawah plat. Sampel yang diuji terdiri dari ekstrak etanol, fraksi etil asetat, serta standar pembanding yang ditotolkan pada garis bawah plat menggunakan mikro pipet. Selanjutnya plat dimasukkan kedalam *chamber*, kemudian dielusi menggunakan fase gerak 1-butanol: asam asetat: akuades (4: 1: 3) sebanyak 10 mL yang telah dijenuhkan, untuk identifikasi senyawa fenolik dengan standar asam galat dan fase gerak toluen: etil asetat: asam format (7: 3: 1) sebanyak 10 mL yang telah dijenuhkan untuk identifikasi senyawa flavonoid dengan standar kuersetin. Setelah proses elusi selesai, plat dikeringkan dan divisualisasikan dibawah sinar tampak serta radiasi ultraviolet pada panjang gelombang 254 dan 366 untuk mengamati munculnya spot-spot senyawa. Identifikasi lebih lanjut terhadap senyawa flavonoid dilakukan dengan penyemprotan pereaksi aluminium klorida (AlCl₃) , dan pengujian senyawa fenolik dengan pereaksi FeCl₃ (Junaedi dkk., 2023; Kementerian Kesehatan, 2022; Saraswati dkk., 2021).

3.3.5 Uji kadar total fenolik dan flavonoid ekstrak dan fraksi daun iler

a. Kadar fenolik total

1. Pembuatan larutan induk asam galat

Larutan induk asam galat dibuat dengan menimbang sejumlah 10 mg kemudian dilarutkan dalam metanol sebanyak 1 mL dalam *microtube* (Nofita dkk., 2020). Dari larutan induk dipipet 1 mL dan diencerkan dengan metanol ke dalam labu ukur 10 mL hingga tanda batas sehingga diperoleh larutan stok (Sadlia dkk., 2024).

2. Pembuatan larutan Na_2CO_3 7,5%

Larutan Na_2CO_3 dibuat dengan melarutkan 7,5 g serbuk Na_2CO_3 dengan 10 mL akuades dalam cawan porselen kemudian dipanaskan diatas *waterbath* sampai serbuk Na_2CO_3 larut sempurna. Setelah itu didiamkan selama 24 jam, disaring dan diencerkan dengan akuades pada labu ukur 100 mL hingga tanda batas (Nofita dkk., 2020).

3. Pembuatan larutan *Folin-Ciocalteu*

Larutan *Folin-Ciocalteu* dibuat dengan mengencerkan 10 mL reagen *Folin-Ciocalteu* menggunakan akuades dalam labu ukur 100 mL (1:10) kemudian gojog hingga homogen dan disimpan dalam botol gelap (Rizvi dkk., 2023).

4. Pembuatan larutan blanko

Larutan blanko dibuat dengan mencampurkan 2300 μL akuades dan 1500 μL reagen *Folin-Ciocalteu* (1:10) dalam tabung reaksi, kemudian dihomogenkan dan didiamkan selama ± 3 menit. Selanjutnya, ditambahkan 1200 μL larutan Na_2CO_3 7,5% dan diresuspensi kembali hingga tercampur merata, masukkan kedalam kuvet absorbansinya diukur menggunakan spektrofotometer Uv-Vis pada rentang panjang gelombang 500-800 nm.

5. Penentuan panjang gelombang maksimum asam galat

Larutan stok asam galat dengan konsentrasi 5 ppm dipipet sebanyak 25 μL dicampurkan dengan 2275 μL pelarut akuades dan direkasikan dengan 1500 μL reagen *Folin-Ciocalteu* yang telah di encerkan (1:10) dalam tabung reaksi. Campuran tersebut diresuspensi hingga homogen lalu dibiarkan selama ± 3 menit. Larutan natirum karbonat Na_2CO_3 7,5% sejumlah 1200 μL

ditambahkan kemudian diresuspensi kembali sampai tercampur merata, absorbansinya diukur menggunakan spektrofotometer Uv-Vis pada rentang panjang gelombang 500-800 nm. Panjang gelombang dengan absorbansi tertinggi akan ditetapkan sebagai panjang gelombang maksimum untuk pengujian sampel (Nofita dkk., 2020).

6. Penentuan *operating time* asam galat

Larutan asam galat 5 ppm dipipet sebanyak 25 μL dicampurkan dengan 2275 μL pelarut akuades dan direaksikan dengan 1500 μL reagen *Folin-Ciocalteu* yang telah di encerkan (1:10) dalam tabung reaksi. Campuran tersebut diresuspensi hingga homogen lalu dibiarkan selama ± 3 menit. Larutan natirum karbonat Na_2CO_3 7,5% sejumlah 1200 μL ditambahkan kemudian diresuspensi kembali sampai tercampur merata, absorbansinya diukur menggunakan spektrofotometer Uv-Vis pada panjang gelombang maksimum dalam rentang waktu 0 hingga 120 menit. Waktu dengan nilai absorbansi yang stabil tiap menit ditetapkan sebagai waktu operasi untuk pengujian sampel (Nofita dkk., 2020).

7. Pembuatan kurva kalibrasi asam galat

Larutan stok asam galat dipipet masing-masing sebanyak 12,5; 25; 50; 75 dan 100 μL dalam tabung reaksi dengan konsentrasi 2,5; 5; 10; 15 dan 20 ppm, kemudian di larutkan menggunakan akuades dengan volume tertentu dan direaksikan dengan 1500 μL reagen *Folin-Ciocalteu* yang telah di encerkan (1:10), kemudian dihomogenkan. Setelah didiamkan selama ± 3 menit, masing-masing larutan ditambahkan 1200 μL larutan Na_2CO_3 7,5%, dihomogenkan kembali sehingga setiap larutan uji memiliki volume akhir sebesar 5000 μL , dan di inkubasi pada suhu kamar selama *operating time* (60 menit). Selanjutnya, diukur absorbansi seluruh larutan pada panjang gelombang maksimum (773 nm) menggunakan spektrofotometer UV-Vis, selanjutnya dibuat kurva baku yang menunjukkan hubungan antara konsentrasi asam galat dan nilai absorbansi (Nofita dkk., 2020).

8. Penetapan kadar fenolik total ekstrak etanol dan fraksi etil asetat

Ekstrak etanol dan fraksi etil asetat daun iler ditimbang dalam *microtube* sebanyak 10 mg, kemudian dilarutkan dengan metanol sebanyak 1 mL. Dari larutan induk dipipet 1 mL dan diencerkan menggunakan metanol ke dalam labu ukur 10 mL hingga tanda batas. Selanjutnya diambil 500 μ L larutan hasil pengenceran dilarutkan dalam akuades sebanyak 1800 μ L dan direaksikan dengan 1500 μ L reagen *Folin-Ciocalteu* yang telah diencerkan (1:10) kemudian dihomogenkan. Didiamkan selama $\pm$ 3 menit, setelah waktunya selesai ditambahkan 1200 μ L larutan Na_2CO_3 7,5%, sehingga setiap larutan uji memiliki volume akhir sebesar 5000 μ L, kemudian diinkubasi pada suhu ruang selama *operating time* (60 menit). Pengukuran absorbansi dilakukan menggunakan spektrofotometer UV-Vis pada panjang gelombang maksimum (773 nm) dengan tiga kali replikasi untuk setiap sampel (Nofita dkk., 2020).

b. Kadar total flavonoid

1. Pembuatan larutan induk kuersetin

Kuersetin ditimbang sejumlah 10 mg kemudian dilarutkan menggunakan metanol didalam *microtube* hingga mencapai volume 1 mL. Dari larutan induk dipipet 1 mL dan diencerkan dengan metanol ke dalam labu ukur 10 mL hingga tanda batas sehingga diperoleh larutan stok (Sadlia dkk., 2024).

2. Pembuatan larutan AlCl_3 10%

Serbuk AlCl_3 ditimbang sebanyak 5 gram dalam gelas beaker dilarutkan menggunakan 10 mL akuades, kemudian dipindahkan kedalam labu ukur 50 mL tambahkan akuades hingga tanda batas, dihomogenkan dan disimpan dalam botol kaca gelap (Nofita dkk., 2020).

3. Pembuatan larutan Kalium asetat (CH_3COOK 1M)

Serbuk kalium asetat (CH_3COOK 1M) ditimbang sebanyak 4,907 gram dalam gelas beaker dilarutkan menggunakan 10 mL akuades, kemudian dipindahkan kedalam labu ukur 50 mL tambahkan akuades hingga tanda batas, dihomogenkan dan disimpan dalam wadah yang tertutup rapat (Nofita dkk., 2020).

4. Pembuatan larutan blanko

Larutan blanko dibuat dengan mencampurkan 4800 μL metanol dengan 100 μL larutan aluminium klorida (AlCl_3) 10% dan 100 μL larutan kalium asetat 1M dalam tabung reaksi, campuran kemudian diresuspensi hingga homogen.

5. Penentuan panjang gelombang maksimum kuersetin

Larutan stok kuersetin dengan konsentrasi 16 ppm dipipet sebanyak 120 μL ditambahkan 4720 μL pelarut metanol dan direaksikan dengan 100 μL larutan aluminium klorida (AlCl_3) 10% dan 100 μL larutan kalium asetat (CH_3COOK 1M) dalam tabung reaksi. Campuran kemudian diresuspensi hingga homogen dan dimasukkan kedalam kuvet kemudian diukur absorbansinya untuk menentukan panjang gelombang maksimumnya menggunakan spektrofotometer UV-Vis pada rentang 300-500 nm. Panjang gelombang dengan absorbansi tertinggi akan ditetapkan sebagai panjang gelombang maksimum untuk pengujian sampel (Sadlia dkk., 2024).

6. Penentuan *operating time* kuersetin

Larutan stok kuersetin dengan konsentrasi 16 ppm dipipet sebanyak 120 μL ditambahkan 4720 μL pelarut metanol dan direaksikan dengan 100 μL larutan aluminium klorida (AlCl_3) 10% dan 100 μL larutan kalium asetat (CH_3COOK 1M) dalam tabung reaksi. Campuran kemudian diresuspensi hingga homogen dan dimasukkan kedalam kuvet kemudian diukur absorbansinya diukur pada panjang gelombang maksimum yang telah ditetapkan, dalam waktu 0 hingga 45 menit dengan interval waktu 1 menit. Pengukuran dilakukan hingga nilai absorbansi stabil atau tidak mengalami perubahan signifikan. Waktu dengan nilai absorbansi yang stabil tiap menit ditetapkan sebagai waktu operasi untuk pengujian sampel (Suharyanto & Hayati, 2021).

7. Pembuatan kurva kalibrasi kuersetin

Larutan stok kuersetin dipipet masing-masing sebanyak 10,20,40,80, dan 120 μL , dengan konsentrasi 2,4,8,16, dan 24 ppm. Dari masing-masing seri kadar di larutkan menggunakan methanol dengan volume tertentu dan dimasukkan kedalam tabung reaksi, kemudian direaksikan dengan 100 μL larutan AlCl_3 10% dan 100 μL larutan kalium asetat (CH_3COOK 1M). Setiap larutan di resuspensi hingga tercampur merata, larutan didiamkan sesuai waktu

operating time (30 menit). Absorbansi diukur menggunakan spektrofotometer UV-Vis pada panjang gelombang maksimum (440 nm) kemudian dibuat kurva baku hubungan antara konsentrasi kuersetin dengan absorbansi (Sadlia dkk., 2024).

8. Penetapan kadar flavonoid total ekstrak etanol dan fraksi etil asetat

Ekstrak etanol dan fraksi etil asetat daun iler ditimbang sebanyak 10 mg, kemudian masing dilarutkan dengan metanol hingga volume 1 mL menggunakan *microtube* (larutan induk). Dari larutan induk dipipet 1 mL dan diencerkan dengan metanol ke dalam labu ukur 10 mL sehingga diperoleh larutan stok. Selanjutnya, sebanyak 500 µL larutan sampel dimasukkan kedalam tabung reaksi kemudian dilarutkan menggunakan metanol sebanyak 4300 µL dan di reaksikan dengan 100 µL larutan AlCl_3 10% serta 100 µL larutan kalium asetat (CH_3COOK 1M). Larutan didiamkan selama *operating time* (30 menit), dan absorbansi diukur menggunakan spektrofotometer UV-Vis pada panjang gelombang maksimum (440 nm) dengan tiga kali replikasi untuk masing-masing sampel (Sadlia dkk., 2024).

3.3.6 Uji aktivitas antioksidan ekstrak dan fraksi daun iler

a. DPPH (2,2 difenil-1- pikrihidrazil)

1. Pembuatan larutan DPPH

Serbuk DPPH ditimbang sebanyak 15,8 mg kemudian dilarutkan dalam metanol hingga volume 1 mL didalam *microtube*. Dari larutan induk dipipet 1 mL dan diencerkan dengan metanol ke dalam labu ukur 100 mL hingga tanda batas sehingga diperoleh larutan stok DPPH. Larutan disimpan dalam botol kaca berwarna gelap pada suhu ruang untuk mencegah terjadinya degradasi akibat paparan Cahaya (Muadifah dkk., 2023).

2. Penentuan panjang gelombang maksimum

Larutan stok DPPH dipipet sebanyak 1 mL, kemudian ditambahkan 4 mL metanol. Campuran tersebut dimasukkan ke dalam tabung reaksi dan dihomogenkan hingga tercampur sempurna. Selanjutnya, campuran dimasukkan ke dalam kuvet, lalu diukur nilai absorbansinya pada rentang panjang gelombang 400-700 nm menggunakan spektrofotometer UV-Vis untuk menentukan panjang gelombang dengan nilai serapan tertinggi.

Panjang gelombang dengan absorbansi tertinggi akan ditetapkan sebagai panjang gelombang maksimum untuk pengujian sampel (Muadifah dkk., 2023).

3. Penentuan *operating time*

Larutan DPPH dipipet sebanyak 1 mL kemudian ditambahkan metanol sebanyak 2,8 mL dan 0,2 mL vit C dalam tabung reaksi (Muadifah dkk., 2023). Larutan dimasukkan kedalam kuvet dan serapan tersebut diukur pada waktu 0-80 menit pada panjang gelombang maksimum. Larutan diukur dengan interval waktu satu menit, waktu dengan nilai absorbansi yang stabil tiap menit ditetapkan sebagai waktu operasi untuk pengujian sampel (Mustarichie & Ramdhani, 2021).

9. Penentuan aktivitas antioksidan Vitamin C sebagai pembanding

Serbuk vitamin C ditimbang sebanyak 10 mg secara teliti, kemudian dilarutkan ke dalam 1 mL metanol dalam *microtube* untuk memperoleh larutan induk. Dari larutan induk dipipet 1 mL dan diencerkan dengan metanol ke dalam labu ukur 10 mL sehingga diperoleh larutan stok vit C. Larutan stok vit C dibuat seri kadar masing-masing 2 ppm, 4 ppm, 6 ppm, 8 ppm, dan 10 ppm dengan mengambil volume sampel berturut-turut sebesar 8,16,24,32, dan 40 μ L sampel kemudian dilarutkan menggunakan metanol dengan volume tertentu. Setelah itu masing-masing larutan uji direaksikan dengan 1000 μ L larutan stok DPPH dalam tabung reaksi yang dilapisi aluminium foil, setiap larutan uji memiliki volume akhir sebesar 4000 μ L. Campuran tersebut dihomogenkan, dan diinkubasi selama (25 menit) *operating time* di ruangan gelap untuk mencegah degradasi akibat cahaya. Setelah proses inkubasi selesai, absorbansi larutan diukur pada panjang gelombang maksimum (515 nm) menggunakan spektrofotometer UV-Vis, kemudian dibuat kurva baku hubungan antara konsentrasi dengan absorbansi. Nilai IC₅₀ ditentukan berdasarkan persamaan regresi linear antara konsentrasi sampel dan presentase inhibisi (Muadifah dkk., 2023).

10. Penentuan aktivitas antioksidan ekstrak etanol dan fraksi etil asetat

Larutan induk dibuat dengan menimbang 10 mg masing-masing ekstrak etanol dan fraksi etil asetat daun iler, kemudian dilarutkan dalam metanol

hingga volume 1 mL dalam *microtube*. Dari larutan induk dipipet 1 mL dan diencerkan dengan metanol ke dalam labu ukur 10 mL sehingga diperoleh larutan stok. Dari larutan stok dibuat lima seri, dengan mengambil volume sampel berturut-turut sebesar 15,6; 31,25; 62,5; 125; dan 250 μL ke dalam tabung reaksi yang sudah dilapisi aluminium foil dan menambahkan methanol dengan volume tertentu, kemudian direaksikan dengan 1000 μL larutan stok DPPH, setiap larutan uji memiliki volume akhir sebesar 4000 μL . Campuran tersebut dihomogenkan, dan diinkubasi selama *operating time* (25 menit) di ruangan gelap untuk mencegah degradasi akibat cahaya. Setelah proses inkubasi selesai, absorbansi larutan diukur pada panjang gelombang maksimum (515 nm) menggunakan spektrofotometer UV-Vis, kemudian dibuat kurva baku hubungan antara konsentrasi dengan absorbansi. Nilai IC_{50} ditentukan berdasarkan persamaan regresi linear antara konsentrasi sampel dan presentase inhibisi (Muadifah dkk., 2023).

3.4 Analisis Hasil

3.4.1 Analisis kualitatif

Identifikasi sampel dilakukan dengan pengamatan dibawah sinar tampak serta radiasi ultraviolet 254 dan 366, disertai dengan penyemprotan reagen kimia. Pengamatan fitokimia dilakukan berdasarkan perubahan warna noda yang muncul setelah penyemprotan reagen. Hasil positif untuk senyawa fenolik ditandai dengan munculnya perubahan warna biru kehitaman setelah penyemprotan FeCl_3 dan diamati dibawah sinar tampak. Sementara itu, keberadaan senyawa flavonoid diindikasikan oleh munculnya warna biru atau kuning setelah penyemprotan AlCl_3 yang terlihat jelas dibawah sinar UV 366 (Kowalska & Sajewicz, 2022).

3.4.2 Analisis kuantitatif

a. Ekstraksi

Ekstrak yang diperoleh dari proses ekstraksi dinyatakan dalam bentuk persentase rendemen. Besarnya nilai rendemen ekstrak dihitung menggunakan rumus perbandingan antara bobot ekstrak yang dihasilkan dengan bobot simplisia awal, kemudian dikalikan 100%, seperti yang tercantum pada rumus berikut (Aji dkk., 2022):

$$\% \text{ Rendemen} = \frac{\text{Bobot Ekstrak (gram)}}{\text{Bobot Simplisia Awal (gram)}} \times 100$$

b. Fraksinasi

Fraksi yang dihasilkan dari proses fraksinasi dinyatakan dalam bentuk persentase rendemen fraksi. Besarnya rendemen fraksi dihitung dengan membandingkan bobot fraksi yang diperoleh terhadap bobot ekstrak awal, kemudian dikalikan 100%. Seperti yang tercantum pada rumus berikut (Ilham dkk., 2024):

$$\% \text{ Rendemen} = \frac{\text{Bobot Fraksi (gram)}}{\text{Bobot Ekstrak (gram)}} \times 100$$

c. Identifikasi senyawa fenolik dan flavonoid

Pada proses identifikasi sampel menggunakan Kromatografi Lapis Tipis (KLT), diperoleh jarak pergerakan noda senyawa yang dinyatakan sebagai nilai *Retardation Factor (RF)*. Nilai RF dihitung berdasarkan perbandingan antara jarak yang di tempuh oleh noda sampel dengan jarak yang ditempuh oleh pelarut (fase gerak) seperti yang tercantum dalam rumus berikut:

$$R_f = \frac{\text{Jarak yang ditempuh oleh komponen}}{\text{Jarak yang ditempuh oleh pelarut}}$$

Nilai R_f berkisar antara 0-1,0 dan pemisahan dianggap optimal apabila nilai R_f berada dalam rentang 0,2-0,8. Kesamaan nilai R_f antara sampel uji dan senyawa baku mengindikasikan bahwa keduanya kemungkinan mengandung komponen senyawa yang identic (Kamar dkk., 2021).

d. Uji kadar total fenolik

Kandungan total fenolik dinyatakan dalam satuan mg ekuivalen asam galat per gram ekstrak (mg GAE/g). Perhitungan kadar total fenolik dilakukan menggunakan rumus berikut (Rohmah, 2022):

$$\text{Kadar Total Fenolik} = \frac{(C \times V \times F_p)}{g}$$

Keterangan:

- C : Konsentrasi fenolik (nilai x hasil persamaan regresi)
- V : Volume larutan ekstrak (mL)
- Fp : Faktor pengenceran
- g : Berat sampel (gram)

e. Uji kadar total flavonoid

Kandungan total fenolik dinyatakan dalam satuan mg ekuivalen kersetin per gram ekstrak (mg QE/g). Perhitungan kadar total fenolik dilakukan menggunakan rumus berikut (Rohmah, 2022):

$$\text{Kadar Total Fenolik} = \frac{(C \times V \times Fp)}{g}$$

Keterangan:

C : Konsentrasi flavonoid (nilai x hasil persamaan regresi)
 V : Volume larutan ekstrak (mL)
 Fp : Faktor pengenceran
 g : Berat sampel (gram)

f. Uji aktivitas antioksidan

Aktivitas antioksidan dari sampel ditetapkan berdasarkan kemampuannya menghambat penyerapan radikal DPPH, yang dinyatakan dalam bentuk presentase (%) inhibisi serapan DPPH dan dihitung menggunakan rumus berikut (Aji dkk., 2022):

$$\% \text{ Inhibisi Antioksidan} = \frac{\text{Abs kontrol} - \text{Abs sampel}}{\text{Abs kontrol}} \times 100$$

Nilai IC₅₀ dari ekstrak daun iler (*Coleus scutellarioides* (L.) Benth) ditentukan menggunakan persamaan regresi linier dengan konsentrasi ekstrak etanol daun iler sebagai sumbu X dan % inhibisi sebagai sumbu Y. persamaan yang digunakan adalah:

$$y = bx + a$$

Penentuan nilai IC₅₀ kemudian dihitung dengan menggunakan rumus (Aji dkk., 2022):

$$IC_{50} = \frac{50 - a}{b}$$

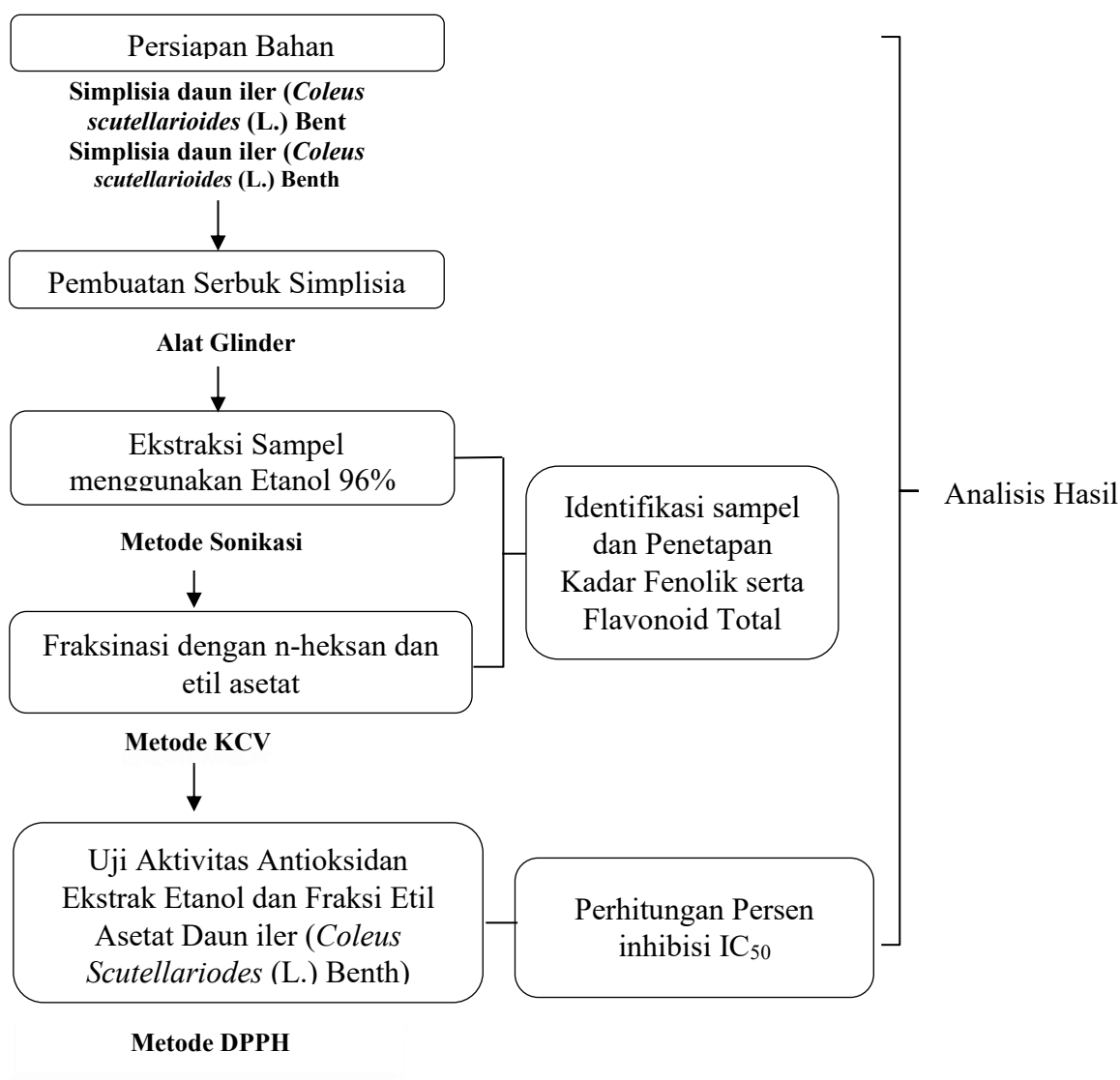
Keterangan:

Y = % inhibisi (50)
 a = Intercept (perpotongan garis di sumbu Y)
 b = Slope (Kemiringan)
 X = Konsentrasi

Secara umum, senyawa dikategorikan sebagai antioksidan sangat kuat jika nilai IC₅₀ kurang dari 50 µg/mL, kuat untuk IC₅₀ bernilai 50-100 µg/mL, sedang jika IC₅₀ bernilai 100-150 µg/mL dan lemah jika IC₅₀ bernilai 151-200 µg/mL. Semakin

rendah nilai IC_{50} , maka semakin kuat potensi aktivitas antioksidan dari suatu senyawa (Maulida dkk., 2022).

3.5 Alur Penelitian



Gambar 3.1 Alur Penelitian

BAB IV

HASIL DAN PEMBAHASAN

Penelitian ini bertujuan untuk mengidentifikasi kandungan senyawa fenolik dan flavonoid dalam ekstrak etanol dan fraksi etil asetat menggunakan metode kromatografi lapis tipis, penetapan kadar fenolik dan flavonoid, serta mengevaluasi aktivitas antioksidannya daun iler (*Coleus scutellarioides* (L.) Benth) melalui metode DPPH.

4.1 Ekstraksi dan Fraksinasi Daun Iler

Simplisia daun iler yang digunakan dalam penelitian ini telah diperoleh dan dideterminasi di Balai Besar Penelitian dan Pengembangan Tanaman Obat dan Obat Tradisional (B2P2TOOT), Tawamangu, Karanganyar, Jawa Tengah, dengan nomor laporan hasil uji TL.02.04/D.XI.6/30138.862/2025 yang tercantum pada **Lampiran 1**. Simplisia daun iler dikeringkan kemudian diserbukkan dan ditentukan kadar airnya (**Tabel 4.1**).

Tabel 4.1 Kadar Air Simplisia dan Serbuk Daun Iler

Sampel	Kadar Air (%)
Simplisia kering	5,28 ± 0,38
Serbuk simplisia	2,76 ± 0,70

Menurut Farmakope Herbal Indonesia Edisi II, kadar air tidak lebih dari 10% sehingga simplisia dan serbuk daun iler yang diperoleh memenuhi persyaratan dan berada dalam rentang yang dapat diterima (Kementerian Kesehatan, 2022). Penetapan kadar air merupakan parameter penting untuk menentukan batas maksimum kandungan air dalam suatu bahan, karena kadar air yang tinggi dapat mendukung pertumbuhan mikroorganisme seperti bakteri dan jamur (Kusumawati dkk., 2023). Oleh karena itu, simplisia dengan kadar air yang memenuhi standar digunakan sebagai bahan awal untuk proses ekstraksi. Ekstraksi daun iler dengan metode sonikasi menggunakan pelarut etanol 96% dipilih karena mampu mempercepat proses ekstraksi dan meningkatkan rendemen. Penggunaan etanol 96% sebagai pelarut didasarkan pada kemampuannya melarutkan senyawa dengan

berbagai tingkat polaritas, sehingga memungkinkan diperoleh ekstrak yang kompleks (Widhihastuti dkk., 2024). Ekstrak yang diperoleh kemudian difraksinasi menggunakan metode kromatografi cair vakum (KCV) dengan pelarut etil asetat untuk memisahkan senyawa berdasarkan kepolarannya, khususnya senyawa semi polar (Muthia dkk., 2018). Secara organoleptik, ekstrak etanol daun iler berwarna hijau kehitaman, bau khas, dan rasa agak pahit sedangkan fraksi etil asetat berwarna hijau tua kehitaman, bau khas, dan rasa agak pahit. Berdasarkan hasil penelitian, rendemen ekstrak etanol dan fraksi etil asetat disajikan pada **Tabel 4.2**.

Tabel 4.2 Rendemen Ekstrak Etanol dan Fraksi Etil Asetat Daun Iler

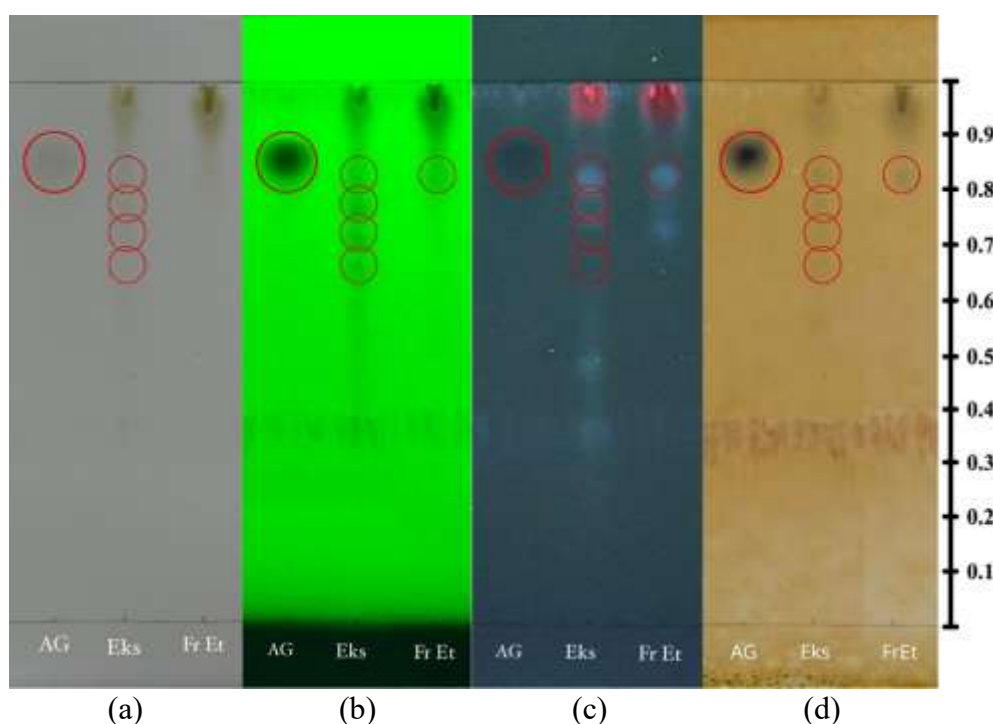
Sampel	Bobot (gram)	Rendemen (%)
Ekstrak etanol	83,0382	11,86
Fraksi etil asetat	17,5417	38,98

Tingginya rendemen pada ekstrak etanol dan fraksi etil asetat berkaitan dengan kesesuaian polaritas pelarut dalam mengekstraksi senyawa, sehingga proses pemisahan menjadi lebih efektif. Efisiensi ekstraksi dipengaruhi oleh ukuran partikel, jenis pelarut, metode, rasio bahan terhadap pelarut, serta waktu ekstraksi (Sulistiawanti dkk., 2025). Rendemen menunjukkan jumlah metabolit sekunder yang terekstraksi oleh pelarut, namun tidak menunjukkan jenis senyawa yang terkandung (Nofita dkk., 2020). Rendemen ekstrak etanol pada penelitian ini 11,86% lebih tinggi dibandingkan penelitian Putri & Widhihastuti (2023) sebesar 5,8% dan Afifah dkk. (2015) sebesar 4,2% yang keduanya menggunakan metode maserasi. Perbedaan tersebut diduga dipengaruhi oleh penggunaan metode UAE yang memanfaatkan efek kavitas ultrasonik sehingga meningkatkan efisiensi ekstraksi, serta metode fraksinasi KCV yang mampu memisahkan senyawa semipolar secara lebih optimal berdasarkan gradien polaritas.

4.2 Identifikasi Kandungan Senyawa Ekstrak Etanol dan Fraksi Etil

Asetat dengan Kromatografi Lapis Tipis (KLT)

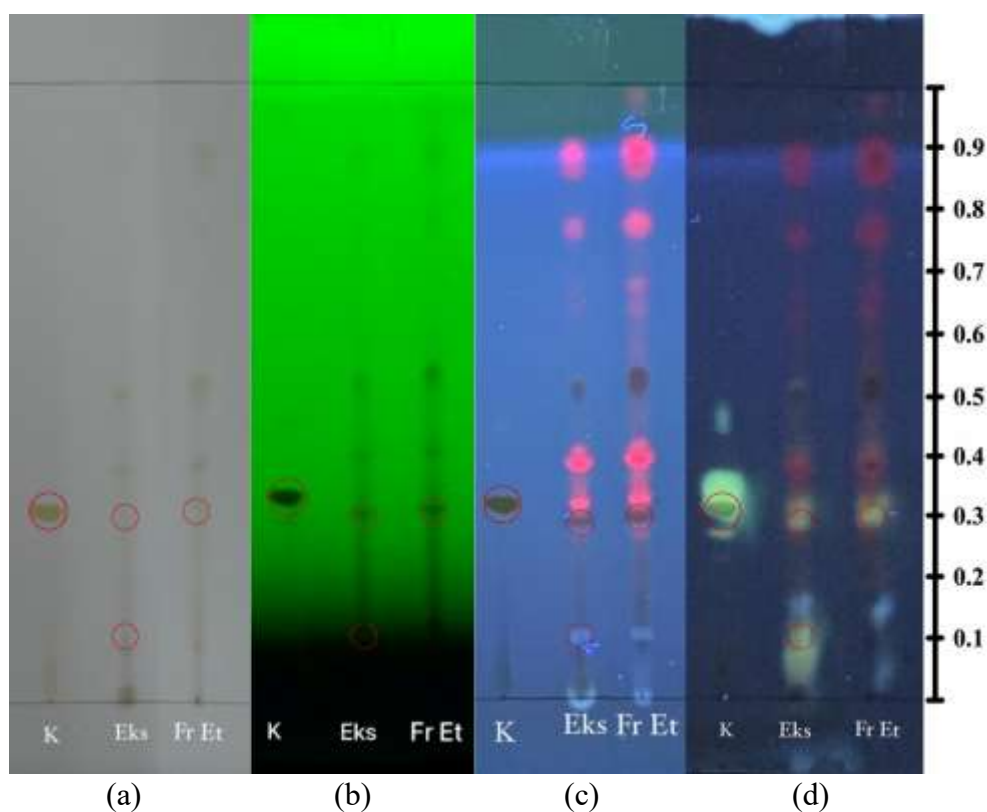
Ekstrak etanol dan fraksi etil asetat daun iler diidentifikasi menggunakan kromatografi lapis tipis (KLT). Metode ini digunakan untuk mengetahui kandungan senyawa, dengan pemisahan berdasarkan mekanisme adsorpsi dan partisi yang dipengaruhi oleh interaksi antara fase diam dan fase gerak. Uji identifikasi senyawa fenolik dengan reagen semprot FeCl_3 merupakan metode skrining sederhana untuk senyawa fenolik, dimana perubahan warna terjadi akibat pembentukan kompleks antara ion besi (III) dan gugus fenolat. Senyawa dengan satu atau lebih gugus hidroksil akan menghasilkan warna khas seperti ungu, biru, hijau, hingga merah kecokelatan, terutama pada struktur dengan gugus hidroksil bersebelahan seperti katekol atau galat yang mampu membentuk kompleks stabil dengan ion logam (Darina dkk., 2025).



Gambar 4.1 Profil Kromatografi Lapis Tipis Senyawa Fenolik Daun Iler

Keterangan: Elusi dilakukan dengan fase diam silika gel 60 GF₂₅₄ dan fase gerak 1-butanol: asam asetat: akuades (4: 1: 3). (a) plat hasil elusi pada sinar tampak, (b) plat hasil elusi pada sinar UV 254, (c) plat hasil elusi pada sinar UV 366, (d) plat hasil elusi setelah semprot reagen FeCl_3 pada sinar tampak. AG = asam galat, Eks = ekstrak etanol, FrEt = fraksi etil asetat.

Berdasarkan hasil identifikasi senyawa fenolik ekstrak etanol dan fraksi etil asetat daun iler mengandung senyawa fenolik (**Gambar 4.1**), yang ditunjukkan oleh munculnya bercak berwarna hitam pada plat KLT setelah penyemprotan reagen FeCl_3 pada pengamatan sinar tampak. Nilai R_f ekstrak etanol dan fraksi etil asetat (0,8375) yang mendekati nilai R_f standar asam galat (0,8625), sehingga mengindikasikan adanya senyawa yang serupa dengan asam galat. Selain itu, terdapat beberapa bercak lain dengan nilai R_f 0,675; 0,725; dan 0,7875 yang juga menunjukkan reaksi positif terhadap FeCl_3 , menandakan keberadaan senyawa fenolik lain yang berbeda dari asam galat.



Gambar 4.2 Profil Kromatografi Lapis Tipis Senyawa Flavonoid Daun Iler

Keterangan: Elusi dilakukan dengan fase diam silika gel 60 GF₂₅₄ dan fase Gerak toluen: etil asetat: asam format (7: 3: 1). (a) plat hasil elusi pada sinar tampak, (b) plat hasil elusi pada sinar UV 254, (c) plat hasil elusi pada sinar UV 366, (d) plat hasil elusi setelah semprot reagen AlCl_3 pada sinar UV 366. AG = asam galat, Eks = ekstrak etanol, FrEt = fraksi etil asetat.

Berdasarkan hasil identifikasi senyawa flavonoid ekstrak etanol dan fraksi etil asetat daun iler mengandung senyawa flavonoid (**Gambar 4.2**), yang ditunjukkan oleh munculnya bercak kuning gelap pada plat KLT setelah

penyemprotan reagen AlCl_3 dan pengamatan pada UV 366. Nilai R_f ekstrak etanol (0,2875) dan R_f fraksi etil asetat (0,3) mendekati nilai R_f standar kuersetin (0,3125), sehingga mengindikasikan adanya senyawa yang serupa dengan kuersetin. Selain itu, terdapat satu bercak lain dengan nilai R_f 0,1 yang juga menunjukkan reaksi positif terhadap AlCl_3 , menandakan keberadaan senyawa flavonoid lain yang berbeda dari kuersetin. Warna kuning terbentuk akibat kompleksasi antara ion Al^{3+} dengan gugus karbonil pada C-4 serta gugus hidroksil pada C-3 atau C-5, dan juga gugus orto-hidroksil pada cincin B ($\text{C3}' - \text{C4}'$), sehingga menghasilkan kompleks stabil dengan serapan didaerah tampak. Kemiripan nilai R_f dengan kuersetin menunjukkan bahwa senyawa flavonoid dalam sampel diduga memiliki struktur atau sifat yang serupa dengan kuersetin (Garg dkk., 2024).

Tabel 4.3 Identifikasi Kandungan senyawa Daun Iler Menggunakan KLT

Senyawa	Reagen semprot	Sampel		Perubahan Warna
		Ekstrak Etanol	Fraksi Etil asetat	
Fenolik	FeCl_3	+	+	Biru kehitaman
Flavonoid	AlCl_3	+	+	Kuning tua

Berdasarkan hasil penelitian, diketahui bahwa ekstrak etanol serta fraksi etil asetat daun iler terbukti mengandung senyawa fenolik dan flavonoid (**Tabel 4.3**). Hasil ini sejalan dengan penelitian oleh Segara M & Kurniawan (2023) yang melaporkan bahwa ekstrak etanol daun iler diketahui mengandung senyawa metabolit sekunder berupa alkaloid, flavonoid, fenol, saponin, dan tanin, serta tidak terdeteksi adanya senyawa steroid dan triterpenoid. Selain itu, penelitian Suryati dkk. (2018) menunjukkan bahwa fraksi etil asetat daun iler mengandung flavonoid, fenolik, triterpenoid, dan steroid. Dengan demikian, hasil penelitian ini memperkuat temuan sebelumnya terkait keberadaan senyawa fenolik dan flavonoid pada daun iler, baik dalam ekstrak etanol maupun fraksi etil asetat. Intensitas noda yang lebih jelas pada fraksi etil asetat menunjukkan bahwa senyawa flavonoid lebih banyak terdistribusi pada fraksi semipolar. Penggunaan metode UAE membantu meningkatkan pelepasan senyawa bioaktif melalui efek kavitasi dan peningkatan penetrasi pelarut kedalam sel tanaman. Salah satu flavonoid yang diketahui terdapat

pada daun iler adalah kuersetin yang termasuk golongan flavonol bersifat semipolar, sehingga lebih mudah larut dalam pelarut semipolar seperti etil asetat. Penggunaan metode KCV juga diduga mampu memisahkan senyawa semipolar secara lebih spesifik dibandingkan fraksinasi cair-cair. Perbedaan jenis senyawa yang teridentifikasi dapat dipengaruhi oleh pemilihan pelarut dan metode ekstraksi yang berkaitan dengan perbedaan polaritas pelarut sesuai prinsip *like dissolves like*, serta kondisi ekstraksi seperti suhu dan waktu yang mempengaruhi stabilitas dan jumlah senyawa yang terekstraksi (Popova & Bankova, 2023). Selain itu, variasi kandungan metabolit sekunder juga dipengaruhi oleh faktor lingkungan, kondisi stres, faktor internal seperti umur dan metabolisme tanaman, serta faktor waktu seperti musim dan siklus harian, sehingga menyebabkan perbedaan jenis maupun jumlah senyawa yang teridentifikasi (Qaderi dkk., 2023).

4.3 Kadar Total Fenolik Ekstrak Etanol dan Fraksi Etil Asetat Daun Iler

Penetapan kadar fenolik total menggunakan reagen *Folin-Ciocalteu*, yang bekerja melalui pembentukan kompleks berwarna biru dalam suasana basa, dimana senyawa fenolik terionisasi menjadi fenolat dan mereduksi fosfomolibat-fosfotungstat menjadi kompleks molybdenum-tungsten. Intensitas warna biru yang terbentuk berbanding lurus dengan kadar fenolik dalam sampel. Asam galat digunakan sebagai standar karena memiliki gugus hidroksil dan sistem terkonjugasi yang efektif dalam membentuk kompleks dengan reagen tersebut (Sitorus dkk., 2020). Dalam pengujian kadar total fenolik, terlebih dahulu dilakukan penentuan panjang gelombang maksimum menghasilkan 773 nm sebagai kondisi pengukuran dengan absorbansi tertinggi (**Lampiran 9**). Sementara itu, *operating time* optimum diperoleh selama 60 menit, yang menunjukkan waktu reaksi antara analit dan reagen telah mencapai kondisi stabil (**Lampiran 10**). Uji kadar fenolik total sampel dilakukan dengan spektrofotometer Uv-Vis menggunakan asam galat sebagai standar pembanding. Kurva kalibrasi asam galat pada rentang konsentrasi 2,45-19,62 µg/mL diperoleh persamaan regresi linear $y = 0,0685x + 0,1438$ di mana y merupakan nilai absorbansi dan x adalah kadar fenolik dalam sampel, dengan nilai koefisien korelasi (R^2) sebesar 0,9854 (**Lampiran 11**). Pengukuran dilakukan sebanyak tiga kali replikasi untuk meningkatkan keakuratan data. Berdasarkan hasil

penelitian, kadar total fenolik ekstrak etanol dan fraksi etil asetat daun iler dapat dilihat pada **Tabel. 4.4.**

Tabel 4.4 Kadar Total Fenolik Daun Iler

Sampel	Kadar Total Fenolik (mgGAE/g)
Ekstrak etanol	$3,79 \pm 0,11$
Fraksi etil asetat	$6,37 \pm 0,04$

Hasil penelitian menunjukkan bahwa fraksi etil asetat memiliki kadar total fenolik yang lebih tinggi dibandingkan ekstrak etanol. Hal ini karena sebagaian senyawa fenolik pada daun iler bersifat semipolar sehingga lebih mudah terdistribusi ke dalam pelarut etil asetat. Perbedaan kadar total fenolik dipengaruhi oleh perbedaan tingkat kepolaran pelarut yang digunakan. Etanol sebagai pelarut polar dapat menarik berbagai senyawa polar lainnya, sehingga ekstrak yang diperoleh masih mengandung campuran senyawa kompleks (Haroen dkk., 2025). Sementara itu, proses fraksinasi menyebabkan senyawa nonpolar terpisah terlebih dahulu sehingga senyawa fenolik lebih terkonsentrasi pada fraksi etil asetat (Ananda dkk., 2025). Hasil penelitian ini lebih tinggi dibandingkan penelitian oleh Suryati dkk. (2018) yang menggunakan metode maserasi dan fraksinasi cair-cair, dengan kadar fenolik fraksi etil asetat sebesar 3,3 GAE/g. Perbedaan tersebut diduga dipengaruhi oleh metode ekstraksi dan fraksinasi yang digunakan. Penggunaan metode UAE dalam penelitian ini lebih efisien dalam mengekstraksi senyawa fenolik dibandingkan metode maserasi karena gelombang ultrasonik mampu meningkatkan transfer massa melalui efek kavitasi sehingga pelepasan senyawa bioaktif dari sel tanaman berlangsung lebih optimal. Penggunaan KCV memungkinkan pemisahan senyawa berdasarkan gradien polaritas secara lebih spesifik dibandingkan fraksinasi cair-cair, sehingga senyawa fenolik dapat lebih terkonsentrasi pada fraksi etil asetat. Kombinasi kedua metode tersebut diduga menyebabkan senyawa fenolik lebih optimal terkonsentrasi pada fraksi etil asetat. Selain itu variasi bahan baku, seperti umur daun dan kondisi lingkungan tumbuh, juga berperan dalam menentukan kandungan metabolit sekunder (Qaderi dkk., 2023).

4.4 Kadar Total Flavonoid Ekstrak Etanol dan Fraksi Etil Asetat Daun

Iler

Penentuan kadar flavonoid dilakukan menggunakan metode kolorimetri AlCl_3 yang didasarkan pada kemampuan flavonoid membentuk kompleks berwarna kuning ketika direaksikan dengan AlCl_3 . Dalam metode ini, kuersetin digunakan sebagai larutan pembanding karena termasuk golongan flavonol yang mampu membentuk kompleks stabil dengan Al^{3+} (Natasya dkk., 2025). Kemampuan tersebut disebabkan oleh adanya gugus karbonil pada posisi C-4, gugus hidroksil pada posisi C-3 dan C-5, serta gugus orto-hidroksil pada cincin B yang berperan dalam pembentukan ikatan koordinasi dengan ion Al^{3+} . Kompleks yang terbentuk menunjukkan serapan maksimum pada daerah tampak sehingga menghasilkan warna kuning (Garg dkk., 2024). Dalam pengujian kadar total flavonoid, terlebih dahulu dilakukan penentuan panjang gelombang maksimum menghasilkan 440 nm sebagai kondisi pengukuran dengan absorbansi tertinggi (**Lampiran 12**). Sementara itu, *operating time* optimum diperoleh selama 30 menit, yang menunjukkan waktu reaksi antara analit dan reagen telah mencapai kondisi stabil (**Lampiran 13**). Penentuan kurva standar dilakukan untuk mengetahui hubungan antara konsentrasi larutan dan nilai absorbansi, sehingga kadar flavonoid dalam sampel dapat dihitung. Kurva kalibrasi kuersetin pada rentang konsentrasi 1,91-22,87 $\mu\text{g/mL}$ diperoleh persamaan regresi linear $y = 0,0594x + 0,0787$, dengan nilai koefisien korelasi (R^2) sebesar 0,9895 (**Lampiran 14**). Berdasarkan hasil penelitian, kadar flavonoid total pada ekstrak etanol dan fraksi etil asetat daun iler disajikan pada **Tabel 4.5**.

Tabel 4.5 Kadar Total Flavonoid Daun Iler

Sampel	Kadar Total Flavonoid (mgQE/g)
Ekstrak etanol	$1,26 \pm 0,03$
Fraksi etil asetat	$3,16 \pm 0,03$

Hasil tersebut menunjukkan bahwa fraksi etil asetat memiliki kandungan flavonoid lebih tinggi dibandingkan ekstrak etanol. Perbedaan ini dapat disebabkan

oleh perbedaan tingkat kepolaran pelarut. Etanol sebagai pelarut polar dapat menarik berbagai senyawa polar lainnya sehingga ekstrak yang diperoleh masih mengandung campuran senyawa yang kompleks. Sementara itu, etil asetat bersifat semipolar lebih selektif dalam menarik senyawa flavonoid semipolar, terutama flavonoid bentuk aglikon (Haroen dkk., 2025). Proses fraksinasi juga menyebabkan senyawa nonpolar terpisah terlebih dahulu sehingga senyawa flavonoid lebih terkonsentrasi pada fraksi etil asetat (Ananda dkk., 2025). Hasil penelitian ini lebih rendah dibandingkan dengan penelitian Verawati dkk. (2016) yang melaporkan kadar total flavonoid fraksi etil asetat sebesar 9,63 mg QE/g menggunakan metode maserasi dan fraksinasi cair-cair. Perbedaan kadar flavonoid tersebut dapat dipengaruhi oleh variasi bahan baku dan kondisi lingkungan tumbuh tanaman. Daun iler pada penelitian ini diperoleh dari Tawamangu, Karanganyar, Jawa Tengah, sedangkan penelitian Verawati dkk. (2016) menggunakan tanaman dari Bukit tinggi, Sumatera Barat. Perbedaan kondisi geografis seperti umur daun, intensitas cahaya, suhu, ketinggian tempat, dan ketersediaan unsur hara diketahui dapat mempengaruhi biosintesis flavonoid pada tanaman, karena flavonoid merupakan metabolit sekunder yang sensitive terhadap factor lingkungan dan stres abiotik (Qaderi dkk., 2023).

4.5 Aktivitas Antioksidan Ekstrak Etanol dan Fraksi Etil Asetat Daun Iler

Analisis aktivitas antioksidan dilakukan menggunakan spektrofotometer UV-Vis untuk menilai kemampuan peredaman radikal bebas (Mustarichie & Ramdhani, 2021). Penentuan panjang gelombang maksimum menghasilkan 515 nm sebagai kondisi pengukuran dengan absorbansi tertinggi (**Lampiran 15**). Sementara itu, *operating time* optimum diperoleh selama 25 menit, yang menunjukkan waktu reaksi antara analit dan reagen telah mencapai kondisi stabil (**Lampiran 16**). Hasil pengujian aktivitas antioksidan dari penelitian ini disajikan pada **Tabel 4.6**.

Tabel 4.6 Aktivitas Antioksidan Daun Iler

Sampel	IC ₅₀ (ppm)	Kategori
Asam askorbat	5,20	Sangat kuat
Ekstrak etanol	39,30 ± 1,62	Sangat kuat
Fraksi etil asetat	34,59 ± 0,21	Sangat kuat

Hasil pengujian aktivitas antioksidan daun iler menggunakan metode DPPH dan asam askorbat sebagai kontrol positif menunjukkan bahwa asam askorbat memiliki nilai IC_{50} sebesar 5,20 ppm dengan persamaan regresi $y = 10,904x - 6,6469$ dengan nilai R^2 0,9825, yang termasuk dalam kategori aktivitas antioksidan sangat kuat. Ekstrak etanol daun iler memiliki nilai IC_{50} sebesar 39,30 ppm ($y = 1,2802x - 0,3077$; R^2 0,9904), dan fraksi etil asetat daun iler menunjukkan nilai IC_{50} sebesar 34,59 ppm ($y = 1,1306x + 10,891$; R^2 0,9947) kedua sampel tersebut memiliki aktivitas antioksidan sangat kuat (**Lampiran 17**).

Asam askorbat merupakan antioksidan alami yang umum digunakan sebagai pembanding dalam pengujian aktivitas antioksidan karena relatif aman dan tidak bersifat toksik (Purwanti dkk., 2019). Hasil penelitian menunjukkan fraksi etil asetat memiliki aktivitas antioksidan lebih tinggi dibandingkan ekstrak etanol. Hal ini berkaitan dengan kemampuan pelarut etil asetat yang bersifat semi polar dalam memisahkan senyawa fenolik dan flavonoid secara selektif (Susanti dkk., 2024). Flavonoid semipolar terutama dalam bentuk aglikon seperti kuersetin, diketahui memiliki aktivitas antioksidan tinggi karena lebih mudah mendonorkan elektron atau atom hidrogen untuk menetralkan radikal bebas dibandingkan bentuk glikosidanya, karena gugus hidroksilnya tidak terikat oleh gugus gula (Haroen dkk., 2025; Hassanpour & Doroudi, 2023). Tingginya aktivitas antioksidan pada fraksi etil asetat juga berkaitan dengan tingginya kadar total fenolik dan flavonoid pada fraksi tersebut, mengingat kedua golongan senyawa ini berperan sebagai antioksidan melalui mekanisme donasi elektron atau atom hidrogen, sehingga semakin tinggi kandungan senyawa tersebut maka aktivitas antioksidan yang dihasilkan semakin kuat. Hasil ini sejalan dengan penelitian Moelyono dkk. (2016) yang melaporkan bahwa fraksi etil asetat memiliki aktivitas antioksidan lebih kuat (IC_{50} 54,20 ppm) dibandingkan ekstrak etanol (IC_{50} 80,23 ppm). Penelitian oleh Melisa dkk. (2018) menyebutkan bahwa ekstrak etil asetat memiliki aktivitas antioksidan yang lebih baik (67,22 ppm) dibandingkan ekstrak lainnya. Selain itu, nilai IC_{50} fraksi etil asetat dan ekstrak etanol pada penelitian ini lebih rendah dibandingkan penelitian sebelumnya, yang dipengaruhi oleh penggunaan metode UAE meningkatkan efisiensi ekstraksi senyawa fenolik dan flavonoid melalui efek kavitasi ultrasonik, sedangkan KCV menghasilkan fraksi etil asetat yang lebih kaya

senyawa semi polar. Dengan demikian, aktivitas antioksidan yang diperoleh tidak hanya dipengaruhi oleh polaritas pelarut yang menentukan jenis serta jumlah senyawa aktif yang terekstraksi, tetapi juga oleh metode ekstraksi dan fraksinasi (Ko dkk., 2014).

Secara keseluruhan, penelitian ini membuktikan bahwa kombinasi metode UAE dan KCV efektif dalam menghasilkan ekstrak etanol dan fraksi etil asetat daun iler yang kaya akan senyawa fenolik dan flavonoid, sebagaimana dikonfirmasi melalui identifikasi KLT. Fraksi etil asetat secara konsisten menunjukkan kadar total fenolik ($6,37 \pm 0,04$ mg GAE/g), flavonoid ($3,16 \pm 0,03$ mg QE/g), dan aktivitas antioksidan ($IC_{50} 34,59 \pm 0,21$ ppm) yang lebih tinggi dibandingkan ekstrak etanol ($IC_{50} 39,30 \pm 1,62$ ppm) dengan keduanya termasuk dalam kategori antioksidan sangat kuat, sehingga menegaskan potensi daun iler sebagai sumber antioksidan alami yang prospektif. Namun penelitian ini juga memiliki beberapa keterbatasan, antara lain identifikasi senyawa melalui KLT masih bersifat kualitatif dan belum dikonfirmasi dengan teknik analitik lanjutan seperti HPLC atau LC-MS, serta pengujian antioksidan yang hanya menggunakan metode DPPH sehingga belum mempresentasikan kondisi biologis sesungguhnya. Selain itu, belum dilakukan isolasi senyawa aktif untuk pengembangan lebih lanjut.

BAB V

KESIMPULAN DAN SARAN

5.1 Kesimpulan

1. Ekstrak etanol dan fraksi etil asetat daun iler terbukti mengandung senyawa fenolik dan flavonoid.
2. Fraksi etil asetat memiliki kadar total fenolik dan flavonoid yang lebih tinggi, yaitu sebesar $6,37 \pm 0,04$ mg GAE/g dan $3,16 \pm 0,03$ mg QE/g, dibandingkan ekstrak etanol sebesar $3,79 \pm 0,11$ mg GAE/g dan $1,26 \pm 0,03$ mg QE/g.
3. Ekstrak etanol dan fraksi etil asetat daun iler menunjukkan aktivitas antioksidan yang tergolong sangat kuat, dengan nilai IC_{50} masing-masing sebesar $39,30 \pm 1,62$ ppm dan fraksi etil asetat sebesar $34,59 \pm 0,21$ ppm, dimana fraksi etil asetat memiliki aktivitas antioksidan yang lebih kuat dibandingkan ekstrak etanol.

5.2 Saran

Perlu dilakukan identifikasi senyawa lebih lanjut menggunakan teknik analitik seperti HPLC atau LC-MS guna memastikan identitas senyawa fenolik dan flavonoid secara definitif, melengkapi pengujian antioksidan dengan metode ABTS atau FRAP, serta melanjutkan dengan uji *in vivo* dan uji toksisitas guna mendukung pengembangan daun iler sebagai kandidat produk herbal antioksidan.

DAFTAR PUSTAKA

- Abisola, A. E., Basit, A. A., Etinosa, A., Princess, O. F., Godwn, I. U., Arinze, A. S., & Abiola, K. E. (2025). Flavonoids and Their Synthetic Derivatives, Chemistry and Biological Applications—A Review. *Iconic Research and Engineering Journals*, 9(3), 130–138. <https://doi.org/10.64388/IREV9I3-1710424-1486>
- Abubakar, A. R., & Haque, M. (2020). Preparation of Medicinal Plants: Basic Extraction and Fractionation Procedures for Experimental Purposes. *Journal of Pharmacy and Bioallied Sciences*, 12(1), 1–10. https://doi.org/10.4103/jpbs.JPBS_175_19
- Afifah, D. N., Fridayanti, A., & Masruhim, M. A. (2015). Uji Aktivitas Antioksidan Fraksi Etil Asetat Daun Miana (*Coleus atropurpureus* Benth). *Prosiding Seminar Nasional Kefarmasian Ke-1*, 140–146. <https://doi.org/10.25026/mpc.v1i1.19>
- Afiyati, A., & Murrukmihadi, M. (2013). The Effect Of Fraction Containing Alkaloids Of Hibiscus Flower (*Hibiscus rosa-sinensis* L.) Varietas Merah Tunduk Terhadap aktivitas Mukolitik Secara In Vitro. *Traditional Medicine Journal*, 18(3), 187–194.
- Aji, N. P., Noviyanty, Y., & Rahmawati. (2022). Uji Aktivitas Antioksidan Ekstrak Etanol Daun Miana (*Coleus scutellarioides* (L.)Benth) Menggunakan Metode Dpph (1,1-Diphenyl-2- Picrylhydrazyl). *Sinta Journal (Science, Technology and Agriculture Journal)*, 3(2), 65–76. <https://doi.org/10.37638/sinta.3.2.65-76>
- Altemimi, A., Lakhssassi, N., Baharlouei, A., Watson, D., & Lightfoot, D. (2017). Phytochemicals: Extraction, Isolation, and Identification of Bioactive Compounds from Plant Extracts. *Plants*, 6(4), 42. <https://doi.org/10.3390/plants6040042>
- Amin, S., & Assafa, Z. (2025). Peran Senyawa Polifenol dalam Mekanisme Antioksidan: Tinjauan dari Aspek Kimia Medisinal. *Jurnal Ilmiah Ilmu Kesehatan*, 3(2), 822–832.
- Ananda, N., Pulungan, A. F., Nasution, H. M., & Daulay, A. S. (2025). Penetapan Kadar Flavonoid Total dari Fraksi Etil Asetat Daun Sirsak (*Annona muricata* L.) Dengan Metode Spektrofotometri Uv-Vis. *Journal of Pharmaceutical and Sciences*, 8(3), 1775–1785. <https://doi.org/10.36490/journal-jps.com.v8i3.1023>
- Apak, R., Gorinstein, S., Böhm, V., Schaich, K. M., Özyürek, M., & Güçlü, K. (2013). Methods of measurement and evaluation of natural antioxidant capacity/activity (IUPAC Technical Report). *Pure and Applied Chemistry*, 85(5), 957–998. <https://doi.org/10.1351/PAC-REP-12-07-15>
- Aryanti, R., Perdana, F., & Mahendra, R. A. (2021). Telaah Metode Pengujian Aktivitas Antioksidan pada Daun Teh Hijau (*Camellia sinensis* (L.) Kuntze). *Jurnal Surya Medika*, 7(1), 15–24.
- Birben, E., Sahiner, U. M., Sackesen, C., Erzurum, S., & Kalayci, O. (2012). Oxidative Stress and Antioxidant Defense. *World Allergy Organization Journal*, 5(1), 9–19. <https://doi.org/10.1097/WOX.0b013e3182439613>
- Boccellino, M. (2023). Health Effects of Natural Antioxidants. *International Journal of Molecular Sciences*, 24(13), 10792. <https://doi.org/10.3390/ijms241310792>

- Coskun, O. (2016). Separation Techniques: Chromatography. *Northern Clinics of Istanbul*, 3(2), 156–160. <https://doi.org/10.14744/nci.2016.32757>
- Darina, V., Gegechkori, V., Morton, D. W., & Agatonovic-Kustrin, S. (2025). The impact of spontaneous fermentation on phenolic and antioxidant profiles of selected aromatic plant extracts. *JPC – Journal of Planar Chromatography – Modern TLC*, 38(4–5), 391–399. <https://doi.org/10.1007/s00764-025-00340-4>
- Dewi, N. P., Vani, A. T., Abdullah, D., Oktora, M., & Marisa, F. (2022). Uji Kuersetin pada Ekstrak Etanol Lidah Buaya (*Aloe vera barbadensis*) dengan Metode Kromatografi Lapis Tipis. *Nusantara Hasana Journal*, 1(11), 59–69.
- Diastuti, H., Mufida, Z. L., & Purwati. (2024). Isolasi Senyawa Metabolit Sekunder dari Fraksi Etil Asetat Rimpang Bangle (*Zingiber cassumunar* Roxb.) serta Uji Aktivitas terhadap *Candida albicans*. *Jurnal Sains dan Edukasi Sains*, 7(1), 29–36. <https://doi.org/10.24246/juses.v7i1p29-36>
- Diniyah, N., & Lee, S.-H. (2020). Komposisi Senyawa fenol dan Potensi Antioksidan Dari Kacang-Kacangan: Review. *Jurnal Agroteknologi*, 14(01), 91–102. <https://doi.org/10.19184/j-agt.v14i01.17965>
- Garg, J., Ghoshal, G., Bhadada, S. K., & Katare, O. P. (2024). Derivatisation mechanistic-guided identification of phytoconstituents of different extracts of *Cissus quadrangularis* by TLC and standardization by HPTLC. *Phytomedicine Plus*, 4(3), 100601. <https://doi.org/10.1016/j.phyplu.2024.100601>
- Gulcin, İ. (2025). Antioxidants: A comprehensive review. *Archives of Toxicology*, 99(5), 1893–1997. <https://doi.org/10.1007/s00204-025-03997-2>
- Hafizah, D. A., & Sunardi. (2024). Pemisahan Kromatografi Lapis Tipis pada Asam Amino dengan Menentukan Nilai Faktor Retensi. *Jurnal Kimia dan Rekayasa*, 5(1), 1–7.
- Haroen, U., Syafwan, S., Kurniawan, K., Budiansyah, A., Widjaja, N., & Fakhri, S. (2025). The phenolic and flavonoid content and biological activity of *Curcuma (Curcuma xanthorrhiza)* fractions with different solvent polarities. *Journal of Advanced Veterinary and Animal Research*, 12(1), 192–204. <https://doi.org/10.5455/javar.2025.1886>
- Hasanah, U., Nopiyanti, N., & Jayati, R. D. (2023). Pengembangan Flipbook Berbasis QR Code Hasil Identifikasi Tumbuhan Obat Berdasarkan Kearifan Lokal di Kecamatan Karang Jaya Kabupaten Musi Rawas Utara. *BIODIK (Jurnal Ilmiah Pendidikan Biologi)*, 9(3), 113–126. <https://doi.org/10.22437/biodik.v9i3.27314>
- Hassanpour, S. H., & Doroudi, A. (2023). Review of the antioxidant potential of flavonoids as a subgroup of polyphenols and partial substitute for synthetic antioxidants. *Avicenna Journal of Phytomedicine*, 13(4), 354–376. <https://doi.org/10.22038/AJP.2023.21774>
- Hlatshwayo, S., Thembane, N., Krishna, S. B. N., Gqaleni, N., & Ngcobo, M. (2025). Extraction and Processing of Bioactive Phytoconstituents from Widely Used South African Medicinal Plants for the Preparation of Effective Traditional Herbal Medicine Products: A Narrative Review. *Plants*, 14(2), 206. <https://doi.org/10.3390/plants14020206>

- Hutabalian, L., Kamu, V. S., & Runtuwene, M. R. J. (2018). Uji Aktivitas Antioksidan dan Total fenolik Dari Hasil Partisi Petroleum Eter, Etil Asetat dan air Daun Tiga (*Allophylus cobbe* L.). *PHARMACON Jurnal Ilmiah Farmasi – UNSRAT*, 7(3), 257–265.
- Ibroham, M. H., Jamilatun, S., & Kumalasari, I. D. (2022). A Review: Potensi tumbuhan-tumbuhan di Indonesia sebagai antioksidan alami. *Seminar Nasional Penelitian LPPM UMJ 2022*. Seminar Nasional Penelitian 2022, Universitas Muhammadiyah Jakarta. <http://jurnal.umj.ac.id/index.php/semnaslit>
- Ilham, I., Supriningrum, R., & Warnida, H. (2024). Penetapan Kadar Flavonoid Total Ekstrak Etanol Kulit Buah Labu Kuning (*Cucurbita moschata*) Berdasarkan Perbedaan Konsentrasi Pelarut Secara Spektrofotometri UV-Vis. *Jurnal Chemica*, 25(1), 110–118. <https://doi.org/10.35580/chemica.v25i1.59074>
- Jonathan, Hairani, R., & Ruga, R. (2024). Skrining Fitokimia dan Uji Toksisitas Ekstrak Diklorometana Rimpang Temu Kunci (*Boesenbergia rotunda*). *Jurnal Atomik*, 9(2), 62–68. <https://doi.org/10.30872/ja.v9i2.1407>
- Junaedi, F., Kosman, R., & Herwin, H. (2023). Identification of Active Chemical Components of Ethanol Extract of Painted Nettle Leaves (*Coleus scutellarioides* L. Benth) Against Gastrointestinal Infection Bacteria Using TLC-Bioautography and Agar Diffusion Method. *Journal Microbiology Science*, 3(1), 1–12. <https://doi.org/10.56711/jms.v3i1.869>
- Junita, A. R., Hamid, F., Budu, B., Natzir, R., Hala, Y., Alam, G., Agus, R., Bahar, B., Syukri, A., Primaguna, M. R., Dwiyantri, R., Febriant, A., Azhar, A., & Hatta, M. (2023). Miana (*Coleus scutellarioides*) Inhibits Nuclear Factor-kappa B (NF-kB) Activity and its Antibacterial and Anti-inflammatory Benefits in Infectious Diseases: Review Article. *Biomedical and Pharmacology Journal*, 16(3), 1303–1317. <https://doi.org/10.13005/bpj/2710>
- Kaczorová, D., Karalija, E., Dahija, S., Bešta-Gajević, R., Parić, A., & Čavar Zeljković, S. (2021). Influence of Extraction Solvent on the Phenolic Profile and Bioactivity of Two *Achillea* Species. *Molecules*, 26(6), 1601. <https://doi.org/10.3390/molecules26061601>
- Kamar, I., Zahara, F., Yuniarni, D., & Umairah, R. U. (2021). Identifikasi Parasetamol dalam Jamu Pegal Linu Menggunakan Metode Kromatografi Lapis Tipis (KLT). *QUIMICA: Jurnal Kimia Sains dan Terapan*, 3(1), 24–29. <https://doi.org/10.33059/jq.v3i1.3973>
- Kartini, K., Shevira, R. A., Setiawan, F., Pradana, A. T., Azminah, A., Sukweenadhi, J., Rosyidah, A., & Widyowati, R. (2025). Botanical, phytochemical, and bioactivity characterization of *Coleus scutellarioides*. *Biodiversitas: Journal of Biological Diversity*, 26(7), 3623–3633. <https://doi.org/10.13057/biodiv/d260748>
- Kautsari, S. N., Purwakusumah, E. D., & Nurcholis, W. (2020). Profil Kromatografi Lapis Tipis Ekstrak Kunyit (*Curcuma longa* Linn) Segar Dan Simplisia Dengan Variasi Metode Ekstraksi. *Media Farmasi*, 16(1), 65–70. <https://doi.org/10.32382/mf.v16i1.1403>

- Kementerian Kesehatan, R. I. (2022). *Suplemen I Farmakope Herbal Indonesia Edisi II* (Edisi II (Suplemen I)). Kementerian Kesehatan Republik Indonesia.
- Khumaidi, A., Widodo, A., Nugrahani, A. W., & Fakhrudin, N. (2020). Profil Proliferasi Sel Limfosit Benalu Batu (*Begonia medicinalis*) Asal Kabupaten Morowali Utara Provinsi Sulawesi Tengah. *Jurnal Ilmu Kefarmasian Indonesia*, 18(1), 61–67.
- Kiss, A., Papp, V. A., Pál, A., Prokisch, J., Mirani, S., Toth, B. E., & Alshaal, T. (2025). Comparative Study on Antioxidant Capacity of Diverse Food Matrices: Applicability, Suitability and Inter-Correlation of Multiple Assays to Assess Polyphenol and Antioxidant Status. *Antioxidants*, 14(3), 317. <https://doi.org/10.3390/antiox14030317>
- Ko, M.-J., Cheigh, C.-I., & Chung, M.-S. (2014). Relationship analysis between flavonoids structure and subcritical water extraction (SWE). *Food Chemistry*, 143, 147–155. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2013.07.104>
- Kowalska, T., & Sajewicz, M. (2022). Thin-Layer Chromatography (TLC) in the Screening of Botanicals—Its Versatile Potential and Selected Applications. *Molecules*, 27(19), 6607. <https://doi.org/10.3390/molecules27196607>
- Kusumawati, V. H., Permatasari, D. A. I., & Permata, B. R. (2023). Uji Antioksidan Ekstrak Dan Formulasi Sediaan Krim Tabir Surya Kulit Delima Putih (*Punica Granatum L.*) Dengan Metode DPPH Dan Penentuan Nilai SPF. *Jurnal Ilmiah Global Farmasi (JIGF)*, 1(2), 35–59. <https://doi.org/10.59680/medika.v1i4.625>
- Lopeda-Correa, M., Valdés-Duque, B. E., & Osorio-Tobón, J. F. (2022). Ultrasound-Assisted Extraction of Phenolic Compounds from *Adenaria floribunda* Stem: Economic Assessment. *Foods*, 11(18), 2904. <https://doi.org/10.3390/foods11182904>
- Losada-Barreiro, S., Sezgin-Bayindir, Z., Paiva-Martins, F., & Bravo-Díaz, C. (2022). Biochemistry of Antioxidants: Mechanisms and Pharmaceutical Applications. *Biomedicines*, 10(12), 3051. <https://doi.org/10.3390/biomedicines10123051>
- Magnani, F., & Mattevi, A. (2019). Structure and mechanisms of ROS generation by NADPH oxidases. *Current Opinion in Structural Biology*, 59, 91–97. <https://doi.org/10.1016/j.sbi.2019.03.001>
- Maharani, A. I., Riskierdi, F., Febriani, I., Kurnia, K. A., Rahman, N. A., Ilahi, N. F., & Farma, S. A. (2021). Peran antioksidan alami berbahan dasar pangan lokal dalam mencegah efek radikal bebas. *Prosiding SEMNAS BIO 2021*, 1(2), 390–399.
- Mahardani, O. T., & Yuanita, L. (2021). Efek Metode Pengolahan Dan Penyimpanan Terhadap Kadar Senyawa Fenolik dan Aktivitas Antioksidan. *Unesa Journal of Chemistry*, 10(1), 64–78. <https://doi.org/10.26740/ujc.v10n1.p64-78>
- Malini, G., Saranya, B., & Parameswari, A. (2023). Review on extraction techniques for medicinal and aromatic plants. *International Journal of Pharmaceutical Chemistry and Analysis*, 10(4), 253–256. <https://doi.org/10.18231/j.ijpca.2023.042>
- Maulida, Z., Sa'adah, A., Saptawati, T., Gloria, F., & Rachma, F. A. (2022). Aktivitas antioksidan Isolat Flavonoid Ekstrak etanol Bunga Telang

- (ClitoriaTernatea) Dengan Metode FRAP. *BENZENA Pharmaceutical Scientific Journal*, 1(02), 93–102. <https://doi.org/10.31941/benzena.v1i2.2437>
- Maurya, A., Kalani, K., Verma, S. C., Singh, R., & Srivastava, A. (2018). Vacuum Liquid Chromatography: Simple, Efficient and Versatile Separation Technique for Natural Products. *Organic & Medicinal Chemistry International Journal*, 7(2), 001–003. <https://doi.org/10.19080/OMCIJ.2018.07.555710>
- Mehta, S. K., & Gowder, S. J. T. (2015). Members of Antioxidant Machinery and Their Functions. Dalam S. J. T. Gowder (Ed.), *Basic Principles and Clinical Significance of Oxidative Stress* (hlm. 59–85). InTech. <https://doi.org/10.5772/61884>
- Melisa, N., Hartianti, I., Prakoso, V. F., Teruna, H. Y., & Hendra, R. (2018). Aktivitas Antioksidan dan Toksisitas Ekstrak Daun Coleus Scutellarioides. *MPI (Media Pharmaceutica Indonesiana)*, 2(1), 9–12. <https://doi.org/10.24123/mpi.v2i1.1297>
- Moelyono, M. W., Rochjana, A. U. H., Diantini, A., Musfiroh, I., Sumiwi, S. A., Iskandar, Y., & Susilawati, Y. (2016). Aktivitas Antioksidan Daun Iler *Plectranthus scutellarioides* (L.) R.Br. *Jurnal Farmasi Indonesia*, 8(1), 271–276.
- Muadifah, A., Ima, E. A., & Putri, A. E. (2023). Analisis Mutu Aktivitas Antioksidan Fraksi Daun Miana (*Coleus atropurpureus* L. Benth) Terhadap Masa Simpan Permen Jelly. *Majalah Farmaseutik*, 19(4), 514–526. <https://doi.org/10.22146/farmaseutik.v19i4.79364>
- Muhaimin, A., Alfati, A. T., Yanti, I. N., Susanti, M., & Noorlena, S. (2025). Tinjauan Berbagai Metode Kromatografi: Kromatografi Kertas, Gas Dan Cair Dalam Analisis Kimia. *Medic Nutricia: Jurnal Ilmu Kesehatan*, 19(2), 1–13. <https://doi.org/10.5455/mnj.v1i2.644>
- Mustaqimah. (2023). Identifikasi Senyawa Flavonoid Ekstrak Etanol Daun Karinat dengan Metode KLT. *Sains Medisina*, 1(1), 169–171.
- Mustarichie, R., & Ramdhani, D. (2021). Antioxidant Of *Coleus Scutellarioides* L. Water Extracts By DPPH Method. *J.Bio.Innov*, 10(6), 1725–1732. <https://doi.org/10.46344/JBINO.2021.v10i06.23>
- Muthia, R., Saputri, R., & Asfia, N. (2018). Uji Aktivitas Antioksidan Fraksi Etil Asetat Kulit Buah Mundar (*Garcinia forbesii* King) Menggunakan Metode DPPH (2,2-Difenil-1-pikrilhidrazil). *Borneo Journal of Pharmascientech*, 2(2), 48–58. <https://doi.org/10.51817/bjp.v2i2.173>
- Natasya, D., Oktavioni, M., Yusnaidar, Y., & Tarigan, I. L. (2023). Review Senyawa Bioaktif dan Konstitues Kimia Dari Tanaman *Coleus* Sebagai Kandidat Obat (Review Of Bioactive Compounds and Chemical Constituents From *Coleus* Plants As drug Candidates). *Indonesian Journal of Pure and Applied Chemistry*, 6(2), 61–76. <https://doi.org/10.26418/indonesian.v6i2.65149>
- Natasya, S. A., Nasution, M. P., Nasution, H. M., & Yuniarti, R. (2025). Determination of Total Flavonoid Content of Ethanol Extract and Ethyl Acetate Fraction of Avocado Seed (*Persea americana* Mill) by Visible Spectrofotometry Methods. *Indonesian Journal of Science and Pharmacy*, 2(3), 120–125. <https://doi.org/10.63763/ijsp.v2i3.98>

- Natzir, R., & Syamsul, T. D. (2024). *Antioksidan Alami dan Perlindungan Molekuler: Solusi untuk Kesehatan Optimal* (Cetakan Pertama). Tahta Media Group.
- Ngo, V., & Duennwald, M. L. (2022). Nrf2 and Oxidative Stress: A General Overview of Mechanisms and Implications in Human Disease. *Antioxidants*, 11(12), 2345. <https://doi.org/10.3390/antiox11122345>
- Nofita, D., Sari, S. N., & Mardiah, H. (2020). Penentuan Fenolik Total dan Flavonoid Ekstrak Etanol Kulit Batang Matoa (*Pometia pinnata* J.R& G.Forst) secara Spektrofotometri. *Chimica et Natura Acta*, 8(1), 36–41. <https://doi.org/10.24198/cna.v8.n1.26600>
- Phaniendra, A., Jestadi, D. B., & Periyasamy, L. (2015). Free Radicals: Properties, Sources, Targets, and Their Implication in Various Diseases. *Indian Journal of Clinical Biochemistry*, 30(1), 11–26. <https://doi.org/10.1007/s12291-014-0446-0>
- Pizzino, G., Irrera, N., Cucinotta, M., Pallio, G., Mannino, F., Arcoraci, V., Squadrito, F., Altavilla, D., & Bitto, A. (2017). Oxidative Stress: Harms and Benefits for Human Health. *Oxidative Medicine and Cellular Longevity*, 2017(1), 1–13. <https://doi.org/10.1155/2017/8416763>
- Popova, M., & Bankova, V. (2023). Contemporary methods for the extraction and isolation of natural products. *BMC Chemistry*, 17(1), 68, s13065-023-00960-z. <https://doi.org/10.1186/s13065-023-00960-z>
- Prasetyawan, H. R., Kusumawati, I., & primaharinastiti, R. (2024). Teknik Aplikasi Sampel Pada Pengujian Kuantitatif Kromatografi Lapis Tipis: Tinjauan Terhadap Area Dan Faktor Retensi. *Media Farmasi*, 20(2), 143–150. <https://doi.org/10.32382/mf.v20i2.655>
- Purnamasari, D. (2018). The Emergence of Non-communicable Disease in Indonesia. *Acta Medica Indonesiana*, 50(4), 273–274.
- Purwanti, L., Dasuki, U. A., & Imawan, A. R. (2019). Perbandingan aktivitas Antioksidan Dari Seduhan 3 Merk Teh Hitam (*Camellia sinensis* (L.) Kuntze) Dengan Metode Seduhan Berdasarkan SNI 01-1902-1995. *Jurnal Ilmiah Farmasi Farmasyifa*, 2(1), 19–25. <https://doi.org/10.29313/jiff.v2i1.4207>
- Putri, Z. A., & Widhiastuti, E. (2023). Sunscreen Activity Test on Iler Leaf Ethanol Extract Cream (*Coleus Scutellarioides* (L) Benth) In Vivo. *Journal of Science and Technology Research for Pharmacy*, 3(2), 28–37.
- Qaderi, M. M., Martel, A. B., & Strugnell, C. A. (2023). Environmental Factors Regulate Plant Secondary Metabolites. *Plants*, 12(3), 447. <https://doi.org/10.3390/plants12030447>
- Qalbi, A. N., Djangi, J., & Muhaedah. (2017). Isolasi Dan Identifikasi Senyawa Metabolit Sekunder Ekstrak Kloroform Daun Tumbuhan Iler (*Coleus scutellarioides*, Linn, Benth). *Jurnal Chemica*, 18(1), 48–55.
- Ritna, A., Anam, S., & Khumaidi, A. (2016). Identifikasi Senyawa Flavonoid pada Fraksi Etil Asetat Benalu Batu (*Begonia* sp.) Asal Kabupaten Morowali Utara. *Jurnal Farmasi Galenika (Galenika Journal of Pharmacy) (e-Journal)*, 2(2), 83–89. <https://doi.org/10.22487/j24428744.2016.v2.i2.5957>
- Rizvi, N. B., Fatima, A., Busquets, R., Khan, M. R., Ashraf, S., Khan, M. S., & Oz, F. (2023). Effect of the Media in the Folin-Ciocalteu Assay for the Analysis

- of the Total Phenolic Content of Olive Products. *Food Analytical Methods*, 16(11–12), 1627–1634. <https://doi.org/10.1007/s12161-023-02527-z>
- Rohmah, J. (2022). Antioxidant Activities Using DPPH, FIC, FRAP, And ABTS Methods From Ethanolic Extract Of Lempuyang Gajah Rhizome (*Zingiber zerumbet* (L.) Roscoe ex Sm.). *Jurnal Kimia Riset*, 7(2), 152–166. <https://doi.org/10.20473/jkr.v7i2.34493>
- Rosyidah, N. A., Zahro, N., & Sanjaya, I. G. M. (2023). Analisis Potensi Senyawa Quercetin dan Turunannya Sebagai Inhibitor Virus Hendra (HeV). *Indonesian Chemistry and Application Journal*, 6(1), 35–40.
- Sadlia, F., Hakim, A. R., Saputri, R., & Rohama, R. (2024). Penetapan Kadar Flavonoid Total Dan Aktivitas Antioksidan Daun Karinat (*Rubus moluccanus* L.). *Journal Pharmaceutical Care and Sciences*, 5(1), 65–76. <https://doi.org/10.33859/jpcs.v5i1.655>
- Salehi, B., Martorell, M., Arbiser, J., Sureda, A., Martins, N., Maurya, P., Sharifi-Rad, M., Kumar, P., & Sharifi-Rad, J. (2018). Antioxidants: Positive or Negative Actors? *Biomolecules*, 8(4), 124. <https://doi.org/10.3390/biom8040124>
- Salimi, Y. K. (2021). *DAUN MIANA SEBAGAI ANTIOKSIDAN DAN ANTIKANKER* (1 ed.). Yayasan Pendidikan dan Sosial Indonesia Maju (YPSIM) Banten.
- Saraswati, N., Moektiwardoyo, M., & Barliana, M. I. (2021). Antiviral Activity of Mayana Leaves (*Plectranthus scutellarioides* (L.) R.Br) Extract and Fraction Against Neuraminidase H5N1 with Munana Assay. *Indonesian Journal of Biological Pharmacy*, 1(1). <https://jurnal.unpad.ac.id/ijbp>
- Segara M, Y., & Kurniawan, A. (2023). Uji Aktivitas Antioksidan dan Penetapan Kadar Flavonoid Total pada Ekstrak Etanol Daun Iler (*Coleus scutellarioides* (L.) Benth.). *Jurnal Farmasi dan Farmakoinformatika*, 1(1), 60–75. <https://doi.org/10.35760/jff.2023.v1i1.8070>
- Shen, L., Pang, S., Zhong, M., Sun, Y., Qayum, A., Liu, Y., Rashid, A., Xu, B., Liang, Q., Ma, H., & Ren, X. (2023). A comprehensive review of ultrasonic assisted extraction (UAE) for bioactive components: Principles, advantages, equipment, and combined technologies. *Ultrasonics Sonochemistry*, 101, 106646. <https://doi.org/10.1016/j.ultsonch.2023.106646>
- Shi, L., Zhao, W., Yang, Z., Subbiah, V., & Suleria, H. A. R. (2022). Extraction and characterization of phenolic compounds and their potential antioxidant activities. *Environmental Science and Pollution Research*, 29(54), 81112–81129. <https://doi.org/10.1007/s11356-022-23337-6>
- Sitorus, F. C., Dwi Wulansari, E., & Sulistyarini, I. (2020). Uji Kandungan Fenolik Total Dan Aktivitas Antibakteri Ekstrak Kulit Buah Asam Paya (*Eleiodoxa conferta* (Griff.) Burret) Terhadap *Staphylococcus aureus*. *Media Farmasi Indonesia*, 15(2), 1617–1624. <https://doi.org/10.53359/mfi.v15i2.163>
- Sudarwati, T. P. L., & Fernanda, M. A. H. F. (2019). *Aplikasi Pemanfaatan Daun Pepaya (Carica papaya) sebagai Biolarvasida terhadap Larva Aedes aegypti* (Cetakan pertama). Graniti.
- Sudrajad, H., & Susanti, D. (2018). Kadar Flavonoid Total Tanaman Iler (*Plectranthus scutellarioides*) dari Berbagai Daerah. 2(1), A.258-A.263. <https://core.ac.uk>

- Suharyanto, S., & Hayati, T. N. (2021). Penetapan Kadar Flavonoid Total Ekstrak Buah Gambas (*Luffa acutangula*(L.) Roxb.) dengan Metode Spektrofotometri UV-Vis. *Pharmacon: Jurnal Farmasi Indonesia*, 18(1), 82–88. <https://doi.org/10.23917/pharmacon.v18i01.10916>
- Sukmawati, Widiastuti, H., & Miftahuljanna. (2019). Analisis Kadar Kuersetin pada Ekstrak Etanol Daun Miana (*Plectranthus scutellarioides* (L.) R.Br.) Secara HPLC (High Performance Liquid Chromatography). *As-Syifaa Jurnal Farmasi*, 11(01), 38–44.
- Sulistiawanti, N. L., Hairunnisa, Ningrum, N. W., & Fitriyanti, S. (2025). Review: Perbedaan Penggunaan Pelarut Terhadap Nilai Rendemen yang Dihasilkan dengan Berbagai Metode Ekstraksi dalam Proses Ekstraksi. *An-Najat: Jurnal Ilmu Farmasi dan Kesehatan*, 3(3), 213–231. <https://doi.org/10.59841/an-najat.v3i3.3169>
- Suryati, Arifin, B., & Vhiolita, A. (2018). Penentuan Kandungan Fenolik Total, Uji Aktivitas Antioksidan, Aktivitas Antimikroba, Dan Sitotoksik Dari Fraksi Etil Asetat Daun Miana (*Plectranthus Scutellarioides* (L.) R. Br.). *Jurnal Kimia Unand*, 7(1), 1–6.
- Susanti, I., Pratiwi, R., Rosandi, Y., & Hasanah, A. N. (2024). Separation Methods of Phenolic Compounds from Plant Extract as Antioxidant Agents Candidate. *Plants*, 13(7), 965. <https://doi.org/10.3390/plants13070965>
- Syafitri, I. F., & Ersam, T. (2016). Senyawa Sikloartobiloksanton dari Kulit Akar *Artocarpus elasticus*. *Jurnal Sains dan Seni ITS*, 5(2), C80–C84.
- Syahara, M. A., Helilusiatiningsih, N., & Irawati, T. (2024). Antioxidant activity assay of Roselle (*Hibiscus sabdariffa*) seeds Ethanol extract with DPPH radical scavenging using UV-Vis Spectrophotometer. *Journal of Natural Sciences and Mathematics Research*, 10(1), 46–54. <https://doi.org/10.21580/jnsmr.v10i1.20515>
- Triyanti, S. B., Lestari, F. P., Fitriana, P. A. N., Rostiana, H. R., Silalahi, D. D., Syalsabina, T. D., Putri, R. Y., & Saputra, I. S. (2025). Pengaruh Metode Ekstraksi Maserasi, Sonikasi, dan Sokletasi Terhadap Nilai Rendemen Sampel Kulit Buah Naga (*Hylocereus polyrhizus*). *Jurnal Sains dan Edukasi Sains*, 8(1), 71–78. <https://doi.org/10.24246/juses.v8i1p71-78>
- Ulfah, A., Nastiti, K., Kurniawati, D., & Hakim, A. R. (2024). Penetapan Kadar Flavonoid Dan Aktivitas Antioksidan Ekstrak Etanol Daun Bangkal (*Nauclea subdita* (Korth) Menggunakan Spektrofotometri Uv-Vis. *Journal of Pharmaceutical Care and Sciences*, 5(1), 29–39. <https://doi.org/10.33859/jpcs.v5i1.650>
- Utami, N. F., Nurdayanty, S. M., Susanto, & Suhendar, U. (2020). Pengaruh Berbagai Metode Ekstraksi Pada Penentuan Kadar Flavonoid Ekstrak Etanol Daun Iler (*Plectranthus scutellarioides*). *FITOFARMAKA: Jurnal Ilmiah Farmasi*, 10(1), 76–83. <https://doi.org/10.33751/jf.v10i1.2069>
- Verawati, Aria, M., Arel, A., & Ryanto, E. (2016). Antioxidant activity and total flavonoid content of fractions of piladang (*Solenostemon scutellarioides* (L) Codd) leaf extract. *Der Pharmacia Lettre*, 8(18), 67–71.
- Wakhidah, A. Z., & Silalahi, M. (2018). Etnofarmakologi tumbuhan miana (*coleus scutellarioides* (L.) Benth) pada masyarakat halmahera barat, maluku utara. *Jurnal Pro-Life*, 5(2), 567–578.

- Widhihastuti, E., Larasati, D. S., Priatmoko, S., & Rakainsa, S. K. (2024). Formulation and Sunscreen Activity of Cream Preparation from Iler Leaves Extract (*Coleus scutellarioides* (L.) Benth). *Indonesian Journal of Chemical Science*, 13(1), 53–63.
- Widiasriani, I. A. P., Udayani, N. N. W., Putri Triansyah, G. A., Mahita Kumari Dewi, N. P. E., Eva Wulandari, N. L. W., & Sri Prabandari, A. A. S. (2024). Artikel Review: Peran Antioksidan Flavonoid dalam Menghambat Radikal Bebas. *Journal Syifa Sciences and Clinical Research*, 6(2). <https://doi.org/10.37311/jsscr.v6i2.27055>
- Wusu, R. L., Ola, A. R. B., Berek, M. F. B., Dapa, P. T., & Lamak, Y. G. (2022). Fraksinasi dan Analisis Kromatografi Lapis Tipis Ekstrak Umbi Bunga Kelelawar Hitam (*Tacca chantrieri* André). *Seminar Nasional Kimia dan Pendidikan Kimia I Universitas Nusa Cendana*, 134–139.
- Zehiroglu, C., & Ozturk Sarikaya, S. B. (2019). The importance of antioxidants and place in today's scientific and technological studies. *Journal of Food Science and Technology*, 56(11), 4757–4774. <https://doi.org/10.1007/s13197-019-03952-x>
- Zhang, L., Xu, L.-Y., Tang, F., Liu, D., Zhao, X.-L., Zhang, J.-N., Xia, J., Wu, J.-J., Yang, Y., Peng, C., & Ao, H. (2024). New perspectives on the therapeutic potential of quercetin in non-communicable diseases: Targeting Nrf2 to counteract oxidative stress and inflammation. *Journal of Pharmaceutical Analysis*, 14(6), 100930. <https://doi.org/10.1016/j.jpha.2023.12.020>
- Zhang, Q.-W., Lin, L.-G., & Ye, W.-C. (2018). Techniques for extraction and isolation of natural products: A comprehensive review. *Chinese Medicine*, 13(1), 2–26. <https://doi.org/10.1186/s13020-018-0177-x>

LAMPIRAN

Lampiran 1. Hasil Uji Determinasi Daun Iler (*Coleus scutellarioides* (L.) Benth)

	Kementerian Kesehatan Direktorat Jenderal Kesehatan Lanjutan RSUD Dr. Sardjito Yogyakarta Jalan Kesehatan Nomor 1, Sekeloa, Sinduadi, Sleman D.I. Yogyakarta 55284 Telp 0274 567334 Email: info@rsardjito.co.id
Kepada Anami Riasri Prodi Farmasi, Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam, Universitas Islam Indonesia Jalan Kaliurang No.Km. 14.5, Krawitan, Umbulmartani, Kec. Sleman, Kab. Sleman, DIY 55584	
LAPORAN HASIL UJI	
Nomor	: TL.02.04/D.XI.6/30138.862/2025
Nomor permohonan	: PE/X/2025/51
Tanggal terbit	: 20 Oktober 2025
Halaman	: 1 dari 2
<u>IDENTITAS SAMPEL</u>	
Nama sampel	: Iler
Merek	: -
Bentuk sampel	: Simplisia Daun
Keterangan sampel	: -
Tanggal Penerimaan	: 15 Oktober 2025
Tanggal Pelaksanaan	: 16 Oktober 2025
Jenis Pengujian	: Fisika/Kimia/Mikrobiologi
Hasil Pengujian	: Terlampir
Laporan Hasil Uji ini hanya berlaku untuk sampel tersebut di atas. Laporan Hasil Uji terdiri dari 2 halaman dan merupakan bagian yang tidak dapat dipisahkan.	

HASIL PENGUJIAN

Nomor : TL.02.04/D.XI.6/30138.862/2025
 Nomor pengujian : PE/X/2025/51
 Halaman : 2 dari 2

Parameter	Satuan	Hasil	Metode Uji / Teknik
Determinasi Tanaman			Organoleptik
Famili	-	Lamiaceae	
Spesies	-	<i>Coleus scutellarioides</i> (L.) Benth.	
Sinonim	-	<i>Plectranthus scutellarioides</i> (L.) R.Br.	

Kepala Instalasi Penunjang,
 Penelitian, dan Penyediaan Produk,



Santoso, S.Farm.
 NIP 198204092006041003

Laporan Hasil Uji ini hanya berlaku untuk sampel tersebut di atas. Laporan Hasil Uji terdiri dari 2 halaman dan merupakan bagian yang tidak dapat dipisahkan.

Lampiran 2. Simplisia Daun Iler (*Coleus scutellarioides* (L.) Benth)



Lampiran 3. Serbuk Daun Iler (*Coleus scutellarioides* (L.) Benth)



Lampiran 4. Ekstrak Etanol dan Fraksi Etil Asetat Daun Iler (*Coleus scutellarioides* (L.) Benth)



Ekstrak etanol daun iler



Fraksi etil asetat daun iler

Lampiran 5. Kadar Air Simplisia dan Serbuk Daun Iler (*Coleus scutellarioides* (L.) Benth)

Sampel	Kadar Air (%)	Rata-rata ± SD (%)
Simplisia kering	5,09	5,28 ± 0,38
	5,03	
	5,73	
Serbuk simplisia	2,10	2,76 ± 0,70
	2,68	
	3,50	

Kadar air simplisia kering: $\frac{(5,09+5,03+5,73)}{3} = 5,28$

Kadar air serbuk simplisia: $\frac{(2,10+2,68+3,50)}{3} = 2,76$

Lampiran 6. Rendemen Ekstrak Etanol Daun Iler (*Coleus scutellarioides* (L.) Benth)

Massa Sampel yang Diekstraksi (gram)	Massa Ekstrak yang Diperoleh (gram)	Rendemen Ekstrak (%)
100	11,8853	11,8853
100	10,5927	10,5927
100	12,2487	12,2487
100	13,2337	13,2337
100	12,1467	12,1467
100	9,5946	9,5946
100	13,3365	13,3365
Total massa dan rendemen ekstrak	83,0382	
Rata-Rata	11,86 %	

Contoh perhitungan % Rendemen Ekstrak: $\frac{11,8853}{100} \times 100 = 11,89\%$

Lampiran 7. Rendemen Fraksi Etil Asetat Daun Iler (*Coleus scutellarioides* (L.) Benth)

Massa Ekstrak yang Difraksinasi (gram)	Massa Fraksi yang Diperoleh (gram)	Rendemen Fraksi (%)
5	1,1951	23,902
5	2,2098	44,196
5	2,1383	42,766
5	2,9845	59,69
5	2,1127	42,254
5	2,0371	40,742
5	1,6727	33,454
5	1,4074	28,148
5	1,7841	35,682
Total massa dan rendemen fraksi	17,5417	350,834
Rata-rata	1,9490	38,98

Contoh perhitungan % Rendemen fraksi: $\frac{2,2098}{5} \times 100 = 44,20\%$

Lampiran 8. Identifikasi Senyawa Metabolit Sekunder Ekstrak Etanol dan Fraksi Etil Asetat Daun Iler (*Coleus scutellarioides* (L.) Benth)

Senyawa dan Reagen	Sampel	Spot	Nilai <i>R_f</i>	Hasil Pengamatan Bercak			Reagen Semprot
				Tampak	UV 254 nm	UV 366 nm	
Fenolik (FeCl ₃)	Ekstrak Etanol	1	0,3625	-	Hitam samar	Biru	-
		2	0,475	-	Hitam samar	Biru	-
		3	0,675	-	Hitam	Biru	Hitam samar
		4	0,725	-	Hitam	kehitaman Biru	Hitam samar
		5	0,7875	-	Hitam	kehitaman Biru	Hitam samar
		6	0,8375	-	Hitam	kehitaman Biru	Hitam samar
		7	0,95	-	Hitam	Merah	Hitam
	Fraksi Etil Asetat	1	0,8375	-	Hitam	kehitaman Biru	Hitam samar
		2	0,925	-	Hitam	Merah	Hitam
	Flavonoid (AlCl ₃)	1	0,0875	Kuning samar	Hitam	kehitaman Biru	Kuning
		2	0,2875	Kuning samar	Hitam	Merah kekuningan	Kuning
		3	0,3	Kuning samar	Hitam samar	Merah	Kuning
		4	0,375	Kuning kehijauan	Hitam samar	Merah	Merah
		5	0,475	Kuning samar	Hitam samar	Hitam	Hitam
		6	0,7625	-	Hitam samar	Merah samar	Merah samar
		7	0,8625	-	Hitam samar	Merah sama	Merah
		8	0,9	-	Hitam samar	Merah	Merah
	Fraksi Etil asetat	1	0,1	Kuning samar	Hitam	Biru	Kuning
		2	0,3	Kuning samar	Hitam	Merah kekuningan	Kuning
		3	0,325	Kuning samar	Hitam samar	Merah	Kuning
		4	0,3875	Kuning kehijauan	Hitam	Merah	Merah kehitaman
		5	0,525	Kuning samar	Hitam	Hitam	Hitam
		6	0,625	-	-	kemerahan Merah samar	Merah samar
		7	0,6625	-	-	Merah samar	Merah samar
		8	0,775	Kuning samar	Hitam samar	Merah	Merah
		9	0,8625	Kuning samar	Hitam samar	Merah	Merah
		10	0,8875	Kuning samar	Hitam samar	Merah	Merah tua

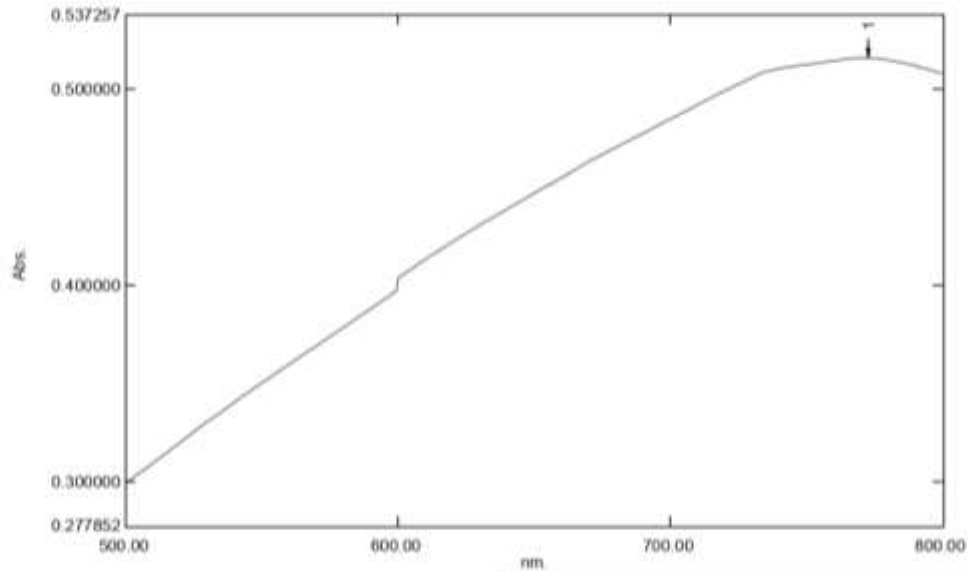
Contoh perhitungan *R_f* spot 2 ekstrak etanol = $\frac{5,8}{8} = 0,725$

Lampiran 9. Panjang Gelombang Maksium Asam Galat

Spectrum Peak Pick Report

02/11/2026 03:30:35 PM

Data Set: 13. LAMDA MAX ASAM GALAT_5 PPM_LAR AQ (AG MET)_110947 (FIX) - RawData



[Measurement Properties]
 Wavelength Range (nm): 500.00 to 800.00
 Scan Speed: Medium
 Sampling Interval: 0.5
 Auto Sampling Interval: Disabled
 Scan Mode: Auto

No.	P/V	Wavelength	Abs.	Description
1		773.00	0.515640	

[Instrument Properties]
 Instrument Type: UV-1780 Series
 Measuring Mode: Absorbance
 Slit Width: 1.0 nm
 Light Source Change Wavelength: 340.8 nm
 S/R Exchange: Normal

[Attachment Properties]
 Attachment: None

[Operation]
 Threshold: 0.0010000
 Points: 4
 InterPolate: Disabled
 Average: Disabled

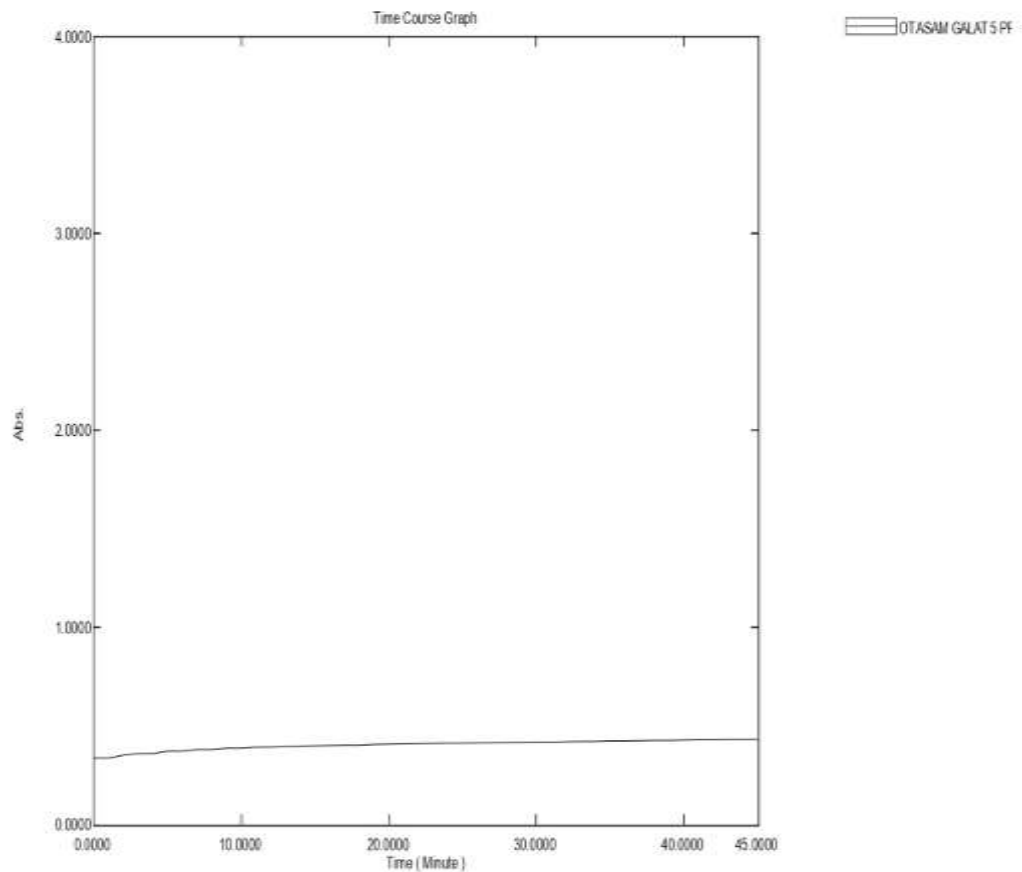
[Sample Preparation Properties]
 Weight:
 Volume:
 Dilution:
 Path Length:
 Additional Information:

Lampiran 10. *Operating Time* Asam Galat

Grafik *operating time* asam galat selama 120 menit

Overlay Time Course Graph Report

02/18/2026 10:38:53 AM



Data absorbansi *operating time* kuersetin selama 120 menit

Kinetics Data Print Report

02/11/2026 03:49:12 PM

Time (Minute)	RawData ...
0.0000	0.3349
1.0000	0.3349
2.0000	0.3490
3.0000	0.3579
4.0000	0.3579
5.0000	0.3701
6.0000	0.3701
7.0000	0.3786
8.0000	0.3786
9.0000	0.3851
10.0000	0.3851
11.0000	0.3902
12.0000	0.3902
13.0000	0.3945
14.0000	0.3963
15.0000	0.3981
16.0000	0.3987
17.0000	0.4012
18.0000	0.4012
19.0000	0.4039
20.0000	0.4053
21.0000	0.4067
22.0000	0.4079
23.0000	0.4092
24.0000	0.4103
25.0000	0.4103
26.0000	0.4128
27.0000	0.4139
28.0000	0.4151
29.0000	0.4161
30.0000	0.4171
31.0000	0.4171
32.0000	0.4191
33.0000	0.4200
34.0000	0.4200
35.0000	0.4219
36.0000	0.4219
37.0000	0.4237
38.0000	0.4246
39.0000	0.4246
40.0000	0.4262
41.0000	0.4269
42.0000	0.4278
43.0000	0.4285
44.0000	0.4285
45.0000	0.4300
46.0000	0.4308
47.0000	0.4315
48.0000	0.4322
49.0000	0.4329
50.0000	0.4335

Kinetics Data Print Report

02/11/2026 03:49:12 PM

Time (Minute)	RawData ...
51.0000	0.4335
52.0000	0.4335
53.0000	0.4355
54.0000	0.4355
55.0000	0.4366
56.0000	0.4366
57.0000	0.4366
58.0000	0.4366
59.0000	0.4366
60.0000	0.4366
61.0000	0.4400
62.0000	0.4406
63.0000	0.4412
64.0000	0.4417
65.0000	0.4422
66.0000	0.4426
67.0000	0.4426
68.0000	0.4437
69.0000	0.4437
70.0000	0.4445
71.0000	0.4445
72.0000	0.4445
73.0000	0.4457
74.0000	0.4466
75.0000	0.4469
76.0000	0.4475
77.0000	0.4475
78.0000	0.4475
79.0000	0.4488
80.0000	0.4488
81.0000	0.4496
82.0000	0.4496
83.0000	0.4505
84.0000	0.4511
85.0000	0.4515
86.0000	0.4520
87.0000	0.4520
88.0000	0.4527
89.0000	0.4531
90.0000	0.4535
91.0000	0.4535
92.0000	0.4535
93.0000	0.4535
94.0000	0.4551
95.0000	0.4554
96.0000	0.4554
97.0000	0.4563
98.0000	0.4567
99.0000	0.4567
100.0000	0.4567
101.0000	0.4578

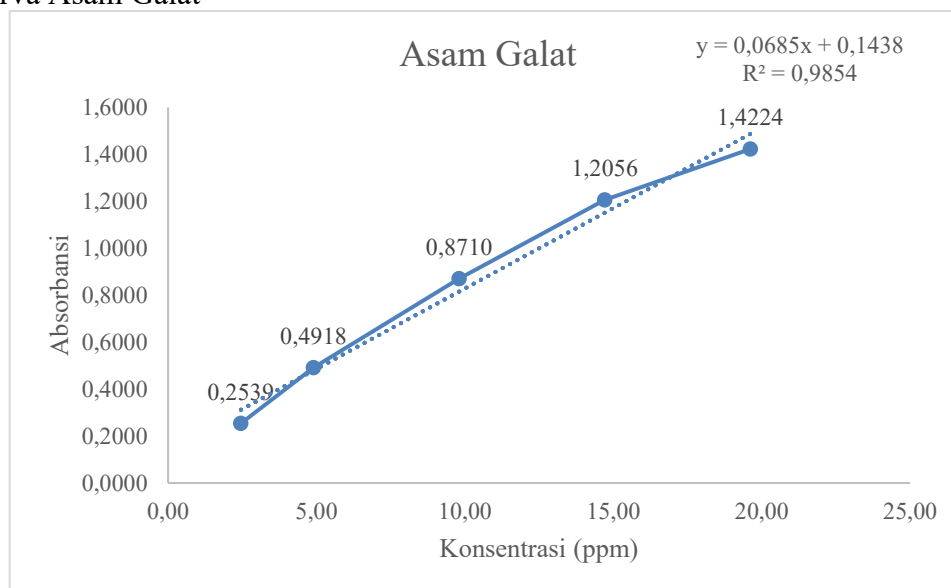
Kinetics Data Print Report

02/11/2026 03:49:12 PM

Time (Minute)	RawData ...
102.0000	0.4578
103.0000	0.4586
104.0000	0.4586
105.0000	0.4586
106.0000	0.4598
107.0000	0.4603
108.0000	0.4605
109.0000	0.4609
110.0000	0.4609
111.0000	0.4609
112.0000	0.4621
113.0000	0.4625
114.0000	0.4625
115.0000	0.4630
116.0000	0.4633
117.0000	0.4637
118.0000	0.4637
119.0000	0.4645
120.0000	0.4647

Lampiran 11. Uji Kadar Total Fenolik Ekstrak Etanol dan Fraksi Etil Asetat Daun Iler (*Coleus scutellarioides* (L.) Benth)

Kurva Asam Galat



Data Absorbansi Standar Asam Galat pada Berbagai Konsentrasi

Konsentrasi (ppm)	Absorbansi	Rata-rata
2,45	0,2801	0,2539
	0,2277	
4,90	0,5041	0,4918
	0,4552	
9,81	0,8933	0,8710
	0,8245	
14,71	1,2831	1,2056
	1,1038	
19,62	1,5204	1,4224
	1,3001	

Hasil Penetapan Kadar Total Fenolik Ekstrak Etanol Daun Iler

Absorbansi	Konsentrasi (µg/mL)	Konsentrasi (mg/mL)	Kadar Total Fenolik (mgGAE/g ekstrak)
0,6756	7,7635	0,0078	3,8740
0,6465	7,3387	0,0073	3,6693
0,6686	7,6613	0,0077	3,8230
Rata-rata			3,79
SD			0,11

$$\text{Contoh perhitungan Kadar Total Fenolik} = \frac{(0,0078 \times 0,5 \times 10)}{0,01002} = 3,87 \text{ mgGAE/g}$$

Keterangan:			
C	:	Konsentrasi fenolik (nilai x hasil persamaan regresi)	
V	:	Volume larutan ekstrak (mL)	
Fp	:	Faktor pengenceran	
g	:	Berat sampel (gram)	

Hasil Penetapan Kadar Total Fenolik Fraksi Etil Asetat Daun Iler

Absorbansi	Konsentrasi (µg/mL)	Konsentrasi (mg/mL)	Kadar Total Fenolik (mgGAE/g fraksi)
1,0121	12,6759	0,0127	6,3353
1,0229	12,8336	0,0128	6,3785
1,0284	12,9139	0,0129	6,3993
Rata-rata			6,37
SD			0,04

Contoh perhitungan Kadar Total Fenolik = $\frac{(0,0127 \times 0,5 \times 10)}{0,01002} = 6,34 \text{ mgGAE/g}$			
Keterangan:			
C	:	Konsentrasi fenolik (nilai x hasil persamaan regresi)	
V	:	Volume larutan ekstrak (mL)	
Fp	:	Faktor pengenceran	
g	:	Berat sampel (gram)	

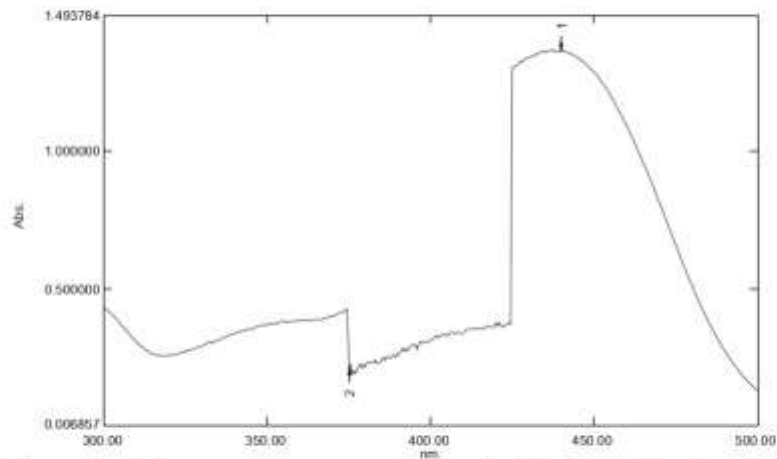
Lampiran 12. Panjang Gelombang Maksimum Kuersetin

Grafik *operating time* kuersetin selama 45 menit

Spectrum Peak Pick Report

02/11/2026 03:33:11 PM

Data Set: LAMDA MAX KUERSETIN_112507 - RawData



[Measurement Properties]
Wavelength Range (nm.): 300.00 to 500.00
Scan Speed: Medium
Sampling Interval: 0.5
Auto Sampling Interval: Disabled
Scan Mode: Auto

[Instrument Properties]
Instrument Type: UV-1790 Series
Measuring Mode: Absorbance
Slit Width: 0.5 nm
Light Source Change Wavelength: 340.8 nm
S/R Exchange: Normal

[Attachment Properties]
Attachment: None

[Operation]
Threshold: 0.0010000
Points: 4
Interpolate: Enabled
Interval: 0.000000
Average: Disabled

[Sample Preparation Properties]
Weight:
Volume:
Dilution:
Path Length:
Additional Information:

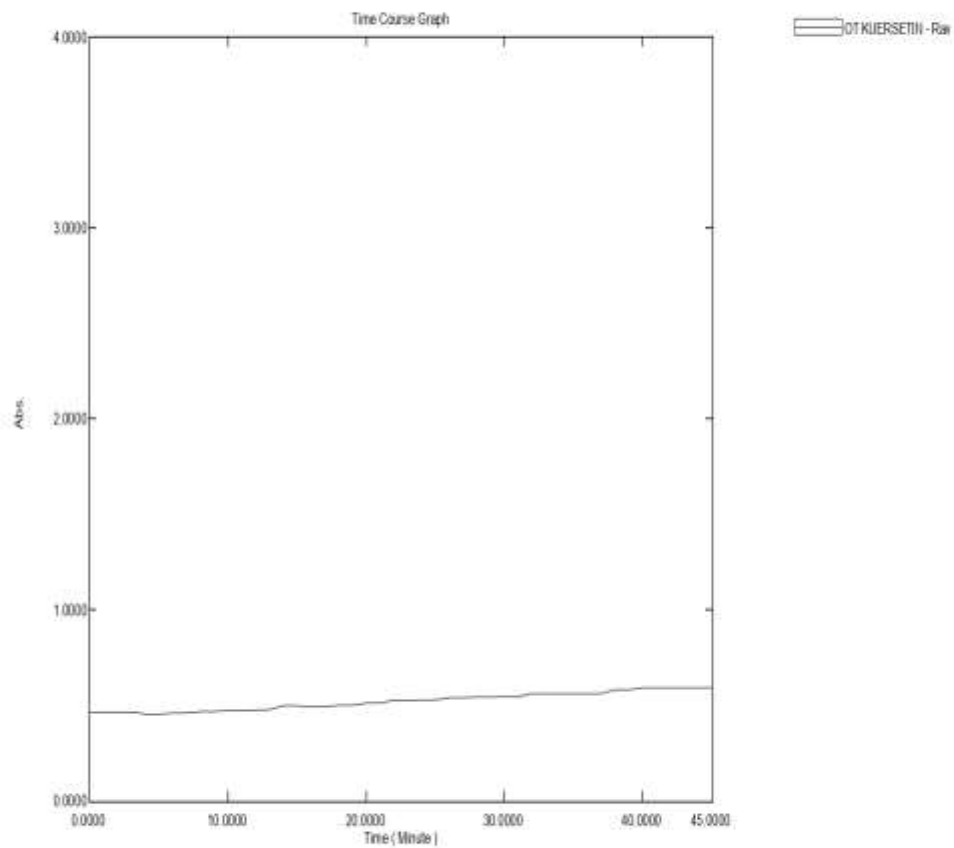
No.	P/N	Wavelength	Abs.	Description
1		440.00	1.365097	
2		375.00	0.214157	

Lampiran 13. *Operating Time* Kuersetin

Data absorbansi *operating time* kuersetin selama 45 menit

Overlay Time Course Graph Report

02/12/2026 05:53:21 PM



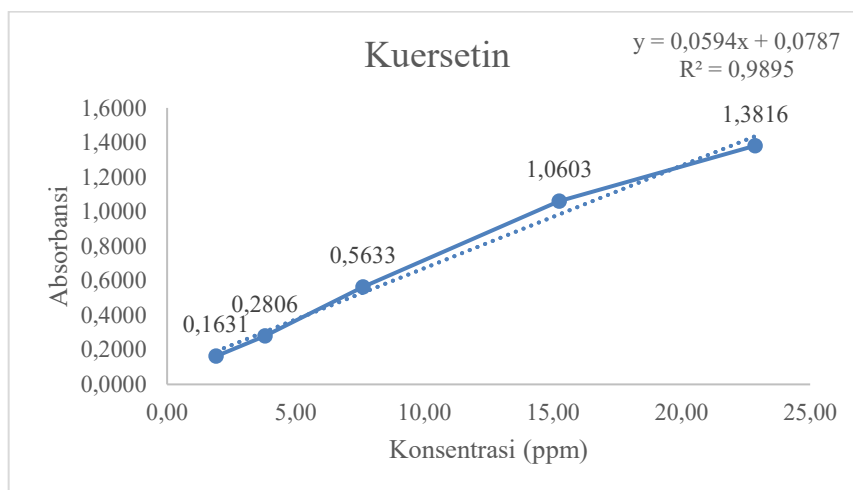
Kinetics Data Print Report

02/12/2026 05:53:43 PM

Time (Minute)	RawData ...
0.0000	0.4639
1.0000	0.4639
2.0000	0.4639
3.0000	0.4639
4.0000	0.4532
5.0000	0.4532
6.0000	0.4568
7.0000	0.4568
8.0000	0.4659
9.0000	0.4659
10.0000	0.4685
11.0000	0.4685
12.0000	0.4744
13.0000	0.4744
14.0000	0.4961
15.0000	0.4961
16.0000	0.4909
17.0000	0.4909
18.0000	0.4977
19.0000	0.4977
20.0000	0.5101
21.0000	0.5101
22.0000	0.5246
23.0000	0.5246
24.0000	0.5255
25.0000	0.5255
26.0000	0.5379
27.0000	0.5379
28.0000	0.5410
29.0000	0.5410
30.0000	0.5441
31.0000	0.5441
32.0000	0.5596
33.0000	0.5596
34.0000	0.5596
35.0000	0.5596
36.0000	0.5596
37.0000	0.5596
38.0000	0.5801
39.0000	0.5801
40.0000	0.5900
41.0000	0.5900
42.0000	0.5900
43.0000	0.5900
44.0000	0.5900
45.0000	0.5900

Lampiran 14. Uji Kadar Total Flavonoid Ekstrak Etanol dan Fraksi Etil Asetat Daun Iler (*Coleus scutellarioides* (L.) Benth)

Kurva Standar Kuersetin



Data Absorbansi Standar Kuersetin pada Berbagai Konsentrasi

Konsentrasi (ppm)	Absorbansi	Rata-rata
1,91	0,1420	0,1631
	0,1842	
3,81	0,2427	0,2806
	0,3185	
7,62	0,5046	0,5633
	0,6219	
15,25	1,0184	1,0603
	1,1021	
22,87	1,3047	1,3816
	1,4584	

Hasil Penetapan Kadar Total Flavonoid Ekstrak Etanol Daun Iler

Absorbansi	Konsentrasi (µg/mL)	Konsentrasi (mg/mL)	Kadar Total Flavonoid (mgQE/g ekstrak)
0,2330	2,5976	0,0026	1,2962
0,2250	2,4630	0,0025	1,2315
0,2281	2,5152	0,0025	1,2551
Rata-rata			1,26
SD			0,03

Contoh perhitungan Kadar Total Flavonoid = $\frac{(0,0026 \times 0,5 \times 10)}{0,01002} = 1,2962 \text{ mgQE/g}$			
Keterangan:			
C	:	Konsentrasi fenolik (nilai x hasil persamaan regresi)	
V	:	Volume larutan ekstrak (mL)	
Fp	:	Faktor pengenceran	
g	:	Berat sampel (gram)	

Hasil Penetapan Kadar Total Flavonoid Fraksi Etil Asetat Daun Iler

Absorbansi	Konsentrasi ($\mu\text{g/mL}$)	Konsentrasi (mg/mL)	Kadar Total Flavonoid (mgQE/g fraksi)
0,4510	6,2677	0,0063	3,1276
0,4570	6,3687	0,0064	3,1654
0,4601	6,4209	0,0064	3,1818
Rata-rata			3,16
SD			0,03

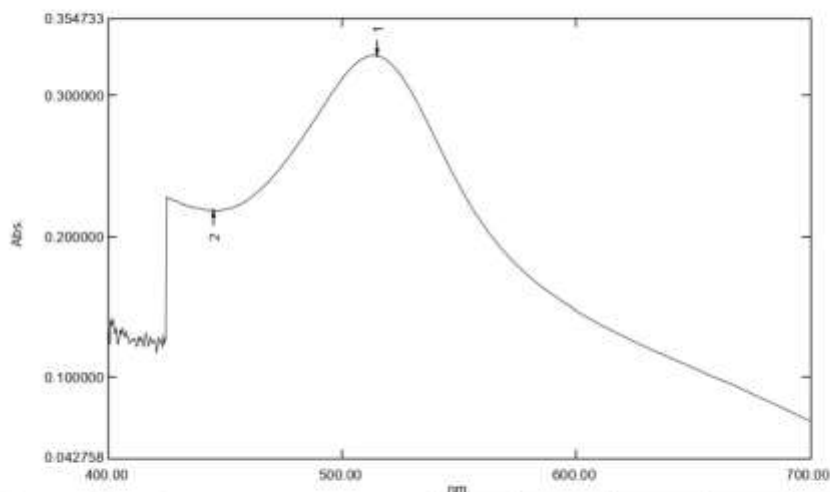
Contoh perhitungan Kadar Total Flavonoid = $\frac{(0,0063 \times 0,5 \times 10)}{0,01002} = 3,1276 \text{ mgQE/g}$			
Keterangan:			
C	:	Konsentrasi fenolik (nilai x hasil persamaan regresi)	
V	:	Volume larutan ekstrak (mL)	
Fp	:	Faktor pengenceran	
g	:	Berat sampel (gram)	

Lampiran 15. Panjang Gelombang Maksimum DPPH

Spectrum Peak Pick Report

02/11/2026 04:16:54 PM

Data Set: lamda max dpph_104834 - RawData



[Measurement Properties]
Wavelength Range (nm.): 400.00 to 700.00
Scan Speed: Medium
Sampling Interval: 0.5
Auto Sampling Interval: Disabled
Scan Mode: Auto

No.	P/V	Wavelength	Abs.	Description
1		515.00	0.328400	dpph
2		445.00	0.218603	

[Instrument Properties]
Instrument Type: UV-1780 Series
Measuring Mode: Absorbance
Slit Width: 0.5 nm
Light Source Change Wavelength: 340.8 nm
S/R Exchange: Normal

[Attachment Properties]
Attachment: None

[Operation]
Threshold: 0.0010000
Points: 4
Interpolate: Enabled
Interval: 5.000000
Average: Disabled

[Sample Preparation Properties]
Weight:
Volume:
Dilution:
Path Length:
Additional Information:

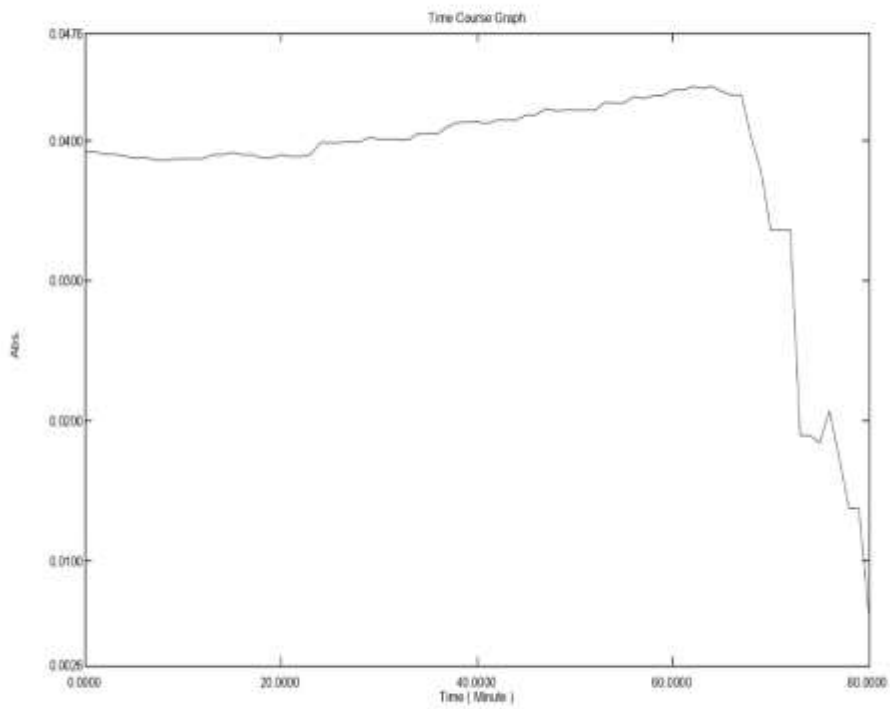
Lampiran 16. Operating Time DPPH

Grafik *Operating time* DPPH selama 80 menit

Active Time Course Graph Report

02/11/2026 04:15:20 PM

Data Set: OT DPPH - RawData



Data Absorbansi *Operating time* DPPH selama 80 menit

Kinetics Data Print Report

02/11/2026 04:15:32 PM

Time (Minute)	RawData ...
0.0000	0.0392
1.0000	0.0392
2.0000	0.0390
3.0000	0.0390
4.0000	0.0389
5.0000	0.0387
6.0000	0.0388
7.0000	0.0386
8.0000	0.0386
9.0000	0.0387
10.0000	0.0387
11.0000	0.0387
12.0000	0.0387
13.0000	0.0390
14.0000	0.0390
15.0000	0.0391
16.0000	0.0390
17.0000	0.0390
18.0000	0.0388
19.0000	0.0388
20.0000	0.0390
21.0000	0.0388
22.0000	0.0388
23.0000	0.0390
24.0000	0.0388
25.0000	0.0388
26.0000	0.0386
27.0000	0.0399
28.0000	0.0399
29.0000	0.0402
30.0000	0.0401
31.0000	0.0401
32.0000	0.0400
33.0000	0.0400
34.0000	0.0405
35.0000	0.0405
36.0000	0.0405
37.0000	0.0410
38.0000	0.0412
39.0000	0.0413
40.0000	0.0413
41.0000	0.0412
42.0000	0.0414
43.0000	0.0414
44.0000	0.0414
45.0000	0.0418
46.0000	0.0418
47.0000	0.0423
48.0000	0.0421
49.0000	0.0421
50.0000	0.0421

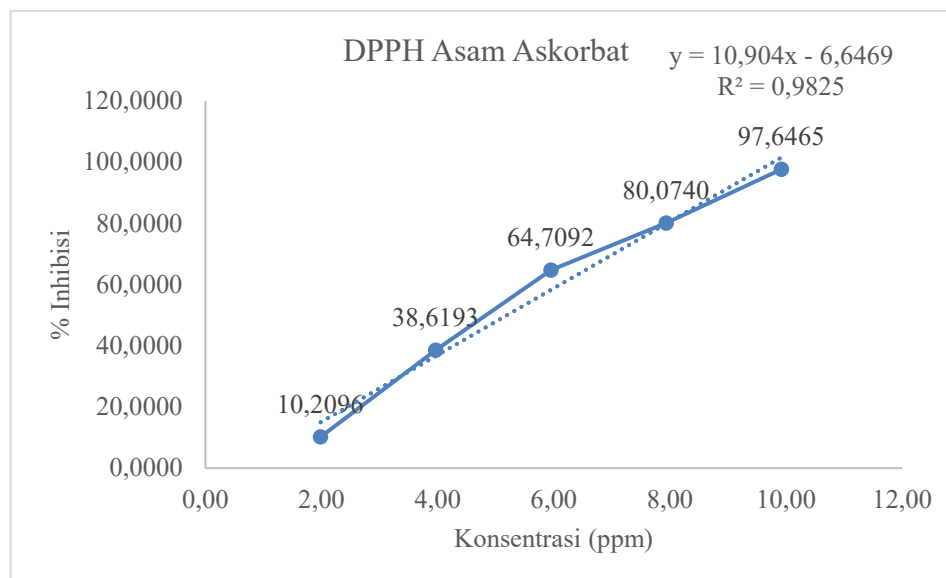
Kinetics Data Print Report

02/11/2026 04:15:32 PM

Time (Minute)	RawData ...
51.0000	0.0421
52.0000	0.0421
53.0000	0.0427
54.0000	0.0427
55.0000	0.0427
56.0000	0.0431
57.0000	0.0430
58.0000	0.0432
59.0000	0.0432
60.0000	0.0436
61.0000	0.0436
62.0000	0.0436
63.0000	0.0437
64.0000	0.0439
65.0000	0.0435
66.0000	0.0432
67.0000	0.0432
68.0000	0.0402
69.0000	0.0378
70.0000	0.0336
71.0000	0.0336
72.0000	0.0336
73.0000	0.0190
74.0000	0.0190
75.0000	0.0184
76.0000	0.0207
77.0000	0.0173
78.0000	0.0138
79.0000	0.0138
80.0000	0.0063

Lampiran 17. Uji Aktivitas Antioksidan Ekstrak Etanol dan Fraksi Etil Asetat Daun Iler (*Coleus scutellarioides* (L.) Benth)

Kurva Asam Askorbat



Data Absorbansi Asam Askorbat pada Berbagai Konsentrasi

Konsentrasi (ppm)	Absorbansi	Inhibisi Radikal Bebas (%)
0	0,8923	0,000
1,98	0,8012	10,2096
3,97	0,5477	38,6193
5,95	0,3149	64,7092
7,94	0,1778	80,0740
9,92	0,021	97,6465
IC₅₀		5,20

$$\text{Contoh perhitungan \% Inhibisi Antioksidan} = \frac{0,8923 - 0,8012}{0,8923} \times 100 = 10,2096$$

$$y = bx + a$$

$$y = 50$$

$$b = 10,904$$

$$a = -6,6469$$

$$IC_{50} = \frac{50 - (-6,6469)}{10,904} = 5,20$$

Keterangan:

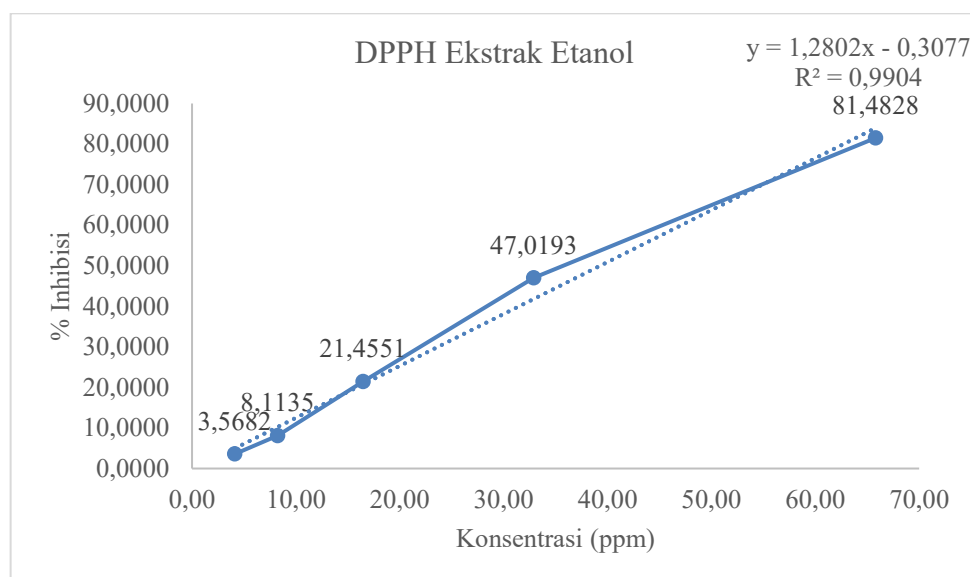
Y = % inhibisi (50)

a = Intercept (perpotongan garis di sumbu Y)

b = Slope (Kemiringan)

X = Konsentrasi

Kurva DPPH Ekstrak Etanol Daun Iler



Data Absorbansi DPPH Ekstrak Etanol pada Berbagai Konsentrasi

Konsentrasi (ppm)	Absorbansi	Inhibisi Radikal bebas (%)	Rata-rata Inhibisi Radikal Bebas (%)
0	0,8927	0,0000	0,0000
	0,8918	0,0000	
	0,8921	0,0000	
	0,8729	2,2180	
4,11	0,8646	3,0500	3,5682
	0,8436	5,4366	
	0,7861	11,9413	
	0,8497	4,7208	
8,22	0,8236	7,6785	8,1135
	0,6439	27,8705	
	0,6824	23,4806	
	0,7760	13,0142	
16,45	0,4995	44,0462	21,4551
	0,4737	46,8827	
	0,4449	50,1289	
	0,1378	84,5637	
32,90	0,2040	77,1249	47,0193
	0,1538	82,7598	
65,79			81,4828
IC₅₀			39,30
SD			1,62

$$\text{Contoh perhitungan \% Inhibisi Antioksidan} = \frac{0,8927 - 0,8729}{0,8927} \times 100 =$$

2,2180%

$$y = bx + a$$

$$y = 50$$

$$b = 1,2802$$

$$a = -0,3077$$

$$IC_{50} = \frac{50 - (-0,3077)}{1,2802} = 39,30$$

Keterangan:

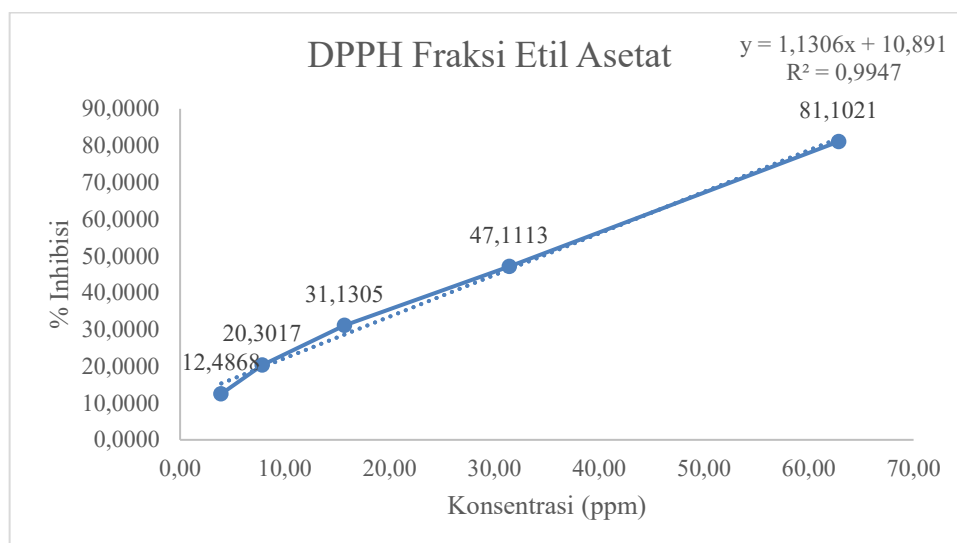
Y = % inhibisi (50)

a = Intercept (perpotongan garis di sumbu Y)

b = Slope (Kemiringan)

X = Konsentrasi

Data Absorbansi DPPH Fraksi Etil Asetat pada Berbagai Konsentrasi



Data Absorbansi DPPH Fraksi Etil Asetat pada Berbagai Konsentrasi

Konsentrasi (ppm)	Absorbansi	Inhibisi Radikal bebas (%)	Rata-rata Inhibisi Radikal Bebas (%)
0	0,8916	0,0000	0,0000
	0,8924	0,0000	
	0,8931	0,0000	
3,92	0,7893	11,4738	12,4868
	0,7808	12,5056	
	0,7727	13,4811	
7,86	0,7106	20,3006	20,3017
	0,7165	19,7109	
	0,7065	20,8935	
15,71	0,6240	30,0135	31,1305
	0,6017	32,5751	
	0,6180	30,8028	
31,43	0,4583	48,5980	47,1113
	0,4780	46,4366	
	0,4796	46,2994	
62,85	0,1797	79,8452	81,1021
	0,1662	81,3761	
	0,1600	82,0849	
IC ₅₀			34,59
SD			0,21

Contoh perhitungan % Inhibisi Antioksidan = $\frac{0,8916 - 0,7893}{0,8916} \times 100 = 11,4738\%$

$$y = bx + a$$

$$y = 50$$

$$b = 1,1306$$

$$a = 10,891$$

$$IC_{50} = \frac{50 - 10,891}{1,1306} = 34,59$$

Keterangan:

Y = % inhibisi (50)

a = Intercept (perpotongan garis di sumbu Y)

b = Slope (Kemiringan)

X = Konsentrasi