



**UJI AKTIVITAS ANTIOKSIDAN DAN PENETAPAN KADAR FLAVONOID
TOTAL EKSTRAK DAN FRAKSI DAUN KENARI (*Canarium indicum* L.)**

SKRIPSI

Oleh

Lukmanto

102210101046

FAKULTAS FARMASI

UNIVERSITAS JEMBER

2015



**UJI AKTIVITAS ANTIOKSIDAN DAN PENETAPAN KADAR FLAVONOID
TOTAL EKSTRAK DAN FRAKSI DAUN KENARI (*Canarium indicum* L.)**

SKRIPSI

Diajukan guna melengkapi tugas akhir dan memenuhi salah satu syarat
untuk menyelesaikan program strata satu pada Fakultas Farmasi (S1)
dan mencapai gelar Sarjana Farmasi

Oleh

Lukmanto
102210101046

FAKULTAS FARMASI
UNIVERSITAS JEMBER

2015

PERSEMBAHAN

Skripsi ini saya persembahkan untuk :

1. Orang tuaku, terutama ibuku Sulikah atas segala kasih sayang, doa, didikan, dukungan dan pengorbanan yang tak terhitung jumlahnya yang tak akan pernah terbalaskan;
2. Nenek dan Kakekku, yang ikut memberikan kasih sayang dan pengorbanan yang tak terhitung jumlahnya;
3. Bapak dan Ibu guruku sejak sekolah dasar hingga perguruan tinggi yang telah memberikan ilmu dan seluruh kemampuannya untuk mendidikku;
4. Almamaterku Fakultas Farmasi Universitas Jember;

MOTTO

Allah akan meninggikan orang-orang yang beriman di antara kamu dan orang-orang yang diberi ilmu pengetahuan beberapa derajat.

(terjemahan Surat Al-Mujadalah ayat 11)^{*)}

Karena sesungguhnya sesudah kesulitan itu ada kemudahan.

Sesungguhnya sesudah kesulitan itu ada kemudahan.

(terjemahan Surat *Alam-Nasyroh* ayat 5-6)^{*)}

Banyak kegagalan dalam hidup ini dikarenakan orang-orang tidak menyadari betapa dekatnya mereka dengan keberhasilan saat mereka menyerah.

(Thomas Alva Edison)^{*)}

^{*)}Departemen Agama Republik Indonesia. 1998. Al Qur'an dan Terjemahannya. Semarang: PT Kumudasoro Grafindo

^{*)}Kennelly, A.E. 1932. Biographical Memoir of Thomas Alva Edison 1847-1931. *National Academy Biographical Memoirs*, Vol. XV.

PERNYATAAN

Saya yang bertanda tangan di bawah ini:

Nama: Lukmanto

NIM : 102210101046

menyatakan dengan sesungguhnya bahwa skripsi yang berjudul “Uji Aktivitas Antioksidan dan Penetapan Kadar Flavonoid Total Ekstrak dan Fraksi Daun Kenari (*Canarium indicum L.*)” adalah benar-benar hasil karya sendiri, kecuali jika dalam pengutipan substansi disebutkan sumbernya, dan belum pernah diajukan pada instansi manapun, serta bukan karya jiplakan. Saya bertanggung jawab atas keabsahan dan kebenaran isinya sesuai dengan sikap ilmiah yang harus dijunjung tinggi.

Demikian pernyataan ini saya buat dengan sebenarnya, tanpa adanya tekanan dan paksaan dari pihak manapun serta bersedia mendapat sanksi akademik jika ternyata dikemudian hari pernyataan ini tidak benar.

Jember, 15 April 2015

Yang menyatakan,

Lukmanto

NIM 102210101046

SKRIPSI

**UJI AKTIVITAS ANTIOKSIDAN DAN PENETAPAN KADAR FLAVONOID
TOTAL EKSTRAK DAN FRAKSI DAUN KENARI (*Canarium indicum* L.)**

Oleh

Lukmanto

102210101046

Pembimbing

Dosen Pembimbing Utama : Endah Puspitasari, S.Farm., M.Sc., Apt.

Dosen Pembimbing Anggota : Lestyo Wulandari, S.Si., Apt. M.Farm

PENGESAHAN

Skripsi berjudul “Uji Aktivitas Antioksidan dan Penetapan Kadar Flavonoid Total Ekstrak dan Fraksi Dau Kenari (*Canarium indicum L.*)” telah diuji dan disahkan oleh Fakultas Farmasi, Universitas Jember pada :

Hari : Rabu
Tanggal : 15 April 2015
Tempat : Fakultas Farmasi, Universitas Jember

Tim Pembimbing

Dosen Pembimbing Utama,

Dosen Pembimbing Anggota,

Endah Puspitasari, S.Farm., M.Sc., Apt.
NIP. 198107232006042002

Lestyo Wulandari, S.Si., Apt. M.Farm
NIP. 197604142002122001

Tim Penguji

Penguji I,

Penguji II,

Siti Muslichah, S.Si., M.Sc., Apt.
NIP. 197305132005012001

Nia Kristiningrum, S.Farm., M.Farm., Apt.
NIP. 198204062006042001

Mengesahkan,
Dekan Fakultas Farmasi Universitas Jember

Lestyo Wulandari, S.Si., Apt. M.Farm
NIP. 197604142002122001

RINGKASAN

Uji Aktivitas Antioksidan dan Penetapan Kadar Flavonoid Total Ekstrak dan Fraksi Daun Kenari (*Canarium indicum* L.); Lukmanto, 102210101046; 2015; 49 halaman; Fakultas Farmasi, Universitas Jember.

Sumber radikal bebas mudah dijumpai dalam lingkungan sehari-hari, seperti asap rokok, obat tertentu, makanan dalam kemasan, bahan aditif, dan lain-lain. Radikal bebas merupakan senyawa yang mengandung elektron tidak berpasangan yang sangat reaktif mencari pasangan elektronnya yang dapat bereaksi dengan molekul sel tubuh sehingga dapat menginduksi penyakit kanker, arteriosklerosis dan penuaan dini, disebabkan oleh kerusakan jaringan karena oksidasi. Radikal bebas ini dapat dinetralkan oleh antioksidan. Sumber antioksidan dapat berupa antioksidan sintetik maupun alami, namun antioksidan dari bahan sintetik memberikan efek samping yang cukup berbahaya bagi kesehatan sehingga dicari sumber antioksidan alami yang lebih aman untuk dikembangkan salah satunya dari tumbuhan.

Penelitian sebelumnya mengungkapkan bahwa daun beberapa spesies genus *Canarium* L. mempunyai aktivitas antioksidan yang kuat. Kemungkinan daun kenari (*Canarium indicum* L.) juga berpotensi besar mempunyai aktivitas antioksidan, karena semakin dekat kekerabatan semakin banyak senyawa fitokimia yang mirip termasuk senyawa yang mempunyai aktivitas antioksidan.

Penelitian ini bertujuan untuk mengetahui kandungan fitokimia, menguji aktivitas antioksidan, menetapkan kadar flavonoid total dan mengetahui hubungan kadar flavonoid total dengan aktivitas antioksidan ekstrak dan fraksi daun kenari. Serbuk kering daun kenari diekstraksi dengan ultasonikasi menggunakan pelarut etanol 96%, kemudian ekstrak dilarutkan campuran air dan etanol dan dilakukan ekstraksi cair-cair (fraksinasi) dengan pelarut n-heksana dan etil asetat. Pengukuran aktivitas antioksidan menggunakan metode DPPH dan penetapan kadar flavonoid

total menggunakan spektrofotometer UV-Vis dengan metode kolorimetri menggunakan pereaksi $AlCl_3$ dengan standar kuersetin.

Hasil penelitian menunjukkan ekstrak etanol, fraksi etil asetat dan fraksi etanol-air mempunyai aktivitas antioksidan yang sangat kuat dengan nilai IC_{50} berturut-turut adalah 25,294; 20,135; dan 28,806 $\mu g/ml$. Sedangkan fraksi n-heksana memiliki aktivitas antioksidan yang lemah dengan nilai IC_{50} 175,245 $\mu g/ml$. Kadar flavonoid total pada ekstrak etanol, fraksi n-heksana, fraksi etil asetat dan fraksi etanol-air berturut-turut adalah 2,624; 0,499; 3,846; dan 1,596 gram kuersetin ekuivalen per gram ekstrak/fraksi.

Hubungan antara aktivitas antioksidan ekstrak dan fraksi daun kenari dengan kadar flavonoid totalnya diperoleh persamaan regresi linier $y = -41,896 + 152,079x$; $r^2 = 0,632$. Hasil ini menunjukkan bahwa 63,2 % aktivitas antioksidan ekstrak dan fraksi daun kenari merupakan kontribusi dari senyawa flavonoid dan 36,8 % karena kehadiran metabolit sekunder yang mempunyai aktivitas antioksidan lainnya.

PRAKATA

Puji syukur ke hadirat Allah SWT atas segala limpahan rahmat dan karunia-Nya sehingga penulis dapat menyelesaikan skripsi yang berjudul “Uji Aktivitas Antioksidan dan Penetapan Kadar Flavonoid Total Ekstrak dan Fraksi Daun Kenari (*Canarium indicum L.*)”. Skripsi ini disusun sebagai prasyarat untuk memperoleh gelar sarjana farmasi pada Fakultas Farmasi Universitas Jember.

Penyusunan skripsi ini tidak terlepas dari bantuan berbagai pihak. Oleh karena itu penulis ingin mengucapkan terima kasih kepada :

1. Ibu Lestyo Wulandari, S.Si., Apt. M.Farm selaku Dekan Fakultas Farmasi Universitas Jember;
2. Ibu Endah Puspitasari, S.Farm., M.Sc., Apt. selaku dosen pembimbing utama dan Ibu Lestyo Wulandari, S.Si., Apt. M.Farm selaku dosen pembimbing anggota yang telah bersedia memberikan bimbingan dan ilmu kepada penulis selama penelitian dan penulisan skripsi ini;
3. Ibu Siti Muslichah, S.Si., M.Sc., Apt. dan Ibu Nia Kristiningrum, S.Farm., M.Farm., Apt. selaku dosen penguji yang telah banyak memberikan bantuan, saran, waktu dan perhatiannya dalam penulisan skripsi ini;
4. Ibu Fransisca Maria C, S.Farm., Apt. dan Ibu Lidya Ameliana, S.Farm., M.Sc., Apt. selaku dosen pembimbing akademik yang telah membimbing penulis untuk menentukan SKS selama kuliah;
5. Seluruh bapak dan ibu dosen Fakultas Farmasi Universitas Jember yang telah memberikan ilmu yang bermanfaat bagi saya;
6. Teman-teman angkatan 2010, terima kasih untuk masa-masa indah dan kehangatan persahabatan kita;
7. Bu Widi dan Mbak Anggra selaku laboran laboratorium biologi, Bu Wayan dan Mbak Hani selaku laboran kimia, serta Mbak Indri dan Mbak Dinik yang telah membantu selama penulis melakukan penelitian;

8. Taman Nasional Meru Betiri Jember yang telah memberikan bahan berupa daun kenari yang penulis butuhkan dalam penelitian ini;
9. Serta semua pihak yang tidak dapat disebutkan satu persatu.

Penulis menyadari bahwa skripsi ini jauh dari sempurna, oleh karena itu penulis mengharapkan kritik dan saran untuk kesempurnaan skripsi ini. Akhirnya, penulis berharap semoga skripsi ini dapat bermanfaat.

Jember, 15 April 2015

Penulis

DAFTAR ISI

	Halaman
HALAMAN JUDUL	i
HALAMAN PERSEMBAHAN	ii
HALAMAN MOTTO	iii
HALAMAN PERNYATAAN.....	iv
HALAMAN PEMBIMBINGAN	v
HALAMAN PENGESAHAN	vi
RINGKASAN.....	vii
PRAKATA	ix
DAFTAR ISI	xi
DAFTAR GAMBAR	xv
DAFTAR TABEL	xvi
DAFTAR LAMPIRAN.....	xvii
BAB 1. PENDAHULUAN	
1.1 Latar Belakang	1
1.2 Rumusan Masalah	4
1.3 Tujuan.....	4
1.4 Manfaat	4
BAB 2. TINJAUAN PUSTAKA	
2.1 Tinjauan Kenari (<i>Canarium indicum</i> L.).....	5
2.1.1 Nama dan Sinonim	5
2.1.2 Klasifikasi	5
2.1.3 Deskripsi.....	6
2.1.4 Kandungan Kimia.....	8
2.1.5 Kegunaan	9
2.2 Ekstraksi	9
2.2.1 Ekstraksi dengan Menggunakan Pelarut.....	9

2.2.1.1 Cara Dingin	10
2.2.1.2 Cara Panas	11
2.2.2 Cara Ekstraksi Lainnya	12
2.3 Ekstraksi Cair-cair (Partisi/Fraksinasi).....	13
2.4 Radikal Bebas	14
2.5 Antioksidan	18
2.6 Uji Aktivitas Antioksidan	19
2.6.1 Metode DPPH	19
2.6.2 Metode FRAP	20
2.6.3 Metode ABTS.....	21
2.6.4 Metode ORAC.....	21
2.6.5 Metode CUPRAC	22
2.7 Flavonoid	22
2.8 Spektrofotometri UV-Vis	25
BAB 3. METODE PENELITIAN	
3.1 Jenis Penelitian.....	27
3.2 Tempat dan Waktu Penelitian	27
3.3 Variabel Penelitian	27
3.3.1 Variabel Bebas	27
3.3.2 Variabel Tergantung	27
3.3.3 Variabel Terkendali	27
3.4 Definisi Operasional.....	28
3.5 Bahan dan Alat yang Digunakan.....	28
3.5.1 Bahan Uji	28
3.5.2 Alat Uji.....	29
3.6 Prosedur Penelitian.....	29
3.6.1 Preparasi Sampel	29
3.6.2 Persiapan Ekstrak	29
3.6.3 Fraksinasi	29

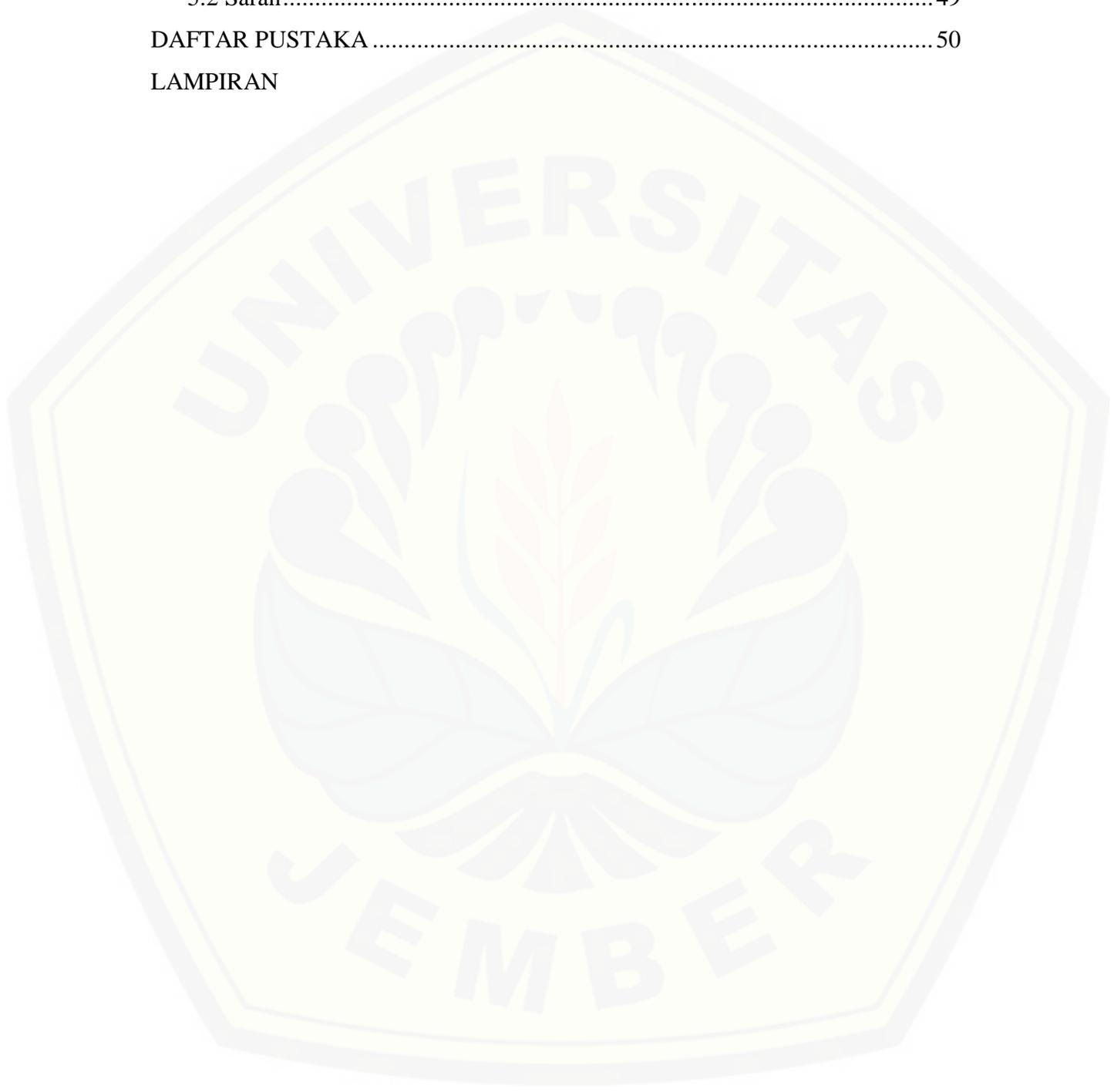
3.6.4 Penapisan Fitokimia Ekstrak.....	30
3.6.4.1 Identifikasi Alkaloid	30
3.6.4.2 Identifikasi Saponin	30
3.6.4.3 Identifikasi Flavonoid	30
3.6.4.4 Identifikasi Polifenol dan Tanin	31
3.6.4.5 Identifikasi Steroid.....	31
3.6.5 Pengujian Aktivitas Antioksidan dan Penetapan IC ₅₀	31
3.6.5.1 Pembuatan Larutan DPPH	31
3.6.5.2 Penentuan Panjang Gelombang Maksimum DPPH.....	32
3.6.5.3 Pembuatan Larutan Larutan Kontrol	32
3.6.5.4 Penentuan <i>Operating Time</i>	32
3.6.5.5 Pembuatan Larutan Uji	32
3.6.5.6 Pembuatan Larutan Vit.C.....	33
3.6.5.7 Penentuan Aktivitas Antioksidan	33
3.6.5.8 Penentuan Persentase Peredaman	34
3.6.6 Analisis Kuantitatif Total Flavonoid	34
3.6.6.1 Pembuatan Kurva Kalibrasi Kuersetin.....	34
3.6.6.2 Penentuan Kadar Flavonoid Total	34
3.7 Analisis Data.....	35
BAB 4. HASIL DAN PEMBAHASAN	
4.1 Pembuatan Ekstrak Daun Kenari	36
4.2 Penapisan Fitokimia	38
4.3 Uji Aktivitas Antioksidan.....	39
4.3.1 Optimasi Panjang Gelombang DPPH.....	39
4.3.2 Penentuan Waktu Optimum	40
4.3.3 Pengukuran Aktivitas Antioksidan.....	41
4.4 Penetapan Kadar Flavonoid Total.....	45
BAB 5. KESIMPULAN DAN SARAN	

5.1 Kesimpulan 49

5.2 Saran..... 49

DAFTAR PUSTAKA 50

LAMPIRAN

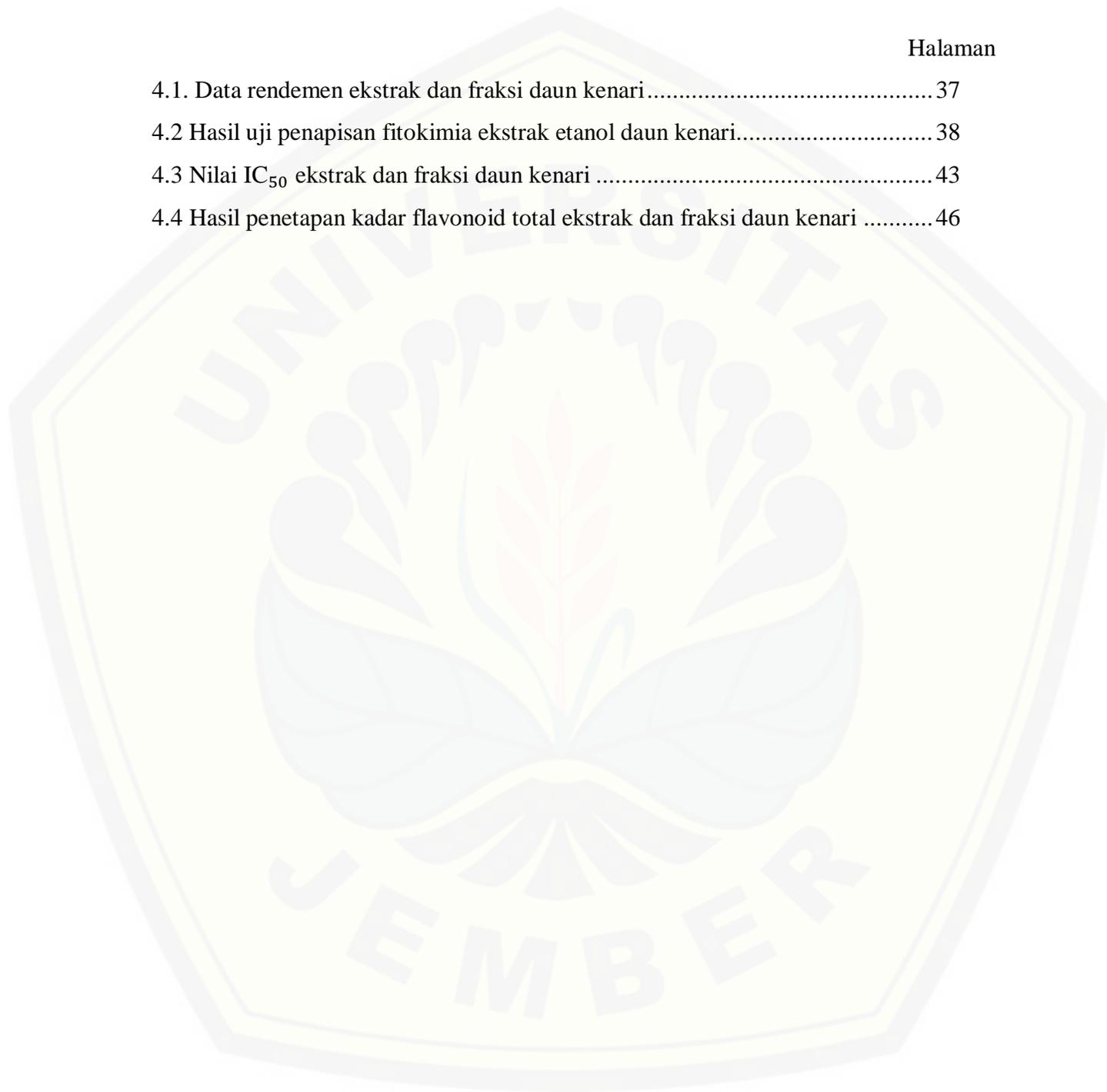


DAFTAR GAMBAR

	Halaman
2.1. Daun kenari.....	7
2.2 Rumus bangun DPPH radikal dan non-radikal.....	19
2.3 Struktur dasar flavonoid	23
2.4 Tempat pengikatan <i>trace metal</i> pada flavonoid.....	24
2.5 Peredaman ROS oleh flavonoid.....	24
4.1 Absorbansi DPPH dan sampel pada λ 400-600 nm	40
4.2 Absorbansi rata-rata larutan DPPH 0,004% dengan penambahan larutan uji mulai menit ke 5 hingga ke 60	41
4.3 Hubungan konsentrasi dengan persen peredaman DPPH (rata-rata \pm SD) ekstrak dan fraksi daun kenari	42
4.4 Struktur dasar flavonoid	44
4.5 Korelasi linier antara aktivitas antioksidan IC_{50} dan kadar flavonoid total ekstrak dan fraksi daun kenari	47

DAFTAR TABEL

	Halaman
4.1. Data rendemen ekstrak dan fraksi daun kenari.....	37
4.2 Hasil uji penapisan fitokimia ekstrak etanol daun kenari.....	38
4.3 Nilai IC ₅₀ ekstrak dan fraksi daun kenari	43
4.4 Hasil penetapan kadar flavonoid total ekstrak dan fraksi daun kenari	46



DAFTAR LAMPIRAN

	Halaman
A. Hasil penapisan fitokimia ekstrak etanol daun kenari.....	56
A.1 Uji alkaloid.....	56
A.2 Uji steroid	57
A.3 Uji saponin	58
A.4 Uji flavonoid	59
A.5 Uji polifenol dan tanin	60
B. Pengamatan absorbansi DPPH.....	61
C. Pengamatan absorbansi sampel.....	63
C.1 Pengamatan absorbansi ekstrak etanol daun kenari 40 µg/ml	63
C.2 Pengamatan absorbansi fraksi n-heksana ekstrak etanol daun kenari 150 µg/ml	65
C.3 Pengamatan absorbansi fraksi etil asetat ekstrak etanol daun kenari 40 µg/ml	67
C.4 Pengamatan absorbansi fraksi etanol-air ekstrak etanol daun kenari 40 µg/ml	69
D. Perhitungan.....	71
E. Penentuan panjang gelombang maksimum DPPH.....	77
F. Penentuan <i>operating time</i>	78
G. Data % peredaman DPPH ekstrak dan fraksi daun kenari	79
H. Regresi konsentrasi sampel terhadap % peredaman DPPH	80
H.1 Regresi konsentrasi ekstrak etanol daun kenari terhadap % peredaman DPPH.....	80
H.2 Regresi konsentrasi fraksi n-heksana ekstrak etanol daun kenari terhadap % peredaman DPPH.....	81
H.3 Regresi konsentrasi fraksi etil asetat ekstrak etanol daun kenari terhadap % peredaman DPPH.....	82

H.4 Regresi konsentrasi fraksi etanol-air ekstrak etanol daun kenari terhadap % peredaman DPPH.....	83
H.5 Regresi konsentrasi vitamin C terhadap % peredaman DPPH.....	84
I. Kadar flavonoid total	85
I.1 Kalibrasi standar kuersetin	85
I.2 Kadar flavonoid total sampel.....	86
J. Korelasi kadar flavonoid total dengan aktivitas antioksidan daun kenari	86

BAB 1. PENDAHULUAN

1.1 Latar Belakang

Sumber radikal bebas mudah dijumpai dalam lingkungan kehidupan sehari-hari, seperti asap rokok, obat tertentu, makanan dalam kemasan, bahan aditif, dan lain-lain (Winarsi, 2007). Radikal bebas merupakan molekul atau fragmen molekul yang mengandung satu atau lebih elektron tidak berpasangan pada orbital atomnya. Radikal bebas ini berbahaya karena sangat reaktif mencari pasangan elektronnya untuk mencapai kestabilan (Valko *et al.*, 2007). Radikal bebas dapat menyebabkan stres oksidatif yang memainkan peranan utama dalam perkembangan penyakit kronis dan degeneratif seperti kanker, arthritis, penuaan, gangguan autoimun, kardiovaskular dan penyakit neurodegeneratif (Pham-Huy *et al.*, 2008).

Sebenarnya radikal bebas penting artinya bagi kesehatan dan fungsi tubuh jika jumlahnya tidak berlebihan atau dalam keadaan seimbang seperti sebagai molekul pengatur relaksasi otot polos, meningkatkan fungsi imun dan menjaga homeostatis redoks (Droge, 2002). Kelebihan radikal bebas dalam tubuh dapat memacu timbulnya berbagai macam penyakit degeneratif dan kronis (Pham-Huy *et al.*, 2008).

Radikal bebas yang merusak tubuh dapat dinetralisir oleh senyawa antioksidan. Antioksidan merupakan senyawa yang dapat menghambat oksigen reaktif dan radikal bebas dalam tubuh. Senyawa antioksidan ini akan menyerahkan satu atau lebih elektron kepada radikal bebas sehingga menjadi bentuk molekul yang normal kembali dan menghentikan berbagai kerusakan yang ditimbulkan (Sasikumar *et al.*, 2009). Tubuh manusia tidak mempunyai cadangan antioksidan dalam jumlah berlebih, sehingga jika terjadi paparan radikal bebas berlebih maka tubuh membutuhkan antioksidan eksogen (Hariyatmi, 2004). Sumber antioksidan dapat berupa antioksidan sintetik maupun alami. Antioksidan sintetik misalnya BHA (*butylated hydroxy anisole*), BHT (*butylated hydroxy toluene*), PG (*propyl gallate*),

dan TBHQ (*tertiary butyl hydroquinone*) (Widowati *et al.*, 2005). Namun, antioksidan dari bahan sintetik memberikan efek samping yang cukup berbahaya bagi kesehatan. Hasil penelitian menunjukkan bahwa antioksidan sintetik BHA dan BHT dapat meracuni binatang percobaan dan pada pemaparan yang lama dapat meningkatkan risiko karsinogenesis (Whysner *et al.*, 1994). Oleh karena itu dicari sumber antioksidan alami yang lebih aman untuk dikembangkan.

Salah satu sumber antioksidan alami berasal dari tumbuhan. Tumbuhan mengandung senyawa yang mempunyai aktivitas sebagai antioksidan salah satunya adalah senyawa flavonoid (Pietta, 2000). Flavonoid adalah golongan senyawa polifenol yang diketahui memiliki sifat antioksidan, antimikroba, antialergi, antivirus, antiinflamasi dan vasodilator (Pietta, 2000). Flavonoid terdapat dalam semua tumbuhan hijau sehingga pasti ditemukan pada setiap telaah ekstrak tumbuhan (Markham, 1988). Flavonoid adalah senyawa yang ditemukan pada buah-buahan, sayur-sayuran, dan beberapa minuman yang memiliki beragam manfaat biokimia dan efek antioksidan (Donald dan Cristobal, 2006).

Indonesia dikenal sebagai *mega biodiversity country*, yaitu bangsa yang memiliki banyak keanekaragaman hayati. Di hutan tropis Indonesia terdapat sekitar 30.000 tumbuhan, diduga sekitar 9.600 spesies diketahui berkhasiat obat, dan sekitar 200 spesies diantaranya merupakan tumbuhan obat penting bagi industri obat tradisional. Saat ini, banyak orang yang kembali menggunakan bahan-bahan alam yang dalam pelaksanaannya membiasakan hidup dengan menghindari bahan-bahan kimia sintesis dan lebih mengutamakan bahan-bahan alami. Salah satunya adalah penggunaan tumbuhan untuk pengobatan (Kardinan dan Kusuma, 2004). Salah satu tumbuhan yang terdapat di Indonesia adalah kenari (*Canarium indicum* L.). Kenari banyak tumbuh di daerah Indonesia bagian timur, seperti Sulawesi Utara, Maluku dan pulau Seram (Thomson dan Evans, 2006). Tumbuhan kenari termasuk dalam genus *Canarium* L. Tanaman ini menghasilkan buah dan biji (kernel) yang biasanya dimanfaatkan sebagai bahan pelengkap kue (Dzarkasi *et al.*, 2011). Kenari juga bermanfaat sebagai tumbuhan obat. Resin untuk mengobati ulser, buah untuk laksanakan,

akar untuk mengobati sakit kepala, serta biji keringnya dimakan untuk menginduksi sterilitas (Quattrocchi, 2012).

Tidak banyak penelitian yang dilakukan mengenai kenari. Dzarkasi *et al.* (2011) telah meneliti senyawa bioaktif pada biji kenari yang menyebutkan komponen terbanyak biji kenari adalah minyak serta biji kenari mengandung banyak senyawa fenol dan flavonoid dan memberikan aktivitas sebagai antioksidan. Limbono (2013) juga melakukan penelitian yang menyebutkan ekstrak etanol biji kenari memiliki daya antioksidan dengan harga IC_{50} sebesar 10.106,75 $\mu\text{g/ml}$. Sedangkan penelitian mengenai daun kenari belum pernah dilakukan, namun telah dilakukan beberapa penelitian mengenai aktivitas antioksidan pada daun beberapa spesies genus *Canarium*. Zhang dan Lin (2008) melaporkan daun *C. album* mengandung tanin yang memiliki aktivitas peredaman DPPH yang baik dengan IC_{50} sebesar 56,86 $\mu\text{g/ml}$. Mogana *et al.* (2011) melaporkan daun *C. patentinervium* Miq. memiliki aktivitas antioksidan sama bagusnya dengan asam askorbat dengan IC_{50} sebesar 2,93 $\mu\text{g/ml}$. Berdasarkan pendekatan kemotaksonomi kemungkinan daun *C. indicum* L. juga mempunyai aktivitas antioksidan.

Berdasarkan fakta di atas, peneliti tertarik melakukan penelitian yang bertujuan untuk mengetahui kandungan fitokimia, menguji aktivitas antioksidan, menetapkan kadar flavonoid total dan mengetahui hubungan kadar flavonoid total dengan aktivitas antioksidan ekstrak dan fraksi daun kenari. Peneliti berharap hasil penelitian ini nantinya dapat bermanfaat untuk pengembangan ilmu pengetahuan dan dapat menemukan sumber antioksidan alami.

1.2 Perumusan Masalah

Berdasarkan latar belakang, maka masalah dalam penelitian ini dirumuskan sebagai berikut:

1. Apa sajakah kandungan fitokimia pada ekstrak etanol daun kenari?
2. Berapakah nilai aktivitas antioksidan ekstrak etanol daun kenari dan fraksinya dengan menggunakan metode DPPH yang dinyatakan dengan IC_{50} ?
3. Berapakah kadar kandungan flavonoid total pada ekstrak etanol daun kenari dan fraksinya?
4. Bagaimanakah hubungan kadar flavonoid total ekstrak etanol daun kenari dan fraksinya terhadap aktivitas antioksidan yang dihasilkan?

1.3 Tujuan Penelitian

Tujuan yang diharapkan dari penelitian ini adalah:

1. Mengetahui kandungan fitokimia pada ekstrak etanol daun kenari.
2. Mengetahui aktivitas antioksidan ekstrak dan fraksi daun kenari dengan menggunakan metode DPPH.
3. Mengetahui kadar kandungan flavonoid total ekstrak dan fraksi daun kenari
4. Mengetahui hubungan kadar flavonoid total ekstrak dan fraksi daun kenari terhadap aktivitas antioksidan yang dihasilkan.

1.4 Manfaat Penelitian

Manfaat yang diharapkan dapat diambil dari penelitian ini adalah:

1. Uji aktivitas antioksidan yang dilakukan dapat dijadikan sebagai salah satu upaya untuk mengembangkan daun kenari menjadi salah satu tanaman yang memiliki khasiat sebagai antioksidan.
2. Sebagai salah satu referensi/perbandingan dalam penelitian lebih lanjut.

BAB 2. TINJAUAN PUSTAKA

2.1 Tinjauan Kenari (*Canarium indicum* L.)

2.1.1 Nama dan Sinonim

C. indicum L. memiliki beberapa sebutan nama. Penyebutan umum atau dalam bahasa Inggris di antaranya Blume Galip, C. Almond, C. Nut, Galip, Galip Nut, Almond Java, Java Olive, Kanari, Nangai Nut, Nut Ali. Penyebutan dalam bahasa daerah diantaranya, Indonesia: Jal, Jar (Ambon), Kanari Bagéa (Maluku), Kenari Ambon (Suku Sunda), Buah Kenari. Malaysia: Canari, Ngali, Nangai, Kenari, Pokok Kenari. Papua New Guinea: Baga, Galip, Galip Nut (General), Hinue (New Ireland), a ngallip lawele (New Britain). Kepulauan Solomon: Eghe (Pulau Savo), Nina, Ninge, Voia (Santa Cruz), Angari (Santa Ana), Ngari (Kausage, Simbo dan Varisi), Ngoeta (Marovo), Nolepo (Garciosa Bay), Nyia Nyinge (Ayiwo). Vanuatu: Nangai (Bislama), Bunnige, Punnige, Nige Kava. Perancis: Noix De Nangaille, Oli, Galap, La Nangaille, Noix De Kanari. Jerman: Indisces Kananaribaum, Kanarinuß, Galipnuß. India: Agarbati, Dhup (Hindi) (Lim, 2012). *C. indicum* ini dikenal juga dengan nama *C. amboinense* Hochr., *C. commune* L., *C. mehenbethene* Gaertn., *C. moluccanum* Blume, dan *C. zephyrinum* Rumphius (Thomson dan Evans, 2006).

2.1.2 Klasifikasi

Tumbuhan *C. indicum* L. secara taksonomi mempunyai klasifikasi sebagai berikut (USDA, 2014) :

Kingdom : Plantae
Subkingdom : Tracheobionta
Superdivisi : Spermatophyta
Divisi : Magnoliophyta
Klas : Magnoliopsida

Subklas : Rosidae
Ordo : Sapindales
Famili : Burseraceae
Genus : *Canarium* L.
Jenis : *Canarium indicum* L.

2.1.3 Deskripsi

Kenari merupakan tanaman asli Indonesia yang banyak tumbuh di daerah Indonesia bagian timur, seperti Sulawesi Utara, Maluku dan pulau Seram. Diduga, tanaman ini berasal dari Indonesia bagian timur. Beberapa sumber menyatakan bahwa tanaman kenari juga banyak dijumpai di beberapa negara seperti Thailand, Filipina, Kepulauan Fiji, dan Papua New Guinea. Penelitian intensif tentang asal-usul tanaman ini yang sebenarnya masih perlu dilakukan. Di Indonesia, tanaman ini masih merupakan tanaman hutan dan belum banyak dibudidayakan. Sumber lain menyatakan bahwa tanaman ini banyak dijumpai di daerah Malenesian (Kennedy dan Clarke, 2004; Thomson dan Evans, 2006).

Genus *Canarium* L. termasuk dalam famili Burseraceae. Genus *Canarium* L. terdiri dari 75 spesies utama yang ditemukan di daerah tropis Asia dan Pasifik dan beberapa spesies di daerah Afrika tropis (Orwa *et al.*, 2009). Dari spesies yang ada, spesies yang terdapat di Pasifik Barat dapat diklasifikasikan menjadi 2 kelompok, yaitu: (1) maluense (spesies: *C. lamili*, *C. salomonense*, *C. harveyi*) dan (2) vulgare (spesies: *C. vulgare*, *C. indicum*, *C. ovatum*) (Leenhouts, 1959; Yen, 1994; Keneddy dan Clarke, 2004). Kenyataan bahwa kemiripan ketiga spesies *C. indicum* L., *C. vulgare*, dan *C. ovatum* yang termasuk dalam kelompok vulgare juga dikemukakan oleh Thomson dan Evans (2006). Menurut Evans (1994) ketiga spesies yang dominan tersebut berbeda-beda asalnya *C. vulgare* dari Indonesia, *C. ovatum* dari Filipina, dan *C. indicum* L. berasal dari Indonesia, Papua New Guinea, Solomon, dan Vanuatu. Leenhouts (1959) mengemukakan bahwa *C. indicum* L. dan *C. vulgare* sangat mirip (*overlap*). Terutama jika didasarkan pada stipula dan morfologi buahnya (bentuk,

ukuran, ketebalan *shell*, dan warna kulit buah). Namun demikian, *C. indicum* L. mempunyai produksi lebih tinggi dari spesies yang lain dan ukuran lebih besar sehingga paling sesuai untuk dijadikan komoditi komersil (Yen, 1994).

Genus *Canarium* L. memiliki sekitar 100 spesies yang kebanyakan tumbuh di hutan lembab dataran rendah di daerah Melanesia (Kennedy dan Clarke, 2004). Namun demikian, spesies domestik yang paling banyak terdapat di Indonesia antara lain, *C. lamili* (Irian Jaya), *C. vulgare* (Sangihe Talaud, Sulawesi, Seram, Morotai, Tanimbar, dan Flores), dan *C. indicum* L. (Sulawesi utara, Ambon, Ternate, pulau Seram, dan Kai) (Leenhouts, 1959; Yen, 1994).

Tempat tumbuh tanaman kenari umumnya di hutan primer dengan kondisi tanah bervariasi; berkapur, berpasir maupun tanah liat. Selain itu, tanaman ini tumbuh baik di dataran rendah sampai dataran tinggi dengan ketinggian 600 meter di atas permukaan laut. Saat matur ketinggiannya 40 sampai 50 meter dan diameter batang bagian bawah 1 – 1,5 meter (Thomson dan Evans, 2006).

Daunnya majemuk menyirip ganjil terdiri dari 6 – 8 pasang berhadapan, lonjong, dan pangkal meruncing, berwarna terang sampai hijau gelap seperti pada Gambar 2.1. Daun tanaman kenari berukuran panjang daun 7 – 28 cm dan lebar 3,5 – 11 cm (Thomson dan Evans, 2006).



Gambar 2.1. Daun kenari (*C. indicum* L.)

Tanaman ini termasuk tanaman berbunga. Bunganya kecil berwarna putih kekuning-kuningan dengan mahkota berbentuk segi tiga. Tanaman ini menghasilkan buah dan biji (kernel) yang biasanya dimanfaatkan sebagai pangan camilan. Biji (kernel) tersebut mengandung lemak dan protein tinggi. Buah kenari berbentuk lonjong (*ovoid*) sampai agak bulat, dengan dimensi morfologi 2-4 x 3-6 cm, dan pada umumnya berwarna hijau pada saat masih mentah, berubah menjadi hijau tua agak kegelapan sampai kehitaman pada saat buah matang. Warna hitam terjadi karena degradasi klorofil pada kulit buah. Secara morfologi, buah kenari terdiri dari bagian kulit luar (*exocarp*), daging buah (*mesocarp*), dan bagian tempurung dan isinya (*endocarp*) (Thomson dan Evans, 2006).

2.1.4 Kandungan Kimia

Belum ada sumber pustaka maupun penelitian mengenai kandungan kimia dari daun kenari. Namun berdasarkan studi literatur, telah banyak dilaporkan tentang kandungan kimia dari daun spesies genus *Canarium* L. lainnya, di antaranya pada *C. schweinfurthii* (Atile) mengandung saponin, tanin, glikosida jantung, steroid dan flavonoid sedangkan alkaloid dan antrakuinon tidak ada (Ngbede *et al.*, 2008). Pada *C. odontophyllum* mengandung terpenoid, tanin, flavonoid, fenol dan saponin sedangkan alkaloid tidak ada (Basri dan Nor, 2014). Pada *C. album* mengandung flavonoid, triterpena dan seskuiterpena (Mogana *et al.*, 2011). Pada *C. bengalense* mengandung *sabinene*, *caryophyllene*, *epi-bisyclosesquiterpene* (Thang *et al.*, 2004). Pada *C. parvum* Leen mengandung β -*caryophyllene*, β -*ocimene*, *germacrene* D, α -*humulene* dan *allo-ocimene* (Thang *et al.*, 2014). Penggunaan kandungan zat kimia sebagai salah satu cara untuk menentukan hubungan kekerabatan jenis (*inter-specific*) dan di bawah tingkat jenis (*infra-specific*) disebut kemotaksonomi (Stuessy, 1989). McNair (1935) menyatakan bahwa semakin dekat hubungan kekerabatan (*taxa*) menghasilkan kandungan kimia yang lebih mirip. Berdasarkan metode kemotaksonomi kemungkinan kandungan kimia daun kenari mirip pada spesies genus *Canarium* L. lainnya.

2.1.5 Kegunaan

Minyak kernel kenari umumnya digunakan untuk memasak, namun juga digunakan untuk obat terutama sebagai produk kosmetik dan perawatan kulit (Lim, 2012). Kernel kenari juga memiliki aktivitas antiinflamasi *in vitro* seperti yang ditunjukkan oleh penghambatan produksi prostaglandin (PGE 2) pada sel fibroblast 3T3 tikus Swiss Albino oleh minyak kernel (Leakey *et al.*, 2008). Minyak kernel menghambat produksi PGE2 sebanding dengan aspirin (Lim, 2012).

Ekstrak minyak kenari sudah diketahui sebagai agen antiinflamasi untuk melawan keriput dan hilangnya kekencangan kulit. Maestro *et al.* (2009) melaporkan bahwa produk kosmetik perawatan kulit kenari dimaksudkan untuk mencegah dan atau mengobati setidaknya salah satu tanda penuaan kulit. Di Kepulauan Solomon barat, kulit kayunya digunakan sebagai obat tradisional untuk sakit dada (Lim, 2012). Resin untuk mengobati ulser, buah untuk laksanakan, akar untuk mengobati sakit kepala, serta biji keringnya dimakan untuk menginduksi sterilitas (Quattrocchi, 2012).

Berdasarkan studi literatur diketahui daun *C. album* memiliki aktivitas peredaman DPPH yang bagus dengan IC_{50} sebesar 56,86 $\mu\text{g/ml}$ (Zhang dan Lin, 2008). Daun *C. patentinervium* Miq. memiliki aktivitas antioksidan sama bagusnya dengan asam askorbat dengan IC_{50} sebesar 2,93 $\mu\text{g/ml}$ (Mogana *et al.*, 2011). Berdasarkan metode kemotaksonomi kemungkinan daun *C. indicum* L. juga mempunyai aktivitas antioksidan.

2.2 Ekstraksi

Ekstraksi adalah kegiatan penarikan kandungan kimia yang dapat larut sehingga terpisah dari bahan yang tidak terlarut dengan pelarut cair. Simplisia yang diekstraksi mengandung berbagai senyawa aktif yang dapat larut dan senyawa aktif yang tidak dapat larut seperti serat, karbohidrat, protein, dan lain-lain (Depkes RI, 2000). Metode ekstraksi yang digunakan dalam bidang farmasi meliputi pemisahan bagian aktif tanaman berkhasiat obat dari komponen yang tidak aktif dengan

menggunakan pelarut selektif. Ketika bahan padat kontak dengan pelarut, komponen yang dapat larut dalam bahan padat berpindah menuju pelarut sehingga ekstraksi pelarut bahan tumbuhan obat menghasilkan perpindahan masa senyawa aktif yang larut menuju pelarut sesuai gradien konsentrasi. Laju perpindahan masa akan menurun jika konsentrasi senyawa aktif dalam pelarut tinggi sampai dicapai titik kesetimbangan yakni konsentrasi senyawa aktif dalam bahan dan pelarut sama (Handa *et al.*, 2008).

Prosedur ekstraksi bertujuan untuk mendapatkan senyawa yang diinginkan dan untuk menghilangkan komponen yang tidak diinginkan dari tanaman menggunakan pelarut yang selektif. Ekstrak yang diperoleh setelah distandardisasi dapat digunakan sebagai bahan obat-obatan seperti dalam bentuk tingtur atau ekstrak cair dan dapat diproses lebih lanjut untuk dibuat dalam bentuk sediaan seperti tablet dan kapsul. Tanaman yang diekstraksi mengandung campuran kompleks dari metabolit seperti alkaloid, glikosida, terpenoid, flavonoid dan lignan (Handa *et al.*, 2008).

Beberapa metode yang digunakan dalam ekstraksi bahan alam antara lain:

2.2.1 Ekstraksi dengan Menggunakan Pelarut

2.2.1.1 Cara Dingin

a. Maserasi

Maserasi adalah proses pengekstrakan simplisia dengan menggunakan pelarut dengan beberapa kali pengocokan atau pengadukan pada temperatur ruangan (kamar). Secara teknologi termasuk ekstraksi dengan prinsip metode pencapaian konsentrasi pada keseimbangan. Maserasi kinetik berarti dilakukan pengadukan yang kontinu (terus-menerus). Remaserasi berarti dilakukan pengulangan penambahan pelarut setelah dilakukan penyaringan maserat pertama dan seterusnya (Depkes RI, 2000). Kelemahan utama dari maserasi adalah prosesnya cukup memakan waktu yang lama, dapat berlangsung beberapa jam sampai beberapa minggu. Ekstraksi secara menyeluruh juga dapat menghabiskan sejumlah besar volume pelarut dan dapat berpotensi hilangnya metabolit. Selain itu, beberapa senyawa tidak terekstraksi secara

efisien jika kurang terlarut dalam temperatur kamar. Di lain pihak, dikarenakan ekstraksi dilakukan pada temperatur kamar, maserasi tidak menyebabkan degradasi dari metabolit yang tidak tahan panas (Depkes RI, 2000).

b. Perkolasi

Perkolasi adalah cara penyarian yang dilakukan dengan mengalirkan cairan penyari melalui serbuk simplisia yang telah dibasahi. Pada perkolasi, serbuk tanaman direndam dalam pelarut pada sebuah alat perkolator, bentuknya seperti kerucut terbalik. Perkolasi cukup sesuai baik untuk ekstraksi pendahuluan maupun dalam jumlah besar. Bahan padat basah dimasukkan dalam jumlah yang tepat kemudian didiamkan selama sekitar 4 jam dalam keadaan tertutup. Setelah itu cairan penyari akan menetes melewati serbuk tanaman, mengganti pelarut yang keluar berupa ekstrak. Seperti pada maserasi, untuk mengekstrak secara menyeluruh dilakukan dengan penambahan pelarut yang baru (*fresh solvent*) dan semua ekstrak dikumpulkan. Untuk meyakinkan perkolasi sudah sempurna, perkolat dapat diuji adanya metabolit dengan reagen spesifik (Depkes RI, 2000; Handa *et al.*, 2008).

2.2.1.2 Cara Panas

a. Refluks

Ekstraksi dengan pelarut pada temperatur titik didihnya selama waktu tertentu dan jumlah pelarut terbatas yang relatif konstan dengan adanya pendingin balik. Umumnya dilakukan pengulangan proses pada residu pertama sampai 3-5 kali sehingga dapat termasuk ekstraksi sempurna. Kekurangan yang utama dari metode ini adalah terdegradasinya komponen yang tidak tahan panas (Depkes RI, 2000).

b. Soxhlet

Soxhlet adalah ekstraksi dengan menggunakan pelarut yang selalu baru yang umumnya dilakukan dengan alat khusus sehingga terjadi ekstraksi secara kontinu dengan jumlah pelarut relatif konstan dengan adanya pendingin balik (Depkes RI, 2000). Ekstraksi soxhlet hanya diperlukan bila senyawa yang diinginkan memiliki kelarutan terbatas dalam suatu pelarut. Keuntungan dari metode ini adalah banyaknya

bagian tanaman akan terlarut dengan kondisi pemanasan. Kelemahannya adalah tidak dapat digunakan untuk senyawa yang tidak tahan pemanasan karena pemanasan yang berkepanjangan dapat menyebabkan degradasi senyawa aktif (Nikhal *et al.*, 2010).

c. Digesti

Digesti adalah maserasi kinetik (dengan pengadukan kontinu) pada temperatur yang lebih tinggi dari temperatur ruangan (kamar), yaitu secara umum dilakukan pada temperatur 40-50 °C (Depkes RI, 2000).

d. Infusa

Infusa adalah ekstraksi dengan pelarut air pada temperatur penangas air (bejana infus tercelup dalam penangas air mendidih, temperatur terukur 96-98 °C) selama waktu tertentu (15-20 menit) (Depkes RI, 2000).

e. Dekok

Dekok adalah infusa pada waktu yang lebih lama dan temperatur sampai titik didih air (Depkes RI, 2000).

2.2.2 Cara ekstraksi lainnya:

a. Destilasi Uap

Destilasi uap adalah ekstraksi senyawa kandungan menguap (minyak atsiri) dari bahan (segar atau simplisia) dengan uap air berdasarkan peristiwa tekanan parsial senyawa kandungan menguap dengan fase uap air dari ketel secara kontinu sampai sempurna dan diakhiri dengan kondensasi fase uap campuran (senyawa kandungan menguap ikut terdestilasi) menjadi destilat air bersama senyawa kandungan yang memisah sempurna atau memisah sebagian (Depkes RI, 2000).

b. Ekstraksi berkesinambungan

Proses ekstraksi yang dilakukan berulang kali dengan pelarut yang berbeda atau resirkulasi cairan pelarut dan prosesnya tersusun berturutan beberapa kali. Proses ini dilakukan untuk meningkatkan efisiensi (jumlah pelarut) dan dirancang untuk bahan dalam jumlah besar yang terbagi dalam beberapa bejana ekstraksi (Depkes RI, 2000).

c. Superkritikal karbondioksida

Penggunaan prinsip superkritik untuk ekstraksi serbuk simplisia, dan umumnya digunakan gas karbondioksida. Dengan variabel tekanan dan temperaur akan diperoleh spesifikasi kondisi polaritas tertentu yang sesuai untuk melarutkan golongan senyawa kandungan tertentu. Penghilangan cairan pelarut dengan mudah dilakukan karena karbondioksida menguap dengan mudah, sehingga hampir langsung diperoleh ekstrak (Depkes RI, 2000).

d. Ekstraksi energi listrik

Energi listrik digunakan dalam bentuk medan listrik, medan magnet serta *electric-discharges* yang dapat mempercepat proses dan meningkatkan hasil dengan prinsip menimbulkan gelembung spontan dan menyebarkan gelombang tekanan berkecepatan ultrasonik (Depkes RI, 2000).

e. Sonikasi

Getaran ultrasonik (> 20.000 Hz.) memberikan efek pada proses ekstrak dengan prinsip meningkatkan permeabilitas dinding sel, menimbulkan gelembung spontan (cavitation) sebagai stres dinamik serta menimbulkan fraksi interfase. Hasil ekstraksi tergantung pada frekuensi getaran, kapasitas alat dan lama proses ultrasonikasi (Depkes RI, 2000).

2.3 Ekstraksi Cair-cair (Partisi/Fraksinasi)

Sebuah ekstrak kasar bahan alam umumnya mengandung campuran banyak senyawa kimia yang mempunyai sifat fisika dan kimia yang beragam. Strategi dasar untuk pemisahan senyawa ini adalah berdasarkan sifat fisika kimianya yang dapat dipisahkan ke dalam beberapa kelompok senyawa kimia (Sarker *et al.*, 2006).

Ada beberapa jenis metode pemisahan, ekstraksi pelarut atau disebut juga ekstraksi cair-cair merupakan metode pemisahan yang paling baik dan populer. Alasan utamanya adalah pemisahan ini dapat dilakukan dengan baik dalam skala mikro maupun makro. Selain itu, alat yang digunakan tergolong sederhana (Khopkar, 2003).

Prinsip metode ini didasarkan pada distribusi zat terlarut dengan perbandingan tertentu antara dua pelarut yang tidak saling bercampur (Khopkar, 2003). Senyawa kimia akan terdistribusi dalam dua pelarut tergantung pada perbedaan koefisien partisinya. Teknik ini sangat efektif pada langkah awal pemisahan senyawa dari ekstrak bahan alam (Sarker *et al.*, 2006).

Kesempurnaan ekstraksi tergantung pada banyaknya ekstraksi yang dilakukan. Hasil yang baik diperoleh apabila jumlah ekstraksi yang dilakukan berulang-ulang dengan penambahan jumlah pelarut sedikit demi sedikit (Khopkar, 2003).

2.4 Radikal Bebas

Radikal bebas merupakan molekul atau fragmen molekul yang mengandung satu atau lebih elektron tidak berpasangan pada orbital atomnya. Elektron tidak berpasangan menyebabkan radikal bebas mempunyai reaktivitas tinggi (Valko *et al.*, 2007). Untuk mencapai kestabilan atom atau molekul radikal bebas akan bereaksi dengan molekul di sekitarnya untuk memperoleh pasangan elektron (Kohen dan Nyska, 2002). Radikal bebas oksigen lebih umum disebut *reactive oxygen species* (ROS) serta *reactive nitrogen species* (RNS) merupakan produk metabolisme seluler. ROS dan RNS keduanya dapat berperan ganda sebagai spesies yang merusak dan menguntungkan karena dapat membahayakan dan menguntungkan sistem kehidupan. Pada konsentrasi rendah atau sedang ROS dan RNS bermanfaat pada respon seluler dan fungsi imun sedangkan pada konsentrasi tinggi menyebabkan stres oksidatif yakni sebuah proses yang dapat merusak semua struktur sel. Stres oksidatif memainkan peranan utama dalam perkembangan penyakit kronis dan degeneratif seperti kanker, arthritis, penuaan, gangguan autoimun, kardiovaskular dan penyakit neurodegeneratif (Pham-Huy *et al.*, 2008).

Pembentukan ROS dan RNS dapat terjadi pada sel dengan dua cara, yaitu reaksi enzimatik dan non-enzimatik. Reaksi enzimatik yang menghasilkan radikal bebas misalnya pada rantai proses pernapasan, fagositosis, sintesis prostaglandin dan

sistem sitokrom P450. Reaksi non-enzimatis yang menghasilkan radikal bebas misalnya dari reaksi oksigen dengan senyawa organik dan yang diprakarsai oleh radiasi pengion. ROS dan RNS dapat berasal dari sumber endogen dan eksogen. Radikal bebas endogen dihasilkan dari aktivasi sel imun, inflamasi, stres mental, olahraga yang berlebihan, iskemia, kanker dan penuaan. Radikal bebas eksogen berasal dari polusi udara atau air, asap rokok, alkohol, logam berat (Cd, Hg, Pb, Fe, As), obat-obatan tertentu (*cylcosporine*, *tacrolimus*, *gentamycin*, *bleomycin*), pelarut industri, makanan tertentu dan radiasi (Pham-Huy *et al.*, 2008).

ROS memiliki beberapa macam bentuk seperti superoksida ($O_2^{\bullet-}$), peroksil (ROO^{\bullet}), alkoksil (RO^{\bullet}), hidroksil (HO^{\bullet}) dan hidroperoksil (HO_2^{\bullet}), sedangkan RNS seperti nitrit oksida (NO^{\bullet}) dan peroksinitrit ($ONOO^-$).

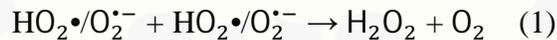
1. Radikal anion superoksida ($O_2^{\bullet-}$)

Anion superoksida baik karena proses metabolisme dan aktivasi oksigen melalui radiasi fisika merupakan ROS primer dan dapat bereaksi dengan molekul lainnya menghasilkan ROS sekunder. Produksi superoksida banyak terjadi dalam sel mitokondria. Reaksi transport elektron mitokondria merupakan sumber utama ATP dalam sel mamalia. Selama transduksi energi, sejumlah kecil elektron bocor ke oksigen sebelum waktunya membentuk radikal oksigen superoksida (Pham-Huy *et al.*, 2008).

Superoksida memiliki sifat yang berbeda tergantung pada lingkungan dan pH. Superoksida mempunyai pKa 4,8 sehingga dapat berada dalam bentuk anion superoksida ($O_2^{\bullet-}$) dan pada pH rendah dalam bentuk hidroperoksil (HO_2^{\bullet}). Hidroperoksil lebih mudah menembus membran biologis daripada bentuk bermuatan. Hidroperoksil merupakan spesies yang penting walaupun dalam pH fisiologis superoksida banyak dalam bentuk bermuatan. Pada lingkungan hidrofilik, keduanya dapat bertindak sebagai agen pereduksi, misalnya pada reduksi ion ferik (Fe^{+3}) menjadi ion feros (Fe^{+2}), namun kapasitas pereduksi hidroperoksil lebih besar. Pada

pelarut organik kelarutan anion superoksida lebih besar dan kemampuan mereduksi meningkat.

Anion superoksida juga beraksi sebagai nukleofil kuat yang dapat menyerang muatan positif dan sebagai agen pengoksidasi dapat bereaksi dengan senyawa pendonor H^+ . Reaksi terpenting radikal superoksida adalah dismutasi ditunjukkan pada reaksi 1. Dalam reaksi ini, superoksida bereaksi dengan superoksida lainnya, salah satu dioksidasi menjadi oksigen dan yang lain direduksi menjadi hidrogen peroksida (Kohen dan Nyska, 2002).



2. Hidrogen peroksida H_2O_2

Hidrogen peroksida adalah spesies reaktif non-radikal dan dapat dengan mudah berdifusi di antara sel hidup. H_2O_2 secara efisien diubah menjadi air dengan enzim katalase, proses yang menentukan waktu paronya (Diplock *et al.*, 1998).

3. Radikal hidroksil ($HO\bullet$)

Radikal hidroksil mempunyai reaktifitas paling tinggi, membuatnya menjadi radikal yang sangat berbahaya dengan waktu paruh *in vivo* sangat pendek sekitar 10^{-9} detik. Radikal $HO\bullet$ dapat terbentuk *in vivo* pada radiasi energi tinggi (misal: sinar X) dengan pemutusan homolitik molekul air atau H_2O_2 endogen pada reaksi yang dikatalis logam. Sinar UV tidak cukup energi untuk memecah molekul air namun dapat memecah H_2O_2 menjadi dua molekul radikal hidroksil (Diplock *et al.*, 1998).

4. Radikal peroksil ($ROO\bullet$)

Radikal peroksil mempunyai waktu paro yang relatif lama dengan jarak difusi yang besar pada sistem biologi. Radikal peroksil dapat dihasilkan dari proses peroksidasi lipid yang diinisiasi dari abstraksi atom H *polyunsaturated fatty acid* (PUFA), radikal hidroksil dapat memulai pemanjangan reaksi ini. Produk lebih lanjut yang dihasilkan dari peroksidasi lipid adalah radikal alkoksil ($RO\bullet$) dan hidroperoksida organik ($ROOH$) (Diplock *et al.*, 1998).

5. Molekul oksigen singlet ($^1\text{O}_2$)

Oksigen singlet adalah ROS non-radikal yang diduga terbentuk pada jaringan yang terpapar cahaya. Waktu paruhnya sekitar 10^{-6} detik tergantung sifat matriks di sekitarnya. Oksigen singlet dapat berinteraksi dengan molekul lain dengan mentransfer energi aktivasinya atau penggabungan secara kimia. Target utama untuk reaksi kimia adalah ikatan rangkap misalnya pada PUFA atau basa guanin DNA (Diplock *et al.*, 1998).

6. Radikal nitrit oksida ($\text{NO}\bullet$)

$\text{NO}\bullet$ adalah molekul kecil yang mengandung satu elektron tak berpasangan pada orbital *antibonding* π_y^* sehingga merupakan radikal. $\text{NO}\bullet$ dihasilkan pada jaringan biologis oleh *specific nitric oxide synthases* (NOSs), yang memetabolisme *arginine* menjadi *citrulline* dengan pembentukan $\text{NO}\bullet$ melalui lima reaksi oksidatif elektron. Nitrit oksida merupakan radikal reaktif yang berlimpah, yang bertindak sebagai molekul sinyal biologis dalam berbagai proses fisiologis, termasuk neurotransmisi, pengatur tekanan darah, mekanisme pertahanan, relaksasi otot polos dan pengaturan sistem imun. $\text{NO}\bullet$ memiliki waktu paruh hanya beberapa detik dalam lingkungan berair (>15 detik) dan mempunyai stabilitas lebih besar pada lingkungan dengan konsentrasi oksigen rendah. $\text{NO}\bullet$ bereaksi dengan oksigen dan air membentuk nitrat dan anion nitrit. Kelebihan produksi spesies nitrogen reaktif disebut stres nitrosatif. Stres nitrosatif dapat menyebabkan reaksi nitrosilasi yang dapat mengubah struktur dan menghambat fungsi normal protein. Sel sistem imun memproduksi nitrit oksida dan anion superoksida selama proses terjadinya inflamasi, nitrit oksida dan anion superoksida dapat bereaksi menghasilkan sejumlah besar molekul yang lebih oksidatif yakni anion peroksinitrit (ONOO^-) yang merupakan agen pengoksidasi kuat yang bisa menyebabkan fragmentasi DNA dan oksidasi lipid (Pham-Huy *et al.*, 2008).

2.5 Antioksidan

Antioksidan adalah suatu zat yang pada konsentrasi rendah dibandingkan substrat yang teroksidasi yang secara signifikan dapat menunda atau menghambat oksidasi substrat (Diplock *et al.*, 1998). Peran antioksidan adalah menetralkan kelebihan radikal bebas untuk melindungi sel terhadap efek toksik radikal dan berkontribusi dalam pencegahan penyakit (Pham-Huy *et al.*, 2008).

Antioksidan dapat berasal dari dalam tubuh (antioksidan endogen) dan dari luar berasal dari makanan (antioksidan eksogen). Antioksidan endogen dalam sel dapat diklasifikasikan sebagai antioksidan enzim dan antioksidan non-enzim. Antioksidan enzim utama yang terlibat langsung dalam netralisasi ROS dan RNS adalah superoksida dismutase (SOD), katalase (CAT), *glutathione peroxidase* (GPx) dan *glutathione reductase* (GRx). Antioksidan non-enzim dibagi menjadi antioksidan metabolik dan antioksidan gizi. Antioksidan metabolik termasuk antioksidan endogen yang diproduksi dalam tubuh seperti asam lemak, *glutathione*, *L-arginine*, koenzim Q10, melatonin, asam urat, bilirubin, protein pengkelat logam, *transferrin* dan sebagainya. Sedangkan antioksidan gizi termasuk antioksidan eksogen yaitu senyawa yang tidak dapat diproduksi dalam tubuh dan harus diberikan melalui makanan atau suplemen seperti vitamin E, vitamin C, karotenoid, *trace logam* (selenium, magnesium, seng), flavonoid, asam lemak omega-3, omega-6 dan lain-lain (Pham-Huy *et al.*, 2008).

Berdasarkan jenisnya, antioksidan dibagi menjadi dua golongan, yakni antioksidan sintetik yaitu antioksidan buatan manusia dan berguna untuk lemak, minyak, dan lipida yang terkandung di dalam makanan, misalnya BHA, BHT, propil galat, TBHQ dan antioksidan alami yaitu antioksidan yang berasal dari bagian-bagian tanaman dan berguna untuk mencegah oksidasi dan polimerisasi asam lemak tak jenuh (Widowati *et al.*, 2005). Antioksidan dari bahan sintetik dapat memberikan efek samping yang cukup berbahaya bagi kesehatan. Hasil penelitian menunjukkan bahwa antioksidan sintetik BHA dan BHT dapat meracuni binatang percobaan dan pada pemaparan yang lama dapat meningkatkan risiko karsinogenesis (Whysner *et*

al., 1994). Antioksidan tidak hanya digunakan dalam industri farmasi, tetapi juga digunakan secara luas dalam industri makanan, industri petroleum, industri karet dan sebagainya (Tahir *et al.*, 2003).

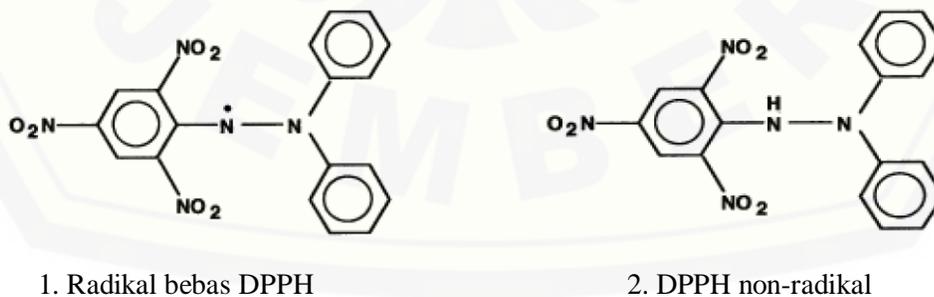
Komponen antioksidan yang terdapat pada tanaman seperti karotenoid, flavanoid, fenol dan *glucobrasicin* bermanfaat bagi kesehatan yang dapat berfungsi sebagai antioksidan (Arnao *et al.*, 1999).

2.6 Uji Aktivitas Antioksidan

Untuk menentukan aktivitas antioksidan *in vitro* dapat dilakukan dengan bermacam metode, antara lain:

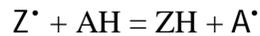
2.6.1 Metode DPPH (1,1-difenil-2-pikrilhidrazil)

Merupakan salah satu metode uji aktivitas antioksidan yang populer dengan menggunakan radikal bebas stabil DPPH. Molekul DPPH (1,1-difenil-2-pikrilhidrazil) mempunyai karakter sebagai radikal bebas yang stabil karena adanya delokalisasi elektron pada keseluruhan molekul, sehingga molekul tidak mengalami dimerisasi tidak seperti dengan radikal bebas lain (Molyeneux, 2004). Delokalisasi juga memberikan warna ungu, ditandai dengan serapan pita sekitar 520 nm (Molyeneux, 2004). Ketika larutan DPPH dicampur dengan substansi yang dapat mendonorkan atom hidrogen, akan menghasilkan bentuk tereduksi (non-radikal) (Gambar 2.2) ditandai dengan hilangnya warna ungu (Molyeneux, 2004).



Gambar 2.2. Rumus bangun DPPH radikal bebas (1) dan DPPH non-radikal (2) (Molyeneux, 2004).

Mekanisme reaksi yang terjadi antara radikal DPPH (Z^{\bullet}) dengan molekul donor (AH) digambarkan sebagai berikut:



Dimana ZH merupakan bentuk tereduksi DPPH (non radikal) dan A^{\bullet} adalah radikal baru yang dihasilkan dari reaksi ini. Radikal A^{\bullet} akan mengalami reaksi selanjutnya yang mengendalikan stoikiometri keseluruhan yaitu jumlah molekul DPPH yang tereduksi oleh molekul tersebut (Molyneux, 2004).

Metode DPPH secara luas digunakan untuk menguji aktivitas antioksidan ekstrak tumbuhan maupun senyawa fenol isolat. Metode DPPH memberikan repeatibilitas yang baik dan sering digunakan (Teow, 2005; Thaipong *et al.*, 2006). Namun, metode DPPH juga mempunyai kekurangan. Bondet *et al.* (1997) melaporkan bahwa banyak antioksidan fenol bereaksi lambat dengan DPPH, membutuhkan waktu 1 sampai 6 jam atau lebih. Selain itu, DPPH hanya bisa larut dalam pelarut organik dan pengaruh warna sampel pada DPPH menyebabkan penurunan aktivitas antioksidan (Arnao, 2000).

Salah satu parameter yang digunakan untuk interpretasi hasil dari metode DPPH adalah nilai EC_{50} (*efficient concentration*) penyebutan lainnya nilai IC_{50} (*inhibition concentration*) adalah konsentrasi substrat yang menyebabkan berkurangnya aktivitas DPPH sebanyak 50%, semakin kecil nilainya menunjukkan aktivitas antioksidan semakin besar (Molyneux, 2004). Menurut Blois (2003), tingkat kekuatan antioksidan adalah sangat kuat ($IC_{50} < 50 \mu\text{g/ml}$), kuat ($IC_{50} 50-100 \mu\text{g/ml}$), sedang ($IC_{50} 101-150 \mu\text{g/ml}$) dan lemah ($IC_{50} > 150 \mu\text{g/ml}$).

2.6.2 FRAP (Ferric Reducing Antioxidant Power)

Metode ini mengukur kapasitas antioksidan berdasarkan transfer elektron. Oksidan yang digunakan adalah probe terdiri dari garam besi, Fe(III) (TPTZ) (*2,4,6-tripyridyls-triazine*) (Teow, 2005). Metode ini mengukur kemampuan mereduksi *ferric 2,4,6-tripyridyl-s-triazine* (TPTZ) menjadi produk berwarna. Metode

mendeteksi senyawa dengan potensial redoks kurang dari 0,7 V (potensial redoks Fe^{3+} -TPTZ). Kekurangannya adalah hasil uji FRAP bisa sangat bervariasi tergantung pada skala waktu analisis, tidak relevan untuk mengukur aktivitas antioksidan secara mekanis dan fisiologis karena FRAP tidak mengukur antioksidan thiol seperti *glutathione*. Kelebihannya merupakan uji yang sederhana, cepat, murah, kuat dan tidak memerlukan peralatan khusus (Prior *et al.*, 2005).

2.6.3 Metode ABTS 2,2'-azinobis (3-ethylbenzthiazoline-6-sulfonic acid)

Metode ABTS menggunakan senyawa 2,2'-azobis (3-ethylbenzthiazoline-6-sulfonic acid) sebagai sumber penghasil radikal bebas. Metode ini mengukur kemampuan antioksidan untuk meredam ABTS^+ yang dihasilkan dalam fase air, hasilnya dibandingkan dengan pembanding trolox (analog vitamin E larut air). Dalam uji ini, kapasitas antioksidan diuji dengan mereaksikan senyawa uji dengan larutan ABTS yang menghasilkan penurunan warna larutan. ABTS^+ dihasilkan dengan mereaksikan garam ABTS dengan agen pengoksidasi kuat seperti potasium permanganat atau potasium persulfat. Penurunan warna hijau-biru radikal ABTS^+ karena donasi atom hidrogen diukur pada panjang gelombang karakteristik (Teow, 2005). Kelebihan metode ini adalah cepat, dapat dilakukan pada rentang pH yang luas serta dapat digunakan pada sistem larutan berbasis air maupun organik (Arnao *et al.*, 1999). Kekurangannya adalah reproduibilitasnya lebih jelek dibanding metode DPPH, ABTS perlu disimpan pada tempat gelap selama 12 jam untuk membentuk radikal bebas dari garam ABTS dan radikal ABTS tidak ditemukan dalam sistem fisiologis mamalia sehingga mempresentasikan sumber radikal non-fisiologis (Thaipong *et al.*, 2006; Prior *et al.*, 2005).

2.6.4 ORAC (Oxygen Radical Absorbance Capacity)

Metode ORAC menggunakan senyawa radikal peroksil yang dihasilkan melalui larutan cair dari 2,2'-azobis-2-metil-propanimidamida. Antioksidan akan

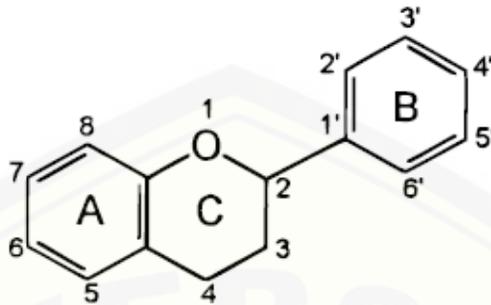
bereaksi dengan radikal peroksil dan menghambat degradasi pendaran zat warna. Kelebihan metode pengujian ORAC adalah kemampuannya dalam menguji antioksidan hipofilik dan lipofilik sehingga akan menghasilkan pengukuran lebih baik terhadap total aktivitas antioksidan (Teow, 2005). Kelemahan dari metode ini adalah membutuhkan peralatan yang mahal, waktu analisis yang lama (>1 jam), dan reproduisibilitasnya jelek karena reaksi ORAC sensitif dengan suhu (Thaipong *et al.*, 2005; Prior *et al.*, 2005).

2.6.5 Metode CUPRAC (*Cupric Reducing Antioxidant Capacity*)

CUPRAC merupakan variasi dari metode FRAP dengan mengganti Fe dengan Cu. Prinsip dari metode CUPRAC adalah berdasarkan reduksi Cu(II) menjadi Cu(I) oleh senyawa pereduksi pada sampel. Uji CUPRAC menggunakan reagen *neocuproine* (*2,9-dimethyl-1,10-phenanthroline*). Kelebihannya adalah lebih bagus dibanding FRAP karena Cu (tembaga) bisa menguji antioksidan thiol dan reaksinya lebih cepat dibanding Fe (besi), sedangkan kekurangannya adalah waktu reaksi lama minimal 30-60 menit (Prior *et al.*, 2005).

2.7 Flavonoid

Flavonoid adalah senyawa fenolik yang ditemukan banyak tumbuhan berpembuluh, lebih dari 8000 jenis senyawa telah diketahui. Flavonoid umumnya ditemukan pada tumbuhan dalam bentuk glikosida dan berfungsi memberikan warna pada daun, bunga dan buah. Banyak penelitian mengungkapkan flavonoid mempunyai aktivitas biologis diantaranya sebagai antialergen, antivirus, antiinflamasi, vasodilator dan yang terkenal sebagai antioksidan. Flavonoid terbentuk pada tumbuhan dari asam amino aromatik fenilalanin, tirosin dan malonat (Pietta, 2000). Struktur dasar flavonoid adalah inti flavan yang terdiri dari 15 atom karbon yang membentuk tiga cincin (C6-C3-C6), yang berlabel A, B C seperti Gambar 2.3.



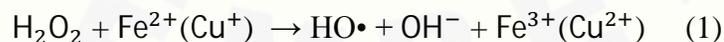
Gambar 2.3. Struktur dasar flavonoid (Pietta, 2000)

Kombinasi yang beragam pada rantai tiga karbon C3 yang menghubungkan dua cincin benzena struktur ini menjadi dasar pembagian golongan flavonoid menjadi flavonol, flavon, flavanon, flavanonol, katekin, antosianidin, leukoantosianidin, kalkon, dihidrokalkon, auron dan isoflavon (Robinson, 1995).

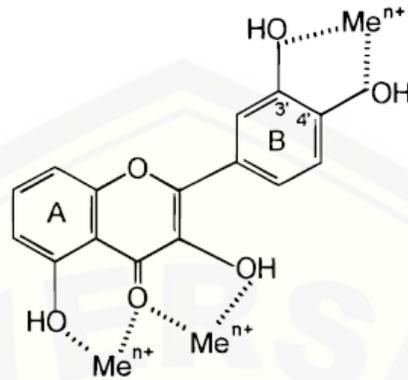
Menurut Pietta (2000), mekanisme aktivitas antioksidan flavonoid ada dua, yaitu:

1. Flavonoid menghambat enzim yang bertanggung jawab terhadap produksi anion superoksida, seperti *xanthine oxidase* dan protein kinase C. Flavonoid juga menghambat siklooksigenase, lipoksigenase, mikrosomal monoksigenase, *glutathione S-transferase*, *mitochondrial succinoxidase* dan NADH oksidase yang kesemuanya terlibat dalam pembentukan spesies oksigen reaktif.

Sejumlah flavonoid mengkelat *trace metal* secara efisien yang berperan penting dalam metabolisme oksigen. Besi dan tembaga bebas adalah peningkat efektif pembentukan spesies oksigen reaktif, misalnya pada reduksi hidrogen peroksida yang menghasilkan radikal bebas hidroksil yang sangat reaktif ditunjukkan reaksi (1), dan tembaga yang memediasi oksidasi LDL (LH) ditunjukkan reaksi (2).

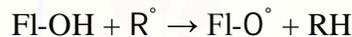


Tempat pengikatan *trace metal* pada flavonoid katekol adalah pada gugus 3'-hidroksil, 4'-hidroksil pada cincin B heterosiklik dan gugus 3-hidroksil, 4-oxo dan gugus 5-hidroksil pada cincin A seperti Gambar 2.4.

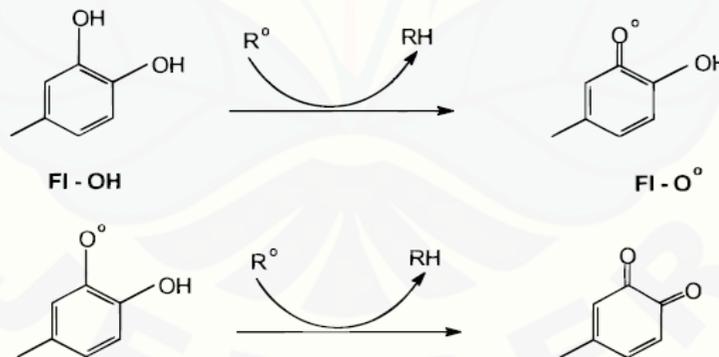


Gambar 2.4. Tempat pengikatan *trace metal* (Me^{n+}) pada flavonoid

2. Flavonoid mempunyai potensial redoks yang rendah ($0,23 < E_7 < 0,75 \text{ V}$) sehingga dapat secara termodinamika meredam oksidasi radikal bebas dengan potensial redoks sekitar 2,13-1,0 V, seperti radikal superoksida, peroksil, alkoksil dan hidroksil dengan mendonorkan atom hidrogen.



FL-OH adalah flavonoid, R° adalah radikal superoksida, peroksil, alkoksil dan hidroksil. Radikal aroksil Fl-O° dapat bereaksi dengan radikal aroksil kedua membentuk struktur stabil kuinon seperti Gambar 2.5.



Gambar 2.5. Peredaman ROS (R°) oleh flavonoid

Analisis flavonoid pada suatu sampel dapat dilakukan dengan berbagai metode, diantaranya metode kolorimetri, kromatografi lapis tipis, kromatografi gas, kromatografi gas-spektrofotometri masa dan kromatografi cair performa tinggi. Meskipun metode kromatografi dengan kombinasi analisis absorpsi spektra dan

spektrofotometri masa memberikan informasi pasti untuk analisis identifikasi dan kuantifikasi flavonoid, tetapi metode tersebut membutuhkan instrumen tertentu, standar yang autentik dan menghabiskan waktu. Berbeda dengan metode kolorimetri yang menarget struktur flavonoid adalah metode yang baik dan cocok untuk analisis rutin. Namun, metode kolorimetri tidak dapat mendeteksi semua jenis flavonoid, hanya untuk jenis flavon dan flavonol.

Metode kolorimetri untuk menentukan kadar flavonoid dalam tumbuhan dibagi menjadi dua macam. Metode pertama merupakan metode kolorimetri menggunakan aluminium klorida berdasarkan pada pembentukan kompleks antara Aluminium klorida dengan gugus keton C-4 dan gugus hidroksil C-3 atau C-5 kelompok flavon dan flavonol yang menghasilkan warna kuning, serta membentuk kompleks asam labil dengan gugus orto-dihidroksil dalam cincin A atau B flavonoid (Chang *et al.*, 2002). Metode kedua merupakan metode kolorimetri dengan DNP (*2,4-dinitrophenylhydrazine*). Prinsip metode ini adalah reagen *2,4-dinitrophenylhydrazine* yang bereaksi dengan karbonil keton dan aldehyd untuk *2,4-dinitrophenylhydrazone* sehingga menghasilkan warna merah (Chang *et al.*, 2002). Metode kolorimetri menggunakan Aluminium klorida dipilih karena sederhana, cepat, dan mudah dilakukan.

2.8 Spektrofotometri Ultraviolet dan Tampak (Visibel)

Spektrum tampak terdapat pada rentang panjang gelombang 400 nm (ungu) sampai 750 nm (merah), sedangkan spektrum ultraviolet terdapat pada rentang panjang gelombang 200 nm sampai 400 nm. Absorbansi cahaya ultraviolet atau cahaya tampak mengakibatkan suatu transisi elektronik yaitu promosi elektron-elektron dari orbital keadaan dasar yang berenergi rendah ke orbital keadaan tereksitasi yang berenergi lebih tinggi. Energi yang terserap selanjutnya terbuang sebagai kalor, sebagai cahaya, atau tersalurkan dalam reaksi kimia (Fessenden dan Fessenden, 1995).

Absorpsi energi direkam sebagai absorban. Absorban pada suatu panjang gelombang tertentu didefinisikan sebagai :

$$A = \log \frac{I^0}{I}$$

Dengan:

A = absorbansi

I^0 = Intensitas sinar yang datang

I = Intensitas sinar yang ditransmisikan

Absorban suatu senyawa pada suatu panjang gelombang tertentu bertambah dengan molekul yang mengalami transisi. Oleh karena itu absorban bergantung pada struktur elektronik senyawanya dan juga pada kepekatan sampel (Fessenden dan Fessenden, 1995).

Output dari spektrofotometri UV-Vis dapat berupa spektra UV-Vis yang dapat digunakan sebagai informasi kualitatif dan dapat digunakan untuk analisis kuantitatif. Dari aspek kualitatif spektroskopi UV-Vis menghasilkan data berupa panjang gelombang maksimal, intensitas, efek pH, dan pelarut yang kesemuanya dapat dibandingkan dengan data yang sudah dipublikasikan sebelumnya. Dari aspek kuantitatif suatu berkas radiasi dikenakan pada larutan sampel (cuplikan) yang akan diukur dan intensitas sinar radiasi yang diteruskan tersebut kemudian diukur besarnya. Intensitas atau kekuatan radiasi cahaya sebanding dengan jumlah foton melalui satu satuan luas penampang per detik (Gandjar dan Rohman, 2007).

BAB 3. METODE PENELITIAN

3.1 Jenis Penelitian

Uji aktivitas antioksidan ekstrak dan fraksi daun kenari (*C. indicum* L.) dengan metode DPPH ini adalah penelitian *experimental laboratories*.

3.2 Tempat dan Waktu Penelitian

Penelitian ini dilakukan mulai bulan Juli tahun 2014 sampai bulan Januari 2015 di Laboratorium Fitokimia Bagian Biologi Fakultas Farmasi dan Laboratorium Kimia Analisis Fakultas Farmasi Universitas Jember.

3.3 Variabel Penelitian

3.3.1 Variabel Bebas

Variabel bebas dalam penelitian ini adalah konsentrasi (% b/v) ekstrak dan fraksi daun kenari dalam pelarut etanol dan jenis pelarut untuk fraksinasi.

3.3.2 Variabel Tergantung

Variabel tergantung dalam penelitian ini adalah persen *inhibition concentration* (IC₅₀) ekstrak dan fraksi daun kenari serta kadar flavonoid total ekstrak dan fraksi daun kenari.

3.3.3 Variabel Terkendali

Variabel terkontrol dalam penelitian ini adalah lokasi pengambilan sampel, umur tanaman, cara pemanenan, metode ekstraksi, metode pengujian aktivitas antioksidan dan metode penetapan flavonoid total.

3.4 Definisi Operasional

Definisi operasional dari penelitian ini adalah:

- a. Daun kenari adalah daun kenari yang diperoleh dari Taman Nasional Meru Betiri Jember, daun kenari yang digunakan merupakan daun yang cukup umur. Daun yang diambil mulai daun deretan kelima dari pucuk sampai deretan ketiga dari pangkal. Daun yang masih muda dan berwarna hijau kekuningan serta daun yang sudah layu dan mengering tidak digunakan pada penelitian ini. Daun diambil dari pohon yang sudah besar dan berbunga penuh pada bulan Juli tahun 2014.
- b. Ekstrak etanol daun kenari adalah ekstrak yang diperoleh dari ekstraksi simplisia daun kenari dengan metode ultrasonikasi selama satu jam dengan pelarut etanol 96% pada suhu 45 °C.
- c. Fraksi ekstrak adalah fraksi n-heksana, fraksi etil asetat dan fraksi etanol-air yang diperoleh dari partisi (ekstraksi cair-cair) ekstrak etanol daun kenari yang dilarutkan dalam campuran pelarut etanol dan akuades hangat (1:1) menggunakan pelarut berturut-turut n-heksana dan etil asetat.
- d. *Inhibition concentration* (IC₅₀) adalah nilai konsentrasi ekstrak dan fraksi daun kenari yang mampu meredam 50% radikal DPPH.
- e. *Quercetine equivalent* (QE) merupakan kadar flavonoid total pada ekstrak dan fraksi daun kenari yang dinyatakan dengan massa (gram) ekuivalen kuersetin per massa (gram) ekstrak/fraksi

3.5 Bahan dan Alat yang Digunakan

3.5.1 Bahan Uji

Bahan yang digunakan dalam penelitian ini adalah daun tumbuhan kenari yang diperoleh dari Taman Nasional Meru Betiri Jember, bahan kimia yang digunakan adalah etil asetat, n-heksana dan etanol 96% teknis yang telah diredestilasi, etanol p.a (*pro analysis*) (Merck), akuades (Brataco Chemica), Wagner LP, Mayer LP, besi (III) klorida, serbuk magnesium, asam klorida, natrium klorida, asam sulfat,

aluminium klorida, potasium asetat, asam askorbat, DPPH (Sigma-Aldrich) dan kuersetin (Sigma-Aldrich).

3.5.2 Alat Uji

Alat-alat yang digunakan dalam penelitian ini adalah alat-alat gelas, neraca analitik, alat *ultrasonic* (Elmasonic S 180H), penangas air, mikropipet, corong Buchner, aluminium foil, kertas saring, kuvet, *rotary evaporator* (Heidolph) dan spektrofotometer (UV-Vis Hitachi U 1800).

3.6 Prosedur Penelitian

3.6.1 Preparasi Sampel

Sampel daun diambil dan dikumpulkan, daun yang digunakan adalah daun cukup umur. Selanjutnya daun-daun tersebut disortir dan dicuci, kemudian daun-daun tersebut diiris tipis-tipis. Selanjutnya irisan daun dikeringanginkan selama 3 hari pada suhu kamar terhindar dari cahaya matahari langsung dan dihaluskan.

3.6.2 Persiapan Ekstrak

Sebanyak 200 g serbuk daun kenari kering diultrasonikasi dalam 2000 ml etanol 96% selama 1 jam pada suhu 45 °C. Filtrat yang diperoleh dipekatkan dengan *rotary evaporator* sehingga diperoleh ekstrak pekat etanol (Oktavia, 2011).

3.6.3 Partisi/Fraksinasi

Ekstrak kental 15 g dilarutkan dalam 100 ml etanol pa dan ditambahkan 100 ml akuades hangat lalu dimasukkan ke dalam corong pisah, kemudian ditambah larutan n-heksana 200 ml, dikocok-kocok kuat dan didiamkan hingga terpisah sempurna. Fase n-heksana akan berada pada bagian atas dan fase etanol-air berada pada bagian bawah, kemudian dipisahkan. Fase etanol-airnya diekstraksi lagi dengan n-heksana sebanyak 2 kali. Fase etanol-air kemudian ditambahkan dengan etil asetat 200 ml, dikocok perlahan dan didiamkan hingga terpisah sempurna. Fase etil asetat

akan berada pada bagian atas dan fase etanol-air berada pada bagian bawah, kemudian dipisahkan. Fase etanol-airnya diekstraksi lagi dengan etil asetat sebanyak 2 kali. Kemudian masing-masing fraksi dipekatkan (Sarker *et al.*, 2006).

3.6.4 Penapisan Fitokimia Ekstrak

3.6.4.1 Identifikasi Alkaloid

Ekstrak sebanyak 0,3 gram ditambah 5 ml HCl 2 N, dipanaskan di atas penangas air selama 2-3 menit, sambil diaduk. Setelah dingin ditambah 0,3 gram NaCl, diaduk rata kemudian disaring. Filtrat yang diperoleh ditambah 5 ml HCl 2 N dan dibagi menjadi tiga bagian yang disebut sebagai larutan IA, IB dan IC. Larutan IA ditambah pereaksi Mayer, larutan IB ditambah dengan pereaksi wagner dan larutan IC dipakai sebagai blangko. Adanya kekeruhan atau endapan menunjukkan adanya alkaloid (Depkes RI, 1995a).

3.6.4.2 Identifikasi Saponin

Sebanyak 0,3 gram ekstrak dimasukkan ke dalam tabung reaksi, kemudian ditambahkan 10 ml air suling, dikocok kuat-kuat selama 30 detik. Tes buih positif mengandung saponin bila terjadi buih yang stabil selama lebih dari 30 menit dengan tinggi 3 cm di atas permukaan cairan (Depkes RI, 1995a).

3.6.4.3. Identifikasi Flavonoid

Sebanyak 2 mg ekstrak kental dilarutkan dalam 1 ml etanol (95%) P. Kemudian ditambahkan 0,1 gram serbuk magnesium P dan 10 tetes asam klorida pekat. Jika terjadi warna merah jingga sampai merah ungu menunjukkan adanya flavonoid. Jika warna kuning jingga menunjukkan adanya flavon, kalkon dan auron (Fansworth, 1996).

3.6.4.4. Identifikasi Polifenol dan Tanin

Sebanyak 0,3 gram ekstrak ditambah 10 ml akuades panas, diaduk dan dibiarkan sampai temperature kamar, lalu ditambahkan 3-4 tetes NaCl 10%, diaduk dan disaring. Filtrat dibagi menjadi tiga bagian masing-masing \pm 4 ml dan disebut sebagai larutan IA, IB dan IC (Depkes RI, 1995a).

- a. Larutan IC diberi beberapa tetes larutan FeCl_3 , kemudian diamati terjadi perubahan warna. Jika terjadi warna hijau kehitaman menunjukkan adanya senyawa polifenol.
- b. Larutan IA digunakan sebagai blangko, larutan IB ditambahkan dengan sedikit larutan gelatin dan 5 ml larutan NaCl 10%. Jika terjadi endapan putih menunjukkan adanya tanin.

3.6.4.5. Identifikasi Senyawa Steroid

Sebanyak 0,2 gram ekstrak dilarutkan dalam 10 ml etanol, lalu dibagi menjadi dua bagian masing-masing 5 ml, disebut sebagai larutan IA dan IB. Larutan IA digunakan sebagai blangko, sedangkan larutan IIB ditambah 1-2 ml H_2SO_4 pekat melalui dinding tabung reaksi. Adanya steroid tak jenuh ditandai dengan timbulnya cincin berwarna merah (Depkes RI, 1995a).

3.6.5. Pengujian Aktivitas Antioksidan dan Penetapan IC_{50} Fraksi

Pengujian aktivitas antioksidan dan penetapan IC_{50} fraksi dilakukan dengan menggunakan metode DPPH (2,2-difenil-1-pikrilhidrazil) secara spektrofotometri UV-Visibel.

3.6.5.1 Pembuatan larutan DPPH

Ditimbang sebanyak 10 mg DPPH dan dilarutkan dengan etanol dalam labu 10 ml sehingga diperoleh larutan dengan konsentrasi 1000 $\mu\text{g/ml}$. Kemudian dipipet 2 ml dilarutkan etanol hingga 50 ml sehingga diperoleh konsentrasi 0,004% atau

40 µg/ml atau 0,10 mM. Larutan dijaga pada suhu rendah, terlindung dari cahaya untuk segera digunakan.

3.6.5.2 Penentuan Panjang Gelombang Maksimum DPPH

Larutan DPPH 0,004% (40 µg/ml) ditentukan spektrum serapannya menggunakan spektrofotometer UV pada panjang gelombang 400 nm hingga 800 nm kemudian ditentukan panjang gelombang maksimumnya.

3.6.5.3 Pembuatan Larutan Kontrol

Pembuatan larutan kontrol dilakukan dengan cara etanol p.a dipipet sebanyak 200 µL kemudian dimasukkan ke dalam vial dan ditambahkan 800 µL larutan DPPH lalu dikocok sampai homogen dan diukur absorbansinya pada panjang gelombang maksimumnya.

3.6.5.4 Penentuan *Operating Time*

Larutan DPPH ditambahkan kedalam larutan ekstrak uji dan larutan vitamin C 30 µg/ml dan 7 µg/ml (Vit. C) (4:1), dihomogenkan, lalu diamati absorbansinya pada panjang gelombang maksimum DPPH, dengan interval waktu 5 menit hingga diperoleh absorbansi yang stabil yaitu tidak terlihat adanya penurunan absorbansi sampai waktu 60 menit (1 jam).

3.6.5.5 Pembuatan Larutan Uji Ekstrak dan Fraksi

Sebanyak 25 mg masing-masing ekstrak dan fraksi daun kenari dilarutkan dengan 10 ml etanol pa dalam labu ukur 10 ml sehingga diperoleh konsentrasi 2500 µg/ml (larutan induk). Kemudian dilakukan pengenceran dengan memipet 1,6 ml dari larutan induk masing-masing (kecuali fraksi n-heksana) dilarutkan etanol hingga 10 ml dalam labu ukur sehingga diperoleh konsentrasi 400 µg/ml. Kemudian dipipet 1; 0,75; 0,5 dan 0,25 ml larutan induk 400 µg/ml masing-masing ke dalam labu ukur 10,0 ml, ditambahkan etanol p.a hingga tanda batas sehingga diperoleh konsentrasi

10, 20, 30 dan 40 $\mu\text{g/ml}$. Larutan uji fraksi n-heksana dibuat dengan cara memipet 0,3; 0,4; 0,5 dan 0,6 dari larutan induk 2500 $\mu\text{g/ml}$ dilarutkan etanol hingga 10 ml dalam labu ukur sehingga diperoleh konsentrasi 75, 100, 125 dan 150 $\mu\text{g/ml}$.

3.6.5.6 Pembuatan Larutan Vitamin C sebagai Pembanding

a. Pembuatan larutan induk 1 vitamin C konsentrasi 2000 $\mu\text{g/ml}$

Sebanyak 20 mg vitamin C ditimbang dan dilarutkan dalam 10 ml etanol p.a kemudian dikocok hingga homogen.

b. Pembuatan larutan vitamin C konsentrasi 3, 5, 7 dan 9 $\mu\text{g/ml}$

Dipipet 0,2 ml larutan induk 1 masukkan ke dalam labu ukur 10,0 ml didapatkan konsentrasi 40 $\mu\text{g/ml}$ disebut larutan induk 2 vitamin C. Dipipet 0,75; 1,25; 1,75 dan 2,25 ml larutan induk 2 vitamin C masing-masing ke dalam labu ukur 10,0 ml, ditambahkan etanol p.a hingga tanda batas. Selanjutnya dipipet 200 μL masing-masing ke dalam 5 vial dan ditambahkan 800 μL larutan DPPH 0,004% dikocok hingga homogen kemudian diinkubasi pada suhu kamar pada *operating time*.

c. Serapan dari larutan tersebut diukur pada panjang gelombang maksimum DPPH.

3.6.5.7 Penentuan Aktivitas Antioksidan

Penentuan aktivitas antioksidan dilakukan berdasarkan metode Molyneux (2003) dengan modifikasi. Dipipet 800 μL larutan DPPH 0,004 % ditambah dengan 200 μL masing-masing larutan uji ekstrak dan fraksi konsentrasi 10, 20, 30 dan 40 $\mu\text{g/ml}$ (fraksi n-heksana: 75, 100, 125 dan 150 $\mu\text{g/ml}$). Campuran didiamkan selama waktu *operating time* yang telah diperoleh. Larutan ini kemudian diukur absorbansinya pada panjang gelombang maksimum DPPH. Blangko yang digunakan adalah larutan ekstrak dengan etanol 1:4 (200 μL ekstrak : 800 μL etanol). Sebagai kontrol digunakan larutan DPPH dengan etanol 4:1(800 μL DPPH : 200 μL etanol). Sebagai pembanding digunakan vitamin C konsentrasi 3, 5, 7 dan 9 $\mu\text{g/ml}$ dengan perlakuan yang sama dengan larutan uji.

3.6.5.8 Penentuan Persentase Peredaman

Persen peredaman dihitung menggunakan rumus :

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

Setelah didapatkan presentasi inhibisi dari masing-masing konsentrasi, kemudian ditentukan persamaan $y = bx + a$ dengan perhitungan secara regresi linear dimana x adalah konsentrasi ($\mu\text{g/ml}$) dan y adalah presentase inhibisi (%). Aktivitas antioksidan dinyatakan dengan *Inhibition Concentration 50%* (IC_{50}) yaitu konsentrasi sampel yang dapat meredam radikal DPPH sebanyak 50%. Nilai IC_{50} didapatkan dari nilai x setelah mengganti $y = 50$.

3.6.6 Analisis Kuantitatif Flavonoid Total (Chang *et al.*, 2002).

3.6.6.1 Pembuatan Kurva Kalibrasi Kuersetin

Larutan baku dibuat dengan menimbang 20 mg kuersetin, dilarutkan dengan etanol sampai 10 ml. Satu seri konsentrasi larutan kuersetin dalam etanol dibuat dari larutan baku, yaitu dengan konsentrasi: 5, 10, 15, 20 dan 25 $\mu\text{g/ml}$. Kemudian masing-masing dipipet 0,5 ml dilarutkan 1,5 mL etanol ditambahkan 0,1 mL AlCl_3 10% ditambahkan 0,1 mL potasium asetat 1M ditambahkan 2,8 mL akuades, didiamkan 30 menit diukur absorbansinya pada panjang gelombang 415 nm, blangko dibuat sama dengan larutan standar dengan mengganti AlCl_3 10% dengan akuades. Dari data ini persamaan regresi antara konsentrasi kuersetin dengan serapan dibuat.

3.6.6.2 Penentuan Kadar Flavonoid Total

Penentuan kadar flavonoid total dilakukan dengan spektrofotometri menggunakan reagen aluminium klorida sesuai prosedur Chang *et al.* (2002). Sebanyak 0,5 ml larutan ekstrak dengan konsentrasi 200 $\mu\text{g/ml}$ dilarutkan 1,5 mL etanol ditambahkan 0,1 mL AlCl_3 10% ditambahkan 0,1 mL potasium asetat 1M ditambahkan 2,8 mL akuades, didiamkan 30 menit diukur absorbansinya pada panjang gelombang 415 nm, blangko dibuat sama dengan larutan uji dengan mengganti AlCl_3

10% dengan akuades. Dibuat perhitungan rata-rata dua kali pengukuran dan kandungan flavonoid dinyatakan dengan kesetaraan pembanding baku kuersetin.

3.7 Analisis Data

Seluruh analisis dilakukan dua kali replikasi. Data ditunjukkan sebagai rata-rata \pm standar deviasi. Aktivitas antioksidan ditunjukkan dengan nilai IC_{50} yang diperoleh dari persamaan regresi konsentrasi larutan uji dengan persen peredaman DPPH. Nilai flavonoid total diperoleh dari substitusi nilai absorbansi sampel pada persamaan regresi kurva standar kuersetin dinyatakan dengan gram kuersetin ekuivalen tiap gram ekstrak sampel. Korelasi antara kadar flavonoid total dengan aktivitas antioksidan diperoleh dengan menggunakan persamaan regresi antara flavonoid total dengan nilai IC_{50} masing-masing sampel ekstrak.

BAB 4. HASIL PENELITIAN DAN PEMBAHASAN

4.1 Pembuatan Ekstrak Daun Kenari

Bahan tumbuhan yang digunakan dalam penelitian ini adalah daun kenari yang berasal dari Taman Nasional Merubetiri Jember. Daun kenari yang digunakan adalah daun yang berwarna hijau, daun yang masih muda dan kering tidak digunakan. Daun kenari yang telah dikeringkan kemudian dibuat serbuk dengan penggilingan untuk memperluas permukaan bahan agar pada tahap ekstraksi interaksi antara pelarut pengestraksi dan bahan yang diekstraksi menjadi lebih efektif (Harborne, 1996). Serbuk kering daun kenari sebanyak 200 g kemudian diultrasonikasi dengan 2000 ml etanol 96% selama satu jam pada suhu 45 °C, kemudian disaring dengan corong Buchner dan filtrat yang diperoleh dipekatkan dengan *rotary evaporator* sehingga diperoleh ekstrak kental etanol.

Metode ekstraksi ultrasonikasi digunakan karena ultrasonikasi memanfaatkan gelombang ultrasonik dengan frekuensi rendah 20-40 kHz yang menyebabkan proses kavitasi untuk membantu difusi pelarut ke dalam dinding sel tanaman sehingga proses perpindahan masa senyawa bioaktif dari dalam sel tanaman ke pelarut menjadi lebih cepat yang menyebabkan waktu ekstraksi lebih singkat (Ashley *et al.*, 2001). Etanol dipilih sebagai pelarut pengestraksi karena etanol merupakan pelarut universal dengan indeks polaritas 5,2 (Snyder *et al.*, 1997), sehingga berbagai senyawa baik polar maupun nonpolar seperti alkaloid, flavonoid, saponin, tanin, steroid dan terpenoid yang terkandung pada daun kenari dapat tertarik ke dalam pelarut serta toksisitasnya lebih rendah dibanding metanol (Tiwari *et al.*, 2011). Etanol dengan konsentrasi 96 % dengan 4 % air dipilih sebagai pelarut pengestraksi karena menghasilkan ekstrak yang mempunyai aktivitas antioksidan yang tinggi dibandingkan dengan menggunakan pelarut etanol 70 % maupun air (Elleanore, 2013).

Sebagian ekstrak kental etanol yang diperoleh kemudian difraksinasi. Prinsip metode ini didasarkan pada distribusi zat terlarut dengan perbandingan tertentu antara dua pelarut yang tidak saling bercampur (Khopkar, 2003). Sebanyak 15 g ekstrak etanol dilarutkan dengan campuran etanol dan air hangat (1:1) kemudian dilakukan pemisahan partisi (fraksinasi) menggunakan corong pisah dengan pelarut n-heksana dengan jumlah yang sama, setelah didiamkan akan terjadi dua fase, fase n-heksana akan berada di atas karena memiliki berat jenis lebih kecil yaitu 0,660 sedangkan fase etanol-air akan berada di bawah karena memiliki berat jenis lebih besar yaitu 0,996 (Depkes RI, 1995b). Kedua fase kemudian dipisahkan dan dilakukan fraksinasi ulang pada fase etanol-air sebanyak dua kali. Fase etanol-air kemudian difraksinasi lagi dengan pelarut etil asetat, akan terbentuk dua fase, fase etil asetat akan berada di atas karena memiliki berat jenis lebih kecil dari air yaitu 0,902 (Depkes RI, 1995b). Kedua fase kemudian dipisahkan dan dilakukan fraksinasi ulang pada fase etanol-air sebanyak dua kali. Masing-masing fraksi kemudian diuapkan dengan *rotary evaporator* sehingga diperoleh fraksi n-heksana, fraksi etil asetat dan fraksi etanol-air. Hasil rendemen masing-masing ekstrak dan fraksi dapat dilihat dalam Tabel 4.1.

Tabel 4.1 Data rendemen ekstrak dan fraksi daun kenari

Nama ekstrak/fraksi	Bobot ekstrak (g)	Rendemen ekstrak (%)
Ekstrak etanol 96 %	19,14	9,57
Fraksi n-heksana	0,86	5,733
Fraksi etil asetat	5,43	36,20
Fraksi etanol-air	12,18	81,20

Fraksinasi dalam penelitian ini menggunakan beberapa pelarut yang mempunyai kepolaran berbeda. N-heksana bersifat non-polar dengan tujuan untuk menghilangkan lemak dan mengekstraksi senyawa-senyawa yang bersifat non-polar seperti asam lemak, sterol, kumarin, dan beberapa terpenoid. Etil asetat dengan tingkat kepolaran menengah digunakan untuk mengekstraksi senyawa dengan polaritas menengah seperti flavonoid, tanin dan beberapa alkaloid. Pemilihan etil

asetat sebagai pelarut didasarkan pada asumsi bahwa etil asetat mampu menggabungkan gugus polar dan non-polar sehingga komponen pada ekstrak yang bersifat polar dan non-polar dapat terekstrak. Air merupakan pelarut yang bersifat polar digunakan untuk mengekstraksi senyawa yang bersifat polar seperti flavonoid, glikosida, tanin dan beberapa alkaloid (Sarker *et al*, 2006).

4.2 Penapisan Fitokimia

Analisis fitokimia adalah salah satu cara untuk mengetahui kandungan metabolit sekunder pada suatu tanaman. Senyawa-senyawa yang diperiksa keberadaannya adalah alkaloid, steroid, saponin, flavonoid, tanin dan senyawa fenolik. Penapisan dilakukan pada ekstrak etanol daun kenari. Hasil uji fitokimia ekstrak etanol kenari dapat dilihat pada Lampiran A dan Tabel 4.2.

Tabel 4.2. Hasil uji penapisan fitokimia ekstrak etanol daun kenari

Senyawa yang diuji	Pereaksi	Hasil	Keterangan
Alkaloid	Mayer, wagner	Tidak terbentuk endapan/kekeruhan	-
Steroid	H ₂ SO ₄	Tidak terbentuk cincin merah di permukaan	-
Saponin	Uji buih	Terbentuk buih yang stabil selama 30 menit	+
Flavonoid	Serbuk magnesium dan HCl pekat	Terbentuk warna merah ungu	+
Tanin	NaCl 10 %	Terbentuk endapan putih	+
Polifenol	FeCl ₃	Terbentuk warna hijau kehitaman	+

Berdasarkan hasil penapisan fitokimia pada ekstrak etanol daun kenari yang diperoleh, diketahui mempunyai banyak persamaan dengan kandungan fitokimia genus *Canarium* L. lainnya yakni mengandung flavonoid, polifenol, tanin, saponin dan sama-sama tidak terkandungnya senyawa alkaloid. Pada *C. schweinfurthii* (Atile) mengandung saponin, tanin, glikosida jantung, steroid dan flavonoid sedangkan alkaloid dan antrakuinon tidak ada (Ngbede *et al*, 2008). Pada *C. odontophyllum*

mengandung terpenoid, tanin, flavonoid, fenol dan saponin sedangkan alkaloid tidak ada (Basri dan Nor, 2014). Pada *C. album* mengandung flavonoid, triterpena dan seskuiaterpena (Mogana *et al.*, 2011). Semakin dekat hubungan kekerabatan (*taxa*) menghasilkan kandunga kimia yang lebih mirip (McNair, 1935).

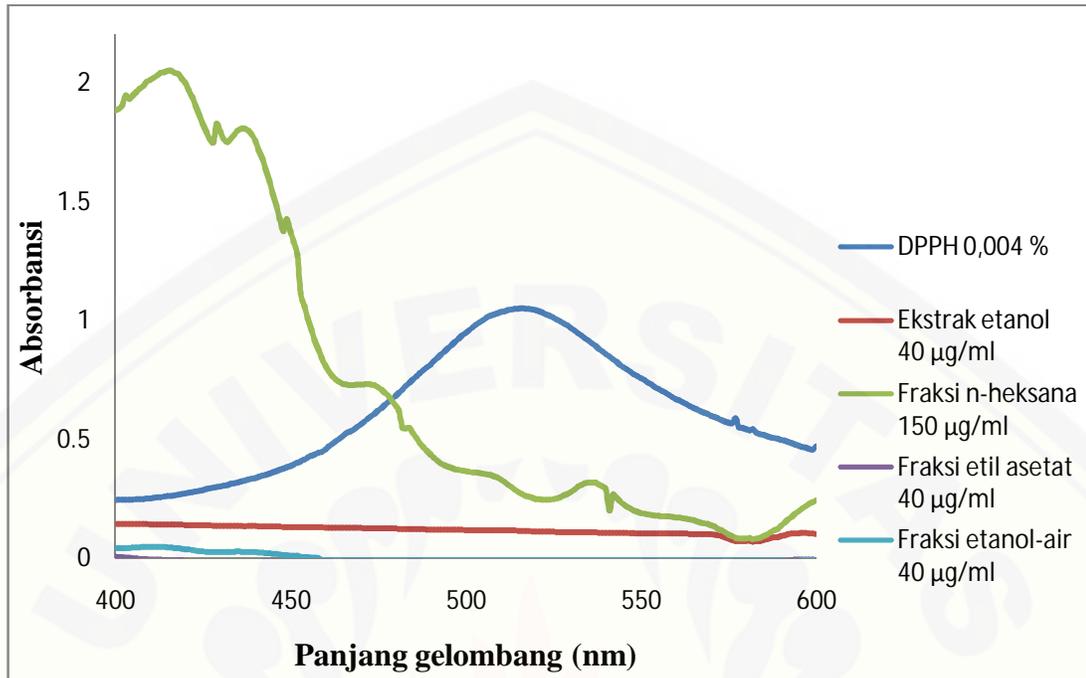
Terdapatnya senyawa tanin, polifenol dan flavonoid mendukung ekstrak daun kenari memiliki potensi sebagai sebagai antioksidan karena senyawa polifenol, flavonoid dan tanin dalam beberapa tanaman mempunyai korelasi yang signifikan dengan aktivitas antioksidan (Heim *et al.*, 2002; Robinson, 1995).

4.3 Uji Aktivitas Antioksidan

4.3.1 Optimasi Panjang Gelombang DPPH

Optimasi ini bertujuan untuk mencari panjang gelombang yang memberikan absorbansi DPPH maksimal. Pada penelitian ini, dilakukan pengamatan absorbansi larutan kontrol DPPH 0,004% dan larutan uji sampel konsentrasi tertinggi pada panjang gelombang 400-800 nm, seperti yang terlihat pada Gambar 4.1.

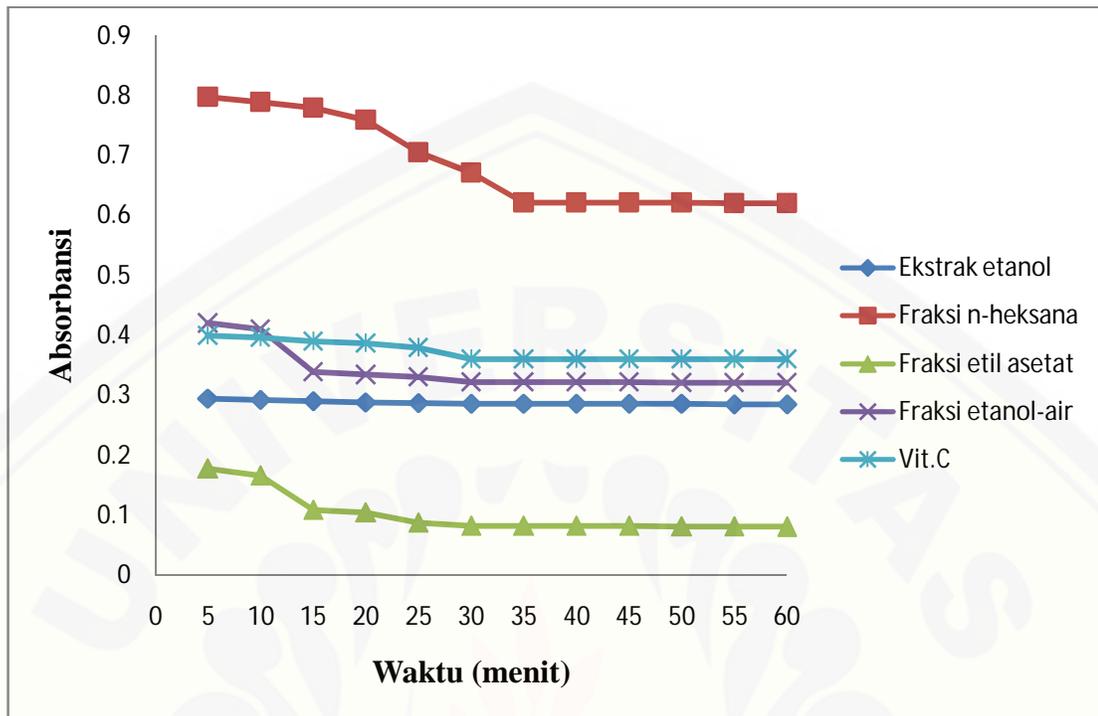
Hasil penelitian menunjukkan bahwa panjang gelombang maksimum larutan DPPH 0,004% adalah 516 nm. Berdasarkan hasil spektra sampel, diketahui bahwa pada panjang gelombang maksimum larutan DPPH 0,004% (516 nm) fraksi n-heksana dan ekstrak etanol memberikan nilai absorbansi sehingga pada pengukuran antioksidan penelitian ini digunakan blangko campuran ekstrak uji dengan etanol sebagai pengganti larutan DPPH untuk menghilangkan pengaruh absorbansi sampel. Data pengamatan panjang gelombang DPPH dan ekstrak uji dapat dilihat pada Lampiran C.



Gambar 4.1 Absorbansi DPPH dan sampel ekstrak pada panjang gelombang (λ) 400-600 nm

4.3.2 Penentuan Waktu Optimum

Pada tahap ini ditentukan waktu optimum inkubasi sampel dengan larutan DPPH untuk bereaksi sempurna. Sampel ekstrak dan fraksi serta pembanding vitamin C direaksikan dengan larutan DPPH dan diamati absorbansinya pada panjang gelombang 516 nm mulai menit ke 0 sampai menit ke 60 dengan selang waktu 5 menit. Waktu reaksi dikatakan optimum jika reaksi terjadi sampai membentuk plateau (Molyneux, 2004). Nilai waktu optimum inkubasi selama 30 menit merupakan waktu yang sering digunakan dalam mereaksikan DPPH (Molyneux, 2004). Hasil penelitian menunjukkan bahwa pada menit ke-30, absorbansi larutan uji ekstrak etanol, fraksi etil asetat, fraksi etanol-air dan vitamin C relatif konstan, sedangkan fraksi n-heksana absorbansinya konstan pada menit ke-35 sehingga pada uji aktivitas antioksidan semua sampel selanjutnya dilakukan pada menit ke-30 dan menit ke-35 untuk fraksi n-heksana (Gambar 4.2).



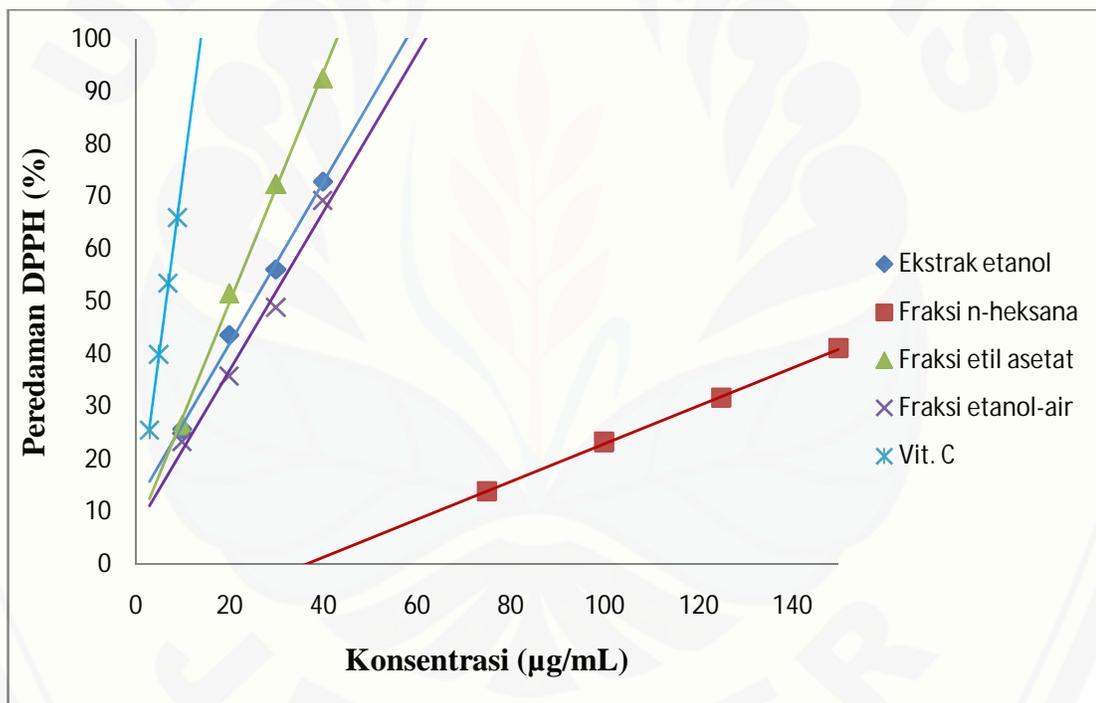
Gambar 4.2 Absorbansi rata-rata larutan DPPH 0,004 % dengan penambahan larutan uji mulai menit ke 5 hingga ke 60

4.3.3 Pengukuran Aktivitas Antioksidan

Pengujian aktivitas antioksidan ekstrak dilakukan dengan menggunakan metode DPPH. Metode DPPH dipilih karena sederhana, mudah, cepat, peka, reproduibel dan hanya memerlukan sedikit sampel (Blois, 2003). Prinsip dari metode DPPH adalah senyawa antioksidan akan mendonorkan atom hidrogennya pada radikal DPPH sehingga akan menyebabkan DPPH menjadi bentuk tereduksi yang bersifat non-radikal. DPPH dalam bentuk non-radikal akan kehilangan warna ungunya yang mana pemudaran warna ini dapat ditunjukkan dengan penurunan serapan dari DPPH pada panjang gelombang maksimum yang diukur menggunakan spektrofotometer UV-Vis (Molyeneux, 2004). Pengukuran penurunan serapan DPPH pada larutan uji dihitung terhadap serapan kontrol yakni larutan DPPH dengan pelarut tanpa sampel. Digunakan blangko berupa larutan uji ekstrak ditambahkan etanol

pengganti larutan DPPH untuk menghilangkan pengaruh absorbansi sampel pada setiap pengukuran sampel uji.

Berdasarkan data penurunan absorbansi DPPH pada larutan uji, dapat dihitung peredaman DPPH (%) seperti yang terlihat pada Lampiran G. Setelah itu, diperoleh hubungan antara konsentrasi larutan uji dan persen peredaman DPPH. Hasil regresi linier menunjukkan adanya korelasi yang baik antara konsentrasi larutan uji dengan % peredaman DPPH. Hal ini ditunjukkan dengan nilai r yang mendekati 1 dan semua nilai r hitung sampel uji $>$ r tabel dengan signifikansi 0,05 yakni 0,950 yang berarti semakin besar konsentrasi larutan uji, semakin besar pula persen peredamannya seperti yang terlihat pada Lampiran H dan Gambar 4.3.



Gambar 4.3 Hubungan konsentrasi dengan persen peredaman DPPH (rata-rata \pm SD) ekstrak dan fraksi daun kenari

Untuk menyatakan aktivitas antioksidan ekstrak daun kenari, digunakan nilai IC_{50} sebagai parameter karena IC_{50} menunjukkan nilai konsentrasi yang mampu meredam 50 % radikal bebas DPPH (Molyneux, 2004). Nilai IC_{50} diperoleh dari

mensubstitusi nilai y dari persamaan regresi linear antara konsentrasi larutan uji dengan persen peredaman DPPH dengan nilai 50, sehingga diperoleh nilai x (IC_{50}). Semakin kecil IC_{50} , maka semakin besar daya peredamannya. Menurut Blois (2003), tingkat kekuatan antioksidan adalah sangat kuat ($IC_{50} < 50 \mu\text{g/ml}$), kuat ($IC_{50} 50\text{-}100 \mu\text{g/ml}$), sedang ($IC_{50} 101\text{-}150 \mu\text{g/ml}$), lemah ($IC_{50} > 150 \mu\text{g/ml}$). Berdasarkan hasil penelitian, diperoleh IC_{50} seperti yang terlihat pada Tabel 4.3.

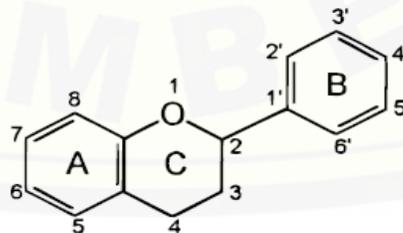
Tabel 4.3 Nilai IC_{50} ekstrak dan fraksi daun kenari

Sampel	Replikasi	Persamaan regresi	IC_{50} ($\mu\text{g/ml}$) rata-rata \pm SD
Ekstrak etanol	1	$y = 1,540x + 10,987$ $r^2 = 0,996; r = 0,998$	25,294 \pm 0,055
	2	$y = 1,537x + 11,184$ $r^2 = 0,996; r = 0,998$	
Fraksi n-heksana	1	$y = 0,358x - 12,864$ $r^2 = 0,999; r = 0,999$	175,245 \pm 0,499
	2	$y = 0,362x - 13,311$ $r^2 = 0,999; r = 0,999$	
Fraksi etil asetat	1	$y = 2,193x + 5,829$ $r^2 = 0,997; r = 0,998$	20,135 \pm 0,009
	2	$y = 2,185x + 6,018$ $r^2 = 0,997; r = 0,998$	
Fraksi etanol-air	1	$y = 1,503x + 6,660$ $r^2 = 0,983; r = 0,991$	28,806 \pm 0,042
	2	$y = 1,515x + 6,375$ $r^2 = 0,985; r = 0,992$	
Vit. C	1	$y = 6,749x + 5,620$ $r^2 = 0,999; r = 0,999$	6,564 \pm 0,016
	2	$y = 6,744x + 5,815$ $r^2 = 0,999; r = 0,999$	

Berdasarkan hasil penelitian menunjukkan bahwa secara umum keempat ekstrak mempunyai aktivitas antioksidan, meskipun fraksi n-heksana memiliki IC_{50} di atas $150 \mu\text{g/ml}$. Ekstrak etanol, fraksi etanol-air dan fraksi etil asetat mempunyai aktivitas yang sangat kuat sebagai antioksidan dengan IC_{50} masing-masing 25,294 $\mu\text{g/ml}$, 28,806 $\mu\text{g/ml}$ dan 20,135 $\mu\text{g/ml}$. Aktivitas terkuat dimiliki oleh fraksi etil

asetat, kemudian ekstrak etanol, fraksi etanol-air dan fraksi n-heksana dengan aktivitas terendah. Bila keempat ekstrak tersebut dibandingkan dengan kontrol positif vitamin C, IC_{50} vitamin C lebih kecil daripada keempat ekstrak tersebut. Hal ini disebabkan karena vitamin C yang digunakan merupakan senyawa murni yang terbukti mempunyai aktivitas antioksidan bila dibandingkan dengan ekstrak yang terdiri dari berbagai komponen.

Menurut Khokhar dan Apenten (2003), kemungkinan aktivitas antioksidan dipengaruhi oleh kehadiran gugus hidroksil (OH). Aktivitas antioksidan juga sangat tergantung pada jumlah dan konfigurasi gugus OH yang ada pada suatu molekul (Heim *et al.*, 2002). Flavonoid merupakan senyawa golongan fenolik yang mempunyai aktivitas sebagai antioksidan (Pietta, 2000). Keberadaan gugus hidroksil pada senyawa fenol dan flavonoid menimbulkan aktivitas antioksidan (Egwaikhide dan Gimba, 2007). Hal ini dapat disebabkan karena atom oksigen pada gugus hidroksil mempunyai pasangan elektron bebas yang cukup untuk menghambat reaktivitas atom reaktif penyusun senyawa radikal bebas (Egwaikhide dan Gimba, 2007). Flavonoid akan memberikan aktivitas antioksidan jika gugus OH pada posisi orto C 3',4', OH pada C-3, fungsi okso pada C-4, ikatan rangkap C-2 dengan C-3. Gugus OH pada posisi orto C 3',4' (cincin B) mempunyai pengaruh terbesar terhadap aktivitas antioksidan flavonoid. Flavonoid yang memiliki gugus OH pada C-3 dan ikatan rangkap C-2 dengan C-3 memiliki aktivitas antioksidan lebih tinggi dibandingkan dengan flavonoid yang hanya memiliki gugus OH pada C-3 serta flavonoid aglikon akan memiliki aktivitas antioksidan lebih tinggi dibandingkan dengan flavonoid glikosida (Heim *et al.*, 2002).



Gambar 4.4. Struktur dasar flavonoid (Heim *et al.*, 2002)

Berdasarkan hasil penelitian, diketahui fraksi etil asetat memberikan aktivitas antioksidan paling kuat, dengan IC_{50} sebesar 20,135 $\mu\text{g/ml}$ sehingga diperlukan penelitian lebih lanjut untuk mengetahui senyawa mana yang memberikan aktivitas antioksidan pada fraksi etil asetat, misalnya dengan cara menggunakan metode pemisahan kromatografi kolom kemudian menguji aktivitas antioksidan setiap fraksi yang dihasilkan. Fraksi teraktif dapat dikarakterisasi senyawa apa yang dikandungnya. Hasil penelitian menunjukkan bahwa fraksi etil asetat mempunyai aktivitas antioksidan yang sangat kuat dengan IC_{50} sebesar 20,135 $\mu\text{g/ml}$, sehingga perlu dilakukan pengembangan formulasi yang tepat agar dapat dimanfaatkan secara optimal sesuai tujuan penelitian untuk mencari bahan alam yang berpotensi sebagai sumber antioksidan. Perlu juga dilakukan uji aktivitas antioksidan pada daun spesies genus *Canarium* L. lainnya yang belum pernah dilakukan karena kemungkinan juga berpotensi memiliki aktivitas antioksidan karena semakin dekat hubungan kekerabatan (*taxa*) menghasilkan kandungan kimia yang lebih mirip, termasuk senyawa yang mempunyai aktivitas sebagai antioksidan (McNair, 1935).

4.4 Penetapan Kadar Flavonoid Total

Pada penetapan kadar flavonoid total, masing-masing ekstrak dan fraksi daun kenari direaksikan dengan AlCl_3 dan potasium asetat sehingga larutan berwarna kuning. Hal ini disebabkan pembentukan kompleks asam yang stabil dengan gugus keton pada C-4 atau gugus hidroksil pada C-3 atau C-5 dari flavon dan flavonol, sehingga terbentuk larutan kuning (Chang *et al.*, 2002). Kandungan flavonoid total dinyatakan dalam masa ekuivalen kuersetin tiap gram ekstrak. Hasil pengukuran flavonoid total dapat dilihat pada Lampiran I. Dari data tersebut, dibuat kurva kalibrasi kuersetin yang menghasilkan persamaan $y = 0,006x - 0,054$ ($r = 0,993$; $r^2 = 0,986$), dengan y merupakan nilai absorbansi dan x merupakan kadar kuersetin. Dari persamaan kurva kalibrasi didapat nilai $r = 0,993$ yang lebih besar dari nilai r tabel dengan signifikansi 0,05 yaitu 0,878 sehingga ada korelasi bermakna antara absorbansi

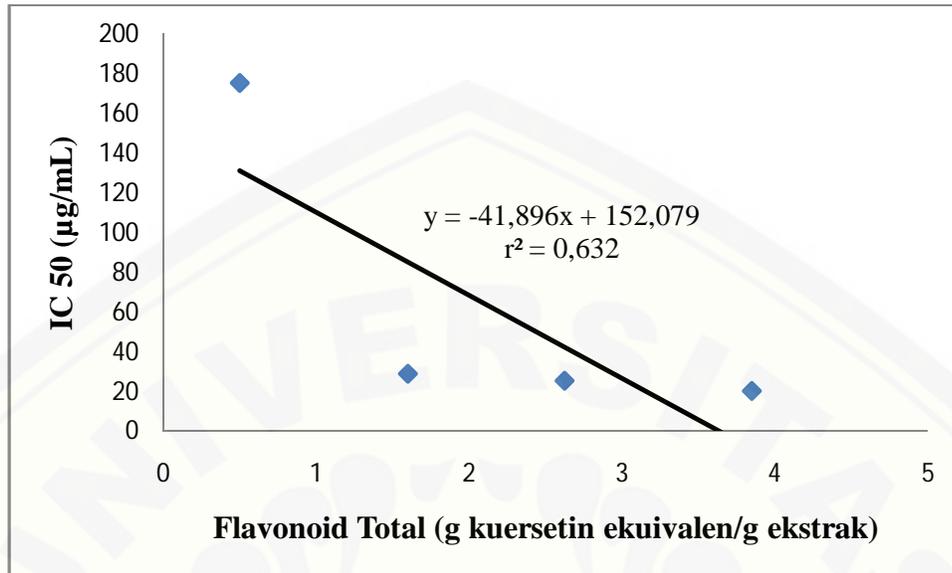
dengan konsentrasi dan persamaan regresi tersebut dapat digunakan (Gandjar dan Rohman, 2007). Kemudian ditentukan kadar flavonoid total dengan memasukkan nilai absorbansi sampel pada persamaan kurva. Hasilnya dapat dilihat pada Tabel 4.4.

Tabel 4.4. Hasil penetapan kadar flavonoid total ekstrak daun kenari

Sampel	Kadar g QE/g ekstrak \pm SD
Ekstrak etanol	2,624 \pm 0,012
Fraksi n-hesana	0,499 \pm 0,023
Fraksi etil asetat	3,846 \pm 0,006
Fraksi etanol-air	1,596 \pm 0,006

Berdasarkan hasil penetapan kadar flavonoid total sampel, diketahui fraksi etil asetat memiliki kadar flavonoid total tertinggi, kemudian ekstrak etanol, fraksi etanol-air dan fraksi n-heksana mempunyai kadar flavonoid total terendah. Diduga hasil ini mempengaruhi besar aktivitas antioksidan yang dihasilkan yang menunjukkan aktivitas antioksidan terbesar dimiliki fraksi etil asetat, kemudian ekstrak etanol, fraksi etanol-air dan fraksi n-heksana mempunyai aktivitas terendah. Diduga bahwa senyawa-senyawa yang berperan sebagai antioksidan dalam tanaman ini adalah flavonoid yang bersifat semi polar sehingga cenderung berada dalam etil asetat, seperti katekin dan proantosianidin (Robinson, 1995). Jumlah gugus hidroksil dan jenis substituen pada struktur flavonoid yang mempengaruhi kelarutannya, semakin banyak gugus hidroksil yang dimiliki menyebabkan semakin besar kelarutannya dalam air, begitu pula sebaliknya semakin sedikit gugus hidroksil dan semakin banyak substituen yang bersifat kurang polar seperti gugus metoksi menyebabkan kelarutan flavonoid menurun (Akowuah *et al.*, 2005).

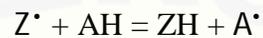
Nilai kadar flavonoid total masing-masing sampel yang telah ditentukan, dikorelasikan terhadap nilai IC_{50} masing-masing sampel dengan menggunakan persamaan regresi linier untuk mengetahui korelasi antara keduanya. Berdasarkan hasil korelasi, diperoleh persamaan regresi linier seperti pada Gambar 4.4.



Gambar 4.4. Korelasi linier antara aktivitas antioksidan IC_{50} (y) dan kadar flavonoid total (x) ekstrak dan fraksi daun kenari

Berdasarkan hasil dari regresi linier diketahui korelasi antara IC_{50} (y) dan kadar flavonoid total (x) ekstrak dan fraksi daun kenari yang mempunyai koefisien korelasi $r^2 = 0,632$ ($y = -41,896 + 152,079$). Hal ini menunjukkan bahwa 63,2 % aktivitas antioksidan dari ekstrak dan fraksi daun kenari karena kontribusi kehadiran senyawa flavonoid. Juga dapat disimpulkan bahwa aktivitas antioksidan ekstrak dan fraksi daun kenari tidak hanya karena adanya senyawa flavonoid, aktivitas antioksidan juga dapat berasal dari adanya metabolit sekunder yang bersifat antioksidan seperti minyak volatil, karotenoid dan vitamin, sehingga 36,8 % aktivitas antioksidan yang dihasilkan ekstrak dan fraksi daun kenari dipengaruhi kehadiran senyawa selain flavonoid (Javanmardi *et al.*, 2003). Kandungan senyawa polifenol, tanin dan saponin yang diketahui melalui penapisan fitokimia pada daun kenari juga berkontribusi pada aktivitas antioksidan yang dihasilkan karena telah diketahui senyawa polifenol, tanin dan saponin mempunyai aktivitas antioksidan (Heim *et al.*, 2002; Robinson, 1995).

Flavonoid, polifenol, tanin dan saponin yang terkandung dalam daun kenari pada penelitian ini mempunyai aktivitas antioksidan karena dapat mendonorkan atom hidrogen pada radikal DPPH. Menurut Molyneux (2004), ketika larutan DPPH dicampur dengan substansi yang dapat mendonorkan atom hidrogen, DPPH akan menjadi bentuk tereduksi ditandai dengan perubahan warna ungu DPPH. DPPH digambarkan dengan Z^{\bullet} dan molekul yang dapat mendonorkan atom H dengan AH, reaksi yang terjadi adalah:



Dimana ZH merupakan bentuk tereduksi DPPH (non radikal) dan A^{\bullet} adalah radikal baru yang dihasilkan dari reaksi ini. Radikal A^{\bullet} akan mengalami reaksi selanjutnya yang mengendalikan stoikiometri keseluruhan yaitu jumlah molekul DPPH yang tereduksi oleh molekul tersebut (Molyneux, 2004).

BAB 5. KESIMPULAN DAN SARAN

5.1 Kesimpulan

Berdasarkan penelitian yang telah dilakukan dapat diambil kesimpulan sebagai berikut:

- a. Ekstrak etanol daun kenari mengandung senyawa flavonoid, polifenol, tanin dan saponin serta tidak mengandung senyawa alkaloid dan steroid.
- b. Ekstrak etanol, fraksi n-heksana, fraksi etil asetat, dan fraksi etanol-air daun kenari memiliki aktivitas antioksidan dengan IC_{50} berturut turut $25,294 \pm 0,055$; $175,245 \pm 0,4999$; $20,135 \pm 0,009$ dan $28,806 \pm 0,0424$ $\mu\text{g/ml}$.
- c. Kandungan flavonoid total ekstrak dan fraksi daun kenari yang dinyatakan dengan massa ekuivalen kuersetin, keempat ekstraknya yakni ekstrak etanol, fraksi n-heksan, fraksi etil asetat, dan fraksi etanol-air masing-masing memiliki kadar sebesar $2,624 \pm 0,012$; $0,499 \pm 0,023$; $3,846 \pm 0,006$ dan $1,596 \pm 0,006$ gram ekuivalen kuersetin per gram ekstrak, korelasi aktivitas antioksidan dengan kadar flavonoid ekstrak dan fraksi daun kenari diperoleh nilai $r^2 = 0,632$.

5.2 Saran

Berdasarkan penelitian yang telah dilakukan, penulis menyarankan:

- a. Perlu dilakukan pemurnian fraksi etil asetat dari ekstrak etanol daun kenari dengan metode pemisahan yang sesuai untuk mengetahui senyawa murni yang berperan sebagai antioksidan.
- b. Perlu dilakukan pengembangan formulasi yang tepat dari fraksi etil asetat ekstrak etanol daun kenari.
- c. Perlu dilakukan uji aktivitas antioksidan pada daun spesies genus *Canarium* lainnya yang belum pernah dilakukan.

DAFTAR PUSTAKA

- Akowuah, G.A., Ismail, Z., Norhayati, I., & Sadikin, A. 2005. The Effect of Different Extraction Solvents of Varying Polarities on Polyphenols of *Orthosiphon stamineus* and Evaluation of Free Radical-Scavenging Activity. *Food Chemistry*. Vol. **93**: 311.
- Arnao, M.B. 2000. Some Methodological Problems in The Determination of Antioxidant Activity Using Chromogen Radicals: A Practical Case. *Trends Food Sci.Technol.* Vol. **11**: 419-421.
- Arnao, M.B., Cano, A. & Acosta, M. 1999. Method to Measure The Antioxidant Activity in Plant Material. A Comparative Discussion. *Free Radical Res.* Vol. **31**: 89- 96.
- Ashley, K., Andrews, R.N., Cavazos, L., & Demange, M. 2001. Ultrasonic Extraction as a Sampel Preparation Technique for Elemental Analysis by Atomic Spectrometry. *Journal of Analytic Spectrometry.* Vol. **16**: 1147-1153.
- Basri, D.F. & Nor, N.H.M. 2014. Phytoconstituent Srceening and Antibacterial Activity of the Leaf Extracts from *Canarium odontophyllum* Miq. *American Journal of Plant Science.* Vol. **5**: 2878-2888.
- Blois, MS. 1958. Antioxidant Determinations by The Use of A Stable Free Radical. *Nature.* Vol. **181**: 1199-1200.
- Chang, C.C., Yang, M.H., Wen, H.M., & Chern, J.C. 2002. Estimation of Total Flavonoid Content in Propolis by Two Complementary Colorimetric Methods *Journal of Food and Drug Analysis.* Vol. **10**: 178-182.
- Departemen Kesehatan Republik Indonesia. 1995a. *Materia Medika Indonesia Jilid VI.* Jakarta: Departemen Kesehatan Republik Indonesia.
- Departemen Kesehatan Republik Indonesia. 1995b. *Farmakope Indonesia Edisi VI.* Jakarta: Departemen Kesehatan Republik Indonesia.
- Departemen Kesehatan Republik Indonesia. 2000. *Parameter Standar Umum Ekstrak Tumbuhan Obat Cetakan Pertama.* Jakarta: Departemen Kesehatan Republik Indonesia.

- Diplock, A.T., Charleux, J.L., Willi, G.C., Kok, F.J., Evans, C.R., Roberfroid, M., Stahl, W., & Ribes, J.V. 1998. Functional Food Science and Defence Against Reactive Oxidative Species. *Suppl.* Vol. **1**: 77-112.
- Djarkasi, G.S.S., Nurali, E.J.N., Sumual, M.F., & Luluhan, L.E. 2011, Analysis of Bioactive Compound C. Nut (*C. indicum* L). Skripsi. Universitas Sam Ratulangi in cooperation with USAID – Texas A&M University.
- Donald, R.B. & Cristobal, M. 2006. Antioxidant Activities of Flavonoids. *J. Agric.* Vol. **52**: 125-757.
- Droge, W. 2002. Free Radicals in The Physiological Control of Cell Function. *Physiol. Rev.* Vol. **82**: 47-95.
- Egwaikhide, P.A & Gimba, C.E. 2007. Analysis of the Phytochemical Content and Anti-microbial Activity of *Plectranthus glandulosus* Whole Plant. *Middle-East Journal of Scientific Research.* Vol **2** (3-4):135-138.
- Elleanore, Y. 2013. Analisis Fitokimia dan Aktivitas Antioksidan Ekstrak Daun Sengon (*Paraserianthes falcataria* (L) Nielsen) Menggunakan Metode DPPH. Skripsi. Bogor: Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam IPB.
- Evans, B. 1994. *Overview of resource potential for indigenous nut production* dalam South Pacific Indigenous Nuts. Edited by Steven, M.L., R.M. Bourke, and B.R. Evans. Canberra: ACAR.
- Fansworth, N.R. 1996. Biological and Phytochemical Screening of Plants. *Journal of Pharmaceutical Science.* Vol. **55** (3): 257-259.
- Fessenden, R.J. & Fessenden, J.S. 1995. *Kimia Organik, Jilid II*, diterjemahkan oleh Pudjaatmaka, A.H., edisi ke 3. Jakarta: Erlangga.
- Gandjar, I. G. & Rohman, A. 2007. *Kimia Farmasi Analisis*. Yogyakarta: Pustaka Pelajar.
- Handa, S.S., Khanuja, S.P.S., Longo G., & Rakes, D.D. 2008. *Extraction Technologies for Medicinal and Aromatic Plants*. Trieste: International Centre for Sciences and High Technology.
- Harborne, J.B. 1996. *Metode Fitokimia: Penentuan Cara Modern Menganalisis Tumbuhan*, penerjemah Padmawinata, K., Soediro, I. Bandung: ITB Press.

- Hariyatmi. 2004. Kemampuan Vitamin E Sebagai Antioksidan Terhadap Radikal Bebas Pada Lanjut Usia. *MIPA*. Vol. **14** (1): 52-60.
- Heim, K.E., Tagliaferro, A.R., & Bobilya, D.J. 2002. Flavonoid Antioxidants: Chemistry, Metabolism and Structure-Activity Relationships. *Journal of Nutritional Biochemistry*. Vol. **13**: 572 -584.
- Javanmardi, J., Stushnoff, C., Locke, E., & Vivanco, J.M. 2003. Antioxidant Activity and Total Phenolic Content of Iranian Ocimum accessions. *Food Chemistry*. Vol. **83**: 547-550.
- Kardinan, A. & Kusuma, F.R. 2004. *Meniran: Penambah Daya Tahan Tubuh Alami*. Jakarta: Agromedia Pustaka.
- Kennedy, J. & Clarke, W. 2004. *Cultivated Landscapes of the Southwest Pasific*. Canberra: Resource Management in Asia-Pasific Program.
- Khokhar, S.M. & Apenten, O.R.K. 2003. Iron Binding Characteristics of Phenolic Compounds: Some Tentative Structure-Activity Relations. *Food Chemistry*. Vol. **81** (1): 133-140.
- Khopkar, S.M. 2003. *Konsep Dasar Kimia Analitik*. Jakarta: UI Press.
- Kohen, R. & Nyska, A. 2002. Invited Review: Oxidation of Biological Systems: Oxidative Stress Phenomena, Antioxidants, Redox Reactions, and Methods for Their Quantification. *Toxicol Pathol*. Vol. **30**: 620.
- Leakey, R., Fuller, S., Treloar, T., Stevenson, L., Hunter, D., Nevenimo, T., Binifa, J., & Moxon, J. 2008. Characterization of Tree-to-Tree Variation in Morphological, Nutritional and Medicinal Properties of *Canarium indicum* Nuts. *Agroforest Syst*. Vol. **73**: 77-87.
- Leenhout, P.W. 1959. Revision of the the Burseraceae of the Malaysian Area in Woder Sense. *C. Stickm. Blumea*. Vol. **9** (2): 275-647.
- Lim, T.K. 2012. *Edible Medicinal and Non-medicinal Plants Volume 1, Fruits*. New York: Springer Science+Business Media.
- Limbono, S. 2013. Daya Antioksidan Ekstrak Etanol Biji Kenari (*Canarium indicum* L.) dengan Metode DPPH (1,1-diphenyl-2-picrylhydrazyl). *Calyptra: Jurnal Ilmiah Mahasiswa Universitas Surabaya*. Vol. **2** (2).

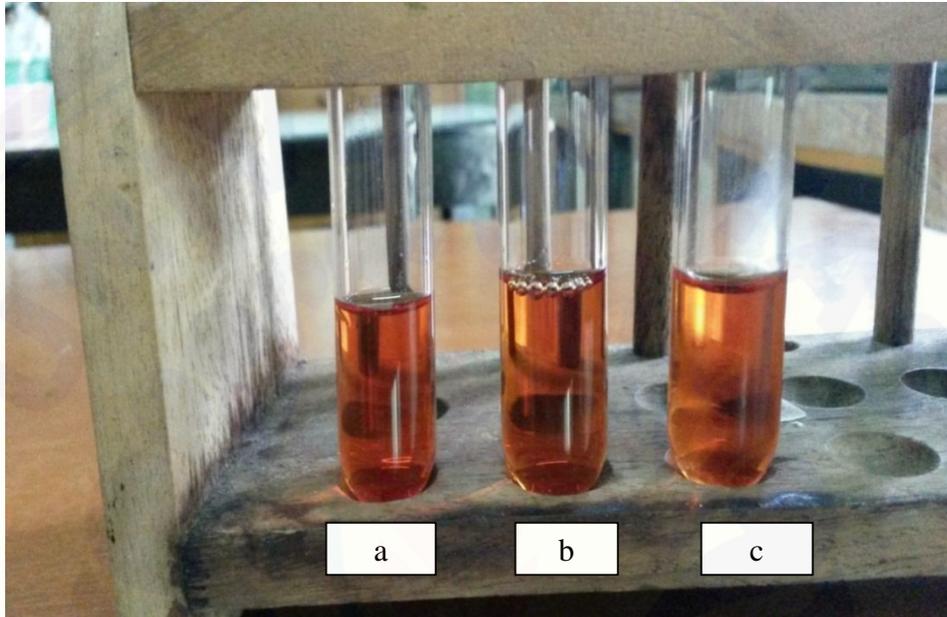
- Maestro, Y., Saintingny, G., & Bernard, F.X. 2009. *Cosmetic Use of An Active Agent Capable of Stimulating Tensin 1 Expression*. Alexandria: United States Patent Application Publication.
- Markham, K.R. 1988. *Cara Mengidentifikasi Flavonoid* (Terjemahan). Bandung : ITB.
- McNair, J.B. 1935. Angiosperm Phylogeny on Chemical Basis. *Bull Torrey Bot.Club*. Vol. **62**: 515-32.
- Mogana, R., Jin, K.T., & Wiart, C. 2011. In Vitro Antimicrobial, Antioxidant Activities and Phytochemical Analysis of *Canarium patentinervium* Miq. From Malaysia. *Biotechnology Research International*. Vol. **2011**.
- Molyneux, P. 2003. The Use of the Stable Free Radical Diphenylpicrylhydrazyl (DPPH) for Estimating Antioxidant Activity. *Songklanakarini J. Sci. Technol*. Vol. **26** (2): 211-219.
- Ngbede, J., Yakbu, R.A., & Nyam, D.A. 2008. Phytochemical Screening for Active Compound in *Canarium shweinfurthii* (Atile) Leaves from Jos North, Plateau State, Nigeria. *Research Journal of Biological Science*. Vol. **3** (9): 1076-1078.
- Nikhal, S.B., Dambe, P.A., Ghongade, D.B., & Goupale, D.C. 2010. Hydroalcoholic Extraction of *Mangifera Indica* (Leaves) by Soxhletion. *International Journal of Pharmaceutical Science*. Vol. **2** (1): 30-32.
- Oktavia, J.D. 2011. Pengoptimuman Ekstraksi Flavonoid Daun Salam (*Syzgium polyanthum*) dan Analisis Sidik Jari dengan Kromatografi Lapis Tipis. Skripsi. Bogor: Fakultas MIPA IPB.
- Orwa, C., Mutua, A., Kindt, R., Jamnadass, R., & Anthony, S. 2009. *Agroforestry Database: A Tree Reference and Selection Guide Version 4.0*. [serial on line]. <http://www.worldagroforestry.org/sites/treadbs/treedatabase.asp> [15 Mei 2014].
- Pham-Huy, L.A., He, H., & Pham-Huy, C. 2008. Free Radicals, Antioxidants in Disease and Health. *International Journal of Biomedical Science*. Vol. **4** (2): 89-96.
- Pietta, P.G. 2000. Flavonoids and Antioxidant. *J. Nat. Prod*. Vol. **63**: 1035-1042.
- Prior, R.L., Wu, X., & Schaich, K. 2005. Standardized Methods for Determination of Antioxidant Capacity and Phenolics in Foods and Dietary Supplements. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. Vol. **53**: 4290-4302.

- Quattrocchi, U. 2012. *CRC World Dictionary of Medicinal and Poisonous Plants: Common names, Scientific names, Eponyms, Synonyms, and Etymology*. Boca Raton: CRC Press.
- Robinson, T. 1995. *Kandungan Organik Tumbuhan Tinggi* (Penerjemah Kosasih Padmawinata). Bandung: ITB.
- Sarker, D., Latif Z., Gray, I., & Alexander. 2006. *Natural Product Isolation*. New Jersey: Humana Press.
- Sasikumar, J.M., Maheshu, V., & Jayadev, R. 2009. In Vitro Antioxidant Activity of Methanolic Extracts of Berberis Tinctoria Lesch. Root and Root Bark. *Journal of Herbal and Toxicology*. Vol. 3 (2): 53-58.
- Snyder, C.R., Kirkland, J.J., & Glajach, J.L. 1997. *Practical HPLC Method Development, Second Edition*. New York: John Wiley and Sons.
- Stuessy, T.F. 1989. *Plant Taxonomy. The Systematic Evaluation of Comparative Data*. New York: Columbia University Press.
- Tahir, I., Wijaya, K., & Widyaningsih, D. 2003. *Terapan Analisis Hansch Untuk Aktivitas Antioksidan Senyawa Turunan Flavon/Flavonol. Seminar on Chemometrics*. Yogyakarta: Departemen Kimia Universitas Gadjah Mada.
- Teow, C.C. 2005. Antioxidant Activity and Bioactive Compounds of Sweetptatoes. Thesis. Raleigh: Food Science Faculty of North Carolina State Unversity.
- Thaipong, K., Boonprakob, U., Crosby, K., Cisneroz-Zevallos, L., & Byrne, H, D. 2006. Comparison of ABTS, FRAP, and ORAC Assays for Estimating Antioxidant Activity from Guajava Fruit Extracts. *J. of Food and Analysis*. Vol. 19: 669-675.
- Thang, T.D., Dai, D.N., Luong, N.X., & Ogunwande, I.A. 2014. Constituents of Essential Oils from the Leaves, Stem barks and Resins of *Canarium parvum* Leen., and *Canarium trandenanum* Dai et Yakovl. (Burseraceae) Grown in Vietnam. *Natural Product Research: Formerly Natural Product Letters*. Vol. 28 (7): 461-466.
- Thang, T.D., Luu, H.V., & Dung, N.X. 2004. Chemical Composition of the Leaf Oil of *Canarium bengalense* Roxb. from Vietnam. *J Essent Oil Bear Plants*. Vol. 7 (1): 43-48.

- Thomson, L.A.J & Evans, B. 2006. *C. indicum* var. *indicum* and *C. harveyi* (C. nut), ver 2.1. *Species Profiles for Pacific Island Agroforestry*. [serial on line]. [www.agroforestry.org/images/pdfs/Canarium canariumnut.pdf](http://www.agroforestry.org/images/pdfs/Canarium_canariumnut.pdf). [14 Mei 2014].
- Tiwari, P., Kumar, B., Kaur, M., & Kaur, H. 2011. Phytochemical Screening and Extraction: A Review. *Int. Pharm. Sci.* Vol. 1: 1-9.
- United States Department of Agriculture. 2014. *Canarium indicum* L. [serial on line]. <http://plants.usda.gov/core/profile?symbol=CAIN42> [14 Mei 2014].
- Valko, M., Leibfritz, D., Moncol, J., Cronin, M.T.D., Mazur, M., & Telser, J. 2007. Review Free Radical Antioxidants in Normal Physiological Functions and Human Disease. *The International Journal of Biochemistry & Cell Biology*. Vol. 39: 44-84.
- Whysner, J., Wang, C.X., Zang, E., Iatropoulos, M.J., & Williams, G.M. 1994. Dose Response of Promotion by Butylated Hydroxyanisole in Chemically Initiated Tumours of the Rat Forestomach. *Fd Chem. Toxic.* Vol. 32 (3): 215-222.
- Widowati, W., Safitri, R., Rumumpuk, R., & Siahaan, M. 2005. Penapisan Aktivitas Superoksida Dismutase pada Berbagai Tanaman. *Universitas Kristen Maranatha Bandung, MKU, Universitas Padjadjaran Bandung, Fakultas MIPA, Universitas Negeri Manado, Fakultas MIPA Universitas Advent Indonesia Bandung, Fakultas MIPA*. Vol. 5 (1): 33-48.
- Winarsi, H. 2007. *Antioksidan Alami dan Radikal Bebas*. Yogyakarta: Kanisius.
- Yen, D.E. 1994. *Melanesian Arboriculture: Historical Perspective with Emphasis on Genus C.* dalam South Pacific Indigenous Nuts. Edited by Steven, M.L., R.M. Bourke, and B.R. Evans. Canberra: ACIAR.
- Zhang, L.L., & Lin, Y.M. 2008. Tanins from *Canarium album* with Potent Antioxidant Activity. *Journal of Zhejiang University SCIENCE B*. Vol. 9 (5): 407-415.

LAMPIRAN A. HASIL PENAPISAN FITOKIMIA EKSTRAK ETANOL DAUN KENARI

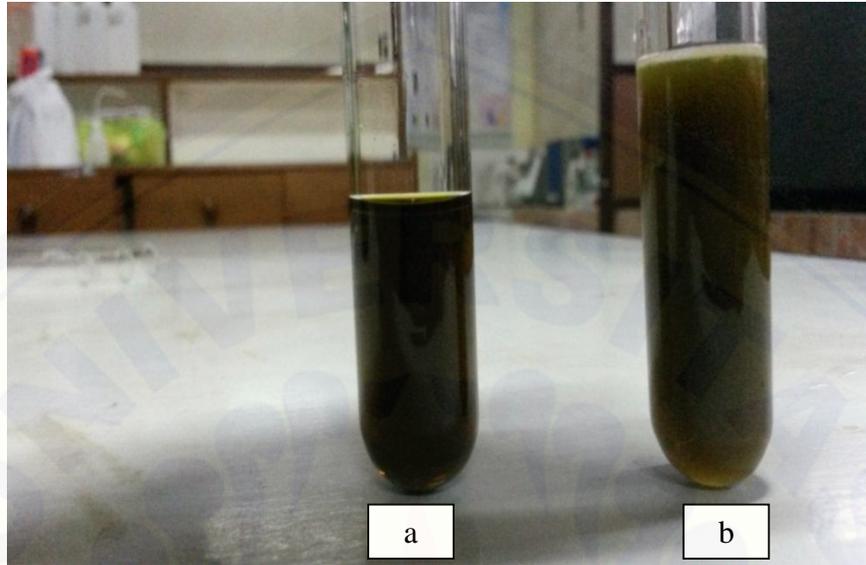
A1. UJI ALKALOID



Keterangan :

- a. Blangko larutan ekstrak etanol daun kenari tanpa pereaksi
- b. Ekstrak etanol dengan pereaksi mayer hasil negatif alkaloid (tidak ada endapan/kekeruhan)
- c. Ekstrak etanol dengan pereaksi wagner hasil negatif alkaloid (tidak ada endapan/kekeruhan)

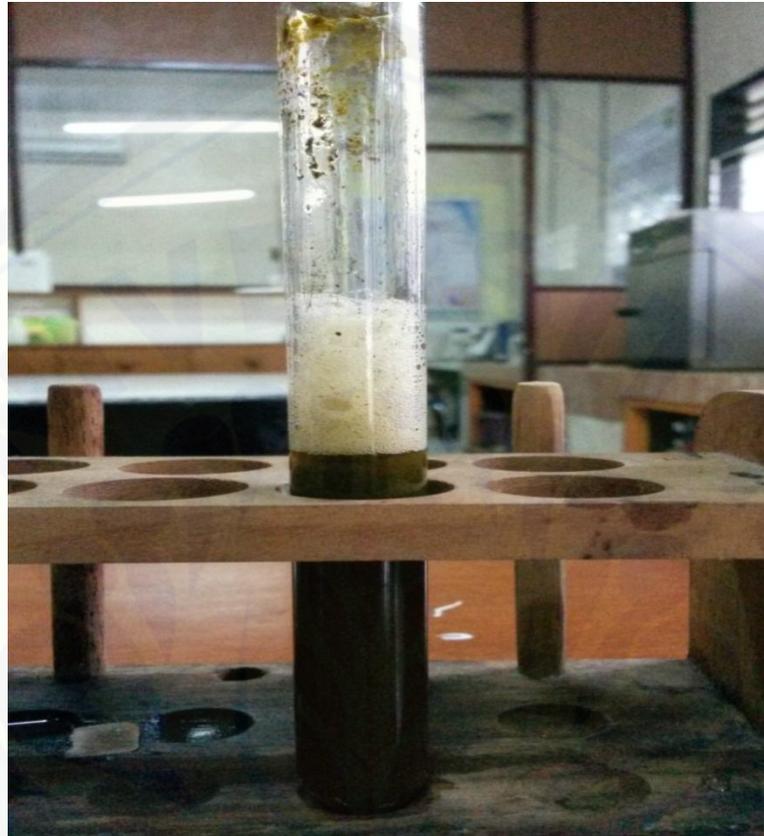
A2. UJI STEROID



Keterangan :

- a. Blangko larutan ekstrak etanol daun kenari tanpa pereaksi
- b. Larutan ekstrak dengan pereaksi H_2SO_4 pekat hasil negatif steroid

A3. UJI SAPONIN



Keterangan :

Ekstrak mengandung saponin ditandai dengan buih yang stabil lebih dari 30 menit.

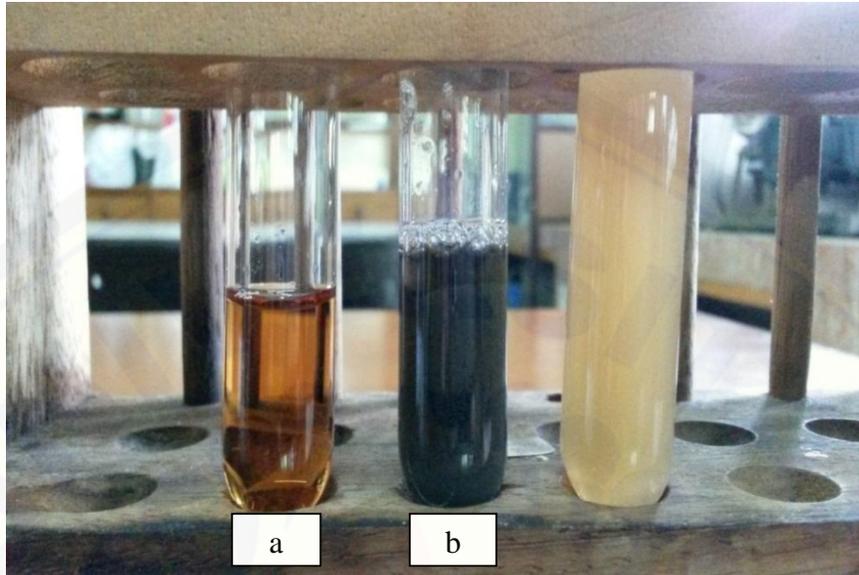
A4. UJI FLAVONOID



Keterangan :

Ekstrak dalam pelarut etanol dengan penambahan serbuk magnesium dan asam klorida pekat hasil positif flavonoid ditandai terjadinya warna merah ungu.

A5. UJI POLIFENOL DAN TANIN



Keterangan :

- a. Blangko larutan ekstrak etanol daun kenari tanpa pereaksi
- b. Larutan uji dengan pereaksi FeCl_3 hasil positif polifenol (warna hijau kehitaman)
- c. Larutan uji dengan pereaksi NaCl 10 % hasil positif tanin (endapan putih)

LAMPIRAN B. PENGAMATAN ABSORBANSI DPPH 0,004 %

ALL Data							
WL(nm)	ABS	WL(nm)	ABS	WL(nm)	ABS	WL(nm)	ABS
600.0	0.471	599.5	0.461	599.0	0.458	598.5	0.460
598.0	0.462	597.5	0.464	597.0	0.465	596.5	0.467
596.0	0.469	595.5	0.471	595.0	0.473	594.5	0.476
594.0	0.479	593.5	0.482	593.0	0.484	592.5	0.487
592.0	0.489	591.5	0.492	591.0	0.495	590.5	0.497
590.0	0.499	589.5	0.501	589.0	0.503	588.5	0.504
588.0	0.506	587.5	0.508	587.0	0.510	586.5	0.512
586.0	0.514	585.5	0.516	585.0	0.519	584.5	0.521
584.0	0.523	583.5	0.525	583.0	0.528	582.5	0.531
582.0	0.533	581.5	0.535	581.0	0.537	580.5	0.540
580.0	0.543	579.5	0.545	579.0	0.548	578.5	0.551
578.0	0.553	577.5	0.556	577.0	0.559	576.5	0.562
576.0	0.565	575.5	0.567	575.0	0.571	574.5	0.573
574.0	0.576	573.5	0.579	573.0	0.582	572.5	0.585
572.0	0.589	571.5	0.592	571.0	0.595	570.5	0.598
570.0	0.601	569.5	0.604	569.0	0.607	568.5	0.610
568.0	0.613	567.5	0.616	567.0	0.619	566.5	0.623
566.0	0.626	565.5	0.629	565.0	0.633	564.5	0.636
564.0	0.640	563.5	0.644	563.0	0.648	562.5	0.652
562.0	0.656	561.5	0.660	561.0	0.663	560.5	0.667
560.0	0.670	559.5	0.674	559.0	0.678	558.5	0.682
558.0	0.687	557.5	0.691	557.0	0.695	556.5	0.699
556.0	0.703	555.5	0.707	555.0	0.712	554.5	0.716
554.0	0.720	553.5	0.725	553.0	0.730	552.5	0.734
552.0	0.739	551.5	0.744	551.0	0.749	550.5	0.753
550.0	0.758	549.5	0.763	549.0	0.767	548.5	0.771
548.0	0.775	547.5	0.780	547.0	0.784	546.5	0.789
546.0	0.794	545.5	0.799	545.0	0.804	544.5	0.810
544.0	0.815	543.5	0.820	543.0	0.826	542.5	0.832
542.0	0.837	541.5	0.843	541.0	0.848	540.5	0.853
540.0	0.859	539.5	0.865	539.0	0.870	538.5	0.876
538.0	0.882	537.5	0.888	537.0	0.894	536.5	0.899
536.0	0.904	535.5	0.910	535.0	0.915	534.5	0.920
534.0	0.926	533.5	0.932	533.0	0.937	532.5	0.943
532.0	0.948	531.5	0.954	531.0	0.959	530.5	0.964
530.0	0.969	529.5	0.975	529.0	0.979	528.5	0.983
528.0	0.987	527.5	0.991	527.0	0.996	526.5	1.000
526.0	1.005	525.5	1.009	525.0	1.013	524.5	1.016
524.0	1.020	523.5	1.023	523.0	1.026	522.5	1.030
522.0	1.033	521.5	1.035	521.0	1.038	520.5	1.041
520.0	1.043	519.5	1.044	519.0	1.046	518.5	1.048
518.0	1.049	517.5	1.050	517.0	1.050	516.5	1.051
516.0	1.051	515.5	1.051	515.0	1.051	514.5	1.051
514.0	1.050	513.5	1.049	513.0	1.048	512.5	1.046
512.0	1.045	511.5	1.042	511.0	1.040	510.5	1.038
510.0	1.035	509.5	1.033	509.0	1.030	508.5	1.028
508.0	1.025	507.5	1.022	507.0	1.019	506.5	1.015
506.0	1.011	505.5	1.007	505.0	1.002	504.5	0.998
504.0	0.993	503.5	0.989	503.0	0.983	502.5	0.977
502.0	0.971	501.5	0.966	501.0	0.959	500.5	0.955
500.0	0.949	499.5	0.943	499.0	0.937	498.5	0.930
498.0	0.924	497.5	0.917	497.0	0.911	496.5	0.905
496.0	0.898	495.5	0.891	495.0	0.884	494.5	0.877
494.0	0.870	493.5	0.864	493.0	0.857	492.5	0.850
492.0	0.843	491.5	0.836	491.0	0.829	490.5	0.822
490.0	0.815	489.5	0.809	489.0	0.803	488.5	0.798
488.0	0.792	487.5	0.786	487.0	0.780	486.5	0.772
486.0	0.766	485.5	0.759	485.0	0.753	484.5	0.746
484.0	0.739	483.5	0.732	483.0	0.725	482.5	0.717
482.0	0.710	481.5	0.704	481.0	0.697	480.5	0.691
480.0	0.684	479.5	0.677	479.0	0.670	478.5	0.664
478.0	0.658	477.5	0.652	477.0	0.646	476.5	0.639
476.0	0.633	475.5	0.627	475.0	0.621	474.5	0.615
474.0	0.609	473.5	0.603	473.0	0.597	472.5	0.591
472.0	0.586	471.5	0.580	471.0	0.573	470.5	0.568
470.0	0.562	469.5	0.557	469.0	0.551	468.5	0.547
468.0	0.542	467.5	0.537	467.0	0.532	466.5	0.527

456.0	0.430	456.0	0.427	455.0	0.423	454.5	0.419
454.0	0.415	453.5	0.412	453.0	0.408	452.5	0.405
452.0	0.401	451.5	0.397	451.0	0.394	450.5	0.391
450.0	0.388	449.5	0.385	449.0	0.382	448.5	0.379
448.0	0.377	447.5	0.374	447.0	0.372	446.5	0.369
446.0	0.366	445.5	0.363	445.0	0.361	444.5	0.358
444.0	0.356	443.5	0.354	443.0	0.351	442.5	0.349
442.0	0.347	441.5	0.345	441.0	0.342	440.5	0.340
440.0	0.338	439.5	0.336	439.0	0.334	438.5	0.333
438.0	0.331	437.5	0.329	437.0	0.327	436.5	0.325
436.0	0.323	435.5	0.321	435.0	0.320	434.5	0.318
434.0	0.316	433.5	0.315	433.0	0.313	432.5	0.311
432.0	0.309	431.5	0.308	431.0	0.306	430.5	0.304
430.0	0.303	429.5	0.301	429.0	0.300	428.5	0.298
428.0	0.297	427.5	0.296	427.0	0.294	426.5	0.293
426.0	0.291	425.5	0.290	425.0	0.288	424.5	0.287
424.0	0.285	423.5	0.284	423.0	0.282	422.5	0.281
422.0	0.279	421.5	0.278	421.0	0.276	420.5	0.275
420.0	0.273	419.5	0.272	419.0	0.271	418.5	0.270
418.0	0.268	417.5	0.267	417.0	0.266	416.5	0.265
416.0	0.264	415.5	0.263	415.0	0.262	414.5	0.261
414.0	0.259	413.5	0.258	413.0	0.258	412.5	0.257
412.0	0.256	411.5	0.255	411.0	0.254	410.5	0.253
410.0	0.252	409.5	0.251	409.0	0.251	408.5	0.250
408.0	0.250	407.5	0.249	407.0	0.249	406.5	0.248
406.0	0.248	405.5	0.248	405.0	0.247	404.5	0.247
404.0	0.247	403.5	0.246	403.0	0.246	402.5	0.246
402.0	0.246	401.5	0.246	401.0	0.246	400.5	0.245
400.0	0.245						

LAMPIRAN C. PENGAMATAN ABSORBANSI SAMPEL

C1. ABSORBANSI EKSTRAK ETANOL DAUN KENARI 40 µg/mL

U-1800 Spectrophotometer

Serial NUM: 5730116
 ROM Version: 07
 Sample Name:
 Date:
 Operator:

Wavelength Scan
 Data Mode: ABS
 Scan Range: 600.0-400.0nm
 Slit Width: 4nm
 Speed(nm/min): 400nm/min
 Lamp Change Wavelength: 340.0nm
 Path Length:

ALL Data	WL(nm)	ABS	WL(nm)	ABS	WL(nm)	ABS	WL(nm)	ABS
	600.0	0.101	599.5	0.103	599.0	0.104	598.5	0.105
	598.0	0.105	597.5	0.106	597.0	0.107	596.5	0.107
	596.0	0.107	595.5	0.106	595.0	0.106	594.5	0.106
	594.0	0.105	593.5	0.105	593.0	0.104	592.5	0.103
	592.0	0.101	591.5	0.100	591.0	0.098	590.5	0.097
	590.0	0.095	589.5	0.092	589.0	0.090	588.5	0.088
	588.0	0.088	587.5	0.087	587.0	0.085	586.5	0.083
	586.0	0.081	585.5	0.079	585.0	0.077	584.5	0.075
	584.0	0.074	583.5	0.073	583.0	0.072	582.5	0.070
	582.0	0.070	581.5	0.072	581.0	0.074	580.5	0.074
	580.0	0.073	579.5	0.072	579.0	0.072	578.5	0.072
	578.0	0.072	577.5	0.073	577.0	0.074	576.5	0.075
	576.0	0.078	575.5	0.080	575.0	0.083	574.5	0.085
	574.0	0.088	573.5	0.091	573.0	0.093	572.5	0.095
	572.0	0.096	571.5	0.098	571.0	0.100	570.5	0.101
	569.0	0.102	569.5	0.102	569.0	0.103	568.5	0.103
	568.0	0.103	567.5	0.103	567.0	0.103	566.5	0.103
	566.0	0.103	565.5	0.103	565.0	0.104	564.5	0.103
	564.0	0.103	563.5	0.104	563.0	0.104	562.5	0.104
	562.0	0.104	561.5	0.104	561.0	0.104	560.5	0.104
	560.0	0.104	559.5	0.104	559.0	0.104	558.5	0.104
	558.0	0.104	557.5	0.104	557.0	0.104	556.5	0.104
	556.0	0.104	555.5	0.105	555.0	0.105	554.5	0.105
	554.0	0.105	553.5	0.104	553.0	0.104	552.5	0.105
	552.0	0.105	551.5	0.105	551.0	0.105	550.5	0.105
	550.0	0.105	549.5	0.105	549.0	0.105	548.5	0.106
	548.0	0.106	547.5	0.106	547.0	0.106	546.5	0.106
	546.0	0.107	545.5	0.107	545.0	0.107	544.5	0.107
	544.0	0.107	543.5	0.107	543.0	0.107	542.5	0.107
	542.0	0.107	541.5	0.107	541.0	0.108	540.5	0.108
	540.0	0.108	539.5	0.108	539.0	0.108	538.5	0.108
	538.0	0.108	537.5	0.109	537.0	0.109	536.5	0.109
	536.0	0.109	535.5	0.109	535.0	0.109	534.5	0.109
	534.0	0.109	533.5	0.110	533.0	0.110	532.5	0.110
	532.0	0.110	531.5	0.111	531.0	0.111	530.5	0.111
	530.0	0.111	529.5	0.111	529.0	0.111	528.5	0.111
	528.0	0.111	527.5	0.111	527.0	0.111	526.5	0.111
	526.0	0.111	525.5	0.112	525.0	0.112	524.5	0.112
	524.0	0.113	523.5	0.112	523.0	0.112	522.5	0.113
	522.0	0.113	521.5	0.113	521.0	0.113	520.5	0.113
	520.0	0.114	519.5	0.114	519.0	0.114	518.5	0.115
	518.0	0.115	517.5	0.115	517.0	0.115	516.5	0.116
	516.0	0.116	515.5	0.116	515.0	0.116	514.5	0.117
	514.0	0.117	513.5	0.117	513.0	0.117	512.5	0.117
	512.0	0.117	511.5	0.117	511.0	0.117	510.5	0.117
	510.0	0.117	509.5	0.118	509.0	0.118	508.5	0.118
	508.0	0.118	507.5	0.118	507.0	0.118	506.5	0.118
	506.0	0.118	505.5	0.118	505.0	0.118	504.5	0.118
	504.0	0.118	503.5	0.118	503.0	0.118	502.5	0.118
	502.0	0.118	501.5	0.119	501.0	0.119	500.5	0.119
	500.0	0.119	499.5	0.119	499.0	0.120	498.5	0.120
	498.0	0.120	497.5	0.120	497.0	0.120	496.5	0.120
	496.0	0.120	495.5	0.120	495.0	0.120	494.5	0.120
	494.0	0.121	493.5	0.121	493.0	0.121	492.5	0.121
	492.0	0.121	491.5	0.121	491.0	0.121	490.5	0.122
	490.0	0.122	489.5	0.122	489.0	0.122	488.5	0.122
	488.0	0.123	487.5	0.123	487.0	0.123	486.5	0.123
	486.0	0.123	485.5	0.123	485.0	0.123	484.5	0.123

484.0	0.123	483.5	0.124	483.0	0.124	482.5	0.124
482.0	0.124	481.5	0.124	481.0	0.124	480.5	0.124
480.0	0.125	479.5	0.125	479.0	0.125	478.5	0.125
478.0	0.125	477.5	0.125	477.0	0.125	476.5	0.125
476.0	0.126	475.5	0.126	475.0	0.126	474.5	0.126
474.0	0.127	473.5	0.127	473.0	0.127	472.5	0.127
472.0	0.127	471.5	0.127	471.0	0.127	470.5	0.128
470.0	0.128	469.5	0.128	469.0	0.128	468.5	0.128
468.0	0.128	467.5	0.129	467.0	0.129	466.5	0.129
466.0	0.129	465.5	0.129	465.0	0.129	464.5	0.129
464.0	0.130	463.5	0.130	463.0	0.130	462.5	0.130
462.0	0.130	461.5	0.130	461.0	0.130	460.5	0.130
460.0	0.130	459.5	0.131	459.0	0.131	458.5	0.131
458.0	0.131	457.5	0.132	457.0	0.132	456.5	0.132
456.0	0.132	455.5	0.132	455.0	0.132	454.5	0.132
454.0	0.132	453.5	0.132	453.0	0.132	452.5	0.132
452.0	0.131	451.5	0.131	451.0	0.131	450.5	0.131
450.0	0.132	449.5	0.132	449.0	0.132	448.5	0.132
448.0	0.132	447.5	0.132	447.0	0.133	446.5	0.133
446.0	0.133	445.5	0.134	445.0	0.134	444.5	0.134
444.0	0.134	443.5	0.134	443.0	0.134	442.5	0.134
442.0	0.134	441.5	0.135	441.0	0.135	440.5	0.135
440.0	0.135	439.5	0.135	439.0	0.136	438.5	0.136
438.0	0.136	437.5	0.136	437.0	0.136	436.5	0.136
436.0	0.136	435.5	0.136	435.0	0.136	434.5	0.136
434.0	0.137	433.5	0.137	433.0	0.137	432.5	0.137
432.0	0.137	431.5	0.137	431.0	0.137	430.5	0.138
430.0	0.138	429.5	0.138	429.0	0.138	428.5	0.138
428.0	0.138	427.5	0.139	427.0	0.139	426.5	0.139
426.0	0.140	425.5	0.140	425.0	0.140	424.5	0.140
424.0	0.139	423.5	0.139	423.0	0.139	422.5	0.139
422.0	0.140	421.5	0.140	421.0	0.140	420.5	0.140
420.0	0.140	419.5	0.141	419.0	0.141	418.5	0.141
418.0	0.141	417.5	0.141	417.0	0.141	416.5	0.141
416.0	0.141	415.5	0.142	415.0	0.142	414.5	0.142
414.0	0.143	413.5	0.143	413.0	0.143	412.5	0.143
412.0	0.143	411.5	0.143	411.0	0.143	410.5	0.143
410.0	0.143	409.5	0.144	409.0	0.144	408.5	0.144
408.0	0.144	407.5	0.145	407.0	0.145	406.5	0.145
406.0	0.145	405.5	0.145	405.0	0.144	404.5	0.144
404.0	0.145	403.5	0.145	403.0	0.145	402.5	0.145
402.0	0.144	401.5	0.144	401.0	0.144	400.5	0.145
400.0	0.145						

C2. ABSORBANSI FRAKSI N-HEKSANA EKSTRAK ETANOL DAUN KENARI
150 µg/mL

U-1800 Spectrophotometer

Serial NUM: 5730116
ROM Version: 07
Sample Name:
Date:
Operator:

Wavelength Scan
Data Mode: ABS
Scan Range: 600.0-400.0nm
Slit Width: 4nm
Speed(nm/min): 400nm/min
Lamp Change Wavelength: 340.0nm
Path Length:

ALL Data							
WL(nm)	ABS	WL(nm)	ABS	WL(nm)	ABS	WL(nm)	ABS
600.0	0.243	599.5	0.240	599.0	0.236	598.5	0.232
598.0	0.228	597.5	0.223	597.0	0.219	596.5	0.214
596.0	0.209	595.5	0.203	595.0	0.198	594.5	0.193
594.0	0.187	593.5	0.181	593.0	0.175	592.5	0.169
592.0	0.163	591.5	0.157	591.0	0.150	590.5	0.144
590.0	0.137	589.5	0.130	589.0	0.123	588.5	0.119
588.0	0.117	587.5	0.113	587.0	0.109	586.5	0.105
586.0	0.100	585.5	0.096	585.0	0.093	584.5	0.090
584.0	0.087	583.5	0.083	583.0	0.084	582.5	0.081
582.0	0.081	581.5	0.083	581.0	0.085	580.5	0.084
580.0	0.084	579.5	0.083	579.0	0.083	578.5	0.083
578.0	0.084	577.5	0.085	577.0	0.087	576.5	0.090
576.0	0.093	575.5	0.096	575.0	0.100	574.5	0.104
574.0	0.109	573.5	0.113	573.0	0.117	572.5	0.121
572.0	0.124	571.5	0.129	571.0	0.133	570.5	0.136
570.0	0.139	569.5	0.142	569.0	0.144	568.5	0.146
568.0	0.147	567.5	0.149	567.0	0.151	566.5	0.154
566.0	0.156	565.5	0.158	565.0	0.160	564.5	0.162
564.0	0.163	563.5	0.165	563.0	0.167	562.5	0.168
562.0	0.170	561.5	0.171	561.0	0.172	560.5	0.173
560.0	0.173	559.5	0.174	559.0	0.175	558.5	0.176
558.0	0.177	557.5	0.177	557.0	0.178	556.5	0.178
556.0	0.178	555.5	0.178	555.0	0.179	554.5	0.179
554.0	0.180	553.5	0.181	553.0	0.182	552.5	0.182
552.0	0.184	551.5	0.185	551.0	0.187	550.5	0.188
550.0	0.190	549.5	0.193	549.0	0.195	548.5	0.197
548.0	0.200	547.5	0.203	547.0	0.208	546.5	0.212
546.0	0.217	545.5	0.222	545.0	0.227	544.5	0.234
544.0	0.241	543.5	0.247	543.0	0.254	542.5	0.261
542.0	0.267	541.5	0.274	541.0	0.280	540.5	0.286
540.0	0.292	539.5	0.299	539.0	0.304	538.5	0.308
538.0	0.312	537.5	0.316	537.0	0.318	536.5	0.320
536.0	0.320	535.5	0.320	535.0	0.319	534.5	0.317
534.0	0.315	533.5	0.311	533.0	0.307	532.5	0.303
532.0	0.299	531.5	0.294	531.0	0.290	530.5	0.285
530.0	0.280	529.5	0.276	529.0	0.271	528.5	0.268
528.0	0.265	527.5	0.261	527.0	0.258	526.5	0.255
526.0	0.253	525.5	0.251	525.0	0.249	524.5	0.247
524.0	0.246	523.5	0.246	523.0	0.246	522.5	0.246
522.0	0.246	521.5	0.247	521.0	0.248	520.5	0.249
520.0	0.250	519.5	0.252	519.0	0.254	518.5	0.257
518.0	0.259	517.5	0.261	517.0	0.264	516.5	0.268
516.0	0.272	515.5	0.276	515.0	0.280	514.5	0.284
514.0	0.289	513.5	0.294	513.0	0.299	512.5	0.305
512.0	0.310	511.5	0.316	511.0	0.321	510.5	0.326
510.0	0.331	509.5	0.335	509.0	0.339	508.5	0.342
508.0	0.345	507.5	0.347	507.0	0.350	506.5	0.352
506.0	0.354	505.5	0.356	505.0	0.357	504.5	0.358
504.0	0.359	503.5	0.360	503.0	0.361	502.5	0.362
502.0	0.363	501.5	0.364	501.0	0.364	500.5	0.365
500.0	0.367	499.5	0.368	499.0	0.370	498.5	0.371
498.0	0.372	497.5	0.374	497.0	0.376	496.5	0.378
496.0	0.380	495.5	0.382	495.0	0.385	494.5	0.388
494.0	0.392	493.5	0.395	493.0	0.400	492.5	0.405
492.0	0.411	491.5	0.417	491.0	0.423	490.5	0.429
490.0	0.436	489.5	0.444	489.0	0.452	488.5	0.459
488.0	0.466	487.5	0.475	487.0	0.485	486.5	0.495
486.0	0.505	485.5	0.516	485.0	0.527	484.5	0.538

484.0	0.549	483.5	0.561	483.0	0.574	482.5	0.587
482.0	0.598	481.5	0.609	481.0	0.620	480.5	0.631
480.0	0.642	479.5	0.653	479.0	0.663	478.5	0.673
478.0	0.682	477.5	0.690	477.0	0.697	476.5	0.704
476.0	0.710	475.5	0.715	475.0	0.720	474.5	0.725
474.0	0.728	473.5	0.730	473.0	0.732	472.5	0.732
472.0	0.733	471.5	0.733	471.0	0.732	470.5	0.732
470.0	0.731	469.5	0.730	469.0	0.730	468.5	0.729
468.0	0.729	467.5	0.728	467.0	0.728	466.5	0.728
466.0	0.730	465.5	0.732	465.0	0.734	464.5	0.738
464.0	0.742	463.5	0.746	463.0	0.752	462.5	0.759
462.0	0.767	461.5	0.776	461.0	0.786	460.5	0.797
460.0	0.810	459.5	0.826	459.0	0.843	458.5	0.860
458.0	0.877	457.5	0.896	457.0	0.916	456.5	0.938
456.0	0.961	455.5	0.984	455.0	1.008	454.5	1.033
454.0	1.059	453.5	1.086	453.0	1.113	452.5	1.140
452.0	1.169	451.5	1.197	451.0	1.223	450.5	1.249
450.0	1.277	449.5	1.304	449.0	1.330	448.5	1.354
448.0	1.376	447.5	1.401	447.0	1.428	446.5	1.456
446.0	1.482	445.5	1.509	445.0	1.535	444.5	1.561
444.0	1.587	443.5	1.611	443.0	1.635	442.5	1.660
442.0	1.680	441.5	1.699	441.0	1.717	440.5	1.736
440.0	1.755	439.5	1.769	439.0	1.783	438.5	1.791
438.0	1.799	437.5	1.805	437.0	1.807	436.5	1.807
436.0	1.807	435.5	1.805	435.0	1.799	434.5	1.791
434.0	1.783	433.5	1.775	433.0	1.765	432.5	1.757
432.0	1.750	431.5	1.743	431.0	1.738	430.5	1.736
430.0	1.733	429.5	1.736	429.0	1.738	428.5	1.743
428.0	1.750	427.5	1.755	427.0	1.765	426.5	1.778
426.0	1.794	425.5	1.810	425.0	1.827	424.5	1.845
424.0	1.863	423.5	1.883	423.0	1.903	422.5	1.921
422.0	1.940	421.5	1.955	421.0	1.971	420.5	1.983
420.0	2.000	419.5	2.009	419.0	2.018	418.5	2.027
418.0	2.036	417.5	2.041	417.0	2.041	416.5	2.046
416.0	2.051	415.5	2.051	415.0	2.051	414.5	2.046
414.0	2.046	413.5	2.046	413.0	2.041	412.5	2.036
412.0	2.032	411.5	2.027	411.0	2.022	410.5	2.018
410.0	2.013	409.5	2.009	409.0	2.004	408.5	1.995
408.0	1.987	407.5	1.983	407.0	1.975	406.5	1.967
406.0	1.963	405.5	1.955	405.0	1.947	404.5	1.940
404.0	1.932	403.5	1.925	403.0	1.917	402.5	1.914
402.0	1.907	401.5	1.896	401.0	1.889	400.5	1.886
400.0	1.883						

C3. ABSORBANSI FRAKSI ETIL ASETAT EKSTRAK ETANOL DAUN KENARI 40 µg/mL

U-1800 Spectrophotometer

Serial NUM: 5730116
 ROM Version: 07
 Sample Name:
 Date:
 Operator:

Wavelength Scan
 Data Mode: ABS
 Scan Range: 600.0-400.0nm
 Slit Width: 4nm
 Speed(nm/min): 400nm/min
 Lamp Change Wavelength: 340.0nm
 Path Length:

ALL Data

WL(nm)	ABS	WL(nm)	ABS	WL(nm)	ABS	WL(nm)	ABS
600.0	-0.009	599.5	-0.007	599.0	-0.005	598.5	-0.005
598.0	-0.004	597.5	-0.004	597.0	-0.004	596.5	-0.004
596.0	-0.004	596.5	-0.004	595.0	-0.005	594.5	-0.005
594.0	-0.005	595.5	-0.006	593.0	-0.007	592.5	-0.008
592.0	-0.010	591.5	-0.011	591.0	-0.013	590.5	-0.014
590.0	-0.016	589.5	-0.019	589.0	-0.021	588.5	-0.023
588.0	-0.023	587.5	-0.024	587.0	-0.026	586.5	-0.028
586.0	-0.030	585.5	-0.032	585.0	-0.034	584.5	-0.036
584.0	-0.038	583.5	-0.039	583.0	-0.041	582.5	-0.042
582.0	-0.042	581.5	-0.040	581.0	-0.038	580.5	-0.039
580.0	-0.039	579.5	-0.040	579.0	-0.041	578.5	-0.041
578.0	-0.040	577.5	-0.040	577.0	-0.039	576.5	-0.037
576.0	-0.035	575.5	-0.033	575.0	-0.030	574.5	-0.028
574.0	-0.025	573.5	-0.022	573.0	-0.019	572.5	-0.018
572.0	-0.017	571.5	-0.015	571.0	-0.014	570.5	-0.013
570.0	-0.012	569.5	-0.012	569.0	-0.011	568.5	-0.011
568.0	-0.011	567.5	-0.011	567.0	-0.011	566.5	-0.012
566.0	-0.012	565.5	-0.012	565.0	-0.012	564.5	-0.012
564.0	-0.012	563.5	-0.012	563.0	-0.012	562.5	-0.012
562.0	-0.012	561.5	-0.012	561.0	-0.013	560.5	-0.013
560.0	-0.013	559.5	-0.013	559.0	-0.013	558.5	-0.013
558.0	-0.013	557.5	-0.013	557.0	-0.013	556.5	-0.014
556.0	-0.014	555.5	-0.014	555.0	-0.013	554.5	-0.013
554.0	-0.013	553.5	-0.013	553.0	-0.014	552.5	-0.014
552.0	-0.014	551.5	-0.014	551.0	-0.014	550.5	-0.014
550.0	-0.014	549.5	-0.014	549.0	-0.014	548.5	-0.014
548.0	-0.014	547.5	-0.014	547.0	-0.014	546.5	-0.014
546.0	-0.014	545.5	-0.014	545.0	-0.014	544.5	-0.014
544.0	-0.014	543.5	-0.013	543.0	-0.013	542.5	-0.014
542.0	-0.014	541.5	-0.013	541.0	-0.013	540.5	-0.013
540.0	-0.013	539.5	-0.013	539.0	-0.013	538.5	-0.013
538.0	-0.013	537.5	-0.012	537.0	-0.012	536.5	-0.012
536.0	-0.012	535.5	-0.012	535.0	-0.012	534.5	-0.012
534.0	-0.012	533.5	-0.012	533.0	-0.011	532.5	-0.011
532.0	-0.011	531.5	-0.011	531.0	-0.011	530.5	-0.011
530.0	-0.011	529.5	-0.011	529.0	-0.011	528.5	-0.011
528.0	-0.011	527.5	-0.011	527.0	-0.011	526.5	-0.011
526.0	-0.011	525.5	-0.010	525.0	-0.010	524.5	-0.011
524.0	-0.011	523.5	-0.011	523.0	-0.011	522.5	-0.011
522.0	-0.010	521.5	-0.010	521.0	-0.010	520.5	-0.010
520.0	-0.010	519.5	-0.010	519.0	-0.010	518.5	-0.010
518.0	-0.010	517.5	-0.010	517.0	-0.010	516.5	-0.010
516.0	-0.010	515.5	-0.010	515.0	-0.010	514.5	-0.010
514.0	-0.010	513.5	-0.010	513.0	-0.010	512.5	-0.010
512.0	-0.010	511.5	-0.010	511.0	-0.010	510.5	-0.010
510.0	-0.010	509.5	-0.010	509.0	-0.010	508.5	-0.010
508.0	-0.010	507.5	-0.010	507.0	-0.010	506.5	-0.010
506.0	-0.010	505.5	-0.010	505.0	-0.010	504.5	-0.011
504.0	-0.011	503.5	-0.011	503.0	-0.011	502.5	-0.011
502.0	-0.011	501.5	-0.011	501.0	-0.011	500.5	-0.011
500.0	-0.011	499.5	-0.011	499.0	-0.011	498.5	-0.011
498.0	-0.011	497.5	-0.011	497.0	-0.011	496.5	-0.011
496.0	-0.011	495.5	-0.011	495.0	-0.011	494.5	-0.011
494.0	-0.011	493.5	-0.011	493.0	-0.011	492.5	-0.011
492.0	-0.011	491.5	-0.010	491.0	-0.010	490.5	-0.010
490.0	-0.011	489.5	-0.011	489.0	-0.011	488.5	-0.010
488.0	-0.010	487.5	-0.011	487.0	-0.011	486.5	-0.011
486.0	-0.011	485.5	-0.011	485.0	-0.011	484.5	-0.010

484.0	-0.010	483.5	-0.010	483.0	-0.010	482.5	-0.010
482.0	-0.010	481.5	-0.010	481.0	-0.011	480.5	-0.011
480.0	-0.010	479.5	-0.010	479.0	-0.010	478.5	-0.011
478.0	-0.011	477.5	-0.010	477.0	-0.010	476.5	-0.010
476.0	-0.010	475.5	-0.010	475.0	-0.010	474.5	-0.010
474.0	-0.010	473.5	-0.010	473.0	-0.010	472.5	-0.010
472.0	-0.010	471.5	-0.010	471.0	-0.010	470.5	-0.010
470.0	-0.010	469.5	-0.010	469.0	-0.010	468.5	-0.010
468.0	-0.010	467.5	-0.010	467.0	-0.011	466.5	-0.011
466.0	-0.011	465.5	-0.011	465.0	-0.011	464.5	-0.011
464.0	-0.011	463.5	-0.011	463.0	-0.011	462.5	-0.011
462.0	-0.011	461.5	-0.011	461.0	-0.011	460.5	-0.011
460.0	-0.011	459.5	-0.011	459.0	-0.011	458.5	-0.011
458.0	-0.011	457.5	-0.010	457.0	-0.010	456.5	-0.010
456.0	-0.010	455.5	-0.010	455.0	-0.010	454.5	-0.010
454.0	-0.011	453.5	-0.011	453.0	-0.011	452.5	-0.011
452.0	-0.011	451.5	-0.011	451.0	-0.011	450.5	-0.011
450.0	-0.010	449.5	-0.010	449.0	-0.010	448.5	-0.011
448.0	-0.011	447.5	-0.011	447.0	-0.010	446.5	-0.010
446.0	-0.010	445.5	-0.010	445.0	-0.010	444.5	-0.010
444.0	-0.011	443.5	-0.011	443.0	-0.011	442.5	-0.011
442.0	-0.011	441.5	-0.011	441.0	-0.011	440.5	-0.011
440.0	-0.011	439.5	-0.011	439.0	-0.011	438.5	-0.010
438.0	-0.010	437.5	-0.010	437.0	-0.010	436.5	-0.010
436.0	-0.010	435.5	-0.010	435.0	-0.010	434.5	-0.010
434.0	-0.010	433.5	-0.010	433.0	-0.010	432.5	-0.010
432.0	-0.010	431.5	-0.010	431.0	-0.010	430.5	-0.010
430.0	-0.010	429.5	-0.010	429.0	-0.010	428.5	-0.010
428.0	-0.010	427.5	-0.010	427.0	-0.010	426.5	-0.010
426.0	-0.010	425.5	-0.010	425.0	-0.010	424.5	-0.010
424.0	-0.009	423.5	-0.009	423.0	-0.009	422.5	-0.009
422.0	-0.009	421.5	-0.009	421.0	-0.009	420.5	-0.009
420.0	-0.009	419.5	-0.008	419.0	-0.008	418.5	-0.008
418.0	-0.008	417.5	-0.008	417.0	-0.008	416.5	-0.008
416.0	-0.008	415.5	-0.008	415.0	-0.007	414.5	-0.007
414.0	-0.007	413.5	-0.006	413.0	-0.006	412.5	-0.005
412.0	-0.005	411.5	-0.005	411.0	-0.004	410.5	-0.004
410.0	-0.004	409.5	-0.003	409.0	-0.003	408.5	-0.002
408.0	-0.002	407.5	-0.002	407.0	-0.001	406.5	-0.001
406.0	-0.000	405.5	0.000	405.0	0.001	404.5	0.002
404.0	0.003	403.5	0.003	403.0	0.004	402.5	0.005
402.0	0.005	401.5	0.005	401.0	0.007	400.5	0.008
400.0	0.008						

C.4 ABSORBANSI FRAKSI ETANOL-AIR EKSTRAK ETANOL DAUN KENARI
40 µg/mL

U-1800 Spectrophotometer

Serial NUM: 5730116
 ROM Version: 07
 Sample Name:
 Date:
 Operator:

Wavelength Scan ABS
 Data Mode: 600.0-400.0nm
 Scan Range: 4nm
 Slit Width: 400nm/min
 Speed(nm/min): 340.0nm
 Lamp Change Wavelength:
 Path Length:

ALL Data	WL(nm)	ABS	WL(nm)	ABS	WL(nm)	ABS	WL(nm)	ABS
600.0	-0.012	599.5	-0.009	599.0	-0.008	598.5	-0.008	
598.0	-0.008	597.5	-0.008	597.0	-0.008	596.5	-0.008	
596.0	-0.008	595.5	-0.008	595.0	-0.009	594.5	-0.009	
594.0	-0.010	593.5	-0.011	593.0	-0.012	592.5	-0.013	
592.0	-0.015	591.5	-0.016	591.0	-0.018	590.5	-0.020	
590.0	-0.022	589.5	-0.025	589.0	-0.027	588.5	-0.028	
588.0	-0.028	587.5	-0.030	587.0	-0.032	586.5	-0.034	
586.0	-0.036	585.5	-0.038	585.0	-0.040	584.5	-0.041	
584.0	-0.043	583.5	-0.044	583.0	-0.046	582.5	-0.047	
582.0	-0.047	581.5	-0.045	581.0	-0.047	580.5	-0.044	
580.0	-0.045	579.5	-0.047	579.0	-0.047	578.5	-0.047	
578.0	-0.041	577.5	-0.046	577.0	-0.045	576.5	-0.044	
576.0	-0.032	575.5	-0.039	575.0	-0.037	574.5	-0.035	
574.0	-0.024	573.5	-0.029	573.0	-0.027	572.5	-0.026	
572.0	-0.018	571.5	-0.022	571.0	-0.020	570.5	-0.019	
570.0	-0.017	569.5	-0.017	569.0	-0.017	568.5	-0.017	
568.0	-0.017	567.5	-0.017	567.0	-0.017	566.5	-0.017	
566.0	-0.017	565.5	-0.017	565.0	-0.017	564.5	-0.017	
564.0	-0.018	563.5	-0.018	563.0	-0.018	562.5	-0.018	
562.0	-0.018	561.5	-0.018	561.0	-0.018	560.5	-0.018	
560.0	-0.018	559.5	-0.018	559.0	-0.018	558.5	-0.019	
558.0	-0.019	557.5	-0.019	557.0	-0.019	556.5	-0.020	
556.0	-0.019	555.5	-0.019	555.0	-0.019	554.5	-0.019	
554.0	-0.019	553.5	-0.019	553.0	-0.019	552.5	-0.019	
552.0	-0.019	551.5	-0.019	551.0	-0.019	550.5	-0.019	
550.0	-0.019	549.5	-0.019	549.0	-0.018	548.5	-0.018	
548.0	-0.018	547.5	-0.018	547.0	-0.018	546.5	-0.018	
546.0	-0.018	545.5	-0.018	545.0	-0.017	544.5	-0.017	
544.0	-0.017	543.5	-0.017	543.0	-0.017	542.5	-0.017	
542.0	-0.017	541.5	-0.017	541.0	-0.016	540.5	-0.016	
540.0	-0.016	539.5	-0.016	539.0	-0.016	538.5	-0.016	
538.0	-0.015	537.5	-0.015	537.0	-0.015	536.5	-0.015	
536.0	-0.015	535.5	-0.015	535.0	-0.014	534.5	-0.014	
534.0	-0.014	533.5	-0.014	533.0	-0.014	532.5	-0.014	
532.0	-0.014	531.5	-0.014	531.0	-0.014	530.5	-0.014	
530.0	-0.015	529.5	-0.015	529.0	-0.015	528.5	-0.015	
528.0	-0.015	527.5	-0.015	527.0	-0.015	526.5	-0.015	
526.0	-0.015	525.5	-0.015	525.0	-0.015	524.5	-0.015	
524.0	-0.016	523.5	-0.016	523.0	-0.016	522.5	-0.016	
522.0	-0.016	521.5	-0.016	521.0	-0.016	520.5	-0.016	
520.0	-0.015	519.5	-0.015	519.0	-0.015	518.5	-0.015	
518.0	-0.015	517.5	-0.015	517.0	-0.015	516.5	-0.015	
516.0	-0.015	515.5	-0.015	515.0	-0.015	514.5	-0.015	
514.0	-0.015	513.5	-0.015	513.0	-0.015	512.5	-0.015	
512.0	-0.015	511.5	-0.015	511.0	-0.015	510.5	-0.015	
510.0	-0.014	509.5	-0.014	509.0	-0.014	508.5	-0.014	
508.0	-0.014	507.5	-0.014	507.0	-0.014	506.5	-0.014	
506.0	-0.014	505.5	-0.014	505.0	-0.014	504.5	-0.014	
504.0	-0.014	503.5	-0.014	503.0	-0.014	502.5	-0.014	
502.0	-0.013	501.5	-0.013	501.0	-0.014	500.5	-0.013	
500.0	-0.013	499.5	-0.013	499.0	-0.013	498.5	-0.013	
498.0	-0.013	497.5	-0.013	497.0	-0.013	496.5	-0.014	
496.0	-0.014	495.5	-0.013	495.0	-0.013	494.5	-0.013	
494.0	-0.013	493.5	-0.012	493.0	-0.012	492.5	-0.012	
492.0	-0.012	491.5	-0.012	491.0	-0.012	490.5	-0.011	
490.0	-0.011	489.5	-0.011	489.0	-0.010	488.5	-0.010	
488.0	-0.010	487.5	-0.009	487.0	-0.009	486.5	-0.008	
486.0	-0.009	485.5	-0.009	485.0	-0.008	484.5	-0.008	

484.0	-0.008	483.5	-0.007	483.0	-0.007	482.5	-0.006
482.0	-0.006	481.5	-0.006	481.0	-0.005	480.5	-0.005
480.0	-0.005	479.5	-0.005	479.0	-0.004	478.5	-0.004
478.0	-0.004	477.5	-0.004	477.0	-0.004	476.5	-0.003
476.0	-0.003	475.5	-0.003	475.0	-0.003	474.5	-0.003
474.0	-0.002	473.5	-0.002	473.0	-0.003	472.5	-0.003
472.0	-0.003	471.5	-0.003	471.0	-0.003	470.5	-0.003
470.0	-0.003	469.5	-0.003	469.0	-0.003	468.5	-0.003
468.0	-0.003	467.5	-0.003	467.0	-0.004	466.5	-0.004
466.0	-0.004	465.5	-0.004	465.0	-0.004	464.5	-0.004
464.0	-0.004	463.5	-0.003	463.0	-0.003	462.5	-0.003
462.0	-0.003	461.5	-0.003	461.0	-0.002	460.5	-0.002
460.0	-0.002	459.5	-0.001	459.0	-0.001	458.5	-0.000
458.0	0.001	457.5	0.002	457.0	0.002	456.5	0.003
456.0	0.003	455.5	0.004	455.0	0.005	454.5	0.005
454.0	0.006	453.5	0.007	453.0	0.007	452.5	0.009
452.0	0.010	451.5	0.010	451.0	0.011	450.5	0.011
450.0	0.012	449.5	0.013	449.0	0.014	448.5	0.014
448.0	0.015	447.5	0.016	447.0	0.017	446.5	0.017
446.0	0.018	445.5	0.019	445.0	0.020	444.5	0.020
444.0	0.021	443.5	0.021	443.0	0.022	442.5	0.023
442.0	0.024	441.5	0.024	441.0	0.025	440.5	0.025
440.0	0.026	439.5	0.026	439.0	0.027	438.5	0.028
438.0	0.028	437.5	0.028	437.0	0.028	436.5	0.028
436.0	0.028	435.5	0.029	435.0	0.029	434.5	0.028
434.0	0.028	433.5	0.027	433.0	0.027	432.5	0.026
432.0	0.026	431.5	0.026	431.0	0.026	430.5	0.025
430.0	0.026	429.5	0.026	429.0	0.026	428.5	0.025
428.0	0.026	427.5	0.026	427.0	0.026	426.5	0.027
426.0	0.027	425.5	0.028	425.0	0.029	424.5	0.030
424.0	0.031	423.5	0.032	423.0	0.033	422.5	0.034
422.0	0.034	421.5	0.036	421.0	0.037	420.5	0.037
420.0	0.039	419.5	0.040	419.0	0.041	418.5	0.042
418.0	0.043	417.5	0.044	417.0	0.044	416.5	0.045
416.0	0.046	415.5	0.046	415.0	0.047	414.5	0.048
414.0	0.048	413.5	0.049	413.0	0.049	412.5	0.049
412.0	0.049	411.5	0.049	411.0	0.049	410.5	0.049
410.0	0.049	409.5	0.048	409.0	0.048	408.5	0.048
408.0	0.048	407.5	0.047	407.0	0.047	406.5	0.046
406.0	0.046	405.5	0.045	405.0	0.045	404.5	0.044
404.0	0.044	403.5	0.044	403.0	0.044	402.5	0.043
402.0	0.043	401.5	0.042	401.0	0.042	400.5	0.042
400.0	0.042						

LAMPIRAN D. PERHITUNGAN

1. % Rendemen ekstrak dan fraksi

$$\% \text{ Rendemen ekstrak} = \frac{\text{bobot ekstrak yang didapat}}{\text{bobot simplisia yang digunakan}} \times 100 \%$$

$$\% \text{ Rendemen fraksi} = \frac{\text{bobot fraksi yang didapat}}{\text{bobot ekstrak etanol yang digunakan}} \times 100 \%$$

$$\text{Ekstrak etanol} = \frac{19,14 \text{ g}}{200 \text{ g}} \times 100\% = 9,57 \%$$

$$\text{Fraksi n-heksana} = \frac{0,86 \text{ g}}{15 \text{ g}} \times 100\% = 5,733 \%$$

$$\text{Fraksi etil asetat} = \frac{5,43 \text{ g}}{15 \text{ g}} \times 100\% = 36,20 \%$$

$$\text{Fraksi air} = \frac{12,18 \text{ g}}{15 \text{ g}} \times 100\% = 81,20 \%$$

2. Perhitungan konsentrasi DPPH

$$\frac{10 \text{ mg}}{10 \text{ mL}} = 0,1 \%$$

$$\frac{2 \text{ mL}}{50 \text{ mL}} \times 0,1 \% = 0,004 \%$$

3. Perhitungan konsentrasi larutan uji ekstrak dan fraksi daun kenari (2x replikasi)

Larutan uji ekstrak etanol, fraksi etil asetat dan fraksi air:

$$\frac{\text{Massa ekstrak}}{\text{Volume pelarut}} \times 1000$$

$$\frac{25 \text{ mg}}{10 \text{ mL}} \times 1000 = 2500 \mu\text{g/ml}$$

Diencerkan

$$\frac{1,6 \text{ mL}}{10 \text{ mL}} \times 2500 \mu\text{g/ml} = 400 \mu\text{g/ml}$$

$$\frac{1 \text{ mL}}{10 \text{ mL}} \times 400 \mu\text{g/ml} = 40 \mu\text{g/ml}$$

$$\frac{0,75 \text{ mL}}{10 \text{ mL}} \times 400 \mu\text{g/ml} = 30 \mu\text{g/ml}$$

$$\frac{0,5 \text{ mL}}{10 \text{ mL}} \times 400 \text{ } \mu\text{g/ml} = 20 \text{ } \mu\text{g/ml}$$

$$\frac{0,25 \text{ mL}}{10 \text{ mL}} \times 400 \text{ } \mu\text{g/ml} = 10 \text{ } \mu\text{g/ml}$$

Larutan uji fraksi n-heksana :

$$\frac{\text{Massa ekstrak}}{\text{Volume pelarut}} \times 1000$$

$$\frac{25 \text{ mg}}{10 \text{ mL}} \times 1000 = 2500 \text{ } \mu\text{g/ml}$$

Dicirikan

$$\frac{0,3 \text{ mL}}{10 \text{ mL}} \times 2500 \text{ } \mu\text{g/ml} = 75 \text{ } \mu\text{g/ml}$$

$$\frac{0,4 \text{ mL}}{10 \text{ mL}} \times 2500 \text{ } \mu\text{g/ml} = 100 \text{ } \mu\text{g/ml}$$

$$\frac{0,5 \text{ mL}}{10 \text{ mL}} \times 2500 \text{ } \mu\text{g/ml} = 125 \text{ } \mu\text{g/ml}$$

$$\frac{0,6 \text{ mL}}{10 \text{ mL}} \times 2500 \text{ } \mu\text{g/ml} = 150 \text{ } \mu\text{g/ml}$$

4. Perhitungan konsentrasi pembanding vitamin C (2 x replikasi)

$$\frac{\text{Massa Vit.C}}{\text{Volume pelarut}} \times 1000$$

$$\frac{20 \text{ mg}}{10 \text{ mL}} \times 1000 \text{ } \mu\text{g/ml} = 2000 \text{ } \mu\text{g/ml}$$

Dicirikan

$$\frac{0,2 \text{ mL}}{10 \text{ mL}} \times 2000 \text{ } \mu\text{g/ml} = 40 \text{ } \mu\text{g/ml}$$

$$\frac{0,75 \text{ mL}}{10 \text{ mL}} \times 20 \text{ } \mu\text{g/ml} = 3 \text{ } \mu\text{g/ml}$$

$$\frac{1,25 \text{ mL}}{10 \text{ mL}} \times 20 \text{ } \mu\text{g/ml} = 5 \text{ } \mu\text{g/ml}$$

$$\frac{1,75 \text{ mL}}{10 \text{ mL}} \times 20 \text{ } \mu\text{g/ml} = 7 \text{ } \mu\text{g/ml}$$

$$\frac{2,25 \text{ mL}}{10 \text{ mL}} \times 20 \text{ } \mu\text{g/ml} = 9 \text{ } \mu\text{g/ml}$$

5. Perhitungan Uji Aktivitas Antioksidan

Rumus :

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

Contoh perhitungan :

$$\% \text{ Inhibisi} = \frac{1,055 - 0,079}{1,055} \times 100 \% = 92,512 \%$$

Setelah didapatkan presentasi inhibisi dari masing-masing konsentrasi, kemudian ditentukan persamaan $y = bx + a$ dengan perhitungan secara regresi linear dimana x adalah konsentrasi ($\mu\text{g/ml}$) dan y adalah presentase inhibisi (%). Nilai IC_{50} didapatkan dari nilai x setelah mengganti $y = 50$.

Contoh perhitungan:

Nilai IC_{50} fraksi etil asetat

$$y = 2,193x + 5,829$$

$$50 = 2,193x + 5,829$$

$$x = 20,142 \mu\text{g/ml}$$

Nilai IC_{50} fraksi etil asetat adalah 20,142 $\mu\text{g/ml}$

6. Penetapan Kadar Flavonoid Total

0,5 mL sampel uji dilarutkan 1,5 mL etanol ditambahkan 0,1 mL AlCl_3 10% ditambahkan 0,1 mL potasium asetat 1M ditambahkan 2,8 mL akuades, didiamkan 30 menit diukur absorbansinya pada panjang gelombang 415 nm, blangko dibuat sama dengan larutan uji dengan mengganti AlCl_3 10% dengan akuades (Khatiwora *et al.*, 2010).

7. Pembuatan AlCl_3 10% :

$$\frac{1000 \text{ mg}}{10 \text{ mL}} = 10 \%$$

8. Pembuatan potasium asetat :

$$\text{Molar} = \frac{\text{massa}}{\text{Mr}} \times \frac{1000}{\text{Volume (mL)}} ; \text{Mr potasium asetat} = 98,15$$

$$\frac{0,9815 \text{ g}}{10 \text{ mL}} = 1 \text{ M}$$

9. Pembuatan larutan standar kuersetin :

$$\frac{20 \text{ mg}}{5 \text{ mL}} \times 1000 \mu\text{g/ml} = 4000 \mu\text{g/ml}$$

$$\frac{0,625 \text{ mL}}{5 \text{ mL}} \times 4000 \mu\text{g/ml} = 500 \mu\text{g/ml}$$

$$\frac{0,2 \text{ mL}}{5 \text{ mL}} \times 500 \mu\text{g/ml} = 20 \mu\text{g/ml}$$

$$\frac{0,4 \text{ mL}}{5 \text{ mL}} \times 500 \mu\text{g/ml} = 40 \mu\text{g/ml}$$

$$\frac{0,6 \text{ mL}}{5 \text{ mL}} \times 500 \mu\text{g/ml} = 60 \mu\text{g/ml}$$

$$\frac{0,8 \text{ mL}}{5 \text{ mL}} \times 500 \mu\text{g/ml} = 80 \mu\text{g/ml}$$

$$\frac{1 \text{ mL}}{5 \text{ mL}} \times 500 \mu\text{g/ml} = 100 \mu\text{g/ml}$$

10. Pembuatan larutan ekstrak uji 200 $\mu\text{g/ml}$ (ekstrak etanol, fraksi n-heksana, fraksi til asetat, fraksi air) 2x replikasi :

$$\frac{50 \text{ mg}}{10 \text{ mL}} \times 1000 \mu\text{g/ml} = 5000 \mu\text{g/ml}$$

$$\frac{0,2 \text{ mL}}{5 \text{ mL}} \times 5000 \mu\text{g/ml} = 200 \mu\text{g/ml}$$

11. Pengamatan absorbansi standar kuersetin

Konsentrasi	Absorbansi	
	Replikasi 1	Replikasi 2
20	0,068	0,071
40	0,174	0,171
60	0,351	0,359
80	0,417	0,420
100	0,560	0,568

12. Pengamatan absorbansi sampel ekstrak dan fraksi daun kenari

Jenis sampel	konsentrasi	replikasi	Absorbansi
Ekstrak	200	1	0,260
etanol	200	2	0,262
Fraksi n- heksana	200	1	0,004
	200	2	0,008
Fraksi etil asetat	200	1	0,407
	200	2	0,408
Fraksi etanol-air	200	1	0,138
	200	2	0,137

Persamaan regresi kurva standar kuersetin:

$$y_1 = 0,0061x - 0,0541$$

$$r = 0,993; r^2 = 0,983$$

$$y_2 = 0,0062x - 0,0621$$

$$r = 0,991; r^2 = 0,982$$

Digunakan persamaan regresi pertama ($y = 0,0061x - 0,0541$ $r^2 = 0,983$)

Berdasarkan persamaan yang telah didapatkan, dapat diketahui nilai x atau kandungan flavonoid total larutan uji ekstrak dan fraksi daun kenari ekuivalen kuersetin dengan memasukkan nilai absorbansi sampel ekstrak dan fraksi daun kenari ke y. Berikut contoh penghitungannya:

$$Y = 0,006x - 0,054$$

$$0,260 = 0,006x - 0,054$$

$$x = 52,333 \mu\text{g QE/mL larutan uji}$$

Kemudian dapat dicari kadar dalam 5 mL larutan uji, selanjutnya dapat dicari kadar dalam larutan pengenceran dan larutan induk sampel sehingga dapat dicari kadar flavonoid total massa ekuivalen kuersetin per massa penimbangan sampel. Berikut contoh perhitungannya:

$$\text{Kadar dalam dalam 5 mL larutan uji} = 52,333 \mu\text{g QE/mL} \times 5 \text{ mL} = 261,665 \mu\text{g QE}$$

$$\text{Kadar dalam larutan pengenceran} = 261,665 \mu\text{g QE} \times \frac{5 \text{ mL}}{0,5 \text{ mL}} = 2.616,65 \mu\text{g QE}$$

Kadar dalam larutan induk $5000 \mu\text{g/ml} = 2.616,65 \mu\text{g QE} \times \frac{10 \text{ mL}}{0,2 \text{ mL}} = 130.832,5 \mu\text{g}$

QE

Kadar tiap gram ekstrak = $\frac{0,1308 \text{ g QE}}{0,05 \text{ g ekstrak}} = 2,616 \text{ g QE/g ekstrak}$

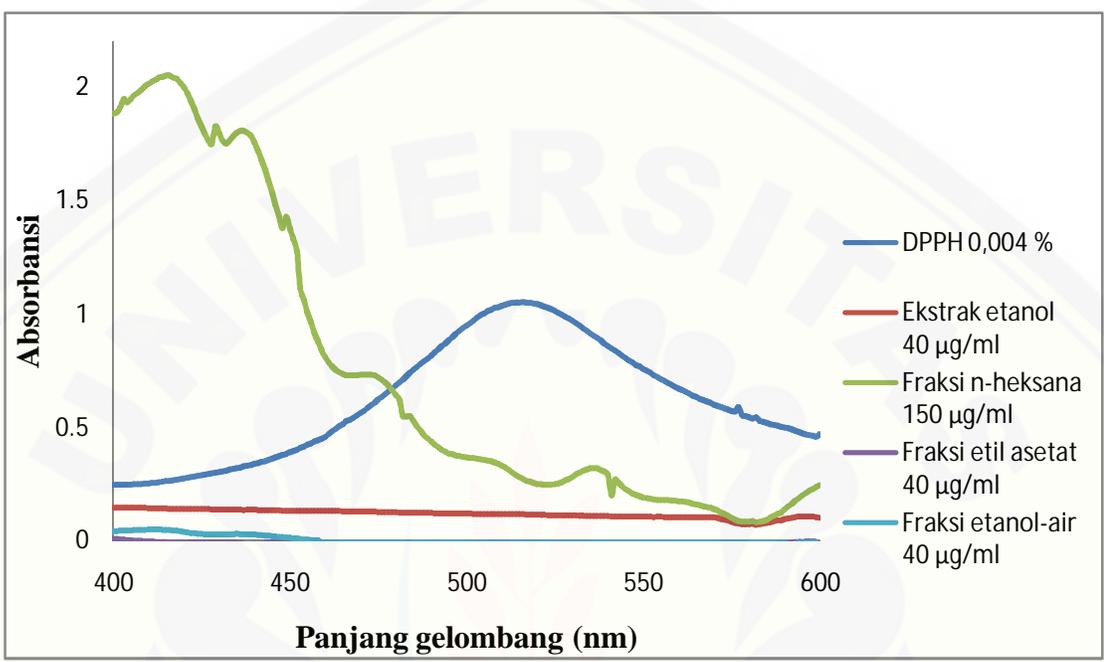
13. Perhitungan Simpangan Deviasi

$$SD = \sqrt{\frac{(a-x)^2 + (b-x)^2}{n-1}}$$

Contoh :

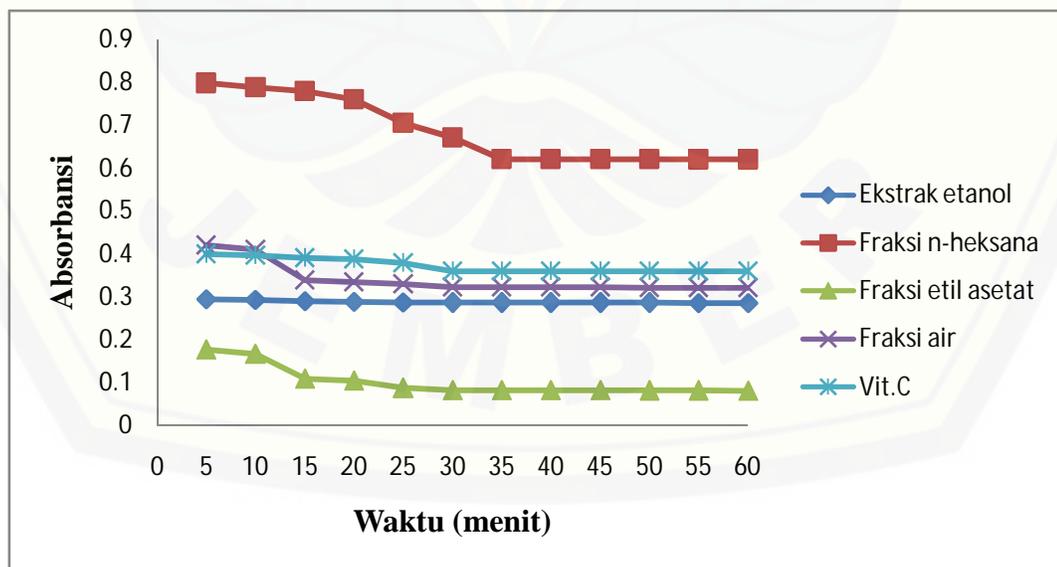
$$\begin{aligned} SD &= \sqrt{\frac{(2,616 - 2,624)^2 + (2,633 - 2,624)^2}{2-1}} \\ &= 0,012 \end{aligned}$$

LAMPIRAN E. PENENTUAN PANJANG GELOMBANG MAKSIMUM DPPH



LAMPIRAN F. PENENTUAN OPERATING TIME

Waktu	Absorbansi rata-rata				
	Ekstrak etanol	Fraksi n-heksana	Fraksi etil asetat	Fraksi air	Vitamin C
5	0,294	0,798	0,177	0,420	0,399
10	0,292	0,789	0,166	0,410	0,396
15	0,290	0,780	0,108	0,339	0,390
20	0,288	0,760	0,104	0,334	0,387
25	0,287	0,705	0,087	0,330	0,379
30	0,286	0,671	0,082	0,322	0,360
35	0,286	0,621	0,082	0,322	0,360
40	0,286	0,621	0,082	0,322	0,360
45	0,286	0,621	0,082	0,322	0,360
50	0,286	0,621	0,081	0,321	0,360
55	0,285	0,620	0,081	0,321	0,360
60	0,285	0,620	0,080	0,321	0,360



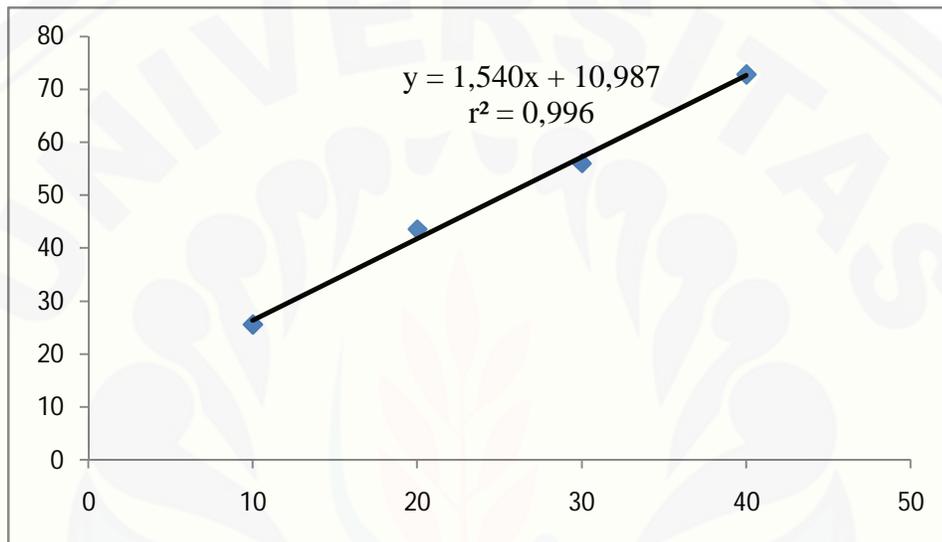
LAMPIRAN G. DATA PERSEN PEREDAMAN DPPH EKSTRAK DAN FRAKSI
DAUN KENARI

Sampel	Konsentrasi ($\mu\text{g/ml}$)	Absorbansi		% Peredaman DPPH		
		Kontrol DPPH	Sampel Rep.1	Sampel Rep.2	Sampel Rep.1	Sampel Rep.2
Eks.	10		0,785	0,783	25,592	25,782
Etanol	20	1,055	0,593	0,595	43,577	43,602
	30		0,464	0,462	56,018	56,208
	40		0,286	0,284	72,787	72,798
Frak.	75		0,906	0,905	13,796	13,891
n-hek	100	1,051	0,805	0,809	23,406	23,026
-sana	125		0,719	0,718	31,588	31,684
	150		0,621	0,618	40,913	41,198
Frak.	10		0,777	0,776	26,351	26,445
Etil asetat	20	1,055	0,513	0,511	51,374	51,564
	30		0,290	0,294	72,512	72,133
	40		0,079	0,080	92,512	92,417
Frak.	10		0,805	0,808	23,406	23,121
Etanol- air	20	1,051	0,676	0,675	35,680	35,775
	30		0,539	0,537	48,715	48,905
	40		0,324	0,323	69,172	69,267
Vit. C	3		0,787	0,785	25,402	25,592
	5	1,055	0,635	0,633	39,810	40,000
	7		0,492	0,491	53,364	53,459
	9		0,360	0,358	65,876	6,066

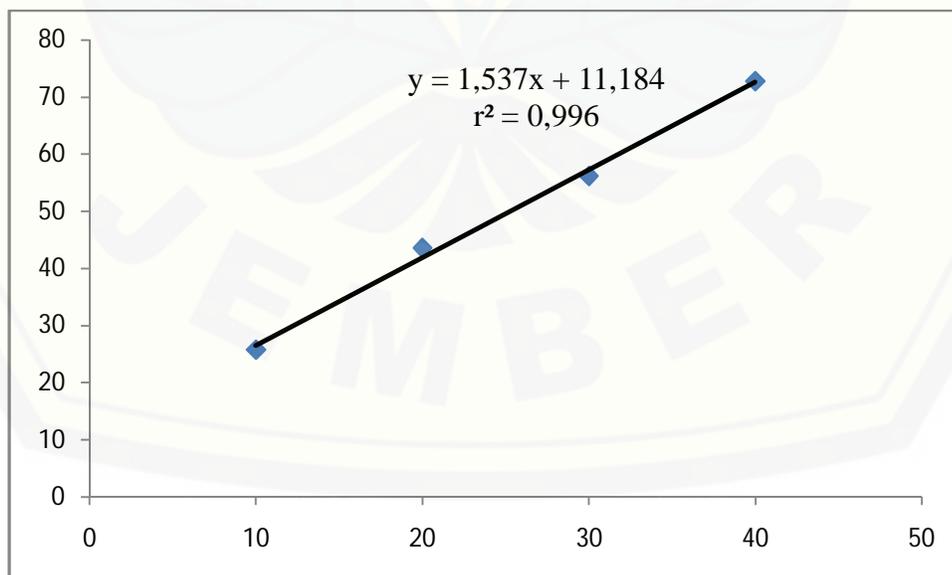
LAMPIRAN H. REGRESI KONSENTRASI ($\mu\text{g}/\text{mL}$) EKSTRAK DAN FRAKSI DAUN KENARI TERHADAP PERSEN PEREDAMAN DPPH (%)

LAMPIRAN H1. REGRESI KONSENTRASI ($\mu\text{g}/\text{mL}$) EKSTRAK ETANOL DAUN KENARI TERHADAP PERSEN PEREDAMAN DPPH (%)

Replikasi 1

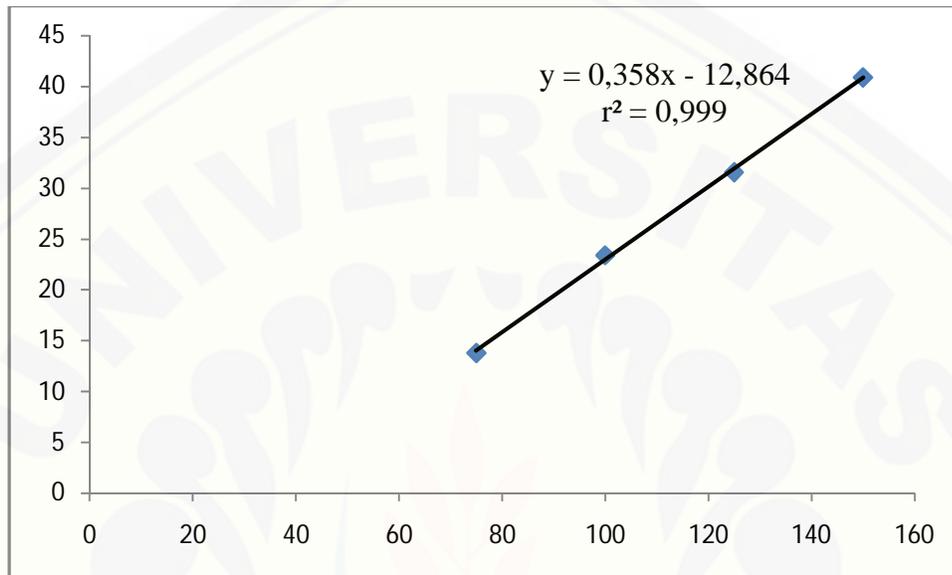


Replikasi 2

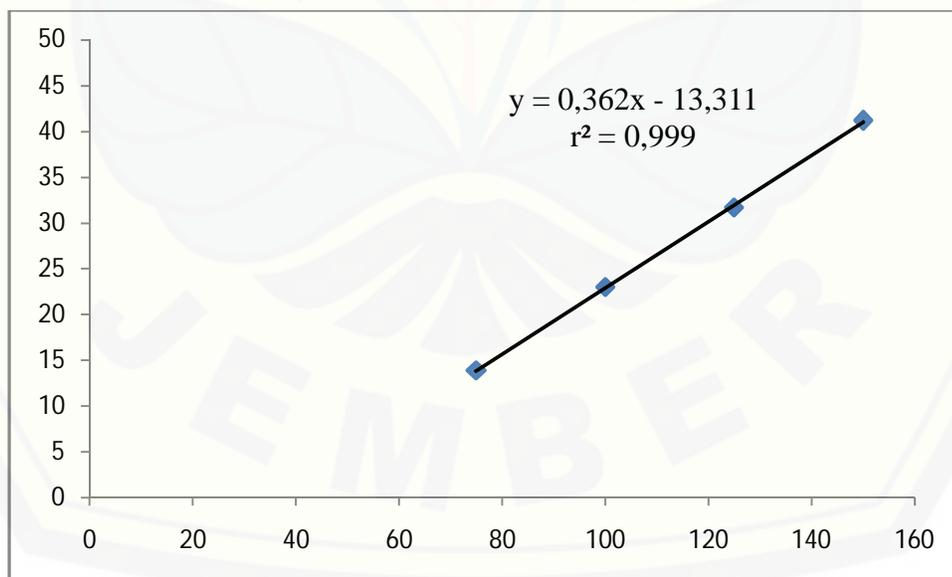


LAMPIRAN H2. REGRESI KONSENTRASI ($\mu\text{g/ml}$) FRAKSI N-HEKSANA EKSTRAK ETANOL DAUN KENARI TERHADAP PEREDAMAN DPPH (%)

Replikasi 1

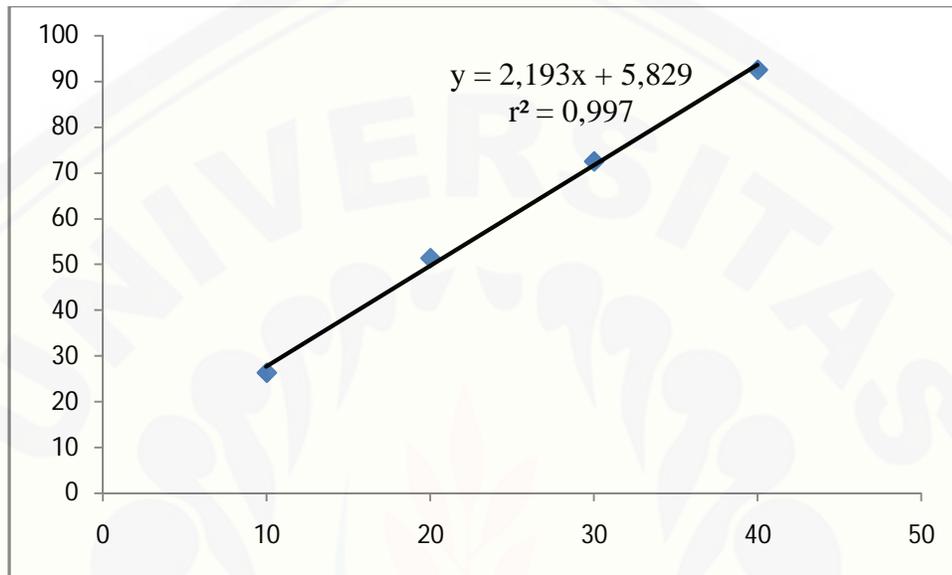


Replikasi 2

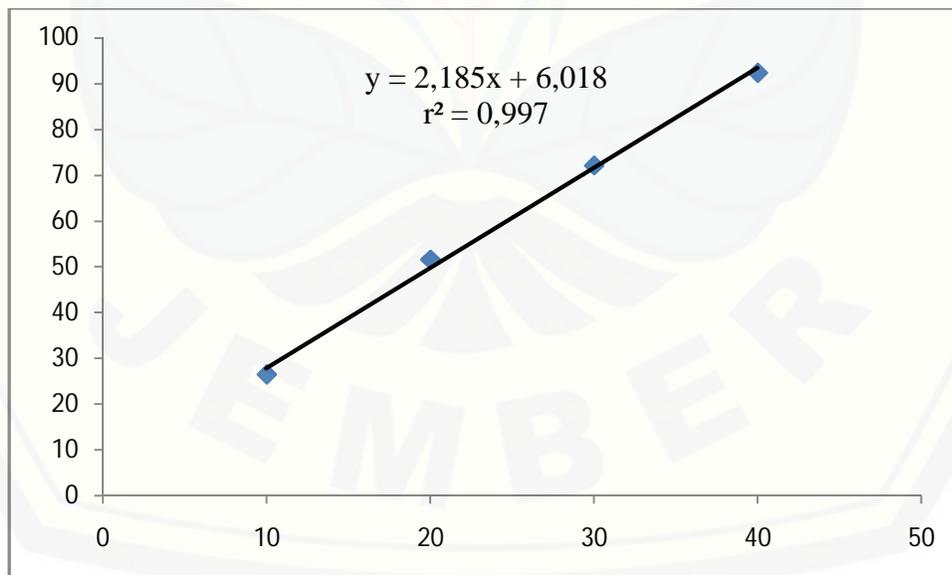


LAMPIRAN H3. REGRESI KONSENTRASI ($\mu\text{g/ml}$) FRAKSI ETIL ASETAT EKSTRAK ETANOL DAUN KENARI TERHADAP PEREDAMAN DPPH (%)

Replikasi 1

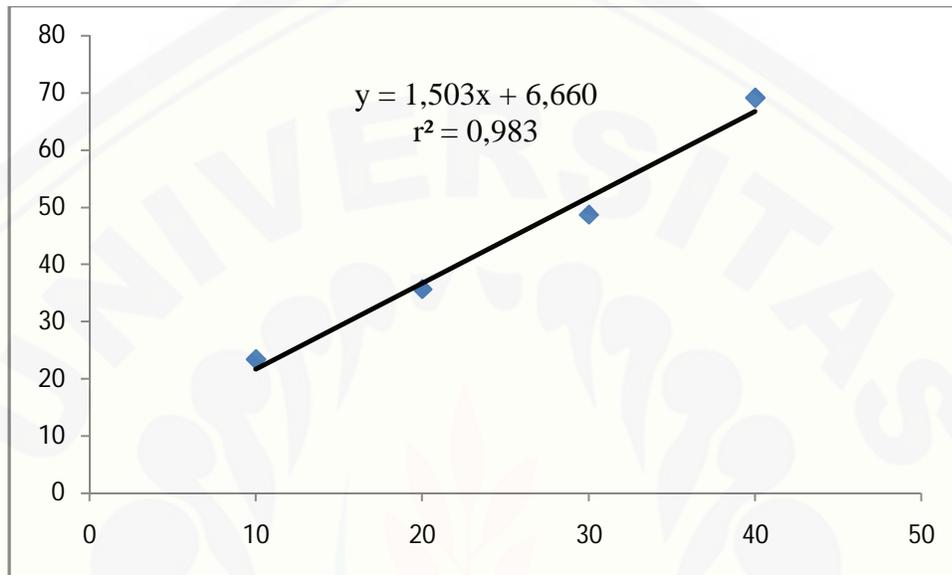


Replikasi 2

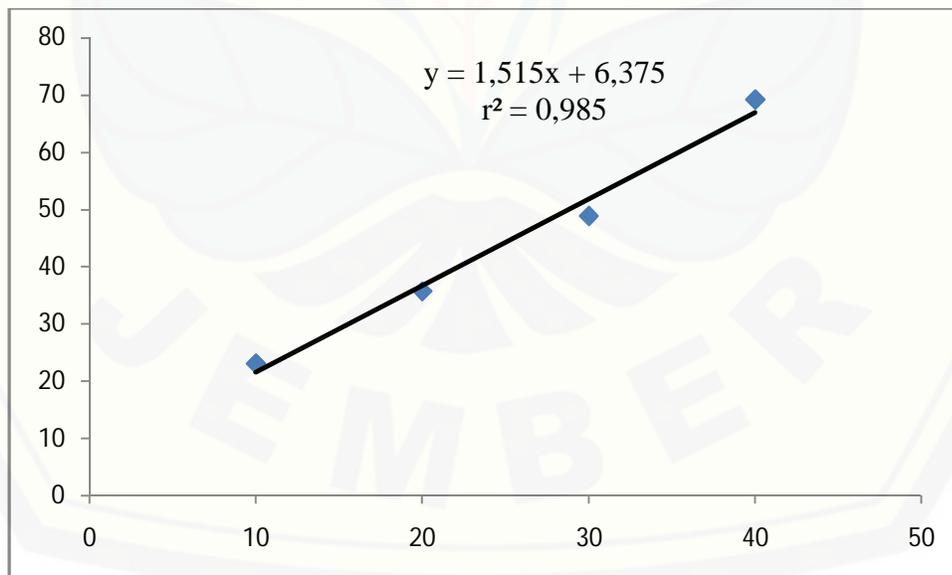


LAMPIRAN H4. REGRESI KONSENTRASI ($\mu\text{g/ml}$) FRAKSI ETANOL-AIR
EKSTRAK ETANOL DAUN KENARI TERHADAP PEREDAMAN DPPH (%)

Replikasi 1

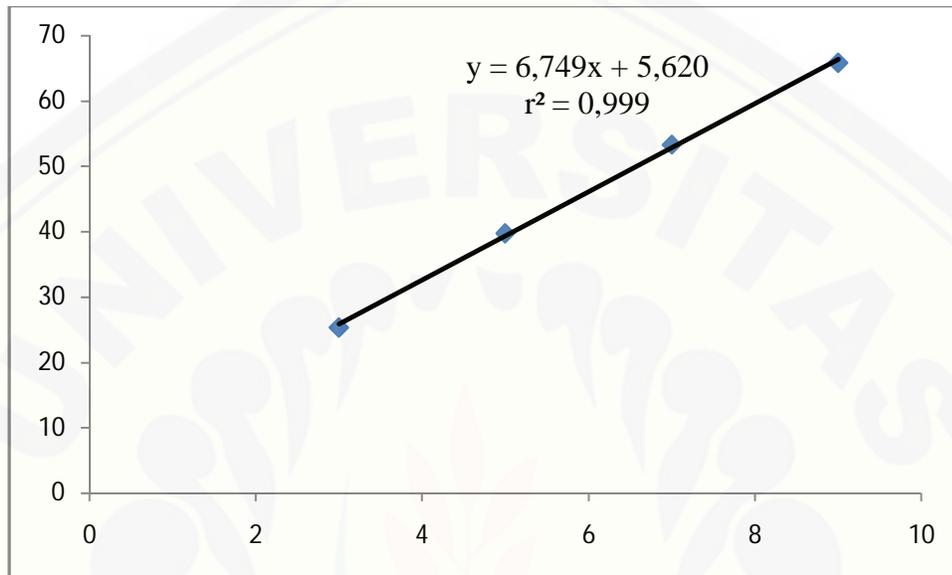


Replikasi 2

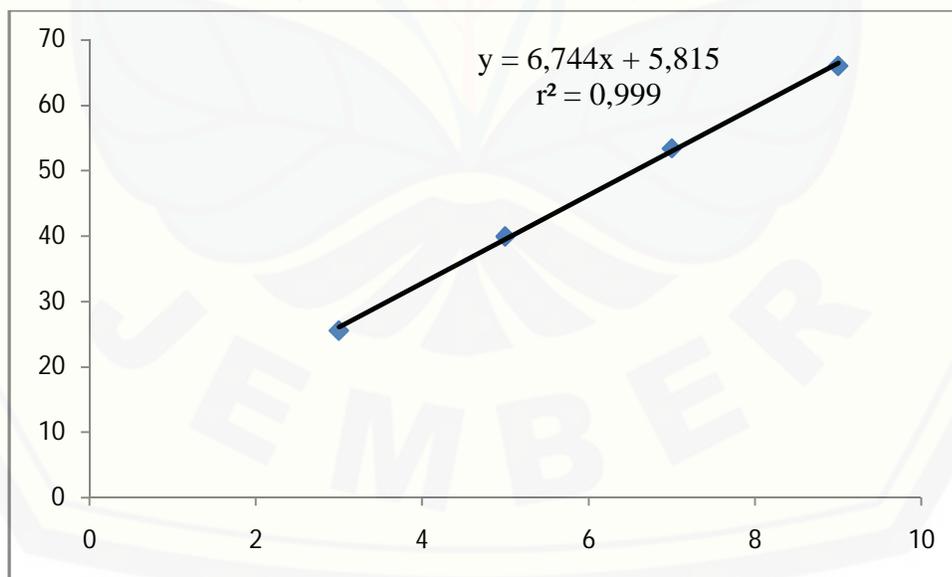


LAMPIRAN H5. REGRESI KONSENTRASI ($\mu\text{g/ml}$) VITAMIN C TERHADAP PEREDAMAN DPPH (%)

Replikasi 1



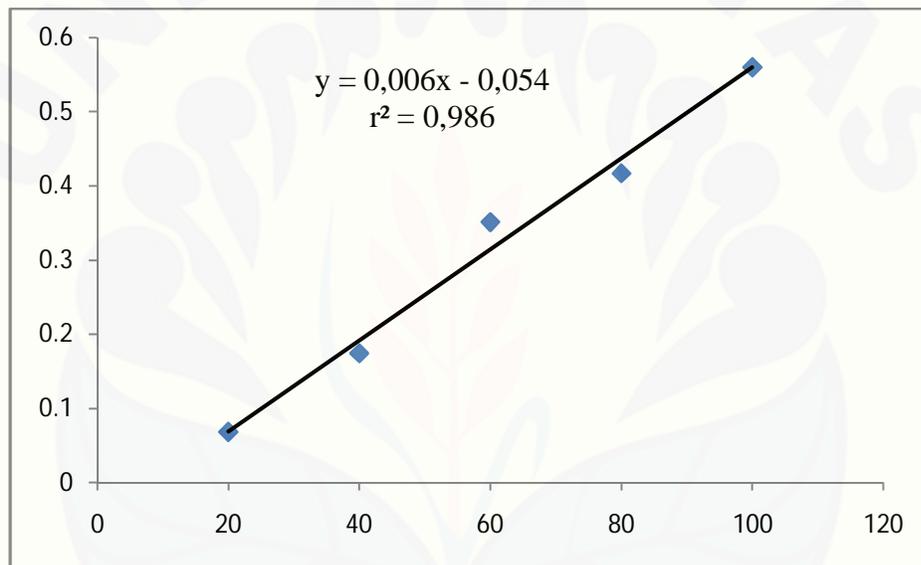
Replikasi 2



LAMPIRAN I. KADAR FLAVONOID TOTAL

I.1 KALIBRASI STANDAR KUERSETIN

Konsetrasi ($\mu\text{g/ml}$)	Absorbansi
20	0,068
40	0,174
60	0,351
80	0,417
100	0,560



Kurva kalibrasi standar kuersetin

I2. KADAR FLAVONOID TOTAL SAMPEL

Sampel	n	Kadar flavonoid total rata-rata (g QE/g ekstrak) \pm SD
Ekstrak etanol	2	2,624 \pm 0,012
Fraksi n-heksana	2	1,596 \pm 0,006
Fraksi etil asetat	2	3,846 \pm 0,006
Fraksi etanol-air	2	0,499 \pm 0023

LAMPIRAN J. KORELASI KADAR FLAVONOID TOTAL DENGAN AKTIVITAS ANTIOKSIDAN DAUN KENARI

