



**PERBEDAAN POTENSI ANTIOKSIDAN EKSTRAK  
DAUN GIRANG (*Leea indica*) DARI TAMAN  
NASIONAL MERU BETIRI DENGAN  
PELARUT N-HEKSAN, ETIL  
ASETAT DAN METANOL**

**SKRIPSI**

Oleh

**Rizka Kartikasari  
NIM 122010101063**

**FAKULTAS KEDOKTERAN  
UNIVERSITAS JEMBER  
2015**



**PERBEDAAN POTENSI ANTIOKSIDAN EKSTRAK  
DAUN GIRANG (*Leea indica*) DARI TAMAN  
NASIONAL MERU BETIRI DENGAN  
PELARUT N-HEKSAN, ETIL  
ASETAT DAN METANOL**

**SKRIPSI**

diajukan guna melengkapi tugas akhir dan memenuhi salah satu syarat untuk  
menyelesaikan Program Studi Ilmu Kedokteran (S1)  
dan mencapai gelar Sarjana Kedokteran

Oleh

**Rizka Kartikasari  
NIM 122010101063**

**FAKULTAS KEDOKTERAN  
UNIVERSITAS JEMBER  
2015**

**PERSEMBAHAN**

Skripsi ini saya persembahkan untuk:

1. Ayahku Drs. Suharmadi, Ibuku Sutriani, S.Pd. dan kakakku Asri Rina Hardiani, S.P yang tercinta;
2. guru-guruku sejak taman kanak-kanak hingga perguruan tinggi;
3. almamater Fakultas Kedokteran Universitas Jember.

**MOTO**

Allah tidak membebani seseorang melainkan sesuai dengan kesanggupannya.  
(terjemahan Surat *Al-Baqarah* ayat 286)<sup>\*)</sup>

Karena sesungguhnya sesudah kesulitan itu ada kemudahan, sesungguhnya sesudah kesulitan itu ada kemudahan. Maka apabila kamu telah selesai (dari sesuatu urusan), kerjakanlah dengan sungguh-sungguh (urusan) yang lain dan hanya kepada Tuhanmulah hendaknya kamu berharap.

(terjemahan Surat *Al-Insyirah* ayat 5-8)<sup>\*)</sup>

---

<sup>\*)</sup> Departemen Agama Republik Indonesia. 1998. Al Qur'an dan Terjemahannya. Semarang: PT. Kumudasmoro Grafindo.

**PERNYATAAN**

Saya yang bertandatangan di bawah ini:

nama : Rizka Kartikasari

NIM : 122010101063

menyatakan dengan sesungguhnya bahwa karya ilmiah yang berjudul “Perbedaan Potensi Antioksidan Ekstrak Daun Girang (*Leea indica*) dari Taman Nasional Meru Betiri dengan Pelarut N-Heksan, Etil Asetat dan Metanol” adalah benar-benar hasil karya sendiri, kecuali kutipan yang sudah saya sebutkan sumbernya, belum pernah diajukan pada institusi mana pun, dan 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 ada tekanan dan paksaan dari pihak mana pun serta bersedia mendapat sanksi akademik jika ternyata di kemudian hari pernyataan ini tidak benar.

Jember, 10 Desember 2015

Yang menyatakan,

Rizka Kartikasari  
NIM 122010101063

**SKRIPSI**

**PERBEDAAN POTENSI ANTIOKSIDAN EKSTRAK DAUN GIRANG  
(*Leea indica*) DARI TAMAN NASIONAL MERU BETIRI DENGAN  
PELARUT N-HEKSAN, ETIL ASETAT DAN METANOL**

Oleh

Rizka Kartikasari  
NIM 122010101063

Pembimbing

Dosen Pembimbing Utama : Dr.rer.biol.hum.dr. Erma Sulistyaningsih, M.Si

Dosen Pembimbing Anggota : dr. Erfan Efendi, Sp.An

**PENGESAHAN**

Skripsi berjudul “Perbedaan Potensi Antioksidan Ekstrak Daun Girang (*Leea indica*) dari Taman Nasional Meru Betiri dengan Pelarut N-Heksan, Etil Asetat dan Metanol” telah diuji dan disahkan pada:

hari, tanggal : Kamis, 10 Desember 2015

tempat Fakultas Kedokteran Universitas Jember

Tim Penguji

Penguji I,

Penguji II,

dr.Hairrudin, M.Kes  
NIP 19751011 200312 1 008

dr. Ancah Caesarina N.M, Ph.D  
NIP 198203092008122002

Penguji III,

Penguji IV,

Dr.rer.biol.hum.dr.Erma Sulistyaningsih,M.Si  
NIP 197702222002122001

dr. Erfan Efendi, Sp. An  
NIP 196803281999031001

Mengesahkan  
Dekan Fakultas Kedokteran Universitas Jember,

dr. Enny Suswati, M.Kes  
NIP 197002141999032001

## RINGKASAN

**Perbedaan Potensi Antioksidan Ekstrak Daun Girang (*Leea indica*) dari Taman Nasional Meru Betiri dengan Pelarut N-Heksan, Etil Asetat dan Metanol;** Rizka Kartikasari, 122010101063; 2015; 54 halaman; Fakultas Kedokteran Universitas Jember.

Banyak penyakit yang di sebabkan oleh radikal bebas. Radikal bebas adalah atom/kelompok atom yang mengandung satu atau lebih elektron yang tidak berpasangan sehingga menyebabkan senyawa tersebut sangat reaktif dan menyerang makromolekul penting seperti protein, asam nukleat, lipid dan lipoprotein. Beberapa penyakit yang diduga kuat berkaitan dengan radikal bebas antara lain aterosklerosis, diabetes melitus, kanker, malaria dan lain-lain. Antioksidan mampu menghambat reaksi oksidasi dengan cara mengikat radikal bebas sehingga senyawa radikal menjadi stabil dan kerusakan makromolekul dapat dicegah.

Tanaman girang (*Leea indica*) oleh penduduk di sekitar Taman Nasional Meru Betiri dipercaya sebagai tanaman obat. Di duga efek terapi tanaman girang oleh karena kandungannya yaitu senyawa fenol yang memiliki kepolaran beragam, berpotensi sebagai antioksidan. Tujuan umum penelitian ini adalah untuk mengetahui perbedaan potensi antioksidan ekstrak daun girang dengan pelarut n-heksan, etil asetat dan metanol. Tujuan khususnya adalah menentukan kandungan total fenol dan total flavonoid dari ekstrak daun girang dengan pelarut n-heksan, etil asetat dan metanol. Untuk mencapai tujuan tersebut, maka penelitian dilaksanakan di laboratorium *Center for Development of Advance Science and Technology*, Universitas Jember, selama bulan Agustus-Oktober 2015.

Penelitian ini menggunakan daun tanaman girang yang di ekstrak dengan metode maserasi bertingkat menggunakan berbagai pelarut sehingga diperoleh ekstrak kasar yang mengandung berturut-turut senyawa non polar, semi polar, dan

polar untuk menganalisis total fenol, flavonoid dan aktivitas antioksidan. Total fenol diukur berdasarkan metode Follin-Ciocalteu pada panjang gelombang 750 nm. Total flavonoid diukur berdasarkan metode kolorimetri menggunakan reagen aluminium klorida pada panjang gelombang 415 nm. Aktivitas antioksidan diukur berdasarkan metode peredaman radikal DPPH (*1,1-diphenyl-2-picrylhidrazyl*) yang hasilnya ditunjukkan dengan parameter persen peredaman radikal dan nilai  $IC_{50}$ . Metode pengujian aktivitas antioksidan juga diukur melalui metode peredaman radikal superoksida dan radikal hidroksil yang hasilnya ditunjukkan dengan parameter persen peredaman radikal. Analisis data hasil penelitian ini menggunakan uji statistik *one way ANOVA* dengan tingkat signifikansi  $p < 0,05$ .

Ekstrak metanol girang yang bersifat polar memiliki kadar total fenol dan total flavonoid tertinggi. Aktivitas antioksidan dengan uji DPPH menunjukkan bahwa ekstrak metanol girang memiliki potensi peredaman radikal DPPH yang paling baik karena memiliki nilai  $IC_{50}$  terkecil yaitu  $1,62 \pm 0,02$   $\mu\text{g GAE/mL}$ . Sedangkan uji peredaman radikal superoksida pada konsentrasi 5  $\mu\text{g GAE/mL}$  menunjukkan bahwa ekstrak etil asetat memiliki persen peredaman tertinggi ( $19,99 \pm 0,86\%$ ). Vitamin C dibandingkan dengan ekstrak daun girang memiliki aktivitas peredaman superoksida yang lebih baik. Kemampuan peredaman radikal hidroksil pada konsentrasi 5  $\mu\text{g GAE/mL}$  paling tinggi terdapat pada ekstrak metanol yang memiliki persen peredaman  $57,60 \pm 2,52\%$ .

Kesimpulan dari penelitian ini adalah ada perbedaan yang bermakna aktivitas antioksidan antara ekstrak daun girang dengan pelarut n-heksan, etil asetat dan metanol. Total fenol ekstrak daun girang dengan pelarut n-heksan, etil asetat dan metanol berturut-turut adalah  $5,27 \pm 0,19$  mg GAE/gram;  $111,9 \pm 0,65$  mg GAE/gram;  $267,56 \pm 2,01$  mg GAE/gram. Total flavonoid ekstrak daun girang dengan pelarut n-heksan, etil asetat dan metanol berturut-turut adalah  $6,97 \pm 0,06$  mg QE/gram;  $29,59 \pm 1,48$  mg QE/gram;  $101,9 \pm 3,24$  mg QE/gram.

## PRAKATA

Puji syukur kepada Allah Swt. yang telah melimpahkan rahmat dan hidayah-Nya sehingga penulis dapat menyelesaikan skripsi yang berjudul “Potensi Ekstrak Tanaman Obat Girang (*Leea indica*) dari Taman Nasional Meru Betiri sebagai Antioksidan”.

Kelancaran penyusunan skripsi ini tidak terlepas dari dukungan dan bantuan berbagai pihak. Penulis menyampaikan terima kasih kepada :

1. dr. Enny Suswati, M.Kes selaku Dekan Fakultas Kedokteran Universitas Jember
2. Dr.rer.biol.hum.dr. Erma Sulistyaningsih, M.Si selaku dosen pembimbing utama, dr. Erfan Efendi, Sp.An selaku dosen pembimbing anggota atas arahan, wawasan, motivasi dan bimbingan yang diberikan dalam penyusunan skripsi ini;
3. dr. Hairrudin, M.Kes dan dr. Ancah Chaesarina Novi Marchianti, Ph.D selaku dosen penguji yang telah meluangkan waktunya guna menguji, serta memberikan kritik dan saran demi kesempurnaan skripsi ini;
4. dr. Pipit Wulandari dan dr. Ali Santoso, Sp.PD selaku dosen pembimbing akademik yang telah membimbing selama penulis menjadi mahasiswa;
5. Prof. Tri Agus Siswoyo, SP., M.Agr., Ph.D atas bantuan dan telah menerima penulis untuk melaksanakan penelitian di laboratorium *Centre for Development of Advance Sciences and Technology* (CDAST) Universitas Jember;
6. Ayahku Drs. Suharmadi, Ibuku Sutriani, S.Pd., kakakku Asri Rina Hardiani, S.P, tanteku Sumartah serta M. Nadzir. atas dukungan semangat/motivasi, doa, nasehat, dan perhatian yang diberikan demi terselesaikannya skripsi ini;

7. teman-teman seperjuangan tim meru betiri, Calysta, Fitriyana, Zulviyati, Lilik D.W, Susilowati, Jainur R, Firdausia IR, Aulia A, dan Putri NR, atas saran, kerjasama dan bantuannya;
8. semua pihak yang telah membantu baik secara langsung maupun tidak langsung hingga terselesaikannya karya tulis ilmiah ini.

Penulis juga menerima saran dan kritik dari semua pihak demi kesempurnaan skripsi ini. Akhirnya, penulis berharap semoga skripsi ini dapat bermanfaat terutama untuk pengembangan wawasan bagi mahasiswa maupun pihak-pihak yang terkait.

Jember, 10 Desember 2015

Penulis

**DAFTAR ISI**

	Halaman
<b>HALAMAN JUDUL</b> .....	i
<b>HALAMAN PERSEMBAHAN</b> .....	ii
<b>HALAMAN MOTO</b> .....	iii
<b>HALAMAN PERNYATAAN</b> .....	iv
<b>HALAMAN PEMBIMBINGAN</b> .....	v
<b>HALAMAN PENGESAHAN</b> .....	vi
<b>RINGKASAN</b> .....	vii
<b>PRAKATA</b> .....	ix
<b>DAFTAR ISI</b> .....	xi
<b>DAFTAR GAMBAR</b> .....	xiv
<b>DAFTAR LAMPIRAN</b> .....	xv
<b>BAB 1. PENDAHULUAN</b> .....	1
<b>1.1 Latar Belakang</b> .....	1
<b>1.2 Rumusan Masalah</b> .....	3
<b>1.3 Tujuan Penelitian</b> .....	3
1.3.1 Tujuan Umum .....	3
1.3.2 Tujuan Khusus .....	3
<b>1.4 Manfaat</b> .....	4
<b>BAB 2. TINJAUAN PUSTAKA</b> .....	5
<b>2.1 Tanaman Girang (<i>Leea indica</i>)</b> .....	5
<b>2.2 Senyawa Fenol</b> .....	7
<b>2.3 Flavonoid</b> .....	8
<b>2.4 Radikal bebas</b> .....	9
<b>2.5 Antioksidan</b> .....	12

<b>2.6 Penyakit Akibat Radikal Bebas</b> .....	14
<b>2.7 Ekstraksi</b> .....	16
<b>2.8 Prinsip Analisis Antioksidan</b> .....	17
2.8.1 Analisis Total Fenol .....	17
2.8.2 Analisis Total Flavonoid .....	18
2.8.3 Analisis Peredaman Radikal DPPH .....	19
2.8.4 Analisis Peredaman Radikal Anion Superoksida .....	21
2.8.5 Analisis Peredaman Radikal Hidroksil.....	22
<b>2.9 Kerangka konseptual</b> .....	24
<b>2.10 Hipotesis</b> .....	25
<b>BAB 3. METODE PENELITIAN</b> .....	26
<b>3.1 Jenis Penelitian</b> .....	26
<b>3.2 Waktu dan Tempat</b> .....	26
<b>3.3 Variabel Penelitian</b> .....	26
<b>3.4 Definisi Operasional</b> .....	27
<b>3.5 Bahan dan Alat</b> .....	28
<b>3.6 Metode</b> .....	29
3.6.1 Penyiapan bahan .....	29
3.6.2 Ekstraksi Sampel.....	29
3.6.3 Penentuan Kandungan Total Fenol.....	30
3.6.4 Penentuan Kandungan Flavonoid .....	31
3.6.5 Penentuan Aktifitas Antioksidan .....	31
<b>3.7 Analisis Data</b> .....	33
<b>3.8 Alur Penelitian</b> .....	34
<b>BAB 4. HASIL DAN PEMBAHASAN</b> .....	35
<b>4.1 Analisis Total Fenol dan Total Flavonoid</b> .....	35
4.1.1 Ekstraksi Daun Girang .....	35
4.1.2 Analisis Total Fenol .....	36
4.1.3 Analisis Total Flavonoid .....	38
<b>4.2 Analisis Antioksidan</b> .....	40

4.2.1 Analisis Peredaman Radikal DPPH ( <i>1,1-diphenyl-2-picrylhydrazil</i> ).....	40
4.2.2 Analisis Peredaman Radikal Superoksida.....	42
4.2.3 Analisis Peredaman Radikal Hidroksil .....	45
4.2.4 Statistik Potensi Antioksidan.....	46
<b>BAB 5. PENUTUP</b> .....	49
<b>5.1 Kesimpulan</b> .....	49
<b>5.2 Saran</b> .....	49
<b>DAFTAR PUSTAKA</b> .....	50
<b>LAMPIRAN</b> .....	55

**DAFTAR GAMBAR**

	Halaman
2.1 Tanaman girang.....	5
2.2 Struktur dasar Fenol.....	7
2.3 Struktur kimia flavonoid.....	8
2.4 Reaksi pembentukan warna dari <i>quercetin</i> .....	19
2.5 Struktur DPPH.....	20
2.6 Reaksi autooksidasi <i>pyrogallol</i> .....	21
2.7 Mekanisme reaksi peredaman radikal anion superoksida oleh <i>quercetin</i> .....	22
2.8 Reaksi reduksi ion $Fe^{3+}$ oleh asam askorbat.....	22
2.9 Reaksi radikal hidroksil dengan <i>2-deoxy-D-ribose</i> .....	23
2.10 Reaksi pembentukan MDA-TBA <i>adduct</i> yang berwarna merah muda .....	23
4.1 Total fenol ekstrak.....	37
4.2 Total flavonoid ekstrak.....	39
4.3 Nilai $IC_{50}$ masing-masing ekstrak dan vitamin C.....	41
4.4 Persen peredaman radikal anion superoksida.....	43
4.5 Persen peredaman radikal hidroksil.....	45
4.6 Perbandingan peredaman radikal.....	47

DAFTAR LAMPIRAN

	Halaman
1. Validasi Tanaman Girang ( <i>Leea indica</i> ).....	55
2. Perhitungan Rendemen Maserasi Daun Girang .....	56
3. Konsentrasi Ekstrak untuk Analisis Total Fenol dan Flavonoid.....	56
4. Kurva standar <i>Gallic acid</i> dan Total Fenol Ekstrak.....	56
5. Kurva Standar <i>Quercetin</i> dan Total Flavonoid Ekstrak.....	57
6. Nilai IC <sub>50</sub> Radikal DPPH.....	58
7. Perbandingan Nilai IC <sub>50</sub> Radikal DPPH Ekstrak Daun Girang dengan Pelarut N-Heksan, Etil Asetat, Metanol dan Vitamin C.....	59
8. Persen Peredaman Radikal Anion Superoksida.....	60
9. Perbandingan Persen Peredaman Radikal Superoksida Ekstrak Daun Girang dengan Pelarut N-Heksan, Etil Asetat, Metanol dan Vitamin C.....	61
10. Persen Peredaman Radikal Hidroksil.....	61
11. Perbandingan Persen Peredaman Radikal Hidroksil Ekstrak Daun Girang dengan Pelarut N-Heksan, Etil Asetat, Metanol dan Vitamin C.....	62

## BAB 1. PENDAHULUAN

### 1.1 Latar Belakang

Banyak penyakit dalam tubuh manusia disebabkan oleh adanya radikal bebas. Radikal bebas adalah setiap atom atau kelompok atom yang hadir secara mandiri dan mengandung setidaknya satu elektron yang tidak berpasangan. Adanya elektron yang tidak berpasangan menyebabkan senyawa tersebut sangat reaktif mencari pasangan, dengan cara menyerang dan mengikat elektron molekul yang berada disekitarnya agar konfigurasinya menjadi stabil (Youngson, 2005).

Menurut Winarsi (2007) target utama radikal bebas adalah protein, asam lemak tak jenuh dan lipoprotein serta DNA termasuk polisakaridanya. Asam lemak tak jenuh adalah yang paling rentan. Radikal bebas akan merusak lemak tak jenuh ganda pada membran sel sehingga dinding sel menjadi rapuh, merusak pembuluh darah dan menimbulkan aterosklerosis. Radikal bebas juga merusak basa DNA sehingga mengacaukan sistem informasi genetika dan membentuk sel kanker. Jaringan lipid juga akan dirusak oleh senyawa radikal bebas sehingga terbentuk peroksida dan menimbulkan penyakit degeneratif.

Dalam tubuh kita terbentuk radikal bebas secara terus menerus, baik melalui metabolisme sel normal, peradangan dan kekurangan gizi dan akibat respons terhadap pengaruh dari luar tubuh, seperti polusi lingkungan, ultraviolet, asap rokok dan lain-lain. Bila radikal bebas atau oksidan dihasilkan oleh tubuh secara berlebihan, maka bahan tersebut akan dinetralisir oleh anti radikal bebas atau antioksidan yang dikenal dengan *scavenger enzyme*, seperti superoksida dismutase (SOD), katalase atau glutathion peroksidase. Antioksidan mampu menghambat reaksi oksidasi dengan cara mengikat radikal bebas dan molekul yang sangat reaktif sehingga senyawa radikal menjadi stabil dan kerusakan sel dapat dicegah. Apabila rasio antara radikal bebas atau oksidan lebih besar

daripada antiradikal bebas atau antioksidan, maka keadaan ini dikenal sebagai stres oksidatif (Sudiana, 2008).

Tubuh manusia tidak mempunyai cadangan antioksidan dalam jumlah berlebih, sehingga jika terjadi paparan radikal bebas berlebih maka tubuh membutuhkan antioksidan eksogen. Antioksidan dapat pula diperoleh dari bahan-bahan alami yang merupakan hasil isolasi bahan alam dan antioksidan sintetik misalnya *butylated hydroxytoluen* (BHT), *butylated hydroxyanisole* (BHA) dan *tersier butil hidroksi quinolin* (TBHQ). Tetapi saat ini penggunaan antioksidan sintetik mulai dibatasi karena dikhawatirkan memiliki beberapa efek samping. Menurut Hartoyo (2003) TBHQ dilarang penggunaannya di beberapa negara seperti Eropa, Jepang, dan Kanada, sedangkan BHA dan BHT diduga bersifat karsinogenik dan dapat meracuni binatang percobaan (Umemura *et al*, 2002). Adanya kekhawatiran akan kemungkinan efek samping dari antioksidan sintetik menyebabkan antioksidan alami menjadi alternatif yang sangat dibutuhkan. Hal ini yang mendorong berbagai penelitian untuk menemukan sumber antioksidan baru yang berasal dari alam.

Kawasan Taman Nasional Meru Betiri (TNMB) hingga saat ini memiliki 518 jenis flora yang telah teridentifikasi. Sebanyak 239 jenis merupakan bahan baku obat tradisional, salah satunya adalah Girang (Balai Taman Nasional Meru Betiri, 2014). Tanaman girang oleh penduduk lokal di sekitar Taman Nasional Meru Betiri dipercaya sebagai tanaman obat. Menurut Zuhud (2013) akar girang berguna sebagai obat antifungi, malaria, dan sakit perut; bunganya berguna sebagai obat bisul di jari; daunnya berguna untuk mengobati bisul, jantung berdebar, kepala pusing, keseleo, luka, perawatan nifas, dan sakit kepala; kayunya dapat digunakan sebagai obat hipakusis dan luka, sedangkan kulit batangnya berguna sebagai antiracun ular. Di duga efek-efek terapi tanaman girang oleh karena kandungannya, salah satunya senyawa yang memiliki aktivitas antioksidan. Senyawa aktif yang terdapat dalam tanaman girang kemungkinan berasal dari golongan fenol. Senyawa golongan fenol kepolarannya beragam karena memiliki struktur yang beragam (Bouterfas *et al*, 2014). Akan tetapi informasi dan penelitian mengenai kandungan dan potensi tanaman girang (Leea

*indica*) masih terbatas, sehingga perlu dilakukan penelitian lebih lanjut mengenai kandungan dan potensi antioksidan tanaman tersebut.

Oleh karena itu, peneliti tertarik untuk meneliti kandungan total fenol, flavonoid dan aktivitas antioksidan dari ekstrak daun girang menggunakan berbagai pelarut yang berbeda kepolarannya yaitu n-heksan (pelarut non polar), etil asetat (pelarut semi polar) dan metanol (pelarut polar). Nilai total fenol dan total flavonoid digunakan sebagai satuan dasar untuk menganalisis potensi antioksidan ekstrak daun girang.

## **1.2 Rumusan Masalah**

Berdasarkan latar belakang di atas, maka dapat disusun rumusan masalah sebagai berikut: Apakah ada perbedaan potensi antioksidan ekstrak daun girang dengan pelarut n-heksan, etil asetat dan metanol?

## **1.3 Tujuan Penelitian**

Penelitian ini memiliki tujuan umum dan khusus. Tujuan dari penelitian ini adalah sebagai berikut:

### **1.3.1 Tujuan Umum**

Tujuan umum penulisan karya tulis ini adalah untuk mengetahui perbedaan potensi antioksidan ekstrak daun girang dengan pelarut n-heksan, etil asetat dan metanol.

### **1.3.2 Tujuan Khusus**

Tujuan khusus penulisan karya tulis ini adalah untuk:

- a. menentukan kandungan total fenol dan total flavonoid dari ekstrak daun girang dengan pelarut n-heksan;
- b. menentukan kandungan total fenol dan total flavonoid dari ekstrak daun girang dengan pelarut etil asetat;
- c. menentukan kandungan total fenol dan total flavonoid dari ekstrak daun girang dengan pelarut metanol.

#### **1.4 Manfaat**

Penelitian ini diharapkan dapat:

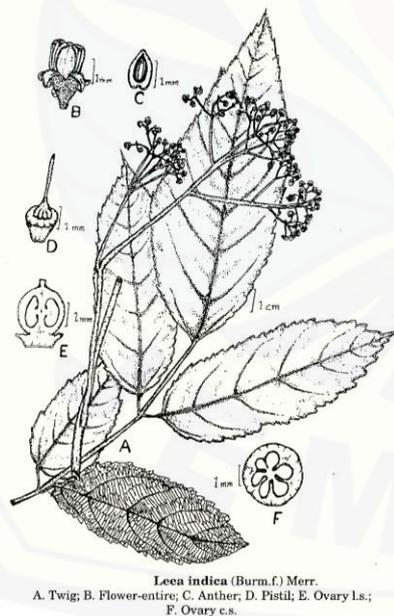
- a. memberikan informasi yang bermanfaat bagi masyarakat dan peneliti terhadap potensi ekstrak daun girang sebagai antioksidan;
- b. memberikan informasi pengaruh jenis pelarut dengan tingkat kepolaran yang berbeda terhadap nilai rendemen dan potensinya sebagai antioksidan.



## BAB 2. TINJAUAN PUSTAKA

### 2.1 Tanaman Girang (*Leea indica*).

*Leea indica*, umumnya dikenal sebagai Girang di Indonesia, sering digunakan sebagai obat alami dalam pengobatan tradisional oleh masyarakat setempat. Girang dapat ditemukan di daerah tropis dan subtropis seperti Indonesia, Thailand, Malaysia, India dan Cina. Girang diklasifikasikan ke dalam divisi Spermatophyta, subdivisi Angiospermae, kelas Dicotyledoneae, bangsa Rhamnales, suku Leaceae, marga *Leea*, jenis *Leea indica* (Burm. f.) Merr (Zuhud, 2013). Sketsa tanaman Girang ditunjukkan oleh Gambar 2.1 (a) (Indian Institute of Science) dan gambar 2.1 (b) menunjukkan foto tanaman girang.



(a)



(b)

Gambar 2.1 Tanaman girang (a) Sketsa (b) Foto

Secara morfologi, girang merupakan perdu dengan tinggi 5 m. Batang tegak, berkayu, bulat, bekas melekatnya daun tampak jelas, dan berwarna hijau. Daun hijau, majemuk, berseling, lonjong, pertulangan menyirip, panjang 8-16 cm, lebar 3-7 cm, dan bertangkai bulat. Bunga berwarna hijau, majemuk, berkelamin dua, berbentuk payung, di ketiak daun, kelopak berbentuk bintang, mahkota berbentuk torong, kepala sari berwarna putih. Buah buni, bulat, dan berwarna hitam. Biji bulat dan berwarna putih. Akar tunggang dan berwarna coklat. Girang tumbuh di hutan campuran dan hutan jati, kadang-kadang ditemukan di semak belukar. Jenis ini tersebar dari dataran rendah sampai ketinggian tempat 1.700 m dpl (Zuhud, 2013).

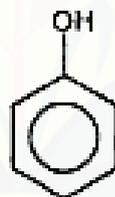
Suharmiati (2005) menyatakan bahwa daun, buah dan akar *Leea indica* mengandung flavonoida, di samping itu daun dan akarnya mengandung saponin, daunnya mengandung polifenol, buah serta akarnya juga mengandung tanin. Daun girang bermanfaat sebagai obat pusing. Sedangkan menurut Zuhud (2013) akar girang berguna sebagai obat antifungi, malaria, dan sakit perut; bunganya berguna sebagai obat bisul di jari; daunnya berguna untuk mengobati bisul, jantung berdebar, kepala pusing, keseleo, luka, perawatan nifas, dan sakit kepala; kayunya dapat digunakan sebagai obat hipakusis dan luka, sedangkan kulit batangnya berguna sebagai antiracun ular.

Daun girang sering digunakan sebagai obat tradisional, akan tetapi informasi dan penelitian mengenai tanaman girang (*Leea indica*) masih terbatas. Srinivasan *et al* (2008) berhasil mengidentifikasi 23 senyawa kimia dari ekstrak metanol daun girang dengan analisis GC-MS, teknik spektroskopi dan co-TLC. Senyawa yang teridentifikasi termasuk 11 hidrokarbon, asam ftalat, asam palmitat, 1-icosanol, solanesol, farnesol, 3 ester asam ftalat, asam galat, lupeol, sitosterol dan asam ursolat. Asam galat diisolasi sebagai *n-butyl galat*. Dari penelitian yang telah dilakukan terhadap *Leea indica*, diperoleh beberapa senyawa yang memiliki aktivitas biologis dan farmakologis seperti antimikroba (Srinivasan, *et al*, 2009 dan Rahman *et al*, 2012), sedatif-anxiolitik (Raihan *et al.*, 2011), penghambatan pertumbuhan sel kanker (Wong dan Abdul Kadir, 2011 dan Raihan *et al*, 2012), efek sitotoksik (Rahman *et al*, 2012, Paul *et al*, 2012, dan

Wong *et al*, 2011), anti hiperglikemik dan hipolipidemik (Dalu *et al*, 2014). Saha *et al* (2004) melaporkan bahwa ekstrak metanol daun *L. indica* memiliki aktivitas antioksidan yang kuat. Aktivitas antioksidan dalam penelitian tersebut diukur dengan menggunakan FTC (*Ferri Tiosianat*), TBA (*asam thiobarbiturat*) dan peredaman radikal DPPH. Hal ini juga diperkuat oleh Rahman *et al* (2012) yang menyebutkan bahwa ekstrak etanol *Leea indica* berpotensi sebagai antioksidan. Selain itu, menurut Reddy *et al* (2012) daun girang memiliki jumlah senyawa fenol yang tinggi dan mempunyai aktivitas antioksidan yang kuat. Aktivitas antioksidan dari ekstrak berkorelasi baik dengan total fenol dan hal ini menunjukkan bahwa senyawa fenol merupakan kontributor yang paling dominan dari aktivitas antioksidan ekstrak daun girang.

## 2.2 Senyawa Fenol

Fenol adalah suatu senyawa aromatik, yang struktur kimianya diturunkan dari benzena jika satu atau lebih atom hidrogen yang terikat pada inti benzena diganti dengan satu atau lebih gugus hidroksil. Struktur dasar fenol ditunjukkan gambar 2.2 (Sumardjo, 2008).



Fenol

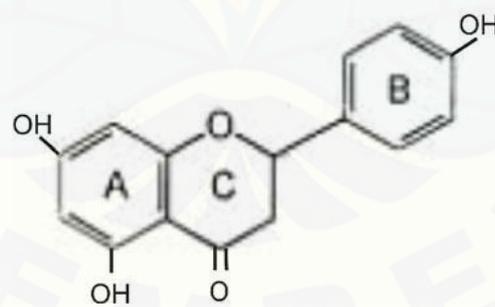
Gambar 2.2 Struktur dasar Fenol

Senyawa fenol biasanya terdapat dalam berbagai jenis sayuran, buah-buahan dan tanaman. Senyawa fenol diproduksi oleh tanaman melalui jalur sikimat dan metabolisme fenil propanoid (Apak *et al.*, 2007). Senyawa aktif yang terdapat dalam tanaman Girang kemungkinan berasal dari golongan fenol. Fenol merupakan salah satu kelompok besar senyawa metabolit sekunder yang umumnya dijumpai pada tanaman tingkat tinggi.

Beberapa senyawa fenol telah diketahui fungsinya. Misalnya lignin sebagai pembentuk dinding sel dan antosianin sebagai pigmen. Namun beberapa lainnya hanya sebatas dugaan sementara. Senyawa fenol diduga mempunyai aktivitas antioksidan, antitumor, antiviral, dan antibiotik. Semua senyawa fenol merupakan senyawa aromatik sehingga semua menunjukkan serapan kuat terhadap spektrum UV. Fenol dapat dibagi menjadi 2 kelompok, yaitu fenol sederhana dan polifenol. Contoh fenol sederhana : *orsinol*, *4-metilresolsinol*, *2-metilresolsinol*, *resolsinol*, *katekol*, *hidrokuinon*, *pirogalol* dan *floroglusinol*. Contoh polifenol adalah *lignin*, *melanin* dan *tanin* (Apak et al., 2007).

### 2.3 Flavonoid

Flavonoid merupakan salah satu jenis komponen yang terkandung dalam tanaman. Flavonoid adalah komponen yang mempunyai berat molekul rendah, dan pada dasarnya merupakan *phenylbenzopyrones* (*phenylchromones*) dengan berbagai variasi pada struktur dasarnya, yaitu tiga cincin utama yang saling melekat. Struktur dasar ini terdiri dari dua cincin benzene (A dan B) yang dihubungkan melalui cincin heterosiklik piran atau piron (dengan ikatan ganda) yang disebut cincin "C". Struktur dasar flavonoid adalah rangkaian cincin karbon C<sub>6</sub>-C<sub>3</sub>-C<sub>6</sub> ditunjukkan pada gambar 2.3 (Middleton et al., 2000).



Gambar 2.3 Struktur kimia flavonoid

Flavonoid sering pula disebut bioflavonoid, yaitu merupakan kelompok pigmen tanaman yang memberikan perlindungan terhadap serangan radikal bebas yang merusak. Senyawa ini berperan dalam memberikan warna pada buah dan bunga. Pada manusia, flavonoid berfungsi sebagai anti peradangan, antialergi,

antivirus, antioksidan dan antikarsinogenik. Flavonoid merupakan komponen fenol (Wirakusumah, 2010).

#### 2.4 Radikal bebas

Radikal bebas adalah setiap atom atau kelompok atom yang hadir secara mandiri dan mengandung setidaknya satu elektron yang tidak berpasangan. (Youngson, 2005). Adanya elektron tidak berpasangan menyebabkan senyawa tersebut sangat reaktif mencari pasangan. Radikal bebas ini akan merebut elektron dari molekul lain yang ada di sekitarnya untuk menstabilkan diri. Radikal bebas erat kaitannya dengan kerusakan sel, kerusakan jaringan, dan proses penuaan (Fessenden dan Fessenden, 1986).

Radikal bebas akan menyerang biomakromolekul penting dalam tubuh seperti komponen penyusun sel, yaitu protein, asam nukleat, lipid dan polisakarida. Winarsi (2007) menyatakan bahwa target utama radikal bebas adalah protein, asam lemak tak jenuh dan lipoprotein serta DNA termasuk polisakaridanya. Asam lemak tak jenuh adalah yang paling rentan. Radikal bebas akan merusak lemak tak jenuh ganda pada membran sel sehingga dinding sel menjadi rapuh, merusak pembuluh darah dan menimbulkan aterosklerosis. Radikal bebas juga merusak basa DNA sehingga mengacaukan sistem informasi genetika dan membentuk sel kanker. Jaringan lipid juga akan dirusak oleh senyawa radikal bebas sehingga terbentuk peroksida dan menimbulkan penyakit degeneratif.

Tubuh dalam keadaan fisiologis menghasilkan ROS (*Reactive Oxygen Species*). Menurut Sudiana (2008) sumber penghasil ROS antara lain mitokondria, fagosit, *xanthine oxydase*, peroksisome, iskemi, jalur pada pembentukan asam arakhidonat, dan sebagainya. Bahan tersebut dihasilkan oleh tubuh untuk membunuh bakteri yang masuk ke dalam tubuh. Namun bila radikal bebas atau oksidan dihasilkan oleh tubuh secara berlebihan, maka bahan tersebut akan dinetralkan oleh anti radikal bebas atau antioksidan yang dikenal dengan *scavenger enzyme*, seperti superoksida dismutase (SOD), katalase atau glutathion

peroksidase. Apabila terjadi ketidakseimbangan antara oksidan dengan antioksidan, maka keadaan ini dikenal sebagai stress oksidatif.

Bagi manusia, oksigen adalah zat yang penting sekaligus toksik. Struktur elektronik oksigen ( $O_2$ , dioksigen) merupakan penyebab paradoks ini. Oksigen molekular memiliki dua elektron tidak berpasangan dengan keadaan putaran paralel. Putaran paralel anti-pengikatan mencegah organisme C-H seperti manusia, secara spontan menjadi panas dan terbakar di atmosfer  $O_2$ . Bahkan, oksidasi dapat terjadi melalui pemindahan elektron tunggal  $O_2$  melalui enzim yang mengandung logam transisi (misal  $Fe^{2+}$  dan  $Cu^+$  dalam sitokrom oksidase). Namun, konsekuensi lain dari sifat  $O_2$  yang biradikal adalah bahwa  $O_2$  memiliki kecenderungan membentuk spesies oksigen yang sangat reaktif yang dapat mencetuskan reaksi berantai radikal bebas (elektron tunggal) dan merusak komponen sel (Marks, 2000).

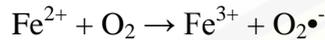
Pada keadaan normal pada rantai pernafasan (*respiratory chain*), oksigen berperan sebagai akseptor terakhir dari electron. Kemudian bersama-sama  $2H^+$  akan membentuk satu molekul  $H_2O$ . Selain itu, oksigen dapat menjadi *toxic mutagenic gas* yang kemudian dikenal sebagai ROS (*Reactive Oxygen Species*). ROS merupakan senyawa oksigen yang bersifat reaktif. Senyawa ini pada dasarnya dapat dikelompokkan menjadi 2, yaitu senyawa oksigen reaktif yang bersifat radikal seperti radikal superoksida ( $O_2^{\bullet-}$ ), radikal hidroksil ( $\bullet OH$ ), radikal peroksil ( $RO_2^{\bullet}$ ), radikal hidroperoksil ( $HO_2^{\bullet}$ ), dan senyawa oksigen reaktif yang bersifat nonradikal (oksidan) seperti hidrogen peroksida ( $H_2O_2$ ), asam hipoklorat ( $HOCl$ ), ozon ( $O_3$ ), singlet oksigen ( $-O_2$ ) dan peroksinitrit ( $ONOO$ ) (Sudiana, 2008).

Dari sekian banyak ROS, pada penulisan ini akan diuraikan beberapa reaksi yang dapat memicu pembentukan radikal superoksida ( $O_2^{\bullet-}$ ), hidrogen peroksida ( $H_2O_2$ ) dan radikal hidroksil ( $\bullet OH$ ). Hal ini akan dibahas lebih lanjut karena ketiga bentuk ROS inilah yang paling banyak berperan dalam proses terjadinya suatu penyakit (Sudiana, 2008).

### 2.4.1 Radikal Superoksida

Pembentukan radikal ini dapat melalui beberapa cara, antara lain sebagai berikut.

- a. Reaksi samping yang melibatkan ion  $\text{Fe}^{2+}$ , misalnya dalam proses oksigenasi hemoglobin.



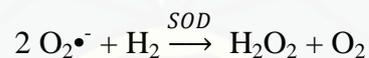
- b. Reaksi dalam mitokondria dan granulosit yang di katalisis oleh NADH/NADPH oksidase.



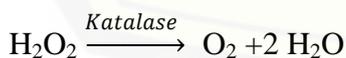
Salah satu radikal bebas yang sering ditemui adalah radikal superoksida. Sekitar 1-3% oksigen yang di hirup manusia, terkonversi menjadi radikal superoksida. Dalam setahun di perkirakan 2 kg superoksida diproduksi tubuh dan jumlahnya akan meningkat pada orang yang menderita penyakit kronis.

### 2.4.2 Hidrogen Peroksida

Pembentukan hidrogen peroksida ( $\text{H}_2\text{O}_2$ ) karena adanya aktivitas suatu enzim yang di kenal SOD (superoksida dismutase), dimana enzim ini mengubah radikal superoksida menjadi hidrogen peroksida. Untuk lebih jelasnya dapat di lihat pada reaksi berikut.



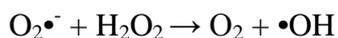
Hidrogen peroksida merupakan bahan yang sangat toksik, dimana bahan ini dapat bereaksi dengan lipid. Oleh karena itu supaya lipid pada sistem membran sel tidak mengalami kerusakan maka peroksida tersebut harus segera di netralisasi, baik melalui aktivitas katalase yang terdapat pada peroksisom maupun melalui proses glutation (GSH).



### 2.4.3 Radikal Hidroksil

Pembentukan radikal hidroksi dapat melalui reaksi Haber-Weiss dan reaksi Fenton, yang dapat digambarkan sebagai berikut,

#### a. Reaksi Haber-Weiss



#### b. Reaksi Fenton



Dari berbagai bentuk senyawa oksigen reaktif tersebut, radikal hidroksil merupakan senyawa yang paling reaktif dan berbahaya. Radikal hidroksil bukan merupakan produk primer proses biologis, melainkan berasal dari  $\text{H}_2\text{O}_2$  dan  $\text{O}_2^{\bullet-}$ .

## 2.5 Antioksidan

Antioksidan merupakan substansi nutrisi maupun non-nutrisi yang mampu mencegah atau memperlambat terjadinya kerusakan oksidatif dalam tubuh. Antioksidan merupakan senyawa pemberi elektron (elektron donor). Antioksidan mampu menghambat reaksi oksidasi dengan cara mengikat radikal bebas dan molekul yang sangat reaktif sehingga kerusakan sel dapat dicegah.

Senyawa antioksidan mempunyai berat molekul kecil tapi mampu menginaktivasi reaksi oksidasi dengan mencegah terbentuknya radikal. Berdasarkan mekanisme kerja dan sumbernya, antioksidan diklasifikasikan menjadi 3 golongan, yaitu antioksidan primer, antioksidan sekunder dan antioksidan tersier. Pertama antioksidan akan mencegah pembentukan radikal bebas baru. Kedua, antioksidan menginaktivasi radikal yang telah terbentuk (pemutusan rantai reaksi). Ketiga, antioksidan akan memperbaiki kerusakan akibat radikal bebas (Winarsi, 2007).

Antioksidan primer disebut juga sebagai antioksidan endogenus, yaitu antioksidan yang diproduksi secara alami dan kontinue oleh tubuh. Antioksidan primer merupakan jenis antioksidan enzimatik, yaitu mampu memberikan atom hidrogen kepada radikal bebas sehingga radikal bebas ini menjadi lebih stabil. Mekanisme kerja antioksidan primer adalah dengan cara mencegah pembentukan

senyawa radikal bebas baru atau mengubah radikal bebas yang telah terbentuk menjadi lebih stabil dan kurang reaktif dengan cara memutus reaksi berantai (polimerisasi) atau dikenal dengan istilah juga *chain-breaking-antioxidant*. Contoh antioksidan primer adalah enzim superoksida dismutase (SOD), katalase dan glutathion peroksidase (GSH).

Antioksidan sekunder disebut juga sebagai antioksidan eksogenus atau antioksidan non-enzimatis, yaitu antioksidan yang tidak diproduksi secara alami oleh tubuh dan didapatkan dari asupan makanan maupun minuman. Mekanisme kerja antioksidan sekunder adalah dengan cara memotong reaksi oksidasi berantai dari radikal bebas atau dengan cara menangkap radikal bebas (*free radical scavenger*). Sehingga radikal bebas tidak akan bereaksi dengan komponen seluler. Antioksidan sekunder terdiri dari antioksidan alami dan antioksidan sintetis. Antioksidan alami banyak ditemukan dalam sayuran dan buah-buahan. Komponen yang terkandung didalamnya adalah vitamin C, vitamin E,  $\beta$ -karoten, flavonoid, isoflavon, flavon, antosianin, katekin, isokatekin, asam lipoat, bilirubin dan albumin, likopen dan klorofil. Antioksidan sintetis dibuat dari bahan-bahan kimia antara lain *butylated hydroxyanisole* (BHA), *butylated hydroxytoluene* (BHT), *tert-butylhydroquinone* (TBHQ) dan *propyl gallate* (PG).

Antioksidan tersier meliputi sistem enzim DNA-repair dan *metionin sulfoksida reduktase*. Enzim-enzim ini berfungsi dalam perbaikan biomolekuler yang rusak akibat aktivitas radikal bebas. Kerusakan DNA akibat radikal bebas dapat dicirikan oleh rusaknya *single* atau *double strand* pada gugus basa dan non-basa.

Winarsi (2007) menyatakan tubuh manusia mempunyai sistem antioksidan yang diproduksi secara kontinue untuk menangkal atau meredam radikal bebas, seperti enzim superoksida dismutase (SOD), katalase dan glutathion peroksidase. Bila jumlah senyawa radikal bebas melebihi jumlah antioksidan alami dalam tubuh maka radikal bebas akan menyerang komponen lipid, protein dan DNA. Sehingga tubuh kita membutuhkan asupan antioksidan yang mampu melindungi tubuh dari serangan radikal bebas tersebut.

## 2.6 Penyakit Akibat Radikal Bebas

Beberapa penyakit yang telah diteliti dan diduga kuat berkaitan dengan aktivitas radikal bebas. Diantaranya adalah penyakit-penyakit degeneratif seperti stroke, CHD (*Cardiovascular Heart Disease*), diabetes melitus dan kanker. Selain penyakit degeneratif, stres oksidatif juga berperan dalam patogenesis penyakit menular seperti malaria.

Ditinjau dari aspek biologi molekuler, proses aterosklerosis diawali oleh fenomena stres oksidatif yang berkepanjangan di dalam sel. Stres oksidatif dapat menyebabkan disfungsi endotel dengan menurunkan bioavailabilitas NO (nitrit oksida) dengan cara berikatan langsung dengan NO melalui radikal superoksida yang akan membentuk peroksinitrit (ONOO). Selain itu ROS juga dapat menurunkan NO dengan cara menghambat jalur sintesis NO. Penurunan kadar NO menyebabkan vasokonstriksi pembuluh darah, dan endotel menjadi lebih proaterogenik dan proinflamasi. Faktor risiko seperti hiperlipidemia memperparah keadaan ini. *Low Density Lipoprotein* (LDL) mudah teroksidasi oleh radikal bebas dan sangat berbahaya karena LDL teroksidasi inilah yang memicu berbagai mekanisme terbentuknya benjolan pada dinding pembuluh darah yang disebut plak ateromatosa sebagai awal penyebab terjadinya aterosklerosis. (Nurtamin, 2014). Jika aterosklerosis terjadi di dalam arteri yang menuju ke otak, maka dapat terjadi stroke. Jika terjadi di dalam arteri yang menuju ke jantung (arteri koroner), dapat terjadi serangan jantung.

Radikal bebas dapat menginduksi timbulnya lesi pada DNA sehingga mengacaukan sistem informasi genetika dan membentuk sel kanker. Menurut Valko *et al* (2004) radikal hidroksil merupakan ROS yang paling reaktif dibandingkan radikal lain dalam bereaksi dengan DNA. Radikal bebas tidak hanya menyerang bagian basa pada DNA tetapi juga menyerang gula deoksiribosa sehingga dapat menyebabkan degradasi dan kerusakan pada DNA. Perubahan genetik akibat radikal bebas, seperti mutasi dan perubahan susunan kromosom dapat berperan dalam proses karsinogenesis terutama tahapan inisiasi. Kemungkinan hal ini dapat terjadi karena perubahan basa DNA di onkogen dan

*tumor suppressor genes* tertentu. Radikal hidroksil mampu mengaktifkan onkogen tertentu, seperti K-ras dan C-Raf 1 dan menginaktivasi *tumor suppressor genes*, seperti p53, yang selanjutnya mengakibatkan mengakibatkan sel kehilangan kendali dan mengalami transformasi ganas.

Diabetes melitus (DM) juga merupakan penyakit yang melibatkan stres oksidatif. Hiperglikemi menyebabkan terjadinya glikasi nonenzimatik pada protein, jalur poliol sorbitol (aldosa reduktase), dan autooksidasi glukosa yang selanjutnya akan mempercepat pembentukan senyawa oksigen reaktif. Pembentukan senyawa oksigen reaktif tersebut dapat meningkatkan modifikasi lipid, DNA, dan protein pada berbagai jaringan. Stres oksidatif memiliki kontribusi pada perburukan dan perkembangan kejadian komplikasi, seperti penyakit vaskular sistemik (percepatan aterosklerosis), penyakit jantung, penyakit mikrovaskular pada mata sebagai penyebab kebutaan dan degenerasi retina (retinopati diabetik), katarak, kerusakan ginjal sebagai penyebab gagal ginjal serta kerusakan saraf tepi (neuropati diabetik). Perubahan status oksidatif pada penderita diabetes melitus ditandai dengan perubahan aktivitas antioksidan endogen serta meningkatnya kerusakan biomolekul secara oksidatif. Oleh karena itu diperlukan antioksidan eksogen sebagai penghambat kerusakan oksidatif di dalam tubuh. Penelitian pada hewan percobaan membuktikan bahwa antioksidan dapat menghambat tahap awal retinopati, nefropati, dan neuropati (Setiawan dan Suhartono, 2005).

Patogenesis malaria sangat berhubungan dengan radikal bebas atau oksidan yang beredar dalam tubuh. Pada malaria terjadi peningkatan radikal bebas. Hal ini terjadi karena parasit hidup dalam lingkungan prooksidan yang mengandung besi dan oksigen. Keadaan ini memungkinkan terbentuknya ROS melalui reaksi Fenton. Hemoglobin diambil oleh parasit dan dibawa ke dalam vakuola makanannya yang bersifat asam sehingga menyebabkan terjadinya oksidasi spontan  $Fe^{2+}$  menjadi  $Fe^{3+}$  dan selanjutnya menghasilkan anion superoksida. Anion superoksida yang terbentuk ini, dengan adanya SOD (superoksida dismutase) akan membentuk hidrogen peroksida yang kemudian akan terurai menjadi radikal hidroksil oleh reaksi Fenton. Hidrogen peroksida dan

radikal hidroksil merupakan suatu *oxygen intermediate* yang sangat reaktif dan toksik. Radikal bebas dapat bereaksi dengan komponen lipid pada membran eritrosit (peroksidasi lipid) yang mengakibatkan terjadinya disfungsi dan kerusakan eritrosit. Antioksidan berperan dalam melawan efek radikal bebas dengan cara menghambat peroksidasi lemak sehingga dinding sel eritrosit menjadi lebih kuat dan tidak mudah ruptur dan mengurangi penyebaran Plasmodium. Dengan demikian diharapkan bahwa pemberian antioksidan dapat mengurangi derajat parasitemia (Tjhajani, 2010).

## 2.7 Ekstraksi

Ekstraksi adalah kegiatan penarikan kandungan kimia yang dapat larut sehingga terpisah dari bahan yang tidak dapat larut dengan pelarut cair. Proses pemisahan senyawa dari simplisia dilakukan dengan menggunakan pelarut tertentu sesuai dengan sifat senyawa yang akan dipisahkan. Pemisahan senyawa berdasarkan kaidah *like dissolved like* yang artinya suatu senyawa akan larut dalam pelarut yang sama tingkat kepolarannya. Kepolaran suatu pelarut ditentukan oleh besar konstanta dielektriknya, semakin besar nilai konstanta dielektrik suatu pelarut maka polaritasnya semakin besar. Konstanta dielektrik dari n-heksana, etil asetat dan metanol pada suhu 25°C masing-masing adalah 1,89; 6,02; 32,63 (Bruno *et al*, 1989).

Ada beberapa faktor yang dapat mempengaruhi keberhasilan proses ekstraksi. Faktor-faktor ini termasuk metode ekstraksi, jenis pelarut yang digunakan, ukuran partikel tanaman obat, suhu, waktu ekstraksi, jumlah pengulangan ekstraksi dan perbandingan sampel-pelarut. Senyawa fenol pada umumnya akan terdegradasi pada suhu tinggi. Kepolaran dari senyawa-senyawa fenol juga beragam karena memiliki struktur yang beragam (Bouterfas *et al*, 2014).

Metode ekstraksi ada berbagai macam, salah satunya adalah metode maserasi. Maserasi adalah proses pengekstrakan simplisia dengan menggunakan pelarut dengan beberapa kali pengocokan atau pengadukan pada temperatur ruangan (suhu kamar). Pada proses ini, simplisia (serbuk tanaman) ditempatkan

dalam wadah tertutup dan pelarut yang selektif ditambahkan ke dalamnya. Setelah itu dibiarkan pada suhu ruang selama minimal 3 hari sambil digerak-gerakan sehingga pelarut dapat mengekstrak senyawa target dengan maksimal. Metode ini dapat menghasilkan ekstrak dalam jumlah banyak serta terhindar dari perubahan kimia senyawa-senyawa tertentu karena pemanasan. (ICS-UNIDO, 2008).

Secara umum, ekstraksi dengan pelarut dapat dilakukan dengan metode ekstraksi bertingkat dan ekstraksi tunggal. Ekstraksi bertingkat dilakukan dengan cara merendam sampel dengan pelarut berbeda secara berurutan, dimulai dengan pelarut non polar berupa n-heksan, lalu dengan pelarut yang kepolarannya menengah yaitu etil asetat, kemudian dengan pelarut polar seperti metanol. Dengan demikian akan diperoleh ekstrak kasar yang mengandung berturut-turut senyawa non polar, semi polar, dan polar. Maserasi bertingkat dipilih untuk mengekstrak senyawa fenol yang secara umum terdegradasi pada suhu tinggi dan memiliki kepolaran yang beragam.

Hasil dari proses ekstraksi disebut sebagai ekstrak. Ekstrak adalah sediaan kental yang diperoleh dengan mengekstraksi senyawa aktif dari simplisia nabati atau simplisia hewani menggunakan pelarut yang sesuai, kemudian semua atau hampir semua pelarut diuapkan dan massa atau serbuk yang tersisa diperlakukan sedemikian hingga memenuhi baku yang telah ditetapkan (Depkes RI, 1995).

## **2.8 Prinsip Analisis Antioksidan**

### **2.8.1 Analisis Total Fenol**

Satuan dasar untuk menganalisis potensi antioksidan menggunakan total fenol dari masing-masing ekstrak. Pengujian total fenol ini menggunakan metode Follin-Ciocalteu dan sebagai pembanding digunakan asam galat. Metode ini biasa digunakan untuk mengukur kadar fenol total dari suatu bahan. Reagen yang digunakan adalah reagen Follin-Ciocalteu, yang pembuatannya menggunakan bahan kimia seperti sodium tungstat, sodium molibdat, litium sulfat, bromin, dan beberapa asam lain (Singleton, 1999).

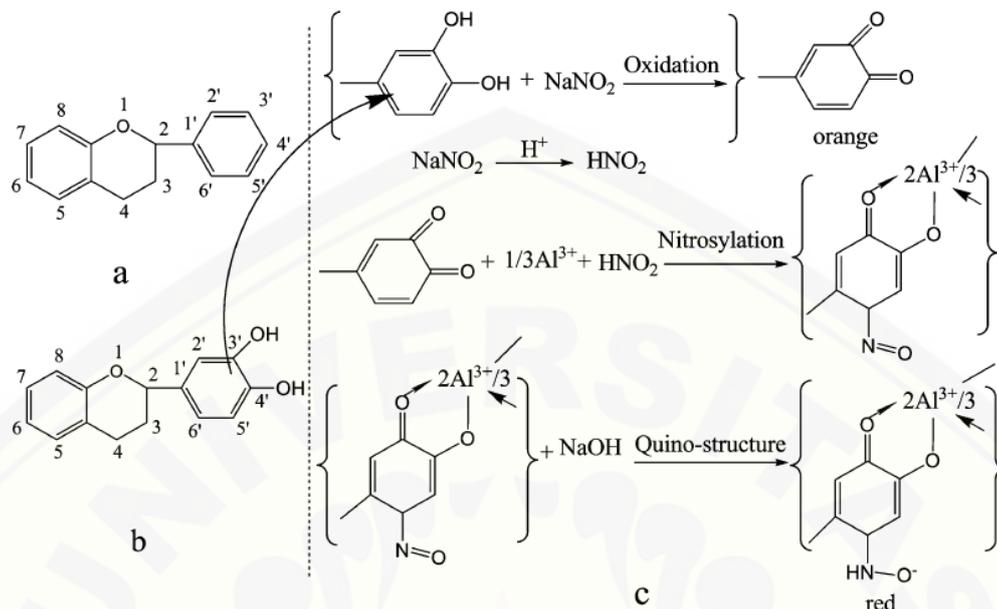
Prinsip kerja metode Follin-Ciocalteu ini adalah reaksi antara senyawa fenol dengan reagen Follin-Ciocalteu. Reaksi ini melibatkan oksidasi gugus fenol

(ROH) dengan campuran asam fosfotungstat dan asam molibdat dalam reagen, menjadi bentuk quinoid (R=O). Reduksi reagen Follin-Ciocalteu ini menghasilkan warna biru sesuai dengan kadar fenol total yang bereaksi. Selanjutnya warna ini dihitung intensitasnya pada panjang gelombang 750 nm. Asam galat digunakan sebagai standar pengukuran dikarenakan asam galat merupakan senyawa polifenol yang terdapat di hampir semua tanaman. Kandungan fenol asam organik ini bersifat murni dan stabil (Singleton, 1999). Nilai total fenol diperoleh dari pengukuran nilai absorban dan perhitungan menggunakan persamaan regresi linear asam galat.

### 2.8.2 Analisis Total Flavonoid

Analisis total flavonoid dapat dilakukan menggunakan spektrofotometri UV-Vis. Prinsip analisis dengan metode ini didasarkan pada pembentukan kompleks antara gugus catechol pada senyawa flavonoid dengan logam aluminium yang akan menghasilkan warna. Analisis dilakukan dengan menggunakan standar quercetin. Quercetin merupakan salah satu jenis flavonoid yang memiliki gugus catechol (*1,2-dihidroksibenzena*) sehingga dapat digunakan sebagai standar.

Reagen yang digunakan untuk analisis total flavonoid adalah  $\text{NaNO}_2$ – $\text{AlCl}_3$ – $\text{NaOH}$ . Zhu *et al* (2009) menyatakan bahwa gugus catechol senyawa flavonoid pada cincin B akan dioksidasi oleh natrium nitrit menjadi keton dan akan menghasilkan warna kuning. Kepekatan warna kuning dalam larutan akan meningkat ketika keton terbentuk. Sementara natrium nitrit sendiri tereduksi menjadi asam nitrit. Gugus keton yang telah terbentuk akan mengompleks dengan kation aluminium ( $\text{Al}^{3+}$ ) yang berasal dari  $\text{AlCl}_3$  dan dilanjutkan dengan nitrosilasi oleh asam nitrit. Senyawa tersebut kemudian direduksi oleh natrium hidroksida yang menghasilkan struktur quino. Tiga senyawa quercetin akan mengompleks dengan satu logam aluminium membentuk struktur quino yang warna. Warna kompleks quino dari quercetin memiliki panjang gelombang maksimum pada 415 nm. Reaksi pembentukan warna dari quercetin ditunjukkan pada gambar 2.4.

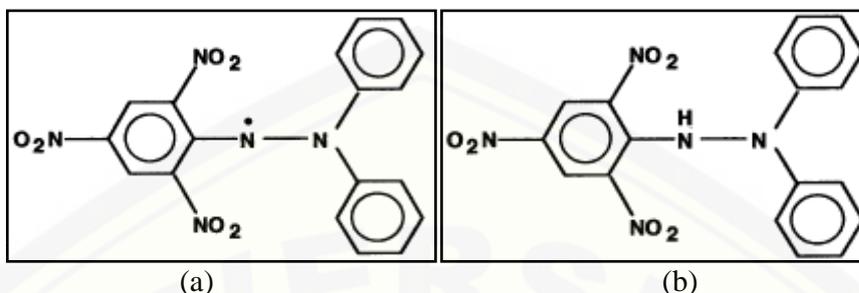
Gambar 2.4 Reaksi pembentukan warna dari *quercetin*

### 2.8.3 Analisis Peredaman Radikal DPPH

Salah satu metode yang paling umum digunakan untuk menguji aktivitas antioksidan adalah dengan menggunakan radikal bebas *1,1-diphenyl-2-picrylhydrazil* (DPPH). Metode ini bersifat sederhana, cepat dan tidak membutuhkan banyak reagen seperti halnya metode lain. Hasil pengukuran dengan metode DPPH menunjukkan kemampuan antioksidan sampel secara umum, tidak berdasar jenis radikal yang dihambat (Juniarti et al., 2009).

Larutan DPPH akan berperan sebagai radikal bebas yang akan bereaksi dengan senyawa antioksidan dalam sampel sehingga DPPH akan berubah menjadi *1,1-diphenyl-2-picrylhydrazin* yang bersifat non-radikal. Peningkatan jumlah *1,1-diphenyl-2-picrylhydrazin* akan ditandai dengan berubahnya warna ungu tua menjadi warna merah muda atau kuning pucat dan dapat diamati menggunakan spektrofotometer sehingga aktivitas peredaman radikal bebas oleh sampel dapat ditentukan (Molyneux, 2004).

Struktur DPPH radikal bebas dan DPPH yang telah bereaksi dengan antioksidan disajikan pada Gambar 2.5.



Gambar 2.5. Struktur DPPH (a) Radikal Bebas dan (b) Radikal Bebas yang Telah Bereaksi dengan Antioksidan

Pengukuran aktivitas antioksidan dengan metode DPPH menggunakan prinsip spektrofotometri. Senyawa DPPH dalam metanol berwarna ungu tua terdeteksi pada panjang gelombang sinar tampak sekitar 515-517 nm. (Molyneux, 2004). Menurut Saeed et al. (2012), persamaan berikut dapat digunakan untuk menentukan persen peredaman radikal DPPH.

$$\text{Persen peredaman radikal} = \frac{(A_0 - A_1)}{A_0} \times 100\%$$

Dimana  $A_0$  adalah absorbansi kontrol dan  $A_1$  adalah absorbansi sampel. Kontrol merupakan larutan yang tidak ditambahkan sampel.

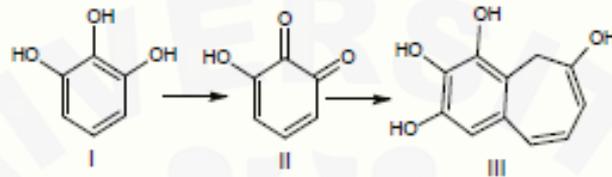
Parameter untuk menginterpretasikan hasil pengujian DPPH adalah dengan nilai  $IC_{50}$  (*Inhibitor Concentration*).  $IC_{50}$  merupakan konsentrasi larutan substrat atau sampel yang mampu mereduksi aktivitas DPPH sebesar 50%. Semakin kecil nilai  $IC_{50}$  berarti semakin tinggi aktivitas antioksidan. Secara spesifik suatu senyawa dikatakan sebagai antioksidan sangat kuat jika nilai  $IC_{50}$  kurang dari 50 ppm ( $IC_{50} < 50$  ppm), kuat ( $50 \text{ ppm} < IC_{50} < 100$  ppm), sedang ( $100 \text{ ppm} < IC_{50} < 150$  ppm), lemah ( $150 \text{ ppm} < IC_{50} < 200$  ppm), dan sangat lemah ( $IC_{50} > 200$  ppm) (Molyneux, 2004). Nilai  $IC_{50}$  radikal DPPH dihitung melalui persamaan linear yang dihasilkan melalui pengeplotan antara % peredaman dan log konsentrasinya. Secara matematis persamaan untuk mendapatkan nilai  $IC_{50}$  adalah sebagai berikut:

$$IC_{50} = 10^{\left(\frac{50-a}{b}\right)}$$

Nilai a dan b diperoleh dari persamaan linear  $y = bx + a$ .

#### 2.8.4 Analisis Peredaman Radikal Anion Superoksida

Analisis peredaman radikal anion superoksida dapat dilakukan menggunakan spektrofotometri UV-Vis. Prinsip analisis dengan metode ini didasarkan pada reaksi autooksidasi *pyrogallol*. Tauber (1953) menyatakan bahwa reaksi autooksidasi *pyrogallol* ditunjukkan oleh gambar 2.6 berikut.



Gambar 2.6 Reaksi autooksidasi *pyrogallol*

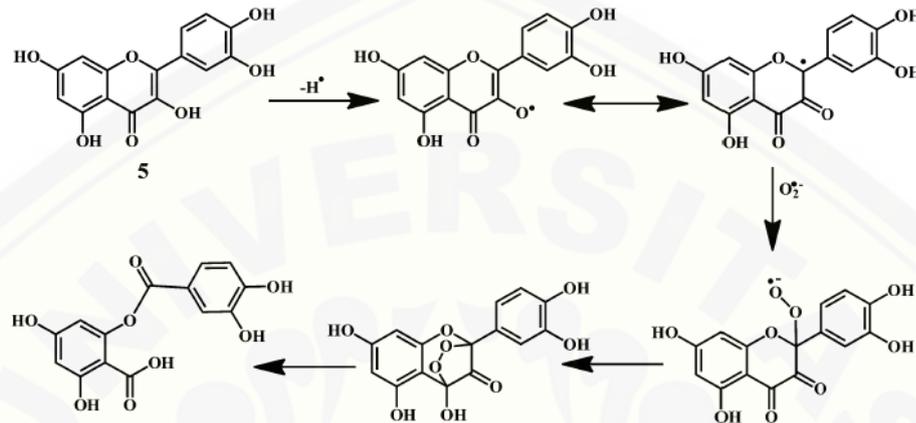
Pyrogallol (*1,2,3-benzenetriol*, I) adalah senyawa yang tidak berwarna. Pada suasana basa senyawa tersebut mengalami autooksidasi yang menghasilkan radikal superoksida dan orthoquinon (II). Orthoquinon yang telah terbentuk akan dioksidasi oleh radikal anion superoksida dan menghasilkan purpulloalgin (*2,3,4,6-tetrahydroxy-5H-benzocycloheptene-5-one*, III) yang berwarna orange dan memiliki panjang gelombang maksimum 320 nm. Reaksi autooksidasi ini akan terus berlangsung sampai *pyrogallol* dan orthoquinon habis bereaksi. Laju pembentukan purpulloalgin berbanding lurus dengan konsentrasi radikal anion superoksida karena radikal anion superoksida yang mengoksidasi orthoquinon menjadi purpulloalgin. Adanya antioksidan akan menurunkan laju pembentukan purpulloalgin karena radikal anion superoksida akan bereaksi dengan antioksidan tersebut. Menurut Saeed *et al* (2012), nilai persen peredaman radikal anion superoksida dapat dihitung melalui persamaan berikut:

$$\text{Persen peredaman radikal} = \frac{(A_0 - A_1)}{A_0} \times 100\%$$

Dimana  $A_0$  adalah slope kontrol dan  $A_1$  adalah slope sampel. Kontrol merupakan larutan yang tidak ditambahkan sampel.

Radikal anion superoksida yang dihasilkan selama reaksi autooksidasi *pyrogallol* akan bereaksi dengan antioksidan seperti fenol. Mekanisme reaksi

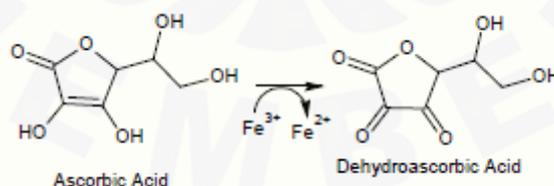
senyawa fenol dalam meredam radikal anion superoksida mungkin bermacam-macam. Gambar 2.7 merupakan salah satu kemungkinan reaksi salah satu senyawa fenol yaitu quercetin dengan radikal anion superoksida (Nimse dan Pal, 2015).



Gambar 2.7 Mekanisme reaksi peredaman radikal anion superoksida oleh Quercetin

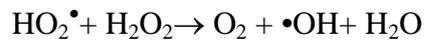
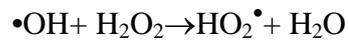
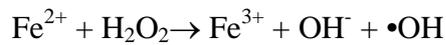
### 2.8.5 Analisis Peredaman Radikal Hidroksil

Prinsip analisis dengan metode ini adalah radikal hidroksil akan bereaksi dengan senyawa antioksidan dalam sampel. Radikal hidroksil yang akan digunakan dalam analisis dihasilkan melalui reaksi Fenton yang terdiri atas  $Fe^{3+}$ -asam askorbat-EDTA- $H_2O_2$  (Gutteridge dan Halliwell, 1988). Ion  $Fe^{3+}$  akan membentuk kompleks dengan EDTA (*Ethylenediaminetetraacetic acid*), kemudian akan direduksi oleh asam askorbat sehingga menjadi ion  $Fe^{2+}$ . Gambar 2.8 merupakan reaksi reduksi ion  $Fe^{3+}$  menjadi  $Fe^{2+}$  oleh asam askorbat.

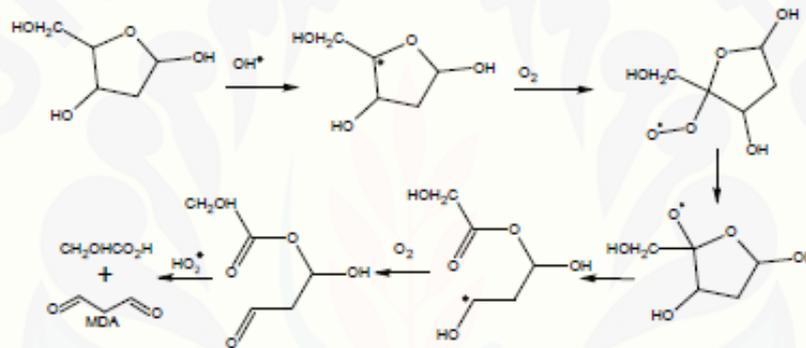


Gambar 2.8 Reaksi reduksi ion  $Fe^{3+}$  oleh asam askorbat

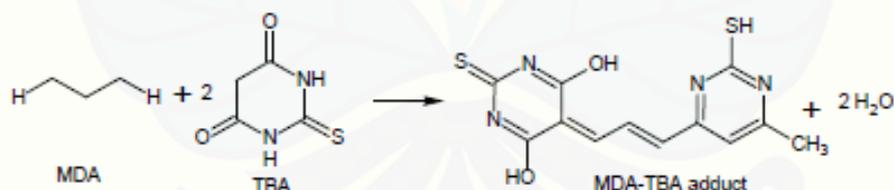
Ion  $Fe^{2+}$  yang telah terbentuk selanjutnya akan dioksidasi oleh  $H_2O_2$  sehingga menghasilkan radikal hidroksil melalui persamaan reaksi berikut:



Radikal hidroksil yang telah terbentuk akan menyerang 2-deoxy-D-ribose dan menghasilkan produk campuran, salah satunya adalah malondialdehyde (MDA). MDA inilah yang akan bereaksi dengan 2-thiobarbituric acid (TBA) membentuk MDA-TBA *adduct* yang memiliki warna merah muda dengan panjang gelombang maksimumnya 523 nm. Reaksi antara radikal hidroksil dengan 2-deoxy-D-ribose dan reaksi pembentukan MDA-TBA *adduct* ditampilkan oleh gambar 2.9 dan gambar 2.10.



Gambar 2.9 Reaksi radikal hidroksil dengan 2-deoxy-D-ribose



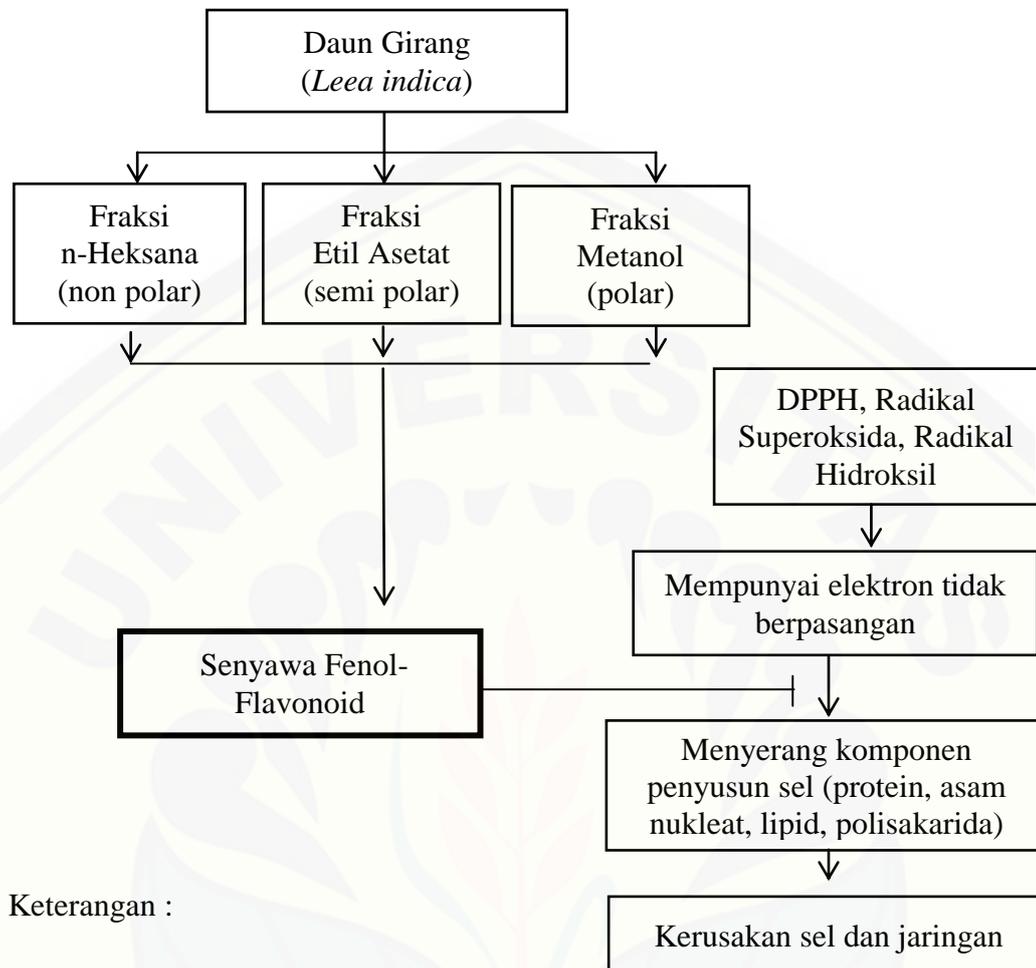
Gambar 2.10 Reaksi pembentukan MDA-TBA *adduct* yang berwarna merah muda

Menurut Saeed et al. (2012), persamaan berikut dapat digunakan untuk menentukan persen peredaman radikal hidroksil.

$$\text{Persen peredaman radikal} = \frac{(A_0 - A_1)}{A_0} \times 100\%$$

Dimana A<sub>0</sub> adalah absorbansi kontrol dan A<sub>1</sub> adalah absorbansi sampel. Kontrol merupakan larutan yang tidak ditambahkan sampel.

## 2.9 Kerangka konseptual



Keterangan :

: Permasalahan

: Variabel yang di teliti

—| : Supresi

Daun Girang diduga memiliki kandungan senyawa fenol-flavonoid yang berpotensi sebagai antioksidan. Senyawa golongan fenol memiliki kepolaran yang beragam karena memiliki struktur yang beragam, sehingga perlu dilakukan ekstraksi daun girang menggunakan berbagai pelarut yang berbeda kepolarannya yaitu n-heksan (pelarut non polar), etil asetat (pelarut semi polar) dan metanol (pelarut polar). Dengan demikian akan diperoleh ekstrak kasar yang mengandung

berturut-turut senyawa non polar, semi polar, dan polar untuk dibandingkan aktivitas antioksidannya. Penelitian ini berfokus pada kandungan senyawa fenol-flavonoid dan potensi sebagai antioksidan dari ekstrak daun girangfraksi n-heksana, etil asetat metanol. Senyawa antioksidan mampu menghambat reaksi oksidasi dengan cara mengikat radikal bebas dan molekul yang sangat reaktif sehingga senyawa radikal menjadi stabil dan kerusakan sel dapat dicegah.

### **2.10 Hipotesis**

Berdasarkan landasan teori di atas, hipotesis untuk penelitian ini adalah ada perbedaan potensi antioksidan ekstrak daun girang dengan pelarut n-heksan, etil asetat dan metanol.

## BAB 3. METODE PENELITIAN

### 3.1 Jenis Penelitian

Jenis penelitian ini adalah penelitian dasar dengan menggunakan metode eksperimental. Studi eksperimental laboratorium adalah studi dimana peneliti melakukan manipulasi terhadap satu atau lebih variabel subyek penelitian dan kemudian mempelajari efek perlakuan tersebut (Sastroasmoro, 2011).

Penelitian dilakukan menggunakan Rancangan Acak Lengkap (RAL) atau *completely randomized design* yang terdiri atas 3 perlakuan variasi jenis pelarut dan 1 kontrol positif dengan pengulangan sebanyak 3 kali. Pelarut yang digunakan memiliki tingkat kepolaran yang berbeda untuk membuat ekstrak daun girang (*Leea indica*) yaitu n-heksana, etil asetat, dan methanol. Vitamin C digunakan sebagai kontrol positif. Metode ini dipilih karena satuan percobaan yang digunakan bersifat homogen atau tidak ada faktor lain yang mempengaruhi respon di luar faktor yang diteliti.

### 3.2 Waktu dan Tempat

Penelitian dilakukan di Laboratorium *Center for Development of Advance Science and Technology* (CDAST), Universitas Jember, selama kurang lebih 3 bulan, dari bulan Agustus hingga Oktober 2015.

### 3.3 Variabel Penelitian

Variabel yang digunakan dalam penelitian ini adalah :

- a. Variabel bebas: jenis untuk membuat ekstrak daun girang (*Leea indica*) yaitu n-heksan, etil asetat dan metanol.
- b. Variabel terikat : aktivitas antioksidan ekstrak daun girang dari pelarut n-heksan, etil asetat dan metanol daun girang (*Leea indica*)

- c. Variabel kontrol : panjang gelombang dari absorbansi, volume larutan dalam kuvet, peralatan yang digunakan dalam penelitian dan metode pengukuran.

### 3.4 Definisi Operasional

Adapun definisi operasional yang digunakan untuk memudahkan pelaksanaan penelitian dan agar penelitian tidak menjadi terlalu luas yaitu sebagai berikut.

- a. Ekstraksi: Pemisahan senyawa dari bubuk simplisia daun girang menggunakan pelarut n-heksan, etil asetat dan metanol dengan menggunakan metode maserasi bertingkat.
- b. Ekstrak n heksan girang (HG): Hasil ekstraksi menggunakan n heksan absolut selama 72 jam.
- c. Ekstrak etil asetat girang (EG): Hasil ekstraksi menggunakan etil asetat absolut selama 72 jam.
- d. Ekstrak metanol girang (MG): Hasil ekstraksi menggunakan metanol absolut selama 72 jam.
- e. Total fenol : Jumlah senyawa fenol yang terdapat di dalam ekstrak girang yang diukur menggunakan pereaksi folin-cioccalteu dan hasilnya dinyatakan dalam milligram ekivalen asam gallat (GAE) per gram ekstrak.
- f. Total flavonoid: Jumlah senyawa flavonoid yang terdapat di dalam ekstrak girang yang diukur menggunakan pereaksi methanol 50%- $\text{NaNO}_2$  5%- $\text{AlCl}_3$  10%-  $\text{NaOH}$  dan hasilnya dinyatakan sebagai milligram ekivalen quersetin (QE) per gram ekstrak.
- g. Metode peredaman radikal DPPH: Metode pengujian aktivitas antioksidan ekstrak daun girang dengan menggunakan radikal DPPH secara *in vitro* yang hasilnya ditunjukkan dengan parameter persen peredaman radikal dan nilai  $\text{IC}_{50}$ .
- h. *Inhibition concentration 50* ( $\text{IC}_{50}$ ): konsentrasi ekstrak daun girang yang mampu menangkap 50% radikal DPPH.

- i. Metode peredaman radikal superoksida: Metode pengujian aktivitas antioksidan ekstrak daun girang terhadap radikal superoksida yang dihasilkan secara *in vitro* menggunakan metode autooksidasi pyrogallol dan hasilnya ditunjukkan dengan parameter persen peredaman radikal.
- j. Metode peredaman radikal hidroksil: Metode pengujian aktivitas antioksidan ekstrak daun girang terhadap radikal hidroksil yang dihasilkan secara *in vitro* dari reaksi fenton menggunakan metode deoksiribosa dan hasilnya ditunjukkan dengan parameter persen peredaman radikal.

### 3.5 Bahan dan Alat

#### 3.5.1 Alat

Alat yang digunakan dalam penelitian ini digolongkan menjadi peralatan gelas, instrumen, dan peralatan bukan gelas. Peralatan gelas meliputi Erlenmeyer 500 mL, gelas ukur 250 mL, tabung reaksi, labu ukur 5, 10 dan 100 mL. Peralatan instrumen meliputi blender, timbangan analitik, *vacuum evaporator*, corong buchner, pendingin, pipet mikro, inkubator, satu set alat spektrofotometer UVVis, *orbital shaker*, vortex, *water bath*, *dry block* dan sentrifugator. Peralatan bukan gelas antara lain gunting, ayakan, plastik sampel, kertas label, kertas saring, eppendorf, dan aluminium foil.

#### 3.5.2 Bahan

##### 3.5.2.1 Bahan uji

Bahan uji yang digunakan dalam penelitian ini adalah daun girang (*Leea indica*) yang diperoleh dari Taman Nasional Meru Betiri, Jember.

##### 3.5.2.2 Bahan Kimia

Bahan kimia yang digunakan dalam penelitian ini adalah heksana (Merck); etil asetat (Merck); metanol (Merck); *aquadest* ; reagen Folin-Ciocalteu (Merck); natrium karbonat (Merck); *Gallic acid* (Sigma-Aldrich); natrium nitrit (Merck); aluminium(III) klorida (Merck); natrium hidroksida (Merck); *quercetin* (nacalai

tasque); *1,1-diphenyl-2-picryl-hydrazil* (DPPH) (nacalai tasque); etanol (Merck); asam askorbat (nacalai tasque); *ethylenediaminetetraacetic acid* (EDTA) (nacalaitasque); besi(III) klorida (Merck); hidrogen peroksida (Sigma-Aldrich); deoksiribosa (Sigma-Aldrich); asam trikoloroasetat (Merck); *2-thiobarbituric acid* (Sigma-Aldrich); *pyrogallol* (Sigma-Aldrich); *Trizma-base* (nacalai tasque).

### 3.6 Metode

Cara kerja yang dilakukan pada penelitian ini melalui beberapa tahapan mulai dari penyiapan bahan, pembuatan ekstrak, penentuan kandungan total fenol, penentuan kandungan flavonoid, pengujian aktivitas antioksidan.

#### 3.6.1 Penyiapan bahan

Simplisia disiapkan dari daun girang (*Leea indica*) yang diperoleh dari Taman Nasional Meru Betiri, Jember dan telah diidentifikasi keabsahannya. Daun girang (*Leea indica*) yang telah dikumpulkan, kemudian dikeringkan selama 10 hari dalam ruangan pada suhu ruang. Simplisia yang telah kering disortir berdasarkan bentuk dan warnanya. Bagian-bagian daun yang berlubang-lubang dan berwarna coklat dipisahkan. Daun yang terpilih selanjutnya dilakukan pengecilan ukuran dengan blender. Simplisia yang telah halus diseragamkan ukurannya dengan ayakan 60 mesh. Partikel dengan ukuran diameter kurang dari 0,250 mm akan lolos ayakan dan digunakan sebagai simplisia bahan uji.

#### 3.6.2 Ekstraksi Sampel

Ekstraksi bioaktif simplisia daun girang dilakukan dengan metode maserasi bertingkat dengan tiga jenis pelarut yang berbeda kepolarannya yaitu heksana, etil asetat, dan metanol. Perbandingan serbuk halus daun Girang : pelarut adalah 1:5 Tahapan ekstraksi dimulai dari pelarut non polar, yaitu heksana. Serbuk *simplisia* seberat 10 gram kering dimaserasi bersama 50 mL pelarut n-heksana. Maserasi dilakukan selama 72 jam pada suhu ruang dengan menggunakan shaker kecepatan 150 *rotation per minutes* (RPM). Setelah itu difiltrasi dengan menggunakan corong Buchner sehingga dihasilkan filtrat dan

residu 1. Kemudian filtrat dievaporasi dengan evaporator vakum pada suhu 40° C sehingga didapat ekstrak kental heksana girang (HG). Residu 1 kemudian dikeringkan sehari semalam. Setelah kering, residu 1 diremaserasi menggunakan 50 mL etil asetat. Campuran tersebut di shaker selama 72 jam pada suhu ruang dengan kecepatan 150 RPM. Larutan kemudian di filtrasi dengan menggunakan corong buchner sehingga di dapatkan filtrat 2 dan residu 2. Filtrat 2 di evaporasi menggunakan evaporator vakum suhu 40° C sehingga didapatkan ekstrak kental etil asetat girang (EG). Residu 2 dibiarkan kering selama sehari semalam. Kemudian di remaserasi kembali dengan pelarut 50 mL metanol. Campuran di shaker selama 72 jam pada suhu ruang dengan kecepatan 150 RPM. Setelah itu difiltrasi dengan corong Buchner sehingga dihasilkan filtrat dan residu 3. Filtrat di evaporasi dengan evaporator vakum pada suhu 40°C sehingga didapat ekstrak kental metanol girang (MG). Masing-masing ekstrak yang diperoleh kemudian ditimbang untuk menghitung nilai rendemen dan disimpan dalam pendingin untuk keperluan analisis berikutnya. Rendeman ekstrak dihitung menggunakan rumus :

$$\% \text{ Rendemen} = \frac{\text{Jumlah berat ekstrak berupa pasta (g)}}{\text{Jumlah berat kering (g)}} \times 100 \%$$

### 3.6.3 Penentuan Kandungan Total Fenol

Total fenol diukur dengan metode Folin-Ciocalteu dari Taga *et al.* (1984) yang dimodifikasi. Sebanyak 45 µl metanol 50% dan 1 ml 2% Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> ditambahkan ke dalam tabung reaksi yang telah berisi masing- masing 5 µl larutan ekstrak. Semua ekstrak telah dilarutkan dengan methanol sebelumnya. Campuran divortex, setelah itu, sebanyak 50 µl folin-Ciocalteu 50 % ditambahkan ke dalam campuran dan divortex kembali. Campuran diinkubasi terlebih dahulu selama 30 menit di tempat gelap pada suhu ruang sebelum absorbansi diukur pada panjang gelombang 750 nm. Standar yang digunakan adalah asam galat (*gallic acid*). Hasil dinyatakan sebagai milligram ekivalen asam gallat (GAE) per gram ekstrak menggunakan persamaan dari kurva standar dari asam galat.

### 3.6.4 Penentuan Kandungan Flavonoid

Analisis kadar total flavonoid menggunakan metode dari Saeed et al. (2012) yang dimodifikasi. Sebanyak 5 µl ekstrak yang telah dilarutkan dengan metanol dicampurkan dengan 50% metanol sebanyak 145 µl dan 5% NaNO<sub>2</sub> sebanyak 30 µl. Campuran divortex dan diinkubasi di tempat gelap pada suhu ruang selama 5 menit. Setelah itu, ditambahkan 10% AlCl<sub>3</sub> sebanyak 30 µl ke dalam campuran dan divortex. Campuran diinkubasi kembali di tempat gelap pada suhu ruang selama 6 menit. Kemudian ditambahkan NaOH sebanyak 200 µl. Absorbansi campuran diukur menggunakan spektrofotometer UV-Vis pada panjang gelombang 415 nm. Standar yang digunakan adalah *quercetin*. Hasil dinyatakan sebagai milligram ekuivalen *quercetin* (QE) per gram ekstrak menggunakan persamaan dari kurva standar *quercetin*.

### 3.6.5 Penentuan Aktifitas Antioksidan

Pada masing-masing ekstrak n-heksana, etil asetat dan metanol dari daun girang (*Leea indica*) diuji aktivitas antioksidan dan dibandingkan dengan vitamin C sebagai kontrol positif.

#### 3.6.5.1 Pengukuran Efek Peredaman Terhadap Radikal 1,1diphenyl-2-picrylhydrazyl (DPPH)

Aktivitas peredaman radikal DPPH diukur berdasarkan metode Saeed et al. (2012) yang dimodifikasi. Sebanyak 50 µL larutan ekstrak dengan 5 konsentrasi yang berbeda dimasukkan ke dalam *microplate reader*. Setelah itu ditambahkan 250 µL reagen DPPH 90 µM (dalam metanol) dan diinkubasi selama 30 menit. Penurunan warna ungu akibat penambahan larutan DPPH diukur absorbansinya dengan menggunakan dengan spektrofotometer Uv-Vis pada λ 517 nm. Dihitung persen peredaman radikal DPPH pada masing-masing konsentrasi fenol.

$$\text{Persen peredaman radikal} = \frac{(A_0 - A_1)}{A_0} \times 100\%$$

Dimana  $A_0$  adalah absorbansi kontrol dan  $A_1$  adalah absorbansi sampel. Kontrol merupakan larutan yang tidak ditambahkan sampel.

Parameter lain yang di uji dalam analisis peredaman radikal DPPH adalah nilai  $IC_{50}$ .  $IC_{50}$  merupakan ukuran kemampuan antioksidan berdasarkan konsentrasi ekstrak yang diperlukan untuk menghambat aktivitas radikal DPPH hingga 50%. Perhitungan nilai  $IC_{50}$  adalah sebagai berikut:

$$IC_{50} = 10^{\left(\frac{50-a}{b}\right)}$$

Nilai a dan b diperoleh dari persamaan linear  $y = bx + a$ . Kontrol positif menggunakan vitamin C sedangkan kontrol negatif menggunakan metanol

#### 3.6.5.2 Pengukuran Efek Peredaman Terhadap Radikal Superoksida

Aktivitas peredaman radikal anion superoksida ditentukan berdasarkan autooksidasi pyrogallol yang mengacu pada Tang *et al.* (2010). Sebanyak 200  $\mu$ L larutan ekstrak dicampur dengan 1,7 mL buffer Tris-HCl 50 mM (pH 8,2) dalam tabung reaksi. Campuran diinkubasi pada suhu ruang selama 10 menit. Sebanyak 100  $\mu$ L pyrogallol 10 mM (dalam HCl 10 mM) ditambahkan setelah 10 menit. Slope reaksi autooksidasi pyrogallol selama 4 menit ditentukan pada 320 nm. Vitamin C digunakan standar positifnya. Dihitung persen peredaman radikal anion superoksida. Nilai persen peredaman radikal anion superoksida dapat dihitung melalui persamaan berikut:

$$\text{Persen peredaman radikal} = \frac{(A_0 - A_1)}{A_0} \times 100\%$$

Dimana  $A_0$  adalah slope kontrol dan  $A_1$  adalah slope sampel. Kontrol merupakan larutan yang tidak ditambahkan sampel.

#### 3.6.5.3 Pengukuran Efek Peredaman Terhadap Radikal Hidroksil

Aktivitas peredaman radikal hidroksil ditentukan dengan mengacu pada Gutteridge *et al.* (1988). Campuran 50  $\mu$ L 2-deoxy-2-ribose 28 mM (dalam buffer fosfat 20 mM; pH 7,4), 150  $\mu$ L ekstrak, 100  $\mu$ L EDTA 1 mM, 100  $\mu$ L  $FeCl_3$  10mM, 50  $\mu$ L  $H_2O_2$  1 mM, dan 50  $\mu$ L asam askorbat 1 mM dimasukkan dalam eppendorf dan divortex. Setelah itu diinkubasi pada suhu 37° C selama 1 jam.

Setelah 1 jam ditambahkan 500  $\mu\text{L}$  TBA 1% dan 500  $\mu\text{L}$  TCA 2,8%. Campuran divortex dan diinkubasi lagi untuk menghasilkan warna merah muda pada suhu 100° C selama 20 menit. Campuran didinginkan dan ditentukan absorbansinya pada 532nm. Vitamin C digunakan sebagai standar positif. Dihitung persen peredaman radikal hidroksil. Nilai persen peredaman radikal hidroksil dapat dihitung melalui persamaan berikut:

$$\text{Persen peredaman radikal} = \frac{(A_0 - A_1)}{A_0} \times 100\%$$

Dimana  $A_0$  adalah absorbansi kontrol dan  $A_1$  adalah absorbansi sampel. Kontrol merupakan larutan yang tidak ditambahkan sampel.

### 3.7 Analisis Data

Analisis data hasil penelitian ini menggunakan uji statistik *one way ANOVA*. Untuk mengetahui distribusi data, terlebih dahulu dilakukan uji normalitas *shapiro wilk*. Apabila dihasilkan data dengan distribusi normal, maka dapat dilanjutkan dengan uji statistik *one way ANOVA* dengan tingkat signifikansi  $p < 0,05$ . Analisis data dilakukan dengan mengaplikasikan software SPSS 17.0.