



**PENENTUAN AKTIVITAS ANTIOKSIDAN EKSTRAK
DAUN TANAMAN MENGGUNAKAN METODE
SPEKTROFOTOMETRI *NEAR INFRARED*
DAN KEMOMETRIK**

SKRIPSI

Oleh

Ekananda Putri Kartikasari

NIM 112210101035

**FAKULTAS FARMASI
UNIVERSITAS JEMBER**

2017



**PENENTUAN AKTIVITAS ANTIOKSIDAN EKSTRAK
DAUN TANAMAN MENGGUNAKAN METODE
SPEKTROFOTOMETRI *NEAR INFRARED*
DAN KEMOMETRIK**

SKRIPSI

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

Oleh

Ekananda Putri Kartikasari

NIM 112210101035

**FAKULTAS FARMASI
UNIVERSITAS JEMBER**

2017

PERSEMBAHAN

Skripsi ini penulis persembahkan untuk:

1. Ayahanda Sutiyono Trimulyanto dan Ibunda Heny Mortianingsih, atas do'a, kasih sayang, motivasi, dan kepercayaan yang mengalir tiada henti kepada penulis.
2. Bapak dan ibu Guru di TK Kemala Bhayangkari, SD Negeri Jember Lor 4, SMP Negeri 2 Jember, dan SMA Negeri 1 Jember yang telah memberikan fondasi untuk membangun masa depan penulis.
3. Seluruh orang yang peduli dan menyayangi penulis, akhirnya penulis bisa mencapai tahap ini.
4. Almamater Fakultas Farmasi Universitas Jember.

MOTTO

"The clock is running. Make the most of today. Time waits for no man. Yesterday is history. Tomorrow is a mystery. Today is a gift. That's why it is called the present."

(Alice Morse Earle)



PERNYATAAN

Saya yang bertanda tangan dibawah ini:

Nama : Ekananda Putri Kartikasari

NIM : 112210101035

menyatakan dengan sesungguhnya bahwa karya ilmiah yang berjudul “Penentuan Aktivitas Antioksidan Ekstrak Daun Tanaman Menggunakan Metode Spektrofotometri *Near Infrared* dan Kemometrik” adalah benar-benar hasil karya sendiri, kecuali kutipan yang sudah saya sebutkan sumbernya, belum pernah diajukan pada institusi manapun, 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 manapun serta bersedia mendapat sanksi akademik jika ternyata di kemudian hari pernyataan ini tidak benar.

Jember, 12 Juli 2017

Yang menyatakan,

Ekananda Putri Kartikasari

NIM. 112210101035

SKRIPSI

**PENENTUAN AKTIVITAS ANTIOKSIDAN EKSTRAK
DAUN TANAMAN MENGGUNAKAN METODE
SPEKTROFOTOMETRI *NEAR INFRARED*
DAN KEMOMETRIK**

Oleh

Ekananda Putri Kartikasari

NIM 112210101035

Pembimbing

Dosen Pembimbing Utama : Lesty Wulandari, S.Si., Apt., M.Farm.

Dosen Pembimbing Anggota : Nia Kristiningrum, S.Farm., Apt., M.Farm.

PENGESAHAN

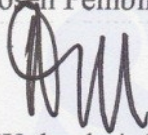
Skripsi berjudul "Penentuan Aktivitas Antioksidan Ekstrak Daun Tanaman Menggunakan Metode Spektrofotometri *Near Infrared* dan Kemometrik" karya Ekananda Putri Kartikasari telah diuji dan disahkan pada:

Hari, tanggal : Rabu, 12 Juli 2017

Tempat : Fakultas Farmasi Universitas Jember.

Tim Pembimbing:

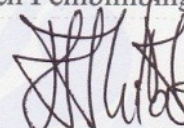
Dosen Pembimbing Utama,



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

NIP. 197604142002122001

Dosen Pembimbing Anggota,

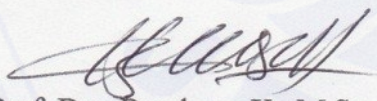


Nia K., S.Farm., Apt., M.Farm.

NIP. 198204062006042001

Tim Penguji:

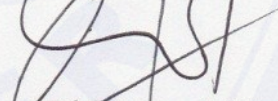
Dosen Penguji 1,



Prof. Drs. Bambang K., M.Sc., Ph.D.

NIP. 196902011994031002

Dosen Penguji II,



Dian Agung P., S.Farm., M.Farm., Apt

NIP. 198410082008121004



Mengesahkan

Dekan,

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

NIP. 197604142002122001

RINGKASAN

Penentuan Aktivitas Antioksidan Ekstrak Daun Tanaman Menggunakan Metode Spektrofotometri *Near Infrared* dan Kemometrik; Ekananda Putri Kartikasari, 112210101035; 2017; 72 halaman; Fakultas Farmasi, Universitas Jember.

Antioksidan merupakan senyawa yang dapat menangkal atau meredam dampak negatif oksidan dalam tubuh. Senyawa ini bekerja dengan cara mendonorkan salah satu elektronnya pada senyawa yang bersifat oksidan sehingga aktivitas senyawa oksidan tersebut terhambat. Pada penelitian ini dilakukan penentuan aktivitas antioksidan menggunakan instrumen spektrofotometri *near infrared* karena metode analisis yang umum digunakan untuk menentukan aktivitas antioksidan membutuhkan tahapan analisis yang panjang dan waktu analisis yang cukup lama. Keuntungan menggunakan metode spektrofotometri *near infrared* diantaranya adalah bersifat non destruktif, jumlah sampel yang dibutuhkan sedikit, hampir semua bentuk sampel dapat diteliti, dan teknik hampir tidak memerlukan pelarut kimia sehingga lebih ramah lingkungan.

Penentuan aktivitas antioksidan dengan metode spektrofotometri *near infrared* dan kemometrik ini memerlukan suatu analisis data multivariat (kemometrik) untuk mengekstrak informasi spektrum yang diperlukan dari spektrum inframerah dan menggunakan informasi spektrum tersebut untuk aplikasi kualitatif dan kuantitatif dengan menggunakan perangkat lunak *The Unscrambler X 10.2*. Teknik yang digunakan dari metode kemometrik untuk pembuatan model kalibrasi (analisis kuantitatif) dan model klasifikasi (analisis kualitatif) dalam penelitian ini masing-masing adalah *Support Vector Machines Regression* (SVMR) dan *Support Vector Machines Classification* (SVMC). Penetapan kadar ini kemudian divalidasi

dengan metode validasi silang (*cross validation*) *Leave-One-Out-Cross-Validation* (LOOCV) dan *2-Fold Cross-Validation* untuk menguji validitas model regresi.

Metode pembandingan yang digunakan dalam penelitian ini adalah metode spektrofotometri UV-Vis menggunakan pereaksi DPPH 0,1 mM dengan pembandingan Vitamin C. Berdasarkan hasil penelitian, model SVMR dengan spektroskopi NIR memberikan hasil terbaik dengan nilai R^2 kalibrasi sebesar 0,9811205; R^2 validasi sebesar 0,9741873; RMSEC sebesar 4,4940028, dan RMSEV sebesar 5,2207675. Validasi model juga memberikan nilai yang baik dengan R^2 kalibrasi dan validasi LOOCV masing-masing sebesar 0,9802536 dan 0,9751751, sedangkan untuk R^2 *2-Fold-Cross-Validation* sebesar 0,9884. Model klasifikasi SVMC yang digunakan pada pengkategorian antara sampel yang memiliki aktivitas antioksidan dan tidak memiliki aktivitas antioksidan menghasilkan akurasi sebesar 100%.

Model SVMC dan SVMR yang telah terbentuk dan tervalidasi kemudian diterapkan pada sampel nyata dan sampel simulasi sehingga diperoleh nilai IC_{50} prediksi dalam sampel nyata dan sampel simulasi. Nilai IC_{50} pada sampel nyata yang diperoleh dari spektrofotometri *near infrared* sebesar 125,172 $\mu\text{g/ml}$ untuk kapsul Stimuno, 252,350 $\mu\text{g/ml}$ untuk kapsul Daun salam, dan 301,994 $\mu\text{g/ml}$ untuk kapsul Daun Sirsak. Sedangkan nilai IC_{50} pada sampel simulasi yang diperoleh dari spektrofotometri *near infrared* sebesar 51,482 $\mu\text{g/ml}$ untuk sampel dengan kode T, 136,854 $\mu\text{g/ml}$ untuk sampel dengan kode U, dan 64,570 $\mu\text{g/ml}$ untuk sampel dengan kode V. Hasil analisis ini kemudian dibandingkan dengan nilai IC_{50} yang diperoleh dari metode spektrofotometri UV-Vis. Hasil penetapan nilai IC_{50} sampel yang diperoleh dari dua metode berbeda ini kemudian diuji dengan Uji T Dua Sampel Berpasangan dan dengan kurva regresi. Dari hasil yang didapatkan, dapat ditarik kesimpulan bahwa kadar yang diperoleh tidak memiliki perbedaan yang bermakna dengan nilai signifikansi 0,134, T hitung 1,575, dan R^2 0,9511 sedangkan pengkategorian sampel nyata dan sampel simulasi dengan model SVMC memberikan persen kemampuan prediksi sebesar 83,333%.

PRAKATA

Puji syukur penulis panjatkan kehadirat Tuhan Yang Maha Esa atas segala rahmat dan karunia-Nya sehingga penulis dapat menyelesaikan skripsi yang berjudul “Penentuan Aktivitas Antioksidan Ekstrak Daun Tanaman Menggunakan Metode Spektrofotometri *Near Infrared* dan Kemometrik”. Skripsi ini disusun untuk memenuhi salah satu syarat menyelesaikan pendidikan strata satu (S1) pada Fakultas Farmasi Universitas Jember.

Penyusunan skripsi ini tidak lepas dari bantuan berbagai pihak. Oleh karena itu, penulis menyampaikan ucapan terima kasih kepada :

1. Ibu Lestyo Wulandari, S.Si., Apt., M.Farm selaku Dekan Fakultas Farmasi Universitas Jember;
2. Ibu Lestyo Wulandari, S.Si., Apt., M.Farm selaku Dosen Pembimbing Utama dan Ibu Nia Kristiningrum, S.Farm., Apt., M.Farm selaku Dosen Pembimbing Anggota yang telah meluangkan waktu, pikiran dan perhatian serta dengan sabar membimbing saya untuk menyelesaikan penelitian dan skripsi ini;
3. Bapak Prof. Drs. Bambang Kuswandi, M.Sc., Ph.D. selaku Dosen Penguji I dan Bapak Dian Agung Pangaribowo, S.Farm., M.Farm., Apt. selaku Dosen Penguji II yang dengan sabar memberikan saran dalam penulisan skripsi ini;
4. Ibu Evi Umayah Ulfa S.Si., M.Si., Apt. dan Bapak Dwi Koko Pratoko S.Farm., M.Sc., Apt. selaku Dosen Pembimbing Akademik yang telah membimbing selama saya menjadi mahasiswa;
5. Seluruh Dosen Fakultas Farmasi Universitas Jember yang telah memberi ilmu, berbagi pengalaman dan selalu memotivasi penulis selama masa perkuliahan, juga staf dan karyawan atas segala bantuan yang diberikan selama saya menjadi mahasiswa Fakultas Farmasi Universitas Jember;
6. Ibu Wayan dan Mbak Hani selaku teknisi Laboratorium Kimia Farmasi Universitas Jember yang telah banyak membantu saya selama penelitian;

7. Orang tua tercinta Bapak Sutiyono Trimulyanto dan Ibu Heny Mortianingsih yang senantiasa memberi doa, kasih sayang, semangat dan motivasi yang tidak terhingga untuk mengiringi perjalanan hidup penulis, adik Dwitiya Raafi'u Rosyidah dan seluruh keluarga besar yang selalu menjadi penyemangat;
8. Partner skripsi (Diya dan Irun) yang selalu siap memberikan bantuan berupa tenaga, pikiran dan juga pundak saat hasil yang didapatkan kurang memuaskan;
9. Semua rekan seperjuangan penelitian bagian Kimia Farmasi yang telah banyak membantu;
10. Teman-teman Angkatan 2011 Fakultas Farmasi Universitas Jember (ASMEF) yang tidak dapat disebutkan satu per satu;
11. Keluarga besar UKMO Essensi untuk ilmu non akademis yang telah banyak membantu saya;
12. Niken, Elsa, Renova, Fiki, Dini, Putri, Fitri, Orin, Mia, dan Nurul atas segala masukan, *sharing* pengalaman, cerita dan banyak bantuan yang telah diberikan;
13. Semua pihak yang tidak dapat penulis sebutkan satu per satu.

Hanya doa yang dapat penulis panjatkan semoga segala kebaikan yang diberikan kepada penulis mendapat balasan dari Tuhan Yang Maha Esa. Penulis juga menerima kritik dan saran dari semua pihak demi kesempurnaan skripsi ini. Akhirnya penulis berharap, semoga skripsi ini dapat bermanfaat.

Jember, 12 Juli 2017

Penulis

DAFTAR ISI

	Halaman
HALAMAN JUDUL	ii
HALAMAN PERSEMBAHAN	iii
HALAMAN MOTTO	iv
HALAMAN PERNYATAAN.....	v
HALAMAN PEMBIMBING	vi
HALAMAN PENGESAHAN.....	vii
RINGKASAN	viii
PRAKATA.....	x
DAFTAR ISI.....	xii
DAFTAR TABEL	xv
DAFTAR GAMBAR.....	xvi
DAFTAR LAMPIRAN	xvii
BAB 1. PENDAHULUAN	1
1.1 Latar Belakang.....	1
1.2 Rumusan Masalah	3
1.3 Tujuan Penelitian.....	3
1.4 Manfaat Penelitian.....	4
1.5 Batasan penelitian	4
BAB 2. TINJAUAN PUSTAKA.....	5
2.1 Daun	5
2.2 Simplisia.....	5
2.3 Ekstrak.....	6
2.4 Metode Ekstraksi	7
2.5 Radikal Bebas.....	8
2.6 Antioksidan.....	9
2.7 Metode Pengujian Aktivitas Antioksidan.....	9

2.7.1	Metode DPPH.....	10
2.7.2	Aktivitas Penghambatan Radikal Nitrogen Monoksida	11
2.7.3	Metode ABTS.....	11
2.7.4	Metode FRAP.....	12
2.7.5	Kapasitas Serapan Radikal Oksigen (ORAC)	12
2.7.6	Metode Aktivitas Penghambatan Radikal Hidroksil	12
2.7.7	Metode Kekuatan Pereduksi.....	13
2.7.8	Lipid Peroksidasi Mikrosomal	13
2.7.9	Metode Xantin Oksidase	13
2.8	Spektrofotometri UV-Vis	13
2.9	<i>Near Infrared Spectroscopy</i> (NIR).....	14
2.10	Kemometrik dan Multivariat.....	15
2.10.1	<i>Principal Component Analysis</i> (PCA).....	16
2.10.2	<i>Linear Discriminant Analysis</i> (LDA).....	17
2.10.3	<i>Soft Independent Modelling of Class Analogies</i> (SIMCA)	17
2.10.4	<i>Partial Least Square</i> (PLS)	18
2.10.5	<i>Support Vector Machines</i> (SVM).....	18
2.11	Validasi Silang.....	19
2.11.1	Leave One Out Cross Validation.....	19
2.11.2	K Fold Cross Validation	19
2.11.3	2 Fold Cross Validation.....	20
BAB 3.	METODOLOGI PENELITIAN.....	21
3.1	Tempat dan Waktu Penelitian.....	21
3.2	Rancangan Penelitian	21
3.3	Alat dan Bahan Penelitian.....	21
3.3.1	Alat Penelitian	21
3.3.2	Bahan Penelitian.....	22
3.4	Alur Penelitian	23
3.5	Prosedur Penelitian.....	24

3.5.1	Pengumpulan Sampel	24
3.5.2	Pembuatan Ekstrak	25
3.5.3	Penentuan Nilai IC ₅₀ dengan Spektrofotometer UV-Vis.....	26
3.5.4	Penentuan Data NIR	28
3.5.5	Pembentukan Model Klasifikasi dan Kalibrasi	28
3.5.6	Validasi Model Terpilih	29
3.5.7	Aplikasi pada Sampel Ekstrak Nyata	30
BAB 4.	HASIL DAN PEMBAHASAN.....	31
4.1	Pembuatan Ekstrak Sampel.....	31
4.2	Penetapan Aktivitas Antioksidan dengan Metode DPPH.....	32
4.2.1	Penetapan Panjang Gelombang Maksimum.....	32
4.2.2	Penentuan Waktu Inkubasi.....	33
4.2.3	Pengukuran Aktivitas Antioksidan.....	35
4.3	Pembentukan Model Kalibrasi dan Klasifikasi	36
4.3.1	Pembentukan Model Klasifikasi dengan SVMC, LDA, dan SIMCA.	37
4.3.2	Pembentukan Model Kalibrasi dengan PLS, SVMR, dan PCR.....	40
4.4	Validasi Model Kalibrasi dan Klasifikasi Terpilih	43
4.4.1	Validasi Model dengan <i>Leave One Out Cross Validation</i>	44
4.4.2	Validasi Model dengan <i>2-Fold Cross Validation</i>	46
4.5	Penerapan Model Terpilih terhadap Sampel	47
BAB 5.	PENUTUP.....	50
5.1	Kesimpulan.....	50
5.2	Saran	50
DAFTAR PUSTAKA		51
LAMPIRAN.....		58

DAFTAR TABEL

	Halaman
2.1 Tingkat kekuatan antioksidan dengan metode DPPH	10
3.1 Simplisia yang digunakan.....	22
3.2 Ekstrak daun yang sudah jadi	22
3.3 Identitas kode tanaman	25
4.1 Waktu inkubasi sampel <i>training set</i>	34
4.2 Waktu inkubasi sampel <i>test set</i>	35
4.3 Hasil penentuan nilai IC_{50} sampel <i>training set</i>	36
4.4 Hasil penentuan nilai IC_{50} sampel <i>test set</i>	36
4.5 Perbandingan kemampuan pengenalan model klasifikasi	40
4.6 Perbandingan parameter model kalibrasi	42
4.7 Data hasil klasifikasi sampel pada validasi <i>2-fold cross validation</i>	46
4.8 Data hasil klasifikasi sampel nyata dan sampel simulasi	47
4.9 Hasil perhitungan IC_{50} ekstrak sampel nyata dan sampel simulasi dengan spektroskopi NIR dan dengan metode pembanding (metode spektrofotometri UV-Vis)	48

DAFTAR GAMBAR

	Halaman
2.1 Instrumentasi NIR.....	15
3.1 Skema alur penelitian	23
4.1 Spektra panjang gelombang DPPH 0,1 mM dengan λ maksimum 515,5 nm	33
4.2 Grafik penentuan waktu inkubasi sampel <i>training set</i> dan <i>test set</i>	34
4.3 Grafik hasil pemetaan <i>training set</i> model LDA	38
4.4 Grafik hasil pemetaan <i>training set</i> model SVMC	38
4.5 Grafik hasil pemetaan <i>training set</i> model SIMCA.....	39
4.6 Grafik hasil pemetaan <i>training set</i> model PLS.....	41
4.7 Grafik hasil pemetaan <i>training set</i> model SVMR	41
4.8 Grafik hasil pemetaan <i>training set</i> model PCR.....	42
4.9 Grafik hasil klasifikasi sampel pada validasi LOOCV.....	44
4.10 Grafik hasil kalibrasi sampel pada validasi LOOCV	45
4.11 Grafik hasil kalibrasi sampel pada validasi <i>2-fold cross validation</i>	47

DAFTAR LAMPIRAN

	Halaman
4.1 Alat dan Bahan yang Digunakan	58
4.2 Perhitungan % Rendemen	60
4.3 Spektrum Sampel dengan Spektroskopi NIR	60
4.4 Identitas Sampel Ekstrak	61
4.5 Perhitungan Pembuatan Larutan DPPH 0,1 mM.....	62
4.6 Data Penetapan Panjang Gelombang Maksimum DPPH 0,1 mM.....	62
4.7 Contoh Perhitungan IC ₅₀ dengan Spektrofotometri UV-Vis.....	65
4.8 Data Hasil Prediksi Kategori Sampel pada Model Klasifikasi.....	68
4.9 Data Hasil Prediksi IC ₅₀ Sampel pada Model Kalibrasi (0,1 µg/ml)	69
4.10 Contoh Perhitungan IC ₅₀ Hasil Prediksi NIR.....	70
4.11 Hasil Analisis Statistik Uji T dengan Program <i>Statistical Product and Service Solutions</i> (SPSS) dan Regresi.....	70
4.12 Tabel Distribusi Normal Standar T	72

BAB 1. PENDAHULUAN

1.1 Latar Belakang

Indonesia terkenal sebagai *megadiversity country*. Indonesia merupakan negara kepulauan yang luasnya mencapai 1,3% dari luas permukaan bumi sehingga Indonesia memiliki keanekaragaman hayati dan Sumber Daya Genetik (SGD) yang melimpah (Kementerian Lingkungan Hidup RI, 2014a). Indonesia merupakan salah satu dari 12 Pusat Keanekaragaman Hayati Dunia yang memiliki \pm 28.000 jenis tanaman dan diantaranya terdapat 400 jenis buah yang dapat dimakan dan sangat bermanfaat. Selain itu, Indonesia memiliki 7500 jenis tanaman obat yang merupakan 10% tanaman obat yang ada di dunia. Namun, hanya 940 spesies tanaman yang telah teridentifikasi dan lebih dari 6000 spesies tanaman dimanfaatkan sebagai bahan makanan, pakaian, dan obat-obatan (Kementerian Lingkungan Hidup RI, 2014). Masih banyak tanaman di Indonesia yang belum diteliti untuk mengetahui potensinya sebagai sumber pengobatan. Dengan melihat kenyataan tersebut, maka usaha untuk mencari informasi kandungan senyawa kimia melalui penelitian ilmiah menjadi sangat penting.

Berbagai tahapan pengerjaan dilakukan untuk memperoleh kandungan kimia dari suatu tanaman, dimulai dari ekstraksi, skrining, dan identifikasi komponen kimia (Harborne, 1987). Pembuatan sediaan ekstrak dimaksudkan agar zat berkhasiat yang terdapat pada simplisia didapat dalam bentuk sediaan yang memiliki kadar tinggi (Anief, 1987). Keuntungan dari penggunaan ekstrak dibandingkan dengan menggunakan simplisia adalah lebih sederhana dan bobot pemakaian yang lebih sedikit dibandingkan dengan bobot tanaman aslinya.

Kandungan senyawa kimia pada berbagai tanaman dijumpai secara tersebar ataupun terpusat pada organ tubuh tanaman seperti daun, bunga, buah, biji, akar, rimpang, atau kulit batang (Hornok, 1992). Pada beberapa bagian tanaman, terutama pada sel tanaman yang mengalami fotosintesis yaitu pada bagian daun, telah banyak

ditemukan senyawa fenolik (Kumar dan Pandey, 2013). Dimana senyawa tersebut merupakan salah satu sumber antioksidan alami.

Antioksidan adalah suatu senyawa yang dapat menunda atau mencegah terjadinya reaksi oksidasi radikal bebas. Radikal bebas adalah molekul yang mengandung satu atau lebih elektron yang tidak berpasangan. Radikal bebas ini sangat reaktif dan berperan terhadap patologi berbagai penyakit degeneratif antara lain kanker, aterosklerosis, jantung koroner, rematik, katarak, dan penyakit degeneratif saraf seperti parkinson (Silalahi, 2006). Oleh karena itu, dibutuhkan tambahan asupan antioksidan dari luar tubuh agar kapasitas radikal bebas untuk menimbulkan kerusakan dapat dikurangi (Soltani dan Baharara, 2014).

Terdapat beberapa metode yang digunakan untuk mengidentifikasi adanya aktivitas antioksidan, diantaranya yaitu melihat nilai *Inhibition Concentration* 50% (IC_{50}) menggunakan metode spektrofotometri UV-Vis dengan reagen *2,2-Diphenyl-1-picrylhydrazyl* (DPPH) (Brand-Williams dkk., 1995; Zuhra dkk., 2008; Dehpour dkk., 2009) dan *near infrared* (NIR) (Wu dkk., 2012). Metode spektrofotometri NIR merupakan salah satu pilihan yang efektif untuk analisis karena merupakan teknik analisis non destruktif. Keuntungan penggunaan NIR yaitu dapat menganalisis dengan kecepatan tinggi, tidak menimbulkan polusi, dan tidak memerlukan bahan kimia (Karlinasari dkk., 2012). Spektrum infra merah yang dihasilkan merupakan hasil interaksi antara senyawa-senyawa kimia dalam matriks sampel yang sangat kompleks. Spektrum ini sangat rumit, perbedaan antara spektrum dari tanaman yang sejenis tidak tampak dengan jelas dan pada umumnya tidak dapat diinterpretasikan secara visual (Sim dkk., 2004).

Teknik kemometrik seperti analisis multivariat dapat digunakan untuk memudahkan analisa data yang dihasilkan oleh spektrum inframerah (Gad dkk., 2013). Manfaat dari metode statistik multivariat tersebut adalah kemampuannya untuk mengekstrak informasi spektrum yang diperlukan dari spektrum inframerah dan menggunakan informasi tersebut untuk aplikasi secara kualitatif dan kuantitatif. Metode statistik multivariat sering disebut dengan metode kemometrik (Ritz dkk.,

2011). Pada penelitian ini digunakan metode kemometrik *Linear Discriminant Analysis* (LDA) dan *Partial Least Square* (PLS), dimana dua metode tersebut merupakan metode yang paling banyak digunakan secara luas.

Mengacu pada uraian tersebut, maka dalam penelitian ini akan dilakukan penentuan aktivitas antioksidan pada ekstrak daun tanaman menggunakan metode spektrofotometri NIR dan kemometrik. Hasil nilai kadar yang didapatkan akan dibandingkan dengan hasil nilai kadar pada analisis menggunakan metode spektrofotometri UV-Vis.

1.2 Rumusan Masalah

Berdasarkan latar belakang di atas maka rumusan masalah yang diperoleh adalah:

1. Apakah metode spektrofotometri *near infrared* dan kemometrik dapat menentukan aktivitas antioksidan (IC_{50}) pada ekstrak daun tanaman?
2. Apakah aktivitas antioksidan (IC_{50}) sampel nyata yang ditetapkan dengan metode NIR-kemometrik tidak berbeda signifikan dengan metode DPPH?

1.3 Tujuan Penelitian

1. Menentukan aktivitas antioksidan (IC_{50}) pada ekstrak daun tanaman dengan metode spektrofotometri *near infrared* dan kemometrik.
2. Mengetahui ada atau tidaknya perbedaan yang signifikan antara aktivitas antioksidan (IC_{50}) yang ditetapkan dengan metode NIR-kemometrik dibandingkan dengan metode DPPH.

1.4 Manfaat Penelitian

1. Memberikan pengetahuan tentang metode analisis aktivitas antioksidan yang lebih sederhana, cepat, dan mudah.
2. Bagi mahasiswa peneliti dapat mengasah kemampuan, kreativitas dan keahlian di bidang kimia analisis.
3. Memberikan pengetahuan tentang aktivitas antioksidan yang terdapat pada beberapa daun tanaman.
4. Model yang diperoleh dapat digunakan untuk efisiensi *screening* obat baru.
5. Model yang dihasilkan dapat digunakan sebagai kontrol kualitas bahan baku ekstrak herbal.

1.5 Batasan penelitian

Batasan masalah dalam penelitian ini adalah:

1. Penentuan aktivitas antioksidan menggunakan spektrofotometri UV-Vis dengan reagen DPPH dan aktivitas antioksidan dinyatakan dengan nilai IC_{50} .
2. Sampel nyata yang digunakan adalah ekstrak daun yang tidak termasuk dalam *training set* maupun *test set*.

BAB 2. TINJAUAN PUSTAKA

2.1 Daun

Daun (*folium*) merupakan satu dari struktur utama tanaman yang memiliki fungsi utama sebagai pelaksana proses fotosintesis. Dalam proses tersebut, daun melakukan fungsi eksternalnya yaitu melakukan respirasi, transpirasi dan absorpsi cahaya (Haryadi, 2013).

Fungsi utama daun adalah membuat makanan melalui fotosintesis. Hal ini terjadi pada helaian daun yang tipis. Pada kebanyakan tanaman dikotil, helaian daun menempel pada batang dengan tangkai daun (petiola). Sistem pembuluh pada batang meluas sampai ke tangkai daun, dan tulang daun ke dalam helaian daun itu sendiri (Cutter, 1989).

Daun mempunyai bentuk dan ukuran yang bervariasi, mulai dari yang berbentuk duri kecil hingga daun yang berbentuk lebar. Sekalipun bentuk dan ukurannya tampak bervariasi, pada dasarnya daun terdiri dari tiga bagian, yaitu bagian pelepah (vagina), tangkai daun (petiolus) dan helaian daun (lamina). Daun yang memiliki ketiga bagian tersebut dinamakan daun lengkap. Pada sebagian besar tanaman, daun hanya terdiri dari satu atau dua bagian saja. Daun-daun tersebut dinamakan sebagai daun tidak lengkap (Latifa, 2015).

2.2 Simplisia

Menurut *Materia Medika Indonesia* jilid VI (1995a), simplisia adalah bahan alami yang digunakan sebagai obat, belum mengalami pengolahan secara sederhana, dan kecuali dikatakan lain, merupakan bahan yang telah dikeringkan. Berdasarkan sumbernya, simplisia dapat dibedakan menjadi tiga, yaitu simplisia nabati, simplisia hewani, dan simplisia pelikan (mineral). Simplisia nabati merupakan simplisia yang berupa tanaman utuh, bagian tanaman atau eksudat tanaman. Eksudat adalah isi sel

yang secara spontan keluar dari tanaman atau isi sel yang dengan cara tertentu dipisahkan dari tanamannya dan belum berupa zat kimia. Simplisia hewani merupakan simplisia yang berupa hewan atau bagian hewan (zat-zat berguna) yang dihasilkan oleh hewan dan belum berupa zat kimia murni. Simplisia pelikan merupakan simplisia yang berupa bahan-bahan pelikan (mineral) yang belum diolah atau telah diolah dengan cara sederhana dan belum berupa zat kimia.

2.3 Ekstrak

Menurut Farmakope Indonesia edisi IV (1995), ekstrak merupakan sediaan kental yang diperoleh dengan mengekstrak 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 rupa sehingga memenuhi baku yang ditentukan.

Menurut (Voigt, 1995), ekstrak dapat dikelompokkan atas dasar sifatnya, antara lain:

- a. Ekstrak encer, merupakan sediaan yang memiliki konsentrasi seperti madu dan dapat dituang.
- b. Ekstrak kental, merupakan sediaan yang kuat dalam keadaan dingin dan tidak dapat dituang, dimana kandungan airnya berjumlah sampai 30%. Tingginya kandungan air menyebabkan sediaan obat tidak stabil karena cemaran bakteri (merupakan medium tumbuh yang baik untuk bakteri).
- c. Ekstrak kering, merupakan ekstrak yang memiliki konsentrasi kering dan mudah digoyangkan dan sebaiknya memiliki kelembaban tidak kurang dari 5%.
- d. Ekstrak cair, merupakan ekstrak yang dibuat sedemikian sehingga satu bagian simplisia sesuai dengan dua bagian ekstrak cair

2.4 Metode Ekstraksi

Ekstraksi adalah kegiatan penarikan kandungan kimia yang dapat larut hingga kandungannya terpisah dari bahan yang tidak dapat larut dengan pelarut cair. Simplisia yang akan diekstraksi mengandung senyawa aktif yang dapat larut dan senyawa aktif yang tidak larut seperti serat, karbohidrat, protein, dan lain-lain (DirJen POM, 2000). Tujuan ekstraksi bahan alam adalah untuk menarik kandungan kimia yang terdapat pada bahan alam. Ekstraksi didasarkan pada prinsip perpindahan massa komponen zat padat ke dalam pelarut yang sesuai, dimana perpindahan tersebut mulai terjadi pada lapisan antar muka kemudian berdifusi masuk ke dalam pelarut (Harborne, 1987). Menurut DirJen POM (2000) terdapat beberapa metode ekstraksi, antara lain:

- a. Maserasi, merupakan proses ekstraksi simplisia yang menggunakan pelarut dengan beberapa kali pengocokan atau pengadukan pada temperatur ruangan (kamar). Maserasi kinetik di lakukan dengan pengadukan secara kontinu (terus menerus). Remaserasi dilakukan dengan pengulangan penambahan pelarut setelah di lakukan penyaringan maserat pertama dan seterusnya.
- b. Perkolasi, merupakan ekstraksi dengan menggunakan pelarut yang selalu baru hingga penyarian sempurna, umumnya di lakukan pada temperatur ruangan. Proses ini terdiri dari tahapan pengembangan bahan, tahap maserasi antara, dan tahap perkolasi sebenarnya (penetesan / penampungan ekstrak) yang terus menerus hingga ekstrak habis tersari.
- c. Refluks, merupakan ekstraksi dengan pelarut pada temperatur titik didihnya, selama waktu tertentu dan dengan jumlah pelarut yang relatif konstan dengan adanya pendingin balik.
- d. Sokletasi, merupakan ekstraksi yang menggunakan pelarut yang selalu baru, umumnya dilakukan dengan alat khusus sehingga terjadi ekstraksi kontinu dan jumlah pelarut relatif konstan dengan adanya pendingin balik.
- e. Digesti, merupakan maserasi dengan pengadukan kontinu pada temperatur yang lebih tinggi dari temperatur ruangan yaitu pada temperatur 40-50° C.

- f. Infus, merupakan ekstraksi dengan pelarut air pada temperatur penangas air mendidih, temperatur terukur 96-98° C selama waktu tertentu (15-20 menit).
- g. Dekok, merupakan infus pada waktu yang lebih lama ($\geq 30^\circ$ C) dengan temperatur sampai titik didih air.

2.5 Radikal Bebas

Oksigen adalah atom yang sangat reaktif sehingga mampu menjadi bagian molekul yang berpotensi menyebabkan kerusakan yang biasa disebut radikal bebas. Radikal bebas tersebut menyerang sel-sel tubuh yang sehat, akibatnya sel-sel tersebut kehilangan struktur dan fungsinya (Percival, 1998). Radikal bebas merupakan molekul dengan elektron yang tidak berpasangan. Radikal bebas sangat tidak stabil dan dapat bereaksi cepat dengan senyawa lain, serta berusaha menangkap elektron agar memperoleh stabilitas (Sarma dkk., 2010). Radikal bebas dianggap berbahaya karena sangat reaktif dalam upaya mendapatkan pasangan elektronnya dan radikal bebas baru dapat terbentuk dari atom atau molekul yang elektronnya diambil untuk berpasangan dengan radikal bebas sebelumnya. Oleh karena memiliki sifat yang sangat reaktif dan gerakan yang tidak beraturan, bila terjadi dalam tubuh makhluk hidup akan menimbulkan kerusakan di berbagai bagian sel (Muhilal, 1991).

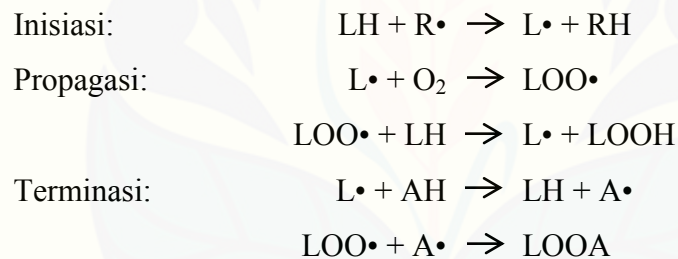
Oksigen yang sangat reaktif dan oksidasi dari protein, lemak, dan unsur lain dalam tubuh dapat menghasilkan radikal bebas. Selain itu, radikal bebas juga dapat disebabkan oleh lingkungan seperti produk samping dari industri plastik, ozon atmosfer, asap knalpot kendaraan, dan asap rokok. Kerusakan sel akibat radikal bebas tampaknya memiliki kontribusi terhadap penuaan dan berbagai penyakit degeneratif seperti kanker, penyakit jantung, katarak, penurunan sistem kekebalan tubuh, dan disfungsi otak (Percival, 1998; Tambayong, 2000).

Pembentukan radikal bebas dikendalikan secara alami oleh berbagai senyawa bermanfaat yang dikenal sebagai antioksidan. Namun apabila ketersediaan antioksidan terbatas, maka kerusakan dapat terakumulasi dan melemahkan fungsi sel-

sel tubuh. Pada serangan awal, radikal bebas dapat dinetralkan namun radikal bebas lain yang terbentuk dalam proses dapat menyebabkan reaksi berantai (Percival, 1998).

2.6 Antioksidan

Secara kimiawi, senyawa antioksidan merupakan senyawa pemberi elektron (*electron donors*). Secara biologis, pengertian antioksidan adalah senyawa yang dapat menangkal atau meredam dampak negatif oksidan dalam tubuh. Antioksidan bekerja dengan cara mendonorkan satu elektronnya kepada senyawa yang bersifat oksidan sehingga aktivitas senyawa oksidan tersebut dapat dihambat. Reaksi penghambatan antioksidan:



Menurut Antolovich dkk. (2002), antioksidan dapat menghambat maupun memperlambat pada tahapan inisiasi dengan mendonorkan salah satu elektronnya pada lemak radikal ($\text{L}\cdot$) dan menghambat pada tahap propagasi dengan cara bereaksi dengan radikal peroksi ($\text{LOO}\cdot$) membentuk senyawa peroksi antioksidan (LOOA).

2.7 Metode Pengujian Aktivitas Antioksidan

Uji aktivitas antioksidan dapat dilakukan secara *in vivo* maupun secara *in vitro*. Metode uji aktivitas antioksidan ada beberapa macam diantaranya metode DPPH, metode aktivitas penghambatan nitrogen monoksida radikal, metode ABTS,

metode FRAP, metode kapasitas serapan radikal oksigen (ORAC), metode kekuatan pereduksi, metode xantin oksidase, metode aktivitas penghambat radikal hidroksil, dan metode lipid peroksidasi mikrosomal.

2.7.1 Metode DPPH

Pada uji aktivitas antioksidan ini digunakan DPPH sebagai penghasil radikal hidroksil (Kim dkk., 2002). DPPH dalam metode ini berperan sebagai radikal bebas yang diredam oleh antioksidan dari bahan uji, dimana DPPH akan ditangkap oleh antioksidan melalui donasi atom hidrogen dari antioksidan sehingga membentuk DPPH-H tereduksi (Molyneux, 2004).

Reaksi penangkapan hidrogen oleh DPPH dari senyawa antioksidan menyebabkan perubahan warna yang dapat diukur dengan spektrofotometer UV-Vis pada panjang gelombang 515-520 nm pada pelarut organik (metanol atau etanol) (Molyneux, 2004). Penambahan antioksidan dengan berbagai konsentrasi akan menghilangkan warna ungu dan berangsur-angsur menjadi kuning sesuai besarnya konsentrasi zat antioksidan. Persen penghambatan akan meningkat dengan meningkatnya konsentrasi dari ekstrak (Dehpour dkk., 2009).

Tabel 2.1 Tingkat kekuatan antioksidan dengan metode DPPH

Intensitas	Nilai IC ₅₀
Sangat aktif	Kurang dari 50 ppm
Aktif	50 - 100 ppm
Sedang	101 - 150 ppm
Lemah	151 - 200 ppm

Sumber: Zuhra dkk., 2008

Kelebihan dari metode DPPH adalah secara teknis sederhana, cepat dan hanya membutuhkan spektrofotometer UV-Vis (Karadag dkk., 2009). Menurut Prakash dkk. (2001), metode DPPH mudah digunakan, cepat, cukup teliti, dan baik digunakan dalam pelarut organik, khususnya alkohol. Kontrol positif yang sering digunakan dalam metode ini yaitu asam askorbat (vitamin C) dan α -tokoferol (Molyneux, 2004).

2.7.2 Aktivitas Penghambatan Radikal Nitrogen Monoksida

Nitrogen monoksida memiliki elektron yang tidak berpasangan sehingga diklasifikasikan sebagai radikal bebas. Penghambatan secara in-vitro dari radikal nitrogen monoksida juga diukur sebagai aktivitas antioksidan. Metode ini didasarkan pada inhibisi dari pembentukan radikal nitrogen monoksida yang dihasilkan dari natrium nitroprusid dalam dapar *phosphate saline* dan diukur dengan pereaksi Griess. Dengan adanya penghambatan, absorbansi diukur pada 546 nm. Aktivitas ini menunjukkan sebagai % reduksi dari oksida nitrat (Alam dkk., 2013).

2.7.3 Metode ABTS

Metode peredaman radikal ABTS \bullet + merupakan metode uji untuk mengukur kapasitas antioksidan yang secara langsung bereaksi atau meredam radikal ABTS \bullet +. ABTS \bullet + merupakan radikal dengan karakteristik warna biru kehijauan yang ketika tereduksi oleh antioksidan menjadi bentuk nonradikal (ABTS) yang tidak berwarna. Metode ini berdasarkan penghambatan pembentukan kation radikal ABTS dengan absorpsi maksimum pada panjang gelombang 750 nm dengan spektrofotometer *diode-array* (Alam dkk., 2013).

2.7.4 Metode FRAP

FRAP (*Ferric Reducing Ability of Plasma*) merupakan salah satu uji kemampuan antioksidan untuk mereduksi Fe^{3+} . Prinsip metode ini berdasarkan adanya reduksi dari kompleks Fe^{3+} dan TPTZ (*2,3,5-triphenyl-1,3,4-triaza-2-azoniacyclopenta-1,4-diene-chloride*) serapannya diukur pada 593 nm menggunakan spektrofotometer *diode-array* (Alam dkk., 2013).

2.7.5 Kapasitas Serapan Radikal Oksigen (ORAC)

ORAC merupakan metode analisis yang baru yang dapat digunakan untuk menguji aktivitas antioksidan makanan dan senyawa kimia lainnya. Uji ini dilakukan dengan menggunakan trolox (analog vitamin E) sebagai standar untuk menentukan trolox ekuivalen (TE). Nilai ORAC kemudian dihitung dari TE dan dinyatakan sebagai satuan atau nilai ORAC. Semakin tinggi nilai ORAC, semakin besar kekuatan nilai antioksidannya. Pengukuran ini berdasarkan pembentukan radikal bebas menggunakan AAPH (*2,2-azobis-2-amidopropane-dihydrochloride*) dan pengukuran penurunan fluoresensi akibat adanya penghambatan radikal bebas (Alam dkk., 2013).

2.7.6 Metode Aktivitas Penghambatan Radikal Hidroksil

Metode ini melibatkan pembentukan radikal hidroksil secara *in vitro* menggunakan campuran ekstrak, *2-deoxy-dribose*, FeCl_3 , asam askorbat, EDTA, dan H_2O_2 kemudian ditambahkan *thiobarbituric acid* dan *trichloroacetic acid*. Penghambatan radikal hidroksil dengan adanya antioksidan diukur dengan spektroskopi pada panjang gelombang 532 nm, dibandingkan dengan blanko negatif. Aktivitas ini dinyatakan dengan penghambatan radikal hidroksil (Alam dkk., 2013).

2.7.7 Metode Kekuatan Pereduksi

Prinsip metode ini yaitu peningkatan serapan dari campuran yang bereaksi. Peningkatan serapan menunjukkan peningkatan aktivitas antioksidan. Pada metode ini campuran antioksidan membentuk kompleks berwarna dengan kalium ferisianida, trikloroasetat dan besi (III) klorida, yang diukur pada panjang gelombang 700 nm. Peningkatan serapan dari reaksi menunjukkan kekuatan inhibisi dari sampel (Alam dkk., 2013).

2.7.8 Lipid Peroksidasi Mikrosomal

Uji ini merupakan salah satu uji yang sering dilakukan untuk mengukur peroksidasi lipid. Metode ini melibatkan isolasi mikrosom dari hati tikus. Proses peroksidasi lipid menghasilkan sejumlah malonaldehida (MDA). Lapisan atas organ diambil dan dilihat pada panjang gelombang 532 nm (Alam dkk., 2013).

2.7.9 Metode Xantin Oksidase

Metode ini merupakan salah satu metode untuk mengukur aktivitas antioksidan. Adanya antioksidan diukur dari persentase inhibisi aktivitas xantin oksidase dengan spektrofotometer pada panjang gelombang 293 nm (Alam dkk., 2013).

2.8 Spektrofotometri UV-Vis

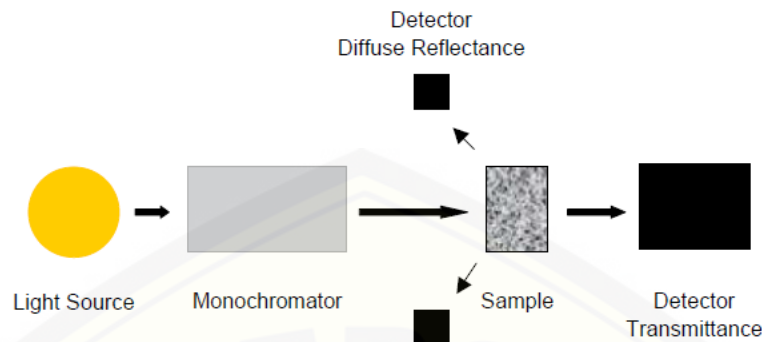
Teknik spektroskopi merupakan salah satu teknik analisis fisiko-kimia yang mengamati interaksi antara atom atau molekul dengan radiasi elektromagnetik (REM). Spektrum tampak terdapat pada rentang panjang gelombang 400 nm (ungu) hingga 750 nm (merah), sedangkan spektrum ultraviolet terdapat pada rentang 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 kemudian terbuang sebagai kalor, sebagai cahaya, atau tersalurkan dalam reaksi kimia (Fessenden dan Fessenden, 1995). Output dari spektrofotometri UV-Vis dapat berupa spektra yang digunakan sebagai informasi kualitatif dan dapat digunakan untuk analisis kuantitatif.

2.9 Near Infrared Spectroscopy (NIR)

Teknologi spektroskopi *near infrared* (NIR) adalah salah satu teknologi modern yang dapat menggantikan metode konvensional dan telah sukses diaplikasikan pada produk pertanian, farmasi, petrokimia dan lingkungan (Andasuryani dkk., 2014). Teknologi NIR telah berkembang sebagai salah satu metode non destruktif, dapat menganalisis dengan kecepatan tinggi, tidak menyebabkan polusi, dan tidak memerlukan bahan kimia. Spektroskopi NIR menggunakan gelombang elektromagnetik dengan panjang gelombang 780 nm - 2500 nm atau 12.800 cm^{-1} - 4000 cm^{-1} (Schwanninger dkk., 2011).

Teknik dalam Spektroskopi NIR didasarkan pada pengukuran cahaya yang dipantulkan atau ditransmisikan oleh sampel dimana spektrum NIR berasal dari energi radiasi yang ditransfer menjadi energi mekanik terkait oleh adanya gerakan atom yang dilakukan bersama oleh ikatan kimia dalam suatu molekul. Awalnya, sampel disinari oleh sumber cahaya dan cahaya yang dipantulkan atau ditransmisikan oleh sampel terkumpul pada detektor yang nantinya diubah menjadi sebuah spektrum (Lukman, 2015).



Gambar 2.1 Instrumentasi NIR (Reich, 2005)

Spektra NIR dapat menjadi kompleks karena seringkali pita spektra yang dihasilkan memunculkan puncak yang saling tumpang tindih sehingga sulit menentukan pita spektra tunggalnya (Karlinasari dkk., 2012). Untuk melakukan analisis NIR secara kualitatif atau kuantitatif, diperlukan metode metode statistik yaitu kemometrika (Reich, 2005).

2.10 Kemometrik dan Multivariat

Kemometrika adalah bidang interdisipliner yang menggunakan matematika dan statistik multivariat untuk memproses, mengekstraksi, dan memahami informasi yang relevan dari data analitis. Ahli kimia analitik adalah pengguna utama kemometrika, namun ada beberapa bidang yang didukung kuat dengan penggunaan kemometrika dari kimia fisik, seperti kinetika dan studi keseimbangan, kimia organik seperti optimasi reaksi, dan lain-lain (Brereton, 2003).

Analisis secara multivariat adalah analisis yang menggunakan banyak variabel untuk mendeskripsikan sistem. Keuntungan dari sistem multivariat adalah selektivitas sensor yang baik, model multivariat yang lebih memadai dan dapat menangani masalah yang tidak bisa dilakukan pada analisis univariat (Bro, 2003). Analisis multivariat menyediakan metode untuk mengurangi data berukuran besar yang diperoleh dari instrumen, seperti spektrofotometer.

Metode kalibrasi multivariat dapat dibagi berdasarkan kegunaan kualitatif atau kuantitatif. Untuk analisis kualitatif dapat menggunakan *Principal Component Analysis* (PCA), *Linear Discriminant Analysis* (LDA), dan *Soft Independent Modelling of Class Analogy* (SIMCA). Sedangkan untuk analisis kuantitatif dapat diklasifikasikan menjadi *Partial Least Square* (PLS), dan *Support Vector Regression* (SVM) (Roggo dkk., 2007).

2.10.1 *Principal Component Analysis* (PCA)

PCA secara umum dikenal sebagai teknik interpretasi multivariat. PCA digunakan sebagai alat statistik melalui penggunaan komponen-komponen yang diturunkan dalam sebuah model regresi untuk memprediksi variabel respon yang tidak teramati menggunakan komponen utama. Komponen utama bertujuan untuk menjelaskan sebanyak mungkin keragaman data dengan kombinasi linier yang ditemukan yang saling bebas satu sama lain dan di dalam arah keragaman paling besar. Tiap-tiap komponen utama merupakan kombinasi linier dari semua variabel. Komponen utama pertama menjelaskan variasi terbesar dari data diikuti dengan komponen utama kedua dan seterusnya (Varmuza, 2001).

Komponen-komponen utama ini dipilih sedemikian rupa sehingga PC1 memiliki variasi terbesar dalam set data, sedangkan PC2 tegak lurus terhadap komponen utama pertama dan memiliki variasi terbesar berikutnya (Miller dan Miller, 2010). Kedua komponen utama ini pada umumnya digunakan sebagai bidang proyeksi untuk pemeriksaan visual data multivariat. Jika jumlah varian dari PC1 dan PC2 lebih besar dari 70%, maka *score plot* memperlihatkan visualisasi dua dimensi yang baik (Varmuza, 2001).

2.10.2 *Linear Discriminant Analysis (LDA)*

LDA didasarkan pada penentuan fungsi diskriminan linier yang memaksimalkan rasio antara kelas varians dan meminimalkan rasio dalam kelas varian. Pada LDA, kelas seharusnya mengikuti distribusi normal multivariat dan distribusi linier (Berrueta dkk., 2007). Dengan menggunakan *Bayes' formula*, pendekatan DA berbeda dengan pendekatan SIMCA. DA menganggap bahwa sampel harus menjadi bagian dari salah satu kategori yang dianalisis (Camo, 2005).

Keberhasilan LDA dalam pengkategorian objek dapat diuji dengan beberapa cara. Cara yang paling sederhana adalah dengan menggunakan model klasifikasi yang telah dibuat untuk mengklasifikasikan objek dan menentukan apakah hasil pengklasifikasian tersebut benar atau tidak. Objek yang diklasifikasi merupakan bagian dari set data yang digunakan untuk membentuk model. Metode yang lebih baik adalah dengan membagi data asli menjadi dua kelompok yang dipilih secara randomisasi. Kelompok pertama disebut *training set* dan digunakan untuk menentukan fungsi diskriminan linier. Objek pada kelompok kedua disebut *test set* dan digunakan untuk mengevaluasi kinerja fungsi diskriminan linier dan keberhasilan LDA dapat diketahui (Miller dan Miller, 2010).

2.10.3 *Soft Independent Modelling of Class Analogies (SIMCA)*

Pemodelan SIMCA dibentuk berdasarkan pembuatan model PCA dalam training set. Sampel yang tidak diketahui kemudian dibandingkan dengan model SIMCA dan pengkategorian dinilai berdasarkan analogi pada sampel percobaan (Camo, 2005).

SIMCA menentukan jarak kategori, kemampuan pemodelan dan diskriminasi. Jarak kategori dapat dihitung sebagai jarak geometrik dari model komponen-komponen utama. Pendekatan lain menganggap bahwa tiap kategori dibatasi dengan jarak wilayah yang mewakili persentase tingkat kepercayaan (biasanya 95%). Kemampuan diskriminasi mengukur seberapa baik variabel membedakan antara dua

kategori. Sedangkan kemampuan pemodelan mengukur pengaruh variabel terhadap 19 model yang diberikan. Alat yang berguna untuk interpretasi hasil SIMCA adalah plot Coomans yang dapat menunjukkan diskriminasi dua kategori (Berrueta dkk., 2007).

2.10.4 *Partial Least Square (PLS)*

PLS merupakan salah satu teknik kalibrasi multivariat yang sangat luas digunakan dalam analisis kuantitatif data spektroskopi dan elektrokimia (Abdollahi dkk., 2003). Model kalibrasi dengan menggunakan PLS dapat digunakan untuk memprediksi komposisi suatu bahan, menggantikan metode konvensional yang membutuhkan waktu lama di laboratorium (Masithoh dkk., 2012). PLS menggunakan informasi yang terdapat pada prediktor dan respon. PLS membutuhkan sedikit faktor untuk mendapatkan hasil yang optimal karena terfokus pada prediksi variabel respon (Camo, 2005).

2.10.5 *Support Vector Machines (SVM)*

Berbeda dengan metode yang lain, metode ini menggunakan kernel *function* (Camo, 2005). SVM merupakan pendekatan baru untuk klasifikasi dimana telah dikemukakan pada awal tahun 1990. SVM disebut sebagai metode pembatas. SVM tidak membentuk model kategori tetapi membentuk pembatas antara dua kategori. SVM diterapkan sebagai pengklasifikasian dua kategori, dimana SVM akan membedakan antara dua kategori tersebut (Brereton, 2007).

2.11 Validasi Silang

Validasi silang (*cross validation*) banyak digunakan dalam metode kemometrik untuk menentukan jumlah optimum komponen (Brereton, 2007). Metode validasi silang adalah metode untuk menguji validitas model regresi dengan menggunakan data uji di luar data yang digunakan dalam *fitting* regresi (Pranowo dkk., 2007). Validasi silang merupakan teknik untuk menilai suatu hasil analisis statistik seberapa jauh dapat diimplementasikan ke dalam set data independen. Hal ini terutama digunakan untuk tujuan prediksi, yaitu untuk memperkirakan seberapa akurat model prediksi yang dibuat untuk dapat diimplementasikan.

Ada beberapa tipe dan cara validasi silang yaitu Leave-one-out, K-fold cross validation, dan 2-fold cross-validation. Penjelasan dari masing-masing tipe tersebut adalah sebagai berikut:

2.11.1 *Leave One Out Cross Validation*

Seperti diketahui dari namanya, *leave one out cross validation* (LOOCV) yang berarti meninggalkan satu untuk validasi silang, yaitu dengan melibatkan sampel pengamatan tunggal dari sampel asli digunakan sebagai validasi data, dan sampel pengamatan yang tersisa digunakan sebagai *training set*. Hal ini dilakukan berulang pada setiap observasi dalam sampel yang digunakan sekaligus sebagai data validasi. LOOCV akan menjadi sama dengan *k-fold*, bila jumlah k-lipatannya sama dengan jumlah sampel asli pengamatan.

2.11.2 *K Fold Cross Validation*

Di dalam validasi silang k-fold, seluruh sampel asli dibagi secara acak ke dalam k-subsampel. Dari sebanyak k-subsampel, sebuah subsampel tunggal dipertahankan sebagai validasi data untuk pengujian model, dan sisanya k-1 subsampel digunakan sebagai *training set*. Proses validasi silang yang kemudian

berulang k-kali (lipatan), dengan masing-masing k-subsampel digunakan tepat satu kali sebagai validasi data. Hasil k-kali dari lipatan kemudian didapat rata-rata (atau dikombinasi) untuk menghasilkan estimasi tunggal. Keuntungan dari metode ini adalah seluruh sampel pengamatan digunakan secara acak dan berulang sebagai data pelatihan dan validasi.

2.11.3 2 Fold Cross Validation

Tipe ini merupakan variasi *k-fold cross-validation* yang paling sederhana. Pada pelaksanaannya, metode ini biasanya dilakukan dengan membagi data sampel menjadi dua bagian yang sama yaitu *training set* yang digunakan untuk membuat model, sedangkan bagian yang lain untuk *test set* yang berfungsi untuk memvalidasi model yang telah terbentuk.

BAB 3. METODOLOGI PENELITIAN

3.1 Tempat dan Waktu Penelitian

Penelitian ini dilakukan di Laboratorium Kimia Farmasi Fakultas Farmasi Universitas Jember mulai bulan Juni 2016 sampai bulan Mei 2017.

3.2 Rancangan Penelitian

Langkah awal yang dilakukan yaitu melakukan ekstraksi pada simplisia tanaman. Ekstraksi dilakukan dengan metode ultrasonikasi dan metode maserasi menggunakan metanol 98%. Dari proses tersebut didapatkan ekstrak kental yang dikeringkan hingga menjadi ekstrak kering. Nilai IC_{50} ditentukan dengan spektrofotometer UV-Vis menggunakan pereaksi DPPH. Analisis aktivitas antioksidan dilakukan dengan melihat pola spektrumnya melalui spektroskopi inframerah yang dikombinsi dengan analisis kemometrik. Dari model yang terbentuk kemudian dievaluasi menggunakan validasi silang dengan metode *Leave-One-Out-Cross Validation* (LOOCV) dan *2-fold-Cross Validation*. Model terpilih selanjutnya digunakan untuk menetapkan nilai IC_{50} dalam sampel nyata. Nilai IC_{50} yang diperoleh kemudian dibandingkan dengan nilai IC_{50} dengan metode DPPH.

3.3 Alat dan Bahan Penelitian

3.3.1 Alat Penelitian

Alat-alat yang digunakan dalam penelitian ini adalah spektrofotometer UV-Vis (Hitachi U-1800), spektrofotometer *near infrared* (Brimrose Luminar 3070), perangkat lunak Brimrose, perangkat lunak *The Unscrambler X 10.2* (Camo), *ultrasonicator* (Elmasonic), *rotavapour*, oven, timbangan analitik digital, blender, erlenmeyer, corong, cawan porselin, sendok ekstrak, kertas saring, dan alat gelas.

3.3.2 Bahan Penelitian

Bahan yang digunakan dalam penelitian ini adalah simplisia daun (Tabel 3.1) yang berasal dari UPT Materia Medica, Kota Batu, Malang, ekstrak daun yang telah tersedia (Tabel 3.2), metanol 98% pa (Merck), metanol teknis, aerosil (*pharmaceutical grade*), DPPH (sigma-aldrich), asam askorbat (*pharmaceutical grade*), kertas saring, aluminium foil.

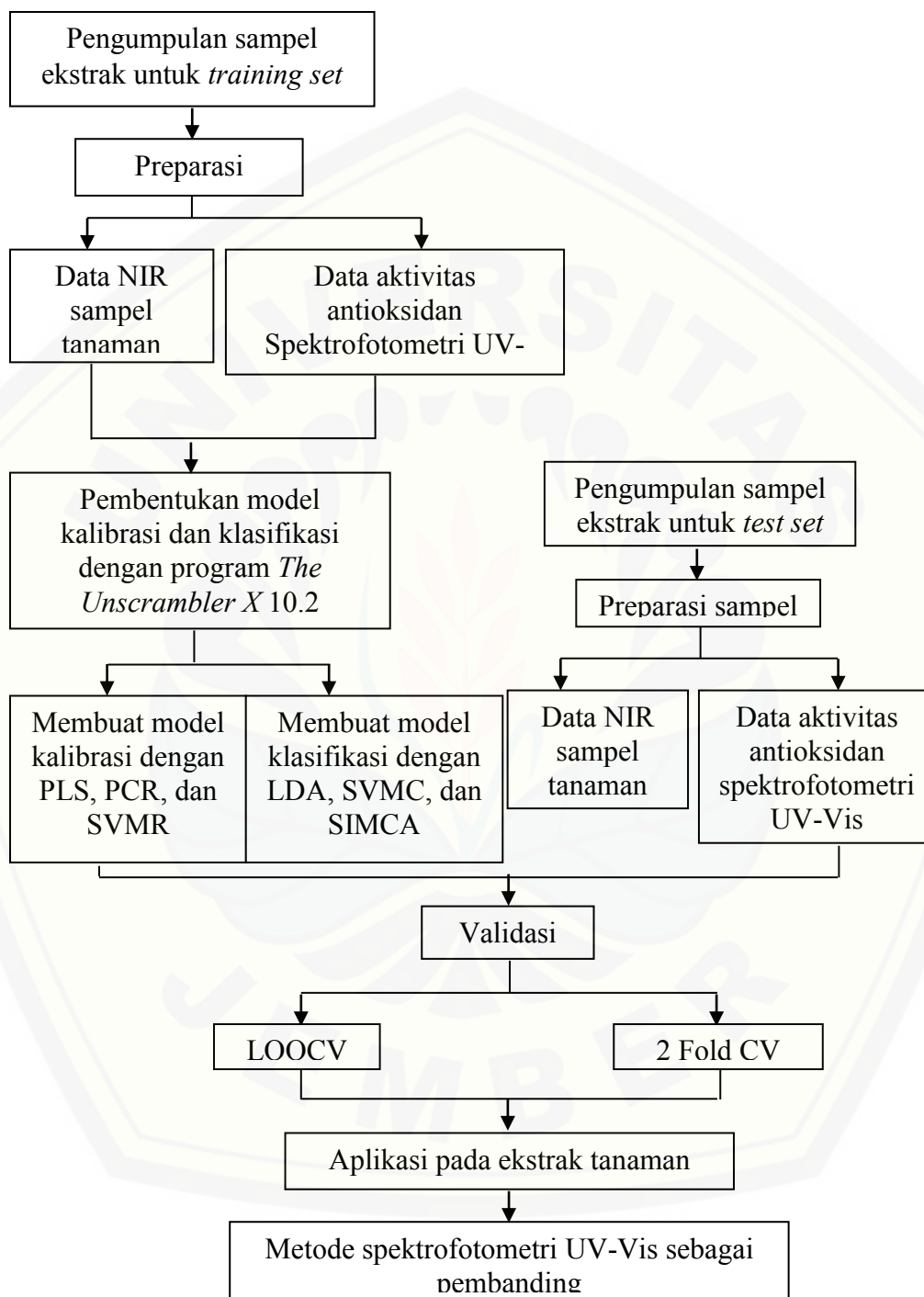
Tabel 3.1 Simplisia yang digunakan

No	Spesies Tanaman	Nama Ilmiah
1.	Daun kunir putih	<i>Kaempferia rotunda</i> L.
2.	Daun mangga	<i>Mangifera indica</i> L.
3.	Daun buncis	<i>Phaseolus vulgaris</i> L.
4.	Daun pepaya	<i>Carica papaya</i> L.
5.	Daun mengkudu	<i>Morinda citrifolia</i> L.
6.	Daun patikan kebo	<i>Euphorbiae hirtae</i>
7.	Daun katuk	<i>Sauropus androgynus</i> Merr.
8.	Daun sirih	<i>Piper betle</i>
9.	Daun sirsak	<i>Annona muricata</i> Linn.
10.	Daun pandan	<i>Pandanus amaryllifolius</i> Roxb.

Tabel 3.2 Ekstrak daun yang sudah jadi

No	Ekstrak	Nama Ilmiah
1.	Daun kluwih	<i>Artocarpus camansi</i>
2.	Daun pare	<i>Momordica charantia</i>
3.	Daun juwet	<i>Syzygium cumini</i>
4.	Daun pletekan	<i>Ruellia tuberosa</i>
5.	Daun sirih merah	<i>Piper crocatum</i>
6.	Daun kopi robusta	<i>Coffea canephora</i>
7.	Daun kopi arabika	<i>Coffea arabica</i>
8.	Daun mimba	<i>Azadirachta indica</i>
9.	Daun putri malu	<i>Mimosa pudica</i>
10.	Daun kemangi	<i>Ocimum basilicum</i>

3.4 Alur Penelitian



Gambar 3.1 Skema alur penelitian

3.5 Prosedur Penelitian

3.5.1 Pengumpulan Sampel

Sampel diperoleh dari ekstrak daun yang sudah tersedia di laboratorium-laboratorium Fakultas Farmasi Universitas Jember dan dari pembuatan ekstrak daun kembang bulan, daun kunir putih, daun mangga, daun buncis, daun pepaya, daun mengkudu, daun binahong, daun patikan kebo, daun belimbing wuluh, daun katuk, daun sirih, daun jambu biji, daun lamtoro, daun sirsak, dan daun pandan.

Pemilihan teknik pengambilan sampel merupakan upaya penelitian untuk mendapat sampel yang representatif (mewakili), yang dapat menggambarkan populasinya. Teknik pengambilan sampel yang digunakan adalah sampel dengan maksud (*purposive sampling*). Pengambilan sampel dilakukan hanya atas dasar pertimbangan peneliti saja yang menganggap unsur-unsur yang dikehendaki telah ada dalam anggota sampel yang diambil (Nasution, 2003).

Tahap awal dalam proses sampling adalah survei. Survei dilakukan di laboratorium-laboratorium Fakultas Farmasi Universitas Jember. Survei dilakukan dengan mendata ekstrak daun yang tersedia dan menentukan ekstrak manakah yang akan digunakan berdasarkan jumlah masing-masing ekstrak. Pengambilan sampel matriks juga dilakukan secara *purposive*, dimana matriks yang dipilih adalah zat yang umum terdapat dalam ekstrak dan pengering yang umum digunakan serta tersedia di laboratorium.

Peneliti tidak melakukan identifikasi masing-masing sampel tanaman, sehingga untuk selanjutnya nama tanaman menggunakan identitas kode tanaman (Tabel 3.3). Dari tanaman-tanaman tersebut dipilih tanaman yang digunakan untuk *training set* dan *test set*. *Training set* terdiri dari objek/sampel yang diketahui pengkategorianannya dan digunakan untuk membentuk model klasifikasi kemometrik. Sedangkan *test set* terdiri dari objek/sampel yang diketahui pengkategorianannya namun digunakan untuk mengevaluasi reliabilitas model yang telah dibentuk oleh *training set* (Berrueta dkk., 2007).

Tabel 3.3 Identitas kode tanaman

No.	Kode	Nama Tanaman
1.	A	Daun kopi arabika muda
2.	B	Daun kopi arabika tua
3.	C	Daun juwet
4.	D	Daun kluwih
5.	E	Daun kunir
6.	F	Daun mangga
7.	G	Daun patikan kebo
8.	H	Daun pletekan
9.	I	Daun buncis
10.	J	Daun katuk
11.	K	Daun mengkudu
12.	L	Daun pare
13.	M	Daun sirih merah
14.	N	Daun sirih
15.	O	Daun sirsak
16.	P	Daun pandan
17.	Q	Daun pepaya
18.	R	Daun kopi robusta muda
19.	S	Daun kopi robusta tua
20.	T	Daun mimba
21.	U	Daun kemangi
22.	V	Daun putri malu

3.5.2 Pembuatan Ekstrak

Daun yang telah kering diangin-anginkan dan dioven selama 10 - 15 menit untuk menghilangkan kelembaban pada daun. Daun yang sudah kering diblender hingga daun menjadi serbuk. Serbuk daun ditimbang sebanyak 80 gram diletakkan di dalam erlenmeyer. Serbuk dibagi menjadi 2 bagian sehingga masing-masing erlenmeyer berisi 40 gram serbuk. Sebanyak 400 ml metanol ditambahkan pada masing-masing erlenmeyer kemudian di ekstraksi dengan ultrasonikator selama 1 jam. Hasil ekstraksi kemudian dimaserasi selama 24 jam. Ekstrak cair yang didapat kemudian disaring menggunakan kertas saring. Filtrat dipekatkan menggunakan rotavapor pada suhu 60 °C untuk menguapkan pelarut dan diperoleh ekstrak kental.

Ekstrak kental dikeringkan dengan aerosil. Selanjutnya ekstrak yang sudah kering digerus sampai halus dan diayak dengan ayakan B-60, kemudian disimpan dalam vial yang telah diberi label.

3.5.3 Penentuan Nilai IC_{50} dengan Spektrofotometer UV-Vis

a Pembuatan larutan DPPH 0,1mM

Serbuk DPPH ditimbang sebanyak 2 mg, dilarutkan dalam 50 ml metanol teknis sehingga didapatkan larutan DPPH dengan konsentrasi 0,1 mM. Larutan ini kemudian disimpan dalam botol gelap dan untuk setiap pengujian dibuat baru.

b Penentuan panjang gelombang maksimum

Sebelum pengujian aktivitas antioksidan dilakukan penentuan panjang gelombang maksimum yaitu dengan mengambil 1,2 ml larutan DPPH 0,1 mM. Kemudian menambahkan 0,3 ml metanol teknis. Campuran dikocok sampai homogen dan diinkubasi selama 30 menit di tempat gelap. Serapan diukur dengan spektrofotometer UV-Vis yang telah diatur panjang gelombangnya dari 400 nm – 800 nm.

c Penentuan waktu inkubasi sampel

Penentuan waktu inkubasi dilakukan dengan cara 1,2 ml DPPH 0,1 mM ditambahkan dengan 0,3 ml larutan uji. Campuran dikocok sampai homogen kemudian dilihat absorbansinya pada panjang gelombang 515,5 nm dari menit ke-0 sampai menit ke-100 setiap 5 menit.

d Pengukuran aktivitas antioksidan larutan uji

Tahap awal yang dilakukan yaitu membuat seri konsentrasi larutan uji dengan 3 replikasi. Pengukuran aktivitas antioksidan dilakukan dengan cara 1,2 ml DPPH 0,1 mM ditambahkan dengan 0,3 ml masing-masing larutan uji. Campuran dikocok sampai homogen dan kemudian diinkubasi di tempat gelap. Selanjutnya, diukur serapannya pada panjang gelombang 515,5 nm.

e Perhitungan

Nilai IC_{50} dihitung berdasarkan persentase peredaman radikal DPPH dari masing-masing konsentrasi larutan sampel yang mengikuti persamaan:

$$\% \text{ Inhibisi} = \frac{\text{Abs Kontrol} - \text{Abs Uji}}{\text{Abs Kontrol}} \times 100\% \dots \dots \dots (3.1)$$

Keterangan:

Abs Kontrol = Absorbansi serapan radikal DPPH kontrol pada panjang gelombang dengan absorbansi maksimum.

Abs Uji = Absorbansi serapan sampel dalam radikal DPPH pada panjang gelombang dengan absorbansi maksimum.

Setelah didapatkan persentase inhibisi dari masing-masing konsentrasi, dilanjutkan dengan perhitungan secara regresi linier menggunakan persamaan:

$$y = a + bx \dots \dots \dots (3.2)$$

Keterangan:

x = konsentrasi ($\mu\text{g/ml}$)

y = persentase peredaman (%)

Aktivitas antioksidan dinyatakan dengan *Inhibition Concentration* 50% atau IC_{50} yaitu konsentrasi sampel yang dapat meredam radikal DPPH sebanyak 50% dengan satuan $\mu\text{g/ml}$. Nilai IC_{50} didapatkan dari nilai x setelah mengganti y dengan 50.

3.5.4 Penentuan Data NIR

Instrumen NIR “Luminar 3070” dihidupkan dengan menekan tombol power dan ditunggu selama 30 menit (warming up). Selanjutnya dibuka perangkat lunak Brimrose. Sampel yang telah dipreparasi diletakkan diatas plat tempat sampel secara merata. Satu sampel discan 5 kali dan dilakukan 3 kali penembakan pada masing-masing *scanning*. Langkah-langkah tersebut diulangi untuk masing-masing sampel dan untuk setiap sampel diberi nama.

3.5.5 Pembentukan Model Klasifikasi dan Kalibrasi

Data yang diperoleh dari pengukuran spektroskopi NIR diolah dengan menggunakan perangkat lunak *The Unscrambler versi X 10.2 (Camo software)*. Buka software *The Unscrambler versi X 10.2*. Masukkan data dengan memilih file, import data, lalu dipilih *Brimrose* sehingga akan muncul tampilan data dengan masing-masing panjang gelombang. Selanjutnya dibuat kategori objek. Kategori tersebut yaitu “memiliki aktivitas antioksidan” dan “tidak memiliki aktivitas antioksidan”. Dimana “tidak memiliki aktivitas antioksidan” adalah sampel yang memiliki nilai $IC_{50} > 200 \mu\text{g/ml}$, sedangkan “memiliki aktivitas antioksidan” adalah sampel yang memiliki nilai $IC_{50} \leq 200 \mu\text{g/ml}$. Objek dikelompokkan dengan memilih *define range* dan *column range* diisi dengan nilai IC_{50} pada kolom 1, kategori pada kolom 2 dan absorbansi pada kolom yang lain.

Pembentukan model klasifikasi dilakukan dengan metode *Linear Discriminant Analysis (LDA)*, *Support Vector Machines Classification (SVMC)*, dan *Soft Independent Modelling of Class Analogies (SIMCA)*. Untuk membuat model LDA dan SVMC dilakukan langkah-langkah sebagai berikut: pilih task, analyze, lalu pilih *Linear Discriminant Analysis* untuk LDA dan *Support Vector Machines Classification* untuk SVMC. Untuk membuat model SIMCA dilakukan langkah-langkah sebagai berikut: pilih task, analyze, lalu pilih *Principal Component Analysis (PCA)* untuk masing-masing kategori, setelah kedua PCA terbentuk maka pilih task,

predict, lalu pilih SIMCA. Jika hasil prediksi dari model telah sesuai dengan klasifikasi yang sebenarnya, maka model klasifikasi tersebut dikatakan valid (persen akurasi yang diperoleh sebesar 100%). Model klasifikasi yang terbentuk kemudian dapat digunakan untuk memprediksi klasifikasi dari sampel yang belum diketahui.

Pembentukan model kalibrasi dibuat dengan metode *Partial Least Square* (PLS), *Principal Component Regression* (PCR), dan *Support Vector Machines Regression* (SVMR). Langkah-langkah yang dilakukan adalah sebagai berikut: pilih *task, analyze*, lalu pilih *Partial Least Square* untuk PLS, *Principal Component Regression* untuk PCR, dan *Support Vector Machines Regression* untuk SVMR. Kriteria yang harus dipenuhi adalah nilai R^2 , RMSEC (*Root Mean Standart Error Of Calibration*), RMSECV (*Root Mean Square Error Cross Validation*). Pemilihan set data spektrum didasarkan pada kemampuan prediksi yang terbaik dengan nilai korelasi R^2 semakin besar, nilai galat RMSEC dan RMSECV terbaik apabila nilai semakin kecil.

3.5.6 Validasi Model Terpilih

a *Leave-One-Out-Cross Validation* (LOOCV)

Set validasi ini dibuat untuk mengevaluasi data dengan mengambil satu set data sampel dari *training set* dimana data tersebut digunakan sebagai set validasi. Sedangkan data yang tersisa digunakan untuk membentuk model baru, demikian seterusnya hingga semua data kalibrasi digunakan sebagai set validasi.

b *2-Fold Cross-Validation*

Set validasi ini dibuat dengan preparasi 4 sampel ekstrak yang ditetapkan nilai IC_{50} dengan spektrofotometri UV-Vis. Penetapan data NIR dilakukan dengan scanning sampel *test set* hingga menghasilkan data spektrum yang kemudian diolah dengan menggunakan software *The Unscrambler versi X 10.2*.

3.5.7 Aplikasi pada Sampel Ekstrak Nyata

Tahapan ini bertujuan untuk mengaplikasikan model kemometrik yang telah dibentuk pada sampel ekstrak yang dijual di pasaran khususnya di daerah Jember. Masing-masing sampel di-*scan* dengan instrumen NIR sehingga diperoleh data spektrum yang absorbansinya digunakan sebagai prediktor pada model kalibrasi terpilih untuk analisis secara kuantitatif dan pada model klasifikasi terpilih untuk menentukan klasifikasi komponen secara kualitatif. Sebagai data pembanding untuk penetapan IC_{50} , digunakan metode spektrofotometri UV-Vis. Hasil analisis aktivitas antioksidan dengan metode NIR dan kemometrik yang dibandingkan dengan metode pembanding spektrofotometri UV-Vis kemudian diuji dengan analisis statistik Uji T Dua Sampel Berpasangan.

BAB 5. PENUTUP

5.1 Kesimpulan

Kesimpulan yang peneliti dapatkan dari keseluruhan penelitian ini adalah:

1. Penentuan aktivitas antioksidan dapat ditentukan menggunakan metode spektrofotometri *near infrared* (NIR) dan kemometrik menggunakan model kalibrasi SVMR. Hasil model kalibrasi analisis data multivariat secara kemometrik dengan SVMR terbentuk dari data *training set* dengan R^2 kalibrasi sebesar 0,9811205; R^2 validasi sebesar 0,9741873; RMSEC sebesar 4,4940028; dan RMSECV sebesar 5,2207675.
2. Hasil analisis nilai IC_{50} dengan NIR-kemometrik yang dibandingkan dengan metode spektrofotometri UV-Vis tidak memiliki perbedaan yang signifikan setelah diuji dengan menggunakan analisis statistik Uji T Dua Sampel Berpasangan dan menggunakan kurva regresi.

5.2 Saran

Berdasarkan hasil penelitian, maka saran yang dapat disampaikan dalam penelitian ini meliputi sebagai berikut:

1. Perlu dibentuk sebuah model kalibrasi dengan SVMC dan model kalibrasi dengan SVMR dengan jumlah sampel lebih banyak (baik menggunakan real sampel maupun dengan menggunakan sampel simulasi), sehingga dalam pengkategorian sampel, nilai R^2 , nilai RMSEC, nilai RMSECV menjadi lebih baik dan cakupan rentang konsentrasi lebih luas untuk sampel yang akan dikuantitasi.
2. Perlu dikembangkan untuk aktivitas antioksidan pada sampel selain ekstrak daun (semisal pada serbuk tanaman obat).

DAFTAR PUSTAKA

- Abdollahi, H., M. S. Panahi, dan M. R. Khoshayand. 2003. Simultaneous spectrophotometric determination of iron, cobalt and copper by partial least-squares calibration method in micellar medium. *Iranian Journal of Pharmaceutical Research*. 2:207–212.
- Alam, M. N., N. J. Bristi, dan M. Rafiquzzaman. 2013. Review on in vivo and in vitro methods evaluation of antioxidant activity. *Saudi Pharmaceutical Journal*. 21(2):143–152.
- Andasuryani, Y. A. Purwanto, I. W. Budiastara, dan K. Syamsu. 2014. Prediksi kandungan katekin gambir (*Uncaria gambir* Roxb.) dengan spektroskopi NIR. *Jurnal Teknologi Industri Pertanian*. 24(1):43–52.
- Anief, M. 1987. *Ilmu Meracik Obat: Teori Dan Praktek*. Yogyakarta: Gadjah Mada University Press.
- Antolovich, M., P. D. Prenzler, E. Patsalides, S. McDonald, dan K. Robards. 2002. Methods for testing antioxidant activity. *Analyst*. 127:183–198.
- Ashley, K., R. N. Andrews, L. Cavazos, dan M. Demange. 2001. Ultrasonic extraction as a sample preparation technique for elemental analysis by atomic spectrometry. *Journal of Analytical Atomic Spectrometry*. 16(10):1147–1153.
- Baranska, M., H. Schulz, R. Siuda, M. A. Strehle, P. Rösch, J. Popp, E. Joubert, dan M. Manley. 2005. Quality control of harpagophytum procumbens and its related phytopharmaceutical products by means of NIR-FT-Raman spectroscopy. *Biopolymers*. 77(1):1–8.
- Berrueta, L. A., R. M. Alonso-Salces, dan K. Héberger. 2007. Supervised pattern recognition in food analysis. *Journal of Chromatography A*. 1158(1–2):196–214.

- Brand-Williams, W., M. E. Cuvelier, dan C. Berset. 1995. Use of a free radical method to evaluate antioxidant activity. *LWT - Food Science and Technology*. 28(1):25–30.
- Brereton, R. G. 2003. *Chemometrics: Data Analysis for the Laboratory and Chemical Plant*. Chichester, UK: John Wiley & Sons, Ltd.
- Brereton, R. G. 2007. *Applied Chemometrics for Scientists*. Chichester, UK: John Wiley & Sons, Ltd.
- Bro, R. 2003. Multivariate calibration: what is in chemometrics for the analytical chemist? *Analytica Chimica Acta*. 500(1–2):185–194.
- Camo. 2005. The Unscrambler Methods. [http://www.camo.com/download/U9.6 pdf manual/The Unscrambler Methods.pdf](http://www.camo.com/download/U9.6%20pdf%20manual/The%20Unscrambler%20Methods.pdf) [Diakses pada June 20, 2017].
- College of Science Harding University. 2017. Running T-Test in SPSS. [www.harding.edu/sbreezeel/460 files/t-test.pdf](http://www.harding.edu/sbreezeel/460%20files/t-test.pdf) [Diakses pada March 27, 2017].
- Cutter, E. . 1989. *Plant Anatomy: Experiment and Interpretation Part 2 Organs*. London: The English Language Book Society and Edward Arnold (Publishers) Ltd.
- Dehpour, A. A., M. A. Ebrahimzadeh, N. S. Fazel, dan N. S. Mohammad. 2009. Antioxidant activity of the methanol extract of *ferula assafoetida* and its essential oil composition. *Grasas Y Aceites*. 60(4):405–412.
- Departemen Kesehatan Republik Indonesia. 1995a. *Materia Medika Indonesia Jilid VI*. Jakarta: Departemen Kesehatan Republik Indonesia.
- Departemen Kesehatan Republik Indonesia. 1995b. *Farmakope Indonesia*. Edisi IV. Jakarta: Direktorat Jendral Pengawasan Obat dan Makanan.

- Direktorat Jenderal Pengawas Obat dan Makanan Departemen Kesehatan Republik Indonesia. 2000. *Parameter Standar Umum Ekstrak Tumbuhan Obat*. Jakarta: Departemen Kesehatan Republik Indonesia.
- Fessenden, R. J. dan J. S. Fessenden. 1995. *Kimia Organik, Jilid II*. Edisi 3. Jakarta: Erlangga.
- Gad, H. A., S. H. El-Ahmady, M. I. Abou-Shoer, dan M. M. Al-Azizi. 2013. Application of chemometrics in authentication of herbal medicines: a review. *Phytochemical Analysis*. 24(1):1–24.
- Harborne, J. B. 1987. *Metode Fitokimia: Penuntun Cara Modern Menganalisis Tumbuhan, Terjemahan Kosasih P. Dan Iwang S.J.* Bandung: ITB Press.
- Haryadi. 2013. Pengukuran luas daun dengan metode simpson. *Anterior Jurnal*. 12(2):1–5.
- Hornok, L. 1992. *Cultivation and Processing of Medicinal Plants*. New York: John Wiley and Sons.
- Karadag, A., B. Ozcelik, dan S. Saner. 2009. Review of methods to determine antioxidant capacities. *Food Analytical Methods*. 2(1):41–60.
- Karlinasari, L., M. Sabed, N. J. Wistara, Y. A. Purwanto, dan H. Wijayanto. 2012. Karakteristik spektra absorbansi nir (near infrared) spektroskopi kayu *acacia mangium* willd. pada 3 umur berbeda. *Jurnal Ilmu Kehutanan*. VI(1):45–52.
- Karoui, R., A. M. Mouazen, É. Dufour, L. Pillonel, E. Schaller, J. De Baerdemaeker, dan J.-O. Bosset. 2006. Chemical characterisation of european emmental cheeses by near infrared spectroscopy using chemometric tools. *International Dairy Journal*. 16(10):1211–1217.
- Kementerian Lingkungan Hidup Republik Indonesia. 2014a. Perlindungan Dan Pengelolaan Keanekaragaman Hayati Ekosistem Kepulauan. <http://www.menlh.go.id/perlindungan-dan-pengelolaan-keanekaragaman-hayati-ekosistem-kepulauan/> [Diakses pada September 30, 2016].

- Kementerian Lingkungan Hidup Republik Indonesia. 2014b. Peluncuran Buku Status Kekinian Keanekaragaman Hayati Indonesia. <http://www.menlh.go.id/peluncuran-buku-status-kekinian-keanekaragaman-hayati-indonesia/> [Diakses pada September 30, 2016].
- Kim, H. J., E. J. Chang, S. H. Cho, S. K. Chung, H. D. Park, dan S. W. Choi. 2002. Antioxidative activity of resveratrol and its derivatives isolated from seeds of *paeonia lactiflora*. *Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry*. 66(9):1990–1993.
- Kumar, S. dan A. K. Pandey. 2013. Chemistry and biological activities of flavonoids: an overview. *The Scientific World Journal*. 2013:1–16.
- Latifa, R. 2015. Karakter Morfologi Daun Beberapa Jenis Pohon Penghijauan Hutan Kota Di Kota Malang. *Prosiding Seminar Nasional Pendidikan Biologi 2015*. March 21, 2015. 667–676.
- Lukman, H. 2015. Penentuan Kadar Flavonoid Pada Ekstrak Daun Tanaman Menggunakan Metode Spektroskopi Inframerah Dan Kemometrik. *Skripsi*. Jember: Universitas Jember.
- Masithoh, R. E., B. Rahardjo, L. Sutiarmo, dan A. Hardjoko. 2012. Pendekatan multivariat untuk pengukuran kualitas tomat (*lycopersicon esculentum*) berdasarkan parameter warna. *AGRITECH*. 32(1):79–86.
- Miller, J. N. dan J. C. Miller. 2010. *Statistics and Chemometrics for Analytical Chemistry*. Edisi 6. Harlow: Pearson Education Limited.
- Molyneux, P. 2004. The use of the stable free radical diphenylpicryl- hydrazyl (dpph) for estimating antioxidant activity. *Songklanakarin Journal of Science and Technology*. 26(2):211–219.
- Muhilal. 1991. Radikal bebas dalam gizi dan kedokteran. *Cermin Dunia Kedokteran*. (73):9–11.

- Nasution, R. 2003. *Teknik Sampling*. Medan: Fakultas Kesehatan Masyarakat Universitas Sumatera Utara.
- Percival, M. 1998. Antioxidants. *Clinical Nutrition Insights*. 31:1–4.
- Prakash, A., F. Rigelhof, dan E. Miller. 2001. Antioxidant activity. *Medallion Laboratories: Analytical Progress*. 19(2):1–4.
- Pranowo, H. D., I. Tahir, dan A. Widiatmoko. 2007. Hubungan kuantitatif struktur elektronik dan aktivitas inhibisi senyawa kurkumin pada reaksi etoksiresorufin o-dealkilasi (erod). *Indonesian Journal of Chemistry*. 7(1):78–82.
- Reich, G. 2005. Near-infrared spectroscopy and imaging: basic principles and pharmaceutical applications. *Advanced Drug Delivery Reviews*. 57(8):1109–1143.
- Ritz, M., L. Vaculíková, dan E. Plevová. 2011. Application of infrared spectroscopy and chemometric methods to identification of selected minerals. *Acta Geodyn. Geomater*. 8(1):47–58.
- Roggo, Y., P. Chalus, L. Maurer, C. Lema-Martinez, A. Edmond, dan N. Jent. 2007. A review of near infrared spectroscopy and chemometrics in pharmaceutical technologies. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*. 44(3):683–700.
- Rohman, A., Sismindari, Y. Erwanto, dan Y. B. Che Man. 2011. Analysis of pork adulteration in beef meatball using fourier transform infrared (ftir) spectroscopy. *Meat Science*. 88(1):91–95.
- Sarma, A. D., A. R. Mallick, dan A. K. Ghosh. 2010. Free radicals and their role in different clinical conditions: an overview. *International Journal of Pharma Sciences and Research*. 1(3):185–192.
- Schwanninger, M., J. C. Rodrigues, dan K. Fackler. 2011. A review of band assignments in near infrared spectra of wood and wood components. *Journal of Near Infrared Spectroscopy*. 19(5):287–308.

- Silalahi, J. 2006. *Makanan Fungsional*. Yogyakarta: Kanisius.
- Sim, C. O., M. R. Hamdan, Z. Ismail, dan M. N. Ahmad. 2004. Assessment of herbal medicines by chemometrics – assisted interpretation of ftir spectra. *Journal of Analytica Chimica Acta*. 570:116–123.
- Soltani, M. dan J. Baharara. 2014. Antioxidant and antiprolifereative capacity of dichloromethane extract of *holoturia leucospilota* sea cucumber. *International Journal of Cellular and Molecular Biotechnology*. 2014:1–9.
- Stchur, P., D. Cleveland, J. Zhou, dan R. G. Michel. 2002. A review of recent applications of near infrared spectroscopy, and of the characteristics of a novel pbs ccd array-based near-infrared spectrometer. *Applied Spectroscopy Reviews*. 37(4):383–428.
- Sugiyono. 2009. *Metode Penelitian Kuantitatif Kualitatif Dan R & D*. Bandung: Alfabeta.
- Tambayong, J. 2000. *Patofisiologi Untuk Keperawatan*. Jakarta: Penerbit Buku Kedokteran EGC.
- Tursiman, P. Ardiningsih, dan R. Nofiani. 2012. Total fenol fraksi etil asetat dari buah asam kandis (*garcinia dioica* blume). *Jurnal Kimia Khatulistiwa*. 1(1):45–48.
- Varmuza, K. 2001. Applied chemometrics: from chemical data to relevant information. *1st Conference on Chemistry*. 1–17.
- Voigt, R. 1995. *Buku Pelajaran Teknologi Farmasi Diterjemahkan Oleh Soendani N. S.* Yogyakarta: Gadjah Mada University Press.
- Wu, D., J. Chen, B. Lu, L. Xiong, Y. He, dan Y. Zhang. 2012. Application of near infrared spectroscopy for the rapid determination of antioxidant activity of bamboo leaf extract. *Food Chemistry*. 135(4):2147–2156.

Zuhra, C. F., J. B. Tarigan, dan H. Sihotang. 2008. Aktivitas antioksidan senyawa flavonoid dari daun katuk (*sauropus androgunus* (l) merr.). *Jurnal Biologi Sumatra*. 3(1):7–10.



LAMPIRAN

Lampiran 4.1 Alat dan Bahan yang Digunakan

4.1a Sampel *Training Set* dan *Test Set*



4.1b Sampel Nyata



4.1c Instrumen yang Digunakan



NIR



Spektrofotometri UV-Vis

4.1d Kompartemen Sampel



NIR



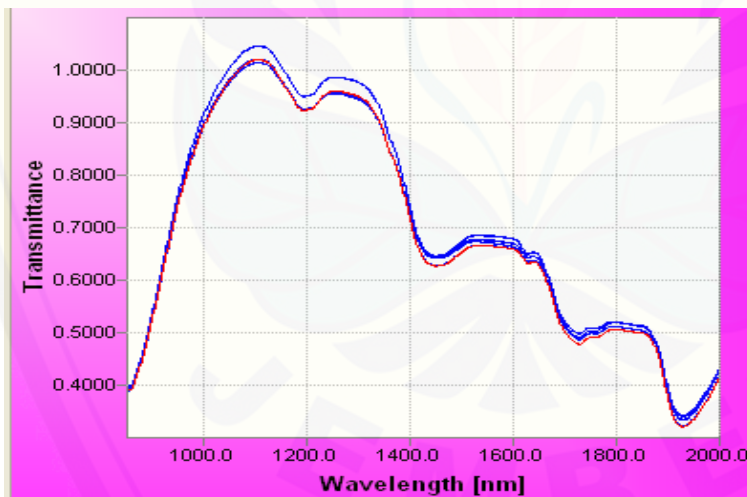
Spektrofotometri UV-Vis

Lampiran 4.2 Perhitungan % Rendemen

$$\% \text{ Rendemen ekstrak} = \frac{\text{Berat ekstrak yang didapat}}{\text{Berat serbuk yang diekstraksi}} \times 100\%$$

No	Nama Simplisia	Serbuk	Ekstrak	% Rendemen
1.	Daun Kunir Putih	80,4729 gram	4,6482 gram	5,776 %
2.	Daun Mangga	80,1578 gram	8,2029 gram	10,233 %
3.	Daun Buncis	80,1100 gram	3,9982 gram	4,991 %
4.	Daun Pepaya	80,0112 gram	5,3008 gram	6,625 %
5.	Daun Mengkudu	80,0248 gram	3,0480 gram	3,809 %
6.	Daun Patikan Kebo	80,0570 gram	2,9762 gram	3,718 %
7.	Daun Katuk	80,0442 gram	3,4661 gram	4,309 %
8.	Daun Sirih	80,0465 gram	3,9268 gram	4,906 %
9.	Daun Sirsak	80,1078 gram	3,6850 gram	4,600 %
10.	Daun Pandan	80,0750 gram	2,2540 gram	2,815 %

Lampiran 4.3 Spektrum Sampel dengan Spektroskopi NIR



Lampiran 4.4 Identitas Sampel Ekstrak**4.4a Sampel Training Set**

No.	Kode	Sampel
1.	A	Daun kopi arabika muda
2.	B	Daun kopi arabika tua
3.	C	Daun juwet
4.	D	Daun kluwih
5.	E	Daun kunir
6.	F	Daun mangga
7.	G	Daun patikan kebo
8.	H	Daun pletekan
9.	I	Daun buncis
10.	J	Daun katuk
11.	K	Daun mengkudu
12.	L	Daun pare
13.	M	Daun sirih merah
14.	N	Daun sirih
15.	O	Daun sirsak

4.4b Sampel Test Set

No.	Kode	Sampel
1.	P	Daun pandan
2.	Q	Daun pepaya
3.	R	Daun kopi robusta muda
4.	S	Daun kopi robusta tua

4.4c Sampel Nyata

Sampel	Pabrik	Kandungan Ekstrak	Waktu Kadaluarsa	Bobot Ekstrak Per Kapsul
Stimuno	Dexa Medica	Meniran	Juli 2018	50 mg
Daun Salam	Herbal Indo Utama	Salam	Mei 2018	200 mg
Daun Sirsak	Herbal Indo Utama	Sirsak	Februari 2019	200 mg

4.4d Sampel Simulasi

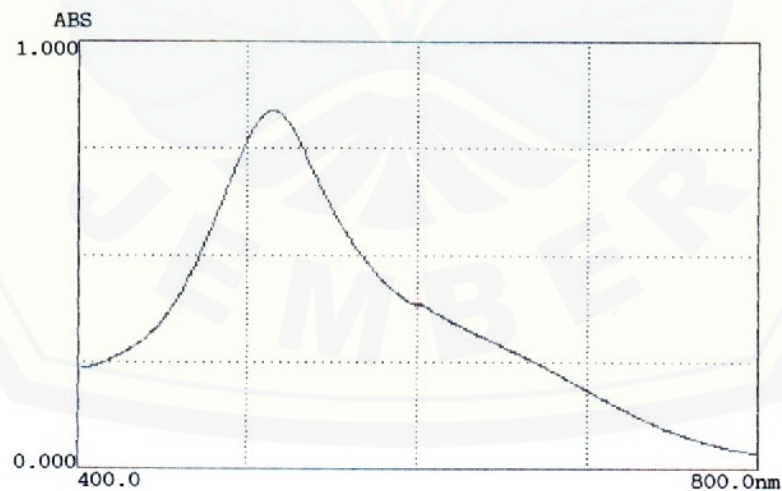
No.	Kode	Sampel
1.	T	Daun mimba
2.	U	Daun kemangi
3.	V	Daun putri malu

Lampiran 4.5 Perhitungan Pembuatan Larutan DPPH 0,1 mM

$$\begin{aligned}\text{Konsentrasi larutan} &= 0,1 \text{ mM} \times \frac{394,32}{1000} \\ &= 0,039432 \text{ mg/ml} \\ &= 39,432 \text{ } \mu\text{g/ml}\end{aligned}$$

Lampiran 4.6 Data Penetapan Panjang Gelombang Maksimum DPPH 0,1 mM

U-1800 Spectrophotometer
Serial NUM: 5730116
ROM Version: 07
Sample Name:
Date:
Operator:



U-1800 Spectrophotometer

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

Wavelength Scan Smooth
 Data Mode: ABS
 Scan Range: 800.0-400.0nm
 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
798.5	0.034	798.0	0.034	797.5	0.034	797.0	0.035
796.5	0.035	796.0	0.035	795.5	0.035	795.0	0.036
794.5	0.037	794.0	0.037	793.5	0.038	793.0	0.038
792.5	0.038	792.0	0.039	791.5	0.039	791.0	0.039
790.5	0.040	790.0	0.040	789.5	0.041	789.0	0.041
788.5	0.042	788.0	0.042	787.5	0.042	787.0	0.043
786.5	0.043	786.0	0.044	785.5	0.044	785.0	0.044
784.5	0.045	784.0	0.045	783.5	0.045	783.0	0.046
782.5	0.047	782.0	0.047	781.5	0.048	781.0	0.048
780.5	0.049	780.0	0.049	779.5	0.049	779.0	0.050
778.5	0.050	778.0	0.051	777.5	0.051	777.0	0.051
776.5	0.052	776.0	0.052	775.5	0.053	775.0	0.054
774.5	0.054	774.0	0.055	773.5	0.055	773.0	0.056
772.5	0.056	772.0	0.057	771.5	0.057	771.0	0.058
770.5	0.058	770.0	0.059	769.5	0.060	769.0	0.060
768.5	0.061	768.0	0.061	767.5	0.062	767.0	0.062
766.5	0.063	766.0	0.064	765.5	0.064	765.0	0.065
764.5	0.065	764.0	0.066	763.5	0.067	763.0	0.067
762.5	0.068	762.0	0.069	761.5	0.069	761.0	0.070
760.5	0.071	760.0	0.071	759.5	0.072	759.0	0.073
758.5	0.074	758.0	0.074	757.5	0.075	757.0	0.075
756.5	0.076	756.0	0.077	755.5	0.077	755.0	0.078
754.5	0.079	754.0	0.079	753.5	0.080	753.0	0.081
752.5	0.082	752.0	0.082	751.5	0.083	751.0	0.084
750.5	0.084	750.0	0.085	749.5	0.086	749.0	0.086
748.5	0.087	748.0	0.087	747.5	0.088	747.0	0.089
746.5	0.090	746.0	0.090	745.5	0.091	745.0	0.092
744.5	0.092	744.0	0.093	743.5	0.094	743.0	0.094
742.5	0.095	742.0	0.097	741.5	0.098	741.0	0.099
740.5	0.100	740.0	0.101	739.5	0.102	739.0	0.103
738.5	0.104	738.0	0.106	737.5	0.107	737.0	0.107
736.5	0.108	736.0	0.109	735.5	0.109	735.0	0.110
734.5	0.111	734.0	0.111	733.5	0.113	733.0	0.114
732.5	0.115	732.0	0.116	731.5	0.117	731.0	0.118
730.5	0.118	730.0	0.119	729.5	0.120	729.0	0.120
728.5	0.122	728.0	0.123	727.5	0.124	727.0	0.125
726.5	0.126	726.0	0.127	725.5	0.128	725.0	0.129
724.5	0.130	724.0	0.131	723.5	0.132	723.0	0.133
722.5	0.134	722.0	0.135	721.5	0.136	721.0	0.137
720.5	0.138	720.0	0.139	719.5	0.140	719.0	0.141
718.5	0.142	718.0	0.143	717.5	0.144	717.0	0.145
716.5	0.146	716.0	0.147	715.5	0.148	715.0	0.149
714.5	0.150	714.0	0.150	713.5	0.152	713.0	0.153
712.5	0.154	712.0	0.155	711.5	0.156	711.0	0.157
710.5	0.158	710.0	0.159	709.5	0.161	709.0	0.162
708.5	0.163	708.0	0.164	707.5	0.165	707.0	0.166
706.5	0.167	706.0	0.168	705.5	0.169	705.0	0.170
704.5	0.170	704.0	0.172	703.5	0.173	703.0	0.174
702.5	0.175	702.0	0.177	701.5	0.177	701.0	0.179
700.5	0.180	700.0	0.181	699.5	0.183	699.0	0.184
698.5	0.185	698.0	0.186	697.5	0.187	697.0	0.188
696.5	0.189	696.0	0.190	695.5	0.191	695.0	0.192
694.5	0.193	694.0	0.194	693.5	0.194	693.0	0.196
692.5	0.197	692.0	0.198	691.5	0.200	691.0	0.201
690.5	0.202	690.0	0.203	689.5	0.204	689.0	0.204
688.5	0.206	688.0	0.207	687.5	0.208	687.0	0.209
686.5	0.211	686.0	0.212	685.5	0.212	685.0	0.214
684.5	0.215	684.0	0.218	683.5	0.217	683.0	0.219

682.5	0.220	682.0	0.220	681.5	0.222	681.0	0.223
680.5	0.224	680.0	0.225	679.5	0.226	679.0	0.227
678.5	0.228	678.0	0.228	677.5	0.230	677.0	0.231
676.5	0.232	676.0	0.232	675.5	0.234	675.0	0.235
674.5	0.236	674.0	0.237	673.5	0.239	673.0	0.240
672.5	0.241	672.0	0.242	671.5	0.243	671.0	0.244
670.5	0.245	670.0	0.246	669.5	0.247	669.0	0.248
668.5	0.249	668.0	0.250	667.5	0.251	667.0	0.252
666.5	0.253	666.0	0.254	665.5	0.255	665.0	0.256
664.5	0.257	664.0	0.257	663.5	0.258	663.0	0.259
662.5	0.260	662.0	0.260	661.5	0.261	661.0	0.263
660.5	0.264	660.0	0.265	659.5	0.267	659.0	0.268
658.5	0.268	658.0	0.269	657.5	0.270	657.0	0.270
656.5	0.272	656.0	0.273	655.5	0.274	655.0	0.274
654.5	0.275	654.0	0.276	653.5	0.277	653.0	0.277
652.5	0.279	652.0	0.280	651.5	0.281	651.0	0.282
650.5	0.283	650.0	0.284	649.5	0.285	649.0	0.286
648.5	0.287	648.0	0.288	647.5	0.289	647.0	0.290
646.5	0.291	646.0	0.292	645.5	0.293	645.0	0.294
644.5	0.295	644.0	0.296	643.5	0.297	643.0	0.298
642.5	0.298	642.0	0.299	641.5	0.300	641.0	0.301
640.5	0.302	640.0	0.304	639.5	0.305	639.0	0.306
638.5	0.306	638.0	0.307	637.5	0.308	637.0	0.309
636.5	0.309	636.0	0.310	635.5	0.311	635.0	0.312
634.5	0.312	634.0	0.313	633.5	0.315	633.0	0.316
632.5	0.317	632.0	0.319	631.5	0.320	631.0	0.321
630.5	0.322	630.0	0.323	629.5	0.324	629.0	0.324
628.5	0.325	628.0	0.326	627.5	0.327	627.0	0.327
626.5	0.329	626.0	0.330	625.5	0.331	625.0	0.331
624.5	0.333	624.0	0.334	623.5	0.335	623.0	0.336
622.5	0.337	622.0	0.337	621.5	0.339	621.0	0.339
620.5	0.341	620.0	0.342	619.5	0.343	619.0	0.345
618.5	0.346	618.0	0.347	617.5	0.348	617.0	0.349
616.5	0.350	616.0	0.351	615.5	0.352	615.0	0.352
614.5	0.354	614.0	0.355	613.5	0.356	613.0	0.358
612.5	0.359	612.0	0.360	611.5	0.361	611.0	0.361
610.5	0.363	610.0	0.364	609.5	0.365	609.0	0.366
608.5	0.368	608.0	0.368	607.5	0.370	607.0	0.371
606.5	0.372	606.0	0.373	605.5	0.375	605.0	0.376
604.5	0.377	604.0	0.378	603.5	0.379	603.0	0.381
602.5	0.381	602.0	0.383	601.5	0.384	601.0	0.386
600.5	0.386	600.0	0.384	599.5	0.382	599.0	0.381
598.5	0.381	598.0	0.382	597.5	0.384	597.0	0.385
596.5	0.386	596.0	0.386	595.5	0.387	595.0	0.388
594.5	0.389	594.0	0.390	593.5	0.392	593.0	0.392
592.5	0.394	592.0	0.395	591.5	0.397	591.0	0.399
590.5	0.400	590.0	0.402	589.5	0.403	589.0	0.404
588.5	0.406	588.0	0.408	587.5	0.409	587.0	0.411
586.5	0.412	586.0	0.414	585.5	0.415	585.0	0.416
584.5	0.418	584.0	0.420	583.5	0.421	583.0	0.423
582.5	0.424	582.0	0.425	581.5	0.427	581.0	0.429
580.5	0.431	580.0	0.433	579.5	0.436	579.0	0.438
578.5	0.440	578.0	0.442	577.5	0.445	577.0	0.447
576.5	0.448	576.0	0.450	575.5	0.453	575.0	0.456
574.5	0.458	574.0	0.461	573.5	0.463	573.0	0.465
572.5	0.468	572.0	0.471	571.5	0.474	571.0	0.476
570.5	0.479	570.0	0.481	569.5	0.483	569.0	0.485
568.5	0.488	568.0	0.490	567.5	0.493	567.0	0.495
566.5	0.498	566.0	0.500	565.5	0.503	565.0	0.505
564.5	0.508	564.0	0.511	563.5	0.513	563.0	0.518
562.5	0.519	562.0	0.521	561.5	0.525	561.0	0.528
560.5	0.530	560.0	0.534	559.5	0.537	559.0	0.540
558.5	0.543	558.0	0.547	557.5	0.550	557.0	0.553
556.5	0.558	556.0	0.559	555.5	0.561	555.0	0.565
554.5	0.568	554.0	0.571	553.5	0.574	553.0	0.578
552.5	0.581	552.0	0.584	551.5	0.588	551.0	0.592
550.5	0.596	550.0	0.599	549.5	0.603	549.0	0.607
548.5	0.610	548.0	0.613	547.5	0.617	547.0	0.620
546.5	0.624	546.0	0.628	545.5	0.632	545.0	0.636
544.5	0.640	544.0	0.644	543.5	0.649	543.0	0.653
542.5	0.657	542.0	0.660	541.5	0.664	541.0	0.668
540.5	0.672	540.0	0.677	539.5	0.681	539.0	0.685
538.5	0.689	538.0	0.694	537.5	0.698	537.0	0.702
536.5	0.706	536.0	0.711	535.5	0.714	535.0	0.719
534.5	0.723	534.0	0.727	533.5	0.731	533.0	0.736
532.5	0.740	532.0	0.745	531.5	0.749	531.0	0.753
530.5	0.757	530.0	0.761	529.5	0.765	529.0	0.769
528.5	0.773	528.0	0.778	527.5	0.782	527.0	0.786
526.5	0.789	526.0	0.793	525.5	0.796	525.0	0.799
524.5	0.803	524.0	0.805	523.5	0.808	523.0	0.810

522.5	0.812	522.0	0.815	521.5	0.817	521.0	0.820
520.5	0.822	520.0	0.824	519.5	0.827	519.0	0.829
518.5	0.831	518.0	0.832	517.5	0.833	517.0	0.835
516.5	0.836	516.0	0.837	515.5	0.838	515.0	0.838
514.5	0.838	514.0	0.838	513.5	0.838	513.0	0.838
512.5	0.838	512.0	0.838	511.5	0.837	511.0	0.836
510.5	0.835	510.0	0.834	509.5	0.833	509.0	0.832
508.5	0.831	508.0	0.829	507.5	0.828	507.0	0.824
506.5	0.822	506.0	0.819	505.5	0.817	505.0	0.815
504.5	0.812	504.0	0.810	503.5	0.807	503.0	0.803
502.5	0.800	502.0	0.796	501.5	0.793	501.0	0.789
500.5	0.784	500.0	0.780	499.5	0.776	499.0	0.772
498.5	0.768	498.0	0.765	497.5	0.760	497.0	0.756
496.5	0.751	496.0	0.746	495.5	0.742	495.0	0.737
494.5	0.733	494.0	0.728	493.5	0.723	493.0	0.719
492.5	0.714	492.0	0.709	491.5	0.704	491.0	0.699
490.5	0.694	490.0	0.688	489.5	0.683	489.0	0.678
488.5	0.673	488.0	0.668	487.5	0.663	487.0	0.659
486.5	0.654	486.0	0.649	485.5	0.643	485.0	0.638
484.5	0.633	484.0	0.627	483.5	0.622	483.0	0.618
482.5	0.613	482.0	0.608	481.5	0.603	481.0	0.598
480.5	0.593	480.0	0.588	479.5	0.582	479.0	0.577
478.5	0.572	478.0	0.567	477.5	0.563	477.0	0.558
476.5	0.553	476.0	0.549	475.5	0.544	475.0	0.540
474.5	0.535	474.0	0.530	473.5	0.526	473.0	0.521
472.5	0.516	472.0	0.512	471.5	0.507	471.0	0.502
470.5	0.498	470.0	0.494	469.5	0.489	469.0	0.485
468.5	0.481	468.0	0.476	467.5	0.472	467.0	0.468
466.5	0.463	466.0	0.460	465.5	0.456	465.0	0.452
464.5	0.448	464.0	0.444	463.5	0.440	463.0	0.436
462.5	0.433	462.0	0.429	461.5	0.425	461.0	0.422
460.5	0.418	460.0	0.414	459.5	0.410	459.0	0.406
458.5	0.403	458.0	0.399	457.5	0.396	457.0	0.393
456.5	0.389	456.0	0.387	455.5	0.384	455.0	0.381
454.5	0.378	454.0	0.375	453.5	0.371	453.0	0.369
452.5	0.366	452.0	0.363	451.5	0.360	451.0	0.358
450.5	0.355	450.0	0.352	449.5	0.349	449.0	0.347
448.5	0.344	448.0	0.341	447.5	0.339	447.0	0.337
446.5	0.334	446.0	0.332	445.5	0.330	445.0	0.328
444.5	0.326	444.0	0.325	443.5	0.323	443.0	0.320
442.5	0.318	442.0	0.316	441.5	0.314	441.0	0.312
440.5	0.310	440.0	0.309	439.5	0.307	439.0	0.305
438.5	0.304	438.0	0.303	437.5	0.301	437.0	0.300
436.5	0.298	436.0	0.297	435.5	0.295	435.0	0.294
434.5	0.293	434.0	0.291	433.5	0.290	433.0	0.289
432.5	0.287	432.0	0.286	431.5	0.285	431.0	0.283
430.5	0.282	430.0	0.281	429.5	0.280	429.0	0.278
428.5	0.277	428.0	0.276	427.5	0.274	427.0	0.273
426.5	0.272	426.0	0.270	425.5	0.270	425.0	0.269
424.5	0.268	424.0	0.267	423.5	0.266	423.0	0.265
422.5	0.264	422.0	0.263	421.5	0.262	421.0	0.261
420.5	0.260	420.0	0.259	419.5	0.258	419.0	0.257
418.5	0.256	418.0	0.255	417.5	0.254	417.0	0.252
416.5	0.252	416.0	0.251	415.5	0.250	415.0	0.250
414.5	0.249	414.0	0.248	413.5	0.247	413.0	0.246
412.5	0.245	412.0	0.245	411.5	0.243	411.0	0.243
410.5	0.242	410.0	0.242	409.5	0.242	409.0	0.242
408.5	0.241	408.0	0.241	407.5	0.240	407.0	0.239
406.5	0.238	406.0	0.237	405.5	0.237	405.0	0.237
404.5	0.236	404.0	0.236	403.5	0.236	403.0	0.236
402.5	0.235	402.0	0.236	401.5	0.236		

Lampiran 4.7 Contoh Perhitungan IC₅₀ dengan Spektrofotometri UV-Vis

4.7a Membuat Larutan Induk

$$\begin{aligned} \text{Larutan Induk 1} &= \frac{24,9 \text{ mg}}{25 \text{ ml}} \times 1000 \\ &= 996 \mu\text{g/ml} \end{aligned}$$

$$\begin{aligned}\text{Larutan Induk 2} &= \frac{24,9 \text{ mg}}{25 \text{ ml}} \times 1000 \\ &= 996 \mu\text{g/ml}\end{aligned}$$

4.7b Membuat Larutan Uji

$$\begin{aligned}\text{Pengenceran larutan induk 1} &= \frac{0,5 \text{ ml}}{10 \text{ ml}} \times 996 \mu\text{g/ml} \\ &= 49,8 \mu\text{g/ml}\end{aligned}$$

$$\begin{aligned}\text{Larutan 5 ppm} &= \frac{1 \text{ ml}}{10 \text{ ml}} \times 49,8 \mu\text{g/ml} \\ &= 4,98 \mu\text{g/ml}\end{aligned}$$

$$\begin{aligned}\text{Larutan 10 ppm} &= \frac{1 \text{ ml}}{5 \text{ ml}} \times 49,8 \mu\text{g/ml} \\ &= 9,96 \mu\text{g/ml}\end{aligned}$$

$$\begin{aligned}\text{Larutan 20 ppm} &= \frac{2 \text{ ml}}{5 \text{ ml}} \times 49,8 \mu\text{g/ml} \\ &= 19,92 \mu\text{g/ml}\end{aligned}$$

$$\begin{aligned}\text{Larutan 25 ppm} &= \frac{5 \text{ ml}}{10 \text{ ml}} \times 49,8 \mu\text{g/ml} \\ &= 24,9 \mu\text{g/ml}\end{aligned}$$

$$\begin{aligned}\text{Pengenceran larutan induk 2} &= \frac{0,5 \text{ ml}}{10 \text{ ml}} \times 996 \mu\text{g/ml} \\ &= 49,8 \mu\text{g/ml}\end{aligned}$$

$$\begin{aligned}\text{Larutan 15 ppm} &= \frac{3 \text{ ml}}{10 \text{ ml}} \times 49,8 \mu\text{g/ml} \\ &= 14,94 \mu\text{g/ml}\end{aligned}$$

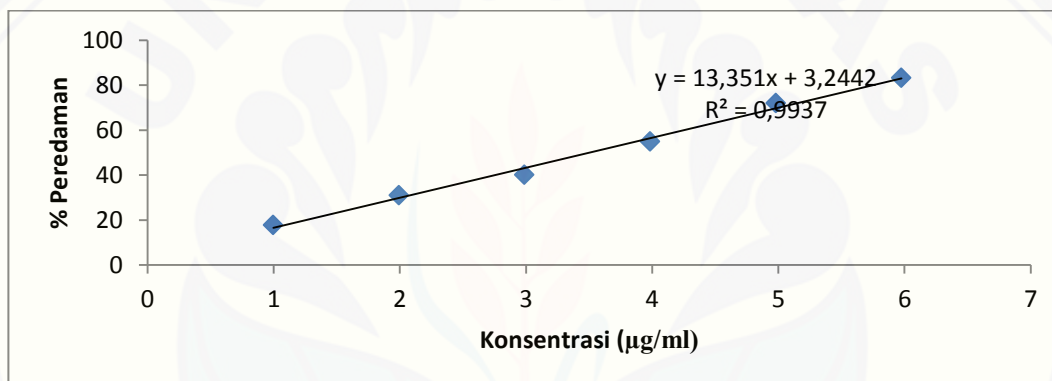
$$\begin{aligned}\text{Larutan 30 ppm} &= \frac{3 \text{ ml}}{5 \text{ ml}} \times 49,8 \mu\text{g/ml} \\ &= 29,88 \mu\text{g/ml}\end{aligned}$$

4.7c Perhitungan % Peredaman dan IC₅₀

$$\% \text{ Peredaman} = \frac{\text{Absorbansi Kontrol} - \text{Absorbansi Sampel}}{\text{Absorbansi Kontrol}} \times 100\%$$

Absorbansi Sampel	Konsentrasi (µg/ml)	% Peredaman
0,707	0,996	17,895
0,593	1,992	30,966
0,515	2,988	40,047
0,388	3,984	54,831
0,241	4,980	71,944
0,144	5,976	83,236

Absorbansi Kontrol : 0,859



Perhitungan IC₅₀

$$50 = 13,351x + 3,2442$$

$$X = \frac{50 - 3,2442}{13,351}$$

$$= 3,502$$

$$\text{IC}_{50} = 3,502 \text{ µg/ml}$$

Lampiran 4.8 Data Hasil Prediksi Kategori Sampel pada Model Klasifikasi

4.8a Prediksi Kategori Sampel pada Validasi 2-Fold Cross Validation

Classified_2		1	Classified_2		1	Classified_2		1
P	1	Tidak Memilik	P	11	Tidak Memilik	Q	21	Tidak Memilik
P	2	Tidak Memilik	P	12	Tidak Memilik	Q	22	Tidak Memilik
P	3	Tidak Memilik	P	13	Tidak Memilik	Q	23	Tidak Memilik
P	4	Tidak Memilik	P	14	Tidak Memilik	Q	24	Tidak Memilik
P	5	Tidak Memilik	P	15	Tidak Memilik	Q	25	Tidak Memilik
P	6	Tidak Memilik	Q	16	Tidak Memilik	Q	26	Tidak Memilik
P	7	Tidak Memilik	Q	17	Tidak Memilik	Q	27	Tidak Memilik
P	8	Tidak Memilik	Q	18	Tidak Memilik	Q	28	Tidak Memilik
P	9	Tidak Memilik	Q	19	Tidak Memilik	Q	29	Tidak Memilik
P	10	Tidak Memilik	Q	20	Tidak Memilik	Q	30	Tidak Memilik
R	31	Memiliki Aktiv	R	41	Memiliki Aktiv	S	51	Memiliki Aktiv
R	32	Memiliki Aktiv	R	42	Memiliki Aktiv	S	52	Memiliki Aktiv
R	33	Memiliki Aktiv	R	43	Memiliki Aktiv	S	53	Memiliki Aktiv
R	34	Memiliki Aktiv	R	44	Memiliki Aktiv	S	54	Memiliki Aktiv
R	35	Memiliki Aktiv	R	45	Memiliki Aktiv	S	55	Memiliki Aktiv
R	36	Memiliki Aktiv	S	46	Memiliki Aktiv	S	56	Memiliki Aktiv
R	37	Memiliki Aktiv	S	47	Memiliki Aktiv	S	57	Memiliki Aktiv
R	38	Memiliki Aktiv	S	48	Memiliki Aktiv	S	58	Memiliki Aktiv
R	39	Memiliki Aktiv	S	49	Memiliki Aktiv	S	59	Memiliki Aktiv
R	40	Memiliki Aktiv	S	50	Memiliki Aktiv	S	60	Memiliki Aktiv

4.8b Prediksi Kategori Sampel Nyata dan Sampel Simulasi

Classified_S		1	Classified_S		1	Classified_S		1
T (1)	1	Memiliki Aktiv	U (1)	10	Memiliki Aktiv	V (1)	19	Memiliki Aktiv
T (2)	2	Memiliki Aktiv	U (2)	11	Memiliki Aktiv	V (2)	20	Memiliki Aktiv
T (3)	3	Memiliki Aktiv	U (3)	12	Memiliki Aktiv	V (3)	21	Memiliki Aktiv
T (4)	4	Memiliki Aktiv	U (4)	13	Memiliki Aktiv	V (7)	22	Memiliki Aktiv
T (5)	5	Memiliki Aktiv	U (5)	14	Memiliki Aktiv	V (8)	23	Memiliki Aktiv
T (6)	6	Memiliki Aktiv	U (6)	15	Memiliki Aktiv	V (9)	24	Memiliki Aktiv
T (13)	7	Memiliki Aktiv	U (10)	16	Memiliki Aktiv	V (10)	25	Memiliki Aktiv
T (14)	8	Memiliki Aktiv	U (11)	17	Memiliki Aktiv	V (11)	26	Memiliki Aktiv
T (15)	9	Memiliki Aktiv	U (12)	18	Memiliki Aktiv	V (12)	27	Memiliki Aktiv
Daun Salam	28	Tidak Memilik	Daun Sirsak	37	Tidak Memilik	Stimuno (7)	46	Tidak Memilik
Daun Salam	29	Tidak Memilik	Daun Sirsak	38	Tidak Memilik	Stimuno (8)	47	Tidak Memilik
Daun Salam	30	Tidak Memilik	Daun Sirsak	39	Tidak Memilik	Stimuno (9)	48	Tidak Memilik
Daun Salam	31	Tidak Memilik	Daun Sirsak	40	Tidak Memilik	Stimuno (10)	49	Tidak Memilik
Daun Salam	32	Tidak Memilik	Daun Sirsak	41	Tidak Memilik	Stimuno (11)	50	Tidak Memilik
Daun Salam	33	Tidak Memilik	Daun Sirsak	42	Tidak Memilik	Stimuno (12)	51	Tidak Memilik
Daun Salam	34	Tidak Memilik	Daun Sirsak	43	Tidak Memilik	Stimuno (13)	52	Tidak Memilik
Daun Salam	35	Tidak Memilik	Daun Sirsak	44	Tidak Memilik	Stimuno (14)	53	Tidak Memilik
Daun Salam	36	Tidak Memilik	Daun Sirsak	45	Tidak Memilik	Stimuno (15)	54	Tidak Memilik

Lampiran 4.9 Data Hasil Prediksi IC₅₀ Sampel pada Model Kalibrasi (0,1 µg/ml)

4.9a Prediksi IC₅₀ Sampel pada Validasi 2-Fold Cross Validation

Predicted_2		1	Predicted_2		1	Predicted_2		1
P	1	33.9708	P	11	31.5839	Q	21	51.4725
P	2	33.0263	P	12	30.7383	Q	22	51.7911
P	3	33.5967	P	13	30.0112	Q	23	52.7479
P	4	33.9066	P	14	29.8454	Q	24	52.6328
P	5	31.2184	P	15	29.9982	Q	25	53.7556
P	6	32.3008	Q	16	52.2843	Q	26	52.1926
P	7	32.0016	Q	17	52.9767	Q	27	50.5274
P	8	30.6221	Q	18	53.1893	Q	28	52.3980
P	9	30.8215	Q	19	51.7790	Q	29	50.6240
P	10	33.1983	Q	20	51.8376	Q	30	52.3092
R	31	2.1266	R	41	2.8539	S	51	7.1983
R	32	2.1470	R	42	3.9187	S	52	6.5428
R	33	2.8386	R	43	2.6809	S	53	4.7210
R	34	2.5087	R	44	1.1767	S	54	6.3936
R	35	2.5788	R	45	1.5620	S	55	5.8834
R	36	1.0477	S	46	7.5834	S	56	7.7201
R	37	2.1855	S	47	6.7076	S	57	7.5600
R	38	2.2465	S	48	4.8238	S	58	7.6670
R	39	1.1480	S	49	7.4580	S	59	8.3247
R	40	2.8293	S	50	5.5943	S	60	9.0223

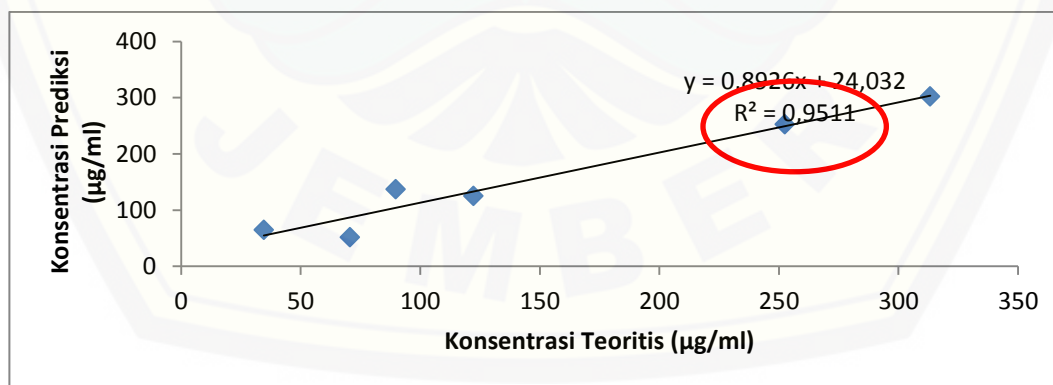
4.9b Prediksi IC₅₀ Sampel Nyata dan Sampel Simulasi

Predicted_Sa		1	Predicted_Sa		1	Predicted_Sa		1
T (1)	1	6.3464	U (1)	10	15.0029	V (1)	19	6.3491
T (2)	2	4.8278	U (2)	11	13.0190	V (2)	20	6.5245
T (3)	3	4.3289	U (3)	12	13.2082	V (3)	21	6.8344
T (4)	4	4.9654	U (4)	13	13.4708	V (7)	22	4.0472
T (5)	5	4.3415	U (5)	14	13.3271	V (8)	23	7.3532
T (6)	6	5.9700	U (6)	15	14.0815	V (9)	24	8.0615
T (13)	7	5.2039	U (10)	16	14.1236	V (10)	25	8.0944
T (14)	8	5.3248	U (11)	17	12.0323	V (11)	26	5.0331
T (15)	9	5.0248	U (12)	18	14.9039	V (12)	27	5.8154
Daun Salam	28	23.9624	Daun Sirsak	37	30.4619	Stimuno (7)	46	12.8139
Daun Salam	29	25.2498	Daun Sirsak	38	30.7184	Stimuno (8)	47	12.4082
Daun Salam	30	25.6772	Daun Sirsak	39	29.4914	Stimuno (9)	48	12.6293
Daun Salam	31	24.2809	Daun Sirsak	40	30.6443	Stimuno (10)	49	13.2430
Daun Salam	32	25.3977	Daun Sirsak	41	30.4913	Stimuno (11)	50	12.2436
Daun Salam	33	25.8361	Daun Sirsak	42	29.5421	Stimuno (12)	51	12.3414
Daun Salam	34	25.6381	Daun Sirsak	43	30.4555	Stimuno (13)	52	12.7951
Daun Salam	35	26.0487	Daun Sirsak	44	30.8781	Stimuno (14)	53	12.0716
Daun Salam	36	25.0238	Daun Sirsak	45	29.1116	Stimuno (15)	54	12.1088

Lampiran 4.10 Contoh Perhitungan IC₅₀ Hasil Prediksi NIR

$$\begin{aligned}\text{Nilai IC}_{50} &= 30,4619 \mu\text{g}/10 \text{ ml} \times 10 \\ &= 304,619 \mu\text{g}/\text{ml}\end{aligned}$$

Replikasi	Konsentrasi ($\mu\text{g}/\text{ml}$)	Rata-rata Replikasi ($\mu\text{g}/\text{ml}$)	Rata-rata IC ₅₀ ($\mu\text{g}/\text{ml}$)	SD	RSD
Replikasi 1	304,619	302,239	301,994	0,44	0,15 %
	307,184				
	294,914				
	306,433				
Replikasi 2	304,913	302,259	301,994	0,44	0,15 %
	295,421				
	304,555				
Replikasi 3	308,781	301,484	301,994	0,44	0,15 %
	291,116				

Lampiran 4.11 Hasil Analisis Statistik Uji T dengan Program *Statistical Product and Service Solutions* (SPSS) dan Regresi**4.11a Hasil Analisis dengan Kurva Regresi**

4.11b Hasil Analisis dengan SPSS

Uji Normalitas

Tests of Normality

	Kolmogorov-Smirnov ^a			Shapiro-Wilk		
	Statistic	df	Sig.	Statistic	df	Sig.
LgNIR	,177	18	,142	,878	18	,024
LgSpektro	,183	18	,113	,900	18	,059

a. Lilliefors Significance Correction

Uji Sampel T Berpasangan

Paired Samples Statistics

	Mean	N	Std. Deviation	Std. Error Mean
Pair 1 LgNIR	2,1062	18	,28852	,06801
LgSpektro	2,0545	18	,33467	,07888

Paired Samples Correlations

	N	Correlation	Sig.
Pair 1 LgNIR & LgSpektro	18	,910	,000

Paired Samples Test

	Paired Differences					T	df	Sig. (2-tailed)
	Mean	Std. Deviation	Std. Error Mean	99% Confidence Interval of the Difference				
				Lower	Upper			
Pair 1 LgNIR - LgSpektro	,05172	,13935	,03285	-,04347	,14691	1,575	17	,134

Lampiran 4.12 Tabel Distribusi Normal Standar T

Titik Persentase Distribusi t (df = 1 – 40)

df	Pr 0.50	0.25 0.20	0.10 0.10	0.05 0.050	0.025 0.02	0.01 0.010	0.005 0.002	0.001 0.002
1	1.00000	3.07768	6.31375	12.70620	31.82052	63.65674	318.30884	
2	0.81650	1.88562	2.91999	4.30265	6.96456	9.92484	22.32712	
3	0.76489	1.63774	2.35336	3.18245	4.54070	5.84091	10.21453	
4	0.74070	1.53321	2.13185	2.77645	3.74695	4.60409	7.17318	
5	0.72669	1.47588	2.01505	2.57058	3.36493	4.03214	5.89343	
6	0.71756	1.43976	1.94318	2.44691	3.14267	3.70743	5.20763	
7	0.71114	1.41492	1.89458	2.36462	2.99795	3.49948	4.78529	
8	0.70639	1.39682	1.85955	2.30600	2.89646	3.35539	4.50079	
9	0.70272	1.38303	1.83311	2.26216	2.82144	3.24984	4.29681	
10	0.69981	1.37218	1.81246	2.22814	2.76377	3.16927	4.14370	
11	0.69745	1.36343	1.79588	2.20099	2.71808	3.10581	4.02470	
12	0.69548	1.35622	1.78229	2.17881	2.68100	3.05454	3.92963	
13	0.69383	1.35017	1.77093	2.16037	2.65031	3.01228	3.85198	
14	0.69242	1.34503	1.76131	2.14479	2.62449	2.97684	3.78739	
15	0.69120	1.34061	1.75305	2.13145	2.60248	2.94671	3.73283	
16	0.69013	1.33676	1.74588	2.11991	2.58349	2.92078	3.68615	
17	0.68920	1.33338	1.73961	2.10982	2.56693	2.89823	3.64577	
18	0.68836	1.33039	1.73406	2.10092	2.55238	2.87844	3.61048	
19	0.68762	1.32773	1.72913	2.09302	2.53948	2.86093	3.57940	
20	0.68695	1.32534	1.72472	2.08596	2.52798	2.84534	3.55181	
21	0.68635	1.32319	1.72074	2.07961	2.51765	2.83136	3.52715	
22	0.68581	1.32124	1.71714	2.07387	2.50832	2.81876	3.50499	
23	0.68531	1.31946	1.71387	2.06866	2.49987	2.80734	3.48496	
24	0.68485	1.31784	1.71088	2.06390	2.49216	2.79694	3.46678	
25	0.68443	1.31635	1.70814	2.05954	2.48511	2.78744	3.45019	
26	0.68404	1.31497	1.70562	2.05553	2.47863	2.77871	3.43500	
27	0.68368	1.31370	1.70329	2.05183	2.47266	2.77068	3.42103	
28	0.68335	1.31253	1.70113	2.04841	2.46714	2.76326	3.40816	
29	0.68304	1.31143	1.69913	2.04523	2.46202	2.75639	3.39624	
30	0.68276	1.31042	1.69726	2.04227	2.45726	2.75000	3.38518	
31	0.68249	1.30946	1.69552	2.03951	2.45282	2.74404	3.37490	
32	0.68223	1.30857	1.69389	2.03693	2.44868	2.73848	3.36531	
33	0.68200	1.30774	1.69236	2.03452	2.44479	2.73328	3.35634	
34	0.68177	1.30695	1.69092	2.03224	2.44115	2.72839	3.34793	
35	0.68156	1.30621	1.68957	2.03011	2.43772	2.72381	3.34005	
36	0.68137	1.30551	1.68830	2.02809	2.43449	2.71948	3.33262	
37	0.68118	1.30485	1.68709	2.02619	2.43145	2.71541	3.32563	
38	0.68100	1.30423	1.68595	2.02439	2.42857	2.71156	3.31903	
39	0.68083	1.30364	1.68488	2.02269	2.42584	2.70791	3.31279	
40	0.68067	1.30308	1.68385	2.02108	2.42326	2.70446	3.30688	