



**UJI AKTIVITAS ANTIOKSIDAN DAN PENETAPAN KADAR
FENOL TOTAL EKSTRAK ETANOL HERBA APU-APU
(*Pistia stratiotes*) DAN FRAKSI-FRAKSINYA**

SKRIPSI

oleh:

**IRAWATI FIRDIYANSARI
NIM: 152210101018**

**FAKULTAS FARMASI
UNIVERSITAS JEMBER
2019**



**UJI AKTIVITAS ANTIOKSIDAN DAN PENETAPAN KADAR
FENOL TOTAL EKSTRAK ETANOL HERBA APU-APU
(*Pistia stratiotes*) DAN FRAKSI-FRAKSINYA**

SKRIPSI

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

oleh:

**IRAWATI FIRDIYANSARI
NIM: 152210101018**

**FAKULTAS FARMASI
UNIVERSITAS JEMBER
2019**

PERSEMBAHAN

Skripsi ini saya persembahkan untuk :

1. Allah SWT, yang dengan petunjuk, rahmat, hidayah, tuntunan serta limpahan kasih-Nya memberikan kelancaran dan kemudahan.
2. Ibu Siti Alfiah dan Ayah Abdul Majid yang tercinta.
3. Saudaraku tersayang Octavianti Nuryani, Juliani Indah Safitri, Ariel Agus Prastiawan.
4. Guru-guru sejak SD hingga SMA, dosen dan segenap civitas akademika Fakultas Farmasi Universitas Jember.
5. Almamater Fakultas Farmasi Universitas Jember.

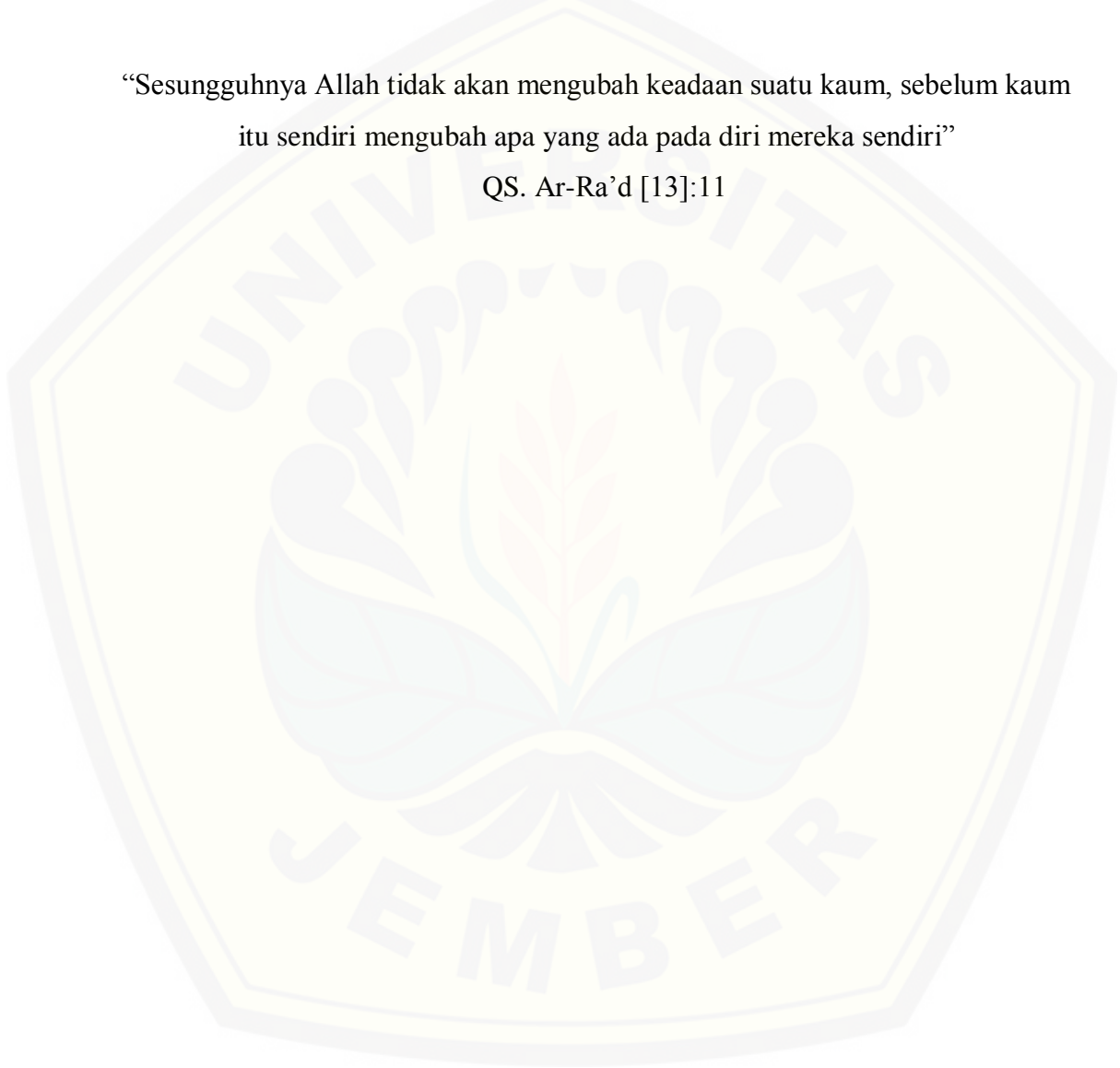
MOTTO

“Bersemangatlah melakukan hal yang bermanfaat untukmu dan meminta pertolongan pada Allah, serta janganlah engkau malas”

(HR. Muslim)

“Sesungguhnya Allah tidak akan mengubah keadaan suatu kaum, sebelum kaum itu sendiri mengubah apa yang ada pada diri mereka sendiri”

QS. Ar-Ra'd [13]:11



PERNYATAAN

Saya yang bertanda tangan dibawah ini :

Nama : Irawati Firdiyansari

NIM : 152210101018

Menyatakan dengan sesungguhnya bahwa skripsi yang berjudul: “Uji Aktivitas Antioksidan Dan Penetapan Kadar Fenol Total Ekstrak Etanol Herba Apu-Apu (*Pistia Stratiotes*) Dan Fraksi-Fraksinya” adalah benar-benar hasil karya sendiri, kecuali dalam pengutipan substansi disebutkan sumbernya, dan belum pernah diajukan pada institusi manapun, serta bukan karya jiplakan. Saya bertanggung jawab atas keabsahan dan kebenaran isinya sesuai dengan sikap ilmiah yang harus dijunjung tinggi.

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

Jember, 19 Juli 2019

Yang menyatakan,

Irawati Firdiyansari,

SKRIPSI

**UJI AKTIVITAS ANTIOKSIDAN DAN PENETAPAN KADAR FENOL
TOTAL EKSTRAK ETANOL HERBA APU-APU (*Pistia stratiotes*)
DAN FRAKSI-FRAKSINYA**

Oleh:

IRAWATI FIRDIYANSARI
NIM: 152210101018

Pembimbing

Dosen Pembimbing Utama : Dewi Dianasari, S.Farm., M.Farm., Apt.

Dosen Pembimbing Anggota : Indah Yulia Ningsih, S.Farm., M.Farm., Apt.

PENGESAHAN

Skripsi berjudul “Uji Aktivitas Antioksidan Dan Penetapan Kadar Fenol Total Ekstrak Etanol Herba Apu-Apu (*Pistia Stratiotes*) Dan Fraksi-Fraksinya” telah diuji dan disahkan oleh Fakultas Farmasi Universitas Jember pada:

Hari, Tanggal : 19 Juli 2019

Tempat : Fakultas Farmasi Universitas Jember

Tim Pembimbing:

Dosen Pembimbing Utama

Dosen Pembimbing Anggota

Dewi Dianasari, S.Farm., M.Farm., Apt.

Indah Yulia N, S.Farm., M.Farm., Apt.

NIP. 198712082014042002

NIP. 198407122008122002

Tim Penguji:

Dosen Penguji I

Dosen Penguji II

Nuri, S.Si., Apt., M.Si

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

NIP. 196904122001121007

NIP. 197807282005012001

Mengesahkan

Dekan,

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

NIP. 197604142002122001

RINGKASAN

Uji Aktivitas Antioksidan dan Penetapan Kadar Fenol Total Ekstrak Etanol Herba Apu-Apu (*Pistia Stratiotes*) dan Fraksi-Fraksinya; Irawati Firdiyansari, 152210101018; 2019: 34 halaman; Fakultas Farmasi Universitas Jember.

Radikal bebas bersifat tidak stabil sehingga akan bereaksi dengan molekul disekitarnya. Reaksi ini, bila tidak dihentikan akan menimbulkan stress oksidatif yang dapat menyebabkan kerusakan sel serta berbagai penyakit degeneratif seperti kanker, jantung, katarak, penuaan dini dan lain-lain. Oleh karena itu, tubuh memerlukan substansi penting yakni antioksidan yang mampu menangkap radikal bebas tersebut sehingga senyawa radikal menjadi stabil. Salah satu tumbuhan yang dapat dimanfaatkan sebagai antioksidan yaitu herba apu-apu (*Pistia stratiotes*). Tumbuhan apu-apu merupakan salah satu tumbuhan yang memiliki kandungan kimia fenol yang diduga memiliki aktivitas sebagai antioksidan.

Penelitian ini bertujuan untuk mengetahui aktivitas antioksidan dan kadar fenol total dari ekstrak etanol, fraksi n-heksana, fraksi etil asetat, fraksi etanol air dari herba apu-apu (*Pistia stratiotes*). Aktivitas Antioksidan diukur dengan metode penangkapan radikal bebas DPPH, yaitu dengan mereaksikan larutan DPPH dengan sampel uji atau pembanding vitamin C yang kemudian diukur serpannya pada panjang gelombang 517 nm menggunakan spektrofotometri UV-Vis. Penetapan kadar fenol diukur dengan metode Folin-ciocalteu dengan cara mereaksikan sampel uji atau standar asam galat dengan reagen Folin-ciocalteu dan Na_2CO_3 7,5%, kemudian diukur serapannya pada panjang gelombang 749nm dengan spektrofotometri UV-Vis.

Hasil penelitian menunjukkan aktivitas antioksidan dari ekstrak etanol, fraksi n-heksana, fraksi etil asetat dan fraksi etanol air dari herba apu-apu dan vitamin C secara berturut-turut yaitu 16,675 $\mu\text{g}/\text{mL}$; 29,915 $\mu\text{g}/\text{mL}$; 11,875 $\mu\text{g}/\text{mL}$; 9,090 $\mu\text{g}/\text{mL}$; 3,909 $\mu\text{g}/\text{mL}$. Sedangkan hasil uji penetapan kadar fenol total dari ekstrak etanol, fraksi n-heksana, fraksi etil asetat dan fraksi etanol air dari herba apu-apu secara berturut-turut yaitu 231,882 mgGAE/g ekstrak; 197,544 mgGAE/g ekstrak; 276,883 mgGAE/g ekstrak; 350,127 mgGAE/g ekstrak. Hasil analisis menggunakan ANOVA dan LSD pada aktivitas antioksidan dan kadar fenol total pada sampel menunjukkan nilai signifikansi $<0,05$ yang artinya terdapat perbedaan signifikan pada semua kelompok. Fraksi etanol-air herba apu-apu (*Pistia stratiotes*) memiliki aktivitas antioksidan dan kadar fenol total tertinggi pada penelitian ini. Aktivitas antioksidan dan kadar fenol total pada penelitian ini menunjukkan korelasi yang bermakna, dimana kadar fenol yang tinggi maka nilai IC_{50} rendah sedangkan aktivitas antioksidannya tinggi.

PRAKATA

Segala Puji syukur kehadirat Allah Subhanahu Wa Ta'ala atas segala rahmat dan karunia-Nya sehingga penulis dapat menyelesaikan skripsi yang berjudul “Uji Aktivitas Antioksidan Dan Penetapan Kadar Fenol Total Ekstrak Etanol Dan Fraksi Herba Apu-Apu (*Pistia Stratiotes*)”. Skripsi ini disusun untuk memenuhi salah satu syarat untuk menyelesaikan pendidikan strata satu (S1) pada Fakultas Farmasi Universitas Jember. Penyusunan skripsi ini tidak lepas dari bantuan berbagai pihak. Oleh karena itu, penulis ingin menyampaikan terima kasih kepada:

1. Ibu Lestyo Wulandari, S.Si., M.Farm., Apt. selaku Dekan Fakultas Farmasi Universitas Jember
2. Bapak Bawon Triatmoko, S.Farm., M.Farm.,Apt. selaku Dosen Pembimbing Akademik
3. Ibu Dewi Dianasari, S.Farm., M.Farm.,Apt. selaku Dosen Pembimbing Utama dan Indah Yulia N, S.Farm., M.Farm., Apt. selaku Dosen Pembimbing Anggota
4. Bapak Nuri, S.Si., Apt., M.Si. selaku Dosen Penguji I dan Ibu Endah Puspitasari, S.Farm., M.Sc., Apt. selaku Dosen Penguji II
5. Laboran Laboratorium Biologi dan Kimia Ibu Widi, Mbak Parka, Ibu Wayan, dan Mbak Hani yang banyak membantu peneliti
6. Ayahanda Abdul Majid, Ibu Siti Alfiah, Mbak Octavianti Nuryani, Adik Juliani Indah Safitri, dan Adik Ariel Agus Prasetiawan yang selalu memberikan dukungan moril, materiil dan tak lupa doanya
7. Keluarga Besar “LIBITUM” yang mau berjuang bersama
8. Sahabatku yang memberi semangat agar cepat lulus Maulidya Barikatul Iftitah , Lilis Sapta Eka L, Miftachul Zannah,Wahyu Nur Jannah.
9. Anak Kost 45B Mbak Linda, Mbak Daniar, Dek Atik dan Dek Daras.
10. Teman-teman skripsi Biologi dan Kimia (Azizah, Tahir, Wayan, Meranti, Syarif, Marwah, Eka, Reny, Ulfa, Arini, dkk)
11. Semua pihak yang tidak bisa disebutkan satu per satu.

Penulis sangat menerima segala kritik dan saran dari semua pihak demi kesempurnaan penulisan skripsi ini. Penulis berharap semoga skripsi ini dapat bermanfaat. Aamiin.

Jember, 19 Juli 2019

Penulis



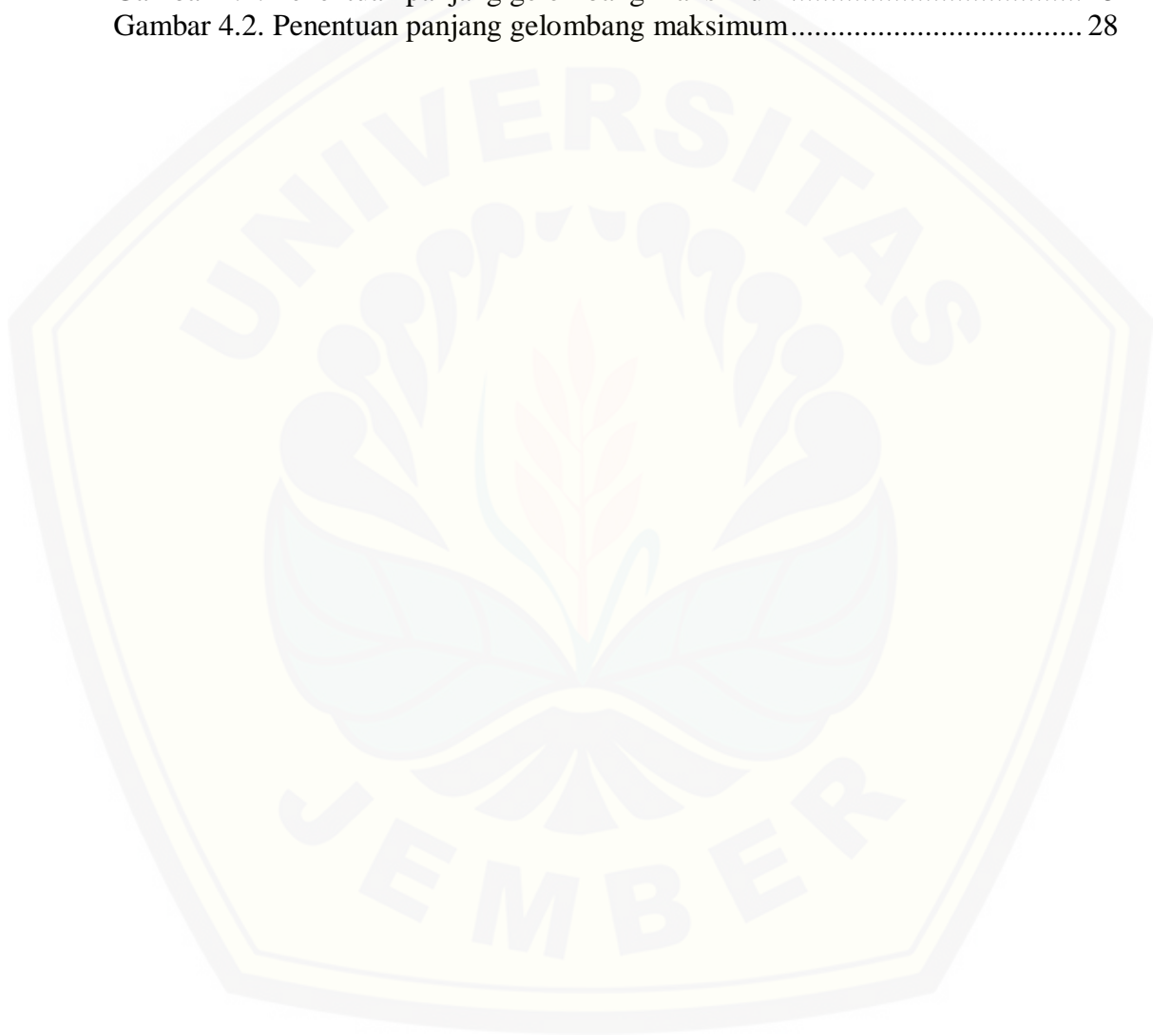
DAFTAR ISI

	Halaman
HALAMAN JUDUL	ii
HALAMAN PERSEMBAHAN	iii
HALAMAN MOTTO	iv
HALAMAN PERNYATAAN	v
HALAMAN PENGESAHAN	vii
HALAMAN RINGKASAN	viii
PRAKATA	ix
DAFTAR ISI	xi
DAFTAR GAMBAR	xiii
DAFTAR TABEL	xiv
DAFTAR LAMPIRAN	xv
BAB I. PENDAHULUAN	1
1.1 Latar Belakang	1
1.2 Rumusan Masalah	2
1.3 Tujuan	2
1.4 Manfaat	3
BAB II. TINJAUAN PUSTAKA	4
2.1 Tinjauan Tentang Apu-Apu (<i>Pistia stratiotes</i>)	4
2.1.1 Klasifikasi	4
2.1.2 Deskripsi	4
2.1.3 Kandungan Kimia dan Khasiat	5
2.2 Tinjauan Radikal Bebas	5
2.3 Tinjauan Antioksidan	6
2.3.1 Antioksidan Alami.....	7
2.3.2 Antioksidan Sintetik	8
2.4 Senyawa Fenolik	8
2.5 Metode Penetapan Kadar Fenol Total	9
2.6 Metode Pengujian Antioksidan	10
2.6.1 Metode DPPH.....	10
2.6.2 Metode Tiosianat	11
2.6.3 Metode Uji Kapasitas Serapan Radikal Oksigen	11
2.6.4 Metode Ferric Antioksidant Reducing Power (Frap)	12
2.6.5 Metode ABTS	12
2.7 Tinjauan Umum Vitamin C	12
2.8 Ekstraksi	13
2.9 Fraksinasi	14
BAB III. METODE PENELITIAN	16
3.1 Jenis Penelitian	16
3.2 Tempat dan Waktu Penelitian	16
3.3 Rancangan Penelitian	16
3.4 Alat dan Bahan	16
3.4.1 Alat	16
3.4.2 Bahan	17
3.5 Variabel Penelitian	17

3.6 Definisi Operasional	17
3.7 Prosedur Penelitian	18
3.7.1 Determinasi	18
3.7.2 Pembuatan Simplisia dan Serbuk Herba Apu-apu (<i>Pistia stratiotes</i>)	18
3.7.4 Fraksinasi	18
3.7.5 Pengujian Aktivitas Antioksidan dengan DPPH	19
3.7.6 Penetapan Kadar Fenol Total	20
3.8 Analisis Data.....	22
3.9 Alur Penelitian.....	23
BAB IV. HASIL DAN PEMBAHASAN	24
4.1 Ekstraksi dan Fraksinasi	24
4.2 Pengujian Aktivitas Antioksidan	25
4.2.1 Penetapan Panjang Gelombang Maksimum	25
4.2.2 Penentuan Waktu Inkubasi.....	25
4.2.3 Pengujian Aktivitas Antioksidan.....	26
4.3 Penetapan Kadar Fenol Total.....	27
4.3.1 Penentuan Panjang Gelombang Maksimum	27
4.3.2 Penentuan Waktu Inkubasi.....	28
4.3.3 Penetapan Kadar Fenol Total	28
4.4 Korelasi Kadar Fenol Total dengan Nilai Aktivitas Antioksidan	29
BAB V. PENUTUP	33
5.1 Kesimpulan.....	33
5.2 Saran.....	33
DAFTAR PUSTAKA.....	32
LAMPIRAN.....	36

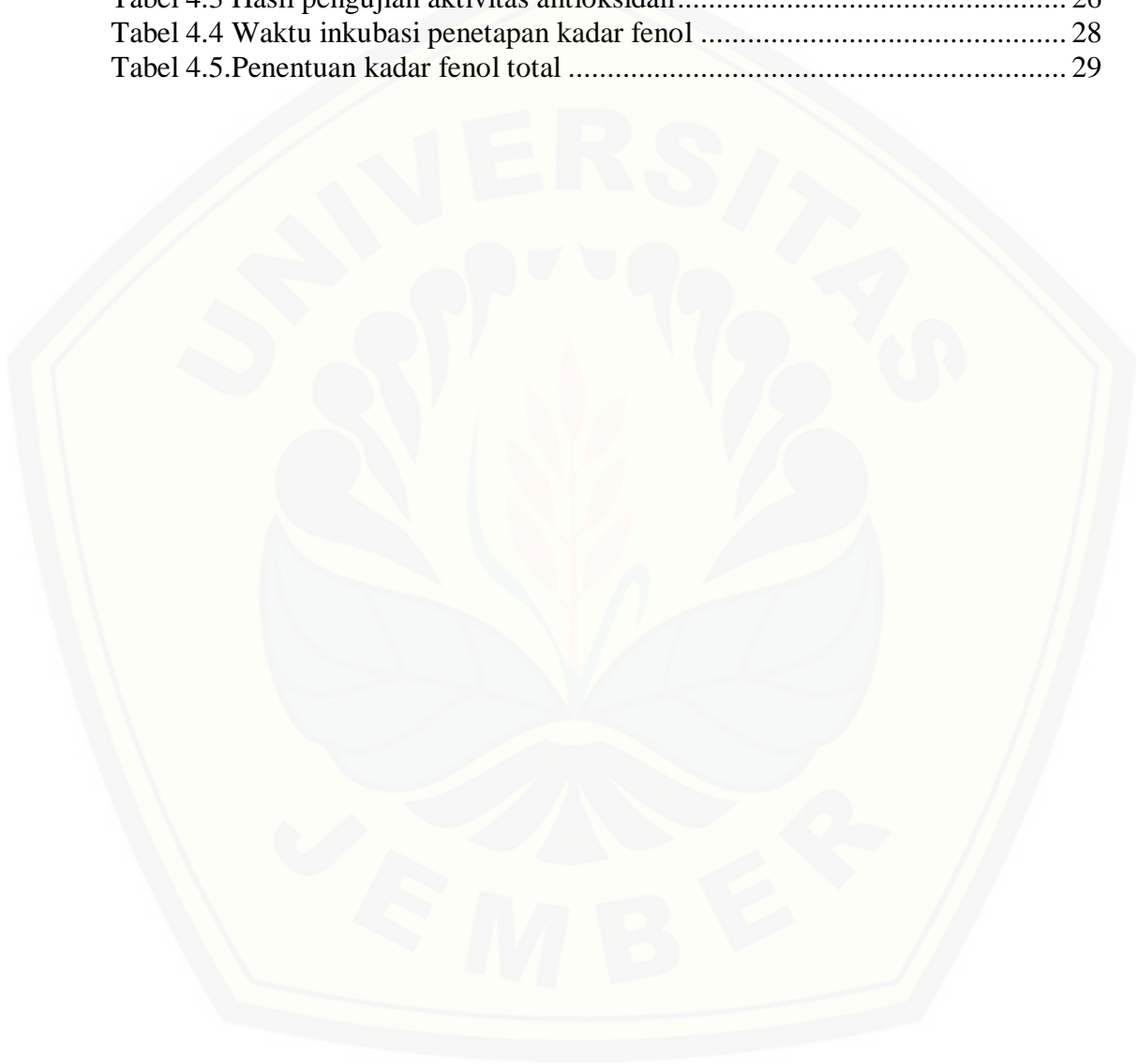
DAFTAR GAMBAR

	Halaman
Gambar 2.1 Tumbuhan apu-apu	4
Gambar 2.2 Prinsip fotooksidasi lemak	7
Gambar 2.3 Struktur dasar fenol	8
Gambar 2.4 Reaksi antioksidan dan DPPH	11
Gambar 2.5 Struktur vitamin C	13
Gambar 4.1. Penentuan panjang gelombang maksimum.....	25
Gambar 4.2. Penentuan panjang gelombang maksimum.....	28



DAFTAR TABEL

	Halaman
Tabel 2.1 Klasifikasi fenol berdasarkan jumlah rantai karbonnya.	9
Tabel 2.2 Tingkat kekuatan antioksidan dengan metode DPPH	10
Tabel 4.1 Hasil ekstraksi dan fraksinasi	24
Tabel 4.2 Waktu inkubasi uji aktivitas antioksidan.....	26
Tabel 4.3 Hasil pengujian aktivitas antioksidan.....	26
Tabel 4.4 Waktu inkubasi penetapan kadar fenol	28
Tabel 4.5. Penentuan kadar fenol total	29



DAFTAR LAMPIRAN

	Halaman
Lampiran 1. Lembar Determinasi.....	36
Lampiran 2. Perhitungan Rendemen	37
Lampiran 3. Perhitungan DPPH dan Larutan Uji.....	38
Lampiran 4. Penentuan Panjang Gelombang DPPH	43
Lampiran 5. Penentuan Waktu Inkubasi.....	45
Lampiran 6. Perhitungan Peredaman DPPH dan <i>IC50</i>	46
Lampiran 7. Pembuatan Standar dan Larutan Uji Penetapan Kadar Fenol Total	57
Lampiran 8. Penentuan Panjang Gelombang Penetapan kadar Fenol Total	60
Lampiran 9. Penentuan Waktu Inkubasi Penetapan kadar Fenol Total.....	62
Lampiran 10. Pengukuran Kadar Fenol Total.....	63
Lampiran 11. Hasil Analisis Varian (ANOVA) Aktivitas Antioksidan (<i>IC50</i>)....	66
Lampiran 12. Hasil Analisis Varian (ANOVA) Kadar Fenol Total.....	68
Lampiran 13. Hasil Korelasi	70

BAB I. PENDAHULUAN

1.1 Latar Belakang

Radikal bebas berperan penting pada terjadinya kerusakan sel dan penyakit degeneratif seperti penyakit jantung koroner, stroke, penuaan dini dan lain-lain (Kumalaningsih, 2006). Radikal bebas merupakan senyawa reaktif yang memiliki elektron terluar tidak berpasangan sehingga lebih suka menyerang senyawa kaya elektron (Badarinath *et al.* 2010). Senyawa dari kelompok fenol merupakan salah satu contoh senyawa kaya elektron, yang umumnya disebut antioksidan (Halliwell & Gutteridge, 2000).

Antioksidan secara alami diproduksi oleh system biologis manusia seperti enzim SOD (*superoksida dismutase*), *glutathione*, dan *katalase*. Senyawa tersebut dapat melindungi tubuh dari kerusakan jaringan oleh oksidasi *reactive oxygen species* (ROS), Ketersediaan antioksidan yang diproduksi oleh tubuh seringkali tidak mencukupi sehingga dibutuhkan asupan dari luar seperti dari bahan alam. Adapun antioksidan dari bahan alam seperti makanan dengan kandungan vitamin E, C, beta karoten maupun antioksidan fitokimia dari golongan fenol (Kumalaningsih, 2006).

Salah satu tumbuhan yang memiliki kandungan fenol yaitu Apu-apu (*Pistia stratiotes*) (Khare, 2005). Apu-apu sering dianggap gulma oleh petani. Namun tidak banyak masyarakat mengetahui bahwa apu-apu memiliki kandungan antioksidan (lebih tinggi atau setara dengan buah/sayur) sehingga dapat menghambat reaksi radikal bebas dalam tubuh. Kandungan kimia dalam apu-api yaitu alkaloid, flavonoid, glikosida, asam palmitat, *vicenin*, *vitexin*, *orientin*. Selain sebagai antioksidan, tanaman gulma ini juga berfungsi sebagai antiseptik, antituberkulosis, antipiretik (Khan, 2014). Menurut penelitian Abraham (2014), aktivitas antioksidan pada daun apu-apu dengan pelarut metanol tergolong sedang dengan persentase penghambatan 45%. Pengujian secara ilmiah mengenai khasiat herba apu-apu (*Pistia stratiotes*), yang diekstraksi dengan menggunakan etanol sebagai antioksidan sejauh ini belum ditemukan data yang dilaporkan.

Berdasarkan uraian diatas, perlu dilakukan penelitian lebih lanjut untuk membuktikan secara ilmiah adanya aktivitas antioksidan dari ekstrak etanol dan fraksi herba apu-apu (*Pistia stratiotes*). Penelitian diawali dengan uji aktivitas antioksidan dengan metode DPPH untuk mengetahui seberapa besar kemampuan ekstrak etanol dan fraksi herba apu-apu (*Pistia stratiotes*) untuk meredam radikal bebas (IC_{50}). Selanjutnya dilakukan penetapan kadar fenol untuk mengetahui kadar antioksidan dalam herba apu-apu.

1.2 Rumusan Masalah

Berdasarkan uraian tersebut maka permasalahan dalam penelitian ini adalah:

1. Bagaimana aktivitas antioksidan dari ekstrak etanol, fraksi n-heksana,etil asetat dan fraksi etanol-air herba apu-apu (*Pistia stratiotes*)?
2. Berapakah kadar fenol total pada ekstrak etanol, fraksi n-heksana, etil asetat dan fraksi etanol-air herba apu-apu (*Pistia stratiotes*)?
3. Apakah terdapat perbedaan yang signifikan pada nilai aktivitas antioksidan (IC_{50}) antara ekstrak etanol, fraksi n-heksana, etil asetat dan fraksi etanol-air herba apu-apu (*Pistia stratiotes*)?
4. Bagaimana korelasi antara kandungan fenol total dengan nilai aktivitas antioksidan (IC_{50})?

1.3 Tujuan

Tujuan yang ingin dicapai dalam penelitian ini adalah:

1. Mengetahui aktivitas antioksidan (IC_{50}) pada ekstrak etanol, fraksi n-heksana, fraksi etil asetat dan fraksi etanol-air herba apu-apu (*Pistia stratiotes*).
2. Mengetahui kadar fenol total pada ekstrak etanol, fraksi n-heksana, etil asetat serta fraksi etanol-air herba apu-apu (*Pistia stratiotes*).
3. Menentukan ada tidaknya perbedaan pada nilai aktivitas antioksidan (IC_{50}) antara ekstrak etanol, fraksi n-heksana, fraksi etil asetat dan fraksi etanol-air herba apu-apu (*Pistia stratiotes*).

4. Menentukan korelasi antara kandungan fenol total dengan nilai aktivitas antioksidan (IC_{50}).

1.4 Manfaat

Beberapa manfaat yang dapat diperoleh dari penelitian ini adalah:

1. Memberikan informasi kepada masyarakat tentang potensi antioksidan tumbuhan apu-apu (*Pistia stratiotes*).
2. Memberikan informasi tentang data ilmiah aktivitas antioksidan ekstrak etanol dan fraksi herba apu-apu (*Pistia stratiotes*) untuk pengembangan penelitian selanjutnya.
3. Mengasah kemampuan mahasiswa dalam melakukan penelitian terutama uji aktivitas antioksidan dan penetapan kadar fenol total.

BAB II. TINJAUAN PUSTAKA

2.1 Tinjauan Tentang Apu-Apu (*Pistia stratiotes*)

2.1.1 Klasifikasi

Klasifikasi tumbuhan apu-apu berdasarkan ITIS (2019) adalah sebagai berikut:

Kingdom	: Plantae
Sub Kingdom	: Viridiplantae
Divisi	: Tracheophyta
Sub Divisi	: Spermatophyta
Class	: Magnoliosida
Superorder	: Liliaceae
Ordo	: Arales
Family	: Araceae
Genus	: Pistia L.
Species	: <i>Pistia stratiotes</i>

2.1.2 Deskripsi

Tumbuhan Apu-apu (Gambar 2.1) merupakan tumbuhan air dimana daun bagian atas tumbuhan ini berwarna hijau kekuningan berdekatan dan tidak jarang saling tumpang tindih. Sedangkan, bagian bawah daun kebanyakan berwarna putih.



Gambar 2.1 Tumbuhan apu-apu (Dokumentasi Pribadi Maret 2019)

Permukaan daunnya memiliki rambut-rambut halus baik bagian bawah maupun atas. Bagian batang tumbuhan apu-apu berukuran pendek, kaku dan bulat. Biasanya batang daun tidak terlihat karena tertutup oleh daunnya. Tumbuhan ini memiliki sistem akar bebulu yang besar sehingga dapat mengapung dengan bebas. Akarnya berwarna coklat kehitaman yang tumbuh dari dasar batang yang memiliki banyak cabang halus dan panjang. Sistem akar tumbuhan apu-apu memiliki kemampuan akumulasi senyawa logam dan non organik, sehingga dapat bertahan dikondisi lingkungan yang kotor dan basah (Nuriasmita, 2012).

2.1.3 Kandungan Kimia dan Khasiat

Tumbuhan apu-apu sering dimanfaatkan sebagai penghias kolam, pakan hewan seperti babi, itik, bebek, ayam, ikan gurami, serta ikan mas. Herba apu-apu memiliki rasa pedas dan terasa sejuk. Secara farmakologis tanaman apu-apu memiliki aktivitas sebagai antiseptik, antituberkulosis, diare, dan demam. Sedangkan ekstrak daunnya dapat digunakan sebagai *eczema*, *ulcers*, *syphilis*, *gout*, dan antioksidan (Khan, 2014)

Menurut Penelitian Abraham (2014), ekstrak methanol, ekstrak kloroform, ekstrak heksana daun apu-apu memiliki aktivitas antioksidan dengan persen penghambatan secara berturut turut yaitu 45%, 34%, 10%. Kandungan kimia dalam tumbuhan apu-apu yakni glikosida, alkaloid, flavonoid dan fitosterol. Pada bagian batang dan daun terdiri dari 92,9% air, 1,4% protein, 0,3% lemak 2,6% karbohidrat, 0,9% serat kasar, 1,9% mineral. Bagian daun kaya akan vitamin C, vitamin E, stigmasterol, stigmasteril, stigmasterat dan asam palmitat. 2-di-CGL flavon dari *vicenin* dan jenis *lucenin*, *antosianin cyaniding-3-glucoside*, luteolin 7-glukosida dan *mono-C-glocosyl flavon-vitexin* dan *orientin* juga telah diisolasi dari tumbuhan (Khare, 2005).

2.2 Tinjauan Radikal Bebas

Radikal bebas merupakan senyawa yang memiliki elektron dibagian atom terluarnya yang tidak berpasangan. Senyawa ini sangat reaktif dan tidak stabil

sehingga cenderung bereaksi dengan zat lain (protein, lemak, DNA) untuk mencapai kestabilan. Dua sifat radikal bebas yaitu memiliki reaktivitas yang tinggi karena kecenderungan menarik elektron. Kedua dapat mengubah suatu molekul menjadi radikal yang baru. Menurut Young *et al.* (2000), penyebab timbulnya radikal bebas ada dua sumber antara lain sumber endogen dan eksogen. Sumber eksogen contohnya sinar X, asap polusi lingkungan, asap rokok, bahan kimia dalam makanan (pengawet, pewarna sintetik, residu pestisida), bahan kimia termasuk obat-obatan. Sedangkan sumber endogen seperti bocornya mitokondria, reaksi enzim, dan reaksi autooksidasi.

Berbagai penyakit degeneratif seperti kanker, jantung koroner, katarak, liver maupun penuaan dini dapat disebabkan oleh radikal bebas yang terus-menerus menginisiasi sel sehingga menyebabkan kerusakan sel. Radikal bebas dapat menyebabkan peroksidasi lemak, perubahan DNA, kerusakan protein sehingga dapat menyebabkan kerusakan jaringan (Young & Woodside, 2001). Adapun tahapan terbentuknya radikal bebas menurut Gordon (1990) adalah sebagai berikut:

- a. Tahap Inisiasi : tahapan awal dalam pembentukan R^* yang dihasilkan karena adanya penarikan atom H oleh suatu ROS hidroksil ($\bullet OH$) sehingga terbentuk suatu radikal.
- b. Tahap Propagasi : tahap dimana radikal (R^*) akan bereaksi dengan oksigen membentuk radikal peroksi (ROO^*) . Selanjutnya, radikal peroksi akan menyerang RH (misalnya pada asma lemak) menghasilkan hiperoksida dan radikal bebas baru.
- c. Tahap terminasi : senyawa radikal akan bereaksi dengan radikal lainnya dan akan terbentuk senyawa non radikal dan radikal yang bereaksi.

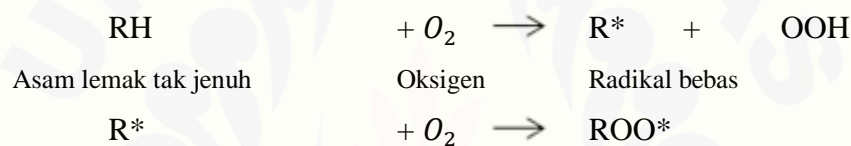
2.3 Tinjauan Antioksidan

Antioksidan merupakan senyawa donor elektron yang dapat mencegah oksidasi sel. Dengan kata lain dapat meredam aktivitas dari radikal bebas. Antioksidan berdasarkan sumbernya dibagi menjadi 2 kelompok yaitu antioksidan sintetik dan antioksidan alami (Young & Woodside, 2001).

Mekanisme antioksidan dalam menghambat reaksi berantai radikal bebas dari lemak yang teroksidasi yaitu:

- 1). Pelepasan hydrogen dari antioksidan
- 2). Pelepasan elektron dari antioksidan
- 3). Adisi lemak kedalam cincin aromatik antioksidan
- 4). Pembentukan senyawa kompleks antara lemak dan cincin aromatic dari antioksidan.

Pada prinsipnya ikatan rangkap lemak tidak jenuh akan teroksidasi oleh oksigen bebas diudara membentuk radikal bebas dan peroksida aktif. Namun, apabila asam lemak berikatan dengan antioksidan maka tidak terbentuk radikal bebas dan peroksida aktif (Winarti, 2010).



Gambar 2.2 Prinsip fotooksidasi lemak (Sumber: Gordon, 2001)

2.3.1 Antioksidan Alami

Antioksidan alami merupakan antioksidan yang didapat dari bahan alam misalnya isoflavon, antosianin, vitamin C, dan lain-lain. Senyawa antioksidan alami pada tumbuhan seperti senyawa fonolik, polifenol, flavonoid, tokoferol, turunan asam sinamat, dan asam organic lainnya. Golongan flavonoid yang memiliki fungsi sebagai antioksidan seperti flavonol, flavon, isoflavon, kalkon. Sedangkan, turunan asam sinamat seperti asam kafeat, asam ferulat dan asam klorogenat (Shahidi & Naczki, 1995).

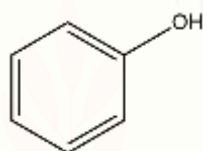
Dalam tubuh manusia secara alami menghasilkan antioksidan alami, namun dalam jumlah sedikit. umumnya antioksidan dihasilkan oleh tubuh merupakan enzimatik, seperti enzim katalase, superoksida dismutase, dan glutathion peroksidase (GSH Px) (Young & Woodside, 2001).

2.3.2 Antioksidan Sintetik

Penggunaan antioksidan sintetik dalam industri pangan yaitu senyawa fenol seperti *butylated hydroxyanisol* (BHA), hidroksi-toluena terbutilasi (BHT), *tersier butylhydroquinone* (TBHQ) dan ester (Gordon *et al.*, 2001). Antioksidan sintesis banyak dilakukan penelitian dan diduga menyebabkan *karsinogenik*.

2.4 Senyawa Fenolik

Fenol (C_6H_6OH) merupakan senyawa yang memiliki gugus hidroksil pada cincin benzena. Senyawa fenol memiliki nama lain seperti asam karbolik, fenat monohidroksilbenzena, asam fenat, asam fenilat, fenilat alkohol, oksibenzena, benzenol, fenil hidrat, fenil hidroksida, monofenol, oksibenzena (Nair *et al.* 2008). Adapun rumus struktur fenol pada Gambar 2.3 adalah sebagai berikut:



Gambar 2.3 Struktur dasar fenol (Vemeris, W. A & Nicholson, R. 2006)

Fenol memiliki banyak klasifikasinya, karena banyak gugus yang menempel atau tersubstitusi pada gugus fenol. Setiap klasifikasi fenol memiliki berat molekul yang berbeda-beda mulai kecil hingga besar lebih dari 3000 Da (Marinova *et al.*, 2005). Senyawa fenol dapat diklasifikasikan berdasarkan jumlah atom karbonnya.

Kandungan kimia tumbuhan kebanyakan memiliki struktur aromatik dengan satu atau lebih gugus hidroksil. Senyawa fenol memiliki kemampuan menangkal radikal bebas atau sebagai antioksidan, anti tumor, antiviral dan antibiotik. Semua senyawa fenol memiliki serapan kuat terhadap spektrum UV karena memiliki cincin aromatik (Harborne, 1987; Apak *et al.*, 2007). Table 2.1 merupakan klasifikasi fenol berdasarkan jumlah rantai karbonnya menurut Vemeris, W. A & Nicholson, R (2006).

Senyawa fenol dibagi menjadi 2 jenis berdasarkan yaitu fenol sederhana (orsinol, katekol, hidrokuinon) dan polifenol (lignin, tannin, melanin). Telah diketahui sejak lama bahwa senyawa fenol memiliki aktivitas sebagai antioksidan.

Senyawa fenol mampu menghambat radikal bebas (mampu mendonorkan elektronnya).

Mekanisme kerja fenol yaitu dengan menghambat pembentukan radikal bebas dari lemak dan mencegah dekomposisi dari hiperperoksida menjadi radikal bebas (Rahmawati, 2009; Gordon, 2001).

Tabel 2.1 Klasifikasi fenol berdasarkan jumlah rantai karbonnya.

Jumlah Rantai Karbon	Klasifikasi
C_6	Simple fenol
C_6-C_1	Asam fenolat
C_6-C_2	Asetopenon, asam fenilasetat
C_6-C_3	Asam sinamat, sinamaldehyd, sinamal alcohol
C_6-C_3	Kumarin, isokumarin, kromon
C_{15}	Kalkon, auron, dihidrokalkon
C_{15}	Flavan
C_{15}	Flavon
C_{15}	Flavonon
C_{15}	Flavonol
C_{15}	Antosianidin
C_{15}	Antosianin
C_{30}	Biflavonyls
$C_6-C_1-C_6-C_6-C_2-C_6$	Benzopenon, xanton, stilbene
C_6, C_{10}, C_{14}	Quinon
C_{18}	Betasianin
Lignan, neolignan	Dimer atau oligomer
Lignin	Polymer
Tannin	Oligomer atau polymer
Phobaphenes	Polymer

2.5 Metode Penetapan Kadar Fenol Total

Metode penetapan kadar fenol total selain metode Folin-Ciocalteu adalah metode Folin-Denis, titrasi permanganat, kolorimetri, absorbansi ultraviolet. Metode uji yang sering digunakan untuk menentukan kadar fenol yaitu metode Folin-Ciocalteu karena metode ini merupakan metode yang sederhana dan cepat. Hasil uji penetapannya dinyatakan dalam massa ekuivalen asam galat tiap mg sampel (Fu *et al.*, 2011).

Prinsip metode ini adalah oksidasi senyawa fenol dalam suasana basa oleh pereaksi Folin-Ciocalteu yang akan menghasilkan kompleks warna biru dengan serapan kuat pada panjang gelombang 760 nm. Peningkatan intensitas warna biru akan sebanding dengan jumlah fenol dalam sampel (Blainski *et al.*, 2013). Salah

satu senyawa fenol merupakan asam galat. Asam galat dapat digunakan sebagai standar karena mempunyai reaktivitas yang tinggi terhadap reagen Folin-Ciocalteu (Prior *et al.*, 2005). Selain itu asam galat bersifat stabil, memiliki sensitivitas tinggi dan harganya cukup terjangkau.

2.6 Metode Pengujian Antioksidan

Terdapat beberapa metode untuk menguji aktivitas antioksidan suatu senyawa. Beberapa metode pengujian antioksidan diantaranya :

2.6.1 Metode DPPH

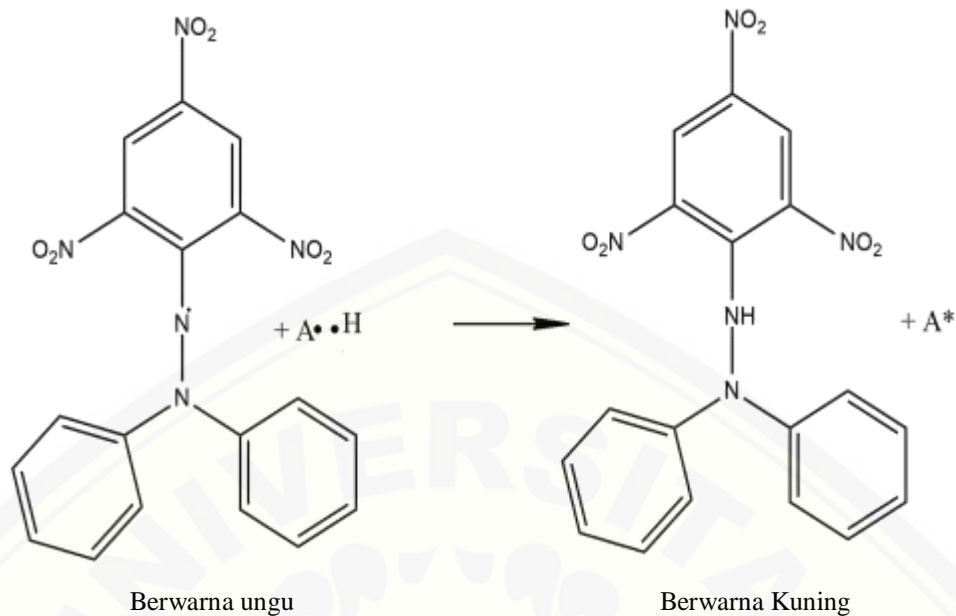
Salah satu metode paling umum yang digunakan untuk pengujian aktivitas antioksidan yaitu dengan radikal bebas DPPH (1,1-difenil-2-pikrihidrazil). Pengukuran antioksidan dengan metode ini merupakan metode yang sederhana, cepat dan tidak memerlukan banyak reagen. Selain itu, metode ini mudah diamati dengan adanya perubahan warna dari ungu menjadi kuning. Reagen DPPH merupakan radikal yang stabil dan memberikan serapan kuat pada panjang gelombang 517 nm. Antioksidan akan menyebabkan elektron radikal bebas berpasangan kemudian menyebabkan hilangnya warna ungu yang akan sebanding dengan jumlah elektron yang diambil (Sunarni, 2005).

Radikal DPPH akan bereaksi dengan antioksidan sehingga berubah warna menjadi kuning karena tereruksinya DPPH. Perubahan warna tersebut akan diukur dengan spektrofotometer dan diplotkan terhadap konsentrasi sampel. Intensitas warna kuning dipengaruhi oleh ikatan rangkap terkonjugasi pada DPPH. Hal ini terjadi karena adanya penangkapan elektron oleh antioksidan. Reaksi DPPH dengan antioksidan seperti pada Gambar 2.3. Adapun tingkat kekuatan antioksidan dengan metode DPPH dapat dilihat pada Tabel 2.2.

Tabel 2.2 Tingkat kekuatan antioksidan dengan metode DPPH

Intensitas	Nilai IC_{50}
Sangat Aktif	<50 $\mu\text{g/mL}$
Aktif	50-100 $\mu\text{g/mL}$
Sedang	101-150 $\mu\text{g/mL}$
Lemah	151-200 $\mu\text{g/mL}$

(Zuhra *et al.*, 2008)



Gambar 2.4 Reaksi antioksidan dan DPPH (Molyneux, 2004)

2.6.2 Metode Tiosianat

Metode tiosianat merupakan menentukan aktivitas radikal bebas menggunakan senyawa pembanding. Sebanyak 2 mL sampel dicampur dengan 2,05 mL asam linoleat dan buffer fosfat pH 7,0 diinkubasi ditempat gelap pada suhu ruang. Jumlah peroksida yang terbentuk ditentukan dari serapan warna merah pada panjang gelombang 500 nm dengan penambahan FeCl_2 dan ammonium tiosianat. Pengukuran dilakukan setiap 24 jam hingga dicapai absorbansi maksimum (Saripah et al., 2009; Sharma, 2014).

Prinsip metode tiosianat adalah lipid peroksidasi. Dengan menggunakan asam linoleat yang merupakan asam lemak tidak jenuh sebagai radikal bebas (Hanani *et al.*, 2006). Metode ini mengukur jumlah radikal bebas berdasarkan peroksidasi lipid, yaitu pembentukan radikal alkoksi. Namun, metode ini memerlukan proses pengukuran serapan yang lama (Saripah *et al.*, 2009; Sharma, 2014).

2.6.3 Metode Uji Kapasitas Serapan Radikal Oksigen

Metode ORAC menggunakan senyawa peroksil yang dihasilkan dari larutan 2,2 azobis-2-aminopropana dihidroklorid (AAPH) yang akan bereaksi

dengan radikal peroksil (Teow *et al.*, 2007). Kelemahan dari metode ini yaitu alat yang digunakan mahal dan hanya sensitif terhadap radikal peroksil (Awika *et al.*, 2003). Sedangkan, kelebihanannya yaitu memberikan pengukuran lebih baik terhadap total antioksidan (Prior *et al.*, 2003 dalam Teow *et al.*, 2007).

2.6.4 Metode Ferric Antioksidant Reducing Power (Frap)

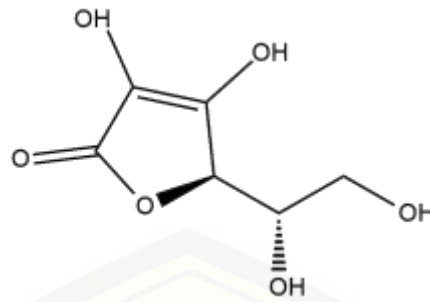
Prinsip metode FRAP yaitu peningkatan serapan ketika antioksidan dapat mereduksi Fe^{3+} menjadi Fe^{2+} dari senyawa radikal 2,4,6-tri(2-piridil)-s-triazine (TPTZ). Larutan akan berwarna biru Fe^{2+} bereaksi dengan TPTZ pada pH 3,6, diukur dengan panjang gelombang maksimum 593 nm (Chanda & Dave, 2009).

2.6.5 Metode ABTS

Metode peredaman radikal kation $ABTS^+$ (garam 2,2-azinobis(3-etilbenzotiazolin-6-sulfonik acid)diamonium) merupakan metode uji untuk mengukur kapasitas antioksidan yang secara langsung bereaksi atau meredam radikal kation ABTS yang dihasilkan dari reaksi kimia. $ABTS^+$ merupakan radikal dengan pusat nitrogen dengan karakteristik warna biru kehijauan, yang ketika tereduksi oleh antioksidan menjadi bentuk nonradikal yang tidak berwarna. Metode ini menguatifikasikan kapasitas peredaman dengan mengukur absorbansi campuran reaksi antioksidan dengan radikal pada panjang gelombang 734 nm pada waktu yang telah ditentukan dengan spektrofotometer (Yu, 2008).

2.7 Tinjauan Umum Vitamin C

Vitamin C merupakan salah satu contoh antioksidan alami yang terdapat pada seluruh jaringan hidup dan dapat mempengaruhi reaksi redoks pada jaringan. Vitamin C seringkali digunakan sebagai kontrol positif pada berbagai penelitian (Dalimartha & Soedibyo, 1998). Kebutuhan manusia akan vitamin C rata-rata sebesar 45-75 mg. namun, dalam keadaan stress kebutuhan vitamin C akan meningkat. Sumber vitamin C dapat diperoleh dari buah maupun sayuran. Berikut merupakan struktur vitamin C pada Gambar 2.4.



Gambar 2.5 Struktur vitamin C (Packer *et al.*, 2002)

Vitamin C atau dengan nama lain asam askorbat memiliki sifat hidrofilik (mudah larut air). Asam askorbat akan menangkap O_2^* (anion superoksida) dan 1O_2 (Singlet oksigen) sehingga dapat memutus rantai radikal bebas melalui lipid peroksidase. Pada konsentrasi rendah vitamin C akan bereaksi dengan radikal peroksil (ROO^*) berubah menjadi askorbil yang lebih stabil. Sedangkan pada konsentrasi tinggi, asam askorbat memiliki peranan penting dalam perlindungan DNA pada sperma (Fraga *et al.*, 1991).

Asam askorbat juga memiliki sifat prooksidan yaitu dengan meningkatkan penyerapan zat besi diusus. Sehingga, seringkali asam askorbat atau vitamin C digunakan sebagai proses penanganan dan pencegahan infeksi, keracunan rokok, alkohol dan lain-lain. Vitamin C merupakan salah satu antioksidan sekunder dan memiliki cara kerja yang sama dengan vitamin E, yaitu menangkap radikal bebas dan mencegah terjadinya reaksi berantai (Packer *et al.*, 2002).

2.8 Ekstraksi

Ekstraksi merupakan perpindahan zat aktif di dalam sel ditarik oleh pelarut sehingga zat aktif akan larut dalam pelarut. Pada umumnya ekstraksi akan menghasilkan rendemen yang lebih banyak ketika permukaan simplisia kontak dengan pelarut semakin luas (Harborne, 1987). Ekstrak dapat didefinisikan sediaan pekat yang diperoleh dengan mengekstraksi zat aktif dari simplia nabati atau hewani dengan pelarut yang sesuai, selanjutnya diuapkan hingga kental (Direktorat Jenderal Pengawasan Obat dan Makanan RI, 1995). Adapun kriteria pemilihan pelarut sebagai berikut:

(1) Murah dan mudah diperoleh,

- (2) stabil secara fisika dan kimia,
- (3) bereaksi netral,
- (4) tidak mudah menguap dan tidak mudah terbakar,
- (5) selektif,
- (6) tidak mempengaruhi zat berkhasiat, dan
- (7) diperbolehkan oleh peraturan yang berlaku

Dalam pemilihan metode ekstraksi tergantung dengan wujud dan kandungan zat dari bahan yang diekstrak. Cara ekstraksi dapat dibedakan menjadi : infundasi, maserasi, perkolasi, dan penyarian berkesinambungan (Direktorat Jenderal Pengawasan Obat dan Makanan RI, 1986). Maserasi merupakan cara ekstraksi sederhana. Metode ini dilakukan dengan cara merendam serbuk simplisia dengan pelarut sehingga pelarut akan menembus dinding sel akibatnya larutan dalam sel akan terdesak untuk keluar. Proses tersebut terjadi berulang hingga konsentrasi didalam dan diluar sel seimbang.

Dapat dilakukan modifikasi pada metode maserasi, misalnya teknik remaserasi. Pada metode ini, cairan dibagi menjadi dua kemudian seluruh serbuk simplisia dimaserasi dengan cairan penyari pertama, sesudah dienuptungkan dan diperas, ampas dimaserasi lagi dengan cairan penyari kedua (Direktorat Jenderal Pengawasan Obat dan Makanan RI, 1986).

2.9 Fraksinasi

Metode fraksinasi merupakan proses pemisahan senyawa yang dilakukan berdasarkan kepolarannya dan ukuran partikelnya. Fraksinasi biasanya dilakukan dengan metode partisi dan kromatografi kolom. Pemisahan dengan metode kromatografi kolom dilakukan dalam kolom yang diisi dengan fase diam berpori seperti silica gel. Sedangkan, fase gerak diisi dengan cairan yang digunakan untuk mengelusi sampel melalui kolom sehingga sampel akan terpisah sesuai dengan ukuran partikelnya. Partikel yang besar akan tersangkut di kolom.

Pemisahan dengan metode partisi cair-cair dilakukan berdasarkan tingkat kepolarannya dari polar, semi polar, nonpolar. Senyawa akan terpisah berdasarkan prinsip *like dissolve like*. Pada umumnya metode ini dilakukan dengan melarutkan

ekstrak etanol atau metanol dalam air hingga larut. Selanjutnya dipartisi secara bertingkat mulai pelarut non polar seperti n-heksana, kloroform, kemudian semi polar seperti etil asetat dan n-butanol. Semua pelarut organik akan berada di atas kecuali pelarut kloroform. Alat yang digunakan pada metode ini yaitu corong pisah (Saifudin, 2014).



BAB III. METODE PENELITIAN

3.1 Jenis Penelitian

Penelitian ini termasuk jenis penelitian *true experimental laboratories*

3.2 Tempat dan Waktu Penelitian

Penelitian dilakukan di Laboratorium Fitokimia Biologi dan Laboratorium Alat Instrumen Kimia Fakultas Farmasi Universitas Jember yang berlangsung mulai bulan April hingga Juni 2019

3.3 Rancangan Penelitian

Penelitian ini mencakup uji aktivitas antioksidan dan penetapan kadar fenol total pada ekstrak etanol dan fraksi n-heksana, etil asetat serta residu herba apu-apu (*Pistia stratiotes*). Tahap awal dalam penelitian ini yakni pengumpulan sampel yakni herba Apu-apu. Tahap berikutnya dilakukan ekstraksi dengan metode maserasi hingga memperoleh ekstrak kental kemudian difraksi dengan pelarut n-heksana dan etil asetat. Ekstrak kental, fraksi n-heksana, etil asetat serta fraksi air-etanol diuji aktivitas antioksidan dan penetapan kadar fenol total. Data hasil pengujian antioksidan dan fenol total dibandingkan dan dianalisis lalu diambil kesimpulan.

3.4 Alat dan Bahan

3.4.1 Alat

Alat yang digunakan dalam penelitian ini yaitu timbangan analitik (Santorius), gelas ekstrak, kertas saring, blender, *vacuum rotary evaporator* (Heidolph), spektrofotometer UV-Vis (Hitachi U-1800), corong *Buchner*, oven, mikropipet 10-1000 μ L (Socorex), kuvet disposable, *stopwatch* dan alat-alat gelas yang lazim digunakan di laboratorium analisis (Pyrex Germany dan Iwaki).

3.4.2 Bahan

Bahan-bahan yang digunakan dalam penelitian ini adalah herba apu-apu (*Pistia stratiotes*), akuades; bahan kualitas p.a. E. Merck yaitu: etanol, metanol, n-heksana, etil asetat, reagen Folin-Ciocalteu; bahan kualitas p.a. Sigma-Aldrich yaitu: DPPH (1,1difenil-pikrilhidrazil), dan asam galat; vitamin C (PT. Brataco), natrium karbonat

3.5 Variabel Penelitian

3.5.1 Variabel bebas

Variabel bebas dari penelitian ini adalah konsentrasi ekstrak etanol dan fraksi etil asetat, n-heksana, serta fraksi etanol-air herba apu-apu (*Pistia stratiotes*).

3.5.2 Variabel terikat

Variabel terikat dari penelitian ini adalah aktivitas antioksidan (IC_{50}) dan kadar fenol total dari ekstrak etanol dan fraksi etil asetat, n-heksana, serta fraksi etanol-air herba apu-apu (*Pistia stratiotes*).

3.5.3 Variabel terkontrol

Variabel terkontrol dari penelitian ini adalah cara ekstraksi bahan, cara penetapan kadar fenol, dan cara pengujian antioksidan.

3.6 Definisi Operasional

Definisi operasional dari penelitian ini yaitu :

1. Herba apu-apu yaitu seluruh bagian tumbuhan apu-apu dari daun hingga akar yang diambil secara acak di Kecamatan Ambulu pada bulan April 2019.
2. Pengamatan besarnya aktivitas antioksidan dilihat dari besarnya persen penghambatan menggunakan Spektrofotometer UV-Vis kemudian dihitung besarnya IC_{50} .
3. Pengamatan besarnya kadar fenol menggunakan Spektrofotometri UV-Vis dalam milligram asam galat ekuivalen per gram ekstrak (mgGAE/g).

3.7 Prosedur Penelitian

3.7.1 Determinasi

Semua bagian tumbuhan apu-apu (*Pistia stratiotes*) dideterminasi di Laboratorium Tumbuhan Politeknik Negeri Jember untuk memastikan bahwa tumbuhan yang diuji benar benar merupakan spesies *Pistia stratiotes*.

3.7.2 Pembuatan Simplisia dan Serbuk Herba Apu-apu (*Pistia stratiotes*)

Herba Apu-apu (*Pistia stratiotes*) dikumpulkan dan disortasi basah. Selanjutnya herba apu-apu (*Pistia stratiotes*) dicuci hingga bersih kemudian diangin-anginkan di dalam ruangan tanpa terkena cahaya matahari langsung. Herba apu-apu (*Pistia stratiotes*) dikatakan kering ditandai dengan mudah diremas. Dilanjutkan dengan sortasi kering untuk menghilangkan kotoran dan komponen selain herba apu-apu. Simplisia diblender dan diayak dengan ayakan 2mm. Serbuk simplisia disimpan untuk penelitian selanjutnya.

3.7.3 Pembuatan Ekstrak Etanol Herba Apu-Apu

Ekstrak etanol herba apu-apu (*Pistia stratiotes*) diperoleh dengan metode remaserasi dengan menimbang simplisia sebanyak 195 gram direndam dalam pelarut etanol 96% dengan perbandingan antara simplisia dan pelarut 1:10. Perendaman simplisia dilakukan selama 3 hari dan diaduk beberapa waktu pada suhu ruang. Maserat difiltrasi dengan corong *buchner*. Residu ditambahkan dengan pelarut dan perbandingan yang sama. Semua maserat dikumpulkan selanjutnya diuapkan dengan *rotary evaporator* pada suhu 40-50°C dengan kecepatan 50-60 rpm hingga diperoleh ekstrak setengah kental. Ekstrak dimasukan kedalam oven suhu 40-50°C hingga didapatkan ekstrak kental, kemudian dihitung persen rendemen yang diperoleh. Ekstrak kental disimpan dalam lemari pendingin untuk pengujian selanjutnya.

3.7.4 Fraksinasi

Ekstrak etanol herba apu-apu sebanyak 3 gram dilarutkan dengan 5 mL etanol kemudian ditambahkan aquadest 45 mL. Campuran dipartisi dengan 50

ml pelarut n-heksana dalam corong pisah, dikocok dan dibiarkan terpisah. Kemudian dikumpulkan fraksi n-heksana, selanjutnya dilakukan penambahan n-heksana sesuai dengan pengumpulan fraksi n-heksana. Dilakukan secara berulang hingga pelarut n-heksana tidak berwarna. Sisa fraksi pertama dipartisi dengan pelarut etil asetat dengan perbandingan pelarut (1:1) dan perlakuan yang sama dengan fraksi n-heksana. Kemudian Fraksi Etil asetat dan Fraksi etanol-air dipisahkan. Masing-masing fraksi n-heksana, etil asetat dan fraksi etanol-air diuapkan hingga pekat. Hasil fraksi kental kemudian dihitung persen rendemennya.

3.7.5 Pengujian Aktivitas Antioksidan dengan DPPH

Pengujian aktivitas antioksidan ekstrak etanol herba apu-apu (*Pistia stratiotes*) sebagai berikut:

a. Pembuatan Larutan DPPH (0,1 mM)

Larutan DPPH 0,1 mM dibuat dengan menimbang sebanyak 1,975 mg DPPH dilarutkan dalam 50 ml metanol. Larutan disimpan dalam botol gelap dan untuk setiap pengujian dibuat ulang.

b. Penentuan Panjang Gelombang Serapan Maksimum DPPH

Larutan DPPH 0,1 mM sebanyak 1,200 mL dan 0,300 mL metanol sebagai blanko masing-masing dimasukkan ke dalam kuvet. Kemudian, larutan tersebut diukur pada panjang gelombang 400-800 nm dengan spektrofotometer UV-Vis.

c. Pembuatan Larutan Sampel

Masing-masing ekstrak dan fraksi ditimbang sejumlah 20mg dan 5 mg kemudian dilarutkan dalam labu ukur 10 mL metanol. Kemudian, larutan diencerkan dengan memipet sejumlah tertentu larutan dan dimasukkan ke dalam labu ukur ditambahkan metanol, sehingga diperoleh konsentrasi larutan uji akhir yakni 10-60 µg/mL.

d. Pembuatan Larutan Vitamin C

Vitamin C ditimbang 25 mg dimasukkan ke dalam labu ukur 25 mL dan dilarutkan dengan metanol sampai batas volume sehingga konsentrasi vitamin C sebesar 1000 µg/mL. Larutan dipipet dan dimasukkan labu ukur 10 mL,

ditambahkan dengan metanol sampai tanda batas hingga diperoleh konsentrasi vitamin C 5-30 µg/mL.

e. Penentuan Waktu Inkubasi Sampel dan Pemanding

Penentuan waktu inkubasi dilakukan dengan memipet 300 µL larutan sampel dan vitamin C ditambahkan dengan 1200 µL larutan DPPH 0,1 mM. Larutan diamati pada panjang gelombang maksimum mulai menit ke-0 sampai menit ke-60 selang 5 menit.

e. Penetapan Aktivitas Antioksidan Larutan Uji dan Vitamin C

Masing-masing sampel dipipet sebanyak 300 µL ditambahkan 1200 µL larutan DPPH di dalam tabung reaksi, kemudian diinkubasi pada suhu ruang selama 30 menit di dalam ruangan gelap. Sebagai kontrol positif, digunakan vitamin C yang juga diinkubasi dengan larutan DPPH dengan volume yang sama. Selanjutnya kadar serapan larutan setelah inkubasi ditentukan dengan spektrofotometri UV-Vis pada panjang gelombang maksimum.

f. Perhitungan

Perhitungan untuk menentukan persen peredaman larutan uji dan vitamin C digunakan rumus pada Persamaan 3.1

$$\% \text{ Inhibisi DPPH} = \frac{\text{abs DPPH} - \text{abs larutan uji}}{\text{abs DPPH}} \times 100\% \dots\dots\dots 3.1$$

Konsentrasi sampel dan persen inhibisinya diplot masing-masing pada sumbu x dan y pada persamaan regresi linear. Persamaan tersebut digunakan untuk menentukan nilai IC₅₀ dari masing-masing sampel dinyatakan dengan nilai y sebesar 50 dan nilai x yang diperoleh sebagai IC₅₀.

3.7.6 Penetapan Kadar Fenol Total

Penetapan kadar fenol total ekstrak etanol herba apu-apu (*Pistia stratiotes*) dilakukan sebagai berikut:

a. Pembuatan Larutan Na₂CO₃ 7,5% b/v

Larutan Na₂CO₃ 7,5% b/v dibuat dengan melarutkan 3,75 gram Na₂CO₃ ke dalam 50 mL akuadest.

b. Penetapan Panjang Gelombang Maksimum Asam Galat

Sebelum penetapan kadar fenol total, terlebih dahulu dilakukan penentuan panjang gelombang maksimum asam galat dengan reagen folin-ciocalteu. Sebanyak 0,15 ml larutan standar asam galat ditambah dengan 0,75 ml reagen Folin-Ciocalteu (1:10) dan didiamkan selama 10 menit. Kemudian, ditambahkan 0,6 ml larutan Na_2CO_3 7,5%. Campuran dikocok sampai homogen dan diinkubasi pada suhu ruang selama 30 menit pada tempat gelap. Serapan diukur dengan spektrofotometer UV-Vis yang telah diatur panjang gelombangnya dari 600–800 nm.

c. Pembuatan Baku Standar

Sebanyak 25 mg standar asam galat ditimbang dan dimasukkan ke dalam labu ukur 25 ml lalu dilarutkan metanol sampai tanda hingga diperoleh konsentrasi larutan induk standar asam galat yaitu 1000 $\mu\text{g/ml}$. Selanjutnya, pengenceran larutan induk asam galat dilakukan dengan memipet sejumlah tertentu larutan induk, kemudian dimasukkan ke dalam labu ukur dan ditambahkan metanol sampai tanda batas, sehingga diperoleh konsentrasi pada rentang 20 - 120 $\mu\text{g/ml}$.

d. Pembuatan Larutan Uji

Masing-masing ekstrak etanol dan fraksi herba apu-apu (*Pistia stratiotes*) ditimbang sebanyak 20 mg. Selanjutnya, dimasukkan ke dalam labu ukur 10 ml dan dilarutkan metanol sampai tanda batas. Kemudian, larutan ekstrak diencerkan hingga konsentrasi larutan uji ekstrak menjadi 80 $\mu\text{g/ml}$

e. Penentuan Waktu Inkubasi Sampel dan Asam Galat

Larutan uji dan larutan standar asam galat masing-masing diambil sebanyak 150 μL kemudian ditambah dengan 750 μL reagen Folin ciocalteu (1:10) dan didiamkan selama 6 menit. Selanjutnya ditambah 600 μL larutan Na_2CO_3 7,5%. Campuran dikocok sampai homogen dan diamati absorbansinya pada panjang gelombang maksimumnya mulai menit ke 0 sampai menit ke 70 dengan selang waktu 5 menit.

f. Pengukuran Serapan Sampel

Penetapan kadar fenol total dilakukan dengan cara 0,15 ml dari masing-masing larutan uji dan larutan standar ditambah dengan 0,75 ml reagen Folin-ciocalteu (1:10) dan didiamkan selama 10 menit. Setelah 10 menit, ditambahkan 1 ml Na_2CO_3 7,5%. Campuran dikocok sampai homogen dan diinkubasi pada suhu ruang selama 60 menit. Kemudian, pengukuran absorbansi dilakukan pada panjang gelombang maksimum.

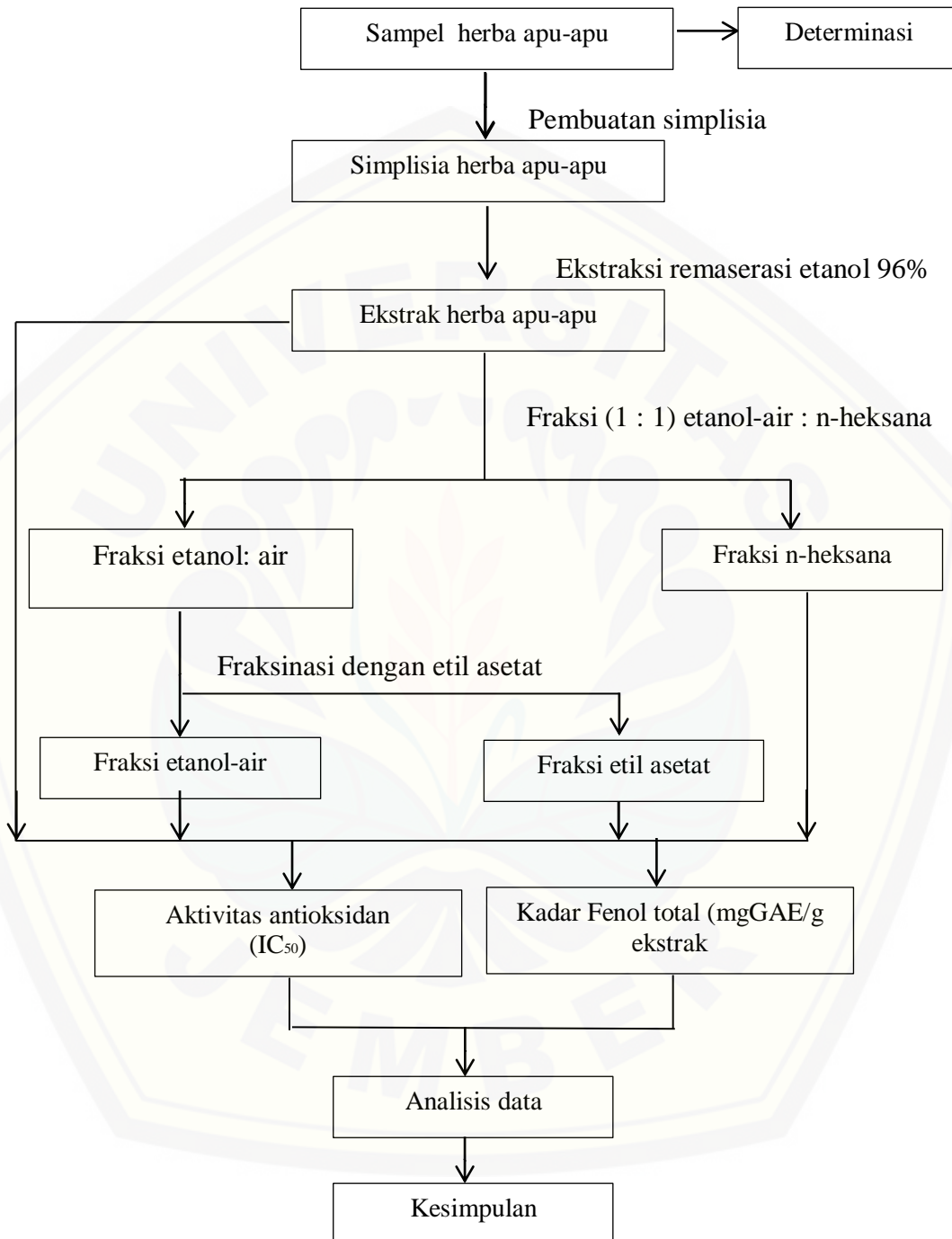
g. Perhitungan

Nilai absorbansi yang diperoleh dari masing-masing konsentrasi larutan ekstrak dimasukkan ke dalam persamaan regresi larutan standar asam galat sehingga diperoleh kadar fenol total yang ditunjukkan dengan miligram asam galat ekuivalen per gram ekstrak (mgGAE/g ekstrak).

3.8 Analisis Data

Data hasil uji aktivitas antioksidan dan kadar fenol total masing-masing fraksi dan ekstrak etanol herba apu-apu dapat dianalisis secara statistik dengan *one way ANOVA* karena jumlah kelompok data lebih dari 2 dan tidak berpasangan. Adapun tahapan pertama yang dilakukan yaitu uji normalitas dan homogenitas. Jika data terdistribusi normal dan homogeny, maka bisa dilanjutkan dengan *one way ANOVA*. Jika data tidak terdistribusi normal atau tidak homogen, maka dilakukan transformasi data terlebih dahulu. Setelah data telah normal dan homogen, dapat dilanjutkan uji *one way ANOVA*. Jika data yang diperoleh dari telah signifikan, maka dilanjutkan analisis statistik dengan *post hoc* dengan LSD. Perbedaan dianggap signifikan apabila p-value $\leq 0,05$ dengan taraf kepercayaan 95%. Uji korelasi antara IC50 dianalisis dengan metode *Pearson*.

3.9 Alur Penelitian



Gambar 3.1 Alur Penelitian

BAB V. PENUTUP

5.1 Kesimpulan

Dari hasil penelitian dapat disimpulkan:

1. Aktivitas antioksidan dari yang tinggi ke rendah secara berurutan adalah fraksi etanol-air, fraksi etil asetat, ekstrak etanol herba apu-apu, fraksi n-heksana. berturut-turut yaitu 9,090 $\mu\text{g/mL}$, 11,875 $\mu\text{g/mL}$, 16,675 $\mu\text{g/mL}$, 29,915 $\mu\text{g/mL}$.
2. Kadar fenol total dari tertinggi ke terendah secara berurutan adalah fraksi etanol-air, fraksi etil asetat, ekstrak etanol herba apu-apu, fraksi n-heksana berturut-turut yaitu 350,127 mgGAE/g ekstrak; 276,883 mgGAE/g ekstrak; 231,882 mgGAE/g ekstrak; 197,544 mgGAE/g ekstrak.
3. Terdapat perbedaan bermakna pada nilai IC_{50} semua kelompok ekstrak dan fraksi, dengan nilai signifikansi $<0,05$.
4. Korelasi antara kadar fenol total dengan aktivitas antioksidan (IC_{50}) yaitu berbanding lurus, artinya semakin tinggi kadar fenol total maka semakin kecil nilai IC_{50} .

5.2 Saran

Saran untuk penelitian ini adalah:

1. Perlu dilakukan skrining fitokimia untuk mengetahui golongan senyawa pada masing-masing fraksi
2. Perlu dilakukan isolasi fraksi etanol-air dan fraksi etil asetat dari ekstrak etanol herba apu-apu dengan metode pemisahan yang sesuai untuk mengetahui senyawa murni yang berperan sebagai antioksidan

DAFTAR PUSTAKA

- Abraham, Jayanti., Pritha, C., Khare, K. 2014. Cytotoxicity and Antimicrobial Effects of Pistia stratorites Leaves. *Research Article*. ISSN: 0975-9344.
- Amarowicz, R., Naczek, M. & Shahidi, F. 2000. Antioxidant Activity of Crude Tannins of Canola and Rapeseed Hulls. *JAOCs*. 77: 957-961.
- Apak, R, Guclu, K., Demirata, B., Ozyurek, m., Celik, S. E., Bektasoglu, B & Ozyurt, D. 2007. Comparative evaluation of various total antioxidant capacity assays applied to phenolic compound from star fruit (averrhoa carambola) mistletoe (Dedrophthoe petandra (L.) Miq.) ethanol extract. *Journal of Applied Sciences*. 6(8): 1659-1663.
- Awika, J. M., Rooney, L. W., Wu, X., Prior, R. L., Cisneros-Zevallos, L. 2003. Screening methods to measure antioxidant activity of sorghum (*Sorghum bicolor*) and sorghum products. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 51: 6657–6662.
- Badarinath A, Rao K, Chetty CS, Ramkanth S, Rajan T, & Gnanaprakash K. , 2010. A Review on In-vitro Antioxidant Methods: Comparisons, Correlations, and Considerations. *International Journal of PharmTech Research*. 1276-1285.
- Blainski, A., Lopes, G. C. & de Mello, J. C. P. 2013. Application and analysis of the Folin Ciocalteu method for the determination of the total phenolic content from *Limonium brasiliense* L. *Molecules*. 18 : 6852-6865.
- Blois, M.S. 1958. Antioxidant determinations by the use of a stable free radical, *Nature*, 181: 1199-1200.
- Chanda, S & R. Dave. 2009. In vitro models for antioxidant activity evaluation and some medicinal plants possessing antioxidant properties: An overview. *African Journal of Microbiology Research*. 3(13): 981-996
- Direktorat Jenderal Pengawasan Obat dan Makanan RI. 1986. *Sediaan Galenik*, Jilid 2. Jakarta: Departemen Kesehatan RI.
- Direktorat Jenderal Pengawasan Obat dan Makanan RI. 1995. *Farmakope Indonesia, Edisi IV*. Jakarta: Departemen Kesehatan Republik Indonesia.
- Edawati, Z. 2012. Uji Aktivitas Antioksidan Ekstrak Metanol *Ascidia Didemnum* sp. Dari Kepulauan Seribu dengan Metode 1,1-difenil-2-pikrilhidrazil (DPPH) dan Identifikasi Golongan senyawa dari Fraksi Teraktif. Skripsi.

Depok: Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam Program Studi Farmasi Ekstensi.

Foti, Mairo.C. 2007. Antioxidant properties of phenols. *Journal of pharmacy and pharmacology*. 59: 1673-1685

Fraga, C. G., Mohchnik, P. A., Shigenage, M. K., Helbock, H. J., Jacob, R. A., Ames, B. N. 1991. Ascorbic Acid Protects against endogenous oxidative DNA damage in human sperm. *Proc. Natl. Acad Sci*. 88 : 11003- 11006.

Fu, L., Xu, B. T., Xu, X. R., Gan, R. Y., Zhang, Y., Xia, E. Q., Li, H. B. 2011. Antioxidant capacities and total phenolic contents of 62 fruits. *Food. Chem Journal*. 129:345–350.

Gordon, M. H. 1990. The Mechanism of Antioxidan Action in Vitro Di dalam B.J.F. Hudson. ed. *Food Antioxidan. Elvisier Applied Science*. Lo.

Gordon. 2001. *Antioxidants in Food*. New York : CRC Press.

Halliwell, B & Gutteridge, J. M. C. 2000. *Free Radical in Biology and Medicine*. Newyork: Oxford University Press.

Hanani, E., Mun'im, A., Sekarini, R., Wiryowidagdo, S. 2006. Uji Aktivitas Antioksidan Beberapa Spons Laut dari Kepulauan Seribu. *Jurnal Bahan Alam Indonesia*. 6:1-3.

Harborne, J. B. 1987. *Metode Fitokimia*. Terjemahan Iwang S. Bandung: ITB Press.

ITIS. 2019. *Pistia stratiotes*. <https://itis.gov/servlet/SingleRpt/SingleRpt#null/> : (Diakses tanggal 10 Mei 2019)

Khare, C.P. 2005. *Encyclopedia of Indian medicinal plants*. Berlin Heidelberg, Germany: Springer-Verlag.

Kumalaningsih, S., 2006. *Antioksidan Alami*. Surabaya: Trubus Agrisarana.

Lu, Y. and Foo, L.Y. 2000. Antioxidant and radical scavenging activities of polyphenols from apple pomace, *Food Chemistry*, 68: 81-85.

Margaretta, S., Handayani, S.D., Indraswati, N., Hindarso, H., 2011, Ekstraksi Senyawa Phenolic Pandanus Amaryllifolius Roxb. Sebagai Antioksidan Alami. *Jurnal Widya Teknik*, 21-30

- Marinova, D., Ribanova, F., Atanassova, M. 2005. Total Phenolics and Total Flavonoids in Bulgarian Fruits and Vegetables. *Journal of the University of Chemical Technology and Metallurgy*. (40): 255-260
- Molyneux, P. 2004. The Use of Stable Free Radical Diphenylpicryl hydrazyl (DPPH) for estimating antioxidant activity. *Songklanakar J. Sci. Technol.* 26(2): 211-219.
- Nair, I. C., Jayachandran, K., Shashidhar, S. 2008. Biodegradation of Phenol. *African Journal of Biotechnology*. 7(25): 4951-4958.
- Packer, L., Traber, Maret., Kraemer, K., Frei, B. 2002. *The Antioxidant Vitamin C and E*. USA: AOCS Press
- Pamungkas, D.K. Retnaningtyas, Y. Wulandari, L. 2017. Pengujian Aktivitas Antioksidan Kombinasi Ekstrak Metanol Daun Mangga Gadung (*Mangifera indica*. L) dan Ekstrak Etanol Daun Pandan Wangi (*Pandanus amaryllifolius* Roxb.). *e-Jurnal Pustaka Kesehatan*. Vol 5.
- Prior, R. L., Wu, X., Schaich, K. 2005. Standardized methods for the determination of antioxidant capacity and phenolics in foods and dietary supplements. *Journal of Agriculture and Food Chemistry*. 53: 4290–4303.
- Rahmawati, Anita. 2009. *Kandungan Fenol Total Ekstrak Mengkudu (*Morinda citrifolia*)*. Skripsi. Jakarta : Fakultas Kedokteran Universitas Indonesia.
- Saripah, R. S. A., Sunalti, M., Norizan A. 2009. Phenolic content and antioxidant activity of fruits of *Ficus deltoidea* var *angustifolia* sp. *MJAS*. 13(2):146-150.
- Shahidi, F., & M. Nacz. 1995. *Food in Phenolics and Nutraceuticals*. New York: CRC Press.
- Sharma, S. 2014. In vitro evaluation of antioxidant activity of metanolic and petroleum ether extracts from seeds of *Benincasa hispida*. *J Nat. Plant Resour.* 4(4):31-4.
- Sunarni, T. 2005. Aktivitas Antioksidan Penangkap Radikal Bebas Beberapa kecambah Dari Biji Tumbuhan Familia Papilionaceae. *Jurnal Farmasi Indonesia*. 2(2): 53-61.
- Teow, C. C., Van-Den, Truong., McFeeters, R. F., Thompson, R. L., Pecota, K. V., Yencho, G. C. 2007. Antioxidant activities, phenolic and β -carotene contents of sweet potato genotypes with varying flesh colours. *Food Chemistry*. 103: 829–838.

- Umayah, E dan Amrun, M. 2007. Uji Aktivitas Antioksidan Ekstrak Buah Naga (*Hylocereus undatus* (Haw.) Brit. & Rose). *Jurnal Ilmu Dasar*. (8):81-90.
- Widyasanti, A. Rohdiana, D. dan Ekatama, N. 2016. Aktivitas Antioksidan Ekstrak Teh Putih (*Camellia sinensis*) dengan Metode DPPH (2,2 difenil-1-picrylhydrazyl). *Fortech*. 1 (1)
- Winarsi, H. 2007. *Antioksidan Alami dan Radikal Bebas*. Yogyakarta: Kanisius
- Winarti, Sri. 2010. *Makanan Fungsional*. Yogyakarta: Graha Ilmu
- Wolfe, K., R. Wu dan R.H. Liu. 2003. Antioxidant Activity of Apple Peels. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 51(3): 609-614.
- Yu, L. 2008. *Wheat Antioxidants*. New Jersey: John Wiley & Sons, Inc.
- Young, I S., J V, Woodside. 2001. Antioxidants in health and disease. *J Clin Pathol*. 54:176–186.
- Zhu, Q.Y., Hackman, R.M., Ensunsa, J.L., Holt, R.R. and Keen, C.L. 2002. Antioxidative Activities of Oolong Tea, *J. Agric. Food Chem.*, 50: 6929-6934
- Zuhra, C.F. Tarigan dan H.Sitoang. 2008. Aktivitas Antioksidan senyawa flavonoid dari daun katuk (*Sauropus androgynous* (L) Merr.). *Jurnal Biologi Sumatra*. 3(1): 7-10

LAMPIRAN

Lampiran 1. Lembar Determinasi

Kode Dokumen : FR-AUK-064 Revisi : 0

 **KEMENTERIAN RISET, TEKNOLOGI, DAN PENDIDIKAN TINGGI**
POLITEKNIK NEGERI JEMBER
LABORATORIUM TANAMAN
Jalan Mastrip Kotak Pos 164 Jember - 68101 Telp. (0331) 333532 - 333534 Fax. (0331) 333531
E-mail : Polije@polije.ac.id Web Site : <http://www.Polije.ac.id>

SURAT KETERANGAN IDENTIFIKASI TANAMAN
No: 74/PL17.3.1.02/LL/2018

Menindaklanjuti surat dari Wakil Dekan I Fakultas Farmasi Universitas Jember No: 3351/UN25.13/LL/2018 perihal Permohonan Identifikasi Tanaman dan berdasarkan hasil pengamatan pada spesimen tumbuhan yang dikirimkan ke Laboratorium Tanaman, Jurusan Produksi Pertanian, Politeknik Negeri Jember oleh:

Nama : Maulidya Barikatul I; Lilis Sapta Eka L; Irawati Firdiyansari
NIM : 152210101015; 152210101017; 152210101018
Jur/Fak/PT : Fakultas Farmasi/ Universitas Jember

maka dapat disampaikan hasilnya bahwa spesimen tersebut di bawah ini (terlampir) adalah:
Kingdom: Plantae; Devisio: Spermatophyta; Sub Devisio: Magnoliophyta; Kelas: Liliopsida; Sub Kelas: Arecidae; Ordo: Arales; Famili: Araceae; Genus: Pistia; Spesies: Pistia stratiotes, L.

Demikian surat keterangan ini dibuat untuk digunakan sebagaimana mestinya.

Jember, 4 Januari 2019
Kepala Laboratorium Tanaman

Lilik Mastuti, MP
NIP. 195808201987032001

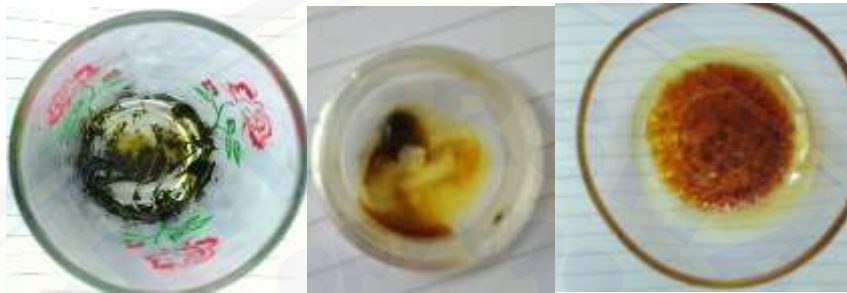


Lampiran 2. Perhitungan Rendemen

1. Pehitungan % Rendemen Ekstrak

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

$$\begin{aligned} \text{Rendemen} &= \frac{24,53 \text{ g}}{195 \text{ g}} \times 100\% \\ &= 12,5\% \end{aligned}$$



Gambar 1. Fraksi N-Heksana; Fraksi Etil asetat; Fraksi Etanol-air

2. Perhitungan % Rendemen Fraksi

$$\% \text{ Rendemen} = \frac{\text{bobot Fraksi yang dihasilkan}}{\text{bobot ekstrak yang digunakan}} \times 100\%$$

a. Rendemen Fraksi n-heksana

$$\begin{aligned} \text{Rendemen} &= \frac{1\text{g}}{3\text{g}} \times 100\% \\ &= 33,3\% \end{aligned}$$

b. Rendemen Fraksi Etil Asetat

$$\begin{aligned} \text{Rendemen} &= \frac{0,07\text{g}}{3\text{g}} \times 100\% \\ &= 2,3\% \end{aligned}$$

c. Rendemen Fraksi Etanol-Air

$$\begin{aligned} \text{Rendemen} &= \frac{1,46\text{g}}{3\text{g}} \times 100\% \\ &= 48,6\% \end{aligned}$$

Lampiran 3. Perhitungan DPPH dan Larutan Uji

1. Perhitungan DPPH

Konsentrasi DPPH = 0,1mM (Molyneux, 2004)

Mr DPPH ($C_{18}H_{12}N_5O_6$) = 394,33 g/mol (Molyneux, 2004)

$$\text{Molar} = \frac{\text{massa (g)}}{\text{Mr}} \times \frac{1000}{\text{volume}}$$

$$0,1 \text{ mM} = \frac{\text{massa (mg)}}{394,33 \text{ g/mol}} \times \frac{1000}{50,00 \text{ ml}}$$

Massa (mg) = 1,975 mg

2. Pembuatan Larutan Uji

a. Vitamin C

Dibuat larutan Induk :

$$1) \frac{25 \text{ mg}}{0,025 \text{ L}} = 1000 \text{ } \mu\text{g/mL}$$

$$\text{Diencerkan } \frac{0,5 \text{ mL}}{10 \text{ mL}} \times 1000 \text{ } \mu\text{g/mL} = 50 \text{ } \mu\text{g/mL}$$

$$\text{Diencerkan } \frac{1 \text{ mL}}{5 \text{ mL}} \times 1000 \text{ } \mu\text{g/mL} = 100 \text{ } \mu\text{g/mL}$$

$\frac{1 \text{ mL}}{10 \text{ mL}} \times 50 \text{ } \mu\text{g/mL} = 5 \text{ } \mu\text{g/mL}$	$\frac{1 \text{ mL}}{10 \text{ mL}} \times 100 \text{ } \mu\text{g/mL} = 10 \text{ } \mu\text{g/mL}$
$\frac{3 \text{ mL}}{10 \text{ mL}} \times 50 \text{ } \mu\text{g/mL} = 15 \text{ } \mu\text{g/mL}$	$\frac{2 \text{ mL}}{10 \text{ mL}} \times 100 \text{ } \mu\text{g/mL} = 20 \text{ } \mu\text{g/mL}$
$\frac{5 \text{ mL}}{10 \text{ mL}} \times 50 \text{ } \mu\text{g/mL} = 25 \text{ } \mu\text{g/mL}$	$\frac{3 \text{ mL}}{10 \text{ mL}} \times 100 \text{ } \mu\text{g/mL} = 30 \text{ } \mu\text{g/mL}$

Sampel	Seri Konsentrasi
Replikasi 1 Larutan Induk (1008 $\mu\text{g/mL}$)	5,04 $\mu\text{g/mL}$; 10,08 $\mu\text{g/mL}$; 15,12 $\mu\text{g/mL}$; 20,16 $\mu\text{g/mL}$; 25,20 $\mu\text{g/mL}$; 30,24 $\mu\text{g/mL}$.
Replikasi 2 Larutan Induk (1012 $\mu\text{g/mL}$)	5,06 $\mu\text{g/mL}$; 10,12 $\mu\text{g/mL}$; 15,12 $\mu\text{g/mL}$; 20,24 $\mu\text{g/mL}$; 25,30 $\mu\text{g/mL}$; 30,36 $\mu\text{g/mL}$.
Replikasi 3 Larutan Induk (1000 $\mu\text{g/mL}$)	5 $\mu\text{g/mL}$; 10 $\mu\text{g/mL}$; 15 $\mu\text{g/mL}$; 20 $\mu\text{g/mL}$; 25 $\mu\text{g/mL}$; 30 $\mu\text{g/mL}$.

b. Ekstrak Etanol Herba Apu-apu

Dibuat larutan Induk :

$$2) \frac{5,0 \text{ mg}}{0,010 \text{ L}} = 500 \text{ } \mu\text{g/mL}$$

$$\text{Diencerkan } \frac{5 \text{ mL}}{10 \text{ mL}} \times 500 \text{ } \mu\text{g/mL} = 250 \text{ } \mu\text{g/mL}$$

$$3) \frac{5,0 \text{ mg}}{0,010 \text{ L}} = 500 \text{ } \mu\text{g/mL}$$

$$\text{Diencerkan } \frac{4 \text{ mL}}{5 \text{ mL}} \times 500 \text{ } \mu\text{g/mL} = 400 \text{ } \mu\text{g/mL}$$

$\frac{0,37 \text{ mL}}{5 \text{ mL}} \times 400 \text{ } \mu\text{g/mL} = 30 \text{ } \mu\text{g/mL}$	$\frac{0,2 \text{ mL}}{5 \text{ mL}} \times 250 \text{ } \mu\text{g/mL} = 10 \text{ } \mu\text{g/mL}$
$\frac{0,5 \text{ mL}}{5 \text{ mL}} \times 400 \text{ } \mu\text{g/mL} = 40 \text{ } \mu\text{g/mL}$	$\frac{0,4 \text{ mL}}{5 \text{ mL}} \times 250 \text{ } \mu\text{g/mL} = 20 \text{ } \mu\text{g/mL}$
$\frac{0,75 \text{ mL}}{5 \text{ mL}} \times 400 \text{ } \mu\text{g/mL} = 60 \text{ } \mu\text{g/mL}$	

Sampel	Seri Konsentrasi
Replikasi 1	10,4 $\mu\text{g/mL}$; 20,8 $\mu\text{g/mL}$; 31,2
Larutan Induk (520 $\mu\text{g/mL}$ dan 520 $\mu\text{g/mL}$)	$\mu\text{g/mL}$; 41,6 $\mu\text{g/mL}$; 62,4 $\mu\text{g/mL}$
Replikasi 2	10,4 $\mu\text{g/mL}$; 20,8 $\mu\text{g/mL}$; 31,8
Larutan Induk (520 $\mu\text{g/mL}$ dan 530 $\mu\text{g/mL}$)	$\mu\text{g/mL}$; 42,4 $\mu\text{g/mL}$; 63,6 $\mu\text{g/mL}$
Replikasi 3	10,4 $\mu\text{g/mL}$; 20,8 $\mu\text{g/mL}$; 30,6
Larutan Induk (520 $\mu\text{g/mL}$ dan 510 $\mu\text{g/mL}$)	$\mu\text{g/mL}$; 40,8 $\mu\text{g/mL}$; 61,2 $\mu\text{g/mL}$

c. Fraksi n-Heksana

Dibuat larutan Induk :

$$a) \frac{5,0 \text{ mg}}{0,010 \text{ L}} = 500 \text{ } \mu\text{g/mL}$$

$$\text{Diencerkan } \frac{5 \text{ mL}}{10 \text{ mL}} \times 500 \text{ } \mu\text{g/mL} = 250 \text{ } \mu\text{g/mL}$$

$$b) \frac{5,0 \text{ mg}}{0,010 \text{ L}} = 500 \text{ } \mu\text{g/mL}$$

$$\text{Diencerkan } \frac{4 \text{ mL}}{5 \text{ mL}} \times 500 \text{ } \mu\text{g/mL} = 400 \text{ } \mu\text{g/mL}$$

$\frac{0,37 \text{ mL}}{5 \text{ mL}} \times 400 \text{ } \mu\text{g/mL} = 30 \text{ } \mu\text{g/mL}$	$\frac{0,2 \text{ mL}}{5 \text{ mL}} \times 250 \text{ } \mu\text{g/mL} = 10 \text{ } \mu\text{g/mL}$
$\frac{0,5 \text{ mL}}{5 \text{ mL}} \times 400 \text{ } \mu\text{g/mL} = 40 \text{ } \mu\text{g/mL}$	$\frac{0,4 \text{ mL}}{5 \text{ mL}} \times 250 \text{ } \mu\text{g/mL} = 20 \text{ } \mu\text{g/mL}$
$\frac{0,75 \text{ mL}}{5 \text{ mL}} \times 400 \text{ } \mu\text{g/mL} = 60 \text{ } \mu\text{g/mL}$	

Sampel	Seri Konsentrasi
Replikasi 1	10,4 $\mu\text{g/mL}$; 20,8 $\mu\text{g/mL}$; 30,6
Larutan Induk (510 $\mu\text{g/mL}$ dan 510 $\mu\text{g/mL}$)	$\mu\text{g/mL}$; 40,8 $\mu\text{g/mL}$; 61,2 $\mu\text{g/mL}$
Replikasi 2	10,2 $\mu\text{g/mL}$; 20,4 $\mu\text{g/mL}$; 31,2
Larutan Induk (510 $\mu\text{g/mL}$ dan 520 $\mu\text{g/mL}$)	$\mu\text{g/mL}$; 41,6 $\mu\text{g/mL}$; 62,4 $\mu\text{g/mL}$
Replikasi 3	10 $\mu\text{g/mL}$; 20 $\mu\text{g/mL}$; 31,2 $\mu\text{g/mL}$;
Larutan Induk (500 $\mu\text{g/mL}$ dan 520 $\mu\text{g/mL}$)	41,6 $\mu\text{g/mL}$; 62,4 $\mu\text{g/mL}$

d. Fraksi Etil Asetat

Dibuat larutan Induk :

$$1) \frac{5,0 \text{ mg}}{0,010 \text{ L}} = 500 \text{ } \mu\text{g/mL}$$

$$\text{Diencerkan } \frac{5 \text{ mL}}{10 \text{ mL}} \times 500 \text{ } \mu\text{g/mL} = 250 \text{ } \mu\text{g/mL}$$

$$2) \frac{5,0 \text{ mg}}{0,010 \text{ L}} = 500 \text{ } \mu\text{g/mL}$$

$$\text{Diencerkan } \frac{4 \text{ mL}}{5 \text{ mL}} \times 500 \text{ } \mu\text{g/mL} = 400 \text{ } \mu\text{g/mL}$$

$\frac{0,37 \text{ mL}}{5 \text{ mL}} \times 400 \text{ } \mu\text{g/mL} = 30 \text{ } \mu\text{g/mL}$	$\frac{0,2 \text{ mL}}{5 \text{ mL}} \times 250 \text{ } \mu\text{g/mL} = 10 \text{ } \mu\text{g/mL}$
$\frac{0,5 \text{ mL}}{5 \text{ mL}} \times 400 \text{ } \mu\text{g/mL} = 40 \text{ } \mu\text{g/mL}$	$\frac{0,4 \text{ mL}}{5 \text{ mL}} \times 250 \text{ } \mu\text{g/mL} = 20 \text{ } \mu\text{g/mL}$
$\frac{0,75 \text{ mL}}{5 \text{ mL}} \times 400 \text{ } \mu\text{g/mL} = 60 \text{ } \mu\text{g/mL}$	

Sampel	Seri Konsentrasi
Replikasi 1	10,2 $\mu\text{g/mL}$; 20,4 $\mu\text{g/mL}$; 31,2
Larutan Induk (510 $\mu\text{g/mL}$ dan 520 $\mu\text{g/mL}$)	$\mu\text{g/mL}$; 41,6 $\mu\text{g/mL}$; 62,4 $\mu\text{g/mL}$
Replikasi 2	10 $\mu\text{g/mL}$; 20 $\mu\text{g/mL}$; 30,6 $\mu\text{g/mL}$;
Larutan Induk (500 $\mu\text{g/mL}$ dan 510 $\mu\text{g/mL}$)	40,8 $\mu\text{g/mL}$; 61,2 $\mu\text{g/mL}$
Replikasi 3	10,2 $\mu\text{g/mL}$; 20,4 $\mu\text{g/mL}$; 30,6
Larutan Induk (510 $\mu\text{g/mL}$ dan 510 $\mu\text{g/mL}$)	$\mu\text{g/mL}$; 40,8 $\mu\text{g/mL}$; 61,2 $\mu\text{g/mL}$

e. Fraksi Etanol-Air

Dibuat larutan Induk :

$$3) \frac{5,0 \text{ mg}}{0,010 \text{ L}} = 500 \text{ } \mu\text{g/mL}$$

$$\text{Diencerkan } \frac{5 \text{ mL}}{10 \text{ mL}} \times 500 \text{ } \mu\text{g/mL} = 250 \text{ } \mu\text{g/mL}$$

$$4) \frac{5,0 \text{ mg}}{0,010 \text{ L}} = 500 \text{ } \mu\text{g/mL}$$

$$\text{Diencerkan } \frac{4 \text{ mL}}{5 \text{ mL}} \times 500 \text{ } \mu\text{g/mL} = 400 \text{ } \mu\text{g/mL}$$

$\frac{0,37 \text{ mL}}{5 \text{ mL}} \times 400 \text{ } \mu\text{g/mL} = 30 \text{ } \mu\text{g/mL}$	$\frac{0,2 \text{ mL}}{5 \text{ mL}} \times 250 \text{ } \mu\text{g/mL} = 10 \text{ } \mu\text{g/mL}$
$\frac{0,5 \text{ mL}}{5 \text{ mL}} \times 400 \text{ } \mu\text{g/mL} = 40 \text{ } \mu\text{g/mL}$	$\frac{0,4 \text{ mL}}{5 \text{ mL}} \times 250 \text{ } \mu\text{g/mL} = 20 \text{ } \mu\text{g/mL}$
$\frac{0,75 \text{ mL}}{5 \text{ mL}} \times 400 \text{ } \mu\text{g/mL} = 60 \text{ } \mu\text{g/mL}$	

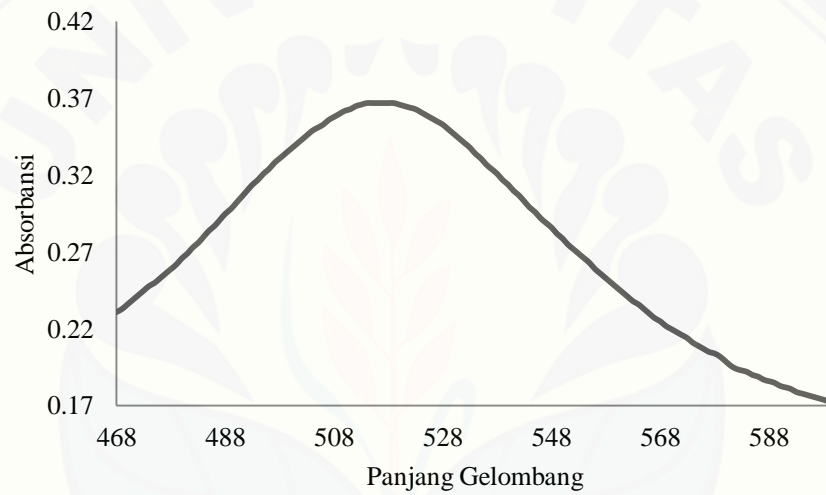
Sampel	Seri Konsentrasi
Replikasi 1 Larutan Induk (510 $\mu\text{g/mL}$ dan 500 $\mu\text{g/mL}$)	10,2 $\mu\text{g/mL}$; 20,4 $\mu\text{g/mL}$; 30 $\mu\text{g/mL}$; 40 $\mu\text{g/mL}$; 60 $\mu\text{g/mL}$
Replikasi 2 Larutan Induk (510 $\mu\text{g/mL}$ dan 500 $\mu\text{g/mL}$)	10,2 $\mu\text{g/mL}$; 20,4 $\mu\text{g/mL}$; 30 $\mu\text{g/mL}$; 40 $\mu\text{g/mL}$; 60 $\mu\text{g/mL}$
Replikasi 3 Larutan Induk (510 $\mu\text{g/mL}$ dan 510 $\mu\text{g/mL}$)	10,2 $\mu\text{g/mL}$; 20,4 $\mu\text{g/mL}$; 30,6 $\mu\text{g/mL}$; 40,8 $\mu\text{g/mL}$; 61,2 $\mu\text{g/mL}$

Lampiran 4. Penentuan Panjang Gelombang DPPH

a. Grafik

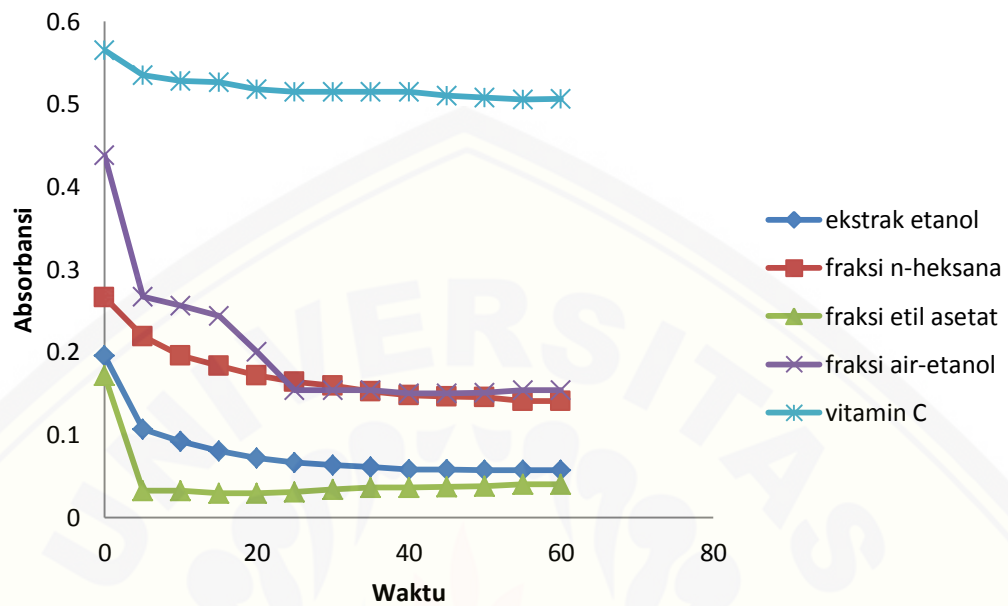
Data mode	:ABS
Scan Range	:600,0-400,0 nm
Slide Width	:4nm
Speed (nm/min)	:800 nm/min
Lamp Change Wavelength	:340,0 nm

b. Data Absorbansi DPPH



WL	ABS	WL	ABS	WL	ABS	WL	ABS
600	0,174	571	0,218	542	0,307	513	0,366
599	0,173	570	0,22	541	0,31	512	0,365
598	0,174	569	0,222	540	0,314	511	0,363
597	0,175	568	0,225	539	0,317	510	0,362
596	0,176	567	0,227	538	0,321	509	0,36
595	0,177	566	0,23	537	0,324	508	0,358
594	0,178	565	0,233	536	0,327	507	0,356
593	0,179	564	0,236	535	0,331	506	0,353
592	0,181	563	0,238	534	0,334	505	0,351
591	0,182	562	0,241	533	0,338	504	0,349
590	0,183	561	0,244	532	0,341	503	0,346
589	0,185	560	0,247	531	0,344	502	0,343
588	0,186	559	0,25	530	0,347	501	0,34
587	0,187	558	0,253	529	0,35	500	0,337
586	0,189	557	0,256	528	0,353	499	0,334
585	0,19	556	0,259	527	0,355	498	0,331
584	0,192	555	0,263	526	0,357	497	0,328
583	0,193	554	0,266	525	0,359	496	0,324
582	0,194	553	0,269	524	0,361	495	0,321
581	0,196	552	0,272	523	0,363	494	0,317
580	0,199	551	0,275	522	0,364	493	0,314
579	0,202	550	0,279	521	0,365	492	0,31
578	0,204	549	0,282	520	0,366	491	0,306
577	0,205	548	0,286	519	0,367	490	0,302
576	0,207	547	0,289	518	0,367	489	0,298
575	0,209	546	0,292	517	0,367	488	0,295

Lampiran 5. Penentuan Waktu Inkubasi



Waktu (menit)	Vitamin C (25,20 µg/mL)	Ekstrak Etanol (0,5 mg/mL)	Fraksi n-Heksana (0,5 mg/mL)	Fraksi etil asetat (0,5 mg/mL)	Fraksi etanol-air (0,5 mg/mL)
0	0,565	0,196	0,256	0,162	0,426
5	0,535	0,107	0,266	0,172	0,438
10	0,528	0,092	0,219	0,032	0,267
15	0,526	0,080	0,196	0,032	0,256
20	0,518	0,072	0,183	0,029	0,244
25	0,515	0,066	0,172	0,029	0,200
30	0,515	0,063	0,164	0,031	0,154
35	0,515	0,061	0,159	0,034	0,154
40	0,515	0,058	0,152	0,036	0,154
45	0,51	0,058	0,148	0,036	0,15
50	0,508	0,057	0,146	0,037	0,15
55	0,505	0,057	0,145	0,038	0,151
60	0,506	0,057	0,141	0,04	0,154

Lampiran 6. Perhitungan Peredaman DPPH dan IC_{50}

$$\text{Peredaman DPPH} = \frac{\text{Absorbansi DPPH} - \text{Absorbansi larutan uji}}{\text{Absorbansi DPPH}} \times 100\%$$

Sampel	IC_{50} ($\mu\text{g/mL}$)	Rata-rata IC_{50} ($\mu\text{g/mL}$)	SD	RSD%
Vitamin	3,274	3,263	0,032	0,010
	3,289			
	3,227			
Ekstrak Etanol	16,752	16,675	0,239	1,435
	16,922			
	16,351			
Fraksi n-heksana	30,122	29,915	0,156	0,521
	29,745			
	29,879			
Fraksi etil asetat	11,814	11,857	0,038	0,322
	11,850			
	11,907			
Fraksi etanol-air	9,058	9,090	0,122	1,352
	8,958			
	9,254			

a. Vitamin C

-Replikasi 1

Konsentrasi ($\mu\text{g/mL}$)	Faktor Pengenceran	Konsentrasi dalam kuvet	Abs Sampel	Abs DPPH	% inhibisi	IC_{50}
5,04	5	1,008	0,781	0,950	17,789	3,274
10,08	5	2,016	0,642	0,950	32,421	
15,12	5	3,024	0,521	0,950	45,158	
20,16	5	4,032	0,355	0,950	62,632	
25,20	5	5,040	0,219	0,950	76,947	
30,24	5	6,048	0,129	0,950	86,421	

-Replikasi 2

Konsentrasi ($\mu\text{g/mL}$)	Faktor Pengenceran	Konsentrasi dalam kuvet	Abs Sampel	Abs DPPH	% inhibisi	IC_{50}
5,06	5	1,012	0,783	0,950	16,526	3,289
10,12	5	2,024	0,639	0,950	32,737	
15,18	5	3,036	0,521	0,950	45,158	
20,24	5	4,048	0,349	0,950	63,263	
25,30	5	5,060	0,219	0,950	76,947	
30,36	5	6,072	0,129	0,950	86,947	

-Replikasi 3

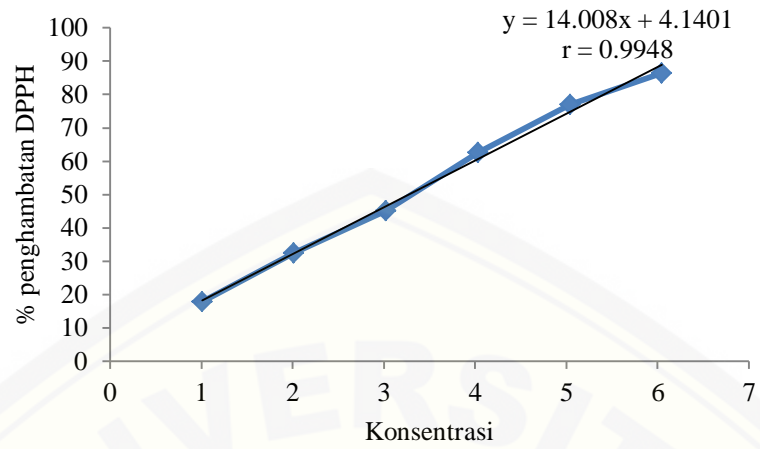
Konsentrasi ($\mu\text{g/mL}$)	Faktor Pengenceran	Konsentrasi dalam kuvet	Abs Sampel	Abs DPPH	% inhibisi	IC_{50}
5	5	1	0,781	0,950	18,000	3,277
10	5	2	0,642	0,950	28,316	
15	5	3	0,521	0,950	44,947	
20	5	4	0,355	0,950	63,158	
25	5	5	0,219	0,950	76,474	
30	5	6	0,129	0,950	86,579	

Rata-rata IC_{50} : 3,263

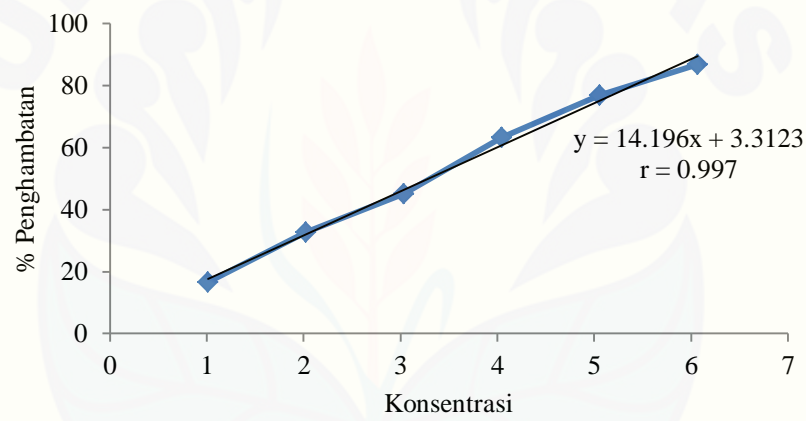
SD : 0.032

RSD : 0.010%

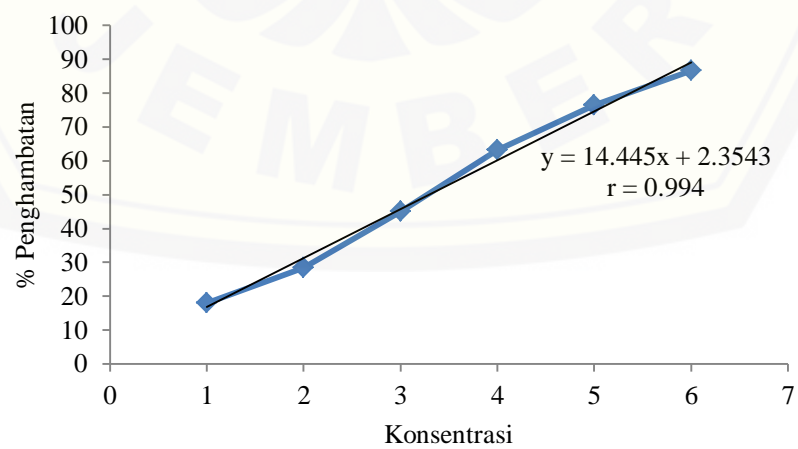
-Replikasi 1



-Replikasi 2



-Replikasi 3



b. Ekstrak Etanol Herba Apu-apu

-Replikasi 1

Konsentrasi (($\mu\text{g}/\text{mL}$))	Faktor Pengenceran	Konsentrasi dalam kuvet	Abs Sampel	Abs DPPH	% inhibisi	IC_{50}
10,4	5	2,08	0,591	0,884	33,144	16,752
20,8	5	4,16	0,57	0,884	35,520	
31,2	5	6,24	0,55	0,884	37,782	
41,6	5	8,32	0,521	0,884	41,063	
62,4	5	12,48	0,49	0,884	44,570	

-Replikasi 2

Konsentrasi (($\mu\text{g}/\text{mL}$))	Faktor Pengenceran	Konsentrasi dalam kuvet	Abs Sampel	Abs DPPH	% inhibisi	IC_{50}
10,4	5	2,08	0,593	0,884	32,918	16,922
20,8	5	4,16	0,571	0,884	35,407	
31,2	5	6,24	0,55	0,884	37,782	
42,4	5	8,48	0,52	0,884	41,176	
63,6	5	12,72	0,488	0,884	44,796	

-Replikasi 3

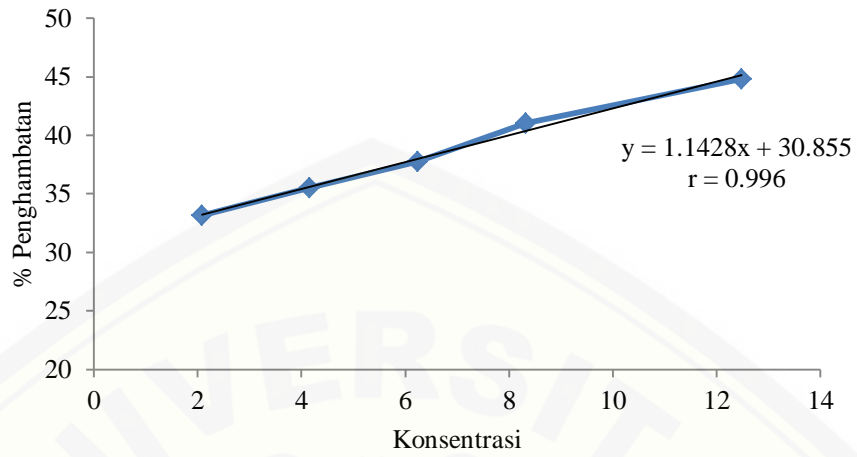
Konsentrasi (($\mu\text{g}/\text{mL}$))	Faktor Pengenceran	Konsentrasi dalam kuvet	Abs Sampel	Abs DPPH	% inhibisi	IC_{50}
10,4	5	2,08	0,591	0,884	33,144	16,351
20,8	5	4,16	0,57	0,884	35,520	
30,6	5	6,12	0,548	0,884	38,009	
40,8	5	8,16	0,523	0,884	40,837	
61,2	5	12,24	0,487	0,884	44,909	

Rata-rata IC_{50} : 16,675

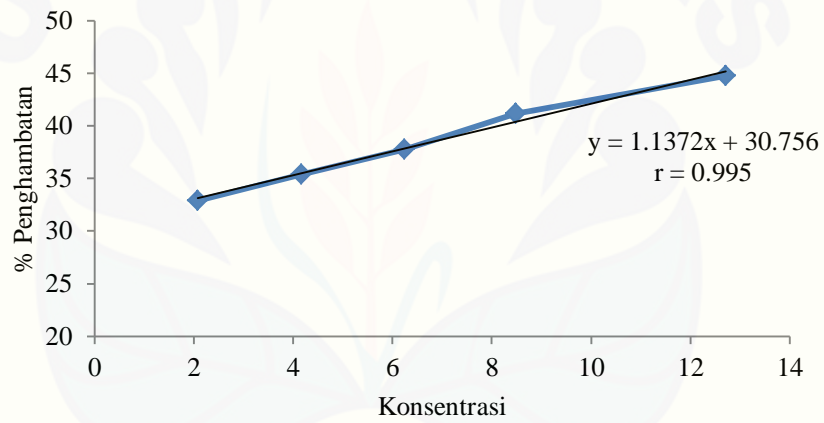
SD : 0,239

RSD : 1,435%

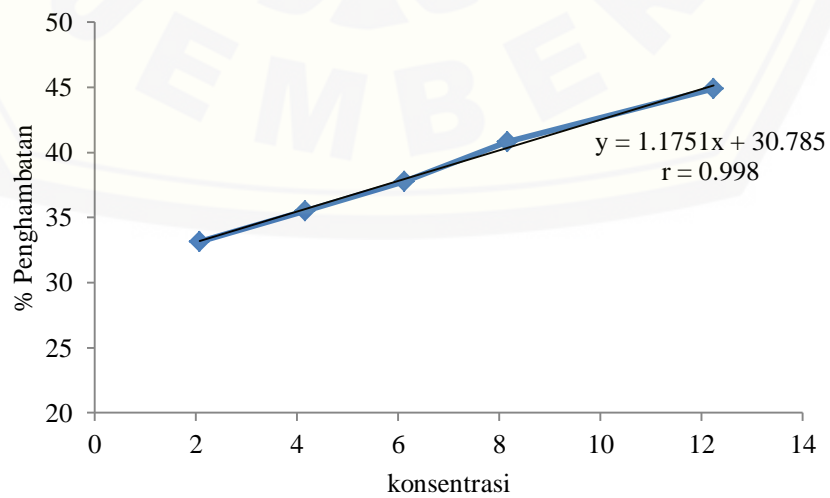
-Replikasi 1



-Replikasi 2



-Replikasi 3



c. Fraksi n-Heksana

-Replikasi 1

Konsentrasi (($\mu\text{g}/\text{mL}$))	Faktor Pengenceran	Konsentrasi dalam kuvet	Abs Sampel	Abs DPPH	% inhibisi	IC_{50}
10,2	5	2,04	0,622	0,884	29,638	30,122
20,4	5	4,08	0,614	0,884	30,542	
30,6	5	6,12	0,602	0,884	31,900	
40,8	5	8,16	0,583	0,884	34,049	
61,2	5	12,24	0,558	0,884	36,877	

-Replikasi 2

Konsentrasi (($\mu\text{g}/\text{mL}$))	Faktor Pengenceran	Konsentrasi dalam kuvet	Abs Sampel	Abs DPPH	% inhibisi	IC_{50}
10,2	5	2,04	0,623	0,884	29,524	29,745
20,4	5	4,08	0,613	0,884	30,656	
31,2	5	6,24	0,601	0,884	32,013	
41,6	5	8,32	0,584	0,884	33,936	
62,4	5	12,48	0,555	0,884	37,217	

-Replikasi 3

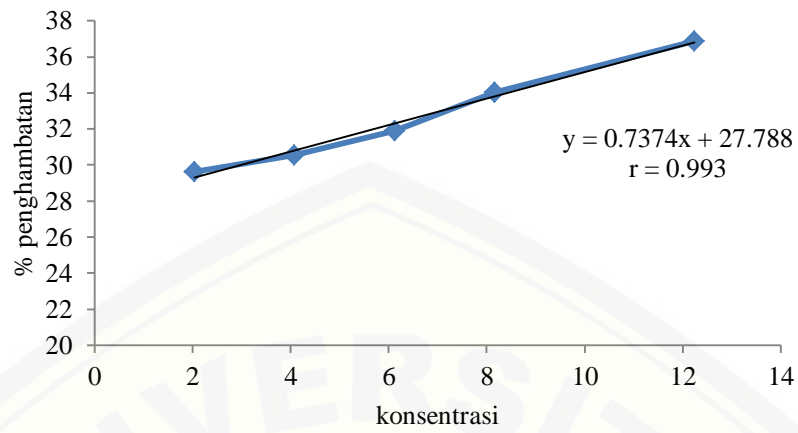
Konsentrasi (($\mu\text{g}/\text{mL}$))	Faktor Pengenceran	Konsentrasi dalam kuvet	Abs Sampel	Abs DPPH	% inhibisi	IC_{50}
10	5	2	0,622	0,884	29,638	29,879
20	5	4	0,616	0,884	30,316	
31,2	5	6,24	0,601	0,884	32,013	
41,6	5	8,32	0,585	0,884	33,823	
62,4	5	12,48	0,555	0,884	37,217	

Rata-rata IC_{50} : 29,915

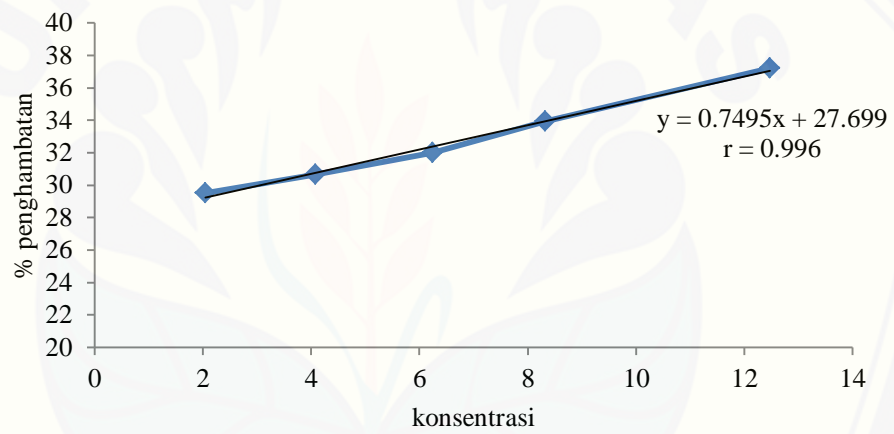
SD : 0,156

RSD : 0,521%

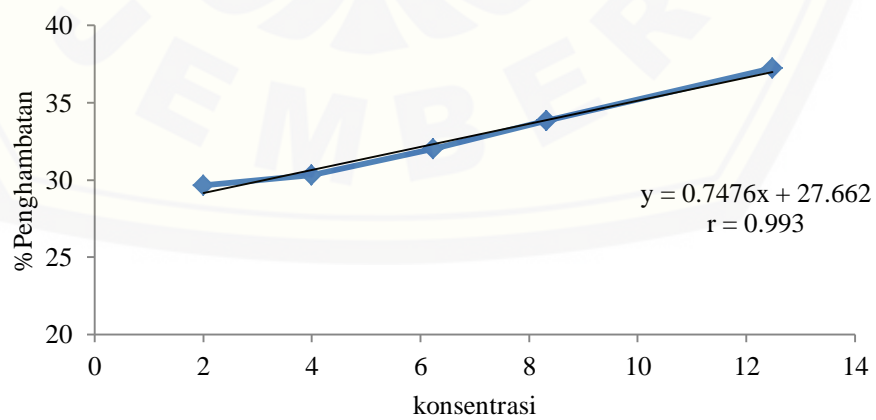
-Replikasi 1



-Replikasi 2



-Replikasi 3



d. Fraksi Etil Asetat

-Replikasi 1

Konsentrasi (($\mu\text{g}/\text{mL}$))	Faktor Pengenceran	Konsentrasi dalam kuvet	Abs Sampel	Abs DPPH	% inhibisi	IC_{50}
10,2	5	2,04	0,804	0,884	9,049	11,814
20,4	5	4,08	0,741	0,884	16,176	
31,2	5	6,24	0,63	0,884	28,733	
41,4	5	8,28	0,557	0,884	36,990	
62,4	5	12,48	0,43	0,884	51,357	

-Replikasi 2

Konsentrasi (($\mu\text{g}/\text{mL}$))	Faktor Pengenceran	Konsentrasi dalam kuvet	Abs Sampel	Abs DPPH	% inhibisi	IC_{50}
10	5	2	0,806	0,884	8,823	11,850
20	5	4	0,746	0,884	15,610	
30,6	5	6,12	0,631	0,884	28,619	
40,8	5	8,16	0,559	0,884	36,764	
61,2	5	12,24	0,443	0,884	49,886	

-Replikasi 3

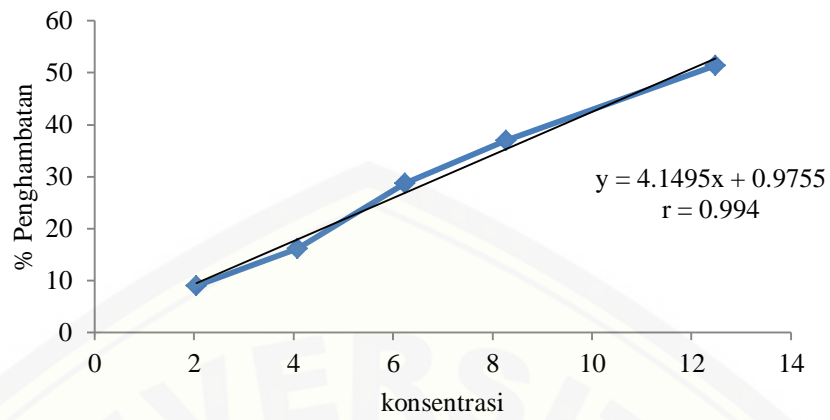
Konsentrasi (($\mu\text{g}/\text{mL}$))	Faktor Pengenceran	Konsentrasi dalam kuvet	Abs Sampel	Abs DPPH	% inhibisi	IC_{50}
10,2	5	2,04	0,804	0,884	9,049	11,907
20,4	5	4,08	0,74	0,884	16,289	
30,6	5	6,12	0,631	0,884	28,619	
40,8	5	8,16	0,558	0,884	36,877	
61,2	5	12,24	0,446	0,884	49,547	

Rata-rata IC_{50} : 11,857

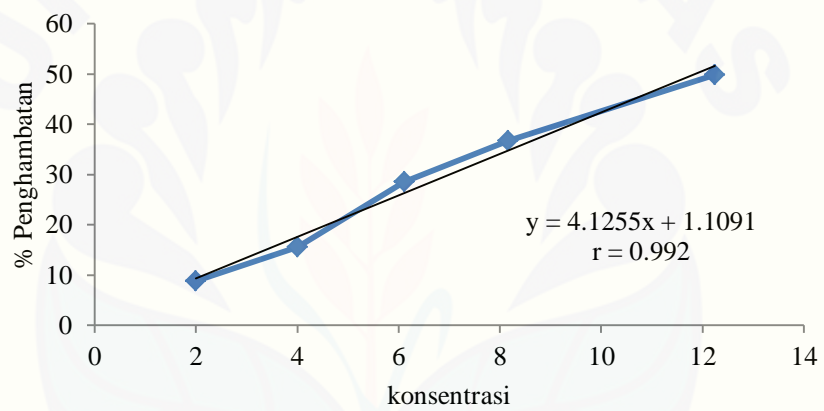
SD : 0,038

RSD : 0,322%

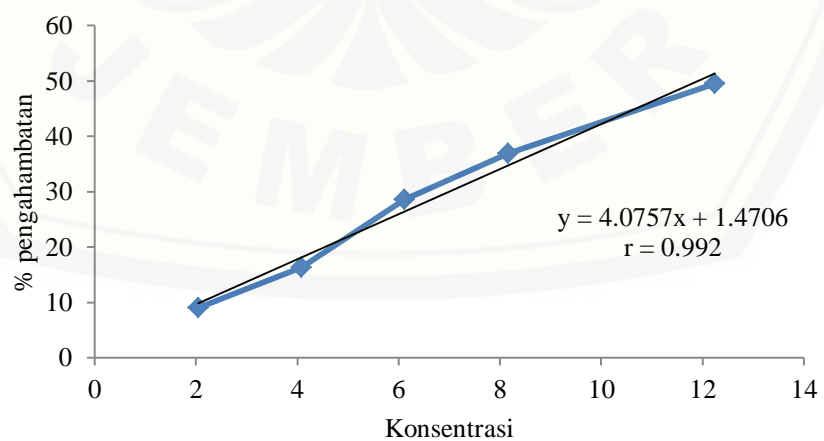
-Replikasi 1



-Replikasi 2



-Replikasi 3



e. Fraksi Etanol-Air

-Replikasi 1

Konsentrasi ($\mu\text{g/mL}$)	Faktor Pengenceran	Konsentrasi dalam kuvet	Abs Sampel	Abs DPPH	% inhibisi	IC_{50}
10,2	5	2,04	0,523	0,884	40,837	9,058
20,4	5	4,08	0,499	0,884	43,552	
30	5	6	0,483	0,884	45,361	
40	5	8	0,464	0,884	47,511	
60	5	12	0,400	0,884	54,751	

-Replikasi 2

Konsentrasi ($\mu\text{g/mL}$)	Faktor Pengenceran	Konsentrasi dalam kuvet	Abs Sampel	Abs DPPH	% inhibisi	IC_{50}
10,2	5	2,04	0,52	0,884	41,176	8,958
20,4	5	4,08	0,496	0,884	43,891	
30	5	6	0,484	0,884	45,248	
40	5	8	0,46	0,884	47,963	
60	5	12	0,4	0,884	54,751	

-Replikasi 3

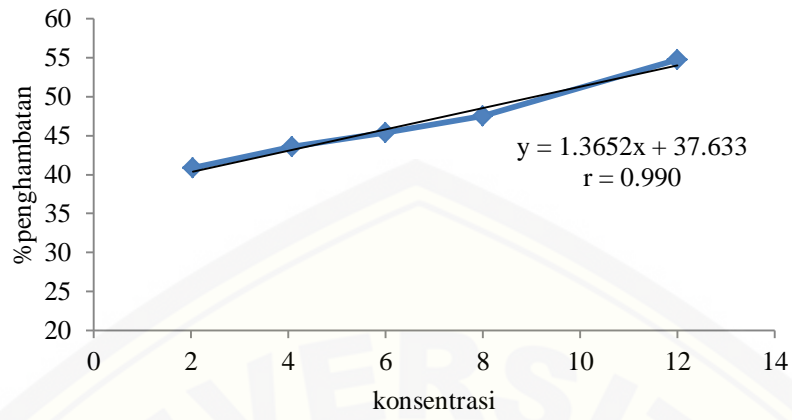
Konsentrasi ($\mu\text{g/mL}$)	Faktor Pengenceran	Konsentrasi dalam kuvet	Abs Sampel	Abs DPPH	% inhibisi	IC_{50}
10,2	5	2,04	0,523	0,884	40,837	9,254
20,4	5	4,08	0,499	0,884	43,552	
30	5	6	0,483	0,884	45,361	
40	5	8	0,464	0,884	47,511	
60	5	12	0,405	0,884	54,185	

Rata-rata IC_{50} : 9,09

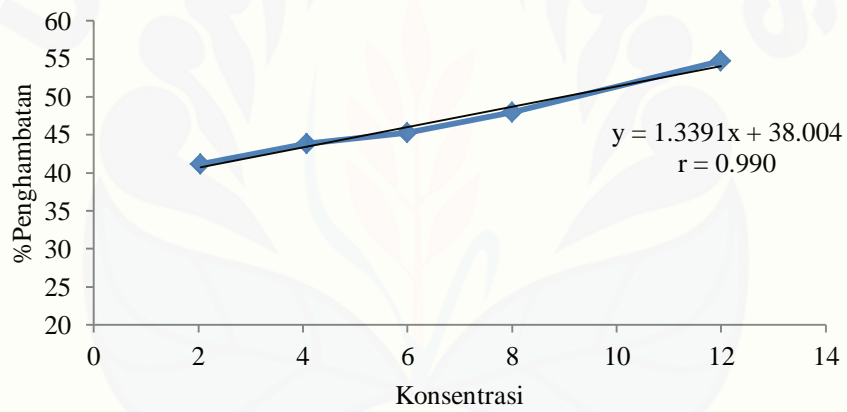
SD : 0,122

RSD : 1,352%

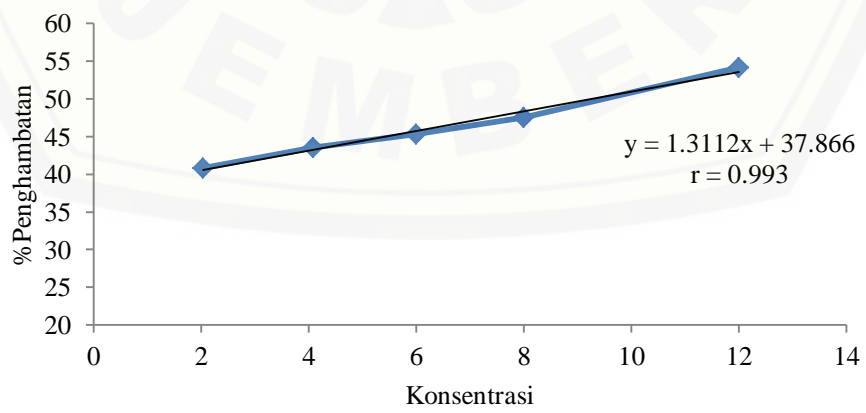
-Replikasi 1



-Replikasi 2



-Replikasi 3



Lampiran 7. Pembuatan Standar dan Larutan Uji Penetapan Kadar Fenol Total

1. Pembuatan Reagen

a. Folin-Ciocalteu (1:10)

1 mL reagen Folin-Ciocalteu dilarutkan dalam 10 mL akuades

b. Na_2CO_3 7,5%

$$\frac{x \text{ gram}}{50 \text{ mL}} \times 100\% = 7,5 \%$$

$$X = \frac{7,5\% \times 50}{100\%} = 3,75 \text{ gram}$$

Na_2CO_3 yang ditimbang adalah 3,75 gram

2. Pembuatan Standar Asam Galat

Dibuat larutan Induk :

$$\frac{25,5 \text{ mg}}{0,025 \text{ L}} = 1020 \text{ } \mu\text{g/mL}$$

Diencerkan

a. $\frac{1 \text{ mL}}{5 \text{ mL}} \times 1020 \text{ } \mu\text{g/mL} = 204 \text{ } \mu\text{g/mL}$

b. $\frac{2 \text{ mL}}{5 \text{ mL}} \times 1020 \text{ } \mu\text{g/mL} = 408 \text{ } \mu\text{g/mL}$

$\frac{1 \text{ mL}}{10 \text{ mL}} \times 204 \text{ } \mu\text{g/mL} = 20,4 \text{ } \mu\text{g/mL}$	$\frac{1 \text{ mL}}{10 \text{ mL}} \times 408 \text{ } \mu\text{g/mL} = 40,8 \text{ } \mu\text{g/mL}$
$\frac{3 \text{ mL}}{10 \text{ mL}} \times 204 \text{ } \mu\text{g/mL} = 61,2 \text{ } \mu\text{g/mL}$	$\frac{2 \text{ mL}}{10 \text{ mL}} \times 408 \text{ } \mu\text{g/mL} = 81,6 \text{ } \mu\text{g/mL}$
$\frac{3,5 \text{ mL}}{10 \text{ mL}} \times 204 \text{ } \mu\text{g/mL} = 71,4 \text{ } \mu\text{g/mL}$	

Konsentrasi larutan standar asam galat 150 μL ditambahkan Folin-ciocalteu 750 μL dan larutan 600V. Jadi volume didalam kuvet sejumlah 1,5mL.

$$\frac{0,15 \text{ mL}}{1,5 \text{ mL}} \times 20,4 \text{ } \mu\text{g/mL} = 2,04 \text{ } \mu\text{g/mL}$$

$$\frac{0,15 \text{ mL}}{1,5 \text{ mL}} \times 40,8 \text{ } \mu\text{g/mL} = 4,08 \text{ } \mu\text{g/mL}$$

$$\frac{0,15 \text{ mL}}{1,5 \text{ mL}} \times 61,2 \text{ } \mu\text{g/mL} = 6,12 \text{ } \mu\text{g/mL}$$

$$\frac{0,15 \text{ mL}}{1,5 \text{ mL}} \times 71,4 \text{ } \mu\text{g/mL} = 7,14 \text{ } \mu\text{g/mL}$$

$$\frac{0,15 \text{ mL}}{1,5 \text{ mL}} \times 81,6 \text{ } \mu\text{g/mL} = 8,16 \text{ } \mu\text{g/mL}$$

3. Pembuatan Larutan Uji

a. Ekstrak Etanol Herba Apu-apu

-Replikasi 1

$$\frac{21,2 \text{ mg}}{0,010 \text{ L}} = 2012 \text{ } \mu\text{g/mL}$$

$$\text{Diencerkan } \frac{0,2 \text{ mL}}{0,005 \text{ L}} \times 2012 \text{ } \mu\text{g/mL} = 80,48 \text{ } \mu\text{g/mL}$$

- Replikasi 2

$$\frac{21,3 \text{ mg}}{0,010 \text{ L}} = 2013 \text{ } \mu\text{g/mL}$$

$$\text{Diencerkan } \frac{0,2 \text{ mL}}{0,005 \text{ L}} \times 2013 \text{ } \mu\text{g/mL} = 80,52 \text{ } \mu\text{g/mL}$$

-Replikasi 3

$$\frac{21,2 \text{ mg}}{0,010 \text{ L}} = 2012 \text{ } \mu\text{g/mL}$$

$$\text{Diencerkan } \frac{0,2 \text{ mL}}{0,005 \text{ L}} \times 2012 \text{ } \mu\text{g/mL} = 80,48 \text{ } \mu\text{g/mL}$$

b. Fraksi n-Heksana

-Replikasi 1

$$\frac{21,7 \text{ mg}}{0,010 \text{ L}} = 2017 \text{ } \mu\text{g/mL}$$

$$\text{Diencerkan } \frac{0,2 \text{ mL}}{0,005 \text{ L}} \times 2017 \text{ } \mu\text{g/mL} = 80,68 \text{ } \mu\text{g/mL}$$

- Replikasi 2

$$\frac{21,5 \text{ mg}}{0,010 \text{ L}} = 2015 \text{ } \mu\text{g/mL}$$

$$\text{Diencerkan } \frac{0,2 \text{ mL}}{0,005 \text{ L}} \times 2015 \text{ } \mu\text{g/mL} = 80,6 \text{ } \mu\text{g/mL}$$

-Replikasi 3

$$\frac{21,6 \text{ mg}}{0,010 \text{ L}} = 2016 \text{ } \mu\text{g/mL}$$

$$\text{Diencerkan } \frac{0,2 \text{ mL}}{0,005 \text{ L}} \times 2016 \text{ } \mu\text{g/mL} = 80,64 \text{ } \mu\text{g/mL}$$

c. Fraksi Etil Asetat

-Replikasi 1

$$\frac{20,7 \text{ mg}}{0,010L} = 2007 \mu\text{g/mL}$$

$$\text{Diencerkan } \frac{0,2 \text{ mL}}{0,005L} \times 2008 \mu\text{g/mL} = 80,28 \mu\text{g/mL}$$

- Replikasi 2

$$\frac{20,8 \text{ mg}}{0,010L} = 2008 \mu\text{g/mL}$$

$$\text{Diencerkan } \frac{0,2 \text{ mL}}{0,005L} \times 2008 \mu\text{g/mL} = 80,32 \mu\text{g/mL}$$

-Replikasi 3

$$\frac{20,6 \text{ mg}}{0,010L} = 2006 \mu\text{g/mL}$$

$$\text{Diencerkan } \frac{0,2 \text{ mL}}{0,005L} \times 2006 \mu\text{g/mL} = 80,24 \mu\text{g/mL}$$

d. Fraksi Etanol-Air

$$\frac{21,6 \text{ mg}}{0,010L} = 2016 \mu\text{g/mL}$$

$$\text{Diencerkan } \frac{0,2 \text{ mL}}{0,005L} \times 2016 \mu\text{g/mL} = 80,64 \mu\text{g/mL}$$

- Replikasi 2

$$\frac{21,6 \text{ mg}}{0,010L} = 2016 \mu\text{g/mL}$$

$$\text{Diencerkan } \frac{0,2 \text{ mL}}{0,005L} \times 2016 \mu\text{g/mL} = 80,64 \mu\text{g/mL}$$

-Replikasi 3

$$\frac{21,8 \text{ mg}}{0,010L} = 2018 \mu\text{g/mL}$$

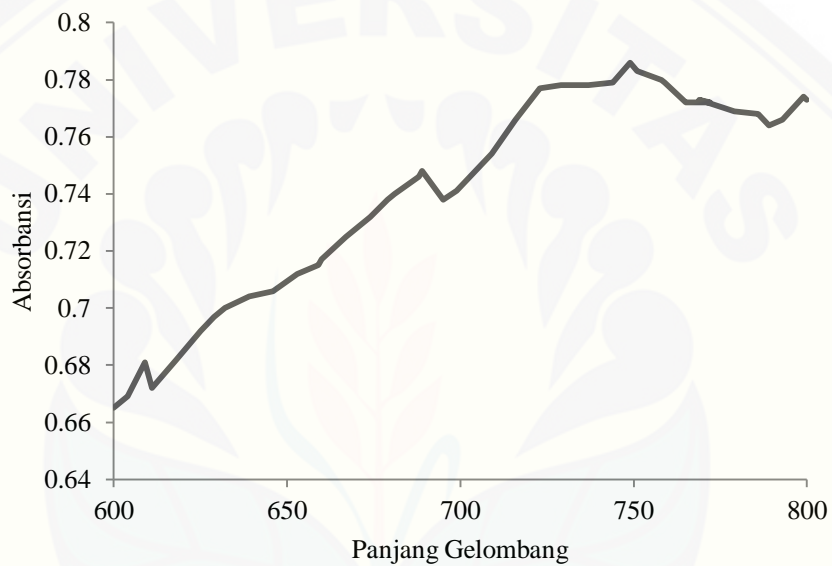
$$\text{Diencerkan } \frac{0,2 \text{ mL}}{0,005L} \times 2018 \mu\text{g/mL} = 80,72 \mu\text{g/mL}$$

Lampiran 8. Penentuan Panjang Gelombang Penetapan Kadar Fenol Total

a. Grafik

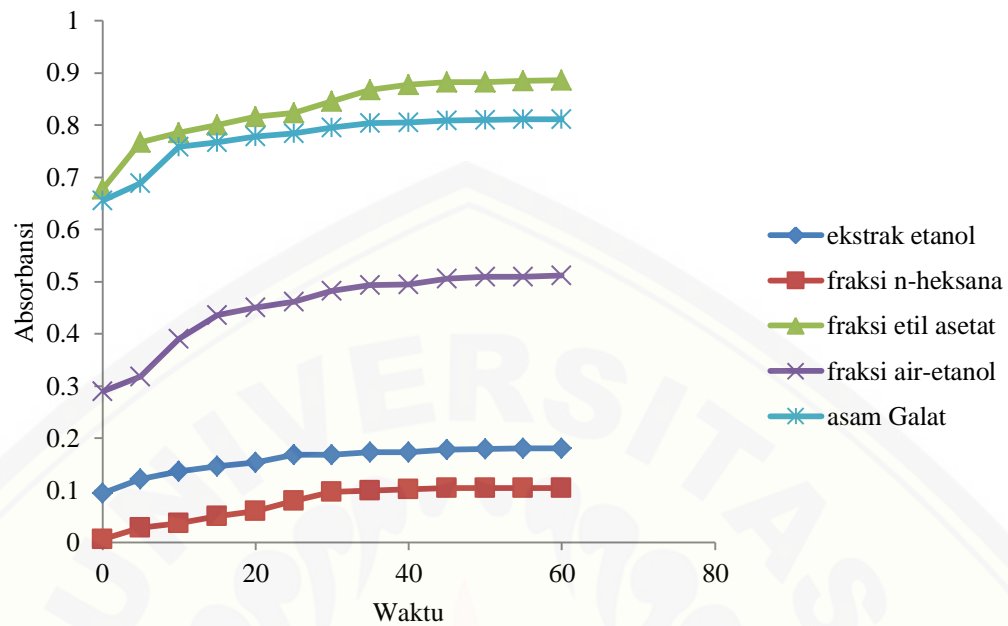
Data mode :ABS
Scan Range :800,0-600,0 nm
Slide Width :4nm
Speed (nm/min) :800 nm/min
Lamp Change Wavelength :340,0 nm

b.



WL	ABS	WL	ABS	WL	ABS
800	0,773	744	0,779	667	0,725
799	0,774	737	0,778	660	0,717
793	0,766	730	0,778	659	0,715
789	0,764	729	0,778	653	0,712
786	0,768	723	0,777	646	0,706
779	0,769	716	0,766	639	0,704
779	0,769	709	0,754	632	0,7
769	0,773	699	0,741	629	0,697
772	0,772	695	0,738	625	0,692
765	0,772	689	0,748	618	0,682
759	0,779	688	0,746	611	0,672
758	0,78	681	0,74	609	0,681
751	0,783	679	0,738	604	0,669
749	0,786	674	0,732	600	0,665

Lampiran 9. Penentuan Waktu Inkubasi Penetapan kadar Fenol Total



Waktu (menit)	asam Galat 80 $\mu\text{g/mL}$	ekstrak etanol 0,5 mg/mL	fraksi n-heksana 0,5 mg/mL	fraksi etil asetat 0,5 mg/mL	fraksi air-etanol 0,5 mg/mL
0	0,655	0,095	0,006	0,677	0,29
5	0,689	0,122	0,028	0,767	0,318
10	0,758	0,136	0,037	0,786	0,39
15	0,767	0,146	0,051	0,8	0,436
20	0,778	0,153	0,06	0,816	0,451
25	0,784	0,168	0,08	0,824	0,462
30	0,796	0,168	0,097	0,846	0,482
35	0,804	0,173	0,099	0,868	0,494
40	0,805	0,173	0,102	0,878	0,495
45	0,805	0,178	0,103	0,882	0,506
50	0,81	0,179	0,104	0,883	0,509
55	0,811	0,18	0,105	0,885	0,510
60	0,812	0,18	0,105	0,886	0,511

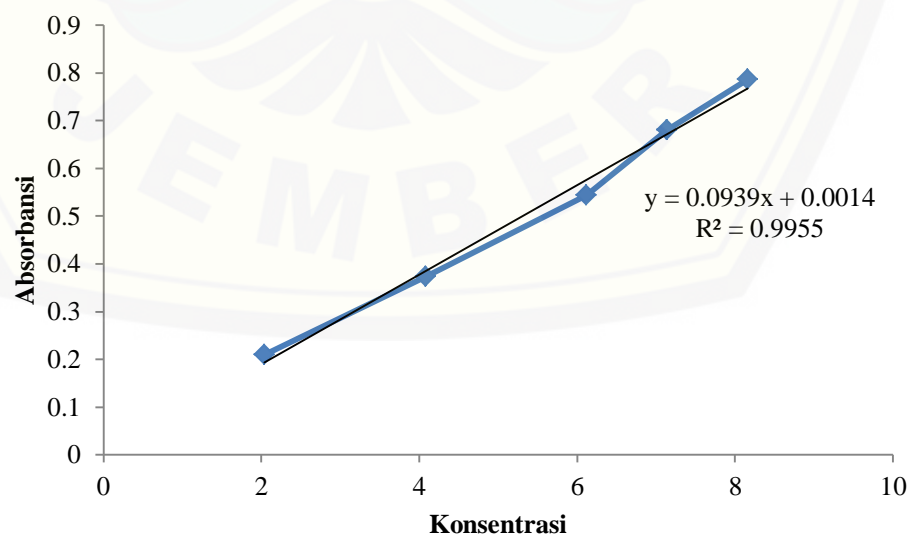
Lampiran 10. Pengukuran Kadar Fenol Total

a. Hasil Pengukuran Kadar Fenol Total

Sampel	Kadar mg GAE/g	Rata-rata (mg GAE/g)	SD	RSD%
Ekstrak Etanol	231,8303	231.83	0,814	0,350
	233,2418			
Fraksi n-heksana	231,8303	196,525	0,896	0,456
	197,0426			
	197,0426			
Fraksi etilasetat	195,4897	277,292	2,293	0,826
	275,9687			
	275,9687			
Fraksi etanol-air	279,9404	350,545	2,569	0,733
	352,0293			
	352,0293			
	347,5784			

b. Kurva Baku Standar Asam Galat

Konsentrasi	Faktor Pengenceran	Konsentrasi	Absorbansi
20,4	10	2,04	0,210
40,8	10	4,08	0,373
61,2	10	6,12	0,543
71,4	10	7,14	0,680
81,6	10	8,16	0,786



c. Perhitungan Kadar Fenol Total Sampel

– Ekstrak Etanol Herba Apu-apu

Penimbangan	Absorbansi	Konsentrasi	Massa dalam 5 mL	Massa dalam 10 mL	Kadar (mgGAE/g)
21,2	0,186	1,965	98,296	4,914	231,830
21,3	0,188	1,987	99,361	4,968	233,241
21,2	0,185	1,955	97,763	4,888	230,574

Rata-ratas Kadar (mgGAE/g) : 231,882

SD : 1,334

RSD : 0,575%

– Fraksi n-Heksana

Penimbangan	Absorbansi	Konsentrasi	Massa dalam 5 mL	Massa dalam 10 mL	Kadar (mgGAE/g)
21,7	0,163	1,720	86,048	4,302	198,269
21,5	0,162	1,710	85,516	4,275	198,875
21,6	0,160	1,689	84,451	4,222	195,489

Rata-rata Kadar (mgGAE/g) : 197,544

SD : 1,805

RSD : 0,913%

– Fraksi Etil Asetat

Penimbangan	Absorbansi	Konsentrasi	Massa dalam 5 mL	Massa dalam 10 mL	Kadar (mgGAE/g)
20,7	0,217	2,296	114,803	5,740	277,301
20,8	0,215	2,274	114,803	5,686	273,408
20,6	0,218	2,306	115,335	5,766	279,940

Rata-rata Kadar (mgGAE/g) : 276.883

SD : 3.285

RSD : 1.186%

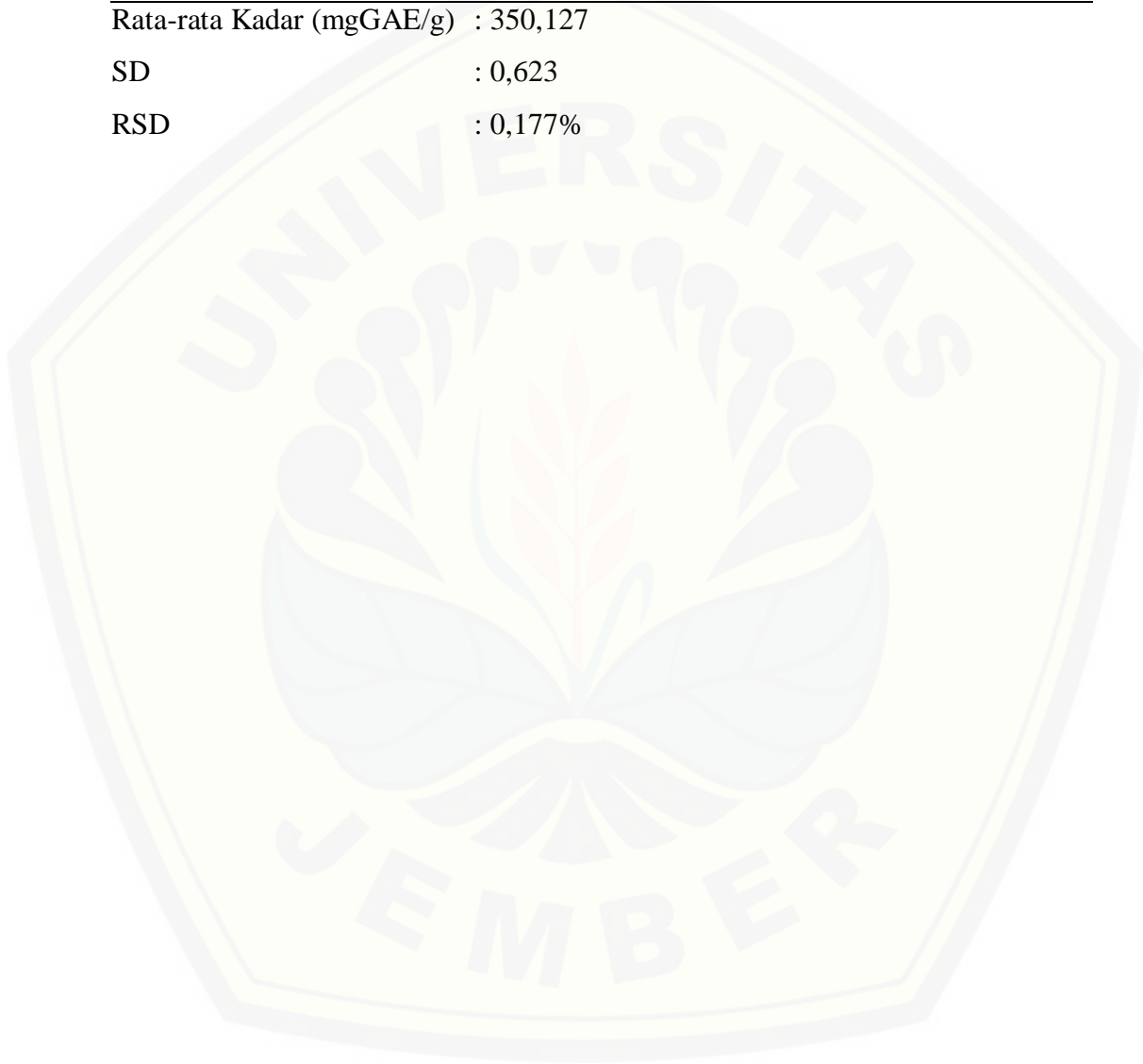
– Fraksi Etanol-Air

Penimbangan	Absorbansi	Konsentrasi	Massa dalam 5 mL	Massa dalam 10 mL	Kadar (mgGAE/g)
21,6	0,285	3,020	151,011	7,550	349,564
21,6	0,286	3,030	151,544	7,577	350,796
21,8	0,288	3,052	152,609	7,630	350,021

Rata-rata Kadar (mgGAE/g) : 350,127

SD : 0,623

RSD : 0,177%



Lampiran 11. Hasil Analisis Varian (ANOVA) Aktivitas Antioksidan (IC_{50})

Tests of Normality

	sampel	Kolmogorov-Smirnov ^a			Shapiro-Wilk		
		Statistic	df	Sig.	Statistic	df	Sig.
Ic50	vitaminC	.296	3	.	.918	3	.447
	Fraksi N-heksana	.242	3	.	.973	3	.684
	Fraksi Etilasetat	.226	3	.	.983	3	.752
	Fraksi etanol-Air	.251	3	.	.966	3	.646
	Ekstrak	.270	3	.	.948	3	.562

a. Lilliefors Significance Correction

Keterangan : Jumlah kelompok uji <50, maka yang dilihat adalah hasil Test of Normality Shapiro-Wilk. Nilai kemaknaan yang diperoleh >0,05. Ini menunjukkan bahwa distribusi data normal.

Test of Homogeneity of Variances

Ic50

Levene Statistic	df1	df2	Sig.
3.191	4	10	.062

Keterangan : Significancy Test homogeneity menunjukkan angka 0,062 ($p > 0,05$) menunjukkan bahwa tidak ada perbedaan varians antara kelompok uji yang dibandingkan dengan kata lain “variens data sama atau data homogen”

ANOVA

Ic50

	Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
Between Groups	1212.905	4	303.226	10216.751	.000
Within Groups	.297	10	.030		
Total	1213.202	14			

Keterangan : Nilai p yang diperoleh adalah 0,000 ($p < 0,05$) yang artinya “ada perbedaan yang bermakna pada nilai IC_{50} pada 4 kelompok ekstrak dan fraksi”

Multiple Comparisons

Dependent Variable: Ic50

LSD

(I) sampel	(J) sampel	Mean Difference (I-J)	Std. Error	Sig.	95% Confidence Interval	
					Lower Bound	Upper Bound
vitaminC	Fraksi N	-26.65200*	.14066	.000	-26.9654	-26.3386
	Fraksi E	-8.59367*	.14066	.000	-8.9071	-8.2802
	Fraksi A	-5.82667*	.14066	.000	-6.1401	-5.5132
	Ekstrak	-13.41167*	.14066	.000	-13.7251	-13.0982
Fraksi N	vitaminC	26.65200*	.14066	.000	26.3386	26.9654
	Fraksi E	18.05833*	.14066	.000	17.7449	18.3718
	Fraksi A	20.82533*	.14066	.000	20.5119	21.1388
	Ekstrak	13.24033*	.14066	.000	12.9269	13.5538
Fraksi E	vitaminC	8.59367*	.14066	.000	8.2802	8.9071
	Fraksi N	-18.05833*	.14066	.000	-18.3718	-17.7449
	Fraksi A	2.76700*	.14066	.000	2.4536	3.0804
	Ekstrak	-4.81800*	.14066	.000	-5.1314	-4.5046
Fraksi A	vitaminC	5.82667*	.14066	.000	5.5132	6.1401
	Fraksi N	-20.82533*	.14066	.000	-21.1388	-20.5119
	Fraksi E	-2.76700*	.14066	.000	-3.0804	-2.4536
	Ekstrak	-7.58500*	.14066	.000	-7.8984	-7.2716
Ekstrak	vitaminC	13.41167*	.14066	.000	13.0982	13.7251
	Fraksi N	-13.24033*	.14066	.000	-13.5538	-12.9269
	Fraksi E	4.81800*	.14066	.000	4.5046	5.1314
	Fraksi A	7.58500*	.14066	.000	7.2716	7.8984

*. The mean difference is significant at the 0.05 level.

Keterangan : Kelompok 1 (vitamin C), 2 fraksi N (fraksi n-heksana), 3 fraksi E (fraksi etil asetat) dan 4 fraksi A (fraksi etanol-air) 5 Ekstrak (ekstrak Etanol Herba Apu-apu). Semua nilai p yang diperoleh 0,000 ($p < 0,05$). Maka perbedaan IC50 berbeda secara bermakna pada semua kelompok fraksi.

Lampiran 12. Hasil Analisis Varian (ANOVA) Kadar Fenol Total

		Tests of Normality					
		Kolmogorov-Smirnov ^a			Shapiro-Wilk		
	Sampel	Statistic	df	Sig.	Statistic	df	Sig.
KadarFenol	Ekstrak	.182	3	.	.999	3	.936
	Fraksi N-heksana	.323	3	.	.879	3	.322
	Fraksi Etil asetat	.217	3	.	.988	3	.789
	Fraksi Etanol-Air	.234	3	.	.978	3	.717

a. Lilliefors Significance Correction

Keterangan : Jumlah kelompok uji <50, maka yang dilihat adalah hasil Test of Normality Shapiro-Wilk. Nilai kemaknaan yang diperoleh >0,05. Ini menunjukkan bahwa distribusi data normal.

Test of Homogeneity of Variances

KadarFenol

Levene Statistic	df1	df2	Sig.
2.002	3	8	.192

Keterangan : Significancy Test homogeneity menunjukkan angka 0,192 ($p > 0,05$) menunjukkan bahwa tidak ada perbedaan varians antara kelompok uji yang dibandingkan dengan kata lain “variens data sama atau data homogen”

ANOVA

KadarFenol

	Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
Between Groups	39095.039	3	13031.680	3212.540	.000
Within Groups	32.452	8	4.057		
Total	39127.491	11			

Keterangan : Nilai p yang diperoleh adalah 0,000 ($p < 0,05$) yang artinya “ada perbedaan yang bermakna pada Kadar Fenol pada 4 kelompok ekstrak dan fraksi”

Multiple Comparisons

Dependent Variable: KadarFenol

LSD

(I) Sampel	(J) Sampel	Mean Difference (I-J)	Std. Error	Sig.	95% Confidence Interval	
					Lower Bound	Upper Bound
Ekstrak	Fraksi N-heksana	34.33727 [*]	1.64449	.000	30.5451	38.1295
	Fraksi Etil asetat	-45.00146 [*]	1.64449	.000	-48.7937	-41.2093
	Fraksi Etanol-Air	-118.24509 [*]	1.64449	.000	-122.0373	-114.4529
Fraksi N-heksana	Ekstrak	-34.33727 [*]	1.64449	.000	-38.1295	-30.5451
	Fraksi Etil asetat	-79.33873 [*]	1.64449	.000	-83.1309	-75.5465
	Fraksi Etanol-Air	-152.58236 [*]	1.64449	.000	-156.3745	-148.7902
Fraksi Etil asetat	Ekstrak	45.00146 [*]	1.64449	.000	41.2093	48.7937
	Fraksi N-heksana	79.33873 [*]	1.64449	.000	75.5465	83.1309
	Fraksi Etanol-Air	-73.24363 [*]	1.64449	.000	-77.0358	-69.4514
Fraksi Etanol-Air	Ekstrak	118.24509 [*]	1.64449	.000	114.4529	122.0373
	Fraksi N-heksana	152.58236 [*]	1.64449	.000	148.7902	156.3745
	Fraksi Etil asetat	73.24363 [*]	1.64449	.000	69.4514	77.0358

*. The mean difference is significant at the 0.05 level.

Keterangan : Kelompok 1 (Ekstrak Etanol Herba Apu-apu) 2 (fraksi n-heksana), 3 (fraksi etil asetat) dan 4 (fraksi n-heksana) 5 (ekstrak Etanol Herba Apu-apu). Semua nilai p yang diperoleh 0,000 ($p < 0,05$). Maka perbedaan IC50 berbeda secara bermakna pada semua kelompok fraksi.

Lampiran 13. Hasil Korelasi

Correlations

		ic50	Fenol
ic50	Pearson Correlation	1	-.873**
	Sig. (2-tailed)		.000
	N	12	12
Fenol	Pearson Correlation	-.873**	1
	Sig. (2-tailed)	.000	
	N	12	12

** . Correlation is significant at the 0.01 level (2-tailed).

Keterangan : Data di atas didapat nilai sig 0,000 ($p < 0,05$) menunjukkan bahwa korelasi antara nilai IC50 dan fenol total adalah bermakna. Nilai negatif menunjukkan bahwa semakin tinggi fenol total maka semakin kecil nilai IC50

$$r = -0,873$$

$$r^2 = 0,762$$

$$\% = 76,6\%$$

Hasil ini menunjukkan bahwa 76,6% aktivitas antioksidan ekstrak dan fraksi etanol herba apu-apu merupakan hasil kontribusi dari senyawa-senyawa fenolik.