

**PENETAPAN KADAR FLAVONOID TOTAL DAN
AKTIVITAS ANTIOKSIDAN DARI EKSTRAK DAN FRAKSI DAUN
SALAM (*Syzygium polyanthum* (Wight.) Walp) DENGAN METODE ABTS**

Determination of Total Flavonoid Content and Antioxidant Activities of Bay leaf
(*Syzygium polyanthum* (Wight.) Walp) Extract and Fraction Using ABTS Method

SKRIPSI



Oleh :

**MARLINA APRIYANI
4161026**

**PROGRAM STUDI S1 FARMASI
SEKOLAH TINGGI ILMU KESEHATAN NASIONAL
SURAKARTA**

2020

**PENETAPAN KADAR FLAVONOID TOTAL DAN
AKTIVITAS ANTIOKSIDAN DARI EKSTRAK DAN FRAKSI DAUN
SALAM (*Syzygium polyanthum* (Wight.) Walp) DENGAN METODE ABTS**

Determination of Total Flavonoid Content and Antioxidant Activities of Bay leaf
(*Syzygium polyanthum* (Wight.) Walp) Extract and Fraction Using ABTS Method

SKRIPSI

**Diajukan untuk memenuhi salah satu syarat mencapai derajat Sarjana Farmasi (S.Farm)
pada Program Studi S1 Farmasi Sekolah Tinggi Ilmu Kesehatan Nasional di Surakarta**

Oleh :

**Marlina Apriyani
4161026**

**PROGRAM STUDI S1 FARMASI
SEKOLAH TINGGI ILMU KESEHATAN NASIONAL
SURAKARTA**

2020

SKRIPSI

**PENETAPAN KADAR FLAVONOID TOTAL DAN
AKTIVITAS ANTIOKSIDAN DARI EKSTRAK DAN FRAKSI DAUN
SALAM (*Syzygium polyanthum* (Wight.) Walp) DENGAN METODE ABTS**

Determination of Total Flavonoid Content and Antioxidant Activities of Bay leaf
(*Syzygium polyanthum* (Wight.) Walp) Extract and Fraction Using ABTS Method

Oleh :

MARLINA APRIYANI
4161026

Diperahankan di hadapan Penguji Skripsi Program Studi S1 Farmasi Sekolah
Tinggi Ilmu Kesehatan Nasional Pada tanggal : 15 Agustus 2020

Pembimbing utama



apt. Novena Yety L., S.Farm., M.Sc.

Mengetahui,

**Ketua Program Studi S1 Farmasi
Sekolah Tinggi Ilmu Kesehatan Nasional**

Pembimbing Pendamping



C.E Dhurhanía, S.Farm., M.Sc.

apt. Lusia Murtisiwi, S.Farm., M.Sc.

Tim Penguji

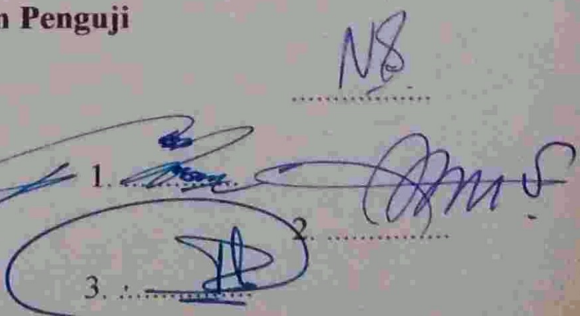
Ketua : Nastiti Utami, S. Si., M. Sc.

Anggota :

1. apt. Susilowati, S.Farm., M.Sc.

2. apt. Novena Yety L, S.Farm., M.Sc.

3. C.E Dhurhanía, S.Farm., M.Sc.



PERSEMBAHAN

Dengan menyebut nama Allah SWT
Yang maha pengasih lagi maha penyayang
'Kesuksesan bukan dilihat dari hasilnya, tapi dilihat dari prosesnya
Karena Hasil bisa direkayasa dan dibeli,
Sedangkan Proses selalu jujur menggambarkan siapa diri kita sebenarnya.
(Abdhy)

Hal yang paling menyakitkan di dunia ini adalah ketika kita tidak bisa
membahagiakan orang yang kita sayangi
(Abdhy)

Kupersembahkan kepada
Tuhan Yang Maha Esa yang senantiasa memberikan rahmat dan hidayah-Nya
Bapak Subardi dan Ibu Sarmiyati, ungkapan rasa hormat dan baktiku
Puja Lestari yang selalu menemani
Teman setia ku Anisa dan Dewi yang selalu menemani dan memberi doa
Sahabat-sahabat ku Dian, Ayu, Riska, Anggia, Indri, Rini, Indraningsih, Yachinta,
Saras yang selalu memberi doa dan semangat
Teman-teman angkatan tahun 2016 yang telah menemani perjuangan

HALAMAN PERNYATAAN

Dengan ini menyatakan bahwa dalam skripsi ini tidak terdapat karya yang pernah diajukan untuk memperoleh gelar kesarjanaan di suatu Perguruan Tinggi, dan sepanjang pengetahuan saya juga tidak terdapat karya atau pendapat yang pernah ditulis atau di terbitkan oleh orang lain, kecuali secara tertulis di acu dalam naskah ini dan disebutkan dalam daftar pustaka.

Surakarta, 13 Agustus 2020

Peneliti



(Marlina Apriyani)

KATA PENGANTAR

Puji syukur kepada Tuhan yang Maha Pengasih dan Penyayang atas segala karunia dan rahmat-Nya sehingga dapat menyelesaikan penelitian dengan judul "Penetapan Kadar Flavonoid Total dan Aktivitas Antioksidan dari Ekstrak dan Fraksi Daun Salam (*Syzygium polyanthum* (Wight.) Walp) dengan Metode ABTS" sebagai salah satu syarat menyelesaikan pendidikan Sarjana Farmasi di Program Studi S1 Farmasi Sekolah Tinggi Ilmu Kesehatan Nasional. Dalam penyusunan skripsi ini tidak terlepas dari bantuan berbagai pihak, oleh karena itu penulis mengucapkan terima kasih kepada:

1. apt. Hartono, M.Si. selaku Ketua Sekolah Tinggi Ilmu Kesehatan Nasional
2. apt. Lusia Murtisiwi, S.Farm., M.Sc. selaku Ketua Program Studi S1 Farmasi.
3. apt. Novena Yety Lindawati, S.Farm., M.Sc. dan C.E Dhurhania, S.Farm., M.Sc. selaku pembimbing yang telah membimbing penulis hingga mampu menyelesaikan Skripsi ini.
4. Nastiti Utami, S.Si., M.Sc. dan apt. Susilowati, S.Farm., M.Sc. selaku Tim penguji Skripsi.
5. Dosen S1 Farmasi yang selalu memberi dukungan motivasi dan semangat.
6. Wibowo, A.Md selaku laboran yang telah membantu menyelesaikan Skripsi.
7. Seluruh staf pengajar dan karyawan Sekolah Tinggi Ilmu Kesehatan Nasional yang telah memberikan banyak pelajaran berharga kepada penulis.

8. Keluarga dan sahabat-sahabatku yang selalu memberikan dukungan maupun doa.
9. Teman-teman angkatan 2016 yang telah berjuang bersama-sama untuk menempuh Sarjana Farmasi di STIKES Nasional

Penulis mengucapkan terimakasih kepada semua pihak yang telah membantu dalam proses menyelenggarakan skripsi ini. Penulis berharap semoga skripsi ini bermanfaat bagi pembaca.

Surakarta, 13 Agustus 2020

Marlina Apriyani

ABSTRAK

Tanaman salam (*Syzygium polyanthum* (Wight.) Walp) memiliki kandungan senyawa flavonoid yang bermanfaat sebagai antioksidan. Penelitian ini bertujuan untuk mengetahui kadar flavonoid total dan aktivitas antioksidan dari ekstrak dan fraksi daun salam serta perbedaan kadar flavonoid total dan aktivitas antioksidan antara ekstrak dan fraksi daun salam (*Syzygium polyanthum* (Wight.) Walp) dengan metode ABTS.

Daun salam diekstraksi dengan metode maserasi menggunakan pelarut etanol 70% selanjutnya dilarutkan akuades dan difraksinasi menggunakan pelarut n-heksan dan etil asetat. Penetapan kadar flavonoid menggunakan metode aluminium klorida dengan Spektrofotometri UV-Vis dan aktivitas antioksidan dilakukan berdasarkan kemampuan meredam radikal bebas *2,2'-azino-bis-(3 etilbenzotiazolin)-6 sulfonate acid* (ABTS). Analisis perbedaan kadar flavonoid total dan aktivitas antioksidan antara ekstrak dan fraksi daun salam (*Syzygium polyanthum* (Wight.) Walp) dilakukan menggunakan *One Way* Anova.

Hasil identifikasi senyawa flavonoid menunjukkan ekstrak dan fraksi daun salam mengandung senyawa flavonoid. Hasil penetapan kadar flavonoid total yang terkandung dalam ekstrak, fraksi n-heksan, fraksi etil asetat dan fraksi air berturut-turut sebesar $2,6433 \pm 0,0309$ %QE, $1,3362 \pm 0,0054$ %QE, $2,1388 \pm 0,0252$ %QE dan $2,0468 \pm 0,0242$ %QE. Hasil aktivitas antioksidan ekstrak, fraksi n-heksan, fraksi etil asetat, fraksi air menghasilkan nilai IC_{50} berturut-turut sebesar $20,0118 \pm 0,1984$ ppm, $23,2512 \pm 0,3377$ ppm, $18,3892 \pm 0,1616$ ppm dan $21,6196 \pm 0,4106$ ppm. Hasil statistik *One Way* Anova terdapat perbedaan yang signifikan ($p < 0,05$) kadar flavonoid total dan aktivitas antioksidan dari ekstrak dan fraksi daun salam.

Kata kunci : Daun Salam, Flavonoid, Antioksidan, IC_{50} , ABTS.

ABSTRACT

Bay Leaves (*Syzygium polyanthum* (Wight.) Walp) of content flavonoid compound that are beneficial as antioxidants. The research determine of total flavonoids content and antioxidant activities of bay leaf extracts and fractions differences of total flavonoids content and antioxidant activities of bay leaf (*Syzygium polyanthum* (Wight.) Walp) extracts and fractions using ABTS method.

Bay leaf of extracted using 70% ethanol solvent of maceration method than aquades solven and partition using n-hexsan and ethyl acetate solvent. Determination of flavonoids content using aluminum chloride method with UV-Vis spectrophotometry. Antioxidant activities is based the ability to free radicals 2,2'-azino-bis-(3 etilbenzotiazolin)-6 sulfonate acid (ABTS) and difference of total flavonoids content and antioxidant activities of bay leaf (*Syzygium polyanthum* (Wight.) Walp) extracts and fractions Using *One Way* Anova.

The results of identification flavonoids compounds indicate bay leaf extracts and fractions contain flavonoids compounds. The determination of total flavonoids contained in extracts, n-hexsan fraction, ethyl acetate fraction and water fraction of $2,6433 \pm 0,0309$ %QE, $1,3362 \pm 0,0054$ %QE, $2,1388 \pm 0,0252$ %QE dan $2,0468 \pm 0,0242$ %QE. The results of the antioxidant activities of extracts, n-hexsan fraction, ethyl acetate fraction, water fraction IC₅₀ value of $20,0118 \pm 0,1984$ ppm, $23,2512 \pm 0,3377$ ppm, $18,3892 \pm 0,1616$ ppm dan $21,6196 \pm 0,4106$ ppm. The statistical results of *One Way* Anova significant differences ($P < 0.05$) of total flavonoids content and antioxidant activities of bay leaf extracts and fractions.

Keywords: Bay leaf, Levels of total flavonoids, Antioxidants, IC₅₀, ABTS.

DAFTAR ISI

HALAMAN JUDUL	i
HALAMAN PENGESAHAN.....	ii
HALAMAN PERSEMBAHAN	iii
HALAMAN PERNYATAAN.....	iv
HALAMAN PENGANTAR	v
ABSTRAK	vii
ABSTRACT	viii
DAFTAR ISI.....	ix
DAFTAR GAMBAR.....	xiii
DAFTAR TABEL	xiv
DAFTAR LAMPIRAN	xv
DAFTAR SINGKATAN.....	xvii
BAB I. PENDAHULUAN.....	1
A. Latar Belakang Masalah.....	1
B. Perumusan Masalah.....	4
C. Tujuan Penelitian.....	5
D. Manfaat Penelitian	5
BAB 2. TINJAUAN PUSTAKA.....	6
A. Tanaman Salam.....	6
1. Deskripsi Tanaman.....	6
2. Kandungan Salam	7

3. Kegunaan Tanaman Salam.....	8
B. Ekstraksi dan Fraksinasi.....	8
C. Flavonoid.....	10
D. Kuersetin	12
E. Antioksidan.....	13
F. Metode ABTS	15
G. Kromatografi Lapis Tipis.....	16
H. Spektrofotometer.....	17
I. Landasan Teori	19
J. Hipotesis.....	20
K Kerangka Konsep Penelitian.....	21
BAB 3. METODE PENELITIAN.....	22
A. Desain Penelitian.....	22
B. Tempat dan Waktu Penelitian	22
C. Populasi dan Sampel	22
D. Variabel Penelitian	23
E. Definisi Operasional.....	23
F. Alat dan Bahan	24
G. Jalannya Penelitian.....	25
1. Determinasi Tanaman Salam	25
2. Persiapan Bahan	25
3. Pembuatan Serbuk.....	25
4. Susut Pengeringan	25

5. Pembuatan Ekstrak Etanol Daun Salam.....	26
6. Pembuatan Fraksi Daun Salam	26
7. Penapisan Fitokimia Flavonoid.....	27
8. Pengujian Pendahuluan Flavonoid Secara KLT.....	27
9. Penetapan Kadar Flavonoid	27
10. Penentuan Aktivitas Antioksidan	30
H. Analisis Data	33
1. Perhitungan rendemen.....	33
2. Identifikasi Flavonoid	34
3. Persamaan regresi linier	34
4. Penentuan aktivitas antioksidan	35
5. Penetapan nilai IC ₅₀	35
6. Perhitungan koefisien variasi.....	36
7. Uji Statistik.....	36
I. Alur Penelitian.....	38
BAB 4. HASIL DAN PEMBAHASAN	39
A. Determinasi Tanaman Salam	39
B. Persiapan Sampel	39
C. Pembuatan Ekstrak dan Fraksi	41
D. Penapisan Fitokimia Flavonoid.....	44
E. Identifikasi Kandungan Flavonoid dengan KLT.....	46
F. Kadar Flavonoid Total.....	49
G. Aktivitas Antioksidan	55

BAB 5. KESIMPULAN DAN SARAN	62
A. Kesimpulan	62
B. Saran	62
DAFTAR PUSTAKA	63
LAMPIRAN.....	70

DAFTAR GAMBAR

GAMBAR 1. Tanaman Daun Salam.....	6
GAMBAR 2. Struktur Flavonoid.....	10
GAMBAR 3. Tipe-Tipe Flavonoid.....	11
GAMBAR 4. Struktur Kuersetin	13
GAMBAR 5. Struktur ABTS.....	15
GAMBAR 6. Bagan Alur Penelitian.....	21
GAMBAR 7. Kerangka Konsep Penelitian	21
GAMBAR 8. Simplisia Daun Salam	40
GAMBAR 9. Pemeriksaan Fitokimia Flavonoid.....	45
GAMBAR 10. Reaksi Flavonol dengan Logam Mg dan HCl.....	46
GAMBAR 11. Profil KLT Ekstrak dan Fraksi Daun Salam.....	48
GAMBAR 12. Pembentukan Senyawa Kompleks Flavonol- $AlCl_3$	49
GAMBAR 13. Spektrum Pengukuran Panjang Gelombang Maksimum Kuersetin.....	51
GAMBAR 14. Kurva Baku Kuersetin	52
GAMBAR 15. Reaksi ABTS dengan Radikal ABTS.....	55
GAMBAR 16. Spektrum Pengukuran Panjang Gelombang Maksimum ABTS	56
GAMBAR 17. Hubungan konsentrasi dengan % inhibisi Kuersetin.....	56
GAMBAR 18. Hubungan konsentrasi dengan % inhibisi replikasi 1.....	57
GAMBAR 19. Hubungan Konsentrasi dengan % Inhibisi replikasi 2	57
GAMBAR 20. Hubungan konsentrasi dengan % inhibisi replikasi 3.....	57

DAFTAR TABEL

Tabel 1. Penggolongan Tingkat Aktivitas Antioksidan	14
Tabel 2. Susut Pengeringan Daun Salam	41
Tabel 3. Hasil Rendemen Ekstrak Etanol Daun Salam.....	42
Tabel 4. Hasil Rendemen Fraksi	43
Tabel 5. Hasil Pemeriksaan Fitokimia Flavonoid dari Ekstrak dan Fraksi.....	44
Tabel 6. Tabel Nilai <i>Retardation factor</i>	48
Tabel 7. Kadar Flavonoid Ekstrak dan Fraksi Daun Salam.....	53
Tabel 8. Nilai IC_{50} Ekstrak Etanol Daun Salam	58
Tabel 9. Nilai IC_{50} Ekstrak Etanol Daun Salam	59
Tabel 10. Nilai IC_{50} Ekstrak Etanol Daun Salam	60
Tabel 11. Nilai IC_{50} Ekstrak Etanol Daun Salam	61

DAFTAR LAMPIRAN

Lampiran 1. Surat Keterangan Determinasi.....	74
Lampiran 2. Data <i>One Way</i> ANOVA Penetapan Kadar	77
Lampiran 3. Data <i>One Way</i> ANOVA Antioksidan.....	79
Lampiran 4. Perhitungan Rendemen Ekstrak Daun Salam.....	81
Lampiran 5. Perhitungan Rendemen Fraksi Daun Salam.....	82
Lampiran 6. Perhitungan KLT Nilai <i>Reterdation factor</i>	85
Lampiran 7. Perhitungan Bahan.....	86
Lampiran 8. Kurva Baku Kuersetin	90
Lampiran 9. Kadar Flavonoid Ekstrak Daun Salam	91
Lampiran 10. Kadar Flavonoid Fraksi n-heksan Daun Salam	93
Lampiran 11. Kadar Flavonoid Fraksi etil asetat Daun Salam	95
Lampiran 12. Kadar Flavonoid Fraksi air Daun Salam	97
Lampiran 13. Kurva dan Data Perhitungan Kuersetin.....	99
Lampiran 14. Kurva dan Data Perhitungan IC ₅₀ Ekstrak Daun Salam.....	100
Lampiran 15. Kurva dan Data Perhitungan IC ₅₀ Fraksi n-heksan Daun Salam...106	
Lampiran 16. Kurva dan Data Perhitungan IC ₅₀ Fraksi etil asetat Daun Salam112	
Lampiran 17. Kurva dan Data Perhitungan IC ₅₀ Fraksi air Daun Salam	118
Lampiran 18. <i>Operating Time</i> (OT) Kuersetin	124
Lampiran 19. <i>Operating Time</i> (OT) ABTS	125
Lampiran 20. Panjang Gelombang Maksimum Kuersetin.....	126
Lampiran 21. Panjang Gelombang Maksimum ABTS	127
Lampiran 22. Pembuatan Simplisia	128

Lampiran 23. Pembuatan Ekstrak Daun Salam.....	129
Lampiran 24. Pembuatan Fraksi Daun Salam.....	130
Lampiran 25. Skrining fitokimia dan KLT	131
Lampiran 26. Dokumentasi Alat dan Bahan	132

DAFTAR SINGKATAN

IC ₅₀	<i>Inhibition Concentratin 50%</i>
KLT	Kromatografi Lapis Tipis
ABTS	<i>2,2'-azino-bis-(3 etilbenzotiazolin)-6 sulfonate acid</i>
Rf	<i>Reterdation factor</i>

BAB I

PENDAHULUAN

A. Latar Belakang Masalah

Pola hidup masyarakat di era modern berdampak pada munculnya berbagai penyakit degeneratif yang berhubungan erat dengan radikal bebas diantaranya adalah kanker, penyakit jantung, penyakit kardiovaskuler, katarak, alzheimer, dan parkinson (Blanco, 2013). Radikal bebas merupakan molekul yang tidak stabil dan sangat reaktif, karena terdapat satu atau lebih elektron yang tidak memiliki pasangan sehingga radikal bebas mudah menarik atau berikatan dengan atom yang lain pada sel-sel dalam tubuh (Neldawati, 2013). Radikal bebas eksogen dapat berasal dari polusi dan debu (Septiana dkk., 2002).

Tubuh memerlukan substansi penting yaitu antioksidan yang dapat membantu melindungi tubuh dari serangan radikal bebas dengan cara meredam dampak negatif dari senyawa radikal bebas. Antioksidan merupakan suatu substansi yang diperlukan tubuh untuk menetralkan radikal bebas dan mencegah kerusakan yang ditimbulkan oleh radikal bebas terhadap sel-sel normal, protein, lemak dan antioksidan memiliki kemampuan mendonorkan elektron untuk menstabilkan radikal bebas. Antioksidan dapat diproduksi dari dalam dan luar tubuh (Winarsih, 2007).

Antioksidan yang diproduksi di dalam tubuh ada tiga enzim, yaitu superoksida dismutase (SOD), glutathion peroksidase (GSH Px), dan katalase (Huang *et al.*, 2005). Antioksidan yang diproduksi dari luar tubuh berasal dari

makanan. Beberapa bahan alam seperti tanaman dan buah-buahan terbukti bermanfaat melindungi tubuh dari bahaya radikal bebas karena bersifat antioksidan (Rohman dan Riyanto, 2006).

Sumber antioksidan alami salah satunya berasal dari tumbuhan dan umumnya merupakan senyawa metabolit sekunder yang telah diisolasi dari berbagai jenis tumbuhan dan bermanfaat sebagai bahan baku obat-obatan (Sitorus *et al.*, 2013). Senyawa fenolik seperti flavonoid memiliki aktivitas antioksidan yang disebabkan adanya gugus hidroksi fenolik dalam struktur molekulnya, senyawa ini bereaksi dengan radikal bebas dapat membentuk radikal baru yang stabil dengan adanya efek resonansi pada inti aromatik (Winarsih, 2007). Kemampuan flavonoid sebagai antioksidan telah banyak diteliti belakangan tahun ini, kemampuan yang dimiliki flavonoid untuk mereduksi radikal bebas dan juga sebagai anti radikal bebas. Senyawa flavonoid pada tanaman yang memiliki antioksidan alami salah satunya adalah tanaman salam (Sumono dan Mulan, 2009).

Tanaman salam (*Syzygium polyanthum* (Wight.) Walp) memiliki kandungan flavonoid yang mempunyai manfaat diantaranya adalah antioksidan, antiinflamasi, antimikroba dan antifungi. Penelitian tentang potensi daun salam sudah banyak dilakukan. Ekstrak daun salam mengandung senyawa aktif berupa alkaloid, flavonoid, saponin, tanin dan steroid (Evendi, 2017).

Ekstrak etanol daun salam pada dosis 2,62 mg/20 g BB dan 5,24 mg/20 g BB dapat menurunkan kadar glukosa darah mencit jantan yang diinduksi dengan aloksan karena daun salam mengandung flavonoid yang dapat menangkap radikal

bebas (Studiawan dan Santosa, 2005). Hasil penelitian Rivai., dkk (2019) menyatakan bahwa kadar flavonoid total pada ekstrak etanol daun salam sebesar 0,512 %. Fraksi etil asetat daun salam memiliki kandungan senyawa metabolit sekunder yaitu flavonoid, tanin, fenolik dan triterpenoid (Indah, 2015). Menurut Wirawan (2018) fraksi etil asetat daun salam pada dosis 200 mg/kgBB dapat menurunkan kadar kolesterol karena adanya kandungan senyawa flavonoid yang bersifat sebagai antioksidan.

Iqbal dan Kusumawati (2011) melaporkan bahwa beberapa tanaman genus *Syzygium* berpotensi sebagai antioksidan. Hasil penelitian tersebut menunjukkan bahwa ekstrak etanol daun salam yang diuji aktivitas antioksidan menggunakan metode DPPH memiliki aktivitas antioksidan paling baik dengan metode maserasi dengan nilai IC_{50} sebesar 35,057 ppm (Verawati, dkk., 2017). Uji aktivitas antioksidan pada penelitian ini menggunakan metode ABTS [(2,2'-azino-bis (3-ethylbenzothiazoline-6-sulphonic acid)]. Pengukuran aktivitas antioksidan dilakukan berdasarkan penghilangan warna ABTS yang semula berwarna biru hijau berubah menjadi tidak berwarna apabila tereduksi oleh radikal bebas. Aktivitas antioksidan metode ABTS lebih sensitif (99,55%) dari metode DPPH dengan aktivitas yang sedikit lebih rendah (95,3%) dan juga metode ABTS dapat digunakan pada tingkat pH yang berbeda sedangkan DPPH sensitif terhadap pH asam. Metode ABTS dapat dilarutkan dalam pelarut organik maupun air sehingga bisa mendeteksi senyawa yang bersifat lipofilik maupun hidrofilik (Shalaby *et al.*, 2013). Beberapa penelitian menunjukkan adanya perbedaan kadar total flavonoid dan aktivitas antioksidan antara ekstrak dan fraksi daun salam.

Berdasarkan uraian di atas, penetapan kadar flavonoid total dan aktivitas antioksidan dari ekstrak dan fraksi daun salam (*Syzygium polyanthum* (Wight.) Walp) dengan metode ABTS belum pernah dilakukan sebelumnya, maka perlu dilakukan penelitian tentang penetapan kadar flavonoid total dan aktivitas antioksidan dari ekstrak dan fraksi daun salam (*Syzygium polyanthum* (Wight.) Walp) dengan metode ABTS.

B. Perumusan Masalah

Rumusan masalah penelitian ini adalah :

1. Berapa kadar flavonoid total dari ekstrak dan fraksi daun salam (*Syzygium polyanthum* (Wight.) Walp) ?
2. Berapa nilai IC_{50} antioksidan dari ekstrak dan fraksi daun salam (*Syzygium polyanthum* (Wight.) Walp) dengan metode ABTS ?
3. Apakah ada perbedaan kadar flavonoid total dan aktivitas antioksidan antara ekstrak dan fraksi daun salam (*Syzygium polyanthum* (Wight.) Walp) ?

C. Tujuan Penelitian

Tujuan penelitian ini adalah :

1. Mengetahui kadar flavonoid total dari ekstrak dan fraksi daun salam (*Syzygium polyanthum* (Wight.) Walp).
2. Mengetahui nilai IC_{50} antioksidan dari ekstrak dan fraksi daun salam (*Syzygium polyanthum* (Wight.) Walp) dengan metode ABTS.

3. Mengetahui adanya perbedaan kadar flavonoid total dan aktivitas antioksidan antara ekstrak dan fraksi daun salam (*Syzygium polyanthum* (Wight.) Walp) menggunakan metode ABTS.

D. Manfaat Penelitian

Manfaat penelitian ini adalah :

1. Memberikan informasi kepada masyarakat tentang penetapan kadar flavonoid total dan aktivitas antioksidan antara ekstrak dan fraksi daun salam (*Syzygium polyanthum* (Wight.) Walp) dalam pengembangan obat tradisional.
2. Menambah sumber data ilmiah atau rujukan bagi penelitian selanjutnya.

BAB III

METODE PENELITIAN

A. Desain Penelitian

Penelitian yang dilakukan merupakan jenis penelitian eksperimental karena adanya intervensi perlakuan dalam proses penyarian yaitu dalam bentuk ekstraksi dan fraksinasi.

B. Tempat dan Waktu Penelitian

Penelitian dilakukan di Laboratorium Teknologi Farmasi Bahan Alam dan Sintesis Obat Sekolah Tinggi Ilmu Kesehatan Nasional pada bulan Januari 2020 sampai Juli 2020. Determinasi tanaman salam dilakukan di Laboratorium Biologi Fakultas MIPA Universitas Muhammadiyah Surakarta.

C. Populasi dan Sampel

Populasi dalam penelitian ini adalah tanaman salam yang diperoleh dari Dusun 7 Desa Sidoharjo, Sumatra Selatan. Sampel dalam penelitian ini adalah daun salam dari tanaman salam yang tumbuh di pekarangan rumah di Dusun 7 Desa Sidoharjo, Sumatra Selatan. Teknik pengambilan sampel yang digunakan adalah *purposive sampling* yaitu teknik pengambilan sampel dan didasarkan pada suatu ketentuan atau pertimbangan tertentu yang dibuat oleh peneliti sendiri, berdasarkan ciri atau sifat-sifat populasi yang sudah diketahui sebelumnya.

Penelitian ini menggunakan daun salam yang berwarna hijau gelap, daun yang utuh dan bersih, tidak berlubang atau sobek – sobek.

D. Variabel Penelitian

1. Variabel bebas dalam penelitian ini adalah cara penyarian sampel dengan metode ekstraksi dan fraksinasi.
2. Variabel tergantung dalam penelitian ini adalah kadar flavonoid total dan aktivitas antioksidan antara ekstrak dan fraksi daun salam.
3. Variabel terkontrol dalam penelitian ini adalah kualitas bahan, penetapan waktu kestabilan serapan, dan alat.

E. Definisi Operasional

Definisi operasional yang digunakan untuk mengetahui kadar flavonoid total dan aktivitas antioksidan dari ekstrak dan fraksi daun salam adalah:

1. Ekstrak etanol daun salam adalah ekstrak yang diperoleh dari ekstraksi simplisia daun salam dengan metode maserasi dengan pelarut etanol 70%.
2. Fraksinasi merupakan proses pemisahan senyawa berdasarkan tingkat kepolaran. Fraksi daun salam (*Syzygium polyanthum* (Wight.) Walp) diperoleh dari partisi (ekstraksi cair-cair) ekstrak etanol daun salam yang dilarutkan dengan akuades menggunakan pelarut berturut-turut n-heksan dan etil asetat.
3. Kadar flavonoid total merupakan kadar flavonoid dalam sampel yang dinyatakan sebagai ekuivalen kuersetin (*QE*). Kadar flavonoid total didapatkan dari perhitungan menggunakan rumus total flavonoid. Kadar flavonoid dalam

sampel (sumbu x) diketahui dengan memasukkan absorbansi sampel ke dalam sumbu y pada persamaan regresi linier kuersetin (Desmiaty, dkk, 2009).

4. *Inhibition Concentration 50% (IC₅₀)* yaitu konsentrasi sampel yang dapat meredam radikal ABTS sebanyak 50%. Nilai *IC₅₀* digunakan untuk menentukan aktivitas antioksidan yang dihitung menggunakan rumus persamaan regresi.

F. Alat dan Bahan

Alat yang digunakan dalam penelitian ini adalah spektrofotometer UV-Vis (Shimadzu UV mini-1240), moisture balance (Ohaus MB 120), rotary evaporator (IKA HB 10 basic), timbangan analitik (Ohaus EP 214 sensitivitas 0,1 mg), blender (Philips), corong pisah (pyrex), gelas ukur (pyrex), labu ukur (pyrex), pipet volume (pyrex), pengayak 40 mesh, pipet tetes, cawan porselin, tabung reaksi, batang pengaduk, chamber, gelas beaker (pyrex).

Bahan yang digunakan dalam penelitian ini adalah daun salam, etanol 70% (Medika), n-heksan (Merck®), etil asetat (Merck®), metanol p.a (Merck®), akuades, kuersetin (Sigma Aldrich), AlCl₃ (Aluminium klorida) (Merck®), natrium asetat (Merck®), reagen ABTS (Sigma Aldrich®), PBS (Phosfat Buffer Saline), K₂S₂O₈ (Kalium persulfat), serbuk magnesium timbal (III) asetat, HCL (Merck®).

G. Jalannya Penelitian

1. Determinasi tanaman salam

Tahap pertama dalam penelitian ini adalah memastikan kebenaran tanaman salam berkaitan dengan ciri-ciri morfologisnya yang ada pada tanaman salam. Determinasi tanaman salam dilakukan di Laboratorium Biologi Fakultas MIPA Universitas Muhammadiyah Surakarta.

2. Persiapan bahan

Daun salam yang diperoleh di Dusun 7 Desa Sidoharjo, Sumatra Selatan selanjutnya dilakukan penyortiran lalu dicuci dengan air mengalir dan ditiriskan, kemudian dikeringkan di bawah sinar matahari dengan kondisi ditutup kain hitam (Wicaksono dan Ulfah, 2017).

3. Pembuatan serbuk

Daun salam yang sudah kering kemudian dijadikan sediaan serbuk dengan menggunakan blender. Serbuk diayak menggunakan pengayak ukuran 40 mesh. Hasilnya disimpan dalam wadah kering dan tertutup (Wicaksono dan Ulfah, 2017).

4. Susut pengeringan

Susut pengeringan serbuk daun salam dilakukan dengan alat *moisture balance*. Serbuk daun salam dimasukkan sebanyak 2,0 gram pada suhu 105⁰C selama 5 menit dan nilai susut kadar air muncul pada alat dalam satuan persen (%) terhadap bobot awal (Wicaksono dan Ulfah, 2017).

5. Pembuatan ekstrak etanol daun salam

Ekstrak daun salam dibuat dengan mengekstraksi 300,0 gram serbuk daun salam dalam bejana maserasi dengan pelarut etanol 70% sebanyak 2250,0 mL dengan perbandingan 1:7,5 yaitu 1 bagian simplisia dimasukkan dalam 7,5 bagian cairan penyari, didiamkan selama 3 hari dengan dilakukan pengadukan 1 kali dalam sehari. Hasil maserat disaring dengan kain flanel kemudian residu direndam kembali dengan 750,0 mL etanol didiamkan selama 1 hari. Hasil maserat yang diperoleh dari maserasi tahap pertama dan kedua disaring dan dipekatkan dengan *vacum rotary evaporator* yang diatur dengan kecepatan putaran 200 rpm dengan suhu 50⁰C, hingga diperoleh ekstrak kental daun salam. Pembuatan ekstrak dilakukan replikasi 3 kali (Wicaksono dan Ulfah, 2017).

6. Pembuatan fraksi daun salam

a. Pembuatan fraksi n-heksan daun salam

Ekstrak etanol daun salam ditimbang seksama 30,0 gram, dilarutkan dalam 30,0 mL air hangat lalu diaduk sampai homogen dan difraksinasi dengan n-heksan sebanyak 30,0 mL, dengan pengulangan 3 kali menggunakan corong pisah. Sari n-heksan dikumpulkan kemudian dipekatkan dengan *waterbath* pada suhu 50⁰C. Sari n-heksan yang sudah pekat disebut fraksi n-heksan. Pembuatan fraksi dilakukan replikasi 3 kali (Maravirnadita, 2019).

b. Pembuatan fraksi etil asetat dan fraksi air daun salam

Residu sisa fraksinasi n-heksan kemudian ditambah etil asetat (1:1), difraksinasi menggunakan corong pisah, dengan pengulangan 3 kali. Sari etil asetat dikumpulkan kemudian dipekatkan dengan *waterbath* pada suhu 50⁰ C.

Sari etil asetat yang sudah pekat disebut fraksi etil asetat. Residu sisa fraksinasi etil asetat disebut fraksi air. Pembuatan fraksi dilakukan replikasi 3 kali (Maravirnadita, 2019).

7. Penapisan fitokimia flavonoid

Ekstrak dan fraksi daun salam sebanyak 1,0 mL diuapkan hingga kering, ditambahkan 1,0 mL etanol, kemudian ditambah sedikit serbuk magnesium dan 2,0 mL asam klorida 5 M. Warna merah hingga merah lembayung menunjukkan adanya senyawa flavonol, flavanon, flavonolol dan dihidroflavonol (Hanani, 2017).

8. Pengujian pendahuluan flavonoid secara KLT

Ekstrak etanol daun salam, fraksi daun salam dan pembanding kuersetin yang telah dilarutkan dengan etanol 70%, ditotolkan bersama-sama pada lempeng kromatografi lapis tipis (KLT) dengan fase diam silika gel dan fase gerak etil asetat : metanol (3:1). Bercak kromatogram yang dihasilkan diamati dengan sinar ultraviolet 254 nm dan 366 nm, sebelum dan setelah disemprot dengan AlCl_3 5%. Bercak dengan fluoresensi warna kuning menunjukkan adanya flavonoid (Markham, 1988).

9. Penetapan kadar flavonoid

a. Pembuatan reagen penetapan kadar flavonoid total

Penetapan kadar flavonoid total yang mengacu pada prosedur Chang *et al.*, (2002) dan Ahmad *et al.*, (2014) dengan beberapa modifikasi kuersetin sebagai standar.

1) Pembuatan larutan AlCl_3 10%

Serbuk AlCl_3 ditimbang seksama 5,0 gram dan dimasukkan ke dalam beaker glass kemudian dilarutkan dengan sebagian akuades hingga larut sempurna ke dalam labu ukur 50,0 mL dan ditambah akuades sampai tanda batas.

2) Pembuatan natrium asetat 1 M

Natrium asetat ditimbang seksama 1,0 gram dan dimasukkan ke dalam beaker glass kemudian dilarutkan dengan sebagian akuades hingga larut sempurna, masukkan ke dalam labu ukur 10,0 mL dan ditambah akuades hingga tanda batas.

3) Pembuatan larutan blangko

Larutan AlCl_3 10% sebanyak 0,2 mL dan ditambahkan 0,2 mL natrium asetat 1 M ke dalam labu ukur 10,0 mL ditambah akuades sampai tanda batas.

4) Pembuatan larutan induk 1000 ppm

Larutan baku induk 1000 ppm dibuat dengan cara menimbang 25,0 mg kuersetin secara seksama dan dilarutkan dengan metanol p.a hingga volume 25,0 mL.

b. Preparasi larutan baku kuersetin

Larutan baku kerja kuersetin dengan deret konsentrasi 10 ppm, 15 ppm, 20 ppm, 25 ppm dan 30 ppm dibuat dari larutan baku induk yang dipipet 0,1 mL, 0,15 mL, 0,20 mL, 0,25 mL dan 0,30 mL. Tiap seri konsentrasi dipipet 1,0 mL ditambahkan 3,0 mL metanol p.a, 0,2 mL AlCl_3

10%, 0,2 mL natrium asetat 1 M dan ditambahkan akuades dalam labu ukur 10,0 mL setelah itu diinkubasi selama 26 menit pada suhu kamar dan ukur absorbansinya pada spektrofotometri Uv-Vis pada panjang 440 nm.

c. Penentuan *Operating Time* (OT)

Absorbansi larutan baku kerja kuersetin 15 ppm dipipet 1,0 mL ditambahkan 3,0 mL metanol p.a, 0,2 mL $AlCl_3$ 10%, 0,2 mL natrium asetat 1 M dan ditambahkan akuades dalam labu ukur 10,0 mL diukur pada panjang gelombang maksimum teoritis 440 nm dengan interval waktu 1 menit hingga diperoleh absorbansi stabil. *Operating time* (OT) tercapai pada waktu dihasilkan absorbansi yang stabil (Indrayani, 2008).

d. Penentuan panjang gelombang maksimum (λ_{maks}) kuersetin

Larutan baku kerja konsentrasi 20 ppm dipipet 1,0 mL ditambahkan 3,0 mL metanol p.a, 0,2 mL $AlCl_3$ 10%, 0,2 mL natrium asetat 1 M dan ditambahkan akuades dalam labu ukur 10,0 mL, diukur serapannya pada rentang panjang gelombang 400-500 nm pada waktu tercapainya *Operating Time*. Panjang gelombang yang menunjukkan nilai serapan tertinggi merupakan panjang gelombang maksimum (Kusuma, 2012).

e. Pembuatan kurva baku kuersetin

Kurva baku dibuat dengan menghubungkan konsentrasi larutan baku kerja 10 ppm, 15 ppm, 20 ppm, 25 ppm, dan 30 ppm dengan hasil serapan yang diperoleh dari pengukuran dengan menggunakan spektrofotometri UV-Vis pada panjang gelombang maksimum 440,6 nm pada menit ke- 26 (Ahmad *et al.*, 2015).

f. Penetapan kadar flavonoid total

Ekstrak dan fraksi daun salam masing- masing ditimbang seksama 100,0 mg dilarutkan dengan 10,0 mL metanol p.a. Larutan sampel dipipet 1,0 mL diencerkan dengan metanol p.a dalam labu ukur 10,0 mL, kemudian diambil 1,0 mL ditambah dengan 3,0 mL metanol p.a ditambahkan 0,2 mL AlCl_3 10%, 0,2 mL natrium asetat 1 M dan ditambahkan akuades dalam labu ukur 10,0 mL. Campuran dikocok homogen lalu dibiarkan selama 26 menit yang diperoleh diukur serapannya menggunakan spektrofotometer UV-Vis pada panjang gelombang maksimum 440,6 nm (Ahmad *et al.*, 2015).

10. Penentuan aktivitas antioksidan

a. Pembuatan larutan

- 1) Larutan ABTS : ABTS (7 mM) ditimbang seksama sebanyak 18,0 mg dilarutkan ke dalam akuades dalam labu ukur 5,0 mL.
- 2) Larutan $\text{K}_2\text{S}_2\text{O}_8$: Kalium persulfat (2,45 mM) ditimbang seksama 14,0 mg dilarutkan ke dalam akuades dalam botol sampai 20,0 mL.
- 3) Larutan PBS pH 7,4 : Natrium klorida ditimbang seksama 8,0 g, 0,2 g kalium klorida, 1,42 g natrium hidrogen fosfat, 0,24 kalium dihidrogen fosfat dilarutkan dalam akuades sampai 1,0 L.
- 4) Larutan radikal ABTS : Larutan ABTS sebanyak 5,0 mL ditambahkan 5 mL larutan kalium persulfat, diinkubasi dalam ruang gelap suhu 22-24⁰C selama 12-16 jam, dihasilkan radikal ABTS dengan warna biru gelap. Larutan yang diperoleh digunakan sebagai larutan kontrol.

- 5) Larutan blangko : Kalium persulfat sebanyak 5,0 mL ditambahkan dengan 5,0 mL akuades diinkubasi dalam ruang gelap suhu 22⁰C - 24⁰C selama 12-16 jam.

b. Penentuan *Operating Time*

Larutan baku kerja kuersetin 15 ppm, dipipet sebanyak 0,1 mL larutan ditambah 2,0 mL larutan radikal ABTS diukur pada panjang gelombang maksimum teoritis 734 nm dengan interval waktu 1 menit hingga diperoleh absorbansi stabil. *Operating time* (OT) tercapai pada waktu dihasilkan absorbansi yang stabil (Rosidah dkk., 2008).

c. Pengukuran panjang gelombang maksimum dengan metode ABTS

Larutan radikal ABTS dipipet sebanyak 1,0 mL dan dicukupkan dengan PBS pH 7,4 dalam labu ukur 25,0 mL. Absorbansi larutan diukur pada rentang panjang gelombang 700-750 nm, tentukan panjang gelombang pada serapan tertinggi (Pulungan, 2018).

d. Pengukuran aktivitas antioksidan metode ABTS dengan baku kuersetin

Larutan baku kerja kuersetin dengan konsentrasi 5 ppm, 10 ppm, 15 ppm, 20 ppm, dan 25 ppm dipipet masing-masing sebanyak 0,25 mL, 0,5 mL, 0,75 mL, 1,0 mL dan 1,5 mL lalu dimasukkan ke dalam labu ukur 5,0 mL kemudian ditambahkan metanol p.a sampai tanda batas. Larutan yang diperoleh masing-masing dipipet sebanyak 0,1 mL lalu ditambah 2,0 mL larutan radikal ABTS. Larutan diinkubasi selama selama 6 menit dan diukur serapan dengan spektrofotometri UV-Vis pada panjang gelombang 734 nm (Faisal, 2019).

e. Pengukuran aktivitas antioksidan ekstrak etanol dengan metode ABTS

Ekstrak etanol ditimbang seksama sebanyak 10,0 mg dilarutkan dengan metanol p.a dalam labu ukur 10,0 mL kemudian dipipet masing-masing sebanyak 0,25 mL, 0,5 mL, 0,75 mL, 1,0 mL dan 1,25 mL ke dalam labu ukur 10,0 mL kemudian ditambahkan metanol p.a sampai tanda batas hingga diperoleh deret konsentrasi 5 ppm, 10 ppm, 15 ppm, 20 ppm, dan 25 ppm. Masing-masing konsentrasi dipipet sebanyak 0,1 mL ditambah 2,0 mL larutan radikal ABTS. Larutan diinkubasi selama 6 menit dan diukur serapan dengan spektrofotometri UV-Vis pada panjang gelombang 734 nm (Faisal, 2019).

f. Pengukuran aktivitas antioksidan fraksi n-heksan dengan metode ABTS

Fraksi n-heksan ditimbang seksama sebanyak 10,0 mg dilarutkan dengan metanol p.a dalam labu ukur 10,0 mL kemudian dipipet masing-masing sebanyak 0,25 mL, 0,5 mL, 0,75 mL, 1,0 mL dan 1,25 mL ke dalam labu ukur 10,0 mL kemudian ditambahkan metanol p.a sampai tanda batas hingga diperoleh deret konsentrasi 5 ppm, 10 ppm, 15 ppm, 20 ppm, dan 25 ppm. Masing-masing konsentrasi dipipet sebanyak 0,1 mL ditambah 2,0 mL larutan radikal ABTS. Larutan diinkubasi selama 6 menit dan diukur serapan dengan spektrofotometri UV-Vis pada panjang gelombang 734 nm (Faisal, 2019).

g. Pengukuran aktivitas antioksidan fraksi etil asetat dengan metode ABTS

Fraksi etil asetat ditimbang seksama sebanyak 10,0 mg dilarutkan dengan metanol p.a dalam labu ukur 10,0 mL kemudian dipipet masing-

masing sebanyak 0,25 mL, 0,5 mL, 0,75 mL, 1,0 mL dan 1,25 mL ke dalam labu ukur 10,0 mL kemudian ditambahkan metanol p.a sampai tanda batas hingga diperoleh deret konsentrasi 5 ppm, 10 ppm, 15 ppm, 20 ppm, dan 25 ppm. Masing-masing konsentrasi dipipet sebanyak 0,1 mL ditambah 2,0 mL larutan radikal ABTS. Larutan diinkubasi selama 6 menit dan diukur serapan dengan spektrofotometri UV-Vis pada panjang gelombang 734 nm (Faisal, 2019).

h. Pengukuran aktivitas antioksidan fraksi air dengan metode ABTS

Fraksi air ditimbang seksama sebanyak 10,0 mg dilarutkan dengan metanol p.a dalam labu ukur 10,0 mL kemudian dipipet masing-masing sebanyak 0,25 mL, 0,5 mL, 0,75 mL, 1,0 mL dan 1,25 mL ke dalam labu ukur 10,0 mL kemudian ditambahkan metanol p.a sampai tanda batas hingga diperoleh deret konsentrasi 5 ppm, 10 ppm, 15 ppm, 20 ppm, dan 25 ppm. Masing-masing konsentrasi dipipet sebanyak 0,1 mL ditambah 2,0 mL larutan radikal ABTS. Larutan diinkubasi selama 6 menit dan diukur serapan dengan spektrofotometri UV-Vis pada panjang gelombang 734 nm (Faisal, 2019).

H. Analisis Data

1. Perhitungan rendemen

Ekstrak dan fraksi kental yang diperoleh kemudian dihitung rendemennya dengan rumus.

$$\% \text{ Rendemen} = \frac{\text{bobot yang diperoleh}}{\text{bobot bahan awal}} \times 100\%$$

2. Identifikasi flavonoid

Ekstrak dan fraksi daun salam dianalisis dengan KLT dan pereaksi warna. Flavonoid dengan KLT diidentifikasi dengan penyemprotan AlCl_3 yang akan memberikan berwarna kuning. Uji reagen dengan etanol dan serbuk magnesium ditambah dengan asam klorida setelah berwarna merah sampai lembayung berarti positif mengandung flavanoid (Hanani, 2017).

3. Persamaan regresi linier

Kadar flavanoid dihitung menggunakan persamaan regresi linier berdasarkan kurva kalibrasi hasil pembacaan dari alat spektrofotometri UV-Vis. Data absorbansi yang diperoleh dari pengukuran dimasukkan ke dalam persamaan regresi linier sebagai y, dan nilai x sebagai konsentrasi larutan baku. Persamaan regresi linier dinyatakan dengan :

$$Y = bx + a$$

Keterangan : y = absorbansi

x = konsentrasi (ppm)

b = slope

a = intersep

Hasil absorbansi dari pengukuran sampel dimasukkan ke dalam regresi linier. Absorbansi sampel sebagai y, sehingga kadar flavonoid total diperoleh dinyatakan sebagai jumlah mg ekuivalen kuersetin (QE) pada tiap gram ekstrak dan fraksi.

$$\text{Kadar flavonoid total (mg/100g)} = \frac{\text{konsentrasi } \left(\frac{\mu\text{g}}{\text{ml}}\right) \times \text{volume sampel}}{\text{Berat sampel}} \times F_p$$

4. Penentuan aktivitas antioksidan

Hasil uji penangkal radikal bebas metode ABTS pada ekstrak dan fraksi daun salam (*Syzygium polyanthum* (Wight.) Walp) dipaparkan sebagai hasil penelitian, sehingga didapat jumlah persen inhibisi. Pengukuran persentase aktivitas antioksidan dihitung menggunakan rumus (Cholisoh, 2008).

$$\{\% \text{ inhibisi} = \frac{\text{abs kontrol} - \text{abs sampel}}{\text{abs kontrol}} \times 100\%$$

Keterangan :

abs kontrol = absorbansi larutan radikal ABTS

abs sampel = absorbansi larutan sampel yang telah ditambah radikal ABTS

5. Penetapan nilai IC_{50}

Perhitungan nilai IC_{50} menggambarkan besarnya konsentrasi larutan uji yang dapat menangkal radikal bebas sebesar 50% melalui persamaan regresi linier yang menyatakan hubungan antara konsentrasi larutan uji (x) dengan % inhibisi (y). Nilai IC_{50} diperoleh dengan mensubstitusikan y sebagai % inhibisi sebesar 50% dan x sebagai IC_{50} . Perhitungan IC_{50} dapat dituliskan dengan cara mengubah nilai $y=50$

$$y = bx + a$$

$$50 = bx + a$$

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

keterangan : x = Konsentrasi sampel

y = % inhibisi

a = Intersep

b = Slope

6. Perhitungan koefisien variasi (KV)

Data penetapan kadar tiap replikasi pada masing-masing proses ekstraksi dan fraksinasi dihitung nilai koefisien variasi. Koefisien variasi (KV) digunakan untuk mengetahui hasil kesesuaian analisis satu dengan hasil analisis lain dari suatu seri pengukuran yang di peroleh dari sampling acak secara berulang dari sampel homogenya. Koefisien variasi yang baik adalah kurang dari 2% (Snyder, dkk., 2010).

$$\%KV = \frac{\text{standar deviasi}}{\text{rata-rata kadar sampel}} \times 100\%$$

7. Uji Statistik

Pengolahan data menggunakan analisis statistik *One Way Anova*. *One Way Anova* adalah uji statistika yang bertujuan untuk mengetahui apakah terdapat perbedaan antara dua atau lebih jumlah kelompok sampel. *One Way Anova* digunakan untuk menguji hipotesis komparatif sampel, bila pada setiap sampel hanya terdiri atas satu kategori. Tahapan yang dilakukan dalam *One Way Anova* yaitu:

1. Kadar flavonoid total

a. Menentukan H_0 dan H_1

H_0 : $\mu_1 = \mu_2 = \mu_3 = \dots = \mu_n$, artinya tidak terdapat perbedaan yang signifikan antara ekstrak etanol, fraksi n-heksan, fraksi etil asetat, dan fraksi air terhadap kadar flavonoid total.

H_1 : $\mu_1 \neq \mu_2 \neq \mu_3 \neq \dots \neq \mu_n$, artinya terdapat perbedaan yang signifikan antara ekstrak etanol, fraksi n-heksan, fraksi etil asetat, dan fraksi air terhadap kadar flavonoid total.

b. Kriteria pengujian

$F_{hitung} \leq F_{tabel}$ maka H_0 diterima yang artinya kadar flavonoid total ekstrak antara ekstrak etanol, fraksi n-heksan, fraksi etil asetat, dan fraksi air tidak berbeda secara signifikan. $F_{hitung} > F_{tabel}$ maka H_0 ditolak dan H_1 diterima yang artinya kadar flavonoid total ekstrak antara ekstrak etanol, fraksi n-heksan, fraksi etil asetat, dan fraksi air berbeda secara signifikan.

2. Aktivitas antioksidan

a. Menentukan H_0 dan H_1

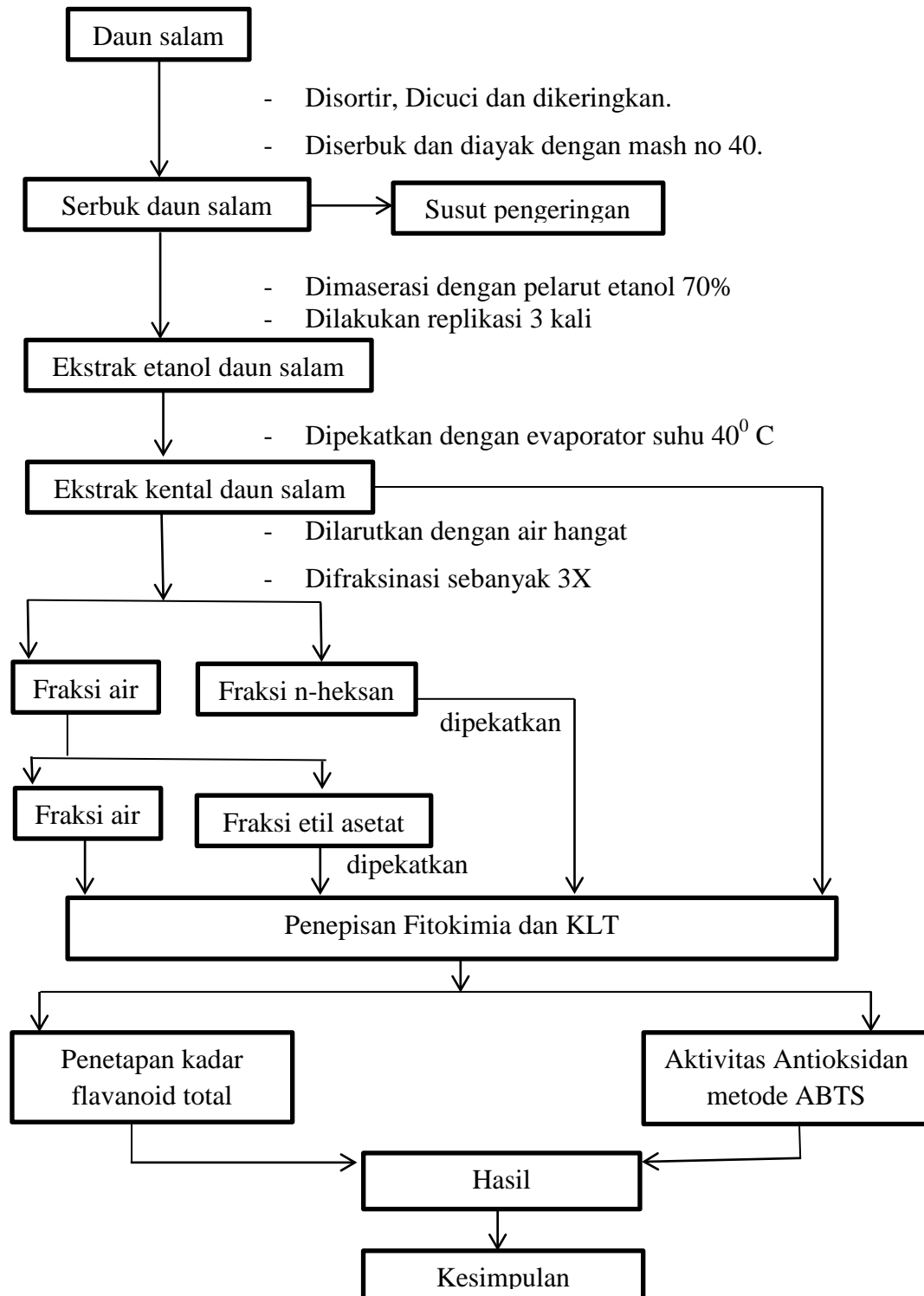
H_0 : $\mu_1 = \mu_2 = \mu_3 = \dots = \mu_n$, artinya tidak terdapat perbedaan yang signifikan antara ekstrak etanol, fraksi n-heksan, fraksi etil asetat, dan fraksi air terhadap aktivitas antioksidan.

H_1 : $\mu_1 \neq \mu_2 \neq \mu_3 \neq \dots \neq \mu_n$, artinya terdapat perbedaan yang signifikan antara ekstrak etanol, fraksi n-heksan, fraksi etil asetat, dan fraksi air terhadap aktivitas antioksidan.

b. Kriteria pengujian

$F_{hitung} \leq F_{tabel}$ maka H_0 diterima yang artinya aktivitas antioksidan ekstrak antara ekstrak etanol, fraksi n-heksan, fraksi etil asetat, dan fraksi air tidak berbeda secara signifikan. $F_{hitung} > F_{tabel}$ maka H_0 ditolak dan H_1 diterima yang artinya aktivitas antioksidan ekstrak ekstrak antara ekstrak etanol, fraksi n-heksan, fraksi etil asetat, dan fraksi air berbeda secara signifikan.

g. Alur Penelitian



Gambar 7. Bagan alur penelitian

BAB V

KESIMPULAN DAN SARAN

A. Kesimpulan

1. Kadar flavonoid total rata-rata dari ekstrak, fraksi n-heksan, fraksi etil asetat dan fraksi air daun salam berturut-turut sebesar $2,6433 \pm 0,0309$ % *QE*, $1,3362 \pm 0,0054$ % *QE*, $2,1388 \pm 0,0252$ % *QE* dan $2,0468 \pm 0,0242$ % *QE*.
2. Nilai IC_{50} rata-rata dari ekstrak, fraksi n-heksan, fraksi etil asetat dan fraksi air dari daun salam menggunakan metode ABTS sebesar $20,0118 \pm 0,1984$ ppm, $23,2512 \pm 0,3377$ ppm, $18,3892 \pm 0,1616$ ppm dan $21,6196 \pm 0,4106$ ppm.
3. Kadar flavonoid total dan aktivitas antioksidan dari ekstrak, fraksi n-heksan, fraksi etil asetat dan fraksi air dari daun salam memiliki perbedaan yang signifikan ($P < 0,05$).

B. Saran

Perlu dilakukan penelitian lebih lanjut lagi tentang kandungan flavonoid dalam bentuk sediaan dan mengisolasi senyawa aktif yang terdapat dalam daun salam yang bertanggungjawab sebagai antioksidan.

DAFTAR PUSTAKA

- Aeni, N., 2012, *Spektrofotometer UV-Visible*, Universitas Tadulako, Palu.
- Ahmad, A.R., Sakina, Wisdawati, Waode,A., 2014, Study of Antioxidant Activity and Determinatoanof Phenol and Flavonoid Contents of Pepino's Leaf Extract (*Solanum muricatum* Aiton). *Chemistry*.
- Ahmad, A.R., Juwita, Ratulangi,S.A.D., Malik,A., 2015, Penetapan Kadar Fenolik dan Flavonoid Total Ekstrak Metanol Buah dan Daun Patilaka (*Etlingera alatiol* (Jack) R.M.SM). *Original Article V(2) No. 1*.
- Alfan, T., Apriliana E., Sholeha.T.U., dan Ricky M.R., 2018, Potensi Ekstrak Daun Salam Sebagai Antibakteri terhadap *Staphylococcus aureus* secara in vitro, *J Agromedicine Unila*
- Anggorowati, D.A., Priandini, G., Thufail., 2016 , Potensi Daun Alpukat (*Persea americana miller*) sebagai Minuman Teh Herbal yang Kaya Antioksidan. *Jurnal Industri Inovatif*.
- Boligon, A.A., Machado, M.M., Athayde, M.L., 2014, Technical evaluation of antioxidant activity, *Med chem*.
- Blanco, A.K., Medina juarez, L. A., Gonzalez guilar., 2013, Antioxidant Activity of the Phenolic and Oily Fractions of Different Sweet Bell Peppers. *J. Med Chem*.
- Chang, C.C., Yang, M.H.,Wen, H.M., dan Cherm J.C., 2002, Estimation of Total Flavonoid Content in Propolis by Two Complementary Colorimetric Methods, *Journal of food and Drug Analysis*.
- Dalimartha, S., 2000, *Atlas Tumbuhan Obat Indonesia Jilid 1*, Trubus Agriwidya: Jakarta.
- Depkes R.I., 1995, *Materia Medika Indonesia Jilid VI*, Departemen Kesehatan RI: Jakarta.
- Dwinatari, I.K., dan Murti, Y.B., 2015, Pengaruh waktu Pemanenan dan Tingkat Maturasi Daun terhadap Kadar Voteksikarpin dalam Daun Legundi (*Vitex trifolia* L.), *Traditional medicine journal*.
- 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*. FMIPA UI. Depok.

- Ergina., Nuryati,S., dan Pursitasari, I.D., 2014, *Uji kualitatif senyawa metabolit sekunder pada daun palado (Agave angustifolia) yang diekstraksi dengan pelarut air dan etanol*, Universitas Tadulako, palu.
- Evans, W.C., 2002, *Pharmakognosi Edisi 15*, W.B Sanders. Philedelphia.
- Fahri, M., 2010, Teknik Ekstraksi Senyawa Flavanoid dari Alga Coklat *Sargassum cristaefollium*. *Skripsi*. Universitas Brawijaya. Malang.
- Faisal,H., 2019, Uji Aktivitas Antioksidan Ekstrak Etanol Buah Okra (*Abelmoschus esculentus* L. Moench) dengan Metode DPPH (1,1- difenil-2-pikrilhidrazil) dan Metode ABTS (2,2-azinobis-(3-Ethylbenzothiazoline-6-Sulfonic Acid), *Jurnal Regional Development Industry & Health Science, Technology and Art of Life*.
- F.H.I., 2009, *Farmakope Herbal Indonesia*. 1st edn, Departemen Kesehatan RI: Jakarta.
- Gandjar, I.G., dan Rohman, A., 2007, *Kimia Farmasi Analisis*, Yogyakarta: Pustaka Pelajar.
- Gillespie, R.J., dan Paul., 2001, *Chemical Bonding and Molecular Geometry*, Oxford University Press, London.
- Hanani, E., 2017, *Analisis Fitokimia*, Penerbit Buku Kedokteran EGC, Jakarta.
- Harborne, J.B., 1987, *Metode Fitokimia: Penuntun Cara ModernMenganalisis Tumbuhan*, ITB: Bandung.
- Hastuti, F.I., 2017, Uji Efektivitas Penangkapan Radikal Bebas DPPH dari Kombinasi Ekstrak Bawang Putih (*Allium sativum* L.) dan Ekstrak Daun Bayam Hijau (*Amaranthus hybridus*), *Karya Tulis Ilmiah*, Sekolah Tinggi Ilmu Kesehatan Nasional, Surakarta.
- Heinrich, M., 2009, *Farmakognosis dan Fitoterapi*, EGC Jakarta.
- Herowaty, R., Rahman, E.K., Ketut, I.K., Nuraini, H., dan Tutus, G.K., 2008, Aktivitas Antiinflamasi Kuersetin-3-monoasetat Hasil Asetilasi Selektif Kuersetin. *Artocarpus*.
- Huang, D., Boxin, OU., Prior, R.L., 2005, The Chemistry behind Antioxidant Capacity Assays. *J.Agric. Food Chem*.
- Huda, N., 2001, Pemeriksaan Kinerja Spektrofotometer UV-Vis, GBC 911A Menggunakan Pewarna Tartazine CI 19140, *Sigma Epsilon ISSN 08539013 No. 20-21*.

- Ikawati, Z., 2008, *Pengantar Farmakologi Molekuler*, cetakan kedua, Gadjah Mada University Press, Yogyakarta.
- Imrawati, M.S., Gani.S.A., Bubua K.I., 2017, Antioxidant Activity of Ethyl Acetate Fraction of *Muntingia calaburo* L. Leaves, *Journal of Pharmaceutical and Medicinal Sciences*.
- Indah, N.S., 2015, The Effect of *Eugenia polyantha* Extract on LDL Cholesterol. *Artikel review. Vol. (4) No. 5*.
- Iqbal, M., dan Kusumawati Idha., 2011, Aktivitas Antioksidan dan Profil Kromatografi Ekstrak Etanol 96% Daun *Syzygium cumini*, *Syzygium aromaticum*, *Syzygium polyanthum*, dan *Syzygium aquaeum*: Ringkasan. *KKB KK2 FF 188/11*.
- Jamaluddin, 2012, *Analisis Instrumen*, Universitas Tadulako, Palu.
- Konan, K. V., Tien, C.L., and Mateescu M.A., 2016, Electrolysis induced fast activation of the ABTS reagent for an antioxidant capacity assay, *This Journal is The Royal Society of Chemistry*.
- Kosasih, E.N., Setiabudhi, T., dan Heryanto, H., 2004, *Peranan Antioksidan pada Lanjut Usia*. Pusat Kajian Nasional Masalah Lanjut Usia: Jakarta.
- Kusuma., Irian, W., Harlinda, K., Enos, T.A., Farida, A., Yu-Hong Min., Jin-Sook Kim., Yong-Ung Kim., 2011, *Biological Activity and Phytochemical of Three Indonesian Medicinal Plants, Murraya koenigii, Syzygium polyanthum, and Zingiber purpurea*.
- Kusuma, P., 2012, Penetapan Kadar Flavonoid Total dan Daya Aantioksidan dari Ekstrak Etanol Buah Pare (*Momordica charantia* L.), *Skripsi*, Fakultas Ilmu Kesehatan Universitas Islam Negeri Aluddin, Makassar.
- Lelono, R.A.A., dan Tachibana, S., 2013, Bioassay-guided isolation and identification of antioxidative compounds from the bark of *Eugenia polyantha*. *Pakistan Journal of Biological Sciences*, 16(16): 812-818.
- Maravirnadita, H.A., 2019, Uji Aktivitas Antioksidan Fraksi n-heksan, etil asetat dan air dari buah belimbing manis dengan metode DPPH, *Skripsi*: Universitas Ahmad Dahlan.
- Mardawati, E., Achyar, C.S., dan Marta, H., 2008, Kajian Aktivitas Antioksidan Ekstrak Kulit Manggis (*Garcinia mangostana* L.) dalam Rangka Pemanfaatan Limbah Kulit Manggis di Kecamatan Puspahiang Kabupaten Tasikmalaya. *Laporan Akhir Penelitian Muda (LITMUD) UNPAD*. Semarang.

- Markham., 1988, *Cara Indentifikasi Flavonoid*, Diterjemahkan oleh Kokasih Padmawinata, Penerbit ITB : Bandung.
- Moeloek, F.A., 2006, Herbal and Traditional Medicine: National Perspective and Policies In Indonesia. *Jurnal Bahan Alam Indonesia*.
- Mulja, M., dan Suherman., 1995, *Analisis instrumental*, Airlangga University Press: Surabaya
- Neldawati., Ratnawulan., Gusnedi., 2013, Analisis Nilai Absorbansi dalam Penentuan Kadar Flavanoid Berbagai Jenis Daun Tanaman Obat. Padang: Pillar Physics, Vol (2).
- Nuengchamnong, N., Hermans Lokkerbol, A., dan Ingkaninan, K., 2004, Separation and detection of the antioxidant flavonoids, rutin and quercetin, using HPLC coupled on-line with colorimetric detection of antioxidant activity. *Naresuan University Journal: Science and Technology*.
- Nimse, S. B., dan Pal, D., 2015, Free radicals, natural antioxidants, and their reaction mechanisms. *Royal Society of Chemistry*. 5(1): 27986-28006.
- Noveriza, R., dan Miftakhurohmah., 2010, Efektivitas Ekstrak Metanol Daun Salam (*Eugenia polyantha*) dan Daun Jeruk Purut (*Cytrus histrix*) Sebagai Antijamur Pada Pertumbuhan *Fusarium oxysporum*. *J Littri* 16(1):6-11.
- Olivera, A., Cardoso, C., Santoso, F., Campos, A.P., 2014, Predictors of Mortality, *European Journal of Chemistry*, 13(3).
- Pekal, A., dan Pyrzynska, K., 2014, Evaluation of Aluminium Complexation Reaction for Flavonoid Content Assay. *Food Anal. Methods Vol. 7*, DOI 10.1007/s12161-014-9814-x , 1776 - 1782.
- Prior, R.L., Scaick, K., 2005, Standardized Methods For the Determination of antioxidant capacity and phenolic in food and dietary supplements, *J. Argic. Food Chem*.
- Pulangan, W. L., 2018, Aktivitas Antioksidan Ekstrak N-heksan, Etil asetat dan Etanol Daun Mobe dengan Metode Pemerangkapan ABTS. *Skripsi*. Universitas Sumatra Utara.
- Rizki, M.I., dan Ester, M.H., 2015. Review: Aktivitas Farmakologi, Senyawa Aktif dan Mekanisme Kerja Daun Salam (*Syzygium polyanthum*). *Prosiding Seminar Nasional & Workshop "Perkembangan Terkini Sains Farmasi & Klinik 5"*.

- Ramadhan., Emir., Sudarsono., 2013, Penangkapan Radikal 2,2-difenil-1-pikrilhidrazil (DPPH) Buah Pepaya (*Carica papaya* L.) Tua dan Muda, Trad. *Med. J*, 18(3).
- Rivai,H., Susi Yulianti. , Boy Chandra., 2019, Analisis Kualitatif dan Kuantitatif dari Ekstrak Heksan, Aseton, Etanol, dan Air Dari Daun Salam (*Syzygium polyanthum* (WIGHT) Walp.), *Jurnal Farmasi Higea*.
- Redha, A., 2010, Flavonoid: Struktur, Sifat Antioksidatif dan Peranannya dalam Sistem Biologi.,(<http://repository.polnep.ac.id>., diakses 28 Mei 2015).
- Rohman, A., dan Riyanto, S., 2006, Aktivitas Antiradikal Bebas Ekstrak Kloroform Buah Mengkudu (*Morinda citrifolia*, L.) dan Fraksi Fraksinya, *Artocarpus*, V (6) No.1 Maret 2006, 39.
- Rohman, A., 2009, *Kimia Farmasi Analisi*.,Pustaka Pelajar: Yogyakarta.
- Rosidah., Yam, M. F., Sadikun, A., dan Asmawi, M. Z., 2008. Antioxidant Potential Of *Gynura Procumbens* : *Pharmaceutical Biology*. Vol. 46(9): 616-625.
- Sayuti, K., Rina Yenrina., 2015, *Antioksidan Alami dan Sintetik*, Andalas Univesity Press: Padang.
- Sen, S., Chakraborty R., Sridhar C., Reddy Y.S.R., dan Biplab D., 2010, Free radicals, antioxidants, disease and phytomedicines: current status and future prospect. *International Journal of Pharmaceutical Sciences Rivew and Reseach*.
- Sepahpour, S., Selamat, J., Manap, M. Y., & Razis, A. F., 2018, Comparative Analysis of Chemical Composition., *Jounal Molecules V (23) Ed 402* , 2 - 17.
- Septiana, A.T., Muchtadi, D., dan Zakaria, F.R., 2002, Aktivitas antioksidan ekstrak diklorometana dan air jahe pada asam linoleat. *Jurnal Teknologi dan Industri Pangan XIII (2)*: 105-110.
- Shalaby., Emand,A., dan Shanab M. M., 2013, Comparison of DPPH and ABTS assays for determining antioxidant potential of water and methanol extracts of *Spirulina platensis*. *Indian Journal of Geo-Marine Sciences Vol. 42(5)*.
- Silalahi, U., 2015, *Metode Penelitian Sosial Kuantitatif*, Bandung: PT. Refika Aditama.
- Sitorus, M., 2009, *Spektroskopi (Elusidasi Struktur Molekul Organik)*. Graha Ilmu. Yogyakarta.

- Stahl, E., 1985, *Analisis Obat Secara kromatografi dan Mikroskopi, diterjemahkan oleh Kosasih Padmawinata dan Iwang Soediro*, ITB, Bandung.
- Studiawan, H., dan Santoso, M.H., 2005, Uji Aktivitas Penurunan Kadar Glukosa Darah Ekstrak Daun Eugenia Polyantha Pada Mencit Yang Diinduksi Aloksan, *Media Kedokteran Hewan*, Vol. 21, No. 2.
- Sumono, A., dan Mulan, A., 2009, Capability of boiling water of bay leaf (Eugenia polyantha W.) for reducing streptococcus sp.colony. *Majalah Farmasi Indonesia*.
- Susilowati., dan Wulandari,S., 2019, Aktivitas Antioksi dan Fraksi Etil Asetat dan Fraksi Air Ekstrak Etanol Daun Salam (*Syzygium polyanthum*(Wight.) Walp.) dengan Metode DPPH (*1,1 Diphenyl-2 picrylhydrazyl method*), *IJMS-Indonesian Journal On Medical Science*.
- Snyder, C.R., Kirkland J.J., and Glajach, J.L., 1997, *Practical HPLC Method Development, Second Edition*.NewYork: John Wiley and Sons,Lnc.Pp.
- Syamsudin., dan Warono, D., 2013, *Unjuk kerja spektrofotometer untuk analisa zat aktif ketoprofen*, *Fakultas Teknik*: Universitas Muhammadiyah Jakarta.
- Tiwari, P., Kumar, B., Kaur, M., Kaur G. & Kaur H., 2011, Phytochemical Screening And Extraction: A Review, *International Pharmaceutica Scientia*, 1 (1), 98-106.
- Utami, P., 2008. *Buku Pintar Tanaman Obat*. Agromedia Pustaka, Jakarta.
- Van, Steenis C.G.G.J., 2003, *Flora*, PT. Pradya Paramita: Jakarta.
- Venn, R.F., 2008. *Principles and Practices of Bioanalysis*. Edisi kedua. Prancis: Taylor and Francis Group Ltd.
- Verawati., Nofiandi, D., Petmawati., 2017, Pengaruh Metode Ekstraksi Terhadap Kadar Fenolat Total dan Aktivitas Antioksidan Daun Salam (*Syzygium polyanthum* (WIGHT) WALP.). *Jurnal Katalisator Kopertis Wilayah X*, 2(2): 53-60.
- Wicaksono, B.I., dan Ulfah, M., 2017, Uji Aktivitas Antioksidan Kombinasi Ekstrak Etanol Daun Sirsak dan Jambu Biji (*Psidium guajava* L.) Dengan Mrtode DPPH. *Jurnal Inovasi Teknik Kimia*, Vol (2), No 1.
- Winarto, W.P., 2004, *Memfaatkan Bumbu Dapur untuk Mengatasi Aneka Penyakit*. Agromedia Pustaka: Jakarta.

- Wirawan, W., 2018, Uji Efektifitas Fraksi Daun Salam Terhadap Kadar Kolesterol Total Tikus Putih Jantan Hiperkolesterolemia Diabetes, *Jurnal Mandala Pharmacoin Indonesia*, Vol (4) No.1.
- Winarsi, 2007, *Antioksidan Alami dan Radikal Bebas*, Kanisius: Yogyakarta.
- Wulandari, Lesty., 2011, *Kromatografi Lapis Tipis*. PT. Taman Kampus Presindo: Jember.
- Yuliantari, N.W.A., I.W.R, Widarta dan I.D.G.M, Permana., 2017, Pengaruh suhu dan waktu ekstraksi terhadap kandungan flavonoid dan aktivitas antioksidan daun sirsak (*Annona muricata* L.) menggunakan ultrasonik. *Scientific Journal of Food Technology*.
- Yu lin,H., Kuo, Y.H.L., and Chiang,W., 2009, Antioxidative Effect And Active Components From Leaves Of Lotus (*Nelumbo nucifera*). *Journal Of Agricultural And Food Chemistry*.