

**UJI AKTIVITAS ANTIOKSIDAN EKSTRAK DAUN WARU
(*Hibiscus tiliaceus*) DENGAN PELARUT N-HEKSAN, ETIL
ASETAT, DAN ETANOL MENGGUNAKAN METODE DPPH
(2,2-difenil-1-pikrilhidrazil)**

SKRIPSI

Diajukan Oleh:

NANDA SYAHPUTRA

NIM. 160704036

**Mahasiswa Program Studi Kimia
Fakultas Sains dan Teknologi UIN Ar-Raniry**



**FAKULTAS SAINS DAN TEKNOLOGI
UNIVERSITAS ISLAM NEGERI AR-RANIRY
BANDA ACEH
2022 M/1443 H**

LEMBAR PERSETUJUAN SKRIPSI

UJI AKTIVITAS ANTIOKSIDAN EKSTRAK DAUN WARU (*Hibiscus tiliaceus*) DENGAN PELARUT N-HEKSAN, ETIL ASETAT, DAN ETANOL MENGGUNAKAN METODE DPPH (2,2-difenil-1-pikrilhidrazil)

TUGAS AKHIR

Diajukan kepada Fakultas Sains dan Teknologi UIN Ar-Raniry
Sebagai Satu Persyaratan Untuk Memperoleh Gelar Sarjana (S-1) dalam Ilmu
Kimia

Oleh:

NANDA SYAHPUTRA
NIM. 160704036

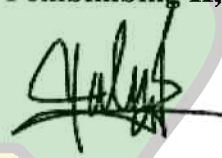
Mahasiswa Fakultas Sains dan Teknologi
Program Studi Kimia

Disetujui Oleh:

Pembimbing I,

Pembimbing II,


Muammar Yulian, M. Si
NIDN. 2030118401


Cut Nuzlia, M. Sc
NIDN. 2014058702

Mengetahui,
Ketua Program Studi Kimia,


Khairun Nisah, M. Si
NIDN. 2016027902

LEMBAR PENGESAHAN SKRIPSI

UJI AKTIVITAS ANTIOKSIDAN EKSTRAK DAUN WARU (*Hibiscus tiliaceus*) DENGAN PELARUT N-HEKSAN, ETIL ASETAT, DAN ETANOL MENGGUNAKAN METODE DPPH (2,2-difenil-1-pikrilhidrazil)

SKRIPSI/ TUGAS AKHIR


**Telah Diuji Oleh Panitia Ujian Munaqasyah Skripsi
Fakultas Sains dan Teknologi UIN Ar-Raniry dan Dinyatakan Lulus
Serta Diterima Sebagai Salah Satu Beban Studi Program Sarjana (S-1)
Dalam Ilmu Kimia**

Pada Hari/Tanggal: Jum'at, 22 Juli 2022

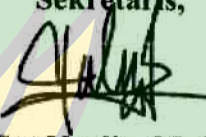
23 Dzulhijjah 1443 H

Panitia Ujian Munaqasyah Skripsi/Tugas Akhir


Ketua,


Muammar Yulian, M. Si
NIDN. 2030118401


Sekretaris,


Cut Nuzlia, M. Sc
NIDN. 2014058702

Penguji I,


Reni Silvia Nasution, M. Si
NIDN. 2022028901

Penguji II,


Bhayu Gita Rhernama, M. Si
NIDN. 2023018901

Mengetahui,

**Dekan Fakultas Sains dan Teknologi
Universitas Islam Negeri Ar-Raniry Banda Aceh**



Dr. H. Azhar Amsal, M. Pd
NIDN. 2001066802

LEMBAR PERNYATAAN KEASLIAN SKRIPSI

Yang bertanda tangan di bawah ini:

Nama : Nanda Syahputra
NIM : 160704036
Program Studi : Kimia
Fakultas : Sains dan Teknologi
Judul Skripsi : Uji Aktivitas Antioksidan Ekstrak Daun Waru (*Hibiscus tiliaceus*) Dengan Pelarut *N*-Heksan, Eti Asetat, Dan Etanol Menggunakan Metode DPPH (2,2-difenil-1-pikrilhidrazil)

Dengan ini menyatakan bahwa dalam penulisan skripsi ini, saya:

1. Tidak menggunakan ide orang lain tanpa mampu mengembangkan dan mempertanggungjawabkan;
2. Tidak melakukan plagiasi terhadap naskah karya orang lain;
3. Tidak menggunakan karya orang lain tanpa menyebutkan sumber asli atau tanpa izin pemilik karya;
4. Tidak memanipulasi dan memalsukan data;
5. Mengerjakan sendiri karya ini dan mampu bertanggung jawab atas karya ini.

Bila dikemudian hari ada tuntutan dari pihak lain atas karya saya, dan telah melalui pembuatan yang dapat dipertanggung jawabkan dan ternyata memang ditentukan bukti bahwa saya telah melanggar pernyataan ini, maka saya siap dikenai sanksi berdasarkan aturan yang berlaku di Fakultas Sains dan Teknologi UIN Ar-Raniry Banda Aceh.

Demikian pernyataan ini saya buat dengan sesungguhnya dan tanpa paksaan dari pihak manapun.

A R - R A Banda Aceh, 22 Juli 2022

Yang Menyatakan,



Nanda Syahputra

ABSTRACT

Name : Nanda Syahputra
NIM : 160704036
Study Program : Chemistry, Faculty of Science and Technology (FST)
Title : Antioxidant Activity Test of Waru Leaf Extract (*Hibiscus tiliaceus*) With *N*-Hexane Solvents, Eth Acetate, And Ethanol Using DPPH Method (2,2-diphenyl-1-picrilhydrazyl)
Thesis Thickness : 87 Pages
Supervisor I : Muammar Yulian, M.Si
Supervisor II : Cut Nuzlia, M. Sc
Keywords : Waru Leaf, *n*-Hexane, Ethyl Acetate, Ethanol, Total Phenolic, Antioxidants, and DPPH

Hibiscus plant is one type of plant that can be used as medicine because it contains antioxidants. This study aims to determine differences in the antioxidant activity of waru leaf extract (*Hibiscus tiliaceus*) with *n*-hexane, ethyl acetate, and ethanol using the DPPH method and to determine which leaf extract has more potential as an antioxidant of the three solvents used. Waru leaf extraction was carried out using a multilevel maceration method. Determination of total phenolic content using the Folin-Ciocalteu method and testing of antioxidant activity using the DPPH (2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl) method. Based on the results obtained in the extraction of bioactive simplicia waru leaves using multilevel maceration method obtained several extracts of yield from three solvents with different polarities, namely waru leaf extract using *n*-hexane solvent with a yield of 87.81%, waru leaf extract using ethyl acetate solvent with yield of 160.38%, and hibiscus leaf extract using ethanol solvent with a yield of 179.17%. The highest yield was obtained in the ethanol extract. The results of determining the total phenolic content using the Folin-Ciocalteu method obtained the standard curve equation for gallic acid, namely $y = 0.0302x + 0.1138$ with $r = 0.9811$ and the total phenolic content of hibiscus leaf extract was highest in ethanol extract (EE), namely 11.0109 ppm, ethyl acetate extract (EEA) of 8.0610 ppm and *n*-hexane extract (ENH) of 6.1054 ppm. The results of the antioxidant activity test of waru leaf extract were seen from the IC_{50} calculation results, namely *n*-hexane extract (12.7 ppm), ethyl acetate extract (11.19 ppm) and ethanol extract (10.6 ppm). The ethanol extract of hibiscus showed the best antioxidant potential when compared to the other two extracts, namely *n*-hexane and ethyl acetate, because the IC_{50} value of the ethanol extract was higher than that of the *n*-hexane and ethyl acetate extracts.

ABSTRAK

Nama : Nanda Syahputra
NIM : 160704036
Program Studi : Kimia Fakultas Sains dan Teknologi (FST)
Judul : Uji Aktivitas Antioksidan Ekstrak Daun Waru (*Hibiscus tiliaceus*) Dengan Pelarut *n*-Heksan, Etil Asetat, Dan Etanol Menggunakan Metode DPPH (2,2-difenil-1-pikrilhidrazil)
Tebal Skripsi : 87 Halaman
Pembimbing I : Muammar Yulian, M.Si
Pembimbing II : Cut Nuzlia, M.Sc
Kata Kunci : Daun Waru, *n*-Heksan, Etil Asetat, Etanol, Total Fenolik, Antioksidan, dan DPPH

Tumbuhan waru merupakan salah satu jenis tumbuhan yang dapat dijadikan obat-obatan karena mengandung antioksidan. Penelitian ini bertujuan untuk mengetahui perbedaan aktivitas antioksidan dari ekstrak daun waru (*Hibiscus tiliaceus*) dengan pelarut *n*-heksan, etil asetat, dan etanol menggunakan metode DPPH serta untuk mengetahui ekstrak daun mana yang lebih berpotensi sebagai antioksidan dari ketiga pelarut yang digunakan. Ekstraksi daun waru dilakukan dengan menggunakan metode maserasi bertingkat. Penentuan kandungan total fenolik menggunakan metode Folin-Ciocalteu dan pengujian aktivitas antioksidan menggunakan metode DPPH (2,2-difenil-1-pikrilhidrazil). Berdasarkan hasil yang diperoleh pada ekstraksi bioaktif simplisia daun waru dengan metode maserasi bertingkat diperoleh beberapa ekstrak rendemen dari tiga pelarut dengan beda kepolaran, yaitu ekstrak daun waru menggunakan pelarut *n*-heksan dengan rendemen sebesar 87,81%, ekstrak daun waru menggunakan pelarut etil asetat dengan rendemen sebesar 160,38%, dan ekstrak daun waru menggunakan pelarut etanol dengan rendemen sebesar 179,17%. Rendemen tertinggi diperoleh pada ekstrak etanol. Hasil penentuan kandungan total fenolik menggunakan metode Folin-Ciocalteu diperoleh persamaan kurva baku asam galat yaitu $y = 0,0302x + 0,1138$ dengan $r = 0,9811$ serta kandungan total fenolik dari ekstrak daun waru yang paling tinggi terdapat pada ekstrak etanol (EE) yaitu sebesar 11,0109 ppm, ekstrak etil asetat (EEA) sebesar 8,0610 ppm dan ekstrak *n*-heksan (ENH) sebesar 6,1054 ppm. Hasil uji aktivitas antioksidan ekstrak daun waru dilihat dari hasil perhitungan IC_{50} yaitu ekstrak *n*-heksan (12,7 ppm), ekstrak etil asetat (11,19 ppm) dan ekstrak etanol (10,6 ppm). Ekstrak etanol pada waru menunjukkan potensi antioksidan paling baik jika dibandingkan dengan kedua ekstrak lainnya yaitu *n*-heksan dan etil asetat, karena nilai IC_{50} ekstrak etanol lebih tinggi dibandingkan ekstrak *n*-heksan dan etil asetat.

KATA PENGANTAR

BISMILLAHIRRAHMANIRRAHIM

Puji syukur kehadiran Allah *Subhanahu wa ta'ala* yang telah memberikan rahmat kepada penulis sehingga dapat menyelesaikan skripsi yang berjudul **“Uji Aktivitas Antioksidan Ekstrak Daun Waru (*Hibiscus tiliaceus*) Dengan Pelarut *N*-Heksan, Eti Asetat, Dan Etanol Menggunakan Metode DPPH (2,2-difenil-1-pikrilhidrazil)”** dan dapat menyusun laporan ini dengan baik guna memenuhi syarat untuk lulus Strata-1 di Prodi Kimia Fakultas Sains dan Teknologi UIN Ar-Raniry. Shalawat beriringkan salam tidak lupa pula penulis sampaikan kepada baginda Nabi Besar Muhammad *Shallallahu 'Alaihi wa Sallam*, beserta keluarga dan para sahabat-Nya sekalian, dan karena beliauah kita semua dapat merasakan betapa bermakna dan indahnya alam yang penuh dengan ilmu pengetahuan seperti yang kita rasakan saat ini.

Skripsi ini dapat disusun dengan baik berkat bantuan dari pihak-pihak yang telah memberikan bimbingan dan dukungan sebagai bahan masukan untuk penulis. Untuk itu pada kesempatan ini penulis mengucapkan terima kasih kepada:

1. Bapak Dr. Azhar, S. Pd., M. Pd., selaku Dekan Fakultas Sains dan Teknologi Universitas Islam Negeri Ar-Raniry.
2. Ibu Khairun Nisah, M. Si., selaku ketua Program Studi Kimia Fakultas Sains dan Teknologi Universitas Islam Negeri Ar-Raniry.
3. Ibu Cut Nuzlia, M. Sc., selaku dosen pembimbing akademik Program Studi Kimia Fakultas Sains dan Teknologi Universitas Islam Negeri Ar-Raniry.
4. Bapak Muammar Yulian, M. Si., selaku pembimbing awal skripsi yang telah banyak memberikan bimbingan, bantuan dan arahan kepada penulis sehingga skripsi ini dapat selesai dengan baik.
5. Seluruh Bapak dan Ibu dosen, Staf dan Asisten Laboratorium Prodi Kimia Fakultas Sains dan Teknologi Universitas Islam Negeri Ar-Raniry yang telah mengajar dan membekali ilmu kepada penulis sejak semester awal hingga semester akhir.

6. Semua teman-teman seperjuangan angkatan 2016 yang telah memberikan dukungan dan motivasi kepada penulis dalam menyelesaikan skripsi dan serta semua pihak yang telah membantu baik secara langsung maupun tidak langsung sehingga skripsi ini dapat terselesaikan.
7. Teramat istimewa kepada kedua orang tua tercinta yang telah memberikan motivasi dan untaian do'a kepada penulis dalam penyusunan skripsi hingga selesai.

Penulis menyadari bahwa masih banyak kekurangan dalam penulisan skripsi ini. Untuk itu penulis mengharapkan kritik dan saran yang bersifat membangun dari pembaca. Penulis mengucapkan terima kasih atas segala dukungan dan bantuan sehingga skripsi ini dapat tersusun dengan baik dan terselesaikan.

Banda Aceh, 22 Juli 2022

Penulis,

Nanda Syahputra



DAFTAR ISI

LEMBAR PERSETUJUAN SKRIPSI	i
LEMBAR PENGESAHAN SKRIPSI	ii
LEMBAR PERNYATAAN KEASLIAN SKRIPSI	iii
ABSTRACT	iv
ABSTRAK	v
KATA PENGANTAR	vi
DAFTAR ISI	viii
DAFTAR TABEL	x
DAFTAR GAMBAR	xi
DAFTAR LAMPIRAN	xii
BAB I PENDAHULUAN	1
I.1. Latar Belakang.....	1
I.2. Rumusan Masalah	4
I.3. Tujuan Penelitian.....	4
I.4. Manfaat Penelitian.....	4
I.5. Batasan Penelitian	5
BAB II LANDASAN TEORITIS	6
II.1. Tumbuhan Waru	6
II.1.1. Klasifikasi Tumbuhan Waru.....	7
II.1.2. Nama Tumbuhan Waru di Berbagai Daerah di Indonesia.....	7
II.1.3. Morfologi Tumbuhan Waru.....	7
II.1.4. Kandungan Kimia Tumbuhan Waru.....	8
II.1.5. Kegunaan	10
II.2. Radikal Bebas	10
II.3. Antioksidan.....	14
II.4. Metode Ekstraksi.....	17
II.5. Prinsip Analisis Antioksidan	19
II.5.1. Analisis Total Fenol.....	19
II.5.2. Analisis Total Flavonoid	20
II.5.3. Analisis Perendaman Radikal Anion Superioksida	21
II.5.4. Analisis Perendaman Radikal Hidroksil.....	21
II.6. Metode DPPH (2,2-difenil-1-pikrilhidrazil).....	22
II.7. Pelarut.....	24
II.8. Penelitian Relevan.....	27
BAB III METODE PENELITIAN	29
III.1. Tempat dan Waktu	29
III.2. Alat dan Bahan	29
III.2.1. Alat	29
III.2.2. Bahan	29
III.3. Cara Kerja.....	30

III.2.1. Pengambilan Sampel	30
III.2.2. Identifikasi Tumbuhan Waru.....	30
III.2.3. Preparasi Sampel dan Pembuatan Serbuk Simplisia	30
III.2.4. Uji Kadar Air	31
III.2.5. Ekstraksi Sampel	31
III.2.6. Skrining Fitokimia.....	33
III.2.7. Penentuan Kandungan Total Fenolik.....	35
III.2.8. Penentuan Uji Aktivitas Antioksidan Dengan Metode DPPH.....	35
BAB IV HASIL PENELITIAN DAN PEMBAHASAN.....	37
IV.1. Hasil Penelitian.....	37
IV.1.1. Identifikasi Tumbuhan Waru.....	37
IV.1.2. Uji Kadar Air	37
IV.1.3. Ekstraksi Daun Waru.....	37
IV.1.4. Uji Skrining Fitokimia Ekstrak Daun Waru	38
IV.1.5. Penentuan Kandungan Total Fenol.....	39
IV.1.6. Penentuan Uji Aktivitas Antioksidan	40
IV.2. Pembahasan	42
BAB V PENUTUP.....	48
V.1. Kesimpulan.....	48
V.2. Saran	48
DAFTAR PUSTAKA	49



DAFTAR TABEL

Tebel II. 1 Nilai Konstanta Dielektrik Berbagai Zat.....	25
Tabel IV. 1 Hasil Penetapan Uji Kadar Air Serbuk Daun Waru	37
Tabel IV. 2 Hasil Presentase Rendemen Ekstrak Daun Waru	38
Tabel IV. 3 Hasil Uji Skrining Fitokimia Ekstrak Daun Waru.....	38
Tabel IV. 4 Kurva Kalibrasi Larutan Standar Asam Galat	39
Tabel IV. 5 Perhitungan Kadar Total Fenolik Pada Ekstrak Daun Waru	39
Tabel IV. 6 Uji Aktivitas Antioksidan Ekstrak Daun Waru Dengan Pelarut...	40
Tabel IV. 7 Uji Aktivitas Antioksidan Ekstrak Daun Waru Dengan Pelarut...	40
Tabel IV. 8 Uji Aktivitas Antioksidan Ekstrak Daun Waru Dengan Pelarut...	41



DAFTAR GAMBAR

Gambar II. 1 Daun Waru.....	6
Gambar II. 2 Pembentukan ROS.....	11
Gambar II. 3 Struktur Asam Galat.....	20
Gambar II. 4 Reaksi DPPH dengan Senyawa Antioksidan.....	22
Gambar IV. 1 Kurva Standar Asam Galat.....	39
Gambar IV. 2 Kurva Ekstrak Daun Waru dengan Pelarut N-Heksan.....	40
Gambar IV. 3 Kurva Ekstrak Daun Waru dengan Pelarut Etil Asetat.....	41
Gambar IV. 4 Kurva Ekstrak Daun Waru dengan Pelarut Etanol.....	42



DAFTAR LAMPIRAN

Lampiran 1. Perhitungan.....	56
Lampiran 2. Surat Keterangan Identifikasi Tumbuhan Waru.....	69
Lampiran 3. Dokumentasi Penelitian.....	70



BAB I PENDAHULUAN

I.1. Latar Belakang

Indonesia dikenal kaya akan keanekaragaman hayati termasuk berbagai jenis tanaman yang berpotensi sebagai antioksidan. Antioksidan yang dihasilkan dari berbagai sumber tanaman yang terdapat di Indonesia dapat dimanfaatkan untuk mencegah penyakit degeneratif. Antioksidan berfungsi membantu tubuh untuk mengontrol proses oksidasi dan dapat juga untuk mencegah atau dapat mengurangi resiko berbagai macam penyakit. Aktivitas antioksidan muncul karena adanya senyawa fenol (Purwantiningsih, Murwanti, dan Hakim, 2019). Senyawa fenol mempunyai potensi sebagai antioksidan karena pada senyawa fenol terdapat gugus hidroksil (-OH) yang berfungsi sebagai penyumbang elektron (Prasetyo, Sangi, dan Wuntu, 2016). Menurut Tursiman, *et al.* (2012) dalam penelitiannya menyebutkan bahwa kebanyakan senyawa yang mempunyai bioaktivitas sebagai antioksidan merupakan senyawa golongan fenol yang mempunyai gugus hidroksi yang tersubstitusi pada cincin benzena pada posisi orto dan para terhadap gugus -OH dan -OR. Senyawa ini mempunyai kemampuan untuk menghambat radikal bebas dengan cara mendonorkan protonnya sehingga membentuk radikal yang stabil. Radikal stabil terbentuk karena elektron bebas distabilkan oleh delokalisasi elektron yang beresonansi pada cincin aromatik. Oleh karena itu, dibutuhkan antioksidan yang dapat membantu melindungi tubuh dari pengaruh radikal bebas dan meredam dampak negatifnya. Konsumsi makanan yang mengandung antioksidan juga dapat meningkatkan status imunologi dan menghambat timbulnya penyakit degeneratif akibat penuaan (Sari, 2016).

Antioksidan eksogen menurut sumbernya dibagi menjadi 2, ada antioksidan alami dan antioksidan sintetis. Antioksidan alami merupakan antioksidan yang bersumber secara alami yang terbentuk dari reaksi-reaksi yang terjadi pada proses pengolahan ataupun yang diisolasi dari sumber alami yang tidak dapat dimakan dan digunakan sebagai bahan tambahan makanan. Adapun contoh dari antioksidan alami diantaranya ada vitamin A, vitamin C, vitamin E, polifenol, *glutathione*, dan

asam *ellagic*. Sedangkan antioksidan sintetis merupakan antioksidan yang bersumber dari hasil sintesis reaksi kimia kemudian diproduksi untuk tujuan komersial. Berikut beberapa contoh antioksidan sintetis yaitu BHA (*butylated hydroxyanisole*), BHT (*butylated hydroxytoluene*), TBHQ (*tertiary butyl hydroquinone*), dan PG (*propyl gallate*) (Rani dan Tiana, 2016). Namun demikian, dilaporkan bahwa penggunaan antioksidan sintetis dapat memberikan dampak negatif pada kesehatan tubuh manusia yaitu berupa gangguan fungsi hati, paru, mukosa usus dan keracunan (Sari, 2016).

Adanya efek samping yang diakibatkan oleh konsumsi antioksidan sintetis telah mendorong peneliti untuk memanfaatkan keanekaragaman hayati yang dimiliki Indonesia sebagai sumber antioksidan alami. Salah satu tumbuhan yang dapat dijadikan sumber antioksidan alami yaitu tumbuhan waru. Tumbuhan waru mudah ditemukan di Indonesia dan juga dapat tumbuh di segala macam kondisi lingkungan. Tumbuhan waru biasanya dimanfaatkan oleh masyarakat sebagai tanaman peneduh. Daun waru juga dimanfaatkan sebagai obat tradisional oleh masyarakat yang diyakini dapat menyembuhkan berbagai macam penyakit seperti demam, batuk, infeksi telinga, sesak nafas, diare, disentri, tipus, TBC, radang amandel, peradangan usus, abses, penyubur rambut, dan bisul. Khasiat-khasiat dari daun waru ini diperoleh dari kandungan senyawa kimia yang terkandung di dalam daun waru itu sendiri seperti flavonoid, tanin, polifenol, saponin, alkaloid dan steroid (Surahmaida, Rachmawati, dan Handayani, 2020).

Waru memiliki nama latin *Hibiscus tiliaceus* Linn (Suwandi dan Hendrati, 2014). Tumbuhan waru termasuk ke dalam salah satu jenis tumbuhan Usada Taru Pramana (UTP) yaitu jenis tumbuhan yang dapat dijadikan obat-obatan. Tumbuhan waru masuk ke dalam famili *Malvaceae* dengan marga *Hibiscus* (Rustini, Ariati, Dewi, dan Swantara, 2015). Famili *Malvaceae* memiliki kurang lebih 250 spesies tumbuhan, salah satunya adalah tumbuhan waru (Narender, Sunil, Dinesh, dan Vipin, 2009). Menurut Sunil, *et al.* (2008) di jurnalnya menjelaskan bahwa daun waru mengandung senyawa metabolit sekunder seperti saponin, flavonoid, dan polifenol. Pada akar waru mengandung senyawa tanin, saponin, dan flavonoid. Sedangkan pada kulit batang waru mengandung senyawa-

senyawa yang bersifat toksik pada sel kanker kolon HT-29 dengan $LC_{50} < 4 \mu\text{g/mL}$. Sementara zat lain yang terkandung pada tumbuhan waru yaitu emolien yang mempunyai manfaat sebagai antiseptik. Tumbuhan waru juga diketahui mengandung protein. (Suwandi dan Hendrati, 2014).

Penelitian yang telah dilakukan oleh Oktari, *et al.* (2014), menjelaskan bahwa ekstrak alami dari daun waru mengandung flavonoid, tanin, dan fenol. Ekstrak etanol yang terkandung pada daun waru juga menunjukkan khasiat antioksidan yang efektif karena mempunyai kandungan fenolik dan flavonoid (Hossain, Akbar, Rahman, Yeasmin, Khan dan Jahar, 2015). Sementara kandungan fitokimia saponin, flavonoid, polifenol dan tannin pada daun waru ternyata juga memiliki efek antibakteri (Lusiana, Soetjipto, dan Hastuti, 2013).

Ada berbagai metode atau cara dalam melakukan uji aktivitas antioksidan, salah satunya yang paling sering digunakan yaitu metode DPPH (2,2-difenil-1-pikrilhidrazil). Metode DPPH adalah metode yang konvensional yang juga telah lama digunakan untuk penetapan aktivitas senyawa antioksidan. Kelebihan menggunakan metode DPPH yaitu metode ini mudah digunakan, cepat, cukup teliti, dan baik digunakan dalam pelarut organik (Sastrawan, Sangi, dan Kamu, 2013). Keunggulan lainnya dari metode DPPH adalah dapat dikerjakan secara cepat dan sederhana dalam penggunaannya (Rorong, 2008). Peredaman radikal bebas dengan metode DPPH biasanya berdasarkan pada reduksi dari larutan metanol radikal bebas DPPH yang berwarna oleh penghambatan radikal bebas. Pada saat larutan DPPH yang berwarna ungu bertemu dengan bahan pendonor elektron maka yang terjadi larutan DPPH akan tereduksi sehingga menyebabkan warna ungu pada larutan DPPH akan memudar dan digantikan warna kuning yang berasal dari gugus pikril (Tristantini, Ismawati, Pradana, dan Jonathan, 2016).

Aktivitas antioksidan dari suatu senyawa dapat dikatakan sangat kuat apabila mempunyai nilai IC_{50} (*inhibition concentration 50%*) kurang dari 50%, jika nilai IC_{50} berkisaran di 50-100% maka dikatakan kuat, bila nilai IC_{50} dikisaran 100-150% maka dikatakan sedang, dan jika nilai IC_{50} di angka 151-

200% maka dikatakan suatu senyawa memiliki aktivitas antioksidan lemah (Tristantini, Ismawati, Pradana, dan Jonathan, 2016).

Berdasarkan latar belakang di atas maka peneliti tertarik untuk meneliti tentang uji aktivitas antioksidan ekstrak daun waru menggunakan berbagai pelarut yang berbeda kepolarannya yaitu *n*-heksan (pelarut non polar), etil asetat (pelarut semi polar), dan etanol (pelarut polar) dengan metode DPPH. Nilai total fenol dan total flavonoid digunakan sebagai satuan dasar untuk menganalisis potensi antioksidan ekstrak daun waru.

I.2. Rumusan Masalah

Adapun yang menjadi rumusan masalah pada penelitian ini adalah sebagai berikut:

1. Bagaimana perbedaan aktivitas antioksidan ekstrak daun waru (*Hibiscus tiliaceus*) dengan pelarut *n*-heksan, etil asetat, dan etanol menggunakan metode DPPH?
2. Ekstrak daun waru (*Hibiscus tiliaceus*) dengan pelarut apakah yang menunjukkan potensi terbaik sebagai antioksidan?

I.3. Tujuan Penelitian

Adapun yang menjadi tujuan dari penelitian ini adalah sebagai berikut:

1. Untuk mengetahui perbedaan aktivitas antioksidan dari ekstrak daun waru (*Hibiscus tiliaceus*) dengan pelarut *n*-heksan, etil asetat, dan etanol menggunakan metode DPPH.
2. Untuk mengetahui ekstrak daun mana yang lebih berpotensi sebagai antioksidan dari ketiga pelarut yang digunakan.

I.4. Manfaat Penelitian

Adapun manfaat penelitian ini adalah sebagai berikut:

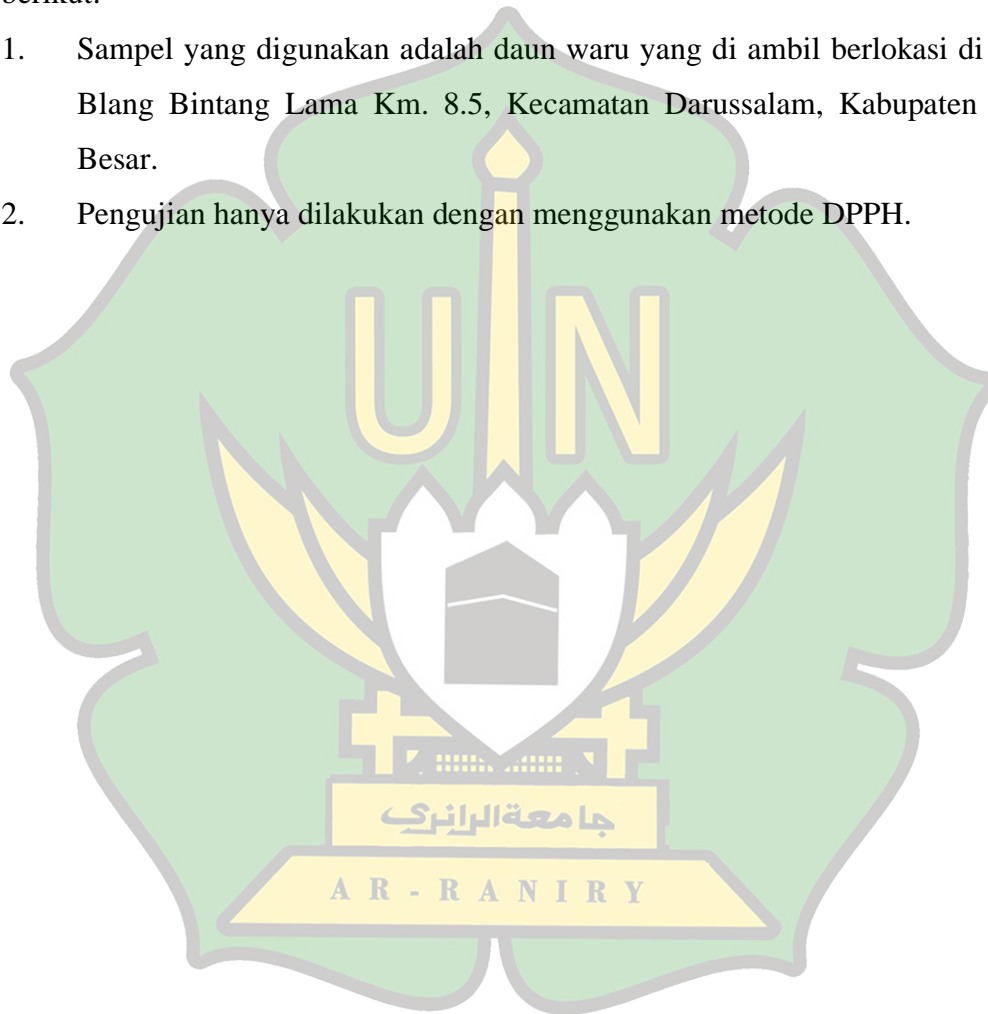
1. Memberikan informasi yang bermanfaat bagi masyarakat dan peneliti terhadap potensi ekstrak daun waru sebagai antioksidan.

2. Memberikan informasi pengaruh jenis pelarut dengan tingkat kepolaran yang berbeda terhadap nilai rendemen dan potensinya sebagai antioksidan.

I.5. Batasan Penelitian

Adapun yang menjadi batasan penelitian pada penelitian ini adalah sebagai berikut:

1. Sampel yang digunakan adalah daun waru yang di ambil berlokasi di Jalan Blang Bintang Lama Km. 8.5, Kecamatan Darussalam, Kabupaten Aceh Besar.
2. Pengujian hanya dilakukan dengan menggunakan metode DPPH.

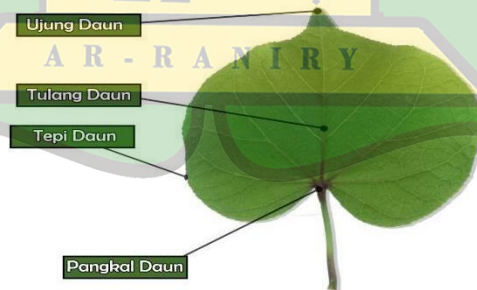


BAB II

LANDASAN TEORITIS

II.1. Tumbuhan Waru

Waru memiliki nama latin *Hibiscus tiliaceus* Linn dan tanaman ini dapat tumbuh pada segala macam lingkungan. Oleh masyarakat, biasanya selain dimanfaatkan sebagai tanaman peneduh, di Indonesia waru juga digunakan sebagai tanaman obat tradisional untuk menyembuhkan penyakit seperti demam, batuk, infeksi telinga, sesak nafas, diare, disentri, tipus, TBC, randang amandel, peradangan usus, abses, penyubur rambut dan bisul. Berbagai macam khasiat yang terdapat pada daun waru ini disebabkan karena adanya kandungan senyawa kimia yang terkandung di dalamnya, seperti flavonoid, tannin, polifenol, saponin, alkaloid dan steroid (Surahmaida, Rachmawati, dan Handayani, 2020). Tumbuhan waru termasuk ke dalam salah satu jenis tumbuhan Usada Taru Pramana (UTP) yaitu jenis tumbuhan yang mengandung khasiat obat atau tumbuhan yang dapat dijadikan obat-obatan. Tumbuhan waru tergolong ke dalam famili *Malvaceae* dengan marga *Hibiscus* (Rustini, Ariati, Dewi, Indah, dan Swantara, 2015). Famili *Malvaceae* memiliki sekitar 250 spesies tumbuhan yang dapat dimanfaatkan sebagai tanaman obat, dimana salah satunya adalah tumbuhan waru (Narender, Sunil K., Dinesh K., dan Vipin K., 2009).



Gambar II. 1 Daun Waru (Sumber: Dokumentasi pribadi)

II.1.1. Klasifikasi Tumbuhan Waru

Identifikasi sampel daun waru di Laboratorium Multifungsi Biologi Fakultas Sains dan Teknologi Universitas Islam Negeri Ar-Raniry Banda Aceh adalah sebagai berikut:

Kingdom	: <i>Plantae</i>
Devisi	: <i>Tracheophyta</i>
Kelas	: <i>Magnoliopsida</i>
Ordo	: <i>Malvales</i>
Familia	: <i>Malvaceae</i>
Genus	: <i>Hibiscus</i>
Spesies	: <i>Hibiscus tiliaceus L.</i>

II.1.2. Nama Tumbuhan Waru di Berbagai Daerah di Indonesia

Di Indonesia tumbuhan ini memiliki banyak nama atau julukkan seperti: baru (Gayo, Belitung, Madura, Makassar, Sumba, Halmahera); baru dowongi (Ternate, Tidore); waru (Sunda, Jawa, Bali, Bugis, Flores); haru, halu, faru, fanu (aneka bahasa di Maluku) (Al-Jami, 2010). Di Pontianak, waru dikenal sebagai waru laut, atau dadap laut (Adolf, Putri, dan Cinta 2018). Sedangkan dalam Bahasa Aceh, waru disebut ba' siron atau bungoeng siren.

II.1.3. Morfologi Tumbuhan Waru

Pohon waru yaitu pohon kecil yang memiliki tinggi 5-15 m. Di tanah yang subur tanaman ini tumbuh lebih lurus dan dengan tajuk yang lebih sempit dari pada di tanah yang gersang yang cenderung tumbuh membengkok, serta percabangan dan daun-daunnya lebih lebar (Al-Jami, 2010). Batangnya berkayu, bulat, bercabang banyak, warnanya coklat (Adolf, Putri, dan Cinta, 2018).

Pangkal daun waru berlekuk atau bertangkai, daun berbentuk bundar telur atau seperti bentuk jantung dengan tepi daun berbagi rata, untuk ujung daun meruncing, garis tengah pada daun memiliki panjang hingga 19 cm, dan daunnya bertulang menyirip (menjari), dimana beberapa bagian yang ada pada tulang daun utama dengan kelenjar pada pangkalnya di sisi bawah daun atau pada sisi bawah berambut abu-abu rapat. Permukaan daun waru bagian atas licin mengkilat sedangkan untuk di bagian bawah daun licin, berwarna hijau tua dibagian atas dan

warna hijau muda dibagian bawah daun. Daging daun waru seperti perkamen, yaitu tipis tetapi cukup kaku. Daun waru berupa daun tidak lengkap (Rahayu, 2019).

Bunga waru berdiri sendiri atau dalam tandan berisi 2-5 kuntum. Daun kelopak tambahan bertaju 8-11, lebih dari separohnya berlekatan. Kelopak sepanjang 2,5 cm, bercangap 5. Daun mahkota bentuk kipas, berkuku pendek dan lebar, 5-7,5 cm, kuning, jingga, dan akhirnya kemerah-merahan, dengan noda ungu pada pangkalnya. Buah kotak bentuk telur, berparuh pendek, beruang 5 tak sempurna, membuka dengan 5 katup (Al-Jami, 2010).

II.1.4. Kandungan Kimia Tumbuhan Waru

Kandungan kimia yang terdapat pada daun dan akar waru adalah saponin dan flavonoid. Pada daun waru juga paling sedikit mengandung lima senyawa fenol, sedangkan pada akar waru mengandung tanin. Kandungan yang ada pada bunga waru yaitu ada antosianin, hiperin, hiperosida, rutin, 3 isokuersitrin, kuersetin-4-glukosida, spiraeoside, kuersimeritrin, sianidin 3,5-diglukosida, sianidin 3-rutinosida-5-glukosida. Senyawa baru dari tumbuhan waru yang diperoleh dari hasil isolasi yaitu n-trans-feruloytyramine, hibiscusamide, dan n-cis-feruloytyramine (Chen, Huang, Duh, Chen, Wang, dan Fang, 2006).

Batang dan daun waru juga dipercaya mengandung zat musilago dimana zat musilago ini berfungsi untuk sebagai pelapis dinding saluran cerna, saluran kencing serta tenggorokan. Sedangkan zat lain yang terkandung pada tumbuhan waru yakni emolien yang mempunyai manfaat sebagai pembasmi kuman (antiseptik). Menurut hasil penelitian Oktari, *et al.* (2014) dijelaskan ekstrak alami daun waru mengandung flavonoid, tanin, dan fenol. Ekstrak etanol daun waru juga menunjukkan khasiat antioksidan yang efektif karena mempunyai kandungan fenolik dan flavonoid (Hossain, Akbar, Rahman, Yeasmi, Khan, Rahman, dan Jahan, 2015). Sementara kandungan fitokimia saponin, flavonoid, polifenol dan tannin pada daun waru ternyata juga memiliki efek antibakteri (Lusiana, Soetjipto, dan Hastuti, 2013).

Adapun senyawa metabolit sekunder yang terdapat pada daun waru (*Hibiscus tiliaceus*) meliputi alkaloid, flavonoid, saponin dan tanin. (Surahmaida, Rachmawati, dan Handayani, 2020):

a. Alkaloid

Alkaloid adalah senyawa metabolit sekunder dengan memiliki lebih dari satu atom nitrogen dan biasanya tergabung dalam cincin heterosiklik. Alkaloid memiliki sifat basa yang dapat menyebabkan senyawa tersebut dapat mengalami dekomposisi akibat adanya sinar atau oksigen. Senyawa alkaloid dapat ditemukan hampir di semua bagian tumbuhan. Senyawa alkaloid dapat berfungsi sebagai senyawa toksik yang bisa melindungi tanaman terhadap musuh. Selain itu, senyawa alkaloid juga dapat mengatur pertumbuhan dan sebagai senyawa cadangan untuk memberikan nitrogen untuk tumbuhan (Nugroho, 2021).

b. Flavonoid

Flavonoid merupakan kelompok senyawa fenolik terbanyak yang dapat ditemukan pada jaringan tanaman. Senyawa flavonoid pada tanaman memiliki fungsi sebagai pelindung dan untuk mengatur pertumbuhan pada tanaman. Flavonoid juga memiliki sifat antioksidan. Umumnya rumus kimia flavonoid adalah $C_6-C_3-C_6$. Berdasarkan strukturnya flavonoid dapat dibedakan dalam beberapa kelompok yang meliputi kalkon, flavon, flavonol, flavanon, antosianin dan isoflavon (Julianto, 2019).

c. Saponin

Saponin merupakan glikosida triterpenoid dan sterol. Senyawa saponin merupakan senyawa aktif pada permukaan yang memiliki sifat seperti sabun. Senyawa saponin memiliki rasa pahit dan dapat membentuk busa jika dikocok dalam air (Julianto, 2019).

d. Tanin

Tanin merupakan senyawa fenolik yang memiliki rasa yang pahit dan sepat. Senyawa tanin banyak terdapat pada berbagai jenis tanaman. Senyawa tanin pada umumnya berfungsi sebagai senyawa pelindung dari pemangsa lain. Senyawa tanin juga dapat mengatur proses metabolisme tumbuhan.

Senyawa tanin dapat dikelompokkan dalam dua kelompok yaitu, tanin terhidrolisis dan tanin terkonsensasi (Julianto, 2019).

II.1.5. Kegunaan

Tumbuhan waru dalam pengobatan digunakan sebagai antimikroba, antiradang, membersihkan darah, antibengkak, melancarkan pengeluaran nanah, antineoplastik, menghentikan pendarahan (koagulan), antikanker esofagus, kardia, lambung, paru-paru, payudara dan kulit (Al-Jami, 2010).

II.2. Radikal Bebas

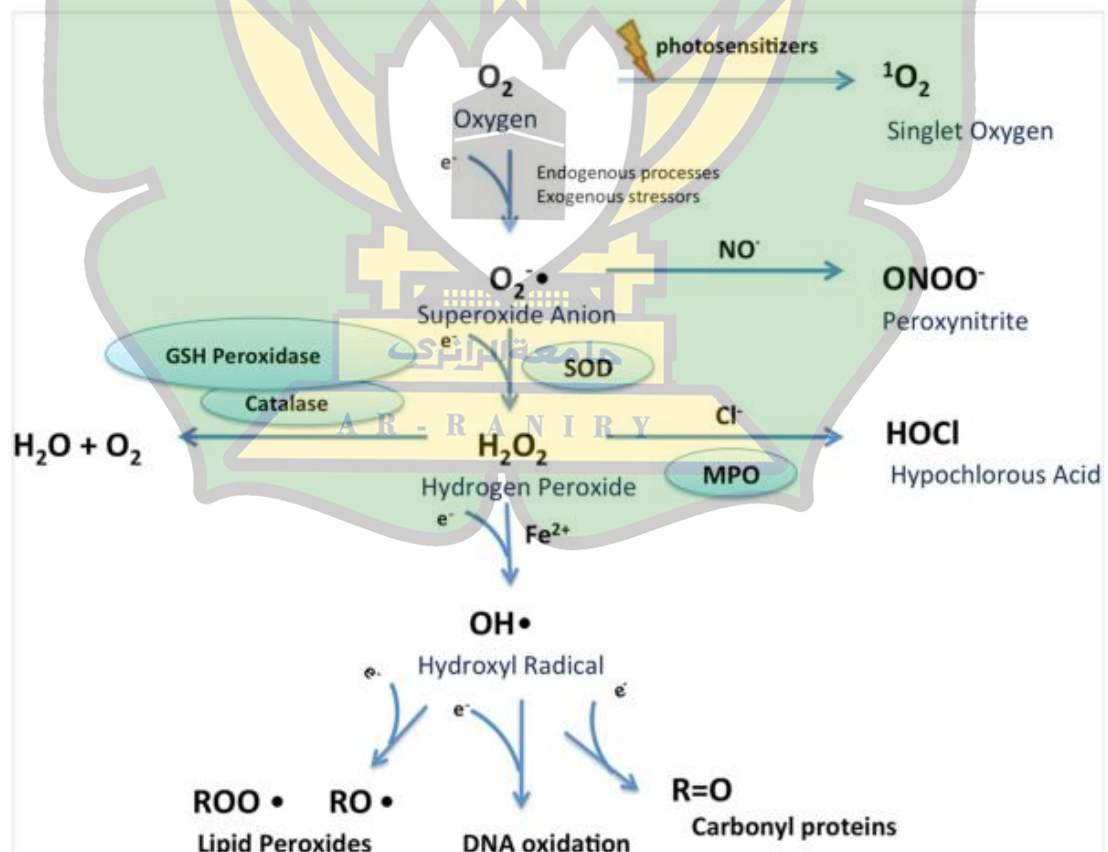
Radikal bebas atau ROS (*Reactive Oxygen Species*) adalah molekul atom yang mempunyai kereaktifan tinggi dikarenakan adanya elektron yang tidak berpasangan (Fitriana, Fatmawati, dan Ersam, 2015). ROS terbentuk melalui dua tahap yaitu endogen atau fisiologis dan eksogen. ROS endogen terbentuk secara fisiologis dari hasil metabolisme normal tubuh. Menurut Andriana, *et al.* (2007) sumber ROS endogen dapat dibentuk dari enzimatik dan non enzimatik yang bersumber dari sisa hasil metabolisme tubuh dan dari luar tubuh contohnya seperti makanan, sinar UV, polutan, dan asap rokok. Radikal bebas dengan jumlah yang banyak dalam tubuh dapat mengakibatkan terjadinya stres oksidatif sel (Fitriana, Fatmawati, dan Ersam, 2015). Stres oksidatif yaitu keadaan yang tidak berimbang antara jumlah molekul ROS dan antioksidan di dalam tubuh kita (Rahayu, Kusriani, Dewi, Fachriyah, dan Enny, 2009). Jika hal ini terus menerus terjadi maka dapat memicu munculnya penyakit degeneratif seperti kanker, diabetes, peradangan dan kardiovaskuler (Fitriana, Fatmawati, dan Ersam, 2015).

Menurut Kumar, *et al.* (2005) ada 3 tahap penyebab kerusakan sel oleh radikal bebas, yaitu:

1. Peroksidasi komponen lipid dari membran sitosol yang menyebabkan serangkaian reduksi asam lemak (autokatalisis) mengakibatkan kerusakan membran dan organel sel.
2. Kerusakan DNA yang dapat mengakibatkan mutasi DNA bahkan dapat menimbulkan kerusakan sel.

3. Modifikasi protein teroksidasi karena *cross linking* protein, melalui mediator sulfidril atas beberapa asam amino labil seperti sistein, metionin, lisin dan histidin.

ROS (*Reactive Oxygen Species*) mempunyai bentuk yaitu *singlet oxygen* ($^1\text{O}_2$), anion superoksida (O_2^-), hidrogen peroksida (H_2O_2) dan hidroksil (OH^-). *Singlet oxygen* merupakan oksigen yang mempunyai satu elektron yang tidak memiliki pasangan pada orbit luarnya dan memiliki tingkat energi lebih besar yang dapat membentuk oksigen yang reaktif. *Singlet oxygen* mempunyai dua pilihan dimana yang pertama dapat mentransfer energi ke bahan organik disekitarnya dan yang kedua mampu membentuk *oxygen spesies* yang lebih reaktif. Anion superoksida terbentuk apabila satu elektron ditambahkan pada atom oksigen. Sedangkan hidrogen peroksida akan terbentuk apabila O_2^- mendapat elektron lain ditambahkan dua atom oksigen dan dua atom hidrogen (Andarina dan Djauhari, 2017).



Gambar II. 2 Pembentukan ROS (Sumber: Andarina dan Djauhari, 2017)

Reactive Oxygen Species terbentuk melalui dua tahap yaitu endogen atau fisiologis dan eksogen. ROS endogen terbentuk secara fisiologis dari hasil metabolisme normal tubuh. Dilihat dari sumbernya, ROS endogen dapat dibentuk dari enzimatik dan non enzimatik. Sumber endogen enzimatik ROS yaitu berasal dari metabolisme oksigen pada mitokondria yaitu mitokondrial oksidase, monoamin oksidase, mieloperoksidase, xantin oksidase dan nitrit oksida sintatase. Sementara sumber endogen non enzimatik ROS berasal dari reaksi Fenton yang merupakan hidrogen peroksida. Reaksi Fenton hidrogen peroksida bereaksi dengan besi atau tembaga akan terbentuk radikal hidroksil (OH^\cdot) yang merupakan ROS paling tidak stabil (Andarina dan Djauhari, 2017).

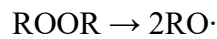
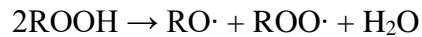
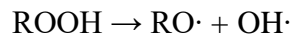
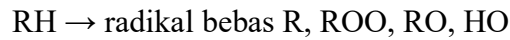
Radikal bebas terbentuk secara *in vivo* dan *in vitro* melalui tahapan proses pemecahan satu molekul secara homolitik menjadi dua molekul dimana proses ini memerlukan tenaga tinggi dari sinar UV, panas, dan radiasi ion. Kemudian dilanjutkan pada hilangnya satu elektron dari molekul dan penambahan elektron pada molekul (Irianti, Sugiyanto, Nuranto, dan Kuswandi, 2017).

Ada dua pembagian spesies oksigen reaktif (ROS) yakni *Oxygen centered non radicals* dan *Oxygen centered radicals*. *Oxygen centered radicals* meliputi beberapa jenis yakni anion superoksida (O_2^\cdot), radikal hidroksil (OH^\cdot), radikal alkoksil (RO^\cdot) dan radikal peroksil (ROO^\cdot). Sedangkan *Oxygen centered non radicals* meliputi hidrogen peroksida (H_2O_2) dan oksigen singlet ($^1\text{O}_2^\cdot$) (Irianti, Sugiyanto, Nuranto, dan Kuswandi, 2017).

Menurut Irianti *et al.* (2017) ada 3 tahapan reaksi pembentukan radikal bebas yakni inisiasi, propagasi dan terminasi dengan mekanisme sebagai berikut:

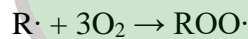
1. Tahap inisiasi, yaitu tahapan awal pembentukan radikal bebas dimana produksi radikal bebas melalui beberapa proses. Proses tersebut meliputi suhu tinggi, proses ekstrusi, dan tekanan pada pemotongan polimer yang menimbulkan radikal alkil. Setelah proses oksidasi dimulai, maka konsentrasi hidroperoksida meningkat. Kemudian dekomposisi hidroperoksida menjadi sumber utama inisiator radikal. Penyerapan sinar UV menghasilkan radikal yang disebabkan oleh hidroperoksida dan senyawa karbonil. Degradasi polimer disebabkan oleh penyerapan cahaya

UV dari autooksidasi radikal. Substrat oksidatif dapat bereaksi secara langsung dengan oksigen khususnya pada temperatur tinggi sehingga menghasilkan radikal.

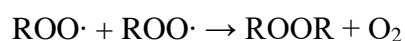
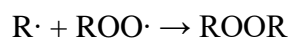
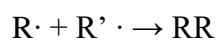


2. Tahap propagasi, yaitu tahap dimana terjadi pemanjangan pada rantai radikal bebas yang mengakibatkan radikal bebas mengalami perubahan menjadi radikal bebas lain. Pada tahap ini juga akan terjadi oksigenasi lemak ($R\cdot$) yang membentuk radikal peroksida ($ROO\cdot$). Proses oksigenasi sangat cepat terjadi dengan aktivitas energi hampir mendekati nol (0) yang mengakibatkan konsentrasi $ROO\cdot$ terbentuk lebih besar.

Sebelum terjadi pemutusan oleh radikal peroksi ke non radikal, reaksi propagasi dapat terjadi beberapa kali. Dekomposisi homolitik hidroperoksida dihasilkan melalui reaksi propagasi yang meningkatkan tingkat inisiasi oleh produksi radikal. Laju reaksi dari molekul oksigen dengan radikal alkil membentuk peroksi radikal jauh lebih tinggi dibandingkan laju reaksi radikal peroksi dengan atom hidrogen dari substrat.



3. Tahap terminasi adalah tahap dimana senyawa radikal akan bereaksi dengan radikal lain sehingga potensi propagasinya rendah. Konversi radikal peroksi dan alkil ke non radikal akan mengakhiri reaksi propagasi, yang menyebabkan berkurangnya rantai kinetik. Reaksi terminasi terjadi dengan begitu cepat saat konsentrasi oksigen sangat rendah. Kombinasi radikal alkil mengakibatkan *cross linking* sehingga terjadi peningkatan viskositas dan berat molekul.



Pada tahap terminasi, spesies non radikal akan terbentuk karena radikal bebas bereaksi satu sama lain. Sementara hidroperoksida akan terdekomposisi menjadi produk alkohol, asam keton, dan substrat lain yang lebih stabil.

II.3. Antioksidan

Antioksidan adalah suatu senyawa kimia yang menyumbangkan satu atau lebih elektron (donor elektron) kepada radikal bebas (Ridho, Sari, dan Wahdaningsih, 2014). Antioksidan menstabilkan radikal bebas dengan melengkapi kekurangan elektron yang dimiliki radikal bebas, dan menghambat terjadinya reaksi berantai dari pembentukan radikal bebas (Malangngi, Sangi, dan Paendong, 2012).

Antioksidan dapat diklasifikasikan menjadi dua jenis yaitu antioksidan sintesis dan antioksidan alami (Yuliani dan Dienina, 2015). Dimana antioksidan alami lebih banyak dicari sebagai antioksidan tambahan bagi tubuh dibandingkan dengan antioksidan sintetik, ini karena antioksidan sintetik seperti butil hidroksitoluen (BHT) diketahui dapat meningkatkan terjadinya efek karsinogenesis. Salah satu sumber antioksidan alami banyak berasal dari jenis tumbuhan yang tergolong ke dalam famili *Malvaceae*. Ada kurang lebih 243 genus dan 4300 jenis tumbuhan yang termasuk ke dalam Famili *Malvaceae*. Sebagian besar tumbuhan famili *Malvaceae* diketahui memiliki kandungan senyawa golongan fenol. Senyawa golongan fenol diketahui sangat berperan terhadap aktivitas antioksidan, semakin besar kandungan senyawa golongan fenolnya maka semakin besar aktivitas antioksidannya (Hardiana, Rudiyanisya, dan Titin, 2012).

Salah satu tumbuhan yang dapat dijadikan sumber antioksidan alami yaitu tumbuhan waru (*Hibiscus tiliaceus*). Tumbuhan waru terutama pada bagian daunnya dipercaya memiliki kandungan senyawa kimia, diantaranya seperti flavonoid, tannin, polifenol, saponin, alkaloid, dan steroid (Surahmida, Rachmawati, dan Handayani, 2020). Sementara zat lain yang terkandung pada tumbuhan waru yaitu emolien yang diketahui punya manfaat sebagai antiseptik.

Tumbuhan waru juga diketahui mengandung protein serta zat tanin (Suwandi dan Hendrati, 2014). Tanin adalah senyawa aktif dari metabolit sekunder yang mempunyai beberapa khasiat diantaranya astringen, anti diare, anti bakteri, dan antioksidan. Tanin merupakan kumpulan zat organik yang sangat kompleks yang terdiri dari senyawa fenolik yang sukar dipisahkan dan sukar mengkristal, mengendapkan protein dari larutannya dan bersenyawa dengan protein tersebut. Tanin dibagi menjadi dua kelompok, yang pertama tanin terhidrolisis dan yang kedua tanin terkondensasi. Tanin memiliki peranan biologis yang kompleks mulai dari pengendap protein hingga pengkhelet logam. Selain itu, tanin juga berfungsi sebagai antioksidan biologis (Malangngi, Sangi, dan Paendong, 2012). Pada tumbuhan, tanin berfungsi sebagai pertahanan diri dari serangan bakteri, fungi, virus, insekta herbivora dan vertebrata herbivora. Dalam bidang kesehatan, tanin juga mempunyai aktivitas sebagai antibiotik. Aktivitas antibiotik dari tanin mempunyai prinsip kerja dengan cara membentuk kompleks dengan enzim ekstraseluler yang dihasilkan oleh patogen atau dengan mengganggu proses metabolisme patogen tersebut. Tanin terkondensasi memiliki aktivitas antioksidan dan dapat melindungi kulit dari kerusakan yang ditimbulkan oleh radiasi ultraviolet (Ikalinus, Widyastuti, dan Setiasih, 2015).

Daun waru diketahui juga mengandung flavonoid. Di alam, flavonoid suatu kelompok fenol terbesar yang pernah ditemukan. Flavonoid memiliki struktur kerangka dasar karbon yang terdiri dari 15 atom karbon, dimana 2 cincin benzen (C_6) terikat pada suatu rantai propane (C_3) sampai membentuk susunan $C_6-C_3-C_6$ (Marhenta, Sunarni, dan Iswand, 2016). Manfaat flavonoid diantaranya untuk melindungi struktur sel, meningkatkan efektifitas vitamin C, antiinflamasi, mencegah keropos tulang dan sebagai antibiotik (Lumbessya, Abidjulua, dan Paendong, 2013). Flavonoid merupakan golongan senyawa fenol yang mempunyai banyak gugus -OH dengan perbedaan keelektronegatifan yang tinggi, sehingga sifatnya polar. Golongan senyawa ini sangat mudah terekstrak dalam pelarut etanol yang mempunyai sifat polar karena adanya gugus hidroksil, sehingga dapat membentuk ikatan hidrogen (Ikalinus, Widyastuti, dan Setiasih, 2015). Flavonoid juga dilaporkan memiliki sifat sebagai penangkap radikal bebas,

penghambat enzim hidrolisis dan oksidatif, dan bekerja sebagai antiinflamasi (Pourmourad, Hosseinimehr, dan Shahabimajd, 2006). Flavonoid telah menunjukkan perannya sebagai antioksidan, antimutagenik antineoplastik dan aktivitas vasolidator (Marhenta, Sunarni, dan Iswand, 2016).

Senyawa lain yang memiliki potensi sebagai antioksidan adalah saponin. Saponin mempunyai kemampuan meredam superoksida dengan cara pembentukan intermediet hidroperoksida sehingga mencegah kerusakan biomolekular oleh radikal bebas (Syarif, Muhajir, Ahmad, dan Malik, 2015). Menurut penelitian Istiqomah, *et al.* (2011), disebutkan jika daun waru juga mempunyai kandungan senyawa saponin yang tinggi yaitu sebesar 12,9 mg/g.

Secara umum sistem kerja dari antioksidan dibagi menjadi dua, yaitu yang pertama secara enzimatik, contohnya superoxide dismutase (SOD), katalase (CAT), peroksidase (POX), asam askorbat peroksidase (APX), *glutathione reductase* (GR), dan polifenol oksidase (PPO). Adapun yang kedua sistem kerja dari antioksidan yaitu secara non-enzimatik, contohnya asam askorbat (vitamin C), senyawa fenolik, karotin dan α -tokoferol. Senyawa fenolik yang sangat aktif sebagai antioksidan alam dan paling banyak ditemukan dalam tanaman diantaranya adalah asam galat dan kuersetin (Maesaroh, Kurnia, dan Anshori, 2018). Kuersetin merupakan golongan senyawa flavonol yang paling banyak terdapat di alam dari pada jenis flavonoid yang lain. Kuersetin berfungsi sebagai antioksidan dan antiaging (Pertiwi, Yari, dan Putra, 2016). Penelitian tentang hubungan antara struktur dan aktivitas antioksidan senyawa fenolik telah membuktikan bahwa aktivitas antioksidan senyawa ditentukan oleh adanya gugus hidroksil bebas dan terkonyugasi seperti pada asam galat, asam tanat dan kuersetin (Maesaroh, Kurnia, dan Anshori, 2018).

Aktivitas antioksidan non enzimatis yang diuji pada tanaman dan bahan pangan umumnya dapat diuji menggunakan metode yang berbasis air 2,2-difenil-1- pikrilhidrazil (DPPH) (reaksi dengan radikal bebas), *Ferric Reducing Antioxidant Power* (FRAP) (reaksi reduksi-oksidasi), *Ferrous Ion Chelating* (FIC) (reaksi kelat atau melalui pembentukan kompleks), dan yang berbasis lemak misalnya dengan *Thiobarbituric acid* (TBA). Banyaknya metode untuk uji

aktivitas antioksidan dapat memberikan hasil uji yang beragam. Hal tersebut diakibatkan oleh adanya pengaruh dari struktur kimiawi antioksidan, sumber radikal bebas, dan sifat fisiko-kimia sediaan sampel yang berbeda. Oleh karena itu, sangat diperlukan pemilihan metode analisa aktivitas antioksidan yang tepat dan selektif untuk suatu jenis sampel tertentu (Maesaroh, Kurnia, dan Anshori, 2018).

II.4. Metode Ekstraksi

Ekstraksi merupakan metode pemisahan zat aktif tertentu pada suatu sampel dengan menggunakan pelarut tertentu (Endarini, 2016). Pelarut yang dipakai harus mampu mengekstrak substansi yang diinginkan tanpa melarutkan material lainnya. Ekstraksi dengan pelarut berdasarkan pada kelarutan komponen terhadap komponen lain dalam campuran (Tuhuloula, Budiyarti, dan Fitriana, 2013). Proses ekstraksi dilakukan untuk mendapatkan komponen bioaktif dalam suatu tumbuhan (Endarini, 2016). Ekstraksi biasanya terdiri dari beberapa metode meliputi maserasi, perkolasi, ekstraksi *soxhlet*, hidrodestilasi dan refluks (Julianto, 2019).

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

Ada beberapa metode umum ekstraksi yang sering dilakukan yaitu ekstraksi dengan pelarut (maserasi), destilasi, *supercritical fluid extraction* (SFE), pengepresan mekanik dan sublimasi, serta secara enzimatik. Seiring dengan perkembangan zaman serta adanya tuntutan terhadap metode ekstraksi yang bertujuan untuk memperoleh hasil yang tinggi dengan waktu yang relatif singkat untuk meminimalkan keterbatasan teknik ekstraksi konvensional, maka diperlukan inovasi teknologi dalam proses ekstraksi. Sebagai jawaban dari

tuntutan tersebut ada beberapa alternatif metode ekstraksi baru untuk mengekstrak senyawa fitokimia dari tanaman seperti ekstraksi dengan ultrasonik, ekstraksi *microwave*, ekstraksi fluida superkritik serta ekstraksi solven aselerasi. Selain metode ekstraksi faktor yang dapat menunjang untuk mengetahui kandungan metabolit sekunder adalah jenis pelarut yang digunakan dalam ekstraksi. Senyawa yang bersifat non polar akan larut dalam pelarut non polar sedangkan senyawa semi polar akan larut dalam pelarut semi polar serta senyawa yang bersifat polar akan larut ke dalam pelarut polar (Sayuti, 2017).

Ada beberapa metode ekstraksi yang dapat digunakan mulai dari metode konvensional sampai yang modern. Metode-metode tersebut mempunyai kelebihan dan kelemahan masing-masing. Oleh karena itu, seiring berkembangnya zaman terdapat metode-metode ekstraksi yang efektif dan efisien untuk mengekstrak pigmen dari bahan. Salah satu metode yang sering digunakan pada penelitian adalah metode maserasi. Metode maserasi menggunakan pelarut yang akan berdifusi masuk ke dalam sel bahan yang selanjutnya senyawa aktif akan keluar akibat dari tekanan osmosis, biasanya juga dilakukan pengadukan dan pemanasan untuk mempercepat proses ekstraksi. Pelarut yang sering dipakai adalah aseton dan etanol. Kelebihan metode ini yaitu sederhana, mudah, dan biayanya yang murah. Sementara kekurangan metode maserasi yaitu metodenya membutuhkan waktu yang lama dalam mengekstraksi suatu sampel. Selain itu, rendemen yang dihasilkan biasanya tidak bebas dari pelarut organik (Maleta, Indrawati, Limantara, dan Brotosudarmo, 2018).

Secara umum, ekstraksi menggunakan pelarut seperti air, metanol, etanol, etil asetat, dan *n*-heksan mampu memisahkan senyawa-senyawa yang penting dalam suatu bahan. Ekstraksi ini mempunyai prinsipnya suatu bahan akan mudah larut dalam pelarut yang sama polaritasnya. Ekstraksi dengan pelarut dapat dilakukan dengan metode ekstraksi bertingkat dan tidak bertingkat. Ekstraksi tidak bertingkat yaitu hanya digunakan satu pelarut untuk ekstraksi, sedangkan pada ekstraksi bertingkat digunakan dua atau lebih pelarut. Ekstraksi bertingkat akan menghasilkan senyawa tertentu yang terekstrak secara spesifik pada tiap pelarut yang digunakan, sedangkan ekstraksi tidak bertingkat menghasilkan

senyawa yang terekstrak merupakan ekstrak total yang mampu terekstraksi dengan pelarut tersebut (Permadi, Sutanto, dan Wardatun, 2018).

Ekstraksi bertingkat dilakukan dengan cara merendam sampel dengan pelarut berbeda secara beruntun. Ekstraksi bertingkat dimulai dengan pelarut non polar seperti *n*-heksan, kemudian dilanjutkan dengan pelarut yang kepolarannya menengah seperti etil asetat, dan prosedur selanjutnya dengan pelarut polar seperti etanol atau metanol. Dengan demikian akan diperoleh ekstrak kasar yang mengandung berturut-turut senyawa non polar, semi polar, dan polar. Pemilihan maserasi bertingkat yaitu untuk mengekstrak senyawa fenol yang secara umum terdegradasi pada suhu tinggi dan memiliki kepolaran yang beragam (Kartikasari, 2015).

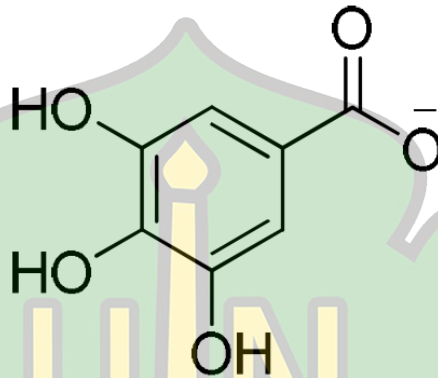
Menurut penelitian Kartikasari (2015), menjelaskan bahwa hasil dari proses ekstraksi disebut dengan ekstrak. Ekstrak adalah sediaan kental yang diperoleh dengan mengekstraksi senyawa aktif dari simplisia nabati atau simplisia hewani menggunakan pelarut yang sesuai, kemudian semua atau hampir semua pelarut diuapkan dan massa atau serbuk yang tersisa diperlakukan sedemikian hingga memenuhi baku yang telah ditetapkan.

II.5. Prinsip Analisis Antioksidan

II.5.1. Analisis Total Fenol

Metode Folin-Ciocalteu digunakan untuk pengujian total fenol dan sebagai pembanding digunakan asam galat (Kartikasari, 2015). Asam galat (asam 3,4,5-trihidroksibenzoat) merupakan senyawa fenolik yang bukan tergolong dalam flavonoid. Gugus fungsi dalam struktur asam galat yang bertanggung jawab memberikan aktivitas antioksidan adalah 3 gugus hidroksil (Lopez, Martinez, Del-Valle, Ferrit, dan Luque, 2003). Adapun kandungan fenolik total dalam suatu sampel dapat diukur secara kolorimetri dengan metode Folin-Ciocalteu dan dinyatakan dengan massa ekuivalen asam galat (Jasson, 2005). Alasan penggunaan asam galat sebagai standar dalam penetapan kandungan fenolik total yaitu karena asam galat terbentuk dari 3-*dehydroshikimic acid* pada jalur sikimat yang melalui serangkaian tahapan reaksi kimia hingga diperoleh asam amino aromatik yaitu L-

phenylalanine, L-tyrosine yang merupakan bentuk dari struktur dasar yang ditemukan pada *cinamic acid*, coumarins, lignans dan flavonoids (Dewick, 2001). Asam galat termasuk dalam golongan antioksidan alami yang sering digunakan sebagai pengawet makanan (Lopez, Martinez, Del-Valle, Ferrit, dan Luque, 2003).



Gambar II. 3 Struktur Asam Galat (Sumber: Dokumentasi pribadi)

Metode Folin-Ciocalteu adalah metode yang umum digunakan sebagai standar penentuan kandungan fenolik total karena merupakan metode yang cepat dan sederhana yang dinyatakan sebagai massa ekuivalen asam galat tiap mg sampel (Fu, Xu, Gan, Zhang, Xia, dan Li, 2011). Prinsip dari metode ini ialah reaksi oksidasi senyawa fenol dalam suasana basa oleh pereaksi Folin-Ciocalteu menghasilkan kompleks berwarna biru yang memberikan serapan kuat pada panjang gelombang 760 nm. Peningkatan intensitas warna biru akan sebanding dengan jumlah senyawa fenolik yang ada dalam sampel (Blainski, Cristiny, dan de Mello, 2013). Reagen yang digunakan adalah reagen Folin-Ciocalteu, yang pembuatannya menggunakan bahan kimia seperti sodium tungstat, sodium molibdat, litium sulfat, bromin, dan beberapa asam lain (Kartikasari, 2015).

II.5.2. Analisis Total Flavonoid

Flavonoid merupakan senyawa polar karena mempunyai sejumlah gugus hidroksi yang tidak tersubstitusi atau tersubstitusi suatu gula (Kate, 2014). Analisis total flavonoid dapat dilakukan menggunakan spektrofotometri UV-Vis. Prinsip analisis dengan metode ini didasarkan pada pembentukan kompleks antara gugus catechol pada senyawa flavonoid dengan logam aluminium yang

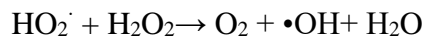
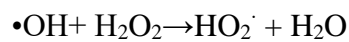
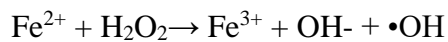
akan menghasilkan warna. Analisis dilakukan dengan menggunakan standar kuersetin. Kuersetin adalah salah satu jenis flavonoid yang memiliki gugus catechol (1,2-dihidroksibenzena) sehingga dapat digunakan sebagai standar. Reagen yang digunakan untuk analisis total flavonoid adalah $\text{NaNO}_2\text{-AlCl}_3\text{-NaOH}$ (Kartikasari, 2015).

II.5.3. Analisis Perendaman Radikal Anion Superoksida

Analisis perendaman radikal anion superoksida dapat dilakukan menggunakan spektrofotometri UV-Vis. Prinsip analisis dengan metode ini didasarkan pada reaksi autooksidasi *pyrogallol*. *Pyrogallol* (1,2,3-benzotriol, I) adalah senyawa yang tidak berwarna. Pada suasana basa senyawa tersebut mengalami autooksidasi yang menghasilkan radikal superoksida dan orthoquinon (II). Orthoquinon yang telah terbentuk akan dioksidasi oleh radikal anion superoksida dan menghasilkan purpulloalgin (2,3,4,6-tetrahydroxy-5H-benzocycloheptene-5-one, III) yang berwarna oranye dan memiliki panjang gelombang maksimum 320 nm. Reaksi autooksidasi ini akan terus berlangsung sampai *pyrogallol* dan orthoquinon habis bereaksi. Laju pembentukan purpulloalgin berbanding lurus dengan konsentrasi radikal anion superoksida karena radikal anion superoksida yang mengoksidasi orthoquinon menjadi purpulloalgin. Adanya antioksidan akan menurunkan laju pembentukan purpulloalgin karena radikal anion superoksida akan bereaksi dengan antioksidan tersebut (Kartikasari, 2015).

II.5.4. Analisis Perendaman Radikal Hidroksil

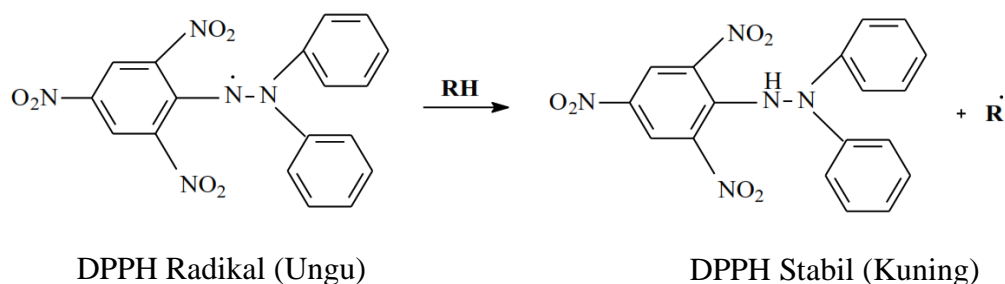
Prinsip analisis dengan metode ini adalah hidroksil akan bereaksi dengan senyawa antioksidan dalam sampel. Radikal hidroksil yang akan digunakan dalam analisis dihasilkan melalui reaksi Fenton yang terdiri atas Fe^{3+} - asam askorbat-EDTA- H_2O_2 . Ion Fe^{3+} akan membentuk kompleks dengan EDTA (*Ethylenediaminetetraacetic acid*), kemudian akan direduksi oleh asam askorbat sehingga menjadi ion Fe^{2+} . Ion Fe^{2+} yang telah terbentuk selanjutnya akan dioksidasi oleh H_2O_2 sehingga menghasilkan radikal hidroksil melalui persamaan reaksi berikut:



II.6. Metode DPPH (2,2-difenil-1-pikrilhidrazil)

Salah satu uji untuk aktivitas antioksidan yang paling sering digunakan yaitu dengan cara penangkapan radikal bebas (*free radical scavenging*) dengan menggunakan radikal 2,2-difenil-1-pikrilhidrazil (DPPH) (Erika, Dellima, dan Sulistyawati, 2014). Kelebihan metode spektrofotometri dengan DPPH adalah metodenya sederhana, mudah, sensitif, dan menggunakan sampel dalam jumlah yang sedikit dengan waktu yang singkat (Yuliani dan Dienina, 2015).

DPPH adalah suatu senyawa radikal bebas yang stabil sehingga apabila dipakai sebagai pereaksi dalam uji penangkapan radikal bebas cukup dilarutkan dan apabila disimpan dalam keadaan yang kering dengan kondisi penyimpanan yang baik maka DPPH bisa stabil selama bertahun-tahun. Nilai absorbansi yang dimiliki DPPH berkisaran antara 515-520 nm. Metode DPPH yaitu didasarkan pada reduksi dari larutan metanol radikal bebas DPPH yang berwarna oleh penghambatan radikal bebas. Ketika larutan DPPH yang berwarna ungu bertemu dengan bahan pendonor elektron maka yang terjadi DPPH akan tereduksi yang menyebabkan warna ungu memudar kemudian digantikan oleh warna kuning yang berasal dari gugus pikril (Tristantini, Ismawati, Pradana, dan Jonathan, 2016). Tujuan penggunaan larutan metanol untuk melarutkan DPPH dan sampel dikarenakan metanol tidak dapat mempengaruhi reaksi antara sampel uji sebagai antioksidan dengan DPPH sebagai radikal bebas (Molyneux, 2004).



Gambar II. 4 Reaksi DPPH dengan Senyawa Antioksidan
(Sumber: Dokumentasi pribadi)

Menurut Molyneux (2004), menjelaskan bahwa antioksidan akan bereaksi dengan 2,2-difenil-1-pikrilhidrazil (DPPH) yang menstabilkan radikal bebas dan mereduksi DPPH. Setelahnya DPPH akan bereaksi dengan atom hidrogen dari senyawa peredam radikal bebas yang membentuk 2,2-difenil-1-pikrilhidrazil (DPPH) yang lebih stabil. Reagen DPPH yang ikut bereaksi dengan antioksidan akan mengalami perubahan warna dari ungu ke kuning, intensitas warna tergantung kemampuan dari antioksidan. Aktivitas antioksidan dari suatu senyawa dapat digolongkan berdasarkan nilai IC_{50} yang diperoleh. Jika nilai IC_{50} suatu ekstrak berada dibawah 50 ppm maka aktivitas antioksidannya masuk kategori sangat kuat, nilai IC_{50} berada diantara 50-100 ppm berarti aktivitas antioksidannya masuk kategori kuat, nilai IC_{50} berada di antara 100-150 ppm berarti aktivitas antioksidannya masuk kategori sedang, nilai IC_{50} berada di antara 150-200 ppm berarti aktivitas antioksidannya masuk kategori lemah, sedangkan apabila nilai IC_{50} berada diatas 200 ppm maka aktivitas antioksidannya dikategorikan sangat lemah (Bahriu, Rahman, dan Diah, 2014).

Uji kualitatif antioksidan dilakukan dengan cara pemantauan ekstrak menggunakan kromatografi lapis tipis dengan pengembang butanol-asam asetat-air (4:1:5) dan fase diam silika gel GF254 pra salut. Pemantauan ekstrak ini dilakukan untuk mengetahui secara kualitatif adanya senyawa yang memiliki aktivitas antioksidan dari daun. Sebagai pembanding akan digunakan vitamin C. Penampak bercak yang digunakan yaitu H_2SO_4 10% dalam metanol, dan DPPH 0,2% dalam methanol (Marliani, Kusriani, dan Sari, 2014).

Uji kuantitatif dilakukan dengan cara menggunakan metode peredaman radikal bebas DPPH. Aktivitas penangkapan radikal bebas dievaluasi menggunakan sistem pendeteksian radikal bebas 2,2-difenil-1-pikrilhidrazil (DPPH) yang memberikan absorbansi kuat pada 516 nm. Sampel dan standar yang dilarutkan dalam metanol ditambahkan larutan stok DPPH dengan perbandingan volume 1:1 kemudian diinkubasi selama 30 menit pada suhu kamar dengan menggunakan wadah gelap yang dilapisi alumunium foil dan tertutup.

Serapan diukur pada panjang gelombang 516 nm. Persen penurunan absorbansi DPPH dihitung menggunakan rumus:

$$I(\%) = \frac{A_0 - A_s}{A_0} \times 100\%$$

Dimana:

I = Persen penurunan absorban DPPH

A₀ = Absorbansi larutan stok DPPH

A_s = Absorbansi larutan sampel setelah ditambahkan DPPH.

Aktivitas antioksidan yang diketahui dinyatakan dengan nilai IC₅₀ yang diperoleh dari regresi linier konsentrasi ekstrak (bpj) terhadap % Inhibisi (%). Untuk memperoleh regresi linier tersebut, masing-masing sampel digunakan 5 konsentrasi ekstrak yang berbeda. Nilai IC₅₀ ditentukan sebagai konsentrasi yang menimbulkan % Inhibisi 50% (y = 50) (Marliani, Kusriani, dan Sari, 2014).

II.7. Pelarut

Pelarut merupakan zat yang biasa digunakan sebagai media yang berfungsi untuk melarutkan zat-zat lain. Kesuksesan penentuan senyawa biologis aktif dari bahan tumbuhan sangat tergantung pada jenis pelarut yang digunakan dalam prosedur ekstraksi. Sifat pelarut yang baik untuk ekstraksi yaitu toksisitas dari pelarut yang rendah, mudah menguap pada suhu yang rendah, dapat mengekstraksi komponen senyawa dengan cepat, dapat mengawetkan dan tidak menyebabkan ekstrak terdisosiasi (Permanasari *et al*, 2020).

Sebagian besar reaksi kimia secara luas terjadi dalam larutan. Larutan terdiri dari pelarut dan zat terlarut. Pelarut umumnya merupakan zat yang berada pada larutan dalam jumlah yang besar, sedangkan zat lainnya dianggap sebagai zat terlarut. Pelarut berfungsi untuk melarutkan reaktan dan reagen sehingga keduanya bercampur, sehingga memudahkan penggabungan antara reaktan dengan reagen hingga merubah reaktan menjadi produk. Pelarut juga dapat menjadi kontrol suhu, seperti meningkatkan energi dari tumbukan partikel sehingga partikel-partikel tersebut dapat bereaksi lebih cepat atau untuk menyerap panas yang dihasilkan selama reaksi eksotermik (Permanasari *et al*, 2020).

Adapun kriteria pelarut yang dapat mencapai proses ekstraksi yang baik diantaranya adalah (Pattikawa dan Fauziawati, 2020):

1. Kemampuan tinggi melarutkan komponen zat terlarut di dalam campuran.
2. Kemampuan tinggi untuk diambil kembali.
3. Tidak mudah bereaksi dengan zat yang akan diekstraksi.
4. Tidak merusak alat secara korosi.
5. Tidak mudah terbakar.
6. Tidak beracun.

Tingkat kepolaran pelarut sangat berpengaruh terhadap daya larut. Adapun indikator kelarutan dapat ditentukan dari nilai konstanta dielektrik dan nilai polaritas pelarut. Berikut merupakan nilai konstanta dielektrik dari berbagai zat pelarut yang sering digunakan (Hibrah, Ikhsandy, Yahya dan Rosalina, 2022).

Tabel II. 1 Nilai Konstanta Dielektrik Berbagai zat

Konstanta Dielektrik	Nama Zat Pelarut	Polaritas
1,890	Petroleum Ringan	↓
2,023	Sikloheksan	
2,238	Karbon Tetraklorida	
2,284	Benzene Diklorometan	
4,806	Kloroform	
4,340	Etileter	
6,020	Etilasetat	
20,700	Aseton N-propanol	
24,300	Etanol	

Penentuan pelarut dalam kimia organik merupakan faktor penting karena menyangkut masalah kepolaran dan kenonpolaran, sifat protik dan aprotik serta kuat dan lemahnya. Suatu senyawa akan terlarut dalam suatu senyawa lainnya ditentukan oleh kepolaran, lingkungan dan suhu. Pemilihan pelarut tergantung pada senyawa yang ditargetkan. Faktor –faktor yang mempengaruhi pemilihan pelarut adalah jumlah senyawa yang akan diekstraksi, laju ekstraksi, keragaman senyawa yang akan diekstraksi, kemudahan dalam penanganan ekstrak untuk perlakuan berikutnya, toksisitas pelarut dalam proses bioassay, potensi bahaya kesehatan dari pelarut (Noviyanty, Salingkat dan Syamsiar, 2019).

Berbagai pelarut yang digunakan dalam prosedur ekstraksi antara lain (Hasmila, Natsir dan Soekamto, 2019) :

1. Air

Air adalah pelarut yang universal, biasanya digunakan untuk mengekstraksi produk tumbuhan yang mempunyai aktivitas antimikroba. Meskipun pengobatan secara tradisional menggunakan air sebagai pelarut, tetapi ekstrak tumbuhan dari pelarut organik telah ditemukan untuk memberikan aktivitas mikroba lebih konsisten dibandingkan dengan ekstrak air. Air juga melarutkan senyawa fenolik yang memiliki aktivitas penting sebagai antioksidan.

2. Etanol

Etanol larut baik dalam air, eter, kloroform dan benzena pada semua proporsi. Etanol membentuk azeotrop terner etanol, air dan benzena pada titik didih 78,2 °C dan kandungan etanol 96% dan air 4%. Sedangkan azeotrop terner etanol, air dan benzena pada titik didih 64,8°C mengandung 18,5% etanol, 7,4% air dan 74,1% benzena. Terdapat dua jenis pelarut teknis komersial, yaitu alkohol 94% yang membentuk azeotrop dengan air dengan kandungan air 5% dan alkohol absolut yang mengandung air 0,1%. Alkohol mengandung impuriti organik. Etanol hasil sintesis mengandung asetaldehid, aseton asam asetat dan etil asetat. Etanol hasil fermentasi mengandung alkohol tinggi dan metanol. Etanol dengan pelarut murni dibuat dengan mendistilasi kembali pelarut teknisnya.

3. N-Heksana

N-Heksana mempunyai karakteristik sangat tidak polar, volatil, mempunyai bau khas yang dapat menyebabkan pingsan. N-Heksana biasanya digunakan sebagai pelarut ekstraksi minyak nabati. Heksana perdagangan mengandung impuriti senyawa-senyawa tidak jenuh. Untuk membuang senyawa tidak jenuh, n-heksana dicuci beberapa kali dengan sejumlah kecil oleum 5%. Selanjutnya dicuci dengan H₂SO₄ pekat, air dan kemudian larutan NaOH 2% dan akhirnya dengan air hingga pH 7 (netral).

4. Etil Asetat

Etil asetat merupakan pelarut dengan karakteristik semipolar. Etil asetat secara selektif akan menarik senyawa yang bersifat semipolar seperti fenol dan terpenoid.

Pelarut teknis etil asetat dalam perdagangan hampir selalu mengandung air etanol dan asam asetat. Sedangkan pelarut etil asetat murni dapat diperoleh dengan mencuci tiga kali dengan volume 1:1 dengan larutan Na₂CO₃ 5%. Kemudian tiga kali lagi dengan setengah volume air. Keringkan dengan Na₂SO₄ anhidrus, sebelum disaring dan selanjutnya diredistilasi. Buang kepala distilat kira-kira setengah volume etil asetat.

II.8. Penelitian Relevan

Beberapa penelitian yang terkait dengan uji aktivitas ekstrak daun waru menggunakan metode DPPH adalah penelitian yang dilakukan oleh Marhenta, *et al.* (2016) dengan judul “*Aktivitas Antioksidan Fraksi n-Heksan, Etil Asetat Dan Fraksi Air Ekstrak Etanolik Daun Waru Gombang (Hibiscus Similis Bi,) Terhadap Radikal Bebas DPPH (2,2-difenil-1-pikrilhidrazil)*”. Penelitian ini dilakukan dengan tujuan untuk mengetahui aktivitas antioksidan pada fraksi n-heksan, fraksi etil asetat, fraksi air dan ekstrak etanolik terhadap radikal DPPH dengan parameter IC₅₀ dan untuk mengetahui fraksi dari ekstrak etanolik daun waru gombang (*Hibiscus similis* BI) yang memiliki aktivitas antioksidan paling tinggi. Serbuk daun waru dimaserasi menggunakan etanol 70%. Ekstrak etanol kemudian difraksinasi dengan pelarut n-heksan, etil asetat dan air untuk memisahkan senyawa berdasarkan polaritasnya. Fraksi dan ekstrak di analisis kandungan senyawa secara KLT. Fraksi dan ekstrak yang didapatkan diuji aktivitas antioksidannya terhadap radikal DPPH menggunakan alat spektrofotometer pada panjang gelombang 517 nm dan ditentukan harga IC₅₀. Rutin digunakan sebagai kontrol positif dalam penelitian ini. Hasil penelitian menunjukkan fraksi n-heksan, fraksi etil asetat, fraksi air, dan ekstrak etanolik memiliki nilai IC₅₀ sebesar 76,14 ppm; 48,13 ppm; 59,71 ppm; 65,67 ppm. Fraksi etil asetat mempunyai aktivitas antioksidan yang paling tinggi.

Penelitian lain yang terkait dengan uji aktivitas ekstrak daun waru menggunakan metode DPPH adalah penelitian yang dilakukan Kumar, *et al.* (2008) di jurnalnya yang berjudul “*Evaluation Of Antioxidant Potential, Phenolic and Flavonoid Contents Of Hibiscus Tiliaceus Flowers*”. Kumar, *et al.* (2008) menjelaskan bahwa pada daun waru mengandung senyawa metabolite sekunder seperti polifenol, saponin, dan flavonoid. Pada akar waru juga mengandung senyawa metabolite sekunder seperti tanin, saponin, dan flavonoid. Sedangkan pada kulit batang waru mengandung senyawa hibiscusamide, N-trans feruloyltiramine, dan N-cis feruloyltiramine dan bersifat toksik pada sel kanker kolon HT-29 dengan $LC_{50} < 4 \mu\text{g/mL}$.

Menurut Rahayu, *et al.* (2022) di jurnalnya yang berjudul “*Kadar Flavonoid dan Fenolik Ekstrak Daun Waru (Hibiscus tiliaceus) Serta Aktivitasnya Sebagai Antioksidan*”, menunjukkan bahwa ekstrak yang terkandung dalam pelarut metanol mempunyai aktivitas antioksidan yang sangat lemah ($IC_{50} = 710,680 \pm 3,747 \mu\text{g/mL}$). Begitupun ekstrak dalam pelarut etanol juga mempunyai aktivitas antioksidan yang sangat lemah ($IC_{50} = 989,150 \pm 0,798 \mu\text{g/mL}$). Pada hasil ekstrak menggunakan pelarut air, aktivitas antioksidan juga dinyatakan sangat lemah ($IC_{50} = 1.643,480 \pm 1,828 \mu\text{g/mL}$). Namun pada penelitian ini ekstrak etanol memiliki kadar flavonoid total tertinggi sementara ekstrak metanol memiliki kadar fenolik total tertinggi.

جامعة الرانيري

A R - R A N I R Y

BAB III

METODE PENELITIAN

III.1. Tempat dan Waktu

Penelitian ini dilaksanakan di Laboratorium Kimia Multifungsi Fakultas Sains dan Teknologi Universitas Islam Negeri Ar-Raniry Banda Aceh. Adapun waktu penelitian ini dilakukan mulai pada bulan Desember 2021 sampai bulan Februari 2022.

III.2. Alat dan Bahan

III.2.1. Alat

Alat yang digunakan pada penelitian ini digolongkan menjadi peralatan gelas, instrumen, dan peralatan bukan gelas. Peralatan gelas meliputi erlenmeyer 500 mL, gelas ukur 250 mL, tabung reaksi, labu ukur 5 mL, 10 mL, dan 100 mL. Peralatan instrumen meliputi blender, timbangan analitik, *vacuum evaporator*, corong *buchner*, pendingin, pipet mikro, inkubator, satu set alat Shimadzu UV-Vis Spektrofotometer UV-1900, *orbital shaker*, *vortex*, *water bath*, *dry block*, dan sentrifugator. Peralatan bukan gelas antara lain gunting, ayakan, cawan porselen, plastik sampel, tisu, kertas kabin, kertas saring, *eppendorf*, dan aluminium *foil*.

III.2.2. Bahan

Bahan yang digunakan pada penelitian ini adalah tumbuhan waru atau daun waru (*Hibiscus tiliaceus*), *n*-heksan (C_6H_{14}), etil asetat ($CH_3CH_2OCCH_3$), etanol 96% (C_2H_5OH), air mengalir (H_2O), aquades, reagen Folin-Ciocalteu, besi(III) klorida ($FeCl_3$), asam klorida pekat (HCl pekat), logam magnesium (logam Mg), asam sulfat (H_2SO_4) 2 N, asam sulfat pekat (H_2SO_4 pekat), natrium hidroksida ($NaOH$), asam asetat (CH_3COOH), dietil eter ($(C_2H_5)_2O$), kuersetin ($C_{15}H_{10}O_7$), larutan 2,2-difenil-1-pikrihidrazil (DPPH), asam galat ($C_7H_6O_5$), natrium karbonat (Na_2CO_3), dan asam askorbat ($C_6H_8O_6$).

III.3. Cara Kerja

III.2.1. Pengambilan Sampel

Sampel tumbuhan waru atau daun waru di ambil berlokasi di Jalan Blang Bintang Lama Km. 8.5, Kecamatan Darussalam, Kabupaten Aceh Besar. Pengambilan sampel tumbuhan waru ini berdasarkan pada kondisi lingkungan tempat tumbuhan tersebut tumbuh. Salah satu faktor yang dapat mempengaruhi produksi metabolit sekunder yaitu suhu dan CO₂, semakin tinggi suhu dan kadar CO₂ maka akan semakin tinggi pula produksi metabolit sekunder yang akan dihasilkan. Pada kondisi lingkungan yang mempunyai suhu tinggi akan terjadi peningkatan pada radikal bebas yang berupa *reactive oxygen species* (ROS) pada tumbuhan yang reaktif di dalam jaringan tumbuhan sehingga hal ini memicu kerusakan sel. Dengan kondisi suhu lingkungan yang tinggi tumbuhan akan memproduksi senyawa yang bersifat antioksidan, kondisi tersebut sebagai bentuk adaptasi tumbuhan terhadap suhu lingkungannya yang mempunyai suhu yang tinggi. Adapun pada suhu yang lebih tinggi, tumbuhan juga akan menghasilkan total flavonoid yang lebih banyak sebagai ekstra sinergi pertahanan dari tumbuhan terhadap cekaman pada lingkungannya (Utomo, Kristiani, dan Mahardika, 2020).

III.2.2. Identifikasi Tumbuhan Waru

Tahapan identifikasi tumbuhan waru yaitu untuk menetapkan kebenaran sampel yang berkaitan dengan ciri-ciri morfologi yang ada pada tumbuhan waru tersebut. Identifikasi tumbuhan waru dilakukan di Laboratorium Multifungsi Biologi Fakultas Sains dan Teknologi Universitas Islam Negeri Ar-Raniry Banda Aceh.

III.2.3. Preparasi Sampel dan Pembuatan Serbuk Simplisia

Sampel daun waru diambil sebanyak 2 Kg (2000 g) dalam keadaan masih segar dan dicuci pada air mengalir untuk menghilangkan kotoran yang menempel, kemudian dikeringkan di udara terbuka. Setelah kering, sampel daun waru dihaluskan menggunakan blender sehingga berbentuk serbuk kasar. Kemudian serbuk kasar daun waru diayak menggunakan ayakan nomor 40 *mesh* untuk mendapatkan serbuk halus daun waru. Penyerbukan bertujuan untuk memperluas permukaan simplisia sehingga proses ekstraksi semakin efektif dan efisien, karena

dengan penyerbukan sejumlah besar dinding-dinding sel akan rusak atau pecah sehingga akan memudahkan masuknya cairan penyari ke dalam sel-sel yang kemudian terjadi perpindahan masa zat aktif dari dalam serbuk keluar atau ke dalam cairan penyari. Hasil penyerbukan akan disimpan di dalam wadah yang kering dan tertutup rapat dimana nantinya akan digunakan kembali untuk penelitian selanjutnya (Marhenta, Sunarni, dan Iswand, 2016).

III.2.4. Uji Kadar Air

Tahapan awal dikeringkan cawan porselen kosong dalam oven pada suhu 40°C selama 30 menit. Setelah 30 menit dikeringkan, cawan porselen dibiarkan dingin kemudian berat cawan porselen kosong ditimbang. Serbuk halus daun waru ditimbang sebanyak 2 gram kemudian dimasukkan ke cawan porselen. Cawan porselen yang berisikan serbuk halus daun waru kemudian dimasukkan ke dalam oven (suhu 40°C selama 3 jam). Pemilihan suhu 40°C pada proses pengeringan sampel bertujuan untuk menjaga kandungan senyawa-senyawa aktif pada simplisia. Dikhawatirkan jika suhu lebih dari 50°C bisa terjadi kerusakan terhadap kandungan senyawa-senyawa aktif pada simplisia (Marhenta, Sunarni, dan Iswand, 2016).

Setelah 3 jam dikeringkan, cawan porselen yang berisikan sampel serbuk daun waru didinginkan kemudian ditimbang kembali. Kadar air dihitung dengan persamaan rumus sebagai berikut (Huliselan, Runtuwene, dan Wewenggang, 2015):

$$\% \text{ Kadar air} = \frac{\text{berat awal} - \text{berat akhir}}{\text{berat sampel}} \times 100\%$$

III.2.5. Ekstraksi Sampel

Ekstraksi bioaktif simplisia daun waru dilakukan dengan metode maserasi bertingkat dengan tiga jenis pelarut yang berbeda kepolarannya yaitu *n*-heksan, etil asetat, dan etanol. Maserasi bertingkat akan menghasilkan senyawa tertentu yang terekstrak secara spesifik pada setiap pelarut yang digunakan. Perbandingan sampel serbuk halus daun waru dan pelarut yang digunakan pada penelitian ini adalah 1:10. Tahapan awal ekstraksi dimulai dari pelarut non polar, yaitu *n*-heksan. Serbuk halus daun waru seberat 50 gram dimaserasi bersama 500 mL

pelarut *n*-heksan selama 72 jam pada suhu ruang dengan menggunakan *shaker* kecepatan 110 RPM (*rotation per minutes*). Setelah di *shaker* selama 72 jam selanjutnya difiltrasi dengan menggunakan corong *Buchner* sehingga diperoleh filtrat 1 dan residu 1 atau ekstrak *n*-heksan (ENH). Filtrat 1 yang diperoleh selanjutnya dievaporasi menggunakan evaporator vakum pada suhu 40°C sehingga diperoleh ekstrak kental *n*-heksan waru. Sementara residu 1 yang diperoleh tadi dikeringkan selama sehari semalam. Setelah dikeringkan, residu 1 dimaserasi kembali menggunakan 500 mL pelarut etil asetat. Campuran residu dan pelarut etil asetat tersebut di *shaker* kembali selama 72 jam pada suhu ruang dengan kecepatan 110 RPM (*rotation per minutes*). Setelah di *shaker* selama 72 jam, berikutnya di filtrasi dengan menggunakan corong *Buchner* sehingga diperoleh filtrat 2 dan residu 2 atau ekstrak etil asetat (EEA). Filtrat 2 yang diperoleh selanjutnya dievaporasi menggunakan evaporator vakum pada suhu 40°C sehingga diperoleh ekstrak kental etil asetat waru. Sementara residu 2 yang diperoleh dikeringkan selama sehari semalam.

Residu 2 yang telah dikeringkan selama sehari semalam kembali di maserasi dengan pelarut etanol 500 mL. Campuran residu dan pelarut etanol di *shaker* kembali selama 72 jam pada suhu ruang dengan kecepatan 110 RPM (*rotation per minutes*). Setelah itu di filtrasi menggunakan corong *Buchner* sehingga diperoleh filtrat 3 dan residu 3 atau ekstrak etanol (EE). Filtrat 3 yang diperoleh di evaporasi menggunakan evaporator vakum pada suhu 40°C sehingga diperoleh ekstrak kental etanol waru.

Masing-masing dari ekstrak kental yang telah diperoleh kemudian ditimbang untuk menghitung nilai rendemen dan disimpan dalam pendingin untuk keperluan analisis berikutnya. Rendemen ekstrak dihitung menggunakan persamaan rumus:

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

III.2.6. Skrining Fitokimia

a. Uji Fenolik

Sebanyak 1 mL ekstrak daun waru dengan pelarut *n*-heksan, etil asetat, dan etanol masing-masing dimasukkan ke dalam tabung reaksi, kemudian masing-masing ditambahkan FeCl_3 5% sebanyak 2-3 tetes. Sampel yang mengandung fenolik akan mengalami perubahan warna menjadi biru kehitaman (Huliselan, Runtuwene, dan Wewengkang, 2015).

b. Uji Flavonoid

▪ Uji Flavonoid dengan HCl Pekat dan Logam Magnesium

Sebanyak 1 mL ekstrak daun waru dengan pelarut *n*-heksan, etil asetat, dan etanol masing-masing dimasukkan ke dalam tabung reaksi, kemudian masing-masing ditambahkan HCl pekat sebanyak 2 tetes dan dikocok kuat. Setelah itu ditambahkan serbuk magnesium (Mg) dan dikocok kuat. Sampel positif mengandung flavonoid bila terdapat buih dengan intensitas yang banyak dan larutan akan mengalami perubahan warna menjadi warna jingga (Huliselan, Runtuwene, dan Wewengkang, 2015).

▪ Uji Flavonoid dengan H_2SO_4

Sebanyak 1 mL ekstrak daun waru dengan pelarut *n*-heksan, etil asetat, dan etanol masing-masing dimasukkan ke dalam tabung reaksi, kemudian masing-masing ditambahkan H_2SO_4 2 N sebanyak 2 tetes dan dikocok kuat. Sampel positif mengandung flavonoid bila larutan mengalami perubahan warna yang sangat mencolok menjadi warna kuning, merah, atau coklat (Huliselan, Runtuwene, dan Wewengkang, 2015).

▪ Uji Flavonoid dengan NaOH 10%

Sebanyak 1 mL ekstrak daun waru dengan pelarut *n*-heksan, etil asetat, dan etanol masing-masing dimasukkan ke dalam tabung reaksi, kemudian masing-masing ditambahkan NaOH 10% sebanyak 2 tetes dan dikocok kuat. Sampel positif mengandung flavonoid bila terdapat warna yang sangat mencolok, yaitu warna kuning, merah, coklat, atau hijau (Huliselan, Runtuwene, dan Wewengkang, 2015).

c. Uji Alkaloid

Sebanyak 1 mL ekstrak daun waru dengan pelarut *n*-heksan, etil asetat, dan etanol masing-masing ditambahkan 10 tetes H₂SO₄ 2 N dan dikocok kuat. Kemudian masing-masing ditambahkan reagen Wagner. Sampel kemudian diamati. Hasil positif bila penambahan reagen Wagner menghasilkan endapan kecokelatan (Huliselan, Runtuwene, dan Wewengkang, 2015).

d. Uji Lieberman Burchard (Uji Terpenoid dan Uji Steroid)

Ekstrak daun waru dengan pelarut *n*-heksan, etil asetat, dan etanol masing-masing diteteskan pada plat tetes pada 3 titik (titik pertama untuk standar dan dua titik lainnya untuk pengujian terpenoid dan steroid) dan dibiarkan hingga kering. Setelah kering, ditambahkan asam sulfat pekat sebanyak 1 tetes, asam asetat sebanyak 1 tetes, dan dietil eter sebanyak 2 tetes, kemudian diamati perubahan warnanya. Sampel positif bila mengalami perubahan warna menjadi merah atau coklat untuk terpenoid (triterpenoid) dan perubahan warna biru, ungu, atau hijau untuk steroid (Huliselan, Runtuwene, dan Wewengkang, 2015).

e. Uji Saponin

Sebanyak 1 mL ekstrak daun waru dengan pelarut *n*-heksan, etil asetat, dan etanol masing-masing dimasukkan dalam tabung reaksi, lalu pada masing-masing ditambahkan 5 mL air panas dan 2 tetes HCl 2 N kemudian dikocok dengan kuat. Setelah proses tersebut selesai, maka dilihat apakah terbentuk buih setelah didiamkan selama 10 menit. Jika terbentuk buih, maka sampel positif mengandung saponin dengan intensitas yang banyak dan konsisten selama 10 menit (Huliselan, Runtuwene, dan Wewengkang, 2015).

f. Uji Tanin

Sebanyak 1 mL ekstrak daun waru dengan pelarut *n*-heksan, etil asetat, dan etanol masing-masing dimasukkan ke dalam tabung reaksi, kemudian masing-masing ditambahkan FeCl₃ 1% sebanyak 2-3 tetes. Sampel positif mengandung tanin bila mengalami perubahan warna menjadi hijau kehitaman (Huliselan, Runtuwene, dan Wewengkang, 2015).

III.2.7. Penentuan Kandungan Total Fenolik

a. Pembuatan Kurva Baku Asam Galat

Larutan asam galat sebanyak 300 μL dengan konsentrasi 20, 40, 60, 80, dan 100 mg/L masing-masing dimasukkan dalam tabung, kemudian ditambah 1,5 mL reagen Folin-Ciocalteu dan digoyang-goyangkan secara perlahan. Setelah didiamkan selama 3 menit, masing-masing larutan ditambah 1,2 mL larutan Na_2CO_3 7,5% digoyang-goyangkan secara perlahan sampai homogen, dan didiamkan selama 60 menit pada suhu kamar. Semua larutan diukur absorbansinya pada λ 775 nm, kemudian dibuat kurva kalibrasi hubungan antara konsentrasi asam galat dengan absorbansi (Huliselan, Runtuwene, dan Wewengkang, 2015).

b. Penetapan Kadar Total Fenolik

Ekstrak etanol, etil asetat, dan *n*-heksan daun waru dengan konsentrasi 1000 mg/L dipipet sebanyak 300 μL dan ditambahkan dengan 1,5 mL reagen Folin-Ciocalteu dan digoyang-goyangkan secara perlahan. Setelah didiamkan selama 3 menit, ditambah 1,2 mL larutan Na_2CO_3 7,5% dan didiamkan lagi selama 60 menit pada suhu kamar. Absorbansi ekstrak dibaca dengan spektrofotometer UV-Vis (Shimadzu UV-1900) pada λ 725 nm. Hasilnya dinyatakan sebagai ekuivalen asam galat dalam mg/L ekstrak (Huliselan, Runtuwene, dan Wewengkang, 2015).

III.2.8. Penentuan Uji Aktivitas Antioksidan Dengan Metode DPPH

Sebanyak 1 mL ekstrak *n*-heksan, etil asetat, dan etanol dengan konsentrasi 10, 20, 30, 40, dan 50 mg/L masing-masing ditambahkan 1 mL larutan 2,2-difenil-1-pikrilhidrazil (DPPH) 90 μM dalam etanol dan divorteks selama 2 menit. Berubahnya warna larutan dari ungu ke kuning menunjukkan efisiensi penangkal radikal bebas. Selanjutnya pada 5 menit terakhir menjelang 30 menit inkubasi, absorbansi diukur pada λ 517 nm dengan menggunakan spektrofotometer UV-VIS (Shimadzu UV-1900). Aktivitas penangkal radikal bebas dihitung sebagai presentase berkurangnya warna DPPH dengan menggunakan persamaan (Huliselan, Runtuwene, dan Wewengkang, 2015):

$$\text{Aktivitas antioksidan (\%)} = 1 - \frac{\text{Absorbansi sampel}}{\text{Absorbansi kontrol}} \times 100\%$$

Parameter yang di uji dalam analisis peredaman radikal DPPH adalah nilai IC_{50} (*Inhibition Concentration 50%*). IC_{50} merupakan ukuran kemampuan antioksidan berdasarkan konsentrasi ekstrak yang diperlukan untuk menghambat aktivitas radikal DPPH hingga 50%. Prinsip kerja metode DPPH yaitu adanya atom hidrogen pada senyawa antioksidan yang berikatan dengan elektron bebas pada senyawa radikal sehingga hal tersebut menyebabkan terjadinya perubahan pada radikal bebas (*diphenylpicrylhydrazyl*) menjadi senyawa non-radikal (*diphenylpicrylhydrazine*). Reaksi ini ditandai oleh perubahan warna dari ungu menjadi kuning (senyawa radikal bebas tereduksi oleh adanya antioksidan) (Setiawan, Yunita, dan Kurniawan, 2018).

Nilai IC_{50} pada masing-masing konsentrasi sampel akan dihitung menggunakan rumus persamaan regresi linier, yang menyatakan hubungan antara konsentrasi fraksi antioksidan, dimana sumbu x dengan % inhibisi yang dinyatakan sebagai sumbu y dari seri replikasi pengukuran. Adapun perhitungan nilai IC_{50} pada sampel yang diuji yaitu menggunakan rumus sebagai berikut:

$$IC_{50} = \frac{(50) - a}{b}$$

Dimana nilai a dan b diperoleh dari hasil perhitungan persamaan linear $y = bx + a$. Menurut Molyneux (2004) secara spesifik suatu senyawa dikatakan sebagai antioksidan sangat kuat jika nilai $IC_{50} < 50$ mg/L.

BAB IV

HASIL PENELITIAN DAN PEMBAHASAN

IV.1. Hasil Penelitian

IV.1.1. Identifikasi Tumbuhan Waru

Identifikasi tumbuhan waru dilakukan di Laboratorium Multifungsi Biologi Fakultas Sains dan Teknologi Universitas Islam Negeri Ar-Raniry Banda Aceh. Secara umum pengklasifikasian tumbuhan waru adalah sebagai berikut:

Kingdom : *Plantae*
Devisi : *Tracheophyta*
Kelas : *Magnoliopsida*
Ordo : *Malvales*
Familia : *Malvaceae*
Genus : *Hibiscus*
Spesies : *Hibiscus tiliaceus Linn*

IV.1.2. Uji Kadar Air

Hasil uji kadar air serbuk daun waru pada penelitian ini yaitu sebesar 3,31 %. Hasil penelitian dapat dilihat pada tabel IV.1 yang menunjukkan presentase kadar air pada serbuk daun waru.

Tabel IV. 1 Hasil Penetapan Uji Kadar Air Serbuk Daun Waru

Sebelum dioven (g)	Sesudah dioven (g)	Kadar air (%)
30,0073	29,0118	3,31

IV.1.3. Ekstraksi Daun Waru

Adapun hasil ekstraksi daun waru menggunakan tiga jenis pelarut yaitu *n*-heksan, etil asetat, dan etanol dengan proses maserasi bertingkat diperoleh nilai rendemen dari masing-masing ekstrak dapat dilihat pada tabel IV.2.

Tabel IV. 2 Hasil Presentase Rendemen Ekstrak Daun Waru

Ekstrak Daun Waru	Berat Serbuk (g)	Berat ekstrak (g)	Rendemen (%)
<i>n</i> -Heksan	50,250	44,126	87,81
Etil Asetat	50,250	80,5938	160,38
Etanol	50,250	90,0342	179,17

IV.1.4. Uji Skrining Fitokimia Ekstrak Daun Waru**Tabel IV. 3** Hasil Uji Skrining Fitokimia Ekstrak Daun Waru

Kandungan Metabolit	Reagen	Ekstrak Daun Waru + <i>n</i>-Heksan (Filtrat 1)	Ekstrak Daun Waru + Etil Asetat (Filtrat 2)	Ekstrak Daun Waru + Etanol (Filtrat 3)
Alkaloid	Mayer	-	+	-
	Wagner	-	+	-
	Dragendroff	-	+	-
Steroid	Uji Liebermann-Burchard	+	+	+
Terpenoid	Uji Liebermann-Burchard	-	-	-
Saponin	Pengocokkan	-	-	-
Flavonoid	HCl dan Logam Mg	+	+	+
Fenolik	FeCl ₃	-	+	+
Tanin	Gelatin+H ₂ SO ₄	+	-	-

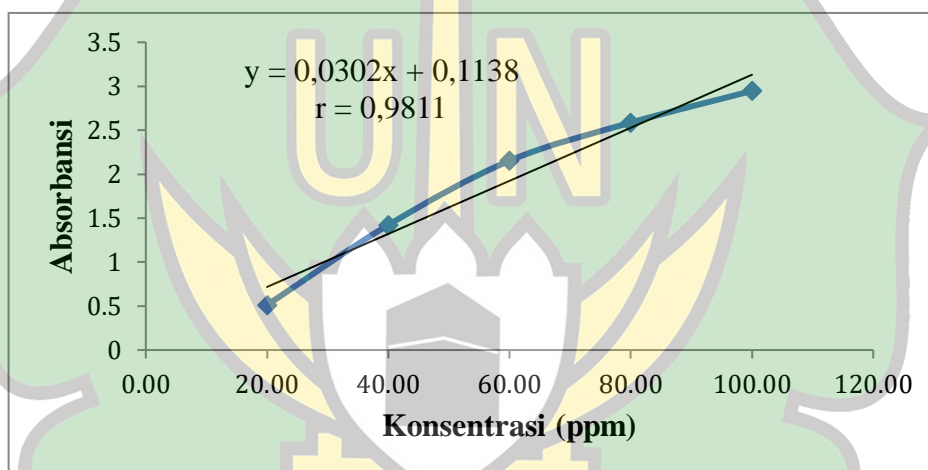
IV.1.5. Penentuan Kandungan Total Fenol

- Kurva kalibrasi larutan standar asam galat

Tabel IV. 4 Kurva Kalibrasi Larutan Standar Asam Galat

No	Konsentrasi Standar Asam Galat (ppm)	Absorbansi
1	20	0,512
2	40	1,422
3	60	2,153
4	80	2,586
5	100	2,9470
	<i>Slope =</i>	0,03017
	<i>Intersep =</i>	0,11380
	<i>R =</i>	0,9811

- Kurva standar asam galat



Gambar IV. 1 Kurva Standar Asam Galat

- Perhitungan kadar total fenolik

Tabel IV. 5 Perhitungan Kadar Total Fenolik Pada Ekstrak Daun Waru

No	Sampel	Berat Sampel (W(mg))	Absorbansi (λ 775)	Konsentrasi (ppm)
1	<i>n</i> -Heksan Daun waru	500	0,298	6,1054
2	Etil Asetat Daun waru	500	0,357	8,0610
3	Etanol daun waru	500	0,446	11,0109

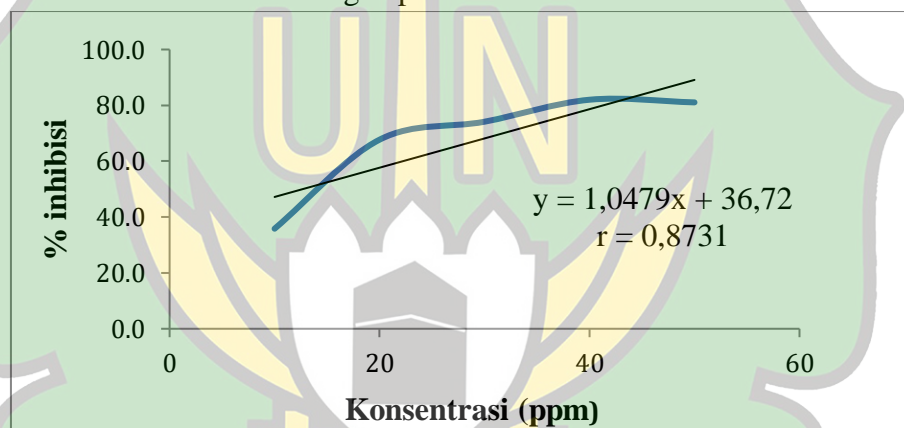
IV.1.6. Penentuan Uji Aktivitas Antioksidan

- Uji aktivitas antioksidan ekstrak daun waru dengan pelarut *n*-heksan

Tabel IV. 6 Uji Aktivitas Antioksidan Ekstrak Daun Waru dengan Pelarut *N*-Heksan

Konsentrasi (ppm)	Absorbansi	% Inhibisi	Slope	Intercept	IC ₅₀
50	0,110	81,1			
40	0,137	82,0			
30	0,197	74,1	1,0	36,7	12,7
20	0,246	67,7			
10	0,489	35,8			

- Kurva ekstrak daun waru dengan pelarut *n*-heksan



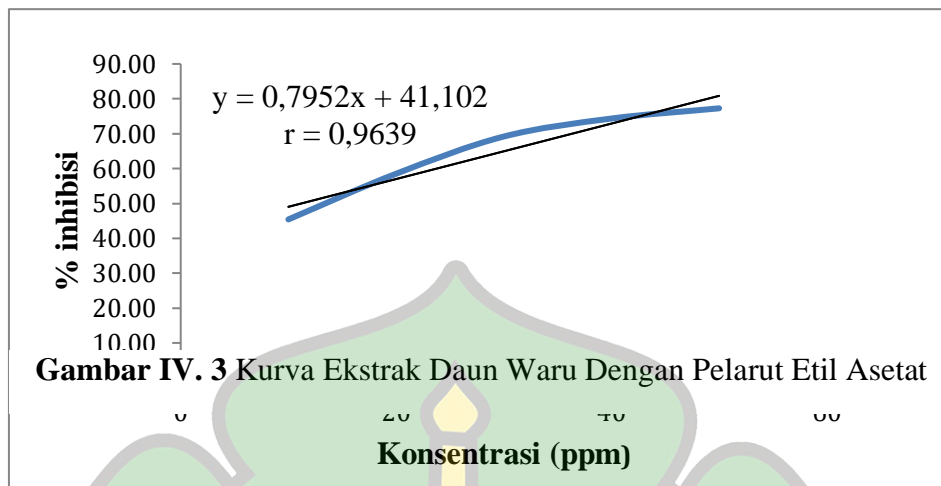
Gambar IV. 2 Kurva Ekstrak Daun Waru dengan Pelarut *N*-Heksan

- Uji aktivitas antioksidan ekstrak daun waru dengan pelarut etil asetat

Tabel IV. 7 Uji Aktivitas Antioksidan Ekstrak Daun Waru dengan Pelarut Etil Asetat

Konsentrasi (ppm)	Absorbansi	% Inhibisi	Slope	Intercept	IC ₅₀
50	0,132	77,28			
40	0,149	74,35			
30	0,179	69,19	0,80	41,10	11,19
20	0,241	58,52			
10	0,317	45,44			

- Kurva ekstrak daun waru dengan pelarut etil asetat

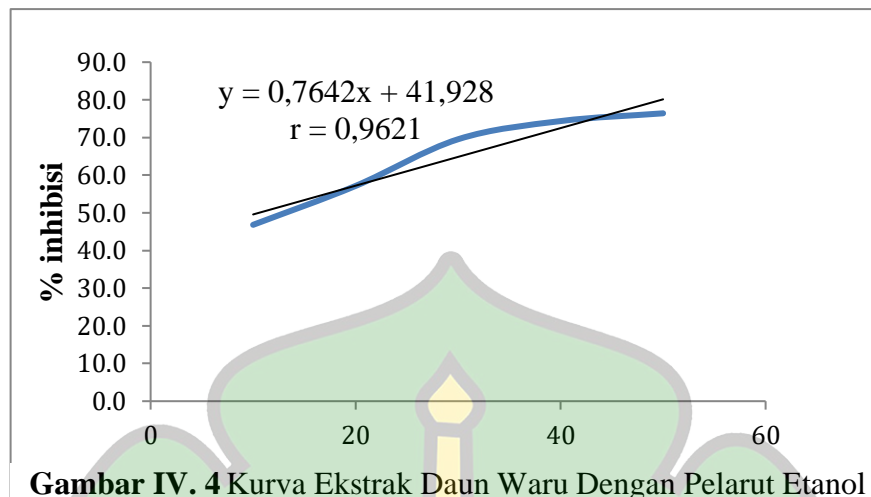


- Uji aktivitas antioksidan ekstrak daun waru dengan pelarut etanol

Tabel IV. 8 Uji Aktivitas Antioksidan Ekstrak Daun Waru dengan Pelarut Etanol

Konsentrasi (ppm)	Absorbansi	% Inhibisi	Slope	Intercept	IC ₅₀
50	0,137	76,4			
40	0,149	74,4			
30	0,177	69,5	0,8	41,9	10,6
20	0,249	57,1			
10	0,309	46,8			

- Kurva ekstrak daun waru dengan pelarut etanol



Gambar IV. 4 Kurva Ekstrak Daun Waru Dengan Pelarut Etanol

IV.2. Pembahasan

Penelitian ini diawali dengan melakukan uji taksonomi pada tumbuhan waru terlebih dahulu berdasarkan ciri-ciri morfologi yang ada pada tumbuhan waru tersebut. Uji taksonomi pada tumbuhan waru dilakukan di Laboratorium Multifungsi Biologi Sains dan Teknologi Universitas Islam Negeri Ar-Raniry. Hasil identifikasi menunjukkan bahwa benar tumbuhan yang digunakan sebagai sampel adalah tumbuhan waru (*Hibiscus tiliaceus*).

Tahap selanjutnya yaitu pengujian kadar air pada serbuk daun waru. Perlakuan ini bertujuan untuk memberikan batasan minimal atau rentang tentang besarnya kandungan air di dalam bahan (Oktavia, Ifora, dan Putri, 2018). Berdasarkan Peraturan Badan Pengawas Obat dan Makanan Republik Indonesia (BPOM RI) No. 12 Tahun 2014 menyatakan bahwa kadar air yang diperbolehkan pada mutu obat tidak boleh lebih dari 10%, karena jika lebih dari 10% akan memudahkan tumbuhnya jamur atau kapang pada serbuk. Hasil penelitian Marhenta, *et al.* (2016), analisis kadar air pada serbuk daun waru diperoleh rata-rata presentase sebesar 5,17%. Sedangkan hasil uji kadar air serbuk daun waru pada penelitian ini yaitu sebesar 3,31%. Hasil uji kadar air pada penelitian ini dapat dikatakan sesuai dengan aturan yang telah ditetapkan BPOM RI dan menunjukkan bahwa serbuk daun waru telah memenuhi persyaratan kadar air

simplisia dimana proses pengeringan sudah dapat menghentikan proses enimatik dalam sel bila kadar air kurang dari 10%.

Ekstraksi bioaktif simplisia daun waru dilakukan dengan metode maserasi bertingkat dengan tiga variasi jenis pelarut yang berbeda yaitu *n*-heksan (non polar), etil asetat (semi polar), dan etanol (polar). Perbedaan pelarut yang digunakan untuk memudahkan mengekstraksi zat aktif yang berbeda polaritasnya sehingga bisa diekstraksi dengan baik. Pemilihan metode maserasi bertingkat pada proses ekstraksi ini dikarenakan ekstraksi bertingkat akan menghasilkan senyawa tertentu yang terekstrak secara spesifik pada tiap pelarut yang digunakan. Penggunaan pelarut dengan tingkat kepolaran yang berbeda dapat mempengaruhi rendemen yang dihasilkan (Permadi, Sutanto, dan Wardatun, 2018). Maserasi bertingkat juga dipilih untuk mengekstrak senyawa fenol yang secara umum terdegradasi pada suhu tinggi dan memiliki kepolaran yang beragam (Kartikasari, 2015).

Ketika ekstraksi bioaktif simplisia daun waru dengan metode maserasi bertingkat diperoleh beberapa ekstrak rendemen dari tiga pelarut dengan beda kepolaran, yaitu ekstrak daun waru menggunakan pelarut *n*-heksan dengan rendemen sebesar 87,81%, ekstrak daun waru menggunakan pelarut etil asetat dengan rendemen sebesar 160,38%, dan ekstrak daun waru menggunakan pelarut etanol dengan rendemen sebesar 179,17%. Rendemen tertinggi diperoleh pada ekstrak etanol. Hal ini dikarenakan etanol merupakan pelarut yang bersifat polar sehingga dapat menghasilkan rendemen yang lebih tinggi dibandingkan pelarut lain yang kurang polar. Selain itu, etanol juga memiliki gugus etil (non polar) yang terindifikasi dapat menarik senyawa yang bersifat semi polar atau sedikit non polar. Pada hasil rendemen yang diperoleh dari ketiga pelarut hasilnya terlalu besar, kemungkinan pelarut tidak kering atau tidak menguap dengan sempurna. Menurut Pangestu (2019) dijurnalnya menyatakan nilai rendemen yang diperoleh besar atau kecil ditunjukkan dengan keefektifan proses ekstraksi. Efektifitas pada proses ekstraksi juga dipengaruhi oleh beberapa faktor yaitu jenis pelarut yang digunakan, jumlah pelarut yang digunakan, ukuran partikel simplisia, metode, dan lamanya waktu ekstraksi.

Uji skrining fitokimia daun waru dengan tiga jenis pelarut dilakukan di laboratorium penelitian jurusan kimia FMIPA Universitas Syah Kuala Banda Aceh. Pada uji skrining fitokimia daun waru dengan tiga jenis pelarut diperoleh hasil yang menunjukkan bahwa ekstrak daun waru dengan pelarut etil asetat paling banyak mengandung senyawa metabolit sekunder seperti fenolik, flavonoid, steroid, dan alkaloid. Sementara pada ekstrak daun waru dengan pelarut etanol senyawa metabolit sekunder yang diperoleh dari uji skrining fitokimia yaitu steroid, flavonoid, dan fenolik. Sedangkan pada ekstrak daun waru dengan pelarut *n*-heksan mengandung senyawa metabolit sekunder yaitu steroid, flavonoid, dan tanin. Penelitian Nurbani, *et al.* (2020), di jurnalnya diperoleh hasil dari identifikasi senyawa fitokimia dari tiga jenis pelarut yaitu *n*-heksan, etil asetat, dan etanol menunjukkan hasil dari ketiga ekstrak mengandung senyawa steroid, tetapi ketiganya tidak mengandung senyawa alkaloid. Hanya ekstrak *n*-heksan yang terdeteksi mengandung saponin, sementara untuk senyawa tanin hanya mampu diidentifikasi pada ekstrak etil asetat. Menurut Oktari, *et al.* (2014), perbedaan hasil uji ini dapat disebabkan karena kemampuan deteksi uji skrining fitokimia yang tidak mampu mendeteksi senyawa metabolit yang berjumlah sedikit di dalam berbagai ekstrak yang digunakan. Menurut Katno (2008), perbedaan kondisi lingkungan tempat tumbuh juga dapat menyebabkan perbedaan jenis dan jumlah dari metabolit sekunder yang terkandung dalam tumbuhan yang tumbuh di suatu daerah tertentu dengan daerah lainnya. Selain itu hal yang menyebabkan perbedaan kandungan metabolit sekunder adalah waktu pengumpulan tanaman.

Berikutnya menentukan kandungan total fenolik pada ekstrak daun waru dengan menggunakan tiga jenis pelarut yang berbeda. Penentuan kandungan total fenolik merupakan perkiraan kasar jumlah senyawa fenolik yang terdapat dalam suatu bahan. Kebanyakan senyawa fenolik biasanya bersifat antioksidan oleh karena itu pengukuran total fenolik dapat digunakan untuk memperkirakan aktifitas antioksidan suatu bahan (Huliselan, Runtuwene, dan Wewenggang, 2015). Metode yang digunakan untuk menentukan kadar fenolik total adalah Metode Folin-Ciocalteu dengan larutan standar asam galat. Menurut Verawati, *et*

al. (2020), metode Folin-Ciocalteu adalah suatu metode yang paling sering digunakan untuk melakukan penentuan kandungan fenolat total pada tumbuhan. Kelebihan yang dimiliki metode Folin-Ciocalteu ini dimana teknik ini pengerjaannya lebih sederhana dan reagen Folin-Ciocalteu dapat bereaksi dengan senyawa fenolat membentuk larutan yang dapat diukur absorbansinya. Penggunaan asam galat yaitu sebagai baku standar pada metode ini sehingga kadar fenolat yang diperoleh nantinya akan dihitung sebagai kesetaraan dengan bobot asam galat. Kurva baku asam galat ditetapkan dengan menggunakan persamaan regresi linier, yang menyatakan hubungan antara konsentrasi asam galat dinyatakan sebagai x dan absorbansi asam galat dengan pereaksi Folin-Ciocalteu dinyatakan sebagai y .

Hasil penentuan kandungan total fenol pada penelitian ini diperoleh persamaan kurva baku asam galat yaitu $y = 0,0302x + 0,1138$ dengan $r = 0,9811$. Berdasarkan penelitian yang telah dilakukan diperoleh konsentrasi kandungan total fenolik dari ekstrak daun waru yang paling tinggi terdapat pada ekstrak etanol (EE) yaitu sebesar 11,0109 ppm, di ikuti ekstrak etil asetat (EEA) sebesar 8,0610 ppm, dan ekstrak *n*-heksan (ENH) sebesar 6,1054 ppm. Hasil ini sesuai dengan pernyataan Harborne (1987) yang menyatakan bahwa tumbuhan mengandung banyak senyawa fenolik, senyawa fenolik ini memiliki sifat yang cenderung larut dalam pelarut polar. Pada penelitian yang dilakukan Fidrianny, *et al.* (2013) juga dibuktikan bahwa pelarut etanol menghasilkan persentase total fenol yang lebih tinggi dibandingkan pelarut etil asetat dan *n*-heksan.

Aktivitas antioksidan diukur dengan menghitung jumlah pengurangan intensitas cahaya ungu DPPH yang sebanding dengan pengurangan konsentrasi DPPH. Perendaman tersebut dihasilkan oleh bereaksinya molekul difenil pikri hirazil dengan atom hidrogen yang dilepaskan oleh molekul komponen sampel sehingga terbentuk senyawa difenil pikril hidrazin dan menyebabkan terjadinya peluruhan warna DPPH dari ungu menjadi kuning (Huliselan, Runtuwene, dan Wewengkang, 2015). Parameter yang digunakan untuk menunjukkan aktivitas antioksidan adalah IC_{50} (*Inhibition Concentration 50%*) yang merupakan konsentrasi suatu zat antioksidan yang dapat menyebabkan 50% DPPH

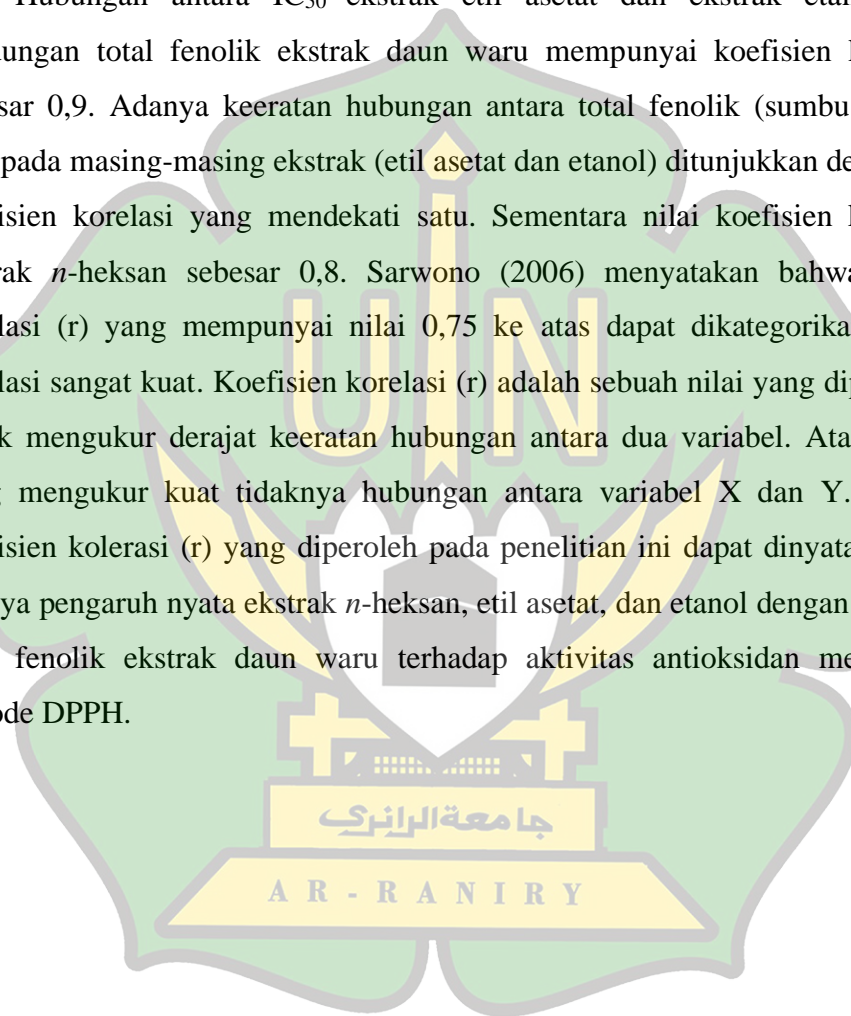
kehilangan karakter radikal atau konsentrasi suatu zat antioksidan yang memberikan persentase penghambatan 50% (Molyneux, 2004).

Hasil penelitian uji aktivitas antioksidan dari ekstrak daun waru menggunakan metode DPPH dengan tiga jenis pelarut yang berbeda diperoleh hasil nilai *slope* pada persamaan regresi linier dari ekstrak etil asetat dan etanol adalah sama yaitu 0,8 sehingga dapat dikatakan bahwa aktivitas antioksidan kedua ekstrak tersebut sama dan lebih tinggi keduanya ketimbang dari aktivitas antioksidan *n*-heksan yang memiliki *slope* 1. Kemudian berdasarkan hasil perhitungan IC₅₀ ekstrak etanol memiliki aktivitas antioksidan tertinggi dengan nilai IC₅₀ sebesar 10,6 ppm dibandingkan dengan ekstrak etil asetat (11,19 ppm) dan ekstrak *n*-heksan (12,7 ppm). Hal ini menunjukkan bahwa ekstrak daun waru memiliki senyawa bioaktif lebih banyak bersifat polar dibandingkan semipolar dan non polar. Hal ini juga sejalan dengan penelitian Do, *et al.* (2014) dan Rebaya, *et al.* (2015) yang menyatakan bahwa pelarut etanol memberikan kandungan fenolik yang tinggi dibandingkan pelarut etil asetat.

Hasil pengujian menunjukkan juga bahwa pelarut etanol 96% lebih efisien dalam mengekstrak dibanding pelarut etil asetat ataupun *n*-heksan. Hal ini dapat disebabkan oleh ekstrak etanol setelah hidrolisis memiliki nilai aktivitas antioksidan yang tinggi diduga karena efek dari proses hidrolisis yang memutuskan ikatan glikosida secara maksimal sehingga lebih mudah dalam mendonorkan atom H ke senyawa radikal bebas DPPH dan dapat menghambat senyawa radikal bebas lebih optimal. Sementara itu, hasil aktivitas antioksidan ekstrak etil asetat dan *n*-heksana setelah hidrolisis lebih lemah bila dibandingkan dengan ekstrak etil asetat dan *n*-heksana sebelum hidrolisis diduga karena banyaknya senyawa campuran yang terbentuk saat proses hidrolisis sehingga lebih sukar mendonorkan atom H ke senyawa radikal bebas karena sedikitnya kandungan atom H pada ekstrak etil asetat dan *n*-heksana daun waru setelah hidrolisis. Hal ini dibuktikan oleh penelitian Rohmah *et al* (2020), menyatakan bahwa ekstrak etanol memiliki kekuatan aktivitas antioksidan yang paling tinggi dibandingkan ekstrak *n*-heksana dan etil asetat. Adapun hasil aktivitas antioksidan dapat dipengaruhi oleh kandungan senyawa aktif yang terekstrak pada masing-

masing jenis pelarut. Dari hasil yang telah diperoleh dapat dinyatakan bahwa aktivitas antioksidan ekstrak daun waru (*Hibiscus tiliaceus*) menggunakan tiga jenis pelarut sangatlah kuat yaitu kurang dari 50 ppm. Namun hasil ini tidak menunjukkan perbedaan yang signifikan terhadap ketiga ekstrak karena memiliki nilai yang berdekatan.

Hubungan antara IC_{50} ekstrak etil asetat dan ekstrak etanol dengan kandungan total fenolik ekstrak daun waru mempunyai koefisien korelasi (r) sebesar 0,9. Adanya keeratan hubungan antara total fenolik (sumbu y) dengan IC_{50} pada masing-masing ekstrak (etil asetat dan etanol) ditunjukkan dengan harga koefisien korelasi yang mendekati satu. Sementara nilai koefisien korelasi (r) ekstrak n -heksan sebesar 0,8. Sarwono (2006) menyatakan bahwa koefisien korelasi (r) yang mempunyai nilai 0,75 ke atas dapat dikategorikan memiliki korelasi sangat kuat. Koefisien korelasi (r) adalah sebuah nilai yang dipergunakan untuk mengukur derajat keeratan hubungan antara dua variabel. Atau koefisien yang mengukur kuat tidaknya hubungan antara variabel X dan Y . Dari nilai koefisien korelasi (r) yang diperoleh pada penelitian ini dapat dinyatakan bahwa adanya pengaruh nyata ekstrak n -heksan, etil asetat, dan etanol dengan kandungan total fenolik ekstrak daun waru terhadap aktivitas antioksidan menggunakan metode DPPH.



BAB V

PENUTUP

V.1. Kesimpulan

Berdasarkan penelitian yang telah dilakukan, maka dapat diambil beberapa kesimpulan diantaranya sebagai berikut:

1. Aktivitas antioksidan ekstrak daun waru (*Hibiscus tiliaceus*) menggunakan tiga jenis pelarut yaitu *n*-heksan, etil asetat, dan etanol menggunakan metode DPPH dapat dinyatakan sangatlah kuat yaitu kurang dari 50 ppm. Namun belum ada perbedaan yang terlalu signifikan pada hasil perhitungan IC_{50} dari ketiga ekstrak, dikarenakan nilai IC_{50} yang diperoleh dari masing-masing ekstrak saling mendekati.
2. Ekstrak etanol waru menunjukkan potensi antioksidan paling baik jika dibandingkan dengan kedua ekstrak lainnya yaitu *n*-heksan dan etil asetat. Nilai IC_{50} yang diperoleh ekstrak etanol waru sebesar 10,6 ppm. Nilai ini lebih tinggi dibandingkan ekstrak *n*-heksan dan etil asetat.

V.2. Saran

1. Peneliti diharapkan dapat melakukan penelitian lebih lanjut baik secara review atau penelitian untuk mengetahui lebih lanjut faktor-faktor lain yang mempengaruhi proses aktivitas antioksidan dalam daun waru dan mengetahui kemampuan antioksidan menggunakan metode lain yang dianggap lebih relevan.
2. Peneliti diharapkan dapat mengaplikasikan ekstrak daun waru ke dalam bidang farmasi atau obat-obatan, terutama obat-obatan herbal.

DAFTAR PUSTAKA

- Adolf, L. L., Putri, S. P., & Cinta, M. Y. (2018). Proposal Program Kreativitas Mahasiswa Efektivitas Daun Waru (*Hibiscus Tiliaceus*) Sebagai Alternatif Detergen Yang Ramah Lingkungan. *Bidang Kegiatan PKM Penelitian*. Sekolah Tinggi Ilmu Kesehatan Surya Mitra Husada Kediri.
- Al-Jami, A. H. (2010). Skrining Senyawa Antimitosis Ekstrak Daun Waru (*Hibiscus tiliaceus* L.) Berdasarkan Penghambatan Pembelahan Sel Telur Bulubabi. (*Undergraduate S-1 thesis*). Universitas Islam Negeri Alauddin Makassar.
- Andarina, R., & Djauhari, T. (2017). Antioksidan dalam dermatologi. *Jurnal Kedokteran dan Kesehatan*. 4(1): 39-48.
- Andayani, R., Lisawati, Y., & Maimunah. (2008). Penentuan Aktivitas Antioksidan, Kadar Fenolat dan Lipoken Pada Buah Tomat (*Solanum Lycopersicum* L.). *Jurnal Sains dan Teknologi Farmasi*. 13(1): 1-9.
- Badan Pengawas Obat dan Makanan Republik Indonesia (BPOM RI). 2014. Peraturan Kepala Badan Pengawas Obat dan Makanan Republik Indonesia Nomor 12 Tahun 2014 Tentang *Persyaratan Mutu Obat Tradisional*. Jakarta: Badan Pengawas Obat dan Makanan Republik Indonesia.
- Bahriul, P., Rahman, N., & Diah, W. A. (2014). Uji Aktivitas Antioksidan Ekstrak Daun Salam (*Syzygium polyanthum*) Dengan Menggunakan 1,1-Difenil-2-Pikrilhidrazil. *Jurnal Akademika Kimia*. 3(3): 368-374.
- Blainski, A., Cristiny G., & de Mello, J. (2013). Application and Analysis of the Folin Ciocalteu Method for the Determination of The Total Phenolic Content from *Limonium Brasiliense* L. *J. Mdpi Molecules*. 18(6): 6852–6865.
- Chen, J. J., Huang, S. Y., Duh, C. Y., Chen, I. S., Wang, T. C., & Fang HY. (2006). A new cytotoxic Amide from the stem wood of *Hibiscus tiliaceus*. *Article in Planta Medica*.
- Dan Fraksi Etil Asetat Daun Senduduk (*Melastoma malabathricum* L.) Dengan Metode FRAP (Ferric Reducing Antioxidant Power). *Jurnal Kesehatan Pharmasi (JKPharm)*. Vol. IV (1): 57-61.
- Depkes RI. (1995). *Farmakope Indonesia Edisi IV*. Jakarta: Departemen Kesehatan RI.
- Dewick, M. P. (2001). *Medicinal Natural Products*. John Wiley & Sons Ltd, England, pp. 121-125.
- Do, Q. D., Angkawijaya, A. E., Tran-Nguyen, P. L., Huynh, L. H., Soetaredjo, F. E., Ismadji, S., & Ju, Y. H. (2014). Effect of Extraction Solvent On Total Phenol Content, Total Flavonoid Content, and Antioxidant Activity of *Limnophila Aromatica*. *Journal of Food and Drug Analysis*. Vol. 22(3): 296-302.
- Endarini, L. H. (2016). *Farmakognosi dan Fitokimia*. Jakarta: Pusdik SDM Kesehatan.

- Erika, R. B., Dellima, M., & Sulistyawati, R. (2014). Aktivitas Penangkapan Radikal DPPH Oleh Fraksi Etil Asetat Daun Kelor (*Moringa oleifera*, Lamk). *Jurnal Ilmu Farmasi*. 11(1): 1-6.
- Fidrianny, I., Wirasutisna R. K., & Amanda, P. (2013). Senyawa Antioksidan dari Ekstrak Etil Asetat Daun Binahong (*Anredera cordifolia* (Ten.) Steenis) dari Babakan Ciparay, Bandung Selatan, Indonesia. *Acta Pharmaceutica Indonesia*. Vol. XXXVIII(1): 26-30.
- Fitriana, D. W., Fatmawati, S., & Ersam, T. (2015). Uji Aktivitas Antioksidan Terhadap DPPH dan ABTS dari Fraksi-Fraksi Daun Kelor (*Moringa oleifera*). *Prosiding Simposium Nasional Inovasi dan Pembelajaran Sains, Bandung, Indonesia*. 657-660.
- Fu, L., Xu, B.T., Gan, R.Y., Zhang, Y., Xu, X.R., Xia, E. Q., & Li, H. B. (2011) Total Phenolic Contents and Antioxidant Capacities of Herbal and Tea Infusions. *Int, J. Mol, Sci*. 12: 2112-2124.
- Hardiana, R., Rudiyansyah, & Titin, A. Z. (2012). Aktivitas Antioksidan Senyawa Golongan Fenol dari Beberapa Jenis Tumbuhan Famili Malvaceae. *Jurnal Kimia Khatulistiwa*. 1(1): 8-13.
- Hasmila, I., Natsir, H., & Soekamto, N. H. (2019,). Phytochemical analysis and antioxidant activity of soursop leaf extract (*Annona muricata* Linn.). In *Journal of Physics: Conference Series* (Vol. 1341, No. 3, p. 032027). IOP Publishing.
- Hibrah., Ikhsandy, F., Yahya, A. K., dan Rosalina. (2022). Maserasi Kinetik Pada Ekstraksi Tanin Biji Pinang Wangi Dengan Variasi Waktu Dan Konsentrasi Pelarut Etanol Variation of Time and Ethanol Solvent Concentration Of Kinetic Maceration Tannin Extraction From Aromatic Areca Catechu. *Jurnal Ilmiah Teknik Kimia*, 6(1).
- Hossain, H., Akbar, N. P., Rahman, E. S., Yeasmin, S., Khan, T. A., Rahman, M., & Jahan, I. A. (2015). HPLC Profiling and Antioxidant Properties of The Ethanol Extract of *Hibiscus tiliaceus* Leaf Available in Bangladesh. *European Journal of Medicinal Plants*. 7(1): 7-15.
- Huliselan, M. Yosina, Runtuwene, R.J. Max, & Wewengkang, S. Defny. (2015). Aktivitas Antioksidan Ekstrak Etanol, Etil Asetat, dan N-Heksan dari Daun Sesewanua (*Clerodendron squamatum* Vahl.). *Jurnal Ilmiah Farmasi*. 4(3): 155-163.
- Ikalinus, R., Widyastuti, K. S., & Setiasih, E. N. L. (2015). Skrining Fitokimia Ekstrak Etanol Kulit Batang Kelor (*Moringa oleifera*). *Indonesia Medicus Veterinus*. 4(1): 71-79.
- Irianti, T., Sugiyanto, Nuranto, S., dan Kuswandi, K. (2017). *Antioksidant*. Yogyakarta: Universitas Gadjah Mada.
- Istiqomah, L., Herdian, H., Febrisantosa, A., & Putra, D. (2011). Waru Leaf (*Hibiscus tiliaceus*) As Saponins Source On In Vitro Ruminant Fermentation Characteristic. *Journal of the Indonesian Tropical Animal Agriculture*. 36(1): 43-49.
- Jasson, N. (2005). *The Determination of Total Phenolic Compounds in Green Tea*. <http://folincioalceu/method/colorimetric>, diakses pada 30 November 2021.

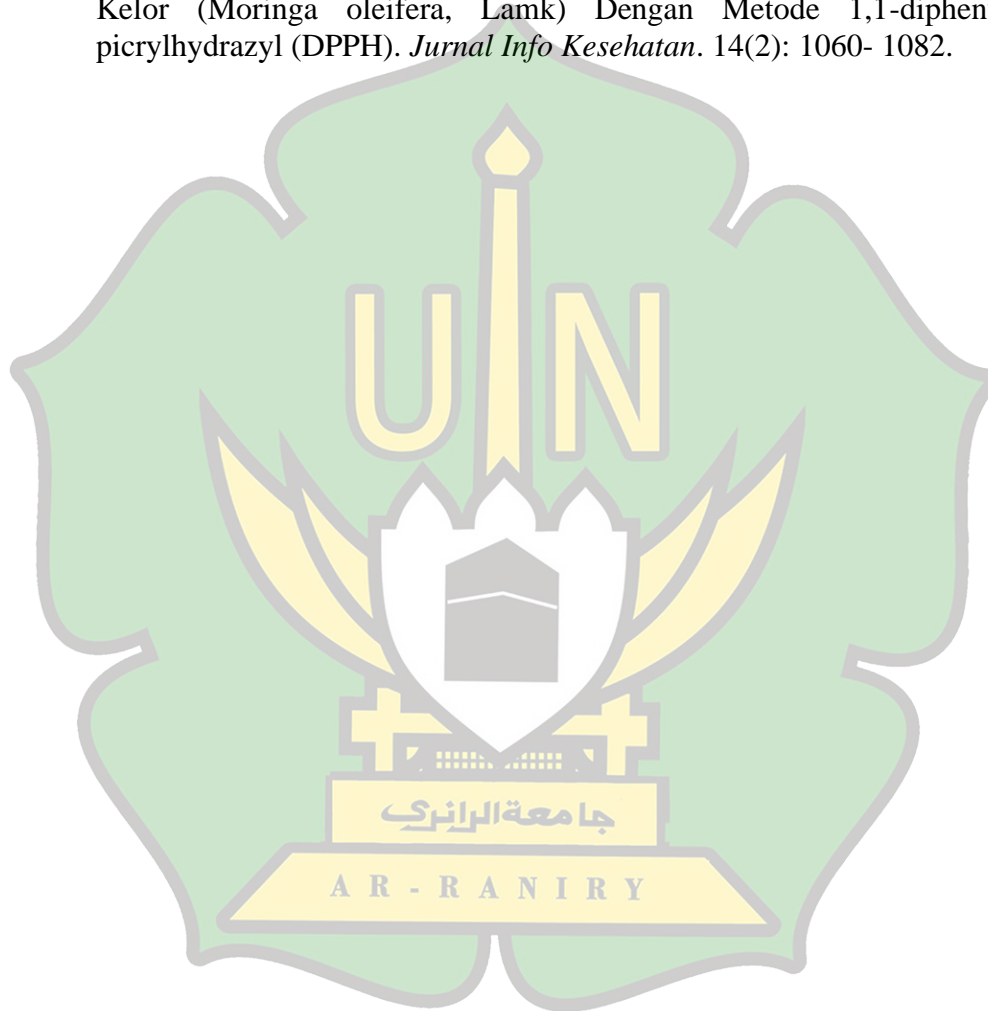
- Julianto, T. S. (2019). *Fitokimia Tinjauan Metabolit Sekunder dan Skrining Fitokimia*. Yogyakarta : Universitas Islam Indonesia.
- Karina, Indrayani Y, Sirait SM. (2016). Kadar Tanin Biji Pinang (*Areca catechu* L) Berdasarkan Lama Pemanasan dan Ukuran Serbuk. *Jurnal hutan lestari*. Vol. 4(1): 119–127.
- Kartikasari, R. (2015). Perbedaan Potensi Antioksidan Ekstrak Daun Girang (*Leea indica*) Dari Taman Nasional Meru Betiri Dengan Pelarut N-Heksan, Etil Asetat, dan Metanol. (*Undergraduate S-1 thesis*). Universitas Jember.
- Kate, I. D. (2014). Penetapan Kandungan Fenolik Total dan Uji Aktivitas Antioksidan Dengan Metode DPPH (1,1-Diphenyl-2-Pikrilhidrazil) Ekstrak Metanolik Umbi Bidara Upas (*Merremia mammosa* (Lour) Hallier f.). (*Undergraduate S-1 thesis*). Universitas Sanata Dharma Yogyakarta.
- Katno. 2008. *Pengelolaan Pasca Panen Tanaman Obat*. Jakarta: B2P2TO- OT Badan Penelitian dan Pengembangan Kesehatan Depkes RI. Hal. 21-37.
- Koirewoa, Y. A., Fatimawali, W. I. Wiyono. (2012). Isolasi dan Identifikasi Senyawa Flavonoid dalam Daun Beluntas (*Pluchea indica* L.). *Laporan Penelitian*. FMIPA UNSRAT. Manado.
- Lopez, M., Martinez, F., Del-Valle, C., Ferrit, M., & Luque, R. (2003). Study of Phenolic Compounds as Natural Antioxidants by a Fluorescence Method. *J. Talanta*. 60: 609-616.
- Lumbessya, M., Abidjulua, J., & Paendong, J. E. Jessy. (2013). Uji Total Flavonoid Pada Beberapa Tanaman Obat Tradisional Di Desa Waitina Kecamatan Mangoli Timur Kabupaten Kepulauan Sula Provinsi Maluku Utara. *Jurnal MIPA Unsrat Online*. 2(1): 50-55.
- Lusiana, K., Soetjipto, H., & Hastuti, K. A. K. Dewi. (2013). Aktivitas Antibakteri dan Kandungan Fitokimia Ekstrak Daun Waru Lengis (*Hibiscus tiliaceus* L.) Sebagai Bahan Dasar Pembuatan Sampo. *Seminar Nasional Kimia dan Pendidikan Kimia V*. Program Studi Pendidikan Kimia Jurusan PMIPA FKIP UNS. 631-638.
- Maesaroh, K., Kurnia, D., & Anshori, J. (2018). Perbandingan Metode Uji Aktivitas Antioksidan DPPH, FRAP dan FIC Terhadap Asam Askorbat, Asam Galat dan Kuersetin. *Chimica et Natura Acta*. 6(2): 93-100.
- Malangngi, P. Liberty., Sangi, S. Meiske., & Paendong, J. E. Jessy. (2012). Penentuan Kandungan Tanin dan Uji Aktivitas Antioksidan Ekstrak Biji Buah Alpukat (*Persea americana* Mill.). *Jurnal MIPA Unsrat Online*. 1 (1): 5-10.
- Maleta, S. H., Indrawati, R., Limantara, L., Brotosudarmo, P. H. T. (2018). Ragam Metode Ekstraksi Karotenoid dari Sumber Tumbuhan dalam Dekade Terakhir (Telaah Literatur). *Jurnal Rekayasa Kimia dan Lingkungan*. 13(1): 40-50.
- Marhenta, B. Y., Sunarni, T., & Iswand. (2016). Aktivitas Antioksidan Fraksi n-Heksan, Etil Asetat, dan Fraksi Air Ekstrak Etanolik Daun Waru Gombang (*Hibiscus similis* BI.) Terhadap Radikal Bebas DPPH (1,1 Difenil-2-pikrilhidrazil). *Jurnal Farmasi Indonesia*. 14(2): 101-104.

- Marliani, L., Kusriani H., & Sari, I. N. (2014). Aktivitas Antioksidan Daun dan Buah Jamblang (*Syzygium Cumini* L.) Skeel. *Prosiding Seminar Nasional Penelitian dan PKM Sains, Teknologi dan Kesehatan*. 4(1): 202-203.
- Molyneux, P. (2004). The use of the stable free radical diphenylpicrylhydrazyl (DPPH) for estimating antioxidant activity. *Journal Science Tecnology*. 26(2): 211-219.
- Narender, Sunil, K., Dinesh, K., & Vipin, K. (2009). Antinociceptive and Anti-Inflammatory Activity of *Hibiscus tiliaceus* Leaves. *International Journal of Pharmacognosy and Phytochemical Research*. 1(1): 15-17.
- Novitasari, A.E. dan D. Z. Putri. (2016). Isolasi dan Identifikasi Saponin Pada Ekstrak Daun Mahkota Dewa Dengan Ekstraksi Maserasi. *Jurnal Sains*. Vol. 6(12): 10-14.
- Noviyanty, A., Salingkat, C. A., & Syamsiar, S. (2019). Pengaruh jenis pelarut terhadap ekstraksi dari kulit buah naga merah (*Hylocereus polyrhizus*). *KOVALEN: Jurnal Riset Kimia*, 5(3), 271-279.
- Nugroho, L. H. (2021). *Struktur dan Produk Jaringan Sekretori Tumbuhan*. Yogyakarta : Gadiah Mada University Press.
- Nurbani, Z. S., Kusuma, J., Siregar, N. A., Hidayah, N. (2020). Identifikasi Senyawa Fitokimia Ekstrak Waru Laut (*Thespesia populnea*) Dari Pesisir Pantai Semarang Kabupaten Natuna. *Jurnal Bluefin Fisheries*. 2(2): 8 -19.
- Nurhayati, T., Ditha Aryanti, Nurjanah. (2009). Kajian Awal Potensi Ekstrak Spons Sebagai Antioksidan Preliminary Study of Sponge Extract as Antioksidan. *Jurnal Kelautan Nasional*. IPB. Vol. 2.
- Nurliyasma, Khotima, M. K., Srihainil. (2022). Aktivitas Antioksidan Ekstrak Etanol
- Oktari, T., Fitmawati, & Sofiyanti, N. (2014). Identifikasi dan Uji Fitokimia Ekstrak Alami Tanaman Antiuroolithiasis. *Jurnal Online Mahasiswa Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam*. Vol. 1(2): 1-9.
- Oktavia, S., Ifora, & Putri, D. A. (2018). Uji Toksisitas Akut Ekstrak Daun Waru (*Hibiscus tiliaceus* L.) Pada Mencit Putih Jantan. *Jurnal Farmasi Higea*. 10(1): 41-48.
- Pattikawa, J., & Fauziawati, A. (2020). *Pengaruh Metode Pemisahan Pelarut Dengan Minyak Terhadap Kualitas Minyak Dedak Padi* (Doctoral dissertation, Institut Teknologi Nasional Bandung).
- Permadi, A., Sutanto, S., & Wardatun, S. (2018). Perbandingan Metode Ekstraksi Bertingkat dan Tidak Bertingkat Terhadap Flavonoid Total Herba Ciplukan (*Physalis angulata* L.) Secara Kolorimetri. *Jurnal Online Mahasiswa (JOM) Bidang Farmasi*. 1(1): 1-10.
- Permanasari, A. R., Saputra, T. R., Nurul'Aina, A., & Liska, S. (2020). Penentuan Pelarut Terbaik pada Ekstraksi Tanin Kulit Kayu Akasia dan Pengaruhnya Sebagai Inhibitor Laju Korosi pada Baja Karbon. *J. Tek. Kim. dan Lingkungan*, 4(1), 7.
- Pertiwi, D. R., Yari, E. C., & Putra, F. N. (2016). Uji Aktivitas Antioksidan Ekstrak Etanol Limbah Kulit Buah Apel (*Malus domestica* Borkh.) Terhadap Radikal Bebas DPPH (2,2-Diphenyl-1-Picrylhydrazil). *Jurnal Ilmiah Manuntung*. 2(1): 81-92.

- Pourmourad, F., Hosseinimehr, S.J., & Shahabimajid, N. (2006). Antioxidant Activity, Phenol and Flavonoid Contents of Some Selected Iranian Medicinal Plants. *African Journal of Biotechnology*. 5(11): 1142-1145.
- Prasetyo, E. Y., Sangi, S. M., & Wuntu, D. A. (2016). Penentuan Total Fenolik dan Aktivitas Antioksidan Fraksi Etil Asetat Dari Tepung Pelelepah Aren (*Arenga pinnata*). *Jurnal Ilmiah Sains*. 16 (2): 68-72.
- Purwantiningsih, P., Murwanti, R., & Hakim, L. (2019). Antioxidant Activities of n-Hexane Soluble and Insoluble Fraction, Ethyl Acetate Soluble and Insoluble Fraction from Ethanol Extract of Sambung Nyawa Leaf (*Gynura procumbens* (Lour.) Merr.). *Traditional Medicine Journal*. 24(2): 91-97.
- Putri, K. O., Rahayu, O. L., Hadiwibowo, F. G., & Manggarani, D. R. (2021). Pengaruh Metode Preparasi Ekstrak Daun Waru (*Hibiscus tiliaceus*) Sebagai Antioksidan Terhadap Kadar Flavonoid dan Fenolik Total. *Jurnal Akta Kimia Indonesia*. 6(2): 162-173.
- Rahayu, O. L., Putri, K. O., & Manggarani, D. R. (2022). Kadar Flavonoid dan Fenolik Ekstrak Daun Waru (*Hibiscus tiliaceus*) Serta Aktivitasnya Sebagai Antioksidan. *JC-T (Journal Cis-Trans)*. 6(1): 17-23.
- Rahayu, S., Dwi, Kusri, Dewi, Fachriyah, & Enny. (2009). Penentuan Aktivitas Antioksidan Dari Ekstrak Etanol Daun Ketapang (*Terminalia catappa* L) Dengan Metode 1,1-Difenil-2-Pikrilhidrazil (DPPH). In: Seminar Tugas Akhir S-1. Jurusan Kimia FMIPA UNDIP, Jurusan Kimia UNDIP: 1-10.
- Rahayu, Y. (2019). Karakteristik Morfologi Daun di Hutan Kota BNI Gampong Tibang Kota Banda Aceh Sebagai Referensi Praktikum Morfologi Tumbuhan. *Skripsi*. Universitas Islam Negeri Ar-Raniry.
- Rani, C. H., & Tiana, M. (2016). Review: Manfaat Antioksidan Pada Tanaman Buah di Indonesia. *Jurnal Unpad Farmaka*. 14(1): 184-190.
- Rebaya, A., Belghith, S. I., Baghdikian, B., Leddet, V. M., Mabrouki, F., Olivier, E., Cherif, J. K., & Ayadi, M. T. (2015). Total Phenolic, Total Flavonoid, Tannin Content, and Antioxidant Capacity of *Halimium Halimifolium* (Cistaceae). *Journal of Applied Pharmaceutical Science*. Vol. 5(1): 52-57.
- Ridho, A. E., Sari, R., & Wahdaningsih, S. (2014). Uji Aktivitas Antioksidan Ekstrak Metanol Buah Lakum Dengan Metode DPPH (2,2-Difenil-1-Pikrihidrazil). *Jurnal Mahasiswa Farmasi Fakultas Kedokteran UNTAN*. 1(1): 1-10.
- Rohmah, J., Saidi, I. A., Rini, C. S., Masyitha, D. A., Ramadhani, D. N., & Wulandari, H. P. (2020). Aktivitas antioksidan ekstrak etanol, etil asetat, dan n-heksana batang turi putih (*Sesbania grandiflora* (L.) Pers.) dengan metode DPPH (1, 1-Diphenyl-2-picrylhydrazyl). *Jurnal Kimia Riset (JKR)*, 5(1), 67-85.
- Rorong, A. J. (2008). Uji Aktivitas Antioksidan Dari Daun Cengkeh (*Eugenia Caryophyllus*) Dengan Metode DPPH. *Chemistry Progress - E-Journal Universitas Sam Ratulangi*. 1(2): 111-116.
- Rustini, L. N., Ariati, K., Dewi, P. A. A. Indah, & Swantara, D. I Made. (2015). Uji Toksisitas Ekstrak Daun Waru (*Hibiscus tiliaceus* L.) Terhadap Larva *Artemia salina* Leach Serta Identifikasi Golongan Senyawanya. *Jurnal Kimia*. 9(1): 47-52.

- Sari, N. A. (2016). Berbagai Tanaman Rempah Sebagai Sumber Antioksidan Alami. *Journal of Islamic Science and Technology*. 2(2): 203-212.
- Sastrawan, N. I., Sangi, M., & Kamu, V. (2013). Skrining Fitokimia dan Uji Aktivitas Antioksidan Ekstrak Biji Adas (*Foeniculum vulgare*) Menggunakan Metode DPPH. *Jurnal Ilmiah Sains*. 13(2): 110-115.
- Sayuti, M. (2017). Pengaruh Perbedaan Metode Ekstraksi, Bagian Dan Jenis Pelarut Terhadap Rendemen Dan Aktifitas Antioksidan Bambu Laut (*Isis Hippuris*). *Technology Science and Engineering Journal*. 1(3): 166-174.
- Setiawan, F., Yunita, O., & Kurniawan, A. (2018). Uji Aktivitas Antioksidan Ekstrak Etanol Kayu Secang (*Caesalpinia sappan*) Menggunakan Metode DPPH, ABTS, dan FRAP. *Media Pharmaceutica Indonesiana*. (2)2: 82-89.
- Sunil, K., Dinesh, K., & Prakash, O. (2008). Evaluation of Antioxidant Potential, Phenolic and Flavonoid Contents of *Hibiscus tiliaceus* Flowers. *Electronic Journal of Environmental, Agricultural and food Chemistry*. 7 (4): 2863-2871.
- Surahmaida, Rachmawati, A., & Handayani, E. (2020). Kandungan Senyawa Kimia Daun Waru (*Hibiscus tiliaceus*) di Kawasan Lingkar Timur Sidoarjo. 5(2): 39-42.
- Suryanto, E., Wehantou, F., & Raharjo, S. (2008). Aktivitas Penstabilan Senyawa Oksigen Reaktif dari Beberapa Herbal. *Jurnal Obat Bahan Alam*. 7(1): 62-68.
- Suwandi, S. Hut., & Hendrati, R. L. (2014). *Perbanyakan Vegetatif dan Penanaman Waru (Hibiscus tiliaceus) untuk Kerajinan dan Obat*. Bogor: IPB Press.
- Syarif, A. R., Muhajir, Ahmad, R. A., & Malik, Abd. (2015). Identifikasi Golongan Senyawa Antioksidan Dengan Menggunakan Metode Perendaman Radikal DPPH Ekstrak. *Jurnal Fitofarmaka Indonesia*. 2(1): 83-89.
- Trisnantini, D., Ismawati, A., Pradana, T. B., & Jonathan, J. G. (2016). Pengujian Aktivitas Antioksidan Menggunakan Metode DPPH pada Daun Tanjung (*Mimusops elengi* L.). *Prosiding Seminar Nasional Teknik Kimia "Kejuangan". Program Studi Teknik Kimia, FTI, UPN "Veteran" Yogyakarta*. 1-7.
- Tuhuloula, A., Budiarti L., & Fitriana, N. E. (2013). Karakterisasi Pektin Dengan Memanfaatkan Limbah Kulit Pisang Menggunakan Metode Ekstraksi. *Konversi*. 2(1): 21 – 27.
- Tursiman, Ardiningsih, P., & Nofiani, R. (2012). Total Fenol Fraksi Etil Asetat dari Buah Asam Kandis (*Garcinia dioica* Blume). *Jurnal Kimia Khatulistiwa*. 1(1): 45-48.
- Ukieyanna, E. (2012). *Aktivitas Antioksidan, Kadar Fenolik, dan Flavonoid Total Tumbuhan Suruhan (Peperomia pellucid L. Kunth)*. Bogor: Fakultas Teknologi Pertanian, Institut Pertanian Bogor.
- Utomo, S. D., Kristiani, E. B. E., & Mahardika, A. (2020). Pengaruh Lokasi Tumbuh Terhadap Kadar Flavonoid, Fenolik, Klorofil, Karotenoid Dan Aktivitas Antioksidan Pada Tumbuhan Pecut Kuda (*Stachytarpheta Jamaicensis*). *UNDIP E-Journal*. 22(2): 143-149.

- Verawati, Sari, M. T., & Savera, H. (2020). Pengaruh Perbedaan Metode Ekstraksi terhadap Aktivitas Antioksidan dan Kadar Fenolat Total dalam Ekstrak Daun Kelor (*Moringa oleifera* Lam.). *Jurnal Farmasi Indonesia*. 17(1):90-97.
- Wijaya, H., & Junaidi, L. (2011). Antioksidan: Mekanisme Kerja dan Fungsinya Dalam Tubuh Manusia. *Journal of Agro-Based Industry*. 28(2): 44-55.
- Winarsi, H. (2007). *Antioksidan Alami dan Radikal Bebas*. Yogyakarta: Kanisius.
- Yuliani, N. N., & Dienina. P. D. (2015). Uji Aktivitas Antioksidan Infusa Daun Kelor (*Moringa oleifera*, Lamk) Dengan Metode 1,1-diphenyl-2-picrylhydrazyl (DPPH). *Jurnal Info Kesehatan*. 14(2): 1060- 1082.



LAMPIRAN

Lampiran 1. Perhitungan

1. Perhitungan Uji Kadar Air

$$\% \text{ Kadar air} = \frac{\text{berat awal} - \text{berat akhir}}{\text{berat sampel}} \times 100\%$$

$$\% \text{ Kadar air} = \frac{30.0073 - 29.0118}{30.0073} \times 100\%$$

$$\% \text{ Kadar air} = \frac{0.9955}{30.0073} \times 100\%$$

$$\% \text{ Kadar air} = 0,0331 \times 100\%$$

$$\% \text{ Kadar air} = 3,31\%$$

2. Perhitungan Rendemen

- Perhitungan persentase rendemen ekstrak daun waru menggunakan pelarut *n*-heksan:

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

$$\% \text{ Rendemen} = \frac{44.126 \text{ gram}}{50.250 \text{ gram}} \times 100\%$$

$$\% \text{ Rendemen} = 0,8781 \text{ gram} \times 100\%$$

$$\% \text{ Rendemen} = 87,81\%$$

- Perhitungan persentase rendemen ekstrak daun waru menggunakan pelarut etil asetat:

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

$$\% \text{ Rendemen} = \frac{80.5938 \text{ gram}}{50.250 \text{ gram}} \times 100\%$$

$$\% \text{ Rendemen} = 1,6038 \text{ gram} \times 100\%$$

$$\% \text{ Rendemen} = 160,38\%$$

- Perhitungan persentase rendemen ekstrak daun waru menggunakan pelarut etanol:

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

$$\% \text{ Rendemen} = \frac{90.0342 \text{ gram}}{50.250 \text{ gram}} \times 100\%$$

$$\% \text{ Rendemen} = 1,7917 \text{ gram} \times 100\%$$

$$\% \text{ Rendemen} = 179,17\%$$

3. Perhitungan Penentuan Kandungan Total Fenol

Tabel data perhitungan penentuan larutan standar asam galat

No	Konsentrasi Standar Asam Galat (X)	Absorbansi (Y)	XY	X ²	Y ²
1	20	0,512	10,24	400	0,262
2	40	1,422	56,88	1600	2,022
3	60	2,153	129,18	3600	4,635
4	80	2,586	206,88	6400	6,687
5	100	2,947	294,7	10000	8,685
	$\Sigma x = 300$	$\Sigma y = 9,62$	$\Sigma xy = 697,88$	$\Sigma x^2 = 22000$	$\Sigma y^2 = 22,291$

Keterangan :

Slope (b) = tingkat kemiringan garis

Intercept (a) = jarak titik y pada garis dari titik 0

n = banyak data

r = regresi

Σx = jumlah konsentrasi

Σy = jumlah luas area

Σxy = jumlah konsentrasi dikali dengan luas area

Σx^2 = jumlah masing-masing konsentrasi dikuadratkan

Σy^2 = jumlah masing-masing luas area dikuadratkan

Diketahui data penentuan larutan standar asam galat:

$$n = 5$$

$$\begin{aligned}\sum x &= 20 + 40 + 60 + 80 + 100 \\ &= 300\end{aligned}$$

$$\begin{aligned}\sum y &= 0,512 + 1,422 + 2,153 + 2,586 + 2,947 \\ &= 9,62\end{aligned}$$

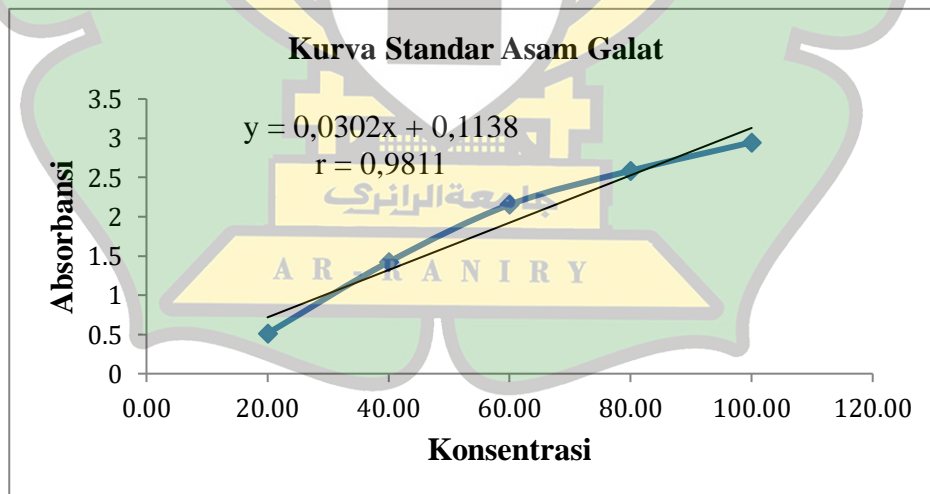
$$\begin{aligned}\sum xy &= (20 \times 0,512) + (40 \times 1,422) + (60 \times 2,153) + (80 \times 2,586) + (100 \times 2,947) \\ &= 10,24 + 56,88 + 129,18 + 206,88 + 294,7 \\ &= 697,88\end{aligned}$$

$$\begin{aligned}\sum x^2 &= (20^2) + (40^2) + (60^2) + (80^2) + (100^2) \\ &= 400 + 1600 + 3600 + 6400 + 10000 \\ &= 22000\end{aligned}$$

$$\begin{aligned}\sum y^2 &= (0,512^2) + (1,422^2) + (2,153^2) + (2,586^2) + (2,947^2) \\ &= 0,262 + 2,022 + 4,635 + 6,687 + 8,685 \\ &= 22,291\end{aligned}$$

- Perhitungan kurva kalibrasi larutan standar asam galat:

Gambar kurva kalibrasi larutan standar asam galat



Mencari persamaan garis linear:

$$y = a + bx$$

$$b = \frac{n \sum xy - \sum x \sum y}{n \sum x^2 - (\sum x)^2}$$

$$= \frac{(5 \times 697,88) - (300 \times 9,62)}{(5 \times 22000) - (300)^2}$$

$$= \frac{3489,4 - 2886}{110000 - 90000}$$

$$= \frac{603,4}{20000}$$

$$= 0,03017$$

$$a = \frac{\sum y - b(\sum x)}{n}$$

$$= \frac{9,62 - (0,03017 \times 300)}{5}$$

$$= \frac{9,62 - 9,051}{5}$$

$$= \frac{0,569}{5}$$

$$= 0,1138$$

Jadi, persamaan garis linear yang diperoleh adalah $y = 0,03017x + 0,1138$.

Perhitungan koefisien korelasi (r) larutan standar asam galat:

$$r = \frac{n \sum xy - \sum x \sum y}{\sqrt{(n \sum x^2 - (\sum x)^2) ((n \sum y^2) - (\sum y)^2)}}$$

$$= \frac{(5 \times 697,88) - (300 \times 9,62)}{\sqrt{((5 \times 22000) - (300)^2) ((5 \times 22,291) - (9,62)^2)}}$$

$$= \frac{3489,4 - 2886}{\sqrt{(110000 - 90000) (111,455 - 92,5444)}}$$

$$= \frac{603,4}{\sqrt{(20000) (18,9106)}}$$

$$= \frac{603,4}{\sqrt{378212}}$$

$$= \frac{614,989}{603,4}$$

$$= 0,9811$$

4. Perhitungan Penentuan Uji Aktivitas Antioksidan Ekstrak Daun Waru

- a. **Tabel** perhitungan penentuan uji aktivitas antioksidan ekstrak daun waru dengan pelarut *n*-heksan

No	Konsentrasi (X)	Absorbansi	% Inhibisi (Y)	XY	X ²	Y ²
1	50	0,110	81,1	4055	2500	6577,21
2	40	0,137	82,0	3280	1600	6724
3	30	0,197	74,1	2223	900	5490,81
4	20	0,246	67,7	1354	400	4583,29
5	10	0,489	35,8	358	100	1281,64
	$\sum x = 150$		$\sum y = 340,7$	$\sum xy = 11270$	$\sum x^2 = 5500$	$\sum y^2 = 24656,95$

- Diketahui data ekstrak daun waru dengan pelarut *n*-heksan:

$$n = 5$$

$$\begin{aligned}\sum x &= 50 + 40 + 30 + 20 + 10 \\ &= 150\end{aligned}$$

$$\begin{aligned}\sum y &= 81,1 + 82,0 + 74,1 + 67,7 + 35,8 \\ &= 340,7\end{aligned}$$

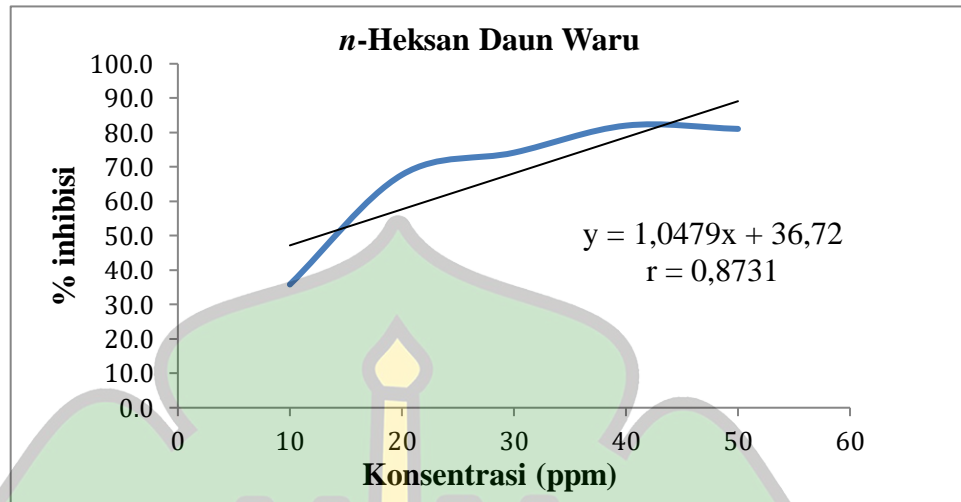
$$\begin{aligned}\sum xy &= (50 \times 81,1) + (40 \times 82,0) + (30 \times 74,1) + (20 \times 67,7) + (10 \times 35,8) \\ &= 4055 + 3280 + 2223 + 1354 + 358 \\ &= 11270\end{aligned}$$

$$\begin{aligned}\sum x^2 &= (50^2) + (40^2) + (30^2) + (20^2) + (10^2) \\ &= 2500 + 1600 + 900 + 400 + 100 \\ &= 5500\end{aligned}$$

$$\begin{aligned}\sum y^2 &= (81,1^2) + (82,0^2) + (74,1^2) + (67,7^2) + (35,8^2) \\ &= 6577,21 + 6724 + 5490,81 + 4583,29 + 1281,64 \\ &= 24656,95\end{aligned}$$

- Perhitungan kurva kalibrasi ekstrak daun waru dengan pelarut *n*-heksan:

Gambar kurva kalibrasi ekstrak daun waru dengan pelarut *n*-heksan



Mencari persamaan garis linear:

$$y = a + bx$$

$$b = \frac{n \sum xy - \sum x \sum y}{n \sum x^2 - (\sum x)^2}$$

$$= \frac{(5 \times 11270) - (150 \times 340.7)}{(5 \times 5500) - (150)^2}$$

$$= \frac{56350 - 51105}{27500 - 22500}$$

$$= \frac{5245}{5000}$$

$$= 1,049$$

$$a = \frac{\sum y - b (\sum x)}{n}$$

$$= \frac{340.7 - (1.049 \times 150)}{5}$$

$$= \frac{340.7 - 157.35}{5}$$

$$= \frac{183.35}{5}$$

$$= 36,7$$

Jadi, persamaan garis linear yang diperoleh adalah $y = 1,049x + 36,7$.

- Perhitungan koefisien korelasi (r) ekstrak daun waru dengan pelarut n-heksan:

$$\begin{aligned}
 r &= \frac{n \sum xy - \sum x \sum y}{\sqrt{(n \sum x^2) - (\sum x)^2} \sqrt{(n \sum y^2) - (\sum y)^2}} \\
 &= \frac{(5 \times 11270) - (150 \times 340,7)}{\sqrt{((5 \times 5500) - (150)^2) ((5 \times 24656,95) - (340,7)^2)}} \\
 &= \frac{56350 - 51105}{\sqrt{(27500 - 22500) (123284,75 - 116076,49)}} \\
 &= \frac{5245}{5245} \\
 &= \frac{\sqrt{(5000) (7208,26)}}{5245} \\
 &= \frac{\sqrt{36041300}}{5245} \\
 &= \frac{6003,44}{5245} \\
 &= 0,87366
 \end{aligned}$$

- b. **Tabel** perhitungan penentuan uji aktivitas antioksidan ekstrak daun waru dengan pelarut etil asetat

No	Konsentrasi (X)	Absorbansi	% Inhibisi (Y)	XY	X ²	Y ²
1	50	0,132	77,28	3864	2500	5972,1984
2	40	0,149	74,35	2974	1600	5527,9225
3	30	0,179	69,19	2075,7	900	4787,2561
4	20	0,241	58,52	1170,4	400	3424,5904
5	10	0,317	45,44	454,4	100	2064,7936
	$\sum x = 150$		$\sum y = 324,78$	$\sum xy = 10538,5$	$\sum x^2 = 5500$	$\sum y^2 = 21776,761$

A R - R A N I R Y

Diketahui data ekstrak daun waru dengan pelarut etil asetat:

$$n = 5$$

$$\begin{aligned}\sum x &= 50 + 40 + 30 + 20 + 10 \\ &= 150\end{aligned}$$

$$\begin{aligned}\sum y &= 77,28 + 74,35 + 69,19 + 58,52 + 45,44 \\ &= 324,78\end{aligned}$$

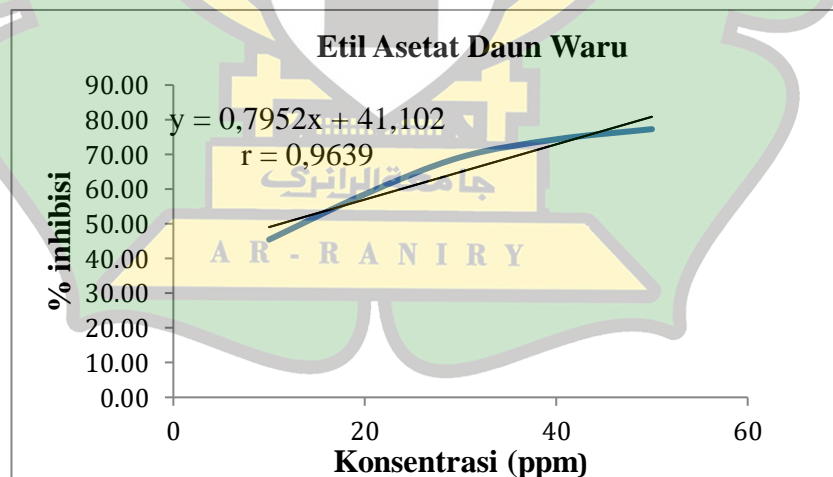
$$\begin{aligned}\sum xy &= (50 \times 77,28) + (40 \times 74,35) + (30 \times 69,19) + (20 \times 58,52) + (10 \times 45,44) \\ &= 3864 + 2974 + 2075,7 + 1170,4 + 1170,4 = 10538,5\end{aligned}$$

$$\begin{aligned}\sum x^2 &= (50^2) + (40^2) + (30^2) + (20^2) + (10^2) \\ &= 2500 + 1600 + 900 + 400 + 100 \\ &= 5500\end{aligned}$$

$$\begin{aligned}\sum y^2 &= (77,28^2) + (74,35^2) + (69,19^2) + (58,52^2) + (45,44^2) \\ &= 5972,1984 + 5527,9225 + 4787,2561 + 3424,5904 + 2064,7936 \\ &= 21776,761\end{aligned}$$

- Perhitungan kurva kalibrasi ekstrak daun waru dengan pelarut etil asetat:

Gambar kurva kalibrasi ekstrak daun waru dengan pelarut etil asetat



Mencari persamaan garis linear:

$$y = a + bx$$

$$b = \frac{n \sum xy - \sum x \sum y}{n \sum x^2 - (\sum x)^2}$$

$$\begin{aligned}
 &= \frac{(5 \times 10538,5) - (150 \times 324,78)}{(5 \times 5500) - (150)^2} \\
 &= \frac{52692,5 - 48717}{27500 - 22500} \\
 &= \frac{3975,5}{5000} \\
 &= 0,7951 \\
 a &= \frac{\Sigma y - b(\Sigma x)}{n} \\
 &= \frac{324,78 - (0,7951 \times 150)}{5} \\
 &= \frac{324,78 - 119,265}{5} \\
 &= \frac{205,515}{5} \\
 &= 41,103
 \end{aligned}$$

Jadi, persamaan garis linear yang diperoleh adalah $y = 0,7951x + 41,103$.

- Perhitungan koefisien korelasi (r) ekstrak daun waru dengan pelarut etil asetat:

$$\begin{aligned}
 r &= \frac{n \Sigma xy - \Sigma x \Sigma y}{\sqrt{(n \Sigma x^2) - (\Sigma x)^2} \sqrt{(n \Sigma y^2) - (\Sigma y)^2}} \\
 &= \frac{(5 \times 10538,5) - (150 \times 324,78)}{\sqrt{((5 \times 5500) - (150)^2) ((5 \times 21776,761) - (324,78)^2)}} \\
 &= \frac{3975,5}{\sqrt{(27500 - 22500) (108883,805 - 105482,0484)}} \\
 &= \frac{3975,5}{\sqrt{(5000) (3401,7566)}} \\
 &= \frac{3975,5}{\sqrt{17008783}} \\
 &= \frac{4124,2}{3975,5} \\
 &= 0,9639
 \end{aligned}$$

- c. **Tabel** perhitungan penentuan uji aktivitas antioksidan ekstrak daun waru dengan pelarut Etanol.

No	Konsentrasi	Absorbansi	% Inhibisi	XY	X ²	Y ²
----	-------------	------------	------------	----	----------------	----------------

	(X)		(Y)			
1	50	0,137	76,4	3820	2500	5836,96
2	40	0,149	74,4	2976	1600	5535,36
3	30	0,177	69,5	2085	900	4830,25
4	20	0,249	57,1	1142	400	3260,41
5	10	0,309	46,8	468	100	2190,24
	$\sum x = 150$		$\sum y = 324,2$	$\sum xy = 10491$	$\sum x^2 = 5500$	$\sum y^2 = 21653,22$

Diketahui data ekstrak daun waru dengan pelarut etanol:

$$n = 5$$

$$\begin{aligned}\sum x &= 50 + 40 + 30 + 20 + 10 \\ &= 150\end{aligned}$$

$$\begin{aligned}\sum y &= 76,4 + 74,4 + 69,5 + 57,1 + 46,8 \\ &= 324,2\end{aligned}$$

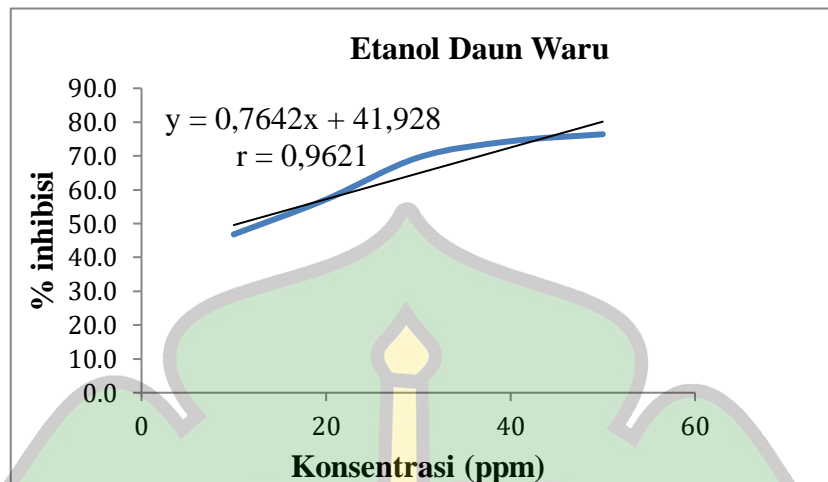
$$\begin{aligned}\sum xy &= (50 \times 76,4) + (40 \times 74,4) + (30 \times 69,5) + (20 \times 57,1) + (10 \times 46,8) \\ &= 3820 + 2976 + 2085 + 1142 + 468 \\ &= 10491\end{aligned}$$

$$\begin{aligned}\sum x^2 &= (50^2) + (40^2) + (30^2) + (20^2) + (10^2) \\ &= 2500 + 1600 + 900 + 400 + 100 \\ &= 5500\end{aligned}$$

$$\begin{aligned}\sum y^2 &= (76,4^2) + (74,4^2) + (69,5^2) + (57,1^2) + (46,8^2) \\ &= 5836,96 + 5535,36 + 4830,25 + 3260,41 + 2190,24 \\ &= 21653,22\end{aligned}$$

- Perhitungan kurva kalibrasi ekstrak daun waru dengan pelarut etanol:

Gambar kurva kalibrasi ekstrak daun waru dengan pelarut etanol



Mencari persamaan garis linear:

$$y = a + bx$$

$$b = \frac{n \sum xy - \sum x \sum y}{n \sum x^2 - (\sum x)^2}$$

$$= \frac{(5 \times 10491) - (150 \times 324,2)}{(5 \times 5500) - (150)^2}$$

$$= \frac{52455 - 48630}{27500 - 22500}$$

$$= \frac{3825}{5000}$$

$$= 0,765$$

$$a = \frac{\sum y - b(\sum x)}{n}$$

$$= \frac{324,2 - (0,765 \times 150)}{5}$$

$$= \frac{324,2 - 114,75}{5}$$

$$= \frac{209,45}{5}$$

$$= 41,89$$

Jadi, persamaan garis linear yang diperoleh adalah $y = 0,765x + 41,89$.

- Perhitungan koefisien korelasi (r) ekstrak daun waru dengan pelarut etil asetat:

$$\begin{aligned}
 r &= \frac{n \sum xy - \sum x \sum y}{\sqrt{(n \sum x^2) - (\sum x)^2} \sqrt{(n \sum y^2) - (\sum y)^2}} \\
 &= \frac{(5 \times 10491) - (150 \times 324,2)}{\sqrt{((5 \times 5500) - (150)^2) ((5 \times 21653,22) - (324,2)^2)}} \\
 &= \frac{52455 - 48630}{\sqrt{(27500 - 22500) (108266,1 - 105105,64)}} \\
 &= \frac{3825}{3825} \\
 &= \frac{\sqrt{(5000) (3160,46)}}{3825} \\
 &= \frac{\sqrt{15802300}}{3825} \\
 &= \frac{3975,21}{3825} \\
 &= 0,9622
 \end{aligned}$$

5. Perhitungan IC₅₀

Nilai IC₅₀ diperoleh dari persamaan regresi linier % penghambatan radikal DPPH terhadap beberapa konsentrasi senyawa.

- a. Perhitungan IC₅₀ ekstrak daun waru dengan pelarut *n*-heksan:

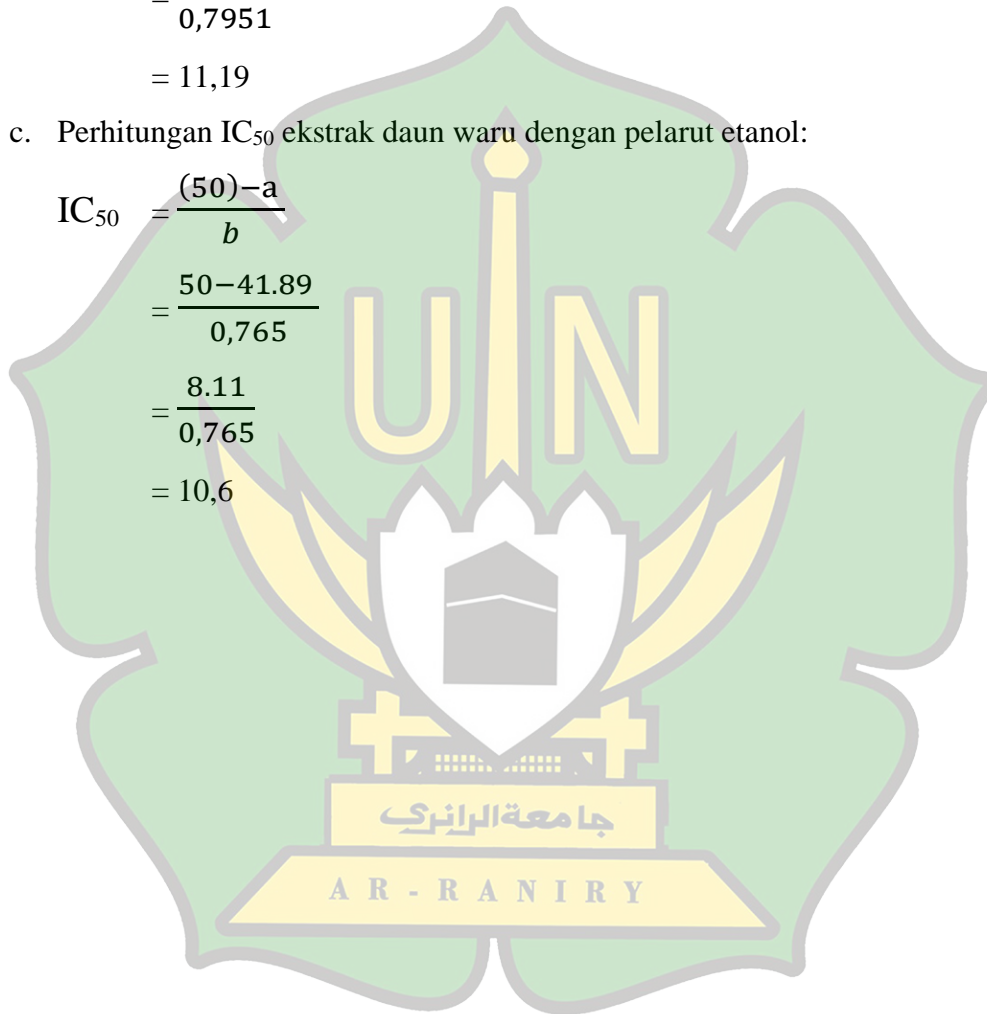
$$\begin{aligned}
 IC_{50} &= \frac{(50) - a}{b} \\
 &= \frac{50 - 36,7}{1,049} \\
 &= \frac{13,3}{1,049} \\
 &= 12,7
 \end{aligned}$$

b. Perhitungan IC_{50} ekstrak daun waru dengan pelarut etil asetat:


$$\begin{aligned} IC_{50} &= \frac{(50)-a}{b} \\ &= \frac{50-41.103}{0,7951} \\ &= \frac{8.897}{0,7951} \\ &= 11,19 \end{aligned}$$

c. Perhitungan IC_{50} ekstrak daun waru dengan pelarut etanol:


$$\begin{aligned} IC_{50} &= \frac{(50)-a}{b} \\ &= \frac{50-41.89}{0,765} \\ &= \frac{8.11}{0,765} \\ &= 10,6 \end{aligned}$$



Lampiran 2. Surat Keterangan Identifikasi Tumbuhan Waru




LABORATORIUM BIOLOGI
FAKULTAS SAINS DAN TEKNOLOGI
UNIVERSITAS ISLAM NEGERI AR-RANIRY
 Jl. Sycikh Abdul Rauf Kopelma Darussalam, Banda Aceh
 Web: www.biologi.fst.ar-raniry.ac.id, Email: biolah.ar-raniry@gmail.com



SURAT KETERANGAN IDENTIFIKASI
 No: B-194/Un.08/Lab.Bio-FST/PP.00.9/12/2021

Nama : Nanda Syahputra NIM : 160704036 Program Studi : Kimia FST UIN Ar-Raniry	Nama Daerah : Waru Nama Ilmiah : <i>Hibiscus tilaceus</i> L. Asal Sampel : Jl. Blang Binatang Lama Km. 8,5 Kec. Darussalam. Kab. Aceh Besar
--	---



KLASIFIKASI :


Kingdom : Plantae
 Divisi : Tracheophyta
 Kelas : Magnoliopsida
 Ordo : Malvales
 Familia : Malvaceae
 Genus : Hibiscus
 Spesies : *Hibiscus tilaceus* L.

Gambar: Waru (*Hibiscus tilaceus* L.)

DESKRIPSI :
 Tumbuhan waru (*Hibiscus tilaceus* L.) termasuk kedalam kategori habitus pohon. Pohon ini memiliki ketinggian 5-15 m. Batangnya berkayu, bulat, dan bercabang yang berwarna coklat. Daun memiliki tangkai yang tunggal, berbentuk jantung atau bundar telur, ukuran diameter sekitaran 19 cm. Pertulangan menjari, berwarna hijau bagian bawah berambut yang rapat. Bungan memiliki ukuran 2-5 dalam tandan, bertajuk 8-11 buah, berwarna kuning dengan ungu pada bagian pangkal dalam buah, kemudian buah berubah menjadi warna kuning kemerahan. Buah berbentuk bulat, berambut lebat, memiliki 5 ruang, panjang buah sekitar 3 cm, dan berwarna coklat. Dan biji kecil berwarna coklat muda.

Demikian surat keterangan ini dibuat untuk dapat dipergunakan sebagaimana mestinya.

Banda Aceh, 14 Desember 2021
 Mengetahui,
 Ketua Laboratorium Biologi



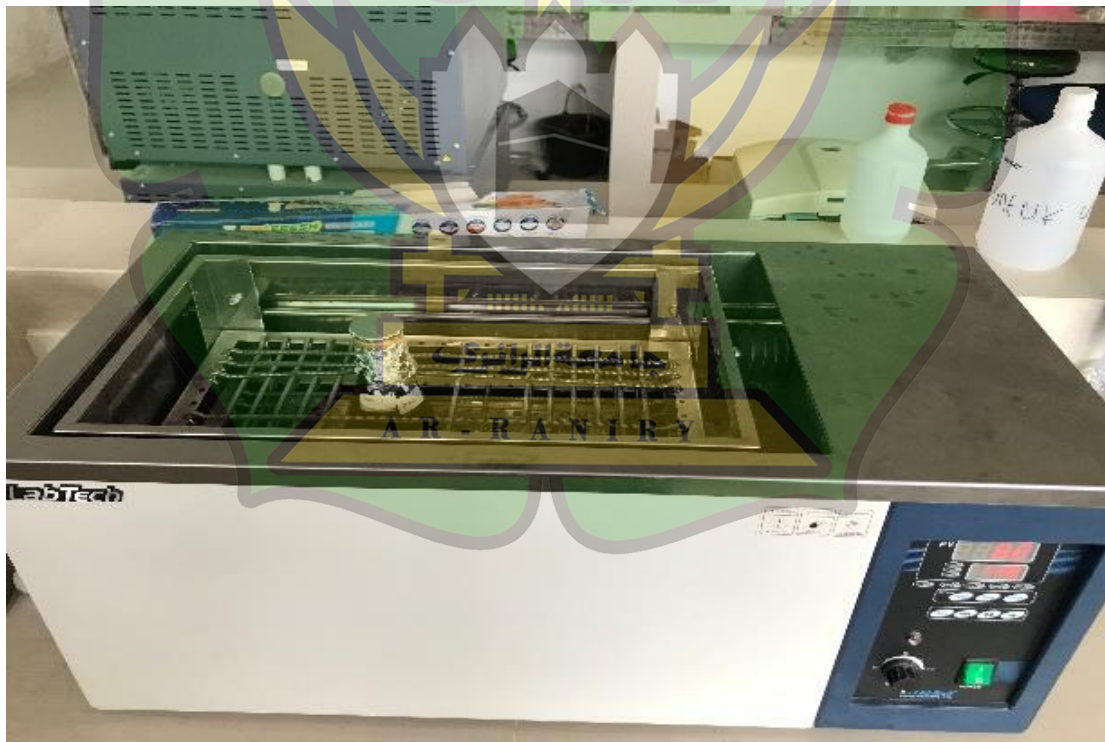
Syafrina Sari Lubis, M.Si
 NIDN. 2025048003

Lampiran 3. Dokumentasi Penelitian

1. Uji Kadar Air Serbuk Daun Waru



2. Proses Maserasi Dilakukan Selama 72 jam Pada Suhu Ruang Dengan Menggunakan *Shaker* Berkecepatan 110 *Rotation Per Minutes* (RPM)



3. Proses Larutan Sampel Difiltrasi Dengan Menggunakan Corong *Buchner* Sehingga Didapatkan Filtrat dan Residu



4. Proses Filtrat Ekstrak Daun Waru dan Pelarut di Evaporasi Menggunakan Evaporator Vakum Pada Suhu 40°C Sehingga Didapatkan Ekstrak Kental Dari Daun Waru



5. Surat Keterangan Skrining Fitokimia Ekstrak Daun Waru dengan pelarut *n*-Heksan (filtrat 1), Etil Asetat (filtrat 2), dan Etanol (filtrat 3)



KEMENTERIAN PENDIDIKAN DAN KEBUDAYAAN,
RISET, DAN TEKNOLOGI
UNIVERSITAS SYIAH KUALA
FAKULTAS MATEMATIKA DAN ILMU PENGETAHUAN ALAM
JURUSAN KIMIA
Jl. Tgk. Tanoh Abec No. 3 Darussalam – Banda Aceh 23111
Telp/Fax. : (0651)-7555264
Email: esp@unsyah.ac.id

SURAT KETERANGAN
Nomor : 017/UN11.1.8.3/DT/2022

Laboratorium Penelitian Jurusan Kimia Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam Universitas Syiah Kuala dengan ini menerangkan bahwa :

No	Nama	NIM	Judul Penelitian
1	Nanda Syahputra	160704036	Uji Aktivitas Antioksidan Ekstrak Daun Waru (<i>Hibiscus tiliaceus</i>) dengan Pelarut <i>n</i> -Heksan, Etil asetat dan Etanol Menggunakan Metode DPPH (2,2-difenil-1-pikrilhidrazil)

Adalah benar yang namanya tersebut di atas telah melakukan uji fitokimia pada Laboratorium Penelitian Jurusan Kimia FMIPA USK dengan hasil sebagai berikut:

Kandungan Metabolit	Reagen	Filtrat 1	Filtrat 2	Filtrat 3
Alkaloid	Mayer	-	+	-
	Wagner	-	+	-
	Dragendorff	-	+	-
Steroid	Uji Liebermann-Burchard	+	+	+
	Uji Liebermann-Burchard	-	-	-
Saponin	Pengocokan	-	-	-
Flavonoid	HCl dan Logam Mg	+	+	+
	FeCl ₃	-	-	+
Tanin	Gelatin+H ₂ SO ₄	+	-	-

Keterangan: (+) menunjukkan hasil positif dan (-) menunjukkan hasil negatif.

Demikian, atas perhatian dan kerjasama yang baik kami ucapkan terimakasih.

Mengetahui,
Ketua Jurusan Kimia,



Dr. Saiful M.Si
NIP.196909221994121001

Darussalam, 14 Januari 2022
Penanggung Jawab Laboratorium

Prof. Dr. Nurdin, M.Si
NIP.196609151991031005

6. Proses dan Hasil Penentuan Uji Aktivitas Antioksidan Ekstrak Daun Waru Dengan Pelarut *n*-heksan, Etil Asetat, dan Etanol Menggunakan Alat Spektrofotometer UV-Vis

