

**UJI AKTIVITAS ANTIOKSIDAN FRAKSI-FRAKSI HASIL PEMISAHAN
EKSTRAK ETIL ASETAT KELOPAK BUNGA ROSELLA
(*HIBISCUS SABDARIFFA*) DENGAN METODE PENANGKAP RADIKAL
DPPH (2,2-DIFENIL-1-PIKRILHIDRAZIL)**

Skripsi
untuk memenuhi sebagian persyaratan
mencapai derajat S-1

Program Studi Kimia



diajukan oleh:

Abdul Gani Wijaya
07630006

**PROGRAM STUDI KIMIA
FAKULTAS SAINS DAN TEKNOLOGI
UNIVERSITAS ISLAM NEGERI SUNAN KALIJAGA
YOGYAKARTA
2011**



SURAT PERSETUJUAN SKRIPSI/TUGAS AKHIR

Hal : Persetujuan Skripsi/Tugas Akhir

Lamp :

Kepada

Yth. Dekan Fakultas Sains dan Teknologi

UIN Sunan Kalijaga Yogyakarta

di Yogyakarta

Assalamu'alaikum wr. wb.

Setelah membaca, meneliti, memberikan petunjuk dan mengoreksi serta mengadakan perbaikan seperlunya, maka kami selaku pembimbing berpendapat bahwa skripsi Saudara:

Nama : Abdul Gani Wijaya

NIM : 07630006

Judul Skripsi : **UJI AKTIVITAS ANTIOKSIDAN FRAKSI-FRAKSI HASIL PEMISAHAN
EKSTRAK ETIL ASETAT KELOPAK BUNGA ROSELLA (*HIBISCUS
SABDARIFFA*) DENGAN METODE DPPH (2,2-DIFENIL-1-PIKRILHIDRAZIL)**

sudah dapat diajukan kembali kepada Program Studi kimia Fakultas Sains dan Teknologi UIN Sunan Kalijaga Yogyakarta sebagai salah satu syarat untuk memperoleh gelar Sarjana Strata Satu dalam bidang kimia.

Dengan ini kami berharap agar skripsi/tugas akhir Saudara tersebut di atas dapat segera dimunaqsyahkan. Atas perhatiannya kami ucapkan terima kasih.

Yogyakarta, 09 Juni 2011

Pembimbing

Esti Wahyu Widowati, M.Si

NIP. 19760830 200312 2 001

SURAT PERSETUJUAN SKRIPSI/TUGAS AKHIR

Hal : NOTA DINAS KONSULTAN SKRIPSI

Lamp :

Kepada

Yth. Dekan Fakultas Sains dan Teknologi

UIN Sunan Kalijaga Yogyakarta

di Yogyakarta

Assalamu'alaikum wr. wb.

Setelah membaca, meneliti, memberikan petunjuk dan mengoreksi serta mengadakan perbaikan seperlunya, maka kami selaku konsultan berpendapat bahwa skripsi Saudara:

Nama : Abdul Gani Wijaya

NIM : 07630006

Judul Skripsi : **UJI AKTIVITAS ANTIOKSIDAN FRAKSI-FRAKSI HASIL PEMISAHAN**

EKSTRAK ETIL ASETAT KELOPAK BUNGA ROSELLA (*HIBISCUS*

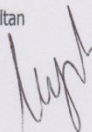
***SABDARIFFA*) DENGAN METODE DPPH (2,2-DIFENIL-1-PIKRILHIDRAZIL)**

sudah dapat diajukan kembali kepada Program Studi kimia Fakultas Sains dan Teknologi UIN Sunan Kalijaga Yogyakarta sebagai salah satu syarat untuk memperoleh gelar Sarjana Strata Satu dalam bidang Kimia.

Wassalamu'alaikum wr. wb

Yogyakarta, 04 Juli 2011

Konsultan



Maya Rahmayanti, M.Si

NIP. 19810627 200604 2 003

SURAT PERSETUJUAN SKRIPSI/TUGAS AKHIR

Hal : NOTA DINAS KONSULTAN SKRIPSI

Lamp :

Kepada

Yth. Dekan Fakultas Sains dan Teknologi

UIN Sunan Kalijaga Yogyakarta

di Yogyakarta

Assalamu'alaikum wr. wb.

Setelah membaca, meneliti, memberikan petunjuk dan mengoreksi serta mengadakan perbaikan seperlunya, maka kami selaku konsultan berpendapat bahwa skripsi Saudara:

Nama : Abdul Gani Wijaya

NIM : 07630006

Judul Skripsi : **UJI AKTIVITAS ANTIOKSIDAN FRAKSI-FRAKSI HASIL PEMISAHAN
EKSTRAK ETIL ASETAT KELOPAK BUNGA ROSELLA (*HIBISCUS
SABDARIFFA*) DENGAN METODE DPPH (2,2-DIFENIL-1-PIKRILHIDRAZIL)**

sudah dapat diajukan kembali kepada Program Studi kimia Fakultas Sains dan Teknologi UIN Sunan Kalijaga Yogyakarta sebagai salah satu syarat untuk memperoleh gelar Sarjana Strata Satu dalam bidang Kimia.

Wassalamu'alaikum wr. wb

Yogyakarta, 04 Juli 2011

Konsultan



Khamidinal, M.Si.

NIP. 19691104 200003 1 002

SURAT PERNYATAAN KEASLIAN SKRIPSI

Saya yang bertanda tangan dibawah ini

Nama : Abdul Gani Wijaya
NIM : 07630006
Program Studi : Kimia
Fakultas : Sains dan Teknologi

Menyatakan bahwa Skripsi saya yang berjudul:

Uji Aktivitas Antioksidan Fraksi-Fraksi Hasil Pemisahan Ekstrak Etil Asetat Kelopak Bunga Rosella (*Hibiscus Sabdariffa*) dengan Metode Penangkap Radikal DPPH (2,2-difenil-1-pikrilhidrazil).

merupakan hasil penelitian saya sendiri dan bukan duplikasi ataupun saduran dari karya orang lain kecuali pada bagian yang secara tertulis diacu dalam naskah ini dan disebutkan dalam daftar pustaka.

Apabila dikemudian hari terbukti adanya penyimpangan dalam karya ini maka tanggung jawab sepenuhnya ada pada penulis.

Yogyakarta, 09 Juni 2011

Penulis,



Abdul Gani Wijaya
NIM. 07630006



Universitas Islam Negeri Sunan Kalijaga

FM-UINSK-BM-05-07/R0

PENGESAHAN SKRIPSI/TUGAS AKHIR

Nomor : UIN.02/D.ST/PP.01.1/1254/2011

Skrripsi/Tugas Akhir dengan judul : Uji Aktivitas Antioksidan Fraksi-Fraksi Hasil Pemisahan Ekstrak Etil Asetat Kelopak Bunga Rosella (*Hibiscus Sabdariffa*) dengan Metode Penangkap Radikal DPPH (2,2-difenil-1-pikrilhidrazil).

Yang dipersiapkan dan disusun oleh :
Nama : Abdul Gani Wijaya
NIM : 07630006
Telah dimunaqasyahkan pada : 27 Juli 2011
Nilai Munaqasyah : A -

Dan dinyatakan telah diterima oleh Fakultas Sains dan Teknologi UIN Sunan Kalijaga

TIM MUNAQASYAH :

Ketua Sidang

Esti Wahyu Widowati, M.Si, M.Biotech
NIP. 19760830 200312 2 001

Penguji I

Maya Rahmayanti, M.Si
NIP.19810627 200604 2 003

Penguji II

Khamidinal, M.Si
NIP. 19691104 200003 1 002

Yogyakarta, 5 Juli 2011

UIN Sunan Kalijaga
Fakultas Sains dan Teknologi
Bekas



Prof. Drs. H. Akh. Minhaji, M.A, Ph.D
NIP. 19580919 198603 1 002

MOTTO

"Hai orang-orang yang beriman, hendaklah kamu menjadi orang-orang yang selalu menegakkan (kebenaran) karena Allah, menjadi saksi yang adil. Dan janganlah sekali-kali kebencianmu terhadap suatu kaum mendorong kamu untuk bersikap tidak adil. Bersikap adillah karena adil itu lebih dekat kepada takwa. Dan bertakwalah kepada Allah, sesungguhnya Allah Maha Mengetahui apa yang kamu kerjakan"

(Q. S. Al-Maidah:8)

Jadilah bagian dari perubahan yang ingin kamu saksikan di dunia ini

(Mahatma Gandhi)

Jangan nakal disana ya nak karena sudah tidak ada yang bisa dijual disini

(Sunarti)

HALAMAN PERSEMBAHAN

Kupersembahkan karya ini untuk:

Bapak dan mamaku tersayang

Kakak dan adikku

almamaterku...

KATA PENGANTAR

Puji syukur penulis panjatkan kehadirat Allah SWT atas limpahan rahmat dan hidayahNya sehingga penulis diberi kemudahan dalam menjalankan kewajiban menuntut ilmu dan dapat menyelesaikan tugas akhir ini tepat waktu. Shalawat serta salam semoga tercurah kepada Nabi Muhammad SAW beserta keluarga dan kita semua selaku pengikut yang setia.

Penulis menyadari bahwa dalam penyusunan skripsi ini tidak mungkin tersusun tanpa adanya kerjasama dan bantuan dari berbagai pihak. Oleh karena itu, pada kesempatan ini penulis menyampaikan terima kasih kepada:

1. Prof. Drs. H. Akh. Minhaji, M.A, Ph.D., selaku Dekan Fakultas Sains dan Teknologi UIN Sunan Kalijaga Yogyakarta.
2. Esti Wahyu Widowati, M.Si., selaku Ketua Progam Studi Kimia dan pembimbing skripsi yang dengan sabar meluangkan waktunya dalam membantu, membimbing, mengarahkan dan memberikan dorongan semangat dalam penelitian maupun penyusunan skripsi ini.
3. Maya Rahmawati, M.Si., selaku dosen pembimbing akademik yang selalu memberikan masukan dalam setiap kesempatan.
4. Pak Wijayanto dan pak Indra selaku laboran Laboratorium Kimia Universitas Islam Negeri Sunan Kalijaga Yogyakarta yang selalu sabar membagi pengetahuan dan pengarahan selama melakukan penelitian.
5. Seluruh staf Dosen Program Studi Kimia Fakultas SAINS dan Teknologi Universitas Islam Negeri.

6. Bapak Parman Wijaya dan Ibu Sunarti selaku orang tuaku tersayang yang telah memberikan kekuatan, kemampuan, doa, kesabaran dan kasih sayang yang tak pernah habis untukku, semoga setiap keringat, air mata yang telah dicurahkan untukku mendapatkan janji yang pasti dari-Nya.
7. Rekan seperjuanganku Andika, Dika, Wiwik, Arin, mbak Linda, mbak Yanti, Aziz, Indri, Rusdi, Mas Alfi, Mas Kholis dan adik-adikku di BEM-PS Kimia. Terima kasih atas bantuannya selama ini.
8. Semua pihak yang telah membantu dalam penyusunan skripsi ini yang tidak dapat penulis sebutkan satu per satu.

Semoga Allah SWT memberikan balasan yang lebih baik atas semua kebaikan yang telah diberikan kepada penulis. Akhirnya hanya kepada Allah SWT penulis mohon ampun atas segala kekurangan dalam penulisan skripsi ini dan semoga bermanfaat bagi penulis khususnya dan bagi pembaca umumnya.

Yogyakarta, 09 Juni 2011

Penyusun,

Abdul Gani Wijaya
NIM. 07630006

DAFTAR ISI

HALAMAN JUDUL	I
HALAMAN PERSETUJUAN	II
HALAMAN NOTA DINAS KONSULTAN	III
HALAMAN PERNYATAAN KEASLIAN	V
HALAMAN PENGESAHAN	VI
HALAMAN MOTTO	VII
HALAMAN PERSEMBAHAN	VIII
KATA PENGANTAR	IX
DAFTAR ISI	XI
DAFTAR TABEL	XIV
DAFTAR GAMBAR	XV
DAFTAR LAMPIRAN	XVI
ABSTRAKSI.....	XVII
BAB I . PENDAHULUAN	
A. Latar Belakang Masalah.....	1
B. Rumusan Masalah	3
C. Tujuan Penelitian	4
D. Manfaat Penelitian	4
BAB II. TINJAUAN PUSTAKA DAN DASAR TEORI	
A. Tinjauan Pustaka	5
B. Dasar Teori	6

1. Deskripsi Tumbuhan Rosella	7
2. Metabolit Sekunder	8
a. Alkaloid	9
b. Flavonoid	11
c. Fenilpropanoid	12
d. Steroid dan triterpenoid	12
3. Ekstraksi Metabolit Sekunder	13
4. Fraksinasi	14
5. Skrining Fitokimia	18
6. Radikal Bebas	20
7. Senyawa Antioksidan	21
8. Pengukuran Aktivitas Antioksidan	22
9. Spektrofotometer UV-Vis	25

BAB III. METODOLOGI PENELITIAN

A. Waktu dan Tempat Penelitian	27
B. Alat dan Bahan Penelitian	27
C. Prosedur Penelitian	28

BAB IV. PEMBAHASAN

A. Penyiapan Fraksi Uji	31
B. Profiling Metabolit Sekunder secara Densitometri	35
C. Skrining Fitokimia	37
D. Uji Aktivitas Antioksidan	40

BAB V. KESIMPULAN DAN SARAN

A. Kesimpulan 46

B. Saran 46

DAFTAR PUSTAKA 47

LAMPIRAN 49



DAFTAR TABEL

Tabel 1. Kandungan gizi kelopak dan daun segar tumbuhan Rosella.....	8
Tabel 2. Hasil uji pendahuluan ekstrak etil asetat kelopak bunga Rosella	32
Tabel 3. Perbandingan volume eluen yang digunakan untuk mengelusi ekstrak etil asetat kelopak bunga Rosella.....	34
Tabel 4. Hasil penggabungan fraksi-fraksi hasil pemisahan ekstrak etil asetat kelopak bunga Rosella	35
Tabel 5. Harga Rf fraksi-fraksi hasil pemisahan ekstrak etil asetat kelopak bunga Rosella secara KLT-Densitometri.....	36
Tabel 6. Fase gerak yang digunakan untuk skrining fitokimia	37
Tabel 7. Harga Rf fraksi-fraksi hasil pemisahan ekstrak etil asetat kelopak bunga Rosella dengan preaksi Dragendroff.....	38
Tabel 8. Harga Rf fraksi-fraksi hasil pemisahan ekstrak etil asetat kelopak bunga Rosella dengan pereaksi besi (III) klorida 1%	39
Tabel 9. Hasil pengujian metabolit sekunder dalam fraksi-fraksi hasil pemisahan ekstrak etil asetat kelopak bunga Rosella dengan pereaksi semprot.....	40
Tabel 10. Persen antiradikal fraksi-fraksi hasil pemisahan ekstrak etil asetat kelopak bunga Rosella	43
Tabel 11. Nilai IC ₅₀ dan EC ₅₀	43

DAFTAR GAMBAR

Gambar 1. Tumbuhan Rosella	7
Gambar 2. Senyawa alkaloid	10
Gambar 3. Senyawa N, N-dimetil triptamin	10
Gambar 4. Struktur Kafein	10
Gambar 5. Struktur dasar flavonoid	11
Gambar 6. Struktur senyawa flavon	12
Gambar 7. Senyawa fenilpropanoid	12
Gambar 8. Struktur senyawa DPPH radikal dan DPPH non radikal.....	23
Gambar 9. Mekanisme reaksi antara BHT dengan DPPH	24
Gambar 10. Reaksi asam tiobarbiturat (TBA) dengan Malonaldehida.....	25
Gambar 11. Transisi energi	25
Gambar 12. Profilling KLT	34
Gambar 13. Profil KLT-densitometri fraksi-fraksi hasil pemisahan ekstrak etil asetat kelopak bunga Rosella	36
Gambar 14. Kromatogram fraksi-fraksi hasil pemisahan ekstrak etil asetat kelopak bunga Rosella.....	38
Gambar 15. Mekanisme reaksi penangkapan radikal bebas DPPH.....	42
Gambar 16. Struktur resonansi dan pembentukan radikal fenol oleh DPPH	44
Gambar 17. Mekanisme reaksi penangkapan radikal DPPH oleh senyawa alkaloid dan vitamin C	45

DAFTAR LAMPIRAN

Lampiran 1. Perhitungan persen antiradikal	49
Lampiran 2. Perhitungan IC_{50} dan EC_{50}	51
Lampiran 3. Dokumentasi.....	54
Lampiran 4. Hasil Profilling Metabolit Sekunder.....	55



ABSTRAKSI

Uji Aktivitas Antioksidan Fraksi-Fraksi Hasil Pemisahan Ekstrak Etil Asetat Kelopak Bunga Rosella (*Hibiscus Sabdariffa* L) dengan Metode Penangkap Radikal DPPH (2,2 difenil -1-dipikrihidrazil)

Oleh

Abdul Gani Wijaya

Nim:07630006

Dosen pembimbing: Esti Wahyu Widowati, M.Si.

Rosella (*Hibiscus Sabdariffa* L.) merupakan salah satu jenis tumbuhan dari keluarga *malvaceae* yang diketahui memiliki berbagai khasiat untuk pengobatan termasuk sebagai antioksidan. Potensi ekstrak kelopak bunga Rosella sebagai antioksidan perlu dikaji lebih lanjut terutama untuk mengetahui metabolit sekunder fraksi-fraksi hasil pemisahan ekstrak etil asetat kelopak bunga Rosella (*Hibiscus Sabdariffa* L) yang mempunyai aktivitas antioksidan.

Penelitian ini diawali dengan fraksinasi terhadap ekstrak etil asetat kelopak bunga Rosella dengan kromatografi cair vakum (KCV). Hasil fraksinasi ekstrak etil asetat kelopak bunga Rosella kemudian diuji aktivitasnya dengan metode penangkap radikal DPPH (2,2 difenil -1-dipikrihidrazil). Skrining fitokimia terhadap fraksi-fraksi hasil pemisahan ekstrak etil asetat kelopak bunga Rosella dilakukan untuk mengetahui metabolit sekunder yang berpotensi sebagai antioksidan.

Fraksinasi ekstrak etil asetat kelopak bunga Rosella dengan kromatografi cair vakum menghasilkan 4 fraksi. Uji aktivitas antioksidan menunjukkan bahwa fraksi 1 ekstrak etil asetat kelopak bunga Rosella memiliki potensi sebagai antioksidan dengan $IC_{50} = 631,78$ ppm dan $EC_{50} = 15,79$. Hasil skrining fitokimia menunjukkan bahwa metabolit sekunder yang terdapat dalam fraksi-fraksi hasil pemisahan ekstrak etil asetat adalah golongan senyawa fenolik dan alkaloid. Kedua golongan senyawa tersebut diduga bertanggung jawab terhadap aktivitas antioksidan fraksi-fraksi tersebut.

Kata kunci: Rosella, fraksinasi, antioksidan, skrining fitokimia, kromatografi cair vakum, DPPH, IC_{50} dan EC_{50} .

BAB I

PENDAHULUAN

A. Latar Belakang Masalah

Tubuh manusia secara alami mengalami proses pembentukan radikal bebas sebagai hasil samping dari proses metabolisme (Cerutti, 1991). Radikal bebas termasuk senyawa oksigen reaktif (SOR) dan senyawa nitrogen reaktif (SNR) di dalam tubuh dapat menyebabkan penyakit degeneratif seperti neurodegeneratif, penuaan, dan kanker (Harman, 1994; Simonian dan Coyle, 1996). Senyawa oksigen reaktif yang diproduksi secara *in vivo* meliputi superoksida radikal (O_2^{\cdot}) dan hidrogen peroksida (H_2O_2) merupakan senyawa yang dapat menyebabkan oksidasi lipid dan kerusakan DNA di dalam sel (Halliwell and Aruoma, 1991).

Produksi SOR di dalam tubuh sebenarnya diimbangi oleh reaksi enzimatik yang merupakan sistem pertahanan terhadap radikal bebas (Ashrafal Alam *et al.*, 2009). Namun, peningkatan radikal bebas yang terbentuk akibat faktor stres, radiasi, dan zat pencemar mengakibatkan sistem pertahanan tersebut tidak memadai lagi sehingga untuk melindungi tubuh dari serangan radikal bebas diperlukan tambahan antioksidan dari luar (Soares *et al.*, 2007). Dengan adanya senyawa antioksidan maka proses oksidasi yang berlebihan dapat dihambat sehingga penyakit-penyakit yang diakibatkan oleh radikal bebas dapat dicegah (Barbaste, 2002).

Sistem pertahanan yang dilakukan oleh reaksi enzimatik yaitu dengan pemutusan reaksi pembentukan radikal bebas menggunakan antioksidan primer seperti enzim superoksida dismutase (SOD), katalase dan glutathion peroksidase (Blokina *et al.*, 2003). Selain itu, sistem pertahanan juga dapat dilakukan dengan cara pencegahan reaksi radikal bebas menggunakan antioksidan sekunder yang banyak ditemukan di dalam tumbuhan seperti vitamin C, vitamin E, β -karoten, flavonoid, isoflavon dan antosianin (Sies and Stahl, 1995).

Sistem pencegahan reaksi radikal bebas dapat diketahui melalui aktivitas antioksidan yang dihitung menggunakan metode penangkap radikal bebas seperti DPPH (*2,2-difenil-1-pikrilhidrazil*). DPPH merupakan radikal yang stabil dan banyak digunakan untuk mengetahui aktivitas antioksidan ekstrak tumbuhan (Brand williams *et al.*, 1995). Salah satu tumbuhan yang dilaporkan memiliki potensi sebagai antioksidan dalam *medicinal plants of the world* ialah bunga Rosella (*Hibiscus sabdariffa* Linn) (Ross, 2003).

Rosella (*Hibiscus sabdariffa* Linn) merupakan tumbuhan yang banyak dikonsumsi oleh masyarakat Indonesia sebagai minuman yang menyegarkan, sedangkan pemanfaatan lainnya masih terbatas sebagai bahan pewarna makanan dan kosmetik (Mazza and Miniati, 1993). Saat ini, Rosella diklaim dapat mencegah penyakit kanker, mencegah resiko stroke dan penyakit jantung, membantu membakar lemak, menurunkan tekanan darah, dan menjaga daya tahan tubuh (Omotuyi *et al.*, 2010).

Penelitian yang dilakukan untuk mengetahui aktivitas antioksidan dari berbagai macam ekstrak kelopak bunga Rosella telah dilakukan oleh Widowati (2010) yang menggunakan ekstrak *n*-heksana, etil asetat dan metanol. Hasil penelitian tersebut menunjukkan bahwa ketiga ekstrak kelopak bunga Rosella memiliki aktivitas sebagai antioksidan. Ekstrak metanol dan etil asetat dilaporkan memiliki aktivitas antioksidan yang lebih tinggi daripada ekstrak *n*-heksana. Penelitian lebih lanjut untuk mengetahui aktivitas antioksidan dari fraksi-fraksi hasil pemisahan ekstrak kelopak bunga Rosella telah dilakukan oleh Rabaina (2011) yang menggunakan ekstrak metanol kelopak bunga Rosella. Untuk mengeksplorasi aktivitas antioksidan kelopak bunga Rosella maka perlu dilakukan fraksinasi terhadap ekstrak etil asetat kelopak bunga Rosella sehingga dapat diketahui hubungan antara yang terdapat dalam fraksi-fraksi hasil pemisahan ekstrak etil asetat kelopak bunga Rosella terhadap aktivitas antioksidannya.

B. Rumusan masalah

Berdasarkan latar belakang di atas dapat dirumuskan berbagai masalah sebagai berikut:

1. Bagaimana aktivitas antioksidan dari fraksi-fraksi hasil pemisahan ekstrak etil asetat kelopak bunga Rosella (*Hibiscus sabdariffa* L).
2. Berapa IC_{50} dan EC_{50} yang diperoleh dari fraksi-fraksi hasil pemisahan ekstrak etil asetat kelopak bunga Rosella (*Hibiscus sabdariffa* L).
3. Bagaimana profil metabolit sekunder fraksi-fraksi hasil pemisahan ekstrak etil asetat kelopak bunga Rosella (*Hibiscus sabdariffa* L) yang dapat menangkap radikal bebas DPPH (2,2-difenil-1-pikrilhidrazil).

C. Tujuan penelitian

Tujuan penelitian ini adalah untuk:

1. Mengetahui potensi antioksidan dari fraksi-fraksi hasil pemisahan ekstrak etil asetat kelopak bunga Rosella (*Hibiscus sabdariffa* L).
2. Mengetahui IC_{50} dan EC_{50} yang diperoleh dari fraksi-fraksi hasil pemisahan ekstrak etil asetat kelopak bunga Rosella (*Hibiscus sabdariffa* L).
3. Memperoleh profil metabolit sekunder fraksi-fraksi hasil pemisahan ekstrak etil asetat kelopak bunga Rosella yang dapat menangkap radikal bebas DPPH (*2,2-difenil-1-pikrilhidrazil*).

D. Manfaat penelitian

Penelitian ini diharapkan dapat memberikan informasi dalam membantu peneliti lain untuk eksplorasi lebih lanjut mengenai senyawa antioksidan yang diperoleh dari bahan alam dan efek farmakologi dari kelopak bunga Rosella sehingga dapat dimanfaatkan secara maksimal sebagai sumber antioksidan alami.

BAB IV

PEMBAHASAN

Penelitian ini merupakan rangkaian dari beberapa tahapan penelitian eksplorasi metabolit sekunder yang terdapat dalam ekstrak kelopak bunga Rosella yang memiliki potensi sebagai sumber antioksidan alami. Dilaporkan pada penelitian sebelumnya (Widowati dkk., 2010) bahwa ekstrak etil asetat kelopak bunga Rosella cukup potensial dalam menghambat reaksi rantai dari radikal bebas ($IC_{50}=1111,48$ ppm) sehingga dalam penelitian ini dilakukan pemisahan lebih lanjut untuk mengetahui fraksi-fraksi hasil pemisahan ekstrak etil asetat kelopak bunga Rosella yang berperan sebagai antioksidan dan karakterisasi profil metabolit sekundernya.

A. Penyiapan Fraksi Uji

1. Uji Pendahuluan dengan Kromatografi Lapis Tipis (KLT)

Uji pendahuluan terhadap ekstrak etil asetat kelopak bunga Rosella (*Hibiscus sabdariffa* L.) dilakukan menggunakan metode Kromatografi Lapis Tipis (KLT) yang bertujuan untuk mengetahui eluen yang sesuai dengan sifat kelarutan senyawa yang akan dipisahkan. Metode ini digunakan karena tergolong sederhana dari segi alat dan bahan tetapi menunjukkan hasil pemisahan yang sempurna (Sastrohamidjojo, 2007). Teknik penentuan eluen mengacu pada Harborne (1987) dengan menggunakan sistem pelarut campuran dengan tingkat kepolaran yang berbeda sedangkan untuk perbandingan campuran dilakukan dengan coba-coba.

Proses pemisahan dilakukan dengan cara menotolkan ekstrak etil asetat kelopak bunga Rosella pada plat KLT menggunakan pipa kapiler. Totolan dibuat kecil dan bundar agar bercak yang dihasilkan tidak melebar. Bercak yang melebar akan menghasilkan pemisahan yang kurang sempurna. Selanjutnya, plat KLT tersebut diletakkan dalam *chamber* kromatografi yang telah dijenuhkan. Proses penjenuhan *chamber* bertujuan untuk memperkecil penguapan eluen sehingga proses elusi dapat berjalan dengan baik. Eluen yang digunakan dalam penelitian ini ialah campuran antara pelarut metanol, etil asetat dan *n*-heksana dengan perbandingan tertentu. Penggunaan eluen tersebut dianggap dapat mewakili tingkat kepolaran metabolit sekunder dalam ekstrak etil asetat kelopak bunga Rosella. Perbandingan pelarut yang digunakan dalam penelitian ini disajikan pada tabel 2.

Tabel 2. Hasil uji pendahuluan terhadap ekstrak etil asetat kelopak bunga Rosella dengan KLT menggunakan plat silika GF₂₅₄ yang diamati di bawah lampu UV pada $\lambda=254$ nm.

No	Pelarut	Perbandingan pelarut	Bercak yang terpisah	Rf
1	Etil asetat : Metanol	1 : 1	1	0.40
2	Etil asetat : Metanol	1 : 2	1	0.37
3	Etil asetat : Metanol	3 : 7	2	0.34 0.46
4	Etil asetat : Metanol	7 : 3	1	0.28
5	Etil asetat : <i>n</i> -Heksana	8 : 2	3	0.20 0.29 0.48
6	Etil asetat : <i>n</i> -Heksana	7 : 1	2	0.25 0.49
7	Etil asetat : <i>n</i> -Heksana	7 : 4	1	0.10
8	Etil asetat : <i>n</i> -Heksana	9 : 1	2	0.30 0.50

Berdasarkan data yang diperoleh dari uji pendahuluan dengan metode KLT terhadap ekstrak etil asetat kelopak bunga Rosella diketahui bahwa pemisahan yang terbaik terdapat pada pelarut campuran etil asetat : *n*-heksana (8:2) dengan bercak sebanyak 3 buah. Dengan demikian, campuran pelarut etil asetat : *n*-heksana dapat digunakan sebagai eluen pada kromatografi kolom.

2. Pemisahan dengan Kromatografi Cair Vakum (KCV)

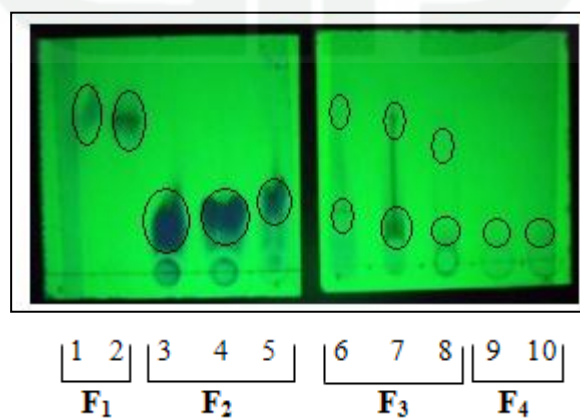
Pemisahan ekstrak etil asetat kelopak bunga Rosella dilakukan dengan metode kromatografi cair vakum (KCV) dengan elusi bergradien. Proses elusi bergradien dilakukan untuk meningkatkan resolusi campuran yang kompleks terutama jika ekstrak etil asetat kelopak bunga Rosella mempunyai kisaran polaritas yang luas (Gritter *et al.*, 1991). Metode pengemasan kolom dalam penelitian ini menggunakan teknik basah (*slurry packing*). Pada teknik basah, fase diam terlebih dahulu dibuat bubuk dengan pengelusi yang akan digunakan. Hal ini bertujuan untuk menghindari terbentuknya gelembung udara dan keretakan pada kemasan kolom yang mudah terbentuk apabila menggunakan teknik kering (*dry packing*). Gelembung udara dan keretakan kolom mengakibatkan terbentuknya rongga yang dapat mengakibatkan proses pemisahan tidak sempurna (Sarker *et al.*, 2006).

Volume eluen yang digunakan untuk mengelusi ekstrak etil asetat kelopak bunga Rosella dalam penelitian ini adalah 50 mL. Eluen dibuat bergradien dengan perbandingan tertentu. Hasil elusi dari ekstrak etil asetat kelopak bunga Rosella ditampung sebagai fraksi-fraksi. Eluen yang digunakan dan perbandingan campuran disajikan pada tabel 3.

Tabel 3. Perbandingan volume eluen yang digunakan untuk mengelusi ekstrak etil asetat kelopak bunga Rosella dalam kromatografi cair vakum.

No	Eluen	Perbandingan (%)
1	Etil asetat : <i>n</i> -Heksana	50:50
2	Etil asetat : <i>n</i> -Heksana	70:30
3	Etil asetat : <i>n</i> -Heksana	70:10
4	Etil asetat : <i>n</i> -Heksana	90:10
5	Etil asetat	100
6	Etil asetat : Metanol	70:30
7	Etil asetat : Metanol	50:50
8	Etil asetat : Metanol	30:70
9	Etil asetat : Metanol	10:90
10	Metanol	100

Fraaksinasi ekstrak etil asetat kelopak bunga Rosella menghasilkan 10 fraksi. Untuk mengetahui fraksi-fraksi hasil pemisahan ekstrak etil asetat kelopak bunga Rosella yang dapat digabungkan, dilakukan *profiling* dengan KLT. Fraksi yang mempunyai R_f sama kemudian dikelompokkan menjadi satu fraksi. Hasil *profiling* dengan KLT terhadap fraksi-fraksi hasil pemisahan ekstrak etil asetat kelopak bunga Rosella ditunjukkan pada gambar 12.



Gambar 12. Profilling KLT terhadap fraksi-fraksi hasil pemisahan ekstrak etil asetat kelopak bunga Rosella dengan menggunakan pelarut etil asetat:metanol (5:4) yang diamati dengan lampu UV 254nm.

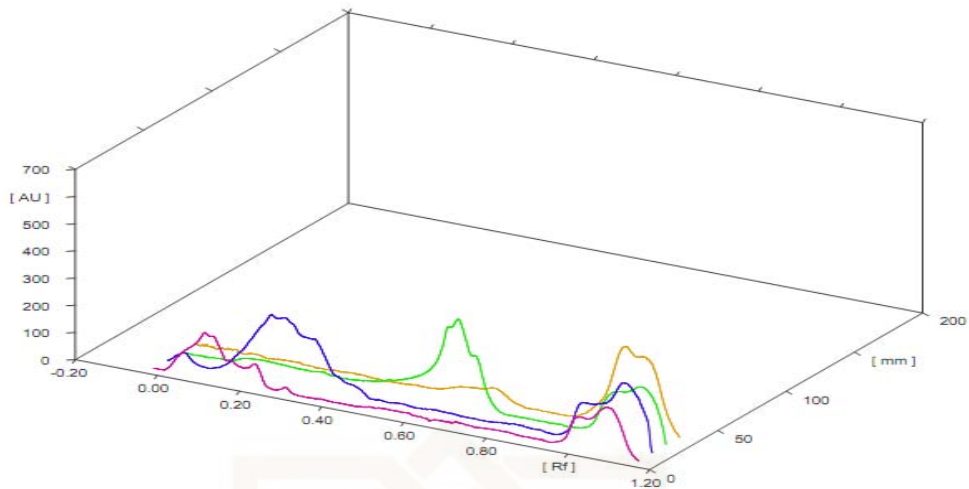
Hasil *profiling* dengan KLT terhadap fraksi-fraksi hasil pemisahan ekstrak etil asetat kelopak bunga Rosella menunjukkan fraksi-fraksi yang dapat digabungkan. Fraksi hasil penggabungan disajikan pada tabel 4.

Tabel 4. Hasil penggabungan fraksi-fraksi hasil pemisahan ekstrak etil asetat kelopak bunga Rosella.

No	Sebelum dikelompokkan	Setelah dikelompokkan	Rendemen (%)
1	Fraksi 1	F1	1,69
2	Fraksi 2		
3	Fraksi 3	F2	57,60
4	Fraksi 4		
5	Fraksi 5		
6	Fraksi 6	F3	10,76
7	Fraksi 7		
8	Fraksi 8		
9	Fraksi 9	F4	1,11
10	Fraksi 10		

B. Profiling Metabolit Sekunder secara KLT-Densitometri

KLT-densitometri dilakukan untuk mengetahui profil metabolit sekunder dari masing-masing fraksi hasil pemisahan ekstrak etil asetat kelopak bunga Rosella. Hal ini dilakukan dengan mengukur intensitas radiasi yang direfleksikan dari permukaan plat ketika disinari dengan lampu UV. Senyawa yang mampu menyerap sinar akan dicatat sebagai *peak* dalam *recorder* (Rohman, 2009). Gambar 13 menunjukkan profil metabolit sekunder yang diperoleh dari analisis KLT-densitometri.



Gambar 13. Profil KLT-densitometri fraksi-fraksi hasil pemisahan ekstrak etil asetat kelopak bunga Rosella. Fraksi 1 (■), fraksi 2 (■), fraksi 3 (■) dan fraksi 4 (■) dengan fase gerak *n*-Butanol : diklorometana (1:1)

Hasil analisis KLT-densitometri merupakan hasil pemisahan maksimal yang dapat diamati dari fraksi-fraksi etil asetat kelopak bunga Rosella karena alat ini lebih peka terhadap senyawa yang mengabsorpsi sinar UV. Berbeda dengan KLT yang diamati di bawah lampu UV dimana senyawa yang diperoleh merupakan senyawa minimal yang dapat diamati karena keterbatasan indra penglihatan. Secara umum, penyebaran metabolit sekunder yang terdapat dalam fraksi-fraksi hasil pemisahan ekstrak etil asetat ditunjukkan pada tabel 5.

Tabel 5. Harga Rf senyawa yang menunjukkan penyebaran metabolit sekunder di dalam fraksi-fraksi hasil pemisahan ekstrak etil asetat kelopak bunga Rosella secara KLT-densitometri.

No	Sampel	Rf
1	Fraksi 1	0,58
		0,85
2	Fraksi 2	0,54
		0,91
3	Fraksi 3	0,008
		0,18
		0,90
4	Fraksi 4	0,08
		0,18
		0,24
		0,90

C. Skrining Fitokimia

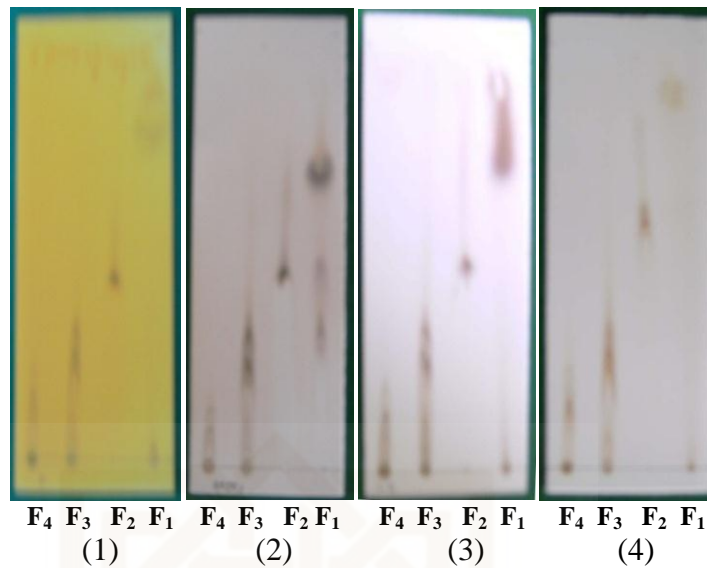
Skrining fitokimia dilakukan untuk mengetahui kandungan metabolit sekunder dalam fraksi-fraksi hasil pemisahan ekstrak etil asetat kelopak bunga Rosella. Uji kualitatif golongan senyawa tersebut dilakukan menggunakan metode KLT dengan pereaksi semprot sesuai prosedur pada Harborne (1987).

Skrining fitokimia yang dilakukan pada penelitian ini meliputi uji senyawa alkaloid, fenolik, steroid/terpenoid dan antrakuinon. Fase gerak yang digunakan dalam metode KLT disajikan pada tabel 6.

Tabel 6. Fase gerak yang digunakan untuk mengelusi fraksi-fraksi hasil pemisahan ekstrak etil asetat kelopak bunga rosella yang akan di skrining fitokimia.

No	Fase Gerak	Perbandingan	Hasil Pemisahan
1	Etil Asetat : Metanol	1:1	+
2	Etil Asetat : Metanol	3:2	++
3	Etil Asetat : Metanol	4:1	++
4	Etil Asetat : Butanol	1:1	++
5	Etil Asetat : Aseton	1:1	+
6	Kloroform : Metanol	1:1	++
7	Kloroform : Etanol	1:1	++
8	Kloroform : Butanol	1:1	+++
9	Kloroform : Butanol	2:1	+++
10	Kloroform : Butanol	4:3	++
11	Diklorometana : Butanol	1:1	++++
12	Diklorometana : Butanol	2:1	+++

Penentuan fase gerak untuk skrining fitokimia fraksi-fraksi hasil pemisahan ekstrak etil asetat kelopak bunga Rosella menunjukkan bahwa fase gerak yang paling baik yaitu *n*-Butanol : diklorometana (1:1). Hasil skrining fitokimia dari fraksi-fraksi hasil pemisahan ekstrak etil asetat kelopak bunga Rosella disajikan pada gambar 14.



Gambar 14. Kromatogram fraksi-fraksi hasil pemisahan ekstrak etil asetat kelopak bunga Rosella setelah disemprot (1) Dragendroff (2) FeCl_3 1% (3) Liebermann-Burchard (4) KOH-etanolik dengan fase gerak *n*-Butanol : diklorometana (1:1).

1. Uji senyawa alkaloid

Pereaksi yang digunakan untuk mendeteksi senyawa alkaloid dalam penelitian ini ialah pereaksi Dragendroff. Hasil pengujian menunjukkan adanya bercak merah pada setiap fraksi sehingga dapat disimpulkan bahwa di dalam fraksi-fraksi hasil pemisahan ekstrak etil asetat terdapat golongan alkaloid. Penyebaran senyawa alkaloid dalam ke-4 fraksi disajikan pada tabel 7.

Tabel 7. Harga Rf yang menunjukkan adanya senyawa alkaloid di dalam fraksi-fraksi hasil pemisahan ekstrak etil asetat kelopak bunga Rosella dengan preaksi Dragendroff.

No	Fraksi	Rf
1	F1	0,61
2	F2	0,36
3	F3	0,45
4	F4	0,56

2. Uji senyawa fenolik

Pengujian golongan fenolik di dalam fraksi-fraksi hasil pemisahan ekstrak etil asetat kelopak bunga Rosella dilakukan dengan pereaksi besi (III) klorida 1% (dalam air). Hasil pengujian menunjukkan bahwa dalam setiap fraksi hasil pemisahan ekstrak etil asetat kelopak bunga Rosella terdapat golongan senyawa fenolik yang ditunjukkan dengan adanya bercak warna ungu pada setiap fraksi. Penyebaran senyawa fenolik dalam fraksi-fraksi hasil pemisahan ekstrak etil asetat kelopak bunga Rosella disajikan pada tabel 8.

Tabel 8. Harga Rf yang menunjukkan adanya senyawa fenolik di dalam fraksi-fraksi hasil pemisahan ekstrak etil asetat kelopak bunga Rosella dengan pereaksi besi (III) klorida 1%.

No	Fraksi	Rf
1	F1	0.85
2	F2	0.71
3	F3	0.68
4	F4	0.34

3. Uji senyawa steroid dan terpenoid

Pengujian golongan steroid dan terpenoid terhadap fraksi-fraksi hasil pemisahan ekstrak etil asetat kelopak bunga Rosella dilakukan dengan pereaksi semprot *Liebermann-Burchard* (LB). Hasil pengujian menunjukkan bahwa di dalam fraksi etil asetat kelopak bunga Rosella tidak terdapat senyawa golongan steroid dan terpenoid. Hal ini ditandai dengan tidak ditemukannya warna biru-ungu setelah masing-masing fraksi disemprot dengan pereaksi LB.

4. Uji senyawa antrakuinon

Uji senyawa antrakuinon dalam sampel dilakukan dengan pereaksi semprot KOH-etanolik. Hasil pengujian menunjukkan bahwa dalam masing-masing fraksi hasil pemisahan ekstrak etil asetat tidak terdapat senyawa golongan antrakuinon. Hal ini ditandai dengan tidak ditemukan adanya pembentukan warna kuning pada masing-masing fraksi. Hasil pengujian metabolit sekunder yang terdapat pada fraksi-fraksi hasil pemisahan ekstrak etil asetat kelopak bunga Rosella disajikan pada tabel 9.

Tabel 9. Hasil pengujian metabolit sekunder dalam fraksi-fraksi hasil pemisahan ekstrak etil asetat kelopak bunga Rosella dengan pereaksi semprot.

Golongan	Hasil pemisahan ekstrak etil asetat kelopak bunga Rosella			
	Fraksi 1	Fraksi 2	Fraksi 3	Fraksi 4
Alkaloid	+	+	+	+
Fenolik	+	+	+	+
Steroid/Terpenoid	-	-	-	-
Antraquinon	-	-	-	-

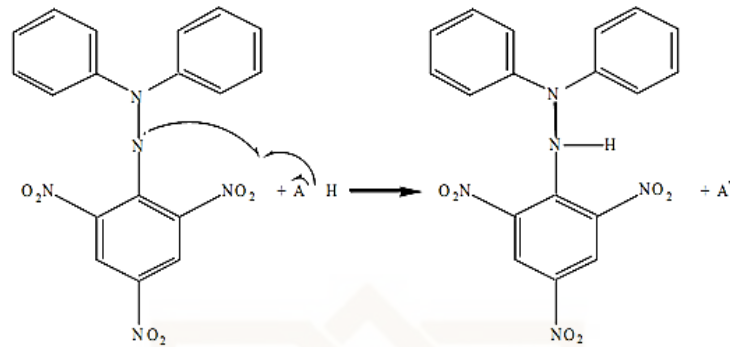
D. Uji Antioksidan

Antioksidan merupakan kemampuan suatu senyawa untuk menghambat reaksi oksidasi yang dapat dinyatakan dengan persen penghambatan. Parameter yang digunakan adalah *efficient concentration* (EC_{50}) dan *inhibition concentration* (IC_{50}) yaitu konsentrasi fraksi yang mampu menangkap radikal bebas sebesar 50% (Prakash, 2001). Semakin kecil EC_{50} dan IC_{50} , maka semakin potensial suatu fraksi sebagai antioksidan.

Pengujian antioksidan fraksi-fraksi hasil pemisahan ekstrak etil asetat kelopak bunga Rosella dilakukan dengan metode penangkap radikal DPPH (2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl). DPPH merupakan radikal sintetik yang stabil yang ditandai oleh delokalisasi cadangan elektron di sekeliling molekulnya secara keseluruhan dengan baik sehingga tidak akan membentuk dimer seperti yang terjadi pada kebanyakan radikal bebas lainnya (Pisoschi, 2009). Senyawa ini mudah larut dalam pelarut polar seperti metanol dan etanol dan mempunyai intensitas warna ungu yang dapat diukur pada panjang gelombang 517 nm (Pokorny *et al.*, 2001).

Interaksi antara antioksidan dengan DPPH dapat berupa transfer elektron atau donor hidrogen, kedua interaksi tersebut akan menetralkan karakter radikal bebas dari DPPH. Pengujian antioksidan fraksi-fraksi hasil pemisahan ekstrak etil asetat kelopak bunga Rosella diawali dengan penentuan panjang gelombang maksimum (λ_{maks}) DPPH menggunakan spektrometri UV-Vis. Nilai λ_{maks} yang diperoleh dalam pengukuran DPPH (40 ppm dalam metanol) pada penelitian ini adalah 515 nm. Vitamin C dipilih sebagai kontrol positif dalam penelitian ini karena mempunyai antioksidan yang tinggi (Prakash, 2001). antioksidan dari fraksi-fraksi hasil pemisahan ekstrak etil asetat kelopak bunga Rosella ditandai dengan perubahan warna pada larutan DPPH yang semula berwarna ungu menjadi kuning. Perubahan warna ini terjadi akibat DPPH tereduksi menjadi DPPH-H karena adanya donor atom hidrogen (*hydrogen atom transfer*) dari senyawa hidroksil (Marxen *et al.*, 2007) yang diduga terdapat dalam masing-masing fraksi hasil

pemisahan ekstrak etil asetat kelopak bunga Rosella kepada DPPH. Mekanisme reaksi antara antoksidan dan DPPH disajikan pada gambar 15.



Gambar 15. Mekanisme reaksi penangkapan radikal bebas DPPH melalui donor atom hidrogen

Penambahan antioksidan akan menurunkan konsentrasi DPPH yang menyebabkan absorbansinya lebih rendah jika dibandingkan dengan absorbansi kontrol negatif. Absorbansi kontrol negatif merupakan absorbansi DPPH dalam larutan yang tidak ditangkap oleh senyawa uji saat penambahan senyawa antioksidan kedalam larutan DPPH.

Pada penelitian ini, penambahan fraksi-fraksi etil asetat kelopak bunga Rosella menurunkan intensitas warna ungu dari DPPH menjadi kuning. Hal ini menunjukkan bahwa fraksi-fraksi hasil pemisahan ekstrak etil asetat kelopak bunga Rosella memiliki potensi dalam menangkap radikal DPPH. Penurunan intensitas warna tersebut kemudian diukur dengan spektrofotometer dan absorbansi yang diperoleh digunakan untuk menghitung persen antiradikal. Hasil perhitungan yang menunjukkan persen antiradikal dari fraksi-fraksi hasil pemisahan ekstrak etil asetat kelopak bunga Rosella disajikan dalam tabel 10, Sedangkan perhitungan lengkapnya disajikan pada lampiran 2 halaman 48.

Tabel 10. Persen antiradikal fraksi-fraksi hasil pemisahan ekstrak etil asetat kelopak bunga Rosella yang diukur pada konsentrasi 100 ppm hingga 500 ppm.

No	Konsentrasi (ppm)	% antiradikal			
		F1	F2	F3	F4
1	500	42,5243	8,7379	36,6990	20,8738
2	250	29,9029	4,3689	28,9320	14,0777
3	200	26,0194	5,3398	26,0194	11,6505
4	150	23,3010	2,4272	19,9029	11,1650
5	100	19,4175	3,3981	21,7476	8,2524

Besarnya antioksidan ditandai dengan nilai IC_{50} , yaitu konsentrasi fraksi yang dapat menghambat 50 % radikal bebas. IC_{50} dan EC_{50} fraksi-fraksi hasil pemisahan ekstrak etil asetat kelopak bunga Rosella disajikan dalam tabel 11. Perhitungan nilai IC_{50} dan EC_{50} disajikan pada lampiran 3 halaman 48.

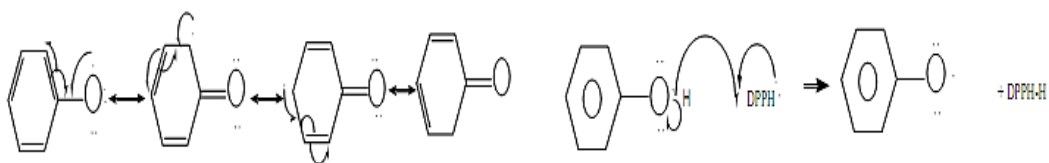
Tabel 11. Nilai IC_{50} dan EC_{50} dari fraksi-fraksi hasil pemisahan ekstrak etil asetat dan vitamin C

No	Sampel	IC_{50}	EC_{50}
1	Fraksi 1	631,78 ppm	15,79
2	Fraksi 2	3473,5 ppm	86,83
3	Fraksi 3	828,25 ppm	20,71
4	Fraksi 4	1469,17 ppm	36,73
5	Vitamin C	26,53 ppm	0,664

Fraksi 1 hasil pemisahan ekstrak etil asetat kelopak bunga Rosella memiliki antioksidan lebih tinggi jika dibandingkan dengan antioksidan *crude extract* etil asetat kelopak bunga Rosella ($IC_{50}=1111,48$ ppm). Namun, antioksidan fraksi-fraksi hasil pemisahan ekstrak etil asetat kelopak bunga Rosella secara keseluruhan masih di bawah antioksidan vitamin C yakni sebesar 26,54 ppm.

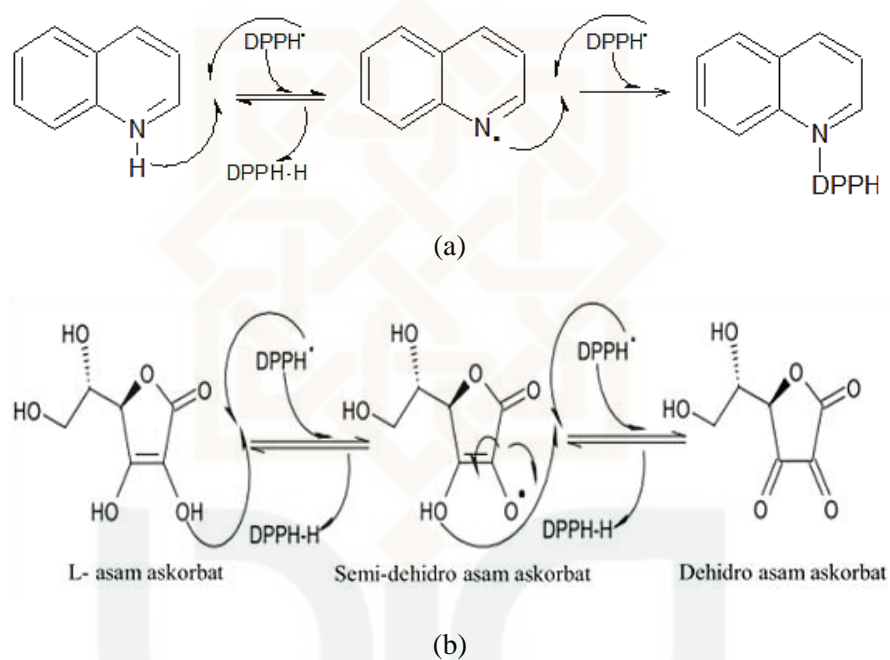
Ada beberapa hal yang mempengaruhi kekuatan penangkapan radikal oleh senyawa antioksidan. Simic (2007) melaporkan bahwa kekuatan penangkapan radikal oleh suatu senyawa antioksidan dipengaruhi oleh potensial reduksi senyawa tersebut. Semakin kecil nilai potensial reduksi dari suatu senyawa maka semakin aktif senyawa tersebut sebagai penangkap radikal karena dengan mudah bertindak sebagai reduktor. Vitamin C memiliki nilai potensial reduksi yang kecil (0,166 V) sehingga lebih mudah mereduksi radikal bebas jika dibandingkan dengan beberapa senyawa fenolik seperti *caffeic acid* (0,45 V). Struktur senyawa juga mempengaruhi antioksidan. Delokalisasi elektron melalui resonansi pada struktur radikal antioksidan mencegah radikal baru terbentuk sehingga menghambat reaksi berantai dari radikal bebas (Cholisoh dan Utami, 2008). Data skrining fitokimia menunjukkan bahwa fraksi-fraksi hasil pemisahan ekstrak etil asetat kelopak bunga *Rosella* memiliki kandungan senyawa fenolik dan alkaloid. Dua golongan metabolit tersebut dapat menyediakan donor elektron sehingga dapat menangkap radikal bebas.

Senyawa fenolik mempunyai gugus $-OH$ yang terikat pada karbon cincin aromatik. Produk radikal bebas yang terbentuk pada senyawa fenolik akan terstabilkan oleh resonansi sehingga dapat berfungsi sebagai antioksidan yang efektif (Fessenden dan Fessenden, 1994). Struktur resonansi dan pembentukan radikal bebas fenol disajikan pada gambar 16.



Gambar 16. Struktur resonansi dan pembentukan radikal fenol oleh DPPH

Delokalisasi elektron pada senyawa fenol dan alkaloid hanya dapat terjadi satu kali, berbeda dengan vitamin C yang dapat dua kali mengalami delokalisasi elektron (Cholisoh dan Utami, 2008). Hal ini mengakibatkan vitamin C dapat menangkap radikal bebas lebih banyak lebih banyak dibandingkan senyawa fenolik dan alkaloid. Mekanisme reaksi penangkapan radikal DPPH oleh senyawa alkaloid dan vitamin C disajikan pada gambar 17.



Gambar 17. Mekanisme reaksi penangkapan radikal DPPH (a) oleh senyawa alkaloid (Kuinalin) (b) oleh vitamin C.

BAB V

PENUTUP

A. KESIMPULAN

1. Fraksi-fraksi hasil pemisahan ekstrak etil asetat kelopak bunga Rosella (*Hibiscus sabdariffa* L) memiliki aktivitas sebagai antioksidan karena dapat menangkap radikal DPPH (*2,2-difenil-1-pikrilhidrazil*).
2. Fraksi 1 memiliki IC₅₀ sebesar 631,78 ppm dan EC₅₀ sebesar 15,79. Fraksi 2 memiliki IC₅₀ sebesar 3473,5 ppm dan EC₅₀ sebesar 86,83. Fraksi 3 memiliki IC₅₀ sebesar 828,25 ppm dan EC₅₀ sebesar 20,71. Fraksi 4 memiliki IC₅₀ sebesar 1469,17 ppm dan EC₅₀ sebesar 36,73.
3. Metabolit sekunder yang terdapat dalam fraksi-fraksi hasil pemisahan ekstrak etil asetat kelopak bunga Rosella yang dapat menangkap radikal bebas DPPH (*2,2-difenil-1-pikrilhidrazil*) yaitu senyawa fenolik dan alkaloid.

B. SARAN

1. Perlu dilakukan isolasi dan karakterisasi terhadap senyawa yang terdapat pada fraksi-fraksi hasil pemisahan ekstrak etil asetat kelopak bunga Rosella.
2. Perlu dilakukan pengujian aktivitas antioksidan menggunakan metode lain sebagai pembanding.

DAFTAR PUSTAKA

- Ali Aberoumand and S.S. Deokule. 2008. *Comparison of Phenolic Compounds of Some Edible Plants of Iran and India*. Pakistan Journal of Nutrition 7 (4): 582-585.
- Amarowicz, R., Naczki, M., and Shahidi, F., 2000, *Antioxidant Activity of Crude Tannins of Canola and Rapeseed Hulls*, JAOCS, 77, 957-961.
- Prakash, Aruna, 2001, *Antioxidant Activity*, Medallion Laboratories, Analytical Progress, Volume 19, Number 2.
- Ashrafal Alam, M. et al, 2009. *Antioxidant Potential of the Ethanol Extract of the Leaves of Vitex Negundo L*. Turk J. Pharm. Sci. 6 (1), 11-20.
- Bassett, J., dkk. 1994, Pudjaatmaka Hadyana Dr.A dan Setiono, Ir. L (Alih Bahasa) *Buku Ajar Vogel Kimia Analisis Kuantitatif Anorganik*, Jakarta: Penerbit Buku kedokteran EGC.
- Bondet, W. Brand-Williams and C. Berset (1997), *Kinetics and Mechanisms of Antioxidant Activity using the DPPH• Free Radical Method*. Laboratoire de Chimie des Substances Naturelles, D'epartement Science de l'Aliment, E.N.S.I.A., 1, Avenue des Olympiades, 91305 Massy (France) 30, 609–615.
- Boonkerd, T., B. N. Songkhla, and W. Thephuttee, 1994, *Plant Resources of South-East Asia*, No. 8, Prosea, Bogor 178-180.
- Buk-Gu Heo et al., 2007. *Antioxidant activity and cytotoxicity of methanol extracts from aerial parts of Korean salad plants*. BioFactors 30 (2007) 79–89. IOS Press.
- Cerutti, P. A. Oxidant stress and carcinogenesis. Eur. J. Clin. Invest. 1991, 21,1-11.
- Chin, Kit L. et al., 2006, *Food Value of Roselle, Hibiscus Sabdariffa – Tea Plant and Soil Science Program*, Southern University, Baton Rouge, LA, Plant and Animal Production System No. 303.
- Cronquist, A., 1981, *An Integrated System of Classification Flowering Plant*, Columbia University Press, New York, 384.
- Duke, J. A., 1985, *Handbook of Medicinal Herbs*, Publ., CRC Press Inc., 228-229.
- Depkes RI. 1986. *Sediaan Galenik*. Jakarta: Departemen Kesehatan Republik Indonesia.
- Depkes RI. 1995. *Farmakope indonesia IV*. Jakarta: Departemen Kesehatan
- Fessenden, Ralph J, dan Fessenden, Joan S. 1994. *Kimia Organik Jilid 1*. Terjemahan Aloysius Handiyana Pudjaatmaka. Jakarta : Erlangga.
- Grotewold, Erich, 2006, *The Science of Flavonoids*, The Ohio State University Columbus, Ohio, USA.
- Halliwell, R., Aruoma, O.I., 1991. DNA damage by oxygen-derived species. FEBS Letters 281, 9–19.
- Harborne.J.B, 1987, *Metode Fitokimia, Penuntun Modern Menganalisa Tumbuhan*, terbitan ke-2, Terjemahan Kosasih Padmawinata dan iwang Soediro, ITB Bandung.
- Harman, D., 1994. *Free radical theory of aging, increasing the functional life span*. Annals of the New York Academy of Sciences 717, 1–15.

- Herbert. R.B, 1995, *Biosintesis Metabolit Sekunder*, Edisi ke-2, cetakan ke-1, terjemahan Bambang Srigandono, IKIP Press Semarang.
- Mahadevan, N., Shivali and Kamboj, Pradeep., 2008, *Hibiscus sabdariffa Linn.– An overview*, Department of Pharmacognosy ISF College of Pharmacy, India.
- Markham. K.R, 1988, *Cara Mengidentifikasi Flavonoid*, Terjemahan Kosasih Padmawinata, ITB Bandung.
- Molyneux P. 2004. *The Use of the stable free radical DPPH for estimating antioxidant activity*. Songklanakarin J. Sci. Technol 26 (2) : 211-219.
- M. Barbaste, B. Berke´ e, M. Dumas, S. Soulet, J.-C.L. Delaunay, C. Castagnino, V. Arnaudinaud, C. Che` eze and J. Vercauteren, *Dietary antioxidants, peroxidation and cardiovascular risks*, J Nutr Health Aging 6 (2002).
- Omotuyi, O. *et al.*, 2010, *Hibiscus sabdariffa Linn anthocyanins alter circulating reproductive hormones in rabbits (Oryctolagus cuniculus)*, Full Length Research Paper, Journal of Diabetes and Endocrinology Vol. 1(3), pp. 36-45.
- Pensri Ruangsri , Paramee Chumsri , Anchalee Sirichote and Arunporn Itharat. 2008. *Changes in quality and bioactive properties of concentrated Roselle (Hibiscus sabdariffa Linn.) extract*. As. J. Food Ag-Ind. 2008, 1(02), 62-67.
- Pokorny, Jan, Yanishlieva, Nedyalka dan Gordon, Michael. 2001. *Antioxidants in Food Practical Applications*. CRC Press ; New York.
- Ponglux, D. *et al*, 1987, *Medicinal Plants, Medicinal Plants Exhibition Committee, The First Princess Chulabhorn Science Congress, International Congress on Natural Products*, Bangkok, 139.
- Pourmorad, F., 2006, *Antioxidant activity, phenol and flavonoid contents of some selected Iranian medicinal plants*. African Journal of Biotechnology Vol. 5 (11), pp. 1142-1145.
- Rohman. 2009. *Kromatografi untuk analisis obat*. Graha Ilmu. Yogyakarta.
- Roy J. Gritter, James M. Bobbit, Arthur E. S., 1991. *Pengantar Kromatografi*. Penerbit ITB. Bandung.
- Sarker, Satyajit D. *et al.*, 2006, *Methods in biotechnology natural products isolation second edition*, New Jersey, Humana Press.
- Sastrohamidjojo, Hardjono.1996. *Sintesis Bahan Alam*.Yogyakarta:Gadjah Mada University Press.
- Sastrohamidjojo, Hardjono.2007. Cetakan Keempat. *Kromatografi*.Yogyakarta Liberty.
- Simonian, N.Y., Coyle, J.T., 1996. *Oxidative stress in neurodegenerative disease. Annual review of pharmacology and toxicology* 36, 83–106
- Soares, J. R., Dinis, T. C. P., Cunha, A. P., Almeida, L. M., *Antioxidant activities of some extracts of Thymus zygis” Free Rad. Res.*, 26, 469-478, 1997.
- Stahl, 1985. *Analisis Obat Secara Kromatografi dan Mikroskopi*, Bandung: ITB. 1985. Hlm 3-18.
- Widowati, Esti W, dkk., 2010, *Senyawa Antioksidan dari Bunga Rosella (Hibiscus sabdariffa) dan Karakterisasi Profil Fitokimianya*, UIN Sunan Kalijaga, Yogyakarta.
- Winarsi, Hery. 2007.*Antioksidan Alami & Radikal Bebas*. Kanisius. Yogyakarta.

Lampiran 1. Perhitungan Persen Antiradikal

1. Fraksi 1

$$\% = ((1,030 - 0,592)/1,030) \times 100$$
$$= 42,5243$$

$$\% = ((1,030 - 0,722)/1,030) \times 100$$
$$= 29,9029$$

$$\% = ((1,030 - 0,762)/1,030) \times 100$$
$$= 26,0194$$

$$\% = ((1,030 - 0,790)/1,030) \times 100$$
$$= 23,3010$$

$$\% = ((1,030 - 0,830)/1,030) \times 100$$
$$= 19,4175$$

2. Fraksi 2

$$\% = (1,030 - 0,940)/ 1,030 \times 100$$
$$= 8,7379$$

$$\% = (1,030 - 0,985)/ 1,030 \times 100$$
$$= 4,3689$$

$$\% = (1,030 - 0,975)/ 1,030 \times 100$$
$$= 5,3398$$

$$\% = (1,030 - 1,005)/ 1,030 \times 100$$
$$= 2,4272$$

$$\% = (1,030 - 0,995)/ 1,030 \times 100$$
$$= 3,3981$$

3. Fraksi 3

$$\% = (1,030 - 0,652)/ 1,030 \times 100$$
$$= 36,6990$$

$$\% = (1,030 - 0,732)/ 1,030 \times 100$$
$$= 28,9320$$

$$\% = (1,030 - 0,762)/ 1,030 \times 100$$
$$= 26,0194$$

$$\% = (1,030 - 0,825)/ 1,030 \times 100$$
$$= 19,9029$$

$$\% = (1,030 - 0,806)/ 1,030 \times 100$$
$$= 21,7476$$

4. Fraksi 4

$$\begin{aligned} \% &= (1,030 - 0,815)/1,030 \times 100 \\ &= 20,8738 \end{aligned}$$

$$\begin{aligned} \% &= (1,030 - 0,885)/1,030 \times 100 \\ &= 14,0777 \end{aligned}$$

$$\begin{aligned} \% &= (1,030 - 0,910)/1,030 \times 100 \\ &= 11,6505 \end{aligned}$$

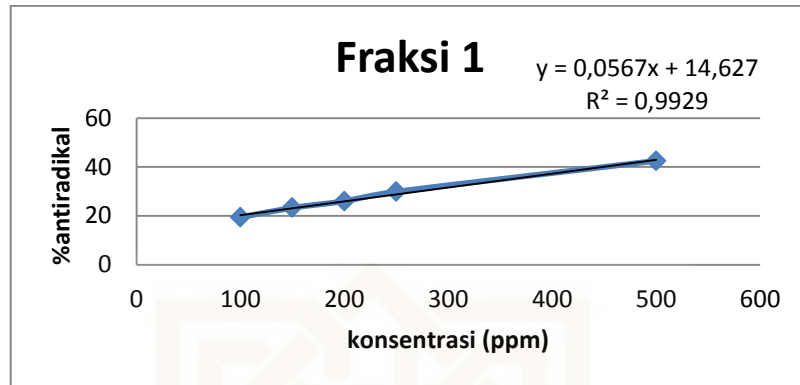
$$\begin{aligned} \% &= (1,030 - 0,915)/1,030 \times 100 \\ &= 11,1650 \end{aligned}$$

$$\begin{aligned} \% &= (1,030 - 0,945)/1,030 \times 100 \\ &= 8,2524 \end{aligned}$$



Lampiran 2. Perhitungan IC_{50} dan EC_{50}

1. Fraksi 1



$$Y = 0,056x + 14,62$$

$$50 = 0,056X + 14,62$$

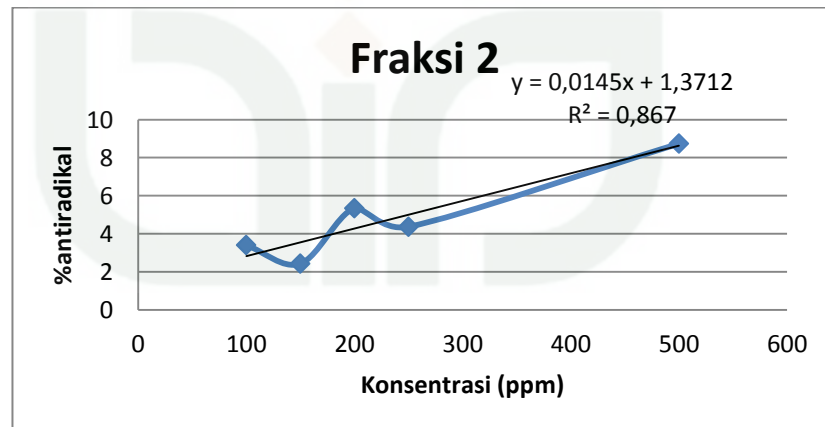
$$X = 50 - 14,62 / 0,056$$

$$IC_{50} = 631,78 \text{ ppm}$$

$$EC_{50} = 631,78 / 40$$

$$= 15,79$$

2. Fraksi 2



$$Y = 0,014X + 1,371$$

$$50 = 0,014X + 1,371$$

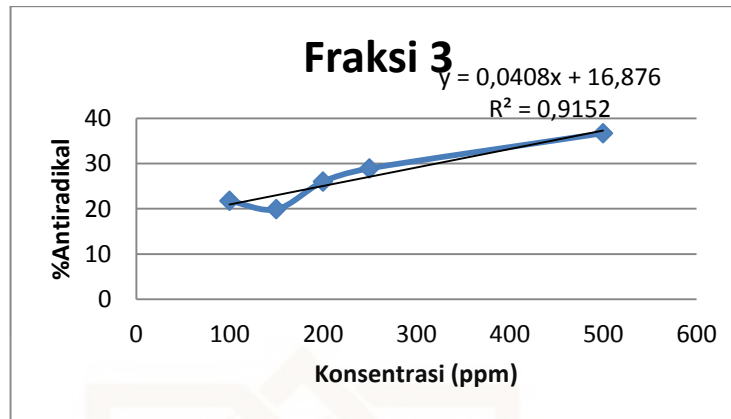
$$X = 50 - 1,371 / 0,014$$

$$IC_{50} = 3473,5 \text{ ppm}$$

$$EC_{50} = 3473,5 / 40$$

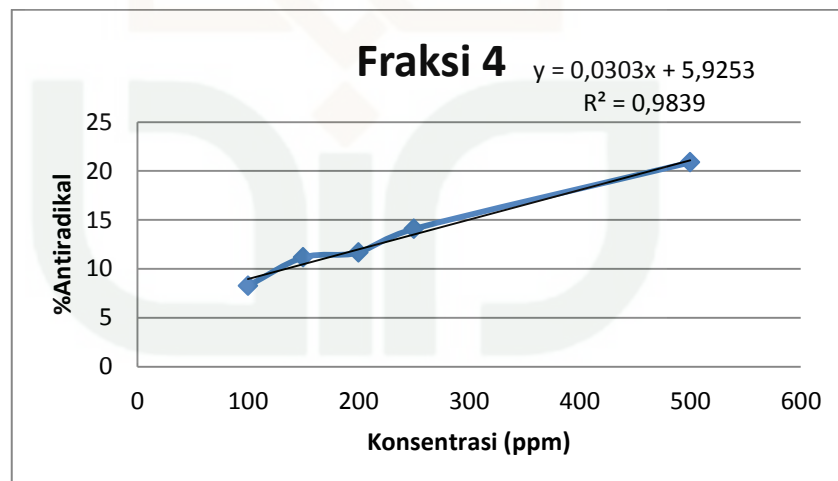
$$= 86,83$$

3. Fraksi 3



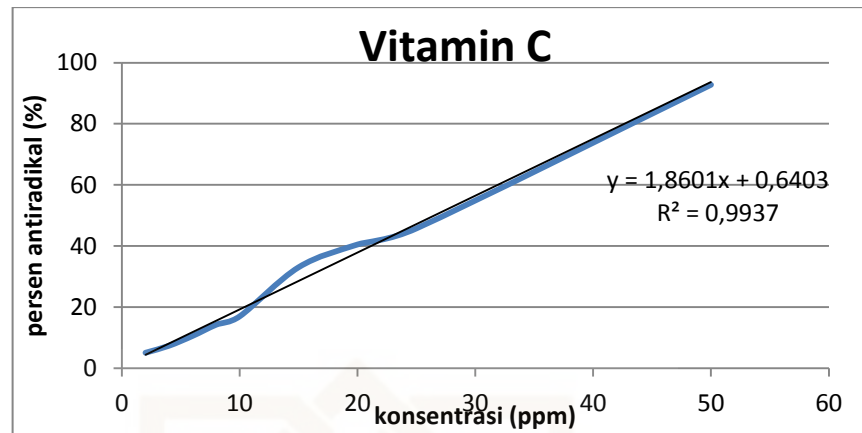
$$Y = 0,040x + 16,87$$
$$50 = 0,040x + 16,87$$
$$X = 50 - 16,87 / 0,040$$
$$IC_{50} = 828,25$$
$$EC_{50} = 828,25/40$$
$$= 20,71$$

4. Fraksi 4



$$Y = 0,030X + 5,925$$
$$50 = 0,030X + 5,925$$
$$X = 50 - 5,925 / 0,030$$
$$IC_{50} = 1469,17 \text{ ppm}$$
$$EC_{50} = 1469,17/40$$
$$= 36,73$$

5. Standar Vitamin C



$$Y = 1,86x + 0,64$$
$$50 = 1,86x + 0,64$$
$$X = 50 - 0,64 / 1,86$$
$$IC_{50} = 26,53$$
$$EC_{50} = 26,53/40$$
$$= 0,664$$