

PENGARUH PERBEDAAN PELARUT EKSTRAKSI TERHADAP TOKSISITAS
DAN AKTIVITAS ANTIOKSIDAN EKSTRAK KULIT BATANG MANGROVE

Xylocarpus granatum

SKRIPSI

PROGRAM STUDI TEKNOLOGI HASIL PERIKANAN
JURUSAN MANAJEMEN SUMBERDAYA PERAIRAN

UNIVERSITAS BRAWIJAYA

Oleh:
DIAS AYUNI
NIM. 125080301111008



FAKULTAS PERIKANAN DAN ILMU KELAUTAN

UNIVERSITAS BRAWIJAYA

MALANG

2016

**PENGARUH PERBEDAAN PELARUT EKSTRAKSI TERHADAP TOKSISITAS
DAN AKTIVITAS ANTIOKSIDAN EKSTRAK KULIT BATANG MANGROVE**

Xylocarpus granatum

SKRIPSI

**PROGRAM STUDI TEKNOLOGI HASIL PERIKANAN
JURUSAN MANAJEMEN SUMBERDAYA PERAIRAN**

**Sebagai Salah Satu Syarat untuk Meraih Gelar Sarjana Perikanan di
Fakultas Perikanan dan Ilmu Kelautan
Universitas Brawijaya**

Oleh:
DIAS AYUNI
NIM. 125080301111008



FAKULTAS PERIKANAN DAN ILMU KELAUTAN

UNIVERSITAS BRAWIJAYA

MALANG

2016

SKRIPSI

PENGARUH PERBEDAAN PELARUT EKSTRAKSI TERHADAP TOKSISITAS
DAN AKTIVITAS ANTIOKSIDAN EKSTRAK KULIT BATANG MANGROVE

Xylocarpus granatum

Oleh:

DIAS AYUNI

NIM. 125080301111008

Telah dipertahankan didepan penguji

pada tanggal 28 oktober 2016

Dosen Penguji I

(Dr. Ir. Hardoko, MS)
NIP. 19620108 1998802 1 001
Tanggal: 08 NOV 2016

Menyetujui,

Dosen Pembimbing I

(Dr. Ir. Titik Dwi Sulistiyati, MP)
NIP. 19581231 198601 2 002
Tanggal: 08 NOV 2016

Dosen Pembimbing II

(Dr. Ir. Bambang Budi S, MS)
NIP. 19570119 198601 1 001
Tanggal: 08 NOV 2016

Mengetahui
Ketua Jurusan
(Dr. Ir. Arniq Wijijeng Ekawati, MS)
NIP. 19620805 198603 2 001
Tanggal: 08 NOV 2016

PERNYATAAN ORISINALITAS

Dengan ini saya menyatakan bahwa dalam skripsi yang saya tulis ini benar-benar merupakan hasil karya sendiri, dan sepanjang pengetahuan saya juga tidak terdapat karya atau pendapat yang pernah ditulis atau diterbitkan oleh orang lain kecuali yang tertulis dalam naskah ini dan disebutkan dalam daftar pustaka.

Apabila kemudian hari terbukti atau dapat dibuktikan skripsi ini hasil penjiplakan (plagiasi), maka saya bersedia menerima sanksi atas perbuatan tersebut, sesuai hukum yang berlaku di Indonesia.

Malang, Oktober 2016

Mahasiswa

Dias Ayuni

NIM. 125080301111008



UCAPAN TERIMA KASIH

Penulis menyadari sepenuhnya bahwa laporan ini tidak akan tersusun tanpa bantuan dari berbagai pihak, rasa hormat dan terima kasih penulis sampaikan kepada :

1. Allah SWT atas segala limpahan rahmat, rezeki, serta hidayah-Nya sehingga penulis dapat menyelesaikan laporan skripsi dengan baik.
2. Kedua orang tua saya, Bapak Hadi Suyatim dan Ibu Imtichana atas doa dan restunya serta adik saya Wahyu Kusnan Ginandi yang selalu memberikan doa dan semangat.
3. Ibu Dr. Ir. Titik Dwi Sulistiyati, MP selaku dosen pembimbing I dan Bapak Dr. Ir. Bambang Budi Sasmito, MS selaku dosen pembimbing II yang telah banyak memberikan bimbingan, arahan, nasehat dan motivasi hingga laporan skripsi ini selesai.
4. Bapak Dr. Ir. Hardoko, MS selaku dosen pengaji I yang telah memberikan kritik dan saran yang membangun untuk laporan skripsi ini.
5. Keluarga Bapak Sueb, Bapak Sunarjo, Bapak Lasiono, Bapak Sarno, dan keluarga SMAN1P atas segala bantuan, dukungan dan doanya.
6. Gengs (Ari, Dwi, Isti, Nurul, Tanti, Tiara dan Yenny) dan teman-teman Tim Skripsi Bimbingan Bu Titik dan Pak Bambang atas segala bantuan, semangat dan doanya.
7. Teman-teman program studi Teknologi Hasil Perikanan angkatan 2012 atas segala dukungan dan bantuannya.

Malang, Oktober 2016

Penulis

Dias Ayuni

NIM. 115080301111008



RINGKASAN

DIAS AYUNI. Skripsi tentang Pengaruh Perbedaan Pelarut Ekstraksi Terhadap Toksisitas dan Aktivitas Antioksidan Ekstrak Kulit Batang Mangrove *Xylocarpus granatum* (dibawah bimbingan **Dr. Ir. Titik Sulistiyati, MP** dan **Dr. Ir. Bambang Budi Sasmito, MS**).

Xylocarpus granatum merupakan spesies mangrove dari family Meliaceae. Kulit batang *Xylocarpus granatum* mengandung zat ekstraktif seperti flavonoid, triterpenoid, dan tanin yang memiliki efek toksik, farmakologik dan ekologik yang penting. Senyawa bioaktif tersebut dapat diperoleh melalui proses ekstraksi dengan menggunakan pelarut dan metode ekstraksi tertentu. N-heksan dipilih sebagai pelarut karena bersifat non polar, etil asetat dipilih karena bersifat semi polar dan methanol bersifat polar. Toksisitas ekstrak tanaman dapat diketahui dengan melakukan uji toksisitas akut menggunakan metode Brine Shrimp Lethality Test (BSLT). Toksisitas sampel ditentukan dalam waktu singkat selama 24 jam setelah pemberian dosis uji terhadap larva *Artemia salina* Leach dengan parameter uji berupa nilai LC₅₀. Senyawa fenolik seperti flavonoid pada tanaman dapat membawa fungsi antioksidan dalam sel tanaman. Aktivitas antioksidan suatu ekstrak tanaman dapat di uji menggunakan metode DPPH (1,1-diphenyl-2-picrylhydrazil) dengan parameter hasil uji berupa nilai IC₅₀.

Tujuan dari penelitian ini adalah untuk mengetahui toksisitas dan aktivitas antioksidan ekstrak kulit batang mangrove *Xylocarpus granatum* dengan menggunakan variasi pelarut ekstraksi yang berbeda. Penelitian ini dilaksanakan pada bulan Maret sampai Juni 2016, bertempat di Laboratorium Perekayasaan Hasil Perikanan, Laboratorium Keamanan Hasil Perikanan, Laboratorium Reproduksi, Pemuliaan dan Pemberian Ikan Fakultas Perikanan dan Ilmu Kelautan, Universitas Brawijaya serta Laboratorium Pusat Penelitian Kimia, LIPI (Lembaga Ilmu dan Pengkajian Ilmiah) Serpong.

Penelitian ini menggunakan metode eksperimen. Kulit batang mangrove *Xylocarpus granatum* dipreparasi dalam tiga macam bentuk sampel yaitu sampel segar, kering dan tepung. Kulit batang *Xylocarpus granatum* dicuci dengan air mengalir, setelah airnya tiris dilanjutkan dengan proses pengecilan ukuran sampel dengan menggunakan pisau sehingga menjadi sampel dalam bentuk segar. Sampel dalam bentuk kering didapatkan dengan cara mengeringkan sampel menggunakan oven suhu 50°C selama 10 jam setelah melakukan proses pengecilan ukuran sampel, sedangkan untuk mendapatkan sampel dalam bentuk tepung yaitu setelah proses pengeringan sampel dilanjutkan dengan proses penghalusan sampel menggunakan blender dan disaring dengan ayakan 60 mesh. Ketiga sampel tersebut masing-masing diekstraksi secara maserasi bertingkat dengan pelarut non polar (n-heksan), semi polar (etil asetat) dan polar (methanol). Perbandingan sampel dengan pelarut saat maserasi yaitu 1:4 (b/v) dengan waktu maserasi tiap pelarutnya 24 jam pada suhu ruang. Filtrat hasil maserasi dievaporasi suhu 45°C hingga menjadi ekstrak kental dan kemudian dilanjutkan dengan penguapan sisa pelarut pada ekstrak dengan gas nitrogen. Sampel yang memiliki nilai persen rendemen ekstrak tertinggi dipilih sebagai sampel untuk di uji lanjut kadar air dengan metode oven kering. Kemudian ekstrak diuji fitokimia yang bersifat kualitatif yaitu uji alkaloid menggunakan pereaksi Mayer, uji flavonoid menggunakan pereaksi serbuk Mg dan HCl. Selain itu juga dilakukan uji tanin menggunakan pereaksi FeCl₃, uji steroid dan triterpenoid menggunakan pereaksi asetat anhidrat dan asam sulfat, serta uji saponin menggunakan metode Forth. Ekstrak kemudian diuji total fenol secara



kuantitatif menggunakan metode folinciocalteu, lalu ekstrak di uji toksitas menggunakan metode *Brine Shrimp Lethality Test* (BSLT). Uji BSLT menggunakan larva *Artemia salina* umur 48 jam dan konsentrasi larutan ekstrak yang digunakan antara lain 1000, 500, 100, 50, 25, 12,5 dan 0 ppm dengan waktu pengamatan setelah 24 jam pemaparan larutan eksktrak terhadap *Artemia*. Parameter uji BSLT berupa nilai LC₅₀. Setelah itu ekstrak di uji aktivitas antioksidan menggunakan metode DPPH, ekstrak dibuat dalam beberapa konsentrasi antara lain 200, 100, 50, 25, 12,5 dan 0 ppm dengan parameter uji berupa nilai IC₅₀. Nilai LC₅₀ dan IC₅₀ dianalisa sidik ragam (ANOVA) untuk mengetahui pengaruh perbedaan pelarut ekstraksi terhadap toksitas dan aktivitas antioksidan dari ekstrak kulit batang *Xylocarpus granatum* dari bentukan sampel terpilih. Ekstrak dengan toksitas yang paling kuat (nilai LC₅₀ terendah) dan ekstrak yang memiliki aktivitas antioksidan paling kuat (nilai IC₅₀ terendah) diidentifikasi senyawa bioaktifnya dengan uji LC-MS.

Pada penelitian ini didapatkan hasil bahwa bentuk sampel tepung kulit batang mangrove *Xylocarpus granatum* yang dimaserasi secara bertingkat dengan pelarut n-heksan, etil asetat dan metanol memiliki nilai rata-rata persen rendemen tertinggi. Nilai kadar air ekstrak n-heksan dan ekstrak etil asetat tepung kulit batang mangrove *Xylocarpus granatum* sama yaitu sebesar 12,667 %. Sedangkan nilai kadar air ekstrak metanol tepung kulit batang mangrove *Xylocarpus granatum* yaitu sebesar 13,333 %. Ekstrak n-heksan, etil asetat dan metanol tepung kulit batang mangrove *Xylocarpus granatum* terdeteksi pada uji fitokimia mengandung senyawa bioaktif yang sama yaitu flavonoid, tanin dan triterpenoid. Pada uji total fenol, ekstrak etil asetat tepung kulit batang memiliki nilai total fenol tertinggi sebesar 409,126 mgGAE/100g sampel. Ekstrak metanol tepung kulit batang nilai total fenolnya sebesar 392,059 mgGAE/100g sampel dan ekstrak n-heksan tepung kulit batang nilai total fenolnya sebesar 362,104 mgGAE/100g sampel. Pada uji toksitas didapatkan nilai LC₅₀ terendah (aktivitas toksik paling kuat) yaitu pada ekstrak n-heksan tepung kulit batang sebesar 79,012 ppm. Ekstrak etil asetat tepung kulit batang sebesar 105,495 ppm dan ekstrak metanol tepung kulit batang sebesar 143,490 ppm. Pada uji aktivitas antioksidan didapatkan nilai IC₅₀ terendah (aktivitas antioksidannya paling kuat) yaitu pada ekstrak etil asetat tepung kulit batang sebesar 92,033 ppm. Ekstrak metanol tepung kulit batang sebesar 99,078 ppm dan ekstrak n-heksan tepung kulit batang sebesar 104,878 ppm dengan nilai IC₅₀ kontrol pembanding yaitu vitamin C sebesar 5,818 ppm. Ekstrak n-heksan tepung kulit batang sebagai ekstrak yang memiliki nilai LC₅₀ terendah (aktivitas toksik paling kuat) di uji LC-MS dan teridentifikasi mengandung senyawa *theophylline*, *berberin* dan *coumarin*. Sedangkan ekstrak etil asetat tepung kulit batang yang memiliki nilai IC₅₀ terendah (aktivitas antioksidan paling kuat) di uji LC-MS dan teridentifikasi mengandung senyawa *caffeic acid*, *3,4-dihydroxybenzaldehyde* dan *coumarin*.

KATA PENGANTAR

Segala puji dan syukur bagi Allah SWT yang telah melimpahkan segala rahmat, rezeki serta karunia-Nya, sehingga penulis dapat menyelesaikan Laporan Skripsi dengan judul Pengaruh Perbedaan Pelarut Ekstraksi Terhadap Toksisitas dan Aktivitas Antioksidan Ekstrak Kulit Batang Mangrove *Xylocarpus granatum*. Dalam penyusunan laporan ini, penulis menyampaikan pokok-pokok bahasan yang meliputi proses preparasi kulit batang mangrove *Xylocarpus granatum*, proses ekstraksi, metode serta cara dalam melakukan skrining fitokimia, uji total fenol, uji toksisitas, serta uji aktivitas antioksidan.

Penulis sadar bahwa laporan ini masih jauh dari kata sempurna baik dalam pelaksanaan di laboratorium, perhitungan yang kurang teliti, penyusunan laporan dan lain sebagainya. Oleh karena itu kritik dan saran, serta masukan yang membangun akan sangat diharapkan demi kesempurnaan laporan skripsi ini agar nantinya bermanfaat bagi orang lain yang membutuhkan.

Malang, Oktober 2016

Penulis

DAFTAR ISI

	Halaman
HALAMAN SAMPUL	i
HALAMAN JUDUL	ii
HALAMAN PENGESAHAN	iii
PERNYATAAN ORISINALITAS	iv
UCAPAN TERIMAKASIH.....	v
RINGKASAN.....	vi
KATA PENGANTAR	viii
DAFTAR ISI	ix
DAFTAR TABEL	xi
DAFTAR GAMBAR	xii
DAFTAR LAMPIRAN	xiii
1. PENDAHULUAN	1
1.1 Latar Belakang	1
1.2 Rumusan Masalah	4
1.3 Tujuan Penelitian	4
1.4 Kegunaan Penelitian	4
1.5 Hipotesa	4
1.6 Tempat dan Waktu	5
2. TINJAUAN PUSTAKA	6
2.1 Klasifikasi dan Morfologi <i>Xylocarpus granatum</i>	6
2.2 Senyawa Bioaktif <i>Xylocarpus granatum</i>	7
2.2.1 Alkaloid	7
2.2.2 Flavonoid	8
2.2.3 Tanin	9
2.2.4 Triterpenoid dan Steroid	9
2.2.5 Saponin	10
2.2.6 Limonoid	10
2.3 Ekstraksi	11
2.4 Pelarut	11
2.4.1 N-heksan	12
2.4.2 Etil Asetat	13
2.4.3 Metanol	13
2.5 Uji Fitokimia	14
2.6 Uji Total Fenol	14
2.7 Uji Toksisitas	15
2.7.1 Brine Shrimp Lethality Test	15
2.7.2 Artemia salina Lench	16
2.8 Uji Aktivitas Antioksidan	17
2.9 LC-MS (<i>Liquid Cromatography-Mass Spectrometry</i>)	18
3. METODE PENELITIAN	20
3.1 Materi Penelitian	20
3.1.1 Bahan Penelitian	20
3.1.2 Alat Penelitian	21
3.2 Metode Penelitian	21
3.2.1 Variabel Penelitian	22

3.2.2 Rancangan Penelitian	22
3.2.3 Parameter Uji	23
3.3 Prosedur Penelitian	24
3.3.1 Preparasi Sampel.....	24
3.3.2 Ekstraksi Sampel	25
3.3.3 Perhitungan Rendemen	29
3.3.4 Uji Kadar Air	29
3.3.5 Uji Fitokimia.....	30
• Uji Alkaloid.....	30
• Uji Flavonoid.....	30
• Uji Tanin	31
• Uji Steroid dan Terpenoid	32
• Uji Saponin	32
3.3.5 Total fenol.....	33
• Pembuatan Kurva Standar Asam Galat.....	33
• Penentuan Total Senyawa Fenolat dengan Metode Folinciocalteu	34
3.3.7 Uji Toksisitas Menggunakan Metode <i>BSLT</i>	36
• Penyiapan Larva <i>Artemia salina</i> Lench.....	36
• Penentuan Konsentrasi Larutan Ekstrak dan Uji Toksisitas <i>Artemia salina</i> Leach.....	36
3.3.8 Uji Aktivitas Antioksidan Metode DPPH	37
3.3.9 Identifikasi Senyawa Bioaktif Menggunakan LC-MS.....	39
4. HASIL DAN PEMBAHASAN	40
4.1 Rendemen Ekstrak Kulit Batang Mangrove <i>Xylocarpus granatum</i>	40
4.2 Kadar Air Ekstrak Tepung Kulit Batang Mangrove <i>Xylocarpus granatum</i>	43
4.3 Uji Fitokimia Ekstrak Tepung Kulit Batang Mangrove <i>Xylocarpus granatum</i>	45
4.4 Uji Total Fenol Ekstrak Tepung Kulit Batang Mangrove <i>Xylocarpus granatum</i>	49
4.5 Uji Toksisitas Ekstrak Tepung Kulit Batang Mangrove <i>Xylocarpus granatum</i>	52
4.6 Uji Aktivitas Antioksidan Ekstrak Tepung Kulit Batang Mangrove <i>Xylocarpus granatum</i>	55
4.7 Hubungan Total Fenol dan Aktivitas Antioksidan.....	58
4.8 Identifikasi Senyawa Bioaktif dengan Uji <i>Liquid Chromatograph Mass Spectrometry</i> (LC-MS)	60
5. KESIMPULAN DAN SARAN	66
5.1 Kesimpulan	66
5.2 Saran	66
DAFTAR PUSTAKA	67
LAMPIRAN	77



DAFTAR TABEL

Tabel

Halaman

1. Rancangan Penelitian Utama	23
2. Nilai Kadar Air Ekstrak Tepung Kulit Batang <i>Xylocarpus granatum</i> ...	44
3. Uji Fitokimia Ekstrak Tepung Kulit Batang Mangrove <i>Xylocarpus granatum</i>	46
4. Dugaan Senyawa yang Bersifat Toksik (Ekstrak N-Heksan Tepung Kulit Batang) dan Senyawa yang Bersifat Antioksidan (Ekstrak Etil Asetat Tepung Kulit Batang)	64



DAFTAR GAMBAR

Gambar	Halaman
1. Mangrove <i>Xylocarpus granatum</i>	7
2. Skema Kerja Preparasi Sampel.....	25
3. Skema Kerja Ekstraksi Sampel (Segar, Kering, Tepung)	28
4. Skema Uji Kadar Air Ekstrak Kulit Batang Mangrove <i>Xylocarpus granatum</i>	29
5. Skema Uji Alkaloid Ekstrak Kulit Batang <i>Xylocarpus granatum</i>	30
6. Skema Uji Flavonoid Ekstrak Kulit Batang <i>Xylocarpus granatum</i>	31
7. Skema Uji Tanin Ekstrak Kulit Batang <i>Xylocarpus granatum</i>	31
8. Skema Uji Steroid Dan Terpenoid Ekstrak Kulit Batang <i>Xylocarpus granatum</i>	32
9. Skema Uji Saponin Ekstrak Kulit Batang <i>Xylocarpus granatum</i>	33
10. Skema Kerja Pembuatan Kurva Standar Asam Galat.	34
11. Skema Kerja Penentuan Total Senyawa Fenolat Pada Ekstrak Kulit Batang <i>Xylocarpus granatum</i>	35
12. Skema Kerja Penetasan Telur <i>Artemia salina</i> Leach.....	36
13. Skema Uji Toksisitas Ekstrak Kulit Batang <i>Xylocarpus granatum</i>	37
14. Skema Kerja Uji Aktivitas Antioksidan	38
15. Skema Kerja Identifikasi Senyawa Bioaktif Menggunakan LC-MS....	39
16. Nilai Rendemen Ekstrak Kulit Batang <i>Xylocarpus granatum</i>	41
17. Nilai Total Fenol Ekstrak Tepung Kulit Batang <i>Xylocarpus granatum</i>	50
18. Nilai LC ₅₀ Ekstrak Tepung Kulit Batang <i>Xylocarpus granatum</i>	53
19. Nilai IC ₅₀ Ekstrak Tepung Kulit Batang <i>Xylocarpus granatum</i>	56
20. Hubungan Total Fenol dan Aktivitas Antioksidan Ekstrak Tepung Kulit Batang <i>Xylocarpus granatum</i>	59
21. Kromatogram Ekstrak N-Heksan Tepung Kulit Batang	61
22. a) Spektrum Massa untuk Waktu Retensi 3,4; b) Spektrum Massa untuk Waktu Retensi 4,4; dan c) Spektrum Massa untuk Waktu Retensi 15,13 Sampel Ekstrak N-Heksan Tepung Kulit Batang	62
23. Kromatogram Ekstrak Etil Asetat.....	62
24. a) Spektrum Massa untuk Waktu Retensi 2,84; b) Spektrum Massa untuk Waktu Retensi 3,23; dan c) Spektrum Massa untuk Waktu Retensi 14,13 Sampel Ekstrak Etil Asetat	63



DAFTAR LAMPIRAN**Lampiran****Halaman**

1. Perhitungan Konsentrasi Larutan Uji Toksisitas.....	77
2. Perhitungan Pembuatan larutan DPPH 0,1 mM dan Konsentrasi Larutan Uji Aktivitas Antioksidan dan Konsentrasi Larutan Vitamin C	79
3. Rancangan Penelitian, Data Hasil Perhitungan dan ANOVA (<i>Analysis of Variance</i>) Rendemen Ekstrak Kulit Batang <i>Xylocarpus granatum</i>	82
4. Data Hasil Perhitungan Kadar Air Ekstrak Tepung Kulit Batang Mangrove <i>Xylocarpus granatum</i>	85
5. Hasil Uji Larutan Standar Asam Galat Serta Kurva Kalibrasi Asam Galat.....	86
6. Data Hasil Perhitungan dan ANOVA (<i>Analysis of Variance</i>) Uji Total Fenol Ekstrak Tepung Kulit Batang <i>Xylocarpus granatum</i> ... 87	87
7. Data Hasil Perhitungan dan ANOVA (<i>Analysis of Variance</i>) Uji Toksisitas Ekstrak Tepung Kulit Batang <i>Xylocarpus granatum</i>	90
8. Data Hasil Perhitungan dan ANOVA (<i>Analysis of Variance</i>) Uji Aktivitas Antioksidan Ekstrak Tepung Kulit Batang <i>Xylocarpus granatum</i>	105
9. Hasil Identifikasi Senyawa Bioaktif Ekstrak N-Heksan dan Ekstrak Etil Asetat Tepung Kulit Batang <i>Xylocarpus granatum</i>	119
10. Dokumentasi Penelitian	126



1. PENDAHULUAN

1.1 Latar Belakang

Mangrove merupakan salah satu sumber daya alam Indonesia yang jumlahnya melimpah dan terbanyak di dunia, tidak hanya dari segi kuantitas area namun juga berdasarkan jumlah species yang ada (Purnobasuki, 2004). Tumbuhan mangrove mempunyai banyak sekali manfaat, tidak hanya dari segi ekologi namun bahan mentah dari mangrove menurut Kumar *et al.*, (2014) mengandung beberapa senyawa bioaktif yang memiliki sifat obat dan signifikan dapat dimanfaatkan untuk menjaga kesehatan manusia.

Senyawa bioaktif dapat diperoleh melalui proses ekstraksi. Ekstraksi mempunyai prinsip untuk memisahkan komponen yang terkandung dalam suatu bahan yang diekstrak menggunakan pelarut tertentu. Pemilihan pelarut dan metode ekstraksi yang digunakan dapat mempengaruhi sifat fisikokimia dari ekstrak yang dihasilkan (Septiana dan asnani, 2012). N-heksan dipilih sebagai pelarut dalam proses ekstraksi karena bersifat non polar (Munawaroh dan Handayani, 2010). Pelarut n-heksan dapat menarik senyawa bioaktif yang memiliki tingkat kepolaran sama dengan n-heksan (Purnamasari *et al.*, 2013). Pelarut etil asetat dipilih karena merupakan pelarut semi polar yang bersifat volatil, tidak beracun, tidak higroskopis, serta mampu menarik senyawa bioaktif seperti flavonoid pilohidroksi dan fenol (Mulyati, 2009). Sedangkan pelarut metanol dipilih karena bersifat universal, memiliki gugus (-OH) dan (-CH₃) sehingga dapat melarutkan zat yang bersifat polar dan nonpolar, serta dapat menarik alkaloid, steroid, saponin, dan flavonoid dari tanaman (Astarina *et al.*, 2013).

Senyawa bioaktif dari tiap spesies mangrove berbeda-beda. Senyawa bioaktif tersebut dapat dianalisis dengan uji fitokimia. Uji fitokimia bersifat

kualitatif yang dilakukan dengan melihat pengujian reaksi warna yang terjadi menggunakan suatu pereaksi. Uji fitokimia dilakukan dengan tujuan untuk menentukan ciri senyawa bioaktif yang terkandung dalam suatu ekstrak kasar yang diduga mempunyai efek farmakologis dan bermanfaat bila diujikan dengan sistem biologi (Artini *et al.*, 2013). Uji fitokimia yang sering dilakukan yaitu uji alkaloid, flavonoid, tanin, triterpenoid dan steroid, serta saponin.

Xylocarpus granatum merupakan salah satu spesies tumbuhan mangrove dari family Meliaceae yang tumbuh dipesisir pantai. Daun dari mangrove jenis ini berwarna hijau dan berbentuk oval, memiliki buah seperti jeruk besar dan berbiji. Sistem perakaran mangrove *Xylocarpus granatum* berada di atas tanah dengan pohon yang memiliki kulit kayu yang lunak, padat dan ringan dengan warna coklat terang hingga oranye (Gazali, 2014). Menurut Yanti (2008), kandungan zat ekstraktif terbanyak yang terdapat pada bagian tanaman selain pada kayu teras juga terdapat pada kulit batangnya. Kulit batang mangrove *Xylocarpus granatum* menurut Wangensteen *et al.*, (2013) mengandung flavonoid, triterpenoid, tanin, dan proanthocyanidin yang memiliki efek toksik, farmakologik dan ekologik yang penting.

Efek toksik dari suatu ekstrak tanaman dapat diketahui dengan melakukan uji ketoksikan menggunakan metode *Brine Shrimp Lethality Test* (BSLT) yang merupakan uji toksitas akut. Efek toksik dari suatu ekstrak tanaman ditentukan dalam waktu yang relatif singkat dengan rentang waktu 24 jam setelah pemberian dosis uji pada larva *Artemia salina*. Parameter uji toksitas metode BSLT berupa nilai LC₅₀ (Cahyadi, 2009). Toksisitas merupakan indikator daya racun bahan terhadap organisme tertentu. Penelitian toksitas merupakan cara potensial yang digunakan sebagai uji pendahuluan untuk mengevaluasi efek toksik dari suatu ekstrak tanaman yang berhubungan dengan pertumbuhan tumor (Utami, 2007).

Mangrove *Xylocarpus granatum* kaya akan senyawa tanin, flavonoid

serta memiliki aktivitas farmakologik seperti antimikroba, antimalaria, antiulcer, antidiare, fungisida, kanker dan penyembuhan luka (Trilochana *et al.*, 2013).

Senyawa fenolik seperti flavonoid pada tanaman dapat membawa fungsi antioksidan dalam sel tanaman tersebut. Pada penelitian secara *in vitro* maupun *in vivo*, senyawa tersebut terbukti efektif mampu mengikat radikal bebas dan memiliki aktivitas farmakologi sebagai antioksidan (Agati *et al.*, 2007).

Aktivitas pengikatan radikal bebas dari suatu ekstrak tanaman dapat di uji dengan menggunakan metode DPPH (*1,1-diphenyl-2-picrylhydrazil*). Parameter uji aktivitas antioksidan metode DPPH berupa nilai IC₅₀. IC₅₀ adalah nilai yang menunjukkan konsentrasi larutan sampel yang mampu mereduksi 50% dari aktivitas DPPH (Ika, 2013).

Penelitian yang dilakukan oleh Haque *et al.*, (2007) menyatakan bahwa kulit batang mangrove jenis *Xylocarpus mollucensis* yang diekstrak dengan pelarut etil asetat memiliki aktivitas toksik terhadap *Artemia salina* Lench. dan pada penelitian Akter *et al.*, (2016) menyatakan bahwa kulit batang *Xylocarpus mekongensis* yang diekstrak dengan pelarut metanol maupun kloroform memiliki aktivitas antioksidan sangat kuat. Namun penelitian mengenai uji toksisitas dan aktivitas antioksidan ekstrak kasar kulit batang mangrove jenis *Xylocarpus granatum* dengan pelarut yang berbeda pada saat maserasi secara bertingkat belum banyak ditemukan, sehingga penelitian ini dilakukan.

1.2 Rumusan Masalah

Rumusan masalah dalam penelitian ini antara lain:

1. Bagaimana pengaruh penggunaan pelarut ekstraksi yang berbeda terhadap toksisitas ekstrak kulit batang mangrove *Xylocarpus granatum*?
2. Bagaimana pengaruh penggunaan pelarut ekstraksi yang berbeda terhadap aktivitas antioksidan ekstrak kulit batang mangrove *Xylocarpus granatum*?

1.3 Tujuan Penelitian

Tujuan dari penelitian ini antara lain:

1. Mengetahui pengaruh penggunaan pelarut ekstraksi yang berbeda terhadap toksisitas ekstrak kulit batang mangrove *Xylocarpus granatum*.
2. Mengetahui pengaruh penggunaan pelarut ekstraksi yang berbeda terhadap aktivitas antioksidan ekstrak kulit batang mangrove *Xylocarpus granatum*.

1.4 Kegunaan Penelitian

Kegunaan dari penelitian ini adalah untuk mengetahui pengaruh penggunaan pelarut ekstraksi yang berbeda terhadap toksisitas dan aktivitas antioksidan dari ekstrak kulit batang mangrove *Xylocarpus granatum* sehingga dapat memberikan manfaat dan informasi keilmuan kepada masyarakat, mahasiswa, lembaga akademis atau perguruan tinggi.

1.5 Hipotesis

Hipotesis dari penelitian ini adalah:

- H_1 : 1. Perbedaan pelarut saat ekstraksi kulit batang mangrove *Xylocarpus granatum* berpengaruh pada nilai LC_{50} ekstrak.
2. Perbedaan jenis pelarut saat ekstraksi kulit batang mangrove *Xylocarpus granatum* berpengaruh pada nilai IC_{50} ekstrak.



1.6 Tempat dan Waktu Penelitian

Penelitian ini dilaksanakan di Laboratorium Keamanan Hasil Perikanan, Laboratorium Perekayasaan Hasil Perikanan, Laboratorium Reproduksi, Pemuliaan dan Pemberian Ikan Fakultas Perikanan dan Ilmu Kelautan, Universitas Brawijaya Malang serta Laboratorium Pusat Penelitian Kimia di Lembaga Ilmu dan Pengkajian Ilmiah, Serpong pada bulan Maret sampai Juni 2016.



2. TINJAUAN PUSTAKA

2.1 Klasifikasi dan Morfologi *Xylocarpus granatum*

Tumbuhan mangrove terdapat di sepanjang garis pantai di sejumlah besar lautan utama di 118 negara tropis yang memiliki fungsi sebagai pendukung berbagai jasa ekosistem, termasuk produksi perikanan dan serat, pengendalian sedimen dan perlindungan pantai dari badai atau tsunami (Donato *et al.*, 2012). Tumbuhan mangrove banyak jenisnya seperti *Rhizophora mucronata* Lamk., *Rhizophora apiculata*, *Rhizophora stylosa* Griff., *Bruguiera gymnorhiza*, *Ceriops tagal*, *Ceriops decandra*, *Avicenia marina*, *Avicenia alba*, dan *Acanthus ilicifolius* yang hidup di habitat berlumpur. *Soneratia alba* yang hidup di habitat berkarang dan korall pasir, serta *Aegiceras corniculatum* dan *Xylocarpus* dengan habitatnya yang lebih kering (Darmadi dan Ardhana, 2010).

Xylocarpus granatum merupakan spesies mangrove dari family *Meliaceae* yang dapat tumbuh tinggi hingga 25 m di bagian pesisir pantai. Daun *Xylocarpus granatum* berwarna hijau dan berbentuk oval, memiliki buah seperti jeruk besar dan berbiji. Sistem perakaran *Xylocarpus granatum* berada di atas tanah dengan pohon yang memiliki kulit kayu yang lunak, padat dan ringan dengan warna coklat terang hingga oranye (Gazali, 2014). Klasifikasi *Xylocarpus granatum* menurut Kumar *et al.*, (2014) adalah sebagai berikut :

Kingdom	: <i>Plantae</i>
Division	: <i>Tracheophyta</i>
Class	: <i>Magnoliopsida</i>
Order	: <i>Sapindales</i>
Family	: <i>Meliaceae</i>
Genus	: <i>Xylocarpus</i>
Species	: <i>Xylocarpus granatum</i>

Gambar mangrove jenis *Xylocarpus granatum* dapat dilihat pada Gambar 1.



Gambar 1. Mangrove *Xylocarpus granatum* (Dokumentasi pribadi, 2016)

2.2 Senyawa Bioaktif *Xylocarpus granatum*

Xylocarpus granatum kaya akan senyawa tanin serta flavonoid. Pada berbagai bagian dari mangrove *Xylocarpus granatum* baik pada bagian daun, kulit kayu, batang dan akar ditemukan memiliki aktivitas seperti antimikroba, antimalaria, antiulcer, antidiare, fungisida, kanker dan penyembuhan luka (Trilochana *et al.*, 2013). Flavonoid seperti catechin, epicatechin, kaempferol, 3-O- β -D-glukosida dapat ditemukan pada kulit kayu, buah dan daun dari mangrove *Xylocarpus granatum* (Kumar *et al.*, 2014).

Kulit batang dari mangrove *Xylocarpus granatum* mengandung flavonoid, triterpenoid, tanin, dan proanthocyanidin (Wangensteen *et al.*, 2013). Astringent yang terkandung pada kulit kayu mangrove *Xylocarpus granatum* dapat digunakan untuk obat penurun panas, obat disentri, diare, dan masalah perut lainnya (Lakhsmi *et al.*, 2010).

2.2.1 Alkaloid

Alkaloid banyak ditemukan pada berbagai jenis tumbuhan, baik di bagian daun, biji, ranting dan kulit kayu. Alkaloid memiliki keaktifan biologis tertentu. Alkaloid dalam bidang kesehatan dapat memberikan efek memicu kerja

sistem saraf, dapat menaikkan tekanan darah, sebagai antimikroba, dapat menjadi obat penenang dan penyakit jantung, serta dapat mengurangi rasa sakit. Pada tumbuhan, alkaloid berfungsi sebagai penguat, melindungi tumbuhan dari serangga dan hama, serta berfungsi untuk mengatur kerja hormon pada tumbuhan (Ikhlas *et al.*, 2014).

Alkaloid merupakan senyawa organik yang mempunyai satu atau lebih atom nitrogen, biasanya dalam gabungan dan sebagian dari sistem siklik. Atom nitrogen yang terkandung dalam alkaloid bersifat basa dan merupakan bagian dari cincin heterosiklik (Tango *et al.*, 2014). Alkaloid memiliki aktivitas antimikroba, antiradikal, antioksidan, antiplasmodial, antikanker dan kegiatan antimutagenik dengan spektrum yang luas (Yang *et al.*, 2012). Alkaloid mampu menginterkalasi dinding sel dan DNA sehingga dapat menghambat pertumbuhan mikroba (Awaludin *et al.*, 2011).

2.2.2 Flavonoid

Flavonoid termasuk senyawa metabolit sekunder yang paling banyak ditemukan pada jaringan tanaman. Flavonoid tergolong senyawa fenolik dengan struktur kimia C6-C3-C6. Flavonoid memiliki satu cincin aromatik A, satu cincin aromatik B, serta cincin tengah berupa heterosiklik yang mengandung oksigen. Flavonoid memiliki sifat antioksidan yang berperan dalam mencegah kerusakan sel dan komponen selular oleh radikal bebas reaktif. Aktivitas antioksidan dari flavonoid bersumber pada kemampuannya dalam mendonasikan atom hidrogen serta kemampuannya dalam mengelat logam (Redha, 2010).

Flavonoid terdiri atas antosianidin, flavonol, flavone, flavanol, flavanone, dan isoflavon. Senyawa golongan flavonol terdiri atas quercetin, kaempferol, dan myricetin, sedangkan dari golongan flavone terdiri atas apigenin dan luteolin. Flavonoid berperan dalam memproduksi pigmen berwarna kuning, merah, atau biru pada bunga (Batari, 2007).

2.2.3 Tanin

Tanin dapat ditemukan pada bagian kulit kayu jenis tumbuhan hijau, baik tumbuhan tingkat tinggi ataupun tingkat rendah dengan kadar dan kualitas yang berbeda-beda seperti pada jenis bakau-bakauan atau tanaman industri (akasia, ekaliptus, pinus). Tanin merupakan senyawa organik yang terdiri dari campuran senyawa polifenol kompleks, yang tersusun atas elemen C, H dan O. Tanin memiliki sifat dapat larut dalam air ataupun alkohol karena memiliki gugus OH. Tanin bersifat anti rayap dan jamur, serta dapat mengikat logam berat (Rinasari, 2002).

Tanin terbagi atas dua kelompok yaitu tanin terhidrolisis dan tanin terkondensasi. Tanin terhidrolisis adalah polimer *gallic* atau *ellagic acid* yang memiliki ikatan ester dengan sebuah molekul gula, sedangkan tanin terkondensasi adalah polimer senyawa flavonoid dengan ikatan karbon. Tanin memiliki kemampuan untuk menghambat pertumbuhan mikroorganisme (Jayanegara dan Sofyan, 2008).

2.2.4 Triterpenoid dan Steroid

Triterpenoid adalah senyawa metabolit sekunder yang dapat ditemukan pada bagian akar, batang, daun, buah maupun biji tanaman. Triterpenoid memiliki kerangka karbon yang berasal dari enam satuan isoprena dan diturunkan dari hidrokarbon C₃₀ asiklik yang merupakan skualena. Senyawa ini memiliki bentuk siklik ataupun asiklik, sering juga memiliki gugus alkohol, aldehida, ataupun asam karboksilat. Triterpenoid bekerja sebagai anti fungus, insektisida, anti pemangsa, anti bakteri dan anti virus pada tanaman. Triterpenoid juga digunakan sebagai obat untuk penyakit diabetes, malaria, gangguan menstruasi, gangguan kulit, dan kerusakan hati (Widiyati, 2006).

Steroid terdapat pada tumbuhan dan hewan. Steroid tumbuhan berupa alkohol dengan gugus hidroksil pada C-3 dan memiliki satu atau dua atom

tambahan. Steroid tidak larut air namun larut dalam hampir semua pelarut organik (Risnafiani *et al.*, 2015).

2.2.5 Saponin

Saponin merupakan glikosida dari campuran karbohidrat sederhana dan aglikon yang dapat ditemui pada beragam jenis tanaman. Saponin berdasarkan hasil hidrolisisnya dapat dibedakan menjadi karbohidrat dan sapogenin. Sapogenin terdiri atas saponin steroid dan saponin triterpenoid. Efek toksitas saponin lebih tinggi pada hewan berdarah dingin dari pada hewan berdarah panas (Rosida, 2002).

Saponin memiliki aktivitas antifungi, antimikroba patogen dan turunan steroid. Biosintesis saponin terdiri atas asam mevalonat yang merupakan senyawa enam karbon disintesis dari asetil ko-A. Mevalonat melepaskan CO₂ membentuk unit isoprenoid. Kemudian enam unit isoprenoid mengadakan kondensasi untuk membentuk senyawa antara yaitu skualen. Skualen lalu mengalami siklisisi untuk menghasilkan senyawa terpenoid, setelah itu senyawa terpenoid tersebut akan berikatan dengan glukosa membentuk saponin (Khristyana *et al.*, 2005).

2.2.6 Limonoid

Limonoid merupakan senyawa metabolit sekunder yang dihasilkan oleh tumbuhan dari golongan *Rutales*, khususnya dari famili *Meliaceae*. Limonoid dapat ditemukan dalam seluruh jaringan tumbuhan. Organ yang berbeda dalam satu individu dapat memproduksi jenis limonoid yang berbeda. Limonoid merupakan suatu triterpenoid dengan atau turunan dari prekursor kerangka 4,4,8-trimetil-17-furanilsteroid. Limonoid digolongkan sebagai tetranortriterpenoid. Limonoid memiliki aktivitas antifeedant dan pengendali pertumbuhan serangga (Mayanti, 2009).

Senyawa limonoid merupakan analog hormon juvenile pada serangga.

Limonoid dapat masuk ke dalam tubuh larva nyamuk dengan cara osmosis melalui kulit dan dinding tubuh. Limonoid dapat mengganggu metabolisme tubuh larva sehingga akan kekurangan energi untuk aktivitas hidupnya dan mengakibatkan kejang hingga akhirnya mati (Prijadi *et al.*, 2014).

2.3 Ekstraksi

Senyawa bioaktif pada tanaman dapat diperoleh dengan cara ekstraksi menggunakan pelarut. Ekstraksi dapat dilakukan dengan satu tahap yang hanya menggunakan satu pelarut untuk ekstraksi, sedangkan pada ekstraksi bertingkat digunakan dua atau lebih pelarut. Ekstraksi dengan pelarut dilakukan dengan cara mempertemukan bahan yang akan diekstrak dengan pelarut selama waktu tertentu yang diikuti dengan proses pemisahan filtrat dari residu bahan yang diekstrak. Prinsip ekstraksi yaitu memisahkan komponen yang ada dalam bahan yang diekstrak dengan menggunakan pelarut (Septiana dan Asnani, 2012).

Metode ekstraksi yang biasa digunakan adalah ekstraksi secara maserasi. Namun proses ekstraksi sendiri terdiri dari 2 bagian yaitu perendaman atau maserasi dan penguapan atau distilasi. Pada proses maserasi, bahan uji dihaluskan terlebih dahulu untuk kemudian direndam dalam pelarut sampai meresap dan melunakkan susunan sel, sehingga zat-zat dalam bahan uji yang mudah larut akan melarut. Proses penguapan selanjutnya dilakukan dengan tujuan untuk memperoleh ekstrak kasar dengan menguapkan pelarut yang ada dalam larutan (Korompis *et al.*, 2010).

2.4 Pelarut

Pemilihan pelarut yang akan digunakan harus memperhatikan sifat kandungan dari senyawa yang akan diisolasi. Polaritas dan gugus polar



merupakan sifat yang penting dari suatu senyawa. Dimana pada prinsipnya suatu bahan akan mudah larut dalam pelarut yang memiliki kepolaran yang sama. Pelarut yang biasanya digunakan untuk ekstraksi antara lain etanol, metanol, etil asetat, dan n-heksan (Septiana dan Asnani, 2012).

Pelarut yang digunakan untuk ekstraksi sampel harus dapat melarutkan semua zat yang terkandung dalam sampel dengan cepat, sempurna dan sedikit mungkin melarutkan bahan seperti lilin maupun pigmen, serta harus bersifat selektif. Pelarut yang dipilih baiknya memiliki titik didih yang cukup rendah agar pelarut mudah diuapkan tanpa menggunakan suhu tinggi. Selain itu, pelarut tidak boleh larut dalam air dan harus bersifat inert agar tidak bereaksi dengan komponen sampel ekstrak. Harga pelarut harus serendah mungkin, serta tidak mudah terbakar (Munawaroh dan Handayani, 2010).

2.4.1 N-heksan

Heksan merupakan senyawa hidrokarbon alkana. Heksan memiliki rumus kimia C_6H_{14} . Awalan heks- merujuk pada enam atom karbon yang ada pada heksan sedangkan akhiran -ana berasal dari alkana yang menunjukkan adanya ikatan tunggal penghubung atom-atom karbon. Pada keadaan standar, n-heksan merupakan cairan tak berwarna yang tidak larut dalam air. Bobot molekul n-heksan sebesar 86,2 gram/mol. N-heksan memiliki titik lebur sebesar -95°C, titik didih 69°C (pada 1 atm) dan densitasnya sebesar 0,6603 gr/ml pada 20°C (Munawaroh dan Handayani, 2010).

N-heksan merupakan pelarut yang paling ringan dalam mengangkat minyak yang terkandung dalam biji-bijian. N-heksan mudah menguap, sehingga memudahkan untuk refluks (Susanti *et al.*, 2012). Pelarut n-heksan mampu menarik senyawa bioaktif yang memiliki kepolaran sama dengan n-heksan (Purnamasari *et al.*, 2013).

2.4.2 Etil Asetat

Etil asetat termasuk jenis pelarut yang bersifat semi polar dan mempunyai titik didih sebesar 77°C (Susanti *et al.*, 2012). Etil asetat merupakan ester yang berasal dari etanol dan asam asetat. Etil asetat bersifat volatil, tidak beracun, dan tidak higroskopis dan sering digunakan sebagai pelarut karena kemampuannya dalam menyari senyawa-senyawa yang memiliki aktivitas antibakteri seperti fenol dan flavonoid pilohidroksi (Mulyati, 2009).

Etil asetat memiliki ciri fisik berupa cairan jernih, tak berwarna, dan berbau khas. Pelarut etil asetat memiliki koefisien distribusi yang lebih tinggi bila dibandingkan dengan pelarut etanol, termasuk jika didasarkan pada kelarutannya dalam gasoline. Etil asetat dapat dibuat dengan memanaskan etanol dan asam asetat glasial serta kemudian ditambahkan katalis berupa asam sulfat (Liza *et al.*, 2015).

2.4.3 Metanol

Metanol banyak digunakan sebagai pelarut untuk proses isolasi senyawa organik (Susanti *et al.*, 2012). Metanol dapat melarutkan zat yang bersifat polar dan nonpolar karena memiliki gugus polar (-OH) dan gugus nonpolar (-CH₃). Metanol dapat menarik senyawa bioaktif seperti alkaloid, flavonoid, steroid dan saponin (Astarina *et al.*, 2013).

Metanol merupakan bentuk alkohol paling sederhana dan sering disebut sebagai metil alkohol, wood alcohol atau spiritus. Metanol memiliki rumus kimia CH₃OH dengan ciri-ciri berbentuk cairan yang ringan, mudah menguap, tidak berwarna, mudah terbakar, sangat larut dalam air, dan beracun dengan bau yang khas (berbau lebih ringan daripada etanol). Massa molar metanol yaitu sebesar 32,04 g/mol dengan titik lelehnya sebesar -97 °C serta titik didihnya sebesar 64,7 °C (Nurul dan Zuliyana, 2010).

2.5 Uji Fitokimia

Fitokimia adalah ilmu pengetahuan yang membahas mengenai aspek kimia dari tanaman. Analisis fitokimia dilakukan untuk menentukan ciri senyawa bioaktif suatu ekstrak kasar tanaman yang diduga mempunyai efek farmakologis dan bermanfaat jika diuji lanjut pada sistem biologi (Ika, 2013). Analisis fitokimia merupakan analisis kualitatif. Menurut Susanty (2014), uji fitokimia penting dilakukan sebagai tahap pendahuluan untuk mengungkap potensi sumber daya tumbuhan yang memiliki sifat obat, baik sebagai antibiotik, antioksidan dan antikanker.

Pelarut dan metode ekstraksi berperan penting dalam uji fitokimia. Uji fitokimia merupakan pengujian secara kualitatif dengan melakukan suatu pengujian reaksi warna (Artini *et al.*, 2013). Uji fitokimia biasanya meliputi uji terhadap adanya senyawa alkaloid, fenolik, flavonoid, tanin, steroid, triterpenoid dan saponin.

2.6 Uji Total Fenol

Fenol adalah senyawa bioaktif yang memiliki sebuah cincin aromatik dengan satu atau lebih gugus hidroksil. Standar uji total fenol menggunakan asam galat. Asam galat bersifat stabil, memiliki sensitivitas tinggi, dan harganya terjangkau. Kandungan fenolik dari standar asam galat maupun sampel tanaman dapat ditentukan dengan menggunakan metode Folin-Ciocalteau (Dyah, 2015). Penentuan total fenol dengan metode Folin-Ciocalteu dilakukan berdasarkan kemampuan reagen Folin-Ciocalteu dalam mengoksidasi gugus hidroksil (OH-) dari senyawa fenolik. Senyawa fenolik mampu mereduksi fosfomolibdat fosfotungstat yang terkandung dalam reagen Folin-Ciocalteu sehingga membentuk molibdenum yang berwarna biru (Rumayati *et al.*, 2014).

Pengujian total fenol digunakan untuk menentukan total senyawa fenolik yang terkandung di dalam sampel. Pengujian total fenol merupakan dasar dilakukannya pengujian aktivitas antioksidan, karena diketahui bahwa senyawa fenolik berperan dalam mencegah terjadinya peristiwa oksidasi. Bila kandungan senyawa fenolik di dalam sampel tinggi, maka diduga aktivitas antioksidannya juga akan tinggi (Yulia, 2007).

2.7 Uji Toksisitas

Setiap zat kimia yang baru di isolasi ataupun ditemukan, harus terlebih dahulu dilakukan penelitian mengenai sifat ketoksikannya sebelum dianjurkan untuk digunakan secara luas (Nisfi, 2010). Pengujian toksisitas suatu sampel uji dilakukan dengan tujuan untuk mendeteksi efek toksik suatu zat pada sistem biologi. Uji toksisitas biasanya menggunakan hewan uji sebagai suatu model uji yang berguna untuk melihat adanya reaksi biokimia, fisiologik dan patologik pada manusia terhadap suatu sediaan sampel uji (Syamsudin, 2014).

Salah satu metode uji toksisitas senyawa bahan alam adalah *brine shrimp lethality test*. *Brine shrimp lethality test* (BSLT) merupakan uji toksisitas awal suatu ekstrak bahan alam sebelum dilakukan uji aktivitas lainnya. Hasil uji toksisitas dengan metode BSLT dapat digunakan untuk menentukan batas atau kisaran konsentrasi ekstrak yang digunakan pada uji aktivitas (Fitriyani, 2009).

2.7.1 Brine Shrimp Lethality Test

Brine Shrimp Lethality Test (BSLT) merupakan metode skrining untuk mengetahui ketoksikan suatu ekstrak bahan alam. Toksisitas dari suatu ekstrak bahan alam bisa diketahui berdasarkan jumlah larva *Artemia salina* Leach yang mati karena pengaruh adanya ekstrak bahan alam pada konsentrasi yang diberikan. Metode ini dilakukan dengan menentukan besarnya nilai LC₅₀. LC₅₀ adalah nilai yang menunjukkan besarnya konsentrasi dari suatu bahan uji yang

mampu menyebabkan 50% dari total jumlah hewan uji mati setelah perlakuan 24 jam. Data persen kematian hewan uji yang diperoleh dianalisa menggunakan probit analisis sehingga nilai LC₅₀ dapat diketahui. Apabila nilai LC₅₀ dari masing-masing ekstrak bahan alam kurang dari 1000 µg/ml maka dapat disimpulkan kalau ekstrak tersebut memiliki aktivitas biologik (Nisfi, 2010).

Metode BSLT sering digunakan untuk penapisan awal terhadap senyawa aktif yang terkandung dalam suatu ekstrak karena metodenya sederhana, cepat dan mudah pengjerajannya serta hasilnya dapat dipercaya. Secara umum senyawa yang bersifat sitotoksik juga menunjukkan sifat toksiknya terhadap *Artemia salina* (Fathiyawati, 2008). Namun, nilai LC₅₀ yang di dapat tidak bisa digunakan sebagai batas konsentrasi untuk konsumsi dan perlu dilakukan penelitian lebih lanjut secara *in vivo* untuk menentukan nilai LD₅₀ ekstrak sehingga keamanannya dapat diketahui secara pasti dengan tujuan untuk dikonsumsi lebih lanjut sebagai obat (Fitriyani, 2009).

2.7.2 *Artemia salina* Lench

Artemia salina Leach. atau *brine shrimp* adalah sejenis udang-udangan primitif yang diberi nama *Cancer salinus* oleh Linnaeus pada tahun 1778, dan pada tahun 1819 diubah oleh Leach menjadi *Artemia salina*. Hewan ini hidup planktonik pada perairan yang memiliki kadar garam tinggi yaitu berkisar antara 15-300 per mil dengan suhu perairannya berkisar antara 25-30°C, oksigen terlarut dalam perairan sekitar 3 mg/L dan memiliki pH antara 7,3–8,4. *Artemia salina* Leach. dapat digunakan dalam uji yang bersifat laboratoris dengan tujuan untuk mendeteksi toksitas dari suatu senyawa ekstrak tumbuhan (Nisfi, 2010). *Artemia salina* memiliki sifat peka terhadap bahan uji, waktu siklus yang cepat, mudah dibiakkan, dan murah (Fitriyani, 2009).

Artemia diperdagangkan dalam bentuk telur istirahat atau kista yang berbentuk bulatan-bulatan kecil berwarna coklat dengan berat per telurnya 3,6

mikrogram dan diameternya sekitar 300 mikron. Saat menetas, berat *Artemia* hanya sekitar 15 mikrogram dan panjangnya 0,4 mm. Kista yang berkualitas baik akan menetas sekitar 18-24 jam apabila diinkubasi dalam air bersalinitas 5-7/mil dan menjadi nauplius yang berwarna oranye, berbentuk bulat lonjong dengan panjang sekitar 400 mikron, lebar 170 mikron, dan berat 0,002 mg. Nauplius kemudian berkembang dan mengalami pergantian kulit menjadi instar (Fathiyawati, 2008).

2.8 Uji Aktivitas Antioksidan

Reactive oxygen species (ROS) atau radikal bebas adalah atom atau molekul yang memiliki satu atau lebih elektron tidak berpasangan dan dapat terbentuk karena adanya paparan sinar matahari serta udara. Radikal bebas dapat menyebabkan terjadinya oksidasi biomolekul sel sehingga sel menjadi rusak dan mati. Radikal bebas membutuhkan elektron dari molekul donor ke molekul radikal agar radikal tersebut menjadi stabil. Senyawa antioksidan mampu mendonasikan sebuah elektron sehingga dapat menetralkan kehadiran radikal bebas ataupun ROS (Nursid *et al.*, 2013).

Antioksidan sangat bermanfaat bagi kesehatan yaitu untuk mencegah penyakit kanker dan tumor, penyempitan pembuluh darah, dan penuaan dini. Antioksidan juga berperan penting untuk mencegah terjadinya proses oksidasi pada produk pangan. Antioksidan dibagi menjadi 3 golongan, yaitu antioksidan preventif (enzim superoksida dismutase, katalase, glutation peroksidase), antioksidan primer (vitamin A, fenolat, flavonoid, katekin, kuersetin), dan antioksidan komplementer (vitamin C, β -karoten, retinoid) (Tamat *et al.*, 2007). Aktivitas antioksidan dari suatu ekstrak tanaman dapat di uji dengan menggunakan metode DPPH (*1,1-diphenyl-2-picrylhydrazil*).

Metode DPPH menggunakan larutan DPPH (*1,1-diphenyl-2-picrylhydrazil*) sebagai radikal bebasnya, dan akan bereaksi dengan senyawa antioksidan sehingga berubah menjadi *1,1-diphenyl-2-picrylhydrazin* yang bersifat non-radikal. Peningkatan jumlah *1,1-diphenyl-2-picrylhydrazin* akan ditandai dengan berubahnya warna ungu tua menjadi warna merah muda atau kuning pucat dan dapat diamati menggunakan spektrofotometer. Aktivitas antioksidan sampel ditentukan oleh besarnya hambatan absorbansi radikal bebas DPPH melalui perhitungan tingkat inhibisi serapan DPPH. Rumus tingkat inhibisi dan nilai IC₅₀ dihitung menggunakan rumus persamaan regresi linier. Suatu senyawa dikatakan sebagai antioksidan kuat jika nilai IC₅₀ berkisar antara 51-100, sedang jika nilai IC₅₀ sebesar 101-150, dan lemah jika nilai IC₅₀ sebesar 151-200 (Pramesti, 2013). Uji DPPH memiliki beberapa kelebihan antara lain merupakan metode uji aktivitas antioksidan yang sederhana, cepat, dan murah. Namun uji DPPH tidak spesifik untuk mengetahui komponen senyawa antioksidan yang terkandung dalam sampel uji dan hanya digunakan untuk pengukuran kapasitas antioksidan dan membantu untuk memahami sifat-sifat fungsional total pada sampel uji tersebut (Yulia, 2007).

2.9 LC-MS (*Liquid Cromatography-Mass Spectrometry*)

Metode LC-MS merupakan metode pemisahan dan identifikasi senyawa obat atau senyawa organik. Metode ini sangat sensitif dan selektif dibandingkan metode deteksi dengan sinar UV biasa (Purwanto, 2011). Kelebihan dari teknologi LC-MS adalah hasil analisanya khas dan spesifik karena menggunakan spectrometer massa sebagai detector. Aplikasi dari teknologi ini luas dengan sistem yang praktis, tidak terbatas pada molekul volatile dan mampu mengukur analit yang sangat polar. Pengujian dengan metode ini juga fleksibel dengan

waktu singkat, serta dapat menghasilkan data kuantitatif maupun kualitatif (Karisma, 2012).

LC-MS merupakan perpaduan HPLC dengan MS (LC-MS). Analisa dengan metode LC-MS menggunakan fasa gerak atau pelarut untuk membawa sampel melalui kolom yang berisi padatan pendukung yang dilapisi cairan sebagai fasa diam. Analit selanjutnya dipartisi di antara fasa gerak dan fasa diam sehingga terjadi pemisahan karena adanya perbedaan koefisien partisi. Sampel yang telah dipisahkan dalam kolom diuapkan pada suhu tinggi, kemudian diionisasi. Ion yang terbentuk difragmentasi sesuai dengan rasio massa/muatan (m/z), yang selanjutnya dideteksi secara elektrik menghasilkan spektra massa. Spektra massa merupakan rangkaian puncak-puncak yang berbeda-beda tingginya (Hermiastuti, 2013).



3. METODE PENELITIAN

3.1 Materi Penelitian

3.1.1 Bahan Penelitian

Bahan yang digunakan dalam penelitian ini adalah kulit batang mangrove *Xylocarpus granatum* yang diperoleh dari Kawasan Hutan Mangrove Pancer Cengkrong, Trenggalek, Jawa Timur. Kulit batang di ambil dari bagian dahan pohon mangrove *Xylocarpus granatum* yang berumur kisaran 5 sampai 10 tahun dengan diameter batang \pm 5 cm. Menurut Gazali (2014), kulit batang mangrove *Xylocarpus granatum* sifatnya lunak, padat dan ringan dengan warna coklat terang hingga oranye.

Penelitian ini terdiri dari beberapa tahapan yaitu proses ekstraksi sampel, uji kadar air, uji fitokimia, uji total fenol, uji toksisitas, uji aktivitas antioksidan dan identifikasi senyawa bioaktif dengan uji *Liquid Chromatograph Mass Spectrometry* (LC-MS). Bahan-bahan yang digunakan pada proses ekstraksi senyawa bioaktif pada sampel meliputi pelarut n-heksan, etil asetat, metanol, kertas saring, plastik wrap, alumunium foil dan kertas label. Setelah memperoleh ekstrak kasar, maka dilakukan pengujian kadar air lalu uji fitokimia menggunakan bahan-bahan antara lain aquades, H_2SO_4 , HCl, pereaksi Meyer, $FeCl_3$ 1%, serbuk magnesium, asam asetat anhidrat dan kertas label. Pada pengujian total fenol menggunakan bahan antara lain aquades, asam galat, pereaksi folin ciocelteau 50%, Na_2CO_3 5%, metanol, plastik wrap, kertas saring, alumunium foil, dan kertas label. Pada pengujian toksisitas menggunakan bahan antara lain air laut, dan starter indukan telur *Artemia salina* Lench. Pada pengujian aktivitas antioksidan menggunakan bahan antara lain metanol, DPPH, alumunium foil, asam askorbat dan kertas label.

3.1.2 Alat Penelitian

Alat yang digunakan dalam penelitian ini terdiri dari alat-alat untuk ekstraksi sampel kulit batang mangrove *Xylocarpus granatum* yang terdiri atas timbangan digital, *rotary evaporator*, gelas ukur, erlenmeyer, beaker glass, botol kaca, spatula dan corong. Alat yang digunakan untuk pengujian kadar air adalah botol timbang, oven, crushable tang, desikator, dan timbangan analitik. Alat untuk uji fitokimia yaitu tabung reaksi, rak tabung reaksi, beaker glass, pipet tetes, pipet volume, gelas ukur, spatula, labu ukur, bola hisap dan timbangan digital. Pada pengujian total fenol menggunakan alat gelas ukur, labu ukur, beaker glass, pipet volume, timbangan analitik, spatula, botol vial, bola hisap dan spektrofotometri UV-Vis. Pada pengujian toksisitas menggunakan alat timbangan digital, mikro pipet, spatula, corong, botol vial, beaker glass, gelas ukur, aerator, selang, cover glass, bola hisap, pipet serelogis, pipet tetes dan pipet volume. Pada pengujian aktivitas antioksidan menggunakan alat gelas ukur, beaker glass, botol vial, pipet serelogis, pipet volume, mikro pipet, bola hisap, pipet tetes, spatula, spektrofotometri UV-Vis, serta instrument LC-MS untuk uji pendugaan senyawa bioaktif pada sampel ekstrak yang memiliki aktivitas toksik dan antioksidan.

3.2 Metode Penelitian

Metode merupakan suatu kerangka kerja untuk melakukan suatu tindakan atau juga dapat disebut sebagai kerangka berpikir dalam menyusun suatu gagasan dengan maksud dan tujuan tertentu. Penelitian merupakan suatu kegiatan mengkaji secara teliti dan teratur dalam suatu bidang ilmu tertentu yang menurut pada suatu kaidah yang disebut metode (Notohadiprawiro, 2006).

Metode yang digunakan dalam penelitian ini adalah metode eksperimen yang bersifat laboratoris. Penelitian dilakukan secara sengaja dengan cara memberikan perlakuan tertentu terhadap subjek penelitian guna membangkitkan

sesuatu kejadian atau keadaan yang akan diteliti untuk diketahui bagaimana akibatnya (Jaedun, 2011).

3.2.1 Variabel Penelitian

Variabel merupakan gejala yang dapat diukur menurut objektivitas, reabilitas dan validitas ilmiah. Dilihat dari peran dan posisinya, variabel dibagi atas variable bebas dan terikat. Variabel bebas merupakan variabel penjelas, penentu dan penduga, sedangkan variabel terikat adalah variabel konsekuensi atau akibat (Suryana, 2010).

Variabel bebas dari penelitian ini adalah pelarut ekstraksi yang berbeda dengan pola ekstraksi bertingkat yaitu dari pelarut non polar (*n*-heksan), pelarut semi polar (etil asetat), dan pelarut polar (metanol). Perbedaan konsentrasi larutan ekstrak yang digunakan dalam penelitian ini tidak termasuk dalam perlakuan karena hasil paparan masing-masing konsentrasi untuk tiap pelarut diakumulasikan menjadi satu menghasilkan persentase nilai LC₅₀ dan IC₅₀.

Variabel terikat pada penelitian ini adalah nilai LC₅₀ dengan menggunakan analisa probit yang diperoleh dari pengujian toksisitas dengan menggunakan hewan uji *Artemia salina* Lench dengan metode BSLT, dan nilai IC₅₀ yang di peroleh dari pengujian aktivitas antioksidan sampel dengan metode DPPH.

3.2.2 Rancangan Penelitian

Rancangan percobaan yang digunakan dalam penelitian ini adalah Rancangan Acak Lengkap (RAL). Rancangan acak lengkap digunakan untuk percobaan yang mempunyai media atau tempat percobaan yang seragam atau homogen. Data hasil penelitian dianalisis dengan menggunakan ANOVA (*Analysis of Variance*) untuk mengetahui pengaruh perlakuan terhadap respon parameter yang dilakukan dengan uji F pada taraf kepercayaan 95% ($\alpha=5\%$).

Apabila nilai F_{hitung} > dari F_{tabel} maka dapat dilakukan uji lanjut, salah satunya dengan uji BNT (Beda Nyata Terkecil) (Sastrosupadi, 2000).

Kulit batang mangrove *Xylocarpus granatum* diekstrak dengan metode maserasi secara bertingkat dengan menggunakan pelarut yang berbeda kepolarannya, yaitu dimulai dari pelarut non polar (n-heksan), semi polar (etil asetat) dan polar (metanol) yang dilanjutkan dengan proses penguapan pelarut hingga menghasilkan 3 ekstrak (n-heksan, etil asetat dan metanol). Adapun rancangan penelitian utama dapat dilihat pada Tabel 1.

Tabel 1. Rancangan Penelitian Utama

Perlakuan	Ulangan						Total	Rata-rata
	1	2	3	4	5	6		
A								
B								
C								

Keterangan:

- A : Ekstraksi sampel dengan pelarut n-heksan (ekstrak n-heksan kulit batang)
- B : Ekstraksi residu n-heksana dengan pelarut etil asetat (ekstrak etil asetat kulit batang)
- C : Ekstraksi residu etil asetat dengan pelarut metanol (ekstrak metanol kulit batang)

3.2.3 Parameter Uji

Parameter uji pada penelitian ini adalah parameter uji kuantitatif, yaitu berdasarkan data yang diperoleh dari hasil perhitungan probit nilai LC_{50} dan perhitungan nilai IC_{50} dari masing-masing ekstrak. Nilai LC_{50} menunjukkan besarnya konsentrasi suatu bahan uji yang dapat menyebabkan 50% dari total jumlah hewan uji mati setelah perlakuan 24 jam. Data tersebut dianalisis menggunakan probit analisis untuk mengetahui nilai LC_{50} . Jika nilai LC_{50} masing-masing ekstrak senyawa uji kurang dari 1000 $\mu\text{g/mL}$ maka dianggap memiliki aktivitas biologik (Nisfi, 2010). Sedangkan nilai IC_{50} merupakan konsentrasi

larutan sampel yang mampu mereduksi 50% aktivitas DPPH (Ika, 2013).

Penelitian ini juga terdiri atas parameter uji berupa nilai rendemen, kadar air, fitokimia ekstrak, total fenol serta pendugaan senyawa bioaktif pada ekstrak dengan uji LC-MS.

3.3 Prosedur Penelitian

Penelitian ini diawali dengan proses preparasi sampel kulit batang *Xylocarpus granatum* dengan tiga macam bentuk sampel, yaitu sampel kulit batang *Xylocarpus granatum* segar, kulit batang *Xylocarpus granatum* kering, dan tepung kulit batang *Xylocarpus granatum*. Sampel tersebut kemudian diekstraksi secara maserasi bertingkat dan dihitung persen rendemen ekstraknya. Sampel yang memiliki nilai persen rendemen tertinggi akan dipilih sebagai sampel untuk dilanjut seperti uji kadar air, fitokimia, total fenol, toksisitas, aktivitas antioksidan dan pendugaan senyawa bioaktif yang memiliki aktivitas toksik dan antioksidan dengan uji *Liquid Chromatograph Mass Spectrometry* (LC-MS).

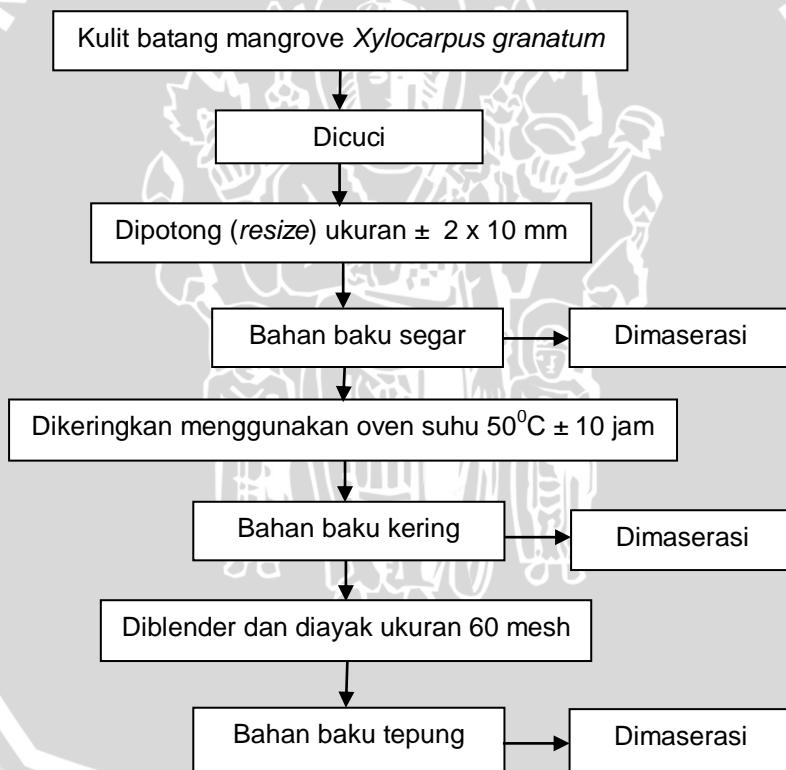
3.3.1 Preparasi Sampel (modifikasi Awaludin *et al.*, 2011)

Preparasi bahan baku meliputi pengumpulan bahan, pencucian kulit batang *Xylocarpus granatum* dengan air mengalir dan proses pengecilan ukuran bahan dengan pisau hingga menjadi bentuk persegi panjang ukuran sekitar 2 mm x 10 mm yang digunakan sebagai sampel dalam bentuk segar. Preparasi untuk sampel dalam bentuk kering yaitu setelah proses pencucian dan proses pengecilan ukuran dilanjutkan dengan proses pengeringan sampel dengan oven suhu 50°C kurang lebih selama 10 jam hingga kandungan air bahan sekitar 15%. Menurut Winangsi *et al.*, (2013) pengeringan menggunakan oven pada suhu 50°C memiliki kadar air paling rendah jika dibandingkan dengan pengeringan



sinar matahari langsung dan kering angin. Semakin rendah kandungan kadar air bahan maka semakin tinggi rendemen zat lain yang terekstrak.

Preparasi untuk sampel dalam bentuk tepung setelah proses pengeringan dilanjutkan dengan proses penghalusan sampel kering dengan blender dan disaring dengan ayakan ukuran 60 mesh. Menurut Maulida dan Guntarti (2015), ukuran partikel yang tersaring oleh mesh 60 merupakan ukuran partikel kecil. Hal ini dapat membuat serbuk simplisia memiliki permukaan untuk kontak dengan pelarut lebih luas dan akan memaksimalkan kesempatan pelarut untuk mengekstraksi senyawa aktif yang terkandung dalam simplisia. Skema kerja preparasi sampel dapat dilihat pada Gambar 2.



Gambar 2. Skema Kerja Preparasi Sampel

3.3.2 Ekstraksi Sampel (Fathonah, 2016)

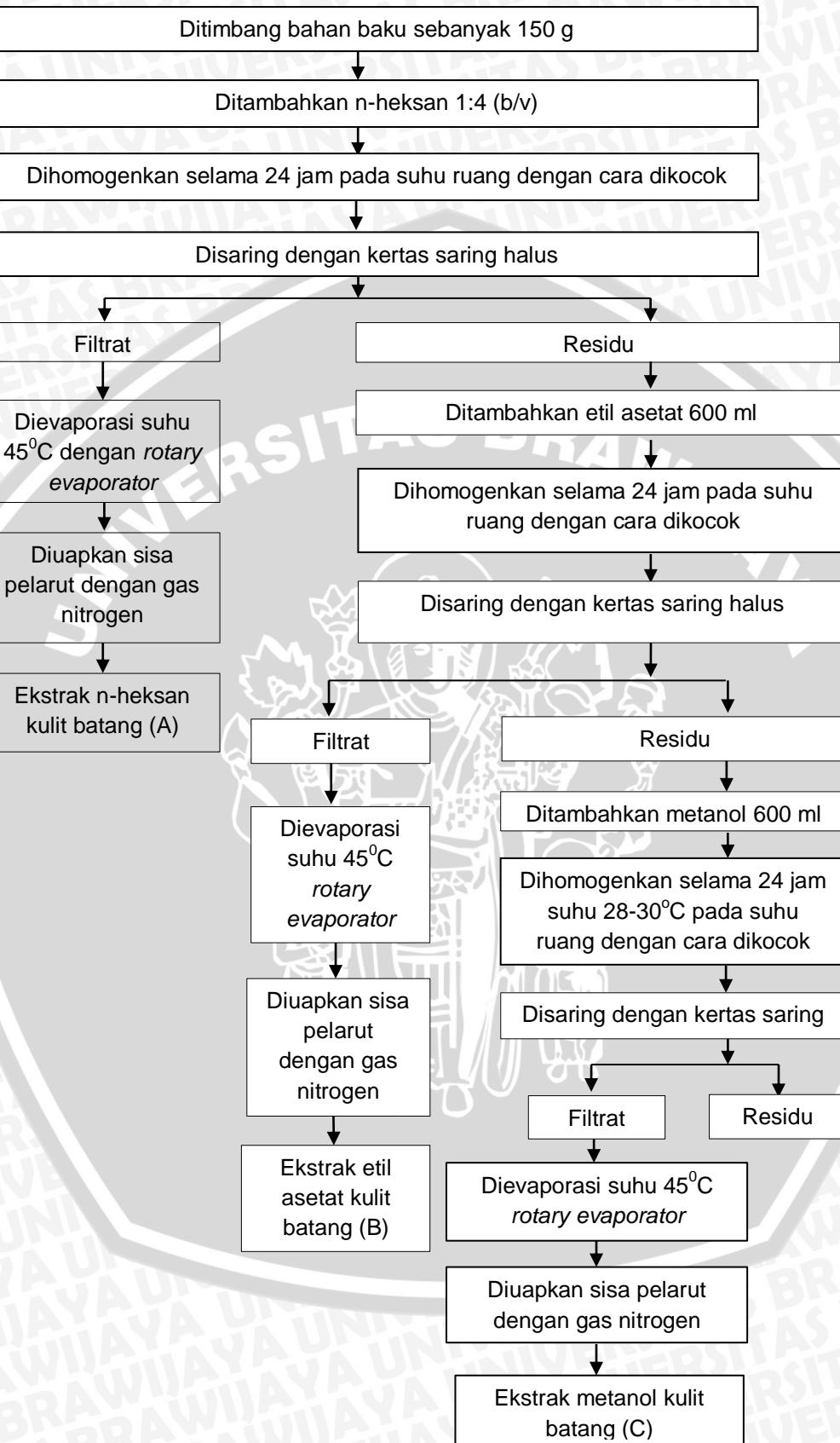
Ekstraksi sampel menggunakan metode maserasi bertingkat. Menurut Wullur *et al.*, (2013) metode maserasi memiliki kelebihan antara lain

pengerjaannya lebih mudah dengan menggunakan peralatan yang sederhana.

Proses maserasi juga sangat menguntungkan dalam ekstraksi senyawa bahan alam karena dengan adanya proses perendaman sampel tumbuhan maka akan menyebabkan dinding dan membran sel tumbuhan pecah karena adanya perbedaan tekanan antara didalam dan diluar sel, sehingga metabolit sekunder yang ada didalam sitoplasma akan terlarut dalam pelarut organik. Pelarut yang digunakan adalah n-heksan, etil asetat, dan metanol. Prinsip pemilihan pelarut adalah *like dissolve like*, artinya pelarut polar akan melarutkan senyawa polar dan pelarut non-polar akan melarutkan senyawa non-polar. Menurut Taroreh *et al.*, (2015) senyawa bioaktif tumbuhan memiliki afinitas yang berbeda-beda terhadap sifat polaritas pelarut, karena itu untuk mengekstrak senyawa bioaktif dalam jaringan tumbuhan sebaiknya menggunakan pelarut yang berbeda-beda tingkat polaritasnya dan bertingkat dari kurang polar ke polar, sehingga diharapkan dapat memisahkan komponen-komponen berdasarkan polaritasnya.

Sampel kulit batang *Xylocarpus granatum* dalam bentuk segar, kering dan tepung masing-masing ditimbang sebanyak 150 g dan dimasukkan kedalam botol kaca. Kemudian ditambahkan pelarut non polar yaitu n-heksan sebanyak 600 ml (1:4 b/v). Botol kaca dengan segera ditutup dan di bungkus dengan alumunium foil. Sampel dan pelarut dalam botol kaca tersebut dihomogenkan selama 24 jam pada suhu ruang (28-30°C) dengan cara sesering mungkin dikocok menggunakan tangan. Menurut Khoirani (2013), kegiatan pengocokan dilakukan untuk mempercepat melarutnya bahan yang terkandung dalam sel simplisia yang mungkin mengalami kerusakan akibat penghalusan sampel dan juga bertujuan untuk mempercepat proses ekstraksi bahan dalam sel simplisia yang masih utuh. Hasil maserasi sampel dalam pelarut n-heksan disaring dengan kertas saring halus dan menghasilkan filtrat dan residu. Selanjutnya filtrat dipisahkan dari pelarutnya menggunakan *rotary vacuum evaporator* suhu 45°C

sehingga diperoleh ekstrak n-heksan kulit batang (A) dan sisa pelarut pada ekstrak diuapkan kembali dengan gas nitrogen. Residu dari ekstrak n-heksan kulit batang dimaserasi kembali dengan pelarut etil asetat sebanyak 600 ml dan dihomogenkan selama 24 jam pada suhu ruang. Kemudian disaring hingga diperoleh filtrat dan residu. Filtrat selanjutnya dipisahkan dengan pelarutnya menggunakan *rotary vacuum evaporator* suhu 45°C sehingga diperoleh ekstrak etil asetat kulit batang (B), dan sisa pelarut pada ekstrak diuapkan kembali dengan gas nitrogen. Residu dari ekstrak etil asetat kulit batang dimaserasi kembali dengan pelarut metanol sebanyak 600 ml dan dihomogenkan selama 24 jam pada suhu ruang. Kemudian disaring hingga diperoleh filtrat dan residu. Filtrat selanjutnya dipisahkan dengan pelarutnya menggunakan *vacuum rotary evaporator* suhu 45°C sehingga diperoleh ekstrak metanol kulit batang (C) dan sisa pelarut pada ekstrak diuapkan kembali dengan gas nitrogen. Skema kerja ekstraksi sampel kulit batang *Xylocarpus granatum* dapat dilihat pada Gambar 3.



Gambar 3. Skema Kerja Ekstraksi Sampel (Segar, Kering, Tepung)

3.3.3 Perhitungan Rendemen (Yulia, 2007)

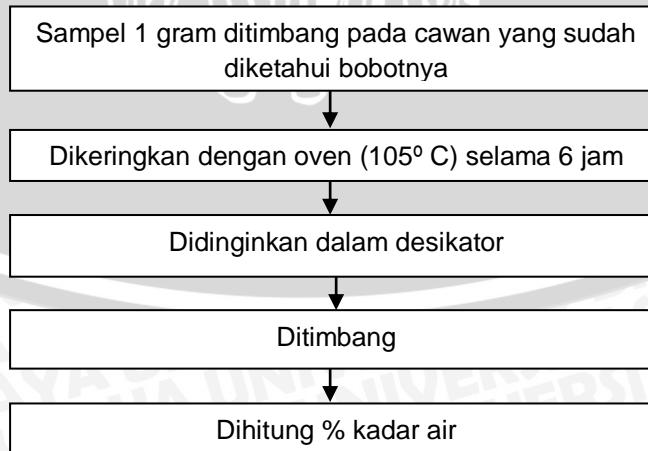
Nilai perhitungan rendemen menunjukkan jumlah ekstrak sampel yang diperoleh dari setiap gram sampel yang diekstrak (%w/w). Rendemen dari masing-masing ekstrak kulit batang *Xylocarpus granatum* dihitung menggunakan rumus perhitungan rendemen sebagai berikut:

$$\% \text{ rendemen} = \frac{\text{berat ekstrak}}{\text{berat sampel yang diekstrak}} \times 100\%$$

3.3.4 Uji Kadar Air (Legowo et al., 2004)

Uji kadar air dilakukan menggunakan metode oven kering (metode termogravimetri). Prinsip penghitungan kadar air dengan metode ini didasarkan pada selisih bobot bahan (sampel) sebelum dan sesudah pengeringan. Selisih bobot tersebut merupakan air yang teruapkan dan dihitung sebagai kadar air bahan. Skema uji kadar air ekstrak kulit batang mangrove *Xylocarpus granatum* dapat dilihat pada Gambar 4. dan rumus perhitungan kadar air bahan sebagai berikut:

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



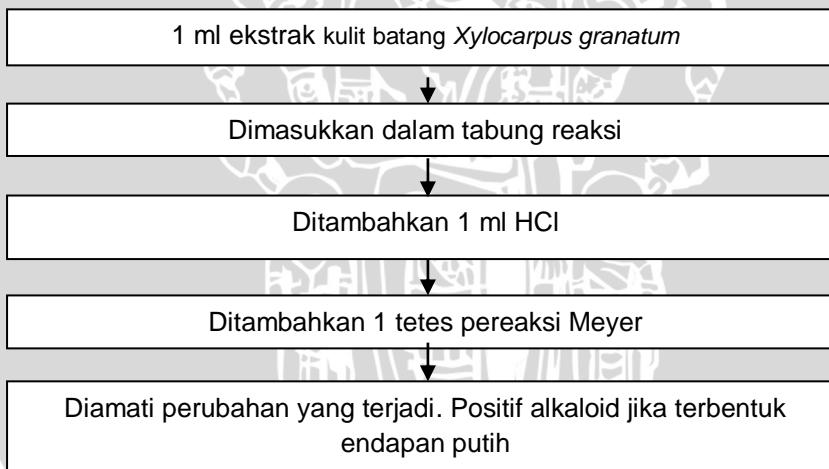
Gambar 4. Skema Uji Kadar Air Ekstrak Kulit Batang Mangrove *Xylocarpus granatum*

3.3.5 Uji Fitokimia

Uji fitokimia merupakan tahap selanjutnya dari penelitian ini. Menurut Artini *et al.*, (2013), uji fitokimia penting dilakukan untuk mengetahui komponen bioaktif yang terkandung dalam suatu sampel tumbuhan yang sedang diteliti. Uji fitokimia yang dilakukan meliputi uji alkaloid, flavonoid, tanin, steroid dan triterpenoid, serta saponin.

- **Uji Alkaloid (Harborne, 1987)**

Identifikasi senyawa alkaloid pada ekstrak kulit batang *Xylocarpus granatum* menggunakan prinsip mereaksikan ekstrak sampel dengan HCl dan pereaksi Meyer. Hasil positif uji alkaloid pada pereaksi Meyer ditandai dengan terbentuknya endapan putih. Skema uji alkaloid pada ekstrak kulit batang *Xylocarpus granatum* dapat dilihat pada Gambar 5.

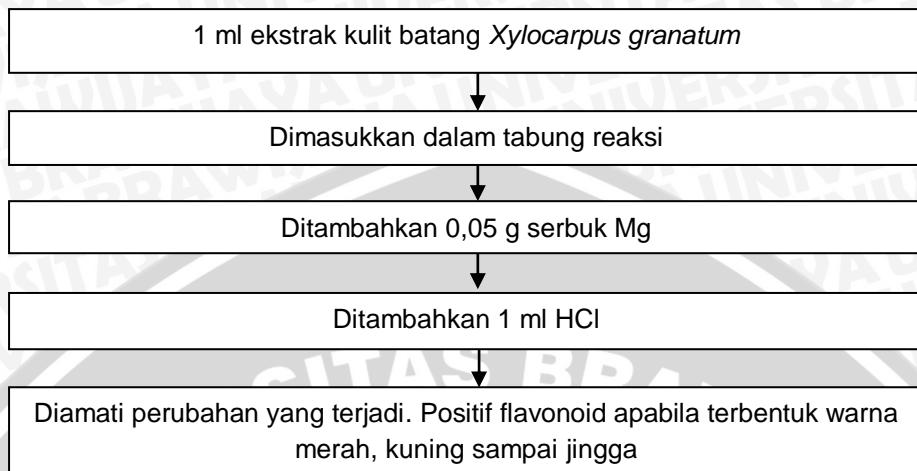


Gambar 5. Skema Uji Alkaloid Ekstrak Kulit Batang *Xylocarpus granatum*

- **Uji Flavonoid (Harborne, 1987)**

Uji flavonoid pada ekstrak kulit batang *Xylocarpus granatum* menggunakan pereaksi antara lain serbuk Mg dan HCl. Hasil uji sampel positif mengandung flavonoid apabila terbentuk warna kuning sampai jingga. Skema uji

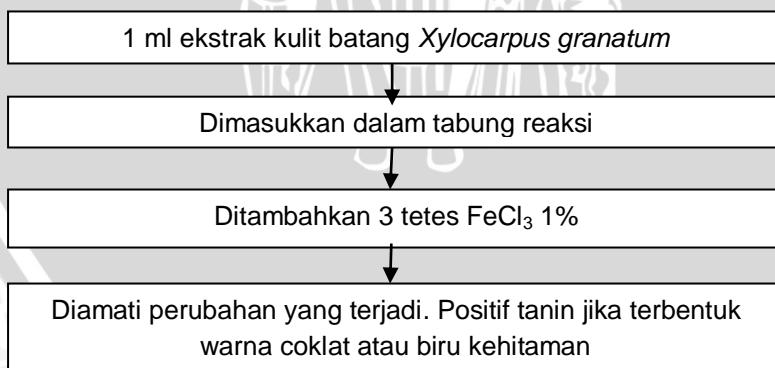
flavonoid pada ekstrak kulit batang *Xylocarpus granatum* dapat dilihat pada Gambar 6.



Gambar 6. Skema Uji Flavonoid Ekstrak Kulit Batang *Xylocarpus granatum*

- **Uji Tanin (Harborne, 1987)**

Uji tanin pada ekstrak kulit batang *Xylocarpus granatum* menggunakan reaksi FeCl_3 . Penambahan larutan FeCl_3 pada sampel ekstrak akan memberikan hasil positif mengandung tanin jika terbentuk warna coklat atau biru kehitaman. Skema uji tanin pada ekstrak kulit batang *Xylocarpus granatum* dapat dilihat pada Gambar 7.

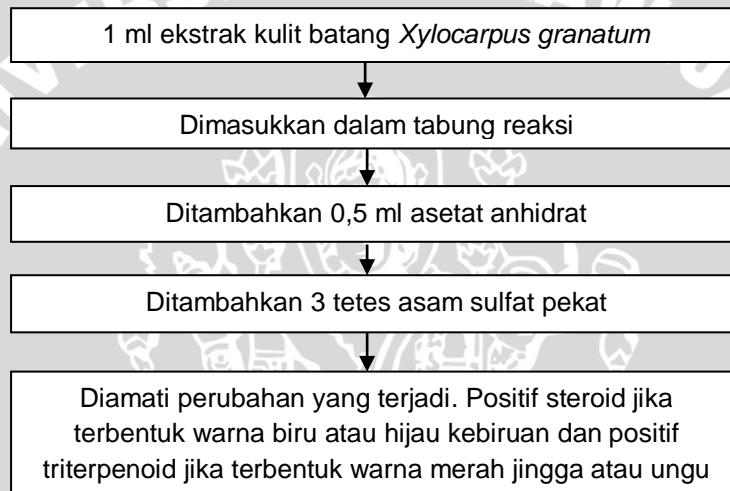


Gambar 7. Skema Uji Tanin Ekstrak Kulit Batang *Xylocarpus granatum*



- **Uji Steroid dan Triterpenoid (Sangi et al., 2008)**

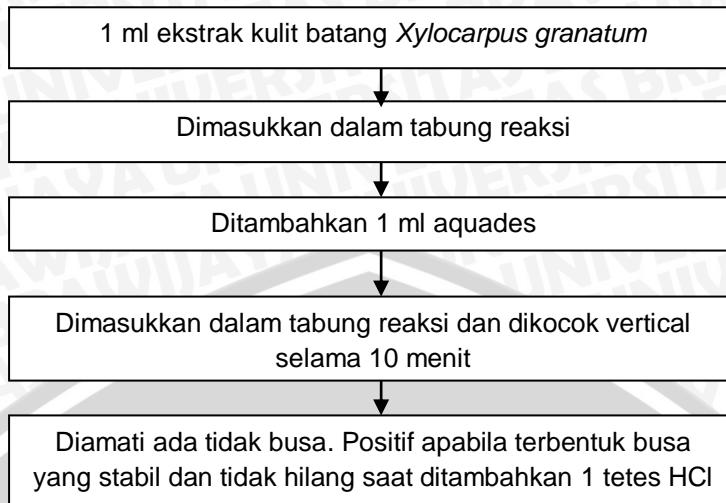
Uji steroid dan triterpenoid pada ekstrak kulit batang *Xylocarpus granatum* menggunakan pereaksi antara lain asetat anhidrat dan asam sulfat. Hasil positif sampel ekstrak mengandung triterpenoid ditandai dengan terbentuknya warna merah jingga atau ungu, sedangkan positif mengandung steroid ditandai dengan terbentuknya warna biru dan jika warna berubah menjadi hijau kebiruan maka positif sterol. Skema uji steroid dan triterpenoid pada ekstrak kulit batang mangrove *Xylocarpus granatum* dapat dilihat pada Gambar 8.



Gambar 8. Skema Uji Steroid dan Triterpenoid Ekstrak Kulit Batang *Xylocarpus granatum*

- **Uji Saponin (Harborne, 1987)**

Pengujian saponin dilakukan menggunakan metode Forth yaitu melihat ada atau tidaknya busa yang terbentuk dengan mereaksikan sampel dengan air. Hasil positif mengandung saponin ditandai dengan terbentuknya busa yang stabil dan tidak hilang saat ditambahkan satu tetes HCl. Skema uji saponin ekstrak kulit batang mangrove *Xylocarpus granatum* dapat dilihat pada Gambar 9.

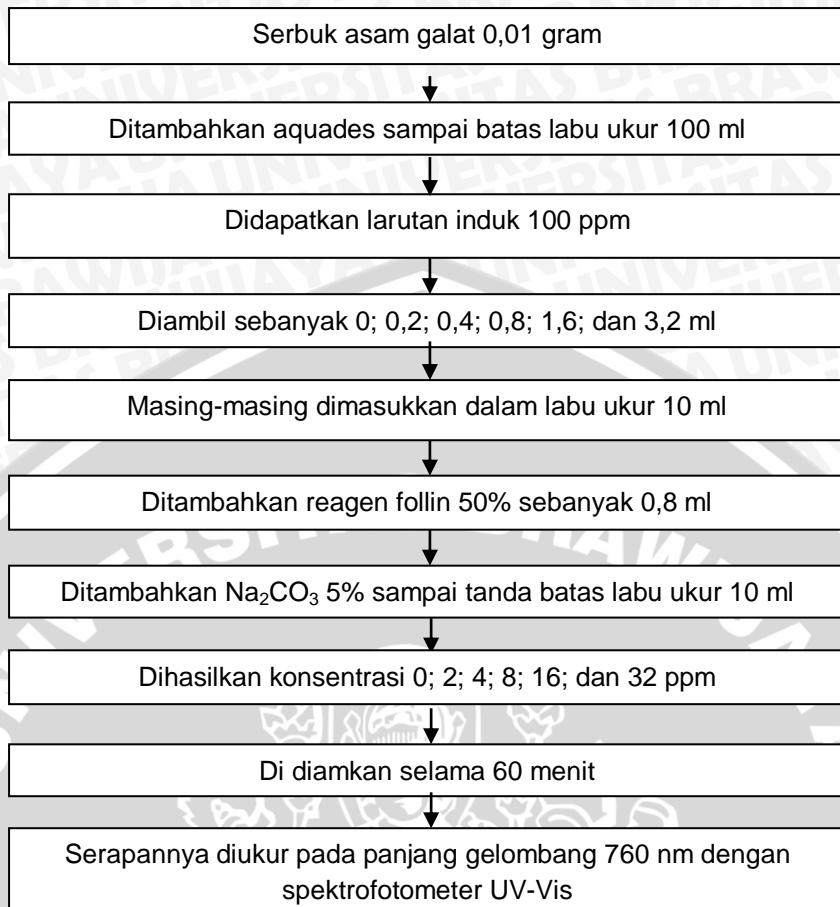


Gambar 9. Skema Uji Saponin Ekstrak Kulit Batang *Xylocarpus granatum*

3.3.6 Total Fenol

- Pembuatan Kurva Standar Asam Galat (Ratnayanti et al., 2012)**

Kurva standar asam galat digunakan sebagai kurva standar untuk menganalisis total fenol sampel ekstrak kulit batang mangrove *Xylocarpus granatum*. Larutan induk asam galat dibuat dengan mengencerkan serbuk asam galat dengan aquades. Larutan asam galat kemudian diambil beberapa ml sesuai dengan konsentrasi yang dibutuhkan. Larutan asam galat dari masing-masing konsentrasi direaksikan dengan reagen folin dan ditambahkan larutan Na_2CO_3 . Larutan dibiarkan bereaksi dengan cara didiamkan selama 60 menit, setelah itu serapannya dapat diukur dengan spektrofotometer UV-Vis pada panjang gelombang 760 nm. Hasil absorbansi dialurkan dengan konsentrasi sehingga didapatkan kurva standar dengan persamaan regresi $y = bx + a$. Skema kerja pembuatan kurva standar asam galat dapat dilihat pada Gambar 10.



Gambar 10. Skema Kerja Pembuatan Kurva Standar Asam Galat

- **Penentuan Total Senyawa Fenolat dengan Metode Folinciocalteu (Ratnayanti et al., 2012)**

Uji total senyawa fenolat merupakan uji kuantitatif untuk senyawa fenol yang dapat dilakukan dengan menggunakan metode folinciocalteu. Menurut Rumayati et al., (2014), penentuan total fenol dengan metode Folin-Ciocalteu dilakukan berdasarkan kemampuan reagen Folin-Ciocalteu mengoksidasi gugus hidroksil (OH-) dari senyawa golongan fenol.

Pada pengujian total fenol sampel ekstrak kulit batang mangrove *Xylocarpus granatum* ditimbang beberapa gram untuk dilarutkan dengan pelarut metanol. Setelah itu disaring dan diambil beberapa ml untuk direaksikan dengan reagen folin. Larutan tersebut dihomogenkan dengan cara dikocok. Lalu



ditambahkan larutan Na_2CO_3 sampai batas tertentu. Larutan didiamkan 60 menit dan setelah itu serapannya diukur pada panjang gelombang 760 menggunakan spektrofotometer UV-Vis. Konsentrasi senyawa fenolat dalam sampel dapat ditentukan dengan mengalurkan absorbansi sampel pada kurva standar asam galat yang telah dibuat. Sedangkan total senyawa fenol menurut Nur *et al.*, (2013) dapat dihitung dengan rumus:

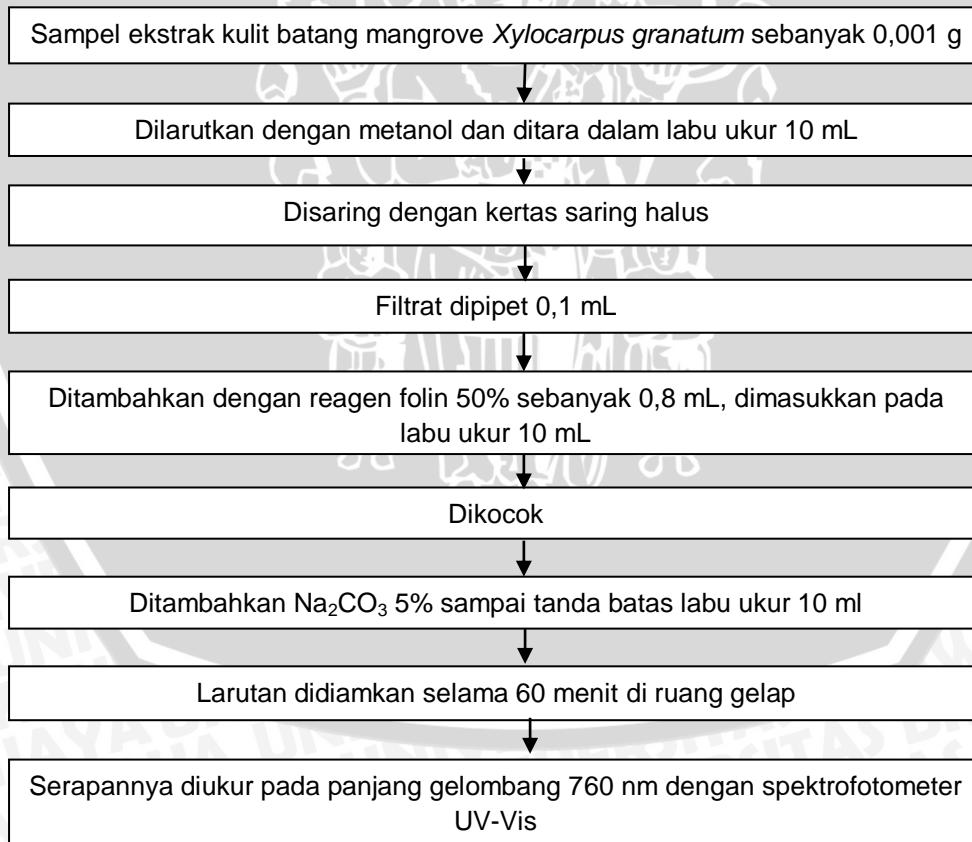
$$\text{Total fenol} = \frac{C \times V \times FP}{W}$$

Keterangan:

C = konsentrasi (mgGAE/L)
FP = faktor pengencer

V = volume (ml)
W = bobot sampel (g)

Skema kerja penentuan total senyawa fenolat pada ekstrak kulit batang mangrove *Xylocarpus granatum* dapat dilihat pada Gambar 11.

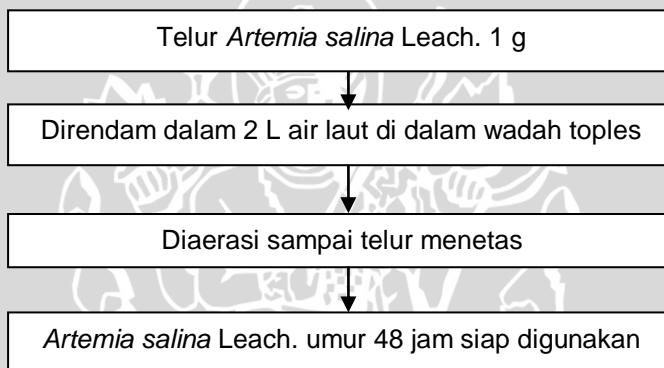


Gambar 11. Skema Kerja Penentuan Total Senyawa Fenolat Pada Ekstrak Kulit Batang *Xylocarpus granatum*

3.3.7 Uji Toksisitas Menggunakan Metode *Brine Shrimp Lethality Test*

- **Penyiapan Larva *Artemia salina* Lench. (Muaja et al., 2013)**

Penyiapan larva *Artemia salina* Leach. dilakukan dengan cara mengambil telur *Artemia salina* Leach. beberapa gram untuk ditetaskan. Telur direndam dalam air laut buatan dan diaerasi selama 48 jam. Telur *Artemia salina* Leach. tersebut akan menetas menjadi *nauplii* yang siap digunakan sebagai hewan uji. Menurut Nuraini et al., (2015), *nauplii* pada usia 48 jam tepat digunakan untuk uji hayati karena sudah memiliki saluran pencernaan lengkap dan metabolisme yang sempurna. Skema kerja penetasan telur *Artemia salina* Leach. dapat dilihat pada Gambar 12.



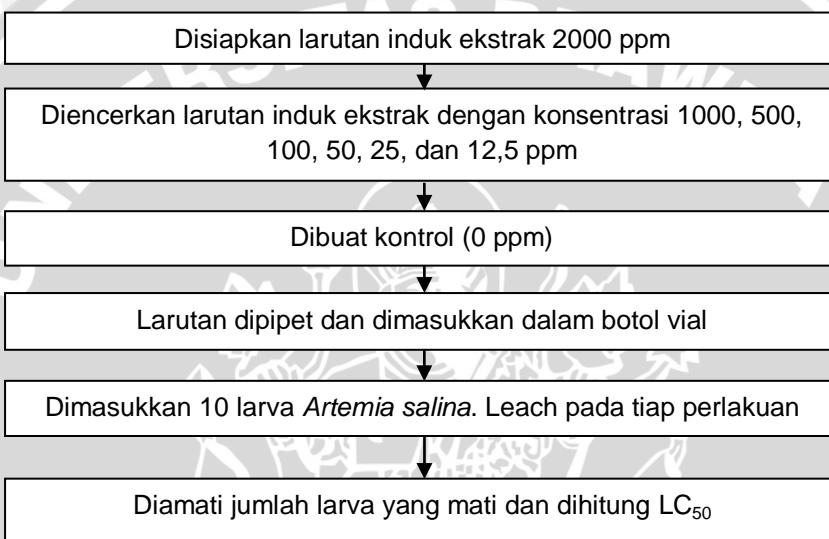
Gambar 12. Skema Kerja Penetasan Telur *Artemia salina* Leach.

- **Penentuan Konsentrasi Larutan Ekstrak dan Uji Toksisitas *Artemia salina* Leach. (Muaja et al., 2013)**

Penentuan konsentrasi larutan uji yang digunakan dimulai dari pembuatan larutan induk dengan konsentrasi 2000 ppm yang dibuat dari melarutkan 40 mg ekstrak sampel dalam 20 ml air laut. Larutan induk tersebut kemudian dicampur kembali hingga menghasilkan larutan dengan konsentrasi 1000, 500, 100, 50, 25, dan 12,5 ppm serta 0 ppm tanpa tambahan ekstrak sampel yang digunakan sebagai kontrol. Perhitungan untuk konsentrasi larutan

uji dapat dilihat pada Lampiran 1.

Uji toksisitas dilakukan dengan mengisikan 5 ml larutan ekstrak kulit batang mangrove *Xylocarpus granatum* (ekstrak + air laut) untuk tiap konsentrasinya ke dalam botol vial. Setelah itu 10 ekor larva *Artemia salina* Leach. dimasukkan kedalam masing-masing botol vial tersebut dan setelah 24 jam, pengamatan jumlah larva *Artemia salina* Leach yang mati dilakukan. Skema uji toksisitas dapat dilihat pada Gambar 13.



Gambar 13. Skema Uji Toksisitas Ekstrak Kulit Batang *Xylocarpus granatum*

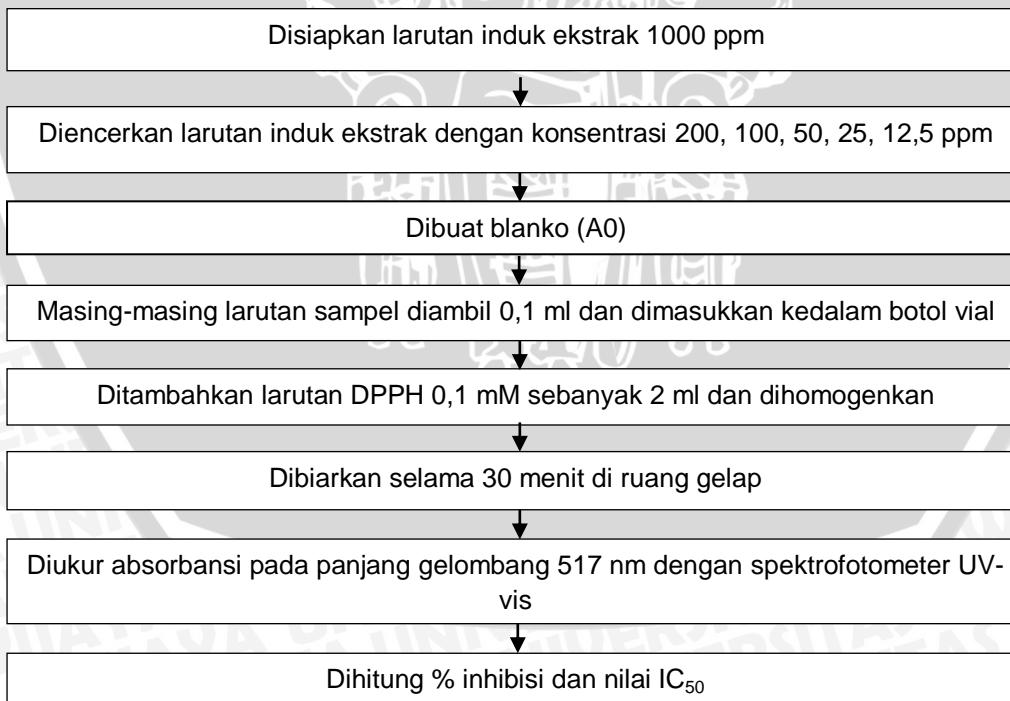
3.3.8 Uji Aktivitas Antioksidan Metode DPPH (Patra et al., 2009)

Uji aktivitas antioksidan ekstrak kulit batang mangrove *Xylocarpus granatum* dilakukan dengan menggunakan metode DPPH untuk mengetahui potensi aktivitas antioksidan senyawa dalam ekstrak berdasarkan prinsip adanya reaksi penangkapan hidrogen dari antioksidan pada radikal bebas DPPH. Sampel ekstrak kulit batang mangrove *Xylocarpus granatum* yang akan di uji terlebih dahulu dilarutkan dalam metanol untuk membuat larutan induk sampel dan kemudian diencerkan menjadi beberapa konsentrasi sampel antara lain 200, 100, 50, 25, 12,5 dan 0 ppm dalam wadah botol vial. Setelah itu larutan sampel

dari masing-masing konsentrasi sampel diambil 0,1 ml dan ditambahkan 2 ml DPPH dengan konsentrasi 0,1 mM kedalam masing-masing botol vial. Sampel dihomogenkan dengan cara sedikit digoyang, lalu diinkubasi pada suhu ruang selama 30 menit. Absorbansi sampel dapat dibaca dengan panjang gelombang 517 nm dan dihitung presentase peredamannya menggunakan persamaan berikut:

$$(\%) \text{ Peredaman} = \frac{A_0 - A_1}{A_0} \times 100\%$$

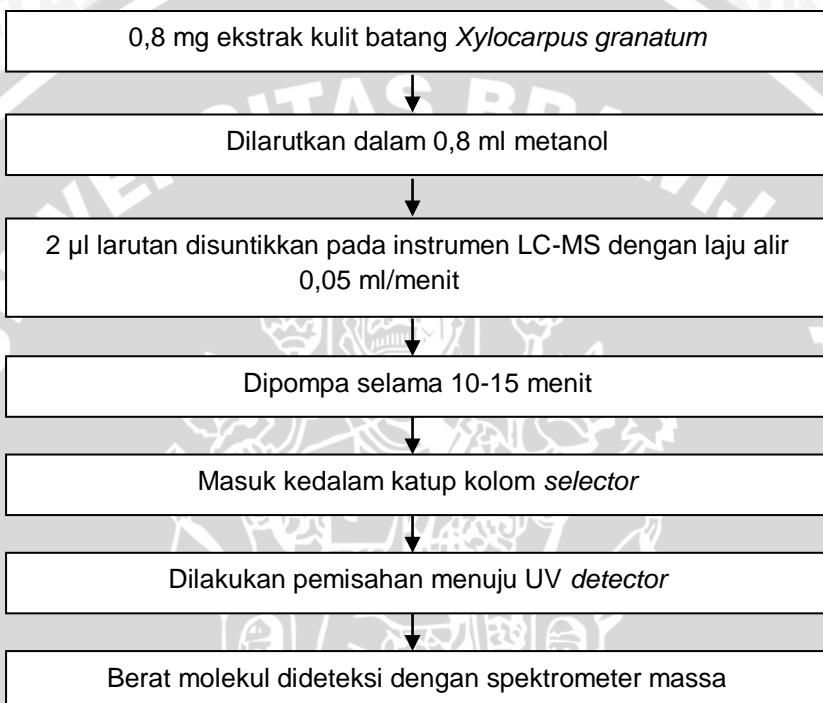
A₀ adalah absorbansi blanko (metanol + DPPH) dan A₁ adalah absorbansi sampel uji (ekstrak + DPPH). Kontrol untuk uji aktivitas antioksidan menggunakan vitamin C dengan konsentrasi 2 ppm, 4 ppm, 8 ppm, 16 ppm dan 32 ppm. Perhitungan pembuatan larutan DPPH 0,1 mM, konsentrasi larutan ekstrak dan vitamin C dapat dilihat pada Lampiran 2. serta untuk skema kerja uji aktivitas antioksidan metode DPPH dapat dilihat pada Gambar 14.



Gambar 14. Skema Kerja Uji Aktivitas Antioksidan

3.3.9 Identifikasi Senyawa Bioaktif Menggunakan LC-MS (Lisdiawati *et al.*, 2007)

Metode LC-MS merupakan metode pemisahan dan identifikasi untuk senyawa obat atau organik. Metode ini sangat sensitif dan selektif dibandingkan metode deteksi dengan sinar UV biasa (Purwanto, 2011). Skema kerja identifikasi senyawa bioaktif menggunakan LC-MS dapat dilihat pada Gambar 15.



Gambar 15. Skema Kerja Identifikasi Senyawa Bioaktif Menggunakan LC-MS

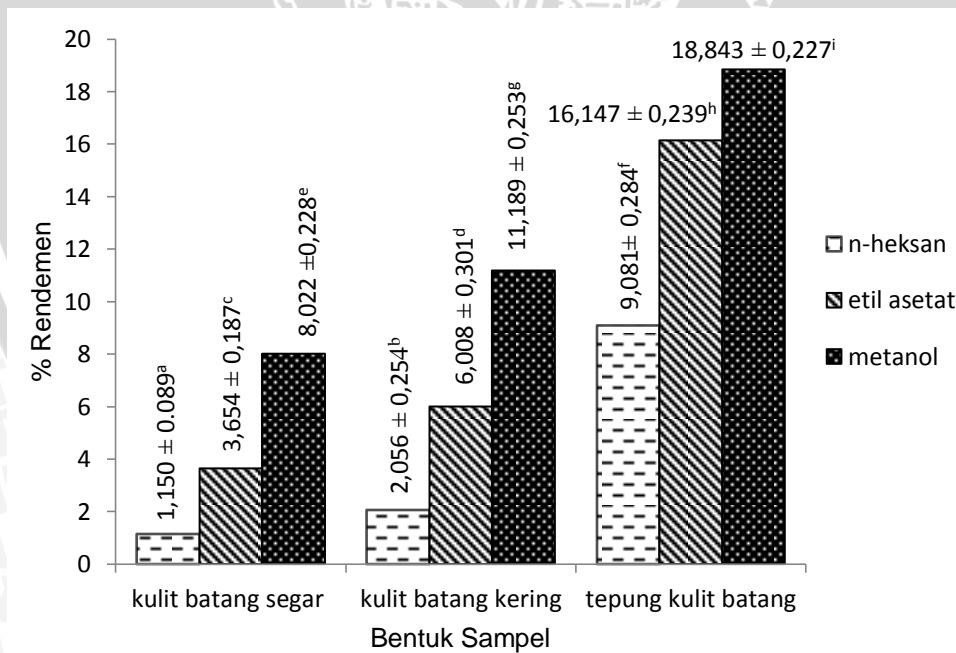
4. HASIL DAN PEMBAHASAN

4.1 Rendemen Ekstrak Kulit Batang Mangrove *Xylocarpus granatum*

Rendemen ekstrak didapat berdasarkan perhitungan perbandingan berat akhir (berat ekstrak yang dihasilkan) dengan berat awal (berat sampel) dikalikan 100% (Nasrul *et al.*, 2014). Sampel kulit batang mangrove *Xylocarpus granatum* yang terdiri atas tiga macam bentuk sampel antara lain sampel segar, kering dan tepung diketahui memiliki berat awal masing-masing sampel adalah 150 g. Kulit batang *Xylocarpus granatum* dicuci dengan air mengalir, setelah airnya tiris dilanjutkan dengan proses pengecilan ukuran sampel dengan menggunakan pisau sehingga menjadi sampel dalam bentuk segar. Sampel dalam bentuk kering didapatkan dengan cara mengeringkan sampel menggunakan oven suhu 50°C selama 10 jam setelah melakukan proses pengecilan ukuran sampel, sedangkan untuk mendapatkan sampel dalam bentuk tepung yaitu setelah proses pengeringan sampel dilanjutkan dengan proses penghalusan sampel menggunakan blender dan disaring dengan ayakan 60 mesh. Sampel tersebut masing-masing diekstraksi secara maserasi bertingkat dari pelarut non polar (n-heksan), semi polar (etil asetat) dan polar (metanol). Filtrat yang di dapat dari proses maserasi di uapkan pelarutnya dengan *rotary vacuum evaporator* dan dilanjutkan dengan penyemprotan gas nitrogen sehingga didapatkan ekstrak kasar dengan tekstur kental. Ekstrak kulit batang *Xylocarpus granatum* dari masing-masing bentuk sampel dengan pelarut yang berbeda-beda ditimbang dan dihitung nilai rendemennya. Perlakuan ekstraksi secara maserasi bertingkat dengan pola maserasi dari pelarut non polar, semi polar dan polar bertujuan untuk memisahkan dan mengelompokkan komponen-komponen senyawa bioaktif yang terekstrak berdasarkan polaritasnya, sehingga memudahkan untuk proses pengujian lanjut ekstrak seperti dalam hal uji

pendugaan atau identifikasi senyawa bioaktif yang terkandung dalam ekstrak menggunakan uji LC-MS.

Nilai rendemen yang didapat kemudian dianalisis dengan menggunakan uji ANOVA (*Analysis of Variance*) dengan rancangan percobaan acak lengkap faktorial. Berdasarkan uji ANOVA (Lampiran 3) pada taraf kepercayaan 95% didapatkan bahwa F_{hitung} dari perlakuan perbedaan bentuk sampel, perbedaan pelarut ekstraksi serta interaksi antara perbedaan bentuk sampel dan pelarut ekstraksi lebih besar dari F_{tabel} . Ketika $F_{hitung} >$ dari F_{tabel} maka perbedaan bentuk sampel, perbedaan pelarut ekstraksi serta interaksi antara perbedaan bentuk sampel dan pelarut ekstraksi memberikan pengaruh yang nyata terhadap hasil rendemen ekstrak yang dihasilkan. Kemudian dilanjutkan dengan uji Tukey untuk mengetahui perbedaan pada setiap kombinasi perlakuan. Nilai rendemen ekstrak kulit batang *Xylocarpus granatum* dapat dilihat pada Gambar 16.



Gambar 16. Nilai Rendemen Ekstrak Kulit Batang *Xylocarpus granatum*

Berdasarkan Gambar 16. dapat diketahui bahwa sampel segar, kering dan tepung kulit batang *Xylocarpus granatum* yang diekstrak secara maserasi bertingkat menggunakan pelarut yang berbeda (n-heksan, etil asetat dan metanol) menghasilkan nilai rendemen ekstrak yang berbeda-beda. Sampel segar kulit batang *Xylocarpus granatum* yang diekstrak menggunakan pelarut metanol memiliki nilai rendemen tertinggi yaitu sebesar 8,022% jika dibandingkan dengan hasil ekstraksi sampel segar menggunakan pelarut n-heksan ataupun etil asetat. Sampel kering kulit batang *Xylocarpus granatum* yang diekstrak menggunakan pelarut metanol juga memiliki nilai rendemen tertinggi yaitu sebesar 11,189% jika dibandingkan dengan hasil ekstraksi sampel kering menggunakan pelarut n-heksan ataupun etil asetat. Begitupun untuk sampel tepung kulit batang *Xylocarpus granatum* yang diekstraksi menggunakan pelarut metanol juga memiliki nilai rendemen tertinggi yaitu sebesar 18,843% jika dibandingkan dengan hasil ekstraksi sampel tepung menggunakan pelarut n-heksan ataupun etil asetat. Tingginya nilai rendemen ekstrak yang dihasilkan dari proses ekstraksi sampel dengan pelarut metanol dapat menunjukkan bahwa komponen bioaktif yang terkandung pada kulit batang *Xylocarpus granatum* cenderung bersifat polar. Menurut Astarina *et al.*, (2013), metanol merupakan pelarut universal yang memiliki gugus polar (-OH) dan gugus nonpolar (-CH₃) sehingga dapat melarutkan seluruh golongan metabolit sekunder baik bersifat polar dan nonpolar.

Hasil nilai rendemen ekstrak jika dilihat berdasarkan masing-masing kombinasi perlakuan yaitu perlakuan perbedaan pelarut ekstraksi dan bentuk sampel diketahui berbeda nyata. Nilai rendemen tertinggi berdasarkan kombinasi perlakuan yaitu sebesar 18,843% pada ekstrak tepung kulit batang *Xylocarpus granatum* yang diekstraksi dengan pelarut metanol. Namun jika dilihat berdasarkan perbedaan bentuk sampel dapat diketahui bahwa sampel tepung

kulit batang *Xylocarpus granatum* yang diekstraksi secara maserasi bertingkat yang paling tinggi nilai rendemennya. Oleh karena itu pada penelitian ini ekstrak tepung kulit batang *Xylocarpus granatum* di uji lanjut untuk mengetahui lebih spesifik pengaruh perbedaan pelarut ekstraksinya terhadap nilai LC₅₀ dan IC₅₀.

Menurut Putri (2013), semakin kecil ukuran bahan yang digunakan maka semakin luas bidang kontak antara bahan dengan pelarut. Hal ini akan membuat proses ekstraksi senyawa aktif yang terkandung didalam sampel berlangsung dengan baik dan tidak memakan waktu yang lama. Ditambahkan juga oleh Maulida dan Guntarti (2015) bahwa ukuran partikel sampel uji yang berbeda-beda memiliki luas permukaan kontak yang berbeda-beda pula. Kontak yang luas antara sampel uji dan pelarut akan memberikan kesempatan yang lebih besar dalam mengekstraksi senyawa aktif yang terkandung didalam sampel sehingga rendemen ekstrak yang dihasilkan lebih tinggi daripada sampel dengan ukuran yang lebih besar.

4.2 Kadar Air Ekstrak Tepung Kulit Batang Mangrove *Xylocarpus granatum*

Kadar air merupakan salah satu sifat fisik dari bahan. Perhitungan kadar air dapat menunjukkan banyaknya air yang terkandung di dalam bahan persatuannya bobot bahan tersebut (Agus, 2012). Kadar air ekstrak tepung kulit batang *Xylocarpus granatum* diuji dengan menggunakan metode oven kering (metode termogravimetri). Perhitungan kadar air ekstrak tepung kulit batang mangrove *Xylocarpus granatum* secara lengkap dapat dilihat pada Lampiran 4. Sedangkan nilai kadar air ekstrak tepung kulit batang *Xylocarpus granatum* dapat dilihat pada Tabel 2.

Tabel 2. Nilai Kadar Air Ekstrak Tepung Kulit Batang
Xylocarpus granatum

Perlakuan	Kadar Air (%)
Ekstrak n-heksan tepung kulit batang	12,667
Ekstrak etil asetat tepung kulit batang	12,667
Ekstrak metanol tepung kulit batang	13,333

Berdasarkan Tabel 2. dapat diketahui bahwa nilai rata-rata kadar air ekstrak n-heksan dan ekstrak etil asetat tepung kulit batang *Xylocarpus granatum* sama yaitu sebesar 12,667% sedangkan nilai rata-rata kadar air ekstrak metanol tepung kulit batang *Xylocarpus granatum* sebesar 13,333%. Nilai kadar air ini didapat dari proses pengujian kadar air dengan berat awal sampel sebesar 1 gram untuk masing-masing ekstrak. Masing-masing ekstrak tersebut dikeringkan menggunakan oven suhu 105°C selama 6 jam dan setelah itu di dinginkan dalam desikator untuk kemudian ditimbang dan dicatat berat akhirnya sehingga dapat dihitung persen kadar airnya. Pada penelitian ini, rata-rata dalam 1 gram ekstrak baik ekstrak n-heksan, etil asetat dan metanol tepung kulit batang *Xylocarpus granatum* setelah proses pengeringan dengan oven mengalami penurunan berat ekstrak yaitu kisaran 12 sampai 14% sehingga didapatkan perhitungan nilai rata-rata persen kadar air yang cenderung sama.

Ketiga kadar air ekstrak tepung kulit batang *Xylocarpus granatum* tersebut lebih tinggi jika dibandingkan dengan kadar air bahan tepung kulit batang *Xylocarpus granatum* yang diperoleh dari data hasil penelitian yaitu sebesar 9%. Kenaikan kadar air ekstrak tersebut diduga karena konsentrasi pelarut yang digunakan tidak 100% murni pelarut. Ketika pelarut yang digunakan untuk ekstraksi seperti n-heksan teknis, metanol dan etil asetat yang memiliki konsentrasi kurang lebih 96% digunakan untuk mengekstrak sampel akan menghasilkan ekstrak dengan kandungan kadar air yang lebih tinggi jika dibandingkan dengan kadar air bahan karena mendapat sumbangan kadar air

kurang lebih 4% dari pelarut yang digunakan yang tidak cukup dapat teruapkan ketika proses penguapan dengan *rotary vacuum evaporator*.

Ketiga ekstrak tersebut, baik ekstrak n-heksan, etil asetat maupun metanol tepung kulit batang *Xylocarpus granatum* masuk dalam kategori ekstrak kental. Menurut Khoirani (2013), suatu ekstrak tumbuhan dapat digolongkan kedalam ekstrak kental jika kandungan air nya berkisar antara 5-30%. Menurut Pardede *et al.*, (2013), produk ataupun sampel yang memiliki kadar air tinggi akan lebih mudah rusak karena bisa menjadi media yang baik untuk pertumbuhan mikroorganisme. Sedangkan produk ataupun sampel yang memiliki kadar air rendah akan lebih stabil untuk penyimpanan dalam jangka panjang.

4.3 Uji Fitokimia Ekstrak Tepung Kulit Batang Mangrove *Xylocarpus granatum*

Uji fitokimia termasuk dalam pengujian kualitatif yang dilakukan untuk mengetahui komponen bioaktif yang terkandung dalam tiap ekstrak tepung kulit batang *Xylocarpus granatum* sebagai hasil dari ekstraksi sampel dengan pelarut yang berbeda-beda. Menurut Artini *et al.*, (2013), uji fitokimia dilakukan dengan melihat pengujian reaksi warna yang terjadi menggunakan suatu pereaksi. Pada penelitian ini dilakukan uji fitokimia terhadap senyawa alkaloid, flavonoid, tanin triterpenoid dan steroid, serta saponin. Hasil uji fitokimia ekstrak tepung kulit batang *Xylocarpus granatum* dapat dilihat pada Tabel 3.

Tabel 3. Uji Fitokimia Ekstrak Tepung Kulit Batang *Xylocarpus granatum*

Jenis Uji	Perlakuan			Keterangan
	Ekstrak n-heksan tepung kulit batang	Ekstrak etil asetat tepung kulit batang	Ekstrak metanol tepung kulit batang	
Alkaloid	-	-	-	(+) Terbentuk endapan warna putih
Flavonoid	+	+	+	(+) Terbentuk warna kuning, merah sampai jingga
Tanin	+	+	+	(+) Terbentuk warna coklat atau biru kehitaman
Triterpenoid dan Steroid	+(triterpenoid)	+(triterpenoid)	+(triterpenoid)	(+ steroid) Terbentuk warna biru atau hijau kebiruan dan (+triterpenoid) terbentuk warna merah jingga atau ungu
Saponin	-	-	-	(+) terbentuk busa

Keterangan:

- (+) : Mengandung senyawa
 (-) : Tidak mengandung senyawa

Berdasarkan hasil uji fitokimia pada Tabel 3. dapat diketahui bahwa pada perlakuan ekstrak n-heksan, etil asetat, dan metanol tepung kulit batang *Xylocarpus granatum* tidak terdeteksi mengandung senyawa alkaloid dan saponin. Pada uji fitokimia ekstrak n-heksan, etil asetat dan metanol tepung kulit batang *Xylocarpus granatum* menunjukkan hasil positif terhadap senyawa bioaktif yang sama yaitu senyawa flavonoid, tanin dan triterpenoid. Kulit batang mangrove *Xylocarpus granatum* menurut Wangensteen *et al.*, (2013) mengandung flavonoid, triterpenoid, tanin terkondensasi yang kebanyakan terdiri atas polimer flavonoid, dan proanthocyanidin yang termasuk dalam golongan senyawa tanin.

Uji senyawa alkaloid pada uji fitokimia dengan reagen Meyer menunjukkan hasil negatif yang ditandai dengan tidak terbentuknya endapan

berwarna putih pada ketiga ekstrak. Menurut Lenny (2006), alkaloid dapat ditemukan dalam berbagai bagian tumbuhan termasuk pada bagian kulit batang. Namun alkaloid umumnya ditemukan dalam kadar yang kecil dan perlu adanya kegiatan pemisahan senyawa alkaloid dari campuran senyawa kompleks yang berasal dari jaringan tumbuhan tersebut. Senyawa alkaloid umumnya dapat larut dalam pelarut organik agak polar seperti benzena, eter, dan kloroform. Namun dalam bentuk garamnya, alkaloid mudah larut dalam pelarut organik polar.

Hasil uji fitokimia menunjukkan positif adanya senyawa flavonoid pada ketiga ekstrak. Hasil positif menunjukkan perubahan warna ekstrak menjadi merah-jingga pada sampel ekstrak tepung kulit batang n-heksan, etil asetat, dan metanol. Menurut Robinson (1995), penambahan serbuk magnesium dan asam klorida dalam uji kualitatif flavonoid akan menyebabkan tereduksinya senyawa flavonoid yang ada dalam sampel sehingga menimbulkan reaksi warna merah hingga jingga yang merupakan ciri adanya flavonoid. Flavonoid menurut Markham (1988) merupakan senyawa polar karena flavonoid memiliki ikatan dengan gugus gula sehingga dapat larut dalam pelarut polar seperti etanol, metanol, aseton, dan lain sebagainya. Sebaliknya, aglikon yang kurang polar seperti isoflavon, flavanon, flavon serta flavonol yang termetoksilasi cenderung lebih mudah larut dalam pelarut organik yang kurang polar seperti n-heksan dan etil asetat.

Hasil uji fitokimia menunjukkan positif adanya senyawa tanin pada sampel ekstrak n-heksan, etil asetat dan metanol tepung kulit batang *Xylocarpus granatum* yang ditandai dengan terbentuknya warna coklat. Menurut Desinta (2015), ekstrak dapat dikatakan positif mengandung tanin jika warna suatu ekstrak berubah menjadi coklat atau biru kehitaman setelah ditambahkan FeCl_3 . Reaksi FeCl_3 melibatkan struktur tanin yang merupakan senyawa polifenol, dimana gugus fenolnya akan berikatan dengan FeCl_3 membentuk kompleks

warna biru kehitaman atau coklat. Tanin menurut Puspita *et al.*, (2015) merupakan suatu senyawa polifenol yang memiliki gugus hidroksi dan karboksil. Tanin juga merupakan senyawa yang termasuk dalam golongan senyawa flavonoid karena tanin memiliki struktur dengan 2 cincin aromatik yang diikat oleh tiga atom karbon (Kamilah *et al.*, 2010). Tanin cenderung bersifat polar sehingga dapat diekstraksi dengan pelarut polar, namun tanin juga dapat diekstrak dengan pelarut heksan walaupun dengan jumlah yang rendah (Tri dan Ari, 2010).

Hasil uji fitokimia menunjukkan positif adanya senyawa triterpenoid pada sampel ekstrak n-heksan, etil asetat dan metanol tepung kulit batang *Xylocarpus granatum* yang ditandai dengan terbentuknya warna merah jingga pada sampel uji. Pengujian steroid atau triterpenoid didasarkan pada kemampuan senyawa untuk membentuk warna dengan H_2SO_4 dalam pelarut asam asetat anhidrat (Sangi *et al.*, 2008). Senyawa triterpenoid dan steroid menurut Firdiyani *et al* (2015) bersifat non polar dan dapat terekstrak oleh pelarut non polar, namun senyawa triterpenoid disini menunjukkan positif pada pelarut polar yaitu metanol. Hal ini sesuai dengan pernyataan Astarina *et al.*, (2013) bahwa beberapa senyawa triterpenoid memiliki struktur siklik yang berupa alkohol yang memiliki gugus OH dan dapat terikat dengan gugus gula sehingga akan dapat tertarik oleh pelarut yang bersifat semi polar ataupun pelarut polar.

Hasil uji fitokimia menunjukkan negatif mengandung senyawa saponin pada ketiga ekstrak yang ditandai dengan tidak terbentuknya busa yang konstan setelah ditetes HCl. Menurut Kumalasari dan Sulistyani (2011), saponin mempunyai gugus hidrofilik dan hidrofob. Ketika sampel uji digojok, maka gugus hidrofil akan berikatan dengan air sedangkan gugus hidrofob akan berikatan dengan udara sehingga membentuk buih. Penambahan asam (HCl) berfungsi untuk menambah kepolaran sehingga gugus hidrofil akan berikatan lebih stabil dan buih yang terbentuk menjadi stabil.

4.4 Uji Total Fenol Ekstrak Tepung Kulit Batang Mangrove *Xylocarpus granatum*

Fenol merupakan senyawa yang mempunyai sebuah cincin aromatik dengan satu atau lebih gugus hidroksil (Dyah, 2015). Uji total fenol dilakukan dengan menggunakan metode Folin-Ciocalteu yang didasarkan pada kemampuan reagen Folin-Ciocalteu mengoksidasi gugus hidroksil (OH-) dari senyawa golongan fenol. Senyawa fenolik mereduksi fosfomolibdat fosfotungstat dalam Folin-Ciocalteu dan membentuk molibdenum yang berwarna biru (Rumayati *et al.*, 2014).

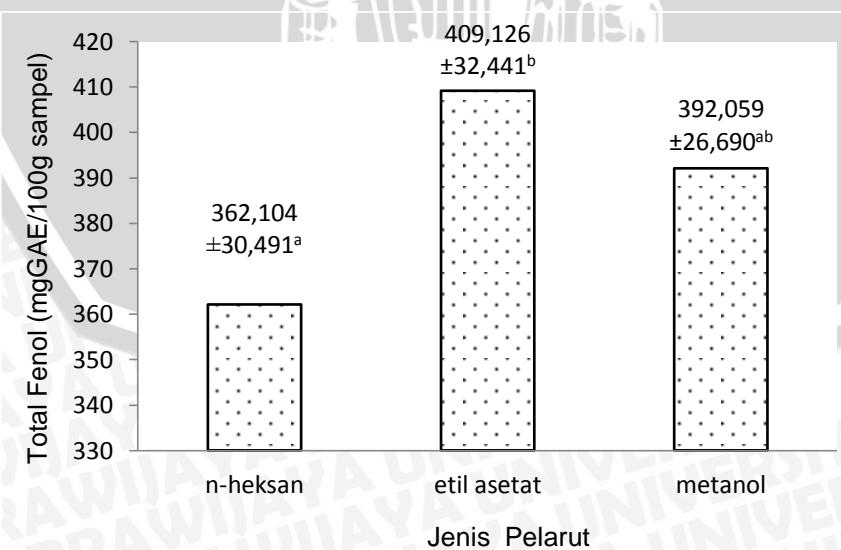
Pada penelitian ini, sebelum dilakukan pengujian total fenol pada sampel ekstrak tepung kulit batang *Xylocarpus granatum*, terlebih dahulu melakukan pengujian terhadap larutan standar asam galat. Larutan standar asam galat dibuat dalam beberapa konsentrasi yaitu 0, 2, 4, 8, 16, dan 32 ppm. Larutan standar tersebut direaksikan dengan reagen folin dan larutan Na_2CO_3 , kemudian diukur serapannya dengan spektrofotometer *UV-Visible* pada panjang gelombang 760 nm. Pengujian larutan standar asam galat ini berguna untuk membantu menentukan kadar fenol dalam sampel melalui persamaan regresi dari kurva standar asam galat. Hasil uji larutan standar asam galat serta kurva kalibrasi asam galat dapat dilihat pada Lampiran 5.

Berdasarkan hasil uji larutan standar asam galat diperoleh kurva standar dengan persamaan regresi $y = 0,0957x + 0,1808$ serta nilai koefisien korelasi (R^2) = 0,9817. Nilai ini menunjukkan bahwa absorbansi (y) dengan konsentrasi (x) memberikan hubungan yang linier. Menurut Julyash *et al.*, (2009) nilai R^2 yang mendekati angka 1 membuktikan bahwa persamaan regresi tersebut merupakan persamaan linier.

Prosedur penentuan kadar total fenol pada sampel ekstrak tepung kulit batang *Xylocarpus granatum* dilakukan sama seperti pengujian larutan standar

asam galat. Sampel ekstrak tepung kulit batang *Xylocarpus granatum* dibuat dalam satu konsentrasi dan hanya diambil 0,1 ml larutan sampel untuk direaksikan dengan reagen folin dan larutan Na₂CO₃. Setelah itu sampel diukur serapannya dengan spektrofotometer *UV-Visible* pada panjang gelombang 760 nm. Hasil absorbansi sampel dialurkan pada kurva standar asam galat untuk mendapatkan konsentrasi kadar fenol, sedangkan untuk total senyawa fenol pada sampel dapat dihitung menggunakan rumus perhitungan total fenol. Perhitungan nilai total fenol ekstrak tepung kulit batang *Xylocarpus granatum* dapat dilihat pada Lampiran 6.

Nilai rata-rata total fenol yang didapat kemudian dianalisis dengan menggunakan uji ANOVA (*Analysis of Variance*) dengan rancangan percobaan acak lengkap. Berdasarkan uji ANOVA (Lampiran 6) pada taraf kepercayaan 95% didapatkan hasil F_{hitung} (3,785) > F_{tabel} (2,131) yang artinya perlakuan perbedaan pelarut ekstraksi memberikan pengaruh nyata terhadap hasil total fenol ekstrak. Kemudian dilanjutkan dengan uji lanjut BNT untuk mengetahui perbedaan pada setiap perlakuan. Nilai total fenol ekstrak tepung kulit batang *Xylocarpus granatum* dapat dilihat pada Gambar 17.



Gambar 17. Nilai Total Fenol Ekstrak Tepung Kulit Batang *Xylocarpus*

Berdasarkan Gambar 17. didapatkan hasil bahwa kandungan total fenol ekstrak n-heksan dan ekstrak etil asetat tepung kulit batang *Xylocarpus granatum* berbeda nyata. Namun, antara ekstrak n-heksan dan metanol serta ekstrak etil asetat dan metanol tepung kulit batang *Xylocarpus granatum* berbeda namun tidak nyata. Menurut Dungir *et al.*, (2012), penggunaan pelarut pada suatu proses ekstraksi bahan harus didasarkan pada sifat kelarutan dari pelarut yang digunakan dan sifat dari komponen yang akan dilarutkan. Komponen fenolik dapat diekstrak dari bahan tumbuhan dengan menggunakan pelarut seperti air, metanol, etanol, aseton, etil asetat.

Kandungan total fenol tertinggi yaitu pada ekstrak etil asetat tepung kulit batang sebesar 409,13 mgGAE/100g sampel sedangkan kandungan total fenol yang terendah yaitu pada ekstrak n-heksan tepung kulit batang sebesar 362,104 mgGAE/100g sampel. Kandungan fenolik total pada masing-masing ekstrak dinyatakan sebagai ekuivalen asam galat atau *Gallic Acid Equivalent* (GAE). GAE merupakan acuan umum untuk mengukur sejumlah senyawa fenolik yang terdapat dalam suatu bahan. Asam galat dijadikan sebagai standar karena didasarkan pada ketersediaan zatnya yang stabil, murni dan harganya tidak terlalu mahal (Mongkolsilp *et al.*, 2004).

Tingginya kandungan fenolik dalam ekstrak etil asetat tepung kulit batang diduga karena sifat pelarut etil asetat yang semi polar, sehingga hasil ekstraksi mengandung lebih banyak komponen fenolik baik yang bersifat nonpolar (aglikon) maupun polar (glikon). Menurut Sri (2016), fenol merupakan senyawa yang dapat larut dalam senyawa polar dan sedikit polar. Fenol bersifat larut air selama komponen dari fenol berikatan dengan gula membentuk glikosida. Senyawa fenol bebas biasanya terdapat dalam jaringan kayu, sementara senyawa fenol yang berada di tempat lain biasanya dalam bentuk

glikosida. Senyawa fenol dapat berupa flavonoid, fenol monosiklik sederhana, fenilpropanoid, dan kuinon fenolik.

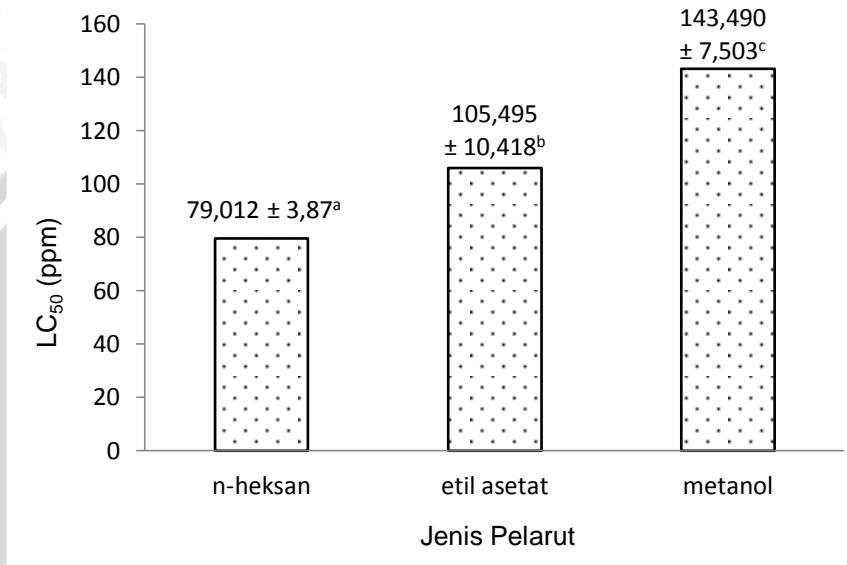
4.5 Uji Toksisitas Ekstrak Tepung Kulit Batang Mangrove *Xylocarpus granatum*

Pengujian toksisitas suatu sampel uji ditujukan untuk mendeteksi efek toksik suatu zat pada sistem biologi (Syamsudin, 2014). Uji toksisitas pada sampel ekstrak tepung kulit batang *Xylocarpus granatum* menggunakan metode uji bioaktivitas senyawa bahan alam yaitu uji letalitas larva udang atau *brine shrimp lethality test*. Menurut Fitriyani (2009), uji toksisitas ini merupakan uji toksisitas awal suatu ekstrak sebelum dilakukan uji toksisitas akut atau uji aktivitas lainnya.

Prosedur awal dalam uji toksisitas pada penelitian ini adalah menyiapkan larva *Artemia salina* Leach. yang ditetaskan dalam media air laut hingga menjadi *nauplii* yang berumur 48 jam. Setelah itu membuat larutan uji dengan berbagai konsentrasi yaitu 1000, 500, 100, 50, 25, 12,5 ppm serta 0 ppm dalam botol vial. Masing-masing konsentrasi dibuat dengan volume 5 ml, berisi ekstrak tepung kulit batang *Xylocarpus granatum* yang dilarutkan dalam air laut. Kemudian 10 ekor larva *Artemia salina* Leach. dimasukkan kedalam masing-masing botol vial. Setelah 24 jam, pengamatan jumlah larva *Artemia salina* Leach yang mati dapat dilakukan. Langkah selanjutnya menghitung persen mortalitas *Artemia salina* Leach dan menghitung nilai LC_{50} pada tiap perlakuan. Data perhitungan uji toksisitas ekstrak tepung kulit batang *Xylocarpus granatum* selengkapnya dapat dilihat pada Lampiran 7.

Nilai rata-rata LC_{50} yang didapat kemudian dianalisis dengan menggunakan uji ANOVA (*Analysis of Variance*) dengan rancangan percobaan acak lengkap. Berdasarkan uji ANOVA (Lampiran 7) pada taraf kepercayaan

95% didapatkan hasil F_{hitung} (103,303) > F_{tabel} (2,131), artinya perlakuan perbedaan pelarut ekstraksi memberikan pengaruh yang nyata terhadap toksisitas ekstrak. Kemudian dilanjutkan dengan uji lanjut BNT untuk mengetahui perbedaan pada setiap perlakuan. Nilai LC_{50} ekstrak tepung kulit batang *Xylocarpus granatum* dapat dilihat pada Gambar 18.



Gambar 18. Nilai LC_{50} Ekstrak Tepung Kulit Batang *Xylocarpus granatum*

Berdasarkan Gambar 18. dapat diketahui bahwa toksisitas dari masing-masing perlakuan ekstrak (n-heksan, etil asetat dan metanol) berbeda nyata. Ekstrak n-heksan tepung kulit batang memiliki nilai LC_{50} yang paling rendah yaitu sebesar 79,012 ppm. Ekstrak etil asetat tepung kulit batang memiliki nilai LC_{50} sebesar 105,495 ppm dan ekstrak metanol tepung kulit batang memiliki nilai LC_{50} yang paling tinggi yaitu sebesar 143,490 ppm. Ketiga ekstrak tersebut dapat dikatakan memiliki potensi toksisitas akut karena menurut Cahyadi (2009) suatu senyawa dinyatakan mempunyai potensi toksisitas akut jika mempunyai nilai LC_{50} kurang dari 1000 ppm.

Menurut Nisfi (2010), nilai LC_{50} menunjukkan besarnya konsentrasi suatu bahan uji yang dapat menyebabkan 50% kematian jumlah hewan uji

setelah perlakuan 24 jam. Sehingga dapat dikatakan semakin rendah nilai LC₅₀ suatu sampel maka toksisitas sampel tersebut semakin kuat. Pada penelitian ini ekstrak n-heksan tepung kulit batang memiliki potensi toksisitas akut lebih kuat dari ekstrak etil asetat dan metanol tepung kulit batang. Namun berdasarkan klasifikasi tingkat toksisitas suatu ekstrak, ketiga ekstrak tersebut masuk dalam kategori bersifat toksik. Menurut Salimi dan Bialangi (2014) ketika nilai LC₅₀ ekstrak \leq 30 ppm maka dapat dikatakan kalau ekstrak tersebut sangat toksik, jika nilai LC₅₀ ekstrak $>$ 31 ppm dan \leq 1000 ppm maka dapat dikatakan kalau ekstrak tersebut toksik, dan jika nilai LC₅₀ suatu ekstrak $>$ 1000 ppm maka dapat dikatakan kalau ekstrak tersebut tidak toksik.

Pada penelitian ini potensi toksisitas dari ekstrak tepung kulit batang *Xylocarpus granatum* jika dihubungkan dengan nilai rendemen ekstrak dapat dijelaskan bahwa semakin rendah nilai rendemen ekstrak makan semakin rendah pula nilai LC₅₀ ekstrak (paling toksik). Hal ini menggambarkan bahwa senyawa bioaktif yang memiliki potensi toksisitas akut yang lebih kuat adalah dari golongan senyawa non polar karena nilai rendemen ekstrak terendah dan nilai LC₅₀ terendah terdapat pada ekstrak n-heksan tepung kulit batang *Xylocarpus granatum*. Dugaan sementara senyawa bioaktif tersebut antara lain senyawa fenolik seperti flavonoid, tanin dan juga senyawa triterpenoid. Senyawa bioaktif tersebut pada kadar tertentu memiliki potensi toksisitas yang dapat menyebabkan kematian larva *Artemia salina* Leach. Mekanisme kematian larva berhubungan dengan fungsi senyawa-senyawa tersebut yang dapat menghambat daya makan larva *Artemia salina* Leach (antifedant) (Muaja et al., 2013). Senyawa bioaktif sebagai zat toksik yang terkandung dalam ekstrak dapat masuk melalui dinding tubuh dan mulut larva *Artemia salina*. Dinding tubuh merupakan bagian tubuh larva yang dapat menyerap zat toksik dalam jumlah besar (Astrid et al., 2009). Senyawa flavonoid memiliki gugus hidroksil yang

dapat menyebabkan perubahan komponen organik dan transpor nutrisi. Gugus hidroksil berikatan dengan protein integral membran sel sehingga transport aktif Na⁺ dan K⁺ terbendung. Transpor aktif yang berhenti menyebabkan pemasukan ion Na⁺ yang tidak terkendali ke dalam sel. Membran sel pecah dan menyebabkan kematian sel (Sumihe *et al.*, 2014). Selain itu, tanin juga mempunyai aktivitas toksik yang berhubungan dengan kandungan astringent tanin yang dapat merusak membran sel hewan uji (Santi *et al.*, 2011).

4.6 Uji Aktivitas Antioksidan Ekstrak Tepung Kulit Batang Mangrove *Xylocarpus granatum*

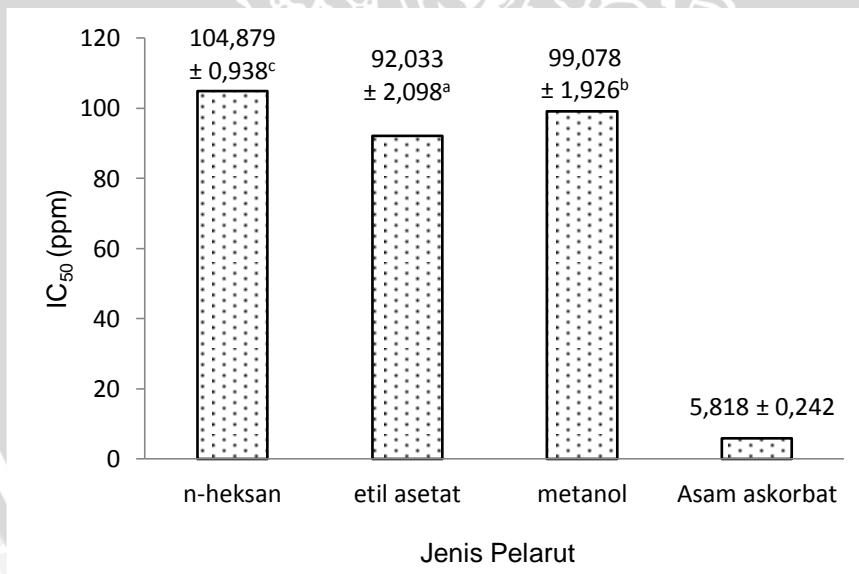
Uji aktivitas antioksidan ekstrak tepung kulit batang mangrove *Xylocarpus granatum* dilakukan dengan menggunakan metode DPPH (1,1-diphenyl-2-picrylhydrazil) untuk mengetahui potensi aktivitas antioksidannya. Menurut Pramesti (2013), Metode DPPH menggunakan larutan DPPH sebagai radikal bebasnya, dan akan bereaksi dengan senyawa antioksidan sehingga berubah menjadi DPPH yang bersifat non-radikal.

Prosedur awal dalam uji aktivitas antioksidan pada penelitian ini adalah menyiapkan larutan induk sampel ekstrak kulit batang mangrove *Xylocarpus granatum* dalam metanol dan kemudian diencerkan menjadi beberapa konsentrasi sampel antara lain 200, 100, 50, 25, 12,5 dan 0 ppm dalam wadah botol vial. Larutan sampel dari masing-masing konsentrasi diambil 0,1 ml dan ditambahkan 2 ml DPPH dengan konsentrasi 0,1 mM kedalam masing-masing botol vial. Sampel dihomogenkan dengan cara sedikit digoyang, lalu diinkubasi pada suhu ruang selama 30 menit. Absorbansi sampel dapat dibaca dengan panjang gelombang 517 nm, lalu presentase peredaman dan nilai IC₅₀ sampel dapat dihitung menggunakan rumus persamaan regresi linier. IC₅₀ menurut Huliselan *et al.*, (2015) merupakan parameter yang digunakan untuk



menunjukkan aktivitas antioksidan. IC_{50} merupakan konsentrasi suatu zat antioksidan yang dapat menyebabkan 50% DPPH kehilangan karakter radikal. Data perhitungan uji aktivitas antioksidan ekstrak tepung kulit batang *Xylocarpus granatum* selengkapnya dapat dilihat pada Lampiran 8.

Nilai rata-rata IC_{50} yang didapat kemudian dianalisis dengan menggunakan uji ANOVA (*Analysis of Variance*) dengan rancangan percobaan acak lengkap. Berdasarkan uji ANOVA (Lampiran 8) pada taraf kepercayaan 5% ($P < 0,05$) didapatkan hasil F_{hitung} (82,852) $>$ F_{tabel} (2,131), artinya perlakuan perbedaan pelarut memberikan pengaruh yang berbeda nyata terhadap aktivitas antioksidan ekstrak. Kemudian dilanjutkan dengan uji lanjut BNT untuk mengetahui apakah terdapat perbedaan pada setiap perlakuan. Nilai IC_{50} ekstrak tepung kulit batang *Xylocarpus granatum* dapat dilihat pada Gambar 19.



Gambar 19. Nilai IC_{50} Ekstrak Tepung Kulit Batang *Xylocarpus granatum*

Berdasarkan Gambar 19. dapat dilihat bahwa nilai IC_{50} masing-masing sampel ekstrak berbeda nyata. Nilai IC_{50} terendah dihasilkan oleh ekstrak etil asetat tepung kulit batang yaitu sebesar 92,033 ppm sedangkan nilai IC_{50} tertinggi dihasilkan oleh ekstrak n-heksan tepung kulit batang yaitu sebesar

104,879 ppm. Semakin rendah nilai IC_{50} maka akan semakin tinggi aktivitas antioksidannya, sehingga ekstrak etil asetat tepung kulit batang yang memiliki aktivitas antioksidan tertinggi. Keefektifan antioksidan pada ekstrak tepung kulit batang etil asetat dalam menetralkan radikal bebas diduga berkaitan dengan sifat etil asetat yang semi polar sehingga banyak komponen bioaktif yang larut di dalamnya, salah satunya yaitu senyawa fenol dan flavonoid. Hal ini juga diperkuat oleh pendapat Sri *et al.*, (2015) yang menjelaskan bahwa tingginya aktivitas penghambatan radikal bebas ekstrak kulit batang mangrove lindur (*Bruguiera gymnorhiza*) dengan pelarut ekstraksi etil asetat disebabkan oleh sifat etil asetat yang semi polar sehingga menyebabkan etil asetat dapat mengekstrak senyawa antioksidan yang bersifat polar maupun senyawa antioksidan yang bersifat nonpolar, sehingga terdapat beragam jenis senyawa antioksidan yang terekstrak. Aktivitas antioksidan senyawa fenol dan flavonoid menurut Yuhernita dan Juniarti (2011) berhubungan dengan struktur rantai samping dan juga substitusi pada cincin aromatiknya. Senyawa tersebut mempunyai kemampuan untuk menyumbangkan atom hidrogennya pada radikal bebas sehingga menjadi stabil. Menurut Molyneux (2004), ketika DPPH (1,1-diphenyl-2-picrylhydrazyl) sebagai radikal bebas dicampur dengan suatu zat yang dapat menyumbangkan atom hidrogen maka dapat membentuk suatu senyawa dengan bentuk tereduksi yang stabil yang ditandai dengan hilangnya warna violet menjadi warna kuning pucat sebagai sisa dari kelompok picryl yang masih ada.

Pada penelitian ini juga dilakukan pengujian aktivitas antioksidan pada sampel asam askorbat (vitamin C) yang merupakan jenis antioksidan yang biasa dikonsumsi sehari-hari. Tujuan dari pengujian aktivitas antioksidan pada asam askorbat ini adalah sebagai pembanding dari nilai aktivitas antioksidan ekstrak tepung kulit batang *Xylocarpus granatum*. Pada penelitian ini, konsentrasi yang

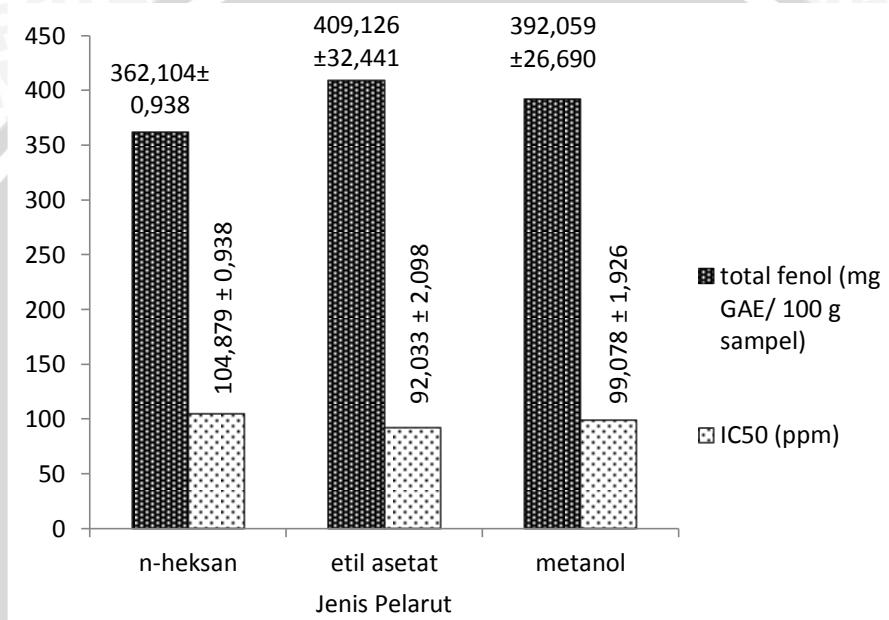
digunakan pada uji aktivitas antioksidan menggunakan asam askorbat yaitu konsentrasi 2, 4, 8, 16, dan 32 ppm. Dari penentuan konsentrasi tersebut, selanjutnya diperoleh hasil nilai IC_{50} asam askorbat yaitu sebesar 5,818 ppm. Hal ini sesuai dengan penelitian Agustini (2012) yang menyatakan bahwa asam askorbat (vitamin C) sebagai kontrol positif memiliki IC_{50} sebesar 5,430 ppm.

Ekstrak etil asetat tepung kulit batang dengan nilai IC_{50} sebesar 92,033 ppm apabila dibandingkan dengan nilai IC_{50} asam askorbat sebesar 5,818 jelas memiliki nilai IC_{50} yang berbeda. Hal ini menandakan bahwa pada asam askorbat memiliki aktivitas antioksidan yang sangat kuat karena nilai IC_{50} yang sangat rendah yaitu dibawah 50 ppm. Sedangkan ekstrak etil asetat tepung kulit batang memiliki aktivitas antioksidan kuat karena nilai IC_{50} yang masih dalam kisaran 50 sampai 100 ppm. Begitupun untuk ekstrak metanol tepung kulit batang yang memiliki nilai rata-rata IC_{50} sebesar 99,078 ppm termasuk dalam kategori memiliki aktivitas antioksidan kuat, dan untuk ekstrak n-heksan tepung kulit batang dengan rata-rata nilai IC_{50} sebesar 104,879 ppm termasuk dalam kategori memiliki aktivitas antioksidan sedang. Menurut Zuhra *et al.*, (2008) suatu senyawa dikatakan sebagai antioksidan sangat kuat jika nilai IC_{50} kurang dari 50 ppm, kuat untuk IC_{50} bernilai 50-100 ppm, sedang jika bernilai 100-150 ppm, dan lemah jika nilai IC_{50} bernilai 151-200 ppm.

4.7 Hubungan Total Fenol dengan Aktivitas Antioksidan (IC_{50})

Uji total fenol dilakukan dengan tujuan untuk menentukan total senyawa fenolik yang terkandung di dalam sampel. Uji total fenol merupakan uji dasar yang sering dilakukan sebelum pengujian aktivitas antioksidan karena menurut Yulia (2007), senyawa fenolik berperan dalam mencegah terjadinya peristiwa oksidasi. Sehingga diduga bila kandungan senyawa fenolik di dalam sampel tinggi maka aktivitas antioksidannya akan tinggi.

Analisis data mengenai hubungan antara nilai total fenol yang dinyatakan dalam mgGAE/100 g sampel dengan aktivitas antioksidan sampel yang dinyatakan dalam nilai IC₅₀ pada ekstrak tepung kulit batang *Xylocarpus granatum* menunjukkan adanya hubungan yang berbanding lurus. Untuk mengetahui sejauh mana hubungan antara total fenol dan aktivitas antioksidan ekstrak tepung kulit batang *Xylocarpus granatum* dapat dilihat pada Gambar 20.



Gambar 20. Hubungan Total Fenol dan Aktivitas Antioksidan Ekstrak Tepung Kulit Batang *Xylocarpus granatum*

Berdasarkan Gambar 20. dapat diketahui bahwa hubungan kandungan total fenol (mgGAE/ 100 g sampel) dengan aktivitas antioksidan (IC₅₀) ekstrak tepung kulit batang *Xylocarpus granatum* berbanding lurus, yaitu semakin tinggi nilai total fenol ekstrak maka semakin kuat aktivitas antioksidannya yang ditunjukkan dengan semakin rendahnya nilai IC₅₀ ekstrak. Dalam hal ini, ekstrak etil asetat tepung kulit batang *Xylocarpus granatum* yang memiliki nilai total fenol tertinggi dan memiliki aktivitas antioksidan yang paling kuat (nilai IC₅₀ terendah). Menurut Yogia (2016), senyawa fenolik merupakan inhibitor radikal yang baik

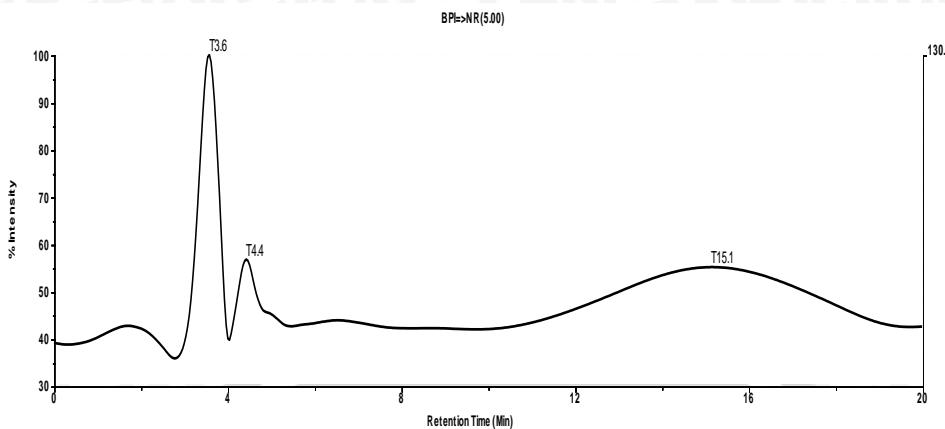
karena mampu mendonorkan atom hidrogennya pada radikal bebas melalui proses transfer elektron sehingga fenol berubah menjadi radikal fenoksil yang kemudian dapat menstabilkan diri memalui efek resonansi. Namun menurut Yusniarti et al., (2013) kandungan total fenol dalam suatu ekstrak tidak selalu memiliki hubungan yang berbanding lurus dengan aktifitas antioksidan ekstrak. Hal ini dapat dikarenakan tidak semua senyawa fenol yang diekstrak dalam suatu pelarut merupakan senyawa fenol yang dapat berfungsi sebagai antioksidan.

4.8 Identifikasi Senyawa Bioaktif dengan Uji *Liquid Chromatograph Mass Spectrometry (LC-MS)*

Identifikasi senyawa bioaktif dilakukan dengan menggunakan metode LC-MS pada ekstrak yang terpilih yaitu ekstrak n-heksan tepung kulit batang yang memiliki aktivitas toksik paling kuat yang ditunjukkan dengan nilai LC_{50} terendah dan ekstrak etil asetat tepung kulit batang yang memiliki aktivitas antioksidan paling kuat yang ditunjukkan dengan nilai IC_{50} terendah.

Uji LC-MS menurut Fathonah (2016) dilakukan dengan tujuan untuk mengetahui senyawa dugaan dalam sampel berdasarkan berat molekul yang terbaca dalam spektrometer massa. Hasil identifikasi senyawa bioaktif ekstrak tepung kulit batang n-heksan dan etil asetat disajikan dalam bentuk kromatogram dengan *peak* (puncak) dalam waktu retensi tertentu. Hasil identifikasi senyawa bioaktif ekstrak tepung kulit batang n-heksan dan ekstrak etil asetat tepung kulit batang dapat dilihat pada Lampiran 9. Kromatogram ekstrak n-heksan tepung kulit batang dapat dilihat pada Gambar 21. dan kromatogram ekstrak etil asetat tepung kulit batang dapat dilihat pada Gambar 23.

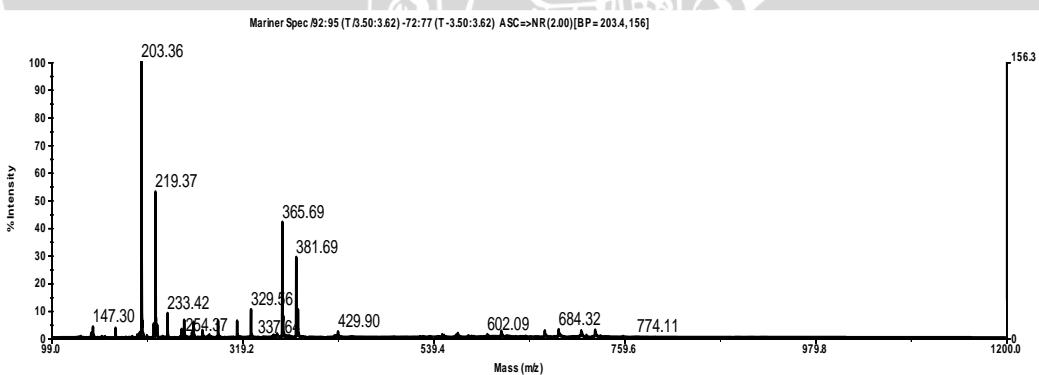




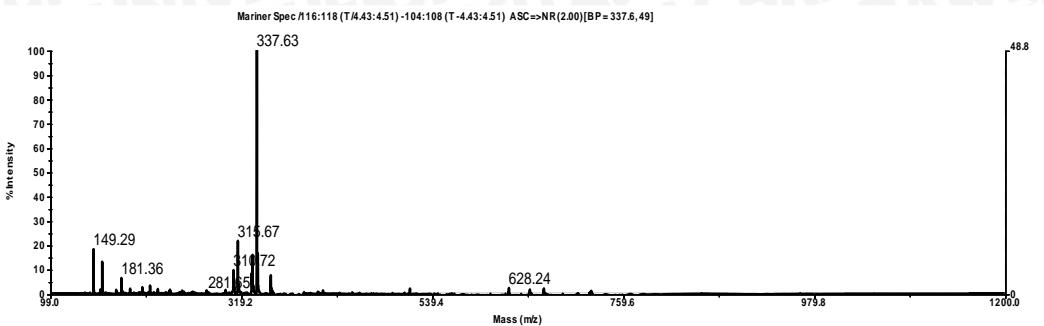
Gambar 21. Kromatogram Ekstrak N-Heksan Tepung Kulit Batang

Berdasarkan hasil kromatogram diatas, dapat diketahui bahwa senyawa-senyawa yang berhasil terekstrak terlihat pada menit ke 3,57; 4,43 dan 15,13. Senyawa-senyawa yang teridentifikasi dari ketiga waktu retensi tersebut menghasilkan puncak-puncak tertinggi. Puncak tertinggi yang dihasilkan pada masing-masing waktu retensi untuk ekstrak n-heksan tepung kulit batang dapat dilihat pada Gambar 22.

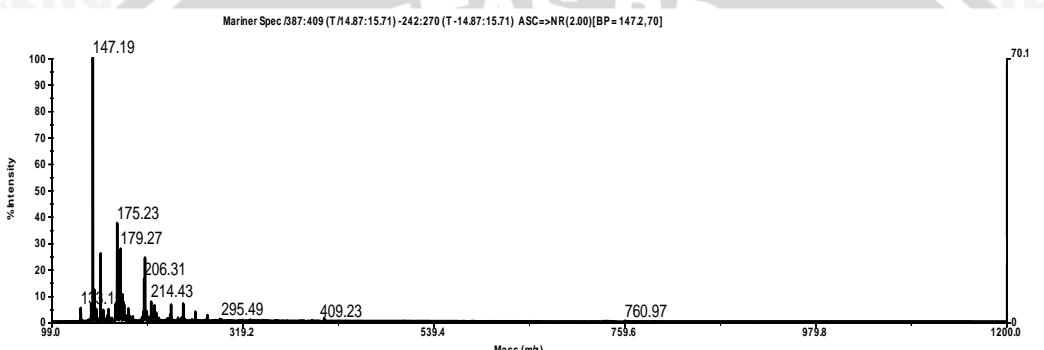
a) Rt 3,57



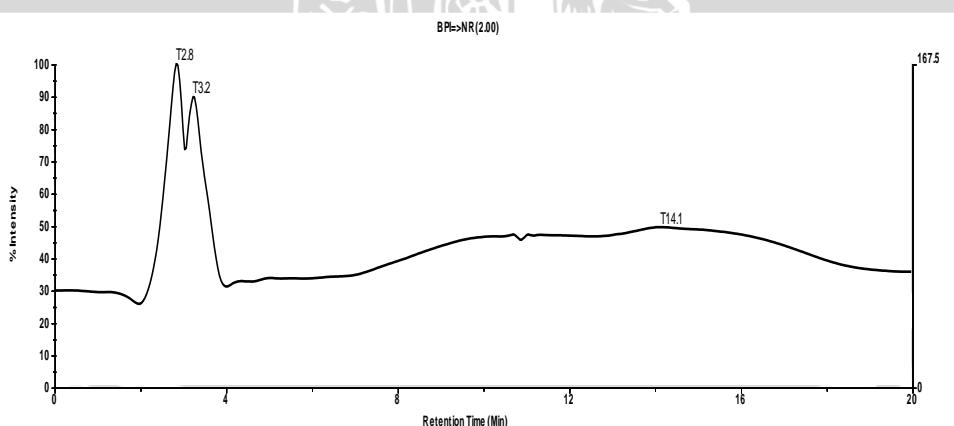
b) Rt 4,4



c) Rt 15,13



Gambar 22. a) Spektrum Massa untuk Waktu Retensi 3,4; b) Spektrum Massa untuk Waktu Retensi 4,4; dan c) Spektrum Massa untuk Waktu Retensi 15,13
 Sampel Ekstrak N-Heksan Tepung Kulit Batang

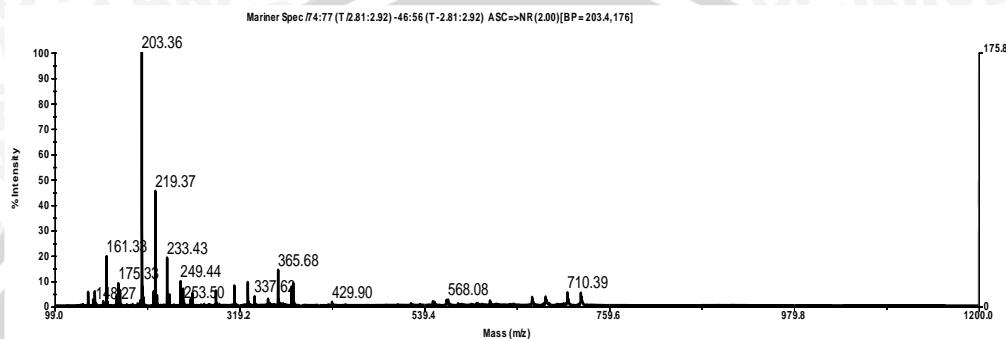


Gambar 23. Kromatogram Ekstrak Etil Asetat Tepung Kulit Batang

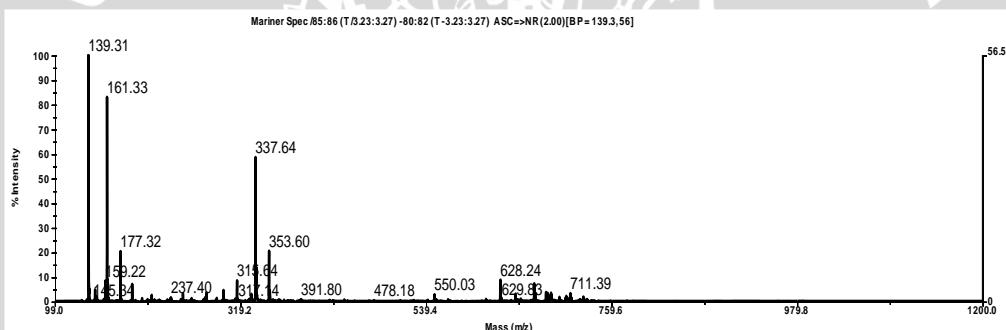
Berdasarkan hasil kromatogram diatas, dapat diketahui bahwa senyawa-senyawa yang berhasil terekstrak terlihat pada menit ke 2,84; 3,23 dan

14,13. Senyawa-senyawa yang teridentifikasi dari ketiga waktu retensi tersebut menghasilkan puncak-puncak tertinggi. Puncak tertinggi yang dihasilkan pada masing-masing waktu retensi untuk ekstrak etil asetat tepung kulit batang dapat dilihat pada Gambar 24.

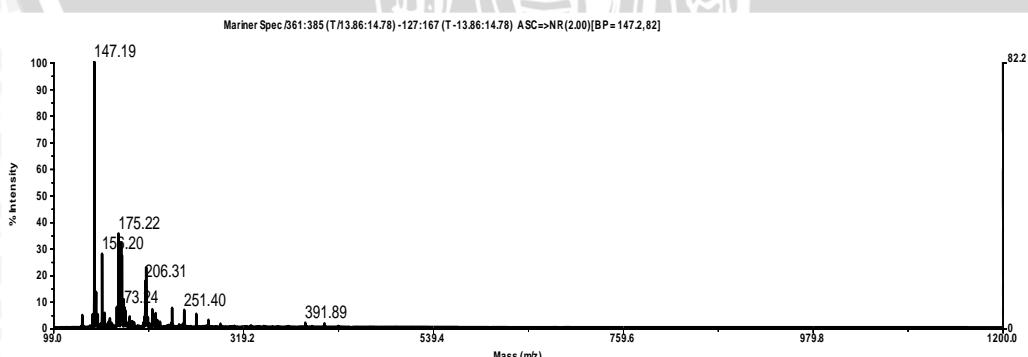
a) Rt 2,84



b) Rt 3,23



c) Rt 14,13



Gambar 24. a) Spektrum Massa untuk Waktu Retensi 2,84; b) Spektrum Massa untuk Waktu Retensi 3,23; dan c) Spektrum Massa untuk Waktu Retensi 14,13 Sampel Ekstrak Etil Asetat Tepung Kulit Batang



Pengujian LC-MS menggunakan metode ionisasi *electrospray ionization*

(ESI) modus positif dengan pelarut metanol. Ionisasi metode ESI positif akan menghasilkan ion molekul dengan penambahan kation, misalnya $[M+H]^+$, atau $[M+Na]^+$. Berikut adalah dugaan senyawa yang bersifat toksik (ekstrak n-heksan tepung kulit batang) dan senyawa yang bersifat antioksidan (ekstrak etil asetat tepung kulit batang) dapat dilihat pada Tabel 4.

Tabel 4. Dugaan Senyawa yang Bersifat Toksik (Ekstrak N-Heksan Tepung Kulit Batang) dan Senyawa yang Bersifat Antioksidan (Ekstrak Etيل Asetat Tepung Kulit Batang)

Perlakuan	Waktu Retensi	Massa Senyawa	Dugaan Senyawa	Rumus Molekul
Ekstrak n-heksan tepung kulit batang	3,57	180,36	<i>Theophylline</i>	$C_7H_8N_4O_2$
	4,43	336,63	<i>Berberin</i>	$C_{20}H_{18}NO_4$
	15,13	146,19	<i>Coumarin</i>	$C_9H_6O_2$
Ekstrak etil asetat tepung kulit batang	2,84	180,36	<i>Caffeic Acid</i>	$C_9H_8O_4$
	3,23	138,38	3,4-dihydroxybenzaldehyde	$C_7H_6O_3$
	14,13	146,19	<i>Coumarin</i>	$C_9H_6O_2$

Senyawa bioaktif yang teridentifikasi pada ekstrak n-heksan tepung kulit batang *Xylocarpus granatum* yaitu *theophylline*, *berberin* dan *coumarin*. Hal ini dapat menjelaskan bahwa senyawa yang memiliki aktivitas toksik paling akut adalah dari senyawa non polar yang didominasi oleh senyawa alkaloid (*theophylline* dan *berberin*). Sedangkan bioaktif yang teridentifikasi pada ekstrak etil asetat tepung kulit batang *Xylocarpus granatum* yaitu *caffeic acid*, 3,4-dihydroxybenzaldehyde dan *coumarin*. Hal ini dapat menjelaskan bahwa senyawa yang memiliki aktivitas antioksidan paling kuat adalah dari senyawa semi polar yang didominasi oleh golongan senyawa fenolik.

Theophylline merupakan alkaloid. *Theophylline* merupakan agen farmasi yang cukup larut dalam air, alkohol, kloroform, dan sedikit larut dalam eter (NTP TR, 1998). *Theophylline* bersifat toxicodrome (Mohamad et al., 2009).

Berberin adalah alkaloid isoquinoline. Berberin memiliki aktivitas farmakologi antara lain antihipertensi, antiinflamasi, antioksidan, antidepresan, antikanker, antidiare dan antimikroba (Singh *et al.*, 2010). Aktivitas antimikroba berberin telah teruji dalam pengobatan untuk infeksi yang disebabkan oleh bakteri, virus, jamur, protozoa dan cacing (Yin *et al.*, 2012).

Coumarin merupakan senyawa alami yang berasal dari tumbuhan dan dikenal karena sifat farmakologinya. Coumarin memiliki aktivitas antiinflamasi, antikoagulan, antibakteri, antijamur, antivirus, antikanker, antihipertensi, dan antioksidan (Venugopala *et al.*, 2013). Coumarin merupakan zat fenolik. Coumarin terdistribusi di seluruh bagian tanaman, dimana banyak dijumpai pada bagian buah, akar, batang dan daun (Jain dan Joshi, 2012).

Asam caffeic adalah senyawa aktif fenolik yang dapat ditemukan pada tumbuhan. Asam caffeic memiliki beberapa aktifitas biologis dan farmakologis seperti antivirus, antioksidan, anti inflamasi, dan anti kanker (Jayanthi dan Subash, 2010). Asam caffeic juga dapat disebut *3,4-dihydroxycinnamic acid* yang merupakan yang berpotensi sebagai antioksidan untuk menghambat oksidasi LDL maupun singlet oksigen (Gulcin, 2005).

3,4-dihydroxybenzaldehyde termasuk dalam golongan senyawa fenolik.

Golongan senyawa fenolik ini berasal dari degradasi lignin pada bagian kayu. *3,4-dihydroxybenzaldehyde* memiliki aktivitas antioksidan yang kuat, selain itu juga memiliki aktivitas penghambatan pada golongan jamur (Syafni *et al.*, 2012).



5. KESIMPULAN DAN SARAN

5.1 Kesimpulan

Kesimpulan yang diperoleh dari penelitian ini adalah:

- Perbedaan pelarut ekstraksi memberikan pengaruh terhadap toksisitas ekstrak tepung kulit batang *Xylocarpus granatum*. Ekstrak n-heksan tepung kulit batang *Xylocarpus granatum* memiliki potensi toksisitas akut yang lebih kuat dari ekstrak lainnya yang ditunjukkan dengan nilai LC₅₀ terendah yaitu sebesar 79,012 ppm.
- Perbedaan pelarut ekstraksi memberikan pengaruh terhadap aktivitas antioksidan ekstrak tepung kulit batang *Xylocarpus granatum*. Ekstrak etil asetat tepung kulit batang *Xylocarpus granatum* memiliki potensi aktivitas antioksidan paling kuat yang ditunjukkan dengan nilai IC₅₀ terendah yaitu sebesar 92,033 ppm.

5.2 Saran

Saran dari penelitian ini yaitu perlu diadakan penelitian lebih lanjut mengenai pemurnian ekstrak kulit batang *Xylocarpus granatum* sehingga senyawa murni yang memiliki potensi toksisitas akut dan antioksidan dapat teridentifikasi secara tepat dan dapat diaplikasikan sebagai produk suplemen ataupun obat.

DAFTAR PUSTAKA

- Agati, G., P Mattei., A Goti dan M Tattini. 2007. Chloroplast-Located Flavonoids Can Scavenge Singlet Oxygen. *Journal Compilation New Phytologist Research*. Halaman 77-89.
- Agus, M H. 2012. Pengeringan Lapisan Tipis Kentang (*Solanum tuberosum*. L) Varietas Granola. Skripsi. Fakultas Pertanian. Universitas Hasanuddin. Makassar. 47 halaman.
- Agustini, N W S. 2012. Aktivitas Antioksidan dan Uji Toksisitas Hayati Pigmen Fikobiliprotein dari Ekstrak *Spirulina platensis*. *Jurnal Hasil Seminar Nasional IX Pendidikan Biologi FKIP UNS*. Halaman 535-543.
- Agustino, W E S., S R D Ariani., Ashadi., B Mulyani dan C P Rahmawati. 2014. Skrining Fitokimia dan Identifikasi Komponen Utama Ekstrak Metanol Kulit Durian (*Durio zibethinus Murr.*) Varietas Petruk. *Jurnal Hasil Seminar Nasional Kimia dan Pendidikan Kimia VI*. Halaman 271-280.
- Akter, M., S Afrin., Sk N Sakib., R Biswas., Md M Billah., M S Rahman dan U S Zohora. 2016. Investigation of Antibacterial, Cytotoxic and Antioxidant Properties of The Mangrove Plant *Xylocarpus mekongensis*. *Journal Advances in Bioscience and Biotechnology*. (7) : 205-207.
- Artini, P E U D., Astuti K W dan Warditiani N K. 2013. Uji Fitokimia Ekstrak Etil Asetat Rimpang Bangle (*Zingiber purpureum Roxb.*). *Jurnal*. Halaman 1-7.
- Astarina, N W G., Astuti K W dan Warditiani N K. 2013. Uji Fitokimia Ekstrak Metanol Rimpang Bangle (*Zingiber purpureum Roxb.*). *Jurnal*. Halaman 1-7.
- Astrid, E Y., N H Suprapti dan J W Hidayat. 2009. Pengaruh Ekstrak Daun Teklan (*Eupatorium riparium*) terhadap Mortalitas dan Perkembangan Larva *Aedes aegypti*. *Jurnal BIOMA*. 11 (1) : 11-17.
- Awaludin, A P., M Firdaus dan R Nurdiani. 2011. Penapisan Fitokimia Dan Antibakteri Ekstrak Metanol Mangrove (*Excoecaria agallocha*) dari Muara Sungai Porong. *Berk Penel Hayati*. (17) : 69-72.
- Batari, R. 2007. Identifikasi Senyawa Flavonoid Pada Sayuran *Indigenous Jawa Barat*. Skripsi. Fakultas Teknologi Pertanian. Institut Pertanian Bogor. Bogor. 140 halaman.
- Cahyadi, R. 2009. Uji Toksisitas Akut Ekstrak Etanol Buah Pare (*Momordica charantia L*) Terhadap Larva *Artemia salina* Lench. dengan Metode *Brine Shrimp Lethality Test (BST)*. Laporan Akhir Penelitian Karya Tulis Ilmiah. Universitas Diponegoro. Semarang. 44 halaman.

- Darmadi, A A K dan I P G Ardhana. 2010. Komposisi Jenis-Jenis Tumbuhan Mangrove di Kawasan Hutan Perapat Benoa Desa Pemogan, Kecamatan Denpasar. *Jurnal Ilmu Dasar.* **11** (2) : 167-171.
- Darminto, Alimuddin, A., dan Iwan, D. 2009. Identifikasi Senyawa Metabolit Sekunder Potensial Menghambat Pertumbuhan Bakteri *aeromonas hydrophyla* dari Kulit Batang Tumbuhan *Aveccennia* sp. *Journal Chemical* . **10** (2): 92-99.
- Desinta, T. 2015. Penentuan Jenis Tanin Secara Kualitatif dan Penetapan Kadar Tanin dari Kulit Buah Rambutan (*Nephelius lappaceum L.*) Secara Permanganometri. *Jurnal Ilmiah Mahasiswa Universita Surabaya.* **4** (1) : 1-10.
- Dian, I T K., T A Sudjono., A Suhendi., M Da'l dan R Wirawati. 2012. Korelasi Kandungan Fenolik dan Aktivitas Antiradikal Ekstrak Etanol Daun Empat Tanaman Obat Indonesia (*Piper bettle*, *Sauropus androgynous*, *Averrhoa bilimbi*, dan *Guazuma ulmifolia*). *Journal Pharmacon* **13** (1) : 1-5.
- Donato, D C ., J B Kauffman., D Mudiyarso., S Kurnianti., M Stidham dan M Kanninen. 2012. Mangrove Adalah Salah Satu Hutan Terkaya Karbon di Kawasan Tropis. *Buletin.* (12) : 1-12.
- Dungir, S G., D G Katja dan V S Kamu. 2012. Aktivitas Antioksidan Ekstrak Fenolik dari Kulit Buah Manggis (*Garcinia mangostana L.*). *Jurnal MIPA Unsrat Online.* **1** (1) : 11-15.
- Dyah, N H. 2015. Aktivitas Antioksidan dan Total Fenol Teh Herbal Daun Pacar Air (*Impatiens balsamina*) dengan Variasi Lama Fermentasi dan Metode Pengeringan. Artikel Skripsi. Program Studi Pendidikan Biologi Fakultas Keguruan dan Ilmu Pendidikan. Universitas Muhammadiyah Surakarta. 11 halaman.
- Fathiyawati. 2008. Uji Toksisitas Ekstrak Daun *Ficus racemosa* L Terhadap *Artemia salina* Leach dan Profil Kromatografi Lapis Tipis. Skripsi. Fakultas Farmasi. Universitas Muhammadiyah Surakarta. Surakarta. Halaman 1-20.
- Fathonah, I. 2015. Uji Toksisitas Ekstrak Alga Coklat *Padina australis* dengan Pelaut yang Berbeda terhadap Larva *Artemia salina* Lench. Skripsi. Teknologi Hasil Perikanan FPIK. Universitas Brawijaya. Malang. 94 halaman.
- Firdiyani, F., T W Agustini dan W F Ma'ruf. 2015. Ekstraksi Senyawa Bioaktif Sebagai Antioksidan Alami *Spirulina platensis* Segar dengan Pelarut yang Berbeda. *JPHPI.* **18** (1) : 28-37.
- Fitriyani, A. 2009. Uji *In Vitro* Ekstrak Air dan Etanol dari Buah Asam Gelugur, Rimpang Lengkuas, dan Kencur Sebagai Inhibitor Aktivitas Lipase Pankreas. Artikel Skripsi. Departemen Kimia Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam. Institut Pertanian Bogor. Bogor. 43 halaman.

- Gazali, M. 2014. *Potensi Limbah Kulit Buah Xylocarpus granatum Koenig. Sebagai Inhibitor Tirosine.* Tesis. Sekolah Pasca Sarjana. Institut Pertanian Bogor. Bogor. Halaman 1-28.
- Gulcin, I. 2005. Antioxidant Activity of Caffeic Acid (3,4-Dihydroxycinnamic Acid). *Elsevier Toxicology Journal.* **217** : 213-220.
- Harborne, J.B. 1987. Metode Fitokimia Edisi ke dua. ITB. Bandung. 354 halaman.
- Haque, Md E., Md Nahidul I., Md Hafizur R dan A Uddin M. 2007. Antimicrobial and Cytotoxic Activities of the Crude Extracts and Isolated Compounds of *Xylocarpus mollucensis*. *Journal Pharmacy Science.* **6** (2): 109-112.
- Hermiastiti, M. 2013. Analisis Kadar Protein dan Identifikasi Asam Amino Pada Ikan Patin (*Pangasius djambal*). Skripsi. Jurusan Kimia Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam. Universitas Jember. 77 halaman.
- Huliselan Y M., M R J Runtuwene dan D S Wewengkang. 2015. Aktivitas Antioksidan Ekstrak Etanol, Etil Asetat, dan N-Heksan dari Daun Sesewanua (*Clerodendron squatum Vahl.*). *Pharmacon Jurnal Ilmiah Farmasi– UNSRAT.* **4** (3) : 155-163.
- Ika, R P. 2013. *Skrining Fitokimia dan Aktivitas Antioksidan Ekstrak Rumput Laut *Sargassum duplicatum* dan *Turbinaria ornata* Dari Jepara.* Tesis. Fakultas Perikanan Dan Ilmu Kelautan. Universitas Diponegoro. Semarang. 104 halaman.
- Ikhlas, M D., D Pandiangan., F E F Kandou dan A M Tangapo. 2014. Penapisan Alkaloid Pada Tumbuhan Paku dari Halmahera Utara. *Jurnal Mipa Unsrat Online.* **3** (2) : 102-107.
- Jaedun, A. 2011. Metodologi Penelitian Eksperimen. Makalah. Fakultas Teknik. UNY. 13 halaman.
- Jain, P K dan H Joshi. 2012. Coumarin: Chemical and Pharmacological Profile. *Journal of Applied Pharmaceutical Science.* **2** (6) : 236-240.
- Jayanegara, A dan A Sofyan. 2008. Penentuan Aktivitas Biologi Tanin beberapa Hijauan secara in Vitro menggunakan 'Hohenheim Gas Test' dengan Polietilen Glikol sebagai Determinan. *Media Peternakan.* **31** (1) : 44-52.
- Julyasih, K S M., I G P Wirawan., W S Harijani dan W Widajati. 2009. Aktivitas Antioksidan Beberapa Jenis Rumput Laut (Seaweeds) Komersial di Bali. *Jurnal Hasil Seminar Nasional Akselerasi Pengembangan Teknologi Pertanian dalam Mendukung Revitalisasi Pertanian.* Halaman 1-8.
- Kamilah, E H., A G Fasyah dan L Sa'adah. 2010. Fraksinasi dan Identifikasi Senyawa Tanin Pada Daun Belimbing Wuluh (*Averrhoa bilimbi L.*). *Jurnal Kimia.* **4** (2) : 193-200.



- Karisma, M G. 2012. Validasi Metode LC-MS Untuk Penentuan Senyawa Asam Trans, Trans-Mukonat, Asan Hippurat, Asam 2-Metil Hippurat, Asam 3-Metil Hippurat, Asam 4-Metil Hippurat dalam Urin Sebagai Biomarker Paparan Benzene, Toluen, dan Xilena. Skripsi. Program Studi Kimia Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam. Universitas Indonesia. Depok. 96 halaman.
- Khoirani, N. 2013. Karakterisasi Simplisia dan Standardisasi Ekstrak Etanol Herba Kemangi (*Ocimum americanum L.*). Skripsi. Fakultas Kedokteran dan Ilmu Kesehatan Program Studi Farmasi. UIN Syarif Hidayatullah. Jakarta. 98 halaman.
- Khristyana, L Y A., E Anggarwulan dan Marsusi. 2005. Pertumbuhan, Kadar Saponin dan Nitrogen Jaringan Tanaman Daun Sendok (*Plantago major L.*) pada Pemberian Asam Giberelat (GA₃). *Biofarmasi*. 3 (1): 11-15.
- Korompis, G E c., V R Danes., O J Sumampouw. 2010. Uji Invitro Aktivitas Antibakteri dari *Lansium domesticum* Correa (Langsat). *Journal Chem Prog.* 3 (1) : 13-19.
- Kumalasari, E dan N Sulistyani. 2011. Aktivitas Antifungi Ekstrak Etanol Batang Binahong (*Anredera cordifolia* (Tenore) Steen.) Terhadap *Candida albicans* Serta Skrining Fitokimia. *Jurnal Ilmiah Kefarmasian*. 1 (2) : 51-62.
- Kumar, S D., D Samantaray dan H Thatoi. 2014. *Ethnomedicinal, Antimicrobial and Antidiarrhoeal Studies on the Mangrove Plants of the Genus Xylocarpus: A Mini Review*. *Journal Bioanalysis and Biomedicine*. Halaman 1-7.
- Lakshmi, V ., N Singh., S Shrivastva., S K Mishra., P Dharmani., V Mishra dan G Palit. 2010. Gedunin and Photogedunin of *Xylocarpus granatum* Show Significant Anti-Secretory Effects and Protect The Gastric Mucosa of Peptic Ulcer in Rats. *Phytomedicine*. 17 : 569–574.
- Legowo, A M dan Nurwantoro. 2004. Diktat Kuliah Analisis Pangan. Program Studi Teknologi Hasil ternak Fakultas peternakan Universitas Diponegoro. Semarang. 54 halaman.
- Lenny, S. 2006. Senyawa Flavonoid, Fenilpropanoida dan Alkaloid. Karya Ilmiah. Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam. Universitas Sumatera Utara. Medan. 25 halaman.
- Lisdawati, V., Sumali, W., L. B. S. Kardono. 2007. Isolasi dan Elusidasi Struktur Senyawa Lignan dan Asam Lemak dari Ekstrak Daging Buah *Phaleria macrocarpa*. *Buletin Penelitian Kesehatan*. 35 (3) : 115-124.
- Liza, S., Azura Nst, R Sutri dan Iriany. 2015. Pembuatan Etil Asetat dari Hasil Hidrolisis, Fermentasi dan Esterifikasi Kulit Pisang Raja (*Musa paradisiaca L.*). *Jurnal Teknik Kimia USU*. 4 (1) : 1-6.
- Markham. 1988. Cara Identifikasi Flavonoid. ITB. Bandung. 449 halaman.

- Maulida, R dan A Guntarti. 2015. Pengaruh Ukuran Partikel Beras Hitam (*Oryza sativa L.*) Terhadap Rendemen Ekstrak dan Kandungan Total Antosianin. *Pharmaçiana*. **5** (1) : 9-16.
- Mayanti, T. 2009. Kandungan Kimia dan Bioaktivitas Tanaman Duku. UNPAD Press. 138 halaman.
- Mohamad, N., N N A Halim., R Ahmad dan K A Baharuddin. 2009. Theophylline Toxicity: A Case Report of The Survival of An Undiagnosed Patient Who Presented to The Emergency Department. *Malaysian Journal of Medical Sciences*. **16** (2) : 34-38.
- Molyneux, P. 2004. The Use of The Stable Free Radical Diphenylpicrylhydrazyl (DPPH) for Estimating Antioxidant Activity. *Journal Science and Technology*. **26** (2) : 211-219.
- Mongolsilp, S., I Pongbupakit., N S Lee dan W Sitthithawon. 2004. Radical Scavenging Activity and Total Phenolic Content of Medicinal Plants Used in Primary Health Care. *J Pharm Sci*. **9** (1) : 32-35.
- Muaja, A., Harry, S., dan Mas, R. J. 2013. Uji Toksisitas dengan Metode BSLT dan Analisis Kandungan Fitokimia Ekstrak Daun Soyogik (*Saurauia bracteosa DC*) dengan Metode Soxhletasi. *J. MIPA* **2** (2) : 115-118.
- Mulyati, E S. 2009. Uji Aktivitas Antibakteri Ekstrak Etil Asetat Daun Ceremai (*Phyllanthus dcidus* (L.) Skeels) Terhadap *Staphylococcus aureus* dan *Escherichia coli* dan Bioautografinya. Skripsi. Fakultas Farmasi. Universitas Muhammadiyah Surakarta. Halaman 1- 22.
- Munawaroh, S dan P A Handayani. 2010. Ekstraksi Minyak Daun Jeruk Purut (*Citrus hystrix* D.C.) dengan Pelarut Etanol dan N-Heksana. *Jurnal Kompetensi Teknik*. **2** (1) : 73-78.
- Nafisah, M., Tukiran., Suyatno., dan Nurul H. 2014. Uji skrining fitokimia pada ekstrak heksan, kloroform dan metanol dari tanaman patikan kebo (*Euphorbiae hirtae*). *Prosiding Seminar Nasional Kimia ISBN : 978-602-0951-00-3* : 279-286.
- Nasrul, R S., F C Nisa., R D Andriani dan J M Maligan. 2014. Analisis Rendemen dan Skrining Fitokimia Ekstrak Etanol Mikroalga Laut *Tetraselmis chuii*. *Jurnal Pangan dan Agroindustri*. **2** (2p) : 121-126.
- Nisfi, R R. 2010. Uji Toksisitas Terhadap *Artemia salina* Leach. dan Toksisitas Akut Komponen Bioaktif *Pandanus conoideus* Var. *Conoideus* Lam. Sebagai Kandidat Antikanker. Skripsi. Jurusan Biologi Fakultas Matematika Dan Ilmu Pengetahuan Alam. Universitas Sebelas Maret. Surakarta. 86 halaman.
- Notohadiprawiro, T. 2006. Metode penelitian dan Penulisan Ilmiah. Ilmu Tanah. Universitas Gajah Mada. 18 halaman.

- NTP TR. 1998. Toxicology and Carcinogenesis Studies of Theophylline. Department of Health and Human Services Public Health Service National Institutes of Health. Halaman 5.
- Nur, D F., S Yasni., A Suswantinah dan G W Aryani. 2013. Pencirian Mutu Kimia dan Mikrobiologis Produk Bandrek Instan dan Sirup Buah Pala (*Myristica fragrans*). *Jurnal Ilmu Pertanian Indonesia*. **18** (1): 43-48.
- Nuraini, A L., W Abdulkadir dan H Hasan. 2015. Uji Efek Sitotoksik Tinta Cumi (*Loligo sumatrensis*) Terhadap Larva Udang *Artemia salina* L. Menggunakan Metode BSLT (*Brine Shrimp Lethality Test*). *Jurnal*. Halaman 1-11 hlm.
- Nursid M., T Wikanta dan R Susilowati. 2013. Aktivitas Antioksidan, Sitotoksitas dan Kandungan Fukosantin Ekstrak Rumput Laut Coklat dari Pantai Binuangeun, Banten. *JB Kelautan dan Perikanan*. **8** (1) : 73-84.
- Nurul, M H dan Zuliyana. 2010. Pembuatan Metil Ester (Biodiesel) dari Minyak Dedak dan Metanol dengan Proses Esterifikasi dan Transesterifikasi. Skripsi. Jurusan Teknik Kimia Fakultas Teknik. Universitas Diponegoro. Semarang. 43 halaman.
- Pardede, A., D Ratnawati dan A Martono H P. 2013. Ekstraksi dan Karakterisasi Pektin dari Kulit Kemiri (*Alleurites mollucana* Willd). *Media Sains..* **5** (1) : 1-6.
- Patra, K P., A D Mohapatra., S K Rath., N K Dhal dan H Thatoi. 2009. Screening of Antioxidant and Antifiral Activity of Leaf Extracts of *Excoecaria agallocha* L. *International Journal of Integrative Biology*. **7** (1) : 9-15.
- Pramesti R. 2013. Aktivitas Antioksidan Ekstrak Rumput Laut *Caulerpa serrulata* dengan Metode DPPH (1,1 difenil 2 pikrilhidrazil). *Buletin Oseanografi Marina*. (2) : 7–15.
- Prijadi, D K., G J P Wahongan dan J B B Bernandus. 2014. Uji Efektifitas Ekstrak Daun Jeruk Nipis (*Citrus aurantifolia*) Dalam Menghambat Pertumbuhan Larva *Aedes spp*. Artikel Skripsi. Fakultas Kedokteran Universitas Sam Ratulangi. Manado. 7 halaman.
- Purnamasari, N., M A M Andriani dan Kawiji. 2013. Pengaruh Jenis Pelarut dan Variasi Suhu Pengering Spray Dryer Terhadap Kadar Karotenoid Kapang Oncom Merah (*Neurospora* sp.). *Jurnal Teknosains Pangan*. **2** (1) : 107-114.
- Purnobasuki, H. 2004. Potensi Mangrove Sebagai Tanaman Obat. *Jurnal Biota*. **9** (2) : 125-126.
- Purwanto. 2011. *Isolasi dan Identifikasi Senyawa Penghambat Polimerisasi Hem dari Fungi Endofit Tanaman Artemisia annua L..* Tesis. Program Studi Ilmu Farmasi Fakultas Farmasi. Universitas Gadjah Mada. Yogyakarta. 155 halaman.

- Puspita, P S., W S Rita dan N M Puspawati. 2015. Identifikasi dan Uji Aktivitas Senyawa Tanin dari Ekstrak Daun Trembesi (*Samanea saman* (Jacq.) Merr) Sebagai Antibakteri *Escherichia coli* (*E. coli*). *Jurnal Kimia*. **9** (1) : 27-34.
- Putri A U. 2013. Uji Potensi Antifungi Ekstrak Berbagai Jenis Lamun Terhadap Fungi *Candida albicans*. Skripsi. Jurusan Ilmu Kelautan Fakultas Ilmu Kelautan Dan Perikanan. Universitas Hasanuddin. Makassar. 63 halaman.
- Rasyid, A. 2012. Identifikasi senyawa metabolit sekunder serta uji aktivitas antibakteri dan antioksidan ekstrak metanol teripang *Stichopus hermanii*. *J. Ilmu dan Teknologi Kelautan Tropis*. **4** (2): 360-368.
- Ratnayani K., A A I A Mayun L., Ni P Indah S P. 2012. Kadar Total Senyawa Fenolat Pada Madu Randu dan Madu Kelengkeng Serta Uji Aktivitas Antiradikal Bebas Dengan Metode DPPH (*Difenilpirril Hidrazi*). *Jurnal Kimia*. **6** (2): 163-168.
- Redha, A. 2010. Flavonoid: Struktur, Sifat Antioksidatif dan Perannya dalam Sistem Biologis. *Jurnal Belian*. **9** (2) : 196-202.
- Risnafiani, A R. E Risnamawati dan H Aprilia. 2015. Karakterisasi Daun Buncis (*Phaseolus vulgaris* L.) dan Identifikasi Kandungan Senyawa Steroid dengan Metode Kromatografi Lapis Tipisan Kromatografi Cair Kinerja Tinggi. *Jurnal Prosiding Penelitian SPeSIA*. halaman 607-614.
- Risnawati, I S. 2002. Tanin. *Jurnal*. Halaman 1-8.
- Robinson, T. 1995. Kandungan Senyawa Organik Tumbuhan Tinggi. Diterjemahkan oleh Kosasih Padmawinata. ITB. Bandung. 367 halaman.
- Rohimat., I Widowati Dan A Trianto. 2014. Aktivitas Antioksidan Ekstrak Metanol Rumput Laut Coklat (*Turbinaria Conoides* dan *Sargassum Cristaeefolium*) yang Dikoleksi dari Pantai Rancabuaya Garut Jawa Barat. *Journal Of Marine Research*. **3** (3) : 304-313.
- Rosida, J. 2002. Uji Saponin Dalam Lidah Buaya, Limbah Buah Mengkudu dan Daun Mimba. *Jurnal Temu Teknis Non Penelitian*. Halaman 70-76.
- Rumayati., N Idiawati dan L Destiarti. 2014. Uji Aktivitas Antioksidan, Total Fenol dan Toksisitas dari Ekstrak Daun dan Batang Lakum (*Cayratia trifolia* (L) Domin). *JKK*. **3** (3) : 30-35.
- Salimin, Y K dan Bialangi N. 2014. Kajian Senyawa Antioksidan dan Antiinflamasi Tumbuhan Obat Binahong (*Andrederra cordifolia* (Ten.) Steenis) Asal Gorontalo. Laporan Tahunan Penelitian Hibah Fundamental. Universitas Negeri Gorontalo. 78 halaman.
- Sangi, M., M R J Runtuwene., H E I Simbala dan V M A Makang. 2008. Analisis Fitokimia Tumbuhan Obat di Kabupaten Minahasa Utara. *Chem Prog*. **1** (1) : 47-53.

- Santi, R N., Muhtadi., P Indrayudha. 2011. Aktivitas Antibakteri Ekstrak Etanol Kulit dan Biji Kelengkeng (*Euphoria longan* (Lour.) Steud) Terhadap *Escherichia coli* dan *Staphylococcus aureus* Serta Toksisitasnya Terhadap *Artemia salina* Leach. *PHARMACON.* **12** (1) : 33-39.
- Sastrosupadi, A. 2000. Rancangan Percobaan Praktis Bidang Pertanian. Kanisius. Yogyakarta. 276 halaman.
- Septiana, A dan A Asnani. 2012. Kajian Sifat Fisikokilia Ekstrak Rumput Laut Coklat *Sargassum duplicatum* Menggunakan Berbagai Pelarut dan Metode Ekstraksi. *Agrointek.* **6** (1): 22-28.
- Singh, A., S Duggal., N Kaur dan J Singh. 2010. Berberine: Alkaloid with Wide Spectrum of Pharmacological Activities. *Journal of Natural Products Vol. 3* : 64-75.
- Sri, S P D U. 2016. *Potensi Lindur (Bruguiera gymnorhiza) dari Mangrove Sebagai Antioksidan dan Inhibitor α-Glukosidase.* Tesis. Sekolah Pascasarjana. Institut Pertanian Bogor. Bogor. 84 halaman.
- Sri, S P D., Nurjanah., A M Jacoeb. 2015. Komposisi Kimia dan Aktivitas Antioksidan Akar, Kulit Batang dan Daun Lindur. *JPHPI.* **18** (2) : 205-219.
- Sumihe, J., R M J Runtuwene., J A Rorong. 2014. Analisis Fitokimia dan Penentuan Nilai LC₅₀ Ekstrak Metanol Daun Liwas. *Jurnal Ilmiah Sains.* **14** (2) : 125-128.
- Suryana. 2010. Metodologi Penelitian Model Praktis Penelitian Kuantitatif dan Kualitatif. Buku Ajar Perkuliahan. Universitas Pendidikan Indonesia. 58 halaman.
- Susanti, A D., D Ardiana., G Gumelar p., Y Bening G. 2012. Polaritas Pelarut Sebagai Pertimbangan dalam Pemilihan Pelarut Untuk Ekstraksi Minyak Bekatul dari Bekatul Varietas Ketan (*Oriza sativa Glatinosa*). *Jurnal Simposium Nasional RAPI XI FT UMS.* Halaman 8-14.
- Susanty, E S. 2014. Skrining Fitokimia Ekstrak Etanol Daun Gatal (*Laportea decumana* (Roxb.) Wedd). *PHARMACY.* **11** (1) : 98-107.
- Syafni, N., D P Putra., D Arbain. 2012. 3,4-Dihydroxybenzoic Acid and 3,4-Dihydroxybenzaldehyde from The Fern *Trichomanes chinense* L.; Isolation, Antimicrobial and Antioxidant Properties. *Indo Journal Chemical.* **12** (3) : 273-278.
- Syamsudi, A. 2014. Pedoman Uji Toksisitas Nonklinik Secara *in Vivo*. Peraturan Kepala Badan Pengawas Obat dan Makanan Republik Indonesia No. 7 Tahun 2014. Badan Pengawas Obat Dan Makanan Republik Indonesia. 165 halaman.



- Tamat S R., T Wikanta., L S Maulina. 2007. Aktivitas Antioksidan dan Toksisitas Senyawa Bioaktif dari Ekstrak Rumput Laut Hijau *Ulva reticulata* Forsskal. *Jurnal Ilmu Kefarmasian Indonesia*. **5** (1) : 31-36.
- Taroreh, M., S Raharjo., P Hastuti dan A Murdiati. 2015. Ekstraksi Daun Gedi (*Abelmoschus manihot* L) Secara Sekuensial dan Aktivitas Antioksidannya. *AGRITECH*. **35** (3) : 280-287.
- Tengo, N A., N Bialangi dan N Suleman. 2014. Isolasi dan Karakterisasi Senyawa Alkaloid dari Daun Alpukat (*Persea americana Mill*). *Jurnal*. Halaman 1-12.
- Tri, A S dan A Asnani. 2012. Kajian Sifat Fisikokimia Ekstrak Rumput Laut Coklat *Sargassum duplicatum* Menggunakan Berbagai Pelarut dan Metode Ekstraksi. *AGRITECH*. **35** (3) : 22-28.
- Trilochana, Y., P Sowjanya., G P V Sangeetha., P Rajeswara R dan Prof P Rajeswara R. 2013. Cardiotonic Activity of alcoholic Bark Extract of *Xylocarpus granatum* with Emphasis on Its Mechanism of Action. *iosr Journal of Pharmacy* **3** (1): 4-9.
- Utami, D. 2007. Sitotoksitas dan genotoksitas Antibakteri dari Ekstrak Metanol *Xylocarpus granatum*. Skripsi. Program Studi Teknologi Hasil Perikanan Fakultas Perikanan dan Ilmu Kelautan. Institut Pertanian Bogor. Bogor. 60 halaman.
- Venugopala, K N., V Rashmi dan B Odhav. 2013. Review on Natural Coumarin Lead Compounds for Their Pharmacological Activity. *Hindawi Publishing Corporation BioMed Research International*. Halaman 1-15.
- Wangensteen H., L Klarpas., M Alamgir., Anne B C S., K E Malterud. 2013. Can Scientific Evidence Support Using Bangladeshi Traditional Medicinal Plants in the Treatment of Diarrhoea? A Review on Seven Plants. *Journal Nutrients* **5** : 1757-1800.
- Widiyati, E. 2006. Penentuan Adanya Senyawa Triterpenoid dan Uji Aktivitas Biologis Pada Beberapa Spesies Tanaman Obat Tradisional Masyarakat Pedesaan Bengkulu. *Jurnal Gradien*. **2** (1): 116-122.
- Winangsih., E Prihastanti dan S Parman. 2013. Pengaruh Metode Pengeringan Terhadap Kualitas Simplicia Lempuyang Wangi (*Zingiber aromaticum* L.). *Buletin Anatomi dan Fisiologi*. **21** (1) : 19-25.
- Wullur A C., J Schaduw dan A N K Wardhani. 2013. Identifikasi Alkaloid Pada Daun Sirsak (*Annona muricata* L.). *Jurnal*. Halaman 54-56.
- Yanti, H., W Syafii dan I G K Tapa D. 2008. Bioaktivitas Ekstraktif Kulit Akasia *Acacia auriculiformis* A. Cunn. Ex. Benth Terhadap Rayap Tanah *Coptotermes curvignathus* Holmgren. *Jurnal*. Halaman 82-93.
- Yin, J., J Ye dan W Jia. 2012. Effects and Mechanisms of Berberine in Diabetes Treatment. *Journal Acta Pharmaceutica Sinica B*. **2** (4) : 327-334.

Yogia, E W. 2016. Uji Aktivitas Antioksidan Ekstrak Tumbuhan Sisik Naga (*Pyrrosia Piloselloides* (L) M.G Price) Pada Pohon Inang Jmbu Air (*Syzygium aqueum*) dengan Metode 2,2-diphenyl-1-picrylhidrazyl (DPPH) dan Penetapan Karakteristik Ekstrak. Skripsi. 111 halaman.

Yuhernita dan Juniarti. 2011. Analisis Senyawa Metabolit Sekunder dari Ekstrak Metanol Daun Surian yang Berpotensi Sebagai Antioksidan. *MAKARA Sains*. **15** (1) : 48-52.

Yulia O. 2007. Pengujian Kapasitas Antioksidan Ekstrak Polar, Nonpolar, Fraksi Protein dan Nonprotein Kacang Komak (*Lablab purpureus* (L.) Sweet). Skripsi. Departemen Ilmu dan Teknologi Pangan Fakultas Teknologi Pertanian Institut Pertanian Bogor. Bogor. 74 halaman.

Yusniarti, F D., Lita., A D Y Motolalu dan F Mentang. 2013. Kandungan Total Fenol Dalam Rumput Laut *Caulerpa racemosa* yang Berpotensi Sebagai Antioksidan. *Jurnal*. 5 halaman.

Zuhra, C F., J B Tarigan dan H Sitohang. 2008. Aktivitas Antioksidan Senyawa Flavonoid dari Daun Katuk (*Sauvagesia androgynus* (L) Merr.). *Jurnal Biologi Sumatera*. **3** (1) : 7–10.



LAMPIRAN**Lampiran 1. Perhitungan Konsentrasi Larutan Uji Toksisitas**

- Larutan induk (konsentrasi 2000 ppm)

$$\begin{aligned}\frac{x}{20 \text{ ml}} &= \frac{2000}{1.000.000} \\ x \times 1.000.000 &= 20 \times 2000 \\ x &= \frac{40.000}{1.000.000} \\ x &= 0,04 \text{ gram}\end{aligned}$$

Ekstrak kasar 0,04 gram ditambah air laut sampai volumenya menjadi 20 ml, maka akan dihasilkan larutan induk dengan konsentrasi 2000 ppm.

- Larutan ekstrak (konsentrasi 1000 ppm)

$$\begin{aligned}V_1 \cdot M_1 &= V_2 \cdot M_2 \\ V_1 \cdot 2000 &= 5 \times 1000 \\ V_1 &= 5000/2000 \\ V_1 &= 2,5 \text{ ml}\end{aligned}$$

Mengambil 2,5 ml dari konsentrasi 2000 ppm dan ditambah air laut sampai volumenya menjadi 5 ml.

- Larutan ekstrak (konsentrasi 500 ppm)

$$\begin{aligned}V_1 \cdot M_1 &= V_2 \cdot M_2 \\ V_1 \cdot 2000 &= 5 \times 500 \\ V_1 &= 2500/2000 \\ V_1 &= 1,25 \text{ ml}\end{aligned}$$

Mengambil 1,25 ml dari konsentrasi 2000 ppm dan ditambah air laut sampai volumenya menjadi 5 ml.

- Larutan ekstrak (konsentrasi 100 ppm)

$$\begin{aligned}V_1 \cdot M_1 &= V_2 \cdot M_2 \\ V_1 \cdot 2000 &= 5 \times 100 \\ V_1 &= 500/2000 \\ V_1 &= 0,25 \text{ ml}\end{aligned}$$

Mengambil kasar 0,25 ml dari konsentrasi 2000 ppm dan ditambah air laut sampai volumenya menjadi 5 ml.



- Larutan ekstrak (konsentrasi 50 ppm)

$$V_1 \cdot M_1 = V_2 \cdot M_2$$

$$V_1 \cdot 2000 = 5 \times 50$$

$$V_1 = 250/2000$$

$$V_1 = 0,125 \text{ ml}$$

Mengambil 0,125 ml dari konsentrasi 2000 ppm dan ditambah air laut sampai volumenya menjadi 5 ml.

- Larutan ekstrak (konsentrasi 25 ppm)

$$V_1 \cdot M_1 = V_2 \cdot M_2$$

$$V_1 \cdot 2000 = 5 \times 25$$

$$V_1 = 125/2000$$

$$V_1 = 0,0625 \text{ ml}$$

Mengambil 0,0625 ml dari konsentrasi 2000 ppm dan ditambah air laut sampai volumenya menjadi 5 ml.

- Larutan ekstrak (konsentrasi 12,5 ppm)

$$V_1 \cdot M_1 = V_2 \cdot M_2$$

$$V_1 \cdot 2000 = 5 \times 12,5$$

$$V_1 = 62,5/2000$$

$$V_1 = 0,03125 \text{ ml}$$

Mengambil 0,03125 ml dari konsentrasi 2000 ppm dan ditambah air laut sampai volumenya menjadi 5 ml..

- Larutan ekstrak (konsentrasi 0 ppm)

$$V_1 \cdot M_1 = V_2 \cdot M_2$$

$$V_1 \cdot 2000 = 5 \times 0$$

$$V_1 = 0. \text{ Diambil } 5 \text{ ml air laut saja.}$$



Lampiran 2. Perhitungan Pembuatan larutan DPPH 0,1 mM, Konsentrasi Larutan Uji Aktivitas Antioksidan dan Konsentrasi Larutan Vitamin C

➤ Perhitungan Pembuatan larutan DPPH 0,1 mM dalam 100 mL Metanol

Diketahui : Konsentrasi = 0,1 mM
 Volume = 100 mL = 0,1 L
 Mr DPPH ($C_{15}H_{12}N_5O_6$) = 394,3 g/mol

Ditanya gram DPPH yang dibutuhkan?

$$\begin{aligned} M &= \frac{\text{mol}}{\text{Volume (L)}} & \text{mol} &= \frac{\text{g}}{\text{Mr}} \\ 0,1 \times 10^{-3} &= \frac{\text{mol}}{0,1 \text{ L}} & 0,00001 &= \frac{\text{g}}{394,3} \\ 0,00001 &= \text{mol} & 0,003943 &= \text{g} \\ && 3,943 &= \text{mg} \end{aligned}$$

➤ Perhitungan Konsentrasi Larutan Uji Aktivitas Antioksidan

- Perhitungan Pembuatan Larutan Induk Ekstrak Mangrove

$$\begin{aligned} 1 \text{ ppm} &= \frac{1 \text{ mg}}{1000 \text{ mL}} & \frac{1000 \text{ mg}}{1000 \text{ mL}} &= \frac{x}{5 \text{ mL}} \\ 1000 \text{ ppm} &= \frac{1000 \text{ mg}}{1000 \text{ mL}} & x &= \frac{1000 \times 5}{1000} = 5 \text{ mg} \end{aligned}$$

Jadi, untuk membuat 1000 ppm larutan ekstrak dalam 5 mL methanol
 membutuhkan 5 mg ekstrak,

- Konsentrasi 12,5 ppm

$$V_1 \times M_1 = V_2 \times M_2$$

$$V_1 \times 1000 = 5 \times 12,5$$

$$V_1 \times 1000 = 62,5$$

$$V_1 = \frac{62,5}{1000}$$

$$= 0,0625 \text{ mL} \times 1000$$

$$= 6,25 \mu\text{L}$$

- Konsentrasi 100 ppm

$$V_1 \times M_1 = V_2 \times M_2$$

$$V_1 \times 1000 = 5 \times 100$$

$$V_1 \times 1000 = 500$$

$$V_1 = \frac{500}{1000}$$

$$= 0,5 \text{ mL} \times 1000$$

$$= 500 \mu\text{L}$$

- Konsentrasi 25 ppm Konsentrasi 200 ppm

$$V_1 \times M_1 = V_2 \times M_2$$

$$V_1 \times 1000 = 5 \times 25$$

$$V_1 \times 1000 = 125$$

$$V_1 = \frac{125}{1000}$$

$$= 0,125 \text{ mL} \times 1000 = 125 \mu\text{L}$$

$$V_1 \times M_1 = V_2 \times M_2$$

$$V_1 \times 1000 = 5 \times 200$$

$$V_1 \times 1000 = 1000$$

$$V_1 = \frac{1000}{1000}$$

$$= 1 \text{ mL} \times 1000 = 1000 \mu\text{L}$$

- Konsentrasi 50 ppm

$$V_1 \times M_1 = V_2 \times M_2$$

$$V_1 \times 1000 = 5 \times 50$$

$$V_1 \times 1000 = 250$$

$$V_1 = \frac{250}{1000} = 0,25 \text{ mL} \times 1000 = 250 \mu\text{L}$$

➤ Perhitungan Konsentrasi Larutan Vitamin C

- Perhitungan Pembuatan Larutan Induk Vitamin C

$$\frac{1000 \text{ mg}}{1000 \text{ mL}} = \frac{x}{5 \text{ mL}}$$

$$x = \frac{1000 \times 5}{1000}$$

$$x = 5 \text{ mg}$$

Jadi, untuk membuat 1000 ppm larutan vitamin C dalam 5 mL methanol
membutuhkan 5 mg ekstrak,

- Konsentrasi 2 ppm

$$V_1 \times M_1 = V_2 \times M_2$$

$$V_1 \times 1000 = 5 \times 2$$

$$V_1 \times 1000 = 10$$

$$V_1 = \frac{10}{1000}$$

$$= 0,01 \text{ mL} \times 1000$$

$$= 10 \mu\text{L}$$

- Konsentrasi 16 ppm

$$V_1 \times M_1 = V_2 \times M_2$$

$$V_1 \times 1000 = 5 \times 16$$

$$V_1 \times 1000 = 80$$

$$V_1 = \frac{80}{1000}$$

$$= 0,08 \text{ mL} \times 1000$$

$$= 80 \mu\text{L}$$

- Konsentrasi 4 ppm

$$V_1 \times M_1 = V_2 \times M_2$$

$$V_1 \times 1000 = 5 \times 4$$

$$V_1 \times 1000 = 20$$

$$V_1 = \frac{20}{1000}$$

$$= 0,02\text{mL} \times 1000$$

$$= 20 \mu\text{L}$$

- Konsentrasi 32 ppm

$$V_1 \times M_1 = V_2 \times M_2$$

$$V_1 \times 1000 = 5 \times 32$$

$$V_1 \times 1000 = 160$$

$$V_1 = \frac{160}{1000}$$

$$= 0,16\text{mL} \times 1000$$

$$= 160 \mu\text{L}$$

- Konsentrasi 8 ppm

$$V_1 \times M_1 = V_2 \times M_2$$

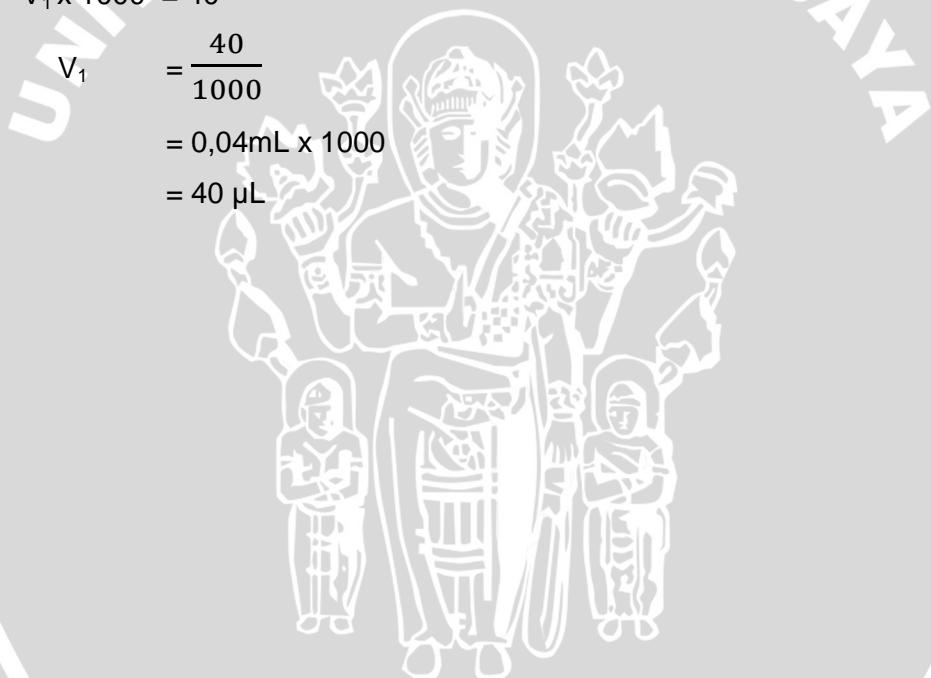
$$V_1 \times 1000 = 5 \times 8$$

$$V_1 \times 1000 = 40$$

$$V_1 = \frac{40}{1000}$$

$$= 0,04\text{mL} \times 1000$$

$$= 40 \mu\text{L}$$



**Lampiran 3. Rancangan Penelitian, Data Hasil Perhitungan dan ANOVA
(Analysis of Variance) Rendemen Ekstrak Kulit Batang
*Xylocarpus granatum***

- Rancangan Penelitian Pengaruh Perbedaan Pelarut Ekstraksi dan Bentuk Sampel Kulit Batang *Xylocarpus granatum* Terhadap Ekstrak yang Diperoleh

Perlakuan	Ulangan		
	1	2	3
Segar-Heksan (SH)	SH (1)	SH (2)	SH (3)
Segar-Etil Asetat (SE)	SE (1)	SE (2)	SE (3)
Segar-Metanol (SM)	SM (1)	SM (2)	SM (3)
Kering-Heksan (KH)	KH (1)	KH (2)	KH (3)
Kering-Etil Asetat (KE)	KE (1)	KE (2)	KE (3)
Kering-Metanol (KM)	KM (1)	KM (2)	KM (3)
Tepung-Heksan (TH)	TH (1)	TH (2)	TH (3)
Tepung-Etil Asetat (TE)	TE (1)	TE (2)	TE (3)
Tepung-Metanol (TM)	TM (1)	TM (2)	TM (3)

- Data Hasil Rendemen Ekstrak Kulit Batang *Xylocarpus granatum*

Bentuk Sampel	Pelarut	Ulangan	Berat Awal (g)	Berat Akhir (g)	Rendemen (%)	Mean	Std. Dev
Segar	N-Heksan	1	150	1,767	1,178		
		2	150	1,577	1,051	1,150	0,089
		3	150	1,833	1,222		
	Etil Asetat	1	150	5,572	3,715		
		2	150	5,166	3,444	3,654	0,187
		3	150	5,703	3,802		
	Metanol	1	150	12,071	8,047		
		2	150	11,673	7,782	8,022	0,228
		3	150	12,355	8,237		
Kering	N-Heksan	1	150	3,416	2,277		
		2	150	3,167	2,111	2,056	0,254
		3	150	2,667	1,778		
	Etil Asetat	1	150	8,877	5,918		
		2	150	9,514	6,343	6,008	0,301
		3	150	8,643	5,762		
	Metanol	1	150	16,757	11,171		
		2	150	16,418	10,945	11,189	0,253
		3	150	17,177	11,451		
Tepung	N-Heksan	1	150	14,193	9,462		
		2	150	13,632	9,088	9,081	0,384
		3	150	13,041	8,694		
	Etil Asetat	1	150	24,253	16,169		
		2	150	24,561	16,374	16,147	0,239
		3	150	23,846	15,897		
	Metanol	1	150	28,307	18,871		
		2	150	27,905	18,603	18,843	0,227
		3	150	28,581	19,054		

Contoh Perhitungan Rendemen

- Segar-Heksan

$$\begin{aligned}\% \text{ Rendemen (U1)} &= \frac{\text{berat ekstrak}}{\text{berat sampel yang diekstrak}} \times 100 \% \\ &= \frac{1,767 \text{ g}}{150 \text{ g}} \times 100 \% \\ &= 1,178 \% \end{aligned}$$

➤ [ANOVA \(Analysis of Variance\) Ekstrak Kulit Batang *Xylocarpus granatum*](#)

Data hasil penelitian dianalisis dengan menggunakan ANOVA (*Analysis of Variance*) untuk mengetahui pengaruh perlakuan terhadap respon parameter yang dilakukan dengan uji F pada taraf kepercayaan 95%. Apabila nilai $F_{\text{hitung}} >$ dari F_{tabel} maka dapat dilakukan uji lanjut, salah satunya dengan uji Tukey.

Source	Type III Sum of Squares (Jumlah Kuadrat)	df (Derajat Bebas)	Mean Square (Kuadrat Tengah)	F_{hitung}	$F_{\text{tabel}} (5\%)$	Sig.
1.Ulangan		2				
2.Corrected Model (perlakuan)	895,427	8	111,928	1766		,000
3.Intercept	1932,873	1	1932,873	3050		,000
4.PERLAKUAN_A (bentuk sampel)	544,96	2	272,248	4296	3,63	,000
5.PERLAKUAN_B (pelarut ekstraksi)	332,232	2	166,116	2621	3,63	,000
6.PERLAKUAN_A * PERLAKUAN_B	18,699	4	4,675	73,759	3,01	,000
7.Galat		16				
8.Error	1,141	18	,063			
9.Total	2829,441	27				
10. Corrected Total	896,568	26				

Berdasarkan tabel di atas dapat diketahui bahwa nilai F_{hitung} dari perlakuan A, B serta interaksi A dan B lebih besar dari F_{tabel} . Ketika $F_{\text{hitung}} >$ dari F_{tabel} maka perbedaan bentuk sampel, perbedaan pelarut ekstraksi serta interaksi

antara perbedaan bentuk sampel dan pelarut ekstraksi memberikan pengaruh yang nyata terhadap hasil rendemen ekstrak.

Uji Lanjut Tukey

Interaksi	Subset for alpha = 0.05									Notasi
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	
Segar-heksan	1,15									a
Kering-heksan		2,06								b
Segar-etyl			3,66							c
Kering-etyl				6,01						d
Segar metanol					8,02					e
Tepung-heksan						9,08				f
Kering-metanol							11,19			g
Tepung-etyl								16,15		h
Tepung-metanol									18,84	i
Sig.	1,00	1,00	1,00	1,00	1,00	1,00	1,00	1,00	1,00	

**Lampiran 4. Data Hasil Perhitungan Kadar Air Ekstrak Tepung Kulit Batang
Mangrove *Xylocarpus granatum***

Perlakuan	Ulangan	Berat Cawan (g)	Berat Akhir (g)	Berat Sampel (g)	Kadar Air (%)	Mean
Ekstrak n-heksan tepung kulit batang	u1	103,82	104,70	1	12	12,667
	u2	102,74	103,61	1	13	
	u3	103,67	104,54	1	13	
Ekstrak etil asetat tepung kulit batang	u1	94,98	95,85	1	13	12,667
	u2	94,92	95,79	1	13	
	u3	97,25	98,13	1	12	
Ekstrak metanol tepung kulit batang	u1	97,25	98,12	1	13	13,333
	u2	97,23	98,09	1	14	
	u3	94,98	95,85	1	13	

Contoh Perhitungan Kadar Air

- Ekstrak tepung kulit batang n-heksan

$$\text{Kadar air (u1)} = \frac{(\text{berat cawan} + \text{berat sampel}) - \text{berat akhir}}{\text{berat sampel}} \times 100\%$$

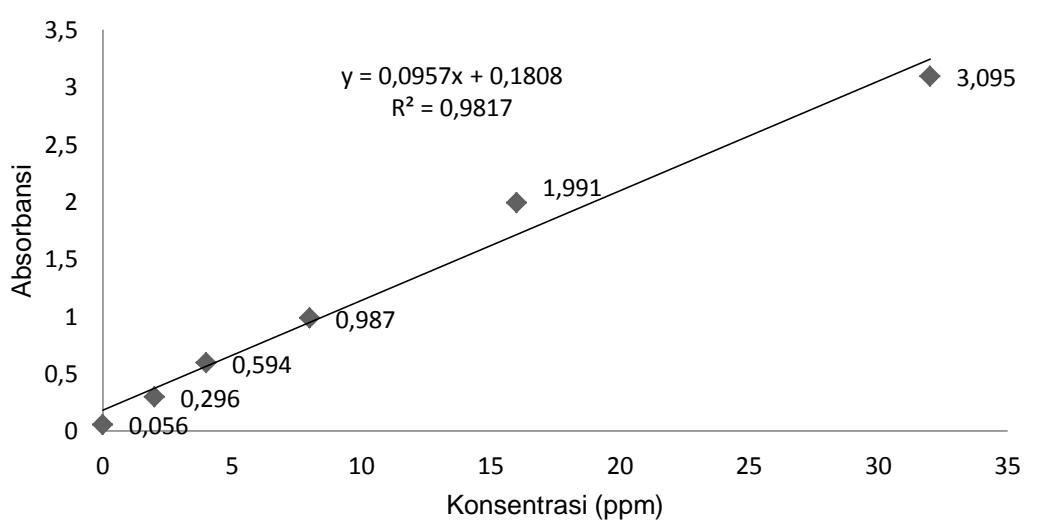
$$= \frac{(103,82\text{g} + 1\text{g}) - 104,7\text{g}}{1} \times 100\% = 12\%$$

Lampiran 5. Hasil Uji Larutan Standar Asam Galat Serta Kurva Kalibrasi Asam Galat

➤ Hasil Uji Larutan Standar Asam Galat

Konsentrasi (ppm)	Absorbansi
0	0,056
2	0,296
4	0,594
8	0,987
16	1,991
32	3,095

➤ Kurva Kalibrasi Asam Galat



Lampiran 6. Data Hasil Perhitungan dan ANOVA (Analysis of Variance) Uji Total Fenol Ekstrak Tepung Kulit Batang *Xylocarpus granatum*

➤ Data Hasil Perhitungan Uji Total Fenol Ekstrak Tepung Kulit Batang *Xylocarpus granatum*

Perlakuan	Ulangan	Berat Sampel	Absorbansi (y)	Konsentrasi Kadar Fenol (ppm atau µg/ml)	Total Fenol (µgGAE)	Total Fenol (mgGAE)	Total Fenol (mgGAE/100g)	Mean	Std.Dev
Ekstrak n-heksan tepung kulit batang	1	0,01	0,473	3,053	30,533	0,031	305,329	362,104	30,491
	2	0,01	0,533	3,680	36,803	0,037	368,025		
	3	0,01	0,555	3,910	39,101	0,039	391,014		
	4	0,01	0,519	3,534	35,340	0,035	353,396		
	5	0,01	0,544	3,795	37,952	0,038	379,519		
	6	0,01	0,540	3,753	37,534	0,038	375,340		
Ekstrak etil asetat tepung kulit batang	1	0,01	0,580	4,171	41,714	0,042	417,137	409,126	32,441
	2	0,01	0,529	3,638	36,385	0,036	363,845		
	3	0,01	0,549	3,847	38,474	0,038	384,744		
	4	0,01	0,605	4,433	44,326	0,044	443,260		
	5	0,01	0,564	4,004	40,042	0,040	400,418		
	6	0,01	0,607	4,454	44,535	0,045	445,350		
Ekstrak metanol tepung kulit batang	1	0,01	0,582	4,192	41,923	0,042	419,227	392,059	26,690
	2	0,01	0,576	4,130	41,296	0,041	412,957		
	3	0,01	0,563	3,994	39,937	0,040	399,373		
	4	0,01	0,514	3,482	34,817	0,035	348,171		
	5	0,01	0,538	3,732	37,325	0,037	373,250		
	6	0,01	0,563	3,994	39,937	0,040	399,373		

Contoh Perhitungan Uji Total Fenol Ekstrak N-Heksan Tepung Kulit Batang
Ulangan 1

1. Konsentrasi kadar fenol

$$y = 0,0957x + 0,1808$$

$$0,473 = 0,0957x + 0,1808$$

$$x = \frac{0,473 - 0,1808}{0,0957}$$

$$x = 3,053 \text{ ppm } (\mu\text{g/ml})$$

2. Kadar Ekuivalen asam galat

Kadar ekuivalen = konsentrasi kadar fenol x jumlah total larutan uji

$$= 3,05 \mu\text{g/ml} \times 10 \text{ ml}$$

$$= 30,533 \mu\text{gGAE}$$

$$= 0,031 \text{ mgGAE}$$

3. Total Fenol

$$\frac{\text{Kadar ekuivalen}}{\text{berat sampel}} = \frac{\text{total fenol}}{100 \text{ g}}$$

$$\frac{0,031 \text{ mgGAE}}{0,01 \text{ g}} = \frac{\text{total fenol}}{100 \text{ g}}$$

$$\text{Total fenol} = \frac{0,031 \text{ mgGAE} \times 100 \text{ g}}{0,01 \text{ g}}$$

$$= 305,329 \text{ mgGAE/100g}$$

- ANOVA (*Analysis of Variance*) Uji Total Fenol Ekstrak Tepung Kulit Batang *Xylocarpus granatum*

Data hasil penelitian dianalisis dengan menggunakan ANOVA (*Analysis of Variance*) untuk mengetahui pengaruh perlakuan terhadap respon parameter yang dilakukan dengan uji F pada taraf kepercayaan 95%. Apabila nilai F_{hitung} > dari F_{tabel} maka dapat dilakukan uji lanjut, salah satunya dengan uji BNT.

Perlakuan	Sum of Squares (JK)	df (derajat bebas)	Mean Square	F_{hitung}	F_{tabel}	Sig.
Between Groups	6799,246	2	3399,623	3,785	2,131	,047
Within Groups	13472,465	15	898,164			
Total	20271,711	17				

Berdasarkan tabel di atas dapat diketahui bahwa nilai F_{hitung} (3,785) > dari F_{tabel} (2,131) yang artinya perbedaan pelarut ekstraksi memberikan pengaruh yang nyata terhadap hasil total fenol ekstrak.

$$\begin{aligned} \text{Nilai BNT}_{\alpha} &= t_{(0,05;\text{db galat})} \times \sqrt{\frac{2 \times KTG}{ulangan}} \\ &= t_{(0,05;15)} \times \sqrt{\frac{2 \times 898,164}{6}} \\ &= 2,131 \times 17,303 = 36,872 \end{aligned}$$

Tabel notasi

Perlakuan	Mean	Notasi	Mean + Nilai BNT
N-Heksan	362,104	a	398,976
Metanol	392,058	ab	428,930
Etil Asetat	409,126	b	445,998

Lampiran 7. Data Hasil Perhitungan dan ANOVA (Analysis of Variance) Uji Toksisitas Ekstrak Tepung Kulit Batang *Xylocarpus granatum*

- Data Hasil Perhitungan Uji Toksisitas Ekstrak Tepung Kulit Batang *Xylocarpus granatum*

- Ekstrak N-Heksan Tepung Kulit Batang

Sampel	Konsentrasi (ppm)	Jumlah <i>Artemia</i> yang Mati					
		U1	U2	U3	U4	U5	U6
Ekstrak n-heksan	0	0	0	0	0	0	0
tepung	12,5	1	1	2	1	2	2
kulit	25	2	3	2	2	2	3
batang	50	4	3	3	4	3	4
	100	4	5	5	4	4	5
	500	9	9	8	8	8	8
	1000	10	10	10	10	10	10

✓ Ulangan 1

Sampel	ppm	Jumlah <i>Artemia</i> Mati	% Mortalitas	Log Konsentrasi	% Probit	Persamaan regersi	R ²	LC ₅₀ (ppm)
Ekstrak n-heksan	0	0	0	0	0			
tepung	12,5	1	10	1,1	3,72			
kulit	25	2	20	1,4	4,16			
batang	50	4	40	1,7	4,75	y = 2,4088x + 0,4407	0,956	78,163
	100	4	40	2	4,75			
	500	9	90	2,7	6,28			
	1000	10	100	3	8,09			

✓ Ulangan 2

Sampel	ppm	Jumlah <i>Artemia</i> Mati	% Mortalitas	Log Konsentrasi	% Probit	Persamaan regersi	R ²	LC ₅₀ (ppm)
Ekstrak n-heksan	0	0	0	0	0			
tepung	12,5	1	10	1,1	3,72			
kulit	25	3	30	1,4	4,48			
batang	50	3	30	1,7	4,48	y = 2,4054x + 0,4894	0,9539	74,989
	100	5	50	2	5			
	500	9	90	2,7	6,28			
	1000	10	100	3	8,09			

✓ Ulangan 3

Sampel	ppm	Jumlah Artemia Mati	% Mortalitas	Log Konsentrasi	% Probit	Persamaan regresi	R ²	LC ₅₀ (ppm)
Ekstrak	0	0	0	0	0	$y = 2,306x + 0,6126$	0,9192	79,983
n-	12,5	2	20	1,1	4,16			
heksan	25	2	20	1,4	4,16			
tepung	50	3	30	1,7	4,48			
kulit	100	5	50	2	5			
batang	500	8	80	2,7	5,84			
	1000	10	100	3	8,09			

✓ Ulangan 4

Sampel	ppm	Jumlah Artemia Mati	% Mortalitas	Log Konsentrasi	% Probit	Persamaan regresi	R ²	LC ₅₀ (ppm)
Ekstrak	0	0	0	0	0	$y = 2,3369x + 0,5001$	0,9342	84,333
n-	12,5	1	10	1,1	3,72			
heksan	25	2	20	1,4	4,16			
tepung	50	4	40	1,7	4,75			
kulit	100	4	40	2	4,75			
batang	500	8	80	2,7	5,84			
	1000	10	100	3	8,09			

✓ Ulangan 5

Sampel	ppm	Jumlah Artemia Mati	% Mortalitas	Log Konsentrasi	% Probit	Persamaan regresi	R ²	LC ₅₀ (ppm)
Ekstrak	0	0	0	0	0	$y = 2,2938x + 0,5977$	0,9141	82,985
n-	12,5	2	20	1,1	4,16			
heksan	25	2	20	1,4	4,16			
tepung	50	3	30	1,7	4,48			
kulit	100	4	40	2	4,75			
batang	500	8	80	2,7	5,84			
	1000	10	100	3	8,09			

✓ Ulangan 6

Sampel	ppm	Jumlah Artemia Mati	% Mortalitas	Log Konsentrasi	% Probit	Persamaan regresi	R ²	LC ₅₀ (ppm)
Ekstrak	0	0	0	0	0	$y = 2,2904x + 0,7235$	0,9103	73,621
n-	12,5	2	20	1,1	4,16			
heksan	25	3	30	1,4	4,48			
tepung	50	4	40	1,7	4,75			
kulit	100	5	50	2	5			
batang	500	8	80	2,7	5,84			
	1000	10	100	3	8,09			

Contoh pengolahan data dengan analisa probit untuk ulangan 6 sampel ekstrak n-heksan tepung kulit batang dimulai dengan mencari % mortalitas (kematian) *Artemia* yaitu dengan menggunakan rumus:

$$\% \text{ Mortalitas } Artemia = \frac{\text{Jumlah } Artemia \text{ yang mati}}{\text{jumlah } Artemia \text{ uji}} \times 100\%$$

$$0 \text{ ppm} = \frac{0}{10} \times 100\% = 0\%$$

$$12,5 \text{ ppm} = \frac{2}{10} \times 100\% = 20\%$$

$$25 \text{ ppm} = \frac{3}{10} \times 100\% = 30\%$$

$$50 \text{ ppm} = \frac{4}{10} \times 100\% = 40\%$$

$$500 \text{ ppm} = \frac{8}{10} \times 100\% = 80\%$$

$$1000 \text{ ppm} = \frac{10}{10} \times 100\% = 100\%$$

Setelah itu, variasi konsentrasi yang digunakan antara lain 0; 12,5; 25; 50; 100; 500 dan 1000 ppm dilogaritma sebagai berikut:

$$\log 0 = 0 \quad \log 100 = 2$$

$$\log 12,5 = 1,1 \quad \log 500 = 2,7$$

$$\log 25 = 1,4 \quad \log 1000 = 3$$

$$\log 50 = 1,7$$



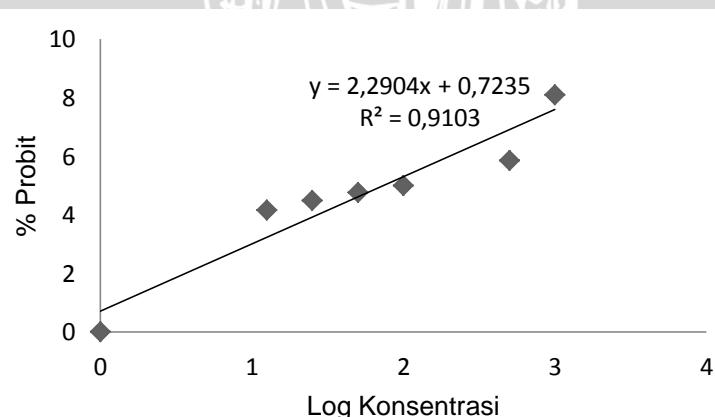
Langkah selanjutnya menentukan nilai % probit dengan melihat tabel probit presentase mortalitas di bawah ini:

% mortalitas	0	1	2	3	4	5	6	7	8	9
0	-	2.67	2.95	3.12	3.25	3.36	3.45	3.52	3.59	3.66
10	3.72	3.77	3.82	3.87	3.92	3.96	4.01	4.05	4.08	4.12
20	4.16	4.19	4.23	4.26	4.29	4.33	4.36	4.39	4.42	4.45
30	4.48	4.50	4.53	4.56	4.59	4.61	4.64	4.67	4.69	4.72
40	4.75	4.77	4.80	4.82	4.85	4.87	4.90	4.92	4.95	4.97
50	5.00	5.03	5.05	5.08	5.10	5.13	5.15	5.18	5.20	5.23
60	5.25	5.28	5.31	5.33	5.36	5.39	5.41	5.44	5.47	5.50
70	5.52	5.55	5.58	5.61	5.64	5.67	5.71	5.74	5.77	5.81
80	5.84	5.88	5.92	5.95	5.99	6.04	6.08	6.13	6.18	6.23
90	6.28	6.34	6.41	6.48	6.55	6.64	6.75	6.88	7.05	7.33
-	0.0	0.1	0.2	0.3	0.4	0.5	0.6	0.7	0.8	0.9
99	7.33	7.37	7.41	7.46	7.51	7.58	7.65	7.75	7.88	8.09

Keterangan:

: nilai % probit

Kemudian data log konsentrasi dan % probit yang telah di dapat di masukkan kedalam Microsoft excel sehingga diperoleh persamaan pada grafik sebagai berikut:



Gambar. Grafik Regresi Log Konsentrasi dan % Probit Kematian Artemia
(Sampel Ekstrak N-Heksan Tepung Kulit Batang U6)

Berdasarkan grafik diatas didapatkan persamaan $y = 2,2904x + 0,7235$. Dimasukkan nilai probit 5 (50% kematian) ke persamaan tersebut, sehingga di dapatkan nilai LC_{50} (konsentrasi sampel yang mampu menyebabkan sebanyak 50% hewan uji mati).

$$y = 2,2904x + 0,7235$$

$$5 = 2,2904x + 0,7235$$

$$x = \frac{5 - 0,7235}{2,2904}$$

$$= 1,867$$

$$\text{Anti Log dari } 1,867 = 73,621 \text{ ppm}$$

$$LC_{50} = 73,621 \text{ ppm}$$



- Ekstrak Etil Asetat Tepung Kulit Batang

Sampel	Konsentrasi (ppm)	Jumlah <i>Artemia</i> yang Mati					
		U1	U2	U3	U4	U5	U6
Ekstrak etil asetat	0	0	0	0	0	0	0
tepung	12,5	2	2	2	1	1	1
kulit	25	2	1	2	3	1	2
batang	50	3	2	2	3	3	2
	100	5	5	5	7	5	4
	500	9	9	9	8	7	7
	1000	9	9	9	9	10	10

✓ Ulangan 1

Sampel	ppm	Jumlah <i>Artemia</i> Mati	% Mortalitas	Log Konsentrasi	% Probit	Persamaan regresi	R ²	LC ₅₀ (ppm)
Ekstrak etil asetat	0	0	0	0	0			
tepung	12,5	2	20	1,1	4,16			
kulit	25	2	20	1,4	4,16			
batang	50	3	30	1,7	4,48	y = 1,9935x + 0,9047	0,9047	107,647
	100	5	50	2	5	+ 0,9483		
	500	9	90	2,7	6,28			
	1000	9	90	3	6,28			

✓ Ulangan 2

Sampel	ppm	Jumlah <i>Artemia</i> Mati	% Mortalitas	Log Konsentrasi	% Probit	Persamaan regresi	R ²	LC ₅₀ (ppm)
Ekstrak etil asetat	0	0	0	0	0			
tepung	12,5	2	20	1,1	4,16			
kulit	25	1	10	1,4	3,72			
batang	50	2	20	1,7	4,16	y = 2,015x + 0,803	0,9149	121,060
	100	5	50	2	5			
	500	9	90	2,7	6,28			
	1000	9	90	3	6,28			

✓ Ulangan 3

Sampel	ppm	Jumlah <i>Artemia</i> Mati	% Mortalitas	Log Konsentrasi	% Probit	Persamaan regresi	R ²	LC ₅₀ (ppm)
Ekstrak etil asetat	0	0	0	0	0			
tepung	12,5	2	20	1,1	4,16			
kulit	25	2	20	1,4	4,16			
batang	50	2	20	1,7	4,16	y = 1,9935x + 0,9025	0,9048	113,501
	100	5	50	2	5			
	500	9	90	2,7	6,28			
	1000	9	90	3	6,28			

✓ Ulangan 4

Sampel	ppm	Jumlah Artemia Mati	% Mortalitas	Log Konsentrasi	% Probit	Persamaan regresi	R ²	LC ₅₀ (ppm)
Ekstrak	0	0	0	0	0			
etil	12,5	1	10	1,1	3,72			
asetat	25	3	30	1,4	4,48			
tepung	50	3	30	1,7	4,48	y = 2,0464x + 0,9154	0,9102	99,083
kulit	100	7	70	2	5,52			
batang	500	8	90	2,7	6,28			
	1000	9	90	3	6,28			

✓ Ulangan 5

Sampel	ppm	Jumlah Artemia Mati	% Mortalitas	Log Konsentrasi	% Probit	Persamaan regresi	R ²	LC ₅₀ (ppm)
Ekstrak	0	0	0	0	0			
etil	12,5	1	10	1,1	3,72			
asetat	25	1	10	1,4	3,72			
tepung	50	3	30	1,7	4,48	y = 2,3185x + 0,42	0,9264	94,406
kulit	100	5	50	2	5			
batang	500	7	70	2,7	5,52			
	1000	10	100	3	8,09			

✓ Ulangan 6

Sampel	ppm	Jumlah Artemia Mati	% Mortalitas	Log Konsentrasi	% Probit	Persamaan regresi	R ²	LC ₅₀ (ppm)
Ekstrak	0	0	0	0	0			
etil	12,5	1	10	1,1	3,72			
asetat	25	2	20	1,4	4,16			
tepung	50	2	20	1,7	4,16	y = 2,2846x + 0,459	0,9151	97,275
kulit	100	4	40	2	4,75			
batang	500	7	70	2,7	5,52			
	1000	10	100	3	8,09			

Contoh pengolahan data dengan analisa probit untuk ulangan 6 sampel ekstrak etil asetat tepung kulit batang dimulai dengan mencari % mortalitas (kematian) Artemia yaitu dengan menggunakan rumus:

$$\% \text{ Mortalitas Artemia} = \frac{\text{Jumlah Artemia yang mati}}{\text{jumlah Artemia uji}} \times 100\%$$

$$0 \text{ ppm} = \frac{0}{10} \times 100\% = 0\%$$

$$12,5 \text{ ppm} = \frac{1}{10} \times 100\% = 10\%$$



25 ppm	$= \frac{2}{10} \times 100\% = 20\%$
50 ppm	$= \frac{2}{10} \times 100\% = 40\%$
100 ppm	$= \frac{4}{10} \times 100\% = 40\%$
500 ppm	$= \frac{7}{10} \times 100\% = 70\%$
1000 ppm	$= \frac{10}{10} \times 100\% = 100\%$

Setelah itu, variasi konsentrasi yang digunakan antara lain 0; 12,5; 25; 50; 100; 500 dan 1000 ppm dilogaritma sebagai berikut:

Log 0	= 0	log 100	= 2
Log 12,5	= 1,1	log 500	= 2,7
Log 25	= 1,4	log 1000	= 3
Log 50	= 1,7		



Langkah selanjutnya menentukan nilai % probit dengan melihat tabel

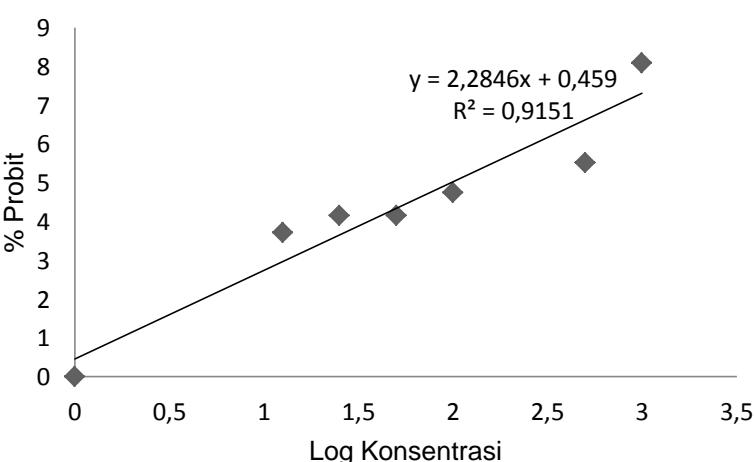
probit presentase mortalitas di bawah ini:

% mortalitas	0	1	2	3	4	5	6	7	8	9
0	-	2.67	2.95	3.12	3.25	3.36	3.45	3.52	3.59	3.66
10	3.72	3.77	3.82	3.87	3.92	3.96	4.01	4.05	4.08	4.12
20	4.16	4.19	4.23	4.26	4.29	4.33	4.36	4.39	4.42	4.45
30	4.48	4.50	4.53	4.56	4.59	4.61	4.64	4.67	4.69	4.72
40	4.75	4.77	4.80	4.82	4.85	4.87	4.90	4.92	4.95	4.97
50	5.00	5.03	5.05	5.08	5.10	5.13	5.15	5.18	5.20	5.23
60	5.25	5.28	5.31	5.33	5.36	5.39	5.41	5.44	5.47	5.50
70	5.52	5.55	5.58	5.61	5.64	5.67	5.71	5.74	5.77	5.81
80	5.84	5.88	5.92	5.95	5.99	6.04	6.08	6.13	6.18	6.23
90	6.28	6.34	6.41	6.48	6.55	6.64	6.75	6.88	7.05	7.33
-	0.0	0.1	0.2	0.3	0.4	0.5	0.6	0.7	0.8	0.9
99	7.33	7.37	7.41	7.46	7.51	7.58	7.65	7.75	7.88	8.09

Keterangan:

: nilai % probit

Kemudian data log konsentrasi dan % probit yang telah di dapat di masukkan kedalam *Microsoft excel* sehingga diperoleh persamaan pada grafik sebagai berikut:



Gambar. Grafik Regresi Log Konsentrasi dan % probit kematian *Artemia*
 (Sampel Ekstrak Etil Asetat Tepung Kulit Batang U6)

Berdasarkan grafik diatas didapatkan persamaan $y = 2,2846x + 0,459$

Dimasukkan nilai probit 5 (50% kematian) ke persamaan tersebut, sehingga di dapatkan nilai LC_{50} (konsentrasi sampel yang mampu menyebabkan sebanyak 50% hewan uji mati).

$$y = 2,2846x + 0,459$$

$$5 = 2,2846x + 0,459$$

$$X = \frac{5 - 0,459}{2,2846}$$

$$= 1,988$$

$$\text{Anti Log dari } 1,988 = 97,275 \text{ ppm}$$

$$LC_{50} = 97,275 \text{ ppm}$$



- Ekstrak Metanol Tepung Kulit Batang

Sampel	Konsentrasi (ppm)	Jumlah <i>Artemia</i> yang Mati					
		U1	U2	U3	U4	U5	U6
	0	0	0	0	0	0	0
Ekstrak	12,5	1	1	1	1	1	1
metanol	25	2	2	1	2	2	2
tepung	50	2	4	4	3	2	3
kulit	100	4	4	4	4	6	5
batang	500	7	7	8	7	7	7
	1000	9	9	8	9	9	9

✓ Ulangan 1

Sampel	ppm	Jumlah <i>Artemia</i> Mati	% Mortalitas	Log Konsentrasi	% Probit	Persamaan regrersi	R ²	LC ₅₀ (ppm)
	0	0	0	0	0			
Ekstrak	12,5	1	10	1,1	3,72			
metanol	25	2	20	1,4	4,16			
tepung	50	2	20	1,7	4,16	y = 1,9002x + 0,9149	0,9149	152,055
kulit	100	4	40	2	4,75	+ 0,854		
batang	500	7	70	2,7	5,52			
	1000	9	90	3	6,28			

✓ Ulangan 2

Sampel	ppm	Jumlah <i>Artemia</i> Mati	% Mortalitas	Log Konsentrasi	% Probit	Persamaan regrersi	R ²	LC ₅₀ (ppm)
	0	0	0	0	0			
Ekstrak	12,5	1	10	1,1	3,72			
metanol	25	2	20	1,4	4,16			
tepung	50	4	40	1,7	4,75	y = 1,9002x + 0,9005	0,9005	137,404
kulit	100	4	40	2	4,75	+ 0,9383		
batang	500	7	70	2,7	5,52			
	1000	9	90	3	6,28			

✓ Ulangan 3

Sampel	ppm	Jumlah <i>Artemia</i> Mati	% Mortalitas	Log Konsentrasi	% Probit	Persamaan regrersi	R ²	LC ₅₀ (ppm)
	0	0	0	0	0			
Ekstrak	12,5	1	10	1,1	3,72			
metanol	25	1	10	1,4	3,72			
tepung	50	4	40	1,7	4,75	y = 1,8806x + 0,8916	0,9019	153,109
kulit	100	4	40	2	4,75	+ 0,8916		
batang	500	8	80	2,7	5,84			
	1000	8	80	3	5,84			

✓ Ulangan 4

Sampel	ppm	Jumlah <i>Artemia</i> Mati	% Mortalitas	Log Konsentrasi	% Probit	Persamaan regresi	R ²	LC ₅₀ (ppm)
Ekstrak metanol	0	0	0	0	0	$y = 1,9002x + 0,8997$	0,9098	143,880
	12,5	1	10	1,1	3,72			
	25	2	20	1,4	4,16			
	50	3	30	1,7	4,48			
	100	4	40	2	4,75			
	500	7	70	2,7	5,52			
	1000	9	90	3	6,28			

✓ Ulangan 5

Sampel	ppm	Jumlah <i>Artemia</i> Mati	% Mortalitas	Log Konsentrasi	% Probit	Persamaan regresi	R ²	LC ₅₀ (ppm)
Ekstrak metanol	0	0	0	0	0	$y = 1,9247x + 0,8838$	0,9057	137,721
	12,5	1	10	1,1	3,72			
	25	2	20	1,4	4,16			
	50	2	20	1,7	4,48			
	100	6	60	2	5,25			
	500	7	70	2,7	5,52			
	1000	9	90	3	6,28			

✓ Ulangan 6

Sampel	ppm	Jumlah <i>Artemia</i> Mati	% Mortalitas	Log Konsentrasi	% Probit	Persamaan regresi	R ²	LC ₅₀ (ppm)
Ekstrak metanol	0	0	0	0	0	$y = 1,9124x + 0,9146$	0,908	136,773
	12,5	1	10	1,1	3,72			
	25	2	20	1,4	4,16			
	50	3	30	1,7	4,48			
	100	5	50	2	5			
	500	7	70	2,7	5,52			
	1000	9	90	3	6,28			

Contoh pengolahan data dengan analisa probit untuk ulangan 6 sampel ekstrak tepung kulit batang metanol dimulai dengan mencari % mortalitas (kematian) *Artemia* yaitu dengan menggunakan rumus:

$$\% \text{ Mortalitas } \textit{Artemia} = \frac{\text{Jumlah } \textit{Artemia} \text{ yang mati}}{\text{jumlah } \textit{Artemia} \text{ uji}} \times 100\%$$

$$0 \text{ ppm} = \frac{0}{10} \times 100\% = 0\%$$

$$12,5 \text{ ppm} = \frac{1}{10} \times 100\% = 10\%$$



$$25 \text{ ppm} = \frac{2}{10} \times 100\% = 20\%$$

$$50 \text{ ppm} = \frac{3}{10} \times 100\% = 30\%$$

$$100 \text{ ppm} = \frac{5}{10} \times 100\% = 50\%$$

$$500 \text{ ppm} = \frac{7}{10} \times 100\% = 70\%$$

$$1000 \text{ ppm} = \frac{9}{10} \times 100\% = 90\%$$

Setelah itu, variasi konsentrasi yang digunakan antara lain 0; 12,5; 25; 50; 100; 500 dan 1000 ppm dilogaritma sebagai berikut:

$$\log 0 = 0$$

$$\log 100 = 2$$

$$\log 12,5 = 1,1$$

$$\log 500 = 2,7$$

$$\log 25 = 1,4$$

$$\log 1000 = 3$$

$$\log 50 = 1,7$$

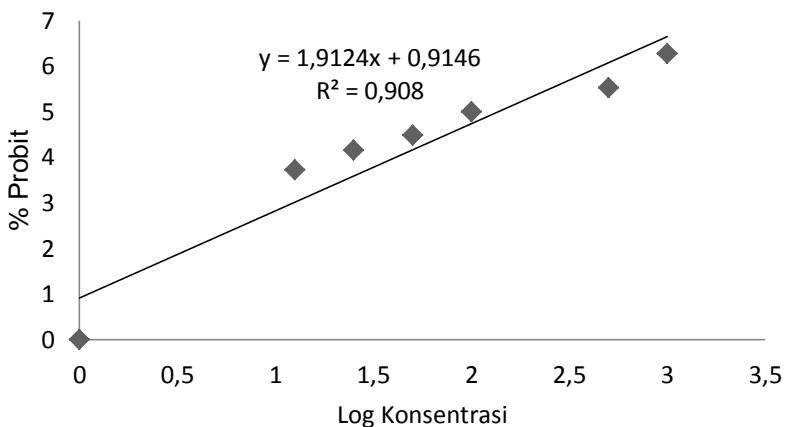
Langkah selanjutnya menentukan nilai % probit dengan melihat tabel probit presentase mortalitas di bawah ini:

% mortalitas	0	1	2	3	4	5	6	7	8	9
0	-	2.67	2.95	3.12	3.25	3.36	3.45	3.52	3.59	3.66
10	3.72	3.77	3.82	3.87	3.92	3.96	4.01	4.05	4.08	4.12
20	4.16	4.19	4.23	4.26	4.29	4.33	4.36	4.39	4.42	4.45
30	4.48	4.50	4.53	4.56	4.59	4.61	4.64	4.67	4.69	4.72
40	4.75	4.77	4.80	4.82	4.85	4.87	4.90	4.92	4.95	4.97
50	5.00	5.03	5.05	5.08	5.10	5.13	5.15	5.18	5.20	5.23
60	5.25	5.28	5.31	5.33	5.36	5.39	5.41	5.44	5.47	5.50
70	5.52	5.55	5.58	5.61	5.64	5.67	5.71	5.74	5.77	5.81
80	5.84	5.88	5.92	5.95	5.99	6.04	6.08	6.13	6.18	6.23
90	6.28	6.34	6.41	6.48	6.55	6.64	6.75	6.88	7.05	7.33
-	0.0	0.1	0.2	0.3	0.4	0.5	0.6	0.7	0.8	0.9
99	7.33	7.37	7.41	7.46	7.51	7.58	7.65	7.75	7.88	8.09

Keterangan:

: nilai % probit

Kemudian data log konsentrasi dan % probit yang telah di dapat di masukkan kedalam Microsoft excel sehingga diperoleh persamaan pada grafik sebagai berikut:



Gambar. Grafik Regresi Log Konsentrasi dan % probit kematian *Artemia* (Sampel Ekstrak Metanol Tepung Kulit Batang U6)

Berdasarkan grafik diatas didapatkan persamaan $y = 1,9124x + 0,9146$

Dimasukkan nilai probit 5 (50% kematian) ke persamaan tersebut, sehingga di dapatkan nilai LC_{50} (konsentrasi sampel yang mampu menyebabkan sebanyak 50% hewan uji mati).

$$y = 1,9124x + 0,9146$$

$$5 = 1,9124x + 0,9146$$

$$x = \frac{5 - 0,9146}{1,9124}$$

$$= 2,136$$

$$\text{Anti Log dari } 2,136 = 136,773 \text{ ppm}$$

$$LC_{50} = 136,773 \text{ ppm}$$



➤ **ANOVA (Analysis of Variance) Uji Toksisitas Ekstrak Tepung Kulit Batang *Xylocarpus granatum***

Perlakuan	Ulangan						Mean	STDev
	1	2	3	4	5	6		
Ekstrak n-heksan	78,163	74,989	79,983	84,333	82,985	73,621	79,012	4,266
Ekstrak etil asetat	107,647	121,060	113,501	99,083	94,406	97,275	105,495	10,418
Ekstrak metanol	152,055	137,404	153,109	143,880	137,721	136,773	143,490	7,503

Data hasil penelitian dianalisis dengan menggunakan ANOVA (*Analysis of Variance*) untuk mengetahui pengaruh perlakuan terhadap respon parameter yang dilakukan dengan uji F pada taraf kepercayaan 95%. Apabila nilai $F_{hitung} >$ dari F_{tabel} maka dapat dilakukan uji lanjut, salah satunya dengan uji BNT.

ANOVA

Perlakuan	Sum of Squares (JK)	df	Mean Square (KT)	F_{hitung}	F_{tabel}	Sig.
Between Groups	12604,764	2	6302,382	103,303	2,131	,000
Within Groups	915,129	15	61,009			
Total	13519,892	17				

Berdasarkan tabel di atas dapat diketahui bahwa nilai F_{hitung} (103,303) > dari F_{tabel} (2,131) yang artinya perbedaan pelarut ekstraksi memberikan pengaruh yang nyata terhadap toksisitas ekstrak.

$$\begin{aligned}
 \text{Nilai BNT}_{\alpha} &= t_{(0,05; \text{db galat})} \times \sqrt{\frac{2 \times KTG}{ulangan}} \\
 &= t_{(0,05; 15)} \times \sqrt{\frac{2 \times 61,009}{6}} \\
 &= 2,131 \times 4,510 = 9,611
 \end{aligned}$$

Tabel notasi

Perlakuan	Mean	Notasi	Mean + Nilai BNT
N-Heksan	79,012	a	88,623
Etil Asetat	105,495	b	115,106
Metanol	143,490	c	153,101



Lampiran 8. Data Hasil Perhitungan dan ANOVA (*Analysis of Variance*) Uji Aktivitas Antioksidan Ekstrak Tepung Kulit Batang *Xylocarpus granatum*

- Data Hasil Perhitungan Uji Aktivitas Antioksidan Ekstrak Tepung Kulit Batang *Xylocarpus granatum* dan Vitamin C
- Ekstrak N-Heksan Tepung Kulit Batang

Sampel	Konsentrasi (ppm)	Absorbansi					
		U1	U2	U3	U4	U5	U6
Ekstrak n-heksan tepung kulit batang	0	0,594	0,584	0,597	0,587	0,605	0,584
	12,5	0,538	0,522	0,532	0,527	0,528	0,519
	25	0,503	0,493	0,496	0,511	0,505	0,498
	50	0,372	0,364	0,364	0,369	0,375	0,358
	100	0,228	0,235	0,231	0,221	0,237	0,240
	200	0,123	0,116	0,120	0,128	0,131	0,114

✓ Ulangan 1

Sampel	Konsentrasi (ppm)	Absorbansi	% Inhibisi	Persamaan regersi	R ²	IC ₅₀ (ppm)
Ekstrak n-heksan tepung kulit batang	0	0,594	0	$y = 0,3991x + 8,0616$	0,9122	105,082
	12,5	0,538	9,428			
	25	0,503	15,320			
	50	0,372	37,374			
	100	0,228	61,616			
	200	0,123	79,293			

✓ Ulangan 2

Sampel	Konsentrasi (ppm)	Absorbansi	% Inhibisi	Persamaan regersi	R ²	IC ₅₀ (ppm)
Ekstrak n-heksan tepung kulit batang	0	0,584	0	$y = 0,3981x + 8,2485$	0,9239	104,877
	12,5	0,522	10,616			
	25	0,493	15,582			
	50	0,364	37,671			
	100	0,235	59,760			
	200	0,116	80,137			

✓ Ulangan 3

Sampel	Konsentrasi (ppm)	Absorbansi	% Inhibisi	Persamaan regersi	R ²	IC ₅₀ (ppm)
Ekstrak n-heksan tepung kulit batang	0	0,597	0	$y = 0,3959x + 9,1074$	0,9116	103,290
	12,5	0,532	10,888			
	25	0,496	16,918			
	50	0,364	39,028			
	100	0,231	61,307			
	200	0,120	79,899			

✓ Ulangan 4

Sampel	Konsentrasi (ppm)	Absorbansi	% Inhibisi	Persamaan regersi	R ²	IC ₅₀ (ppm)
Ekstrak n-heksan tepung kulit batang	0	0,587	0	$y = 0,3968x + 7,8511$	0,9023	106,222
	12,5	0,527	10,221			
	25	0,511	12,947			
	50	0,369	37,138			
	100	0,221	62,351			
	200	0,128	78,194			

✓ Ulangan 5

Sampel	Konsentrasi (ppm)	Absorbansi	% Inhibisi	Persamaan regersi	R ²	IC ₅₀ (ppm)
Ekstrak n-heksan tepung kulit batang	0	0,605	0	$y = 0,3855x + 9,5112$	0,9098	105,029
	12,5	0,528	12,727			
	25	0,505	16,529			
	50	0,375	38,017			
	100	0,237	60,826			
	200	0,131	78,347			

✓ Ulangan 6

Sampel	Konsentrasi (ppm)	Absorbansi	% Inhibisi	Persamaan regersi	R ²	IC ₅₀ (ppm)
Ekstrak n-heksan tepung kulit batang	0	0,584	0	$y = 0,3984x + 8,2583$	0,9242	104,773
	12,5	0,519	11,130			
	25	0,498	14,726			
	50	0,358	38,699			
	100	0,240	58,904			
	200	0,114	80,479			

Contoh pengolahan data dengan analisa aktivitas antioksidan untuk ulangan 6 sampel ekstrak n-heksan tepung kulit batang dimulai dengan mencari % inhibisi yaitu dengan menggunakan rumus:

$$\% \text{ Inhibisi} = \frac{A_0 - A_1}{A_0} \times 100\%$$

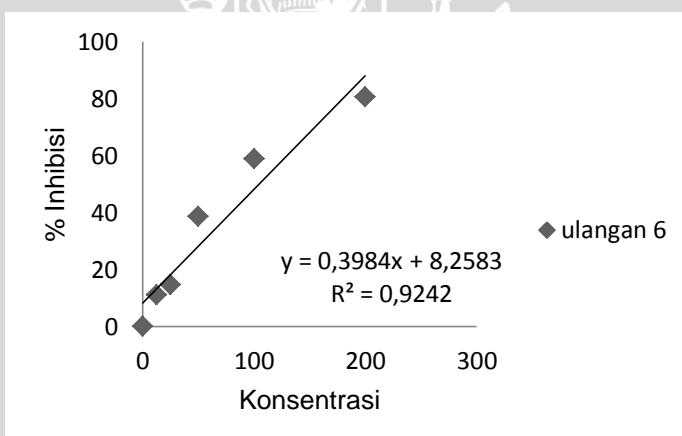
A₀ = absorbansi kontrol (metanol + DPPH) tanpa ekstrak

A₁ = absorbansi sampel uji (Ekstrak + DPPH).



0 ppm	$= \frac{0,584 - 0,584}{0,584} \times 100\% = 0\%$
12,5 ppm	$= \frac{0,584 - 0,519}{0,584} \times 100\% = 11,130\%$
25 ppm	$= \frac{0,584 - 0,498}{0,584} \times 100\% = 14,726\%$
50 ppm	$= \frac{0,584 - 0,358}{0,584} \times 100\% = 38,699\%$
100 ppm	$= \frac{0,584 - 0,24}{0,584} \times 100\% = 58,904\%$
200 ppm	$= \frac{0,584 - 0,114}{0,584} \times 100\% = 80,479\%$

Konsentrasi sampel yang digunakan dalam penelitian dialurkan dengan hasil %inhibisi untuk membentuk suatu grafik sehingga menghasilkan persamaan regresi linier sebagai berikut:



Gambar. Grafik Regresi Aktivitas Antioksidan Sampel Ekstrak N-Heksan Tepung Kulit Batang Ulangan 6

Berdasarkan persamaan grafik diatas yaitu $y = 0,3984x + 8,2583$ dapat dihitung nilai IC₅₀ sampel sebagai berikut :

$$Y = 0,3984x + 8,2583$$

$$50 = 0,984x + 8,2583$$

$$50 - 8,2583 = 0,3984x$$

$$X = 104,773 \text{ ppm}$$

- Ekstrak Etil Asetat Tepung Kulit Batang

Sampel	Konsentrasi (ppm)	Absorbansi					
		U1	U2	U3	U4	U5	U6
Ekstrak etil asetat tepung kulit batang	0	0,594	0,584	0,597	0,587	0,605	0,584
	12,5	0,485	0,492	0,504	0,488	0,522	0,497
	25	0,391	0,398	0,382	0,385	0,395	0,388
	50	0,337	0,324	0,331	0,341	0,354	0,341
	100	0,254	0,244	0,267	0,259	0,274	0,256
	200	0,081	0,078	0,062	0,085	0,091	0,065

✓ Ulangan 1

Sampel	Konsentrasi (ppm)	Absorbansi	% Inhibisi	Persamaan regresi	R ²	IC ₅₀ (ppm)
Ekstrak etil asetat tepung kulit batang	0	0,594	0	$y = 0,3816x + 15,253$	0,9024	91,056
	12,5	0,485	18,350			
	25	0,391	34,175			
	50	0,337	43,266			
	100	0,254	57,239			
	200	0,081	86,364			

✓ Ulangan 2

Sampel	Konsentrasi (ppm)	Absorbansi	% Inhibisi	Persamaan regresi	R ²	IC ₅₀ (ppm)
Ekstrak etil asetat tepung kulit batang	0	0,584	0	$y = 0,3916x + 14,207$	0,9063	91,402
	12,5	0,492	15,753			
	25	0,398	31,849			
	50	0,324	44,521			
	100	0,244	58,219			
	200	0,078	86,644			

✓ Ulangan 3

Sampel	Konsentrasi (ppm)	Absorbansi	% Inhibisi	Persamaan regresi	R ²	IC ₅₀ (ppm)
Ekstrak etil asetat tepung kulit batang	0	0,597	0	$y = 0,3966x + 14,559$	0,9019	89,362
	12,5	0,504	15,578			
	25	0,382	36,013			
	50	0,331	44,556			
	100	0,267	55,276			
	200	0,062	89,615			

✓ Ulangan 4

Sampel	Konsentrasi (ppm)	Absorbansi	% Inhibisi	Persamaan regersi	R ²	IC ₅₀ (ppm)
Ekstrak etil asetat tepung kulit batang	0	0,587	0	$y = 0,379x + 14,622$	0,9039	93,346
	12,5	0,488	16,865			
	25	0,385	34,412			
	50	0,341	41,908			
	100	0,259	55,877			
	200	0,085	85,520			

✓ Ulangan 5

Sampel	Konsentrasi (ppm)	Absorbansi	% Inhibisi	Persamaan regersi	R ²	IC ₅₀ (ppm)
Ekstrak etil asetat tepung kulit batang	0	0,605	0	$y = 0,3804x + 13,695$	0,9006	95,439
	12,5	0,522	13,719			
	25	0,395	34,711			
	50	0,354	41,488			
	100	0,274	54,711			
	200	0,091	84,959			

✓ Ulangan 6

Sampel	Konsentrasi (ppm)	Absorbansi	% Inhibisi	Persamaan regersi	R ²	IC ₅₀ (ppm)
Ekstrak etil asetat tepung kulit batang	0	0,584	0	$y = 0,4004x + 13,327$	0,9206	91,591
	12,5	0,497	14,897			
	25	0,388	33,562			
	50	0,341	41,610			
	100	0,256	56,164			
	200	0,065	88,870			

Contoh pengolahan data dengan analisa aktivitas antioksidan untuk ulangan 6 sampel ekstrak etil asetat tepung kulit batang dimulai dengan mencari % inhibisi yaitu dengan menggunakan rumus:

$$\% \text{ Inhibisi} = \frac{A_0 - A_1}{A_0} \times 100\%$$

A₀ = absorbansi kontrol (metanol + DPPH) tanpa ekstrak

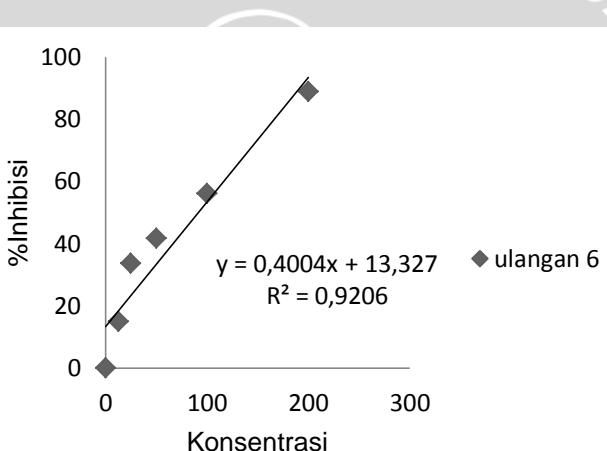
A₁ = absorbansi sampel uji (Ekstrak + DPPH).

$$0 \text{ ppm} = \frac{0,584 - 0,584}{0,584} \times 100\% = 0\%$$



12,5 ppm	$= \frac{0,584 - 0,497}{0,584} \times 100\% = 14,897\%$
25 ppm	$= \frac{0,584 - 0,388}{0,584} \times 100\% = 33,562\%$
50 ppm	$= \frac{0,584 - 0,341}{0,584} \times 100\% = 41,610\%$
100 ppm	$= \frac{0,584 - 0,256}{0,584} \times 100\% = 56,164\%$
200 ppm	$= \frac{0,584 - 0,065}{0,584} \times 100\% = 88,870\%$

Konsentrasi sampel yang digunakan dalam penelitian dialurkan dengan hasil %inhibisi untuk membentuk suatu grafik sehingga menghasilkan persamaan regresi linier sebagai berikut:



Gambar. Grafik Regresi Aktivitas Antioksidan Sampel Ekstrak Etil Asetat Tepung Kulit Batang Ulangan 6

Berdasarkan persamaan grafik diatas yaitu $y = 0,4004x + 13,327$ dapat dihitung nilai IC₅₀ sampel sebagai berikut :

$$\begin{aligned}
 y &= 0,4004x + 13,327 \\
 50 &= 0,4004x + 13,327 \\
 50 - 13,327 &= 0,4004x \\
 x &= 91,591 \text{ ppm}
 \end{aligned}$$



- Ekstrak Metanol Tepung Kulit Batang

Sampel	Konsentrasi (ppm)	Absorbansi					
		U1	U2	U3	U4	U5	U6
Ekstrak metanol tepung kulit batang	0	0,594	0,584	0,597	0,587	0,605	0,584
	12,5	0,512	0,497	0,492	0,503	0,519	0,510
	25	0,446	0,466	0,459	0,461	0,473	0,469
	50	0,357	0,352	0,364	0,349	0,365	0,357
	100	0,228	0,212	0,225	0,215	0,235	0,223
	200	0,107	0,097	0,119	0,111	0,115	0,121

✓ Ulangan 1

Sampel	Konsentrasi (ppm)	Absorbansi	% Inhibisi	Persamaan regersi	R ²	IC ₅₀ (ppm)
Ekstrak metanol tepung kulit batang	0	0,594	0	$y = 0,3892x + 11,9$	0,9124	97,893
	12,5	0,512	13,805			
	25	0,446	24,916			
	50	0,357	39,899			
	100	0,228	61,616			
	200	0,107	81,987			

✓ Ulangan 2

Sampel	Konsentrasi (ppm)	Absorbansi	% Inhibisi	Persamaan regersi	R ²	IC ₅₀ (ppm)
Ekstrak metanol tepung kulit batang	0	0,584	0	$y = 0,4032x + 10,944$	0,9167	96,865
	12,5	0,497	14,897			
	25	0,466	20,205			
	50	0,352	39,726			
	100	0,212	63,699			
	200	0,097	83,390			

✓ Ulangan 3

Sampel	Konsentrasi (ppm)	Absorbansi	% Inhibisi	Persamaan regersi	R ²	IC ₅₀ (ppm)
Ekstrak metanol tepung kulit batang	0	0,597	0	$y = 0,3769x + 12,678$	0,9043	99,024
	12,5	0,492	17,588			
	25	0,459	23,116			
	50	0,364	39,028			
	100	0,225	62,312			
	200	0,119	80,067			

✓ Ulangan 4

Sampel	Konsentrasi (ppm)	Absorbansi	% Inhibisi	Persamaan regersi	R ²	IC ₅₀ (ppm)
	0	0,587	0			
Ekstrak metanol	12,5	0,503	14,310			
tepung kulit batang	25	0,461	21,465	y = 0,3907x + 11,565	0,9029	98,375
	50	0,349	40,545			
	100	0,215	63,373			
	200	0,111	81,090			

✓ Ulangan 5

Sampel	Konsentrasi (ppm)	Absorbansi	% Inhibisi	Persamaan regersi	R ²	IC ₅₀ (ppm)
	0	0,605	0			
Ekstrak metanol	12,5	0,519	14,215			
tepung kulit batang	25	0,473	21,818	y = 0,3876x + 11,277	0,9144	99,905
	50	0,365	39,669			
	100	0,235	61,157			
	200	0,115	80,992			

✓ Ulangan 6

Sampel	Konsentrasi (ppm)	Absorbansi	% Inhibisi	Persamaan regersi	R ²	IC ₅₀ (ppm)
	0	0,584	0			
Ekstrak methanol	12,5	0,51	12,671			
tepung kulit batang	25	0,469	19,692	y = 0,3864x + 10,431	0,9071	102,404
	50	0,357	38,870			
	100	0,223	61,815			
	200	0,121	79,281			

Contoh pengolahan data dengan analisa aktivitas antioksidan untuk ulangan 6 sampel ekstrak metanol tepung kulit batang dimulai dengan mencari % inhibisi yaitu dengan menggunakan rumus:

$$\% \text{ Inhibisi} = \frac{A_0 - A_1}{A_0} \times 100\%$$

A₀ = absorbansi kontrol (metanol + DPPH) tanpa ekstrak

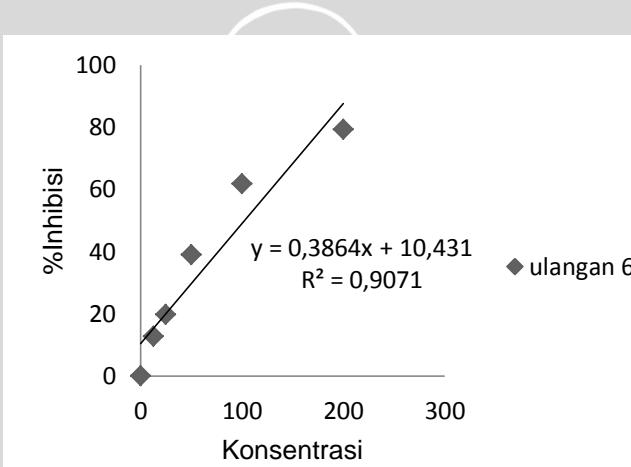
A₁ = absorbansi sampel uji (Ekstrak + DPPH).

$$0 \text{ ppm} = \frac{0,584 - 0,584}{0,584} \times 100\% = 0\%$$



$$\begin{aligned}
 12,5 \text{ ppm} &= \frac{0,584 - 0,51}{0,584} \times 100\% = 12,671\% \\
 25 \text{ ppm} &= \frac{0,584 - 0,469}{0,584} \times 100\% = 19,692\% \\
 50 \text{ ppm} &= \frac{0,584 - 0,357}{0,584} \times 100\% = 38,870\% \\
 100 \text{ ppm} &= \frac{0,584 - 0,223}{0,584} \times 100\% = 61,815\% \\
 200 \text{ ppm} &= \frac{0,584 - 0,121}{0,584} \times 100\% = 79,281\%
 \end{aligned}$$

Konsentrasi sampel yang digunakan dalam penelitian dialurkan dengan hasil %inhibisi untuk membentuk suatu grafik sehingga menghasilkan persamaan regresi linier sebagai berikut:



Gambar. Grafik Regresi Aktivitas Antioksidan Sampel Ekstrak Metanol Tepung Kulit Batang Ulangan 6

Berdasarkan persamaan grafik diatas yaitu $y = 0,3864x + 10,431$ dapat dihitung nilai IC₅₀ sampel sebagai berikut :

$$\begin{aligned}
 y &= 0,3864x + 10,431 \\
 50 &= 0,3864x + 10,431 \\
 50 - 10,431 &= 0,3864x \\
 x &= 102,404 \text{ ppm}
 \end{aligned}$$

- Asam Askorbat

Sampel	Konsentrasi (ppm)	Absorbansi					
		U1	U2	U3	U4	U5	U6
Asam askorbat	0	0,584	0,591	0,587	0,584	0,597	0,579
	12,5	0,302	0,312	0,31	0,322	0,316	0,328
	25	0,215	0,209	0,223	0,213	0,221	0,217
	50	0,162	0,158	0,165	0,152	0,149	0,161
	100	0,111	0,123	0,109	0,12	0,117	0,113
	200	0,015	0,012	0,017	0,02	0,021	0,018

✓ Ulangan 1

Sampel	Konsentrasi (ppm)	Absorbansi	% Inhibisi	Persamaan regresi	R ²	IC ₅₀ (ppm)
Asam askorbat	0	0,584	0	$y = 2,2103x + 37,52$	0,6158	5,646
	12,5	0,302	48,288			
	25	0,215	63,185			
	50	0,162	72,260			
	100	0,111	80,993			
	200	0,015	97,432			

✓ Ulangan 2

Sampel	Konsentrasi (ppm)	Absorbansi	% Inhibisi	Persamaan regresi	R ²	IC ₅₀ (ppm)
Asam askorbat	0	0,591	0	$y = 2,2088x + 37,554$	0,6116	5,635
	12,5	0,312	47,208			
	25	0,209	64,636			
	50	0,158	73,266			
	100	0,123	79,188			
	200	0,012	97,970			

✓ Ulangan 3

Sampel	Konsentrasi (ppm)	Absorbansi	% Inhibisi	Persamaan regresi	R ²	IC ₅₀ (ppm)
Asam askorbat	0	0,587	0	$y = 2,2281x + 36,914$	0,625	5,873
	12,5	0,31	47,189			
	25	0,223	62,010			
	50	0,165	71,891			
	100	0,109	81,431			
	200	0,017	97,104			

✓ Ulangan 4

Sampel	Konsentrasi (ppm)	Absorbansi	% Inhibisi	Persamaan regersi	R ²	IC ₅₀ (ppm)
Asam askorbat	0	0,584	0	$y = 2,2035x + 36,962$	0,6106	5,917
	12,5	0,322	44,863			
	25	0,213	63,527			
	50	0,152	73,973			
	100	0,12	79,452			
	200	0,02	96,575			

✓ Ulangan 5

Sampel	Konsentrasi (ppm)	Absorbansi	% Inhibisi	Persamaan regersi	R ²	IC ₅₀ (ppm)
Asam askorbat	0	0,597	0	$y = 2,1841x + 37,76$	0,6002	5,604
	12,5	0,316	47,069			
	25	0,221	62,982			
	50	0,149	75,042			
	100	0,117	80,402			
	200	0,021	96,482			

✓ Ulangan 6

Sampel	Konsentrasi (ppm)	Absorbansi	% Inhibisi	Persamaan regersi	R ²	IC ₅₀ (ppm)
Asam askorbat	0	0,579	0	$y = 2,2531x + 35,959$	0,6321	6,232
	12,5	0,328	43,351			
	25	0,217	62,522			
	50	0,161	72,193			
	100	0,113	80,484			
	200	0,018	96,891			

Contoh pengolahan data dengan analisa aktivitas antioksidan untuk ulangan 6 sampel asam askorbat dimulai dengan mencari % inhibisi yaitu dengan menggunakan rumus:

$$\% \text{ Inhibisi} = \frac{A_0 - A_1}{A_0} \times 100\%$$

A₀ = absorbansi kontrol (metanol + DPPH) tanpa ekstrak

A₁ = absorbansi sampel uji (Ekstrak + DPPH).

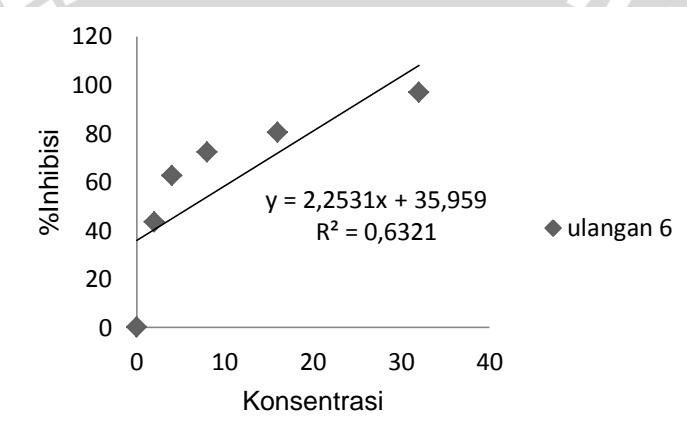
$$0 \text{ ppm} = \frac{0,579 - 0,579}{0,579} \times 100\% = 0\%$$

$$12,5 \text{ ppm} = \frac{0,579 - 0,328}{0,579} \times 100\% = 43,351\%$$



$$\begin{aligned} 25 \text{ ppm} &= \frac{0,579 - 0,217}{0,579} \times 100\% = 62,522\% \\ 50 \text{ ppm} &= \frac{0,579 - 0,161}{0,579} \times 100\% = 72,193\% \\ 100 \text{ ppm} &= \frac{0,579 - 0,113}{0,579} \times 100\% = 80,484\% \\ 200 \text{ ppm} &= \frac{0,584 - 0,018}{0,584} \times 100\% = 96,891\% \end{aligned}$$

konsentrasi sampel yang digunakan dalam penelitian dialurkan dengan hasil %inhibisi untuk membentuk suatu grafik sehingga menghasilkan persamaan regresi linier sebagai berikut:



Gambar. Grafik Regresi Aktivitas Antioksidan Sampel Asam Askorbat (Vitamin C) Ulangan 6

Berdasarkan persamaan grafik diatas yaitu $y = 2,2531x + 35,959$ dapat dihitung nilai IC₅₀ sampel sebagai berikut :

$$\begin{aligned} y &= 2,2531x + 35,959 \\ 50 &= 2,2531x + 35,959 \\ 50 - 35,959 &= 2,2531x \\ X &= 6,232 \text{ ppm} \end{aligned}$$



- **ANOVA (Analysis of Variance) Uji Aktivitas Antioksidan Ekstrak Tepung Kulit Batang *Xylocarpus granatum***

Sampel	Ulangan						Mean	STDev
	1	2	3	4	5	6		
Ekstrak n-heksan tepung kulit batang	105,082	104,877	103,290	106,222	105,029	104,773	104,879	0,938
Ekstrak etil asetat tepung kulit batang	91,056	91,402	89,362	93,346	95,439	91,591	92,033	2,098
Ekstrak metanol tepung kulit batang	97,893	96,865	99,024	98,375	99,905	102,404	99,078	1,926

Data hasil penelitian dianalisis dengan menggunakan ANOVA (*Analysis of Variance*) untuk mengetahui pengaruh perlakuan terhadap respon parameter yang dilakukan dengan uji F pada taraf kepercayaan 95%. Apabila nilai $F_{hitung} >$ dari F_{tabel} maka dapat dilakukan uji lanjut, salah satunya dengan uji BNT.

ANOVA

Perlakuan	Sum of Squares (JK)	df	Mean Square	F_{hitung}	F_{tabel}	Sig.
Between Groups	496,619	2	248,310	82,852	2,131	,000
Within Groups	44,956	15	2,997			
Total	541,575	17				

Berdasarkan tabel di atas dapat diketahui bahwa nilai F_{hitung} (82,852) > dari F_{tabel} (2,131) yang artinya perbedaan pelarut ekstraksi memberikan pengaruh yang nyata terhadap aktivitas antioksidan ekstrak.

$$\begin{aligned}
 \text{Nilai BNT}_\alpha &= t_{(0,05;\text{db galat})} \times \sqrt{\frac{2 \times KTG}{ulangan}} \\
 &= t_{(0,05;15)} \times \sqrt{\frac{2 \times 2,997}{6}} \\
 &= 2,131 \times 0,999 = 2,129
 \end{aligned}$$

Tabel notasi

Perlakuan	Mean	Notasi	Mean + Nilai BNT
Etil Asetat	92,033	a	94,162
Metanol	99,078	b	101,207
N-Heksan	104,879	c	107,008

Lampiran 9. Hasil Identifikasi Senyawa Bioaktif Ekstrak N-Heksan dan Ekstrak Etil Asetat Tepung Kulit Batang *Xylocarpus granatum*

LC MS –ESI pos ion

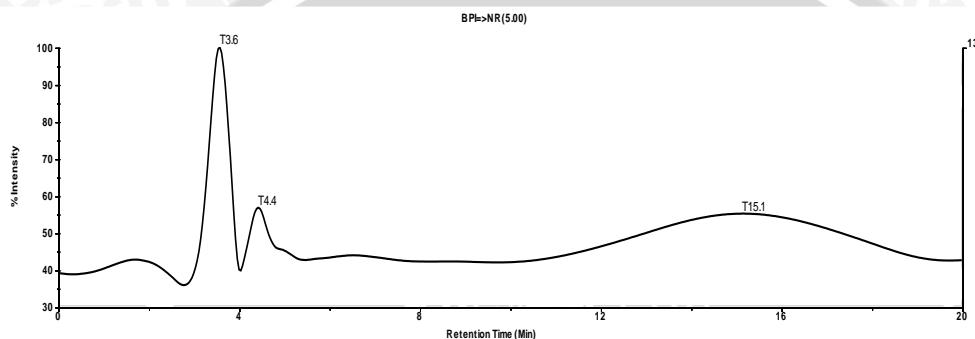
Vol injection 2 ul

Flow 0.05 ml/min

Column C-18 (15mm x 1 mm)

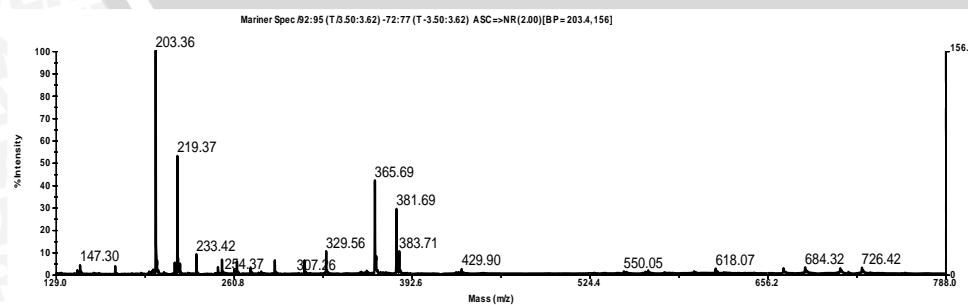
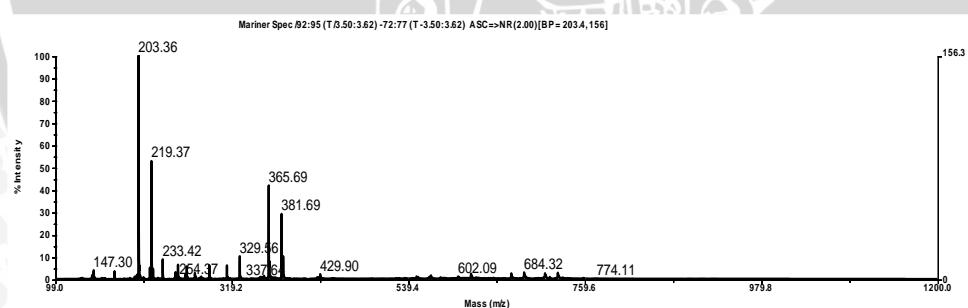
Eluent MeOH

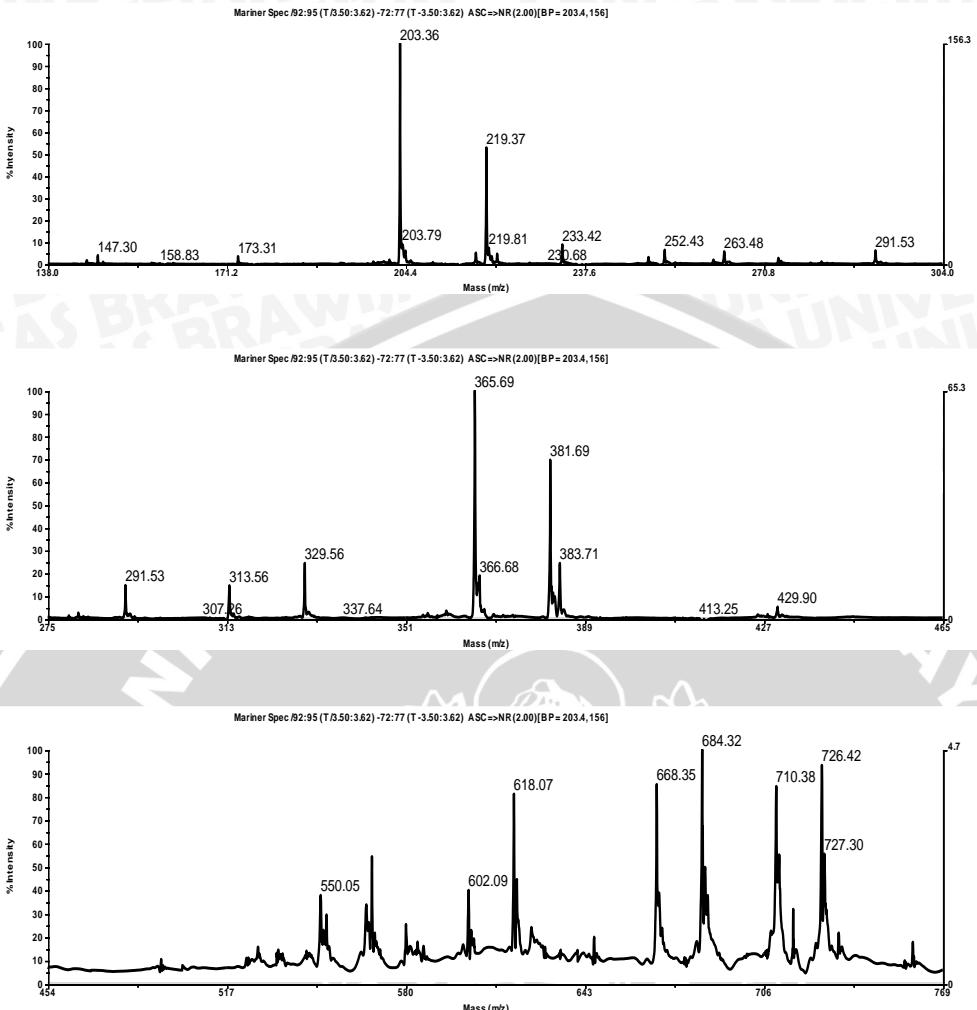
- Ekstrak N-Heksan Tepung Kulit Batang



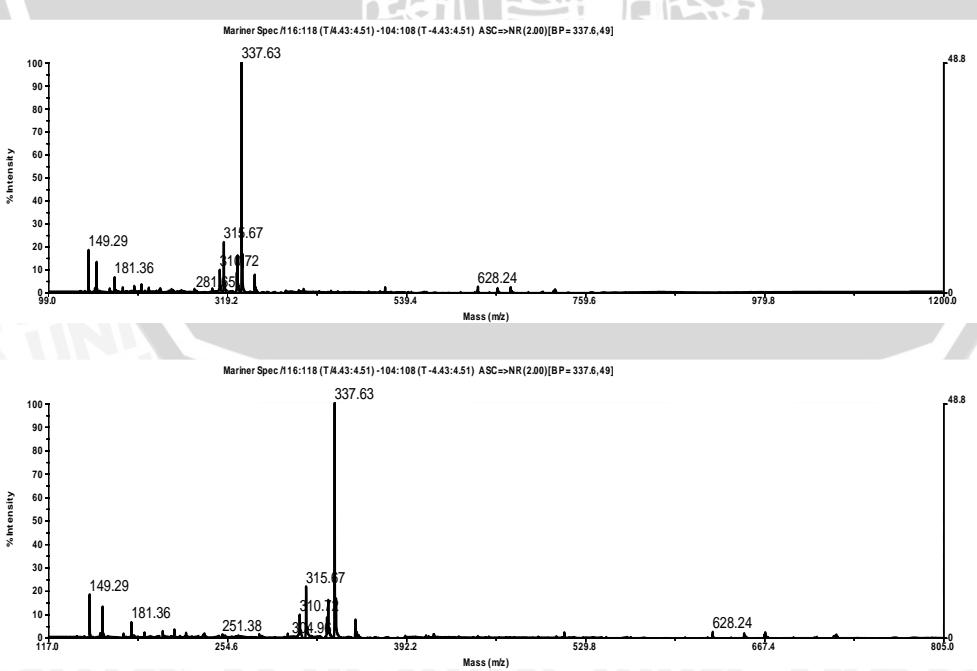
Index	Time	Lower Bound	Upper Bound	Height	Area
1	3.578650	2.846100	4.004433	130	1149.63
2	4.429700	4.082367	5.357200	74	300.79
3	15.135267	10.704566	19.221983	72	1983.92

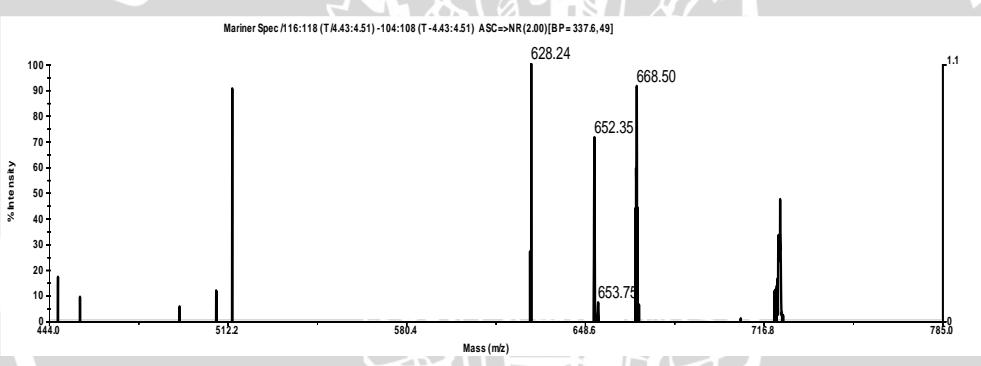
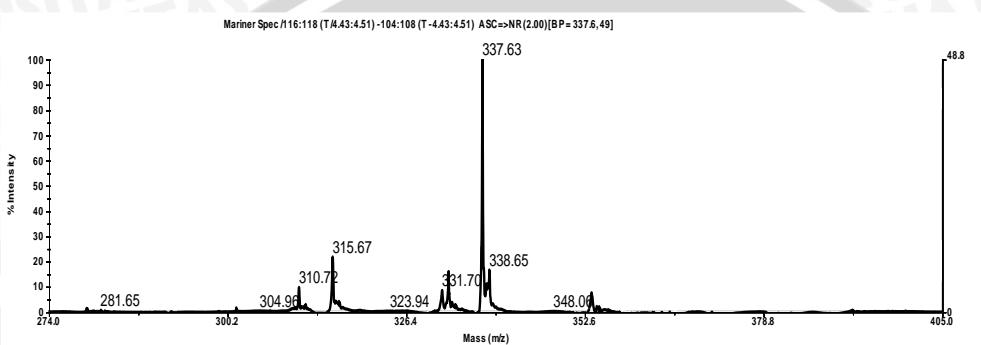
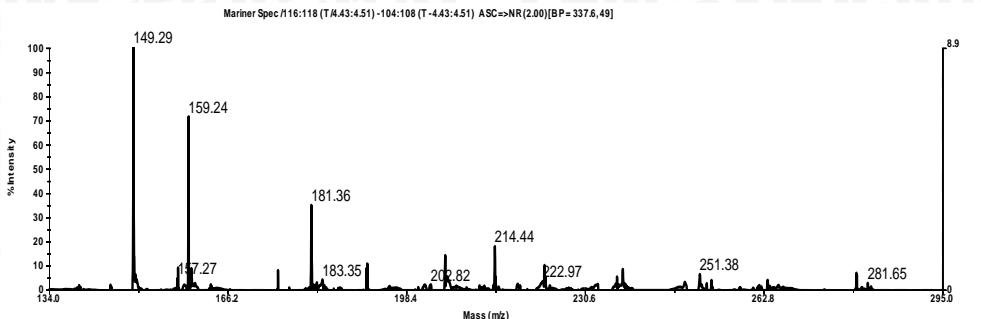
Rt 3.57



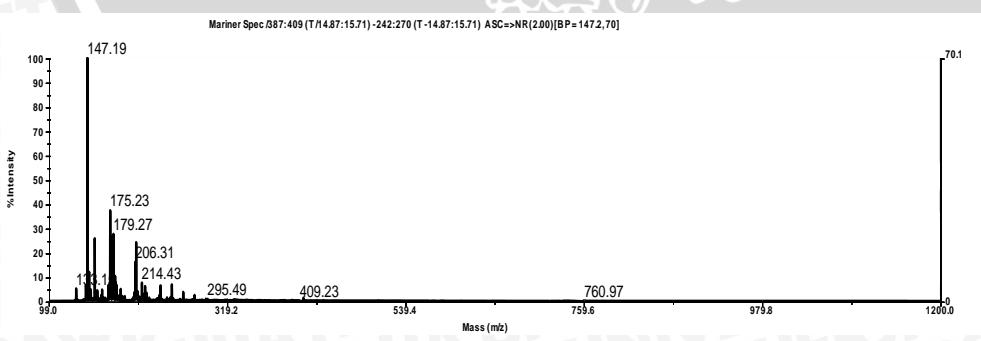


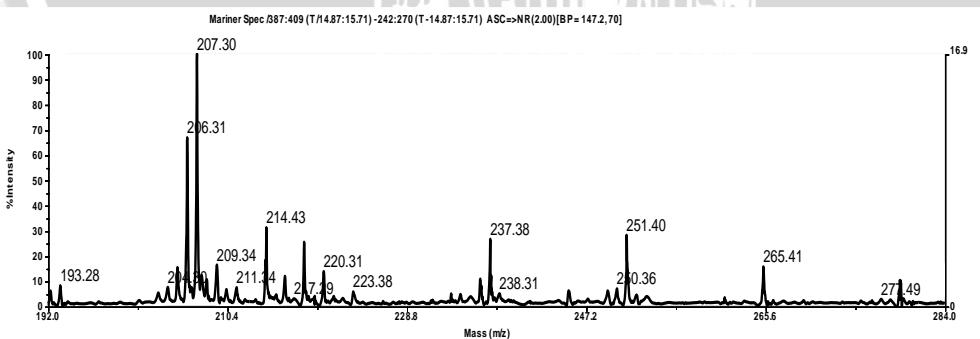
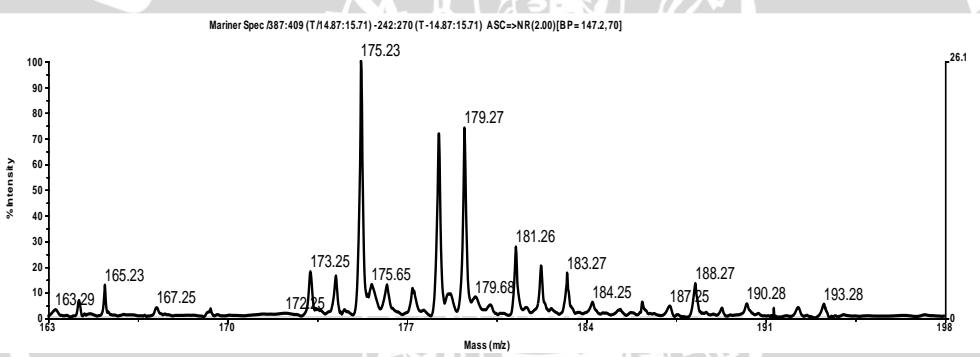
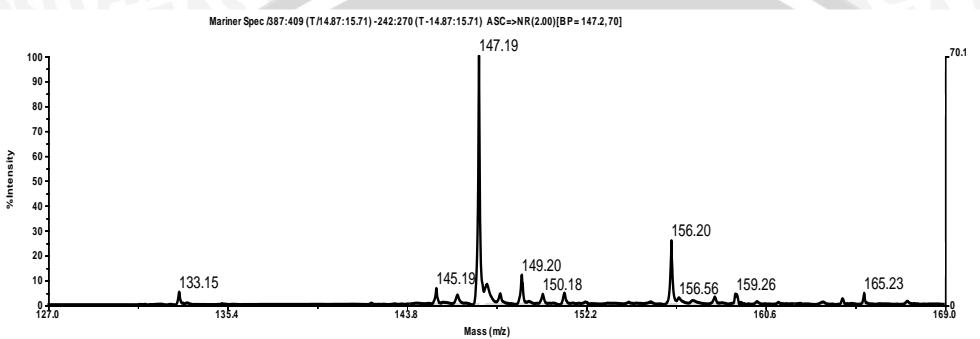
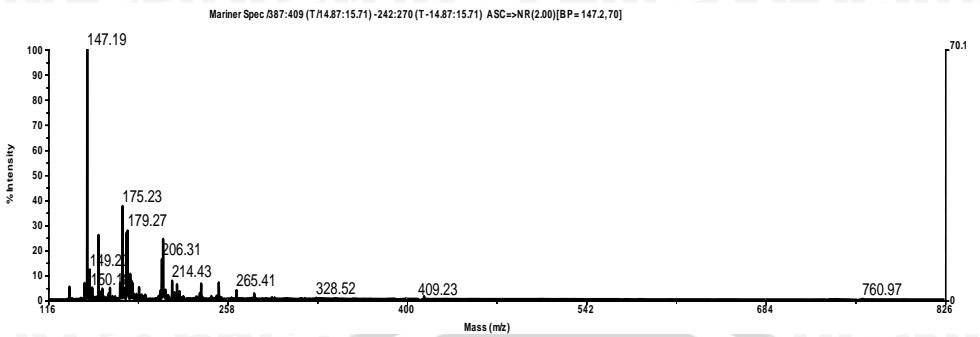
Rt 4.43

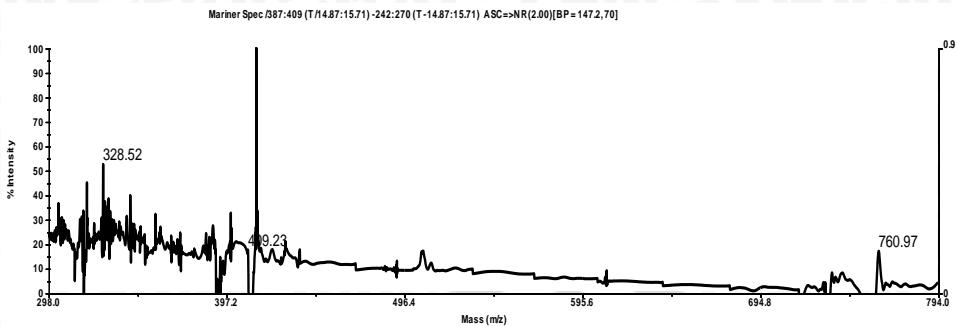




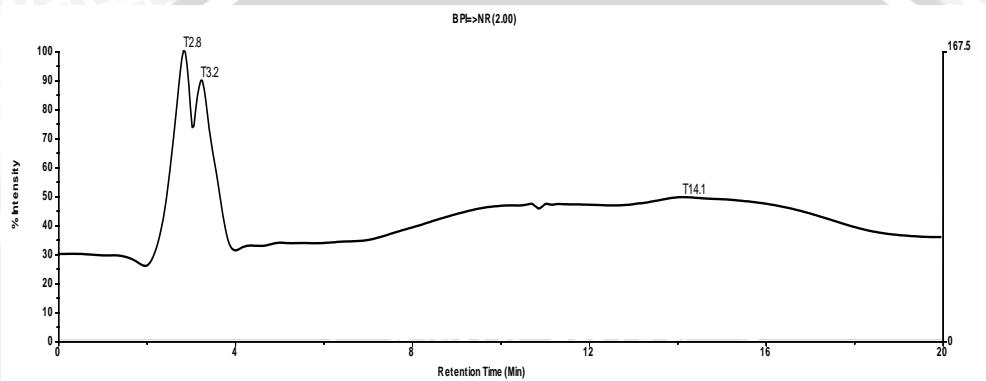
Rt 15.13





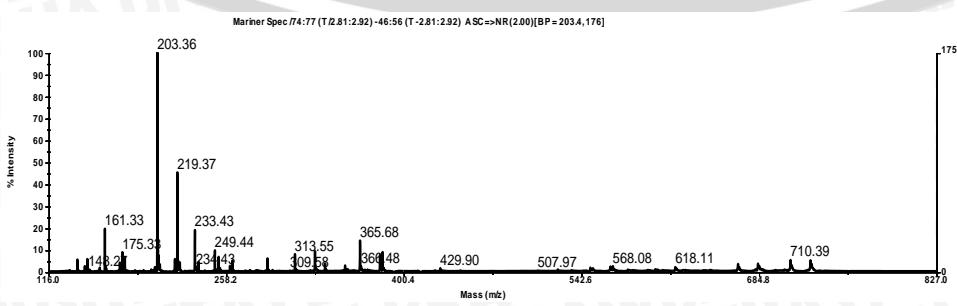
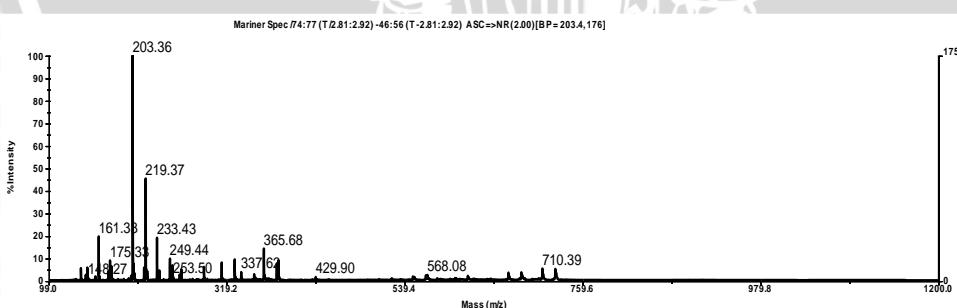


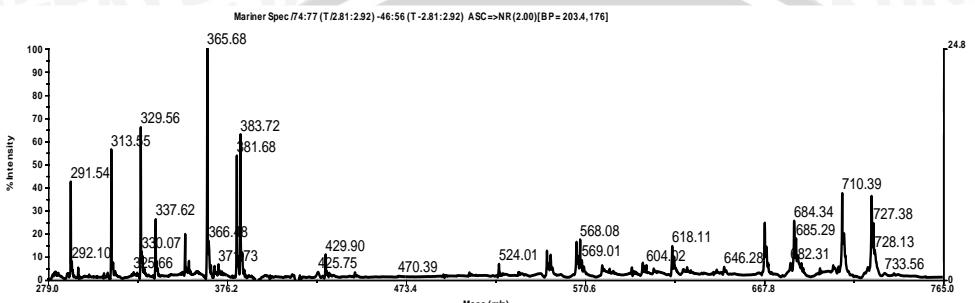
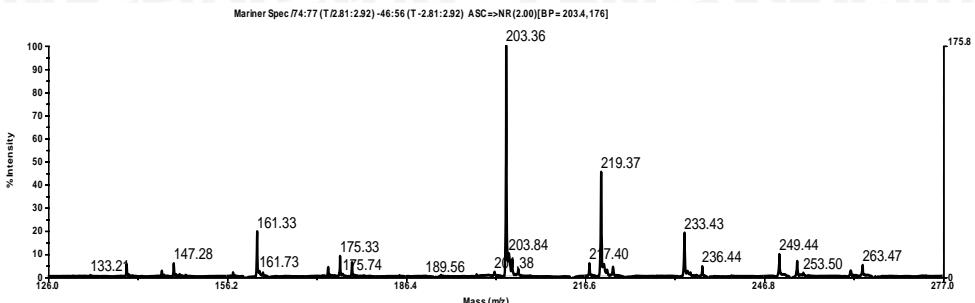
- Ekstrak Etil Asetat Tepung Kulit Batang



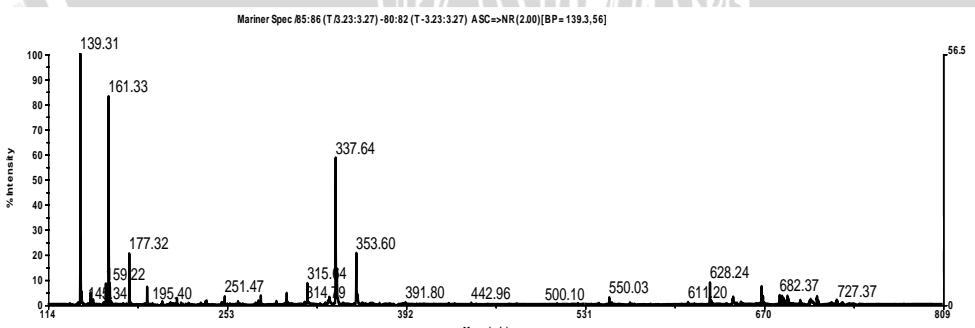
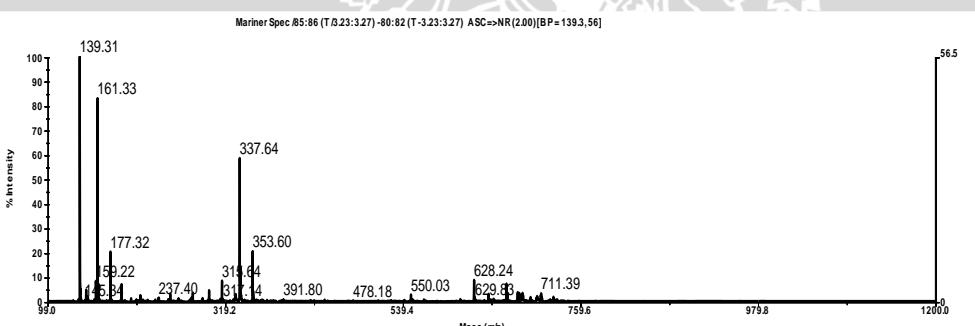
Index	Time	Lower Bound	Upper Bound	Height	Area
1	2.845433	2.036433	3.000150	168	1479.56
2	3.232317	3.116483	3.965367	150	1150.72
3	14.129817	12.973833	18.749467	83	2163.08

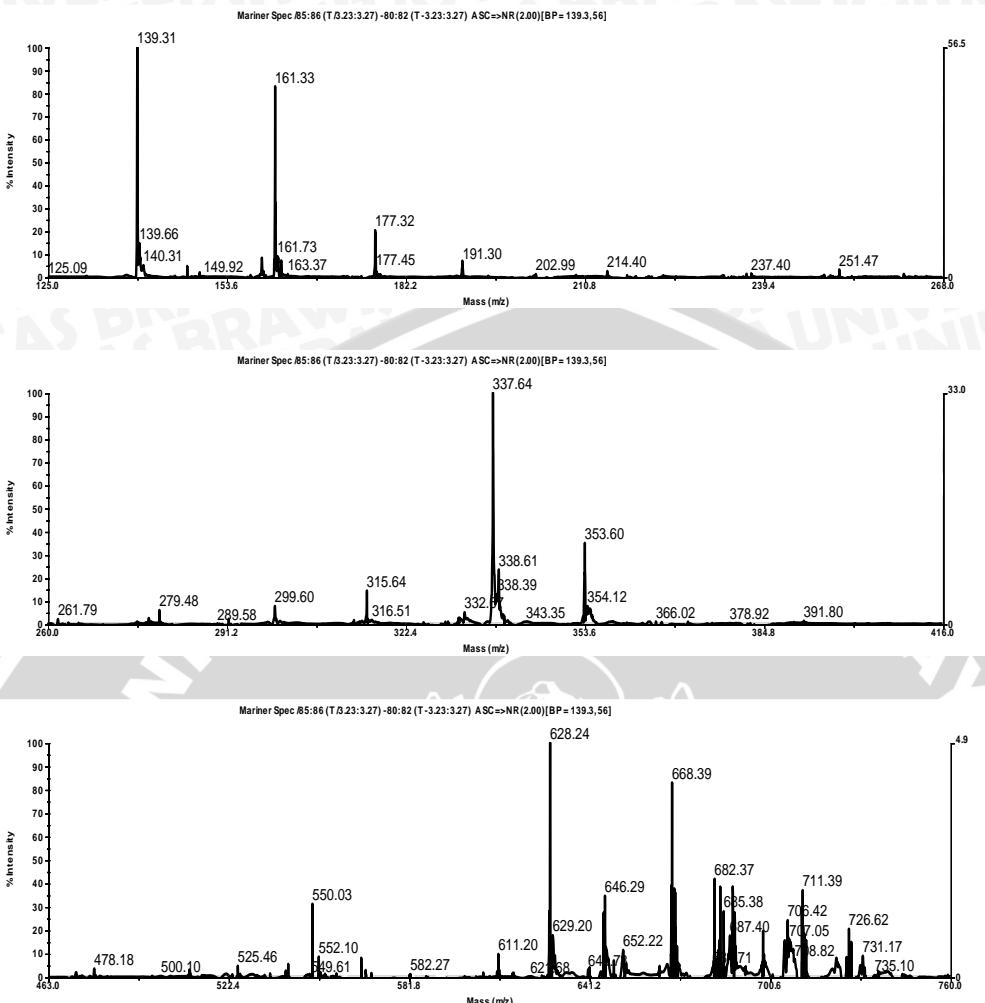
Rt 2.84



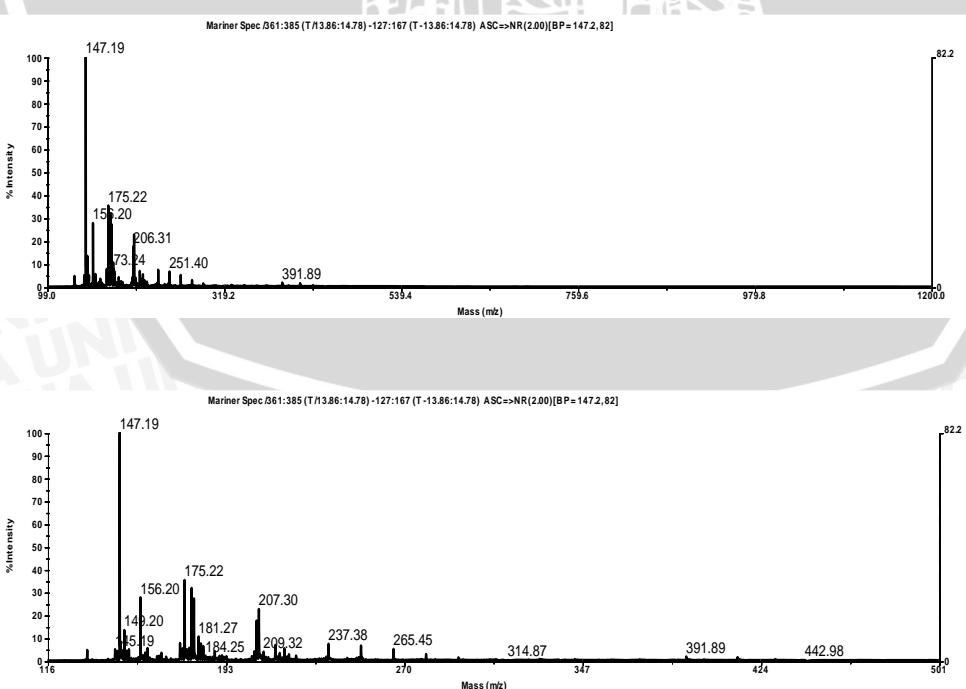


Rt 3.23





Rt 14.13



Lampiran 10. Dokumentasi Penelitian**• Ekstraksi Sampel**

1. Sampel Segar Kulit Batang *Xylocarpus granatum*



2. Sampel Kering Kulit Batang *Xylocarpus granatum*



3. Sampel Tepung Kulit Batang *Xylocarpus granatum*



4. Sampel ditimbang



5. Sampel + Pelarut (1:4)



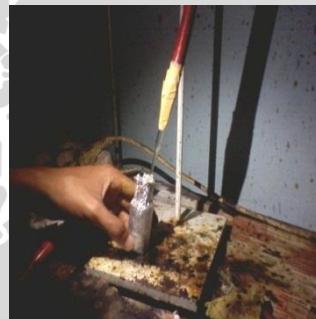
6. Maserasi Selama 24 Jam



7. Proses Penyaringan Sampel didapatkan filtrat dan residu untuk di maserasi dengan pelarut berikutnya



8. Evaporasi Sampel



9. Ekstrak Di Semprot Gas Nitrogen

- Fitokimia Sampel dan Kadar Air Sampel



1. Uji Alkaloid



2. Uji Flavonoid



3. Uji Steroid dan Triterpenoid



4. Uji Tanin



5. Uji Saponin



Kadar Air Sampel

- Uji Total Fenol



1. Menyiapkan Alat dan Bahan Uji



2. Sampel, Asam Galat Ditimbang



3. Sampel Diencerkan



4. Penambahan Reagen Folin dan Na_2CO_3 pada Sampel juga Pada Larutan Standar Asam Galat. Ditunggu 1 Jam.



5. Pengukuran Absorbansi Sampel dan Standar dengan Spektrofotometer UV-Vis



6. Larutan Asam Galat yang Telah Diukur Absorbansinya



7. Ekstrak N-Heksan yang Telah Diukur Absorbansinya



8. Ekstrak Etil Asetat yang Telah Diukur Absorbansinya



9. Ekstrak Metanol yang Telah Diukur Absorbansinya

- Uji Toksisitas



1. Telur *Artemia*



2. Perendaman Telur *Artemia* dalam Air Laut dan Diaerasi Selama 48 Jam



3. Penimbangan Ekstrak



4. Hasil pengenceran Ekstrak N-Heksan



5. Hasil pengenceran Ekstrak Etil Asetat



6. Hasil pengenceran Ekstrak Metanol



7. Masing-Masing Botol Vial di isi 10 Ekor Larva *Artemia* d

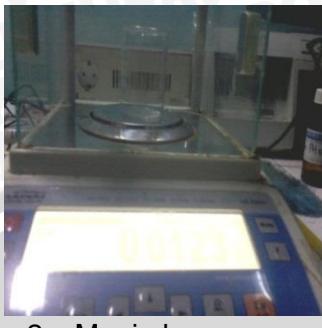


8. Setelah 24 Jam Dapat diamati Kematiannya

- Uji Aktivitas Antioksidan



1. Menyiapkan Alat dan Bahan



2. Menimbang Sampel



3. Sampel Diencerkan



4. Larutan Sampel ditambahkan DPPH dan Kemudian Disimpan dalam Ruang Gelap Selama 30 menit



5. Diukur Absorbansi sampel dengan Spektrofotometer UV-Vis



6. Ekstrak Etil Asetat yang Telah Diukur Absorbansinya