

PENGARUH JENIS PELARUT PADA EKSTRAKSI BERTINGKAT BIJI JAGUNG UNGU (ZEA MAYS VAR CERATINA KULESH) TERHADAP AKTIVITAS ANTIOKSIDAN

(Effect of Solvent Type in Stage Extraction of Purple Corn Seeds (Zea mays var Ceratina Kulesh) on Antioxidant Activity)

Gita Rizki Saputri^{1,*}, Dina Febrina², Rani Prabandari³

¹²³Program Studi Farmasi Fakultas Kesehatan Universitas Harapan Bangsa, Jl. Raden Patah No 100 Ledug, Purwokerto Timur, 53182, Indonesia

¹rizkigita011@gmail.com*; ²dfebrinadina@gmail.com, ³raniprabandari@uhb.ac.id

ABSTRACT

In recent years, the high antioxidant content of purple corn anthocyanins has become an attraction for use as a practical food ingredient. Extraction efficiency is mainly influenced by the choice of solvent. Differences in the polarity level of a solvent can affect the extract yield value, IC₅₀ value, total phenolics and total flavonoids. The aim of this research was to see which solvent had the greatest influence on total flavonoids, total phenolics, and antioxidant activity in purple corn kernel extract, as well as the type of solvent that was best in producing antioxidant activity in purple corn kernels. The data obtained will be checked for normality and homogeneity of variance, then one-way ANOVA will be used to analyze the results. The results showed that total phenolics, total flavonoids, and IC₅₀ values were all significantly influenced by different solvents (P<0,05). Methanol solvent produced the best antioxidant activity based on IC₅₀ of 33,46 ppm, total flavonoid content of 4,97 mg QE/g extract, and total phenolic content of 11,73 mg GAE/g extract.

Keywords : antioxidants; multilevel extraction; purple corn;

ABSTRAK

Kandungan antioksidan yang tinggi dari antosianin jagung ungu menjadi daya tarik tersendiri untuk digunakan sebagai bahan makanan yang praktis. Efisiensi ekstraksi terutama dipengaruhi oleh pemilihan pelarut. Perbedaan tingkat kepolaran suatu pelarut dapat mempengaruhi nilai rendemen ekstrak, nilai IC₅₀, total fenolik serta total flavonoid. Tujuan dari penelitian ini adalah untuk melihat pelarut mana yang paling berpengaruh terhadap total flavonoid, total fenolik, dan aktivitas antioksidan pada ekstrak biji jagung ungu, serta jenis pelarut yang paling terbaik dalam menghasilkan aktivitas antioksidan pada biji jagung ungu. Data yang diperoleh diperiksa normalitas dan homogenitas variansnya, kemudian digunakan ANOVA satu arah untuk menganalisis hasilnya. Hasil penelitian menunjukkan bahwa total fenolik, total flavonoid, dan nilai IC₅₀ semuanya dipengaruhi secara signifikan oleh pelarut yang berbeda (P<0,05). Pelarut metanol menghasilkan aktivitas antioksidan yang terbaik berdasarkan IC₅₀ sebesar 33,46 ppm, kadar flavonoid total sebesar 4,97 mg QE/g ekstrak, dan kadar fenolik total sebesar 11,73 mg GAE/g ekstrak.

Kata kunci : antioksidan; ekstraksi bertingkat; jagung ungu;



PENDAHULUAN

Radikal bebas merupakan penyebab berbagai penyakit pada tubuh manusia. Penyebab sebagian besar penyakit adalah kerusakan sel dan jaringan akibat radikal bebas (Pramiastuti, Solikhati, & Suryani, 2021). Gangguan degeneratif seperti PJK, rematik, katarak, kanker, stroke, hipertensi, diabetes mellitus, iskemia, dan penyakit saraf terkait dengan akumulasi radikal bebas (Dewi, 2021). Senyawa yang menangkap radikal bebas dan donor elektron seperti antioksidan dapat mencegah kerusakan oksidatif (Dewi, 2021).

Antioksidan merupakan senyawa penting untuk pemeliharaan kesehatan yang baik karena memutus reaksi berantai radikal bebas dalam tubuh (Sandra Tri Juli Fendri *et al.*, 2022). Saat ini telah banyak dilakukan penelitian tentang senyawa antioksidan dari bahan alam, karena senyawa antioksidan sintetik sering menimbulkan efek samping yang tidak diinginkan, banyak penelitian alternatif antioksidan dari bahan alam (Sandra Tri Juli Fendri *et al.*, 2022). Tanaman yang kaya akan senyawa fenolik, turunan asam benzoat, flavonoid, proanthocyanidins, stilbenes, coumarin, lignan dan lignin merupakan sumber antioksidan alami yang baik (Sandra Tri Juli Fendri *et al.*, 2022). Tumbuhan, khususnya buah-buahan dan sayuran, telah memberikan antioksidan alami yang sangat bermanfaat (Aulyawati, Yahdi, & Suryani, 2021).

Salah satu tumbuhan yang mengandung antioksidan merupakan jagung ungu. Jagung ungu (*Zea mays* var *ceratina* kulesh) merupakan jagung varietas dari spesies pulut, jagung pulut merupakan varietas jagung dengan sifat khusus yaitu pulut/beras ketan (Parwati, 2021). Tingginya kadar antosianin, terutama chrysanthemine (cyanidin 3-O-glucoside), (pelargonidin 3-O-B-D-Glucoside), memberikan warna khas pada jagung ungu (Parwati, 2021). Dalam beberapa tahun terakhir, kandungan antioksidan yang tinggi dari antosianin jagung ungu menjadi daya tarik tersendiri untuk digunakan sebagai bahan makanan yang praktis. Jagung ungu dimanfaatkan sebagai sumber antosianin dalam industri pangan, farmasi dan kosmetik (Nurnawati *et al.*, 2022).

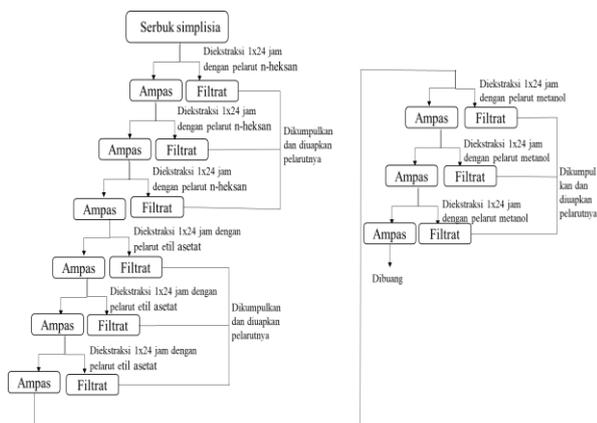
Antosianin diklasifikasikan sebagai komponen polar karena adanya gugus polar (OH, CO, atau OCH₃) pada cincin aromatik dan residu glukosilnya (Chayati, ., Marsono, & Astuti, 2020). Air, metanol, etanol, aseton, etil

asetat, n-butanol, propilen glikol dan campurannya diperlukan untuk prosedur ekstraksi antosianin polar. Pilihan pelarut memiliki pengaruh terbesar pada efisiensi ekstraksi. (Chayati *et al.*, 2020).

Dalam prosedur ekstraksi, memilih pelarut yang tepat sangat penting. Sebagian besar metabolit sekunder yang ditargetkan dapat diekstrak menggunakan pelarut yang digunakan (Dewatisari, 2020). Oleh karena itu, penelitian ini menggunakan metode ekstraksi bertingkat dengan pelarut yang berbeda. Perbedaan kepolaran pelarut dapat mempengaruhi nilai rendemen ekstraksi, nilai IC₅₀, total fenolik dan total flavonoid (Hidayah dan Anggarani, 2022). Pada penelitian sebelumnya mengenai pengaruh jenis pelarut terhadap kandungan total fenolik, aktivitas antioksidan dan toksisitas ekstrak buah ciplukan, jenis pelarut terbukti mempengaruhi variabel-variabel tersebut secara signifikan (Julianti, Ikrawan, & Iwansyah, 2019). Berdasarkan uraian diatas penulis tertarik untuk menguji aktivitas antioksidan menggunakan jenis pelarut yang berbeda pada ekstraksi bertingkat, sehingga menghasilkan ekstrak biji jagung ungu dengan aktivitas antioksidan terbaik.

METODE PENELITIAN

Metode penelitian yang dilakukan ini merupakan metode eksperimental. Penelitian ini dilakukan dengan ekstraksi bertingkat menggunakan simplisia biji jagung sebanyak 1000 gram dan diekstraksi sampai semua serbuk terendam seperti pada gambar 1. Hasil maserat yang diperoleh dipekatkan dengan rotary evaporator suhu 40°C. Selanjutnya maserat diuapkan dengan waterbath suhu 60°C (Desnita, Luliana, & Anastasia, 2018). Sehingga mendapatkan ekstrak kental n-heksan, ekstrak kental etil asetat dan ekstrak kental metanol biji jagung ungu. Dilakukan skrining firokimia dan penetapan kadar flavonoid total dan kadar fenolik total. Dilakukan uji antioksidan untuk melihat pengaruh jenis pelarut pada ekstraksi bertingkat biji jagung ungu (*Zea mays* var *Ceratina* Kulesh) terhadap aktivitas antioksidan dan pelarut yang dapat menghasilkan aktivitas antioksidan terbaik pada biji jagung ungu (*Zea mays* var *Ceratina* Kulesh).



Gambar 1. Metode ekstraksi bertingkat

HASIL DAN PEMBAHASAN

1. Hasil Determinasi Tumbuhan

Tanaman jagung ungu didapatkan dari sawah, Desa Mundu, Kecamatan Tanjung, Kabupaten Brebes, Jawa Tengah. Determinasi tanaman dilakukan untuk menetapkan keaslian dari tanaman yang digunakan dalam dalam penelitian. Determinasi ini dilakukan di Laboratorium Lingkungan Universitas Jendral Soedirman Purwokerto. Berdasarkan hasil determinasi tanaman jagung ungu menunjukkan bahwa tanaman yang digunakan dalam penelitian ini.

2. Preparasi sampel

Serbuk dari jagung ungu diayak dengan ayakan dengan ukuran mesh no. 40 dan didapatkan hasil yaitu serbuk simplisia jagung ungu dengan bobot sebesar 1000 gram kemudian disimpan dalam wadah yang tertutup.

3. Ekstraksi bertingkat

Pembuatan ekstrak biji jagung ungu (*Zea mays* var *Ceratina* Kulesh) menggunakan metode ekstraksi bertingkat. Keunggulan dari metode ekstraksi bertingkat ini adalah ekstrak yang dihasilkan mengandung senyawa tertentu yang spesifik pada setiap pelarut yang digunakan berdasarkan polaritasnya (Laware, 2015). Berdasarkan hal tersebut, metode ekstraksi bertingkat sering digunakan sebagai teknik pemisahan awal senyawa organik pada bahan alam. Pada penelitian ini, proses ekstraksi bertingkat menggunakan beberapa jenis pelarut dengan tingkat kepolaran yang berbeda-beda (n-heksan, etil asetat, dan metanol).

Pada tahap awal, simplisia biji jagung ungu sebanyak 1000 gram diekstraksi menggunakan pelarut n-heksan sampai serbuk terendam kemudian direndam selama

3x24 jam dan setiap 24 jam diganti dengan pelarut yang baru. Dilakukan maserasi kembali dengan menggunakan pelarut etil asetat dan metanol dengan cara yang sama. Proses ekstraksi dilakukan dengan remaserasi selama tiga hari dengan pergantian pelarut setiap 24 jam. Tujuannya agar tidak terjadi kejenuhan pelarut sehingga senyawa yang terekstrak menjadi lebih optimal (Nurmalasari, S. Luliana, & S. Wahdaningsih, 2019). Maserasi dilakukan selama 3x24 jam untuk mengekstraksi senyawa yang terkandung dalam sampel secara sempurna (Runadi, 2007). Berdasarkan tabel 1 terlihat adanya perbedaan rendemen ekstrak biji jagung ungu dengan varian pelarut yang berbeda. Rendemen ekstrak biji jagung ungu dengan pelarut n-heksan paling tinggi. Diikuti dengan pelarut metanol dan terendah dengan pelarut etil asetat seperti terlihat pada tabel 1.

Tabel 1. Ekstrak biji jagung ungu

Ekstrak	Berat (g)	Rendemen (%)
N-heksan	35,1126	3,5
Etil asetat	6,351	0,63
Metanol	31,3565	3,1

Tabel 1 memperlihatkan perbedaan karakter dari masing-masing ekstrak, rendemen yang paling banyak dihasilkan oleh ekstrak n-heksan. Hal ini dikarenakan pelarut n-heksan lebih reaktif saat mengekstraksi minyak jagung ungu (Aziz *et al.*, 2009) selain non-polar, n-heksan cenderung mengekstraksi kandungan minyak dari biji jagung ungu (Widyasanti, Rohdiana, & Ekatama, 2016). Bentuk berminyak berwarna kuning pada ekstrak n-heksan biji jagung ungu dikarenakan ekstrak n-heksan mengandung minyak dan senyawa non polar (Indrianingsih *et al.*, 2007). Munculnya perbedaan rendemen dipengaruhi oleh jenis pelarut yang digunakan. Rendemen ekstrak yang diperoleh dipengaruhi oleh beberapa faktor antara lain metode ekstraksi, ukuran partikel sampel, kondisi, lama penyimpanan, waktu ekstraksi, rasio jumlah sampel dan pelarut, dan jenis pelarut yang digunakan. (Salamah, Ayuningrat, & Purwaningsih, 2008).

4. Skrining fitokimia

Skrining fitokimia ini bertujuan untuk mengidentifikasi metabolit sekunder yang terdapat pada biji jagung ungu tergantung pada jenis pelarut ekstraksi. Data uji fitokimia ekstrak biji jagung ungu disajikan dalam tabel 2 sebagai berikut:

Tabel 2. Hasil skrining fitokimia ekstrak biji jagung ungu

Golongan senyawa	Ekstrak		
	N-heksan	Etil asetat	Metanol
Flavonoid	-	-	+
Fenol	-	+	+
Alkaloid	-	-	+
Saponin	-	-	-
Terpenoid	-	+	+
Steroid	-	-	-
Tanin	-	+	+

Keterangan:

(+): Teridentifikasi

(-): Tidak teridentifikasi

Pengujian golongan senyawa yang dilakukan pada masing-masing ekstrak dengan ditandai perubahan warna adalah uji positif. Reaksi positif adalah perubahan warna pada golongan senyawa flavonoid, fenol, tanin, alkaloid, saponin, steroid dan triterpenoid. Skrining fitokimia yang dilakukan pada ekstrak n-heksan, etil asetat dan metanol biji jagung ungu menunjukkan hasil yang berbeda untuk setiap ekstrak, karena senyawa-senyawa yang terdapat dalam setiap ekstrak tergantung pada tingkat kelarutan pelarut yang digunakan. Pelarut akan mengekstrak senyawa-senyawa yang memiliki kelarutan yang sama atau serupa dengan kelarutan pelarut yang digunakan (Permadi, Sutanto, & Sri, 2015).

Dari hasil identifikasi pada ekstrak biji jagung ungu yang mengandung senyawa alkaloid merupakan ekstrak metanol biji jagung ungu. Dalam penentuan alkaloid, pereaksi Mayer mengandung merkuri klorida dan kalium iodida. Prinsip pengendapan alkaloid terjadi karena adanya atom nitrogen dengan pasangan elektron bebas yang dapat menggantikan ion iodo dalam reaksi, membentuk ikatan kovalen koordinasi dengan ion logam (Wahidah *et al.*, 2017).

Ekstrak biji jagung ungu yang memiliki kandungan senyawa flavonoid adalah ekstrak metanol biji jagung ungu dengan membentuk warna merah. Pengujian flavonoid menunjukkan hasil yang positif dengan munculnya warna merah, kuning, atau jingga pada sampel setelah ditambahkan serbuk magnesium dan asam klorida. Serbuk magnesium dan asam klorida berperan dalam mengurangi inti benzopiron yang terdapat dalam struktur flavonoid dan membentuk garam flavilium yang berwarna merah atau jingga (Khotimah, 2016). Sedangkan pada ekstrak n-heksan dan etil asetat tidak terjadi perubahan warna merah, maka dikatakan negatif. Hal ini bisa dikarenakan senyawa flavonoid pada ekstrak tidak tereduksi

sempurna pada magnesium dan HCl sehingga tidak menghasilkan perubahan warna yang menyatakan mengandung flavonoid. Hal ini juga dikarenakan senyawa golongan flavonoid pada ekstrak ini lebih larut dalam pelarut polar seperti metanol (Ncube, Afolayan, & Okoh, 2008).

Fenol bereaksi dengan FeCl_3 1% menghasilkan warna merah, ungu, biru atau hitam karena FeCl_3 bereaksi dengan gugus aromatik -OH (Haryati *et al.*, 2015). Kompleks yang terbentuk diduga besi (III) heksafenolat. Ion Fe^{3+} mengalami hibridisasi orbital $d^2 sp^3$ sehingga ion Fe^{3+} ($4s^0 3d^5$) memiliki 6 orbital kosong yang diisi donor pasangan electron yaitu atom oksigen dalam senyawa fenol dengan pasangan elektron terisolasi (Marliana dan Saleh, 2011). Ekstrak biji jagung ungu yang memiliki kandungan senyawa fenol adalah ekstrak etil asetat dan metanol.

Dalam tanin FeCl_3 digunakan untuk menentukan keberadaan gugus fenol dalam sampel. Jika sampel mengandung gugus fenol setelah ditambahkan FeCl_3 , maka akan ditandai dengan warna biru tua atau hijau kehitaman. Jika uji tanin pada sampel yang menggunakan FeCl_3 positif, kemungkinan terdapat senyawa fenolik dan salah satunya mengandung tanin karena tanin merupakan senyawa polifenol (Wahidah *et al.*, 2017). Ekstrak biji jagung ungu yang memiliki kandungan senyawa tanin adalah ekstrak etil asetat.

Senyawa saponin memiliki gugus polar dan non polar yang aktif di permukaan. Saat dikocok dengan air, saponin terhidrolisis dan membentuk misel. Struktur misel yang dihasilkan menyebabkan gugus polar menghadap ke luar dan gugus non polar menghadap ke dalam, sehingga tampak seperti busa (Robinson, 1991). Ekstrak biji jagung ungu tidak ada yang memiliki kandungan senyawa saponin.

Triterpenoid dan steroid menunjukkan hasil positif untuk senyawa triterpenoid pada ekstrak etil asetat dan ekstrak metanol. Pada sampel yang positif setelah penambahan pelarut asam asetat anhidrat, asam sulfat pekat dalam perlakuan pelarut etil asetat dan metanol terdapat pembentukan warna merah. Hal ini mungkin karena kepolaran dan sifat pelarut sesuai dengan golongan senyawa triterpenoid (Wahidah *et al.*, 2017). Berdasarkan hasil yang diperoleh menunjukkan bahwa penggunaan pelarut polar lebih banyak mengidentifikasi metabolit

sekunder dibandingkan dengan penggunaan pelarut non polar dan semi polar.

5. Penetapan kadar flavonoid total

Penentuan kadar flavonoid pada penelitian ini menggunakan metode aluminium klorida. Prinsip penentuan kadar flavonoid menggunakan metode $AlCl_3$ adalah terbentuknya kompleks antara $AlCl_3$ dengan gugus keto pada atom C-4 atau C-5 yang berdekatan (Hohakay, Pontoh, & Yudistira, 2019). Penambahan natrium asetat bertujuan untuk mempertahankan panjang gelombang pada daerah tampak (Chang *et al.*, 2002). Penentuan kadar flavonoid pada penelitian ini menggunakan metode aluminium klorida. Prinsip penentuan kadar flavonoid menggunakan metode $AlCl_3$ adalah terbentuknya kompleks antara $AlCl_3$ dengan gugus keto pada atom C-4 atau C-5 yang berdekatan (Hohakay *et al.*, 2019). Penambahan natrium asetat dikatakan menjaga panjang gelombang dalam rentang yang terlihat (Chang *et al.*, 2002). Senyawa yang digunakan sebagai standar untuk penentuan kadar flavonoid total adalah kuersetin. Kuersetin merupakan kelompok flavonol dari flavonoid dengan kelompok keton pada C-4 dan kelompok hidroksil pada atom C-3 atau C-5, yang berdekatan dengan flavon dan flavonol (Azizah *et al.*, 2014).

a. Penentuan panjang gelombang maksimum

Penentuan panjang gelombang maksimum adalah faktor penting dalam analisis kimia menggunakan metode spektrofotometer. Tujuan penentuan panjang gelombang maksimum merupakan untuk menentukan panjang gelombang terukur di mana kompleks antara kuersetin dan $AlCl_3$ memberikan penyerapan optimal. Pengukuran pada panjang gelombang maksimum menghasilkan perubahan absorbansi terbesar untuk setiap satuan kadar, sehingga pengukuran berulang dan pengulangan meminimalkan terjadinya kesalahan pengukuran (Suharyanto dan Prima, 2020). Dalam analisis ini panjang gelombang maksimum kuersetin yang didapatkan sebesar 442 nm dengan nilai absorbansi sebesar 0,306 pada konsentrasi 30 ppm dalam rentang 400-800 nm.

b. Penentuan *operating time*

Operating Time mempunyai tujuan untuk mengetahui waktu pengukuran suatu senyawa yang diperoleh saat absorbansi paling stabil. *Operating time* dilakukan dengan mengukur antara waktu pengukuran dengan absorbansi larutan. Penetapan *operating time*

perlu dilakukan untuk meminimalkan terjadinya kesalahan pengukuran. Hal ini disebabkan karena senyawa yang akan diukur absorbansinya dalam penelitian ini adalah suatu senyawa kompleks antara kuersetin dengan $AlCl_3$. Senyawa kompleks ini membutuhkan waktu agar reaksi yang terbentuk stabil. Jika pengukuran dilakukan sebelum waktu *operating time*, maka masih ada kemungkinan reaksi yang terbentuk belum sempurna (Suharyanto dan Prima, 2020). Dari hasil yang diperoleh, absorbansi yang stabil pada menit ke-50 sehingga dapat disimpulkan bahwa *operating time* untuk penetapan kadar flavonoid total ekstrak biji jagung ungu adalah 50 menit.

c. Validasi metode

1) Linearitas

Sebelum menentukan kadar flavonoid total, dibuat kurva kalibrasi dengan larutan baku kuersetin. Kurva kalibrasi adalah metode statistik yang membandingkan pengaruh kadar analit terhadap respon instrumen (Kantasubrata, 2008). Penentuan kurva kalibrasi bertujuan untuk membuat persamaan regresi linear antara absorbansi dan konsentrasi serta menunjukkan konsentrasi larutan sampel dari hasil pengukuran (Saptari *et al.*, 2019). Absorbansi larutan baku kuersetin pada konsentrasi 10, 20, 30, 40, 50 dan 60 ppm diperoleh persamaan regresi $y = 0,0107x + 0,0947$ dengan nilai r sebesar 0,998.

Photometry Test Report					
File Name:kadar flavonoid.bas			Test Time:		
Software Version:UV V1.101.0					
Operator:Laboratorium Farmasi			Company:		
Test Record List.					
No.	WL(nm)	Abs	Trans(%)	Test Time	Sample Name
1	442.0	0.317	48.1	2023-07-18 12:52	n-heksan r1
2	442.0	0.318	48.0	2023-07-18 12:52	n-heksan r2
3	442.0	0.319	47.9	2023-07-18 12:53	n-heksan r3
4	442.0	0.418	38.1	2023-07-18 12:54	etil asetat r1
5	442.0	0.419	38.1	2023-07-18 12:54	etil asetat r2
6	442.0	0.420	38.1	2023-07-18 12:54	etil asetat r3
7	442.0	0.520	30.0	2023-07-18 12:57	metanol r1
8	442.0	0.522	30.5	2023-07-18 12:59	metanol r2
9	442.0	0.523	30.0	2023-07-18 13:01	metanol r3

Gambar 2. Hasil photometry test report



Gambar 3. Hasil grafik Kurva baku kuersetin

Hasil pengujian memenuhi persyaratan berdasarkan ketentuan umum yaitu harga koefisien korelasi yang baik adalah mendekati 1 atau sama dengan 1 (Harmita, 2004).

2) Presisi

Hasil uji presisi menunjukkan bahwa nilai perhitungan standar deviasi diperoleh dari data yang diperoleh dengan pengulangan sebanyak enam kali yaitu SD (standar deviasi) sebesar 0,0659 pada konsentrasi 30 ppm. Nilai RSD (Relative Standar Deviation) atau KV (koefisien varians) adalah 0,22%. Berdasarkan hasil pengujian menunjukkan bahwa pengendalian akurasi dengan metode spektrofotometer UV-Vis baik bila metode tersebut dinilai baik bila akurasi yang dihasilkan memenuhi syarat bila $KV \leq 2\%$ (Harmita, 2004).

Tabel 3. Nilai presisi kurva baku kuersetin

Replikasi	Absorbansi	Konsentrasi (ppm)
1	0,404	28,90
2	0,405	29
3	0,405	29
4	0,406	29,09
5	0,404	28,90
6	0,404	28,90
Rata-rata		28,965
SD		0,0659
KV		0,22%

3) Akurasi

Akurasi adalah ukuran yang menunjukkan derajat kedekatan hasil analisis dengan kadar analit yang sebenarnya. Uji akurasi untuk melakukan validasi metode penetapan kadar flavonoid total pada biji jagung ungu dengan menggunakan larutan baku kuersetin konsentrasi 10, 20, 30, 40, 50 dan 60 ppm, Kemudian dilakukan perhitungan sehingga menghasilkan %recovery rata-rata sebesar 99,71%, persen perolehan kembali ini dapat diterima karena memenuhi syarat akurasi yaitu pada rentang rata-rata persen perolehan kembali 80-110% (Harmita, 2004).

Tabel 4. Data hasil uji akurasi

Konsentrasi teoritis (ppm)	Konsentrasi (ppm)	Absorbansi (nm)	% Recovery
10	0,205	10,30	103
20	0,303	19,46	97,3
30	0,404	28,90	96,3
40	0,534	41,05	102,62
50	0,633	50,30	100,6
60	0,727	59,09	98,48
	Rata-rata		99,71

4) LOD dan LOD

Setelah diperoleh kurva kalibrasi yang memenuhi persyaratan analisis, data konsentrasi masing-masing analit untuk absorbansi yang berbeda diproses untuk menentukan batas deteksi (LOD) dan batas kuantitasi (LOQ). Batas deteksi adalah konsentrasi terendah suatu analit dalam sampel yang masih dapat dideteksi (Harmita, 2004). Penentuan batas deteksi dan batas kuantitasi tergantung pada kemiringan kurva kalibrasi. Hasil uji batas deteksi untuk mengetahui kadar flavonoid total pada ekstrak biji jagung ungu memberikan nilai batas deteksi (LOD) sebesar 0,1977 ppm dan batas kuantitasi (LOQ) sebesar 0,659 ppm.

d. Pengukuran kurva baku kuersetin

Penentuan kurva baku adalah untuk menentukan hubungan antara konsentrasi larutan dengan nilai absorbansi sehingga dapat diketahui konsentrasi sampel. Jika hukum Lambert-Beer terpenuhi, kurva kalibrasinya berupa garis lurus (Grace *et al.*, 2015). Pada penelitian ini, kalibrasi dilakukan pada seri konsentrasi 10, 20, 30, 40, 50 dan 60 ppm. Hal ini dilakukan agar nilai absorbansi yang diperoleh memenuhi persyaratan Lambert-Beer antara 0,2 dan 0,8. Hasil pengukuran menunjukkan bahwa semakin tinggi nilai konsentrasi maka absorbansi semakin tinggi.

Pada penentuan kurva baku diperoleh persamaan $y = 0,0107x + 0,0947$. Persamaan ini digunakan untuk menghitung kadar flavonoid dalam sampel biji jagung ungu (y) nilai absorbansi dan (x) menyatakan kadar flavonoid dalam sampel. Nilai koefisien korelasi (r) merepresentasikan hubungan linier antara dua variabel. Nilai r yang diperoleh pada penelitian ini adalah 0,998. Hasil pengujian memenuhi persyaratan berdasarkan ketentuan umum yaitu harga koefisien korelasi yang baik mendekati 1 atau sama dengan 1 (Harmita, 2004).

e. Penetapan kadar flavonoid total

Kadar flavonoid total ekstrak biji jagung ungu ditentukan dengan metode kolorimetri menggunakan larutan baku kuersetin. Pada penentuan kadar flavonoid total larutan sampel, ditambahkan $AlCl_3$ yang merupakan kompleks yang terbentuk antara flavonoid dan $AlCl_3$ yang ditandai dengan adanya warna kuning pada larutan (Suharyanto dan Prima, 2020). Ketika kadar flavonoid total ditentukan dengan menggunakan prinsip metode kolorimetri $AlCl_3$, terbentuk kompleks yang

mengarah pada perubahan arah yang terlihat (visible), ditandai dengan terbentuknya warna larutan yang lebih kuning. Pada senyawa flavonol, $AlCl_3$ bereaksi dengan gugus keto pada C4 dan gugus OH pada C5 membentuk senyawa kompleks yang stabil (Salmia, 2016).

Penambahan natrium asetat bertujuan untuk mempertahankan panjang gelombang pada daerah tampak (Chang *et al.*, 2002). Penentuan kadar flavonoid total dilakukan dengan menggunakan standar eksternal yaitu memasukkan nilai absorbansi sampel ekstrak biji jagung ungu ke dalam baku kuersetin sesuai dengan persamaan kurva.

Tabel 5. Hasil penetapan kadar flavonoid total

Sampel	Replikasi	Konsentrasi (mgQE/g ekstrak)	\bar{x}
N-heksan	1	2,59	2,60
	2	2,60	
	3	2,60	
Etil asetat	1	3,77	3,78
	2	3,78	
	3	3,78	
Metanol	1	4,96	4,97
	2	4,98	
	3	4,99	

Hasil analisis flavonoid total dalam berbagai ekstrak biji jagung ungu ditunjukkan pada tabel diatas. Ekstrak metanol merupakan sampel uji yang memiliki kadar flavonoid total per gram ekstrak terbesar dibanding dengan sampel uji lainnya. Kadar flavonoid total masing-masing ekstrak lebih rendah dibandingkan dengan kadar fenolik total karena senyawa flavonoid merupakan sub bagian dari fenolik. Kadar flavonoid total ekstrak mempengaruhi aktivitas antioksidannya. Semakin tinggi total flavonoid maka semakin tinggi pula aktivitasnya antioksidannya (Perwiratami, Suzery, & Cahyono, 2014). Perlu dicatat bahwa penelitian yang berhubungan dengan penentuan kadar flavonoid total bagian biji jagung ungu belum pernah dilaporkan sehingga hasil penelitian ini tidak dapat diperbandingkan dengan hasil uji peneliti lain.

6. Penetapan kadar fenolik total

Penetapan kadar fenolik total dengan menggunakan pereaksi Folin Ciocalteu. Prinsip metode ini adalah prinsip oksidasi ion fenolat oleh reagen *folin ciocalteu* menghasilkan kompleks berwarna biru yang

terukur pada panjang gelombang 740 nm. Pada metode folin-ciocalteu terjadi reaksi reduksi ion molybdenum ($Mo6+$) menjadi $Mo5+$, reaksi ini diduga menyebabkan perubahan larutan kuning menjadi biru (Pangestuty, 2016).

Asam galat dipilih sebagai standar karena merupakan salah satu fenol alami yang stabil dan relatif ekonomis dibandingkan dengan yang lainnya. Asam galat termasuk dalam senyawa fenol yang berasal dari asam hidroksi benzoat dan diklasifikasikan sebagai asam fenol yang sederhana. Asam galat dipilih sebagai standar untuk memastikan ketersediaan substansi yang stabil dan murni (Viranda, 2009).

Asam galat direaksikan dengan reagen *Folin-Ciocalteu* menghasilkan warna kuning yang menandakan bahwa mengandung fenol, setelah itu ditambahkan dengan larutan NaOH menghasilkan warna biru. Reaksi tersebut hanya dapat terjadi pada kondisi basa, sehingga pada penelitian digunakan Natrium Hidroksida (NaOH) sebagai basa. Warna biru yang dihasilkan menggambarkan jumlah kompleks yang terbentuk, sehingga semakin tinggi kandungan total fenol dalam satu larutan maka semakin pekat warna biru yang dihasilkan (Pangestuty, 2016).

a. Penentuan panjang gelombang maksimum

Pada penelitian ini penentuan panjang gelombang maksimum asam galat menggunakan spektrofotometer UV-Vis yang diukur serapannya pada rentang 400-800 nm. Hasil pengukuran panjang gelombang maksimum asam galat konsentrasi 45 ppm berada pada 740 nm. Hasil tersebut sesuai dengan teori yang menyatakan bahwa panjang gelombang absorbansi maksimum asam galat terdapat pada rentang 400-800 nm (Tahir, Muflihunna, & Syafrianti, 2017). Penentuan panjang gelombang maksimum ini bertujuan untuk menentukan pada panjang gelombang berapa yang dapat menghasilkan nilai absorbansi maksimum, sehingga didapatkan nilai absorbansi yang akurat (Rohmah, Muadifah, & Martha, 2021).

b. Penentuan *operating time*

Dari hasil yang diperoleh, absorbansi yang stabil pada menit ke-8 sehingga dapat disimpulkan bahwa *operating time* untuk penetapan kandungan total fenolik ekstrak biji jagung ungu adalah 8 menit. Tujuan penetapan *operating time* untuk

mendapatkan waktu pengukuran pada saat reaksi telah berjalan optimal yang ditandai dari absorbansi yang stabil, sehingga dapat memaksimalkan pengukuran. Kenaikan absorbansi secara terus-menerus dari menit ke menit tidak dapat dijadikan sebagai *operating time* karena perubahan absorbansi masih terus berjalan, sehingga pengukuran menjadi tidak maksimal jika dilakukan pada waktu tersebut. Sebaliknya ketika absorbansi mulai stabil merupakan waktu yang tepat dijadikan sebagai *operating time* (Pangestuty, 2016).

c. Validasi metode

1) Linearitas

Sebelum dilakukan penentuan kadar fenolik total, dibuat kurva kalibrasi dengan larutan standar asam galat. Kurva kalibrasi merupakan metode statistik yang digunakan untuk mengetahui perbandingan pengaruh kadar analit dengan respon alat (instrumen) (Kantasubrata, 2008). Penentuan kurva kalibrasi bertujuan untuk menghasilkan persamaan regresi linearitas antara absorbansi dengan konsentrasi dan menunjukkan besarnya konsentrasi larutan sampel dari hasil pengukuran (Saptari *et al.*, 2019).

Pada grafik diatas menunjukkan persamaan regresi menggunakan larutan standar asam galat yang diukur pada panjang gelombang maksimumnya yaitu 740 nm. Serapan atau absorbansi larutan standar asam galat dengan konsentrasi ppm menghasilkan persamaan regresi $y = 0,0071x + 0,1295$ dengan nilai r sebesar 0,9985. Hasil pengujian memenuhi persyaratan berdasarkan ketentuan umum yaitu harga koefisien korelasi yang baik adalah mendekati 1 atau sama dengan 1 (Harmita, 2004).

2) Presisi

Presisi adalah ukuran yang menunjukkan derajat kesesuaian antara hasil uji individual. Presisi diukur sebagai simpangan baku atau simpangan baku relatif (koefisien variasi). Kriteria ketelitian diberikan jika metode memberikan simpangan baku relatif $\leq 2\%$. Makin kecil simpangan baku relatif yang diberikan suatu metode analisis maka kesahihan metode tersebut lebih terjamin (Harmita, 2004).

Dari hasil penelitian didapatkan nilai simpangan baku sebesar 0,24%. Data tersebut diperoleh dari pengujian secara

berulang yang dilakukan sebanyak enam replikasi sampel. Sampel yang diuji adalah larutan asam galat yang memiliki konsentrasi 45 ppm. Hasil tersebut menunjukkan metode yang digunakan dalam penelitian memiliki keterulangan yang baik karena memenuhi persyaratan yaitu memiliki nilai kurang dari 2%.

Tabel 6. Nilai presisi kurva baku asam galat

Replikasi	Absorbansi	Konsentrasi (ppm)
1	0,456	45,98
2	0,456	45,98
3	0,457	46,12
4	0,456	45,98
5	0,457	46,12
6	0,458	46,26
Rata-rata		46,07
SD		0,1143
KV		0,24%

3) Akurasi

Akurasi adalah ukuran yang menunjukkan derajat kedekatan hasil analisis dengan kadar analit yang sebenarnya. Uji akurasi untuk melakukan validasi metode penetapan kadar fenolik total pada biji jagung ungu dengan menggunakan larutan baku asam galat konsentrasi 15, 30, 45, 60, 75, dan 90 ppm, Kemudian dilakukan perhitungan sehingga menghasilkan %recovery rata-rata sebesar 99,71%. Berdasarkan data yang diperoleh persen perolehan kembali ini dapat diterima karena syarat akurasi yaitu pada rentang rata-rata persen perolehan kembali 80–110% (Harmita, 2004).

Tabel 7. Hasil uji akurasi

Konsentrasi teoritis (ppm)	Absorbansi (nm)	Konsentrasi terukur (ppm)	%recovery
15	0,225	13,45	89,6
30	0,348	30,77	102,56
45	0,456	45,98	102,17
60	0,562	60,91	101,51
75	0,657	74,29	99,05
90	0,763	89,22	99,13
	Rata-rata		99

4) LOD dan LOQ

Batas deteksi (LOD) dan batas kuantitasi (LOQ) dapat dihitung secara statistik melalui persamaan regresi dari kurva kalibrasi yang telah masuk dalam standar atau memenuhi persyaratan. Batas deteksi (LOD) merupakan jumlah terkecil analit yang dapat dideteksi oleh alat atau instrument sedangkan batas kuantitasi (LOQ) merupakan jumlah terkecil analit yang dapat dihitung. Dari hasil penelitian

untuk pengujian penentuan jumlah fenolik total didapatkan nilai batas deteksi (LOD) sebesar 0,3429 ppm dan batas kuantitasi (LOQ) sebesar 1,143 ppm.

d. Pengukuran kurva baku asam galat

Panjang gelombang maksimum yang diperoleh digunakan untuk mengukur absorbansi seri konsentrasi asam galat pada penentuan kurva kalibrasi asam galat. Penentuan kurva kalibrasi bertujuan untuk menghasilkan persamaan regresi linearitas antara absorbansi dengan konsentrasi dan menunjukkan besarnya konsentrasi larutan sampel dari hasil pengukuran (Saptari *et al.*, 2019). Seri konsentrasi asam galat yang digunakan dalam penelitian ini yaitu konsentrasi 15, 30, 45, 60, 75 dan 90 ppm direaksikan dengan larutan Folin Ciocalteu diamkan selama 8 menit dan ditambahkan NaOH 1% diinkubasi selama 8 menit kemudian diukur absorbansinya pada panjang gelombang 740 nm diperoleh data seperti pada data.

Hasil pengukuran absorbansi reaksi larutan baku asam galat dengan reagen *Folin Ciocalteu* yang ditampilkan pada tabel di atas memberikan arti bahwa semakin besarnya konsentrasi dari asam galat maka semakin tinggi kandungan fenolatnya. Hal ini terlihat dari semakin besarnya nilai absorbansi (Tahir *et al.*, 2017). Hasil dari pengukuran ini dibuatkan kurva baku untuk mendapatkan persamaan regresi linier yang digunakan untuk menghitung konsentrasi dari fenolik yang terdapat dalam ekstrak. Pada kurva terlihat bahwa persamaan regresi yang dimiliki adalah $y = 0,0071x + 0,1295$ dengan nilai $r = 0,9985$. Nilai r yang didapatkan mendekati 1 yang berarti persamaan regresi linier atau memenuhi syarat kelayakan metode analisis (Harmita, 2004).

e. Penetapan kadar fenolik total

Kadar fenolik dari ekstrak biji jagung ungu yang diperoleh dari pengukuran dihitung menggunakan persamaan regresi larutan baku asam galat yang diperoleh. Pada tabel di bawah terlihat bahwa kadar senyawa metabolit sekunder golongan polifenol banyak terdapat pada ekstrak metanol sebesar 11,19 mgGAE/ 0,1 g ekstrak dan yang sedikit pada ekstrak n-heksan sebesar 10,87 GAE/ 0,1 g ekstrak. Besarnya kadar fenolik dari ekstrak dapat dilihat pada tabel 10 di bawah ini.

Tabel 8. Hasil kadar fenolik total biji jagung ungu

Sampel	Replikasi	Konsentrasi (mg GAE/g ekstrak)	\bar{x}
N-heksan	1	10,83	10,87
	2	10,88	
	3	10,92	
Etil asetat	1	11,15	11,16
	2	11,17	
	3	11,18	
Metanol	1	11,71	11,73
	2	11,73	
	3	11,76	

Fenolik total tertinggi dihasilkan pelarut metanol yang menunjukkan bahwa senyawa-senyawa fenolik pada biji jagung ungu lebih larut pada pelarut metanol. Tingginya kandungan fenol yang terekstraksi dalam ekstrak metanol karena pengaruh pelarut yang digunakan untuk ekstraksi. Pelarut polar seperti metanol merupakan pelarut yang sangat luas digunakan dan efektif untuk ekstraksi komponen-komponen fenolik dari bahan alam (Shahidi, 1997). Kadar fenolik total masing-masing ekstrak berbanding lurus dengan aktivitas antioksidannya. Semakin tinggi kandungan fenol dalam suatu bahan semakin tinggi pula aktivitasnya sebagai antioksidan (Dejian Huang *et al.*, 2005 ; Nur *et al.*, 2019).

7. Aktivitas antioksidan

Pada penelitian ini pengujian aktivitas antioksidan menggunakan metode DPPH yang dilakukan dengan spektrofotometer Uv-Vis. DPPH adalah metode yang umum digunakan karena metode ini sederhana, cepat, sensitif terhadap aktivitas antioksidan (Koleva *et al.*, 2002). Uji DPPH didasarkan pada reduksi warna ungu larutan DPPH (Floegel, Kim, Chung, Koo, & Chun, 2011), yang mana terjadi reaksi transfer atom hidrogen antara antioksidan dan radikal peroksil (Wootton-Beard *et al.*, 2011).

Prinsip dari pengukuran antioksidan dengan menggunakan DPPH adalah terjadinya pemudaran radikal DPPH akibat adanya antioksidan yang dapat menetralkan molekul radikal bebas (Pujiastuti dan Islamiyati, 2021). Perbandingan yang digunakan sebagai kontrol positif adalah vitamin C karena berfungsi sebagai antioksidan sekunder yang menangkap radikal bebas, mencegah terjadinya reaksi berantai, aktivitas antioksidannya sangat tinggi, mudah diperoleh dan vitamin C lebih polar dari vitamin lain. Vitamin C memiliki gugus hidroksi bebas yang bertindak sebagai

penangkap radikal bebas (Isnindar, Wahyuono, & Setyowati, 2011).

a. Penentuan panjang gelombang maksimum

Berdasarkan hasil pengukuran panjang gelombang maksimum larutan DPPH 40 ppm dalam metanol *p.a* dengan spektrofotometer Uv-Vis dalam rentang 400-800 nm diperoleh serapan maksimum pada gelombang 514 nm dengan nilai absorbansi sebesar 0,797. Panjang gelombang ini sesuai dengan yang ada pada literatur (Norhabibah, Rakhman, & Darini, 2019).

b. Penentuan operating time

Penentuan *operating time* (OT) digunakan untuk menentukan waktu yang paling tepat larutan uji dalam meredam radikal DPPH, *operating time* ini menunjukkan bahwa reaksi antara larutan uji dan DPPH telah stabil yang dapat ditunjukkan dengan tidak terjadinya penurunan absorbansi. Pengukuran *operating time* yang sesuai akan diperoleh keterulangan yang tinggi. Hal ini disebabkan karena pada awal reaksi, absorbansi pada senyawa yang berwarna ini akan meningkat sampai waktu tertentu hingga diperoleh absorbansi yang stabil (Ganjar dan Rohman, 2012).

Penentuan *operating time* dengan pengambilan konsentrasi 3 ppm vitamin C yang direaksikan dengan larutan DPPH 40 ppm. Panjang gelombang yang digunakan yaitu 514 nm dan diukur pada rentang waktu ke 185 menit dengan absorbansi 0,346 dihasilkan waktu yang stabil.

c. Validasi metode

1) LOD, LOQ dan linearitas

Batas deteksi (*Limit of Detection*, LOD) merupakan konsentrasi analit yang masih dapat terdeteksi walaupun tidak selalu dapat dikuantifikasi. Sedangkan Batas kuantifikasi (*Limit of Quantification*, LOQ) merupakan konsentrasi analit terendah dari sampel yang dapat ditentukan dengan presisi dan akurasi yang dapat diterima pada kondisi operasional metode yang digunakan. Batas deteksi (LOD) dan batas kuantitas (LOQ) dapat dihitung secara statistik melalui persamaan regresi linier dari kurva standar (Ganjar dan Rohman, 2012). Dari hasil perhitungan didapatkan bahwa replikasi 1 LOD sebesar 0,2421 ppm dan LOQ sebesar 0,807 ppm, replikasi 2 LOD sebesar 0,408 ppm dan LOQ sebesar 1,36 ppm, dan replikasi 3 LOD

sebesar 0,078 ppm dan LOQ sebesar 0,26 ppm.

Uji linearitas dapat dilakukan dengan menghitung secara statistik melalui koefisien korelasi dari konsentrasi dan absorbansi larutan baku (Ganjar dan Rohman, 2012). Nilai persamaan linearitas replikasi 1 didapatkan persamaan dengan nilai $y = 0,0178x + 0,0233$ dan nilai $r = 0,9995$, replikasi 2 didapatkan persamaan $y = 0,0177x + 0,0231$ dan nilai $r = 0,9996$, dan replikasi 3 didapatkan persamaan $y = 0,0175x + 0,0287$ dan nilai $r = 0,9993$. Berdasarkan ketentuan umum yaitu harga koefisien korelasi yang baik adalah mendekati 1 atau sama dengan 1 (Harmita, 2004).

2) Presisi

Presisi merupakan ukuran tingkat keterulangan metode analisis yang ditampilkan dalam simpangan baku relatif dari sampel yang berbeda secara signifikan secara statistik. Hasil absorbansi yang diperoleh digunakan untuk menghitung Standar Deviasi (SD) dan RSD (*Relative Standard Deviation*) (Ganjar dan Rohman, 2012). Pada uji presisi dilakukan pada larutan DPPH yang dilihat absorbansinya sebanyak 6 kali didapatkan RSD (*Relative Standard Deviation*) atau standar deviasi relative dapat dilihat pada tabel dibawah ini.

Berdasarkan hasil uji tersebut menunjukkan bahwa pengujian presisi yang digunakan adalah baik dimana metode dikatakan baik apabila presisi yang dihasilkan memenuhi persyaratan dengan $KV \leq 2\%$ (Harmita, 2004).

Tabel 9. Nilai presisi kurva baku DPPH replikasi 1

Replikasi	Absorbansi	Konsentrasi (ppm)
1	0,207	10,32
2	0,203	10,09
3	0,205	10,20
4	0,205	10,20
5	0,206	10,26
6	0,204	10,15
Rata-rata		10,20
SD		0,0807
KV		0,79%

Tabel 10. Nilai presisi kurva baku DPPH replikasi 2

Replikasi	Absorbansi	Konsentrasi (ppm)
1	0,202	10,13
2	0,203	10,19
3	0,203	10,19
4	0,204	10,24
5	0,207	10,41
6	0,208	10,47
Rata-rata		10,27
SD		0,136
KV		1,32%

Tabel 11. Nilai presisi kurva baku DPPH replikasi 3

Replikasi	Absorbansi	Konsentrasi (ppm)
1	0,211	10,41
2	0,211	10,41
3	0,210	10,36
4	0,210	10,36
5	0,210	10,36
6	0,210	10,36
Rata-rata		10,37
SD		0,026
KV		0,25%

3) Akurasi

Akurasi adalah ukuran yang menunjukkan derajat kedekatan hasil analisis dengan kadar analit yang sebenarnya. Hasil pengujian akurasi untuk mendeteksi aktivitas antioksidan setelah dilakukan perhitungan menggunakan rumus persen perolehan didapatkan nilai %recovery rata-rata pada replikasi 1 sebesar 100,26%, replikasi 2 sebesar 100,31% dan replikasi 3 sebesar 100,17%. Berdasarkan nilai akurasi tersebut diketahui bahwa metode antioksidan ini dapat memenuhi syarat. Syarat akurasi yaitu pada rentang rata-rata persen perolehan kembali 80-110% (Harmita, 2004). Hasil dapat dilihat pada tabel dibawah ini.

Tabel 12. Hasil uji akurasi replikasi 1

Konsentrasi teoritis (ppm)	Absorbansi (nm)	Konsentrasi terukur (ppm)	%Recovery
10	0,204	10,15	101,5
15	0,289	14,92	99,46
20	0,383	20,20	101
25	0,464	24,75	99
30	0,556	29,92	99,73
35	0,652	35,32	100,91
Rata-rata			100,26

Tabel 13. Hasil uji akurasi replikasi 2

Konsentrasi teoritis (ppm)	Absorbansi (nm)	Konsentrasi terukur (ppm)	%Recovery
10	0,205	10,30	103
15	0,285	14,82	98,8
20	0,375	19,90	99,5
25	0,453	24,88	99,52
30	0,557	30,19	100,63
35	0,695	35,16	100,45
Rata-rata			100,31

Tabel 14. Hasil uji akurasi replikasi 3

Konsentrasi teoritis (ppm)	Absorbansi (nm)	Konsentrasi terukur (ppm)	%Recovery
10	0,209	10,30	103
15	0,288	14,81	98,73
20	0,374	19,73	98,65
25	0,465	24,93	99,72
30	0,559	30,30	101
35	0,641	34,98	99,94
Rata-rata			100,17

d. Pengukuran aktivitas antioksidan vitamin C

Vitamin C merupakan antioksidan yang bekerja sebagai oxygen scavengers, yaitu mengikat oksigen sehingga tidak mendukung reaksi oksidasi. Dalam hal ini, vitamin C akan mengadakan reaksi dengan oksigen yang berada dalam sistem sehingga jumlah oksigen akan berkurang. Selain vitamin C, senyawa yang bekerja sebagai oxygen scavengers diantaranya askorbil palminat, asam eritorbat, dan sulfit (Gordon, 1990).

Vitamin C berfungsi sebagai antioksidan sekunder yaitu menangkap radikal bebas, mencegah terjadinya reaksi berantai, aktivitas antioksidannya sangat tinggi, mudah diperoleh. Vitamin C lebih polar dari vitamin yang lain. Vitamin C mempunyai gugus hidroksi bebas yang bertindak sebagai penangkap radikal bebas (Isnindar *et al.*, 2011).

Vitamin C mempunyai peran sebagai senyawa antioksidan alami dengan aktivitas terlarut dalam air tinggi, tetapi karena sifatnya hidrofilik sehingga efektivitas dalam menstabilkan lemak dan minyak berkurang (Wijayati, Rohmah, & Supartono, 2016). Vitamin C sebagai kontrol positif juga memiliki aktivitas antioksidan yang sangat kuat. Besarnya antioksidan ekstrak biji jagung ungu berbeda dengan besarnya aktivitas antioksidan vitamin C. Perbedaan ini diartikan bahwa ekstrak biji jagung ungu memiliki aktivitas antioksidan lebih lemah dibandingkan vitamin C. Hasil pengukuran serapan vitamin C dapat dilihat pada tabel 17 dibawah ini.

Tabel 15. Hasil uji aktivitas antioksidan vitamin C

Replikasi	Konsentrasi (ppm)	Absorbansi rata-rata	Inhibisi (%)	IC50 (ppm)	Rata-rata IC50 (ppm)
I	1	0,483	27,03	6,53	
	2	0,465	29,75		
	3	0,436	34,13		
	4	0,397	40,03		
	5	0,378	42,90		
	6	0,344	48,03		
II	1	0,487	26,65	7	6,65
	2	0,466	29,81		
	3	0,433	34,78		
	4	0,398	40,06		
	5	0,375	43,52		
	6	0,346	47,59		
III	1	0,489	26,46	6,42	
	2	0,469	29,47		
	3	0,438	34,14		
	4	0,397	40,03		
	5	0,371	44,21		
	6	0,349	47,51		

Hasil ini memperlihatkan bahwa semakin besar konsentrasi vitamin C maka semakin kecil persen aktivitas antioksidan yang didapatkan. Tetapi ketika nilai suatu aktivitas

antioksidan yang semakin besar dengan konsentrasi yang besar pula maka komponen partikel vitamin C yang dibutuhkan dalam mengoksidasi DPPH sebagai radikal bebas semakin banyak (Rikantara, Utami, & Kasasiah, 2022). Nilai IC₅₀ pada vitamin C sebagai kontrol positif adalah sebesar 6,65 ppm aktivitas antioksidannya merupakan golongan sangat kuat karena vitamin C merupakan senyawa yang sudah murni (Amin, Wunas, & Anin, 2016).

e. Pengukuran aktivitas antioksidan ekstrak biji jagung ungu

Pengujian aktivitas antioksidan ekstrak biji jagung ungu dilakukan sebanyak tiga kali replikasi dengan panjang gelombang 514 nm dan waktu inkubasi 185 menit. Pengujian sebanyak tiga kali replikasi bertujuan untuk meminimalisir terjadinya kesalahan dalam analisis sampel dan pengukuran aktivitas antioksidan (Syafiq, 2022). Konsentrasi ekstrak biji jagung ungu yang digunakan dalam penelitian ini adalah 5 ppm, 10 ppm, 15 ppm, 20 ppm, 25 ppm dan 30 ppm. Penggunaan enam konsentrasi bertujuan untuk membuat kurva baku yang menghasilkan persamaan regresi linear dan dapat digunakan untuk menghitung persentase peredaman radikal bebas.

Konsentrasi pada sampel juga dapat mempengaruhi nilai absorbansi, semakin tinggi konsentrasinya maka semakin tinggi pula % DPPH yang dihasilkan atau dapat dikatakan semakin tingginya konsentrasi menunjukkan adanya peningkatan aktivitas antioksidan atau peningkatan peredaman radikal bebas (Adawiyah, Lady Yunita Handoyo, Gasim Soka, Nur Atiqah, & Haryanto Susanto, 2023). Berdasarkan penelitian yang telah dilakukan terjadi perubahan warna ungu pekat pada DPPH sebagai radikal bebas yang memudar menjadi kuning atau ungu pudar setelah ditambahkan larutan ekstrak biji jagung ungu.

Perubahan warna tersebut terjadi karena adanya antioksidan yang mereduksi senyawa radikal bebas. Semakin pudar warna ungu yang diperoleh, maka menunjukkan kapasitas antioksidan suatu senyawa yang semakin kuat (Setiawan, Yunita, & Kurniawan, 2018; Yuslianti, 2019). Larutan DPPH secara visual tidak mengalami perubahan warna yang signifikan dari ungu pekat menjadi kuning setelah penambahan larutan ekstrak biji jagung ungu. Perubahan warna ungu pekat menjadi ungu pudar juga dapat dinyatakan bahwa ekstrak biji jagung ungu memiliki

aktivitas antioksidan sedangkan kekuatan aktivitas antioksidan pada ekstrak biji jagung ungu dapat dilihat secara kuantitatif menggunakan spektrofotometri UV-Vis untuk menunjukkan nilai yang lebih akurat (Oey *et al.*, 2022; Rante *et al.*, 2020).

Salah satu parameter yang telah diperkenalkan baru-baru ini untuk interpretasi hasil dari metode DPPH adalah nilai IC₅₀. IC₅₀ didefinisikan sebagai konsentrasi substrat yang menyebabkan hilangnya 50% dari aktivitas DPPH (Molyneux, 2004). Nilai IC₅₀ diperoleh berdasarkan perhitungan persamaan regresi linear yang didapatkan dengan memplot konsentrasi larutan uji dan persen peredaman DPPH, dengan konsentrasi larutan uji sebagai absis dan nilai persen peredaman sebagai ordinat. Hasil aktivitas antioksidan ekstrak biji jagung ungu dapat dilihat pada tabel dibawah ini.

Tabel 16. Hasil uji aktivitas antioksidan ekstrak n-heksan

Replikasi	Konsentrasi (ppm)	Absorbansi rata-rata	Inhibisi (%)	IC50 (ppm)	Rata-rata IC ₅₀ (ppm)
I	5	0,487	26,43	38,82	
	10	0,456	31,11		
	15	0,430	34,29		
	20	0,415	37,31		
	25	0,389	41,23		
	30	0,375	43,35		
II	5	0,481	27,56	37,24	38,19
	10	0,464	30,21		
	15	0,436	34,33		
	20	0,414	37,34		
	25	0,387	41,71		
	30	0,366	44,87		
III	5	0,486	26,91	38,51	
	10	0,465	30,07		
	15	0,437	34,28		
	20	0,415	37,59		
	25	0,390	41,35		
	30	0,376	43,45		

Tabel 17. Hasil uji aktivitas antioksidan ekstrak Etil asetat

Replikasi	Konsentrasi (ppm)	Absorbansi rata-rata	Inhibisi (%)	IC50 (ppm)	Rata-rata IC ₅₀ (ppm)
I	5	0,510	22,96	35,23	
	10	0,492	25,67		
	15	0,458	30,81		
	20	0,428	35,34		
	25	0,390	41,08		
	30	0,362	45,31		
II	5	0,505	23,94	35,37	35,23
	10	0,495	26,35		
	15	0,451	32,07		
	20	0,426	35,84		
	25	0,393	40,81		
	30	0,361	45,63		
III	5	0,506	23,90	35,10	
	10	0,495	25,56		
	15	0,451	32,18		
	20	0,423	36,39		
	25	0,392	41,05		
	30	0,363	45,41		

Tabel 18. Hasil uji aktivitas antioksidan ekstrak metanol

Replikasi	Konsentrasi (ppm)	Absorbansi rata-rata	Inhibisi (%)	IC ₅₀ (ppm)	Rata-rata IC ₅₀ (ppm)
I	5	0,524	20,84	33,47	
	10	0,495	25,22		
	15	0,464	29,90		
	20	0,431	34,89		
	25	0,387	41,99		
II	30	0,354	46,52	33,46	33,46
	5	0,525	20,93		
	10	0,496	25,30		
	15	0,465	29,96		
	20	0,434	34,63		
III	25	0,385	42,01	33,47	
	30	0,354	46,68		
	5	0,526	20,90		
	10	0,497	25,26		
	15	0,465	30,07		
	20	0,433	34,88		
	25	0,385	42,10		
	30	0,356	46,46		

Pada gambar menunjukkan bahwa semakin tinggi konsentrasi sampel, semakin besar kemampuan sampel dalam menangkal radikal bebas. Hal ini disebabkan karena semakin banyak atom hidrogen yang didonorkan oleh senyawa metabolit sekunder pada senyawa DPPH maka semakin banyak juga reduksi yang dapat dilakukan terhadap DPPH (Rahayu et al., 2010). Hasil persen aktivitas antioksidan dapat digunakan untuk mengetahui potensi aktivitas antioksidan dalam sampel yang ditunjukkan dengan nilai IC₅₀ merupakan parameter yang digunakan untuk menunjukkan konsentrasi ekstrak uji yang mampu menangkal radikal bebas DPPH sebanyak 50%. Semakin kecil nilai IC₅₀, maka akan semakin tinggi nilai aktivitas (Widyasanti et al., 2016).

Berdasarkan tabel 4.18, ekstrak metanol memiliki nilai aktivitas antioksidan paling tinggi yaitu sebesar 33,46 ppm. Selain itu, pada tabel 4.5 terlihat bahwa ekstrak metanol memiliki kadar flavonoid total dan pada tabel 4.8 ekstrak metanol memiliki kadar fenolik total yang lebih besar yaitu 4,97 mg QE/g ekstrak dan 11,73 mg GAE/g ekstrak. Senyawa fenolik memiliki korelasi yang kuat dengan aktivitas antioksidan (Oliveira et al., 2012).

Senyawa golongan flavonoid dan fenolik memiliki kontribusi yang besar terhadap aktivitas antioksidan. Semakin tinggi kadar senyawa flavonoid/fenolik pada ekstrak maka semakin baik pula aktivitas antioksidannya (Ghasemzadeh dan Ghasemzadeh, 2011). Hal tersebut dapat dilihat pada tabel 4.5 kadar flavonoid total dan tabel 4.8 kadar fenolik total yang tinggi pada ekstrak metanol memberikan dampak yang signifikan pada hasil pengujian antioksidan Tabel 4.18.

Senyawa fenolik dapat meredam radikal bebas dengan beberapa cara diantaranya mendonorkan hidrogen kepada spesi radikal oksigen sehingga memutuskan siklus pembentukan radikal baru. Selain itu, senyawa fenolik juga dapat mendonorkan gugus hidroksi kepada spesi radikal. Kekuatan antioksidan senyawa fenolik juga dikaitkan dengan kemampuan senyawa fenolik dalam mengkhelat dengan ion logam yang terlibat dalam reaksi radikal bebas (Pereira, Valentão, Pereira, & Andrade, 2009).

8. Analisis Data

Hasil data nilai kadar flavonoid total, kadar fenolik total dan hasil analisis aktivitas antioksidan diolah dengan metode SPSS one way ANOVA untuk mengetahui pengaruh ekstrak biji jagung ungu terhadap aktivitas antioksidan. Analisis dilanjutkan menggunakan uji tukey untuk melihat perbedaan yang signifikan dengan perubahan pelarut ($p < 0,05$) atau tanpa perubahan ($p > 0,05$). Uji ANOVA menggunakan Software SPSS 29 dengan menggunakan data hasil replikasi kadar flavonoid total, kadar fenolik total dan aktivitas antioksidan. Uji ANOVA pada penelitian ini berdasarkan perbedaan jenis pelarut yaitu n-heksan, etil asetat dan metanol.

Analisis statistik dimulai dengan uji normalitas, uji normalitas dilakukan untuk mengukur apakah data memiliki distribusi normal sehingga dapat dipakai dalam statistik parametrik. Signifikansi dari uji normalitas yaitu $p < 0,05$ memiliki distribusi tidak normal, sedangkan jika $p > 0,05$ memiliki distribusi data normal. Hasil dari uji normalitas dapat dilihat pada Tabel dibawah ini.

Tabel 19. Signifikansi kadar flavonoid total uji normalitas

No	Data	Nilai signifikansi (p)	Keterangan
1	N-heksan	0,637 > 0,05	Berdistribusi normal
2	Etil asetat	0,637 > 0,05	Berdistribusi normal
3	Metanol	0,463 > 0,05	Berdistribusi normal

Tabel 20. Signifikansi kadar fenolik total uji normalitas

No	Data	Nilai signifikansi (p)	Keterangan
1	N-heksan	0,363 > 0,05	Berdistribusi normal
2	Etil asetat	0,637 > 0,05	Berdistribusi normal
3	Metanol	0,780 > 0,05	Berdistribusi normal

Tabel 21. Signifikansi aktivitas antioksidan uji normalitas

No	Data	Nilai signifikansi (p)	Keterangan
1	N-heksan	0,356 > 0,05	Berdistribusi normal
2	Etil asetat	0,959 > 0,05	Berdistribusi normal
3	Metanol	0,114 > 0,05	Berdistribusi normal

Dari tabel diatas semua sampel diatas memiliki nilai signifikansi $> 0,05$. Maka dapat disimpulkan dari semua sampel diatas terdistribusi normal. Selanjutnya dilakukan uji homogenitas untuk mengetahui apakah kelompok data memiliki varians yang homogen atau tidak, kriteria pengujian adalah jika nilai signifikansi $> 0,05$. Hasil uji homogenitas bisa dilihat pada Tabel dibawah ini:

Tabel 22. Nilai signifikansi uji homogenitas

No	Data	Nilai signifikansi (p)	Keterangan
1	Kadar flavonoid total	0,715 $> 0,05$	Varian homogen
2	Kadar fenolik total	0,566 $> 0,05$	Varian homogen
3	Aktivitas antioksidan	0,117 $> 0,05$	Varian homogen

Berdasarkan data diatas, didapatkan hasil uji homogenitas $p > 0,05$, hal ini menunjukkan sampel adalah kelompok data sampel yang homogen (varian data homogen). Dari kedua uji diatas yaitu uji normalitas dan uji homogenitas dinyatakan memenuhi syarat uji statistik parametrik. Analisis statistik selanjutnya yaitu menggunakan metode *one way ANOVA*. Uji *one way ANOVA* dilakukan untuk mengetahui ada atau tidaknya perbedaan yang bermakna antara jenis pelarut n-heksan, etil asetat dan metanol yang dihasilkan secara statistika. Kriteria pengujian *one way ANOVA* yaitu jika nilai signifikansi $< 0,05$ maka memiliki rata rata yang berbeda. Sedangkan jika nilai signifikansi $> 0,05$ maka memiliki rata rata yang sama. Berikut merupakan hasil uji *one way ANOVA* pada Tabel dibawah ini:

Tabel 23. Nilai signifikansi uji *one way ANOVA*

No	Data	Nilai signifikansi (p)	Keterangan
1	Kadar flavonoid total	0,001 $< 0,05$	Berbeda secara nyata
2	Kadar fenolik total	0,001 $< 0,05$	Berbeda secara nyata
3	Aktivitas antioksidan	0,000 $< 0,05$	Berbeda secara nyata

Setelah dilakukan uji *one way ANOVA*, didapatkan hasil signifikansi $< 0,05$. Hasil diatas menyatakan bahwa ada perbedaan rata-rata kadar flavonoid total, kadar fenolik total dan aktivitas antioksidan dengan perbedaan jenis pelarut. Uji statistik dilanjutkan dengan uji Tukey SHD untuk mengetahui kelompok mana yang berbeda secara nyata. Kelompok yang memiliki data berbeda secara makna yaitu kelompok yang memiliki nilai $p < 0,05$. Hasil uji Post Hoc Tukey SHD dapat dilihat pada Tabel dibawah ini:

Tabel 24. Nilai signifikansi uji post hoc Tukey SHD kadar flavonoid total

Kelompok 1	Kelompok 2	Nilai signifikansi (p)
N-heksan	Etil asetat	0,001
	Metanol	0,001
Etil asetat	N-heksan	0,001
	Metanol	0,001
Metanol	N-heksan	0,001
	Etil asetat	0,001

Tabel 25. Nilai signifikansi uji post hoc Tukey SHD kadar fenolik total

Kelompok 1	Kelompok 2	Nilai signifikansi (p)
N-heksan	Etil asetat	0,001
	Metanol	0,001
Etil asetat	N-heksan	0,001
	Metanol	0,001
Metanol	N-heksan	0,001
	Etil asetat	0,001

Tabel 26. Nilai signifikansi uji post hoc Tukey SHD aktivitas antioksidan

Kelompok 1	Kelompok 2	Nilai signifikansi (p)
N-heksan	Etil asetat	0,001
	Metanol	0,000
Etil asetat	N-heksan	0,001
	Metanol	0,012
Metanol	N-heksan	0,000
	Etil asetat	0,012

Berdasarkan hasil Uji Post Hoc Tukey HSD diatas, diperoleh bahwa terdapat perbedaan nyata yang signifikan dari kadar flavonoid total, fenolik total dan aktivitas antioksidan dengan perbedaan jenis pelarut. Sehingga dapat diartikan bahwa pengaruh jenis pelarut akan memberikan hasil kadar flavonoid total, kadar fenolik total dan aktivitas antioksidan yang berbeda signifikan.

SIMPULAN

Berdasarkan hasil penelitian yang telah dilakukan, maka dapat disimpulkan bahwa jenis pelarut pada ekstraksi bertingkat berpengaruh sangat nyata terhadap kadar fenolik total, kadar flavonoid total dan aktivitas antioksidan ekstrak biji jagung ungu. Hasil penelitian terbaik menunjukkan bahwa pelarut metanol menghasilkan aktivitas antioksidan tertinggi yaitu nilai IC_{50} sebesar 33,46 ppm, kadar flavonoid total sebesar 4,97 mg QE/g ekstrak, dan kadar fenolik total sebesar 11,73 mg GAE/g ekstrak.

SARAN

Berdasarkan hasil penelitian yang telah dilakukan, maka dapat disarankan untuk dilakukan penelitian lebih lanjut untuk mengisolasi senyawa antioksidan pada biji jagung ungu sehingga dapat diperoleh senyawa tunggal yang berefek sebagai antioksidan. Selain itu perlu dilakukan uji aktivitas antioksidan dengan menggunakan metode lain seperti ABTS, CUPRA, dan FRAP sehingga dapat membandingkan hasilnya dengan penelitian ini.

DAFTAR PUSTAKA

- Adawiyah, R., Lady Yunita Handoyo, D., Gasim Soka, B., Nur Atiqah, S., & Haryanto Susanto, F. (2023). Pengaruh Temperatur Roasting Biji Kopi Robusta (*Coffea canephora* Pierre) terhadap Nilai IC 50. *Jurnal Farmasi Ma Chung: Sains Teknologi dan Klinis Komunitas*, 1(1), 1–7.
- Amin, A., Wunas, J., & Anin, Y. M. (2016). Uji Aktivitas Antioksidan Ekstrak Etanol Klika Faloak (*Sterculia quadrifida* R.Br) dengan Metode DPPH (2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl). *Jurnal Fitofarmaka Indonesia*, 2(2), 111–114.
- Aulyawati, N., Yahdi, & Suryani, N. (2021). Skrining Fitokimia Dan Aktivitas Antioksidan Ekstrak Etanol Rambut Jagung Manis (*Zea Mays* Ssaccharata Strurf) Menggunakan Metode DPPH. *Jurnal Kimia & Pendidikan Kimia*, 3(2), 132–142.
- Aziz T, R. C. dan A. F. (2009). Pengaruh pelarut heksana dan etanol, volume pelarut dan waktu ekstraksi terhadap hasil ekstraksi minyak kopi. *Universitas Sriwijaya: Palembang*.
- Chang, C., Yang, M., Wen, H., dan C., & J. (2002). Estimation of Total Flavonoid Content in Propolis by Two Complementary Colorimetric Methods. *Journal of Food and Drug Analysis*, 10(No 3), p.1978-1982.
- Chayati, I., . S., Marsono, Y., & Astuti, M. (2020). Pengaruh Varietas, Fraksi Pengayakan, Dan Jenis Pelarut Terhadap Kadar Antosianin, Total Fenolik, Dan Aktivitas Antioksidan Ekstrak Jagung Ungu. *Jurnal Riset Teknologi Industri*, 14(1), 13.
- Dejian Huang, Boxin, OU, dan R. L. P. (2005). The Chemistry behind Antioxidant Capacity Assays DEJIAN. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 53(6), 1841–1856.
- Desnita, R., Luliana, S., & Anastasia, D. S. (2018). Antiinflammatory Activity Patch Ethanol Extract Of Leaf Katuk (*Sauropus Androgynus* L. Merr). *Jurnal Ilmu Kefarmasian Indonesia*, 16(1), 1.
- Dewatisari, W. F. (2020). Perbandingan Pelarut Kloroform dan Etanol terhadap Rendeman Ekstrak Daun Lidah Mertua (*Sansevieria trifasciata* prain.) Menggunakan Metode Maserasi. *Jurnal Biologi, Fakultas Sains dan Teknologi, UIN Alaudin Makassar*, (September), 128–132.
- Dewi, Y. K. (2021). SPIN Berdasarkan data World Health Berdasarkan penelitian Ni Made, 3(1), 22–31.
- Dwi Sri Rahayu, Dewi Kusriani, E. F. (2010). Penentuan Aktivitas Antioksidan dari Ekstrak Etanol Daun Ketapang (*Terminalia catappa* L) dengan Metode 1,1-Difenil-2-Pikrihidrazil (DPPH). *Skripsi. Semarang: Universitas*.
- Dyah Nur Azizah, Endang Kumolowati, F. F. (2014). PENETAPAN KADAR FLAVONOID METODE AICI3 PADA EKSTRAK METANOL KULIT BUAH KAKAO (*Theobroma cacao* L.) Dyah Nur Azizah, Endang Kumolowati, Fahrauk Faramayuda. *Des*, 2014(2), 45–49.
- Floegel, A., Kim, D. O., Chung, S. J., Koo, S. I., & Chun, O. K. (2011). Comparison of ABTS/DPPH assays to measure antioxidant capacity in popular antioxidant-rich US foods. *Journal of Food Composition and Analysis*, 24(7), 1043–1048. Elsevier Inc.
- Ganjar, I.G., dan Rohman, A. (2012). *Kimia Farmasi Analisis. Yogyakarta, Pustaka Pelajar*.
- Ghasemzadeh, A., & Ghasemzadeh, N. (2011). Flavonoids and phenolic acids: Role and biochemical activity in plants and human. *Journal of Medicinal Plant Research*, 5(31), 6697–6703.
- Gordon, M. H. (1990). The mechanism of antioxidant action in vitro. *In Food antioxidants (pp. 1-18)*, (Dordrecht: Springer Netherlands).
- Grace, F, X., C, Darsika, K.V., Sownya, K., Suganya, and S, S. (2015). Preparation and Evaluation of Herbal Peel of Mask. *American Journal of Pharm Tech Research*, 5, 33–336.
- Harmita, H. (2004). Petunjuk Pelaksanaan Validasi Metode Dan Cara

- Perhitungannya. *Majalah Ilmu Kefarmasian*, 1(3), 117–135.
- Haryati, N.A., C. S. E. (2015). Uji Toksisitas dan Aktivitas Antibakteri Ekstrak Daun Merah (*Syzygium mytilifolium* Walp) terhadap Bakteri *Staphylococcus aureus* dan *Escherichia coli*. *Jurnal Kimia Mulawarman*, 13(1), 35–39.
- Hidayah, L. A., & Anggarani, M. A. (2022). Determination of Total Phenolic, Total Flavonoid, and Antioxidant Activity of India Onion Extract. *Indonesian Journal of Chemical Science*, 11(2), 123–135.
- Hohakay, J. J., Pontoh, J., & Yudistira, A. (2019). PENGARUH METODE PENERINGAN TERHADAP KADAR FLAVONOID DAUN SESEWANUA (*Clerodendron squamatum* Vahl.). *Pharmakon*, 8(3), 748.
- Indrianingsih, Anastasia, W., Nisa, Khoirun., Damayanti, Ema., Maryana, Roni dan Krido, S., & W. (2007). Efektivitas Fraksi N-Heksana, Kloroform dan Etanol Ekstrak Biji Mimba Sebagai Biopestisida Untuk Jamur *Alternaria pori*. *Teknologi Proses Pangan*, (Yogyakarta: UPT BPPT Kimia LIPI. Diakses dari <http://www.researchgate.net/publication/273130034> pada tanggal 18 Oktober 2018.).
- Isnindar, Wahyuono, S., & Setyowati, E. P. (2011). Isolasi dan identifikasi senyawa antioksidan daun kesemek (*Diospyros kaki* Thunb.) dengan metode DPPH (2,2-Difenil-1-Pikrilhidrazil). *Majalah Obat Tradisional*, 16(3), 157–164.
- Julianti, W. P., Ikrawan, Y., & Iwansyah, A. C. (2019). Pengaruh Jenis Pelarut Terhadap Kandungan Total Fenolik, Aktivitas Antioksidan dan Toksisitas Ekstrak Buah Ciplukan (*Physalis angulata* L). *Jurnal Riset Teknologi Industri*, 13(1), 70.
- Kantasubrata, J. (2008). Jaminan Mutu Data Hasil Pengujian: Kontrol Sampel dan Aplikasinya, (RC Chem Learning Centre. Bandung).
- Khotimah, K. (2016). Skrining Fitokimia dan Identifikasi Metabolit Sekunder Senyawa Karpain pada Ekstrak Metanol Daun *Carica pubescens* Lanne & K. Koch dengan LC/MS, (Skripsi S1. UIN Maulana Malik Ibrahim, Malang).
- Koleva, I.I., van Beek, T.A., Linssen, J.P.H., D., & Groot, A., & E. L. (2002). Screening of plant extracts for Antioxidant activity: a comparative study on three testing methods. *Phytochemical Analysis*, 13(1), 8–17.
- Laware, S. L. (2015). Sequential extraction of plant metabolites. *International Journal of Current Microbiology and Applied Sciences*, 4(2), 33–38.
- Marliana, E., & Saleh, C. (2011). Uji Fitokimia dan Aktivitas Antibakteri Ekstrak Kasar Etanol, Fraksi N-Heksana, Etil Asetat dan Metanol dari Buah Labu Air (*Lagenari siceraria* (Molina) Standl). *Jurnal Kimia Mulawarman*, 8(2), 63–69.
- Molyneux, p. (2004). The use of the stable free radical diphenylpicryl-hydrazyl (DPPH) for estimating antioxidant activity. *Songklanakarinn Journal of Science and Technology*, 50(June 2003), 211–219.
- Ncube, N. S., Afolayan, A. J., & Okoh, A. I. (2008). Assessment techniques of antimicrobial properties of natural compounds of plant origin: Current methods and future trends. *African Journal of Biotechnology*, 7(12), 1797–1806.
- Norhabibah, Rakhman, H. A., & Darini, K. (2019). Uji Kuantitatif Flavonoid Total dan Aktivitas Antioksidan Ekstrak Daun Kacaping (*Gardenia jasminoides* Ellis). *Indonesian Journal of Pharmacy and Natural Product*, 5(2), 4–7.
- Nur, S., Sami, F. J., Awaluddin, A., & Afsari, M. I. A. (2019). Korelasi Antara Kadar Total Flavonoid dan Fenolik dari Ekstrak dan Fraksi Daun Jati Putih (*Gmelina arborea* Roxb.) Terhadap Aktivitas Antioksidan. *Jurnal Farmasi Galenika (Galenika Journal of Pharmacy) (e-Journal)*, 5(1), 33–42.
- Nurmalasari, E. Y., S. Luliana, & S. Wahdaningsih. (2019). Identifikasi Senyawa Fenol dan Flavonoid dari Berbagai Bagian Tanaman Senggani (*Melastoma malabathricum* L.) Menggunakan Metode Kromatografi Lapis Tipis. *Jurnal Mahasiswa Farmasi*, 4, 1–5.
- Oey, U. A. R., Rahayu, T., & Jayanti, G. E. (2022). Pengaruh Suhu terhadap Aktivitas Antioksidan dalam Daun Zaitun (*Olea europaea* L.) dengan Metode DPPH. *Jurnal SAINS ALAMI (Known Nature)*, 5(1), 47–59.
- de Oliveira, A. M. F., Pinheiro, L. S., Pereira, C. K. S., Matias, W. N., Gomes, R. A., Chaves, O. S., de Souza, M. de F. V., et al. (2012). Total phenolic content and

- antioxidant activity of some malvaceae family species. *Antioxidants*, 1(1), 33–43.
- Pangestuty, A. (2016). Uji Aktivitas Antioksidan dan Penetapan Kadar Fenolik Total Fraksi Etil Asetat Ekstrak Etanol Buah Buni (*Antidesma bunius* L. [Spreng]) dengan Metode 2,2-Difenil-1-Pikrilhidrazil (DPPH) dan Metode Folin-Ciocalteu. *Skripsi*, 1–107.
- Pereira, D. M., Valentão, P., Pereira, J. A., & Andrade, P. B. (2009). Phenolics: From chemistry to biology. *Molecules*, 14(6), 2202–2211.
- Permadi, A., Sutanto, & Sri, W. (2015). Perbandingan Metode Ekstraksi Bertingkat dan Tidak Bertingkat Terhadap Flavonoid Total Herba Ciplukan (*Physalis angukata* L.) Secara Kolorimetri. *Jurnal Online Mahasiswa (JOM) Bidang Farmasi*, 1(1), 1–10.
- Perwiratami, C., Suzery, M., & Cahyono, B. (2014). Korelasi Fenolat Total dan Flavonoid Total dengan Antioksidan dari Beberapa Sediaan Ekstrak Buah Tanjung (*Mimusops elengi*). *Chem. Prog*, 7(1), 34–39.
- Pramiastuti, O., Solikhati, D. I. K., & Suryani, A. (2021). Aktivitas antioksidan Fraksi Umbi Bawang Dayak (*Eleutherine bulbosa* (Mill.) Urb) Dengan Metode DPPH (1,1-difenil-2-pikrilhidrazil) Antioksidant. *Jurnal Wiyata*, 8(1), 55–66.
- Pujiastuti, E., & Islamiyati, R. (2021). Aktivitas Antioksidan Fraksi Etil Asetat dan Air Ranting Buah Parijoto (*Medinilla speciosa* blume) dengan Peredaman Radikal Bebas DPPH. *Cendekia Journal of Pharmacy*, 5(2), 135–144.
- Rante, T. R. K., Simbala, H. E. I., & Mansauda, K. L. R. (2020). Skrining Fitokimia Dan Potensi Antioksidan Dari Ekstrak Daun Tumbuhan Ekor Tikus (*Stachytarpheta jamaicensis* L) Dengan Metode 1.1 Diphenyl-2-Picrylhydracyl (Dpph). *Jurnal MIPA*, 9(2), 91.
- Rikantara, F. S., Utami, M. R., & Kasasiah, A. (2022). Aktivitas antioksidan kombinasi ekstrak daun sirsak (*Annona muricata* L.) dan ekstrak daun pepaya (*Carica papaya* L.) dengan metode DPPH. *Lambung Farmasi*, 3(2), 124–133.
- Robinson, T. (1991). Kandungan Organik Tumbuhan Tinggi. 6.a.b. Edited by Kosasih Padmawinata, (Bandung: Penerbit ITB).
- Rohmah, S. A. A., Muadifah, A., & Martha, R. D. (2021). Validasi Metode Penetapan Kadar Pengawet Natrium Benzoat pada Sari Kedelai di Beberapa Kecamatan di Kabupaten Tulungagung Menggunakan Spektrofotometer Uv-Vis. *Jurnal Sains dan Kesehatan*, 3(2), 120–127.
- Runadi, D. (2007). Isolasi dan Identifikasi Alkaloid dari Herba komfrey (*symphytum officinale* l.). *Karya Ilmiah*.
- Salamah, E., Ayuningrat, E., & Purwaningsih, S. (2008). Penapisan awal komponen bioaktif dari kijing taiwan (, XI(0251), 119–133.
- Salmia, S. (2016). Analisis Kadar Flavonoid Total Ekstrak Kulit Batang Kedondong Bangkok (*Spondias dulcis*) dengan Metode Spektrofotometri UV-Vis. *Skripsi, Universitas Alauddin Makassar*, 48.
- Sandra Tri Juli Fendri, Verawati, Amilia Putri, S. F. (2022). Penentuan Kadar Fenolat Total dan Uji Aktivitas Antioksidan dari Ekstrak Non Polar, Semi Polar dan Polar Buah Rotan (*Calamus manan*), 14(1), 58–65.
- Setiawan, F., Yunita, O., & Kurniawan, A. (2018). Uji Aktivitas Antioksidan Ekstrak Etanol Kayu Secang (*Caesalpinia sappan*) Menggunakan Metode DPPH, ABTS, dan FRAP. *MPI (Media Pharmaceutica Indonesiana)*, 2(2), 82–89.
- Shahidi, F. (1997). Natural antioxidants : chemistry, health effects, and applications. *Champaign (Ill.): AOCS press*.
- Suharyanto, & Prima, D. A. N. (2020). Penetapan Kadar Flavonoid Total pada Daun Ubi Jalar Ungu (*Ipomoea batatas* L.) yang Berpotensi Sebagai Hepatoprotektor dengan Metode Spektrofotometri UV-Vis. *Cendekia Journal of Pharmacy*, 4(2), 110–119.
- Syafiq, A. F. (2022). Aktivitas Antioksidan In Vitro Infusa Bunga Pepaya Gantung (*Carica papaya* L.) dengan Metode DPPH (2, 2-diphenyl-1 picrylhidrazil).
- Tahir, M., Muflihunna, A., & Syafrianti, S. (2017). PENENTUAN KADAR FENOLIK TOTAL EKSTRAK ETANOL DAUN NILAM (*Pogostemon cablin* Benth.) DENGAN METODE SPEKTROFOTOMETRI UV-VIS. *Jurnal Fitofarmaka Indonesia*, 4(1), 215–218.
- Tri Saptari H, Triastinurmiatiningsih, Bina Lohita S., I. N. S. (2019). Kadar Fenolik

- dan Aktivitas Antioksidan Ekstrak Etanol Rumpun Laut Coklat (*Padina australis*). *Fitofarmaka*, 9, 1–8.
- Viranda, P. M. (2009). Pengujian Kandungan Tomat, (Jakarta. Fakultas Kedokteran. Universitas. Indonesia.).
- Wahidah, S. W., Fadhilah, K. N., Nahhar, H., Afifah, S. N., Sri, N., Farmasi, F., & Buana, U. (2017). Uji skrining fitokimia dari amilum familia zingiberaceae 1, (1996), 1–4.
- Widyasanti, A., Rohdiana, D., & Ekatama, N. (2016). Aktivitas Antioksidan Ekstrak Teh Putih (*Camellia sinensis*) dengan Metode DPPH (2,2 Difenil-1-Pikrilhidrazil). *Journal Fortech*, 1(1), 1–9.
- Wijayati, N., Rohmah, S. A., & Supartono, S. (2016). Sintesis Ester-C Sebagai Senyawa Antioksidan Menggunakan Biokatalis Enzim Lipase/Zeolit Alam. *Jurnal Kimia Riset*, 1(1), 7.
- Wootton-Beard, P.C., Moran, A., & Ryan, L. (2011). Stability of the total antioxidant capacity and total polyphenol content of 23 commercially available vegetable juices before and after in vitro digestion measured by FRAP, DPPH, ABTS and Folin-Ciocalteu methods. *Food Research International*, 44(1), 217–224.
- Yuslianti, E. R. (2019). Prinsip dasar pemeriksaan radikal bebas dan antioksidan. *Yogyakarta: Deepublish*.