

## **BAB IV**

### **HASIL DAN PEMBAHASAN**

#### **A. Hasil**

##### 1. Determinasi Tanaman

Determinasi tanaman bayam hijau telah dilakukan di Laboratorium Pembelajaran Biologi Fakultas Sains dan Teknologi Terapan Universitas Ahmad Dahlan Yogyakarta pada tanggal 2 Juni 2022 dengan nomor surat 210/Lab.Bio/B/VI/2022. Kriteria tanaman bayam hijau yang diambil untuk dilakukan determinasi yaitu bagian tanaman utuh yang terdiri dari daun, batang, dan akar. Hasil determinasi yang telah dilakukan menunjukkan bahwa tanaman bayam hijau yang digunakan pada penelitian ini adalah tanaman (*Amaranthus hybridus* L.) dari famili *Amaranthaceae* dengan hasil dapat dilihat pada (Lampiran 2).

##### 2. Penyiapan Simplisia

Sampel daun bayam hijau yang digunakan diambil pagi hari pukul 08.00-12.00 WIB sebanyak 3 kg pada bulan Juni 2022 dari petani di Desa Berdaya Candibinangun, Kecamatan Pakem, Kabupaten Sleman, Daerah Istimewa Yogyakarta. Pengambilan sampel pada waktu tersebut dikarenakan proses fotosintesis daun lebih optimal pada pagi hari dengan kondisi fisik yang lebih segar dan hijau atau dapat juga dipengaruhi oleh kadar senyawa aktif (fenolik) yang terkandung dalam sampel. Daun bayam hijau yang telah diperoleh sortasi basah untuk menghilangkan bagian yang tidak perlu/pengotor ataupun benda asing yang menempel pada daun dengan cara membuang bagian yang tidak layak digunakan. Lalu dicuci dengan air mengalir untuk menghilangkan pengotor yang menempel pada daun. Setelah itu, dikeringkan menggunakan oven pada suhu  $\pm 45^{\circ}\text{C}$  untuk memperoleh simplisia kering (ditandai dengan simplisia mudah hancur saat digenggam).

Simplisia yang telah kering, selanjutnya dilakukan penyerbukan dengan menggunakan *grinder* dan di ayak menggunakan ayakan 40 mesh. Ayakan 40 mesh adalah pemisahan partikel berdasarkan ukurannya.

Pengayakan bertujuan agar memperoleh ukuran partikel yang sama atau seragam dan juga untuk memperbesar kontak dengan pelarut pada proses penyarian saat melakukan ekstraksi dengan mempermudah penarikan senyawa aktif pada simplisia oleh pelarut yang digunakan.

### 3. Proses Ekstraksi

Pada proses ekstraksi serbuk daun bayam hijau digunakan metode maserasi dengan perbandingan (1:10). Sebanyak 250 gram serbuk dimasukan dalam toples maserasi dan direndam dengan pelarut metanol sebanyak 2,5 liter lalu disimpan pada tempat gelap (agar senyawa antioksidan tidak rusak) selama 72 jam sambil dilakukan pengadukan setiap 6 jam selama 5 menit untuk menarik senyawa menarik senyawa aktif yang terdapat pada simplisia sehingga diperoleh lebih hasil maserat. Hasil maserat yang diperoleh, kemudian dilakukan penyaringan dengan menggunakan kain *wori* dan dilapisi kertas saring, sisa residu selanjutnya diremaserasi selama 2 hari yang diberi pelarut metanol sebanyak 1,25 liter. Tujuan dari remaserasi untuk menarik kandungan senyawa dan meminimalisir terbuangnya zat-zat yang masih tertinggal pada maserasi pertama. Penelitian ini digunakan pemilihan metode maserasi karena metodenya sederhana, mudah dilakukan dan cocok untuk menarik senyawa fenolik yang tidak tahan panas. Hasil dari maserasi dan remaserasi kemudian di saring kembali dengan menggunakan pompa vakum agar filtrat yang diperoleh terbebas dari sisa-sisa serbuk yang masih tertinggal pada filtrat, selanjutnya filtrat yang diperoleh diuapkan dengan kompor listrik hingga didapatkan ekstrak pekat.

Hasil penguapan ekstrak pekat dapatkan sebesar 55,06 gram dengan nilai rendemen sebesar 22,024% telah memenuhi syarat nilai rendemen yang baik yaitu tidak kurang dari 9,7%. Rendeman ekstrak kental dihitung sebagai persentase perbandingan berat ekstrak kental yang diperoleh dari berat serbuk daun bayam hijau yang digunakan pada saat proses maserasi yaitu 250 gram. Perhitungan rendemen bertujuan untuk melihat keterkembalian serbuk daun bayam hijau sebelum dan sesudah ekstraksi.

#### 4. Uji Kelembapan

Uji kelembapan dilakukan untuk mengetahui kelembapan dari sampel yang akan diekstraksi menggunakan alat *moisturizer content balance* dan diperoleh hasilnya sebesar 5,70 % yang berarti nilai uji kelembapan telah sesuai dengan literatur yaitu tidak lebih dari 10 % Farmakope Herbal Indonesia tahun 2017. Nilai kelembapan yang tinggi maka dapat mempercepat pertumbuhan mikroba sehingga dapat merusak, memperpendek waktu simpan dan mempengaruhi kualitas simplisia.

#### 5. Uji Organoleptik

Uji organoleptik terhadap ekstrak dilakukan untuk memberikan pengenalan awal secara objektif menggunakan alat indera dengan mengamati tesktur/bentuk, warna, rasa, bau/aroma, dan dari ekstrak. Hasil uji organoleptik ekstrak dapat dilihat pada (Tabel 3).

**Tabel 3. Hasil Uji Organoleptik**

Uji Organoleptik	Hasil	Literatur (Moilati <i>et al.</i> , 2020)
Warna	Hijau tua pekat sampai kehitaman	Hijau kehitaman
Rasa	Pahit sedikit asam	Sedikit asam
Bau/aroma	Khas bayam	Khas bayam
Tekstur/bentuk	Kental, lengket	Kental

#### 6. Skrining Fitokimia

Pengujian skrining fitokimia dilakukan untuk mengetahui senyawa metabolit sekunder yang terkandung dalam daun bayam hijau seperti senyawa alkaloid, fenolik, flavonoid, saponin dan tanin. Hasil pengujian ekstrak metanol daun bayam hijau dapat dilihat pada (Tabel 4).

**Tabel 4. Skrining Fitokimia**

Identifikasi senyawa	Pereaksi	Hasil	Literatur (Kusmiati, 2012)
Alkaloid	Wagner	+	Coklat kemerahan
	Mayer	+	Endapan putih
	Dragendrof	+	Endapan jingga
Fenolik	FeCl <sub>3</sub>	+	Terbentuk warna hijau kehitaman
Flavonoid	HCl pekat	+	Terbentuk warna merah, orange atau kuning
Saponin	Aquadest	+	Adanya busa/buih
Tanin	FeCl <sub>3</sub>	+	Terbentuk warna hijau, biru kehitaman

Keterangan : (+) positif : mengandung senyawa

(-) negatif : tidak mengandung senyawa

## 7. Identifikasi Senyawa Fenolik Dengan KLT

Kromatografi Lapis Tipis (KLT) merupakan metode analisis kualitatif yang digunakan untuk mengidentifikasi ada atau tidak adanya senyawa penanda yang terkandung dalam ekstrak metanol daun bayam hijau. Pemilihan metode KLT ini karena merupakan metode yang mudah dilakukan, memerlukan waktu yang cepat, dan menggunakan peralatan yang murah dan sederhana. Penelitian ini, senyawa yang akan dideteksi adalah fenolik dengan ditunjukkan pada data berupa bercak/noda dan nilai  $R_f$  (*Reterdation factor*) pada sampel daun bayam hijau dan standar kuersetin.

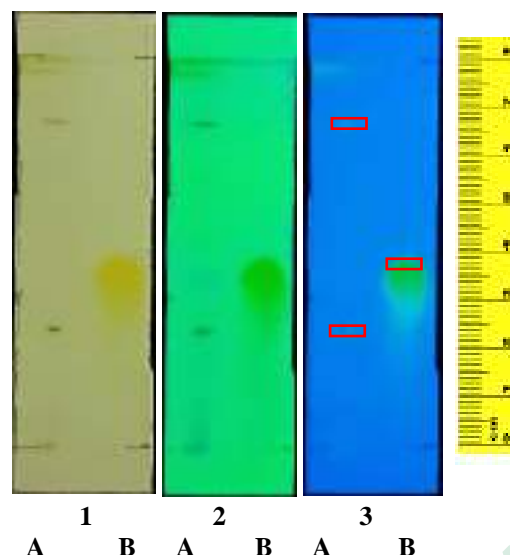
Pengujian KLT menggunakan fase gerak, *chamber*/bejana dan fase diam. Fase gerak campuran dari beberapa pelarut berdasarkan tingkat kelarutannya, sedangkan *chamber*/bejana adalah tempat elusi berlangsung, serta fase diam yaitu berupa plastik, *aluminium foil* atau kaca yang dilapisi adsorben silika aluminium oksida dan selulosa. Fase diam yang digunakan berupa plat silika gel GF<sub>254</sub> yang bersifat polar, plat silika dibuat dengan panjang 10 cm dan lebar  $\pm 2$  cm yang telah diberi garis bagian atas dan bawah 1 cm agar mempermudah penotolan dan mengetahui jarak pelarut yang ditempuh sehingga mempermudah dalam penotolan. Pengujian KLT terlebih dahulu dilakukan optimasi fase (Tabel 5) yang bertujuan untuk menentukan fase gerak mana yang dapat digunakan untuk memisahkan senyawa dalam sampel.

**Tabel 5. Optimasi Fase Gerak pada Uji KLT**

No	Fase Gerak	Hasil
1	n-butanol : asam asetat : aquadest (4 : 1 : 5 v/v/v)	Fase gerak naik, sampel terelusi tetapi kuersetin tidak terelusi
2	metanol : kloroform (9 : 1 v/v)	Fase gerak naik, sampel terelusi tetapi noda tidak terlihat jelas dan kuersetin tailing
3	metanol : kloroform : n-heksan (1 : 9 : 1 v/v/v)	Fase gerak naik, terjadi pemisahan sampel dan kuersetin yang terelusi dengan baik dan didapatkan bercak noda

Dari beberapa optimasi fase gerak yang telah dilakukan pada uji KLT didapatkan hasil yang paling optimal yaitu terdapat pada fase gerak metanol : kloroform : n-heksan dengan perbandingan 1 mL : 9 mL : 1 mL. Pengujian KLT dilakukan dengan bejana dijenuhkan terlebih dahulu dengan fase gerak (eluen). Penjenuhan bejana dengan fase gerak bertujuan agar seluruh permukaan didalam bejana homogen terisi uap eluen sehingga rambatan yang dihasilkan oleh silika gel baik dan beraturan. Bejana KLT lalu diisi dengan fase gerak dan ditunggu hingga jenuh tujuannya fase gerak dijenuhkan untuk menyamakan tekanan uap dari fase gerak. Fase gerak yang telah jenuh ditandai dengan eluen yang merambat keluar melalui kertas saring pada proses elusi, dimana silika gel akan mengabsorpsi fase gerak.

Bejana yang telah jenuh, kemudian dimasukkan plat KLT yang sudah ditotolkan ekstrak daun bayam hijau dan standar kuersetin menggunakan *white tip* dengan konsentrasi ekstrak 50.000 ppm (50 mg/1 mL) dan standar 2.000 ppm (2 mg/ 1 mL), ditunggu  $\pm$  20 menit atau hingga fase gerak mencapai batas, lalu plat diangkat dan dikeringkan dengan cara diangin-anginkan. Hasil penotolan dibaca pada sinar UV dengan panjang gelombang 254 nm dan 366 nm diamati bercak noda setelah disemprot dengan  $AlCl_3$ , penyemprotan pereaksi kompleks  $AlCl_3$  akan membentuk senyawa kompleks dengan standar kuersetin yang menghasilkan bercak noda warna kuning yang lebih jelas pada standar kuersetin dan ekstrak (Guntarti & Ruliyani, 2020). Hasil eluen yang baik adalah yang bisa memisahkan senyawa dalam jumlah yang banyak yang ditandai dengan munculnya noda. Syarat noda yang ialah bentuk noda yang tidak berekor dan jarak noda satu dengan lainnya terlihat jelas. Hasil optimasi (Tabel 5) dengan profil KLT (Gambar 10) diperoleh hasil elusi yang paling optimal dengan fase gerak berupa metanol : kloroform : n-heksan (1 :9 :1 v/v/v).



**Gambar 10.** Profil KLT Ekstrak Metanol Daun Bayam Hijau (*Amaranthus hybridus* L.)  
Keterangan: 1. Deteksi dengan sinar UV visibel/tampak; 2. Deteksi dengan sinar UV 254; 3. Deteksi dengan sinar UV 366. A) Ekstrak metanol daun bayam hijau; B) Standar kuersetin. Fase diam silika gel GF<sub>254</sub> ; Fase gerak = metanol : Kloroform : n-heksan (1 : 9 : 1 v/v/v)

Hasil nilai Rf standar kuersetin dan ekstrak metanol daun bayam hijau dapat dilihat pada (Tabel 6).

**Tabel 6. Nilai Rf Standar Kuersetin dan Ekstrak**

Standar		Ekstrak		Literatur
Spot (noda)	Rf	Spot (noda)	Rf	Gwatidzo <i>et al.</i> , (2018) Nilai Rf
1	0,475	1	0,35	0,63-0,81
		2	0,837	

## 8. Penetapan Kadar Fenolik Total Ekstrak Daun Bayam Hijau

### a. Penentuan Panjang Gelombang Maksimum (nm)

Penentuan panjang gelombang maksimum adalah pengukuran yang dapat memberikan nilai serapan absorbansi maksimum pada suatu larutan. Hasil penentuan panjang gelombang maksimum fenolik yang dibuat dengan konsentrasi 30 ppm dengan cara melakukan *scanning* panjang gelombang pada rentang 600-800 nm diperoleh hasilnya yaitu 748 nm dapat dilihat pada (Lampiran 12).

### b. Penentuan *Operating Time* (OT)

Penentuan OT dilakukan dengan di *scanning* pada waktu 0-2 jam dengan selang waktu 2 menit selama 2 jam. OT bertujuan untuk menentukan waktu pengukuran suatu larutan saat sudah selesai bereaksi

yang ditandai dengan nilai absorbansi yang stabil, sehingga mendapatkan hasil pengukuran lebih maksimal. Hasil *operating time* fenolik yang diperoleh yaitu 60 menit dapat dilihat pada (Lampiran 13).

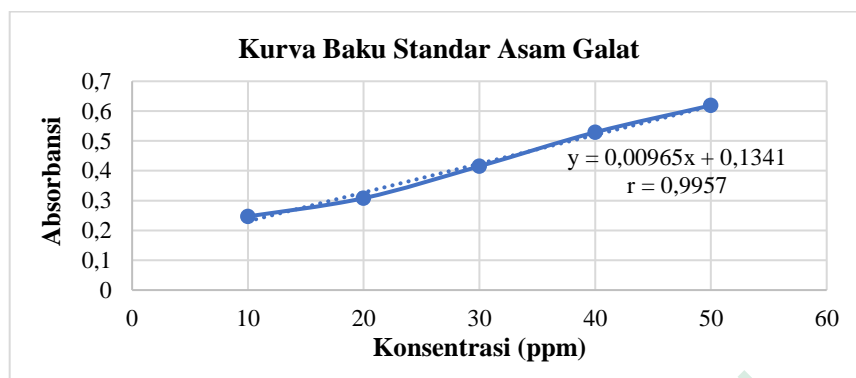
c. Penetapan Kurva Baku Standar Asam Galat

Kurva baku standar yang digunakan untuk penentuan kadar fenolik dalam penelitian ini adalah standar asam galat karena merupakan salah satu antioksidan alami yang stabil dan relatif murah serta termasuk dalam senyawa fenolik. Penetapan kurva baku standar bertujuan untuk mengetahui hubungan antara konsentrasi asam galat yaitu 10, 20, 30, 40, 50 ppm dengan nilai absorbansinya, dengan data absorbansi kurva baku standar asam galat dapat dilihat pada (Tabel 7). Hasil yang diperoleh dari hubungan antara konsentrasi asam galat (nilai x) dengan absorbansi (nilai y) ditentukan sebagai nilai kadar sampel dalam penelitian ini.

Pada data kurva baku (Gambar 11) dengan persamaan regresi linearnya adalah  $y = 0,00965x + 0,1341$  dan nilai  $r$  (koefisien korelasi) yang mendekati satu menunjukkan bahwa terdapat korelasi yang baik antara kadar asam galat dan absorbansi dengan nilai  $r$  sebesar 0,9957. Hasil dari persamaan regresi linier yang diperoleh tersebut kemudian akan digunakan untuk menghitung nilai kadar total fenolik yang terkandung dalam ekstrak metanol daun bayam hijau.

**Tabel 7. Data Absorbansi Kurva Baku Standar Asam galat**

Konsentrasi (ppm)	Absorbansi			Rata-rata $\pm$ SD
	Replikasi			
	1	2	3	
10	0,282	0,248	0,211	0,247 $\pm$ 0,0355
20	0,312	0,310	0,302	0,308 $\pm$ 0,0052
30	0,427	0,418	0,401	0,415 $\pm$ 0,0132
40	0,544	0,536	0,507	0,529 $\pm$ 0,0194
50	0,627	0,620	0,612	0,619 $\pm$ 0,0075



**Gambar 11. Kurva Hubungan Antara Konsentrasi Asam Galat (ppm) Dengan Absorbansi**

d. Penetapan Kadar Fenolik Total

Penetapan kadar fenolik total dihitung dari persamaan regresi linear kurva baku diatas dengan dimasukkan nilai absorbansi sampel yang telah didapatkan kedalam persamaan diatas dan kemudian dihitung persen kadar totalnya. Hasil kadar fenolik total ekstrak metanol daun bayam hijau diperoleh nilai yaitu sebesar  $1,150 \pm 0,025$  dapat dilihat dalam (Tabel 8). Penetapan kadar fenolik total dilakukan 3 kali replikasi dengan tujuan untuk melihat kedekatan hasil pengujian antara sampel satu dan lainnya dengan konsentrasi yang sama.

**Tabel 8. Hasil Penetapan Kadar Fenolik Total**

Sampel	Absorbansi	Kadar terhitung (mg/mL)	Kadar fenolik total (% b/b)
Ekstrak metanol daun bayam hijau	0,300	0,045	$1,150 \pm 0,025$
	0,309	0,046	
	0,326	0,047	

9. Hasil Uji Peredaman Radikal Bebas

Pengujian peredaman radikal bebas ekstrak metanol daun bayam hijau dilakukan uji secara kuantitatif untuk menghitung nilai  $IC_{50}$  dengan menggunakan metode peredaman radikal bebas DPPH (*1,1-Difenil-2-Pikrilhidrazil*) dan digunakan vitamin C sebagai standar pembanding.

a. Penentuan Panjang Gelombang Maksimum dan *Operating Time* DPPH

Penentuan panjang gelombang maksimum dilakukan untuk mengetahui nilai serapan yang dapat menghasilkan nilai absorbansi optimal larutan DPPH pada spektrofotometer dengan panjang gelombang



400-600 nm. Serapan tertinggi merupakan panjang gelombang maksimum didapat dari nilai absorbansi yang stabil dan hasil panjang gelombang maksimum yang diperoleh yakni 516 nm (Lampiran 10). *Operating time* dilakukan dengan rentang waktu 0 hingga 40 menit untuk menentukan waktu pengukuran suatu larutan pada saat sudah selesai bereaksi yang ditandai dengan nilai absorbansi yang stabil. Pengukuran dilakukan dengan menambahkan 4.000  $\mu\text{L}$  larutan DPPH ke dalam 50  $\mu\text{L}$  vitamin C dan diukur menggunakan spektrofotometer UV-Vis pada panjang gelombang 516 nm. Penentuan *operating time* dilihat dari nilai absorbansi yang stabil sehingga diperoleh hasil dari nilai yang stabil yaitu pada menit ke-20 (Lampiran 11).

b. Presisi Standar Vitamin C

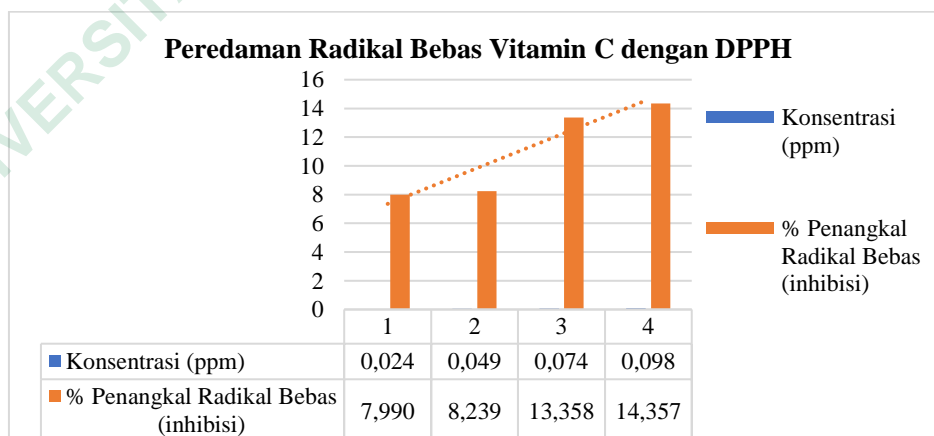
Presisi adalah ukuran kedekatan antara hasil pengujian yang satu dengan yang lainnya dalam rangkaian pengujian yang berulang pada konsentrasi yang sama. Uji presisi dilakukan dengan diambil 4 mL larutan vitamin C (konsentrasi 8 ppm) lalu di ad dengan metanol *p.a* dalam labu ukur 5 mL dan diukur absorbansinya pada panjang gelombang 516 nm. Dilakukan 6 kali replikasi dengan tujuan untuk melihat kedekatan hasil pengujian antara sampel satu dan lainnya dengan data dapat dilihat pada (Tabel 9). Hasil uji presisi vitamin C dinyatakan dalam nilai RSD (*Relative Standar Deviantion*) sebesar 1,834% telah memenuhi syarat yang baik yaitu  $\leq 2\%$ .

**Tabel 9. Data Presisi Vitamin C Konsentrasi 8 ppm**

Sampel	Absorbansi
Blanko	0,674
Presisi Standar (1)	0,663
Presisi Standar (2)	0,659
Presisi Standar (3)	0,658
Presisi Standar (4)	0,648
Presisi Standar (5)	0,640
Presisi Standar (6)	0,637

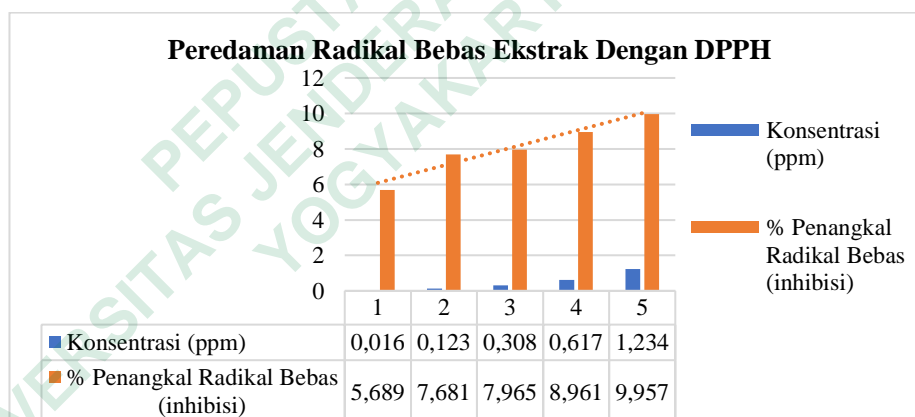
c. Pengujian Antioksidan Vitamin C dan Ekstrak Metanol Daun Bayam Hijau

Pengujian DPPH konsentrasi 0,1 mM dengan menimbang DPPH sebanyak 3,9 mg dan di ad dengan metanol *p.a* dalam labu ukur 100 mL. Uji peredaman radikal bebas pada ekstrak metanol daun bayam hijau, menggunakan pembanding berupa vitamin C. Pembuatan larutan induk (pembanding) 10 ppm dengan menimbang Vitamin C 1 mg, ditambahkan metanol *p.a* ad dengan metanol *p.a* dalam labu ukur 100 mL dan dibuat larutan seri dengan konsentrasi 2 ppm, 4 ppm, 6 ppm dan 8 ppm (Lampiran 6). Pengujian dilakukan dengan mengambil larutan vitamin C 50  $\mu$ L dari masing-masing konsentrasi dan ditambahkan 4.000  $\mu$ L DPPH yang ditampung menggunakan tabung reaksi dan ditutup menggunakan aluminium foil agar terhindar dari cahaya kemudian didiamkan selama *operating time* 20 menit yang bertujuan agar senyawa antioksidan dan radikal bebas dapat bereaksi secara optimal, kemudian diukur absorbansi menggunakan spektrofotometer UV-Vis dengan panjang gelombang 516 nm. Data peredaman radikal bebas vitamin C dengan DPPH dilihat pada (Lampiran 7) dan hasil grafik peredaman radikal bebas vitamin C dengan DPPH dapat dilihat pada (Gambar 12).



**Gambar 12. Grafik Peredaman Radikal Bebas Vitamin C dengan DPPH**

Sedangkan untuk pengujian ekstrak metanol daun bayam hijau dibuat larutan induk konsentrasi 500 ppm dengan menimbang 5 mg ekstrak daun bayam hijau dan dilarutkan menggunakan metanol *p.a* ad 10 mL dan larutan ekstrak dibuat variasi konsentrasi 5, 10, 25, 50, dan 100 ppm. Pengujian Sampel dan DPPH dilakukan dengan diambil sebanyak 50  $\mu$ L dimasukan kedalam tabung reaksi dan ditambahkan 4.000  $\mu$ L DPPH dan ditutup menggunakan aluminium foil agar terhindar dari cahaya kemudian didiamkan selama 20 menit waktu OT, bertujuan agar senyawa antioksidan dan radikal bebas dapat bereaksi secara optimal, kemudian diukur absorbansi menggunakan spektrofotometer UV-Vis dengan panjang gelombang 516 nm. Data peredaman radikal bebas ekstrak metanol daun bayam hijau dengan DPPH dilihat pada (Lampiran 7) dan hasil grafik peredaman radikal bebas ekstrak metanol daun bayam hijau dengan DPPH dapat dilihat pada (Gambar 13).



**Gambar 13. Grafik Peredaman Radikal Bebas Ekstrak Metanol Daun Bayam Hijau Dengan DPPH**

Hasil uji aktivitas peredaman radikal bebas dihirung nilai  $IC_{50}$  berdasarkan, nilai absorbansi sampel yang telah didapatkan dihitung persentase inhibisinya kedalam persamaan absorbansi DPPH blanko dikurangi absorbansi sampel dibagi absorbansi sampel dikali 100%. Hasil % inhibisi yang diperoleh dibuat persamaan regresi linier yang menghubungkan antara % inhibisi dengan konsentrasi dari sampel. Hasil perhitungan dari sampel dan standar vitamin C dapat dilihat pada tabel

diatas. Dari kedua tabel tersebut memiliki persentasi aktivitas yang sangat kuat sehingga dapat disimpulkan bahwa sampel yang diteliti mengandung nilai  $IC_{50}$  yang dapat meredam 50% dari total radikal bebas DPPH.

#### 10. Analisis Data Statistik Antioksidan

Analisis data antioksidan diuji secara statistik menggunakan *software SPSS* untuk nilai  $IC_{50}$  yang diperoleh dari ekstrak metanol daun bayam hijau dan vitamin C. Analisis dengan perangkat lunak *SPSS* digunakan untuk menentukan data yang diperoleh dari distribusi normal dengan menggunakan beberapa uji, termasuk uji normalitas dan homogenitas. Uji normalitas *Shapiro-Wilk* ini sudah sering diaplikasikan dalam analisis regresi untuk pemeriksaan asumsi normal, dengan mengidentifikasi suatu data (variabel random) terdistribusi normal atau tidak, dan uji homogenitas *Levene's test* digunakan untuk melihat seberapa besar varians antara dua data atau lebih yang berbeda memiliki indikasi homogen atau tidak. Berdasarkan uji normalitas *Shapiro-Wilk*, vitamin C memberikan hasil 0,537 dan ekstrak metanol daun bayam 0,770, nilai  $IC_{50}$  kedua pengujian dinyatakan normal dengan nilai signifikan ( $p > 0,05$ ). Hasil uji homogenitas menggunakan *Levene's test* diperoleh nilai 0,078 yang menunjukkan bahwa data homogen dan nilai signifikan ( $p > 0,05$ ) dapat dilihat pada (Lampiran 7). Lalu dilakukan uji *t-test Independent* untuk mengetahui perbedaan antara sampel ekstrak metanol daun bayam hijau dan standar vitamin C. Hasil uji *t-test Independent* diperoleh nilai sebesar 0,014 yang menunjukkan bahwa aktivitas peredaman radikal bebas antara ekstrak metanol daun bayam hijau dan vitamin C standar berbeda secara nyata atau signifikan ( $p < 0,05$ ).

## B. Pembahasan

Penelitian ini termasuk jenis penelitian yang bersifat eksperimental yang bertujuan untuk mengetahui kadar fenolik total dan peredaman radikal bebas bebas ekstrak metanol daun bayam hijau (*Amaranthus hybridus* L.) dengan DPPH (*1,1-Difenil-2-Pikrilhidrazil*). Hal pertama yang dilakukan dalam penelitian ini yaitu pengujian determinasi tanaman bayam hijau yang bertujuan untuk mengetahui kebenaran identitas yang jelas dari tanaman dan menghindari kesalahan pada saat pengumpulan bahan utama yang akan diteliti. Berdasarkan hasil determinasi (Lampiran 2) dibuktikan bahwa tanaman yang digunakan dalam penelitian adalah benar tanaman (*Amaranthus hybridus* L.) dari famili *Amaranthaceae*, bagian yang diteliti pada saat determinasi adalah tanaman utuh yang terdiri dari daun, batang, dan akar.

Hal kedua adalah pengambilan sampel daun bayam hijau yang diambil pagi hari pukul 08.00-12.00 WIB sebanyak 3 kg dari petani di Desa Berdaya Candibinangun, Kecamatan Pakem, Kabupaten Sleman, Daerah Istimewa Yogyakarta pada bulan Juni 2022. Pengambilan sampel pada waktu tersebut dikarenakan proses fotosintesis daun lebih optimal pada pagi hari dengan kondisi fisik yang lebih segar dan hijau atau dapat juga dipengaruhi oleh kadar senyawa aktif (fenolik) yang terkandung dalam sampel (Dwinatari & Murti, (2015). Daun bayam hijau yang telah diperoleh lalu dicuci dengan air mengalir untuk menghilangkan pengotor yang menempel pada daun dan bagian yang tidak layak digunakan. Sampel yang telah dicuci bersih kemudian dikeringkan menggunakan oven pada suhu  $\pm 45^{\circ}\text{C}$ . Alasan penggunaan suhu  $45^{\circ}\text{C}$  karena zat aktif (fenolik) dari sampel daun bayam hijau dapat bertahan pada suhu tersebut. Simplisia kering (ditandai dengan simplisia mudah hancur saat digenggam), pengeringan bertujuan untuk mengurangi kadar air sampel sehingga dapat mencegah terjadinya reaksi enzimatik yang dapat menyebabkan penguraian kandungan kimia pada daun bayam hijau yang digunakan (Kusnadi & Devi, 2017). Selanjutnya dilakukan penyerbukan dengan menggunakan *grinder* dan di ayak menggunakan ayakan 40 mesh. Pengayakan bertujuan agar memperoleh ukuran partikel yang sama atau

seragam dan juga untuk memperbesar kontak dengan pelarut pada proses penyerian saat melakukan ekstraksi dan mempermudah penarikan senyawa aktif pada simplisia oleh pelarut yang digunakan (Diniatik, 2015).

Hal ketiga dilakukan ekstraksi pembuatan ekstrak metanol daun bayam hijau dengan metode penyarian yang digunakan adalah maserasi. Maserasi merupakan metode yang sederhana, murah, dan mudah dilakukan. Maserasi dilakukan dengan cara merendam serbuk simplisia dalam cairan penyari dan untuk meningkatkan efektifitas ekstraksi dilakukan pengadukan dan remaserasi. Cairan penyari yang digunakan yaitu metanol teknis karena pelarut yang bersifat netral, tidak beracun, selektif, dan mampu menarik senyawa fenolik yang terdapat dalam sampel. Sari yang diperoleh dari meserasi kemudian dilakukan penguapan hingga didapatkan ekstrak kental, penguapan bertujuan untuk menghilangkan atau mengurangi larutan penyari agar tidak mempengaruhi pengujian berikutnya (Diniatik, 2015). Ekstrak kental yang didapat dari hasil penguapan lalu dihitung nilai rendemen didapatkan hasil sebesar 22,024% dengan nilai rendemen yang baik ekstrak daun bayam Menurut Farmakope Herbal Indonesia tahun 2017 tidak kurang dari 9,7%. Lalu dilakukan uji organoleptik hasil yang diperoleh yaitu warna hijau tua pekat sampai kehitaman, rasa pahit sedikit asam, bau/aroma khas bayam dan memiliki tekstur/bentuk kental yang lengket. Pada hasil pengamatan yang dilakukan didapatkan bahwa hasil uji organoleptik sesuai dengan penelitian yang dilakukan oleh Moilati *et al.*, (2020).

Uji kelembapan dilakukan untuk mengetahui kelembapan dari sampel yang akan diekstraksi dengan menggunakan alat *moisturizer content balance* dan diperoleh hasilnya sebesar 5,70% yang berarti nilai uji kelembapan telah sesuai dengan literatur yaitu tidak lebih dari 10 % Farmakope Herbal Indonesia tahun 2017. Jika nilai kelembapan tinggi maka dapat mempercepat pertumbuhan mikroba sehingga dapat merusak, memperpendek waktu simpan dan mempengaruhi kualitas simplisia (Trinovita, Y *et al.*, 2019).

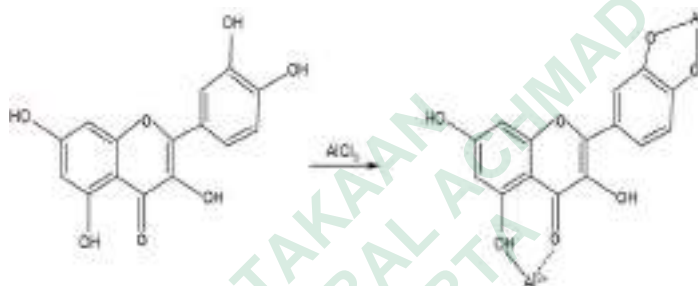
Hal keempat adalah pengujian skrining fitokimia dengan dilakukan pemeriksaan kandungan senyawa kimia yang dianalisis secara kualitatif untuk mengetahui golongan senyawa metabolit sekunder yang terkandung dalam suatu

tumbuhan dan juga mengetahui ada tidaknya komponen senyawa bioaktif yang terkandung dalam ekstrak metanol daun bayam hijau (Hilma *et al.*, 2017). Pengujian skrining fitokimia didapatkan ekstrak metanol daun bayam hijau positif mengandung senyawa alkaloid, fenolik, flavonoid, saponin dan tanin yang telah sesuai dengan literatur (Kusmiati, 2012). Alkaloid merupakan senyawa metabolit sekunder yang bersifat basa dan mengandung atom nitrogen yang mempunyai pasangan elektron bebas sehingga dapat membentuk ikatan kovalen koordinat dengan ion logam. Pada uji alkaloid didapatkan hasil positif pada uji *mayer*, *wagner*, dan *dargendorff*. Uji *mayer* menunjukkan adanya endapan putih yang menandakan positif mengandung senyawa alkaloid, uji *wagner* positif terbentuk warna coklat kemerahan, dimana atom nitrogen pada alkaloid akan bereaksi dengan ion logam  $K^+$  dari kalium tetraiodomercurat (II) membentuk kompleks kalium-alkaloid yang mengendap. Uji *dargendorff* positif terbentuknya endapan jingga, dimana endapan tersebut adalah kalium alkaloid dimana atom nitrogen digunakan untuk membentuk ikatan kovalen koordinat dengan  $K^+$  yang merupakan ion logam (Hilma *et al.*, 2017). Pengujian senyawa fenolik dan tanin dilakukan dengan menambahkan pereaksi besi (III) klorida ( $FeCl_3$ ) dengan hasil positif terbentuknya warna biru tua, biru kehitaman atau hitam kehijauan. Perubahan warna terjadi karena terbentuk ikatan kovalen koordinasi antara ion besi (III) dengan gugus hidroksil yang ada pada senyawa tersebut. Flavonoid merupakan senyawa polar yang memiliki banyak gugus hidroksil, pada identifikasi flavonoid serbuk magnesium + HCl pekat yang akan membentuk gelembung-gelembung dihidrogen ( $H_2$ ). Penambahan HCl pekat, akan menghidrolisis flavonoid glikosida menjadi aglikon yang kemudian membentuk kompleks dengan magnesium terbentuk warna merah, jingga atau kuning. Saponin merupakan senyawa yang bersifat polar sehingga dapat larut dengan air. Saponin juga memiliki gugus non polar yaitu terpenoid/steroid. Senyawa yang memiliki gugus polar dan non polar dapat bersifat aktif dipermukaan sehingga dengan pengocokan menggunakan air (suatu agregat dari molekul surfaktan yang terdispersi dalam suatu koloid cair) dan larutan koloidal yang akan tampak seperti buih (Handayani *et al.*, 2020).

Identifikasi kandungan senyawa fenolik ekstrak metanol daun bayam hijau menggunakan metode KLT. Pemilihan metode KLT dikarenakan analisis pemisahan yang sederhana, memerlukan waktu yang cepat, mudah mengerjakannya, dan menggunakan peralatan yang relatif murah (Dewi *et al.*, 2015). Prinsip kerja KLT yaitu didasarkan pada pemisahan komponen kimia yang ditentukan oleh fase gerak dan fase diam. Fase gerak digunakan dari beberapa campuran pelarut berdasarkan tingkat kelarutannya dengan dilakukan optimasi terlebih dahulu untuk menentukan fase gerak mana yang dapat memisahkan senyawa dalam sampel. Optimasi bertujuan untuk menentukan fase gerak mana yang mampu memisahkan senyawa pada sampel, dengan fase gerak n-butanol : asam asetat : aquadest (4: 1: 5 v/v/v) diperoleh fase gerak naik, sampel terelusi tetapi kuersetin tidak terelusi. Optimasi dengan fase gerak metanol : kloroform (9 : 1) didapatkan hasil fase geraknya naik, sampel terelusi tetapi noda ekstrak tidak terlihat jelas dan kuesetin tailing (membentuk seperti ekor). Hasil optimasi fase gerak yang telah dilakukan didapatkan hasil yang paling optimal pada fase metanol : kloroform : n-heksan (1: 9: 1 v/v/v ). Hal ini sesuai dengan penelitian Gwatidzo *et al.*, (2018) dengan hasil fase geraknya naik, terjadi pemisahan sampel dan kuersetin yang terelusi dengan baik dan didapatkan bercak noda. Fase gerak digunakan dimana metanol bersifat polar, sedangkan kloroform dan n-heksan bersifat nonpolar dan fase diam digunakan silika gel GF<sub>254</sub> (*Gypsum fluoresens* 254) yaitu berupa plastik, *aluminium foil* atau kaca yang dilapisi adsorben silika aluminium oksida dan selulosa yang bersifat polar. Uji KLT terlebih dahulu dilakukan penjenjuran bejana dengan fase gerak (eluen). Penjenjuran bejana dengan fase gerak bertujuan agar seluruh permukaan didalam bejana homogen terisi uap eluen sehingga rambatan yang dihasilkan oleh silika gel baik dan beraturan. Bejana yang diisi fase gerak, diketahui telah jenuh dengan cara diberi kertas saring yang ditandai dengan eluen yang merambat keluar melalui kertas saring pada proses elusi, dimana silika gel akan mengabsorpsi fase gerak. Bejana yang telah jenuh, selanjutnya dimasukkan plat KLT yang sudah ditotolkan ekstrak daun bayam hijau dan standar kuersetin menggunakan *white tip* dengan konsentrasi ekstrak 50.000 ppm (50 mg/1 mL) dan standar 2.000 ppm (2 mg/ 1 mL), ditunggu



hingga fase gerak mencapai batas, lalu plat diangkat dan dikeringkan dengan cara diangin-anginkan. Dibaca hasil penotolan sinar UV dengan panjang gelombang 254 nm dan 366 nm diamati bercak noda setelah disemprot dengan  $\text{AlCl}_3$ , penyemprotan pereaksi kompleks  $\text{AlCl}_3$  akan membentuk senyawa kompleks dengan standar kuersetin yang menghasilkan bercak noda warna kuning yang lebih jelas pada standar kuersetin dan ekstrak. Kuersetin merupakan salah satu senyawa fenolik yang termasuk dalam golongan flavonoid yang dapat bereaksi dengan  $\text{AlCl}_3$ , reaksi antara kuersetin dan  $\text{AlCl}_3$  dapat dilihat pada (Gambar 14) (Guntarti & Ruliyani, 2020).



**Gambar 14. Reaksi Kuersetin dengan  $\text{AlCl}_3$**

Sumber: Dokumen pribadi berdasarkan jurnal *Farmasi Sains dan Praktis* (Guntarti & Ruliyani, 2020)

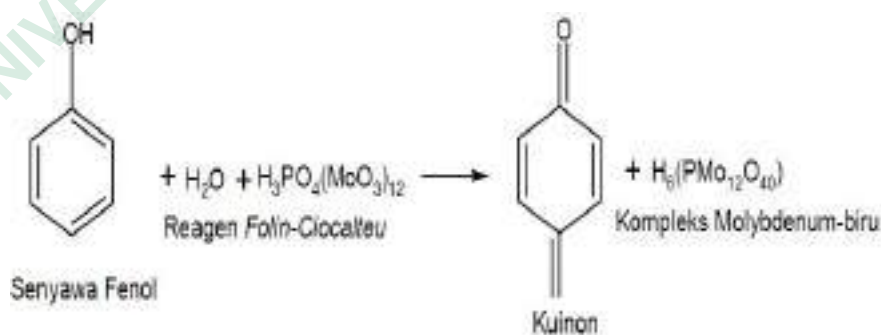
Pengamatan pada sinar UV 254 nm dan 366 nm akan menghasilkan bercak noda yang berpendar dengan latar belakang gelap, sehingga noda yang berpendar (berfluoresensi) dapat dilihat secara visual. Hal ini disebabkan oleh adanya interaksi antara sinar UV dengan gugus kromofor yang terikat oleh ausokrom pada bercak noda. Fluoresensi yang tampak terlihat merupakan hasil emisi cahaya yang dipancarkan oleh komponen tersebut, ketika elektron tereksitasi dari tingkat dasar ke tingkat energi yang lebih tinggi dan kemudian akan kembali semula dengan melepaskan energi (Karima *et al.*, 2019). Pereaksi semprot  $\text{AlCl}_3$  digunakan untuk mendeteksi bercak/noda yang lebih jelas pada ekstrak metanol daun bayam hijau dan standar kuersetin. Penggunaan kuersetin sebagai standar dalam uji KLT dikarenakan kuersetin adalah senyawa flavonoid golongan flavonol yang paling banyak terdapat dalam tumbuhan dan memiliki aktivitas antioksidan dengan manangkal radikal bebas cukup baik (Laksmiani *et al.*, 2020). Hasil nilai Rf diperoleh standar kuersetin 0,475, dan ekstrak metanol daun bayam hijau didapat 2 spot yaitu 0,35 dan 0,837 diduga kemungkinan ada banyak kandungan senyawa

fenolik golongan lain yang terdapat didalam ekstrak metanol daun bayam hijau seperti senyawa tanin, lignin, fenil propanoid dan kuinon (Tahir *et al.*, 2017), tetapi kebutulan yang terelusi cukup baik pada saat pengujian KLT ini adalah spot 2 dengan nilai Rf 0,837 yang berarti ekstrak metanol daun bayam hijau positif memiliki senyawa flavonoid yang di buktikan dalam penelitian Gwatidzo *et al.*, (2018) dengan menggunakan pelarut yang sama memiliki nilai Rf yang hampir mirip yaitu 0,81. Menurut Dewi *et al.*, (2015) nilai Rf yang baik berkisaran antara 0,2-0,8. Nilai Rf dapat dipengaruhi oleh kejenuhan bejana/chamber, jumlah totalan sampel yang digunakan, suhu, dan struktur senyawa yang dipisahkan. Hasil uji KLT tersebut didapatkan spot yang terlihat jelas antara ekstrak dan standar pada ekstrak menunjukkan adanya bercak berwarna kuning kehijaun dan standar kuersetin yang berwarna kuning. Eluen yang baik adalah yang bisa memisahkan senyawa dalam jumlah yang banyak yang ditandai dengan munculnya noda dengan syarat noda yang ialah bentuk noda yang tidak berekor dan jarak noda satu dengan lainnya terlihat jelas (Kusnadi & Devi, 2017).

Penentuan kadar fenolik total ekstrak metanol daun bayam hijau dianalisis secara kuantitatif dengan metode *Folin-Ciocalteu*. Hal ini didasarkan pada metode (Chun *et al.*, 2003) dalam (Djuleng A *et al.*, 2021) menggunakan asam galat sebagai standar. Metode *Folin-Ciocalteu* adalah metode yang paling umum dengan pengerjaan yang sederhana digunakan untuk menentukan kandungan kadar fenolik total pada tanaman. Prinsip metode *Folin-Ciocalteu* mengoksidasi fenolat (garam alkali) atau gugus fenolik-hidroksi, lalu mereduksi asam heteropoli (*fosfomolibdat-fosfotungstat*) membentuk suatu kompleks *molibdenum-tungsten*. Senyawa fenolik atau ion fenolat yang bereaksi dengan reagen *Folin-Ciocalteu* dalam suasana basa dapat terjadi disosiasi proton (Gambar 15), untuk membuat suasana basa maka digunakan natrium bikarbonat 7%. Gugus hidroksil pada senyawa fenolik yang bereaksi dengan reagen *Folin-Ciocalteu* membentuk kompleks *molibdenumtungsten* berwarna biru yang dapat dideteksi dengan spektrofotometer visibel. Semakin besar konsentrasi senyawa fenolik maka semakin banyak ion fenolat yang akan mereduksi asam heteropoli (*fosfomolibdat-*

*fosfotungstat*) menjadi kompleks *molibdenum-tungsten* sehingga warna biru yang dihasilkan semakin pekat (Sari *et al.*, 2020).

Pada penelitian ini, asam galat digunakan sebagai standar untuk menentukan kandungan fenolik total karena asam galat merupakan senyawa fenolik stabil alami dan senyawa fenolik yang berasal dari asam fenolat sederhana asam hidroksibenzoat. Asam galat bereaksi dengan reagen *Folin-Ciocalteu* untuk menghasilkan warna hijau kehitaman dalam kondisi basa, menunjukkan hasil positif atau mengandung fenol. Reaksi senyawa fenolik berlangsung dalam kondisi basa, terjadi disosiasi proton menjadi ion fenol. Larutan basa yang digunakan untuk penentuan total fenol adalah larutan natrium karbonat ( $\text{NaCO}_3$ ). Asam galat bereaksi dengan *Folin-Ciocalteu* menghasilkan warna kuning yang menunjukkan bahwa sampel mengandung fenol. Kemudian ditambahkan larutan  $\text{Na}_2\text{CO}_3$  sebagai zat basa. Selama reaksi berlangsung, gugus hidroksil dari senyawa fenolik bereaksi dengan pereaksi *Folin-Ciocalteu* membentuk kompleks *molibdenum-tungsten* biru yang dapat dideteksi dengan spektrofotometri UV-Vis. Warna biru yang terbentuk lebih pekat tergantung pada konsentrasi ion fenolik yang terbentuk, sehingga semakin tinggi konsentrasi senyawa fenolik maka semakin banyak ion fenolik yang akan membentuk asam heteropoli (asam *fosfomolibdat-fosfotungstat*) menjadi kompleks molibdenum tungsten sehingga akan direduksi menjadi warna biru yang lebih pekat. Gambar 15 menunjukkan reaksi senyawa fenol dengan pereaksi reagen *Folin-Ciocalteu*.



**Gambar 15. Reaksi Senyawa Fenol dengan Reagen *Folin-Ciocalteu***

Sumber: Dokumen pribadi berdasarkan jurnal *Pharm.Sci* (Mukhrani *et al.*, 2019)

Pada penetapan kadar fenolik total ekstrak metanol daun bayam hijau, diawali dengan penentuan panjang gelombang maksimum yang dibuat dengan konsentrasi 30 ppm dengan cara melakukan *scanning* panjang gelombang pada rentang 600-800 nm diperoleh hasilnya yaitu 748 nm dan penentuan *operating time* bertujuan untuk menentukan waktu pengukuran suatu larutan saat sudah selesai bereaksi yang ditandai dengan nilai absorbansi yang stabil (Fauzi *et al.*, 2021). Hasil *operating time* fenolik yang diperoleh yaitu 60 menit sesuai literatur (Supriningrum, *et al.*, 2020). Kemudian dilakukan penentuan kurva baku standar hubungan antara konsentrasi asam galat dengan nilai absorbansinya, dengan konsentrasi yang digunakan yaitu 10, 20, 30, 40, 50 ppm. Pada data kurva baku didapatkan persamaan regresi linearnya adalah  $y = 0,00965x + 0,1341$  dan nilai  $r$  (koefisien korelasi) yang mendekati satu menunjukkan bahwa terdapat korelasi yang baik antara kadar asam galat dan absorbansi dengan nilai  $r$  sebesar 0,9957 dan  $r^2$  sebesar 0,9914. Hasil dari persamaan regresi linear yang diperoleh tersebut kemudian akan digunakan untuk menghitung nilai kadar fenolik total yang terkandung dalam ekstrak metanol daun bayam hijau. Kadar fenolik total dari sampel ekstrak metanol daun bayam hijau dibuat dengan 40 mg/10 mL metanol *p.a* yang dilakukan dengan 3 kali replikasi yang bertujuan untuk memperoleh data yang lebih akurat, sehingga hasil kadar fenolik total ekstrak metanol daun bayam hijau diperoleh nilai yaitu sebesar  $1,150 \pm 0,025$ . Hal ini dibuktikan dalam penelitian yang dilakukan Naspera *et al.*, (2013) dengan menggunakan sampel yang sama yaitu daun bayam hijau memiliki kadar senyawa fenolik total sebesar 0,940 mg/g, dimana diketahui bahwa semakin besar kandungan senyawa fenolik total yang diperoleh maka semakin tinggi aktivitas peredaman radikal bebas begitupun sebaliknya, dalam hal ini dapat dinyatakan bahwa kadar fenolik total telah memenuhi syarat karena memiliki nilai kadar yang lebih tinggi dari penelitian sebelumnya (Naspera *et al.*, 2013). Senyawa fenol di alam terdapat sangat banyak dan variasi struktur yang beragam, mudah ditemukan di semua tanaman, seperti pada daun, bunga dan buah. Senyawa fenolik di alam telah diketahui strukturnya antara lain flavonoid, fenol monosiklik sederhana, fenil propanoid, polifenol (lignin, melanin, tanin), dan kuinon (Tahir *et al.*, 2017).

Pada pengujian peredaman radikal bebas, dilakukan uji peredaman radikal bebas pada ekstrak metanol daun bayam hijau menggunakan metode peredaman radikal DPPH dengan mengukur aktivitas antioksidan dengan menggunakan spektrofotometer UV-Vis pada panjang gelombang 516 nm. Prinsip uji metode DPPH adalah adanya donasi atom hidrogen dari substansi yang diujikan kepada radikal DPPH menjadi senyawa non radikal *difenilpikrilhidrazin* yang akan terjadinya perubahan warna, kapasitas penangkapan radikal bebas ditunjukkan dengan presentase berkurangnya warna ungu dari DPPH. DPPH memberikan serapan kuat pada panjang gelombang maksimum dengan warna ungu gelap. Senyawa yang bereaksi sebagai penangkal radikal bebas akan mereduksi DPPH yang dapat diamati dengan adanya perubahan warna DPPH dari warna ungu menjadi warna kuning ketika elektron tidak perpasangan dari radikal DPPH telah berpasangan dengan hidrogen dari senyawa penangkal radikal bebas yang akan membentuk DPPH-H tereduksi (Amrinto, 2018).

Untuk pengujian antioksidan ini, hal pertama dibuat larutan induk DPPH 0,1 mM. Larutan DPPH berperan sebagai radikal bebas yang nantinya akan bereaksi dengan suatu antioksidan yaitu antara ekstrak metanol daun bayam hijau dan vitamin C. vitamin C berfungsi sebagai antioksidan yang sangat aktif, aman dan tidak beracun, sehingga bermanfaat sebagai standar (Fauzi *et al.*, 2021). Larutan induk DPPH 0,1 mM dibuat dengan melarutkan 3,9 mg serbuk DPPH dengan di ad metanol *p.a* dalam labu ukur 100 ml. Penggunaan metanol karena DPPH dapat larut pada pelarut polar seperti metanol. Larutan induk yang telah dibuat lalu dilapisi dengan aluminium foil. Tujuannya dilapisi dengan aluminium foil agar larutan DPPH tetap berada dalam keadaan gelap, tidak terkena sinar atau cahaya secara langsung karena dapat membuat larutan menjadi tidak stabil dan hasil data yang diperoleh menjadi bias atau kurang akurat. Setelah itu, dilakukan penentuan panjang gelombang larutan DPPH pada rentang 400-600 nm. Pada percobaan yang telah dilakukan didapatkan panjang gelombang maksimum DPPH 516 nm. Tujuan dilakukan penentuan panjang gelombang yaitu untuk mengetahui daerah serapan yang optimum sehingga nantinya dapat meningkatkan sensitivitas pada nilai analisis yang didapatkan. Hasil penentuan panjang gelombang yang

diperoleh sesuai dengan penelitian yang dilakukan Fauzi *et al.*, (2021) bahwa panjang gelombang maksimum dari DPPH yaitu 516 nm. Setelah didapatkan nilai panjang gelombang yang maksimum kemudian dilakukan *operating time*. Penentuan *operating time* ini dilakukan pembacaan setiap 5 menit sekali selama 40 menit. Pembacaan dilakukan setiap 5 menit agar dapat melihat secara spesifik waktu yang didapatkan dalam keadaan stabil. Hasil OT didapatkan waktu stabil DPPH bereaksi dengan vitamin C yaitu pada menit ke-20. Tujuan dilakukannya OT adalah untuk mengetahui waktu pengukuran senyawa dalam keadaan stabil dan sudah terjadi reaksi yang optimum antara sampel yang memiliki aktivitas penangkal radikal bebas (vitamin C) dan radikal bebas (DPPH). Semakin tinggi konsentrasi dalam suatu sampel maka aktivitas antioksidan juga akan semakin tinggi, ditandai dengan berkurangnya intensitas warna yang menggambarkan penurunan konsentrasi DPPH pada saat penambahan sampel maupun perbandingan. Semakin besar aktivitas peredaman radikal DPPH maka konsentrasi DPPH akan semakin kecil, sehingga nilai absorbansi yang dihasilkan semakin turun (Fauzi *et al.*, 2021).

Setelah penentuan panjang gelombang DPPH dan *operating time*, lalu dilakukan pengujian presisi vitamin C yaitu dibuat dengan mengambil 4 mL larutan vitamin C (konsentrasi 8 ppm) lalu di ad dengan metanol *p.a* dalam labu ukur 5 mL dan diukur absorbansinya pada panjang gelombang 516 nm, dilakukan 6 kali replikasi. Pengujian presisi berfungsi untuk mengukur kedekatan antara hasil pengukuran satu dengan pengukuran yang lain. Hasil uji presisi vitamin C dinyatakan dalam nilai simpangan baku relatif/RSD (*Relative Standar Deviantion*) sebesar 1,834%. Berdasarkan hasil yang diperoleh tersebut nilai RSD sesuai persyaratan yaitu  $\%RSD \leq 2\%$  yang artinya semakin kecil nilai presisi maka semakin baik (Pranoto dan Rosmiati, 2021).

Hasil pengujian peredaman radikal bebas pada ekstrak metanol daun bayam hijau dinyatakan dalam persen peredaman radikal pada standar vitamin C diperoleh persamaan regresi linear  $y = 98,132x + 4,975$  dan nilai koefisien korelasi ( $r$ ) yaitu 0,936 sedangkan pada ekstrak diperoleh persamaan regresi linear  $y = 2,928x + 4,704$  dan nilai koefisien korelasi ( $r$ ) yaitu 0,898. Persamaan regresi

linear didapat dari plot antar konsentari (x) vs % penangkal radikal bebas (inhibisi) (y). Hasil tersebut kemudian digunakan untuk menghitung *Inhibitory Concentration* (IC<sub>50</sub>). Nilai IC<sub>50</sub> ini berfungsi agar diketahui seberapa besar kemampuan yang dapat menghambat 50% radikal bebas DPPH. Semakin kecil nilai IC<sub>50</sub> menandakan bahwa senyawa antioksidan didalam sampel sangat kuat, begitu juga sebaliknya semakin besar nilai IC<sub>50</sub> maka senyawa antioksidan didalam sampel semakin lemah. Hasil nilai IC<sub>50</sub> yang diperoleh dalam penelitian ini yaitu standar vitamin C sebesar 0,458 ppm dan ekstrak metanol daun bayam hijau sebesar 14,786 ppm keduanya termasuk kategori mengandung antioksidan yang sangat kuat. Yang didukung juga pada penelitian terdahulu dengan hasil uji antioksidan yang diperoleh dari penelitian daun bayam hijau dengan pengaruh suhu dan konsentarsi gum arab 8% Awaliyah *et al.*, (2019) IC<sub>50</sub> sebesar 42,63 ppm, sedangkan dalam penelitian Guntarti & Ruliyani, (2020) mengatakan bahwa ekstrak etanol daun bayam hijau IC<sub>50</sub> sebesar 209,395±0,607 µg/mL, lalu dalam penelitian Naspera *et al.*, (2013) mengatakan bahwa ekstrak etanol daun bayam hijau IC<sub>50</sub> sebesar 28,196 µg/mL, dan selanjutnya dalam penelitian Rahmani *et al.*, (2021) mengatakan bahwa pengaruh kualitas nutrisi *microgreen* bayam hijau diperoleh IC<sub>50</sub> sebesar 20,207±7,768 µg/mL. IC<sub>50</sub> merupakan parameter yang berkaitan dengan konsentrasi antioksidan yang mampu menyerap/menangkal 50% radikal DPPH (Molyneux, 2004).

Hasil analisis statistik yang telah dilakukan dengan menggunakan SPSS pada beberapa uji yaitu, uji normalitas menggunakan *Shapiro-Wilk* (vitamin c 0,537 dan ekstrak 0,770). Alasan digunakan *Shapiro-Wilk* ini dikarenakan sudah sering diaplikasikan dalam analisis regresi untuk pemeriksaan asumsi normal, dengan mengidentifikasi suatu data (variabel random) terdistribusi normal atau tidak. Uji homogenitas menggunakan *Levene test* digunakan untuk melihat seberapa besar varians antara dua data atau lebih yang berbeda memiliki indikasi homogen atau tidak dengan diperoleh nilai 0,078 berdasarkan data yang diperoleh dinyatakan terdistribusi normal dimana nilai signifikan >0,05, sedangkan berdasarkan uji *t-test independent* digunakan untuk mengetahui perbedaan antara sampel ekstrak metanol daun bayam hijau dan standar vitamin C dengan diperoleh

hasil nilai  $IC_{50}$  sebesar 0,014 pada ekstrak metanol daun bayam hijau dan vitamin C menggunakan metode peredaman radikal bebas DPPH menunjukkan perbedaan yang signifikan ( $p < 0,005$ ).

Pada penelitian ini, didapatkan hasil  $IC_{50}$  vitamin C dan ekstrak metanol daun bayam yang diperoleh dengan nilai  $IC_{50}$  vitamin C lebih kecil dibandingkan dengan ekstrak metanol daun bayam, hal ini menunjukkan bahwa aktivitas peredaman radikal bebas ekstrak metanol daun bayam lebih rendah dibandingkan dengan aktivitas peredaman radikal bebas vitamin C. Aktivitas antioksidan dengan nilai yang rendah dapat disebabkan oleh beberapa faktor yaitu memiliki sifat yang mudah rusak akibat terpapar oksigen, metode ekstraksi yang kurang cukup untuk menarik suatu senyawa yang memiliki sifat antioksidan pada simplisia, dan lamanya masa simpan ekstrak (Molyneux, 2004). Perbedaan nilai  $IC_{50}$  antara vitamin C dan ekstrak metanol dari daun bayam hijau disebabkan karena vitamin C merupakan salah satu senyawa standar murni dan terdapat empat gugus hidroksil dengan secara langsung menyumbangkan satu elektron untuk membentuk senyawa non-reaktif, sedangkan ekstrak metanol daun bayam hijau mengandung beberapa senyawa lainnya berperan sebagai antioksidan. Pemilihan pengujian aktivitas antioksidan dari daun bayam dalam penelitian ini agar dapat mengetahui manfaat apa saja yang terdapat dalam daun bayam hijau, dan setelah dilakukan penelitian didapatkan daun bayam hijau memiliki kandungan senyawa antioksidan seperti alkaloid, flavonoid, saponin, fenolik, tanin, yang dibuktikan dalam uji skrining fitokimia. Selain itu, daun bayam hijau mengandung senyawa steroid/terpenoid, antikolesterol, antitumor dan anti penuaan dini (Kusmiati, 2012). Adapun penelitian Chinko & Amah-Tariah, (2020) daun bayam juga memiliki kandungan senyawa lainnya yaitu beta-karoten, likopen, dan antosianin. Sehingga diperlukan penelitian lebih lanjut terkait senyawa yang dapat mempengaruhi aktivitas antioksidan yang didasarkan pada pigmen atau warna daun bayam hijau.