

## **BAB IV**

### **HASIL DAN PEMBAHASAN**

#### **A. Hasil**

##### **1. Pengambilan Bahan dan Determinasi Tanaman**

Tanaman alpukat diambil dari perkebunan yang berada di kecamatan Purwosari, kabupaten Gunung Kidul, Yogyakarta pada bulan Mei 2023. Pengambilan daun dilakukan pada pagi hari pukul 06.00-07.00 WIB, yang kemudian dilakukan determinasi di Laboratorium Pembelajaran Biologi, Fakultas Sains dan Teknologi Terapan Universitas Ahmad Dahlan Yogyakarta. Bagian tanaman yang diambil untuk determinasi, meliputi daun alpukat, buah, biji, batang, ranting, dan akar dari tanaman alpukat. Berdasarkan hasil determinasi yang telah didapatkan menunjukkan bahwa tanaman yang digunakan merupakan tanaman alpukat (*Persea americana* Mill.) (Lampiran 2).

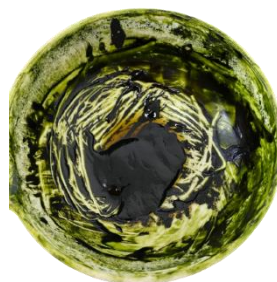
##### **2. Persiapan Sampel**

Sampel daun alpukat yang telah dipetik dan dikumpulkan sebanyak  $\pm 1$  kg kemudian dilakukan sortasi basah dan pencucian terlebih dahulu dengan menggunakan air mengalir. Sampel yang telah terpilih dan telah bebas dari kontaminan selanjutnya dilakukan pengeringan dengan menggunakan oven pada suhu rendah  $40^{\circ}\text{C}$ . Setelah didapatkan sampel yang kering kemudian sampel diserbuk dengan menggunakan grinder. Serbuk yang telah didapatkan kemudian diayak menggunakan ayakan 40 mesh. Serbuk yang didapatkan kemudian ditimbang dan didapatkan bobot serbuk sebesar 249,34 gram.

##### **3. Ekstraksi**

Ekstraksi yang digunakan pada penelitian ini menggunakan gelombang ultrasonik pada suhu  $45^{\circ}\text{C}$  dalam waktu 45 menit. Langkah pertama yaitu dengan menimbang serbuk daun alpukat sebanyak 20 g kemudian dicampurkan dengan variasi konsentrasi pelarut etanol sebanyak 200 mL (1:10). Ekstrak yang didapatkan kemudian disaring dengan menggunakan kertas saring *whatman* no 1 dan diperoleh ekstrak cair. Ekstrak cair yang telah diperoleh kemudian

dikentalkan menggunakan *waterbath* dengan suhu 45<sup>0</sup>C hingga diperoleh ekstrak kental. Ekstrak kental yang diperoleh dapat dilihat pada (Gambar 8) berikut:



**Gambar 8. Ekstrak Kental Daun Alpukat (*Persea americana* Mill.)** (Dokumentasi Pribadi)

Setelah didapatkan ekstrak kental dari pengentalan yang telah dilakukan, kemudian dihitung rendemennya dengan cara jumlah ekstrak kental yang didapat dibagi dengan jumlah serbuk yang ditimbang dan dikali dengan 100% (Lampiran 5). Hasil berat dan rendemen yang didapat dari berbagai variasi konsentrasi etanol 50%, 70%, dan 96% dapat dilihat pada (Tabel 3) dibawah ini:

**Tabel 3. Data Rendemen Ekstraksi Pertama**

Variasi Konsentrasi	Berat Serbuk (g)	Ekstrak Kental (g)	Rendemen (%)	Sumber (FHI, 2017)	Ket.
Ekstrak etanol 50%	20	3,9127	19,5635	Hasil rendemen tidak kurang dari 26%	Tidak memenuhi persyaratan
Ekstrak etanol 70%	20	3,7475	18,7375		Tidak memenuhi persyaratan
Ekstrak etanol 96%	20	2,2834	11,4170		Tidak memenuhi persyaratan

#### 4. Uji Organoleptis

Untuk mengetahui kualitas dari tiap ekstrak, dilakukan beberapa uji kualitatif, yaitu uji organoleptik yang meliputi warna, konsistensi, bau, dan rasa dari ekstrak. Data hasil uji organoleptik yang telah dilakukan dapat dilihat pada (Tabel 4) berikut:

**Tabel 4. Hasil Uji Organoleptik**

Variasi Konsentrasi	Warna	Konsistensi	Bau	Rasa	Sumber (FHI, 2017)	Ket.
Ekstrak etanol 50%	Coklat kemerahan	Kental	Khas	Pahit dan kelat	Ekstrak kental, warna coklat	Memenuhi persyaratan
Ekstrak etanol 70%	Coklat kemerahan	Kental	Khas	Pahit dan kelat	kehitaman, bau khas,	Memenuhi persyaratan
Ekstrak etanol 96%	Coklat kehijauan	Kental	Khas	Pahit dan kelat	rasa pahit dan kelat	Memenuhi persyaratan

#### 5. Uji Penapisan Fitokimia

Berdasarkan pengujian penapisan fitokimia yang telah dilakukan, diperoleh hasil ekstrak etanol daun alpukat dengan konsentrasi 50%, 70% dan 96% mengandung senyawa alkaloid, flavonoid, saponin, dan tanin. Data hasil uji penapisan fitokimia dengan variasi konsentrasi pelarut dapat dilihat pada (Tabel 5) dan (Lampiran 6).

**Tabel 5. Data Hasil Uji Penapisan Fitokimia**

Senyawa Bioaktif	Variasi Ekstrak Etanol			Sumber (Yanis <i>et al.</i> , 2021)
	50%	70%	96%	
<b>Alkaloid</b>				Daun alpukat positif mengandung alkaloid, flavonoid, saponin dan tanin.
Mayer	+	+	+	
Wagner	+	+	+	
<b>Flavonoid</b>	+	+	+	
<b>Saponin</b>	+	+	+	
<b>Tanin</b>	+	+	+	

Keterangan: (+) Terdapat kandungan senyawa.

## 6. Kromatografi Lapis Tipis (KLT)

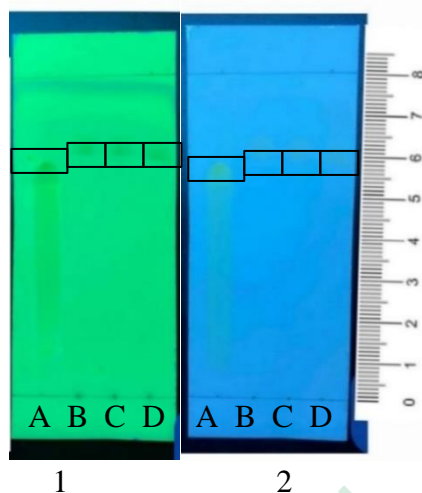
Identifikasi senyawa flavonoid dengan metode kromatografi lapis tipis ini digunakan fase diam berupa *silica gel* 60 F<sub>254</sub> dan fase gerak berupa campuran Kloroform : Metanol : Air serta pembanding yang digunakan berupa kuersetin (Kemenkes RI, 2017). Langkah pertama dilakukan penjenuhan bejana menggunakan fase gerak yang telah ditentukan. Penjenuhan bejana dilakukan dengan cara memasukkan fase gerak berupa Kloroform : Metanol : Air dalam bejana bersama dengan kertas saring berukuran 10 cm. Bejana yang telah jenuh ditandai dengan terbasahnya kertas saring yang dimasukkan bersama dengan fase gerak. Fase gerak yang digunakan diperoleh dari hasil optimasi yang dapat dilihat pada (Tabel 6) berikut:

**Tabel 6. Optimasi Fase Gerak**

No	Fase Gerak	Hasil Kromatografi Lapis Tipis
1	Kloroform : Metanol : Air (9,6:1,44:0,96) 3 kali penotolan	Terjadi tailing pada sampel dan kuersetin
2	Kloroform : Metanol : Air (8:1,2:0,8) 3 kali penotolan	Bercak dari kuersetin dan ketiga sampel terlihat samar-samar
3	Kloroform : Metanol : Air (8:1,2:0,8) 4-5 kali penotolan	Bercak terlihat jelas tanpa adanya tailing

Tahap selanjutnya pengaktifan lempeng yang dilakukan dengan cara plat dioven pada suhu 100<sup>0</sup>C selama 45 menit. Setelah plat berhasil diaktifkan, kemudian dilakukan penotolan larutan sampel dan pembanding dengan volume ± 1 µl menggunakan *white tip* dan dimasukkan ke dalam bejana berisi fase gerak yang telah jenuh.

Berdasarkan hasil optimasi yang telah dilakukan, yang memberikan hasil paling baik dalam uji KLT ini, yaitu pada perbandingan Kloroform : Metanol : Air (8:1,2:0,8) dengan penotolan 4-5 kali. Fase gerak tersebut dapat memisahkan sampel dan standar pada ekstrak etanol daun alpukat. Hasil uji KLT yang telah dilakukan dengan spot yang tertera dapat dilihat pada gambar 10 dibawah ini:



**Gambar 9.** Profil KLT Ekstrak Daun Alpukat (*Persea americana* Mill.)  
Keterangan: 1. Deteksi dengan UV 254 nm; 2. Deteksi dengan UV 366 nm. (A) spot kuersetin; (B) spot ekstrak etanol 50%; (C) spot ekstrak etanol 60%; (D) spot ekstrak etanol 96%. Fase diam = *silica gel* 60 F<sub>254</sub>; Fase gerak = Kloroform : Metanol : Air (8:2:0,8; v/v/v)

Berdasarkan hasil KLT yang telah diperoleh spot dari ketiga sampel memiliki nilai  $R_f$  yang hampir sama dengan  $R_f$  pembanding. Perhitungan nilai  $R_f$  dilakukan dengan cara perhitungan yang telah terlampir pada Lampiran 7 dan untuk data yang telah diperoleh dapat dilihat pada (Tabel 7) berikut:

**Tabel 7. Hasil Data Perhitungan Nilai  $R_f$**

Sampel	Panjang Spot (cm)	Nilai $R_f$	$R_f$ Kuersetin (Natasa <i>et al.</i> , 2021)
Kuersetin	6,1	0,763	
Ekstrak Etanol 50%	6,3	0,788	0,35
Ekstrak Etanol 70%	6,2	0,776	
Ekstrak Etanol 96%	6,2	0,776	

## 7. Uji Peredaman Radikal Bebas DPPH

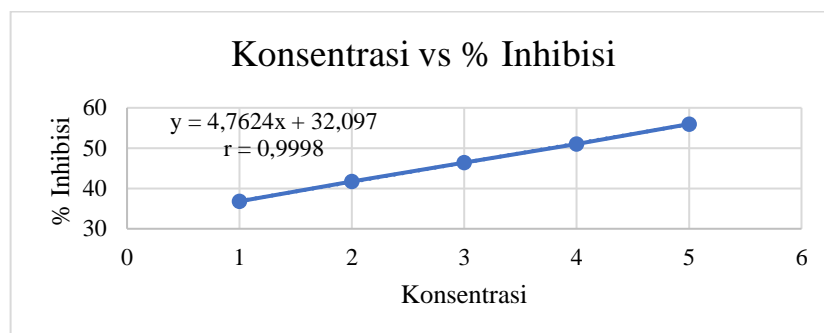
Penelitian aktivitas peredaman radikal bebas DPPH ini dilakukan secara kuantitatif dengan menghitung nilai IC<sub>50</sub> pada berbagai konsentrasi ekstrak etanol daun alpukat dan pembanding (kuersetin). Langkah pertama dibuat larutan stok DPPH 0,1 mM terlebih dahulu dengan penimbangan DPPH sebanyak 4 mg dalam 100 mL etanol p.a. Langkah kedua dibuat larutan induk pembanding berupa kuersetin 100 ppm dengan penimbangan sebanyak 10 mg

dalam 100 mL etanol p.a, yang kemudian dilanjutkan dengan pembuatan seri konsentrasi kuersetin. Langkah ketiga dibuat larutan induk EDA dari berbagai variasi konsentrasi dengan penimbangan sebanyak 25 mg dalam 50 mL etanol p.a, sehingga diperoleh larutan induk dengan konsentrasi 500 ppm dan dilanjutkan dengan pembuatan seri konsentrasi larutan induk EDA.

Tahap selanjutnya, yaitu penentuan panjang gelombang maksimum dan *operating time*. Penentuan panjang gelombang maksimum dilakukan dengan rentang 400-800 nm dan didapatkan hasil  $\lambda$  515 nm (Lampiran 8). Setelah itu, dilakukan *operating time* selama 1 jam dan didapatkan hasil yang stabil pada menit ke 33 (Lampiran 8). Setelah diperoleh nilai panjang gelombang maksimum dan *operating time* dilakukan pembacaan nilai absorbansi dari tiap seri konsentrasi yang telah dibuat dan direaksikan dengan DPPH. Hasil pembacaan seri konsentrasi yang telah dilakukan dapat dilihat pada (Tabel 8) berikut:

**Tabel 8. Hasil Peredaman Radikal Bebas DPPH (Kuersetin)**

Konsentrasi (ppm)	Replikasi	Absorbansi	Rata-rata absorbansi	% Inhibisi	IC <sub>50</sub> (µg/mL)
1	1	0,654	0,656	36,802	3,759
	2	0,663			
	3	0,649			
1,5	1	0,604	0,605	41,745	
	2	0,613			
	3	0,597			
2	1	0,556	0,557	46,371	
	2	0,565			
	3	0,549			
2,5	1	0,509	0,508	51,028	
	2	0,515			
	3	0,501			
3	1	0,457	0,457	55,973	
	2	0,462			
	3	0,452			
Absorbansi DPPH 1,038					



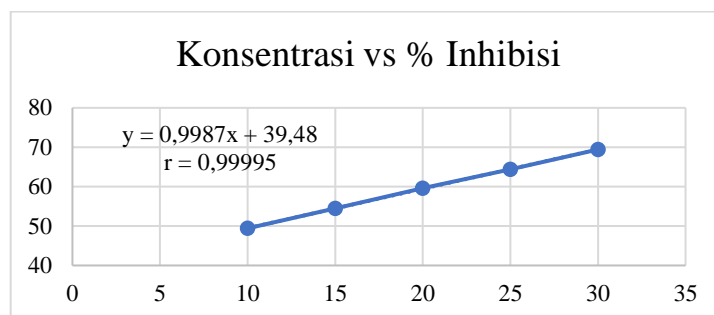
**Gambar 10. Grafik Kuersetin**

Setelah didapatkan absorbansi tiap seri kadar, dari data tersebut bisa digunakan untuk menghitung % inhibisi yang akan digunakan dalam menentukan regresi linier dan menghitung nilai  $IC_{50}$ . Berdasarkan hasil data yang telah diperoleh didapatkan persamaan regresi linier  $y = 4,7624x + 32,097$  (Gambar 10) dan nilai  $IC_{50}$  3,759  $\mu\text{g/mL}$  yang merupakan kategori sangat kuat.

Sementara pada pembacaan absorbansi tiap konsentrasi EDA dapat dilihat pada (Tabel 9, 10, 11) berikut:

**Tabel 9. Hasil Analisis Aktivitas Antioksidan DPPH Ekstrak Etanol 50%**

Konsentrasi (ppm)	Replikasi	Absorbansi	Rata-rata absorbansi	% Inhibisi	$IC_{50}$ ( $\mu\text{g/mL}$ )
10	1	0,523	0,525	49,422	10,534
	2	0,529			
	3	0,523			
15	1	0,473	0,473	54,46	
	2	0,476			
	3	0,469			
20	1	0,420	0,420	59,570	
	2	0,423			
	3	0,416			
25	1	0,371	0,370	64,387	
	2	0,373			
	3	0,365			
30	1	0,318	0,317	69,428	
	2	0,320			
	3	0,314			
Absorbansi DPPH 1,038					

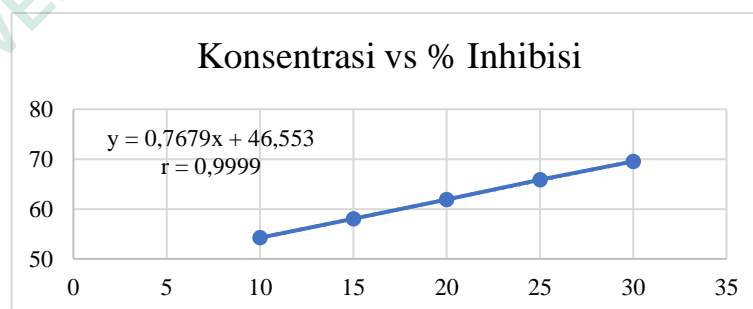


**Gambar 11. Grafik EDA 50%**

**Tabel 10. Hasil Analisis Aktivitas Antioksidan DPPH Ekstrak Etanol 70%**

Konsentrasi (ppm)	Replikasi	Absorbansi	Rata-rata absorbansi	% Inhibisi	IC <sub>50</sub> (µg/mL)
10	1	0,563	0,563	54,238	4,489
	2	0,566			
	3	0,561			
15	1	0,517	0,516	58,056	
	2	0,521			
	3	0,511			
20	1	0,472	0,469	61,874	
	2	0,475			
	3	0,461			
25	1	0,426	0,420	65,854	
	2	0,425			
	3	0,410			
30	1	0,376	0,375	69,537	
	2	0,382			
	3	0,367			

Absorbansi DPPH 1,231



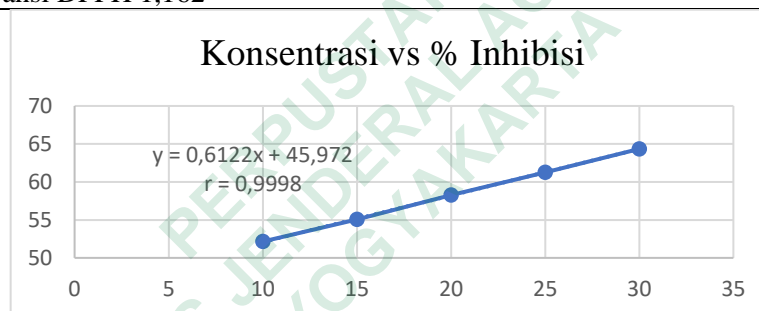
**Gambar 12. Grafik EDA 70%**



**Tabel 11. Hasil Analisis Aktivitas Antioksidan DPPH Ekstrak Etanol 96%**

Konsentrasi (ppm)	Replikasi	Absorbansi	Rata-rata absorbansi	% Inhibisi	IC <sub>50</sub> (µg/mL)
10	1	0,558	0,556	52,151	6,580
	2	0,554			
	3	0,556			
15	1	0,522	0,522	55,049	
	2	0,523			
	3	0,522			
20	1	0,486	0,486	58,262	
	2	0,483			
	3	0,486			
25	1	0,452	0,451	61,274	
	2	0,447			
	3	0,451			
30	1	0,416	0,415	64,343	
	2	0,412			
	3	0,415			

Absorbansi DPPH 1,162

**Gambar 13. Grafik EDA 96%****Tabel 12. Hasil Nilai IC<sub>50</sub> Pemanding dan Sampel**

Sampel	Nilai IC <sub>50</sub> (µg/mL)	Keterangan
Kuersetin	3,759	Sangat Kuat
Ekstrak Etanol 50%	10,534	Sangat Kuat
Ekstrak Etanol 70%	4,489	Sangat Kuat
Ekstrak Etanol 96%	6,580	Sangat Kuat

Nilai absorbansi yang telah diperoleh dapat digunakan untuk menghitung % inhibisi dan penentuan persamaan regresi linier yang kemudian digunakan untuk menghitung nilai IC<sub>50</sub>. Berdasarkan hasil pembacaan nilai absorbansi ekstrak etanol 50% (Tabel 9), ekstrak etanol 70% (Tabel 10), dan ekstrak etanol 96% (Tabel 11) didapatkan nilai IC<sub>50</sub> berturut-turut sebesar (10,534 ; 4,489; 6,580) µg/mL yang merupakan kategori antioksidan sangat kuat.

## 8. Uji Anova (Analisis Data Statistik)

Uji selanjutnya yaitu analisis statistik dengan menggunakan *software* SPSS menggunakan data berupa IC<sub>50</sub> yang telah dihitung sebelumnya. Analisis statistik yang dilakukan, yaitu berupa uji normalitas dengan metode *Shapiro Wilk*, uji homogenitas dengan metode *Homogeneity of Variance Test* serta uji *One Way Anova*. Hasil analisis statistik yang telah dilakukan dapat dilihat pada Tabel 13 dan Lampiran 10.

**Tabel 13. Hasil Data SPSS**

Sampel	Uji Normalitas	Uji Homogenitas	Uji <i>One Way Anova</i>
Kuersetin	0,471		
Ekstrak etanol 50%	0,620	0,181	< 0,001
Ekstrak etanol 70%	0,384		
Ekstrak etanol 96%	0,959		
Keterangan	Normal (> 0,05)	Homogen (> 0,05)	Berbeda secara signifikan (< 0,05)

### B. Pembahasan

Daun yang digunakan pada penelitian ini didapatkan dari perkebunan buah alpukat yang ada di kecamatan Purwosari, kabupaten Gunung Kidul, Yogyakarta. Daun yang berada di lokasi tersebut cocok dijadikan sampel pada penelitian ini karena lokasi perkebunannya yang jauh dari pemukiman warga. Alasan dipilihnya lokasi perkebunan yang jauh dari pemukiman warga dikarenakan perkebunan yang berada di pekarangan rumah atau yang berada di dekat pemukiman warga akan sering terkena polusi udara. Polusi udara yang mengandung senyawa beracun seperti logam berat dan senyawa organik berbahaya dapat menurunkan sifat antioksidan pada tanaman daun alpukat. Pemetikan daun dilakukan pada pagi hari jam 06.00-07.00 WIB dikarenakan pada pagi hari, suhu udara umumnya lebih rendah dibandingkan dengan siang hari. Suhu tinggi dapat memicu aktivitas metabolisme yang lebih tinggi dan potensial kerusakan oksidatif yang lebih besar dalam jangka waktu yang lebih singkat. Dengan menghindari suhu tinggi pada siang hari, risiko kerusakan oksidatif terhadap senyawa antioksidan dalam daun dapat dikurangi. (Yuliani & Dienina, 2015).

Daun yang telah dikumpulkan sebanyak  $\pm 1$  kg dilakukan sortasi basah dan pencucian terlebih dahulu dengan menggunakan air mengalir. Sortasi basah bertujuan untuk memisahkan sampel yang tidak lulus uji yang disebabkan karena kotoran atau sampel yang rusak karena serangga, sedangkan pencucian sampel bertujuan untuk menghilangkan kontaminan yang ada pada sampel. Langkah selanjutnya dikeringkan daun menggunakan oven pada suhu  $40^{\circ}\text{C}$  dikarenakan penggunaan suhu yang tinggi dapat mengakibatkan kerusakan senyawa flavonoid yang terdapat pada daun. Pengeringan ini bertujuan untuk menurunkan kadar air dalam sampel agar tidak mudah ditumbuhi mikroba. Sampel yang telah kering ditandai dengan warna daun yang berubah menjadi coklat dan kemudian jika diremas daun akan hancur (Kemenkes RI, 2017). Daun yang telah kering kemudian diserbuk menggunakan grinder (*fomac*) dengan tujuan untuk memperluas kontak antara sampel dengan pelarut yang kemudian akan membantu proses difusi. Sampel yang sudah kering diayak menggunakan ayakan 40 mesh, dengan tujuan agar sampel memiliki ukuran yang seragam. Pemisahan senyawa bioaktif pada sampel daun alpukat dapat dilakukan dengan menggunakan metode ekstraksi.

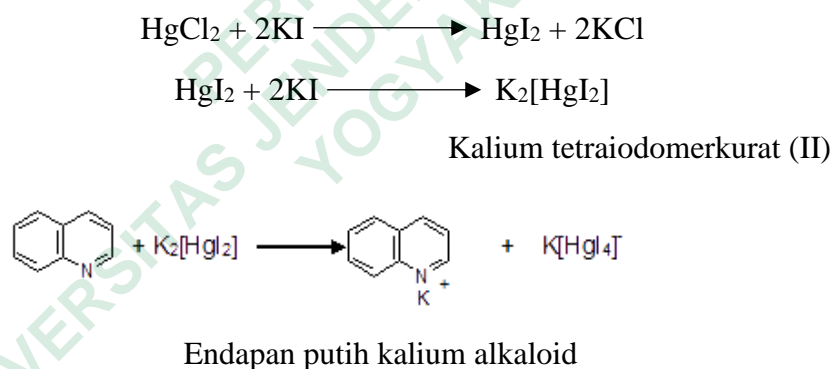
Ekstraksi daun alpukat pada penelitian ini menggunakan gelombang ultrasonik pada suhu  $45^{\circ}\text{C}$  dalam waktu 45 menit. Penggunaan suhu yang terlalu tinggi akan merusak senyawa flavonoid yang ada dalam sampel, sedangkan suhu yang terlalu rendah mengakibatkan senyawa flavonoid yang ada dalam sampel tidak terekstrak (Sekarsari *et al.*, 2019). Ekstraksi menggunakan metode UAE dimaksudkan agar proses penyarian zat aktif dapat berjalan lebih cepat dan pelarut yang digunakan tidak banyak. Proses ekstraksi dengan metode ultrasonikasi ini menggunakan perbandingan 1:10 untuk tiap variasi konsentrasi. Tujuan dilakukannya analisis variasi konsentrasi ini ialah untuk melihat di kepolaran manakah (tinggi 50%, sedang 70% atau rendah 96%) senyawa aktif dalam sampel daun alpukat akan tertarik dengan baik. Ekstrak yang didapatkan kemudian disaring menggunakan kertas saring *whatman* no 1, dikarenakan kertas saring *whatman* no 1 memiliki ukuran diameter pori-pori yang cukup kecil ( $11\ \mu\text{m}$ ) sehingga cukup efektif untuk menahan partikel padatan. Ekstrak cair yang telah didapatkan kemudian dipekatkan menggunakan *waterbath* pada suhu  $45^{\circ}\text{C}$  hingga diperoleh

ekstrak kental. Berdasarkan hasil pengentalan yang telah dilakukan, ekstrak etanol 96% lebih cepat kental diikuti dengan ekstrak etanol 70%, dan kemudian ekstrak etanol 50%, dikarenakan pada etanol 96% memiliki perbandingan etanol : air (96:4); etanol 70% (70:30); dan etanol 50% (50:50). Oleh karena itu ekstrak etanol 96% lebih cepat menguap dan kental dari pada ekstrak etanol 70% dan 50%. Ekstrak kental yang diperoleh kemudian dihitung rendemennya dengan cara jumlah ekstrak yang didapat dibagi dengan jumlah serbuk yang ditimbang dan dikali 100% (Lampiran 5). Berdasarkan FHI (2017), persyaratan rendemen yang baik pada ekstrak kental daun alpukat itu tidak kurang dari 26% (Kemenkes RI, 2017). Hasil yang telah didapatkan (Tabel 3) menunjukkan bahwa dari ketiga sampel tersebut tidak memenuhi syarat, hal tersebut terjadi dikarenakan rendemen suatu ekstrak dapat dipengaruhi beberapa faktor, diantaranya yaitu jenis pelarut dan konsentrasinya serta jumlah serbuk yang digunakan (Syamsul *et al.*, 2020). Rendemen yang telah dihasilkan menunjukkan bahwa ekstrak etanol 50% (19,5635%) lebih tinggi rendemennya dibandingkan dengan ekstrak etanol 70% (18,7375%) dan ekstrak etanol 96% (11,4170%). Rendemen suatu ekstrak berhubungan dengan kandungan metabolit sekunder yang tersari pada proses ekstraksi, tetapi pada proses pengentalan ada beberapa faktor yang mempengaruhi hasil rendemen tersebut, diantaranya adanya ekstrak yang tumpah saat melakukan penelitian dan juga adanya ekstrak yang kering/tertinggal pada cawan saat proses pengentalan. Ekstrak kental yang didapatkan kemudian dilakukan pengujian secara kualitatif berupa uji organoleptik, penapisan fitokimia dan KLT.

Uji organoleptik pada penelitian ini mengacu pada warna, konsistensi, bau, dan rasa. Berdasarkan FHI (2017), ekstrak yang baik menunjukkan ekstrak yang kental, warna coklat kehitaman, bau khas, serta rasa pahit dan kelat (Kemenkes RI, 2017). Hasil pada penelitian ini menunjukkan ketiga variasi sampel ekstrak etanol daun alpukat memenuhi persyaratan. Ekstrak kental tersebut kemudian dilanjutkan analisis dengan menggunakan uji penapisan fitokimia dan uji KLT.

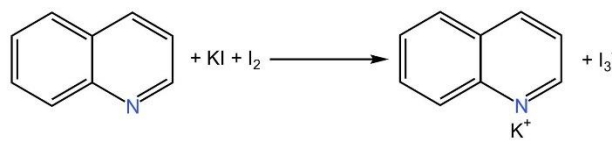
Berdasarkan hasil pengujian penapisan fitokimia yang telah dilakukan ekstrak etanol daun alpukat dari berbagai variasi 50%, 70%, 96% positif mengandung alkaloid, flavonoid, saponin, dan tanin. Hasil tersebut sesuai dengan

penelitian yang telah dilakukan oleh (Kemit *et al.*, 2016) yang menyatakan bahwa ekstrak daun alpukat mengandung senyawa bioaktif berupa alkaloid, flavonoid, saponin, dan tanin. Berdasarkan analisis fitokimia senyawa alkaloid, yang telah diketahui bahwa alkaloid mempunyai sifat basa, oleh karena itu diperlukan penambahan suatu asam (HCl 1%) untuk membentuk garam. Pembentukan garam tersebut bertujuan untuk memisahkan alkaloid yang bersifat basa dengan komponen lain. Selain penambahan suatu asam, identifikasi alkaloid dalam penelitian ini juga ditambahkan suatu reagen Mayer. Penambahan reagen Mayer ini menunjukkan hasil positif yang ditandai dengan adanya gumpalan putih yang ada dalam tabung. Gumpalan putih tersebut diperkirakan yaitu senyawa kompleks kalium-alkaloid. Nitrogen yang terkandung dalam alkaloid bereaksi dengan atom  $K^+$  dari kalium tetraiodomerkuret (II) membentuk senyawa kompleks kalium-alkaloid yang menggumpal. Perkiraan reaksi antara Mayer dan alkaloid dapat dilihat pada gambar 14 di bawah ini:



**Gambar 14. Reaksi Uji Mayer** (Dokumentasi Pribadi)

Sementara, pada uji alkaloid dengan menggunakan pereaksi Wagner membentuk gumpalan endapan berwarna coklat. Atom nitrogen pada alkaloid membentuk ikatan kovalen dengan ion logam  $K^+$  pada reagen Wagner membentuk kompleks kalium-alkaloid yang mengendap dan berwarna coklat dari  $I_3$  (Ningsih *et al.*, 2020). Reaksi antara atom nitrogen pada alkaloid dan reagen Wagner dapat dilihat pada (Gambar 15) berikut:

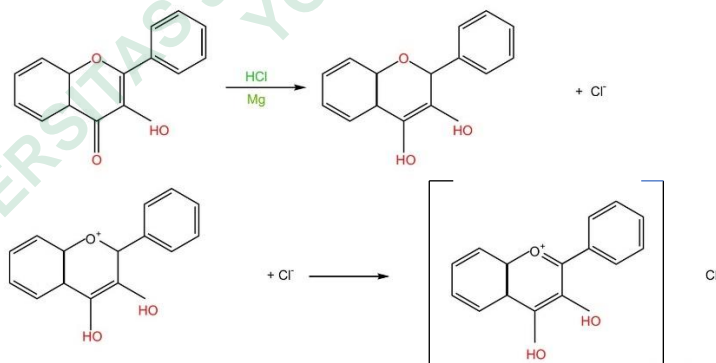


Kuinson

Kalium-alkaloid (endapan coklat)

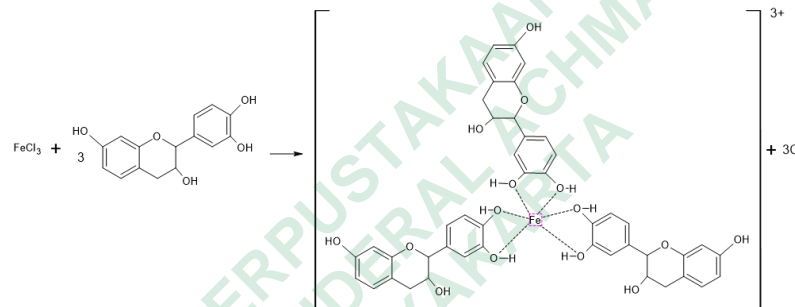
**Gambar 15. Reaksi Uji Wagner** (Dokumentasi Pribadi)

Pengujian fitokimia yang kedua, yaitu uji flavonoid. Pengujian flavonoid ini dilakukan dengan cara menambahkan serbuk magnesium dan HCl pekat. Tujuan penambahan Mg dan HCl pekat ini yaitu untuk mereduksi ikatan glikosida dengan flavonoid. Senyawa flavonoid yang tereduksi dengan Mg dan HCl pekat membentuk warna merah, kuning atau jingga (adanya flavon), merah tua (adanya flavanon atau flavonol), hijau sampai biru (adanya glikosida atau aglikon) (Sulistyarini *et al.*, 2014). Pengujian flavonoid pada penelitian ini menunjukkan warna jingga yang dapat dilihat pada (Lampiran 6). Perubahan warna jingga tersebut disebabkan senyawa kompleks dari ion magnesium dengan ion fenoksi pada senyawa flavonoid yang terkandung dalam ekstrak dengan  $Mg^{2+}$  dan HCl pekat akan membentuk kompleks  $[Mg(OAr)_6]^{4-}$  yang berwarna jingga (Oktavia & Sutoyo, 2021).

**Gambar 16. Reaksi Flavonoid dengan Magnesium** (Dokumentasi Pribadi)

Proses pengujian fitokimia senyawa saponin, hal pertama yang dilakukan, yaitu penambahan ekstrak dengan air. Penambahan air ini dikarenakan sebagian saponin akan larut dalam air yang akan berikatan dengan air, sedangkan saponin yang tidak larut air akan berikatan dengan udara membentuk buih. Pada uji saponin ini juga ditambahkan sedikit HCl 1 N dengan tujuan agar buih yang didapatkan lebih stabil (Sulistyarini *et al.*, 2014). Pengujian fitokimia yang terakhir, yaitu uji

tanin yang dilakukan dengan cara ekstrak yang telah dilarutkan dalam aquades ditambahkan 1 mL  $\text{FeCl}_3$  10%. Tujuan penambahan  $\text{FeCl}_3$  ini yaitu untuk melihat ekstrak daun alpukat mengandung fenol. Sampel yang mengandung fenol akan berubah warna menjadi biru tua atau hijau kehitaman. Hal tersebut disebabkan karena terbentuknya senyawa kompleks antara tanin dengan ion besi ( $\text{Fe}^{3+}$ ). Tanin merupakan senyawa organik yang umumnya memiliki gugus hidroksil polifenolik. Ketika  $\text{FeCl}_3$  ditambahkan ke dalam sampel yang mengandung tanin, ion besi ( $\text{Fe}^{3+}$ ) akan bereaksi dengan gugus hidroksil yang ada pada tanin. Gugus hidroksil ini berfungsi sebagai donor elektron dalam pembentukan ikatan dengan ion besi (Muthmainnah, 2017).



**Gambar 17. Reaksi  $\text{FeCl}_3$  dengan Tanin** (Dokumentasi Pribadi)

Tanin juga mempunyai aktivitas antioksidan, semakin banyak tanin yang terkandung dalam sampel, maka aktivitas antioksidannya semakin tinggi pula. Tanin dikatakan mempunyai aktivitas antioksidan karena memiliki senyawa polifenol yang berfungsi sebagai peredam radikal bebas (Widiastini et al., 2021).

Uji kualitatif yang kedua pada penelitian ini, yaitu identifikasi senyawa flavonoid dengan menggunakan metode KLT. Kromatografi lapis tipis (KLT) merupakan suatu identifikasi sederhana yang digunakan untuk mendeteksi suatu senyawa kimia yang terkandung dalam suatu sampel disamping penapisan fitokimia. Metode ini digunakan karena merupakan metode yang cukup fleksibel, mudah dalam preparasi sampel, sederhana, biaya relatif murah, pelarut yang digunakan sedikit, selektif & sensitif, serta untuk kromatogramnya dapat diamati secara visual (Syafi'i et al., 2018). Identifikasi senyawa kimia dengan metode KLT ini didapatkan hasil berupa bercak/noda dan nilai  $R_f$ . Tujuan uji flavonoid ini dikarenakan flavonoid merupakan metabolit sekunder yang berperan sebagai

antioksidan untuk menangkal radikal bebas (Hanin & Pratiwi, 2017). Perbandingan yang digunakan dalam identifikasi ini menggunakan perbandingan berupa kuersetin. Digunakan perbandingan berupa kuersetin dikarenakan kuersetin merupakan senyawa flavonoid golongan flavonol (Jannah *et al.*, 2022). Kuersetin yang digunakan pada penelitian ini merupakan kuersetin dengan konsentrasi 0,1% yang dilakukan dengan etanol p.a. Sedangkan larutan uji yang digunakan merupakan ekstrak etanol dengan konsentrasi 10% yang dilakukan dengan etanol p.a. Penggunaan etanol p.a dikarenakan dalam KLT, kemurnian pelarut sangat penting sehingga sedikit kontaminan dapat mempengaruhi hasil pemisahan dan identifikasi senyawa-senyawa dalam sampel. Fase diam yang digunakan dalam uji KLT ini, yaitu menggunakan *silica gel 60 F<sub>254</sub>*, plat *silica* ini mempunyai sifat polar dengan adsorpsi yang baik pada senyawa organik dan anorganik. Sedangkan fase gerak yang digunakan yaitu kloroform : metanol : air dengan perbandingan (8;1,2;0,8) yang mempunyai sifat lebih ke non polar. Digunakan perbandingan tersebut berdasarkan hasil optimasi yang telah dilakukan.

Plat *silica gel* diukur dengan panjang 10 cm dan lebar 5 cm untuk 1 perbandingan dan 3 sampel. Plat yang telah terukur kemudian dimasukkan ke dalam oven pada suhu 100<sup>0</sup>C selama 45 menit untuk mengaktifkan lempeng. Pengaktifan lempeng bertujuan agar sisa kadar air dalam plat hilang serta mengaktifkan gugus silanol dan siloksan dari plat, sehingga meningkatkan daya serap yang dihasilkan (Dewi *et al.*, 2018). Setelah lempeng aktif dilakukan penjujukan bejana yang bertujuan untuk menyelaraskan tekanan uap dari fase gerak yang digunakan sehingga proses pemisahan dapat berjalan dengan efektif. Penjujukan bejana dilakukan dengan cara meletakkan kertas saring dalam bejana yang berisi fase gerak. Jika kertas saring telah terbasahi keseluruhan oleh fase gerak maka fase gerak dapat dikatakan jenuh. Proses penentuan fase gerak, dilakukan dengan cara optimasi fase gerak terlebih dahulu menggunakan perbandingan Kloroform : Metanol : Air (9,6:1,44:0,96), pada saat menggunakan perbandingan ini, didapatkan bercak yang tailing, kemudian dilakukan kembali uji dengan perbandingan Kloroform : Metanol : Air (8:2:0,8) dengan penotolan sebanyak 3 totol dan didapatkan hasil dengan bercak yang sedikit samar-samar. Setelah itu dilakukan



kembali percobaan dengan perbandingan yang sama (8:2:0,8) dengan 4-5 kali total dan didapatkan hasil bercak yang jelas tanpa ada tailing, oleh karena itu, digunakan fase gerak dengan perbandingan Kloroform : Metanol : Air (8:2:0,8) dengan 4-5 kali total, dimana kloroform bersifat nonpolar, metanol bersifat polar dan air bersifat polar. Penotolan sampel pada plat KLT menggunakan *white tip* karena *white tip* mempunyai ujung yang kecil dan lancip sehingga mudah dalam penotolan dan tidak berlebihan. Penotolan dilakukan dengan jarak 1 cm tiap spot dan ditotolkan tiap sampel sebanyak 4-5x total. Penotolan plat yang telah sempurna kemudian dimasukkan kedalam chamber yang telah jenuh dan ditutup rapat hingga eluen naik.

Ketika fase gerak mencapai titik tertentu di atas lembar KLT, senyawa flavonoid yang ada pada sampel akan terpisah dan bergerak sesuai dengan sifat-sifat kimianya. Jika senyawa flavonoid memiliki afinitas adsorpsi dengan fase diam (seperti *silica gel* 60 F<sub>254</sub>), maka mereka akan teradsorpsi pada permukaan *silica gel* saat fase gerak berhenti bergerak. Bercak yang terbentuk pada lembar KLT setelah pengembangan akan terlihat sebagai area berwarna yang menunjukkan keberadaan senyawa flavonoid. Warna yang terbentuk pada pembanding kuersetin menunjukkan warna kuning kecoklatan, sedangkan warna yang terbentuk pada variasi sampel ekstrak etanol daun alpukat menunjukkan warna kuning kehijauan. Hasil dengan bercak kuning kehijauan dan kuning kecoklatan diduga merupakan senyawa flavonoid (Kusnadi & Devi, 2017). Berdasarkan hasil yang telah didapatkan, ketiga sampel terbukti terdapat senyawa flavonoid yang ditandai dengan nilai *R<sub>f</sub>* sampel yang mendekati nilai *R<sub>f</sub>* kuersetin. Selisih nilai *R<sub>f</sub>* dapat dikatakan positif, jika selisihnya < 0,05. Sedangkan nilai *R<sub>f</sub>* dikatakan negatif, jika selisihnya ≥ 0,05 (Husna & Mita, 2020). Setelah ekstrak terbukti mempunyai senyawa flavonoid, Langkah selanjutnya yaitu uji kuantitatif peredaman radikal bebas dengan DPPH.

Uji kuantitatif peredaman radikal bebas menggunakan DPPH dalam penelitian ini menggunakan DPPH dengan konsentrasi 0,1 mM. Langkah pertama pembuatan larutan stok DPPH 0,1 mM yaitu dengan cara menimbang DPPH sebanyak 4 mg dalam 100 mL etanol p.a dan didapatkan larutan DPPH 40 ppm.

DPPH digunakan untuk mengukur kemampuan senyawa lain (ekstrak etanol daun alpukat dan kuersetin) untuk menetralkan radikal bebas. Ketika senyawa antioksidan (ekstrak etanol daun alpukat dan kuersetin) ditambahkan ke larutan DPPH, senyawa antioksidan tersebut akan menyumbangkan satu elektron untuk mengisi kekurangan elektron dalam DPPH (Puspitasari & Ningsih, 2016). DPPH merupakan radikal bebas yang sangat sensitif terhadap cahaya, dan jika DPPH terpapar cahaya akan menyebabkan DPPH tidak stabil dan hasil yang didapatkan saat melakukan spektrofotometri akan tidak bagus, oleh karena itu dalam pengujian peredaman radikal bebas DPPH ini, dilakukan di tempat yang gelap (menutupi tabung reaksi dengan aluminium foil).

Penentuan panjang gelombang maksimum DPPH bertujuan untuk menentukan  $\lambda$  mana DPPH menyerap cahaya dengan intensitas tertinggi. Penentuan panjang gelombang maksimum DPPH dilakukan dengan cara mengambil sebanyak 3 mL larutan stok DPPH dan *discanning* menggunakan spektrofotometer pada panjang gelombang 400-800 nm. Penggunaan panjang gelombang cahaya tampak (*Visible Light*) dikarenakan larutan sampel yang digunakan merupakan larutan yang berwarna. Penentuan panjang gelombang yang telah dilakukan pada penelitian ini didapatkan  $\lambda$  max 515 nm yang dapat dilihat pada (Lampiran 8).

Selanjutnya dilakukan, *operating time* yang bertujuan untuk mengetahui waktu optimum reaksi antara baku pembanding dengan larutan uji DPPH yang diberikan. Penentuan *operating time* ini dilakukan dengan cara mengambil larutan kuersetin sebanyak 2 mL dan di reaksikan dengan larutan DPPH sebanyak 2 mL. setelah itu serapan dibaca pada panjang gelombang maksimum yang telah didapatkan sebelumnya, yaitu 515 nm dalam *time range* 0-60 menit (interval 1 menit). *Operating time* pada penelitian ini didapatkan absorbansi yang stabil pada menit ke 33 yang dapat dilihat pada (Lampiran 8).

Pembanding yang digunakan dalam penelitian peredaman radikal bebas DPPH ini, yaitu kuersetin. Kuersetin merupakan senyawa flavonoid golongan flavonol yang dapat ditemukan dalam daun alpukat (Anggorowati *et al.*, 2016). Pembanding kuersetin dibuat dalam larutan stok dengan konsentrasi 100 ppm yang dilakukan dengan cara menimbang kuersetin sebanyak 10 mg dalam etanol p.a 100

mL. Adanya kontaminasi dalam pelarut dapat mempengaruhi hasil pengukuran dan menghasilkan spektrum yang tidak akurat, oleh karena itu digunakan etanol dengan grade p.a yang mempunyai kemurnian tinggi.

Sampel dengan variasi konsentrasi ekstrak etanol daun alpukat dibuat larutan stok dengan cara menimbang 25 mg ekstrak daun alpukat dan dicampurkan dalam 50 mL etanol p.a sehingga diperoleh larutan baku 500 ppm. Pengujian peredaman radikal bebas ini dilakukan dengan membuat seri konsentrasi dari larutan stok pembanding kuersetin yang telah dibuat dengan konsentrasi 1 ppm; 1,5 ppm; 2 ppm; 2,5 ppm; 3 ppm dan membuat seri konsentrasi dari larutan stok tiap sampel ekstrak yang telah dibuat sebelumnya dengan konsentrasi 10 ppm; 15 ppm; 20 ppm; 25 ppm; 30 ppm.

Larutan uji dengan seri konsentrasi (50%, 70%, 96%) serta larutan pembanding kuersetin yang telah dibuat 5 seri konsentrasinya masing-masing di ambil sebanyak 2 mL, kemudian direaksikan seri konsentrasi yang ada dengan menggunakan DPPH sebanyak 1 mL dalam tabung reaksi yang telah terlapiasi oleh aluminium foil. Setelah semua bahan masuk, dilakukan inkubasi dalam tempat yang gelap selama 33 menit sesuai OT yang telah didapatkan sebelumnya. Tujuan inkubasi (OT) tersebut untuk memastikan bahwa reaksi antara larutan sampel (ekstrak etanol daun alpukat dan kuersetin) dan larutan DPPH terjadi secara optimal sebelum pengukuran aktivitas antioksidan dilakukan menggunakan spektrofotometer UV-Vis. Pembacaan absorbansi tiap konsentrasi dilakukan pengulangan sebanyak 3 kali. Hasil yang telah didapatkan  $IC_{50}$  kuersetin yaitu 3,759  $\mu\text{g/mL}$ . Sedangkan  $IC_{50}$  dari ketiga sampel, yaitu ekstrak etanol 50% (10,534  $\mu\text{g/mL}$ ), etanol 70% (4,489  $\mu\text{g/mL}$ ), dan ekstrak etanol 96% (6,580  $\mu\text{g/mL}$ ) yang dapat dilihat pada (Tabel 8, Tabel 9, Tabel 10, Tabel 11). Hasil tersebut semua sampel dikategorikan sebagai antioksidan yang sangat kuat dikarenakan memiliki nilai  $IC_{50} < 50$ .

Berdasarkan hasil pengujian peredaman radikal bebas DPPH yang telah dilakukan, didapatkan hasil  $IC_{50}$  berturut-turut dari yang tertinggi yaitu ekstrak etanol 70%, ekstrak etanol 96%, dan ekstrak etanol 50%. Hasil tersebut dapat disimpulkan bahwa untuk penelitian variasi konsentrasi etanol pada aktivitas

antioksidan ekstrak daun alpukat ini peredaman radikal bebas DPPH tertinggi ada pada konsentrasi sedang (70%). Hal tersebut sesuai dengan penelitian yang dilakukan oleh (Widarta & Arnata, 2017). Kuatnya aktivitas antioksidan pada ekstrak etanol 70% daun alpukat berhubungan dengan kandungan metabolit sekunder yang tersari pada proses ekstraksi.

Analisis yang terakhir, yaitu analisis statistik menggunakan *software* SPSS. Syarat dilakukannya uji statistik parametrik, yaitu dilakukannya uji normalitas dan uji homogenitas. Analisis tersebut bertujuan untuk mengetahui apakah data terdistribusi normal dan homogen atau tidak. Uji normalitas dilakukan dengan menggunakan metode *Shapiro Wilk*. Digunakannya metode *Shapiro Wilk* karena sampel yang digunakan merupakan sampel yang kecil  $< 50$ , sedangkan untuk uji homogenitas menggunakan metode *Levene's*. *Levene's* digunakan untuk melihat seberapa besar varian antara 2 data atau lebih yang berbeda. Apabila data yang telah diuji menunjukkan data tidak normal atau tidak homogen, maka dilakukan uji *Kruskal Wallis* sebagai pengganti uji. Berdasarkan hasil analisis yang telah dilakukan menunjukkan bahwa data  $IC_{50}$  yang diperoleh menunjukkan data yang normal dengan bukti nilai Sig. (signifikansi)  $> 0,05$  dan juga homogen dengan bukti nilai Sig. (signifikansi)  $> 0,05$  maka analisis dapat dilanjutkan dengan menggunakan uji *One Way Anova* untuk melihat apakah data memiliki perbedaan atau tidak. Berdasarkan hasil uji *One Way Anova* yang telah dilakukan dapat dilihat pada (Tabel 13) dan (Lampiran 10) didapatkan hasil  $< 0,001$  yang artinya data memiliki perbedaan secara signifikan. Setelah data dinyatakan normal dan homogen serta telah di uji *One Way Anova*, dilanjutkan dengan uji lanjut (*Post Hoc Test*) dengan metode *Benferroni* dikarenakan asumsi uji homogenitas terpenuhi. Jika asumsi uji homogenitas tidak terpenuhi, maka digunakan metode uji lanjut *Games-Howell*. Data uji lanjut (*Post Hoc Test*) dapat dilihat pada (Lampiran 10) yang dapat disimpulkan bahwa semua data dinyatakan berbeda secara nyata tiap sampel.