

BAB IV

HASIL DAN PEMBAHASAN

A. Hasil

1. Determinasi tanaman

Daun kayu bulan yang dimanfaatkan pada penelitian ini diperoleh dari Desa Nyemengan, Kecamatan Tirtonirmolo, Kecamatan Kasihan, Kabupaten Bantul, Daerah Istimewa Yogyakarta pada bulan April 2023. Proses identifikasi tumbuhan dilakukan di Laboratorium Sistematika Tumbuhan Fakultas Biologi Universitas Gadjah Mada Yogyakarta, pada tanggal 6 April 2023 dengan nomor referensi 0306/S.Tb/IV/2023. Hasil penetapan tersebut bisa dilihat pada **lampiran 2**.

2. Preparasi sampel

Sebanyak 3 kg daun kayu bulan dicuci bersih memanfaatkan air mengalir untuk menghilangkan partikel kotoran yang mungkin ada di permukaan daun. Selanjutnya, daun dibiarkan mengering secara alami di udara dan dirajang menjadi potongan-potongan kecil untuk mempercepat pengeringan secara keseluruhan (Lady Yunita Handoyo & Pranoto, 2020). Daun-daun tersebut dikeringkan di dalam oven dengan suhu 40°C selama tiga hari. Digunakan suhu 40°C karena didalam kandungan daun kayu bulan terdapat senyawa fenolik dan flavonoid yang termasuk senyawa tidak tahan panas sehingga apabila senyawa tersebut rusak maka akan menurunkan potensi dari antioksidan (Syafriada *et al.*, 2018). Sampel daun yang sudah kering selanjutnya di grinder hingga menjadi serbuk dan diayak dengan ayakan ukuran 40 mesh menghasilkan serbuk yang halus. Penyerbukan tersebut dilakukan agar membuat partikel serbuk menjadi lebih kecil sehingga luas permukaan partikel menjadi lebih besar yang dapat memudahkan saat dilakukan pengestraksian (Jayani & Handoyo, 2021).

3. Ekstraksi sampel

Serbuk halus daun kayu bulan yang telah disiapkan kemudian diekstraksi dengan metode maserasi. Dua pelarut yang berbeda yaitu etanol 70% dan etanol 96% dimanfaatkan dengan perbandingan 1:10 untuk proses ekstraksi. Proses maserasi melibatkan penetrasi dinding sel tumbuhan oleh pelarut, seperti etanol 70% dan etanol 96%, yang selanjutnya masuk ke dalam rongga sel yang mengandung zat aktif. Pelarutan zat aktif terjadi karena adanya gradien konsentrasi antara larutan intraseluler dan ekstraseluler, sehingga terjadi pengeluaran larutan pekat (Mus *et al.*, 2017). Proses maserasi dilakukan dengan cara merendam 250 g serbuk halus daun kayu bulan dalam larutan yang terdiri dari 2,5 L etanol teknis dengan konsentrasi 70% dan 96%. Maserasi berlangsung selama 5 hari dan dilakukan di lingkungan yang gelap, terlindung dari sinar matahari. Campuran diaduk setiap 3x24 jam. Proses pengadukan dilakukan dengan tujuan untuk mempercepat pelarutan senyawa zat aktif yang terdapat pada kayu daun bulan ke dalam pelarut. Kemudian dilakukan remaserasi agar memaksimalkan penyarian zat aktif yang terkandung dalam serbuk simplisia sampel daun kayu bulan selama 2 hari dengan pelarut etanol 70% dan 96% sejumlah setengah dari volume pada saat maserasi, yaitu 1,25 L dan disimpan kembali. Filtrat yang terkumpul selanjutnya dipekatkan dengan penguapan menggunakan penangas air yang dijaga pada suhu di bawah 50°C untuk menjamin terjaganya senyawa yang ada dalam sampel.

Dihasilkan ekstrak kental, dan nilai hasil yang dihasilkan ditunjukkan pada **Tabel 2**. Nilai hasil berkaitan dengan konsentrasi komponen bioaktif yang ada di tanaman, yang menunjukkan bahwa peningkatan hasil ekstrak sesuai dengan semakin tingginya zat yang tertarik pada tanaman tersebut (Senduk *et al.*, 2020). Syarat rendemen ekstrak kental yang baik nilainya tidak kurang dari 10% (Farmakope Herbal Indonesia, 2017).

Tabel 2. Hasil Rendemen Ekstrak Kental Daun Kayu Bulan

Sampel	Berat Simplisia (g)	Berat wadah + ekstrak (g)	Berat wadah kosong (g)	Berat ekstrak (g)	Rendemen (g)
Ekstrak etanol 70%	250 gr	370,14 gr	225,12 gr	145,02 gr	58,008%
Ekstrak etanol 96%	250 gr	393,07 gr	285,12 gr	107,95 gr	43,18%

4. Uji aktivitas antioksidan dengan metode DPPH

Metode DPPH dimanfaatkan untuk menilai aktivitas antioksidan. Metode ini bekerja berdasarkan prinsip bahwa senyawa antioksidan dapat mendonorkan atom hidrogennya untuk berikatan dengan elektron bebas pada senyawa radikal. Akibatnya, radikal bebas mengalami perubahan menjadi senyawa non-radikal, yang disertai dengan perubahan warna yang mencolok dari ungu tua menjadi kuning. Perubahan warna ini berfungsi sebagai indikator kapasitas sampel atau ekstrak untuk mengurangi keberadaan radikal bebas (Setiawan *et al.*, 2018). DPPH ini memiliki kekurangan dari metodenya yaitu DPPH radikal hanya bisa larut dalam pelarut organik sehingga untuk menganalisis senyawa yang bersifat hidrofilik agak sulit dan lebih cepat, metode ini sederhana serta murah untuk mengukur antioksidan (Shalaby & Shanab, 2013).

a. Penentuan panjang gelombang maksimum DPPH

Pengukuran panjang gelombang dilakukan dengan mengukur larutan DPPH yang telah direaksikan dengan kuersetin pada rentang panjang gelombang 400-600 nm. Penentuan panjang gelombang maksimum dilakukan untuk memastikan panjang gelombang yang dimanfaatkan dalam penilaian aktivitas antioksidan yang menghasilkan tingkat absorbansi tertinggi. Panjang gelombang DPPH yang diperoleh pada percobaan ini ialah 516 nm.

b. Penentuan *operating time* DPPH

Pengukuran waktu *operating time* dengan mengambil 2 mL larutan DPPH dan kemudian mengukur absorbansi pada panjang gelombang 516 nm pada interval

5 menit selama durasi 60 menit. Penentuan *operating time* ini dilakukan agar dapat mengetahui waktu pengukuran DPPH yang memberikan absorbansi stabil. *Operating time* yang didapatkan yaitu 24 menit.

c. Uji aktivitas antioksidan kuersetin dengan metode DPPH

Pada uji aktivitas antioksidan penelitian ini digunakan standar pembanding kuersetin karena kuersetin termasuk turunan flavonoid yang dapat digunakan sebagai antioksidan untuk menghambat radikal bebas DPPH. Pengujian aktivitas antioksidan kuersetin dilakukan dengan mereaksikan 1 mL kuersetin dengan 2 mL larutan DPPH kemudian diinkubasi selama 24 menit dan dibaca absorbansinya pada panjang gelombang 516 nm. Dilakukan replikasi sebanyak 2x agar mendapatkan kurva baku dengan nilai r (koefisien korelasi) mendekati satu.

Pengukuran radikal bebas dalam bentuk persentase menandakan kapasitas sampel untuk menghilangkan radikal bebas. Sebaliknya, IC_{50} (*Inhibition Concentration*) ialah parameter yang menghitung konsentrasi optimal sampel yang diperlukan untuk meredam radikal bebas sebesar 50%. Persamaan regresi linier diperoleh dengan memplot konsentrasi terhadap nilai persen dari parameter redaman radikal. Persamaan regresi linier dimanfaatkan untuk estimasi besarnya IC_{50} .

d. Uji aktivitas antioksidan sampel etanol ekstrak daun kayu bulan dengan metode DPPH

Uji aktivitas antioksidan pada sampel ekstrak etanol 70% dan 96% daun kayu bulan diambil 1 mL ditambah 2 mL larutan DPPH lalu diinkubasi selama 24 menit. Selanjutnya, ukur absorbansi pada panjang gelombang puncak 516 nm dan ulangi pengukuran dua kali. Nilai IC_{50} ditentukan dengan memanfaatkan persamaan regresi linier yang diperoleh dari korelasi antara persentase inhibisi dan konsentrasi sampel. Hasil penelitian dapat dilihat pada **Tabel 3**. Berlandaskan hasil tersebut bisa disimpulkan nilai IC_{50} dari kuersetin lebih baik

potensinya dalam meredam radikal bebas DPPH daripada nilai IC_{50} etanol 70% dan etanol 96%.

Tabel 3. Hasil Nilai IC_{50} Sampel Ekstrak Etanol Daun Kayu Bulan

No	Pelarut	Nilai $IC_{50} \pm SEM$	Kategori Antioksidan
1	Kuersetin	2,761 \pm 0,163	Sangat Kuat
2	Etanol 70%	1639,741 \pm 25,636	Sangat Lemah
3	Etanol 96%	2231,155 \pm 15,861	Sangat Lemah

5. Uji aktivitas antioksidan dengan ABTS

Uji aktivitas antioksidan dengan menggunakan ABTS memiliki prinsip inhibisi yaitu dengan cara menambahkan sampel pada sistem penghasil radikal bebas dan pengaruh inhibisi terhadap efek radikal bebas diukur untuk menentukan total kapasitas antioksidan dari sampel (Setiawan *et al.*, 2018). ABTS ini digunakan untuk mengevaluasi aktivitas peredaman radikal bebas dari suatu antioksidan alami. ABTS dihasilkan dengan mengoksidasi larutan kation ABTS dengan kalium persulfat. ABTS memiliki kelebihan dibandingkan DPPH karena dapat digunakan di sistem larutan berbasis air maupun organik mempunyai absorbansi yang spesifik pada panjang gelombang visibel dan dengan waktu yang singkat. Selain itu, ABTS juga memiliki tingkat sensitivitas lebih tinggi daripada DPPH (Shalaby & Shanab, 2013). ABTS didasarkan pada kemampuan senyawa menstabilkan senyawa radikal bebas dengan mendonorkan radikal proton.

a. Penentuan panjang gelombang maksimum ABTS

Pengukuran panjang gelombang dilakukan melalui penilaian larutan ABTS yang telah mengalami reaksi dengan kuersetin dalam spektrum panjang gelombang dari 700 hingga 750 nm. Penentuan panjang gelombang maksimum dilakukan untuk memastikan panjang gelombang yang dimanfaatkan dalam penilaian aktivitas antioksidan yang menghasilkan tingkat absorbansi tertinggi. Panjang gelombang ABTS ditentukan menjadi 746 nm.

b. Penentuan *operating time* ABTS

Penentuan *operating time* melibatkan pengukuran absorbansi pada panjang gelombang 746 nm setiap menit selama 45 menit, memanfaatkan 2 mL sampel larutan ABTS. Penentuan *operating time* ini dilakukan agar dapat mengetahui waktu pengukuran ABTS yang memberikan absorbansi stabil. *Operating time* yang didapatkan yaitu 14 menit.

c. Uji aktivitas antioksidan kuersetin dengan metode ABTS

Pada uji aktivitas antioksidan penelitian ini digunakan standar pembanding kuersetin dengan mereaksikan 1 mL kuersetin dengan 2 mL larutan ABTS kemudian diinkubasi selama 14 menit dan dibaca absorbansinya pada panjang gelombang 746 nm. Dilakukan replikasi sebanyak 2x agar mendapatkan kurva baku dengan nilai koefisien korelasi (r) paling bagus mendekati 1. Pada standar pembandingnya digunakan kuersetin karena termasuk turunan flavonoid yang dapat digunakan sebagai antioksidan untuk menghambat radikal bebas ABTS. Persentase peredaman radikal ialah ukuran kapasitas sampel untuk menghilangkan radikal bebas, sedangkan IC_{50} ialah parameter yang menandakan konsentrasi sampel di mana 50% radikal bebas secara efektif meredam ABTS. Persamaan regresi linier diperoleh dengan memplot konsentrasi terhadap nilai persen dari parameter redaman radikal. Persamaan regresi linier dimanfaatkan untuk penentuan besarnya IC_{50} .

d. Uji aktivitas antioksidan sampel etanol ekstrak daun kayu bulan dengan metode ABTS

Uji aktivitas antioksidan pada sampel ekstrak etanol 70% dan 96% daun kayu bulan menggunakan konsentrasi 50, 100, 150, 200, dan 250 ppm. Pada setiap seri konsentrasi diambil 1 mL ditambah 2 mL larutan ABTS lalu diinkubasi selama 14 menit. Selanjutnya, diukur absorbansi pada panjang gelombang maksimum yang ditentukan 746 nm, pengukuran diulang tiga kali untuk akurasi. Nilai IC_{50} ditentukan dengan memanfaatkan persamaan regresi linier yang diperoleh dari korelasi antara persentase inhibisi dan konsentrasi sampel. Hasil penelitian dapat

dilihat pada **Tabel 4**. Berlandaskan hasil tersebut bisa disimpulkan bahwa nilai IC_{50} dari kuersetin lebih baik potensinya dalam meredam radikal bebas ABTS daripada etanol 70% dan 96%.

Tabel 4. Hasil Nilai IC_{50} Sampel Ekstrak Etanol Daun Kayu Bulan

No	Pelarut	Nilai $IC_{50} \pm SEM$	Kategori Antioksidan
1	Kuersetin	1,373 \pm 0,019	Sangat Kuat
2	Etanol 70%	137,860 \pm 1,584	Sedang
3	Etanol 96%	192,174 \pm 4,454	Sedang

6. Analisis data

a. Analisis statistik DPPH

Data yang dikumpulkan di analisis statistik memanfaatkan perangkat lunak SPSS. Uji Levene's akan dimanfaatkan untuk menilai homogenitas data sampel. Selain itu, normalitas data sampel akan digunakan uji Shapiro-Wilk, karena data yang dikumpulkan terdiri dari kurang dari 50. Hasil dari analisis efek penghambatan ekstrak etanol 70% dan 96% terhadap radikal bebas **Tabel 5** menyajikan hasil yang menunjukkan bahwa data yang digunakan dalam penelitian homogen dan berdistribusi normal, yang dibuktikan dengan nilai signifikansi melebihi 0,05. Data menunjukkan homogen dan berdistribusi normal, selanjutnya dianalisis uji ANOVA untuk memastikan adanya perbedaan di antara ketiga sampel. Uji ANOVA dilakukan karena adanya lebih dari dua kelompok dalam sampel yang dianalisis. Uji ANOVA menghasilkan perbedaan yang signifikan secara statistik antara sampel, yang ditunjukkan dengan tingkat signifikansi kurang dari 0,05. Selanjutnya akan dilakukan *Post Hoc* Test dengan memanfaatkan uji LSD untuk mengetahui sampel mana yang menunjukkan perbedaan nyata secara statistik.

Tabel 5. Hasil Uji Statistik Nilai IC₅₀ Ekstrak Etanol Daun Kayu Bulan

Sampel	Nilai IC ₅₀ Ekstrak Etanol Daun Kayu Bulan			
	Homogenitas	Normalitas	ANOVA	LSD
Kuersetin		0,342**		<0,001 ^a
Etanol 70%	0,137*	0,838**	<0,001 ^a	<0,001 ^a
Etanol 96%		0,919**		<0,001 ^a

Keterangan: Sig.>0,05: Data homogen*, Sig.<0,05: Data terdistribusi normal**, Sig.<0,001: Terdapat perbedaan yang signifikan^a.

Analisis nilai IC₅₀ ekstrak etanol daun kayu bulan menunjukkan bahwa data yang diperoleh menunjukkan homogen dan berdistribusi normal yang ditunjukkan dengan nilai signifikansi lebih besar dari 0,05. Jika data menunjukkan homogen dan berdistribusi normal, uji ANOVA dimanfaatkan untuk menilai signifikansi statistik. Hasil yang diperoleh menunjukkan perbedaan yang signifikan di antara sampel, yang dibuktikan dengan tingkat signifikansi di bawah 0,05. Selain itu, uji *Post Hoc* menggunakan uji LSD dilakukan mengikuti setiap parameter uji untuk menentukan sampel yang menunjukkan perbedaan yang signifikan secara statistik.

b. Analisis statistik ABTS

Data yang diperoleh dilakukan analisis statistik dengan memanfaatkan *software* SPSS. Uji Levene's dilakukan untuk menilai homogenitas data sampel dan untuk menguji distribusi normal dari data sampel. Secara khusus, uji Shapiro-Wilk dimanfaatkan karena ukuran sampel kurang dari 50.

Tabel 6. Hasil Uji Statistik Nilai IC₅₀ Ekstrak Etanol Daun Kayu Bulan

Sampel	Nilai IC ₅₀ Ekstrak Etanol Daun Kayu Bulan			
	Homogenitas	Normalitas	Kruskal Wallis	Pairwise Comparisons
Kuersetin		0,493**		<0,001 ^a
Etanol 70%	0,020*	0,162**	0,027 ^b	<0,001 ^a
Etanol 96%		0,262**		<0,001 ^a

Keterangan: Sig.>0,05: Data homogen*, Sig.<0,05: Data terdistribusi normal**, Sig.<0,001: Terdapat perbedaan yang signifikan^a, Sig.>0,05: Tidak terdapat perbedaan yang signifikan^b

Diperoleh hasil analisis data nilai IC₅₀ ekstrak etanol daun kayu bulan pada uji normalitas yang terdistribusi normal dengan nilai signifikansinya >0,05.

Sedangkan dalam uji homogenitas, hasil uji yang diperoleh tidak homogen dengan nilai signifikansinya $<0,05$ sehingga dilanjutkan uji *Kruskal Wallis* dan uji *Post Hoc*. Pada uji *Kruskal Wallis* diperoleh hasil nilai 0,027 sehingga nilai tersebut $>0,05$ yang menunjukkan tidak terdapat perbedaan yang signifikan pada semua sampel ekstrak daun kayu bulan. Kemudian dilanjutkan dengan Uji *Post Hoc* menggunakan uji *Pairwise Comparisons* untuk mengetahui sampel mana yang berbeda signifikan. Hasil menunjukkan bahwa sampel ekstrak daun kayu bulan memiliki nilai signifikansi $<0,001$ yang berarti terdapat perbedaan yang signifikan antar sampel yang digunakan.

B. Pembahasan

Pada penelitian eksperimental laboratorium ini memanfaatkan sampel daun kayu bulan (*Pisonia alba* Span). Metode maserasi digunakan untuk mengekstraksi daun kayu bulan, memanfaatkan etanol sebagai pelarut. Etanol dipilih karena memiliki gugus hidroksil yang mampu membentuk ikatan hidrogen dengan gugus hidroksil dari senyawa flavonoid sehingga meningkatkan kelarutan senyawa fenolik (Riwanti *et al.*, 2018). Selain itu, sifat pelarutnya yang universal dan juga memiliki tingkat ekstraksi yang tinggi serta etanol relatif tidak toksik dibanding dengan pelarut yang lain seperti aseton dan metanol (Hasanah & Novian, 2020). Terdapat dua konsentrasi pelarut etanol yang digunakan dalam penelitian ini yaitu 70% dan 96%. Pelarut dengan konsentrasi yang berbeda dapat mempengaruhi hasil ekstraksi yang dapat menyebabkan perubahan polaritas pelarut sehingga mempengaruhi kelarutan senyawa aktif (Hakim & Saputri, 2020). Perbedaan konsentrasi pelarut dapat berpengaruh terhadap banyaknya senyawa aktif yang akan diambil pada saat maserasi karena semakin mirip polaritas pelarut dengan senyawa aktif, maka semakin cepat terlarut senyawa aktif tersebut. Senyawa aktif yang diambil pada daun kayu bulan ini yaitu senyawa fenolik dan flavonoid. Kedua senyawa tersebut memiliki sifat polar sehingga dapat diekstraksi dengan pelarut etanol dan berpotensi sebagai antioksidan (Hanin & Pratiwi, 2017). Pelarut ekstraksi yang digunakan etanol 70% dan 96% memiliki tingkat kepolaran yang berbeda dimana

lebih polar etanol 70% dari pada etanol 96%. Hal tersebut sesuai dengan hasil ekstrak yang didapatkan dilihat dari nilai rendemen dinyatakan bahwa rendemen ekstrak etanol 70% lebih besar yaitu 58,008% sedangkan rendemen ekstrak etanol 96% yaitu 43,18%. Dari hasil tersebut dapat dikatakan bahwa etanol 70% dapat menarik lebih banyak sampel daun kayu bulan dalam ekstraksi maserasi. Namun nilai rendemen yang diperoleh dari kedua ekstrak tersebut sangat besar karena waktu pada saat proses pemekatan kurang maksimal sehingga kadar air yang dihasilkan masih tinggi.

Penelitian ini dilakukan uji dengan DPPH dan ABTS karena daun kayu bulan memiliki aktivitas sebagai antioksidan. Menurut Matheos *et al.*, (2014) terdapat senyawa fenolik yang terkandung dalam daun kayu bulan sehingga pada daun kayu bulan tersebut memiliki aktivitas antioksidan yang cukup baik untuk menangkal radikal bebas. Uji aktivitas dengan metode DPPH sering digunakan karena metode ini sederhana dan cepat untuk mengukur antioksidan. Metode DPPH ini memiliki prinsip dengan adanya atom hidrogen dari senyawa radikal yang dapat menyebabkan perubahan radikal bebas tersebut menjadi senyawa non radikal. Perubahan tersebut ditandai dengan adanya reaksi perubahan warna ungu menjadi kuning yang menandakan terdapat kemampuan sampel atau ekstrak dalam meredam aktivitas radikal bebas DPPH (Suyatmi *et al.*, 2019), sedangkan metode ABTS dianggap lebih unggul dari metode DPPH karena sensitivitasnya yang lebih tinggi. Hal ini disebabkan penggunaan metode ABTS untuk uji kehilangan warna kation ABTS, yang memungkinkan interaksi langsung dengan radikal kation ABTS untuk mengukur kapasitas antioksidan. Senyawa ABTS menunjukkan rona biru-hijau yang khas, yang dapat diubah dari keadaan berwarna menjadi keadaan tidak berwarna melalui reduksi oleh antioksidan (Raharjo *et al.*, 2022). Pada pengujian antioksidan menggunakan DPPH pada ekstrak etanol daun kayu bulan diperoleh nilai IC_{50} pada ekstrak etanol 70% sebesar $1639,741 \pm 25,636$ ppm dan pada ekstrak etanol 96% sebesar $2231,155 \pm 15,861$ ppm. Kemudian diperoleh hasil bahwa ekstrak etanol 70% lebih baik daripada ekstrak etanol 96% dengan memiliki perbedaan yang signifikan ditunjukkan dengan nilai sig $< 0,05$. Hal yang sama terjadi pada pengujian menggunakan

ABTS diperoleh nilai IC_{50} pada ekstrak etanol 70% juga lebih baik daripada ekstrak etanol 96% dengan nilai IC_{50} ekstrak etanol 70% sebesar $137,860 \pm 1,584$ ppm dan pada ekstrak etanol 96% sebesar $192,174 \pm 4,454$ ppm dengan memiliki perbedaan yang signifikan dengan nilai sig $< 0,05$. Pada uji aktivitas antioksidan dengan standar pembanding kuersetin diperoleh nilai IC_{50} pada metode DPPH sebesar $2,761 \pm 0,163$ dan nilai IC_{50} pada metode ABTS sebesar $1,373 \pm 0,019$ sehingga dapat dikatakan kuersetin masuk dalam kategori antioksidan yang sangat kuat. Dari hasil nilai IC_{50} standar kuersetin tersebut terdapat perbedaan yang signifikan dengan nilai sig $< 0,05$ antara standar dan sampel etanol 70% dan 96%, hal tersebut dikarenakan kuersetin merupakan senyawa murni dibandingkan ekstrak etanol 70% dan 96% daun kayu bulan yang kemungkinan masih terdapat senyawa lain yang tidak memiliki aktivitas antioksidan.

Berdasarkan hasil uji antioksidan pada kedua metode diperoleh bahwa kemampuan aktivitas antioksidan pada metode ABTS lebih baik dibandingkan dengan DPPH. Hal ini dikarenakan ABTS memiliki sensitivitas yang cukup tinggi dalam mengukur jumlah radikal bebas, efektif serta ABTS dan DPPH memiliki mekanisme aksi yang berbeda (Faisal, 2019). Pada DPPH berdasarkan kemampuan senyawa antioksidan dalam mendonorkan hidrogen, sedangkan pada ABTS kemampuan antioksidan untuk menstabilkan radikal bebas dengan mendonorkan proton (Fitriana *et al.*, 2015). Apabila dibandingkan antara konsentrasi pelarut etanol 70% dan 96% diperoleh adanya perbedaan signifikan dengan nilai sig $< 0,05$ baik pada metode DPPH maupun ABTS. Hal ini berkaitan dengan polaritas yang berbeda antara 70% dan 96%. Pelarut etanol 70% memiliki sifat yang lebih polar daripada pelarut etanol 96% sehingga senyawa seperti fenolik dan flavonoid yang terkandung dalam daun kayu bulan yang bersifat polar cenderung terlarut lebih banyak pada etanol 70% (Kemit *et al.*, 2016). Adanya suatu perbedaan konsentrasi pada pelarut etanol dapat berpengaruh terhadap tingkat polaritas suatu pelarut. Semakin tinggi konsentrasi pelarut maka semakin rendah tingkat kepolarannya.