

BAB IV HASIL DAN PEMBAHASAN

A. Hasil

1. Determinasi

Determinasi dilakukan pada 1 Juli 2024 di Laboratorium Biologi, Fakultas Sains dan Ilmu Terapan, Universitas Ahmad Dahlan Yogyakarta. Hasilnya menunjukkan bahwa tanaman yang diteliti adalah Daun Alpukat (*Persea americana* Mill.) dan Daun Salam (*Syzygium polyanthum* (Wight) Walp). (Lihat Lampiran 2)

2. Penyiapan Sampel

Sampel diambil dari Rojosari, Kelurahan Sardonoharjo, Kecamatan Ngaglik, Kabupaten Sleman, Daerah Istimewa Yogyakarta. Pada pagi hari, dipanen sebanyak 2,2 kg daun alpukat dan 1,4 kg daun salam. Daun-daun tersebut kemudian disortasi dengan memilih daun yang baik dan bebas dari kerusakan. Proses ini bertujuan untuk meminimalisir kontaminan dan benda asing yang mungkin menempel. Selanjutnya, daun dicuci pada air yang mengalir kemudian dikeringkan dengan menggunakan oven suhu 50°C dalam waktu 48 jam. Simplisia yang telah dihaluskan dan diayak menghasilkan bobot sebesar 750 g serbuk daun alpukat dan 407 g serbuk daun salam.

3. Ekstraksi Daun Alpukat dan Daun Salam

Ekstraksi daun alpukat dan daun salam menggunakan metode maserasi menggunakan etanol 96% (1:10 b/v) selama tiga hari, diikuti remaserasi satu hari. Ekstrak yang dihasilkan diuapkan hingga kental, dan persentase rendemen dihitung. Persentase rendemen ekstrak daun alpukat adalah 15,685%, sementara daun salam 4,100% (lihat Tabel 3).

Tabel 3. Hasil Rendemen Ekstrak Etanol Daun Alpukat dan Daun Salam

Sampel	Berat serbuk (g)	Berat ekstrak kental (g)	%Rendemen
Daun alpukat	100	15,685	15,685
Daun salam	100	4,100	4,100

Hasil dari perhitungan % rendemen menunjukkan ekstrak daun alpukat menghasilkan % rendemen yang lebih tinggi apabila dibandingkan ekstrak daun salam. Berdasarkan Farmakope Herbal Indonesia Edisi II tahun 2017 menunjukkan sampel ekstrak daun alpukat memenuhi syarat >10%, sedangkan daun salam tidak memenuhi syarat karena kurang dari 10% (Depkes RI, 2017).

4. Uji Organoleptik

Hasil uji organoleptik meliputi bau, tekstur dan warna pada masing-masing sampel dengan hasil pada Tabel 4 dibawah.

Tabel 4. Hasil Pengamatan Uji Organoleptis Ekstrak Daun Alpukat dan Daun Salam.

Uji Organoleptik	Daun Alpukat	Teori (Cempaka <i>et al.</i> , 2023)	Daun Salam	Teori (Rahmat <i>et al.</i> , 2020)
Bau	Khas	Khas	Khas	khas
Tekstur	Kental	Semipadat	Kental-Padat	Keras-padat
Warna	Hijau-Kehitaman	Coklat kehijaun	Hijau Pekat	Hijau gelap

5. Skrining Fitokimia

Hasil dari skrining fitokimia ekstrak daun alpukat dan daun salam didapatkan bahwa masing-masing ekstrak mengandung senyawa flavonoid, senyawa fenolik, senyawa alkaloid, dan senyawa saponin.

Tabel 5. Hasil Skrining Fitokimia

Jenis uji	Ekstrak daun alpukat	Ekstrak daun salam
Flavonoid	+	+
Fenolik	+	+
Alkaloid		
Dragendroff	+	+
Mayer	+	+
Wagner	+	+
Terpenoid	-	-
Saponin	+	+

Keterangan:

(+) = Positif mengandung senyawa

(-) = Negatif mengandung senyawa

6. Hasil Peredaman Radikal Bebas DPPH

a. Penentuan panjang gelombang maksimal DPPH

Dilakukan penentuan panjang gelombang maksimal DPPH yang bertujuan untuk menentukan larutan uji dalam meredam radikal bebas DPPH (Putri & Mahfur, 2023). Panjang gelombang maksimal yang diperoleh adalah 515 nm (Lampiran 9). Hasil yang diperoleh sejalan dengan penelitian yang dilakukan oleh Haryani *et al.*, (2019) dengan hasil 515 nm. Penetapan panjang gelombang maksimum penting untuk larutan DPPH karena memungkinkan untuk menghitung absorbansi dimana larutan paling aktif dalam spektrofotometri UV-Vis (Saptari *et al.*, 2019).

b. Penentuan *operating time*

Penentuan waktu *operating time* untuk mengetahui waktu yang diperlukan larutan uji dalam meredam radikal bebas DPPH (Putri & Mahfur, 2023). *Operating time* pada penelitian ini dilakukan selama 60 menit dengan interval waktu 1 menit. Hasil absorbansi yang stabil diperoleh pada menit 27 sampai menit 42. Sehingga *operating time* yang digunakan adalah 27 menit. Hasil tersebut sama dengan penelitian (Firdausia *et al.*, 2023) yaitu sebesar 27 menit.

c. Penetapan aktivitas peradaman radikal bebas DPPH

Peredaman radikal bebas DPPH dilakukan pada standar kuersetin, ekstrak tunggal serta kombinasi ekstrak daun alpukat dan daun salam. Uji tersebut dilakukan dengan mereaksikan dengan mengambil 1 mL standar atau sampel dengan 2 mL larutan DPPH dan dilakukan inkubasi selama *operating time* waktu 27 menit dan dapat dilakukan pembacaan pada panjang gelombang maksimal yaitu 515 nm. Direplikasi tiga kali untuk meningkatkan akurasi hasil.

Tabel 6. Hasil Penetapan Radikal Bebas DPPH Daun Alpukat

Sampel	IC₅₀ (ppm)	Kategori (Nasution <i>et al.</i> ,2015)
Kuersetin	3,093	Sangat kuat
Ekstrak tunggal daun alpukat	18,917	Sangat kuat
Ekstrak tunggal daun salam	17,569	Sangat kuat
Kombinasi ekstrak daun alpukat dan daun salam (1:1)	14,083	Sangat kuat

Uji aktivitas peredaman radikal bebas DPPH menunjukkan hasil standar kuersetin, ekstrak tunggal daun alpukat dan daun salam, serta kombinasi dari daun alpukat dan daun salam dengan nilai IC₅₀ yang didapatkan hasilnya berbeda-beda seperti pada Tabel 6. Dari hasil tersebut standar kuersetin menghasilkan nilai IC₅₀ sangat kuat yaitu 3,093 ppm. Ekstrak tunggal daun alpukat memberikan nilai IC₅₀ 18,917 ppm dan ekstrak tunggal daun salam sebesar 17,569 ppm, sedangkan kombinasi ekstrak daun alpukat dan daun salam menghasilkan nilai IC₅₀ sebesar 14,083 ppm. Berdasarkan hasil disimpulkan bahwa kombinasi dari ekstrak daun alpukat dan daun salam menghasilkan nilai IC₅₀ paling kecil dibandingkan ekstrak tunggalnya. Semakin rendah nilai IC₅₀, semakin kuat aktivitas peredaman radikal bebas (Maryam, 2015).

7. Analisis Data

Analisis hasil nilai IC₅₀ dari uji aktivitas peredaman radikal bebas DPPH standar kuersetin, ekstrak tunggal dan kombinasi ekstrak daun alpukat dan daun salam dilakukan menggunakan SPSS. Hal ini diperlukan karena terdapat perbedaan nilai IC₅₀ dari larutan standar kuersetin, ekstrak tunggal dan kombinasi daun alpukat dan daun salam. Analisis statistik diamati dengan uji normalitas menggunakan *Shapiro-wilk* dan uji homogenitas dengan *Levene statistic*. Berdasarkan Tabel 7, data yang terdistribusi normal dan homogen apabila ($p > 0,05$). Kemudian dilanjutkan dengan uji ANOVA *one way*, menunjukkan perbedaan signifikan ($p < 0,05$) antara nilai IC₅₀ kuersetin, ekstrak tunggal, kombinasi ekstrak daun alpukat dan daun salam.

Tabel 7. Hasil Analisis Peredaman Radikal Bebas DPPH

No	Ekstrak (IC ₅₀)	Normalitas (<i>Shapiro Wilk</i>)	Homogenitas (<i>Levene Statistic</i>)	ANOVA
1	Kuersetin	0,994		
2	Daun alpukat	0,305	0,161	<0,001
3	Daun salam	0,975		
4	Kombinasi	0,791		

B. Pembahasan

Penelitian ini bertujuan untuk mengetahui aktivitas peredaman radikal bebas DPPH dari ekstrak tunggal dan kombinasi ekstrak daun alpukat dan daun salam (1:1). Tanaman dideterminasi untuk memastikan keaslian tanaman (Lampiran 2). Setiap tanaman dilakukan proses pengeringan dalam oven pada suhu 50°C agar cepat terjadinya penguapan pelarut tanpa merusak senyawa antioksidan pada ekstrak (Sayakti *et al.*, 2022). Sampel kering dilakukan penghalusan untuk memperkecil ukuran partikel, sehingga memperluas permukaan dan memudahkan pelarut mengekstraksi senyawa aktif dari simplisia (Kusumawardany *et al.*, 2023). Sampel diayak dengan tujuan untuk menyeragamkan ukuran partikel. Ukuran partikel yang seragam meningkatkan luas permukaan, sehingga mempercepat kelarutan zat (Tambun *et al.*, 2016).

Sampel diekstraksi menggunakan metode maserasi dengan prinsip merendamkan bubuk simplisia menggunakan pelarut yang sesuai dengan temperatur ruangan dan terlindung dari cahaya (Tantrayana & Elok, 2015). Keuntungan metode maserasi adalah kesederhanaannya dan tanpa pemanasan, sehingga mencegah kerusakan atau kehilangan zat aktif (Yasacaxena *et al.*, 2023). Pada proses ekstraksi dilakukan remaserasi dilakukan untuk menarik senyawa yang mungkin belum terambil pada proses maserasi sebelumnya (Nadia *et al.*, 2016). Pelarut ekstraksi menggunakan etanol 96% karena sifat yang diinginkan, termasuk polaritas, aksesibilitas, kurangnya toksisitas, penyerapan yang baik dan kapasitas yang besar untuk mengekstrak molekul polar salah satunya flavonoid (Nugrahani *et al.*, 2016). Ekstrak kental yang diperoleh dengan cara menguapkan filtrat menggunakan penangas air yang

diatur pada suhu 60°C. Suhu tersebut dipilih untuk mempercepat penguapan pelarut tanpa merusak senyawa antioksidan dalam ekstrak (Sayakti *et al.*, 2022).

Ekstrak kental yang diperoleh dihitung nilai % rendemennya. Pada penelitian ini didapatkan % rendemen ekstrak daun alpukat sebesar 15,685% dan ekstrak daun salam sebesar 4,100%. Persyaratan % rendemen yang baik menurut Farmakope Herbal Indonesia Edisi II tahun 2017 yaitu > 10% (Depkes RI, 2017). Hasil % rendemen menunjukkan ekstrak daun alpukat memenuhi persyaratan sedangkan ekstrak daun salam tidak memenuhi persyaratan. Besar atau kecilnya suatu rendemen yang didapat pada proses ekstraksi merupakan faktor penting untuk menentukan sejauh manakah proses tersebut berhasil. Besarnya suatu rendemen juga menggambarkan jumlah senyawa aktif yang berhasil diambil pada zat (Vifta *et al.*, 2017).

Komponen metabolit sekunder yang terdapat dalam ekstrak alpukat dan daun salam ditentukan dengan menggunakan uji fitokimia. Senyawa yang diuji meliputi flavonoid, fenolik, terpenoid, alkaloid dan saponin. Berdasarkan hasil uji skrining fitokimia daun alpukat mengandung flavonoid, fenolik, alkaloid dan saponin hasil tersebut sesuai pada penelitian sebelumnya yang dilaporkan oleh Tingo *et al.*, (2013) bahwa daun alpukat mengandung senyawa tersebut. Hasil skiring fitokimia pada penelitian ini juga menunjukkan bahwa daun salam mengandung flavonoid, fenolik, alkaloid dan saponin yang sesuai dengan penelitian (Arukwe *et al.*, 2012).

Ekstrak daun alpukat dan daun salam menghasilkan warna jingga yang menunjukkan positif mengandung senyawa flavonoid. Menurut Mukhollif (2016), ketika asam klorida dan serbuk magnesium ditambahkan ke dalam uji flavonoid, maka akan menghasilkan gelembung-gelembung H₂ dan logam. Gelembung-gelembung ini akan mengurangi inti benzopiron yang ada pada senyawa flavonoid, sehingga didapatkan warna jingga kemerahan. Pada sampel ekstrak daun alpukat dan daun salam positif mengandung fenolik ditandai adanya warna hijau kehitaman ketika ditambahkan FeCl₃ 1%. Warna-warna ini dihasilkan ketika FeCl₃ bergabung dengan gugus hidroksil yang terdapat dalam molekul fenol (Putri *et al.*, 2018).

Uji alkaloid pada sampel menunjukkan hasil yang positif pada reagen Mayer ditunjukkan dengan timbulnya endapan warna putih, pada reagen Wagner terbentuknya endapan coklat dan pada reagen Dragendroff terbentuknya endapan warna merah jingga. Pada uji Mayer sampel menghasilkan endapan berwarna putih, endapan putih yang terbentuk disebabkan oleh perubahan ligan pada reagen Mayer, yang terdapat kandungan kalium iodida dan merkuri klorida. Reaksi ini menghasilkan senyawa Kalium-Alkaloid (Nofitarini *et al.*, 2019). Pada uji Wagner, endapan coklat terbentuk karena ion K^+ berikatan kovalen dengan nitrogen pada alkaloid, yang dapat terbentuk kompleks kalium-alkaloid yang mengendap (Fajrin & Susilo 2019). Pada uji Dragendroff menghasilkan endapan berwarna jingga yang disebabkan adanya ikatan kovalen koordinat antara nitrogen sampel yang mengandung alkaloid dengan K^+ dari pereaksi Dragendroff ($K[BiHl_4]$) (Fajrin & Susilo 2019)

Pereaksi Lieberman-Burchard berisikan campuran antara larutan asetat anhidrat dengan asam sulfat yang digunakan dalam menentukan ada tidaknya senyawa terpenoid. Asetat anhidrat pekat dituangkan melalui dinding tabung reaksi, menyebabkannya bereaksi dengan asam. Karboksilasi yang terbentuk berinteraksi dengan atom oksigen pada gugus $-OH$ senyawa triterpenoid. Pada reaksi khusus ini, molekul triterpenoid bereaksi dengan asetat anhidrat menghasilkan senyawa ester (Takaeb & Leo, 2023). Hasil positif ketika terbentuk warna cincin kecoklatan (Maravirnadita, 2019), hasil uji menunjukkan bahwa ekstrak daun alpukat dan daun salam negatif terpenoid. Hasil uji saponin pada ekstrak daun alpukat dan daun salam menghasilkan hasil positif, didapatkan bentuk busa yang stabil pada sampel. Busa muncul karena karena sifat saponin dapat larut didalam air dan menghasilkan busa saat dikocok (Nugrahani *et al.*, 2016; Suharto *et al.*, 2012).

Pengujian peredaman radikal bebas DPPH melibatkan reaksi antara senyawa antioksidan dan DPPH, di mana antioksidan menyumbangkan atom hidrogen, mengubah warna larutan dari ungu menjadi kuning (Ngibad & Lestari, 2020). Souhoka *et al.*, (2019) menyatakan bahwa spektrofotometer UV-Vis dapat untuk memastikan kemampuan radikal bebas DPPH dalam meredam stres

oksidatif dengan mengamati perubahan data absorbansi yang sesuai dengan panjang gelombang maksimum DPPH, yang berada pada rentang 490-534 nm. Panjang gelombang maksimal yang tercatat adalah 515 nm, hasil tersebut sesuai dengan penelitian Haryani *et al.*, (2019). Kemudian dilakukan *operating time* untuk melihat pada waktu berapa sampel dapat bereaksi dengan DPPH secara maksimal, sehingga pada penelitian ini didapatkan waktu ke-27. Hasil *operating time* tidak jauh berbeda dengan penelitian (Firdausia *et al.*, 2023)

Hasil uji peredaman radikal bebas DPPH diperoleh nilai IC₅₀ standar kuersetin 3,093 ppm, ekstrak tunggal daun alpukat sebesar 18,313 ppm, ekstrak tunggal daun salam sebesar 17,543 ppm dan kombinasi ekstrak daun alpukat dan daun salam sebesar 14,083 ppm yang dikategorikan sebagai antioksidan yang sangat kuat karena <50 (Indrawati *et al.*, 2022). Nilai IC₅₀ adalah konsentrasi antioksidan yang diperlukan untuk meredam 50% radikal bebas DPPH. Semakin kecil nilai IC₅₀ yang didapatkan, semakin kuat aktivitas antioksidannya. Berdasarkan hasil yang diperoleh, IC₅₀ terbaik terdapat pada kuersetin dengan nilai 3,093 ppm termasuk kategori sangat kuat. Pengujian aktivitas antioksidan dilakukan dengan menggunakan kuersetin sebagai pembanding untuk menilai aktivitas antioksidan ekstrak daun alpukat dan daun salam. Kuersetin adalah antioksidan murni, sehingga hasil pengujian ini dapat menunjukkan seberapa kuat aktivitas antioksidan dari ekstrak daun alpukat dan daun salam jika dibandingkan dengan antioksidan murni tersebut (Anam *et al.*, 2014).

Ekstrak tunggal daun alpukat dan daun salam menghasilkan nilai Kombinasi ekstrak daun alpukat dan daun salam yang diperoleh menghasilkan nilai IC₅₀ 18,917 ppm dan 16,196 ppm secara berturut-turut dengan kategori antioksidan sangat kuat. Kombinasi antara kedua ekstrak tersebut menghasilkan nilai IC₅₀ 14,181 ppm yang lebih baik dibandingkan masing-masing ekstrak tunggal. Hasil ini sesuai pada penelitian amalia *et al.*, (2023) kombinasi ekstrak kulit pisang kapok dan buah naga merah menghasilkan nilai IC₅₀ sebesar 19,50 dikategorikan sangat kuat. Hal ini mengindikasikan bahwa kombinasi ekstrak daun alpukat dan daun salam lebih diutamakan untuk meredam radikal bebas

DPPH dibandingkan dengan ekstrak tunggalnya. Hal tersebut menandakan bahwa terdapat efek sinergis ketika dua ekstrak dikombinasikan.

Analisis statistik penelitian ini, uji One-Way ANOVA diterapkan untuk membandingkan nilai IC_{50} dari kuersetin, ekstrak tunggal daun alpukat, ekstrak tunggal daun salam, serta kombinasi ekstrak daun alpukat dan daun salam. Sebelum melaksanakan uji ANOVA One-Way, dilakukan dua uji pendahuluan yaitu uji normalitas dengan metode Shapiro-Wilk dan uji homogenitas menggunakan tes Levene, keduanya dengan taraf kepercayaan 95%. Uji normalitas dan homogenitas bertujuan untuk memastikan bahwa data IC_{50} terdistribusi normal dan homogen, dimana hasil signifikansi $>0,05$ menunjukkan bahwa data terdistribusi normal dan homogen. Hasil *One-Way* ANOVA kemudian terdapat perbedaan yang signifikan antar kelompok ($0,001 < 0,05$). Berdasarkan hasil yang didapatkan, disimpulkan bahwa masing-masing ekstrak tunggal dan kombinasi memiliki perbedaan aktivitas penangkap radikal bebas DPPH secara signifikan.

Pada penelitian ini data nilai absorbansi ekstrak daun alpukat tunggal konsentrasi 100 ppm, ekstrak daun salam tunggal 60, 80, 100 ppm, kombinasi ekstrak daun alpukat dan salam 80, 100 ppm tidak berada pada rentang absorbansi baik yang ditentukan yaitu 0,2 sampai 0,8 yang tidak sesuai dengan hukum Lambert-Beer (Ahriani *et al.*, 2021). Oleh karena itu diperlukan pengecekan nilai absorbansi kembali untuk menghasilkan data yang lebih baik.