

**UJI ANTIOKSIDAN DAN UJI TOKSISITAS AKUT DARI KOMBINASI
EKSTRAK BUAH KELAPA SAWIT MERAH, DAUN SALAM KOJA DAN
BIJI BUAH MARKISA**

SKRIPSI

Oleh :

FEBRI PADHILAH

066120105



**PROGRAM STUDI FARMASI
FAKULTAS MATEMATIKA DAN ILMU PENGETAHUAN ALAM
UNIVERSITAS PAKUAN
BOGOR
2024**

**UJI ANTIOKSIDAN DAN UJI TOKSISITAS AKUT DARI KOMBINASI
EKSTRAK BUAH KELAPA SAWIT MERAH, DAUN SALAM KOJA DAN
BIJI BUAH MARKISA**

SKRIPSI

**Skripsi Diajukan Sebagai Salah Satu Syarat Untuk Memperoleh Gelar
Sarjana Pada Program Studi Farmasi Fakultas Matematika dan Ilmu
Pengetahuan Alam Universitas Pakuan**

**Oleh :
FEBRI PADHILAH
066120105**



**PROGRAM STUDI FARMASI
FAKULTAS MATEMATIKA DAN ILMU PENGETAHUAN ALAM
UNIVERSITAS PAKUAN
BOGOR
2024**

HALAMAN PENGESAHAN

**Judul Tugas Akhir : UJI ANTIOKSIDAN DAN UJI TOKSISITAS AKUT
DARI KOMBINASI EKSTRAK BUAH KELAPA
SAWIT MERAH, DAUN SALAM KOJA DAN BIJI
BUAH MARKISA**

Nama : Febri Padhilah

NPM : 066120105

Program Studi : Farmasi

Skripsi ini telah disetujui dan disahkan :

Bogor, Agustus 2024

Pembimbing Pendamping



Nina Herlina, S.Farm., M.Si.

Pembimbing Utama



Yulianita, M.Farm.

Mengetahui,

Ketua Program Studi Farmasi



apt. Dra. Ike Yulia Wiendarlina, M.Farm.

Dekan FMIPA-UNPAK



Asep Denih, S.Kom., M.Sc., Ph.D.

PERNYATAAN KEASLIAN KARYA TULIS

Saya yang bertanda tangan di bawah ini :

Nama : Febri Padhilah

Npm : 066120105

Judul Skripsi : Uji Antioksidan dan Uji Toksisitas Akut dari Kombinasi Ekstrak Buah Kelapa Sawit Merah, Daun Salam Koja dan Biji Buah Markisa.

Dengan ini saya menyatakan bahwa skripsi ini adalah karya tulis yang dikerjakan sendiri dan tidak pernah dipublikasikan atau digunakan untuk mendapat gelar sarjana diperguruan tinggi atau lembaga lainnya.

Demikian pernyataan ini saya buat dengan sebenar-benarnya. Apabila dikemudian hari terdapat gugatan, penulis bersedia dikenakan sanksi sesuai dengan peraturan yang berlaku.

Bogor, Agustus 2024



**PERNYATAAN MENGENAI TUGAS AKHIR DAN SUMBER
INFORMASI SERTA PELIMPAHAN HAK CIPTA**

Judul Tugas Akhir : Uji Antioksidan dan Uji Toksisitas Akut dari Kombinasi Ekstrak Buah Kelapa Sawit Merah, Daun Salam Koja dan Biji Buah Markisa.

Nama : Febri Padhilah

NPM : 066120105

Dengan ini saya menyatakan bahwa tugas akhir diatas adalah benar karya saya dengan arahan dari komisi pembimbing dan belum diajukan dalam bentuk apapun kepada perguruan tinggi manapun. Sumber informasi yang berasal atau dikutip dari karya yang diterbitkan maupun tidak diterbitkan dari penulis lain telah disebutkan dalam teks dan dicantumkan dalam Daftar Pustaka dibagian akhir dari tugas akhir ini. Dengan ini saya, melimpahkan hak cipta dari karya tulis ini kepada Universitas Pakuan.

Bogor, Agustus 2024



Febri Padhilah

HALAMAN PERSEMBAHAN

Alhamdulillah,

Dengan penuh rasa syukur dan kerendahan hati, saya mengucapkan terima kasih kepada Allah Yang Maha Pengasih dan Maha Penyayang, karena telah memberikan kemudahan, kesehatan, dan kelancaran dalam perjalanan menyelesaikan skripsi ini dengan baik. Hanya dengan karunia-Nya, segala halangan dan rintangan dapat saya lalui dengan tegar. Dengan limpahan rahmat dan petunjuk-Nya, penulis dapat mengatasi berbagai tantangan dan menjalani proses penulisan skripsi ini dengan penuh keyakinan dan keikhlasan.

Skripsi yang penuh perjuangan dan istimewa ini, saya persembahkan untuk mereka yang sangat saya hormati, saya sayangi, saya cintai dan berkat merekalah karya tulis ini dapat selesai tepat 4 tahun sebelum masa kuliah saya selesai.

Untuk keluargaku tercinta. Papah, mamah, dan adek yang sudah menjadi tiang kokoh dalam hidupku ini, dengan rasa cinta dan terima kasih, saya persembahkan skripsi ini sebagai bukti pengabdian atas segala doa, pengorbanan, semangat serta dukungan dalam segala hal baik materi maupun kasih sayang yang tak pernah pudar dan juga restu kalian selama ini. Kata-kata tidak akan mampu mencukupi betapa besar rasa syukur kepada kalian. Kalian telah mengajarkan arti keteguhan, keberanian, kejujuran, dan keikhlasan yang semuanya terasa begitu berharga dalam upaya menyelesaikan skripsi ini.

Untuk kedua dosen pembimbing yang saya hormati. Ibu Yulianita, M.Farm. dan ibu Nina Herlina, S.Farm., M.Si. saya mengucapkan terima kasih yang tak terhingga atas kesabaran, dukungan, ilmu pengetahuan yang saya dapatkan selama ini, dan arahan yang sangat luar biasa. Berjuta-juta kata terima kasih tidak akan pernah cukup atas perhatian mendalam dan dedikasi yang diberikan dalam mengarahkan saya menuju kesempurnaan. Tanpa adanya bimbingan perjalanan penulisan skripsi ini mungkin tidak akan seberhasil ini. Semoga Allah membalas kebaikan ibu dosen pembimbing dengan berlipat ganda, dan semoga amal baik tersebut menjadi bagian dari pahala yang terus mengalir. Aamiin.

Untuk kerabat, sahabat dan teman-teman yang saya sayangi. Teman seperjuanganku Manfar Kece Anjay: Suci, Ratna, Vira, dan Adit terima kasih untuk semua bantuan dan dukungan dari kalian mulai dari perkuliahan online sampai sekarang semester 8, semoga kebaikan-kebaikan kalian semua menjadi jalan untuk mempermudah jalan kalian nantinya. Adinda, Elly, Nida, Elsa dan Nisa, terima kasih sudah mau berjuang bersama-sama, terima kasih karena sudah banyak meluangkan waktu untuk memberi semangat, saran dan menolong saya dikala kebingungan. Tanpa kalian semua hambatan dan kesulitan tidak bisa saya lakukan sendiri. Kakak tingkat yang selalu memberiku masukan: Ka Akmal, Ka Ivan, Ka Melisa dan Ka Ridha, terima kasih karena sudah banyak meluangkan waktu untuk memberi semangat, saran, gambaran dan menolong saya dikala kebingungan. Semua bantuan tersebut sangat berarti untuk saya. Niken, Nita, Indah, Halda, Uci, Egnes, Echa, Ocina dan Icha merupakan sosok teman-teman terbaik saya, terima kasih untuk selalu memberi motivasi, semangat, dukungan serta doa. Terima kasih karena telah berbagi tawa dan keceriaan kepada saya. Teman-teman kelas CD yang namanya tidak bisa saya sebutkan satu per satu, terima kasih banyak karena telah memberikan pertolongan, tawa dan keceriaan kepada saya, terimakasih untuk semua hal yang telah dilewati bersama selama 4 tahun ini, semoga kita bisa saling menyapa kembali dikemudian hari.

Untuk diriku sendiri. Febri Padhilah, entah berapa banyak kata maaf dan terima kasih yang harus diucapkan bersamaan. Maaf karena telah banyak memaksamu melakukan dan mengejar semuanya, memaksamu berlari, memaksamu mengejar sesuatu tanpa sekalipun menepi. Terima kasih karena selalu berjuang untuk melakukan yang terbaik, untuk selalu bangkit dan kembali berdiri. Kamu hebat Febri, so proud of myself. Selamat atas gelar S.Farm yang kau dapatkan dibelakang namamu hari ini, semoga gelar ini menjadi awal baru untuk melanjutkan perjuanganmu nanti. Aamiin.

"Karena sesungguhnya sesudah kesulitan itu ada kemudahan. Sesungguhnya sesudah kesulitan itu ada kemudahan." -Q.S. Al-Insyirah (94):5-6.

"Terkadang, kesulitan harus kamu rasakan terlebih dahulu sebelum kebahagiaan yang sempurna datang kepadamu." -R.A. Kartini.

DAFTAR RIWAYAT HIDUP



Penulis bernama lengkap Febri Padhilah. Penulis lahir di Bogor pada 28 Februari 2002. Penulis adalah anak pertama dari dua bersaudara, anak dari pasangan Bapak Subroni dan Ibu Hodijah. Penulis memulai Pendidikan formalnya di TK IT Al-Utsmaniah pada tahun 2007-2008. Kemudian penulis melanjutkan Pendidikan Sekolah Dasar di SDN Tarikolot 05 pada tahun 2008-2014. Kemudian penulis melanjutkan pendidikan di SMPN 3 Citeureup pada tahun 2014-2017. Penulis memilih untuk fokus mengambil Sekolah Menengah Kejuruan dibidang farmasi dan melanjutkan pendidikan di SMK Kesehatan Annisa pada tahun 2017-2020. Pada tahun 2020 penulis memilih untuk melanjutkan pendidikan tingkat sarjana S1 di Program Studi Farmasi, Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam, Universitas Pakuan Bogor dan dinyatakan lulus pada Agustus 2024. Penulis menyelesaikan studinya dan memperoleh gelar Sarjana Farmasi setelah menyelesaikan skripsi yang berjudul **“UJI ANTIOKSIDAN DAN UJI TOKSISITAS AKUT DARI KOMBINASI EKSTRAK BUAH KELAPA SAWIT MERAH, DAUN SALAM KOJA DAN BIJI BUAH MARKISA”**

KATA PENGANTAR

Alhamdulillah, puji serta syukur penulis panjatkan kepada Allah SWT. atas berkat rahmat, hidayah dan karunia-Nya sehingga penulis dapat menyelesaikan skripsi dengan judul **“Uji Antioksidan dan Uji Toksisitas Akut dari Kombinasi Ekstrak Buah Kelapa Sawit Merah, Daun Salam Koja dan Biji Buah Markisa”** selama melakukan penelitian dan penulisan tugas akhir ini penulis banyak memperoleh bimbingan, bantuan serta dukungan dari berbagai pihak, oleh karena itu penulis ingin mengucapkan terima kasih kepada:

1. Ibu Yulianita, M.Farm selaku Dosen Pembimbing Utama dan Ibu Nina Herlina, S.Farm., M.Si selaku Dosen Pembimbing Pendamping yang penuh kesabaran membimbing penulis dalam penulisan proposal penelitian ini.
2. Dekan Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam, Ketua Program Studi Farmasi serta seluruh Dosen dan Staf Program Studi Farmasi.
3. Kedua orangtua, adik beserta keluarga besar yang selalu memberikan doa, semangat, dukungan, kasih sayang dan juga restunya selama ini.
4. Teman-teman penulis yang selalu memberikan semangat, bantuan kerjasamanya serta motivasi selama proses penyusunan hasil penelitian ini.

Penulis menyadari bahwa skripsi ini jauh dari kesempurnaan, untuk itu penulis mengharapkan kritik dan saran yang membangun dari pembaca sehingga dapat memberikan manfaat bagi semua pihak

Bogor, Agustus 2024

Penulis

RINGKASAN

FEBRI PADHILAH. 066120105. 2024. **UJI ANTIOKSIDAN DAN UJI TOKSISITAS AKUT DARI KOMBINASI EKSTRAK BUAH KELAPA SAWIT MERAH, DAUN SALAM KOJA DAN BIJI BUAH MARKISA.**

Dibawah Bimbingan: Yulianita dan Nina Herlina.

Minyak kelapa sawit merah, daun salam koja, dan buah markisa ungu merupakan sumber alami yang mengandung senyawa antioksidan yang memiliki berbagai manfaat kesehatan seperti dapat mengurangi antiinflamasi, dan mencegah terjadinya stress oksidatif yang dapat mempengaruhi stabilitas sel darah merah. Dosis dapat membahayakan serta memberikan efek toksik sehingga perlu dilakukan pengujian toksisitas untuk pengembangan obat baru sebagai syarat agar suatu bahan dapat digunakan sebagai obat.

Penelitian ini bertujuan untuk menentukan aktivitas antioksidan pada kombinasi ekstrak buah kelapa sawit merah, ekstrak daun salam koja dan ekstrak biji buah markisa, dengan 4 perbandingan yaitu (1:1:1), (1:1:2), (1:2:1) dan (2:1:1). Dilakukan pengujian aktivitas antioksidan dengan metode DPPH yang diukur menggunakan Spektrofotometer UV-Vis dan menentukan rentang dosis, peringkat ketoksikan serta menentukan pemberian formula yang dapat berpengaruh terhadap organ pada kombinasi ekstrak tersebut. Uji toksisitas dilakukan dengan metode *fixed dose* dengan dosis 300 mg/KgBB dan 2000 mg/KgBB menggunakan hewan uji mencit betina galur *Deutschland Denken Yoken*.

Hasil penelitian menunjukkan bahwa aktivitas antioksidan pada kombinasi tersebut memiliki nilai IC_{50} pada perbandingan (1:1:1) sebesar 5,28 ppm, (1:1:2) sebesar 3,34 ppm, (1:2:1) sebesar 3,69 ppm dan (2:1:1) sebesar 4,69 ppm. Nilai IC_{50} yang lebih kuat yaitu pada perbandingan (1:1:2) dengan kategori sangat aktif, yang memiliki nilai rata-rata IC_{50} yaitu $3,34 \pm 0,01$ ppm. Pada kombinasi ekstrak ini memperoleh kisaran nilai LD_{50} 2000 mg/KgBB termasuk ke dalam kategori tingkat toksisitas 4 yaitu toksik sedang yang memberikan pengaruh terhadap organ hati.

Kata kunci: Buah kelapa sawit merah, Daun salam koja, Biji buah markisa, Antioksidan, Toksisitas akut.

SUMMARY

FEBRI PADHILAH. 066120105. 2024. **ANTIOXIDANT TEST AND ACUTE TOXICITY TEST OF THE COMBINATION OF RED PALM FRUIT EXTRACT, CURRY LEAVES AND PASSION FRUIT SEED.** Under the Guidance of: Yulianita and Nina Herlina.

Red palm oil, curry leaves, and purple passion fruit are natural sources that contain antioxidant compounds that have various health benefits such as reducing anti-inflammatory, and preventing oxidative stress that can affect red blood cell stability. The dose can be harmful and provide toxic effects so it is necessary to conduct toxicity testing for the development of new drugs as a requirement for an ingredient to be used as a drug.

This study aims to determine the antioxidant activity of the combination of red palm fruit extract, curry leaf extract and passion fruit seed extract, with 4 comparisons namely (1:1:1), (1:1:2), (1:2:1) and (2:1:1) conducted by testing the DPPH method measured using UV-Vis spectrophotometer and determine the dose range, ketoksikan rank and determine what organs can affect the formula in the combination of extracts. Toxicity tests were conducted using the fixed dose method with doses of 300 mg/KgBB and 2000 mg/KgBB using female mice of the *Deutschland Denken Yoken* strain.

The results showed that the antioxidant activity of the combination had an IC50 value in the ratio (1:1:1) of 5.28 ppm, (1:1:2) of 3.34 ppm, (1:2:1) of 3.69 ppm and (2:1:1) of 4.69 ppm. The stronger IC50 value is in the ratio (1:1:2) with a very active category, which has an average IC50 value of 3.34 ± 0.01 ppm. In this combination of extracts obtained a range of LD50 values of 2000 mg/KgBB included in the category of toxicity level 4 which is moderately toxic which affects the liver.

Keywords: Red palm fruit, Curry leaf, Passion fruit seed, Antioxidant, Acute toxicity.

DAFTAR ISI

HALAMAN PENGESAHAN	i
PERNYATAAN KEASLIAN KARYA TULIS	ii
SURAT PELIMPAHAN SKRIPSI	iii
HALAMAN PERSEMBAHAN	iv
DAFTAR RIWAYAT HIDUP	vi
KATA PENGANTAR	vii
RINGKASAN	viii
SUMMARY	ix
DAFTAR ISI	x
DAFTAR GAMBAR	xiv
DAFTAR TABEL	xv
DAFTAR LAMPIRAN	xvi
BAB I PENDAHULUAN	1
1.1 Latar Belakang	1
1.2 Tujuan Penelitian.....	3
1.3 Hipotesis.....	4
BAB II TINJAUAN PUSTAKA	5
2.1 Buah Kelapa Sawit (<i>Elais guineensis</i> Jacq.)	5
2.1.1 Deskripsi Buah Kelapa Sawit (<i>Elais guineensis</i> Jacq.).....	5
2.1.2 Kandungan Senyawa Buah Kelapa Sawit (<i>Elais guineensis</i> Jacq.).....	6
2.1.3 Manfaat Buah Kelapa Sawit (<i>Elais guineensis</i> Jacq.).....	6
2.2 Daun Salam Koja (<i>Murraya koenigii</i> (Linn.) Spreng).....	7
2.2.1 Deskripsi Daun Salam Koja (<i>Murraya koenigii</i> (Linn.) Spreng).....	7
2.2.2 Kandungan Senyawa Daun Salam Koja (<i>Murraya koenigii</i> (Linn.) Spreng)	8
2.2.3 Manfaat Daun Salam Koja (<i>Murraya koenigii</i> (Linn.) Spreng).....	8
2.3 Buah Markisa (<i>Passiflora edulis</i> var. <i>edulis</i> Sims.)	8
2.3.1 Deskripsi Buah Markisa (<i>Passiflora edulis</i> var. <i>edulis</i> Sims.).....	8

2.3.2 Kandungan Senyawa Buah Markisa (<i>Passiflora edulis</i> var. <i>edulis</i> Sims.)	9
2.3.3 Manfaat Buah Markisa (<i>Passiflora edulis</i> var. <i>edulis</i> Sims.)... ..	9
2.4 Ekstraksi Maserasi.....	10
2.5 Pelarut.....	10
2.6 Radikal Bebas.....	11
2.7 Antioksidan.....	11
2.8 Metode Uji Antioksidan.....	12
2.8.1 DPPH (2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl).....	12
2.8.2 ABTS (2,2-azinobis-3-Ethylbenzothiazoline-6-Sulfonic Acid)	12
2.9 Spektrofotometri UV-Vis	13
2.10 Toksisitas.....	13
2.11 Uji toksisitas Akut Oral.....	14
2.12 Metode Uji Toksisitas Akut (<i>Fixed Dose Method</i>).....	16
2.13 Mekanisme Efek Toksik.....	17
2.14 <i>Lethal Dose 50</i> (LD ₅₀).....	17
2.15 Mencit Putih	18
BAB III METODE PENELITIAN	20
3.1 Waktu dan Tempat Penelitian.....	20
3.2 Alat dan Bahan.....	20
3.2.1 Alat	20
3.2.2 Bahan.....	20
3.3 Metode Kerja.....	20
3.3.1 Pengumpulan Bahan Baku dan Determinasi Tanaman	20
3.3.2 Penetapan Kadar Air Ekstrak	21
3.3.3 Penetapan Kadar Abu Ekstrak.....	21
3.3.4 Skrining Fitokimia.....	22
3.3.4.1 Identifikasi Alkaloid	22
3.3.4.2 Identifikasi Flavonoid.....	22
3.3.4.3 Identifikasi Tanin	22

3.3.4.4	Identifikasi Saponin	22
3.3.5	Pengujian Aktivitas Antioksidan Ekstrak Buah Kelapa Sawit Merah, Daun Salam Koja dan Biji Buah Markisa dengan Metode DPPH.....	23
3.3.5.1	Pembuatan Larutan Pereaksi.....	23
3.3.5.2	Penentuan Panjang Gelombang Maksimum DPPH.	23
3.3.5.3	Penetapan Waktu Inkubasi Optimum.....	23
3.3.5.4	Pembuatan Deret Larutan Vitamin C (Kontrol Positif)	24
3.3.5.5	Pembuatan Larutan Uji	24
3.3.5.6	Penentuan Nilai IC ₅₀ (Inhibitory Concentration)...	24
3.3.6	Kode Etik Hewan	25
3.3.7	Rancangan Penelitian	25
3.3.8	Penyiapan Hewan Uji.....	26
3.3.9	Penentuan Dosis dan Volume Pemberian	27
3.3.9.1	Pembuatan Sediaan Uji Kombinasi Formula Buah Kelapa Sawit Merah, Daun Salam Koja dan Biji Buah Markisa	27
3.3.9.2	Pembuatan Na-CMC 0,5 %	28
3.3.9.3	Larutan Uji dengan dosis 300 mg/KgBB.....	28
3.3.9.4	Larutan Uji dengan dosis 2000 mg/KgBB.....	28
3.3.10	Percobaan Uji Toksisitas Modifikasi Metode <i>Fixed Dose</i>	28
3.3.11	Pengamatan Hewan Uji.....	29
3.3.12	Penentuan Kisaran LD ₅₀	30
3.3.13	Pengamatan Indeks Organ.....	34
3.3.14	Analisis Data.....	30
BAB IV	HASIL DAN PEMBAHASAN	32
4.1	Hasil Determinasi Tanaman.....	32
4.2	Hasil Organoleptik Ekstrak.....	32
4.3	Hasil Penetapan Kadar Air Ekstrak	33
4.4	Hasil Penetapan Kadar Abu Ekstrak	34
4.5	Hasil Skrining Fitokimia.....	35
4.6	Hasil Uji Aktivitas Antioksidan	37

4.6.1	Hasil Penentuan Panjang gelombang DPPH	37
4.6.2	Hasil Penentuan Waktu Inkubasi Optimum DPPH.....	38
4.6.3	Hasil Pembuatan Deret Standar Larutan Vitamin C	39
4.6.4	Hasil Penentuan Aktivitas Antioksidan.....	40
4.7	Hasil Uji Toksisitas Akut	44
4.7.1	Pemeliharaan Hewan Uji	44
4.7.2	Hasil Uji Pendahuluan	44
4.7.3	Hasil Pengamatan Berat Badan Hewan Uji	45
4.7.4	Hasil Pengamatan Gejala Toksisitas Pada Mencit	46
4.7.5	Hasil Pengamatan Indeks Organ.....	52
4.7.6	Hasil Pengamatan Makroskopik Hewan Uji.....	55
4.7.7	Hasil Penentuan Nilai <i>Lethal Dose</i> 50 (LD ₅₀)	56
BAB V KESIMPULAN DAN SARAN		57
5.1	Kesimpulan.....	57
5.2	Saran.....	57
DAFTAR PUSTAKA.....		58
LAMPIRAN.....		68

DAFTAR GAMBAR

Gambar	Halaman
1. Buah Kelapa Sawit (<i>Elaeis guineensis</i> Jacq.)	5
2. Daun Salam Koja (<i>Murraya koenigii</i> (Linn.) Spreng)	7
3. Biji buah markisa (<i>Passiflora edulis</i> var. <i>edulis</i> Sims.).....	9
4. Reaksi Radikal Bebas DPPH dengan Senyawa Antioksidan	12
5. Mencit (<i>Mus musculus</i> L.)	18
6. Uji Organoleptik Ekstrak	32
7. Kurva panjang gelombang DPPH	38
8. Kurva konsentrasi nilai IC_{50} vitamin C	40
9. Diagram rata-rata bobot badan mencit selama 14 hari.....	46

DAFTAR TABEL

Tabel	Halaman
1. Spesifikasi Antioksidan.....	11
2. Kriteria penggolongan sediaan uji menurut OECD (pada tikus)	17
3. Kriteria penggolongan sediaan uji	15
4. Uji Toksisitas.....	29
5. Kriteria penggolongan sediaan uji	30
6. Hasil Penetapan Kadar Air	33
7. Hasil Penetapan Kadar Abu	34
8. Hasil Uji Fitokimia.....	35
9. Hasil nilai IC ₅₀ dari ketiga ekstrak dengan empat perbandingan kombinasi	41
10. Superskrip perbedaan perbandingan nilai IC ₅₀ dari masing-masing kombinasi ekstrak.....	48
11. Pengamatan Gejala Toksisitas pada Kelompok Kontrol Negatif.....	47
12. Pengamatan Gejala Toksisitas pada Kelompok Uji Pendahuluan Dosis 300mg/KgBB	47
13. Pengamatan Gejala Toksisitas pada Kelompok Uji Pendahuluan Dosis 2000 mg/KgBB	48
14. Rata-rata Berat dan Indeks Organ Hewan Uji.....	53

DAFTAR LAMPIRAN

Lampiran	Halaman
1. Alur Penelitian.....	69
2. Lembar Determinasi Buah Kelapa Sawit Merah	70
3. Lembar Determinasi Daun Salam Koja	71
4. Lembar Determinasi Biji Buah Markisa	72
5. Surat Hasil Kaji Etik	73
6. Perhitungan Kadar Air Ekstrak	74
7. Perhitungan Kadar Abu Ekstrak.....	76
8. Hasil Uji Fitokimia.....	78
9. Data perhitungan dalam pengujian Aktivitas Antioksidan pada kombinasi ekstrak buah kelapa sawit merah, ekstrak daun salam koja dan ekstrak biji buah markisa	79
10. Hasil analisis statistik nilai IC ₅₀ dari ketiga kombinasi ekstrak berdasarkan perbedaan perbandingan konsentrasi ekstrak.....	107
11. Perhitungan Dosis Sediaan Uji.....	92
12. Perhitungan CV Hewan Uji	94
13. Gejala Toksisitas Uji Pendahuluan.....	95
14. Data Berat Badan Hewan Uji Selama 14 Hari	98
15 . Data Berat Organ Hewan Uji	99
16. Data dan Perhitungan Indeks Organ Hewan Uji	100
17. Hasil Pembedahan Hewan Uji	101
18. Dokumentasi Penelitian	103

BAB I

PENDAHULUAN

1.1 Latar Belakang

Kelapa sawit atau dikenal juga dengan *Elaeis guineensis* Jacq adalah tanaman yang ditanam dalam jangka waktu yang cukup lama atau tanaman hasil kebun yang menghasilkan minyak (Maulana *et al.*, 2023). Mengandung senyawa fitonutrien seperti senyawa β -karoten yang bekerja dalam aktivitas antioksidan dan antiinflamasi (Andulaa dkk., 2017). Pada penelitian Oktaria (2023) aktivitas antioksidan minyak sawit merah menghasilkan nilai *Inhibitory Concentration* (IC_{50}) yang sangat kuat sebesar 5,59 ppm artinya sangat kuat yaitu < 50 ppm (Oktaria dkk., 2023). Selain buah kelapa sawit, daun salam koja, dan biji buah markisa juga memiliki aktivitas antioksidan.

Daun salam koja atau dikenal juga dengan *Murraya koenigii* L. Spreng di dalamnya terdapat senyawa alkaloid dan flavonoid merupakan bahan aktif yang ditemukan dalam daun salam koja (Abigail dkk., 2020). Senyawa ini dapat bertindak sebagai antioksidan yang memiliki nilai *Inhibitory Concentration* (IC_{50}) sangat kuat sebesar 23 ppm yaitu < 50 ppm (Mustanir dkk., 2019) dan ekstrak etanol daun salam koja bermanfaat juga sebagai antiinflamasi pada dosis 150 mg/kgBB (Cahyaningsih dkk., 2018)

Buah markisa ungu dikenal sebagai *Passiflora edulis* var. *edulis* Sims mengandung karotenoid, antosianin, flavonoid, dan vitamin C yang berfungsi sebagai antioksidan yang sangat kuat yaitu < 50 ppm dan sebagai antiinflamasi (Kusumah dkk., 2021). Pada penelitian Kurniawati (2021) buah markisa ungu didapatkan aktivitas antioksidan dengan nilai *Inhibitory Concentration* (IC_{50}) sebesar 9,76 ppm artinya sangat kuat yaitu < 50 ppm. (Kurniawati dan Sutoyo, 2021).

Radikal bebas dalam tubuh dapat menyebabkan terjadinya reaksi oksidasi, maka dari itu senyawa antioksidan diperlukan karena berfungsi untuk menghambat dan menetralkan terjadinya reaksi tersebut (Wibawa dkk., 2020). Aktivitas antiinflamasi erat kaitannya dengan aktivitas antioksidan. Sel darah merah sangat sensitif terhadap radikal bebas *Reactive Oxygen Species* (ROS), antioksidan ini

memiliki kemampuan untuk menghindari stress oksidatif yang dapat mengganggu stabilitas pada sel darah merah (Armadany dkk., 2020). Secara *in vitro* untuk mengukur radikal bebas oleh senyawa antioksidan adalah dengan menggunakan metode 2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl (DPPH). Kelebihannya tidak membutuhkan banyak reagen, pengerjaannya sederhana dan cepat. Prinsip metode ini bergantung pada reduksi senyawa yang berpotensi berfungsi sebagai antioksidan oleh 2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl (DPPH) yang mengubah warna dari ungu menjadi warna kuning (Masrifah dkk., 2017). Semakin kecil nilai absorbansi dalam zat uji akan semakin tinggi aktivitas antioksidannya (Sadeli, 2016).

Pengujian toksisitas akut dilakukan untuk menilai dampak dosis tunggal suatu senyawa kepada hewan uji dan untuk menilai keamanan obat atau bahan yang akan digunakan secara akut. Dalam pengujian ini diberi sediaan uji dengan dosis yang berbeda pada hewan uji, kemudian hewan tersebut diamati selama periode 14 hari. Pengujian ini dilakukan dengan tujuan untuk mengetahui toksisitas alami suatu zat dan mengetahui nilai *lethal dose* (LD₅₀) yaitu dosis zat uji yang menyebabkan kematian pada 50% hewan uji secara akut (Ayun *et al.*, 2021).

Pada penelitian Zainal (2020) yang menjelaskan uji toksisitas akut pada ekstrak buah kelapa sawit (*Elaeis guineensis* Jacq.) memiliki nilai *lethal dose* (LD₅₀) sebesar 2000 mg/KgBB. Dalam hal ini pada ekstrak kelapa sawit dapat dikategorikan sebagai klasifikasi No. 4 merupakan kategori toksisitas sedang (Zainal *et al.*, 2020). Sedangkan pada penelitian Sakarkar (2017) pada ekstrak etanol daun salam koja (*Murraya koenigii* (Linn.)) tidak ada tanda-tanda mortalitas atau morbiditas yang terlihat pada tikus jantan atau betina yang diberi ekstrak etanol daun salam koja (300 dan 500 mg/kg) selama 28 hari. Selain itu, tidak ada kematian yang diamati pada dosis yang lebih tinggi yaitu 900 mg/KgBB, namun kemacetan perdarahan, dan infiltrasi limfosit tercatat. Dalam hal ini pada ekstrak etanol daun salam koja dapat dikategorikan sebagai klasifikasi No.4 merupakan kategori toksisitas sedang (Sakarkar *et al.*, 2017) dan, pada penelitian Ginting (2018) pada ekstrak etanol kulit buah markisa ungu tidak menyebabkan ketoksikan pada dosis 500 mg/KgBB dan dosis 1000 mg/KgBB, namun menimbulkan hepatotoksitas pada dosis 2000mg/KgBB dan 5000 mg/KgBB. Dalam hal ini pada ekstrak kulit

buah markisa dapat dikategorikan sebagai klasifikasi No.5 merupakan kategori toksisitas ringan (Ginting dkk., 2018).

Maka, dalam hal ini dilakukan kombinasi ekstrak dari buah kelapa sawit merah, daun salam koja dan biji buah markisa agar diharapkan dapat berpotensi sebagai tanaman dengan khasiat antioksidan dapat mengurangi tingkat radikal bebas dalam tubuh serta dapat dipilih karena masing-masing memiliki profil senyawa aktif yang unik dan mekanisme aksi yang saling melengkapi. Minyak kelapa sawit merah kaya akan β -karoten yang memiliki potensi antioksidan yang kuat, daun kari mengandung alkaloid dan flavonoid yang memberikan efek antioksidan dan antiinflamasi tambahan. Markisa ungu mengandung karotenoid, antosianin, dan vitamin C yang dapat meningkatkan potensi antioksidan dan mendukung kesehatan secara keseluruhan. Dan dilakukannya kombinasi ekstrak tersebut agar didapatkan efek sinergis. Dengan menggabungkan tiga ekstrak ini, diharapkan dapat menciptakan spektrum antioksidan yang sangat kuat dan dilakukannya pengujian toksisitas akut oral agar mengetahui nilai *lethal dose* (LD₅₀) dan menentukan batas dosis yang dapat membahayakan dan bersifat toksik pada ketiga kombinasi ekstrak tersebut, sehingga dapat dikembangkan sebagai alternatif pengobatan tradisional dengan dosis yang lebih aman ketika digunakan.

1.2 Tujuan Penelitian

1. Menentukan aktivitas antioksidan dari kombinasi ekstrak buah kelapa sawit merah (*Elaeis Guineensis* Jacq.), ekstrak daun salam koja (*Murraya koenigii* (Linn.) Spreng) dan ekstrak biji buah markisa (*Passiflora edulis* var. *edulis* Sims).
2. Menentukan kisaran nilai LD₅₀ dari kombinasi ekstrak buah kelapa sawit merah (*Elaeis Guineensis* Jacq.), ekstrak daun salam koja (*Murraya koenigii* (Linn.) Spreng) dan ekstrak biji buah markisa (*Passiflora edulis* var. *edulis* Sims).
3. Menentukan gejala toksisitas berbahaya yang muncul setelah diberikan sediaan kombinasi ekstrak buah kelapa sawit merah (*Elaeis Guineensis* Jacq.), ekstrak daun salam koja (*Murraya koenigii* (Linn.) Spreng) dan

ekstrak biji buah markisa (*Passiflora edulis* var. *edulis* Sims) setelah dilakukannya pengamatan selama 14 hari

1.3 Hipotesis

1. Didapatkan aktivitas antioksidan pada nilai IC_{50} dari kombinasi ekstrak buah kelapa sawit merah (*Elaeis Guineensis* Jacq.), ekstrak daun salam koja (*Murraya koenigii* (Linn.) Spreng) dan ekstrak biji buah markisa (*Passiflora edulis* var. *edulis* Sims).
2. Didapatkan kisaran nilai LD_{50} dari kombinasi ekstrak buah kelapa sawit merah (*Elaeis Guineensis* Jacq.), ekstrak daun salam koja (*Murraya koenigii* (Linn.) Spreng) serta ekstrak biji buah markisa (*Passiflora edulis* var. *edulis* Sims) .
3. Tidak ditemukannya gejala toksisitas berbahaya yang muncul setelah dilakukan pengamatan selama 14 hari.

BAB II

TINJAUAN PUSTAKA

3.1 Buah Kelapa Sawit (*Elaeis guineensis* Jacq.)

2.1.1 Deskripsi Buah Kelapa Sawit (*Elaeis guineensis* Jacq.)

Tanaman kelapa sawit dikenal juga dengan *Elaeis guineensis* Jacq. Varietas dari tanaman *Elaeis guineensis* Jacq. bervariasi cukup banyak, sering diklasifikasikan berdasarkan jenis buah, ketebalan cangkang, warna buah dan karakteristik lainnya (Prayogi dkk., 2010). Tanaman ini adalah jenis tanaman dalam golongan famili *Arecaceae* dan termasuk dalam spesies *Elaeis guineensis* Jacq.

Kelapa sawit atau *Elaeis guineensis* Jacq. adalah tanaman tropis yang diyakini berasal dari Nigeria dan hingga saat ini tanaman tersebut dikenal sebagai penghasil minyak nabati yang paling baik dan menguntungkan diantara tanaman lainnya (Darmawan dkk., 2020). *Elaeis guineensis* dan *Elaeis oleifera* adalah jenis kelapa sawit yang memiliki fungsi dan keunggulan masing-masing. Perbedaannya pada *Elaeis oleifera* memiliki tinggi tanaman yang lebih rendah sedangkan pada *Elaeis guineensis* memiliki tingkat produksi yang sangat tinggi. Banyak orang saat ini sedang melakukan persilangan antara kedua species ini dengan tujuan untuk menghasilkan varietas yang memiliki produksi tinggi dan mudah dipanen (Syahputra dkk., 2011).



Gambar 1. Buah Kelapa Sawit (*Elaeis guineensis* Jacq.)

Buah kelapa sawit adalah jenis buah yang dibungkus dengan bagian luar yang berdaging yang memiliki tiga bagian utama, yaitu bagian luar disebut *epicarpium*, bagian tengah disebut *mesocarpium*, yang mengandung minyak kelapa sawit dikenal sebagai *Crude Palm Oil* (CPO), dan bagian dalam disebut

endocarpium. Dari proses penyerbukan hingga buah matang membutuhkan waktu 6 bulan untuk proses pembentukan buah. Minyak sawit diekstraksi dari buah kelapa sedangkan minyak inti sawit diekstrak dari biji buah sawit (Direktorat Jenderal Penataan Ruang Departemen Pekerjaan Umum, 2008). Gambar buah kelapa sawit dapat dilihat pada Gambar 1.

Pengeringan pada buah ini dapat mempengaruhi beberapa faktor antara lain sampel yang akan dikeringkan, suhu dan alat yang digunakan. Sampel yang akan dikeringkan ditentukan oleh bentuk, ukuran dan komposisinya. sampel berwujud cair cenderung memerlukan waktu lebih lama untuk dikeringkan secara menyeluruh. Proses pengeringan dan penjemuran buah kelapa sawit sangat dipengaruhi oleh kondisi cuaca, dan akan lebih efisien saat musim panas dibandingkan dengan musim hujan karena pengeringan akan lebih lama. Mengeringkan menggunakan oven akan lebih cepat dibandingkan dengan menjemur dibawah sinar matahari. Pengeringan dengan oven tidak efisien karena akan membutuhkan biaya yang lebih besar (Rahmawan, 2011).

2.1.2 Kandungan Senyawa Buah Kelapa Sawit (*Elais guineensis* Jacq.)

Flavonoid, triterpenoid, alkaloid, steroid dan tanin dapat ditemukan dibagian kelapa sawit (Hamzah dkk., 2012). Karoten, senyawa tokoferol (vitamin E), sterol, alkohol, triterpen dan fosfolipida adalah bagian dari minyak sawit (Siregar dkk, 2018 & Nor Azman dkk, 2018). Senyawa karotenoid merupakan komponen fitonutrien yang terdapat dalam jumlah besar di minyak kelapa sawit sekitar 500 - 700 ppm. Jenis-jenis karotenoid tersebut meliputi α -karoten, β -karoten, fitoin, fitofluen, cis- β -karoten, cis- α -karoten dan lain-lain. β -karoten adalah senyawa yang penting bagi tubuh karena berperan sebagai antioksidan (Naji N *et al.*, 2013).

2.1.3 Manfaat Buah Kelapa Sawit (*Elais guineensis* Jacq.)

Manfaat buah kelapa sawit yang berasal dari kandungan senyawa karoten dan vitamin E berfungsi untuk melawan radikal bebas, yang membantu mencegah kanker, aterosklerosis, penuaan dini, dan penyakit degeneratif lainnya (Siregar dkk, 2018 & Nor Azman dkk, 2018). Fitosterol yang terdapat secara alami dalam minyak

kelapa sawit dapat membantu menurunkan kadar kolesterol. Selain itu, nutrisi ini meningkatkan fungsi otak, menurunkan tekanan darah, dan meminimalkan kemungkinan terjadinya gumpalan darah di arteri (efek antitrombotik) (Estiasih *et al.*, 2015).

3.2 Daun Salam Koja (*Murraya koenigii* (Linn.) Spreng)

2.2.1 Deskripsi Daun Salam Koja (*Murraya koenigii* (Linn.) Spreng)

Daun temurui juga dikenal sebagai *Murraya koenigii* L. Spreng dalam golongan famili *Rutaceae* atau suku jeruk-jerukan dan termasuk dalam spesies *Murraya koenigii* L. Spreng yang berasal dari India dan Sri Lanka serta tumbuh dengan baik di lingkungan tropis. Daun kari yang dikenal sebagai “daun temurui” dalam bahasa daerah, banyak tersebar di Provinsi Aceh digunakan sebagai rempah pada masakan oleh masyarakatnya. Secara tradisional masih dimanfaatkan sebagai obat untuk mengatasi penyakit rematik, diare dan bahkan gigitan ular (Sukma *et al.*, 2018).



Gambar 2. Daun Salam Koja (*Murraya koenigii* (Linn.) Spreng)

Daun temurui (*Murraya koenigii* (Linn.) Spreng) memiliki bentuk daun yang menyirip dan merupakan tumbuhan majemuk. Daun kari dan daun salam hampir mirip, tetapi yang membedakan yaitu daun kari lebih kecil dan baunya lebih tajam. Pohon kari memiliki morfologi yang unik. Pohon ini bisa tumbuh 4 hingga 6 meter dengan tangkai panjang yang terdiri dari 11 hingga 21 helai daun per tangkai. Tanaman ini memiliki bunga putih kecil dan memiliki warna coklat

kehitaman pada buahnya. Batangnya berwarna hijau gelap kecoklatan (Singh *et al.*, 2014). Gambar tanaman salam koja dapat dilihat pada Gambar 2.

2.2.2 Kandungan Senyawa Daun Salam Koja (*Murraya koenigii* (Linn.) Spreng)

Daun salam koja mengandung saponin, terpenoid, karbazol alkaloid, glikosida, flavonoid, tanin, dan fenol (Abigail dkk., 2020). Pada penelitian Sukma (2018) senyawa terpenoid ditemukan pada ekstrak methanol daun salam koja. Dapat ketahui sifat antioksidan dan antibakteri dalam senyawa ini dapat dimanfaatkan dalam industri pangan dan farmasi (Sukma *et al.*, 2018)

2.2.3 Manfaat Daun Salam Koja (*Murraya koenigii* (Linn.) Spreng)

Daun salam koja sudah pernah dilakukan penelitian dinegara maju dan diketahui memiliki zat aktif sebagai antioksidan, antibakteri, antiinflamasi, antidiabetes (Hayati, 2021). Hal ini juga didukung oleh penelitian Sukma dkk., (2018) daun salam koja sangat potensial untuk dikembangkan karena memiliki senyawa aktif. Pada tanaman daun salam koja mengandung alkaloid, saponin, terpenoid, flavonoid dan tanin. Senyawa-senyawa tersebut pada Insekta sebagai penghambat racun pernafasan.

2.3 Buah Markisa (*Passiflora edulis* var. *edulis* Sims.)

2.3.1 Deskripsi Buah Markisa (*Passiflora edulis* var. *edulis* Sims.)

Markisa ungu adalah tanaman semak belukar dari famili *Passiflora* (Afifah *et al.*, 2019) dan termasuk dalam spesies *Passiflora edulis* var. *edulis* Sims. Tanaman ini tidak membutuhkan perawatan yang lebih agar tetap tahan terhadap penyakit dan hama serta dapat tumbuh dengan baik didataran tinggi maupun rendah (Lutfi Alhazami, 2022).



Gambar 3. Biji buah markisa (*Passiflora edulis* var. *edulis* Sims.)

Buah markisa (*Passiflora edulis* var. *edulis* Sims.) adalah salah satu dari banyak jenis tanaman dan memiliki famili yang sangat bervariasi dengan banyak jenis. Tanaman ini sebagian besar tumbuh di hutan dengan bentuk semak belukar atau pohon kecil umum di Indonesia (Armin dkk., 2014). Biji markisa *Passiflora edulis* var. *edulis* Sims. berbentuk pipih, berwarna hitam, dan biji-biji tersebut terbungkus oleh selaput biji atau selaput lendir biji yang mengandung cairan sari buah berasa asam pada *Passiflora edulis* var. *edulis* Sims. serta beraroma khas yang harum. Gambar biji buah markisa dapat dilihat pada Gambar 3.

2.3.2 Kandungan Senyawa Buah Markisa (*Passiflora edulis* var. *edulis* Sims.)

Buah markisa yang berasal dari daerah tropis, memiliki kulit yang kaya dengan zat seperti flavonoid, alkaloid, pektin, dan polisakarida (Widodo dan Tukiran, 2021). Buah markisa mengandung alkaloid, flavonoid, dan karotenoid sebagai senyawa kimia utama (Randa Kurniawan dkk., 2018). Senyawa yang berfungsi sebagai antioksidan dalam buah markisa ungu adalah karotenoid, antosianin, flavonoid, dan vitamin C (Kusumah *et al.*, 2021).

2.3.3 Manfaat Buah Markisa (*Passiflora edulis* var. *edulis* Sims.)

Buah markisa bermanfaat untuk antidiabetes, antikanker, antiinflamasi, dan sebagai antioksidan. Pada antioksidan senyawa fenolik dapat melindungi kerusakan dari sel beta pankreas, dan menjaga kandungan insulinnya (Utomo dkk., 2020 dan Randa Kurniawan dkk., 2018). Karena banyak manfaatnya, buah markisa

asam baik untuk dikonsumsi dan dibudidayakan. Kandungan seratnya sangat tinggi mencakup 10,40 gram atau 27% dari total serat diet. Buah markisa asam juga merupakan sumber vitamin C yang baik, dapat meningkatkan kekebalan tubuh dan sebagai antioksidan alami (Budi Prabowo, 2021).

2.4 Ekstraksi Maserasi

Ekstraksi juga disebut sebagai penyarian adalah dengan memisahkan senyawa dari simplisia menggunakan pelarut yang sesuai. Metode dipilih berdasarkan sifat senyawa, pelarut yang digunakan, dan alat yang digunakan (Hanani, 2015). Menarik senyawa dari bentuk campuran atau simplisianya merupakan tujuan dari ekstraksi. Maserasi dan refluks adalah teknik ekstraksi yang paling umum (Hanani, 2017). Prinsip kelarutan *like dissolve like* digunakan dalam metode pemisahan ekstraksi. (Syamsul dkk., 2020). Ekstrak adalah sediaan kering, kental atau cair yang dibuat dengan menyari simplisia nabati atau hewani, dan terhindar dari cahaya matahari langsung (Depkes RI, 2008).

Maserasi adalah metode ekstraksi simplisia dimana pelarut direndam dalam suhu kamar untuk mengurangi kerusakan metabolit. Dalam proses maserasi dilakukan dengan pengadukan secara kinetik dan pelarut yang digunakan harus diganti berulang kali (Hanani, 2015). Bekerja dengan merendam bubuk simplisia dengan pelarut yang sesuai dan terlindung dari cahaya. Waktu maserasi harus dilakukan secara optimal agar senyawa dapat tertarik semua (Yasacaxena *et al.*, 2023). Kelebihan metode maserasi adalah sederhana, cepat, dan tidak memerlukan pemanasan yang akan mengakibatkan rusaknya atau hilangnya zat aktif yang ingin disari (Fadlilaturrahmah *et al.*, 2022). Salah satu kelemahan dari metode maserasi adalah membutuhkan waktu yang lama, membutuhkan pelarut yang cukup banyak, dan harus terlindung dari cahaya matahari (Yasacaxena *et al.*, 2023).

2.5 Pelarut

Pelarut adalah larutan dalam jumlah yang besar. Pelarut digunakan untuk proses ekstraksi diharuskan dapat melarutkan dengan baik zat aktif yang terdapat dalam sampel ataupun simplisia, sehingga senyawa lain yang terdapat dalam simplisia dapat dipisahkan dengan zat aktifnya. Prinsip *like dissolve like*

mengatakan bahwa senyawa polar non polar akan melarutkan kelarutan yang sama dengan sifat pelarutnya (Samudra *et al.*, 2022). Air, etanol, metanol, dan aseton adalah pelarut polar (Samudra *et al.*, 2022).

2.6 Radikal Bebas

Radikal bebas turunan oksigen atau *reactive oxygen species* (ROS) dan radikal bebas turunan nitrogen atau *reactive nitrogen species* (RNS) adalah dua jenis radikal yang paling umum ditemukan dalam sistem biologis. Radikal bebas memiliki satu atau lebih elektron yang tidak berpasangan dengan kulit terluarnya. Sebagian besar *Reactive Oxygen Species* (ROS) berasal dari paparan radikal bebas yang dapat menyebabkan peradangan atau inflamasi dan sebagian kecil berasal dari metabolisme sel-sel di dalam tubuh, seperti metabolisme karbohidrat dan protein. (Wibawa *et al.*, 2020).

2.7 Antioksidan

Menunda, memperlambat, dan menghambat proses oksidasi adalah kemampuan dari senyawa antioksidan. Senyawa ini dapat menghentikan reaksi rantai oksidatif, yang memungkinkan untuk memperbaiki kerusakan oksidatif yang dialami sel-sel tubuh (Devitria dkk., 2023). Antioksidan endogen dihasilkan secara alami oleh tubuh dan antioksidan eksogen dihasilkan dari luar tubuh. Antioksidan cenderung bereaksi terlebih dahulu dengan radikal bebas dari pada dengan molekul lain karena kemampuan mereka untuk mudah teroksidasi atau menjadi reduktor kuat (Amiani, 2022). Nilai IC_{50} adalah angka yang menunjukkan konsentrasi ekstrak (ppm) yang memiliki kemampuan untuk menghentikan proses oksidasi sebesar 50%. Nilai IC_{50} yang lebih rendah menunjukkan bahwa aktivitas antioksidannya lebih tinggi atau lebih kuat. Spesifikasi suatu senyawa dikatakan sebagai antioksidan, dapat dilihat pada Tabel 1.

Tabel 1. Spesifikasi Antioksidan

Nilai IC_{50}	Intensitas
< 50 ppm	Sangat Kuat
51 – 100 ppm	Kuat

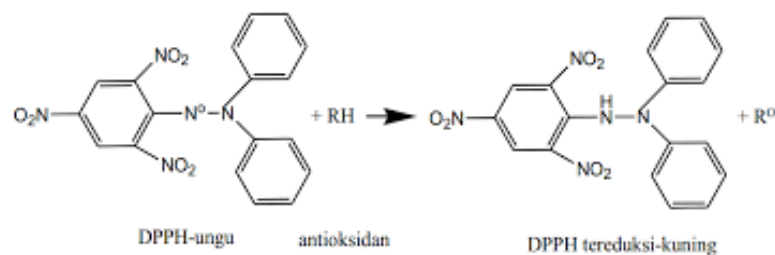
Nilai IC ₅₀	Intensitas
100 – 150 ppm	Sedang
150 – 200 ppm	Lemah

(Sumber : Molyneux, 2004)

2.8 Metode Uji Antioksidan

2.8.1 DPPH (2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl)

2,2- diphenyl-1-picrylhydrazyl (DPPH) adalah radikal bebas yang digunakan sebagai model, dipilih karena pengujian ini membutuhkan sampel yang kecil, sederhana, mudah, cepat, dan sensitif untuk mengukur aktivitas antioksidan. Kelemahan dari metode ini adalah sensitif terhadap cahaya dan dapat terkoagulasi pada beberapa jenis antioksidan, reaksinya lambat dan tidak cocok untuk uji aktivitas antioksidan plasma (Hanani dkk., 2005). Prinsip perendaman radikal bebas DPPH adalah bahwa larutan radikal bebas DPPH yang berwarna ungu direduksi oleh penghambatan radikal bebas, sehingga radikal bebas menjadi bentuk tereduksi yang bersifat nonradikal. Gugus pikril akan menghasilkan warna kuning ketika DPPH yang berwarna ungu bertemu dengan pendonor elektron dan mengalami reduksi (Tristantini *et al.*, 2016). Reaksi DPPH dapat dilihat pada Gambar 4.



Gambar 4. Reaksi Radikal Bebas DPPH dengan Senyawa Antioksidan

Sumber : Molyneux (2004).

2.8.2 ABTS (2,2-azinobis-3-Ethylbenzothiazoline-6-Sulfonic Acid)

Salah satu metode pengujian yang sangat sensitif untuk menentukan jumlah radikal bebas adalah metode perendaman radikal bebas menggunakan senyawa 2,2-azinobis-3-Ethylbenzothiazoline-6-Sulfonic Acid (ABTS). ABTS

adalah substrat enzim peroksidase yang dapat teroksidasi menjadi kation radikal oleh peroksida (H_2O_2) (Serlahwaty & Sevian, 2016 dan Windiawati *et al.*, 2015). Proton akan didonorkan kepada radikal bebas sehingga dapat menstabilkan senyawa antioksidan. Hal ini ditunjukkan dengan adanya penurunan kation radikal (Shalaby *et al.*, 2014 dan Sukweenadhi *et al.*, 2020). Kelebihan metode ABTS memiliki waktu yang lebih cepat, bekerja pada rentang pH yang luas, dan dapat digunakan pada sistem yang berbasis air maupun organik. Kekurangan metode ini adalah tidak dapat menunjukkan apakah sistem dalam tubuh terhadap radikal bebas, sehingga hanya dapat digunakan sebagai pembanding karena tidak menunjukkan sistem biologis tubuh (Kurniawati & Sutoyo, 2021).

2.9 Spektrofotometri UV-Vis

Spektrofotometri UV-Vis, yang mengukur jumlah radiasi tampak atau ultraviolet yang diserap oleh zat dalam larutan. Alat ini akan mengukur rasio intensitas dua sinar cahaya di area yang terlihat. Spektrofotometri sederhana, cepat, cukup spesifik, dan dapat digunakan untuk mengidentifikasi hanya sejumlah kecil senyawa. Hukum Lambert-Beer adalah hukum dasar pada spektrofotometri (Wahyuni dkk., 2022). Untuk analisis kuantitatif biasanya menggunakan spektrofotometri UV-Vis. Alat ini menggunakan sumber gelombang elektromagnetik ultra violet dengan panjang gelombang 190-380 nm dan sinar tampak visible dengan panjang gelombang 380-780 nm (Asmaningrum dkk, 2016). Spektrofotometri UV-Vis bekerja dengan sinar yang datang akan diserap. Intensitas zat yang menyerap sinar sebanding dengan besarnya konsentrasi zat tersebut (Wahyuni *et al.*, 2022).

2.10 Toksisitas

Efek toksik suatu zat, pengumpulan data seperti dosis dan respon yang khas dari sediaan uji merupakan tujuan dari uji toksisitas. Informasi yang didapat dari uji ini yaitu digunakan untuk menentukan tingkat dari sediaan uji yang berbahaya ketika dipaparkan pada manusia, dan untuk menentukan dosis yang tepat untuk digunakan (BPOM RI, 2022).

Reaksi biokimia, fisiologik, dan patologik pada manusia dapat dilihat terhadap uji toksisitas akut dalam sediaan menggunakan hewan uji. Hasil uji tidak dapat digunakan untuk membuktikan bahwa bahan atau sediaan itu aman untuk digunakan pada manusia, tetapi mereka dapat menunjukkan tingkat toksisitas relatif dan membantu menemukan efek toksik ketika terpapar pada manusia (BPOM RI, 2022).

Pemilihan spesies, galur, jumlah hewan, umur, berat badan hewan, jenis kelamin, teknik dan prosedur pengujian termasuk penanganan hewan selama percobaan dan cara pemberian sediaan, dosis serta efek samping sediaan uji adalah komponen yang menentukan validitas hasil uji toksisitas secara *in vivo* (BPOM RI, 2022).

2.11 Uji toksisitas Akut Oral

Prinsip uji toksisitas akut oral adalah sediaan uji dalam dosis yang berbeda diberikan pada beberapa kelompok hewan uji, biasanya satu dosis untuk satu kelompok, dan kemudian diamati apakah ada efek toksik atau kematian. Dilakukan pembedahan terhadap hewan yang mati selama percobaan dan yang hidup sampai akhir percobaan untuk mengidentifikasi adanya gejala toksisitas pada organ hewan uji tersebut. Hewan yang mati karena sekarat menunjukkan gejala seperti adanya rasa nyeri, sakit atau distress dianggap sebagai hewan yang diberikan sediaan uji (BPOM RI, 2022).

Pada Tabel 2. menunjukkan kriteria bahaya dari GHS (*Globally Harmonised Classification System for Chemical Substances and Mixtures*). Kriteria penggolongan menurut OECD (2001) digunakan untuk menentukan kategori toksisitas akut dari bahan kimia, seperti pestisida, dan untuk menentukan labelnya.

Tabel 2. Kriteria penggolongan sediaan uji menurut OECD (pada tikus)

Dosis (mg/kg berat badan)	Kematian	Kategori
5	≥ 2 dari 5 ekor mati	1
5	≥ 1 ekor menunjukkan gejala toksisitas dan tidak ada kematian	2
50	≥ 2 dari 5 ekor mati	
50	≥ 1 ekor dengan gejala toksisitas dan tidak ada kematian	3
300	≥ 2 dari 5 ekor mati	
300	≥ 1 ekor dengan gejala toksisitas dan atau < 1 mati	4
2000	≥ 2 dari 5 ekor mati	
2000	≥ 1 ekor dengan gejala toksisitas dan atau tidak ada kematian	5
	Tidak ada gejala toksisitas	5/ unclassified

*) Tabel ini berlaku juga untuk pengujian pada mencit

Sedangkan untuk menentukan toksisitas akut, penggolongan klasifikasi yang digunakan untuk Obat, Obat Tradisional, Suplemen Kesehatan, dan bahan lainnya yang umumnya diakui aman *Generally Recognized As Safe* (GRAS) seperti bahan pangan dapat dilihat pada Tabel 3.

Tabel 3. Kriteria penggolongan sediaan uji

Tingkat Toksisitas	LD₅₀ oral (pada tikus)	Klasifikasi
1	≤ 5 mg/kg	Super Toksik
2	5-50 mg/kg	Sangat Toksik
3	$> 50 - 500$ mg/kg	Toksik
4	$> 500 - 2000$ mg/kg	Toksik Sedang
5	$> 2000-5000$ mg/kg	Toksik Ringan
6	> 5000 mg/kg	Tidak Toksik

(Hodge dan Sterner, 1995 dengan modifikasi)

*) Tabel ini berlaku juga untuk pengujian pada mencit.

Tujuan dari uji toksisitas akut oral adalah untuk mengidentifikasi toksisitas mendasar suatu zat, menentukan organ yang terpengaruh, mengevaluasi kepekaan spesies tertentu, memberikan informasi tentang bahaya setelah paparan akut terhadap zat tersebut, memberikan panduan awal untuk menetapkan dosis yang aman, merencanakan uji toksisitas lanjutan, menentukan nilai LD₅₀ dari bahan atau produk, serta mengklasifikasikan bahan atau produk tersebut dan merancang label yang sesuai (BPOM RI, 2022).

Pengujian ini diperlukan untuk mengidentifikasi efek toksik yang muncul dalam waktu yang singkat setelah pemberian perlakuan dalam dosis tunggal atau dosis yang diberikan berulang dalam jangka waktu tidak lebih dari 24 jam. Jika dosis diberikan secara berulang, interval waktu antar pemberian tidak kurang dari 3 jam (BPOM RI, 2022).

2.12 Metode Uji Toksisitas Akut (*Fixed Dose Method*)

Pada awalnya, toksisitas akut diuji dengan metode konvensional, namun metode ini memiliki kelemahan karena membutuhkan banyak hewan uji untuk menentukan parameter akhir, yang bertentangan dengan *animal welfare*. Pada tahun 1984 metode alternatif seperti metode *Up and Down Procedure*, *Fixed Dose Method* dan *Acute Toxic Class Method* dibuat dengan jumlah hewan yang lebih sedikit (BPOM RI, 2022).

Metode Alternatif direvisi dari standar OECD tahun 1984 untuk memfasilitasi klasifikasi senyawa kimia dengan lebih efisien. Dalam metode ini, yang digunakan hanya satu jenis kelamin hewan uji karena pada literatur menunjukkan bahwa perbedaan jenis kelamin tidak akan menghasilkan perbedaan nilai LD₅₀ yang signifikan. Meskipun secara umum hewan betina lebih sensitif dalam kondisi tertentu, metode alternatif ini memilih untuk menggunakan hanya hewan dengan jenis kelamin betina. Selain itu jumlah hewan yang digunakan dalam metode alternatif lebih sedikit dibandingkan dengan pendekatan konvensional. Panduan ini membahas uji toksisitas akut menggunakan metode *Fixed Dose Method*, *Acute Toxic Class Method* dan *Up and Down Procedure Method* (BPOM RI, 2022).

Untuk bahan uji dengan derajat toksisitas sedang tidak menimbulkan kematian, nyeri hebat, iritatif atau korosif. Kelompok hewan uji yang berjenis kelamin sama diberikan dosis bertingkat dengan metode yang tetap, yang mencakup 5, 50, 300 dan 2000 mg/kg berat badan, dengan dosis tambahan dapat mencapai 5000 mg/KgBB. Dosis awal yang tidak menimbulkan gejala dipilih berdasarkan uji pendahuluan. Proses ini dilakukan hingga dosis yang menyebabkan efek toksik atau ditemukannya tidak lebih dari satu kematian, atau efek toksik tidak terlihat hingga dosis yang paling tinggi dan mengalami kematian terjadi pada dosis yang lebih rendah.

2.13 Mekanisme Efek Toksik

Efek toksik terjadi ketika zat toksik atau metabolit aktifnya berinteraksi secara biokimia dengan bagian-bagian tertentu dari makhluk hidup seperti enzim, asam nukleat dan membran sel atau dengan reseptornya. Perubahan yang terjadi pada reseptor tersebut dapat memberikan stimulus yang bersifat positif atau negatif (Issa *et al.*, 2019). Dalam teori, intensitas efek toksik ditentukan oleh konsentrasi dan ketahanan toksikan utama dilokasi aksinya (*site of action*). Toksikan utama adalah istilah yang mengacu pada bahan kimia yang berinteraksi dengan molekul target atau mengubah lingkungan biologis, menyebabkan perubahan struktural atau fungsional yang menyebabkan toksisitas. Toksikan utama dapat berupa senyawa induk, metabolit, bahan kimia senyawa induk, reaksi oksigen atau nitrogen spesies (ROS atau RNS), atau molekul endogen yang dihasilkan selama proses biotransformasi toksikan. Absorpsi, distribusi ke lokasi aksi, reabsorpsi, dan toksifikasi semuanya dapat menyebabkan peningkatan konsentrasi. Sementara itu eliminasi pra-sistemik, distribusi menjauh dari lokasi aksi, ekskresi dan detoksifikasi akan menurunkan konsentrasi toksikan pada targetnya (Randa Kurniawan dkk., 2018).

2.14 Lethal Dose 50 (LD₅₀)

Pengujian toksisitas akut *lethal dose 50* (LD₅₀) dilakukan untuk menilai efek suatu senyawa pada hewan ketika diberikan dosis tunggal. Hal ini juga dilakukan untuk mengevaluasi keamanan obat dan bahan-bahan yang akan

digunakan secara langsung. Hewan coba diberi dosis secara bervariasi, kemudian dilakukan pengamatan selama 14 hari. Toksisitas intrinsik suatu zat serta mendapatkan informasi mengenai nilai LD₅₀ yaitu nilai yang menunjukkan dosis zat uji menyebabkan 50% kematian langsung pada hewan uji merupakan tujuan dari uji toksisitas akut (BPOM, 2014).

Nilai LD₅₀ dapat dipengaruhi antara lain usia, jenis kelamin, berat badan, spesies dan kesehatan nutrisi. Teknis pemberian juga dapat mempengaruhi hasil yaitu, suhu lingkungan, kelembapan, sirkulasi udara dan waktu pemberian (BPOM RI, 2022). Jika nilai LD₅₀ lebih rendah, senyawa tersebut akan lebih toksik. Sebaliknya, jika nilai LD₅₀ lebih tinggi, maka toksisitasnya lebih rendah.

2.15 Mencit Putih

Hewan coba adalah hewan penelitian biologis dan biomedik yang dipilih berdasarkan persyaratan atau standar dasar yang diperlukan untuk penelitian (Kurniawan dkk., 2018). Jumlah mencit yang digunakan sebagai model laboratorium adalah berkisar 40%. Hal ini disebabkan oleh kelebihan mencit yaitu memiliki siklus hidup yang pendek, jumlah kelahiran tinggi, mudah dalam perawatan, dan sifat produksi dan reproduksinya yang mirip dengan hewan mamalia lainnya. Selain itu, mencit memiliki kemampuan untuk hidup mencapai umur 1-3 tahun (Ubang dkk., 2022). Morfologi mencit dapat dilihat pada Gambar 5.



Gambar 5. Mencit (*Mus musculus* L.)

Nama latin mencit (*Mus musculus* L.) adalah hewan yang berukuran kecil dengan siklus hidup yang singkat, mudah berkembang biak, aktif pada malam hari dan merupakan hewan yang jinak (Hasanah dan Masri, 2015). Hal ini menjadi alasan mengapa mencit lebih sering digunakan sebagai hewan percobaan daripada hewan lainnya (Veterinus dkk., 2021).

BAB III

METODE PENELITIAN

3.1 Waktu dan Tempat Penelitian

Penelitian dilaksanakan pada bulan Maret hingga Mei 2024 di Laboratorium Farmasi Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam Universitas Pakuan, Bogor.

3.2 Alat dan Bahan

3.2.1 Alat

Alat-alat yang digunakan dalam penelitian ini adalah aluminium foil (*Best fresh*), ayakan, batang pengaduk (Pyrex[®]), cawan uap (Pyrex[®]), cawan krus, corong (Pyrex[®]), desikator, erlenmeyer (Pyrex[®]), gelas kimia (Pyrex[®]), gelas ukur (Pyrex[®]), gunting bedah(+1EDSTUFF), jarum sonde, kaca arloji, kertas saring, kuvet, labu ukur (Pyrex[®]), mikropipet, oven, penangas air, pipet tetes, sarung tangan (Sensi[®]), sendok tanduk, spektrofotometer UV-Vis (Jasco V-730[®]), tabung reaksi (Pyrex[®]), Tabung eppendorf (OneMed), tanur (Daihan Scientific[®]), dan timbangan analitik(Labpro[®]).

3.2.2 Bahan

Bahan-bahan yang digunakan dalam penelitian ini adalah akuades, buah kelapa sawit, daun salam koja dan biji buah markisa, asam klorida (HCl) pekat (HCl), asam klorida (HCl) 2 N, asam asetat anhidrat (CH₃CO)₂O, asam sulfat (H₂SO₄) pekat, aluminium klorida (AlCl₃), DPPH (2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl), etil asetat, besi (III) klorida (FeCl₃) 1%, serbuk magnesium, serbuk zink, gelatin, methanol pro analisis(Merck, Germany), mencit putih, natrium karboksimetil selulosa (Na-CMC), natrium klorida (NaCl), pereaksi dragendorff, pereaksi meyer, pereaksi bouchardat dan Vitamin C(Merck, Germany).

3.3 Metode Kerja

3.3.1 Pengumpulan Bahan Baku dan Determinasi Tanaman

Bahan yang dikumpulkan yaitu buah kelapa sawit (*Elaeis guineensis* Jacq.), daun salam koja (*Murraya koenigii* (Linn.) Spreng) dan buah markisa

(*Passiflora edulis* var. *edulis* Sims) dari Medan, Sumatera Utara. Ketiga sampel ini sudah didapatkan dan diterima dalam bentuk ekstrak kemudian untuk sampel yang masih utuh dalam bentuk tumbuhannya dilakukan determinasi yang dilaksanakan di PT. Palapa Muda Perkasa Chemicals Product and Chemicals Analysis Service di Jalan Kalimulya No. 23 Cilodong, Kota Depok Jawa Barat, 16417.

3.3.2 Penetapan Kadar Air Ekstrak

Penetapan kadar air untuk serbuk simplisia buah kelapa sawit, daun salam koja dan biji buah markisa dilakukan dengan metode gravimetri. Pertama-tama selama 15 menit cawan kosong dipanaskan menggunakan oven dengan suhu 105°C, kemudian didinginkan didalam desikator dan ditimbang bobot cawan. Masing-masing ekstrak sebanyak 2 gram ditimbang dalam cawan yang bobotnya telah diketahui, lalu dikeringkan dalam oven dengan suhu 105°C selama 5 jam, didinginkan lalu ditimbang. Ekstrak dikeringkan sampai bobot konstan, dimana perbedaan antara dua penimbangan tidak lebih dari 0,25% (Depkes RI, 1994). Kadar air dapat dihitung dengan rumus :

$$\text{Kadar air (\%)} = \frac{w_1 - w_2}{\text{Bobot sampel (g)}} \times 100 \%$$

Keterangan :

w_1 = bobot cawan + isi sebelum dipanaskan

w_2 = bobot cawan + isi sesudah dipanaskan

3.3.3 Penetapan Kadar Abu Ekstrak

Sebanyak 2 gram masing-masing sampel ditimbang lalu dimasukkan ke dalam krus porselen yang telah dipijarkan dan ditara sebelumnya. Sampel dipijarkan dalam tanur pada suhu 600°C sampai arang abis, kemudian didinginkan lalu ditimbang hingga bobot konstan $\pm 0,25$ %. Kadar abu ekstrak tidak lebih dari 10,2% (DepKes RI, 2009). Filtrat dimasukkan kedalam krus lalu diuapkan dan dipijarkan kembali hingga bobot konstan. Kadar abu dihitung terhadap bahan yang telah dikeringkan diudara (DepKes RI, 1980). Persentase kadar abu dapat dihitung dengan rumus :

$$\text{Kadar abu (\%)} = \frac{\text{Bobot krus isi sesudah tanur (g)} - \text{Bobot krus kosong (g)}}{\text{Bobot sampel (g)}} \times 100 \%$$

3.3.4 Skrining Fitokimia

3.3.4.1 Identifikasi Alkaloid

Masing-masing sampel ditimbang sebanyak 0,5 gram, kemudian ditambahkan 2 mL asam klorida 2N dan 9 mL air, dan dipanaskan diatas penangas air selama 15 menit. Sampel selanjutnya didinginkan dan disaring menggunakan kertas saring. Selanjutnya masing-masing sampel dibagi kedalam 3 tabung reaksi yang berbeda, tabung reaksi pertama direaksikan dengan beberapa tetes reagen Meyer, tabung reaksi kedua direaksikan dengan beberapa tetes reagen Dragendorff dan tabung reaksi ketiga direaksikan dengan beberapa tetes reagen Bouchardat. Diamati warna endapan yang terbentuk (Hanani, 2015).

3.3.4.2 Identifikasi Flavonoid

Masing-masing sampel ditimbang sebanyak 0,5 gram, kemudian ditambahkan 2-3 tetes etanol. Kemudian masing-masing larutan sampel dimasukkan 0,1 g serbuk Mg dan 10 tetes HCl pekat melalui dinding tabung, dan kemudian dikocok perlahan. Adanya flavonoid menunjukkan warna merah jingga, sedangkan warna kuning jingga menunjukkan adanya flavon, kalkon, dan auron.

3.3.4.3 Identifikasi Tanin

Masing-masing sampel sebanyak 0,5 gram kemudian ditambahkan dengan larutan 10% gelatin, natrium klorida gelatin (larutan 1% gelatin dalam larutan 10% natrium klorida dengan perbandingan 1:1) dan larutan 3% FeCl₃ sebanyak 3 tetes. Jika positif mengandung tanin akan ditandai dengan terbentuknya warna endapan putih pada penambahan 10% gelatin, menimbulkan warna hijau biru hingga kehitaman pada penambahan 3% FeCl₃ (Hanani, 2015).

3.3.4.4 Identifikasi Saponin

Masing-masing sampel ekstrak sebanyak 0,5 gram dimasukkan kedalam tabung reaksi dan ditambahkan 10 mL aquadest kemudian dikocok dengan kuat selama 10 detik. Terbentuknya busa yang stabil setelah pengocokkan dengan asam klorida menunjukkan bahwa itu mengandung saponin dan busa tidak hilang selama beberapa menit setelah pengocokkan (Hanani, 2015).

3.3.5 Pengujian Aktivitas Antioksidan Ekstrak Buah Kelapa Sawit Merah, Daun Salam Koja dan Biji Buah Markisa dengan Metode DPPH

3.3.5.1 Pembuatan Larutan Pereaksi

1. Pembuatan Larutan DPPH 1 mM

Serbuk DPPH ditimbang sebanyak 39,432 mg kemudian dilarutkan dengan metanol *pro analisa* hingga homogen dalam labu ukur 100 mL sampai tanda batas (setelah dilapisi aluminium foil) didapatkan larutan induk DPPH 1 mM (Tristantini dkk., 2016).

2. Pembuatan Larutan Blanko

Larutan DPPH 1 mM sebanyak 1 mL ditambahkan metanol *pro analisa* hingga homogen ke dalam labu ukur 10 mL sampai tanda batas. Larutan blanko diinkubasi selama 30 menit pada suhu 25-30°C (aluminium foil telah dilapisi pada labu ukur). Absorbansi larutan blanko diukur dengan panjang gelombang maksimal DPPH 1 mM yang sebelumnya diperoleh (Tristantini dkk., 2016).

3. Pembuatan Larutan Standar Induk Vitamin C 100 PPM

Serbuk vitamin C ditimbang 100 mg ditambahkan dengan metanol *pro analisa* sampai larut dalam labu ukur 100 mL dan mencapai tanda batas (1000 ppm). Untuk larutan induk vitamin C 100 ppm, larutan vitamin C 1000 ppm dipipet 1 mL ditambahkan ke dalam labu ukur 10 mL dengan metanol *pro analisa* sampai tanda batas (100 ppm) (Tristantini dkk., 2016).

3.3.5.2 Penentuan Panjang Gelombang Maksimum DPPH

Larutan DPPH 1 mM dipipet, 1 mL diencerkan dengan metanol *pro analisa* ke dalam labu ukur 10 mL hingga tanda batas. Kemudian diinkubasi selama 30 menit. Diukur serapannya pada panjang gelombang maksimal 400-800 nm, dan panjang gelombang ditetapkan ketika diperoleh serapan tertinggi (Tristantini dkk., 2016).

3.3.5.3 Penetapan Waktu Inkubasi Optimum

Larutan vitamin C 100 ppm dipipet 1 mL. Ditambahkan 1 mL larutan DPPH 1 mM. Kemudian dimasukkan ke dalam labu ukur 10 mL. Ditambahkan

metanol *pro analisa* sampai tanda batas dan dihomogenkan. Serapan diukur pada 10, 20, 30, 40, 50 dan 60 menit hingga diperoleh waktu serapan optimum.

3.3.5.4 Pembuatan Deret Larutan Vitamin C (Kontrol Positif)

Larutan vitamin C 100 ppm dibuat deret 0,5, 1, 1,5, 2, 2,5 dan 3 ppm, dimasukkan ke dalam labu ukur 10 mL. Tiap konsentrasi ditambahkan 1 mL larutan DPPH 1 mM dan metanol *pro analisa* sampai tanda batas kemudian dilapisi dengan aluminium foil. Absorban diukur dengan panjang gelombang maksimum yang sebelumnya larutan sudah diinkubasi pada waktu optimum.

3.3.5.5 Pembuatan Larutan Uji

1. Larutan Induk (100 PPM)

Dilakukan kombinasi pada ekstrak buah kelapa sawit merah, daun salam koja dan biji buah markisa dengan perbandingan (1:1:1) (1:1:2) (1:2:1) dan (2:1:1) kemudian dilarutkan dengan metanol *pro analisa* ke dalam labu ukur 100 mL hingga tanda batas. Untuk larutan induk 100 ppm, larutan uji 1000 ppm dipipet 1 mL ditambahkan dengan metanol *pro analisa* dimasukkan ke dalam labu ukur 10 mL hingga tanda batas (100 ppm).

2. Pembuatan Larutan Deret Standar Konsentrasi

Dari masing-masing perbandingan larutan ekstrak dibuat deret konsentrasi 1,5, 2,5, 3,5, 4,5 dan 5,5 ppm. Tiap konsentrasi ditambahkan 1 mL larutan DPPH 1 mM dan metanol *pro analisa* sampai tanda batas labu ukur 10 mL dan dihomogenkan. Deret larutan uji diinkubasi selama waktu optimum pada 25-30°C (suhu kamar) dalam ruangan gelap. Absorban diukur pada panjang gelombang maksimum.

3.3.5.6 Penentuan Nilai IC₅₀ (Inhibitory Concentration)

Persamaan regresi linier diperoleh berdasarkan konsentrasi sampel dan persen inhibisi pada sumbu x dan y yang digunakan dalam menentukan nilai IC₅₀. Serapan deret larutan vitamin C, deret larutan uji dan blanko diukur pada spektrofotometer dengan panjang gelombang maksimum yang didapatkan. Nilai persentase hambatan DPPH dihitung berdasarkan nilai *Inhibition Concentration 50*

% yaitu konsentrasi sampel yang dapat merendam radikal bebas DPPH sebanyak 50%. Nilai IC₅₀ dihitung dengan rumus :

$$\% \text{ Inhibisi} = \frac{[A \text{ blanko (DPPH)} - [A \text{ sampel (ekstrak) atau (vit C)}]}{[A \text{ blanko (DPPH)}]} \times 100 \%$$

Dimana A = absorbansi

Grafik diperoleh berdasarkan harga persentase inhibisi menghasilkan persamaan regresi linier. Persamaan garis regresi linier $y = bx + a$, dimana $y = 50$ dan $x =$ menunjukkan IC₅₀ (Molyneux, 2004).

3.3.6 Kode Etik Hewan

Kode etik hewan coba dilakukan di FMIPA Universitas Pakuan. Tujuan dilakukan kode etik hewan agar dapat mengetahui etika penanganan hewan coba sehingga dapat meningkatkan keselamatan hewan coba.

3.3.7 Rancangan Penelitian

Penelitian dilakukan dengan menggunakan metode *Fixed Dose*. Sekelompok hewan uji dengan jenis kelamin yang sama diberi dosis bertingkat mulai dari 5, 50, 300 dan 2000 mg/kgBB. Mencit betina (*Mus musculus*) yang homogen berdasarkan bobot badan dan atau umur. Pada penelitian ini uji toksisitas akut oral dilakukan menggunakan metode *Fixed Dose Procedure* dengan parameter perlakuannya yaitu uji pendahuluan, *limit test* (uji pembatasan) dan *main test* (uji utama).

A. Uji Pendahuluan

Tujuan dari uji pendahuluan adalah untuk menentukan dosis awal yang tepat untuk uji utama dengan menggunakan 1 ekor mencit. Menurut *Organization for Economic Co-operation and Development* (OECD) 420, pemilihan tingkatan *fixed dose* 5, 50, 300 dan 2000 mg/kgBB merupakan dosis awal untuk uji pendahuluan yang dapat dipilih dan dosis ini dianggap memiliki efek toksik. Sampai saat ini belum ada penelitian yang menunjukkan LD₅₀ dari ekstrak buah kelapa sawit merah, daun salam koja dan biji buah markisa, sehingga untuk tahap awal dalam rangka mencari kisaran LD₅₀ dimulai pada dosis 300 mg/KgBB, dosis 300 mg/KgBB dipilih karena belum ada uji sebelumnya. Dosis tersebut dapat diturunkan apabila terbukti adanya bukti toksisitas atau kematian. Hewan uji yang

menunjukkan gejala toksisitas, seperti perubahan aktivitas otonom, seperti berjalan menggunakan perut, diare, menyiksa diri sendiri, perdarahan di orifisium atau tidak adanya bukti toksisitas pada dosis 2000 mg/KgBB uji pendahuluan ini dapat dihentikan. Kemudian, uji utama dilakukan sesuai dengan prosedur OECD (OECD, 2001). Untuk setiap dosis, waktu pengamatan harus dilakukan minimal 24 jam, dan setiap hewan harus diamati selama minimal 14 hari (BPOM RI, 2022).

B. Uji Batas

Tidak perlu diberikan dosis lebih dari 2000 mg/KgBB jika pada uji pendahuluan tidak ada kematian atau tidak ada hewan yang meninggal pada dosis 2000 mg/KgBB pada uji utama. Penetapan uji batas pada penelitian dibuat berdasarkan bahan dan produk. Jika penelitian pada bahan atau produk menunjukkan bahwa uji batas untuk obat tradisional dapat dilakukan pada dosis 5000 mg/KgBB, maka uji batas tersebut juga dapat dilakukan pada dosis 2000 mg/KgBB (BPOM RI, 2022).

C. Uji Utama

Uji utama digunakan untuk menentukan uji yang sebenarnya dengan menentukan kisaran nilai LD₅₀ dari suatu senyawa dengan 5 ekor hewan uji pada setiap tingkatan dosis, yaitu 5, 50, 300, 2000 mg/KgBB. Dosis awal yang diberikan pada uji pendahuluan telah ditetapkan, lalu dilakukan pengamatan intensif setiap 30 menit selama 4 jam pertama, setiap 4 jam selama 24 jam dan sehari sekali selama 14 hari. Jika lebih dari 2 hewan uji meninggal, dosis diturunkan satu tingkat lebih rendah dari dosis awal. Jika kematian hewan uji ≤ 1 , maka dapat langsung ditentukan kisaran nilai LD₅₀ (OECD, 2001).

3.3.8 Penyiapan Hewan Uji

Perlakuan pada hewan uji dikerjakan sesuai protokol yang sudah disetujui oleh Komite Etik Hewan Farmasi Fakultas MIPA Universitas Pakuan. Hewan uji yang digunakan yaitu mencit betina (*Mus musculus*) virgin (galur ddY) dewasa yang sehat dengan bobot 20-30 gram dan berumur 8-12 minggu dengan rata-rata berat badan tidak boleh lebih dari 20%. Hewan betina digunakan karena lebih sensitif dibandingkan hewan jantan. Homogenitas bobot badan hewan harus diketahui berdasarkan nilai CV (*Coeffisient of Variation*). Nilai CV ≤ 15 %

dinyatakan homogen. Hewan coba kemudian diaklimatisasi selama 5-7 hari, diberi makan dan minum standar secara *ad libitum*. Tujuan uji aklimatisasi adalah untuk menyesuaikan diri terhadap lingkungan yang baru. Hewan uji dipuasakan selama 3-4 jam sebelum diberikan sediaan uji air minum boleh diberikan, kemudian hewan ditimbang lalu sediaan uji boleh diberikan. Alat sonde digunakan untuk memberikan sediaan uji dalam dosis tunggal (BPOM RI, 2022).

Hewan uji dipelihara didalam kandang yang terbuat dari bahan yang kedap air, kuat dan mudah dibersihkan, dan diruangan yang tidak bising. Tempat makan dan tempat minum diletakkan terpisah di atas tutup kawat pada bagian alas kandang yang diberi sekam. Menurut *National Research Countil (US) Committee for the Update of the Guide for the Care and Use of Laboratory Animals* (2011) luas area kandang per ekor hewan untuk mencit dengan berat badan 15-25 gram minimal 80 cm² dan tinggi kandang minimal 13 cm.

3.3.9 Penentuan Dosis dan Volume Pemberian

Dosis uji pendahuluan dengan formula (1:1:1) dalam pengujian ini yaitu dosis yang sesuai dengan metode *fixed Dose* dan berdasarkan pertimbangan pada *lethal dose* masing-masing tanaman yaitu dimulai pada dosis 50, 300 dan 2000 mg/KgBB. Volume cairan tertinggi yang dapat diberikan tergantung pada berat badan hewan uji. Bila pelarut air (*aqueous*), batas volume maksimal yang dapat diberikan adalah 1 mL pada mencit dengan berat badan >50 gram (BPOM RI, 2022).

3.3.9.1 Pembuatan Sediaan Uji Kombinasi Formula Buah Kelapa Sawit

Merah, Daun Salam Koja dan Biji Buah Markisa

Hewan uji harus dipuasakan terlebih dahulu sebelum diberikan sediaan uji. Hewan uji dipuasakan sekitar 3-4 jam, tetapi pemberian air minum masih dapat diberikan. Setelah dipuasakan dan diberi sediaan uji, hewan uji kemudian ditimbang. Sediaan uji diberikan dalam dosis tunggal menggunakan sonde. Setelah diberikan perlakuan, pakan boleh diberikan kembali setelah 3-4 jam. Pada situasi dimana dosis tidak dapat diberikan satu kali, sebelum mencapai waktu 24 jam sediaan uji dapat diberikan beberapa kali. Untuk mencit, pakan dapat diberikan

kembali setelah 1-2 jam setelah pemberian perlakuan. Sediaan uji dapat diberikan beberapa kali, tergantung pada lama periode pemberian sediaan uji. (BPOM RI, 2022).

3.3.9.2 Pembuatan Na-CMC 0,5 %

Serbuk Na-CMC ditimbang sebanyak 0,5 gram, kemudian ditaburkan ke dalam mortir yang berisi 20 bagian air panas dan didiamkan selama 15 menit hingga mengembang. Aquadest ditambahkan sebanyak 10 bagian lalu digerus sampai homogen. Volume suspensi dicukupkan hingga 100 mL dengan akuades dan diaduk sampai terbentuk massa suspensi yang homogen.

3.3.9.3 Larutan Uji dengan dosis 300 mg/KgBB

Larutan kombinasi ekstrak dibuat dengan konsentrasi dosis sediaan uji 3 % ditimbang masing-masing ekstrak sebanyak 100 mg ekstrak yang terdiri dari campuran ekstrak buah kelapa sawit merah, daun salam koja dan biji buah markisa (1:1:1) kemudian dilarutkan dengan Na CMC 0,5 % sebanyak 10 mL hingga larut, kemudian dimasukkan ke dalam tabung eppendorf dan diberi label sediaan uji dosis 300 mg/KgBB.

3.3.9.4 Larutan Uji dengan dosis 2000 mg/KgBB

Larutan kombinasi ekstrak dibuat dengan konsentrasi dosis sediaan uji 20 % ditimbang ekstrak sebanyak 667 mg ekstrak yang terdiri dari campuran ekstrak buah kelapa sawit merah, daun salam koja dan biji buah markisa (1:1:1) kemudian dilarutkan dengan Na CMC 0,5 % sebanyak 10 mL hingga larut, kemudian dimasukkan ke dalam tabung eppendorf dan diberi label sediaan uji dosis 2000 mg/KgBB.

3.3.10 Percobaan Uji Toksisitas Modifikasi Metode *Fixed Dose*

Dosis untuk uji utama ditentukan melalui uji pendahuluan. Menggunakan 3 kelompok dengan jumlah hewan uji yang digunakan masing-masing 1 hewan mencit untuk setiap tingkatan dosis dan diberi sediaan uji secara oral sebanyak \pm 1 mL, yang dimulai dengan dosis bertingkat yang dimulai dari 300 mg/KgBB dan

2000 mg/KgBB sebagai dosis yang diharapkan dapat menimbulkan efek toksik. Perlakuan uji toksisitas dapat dilihat pada Tabel 4.

Tabel 4. Uji Toksisitas

Pengujian	Kelompok	Perlakuan
Kontrol Negatif	Kontrol negatif	Diberi Na CMC 0,5 %
Pendahuluan	Kelompok I	Dosis 300 mg/KgBB
	Kelompok 2	Dosis 2000 mg/KgBB
Utama	Kelompok III	Dosis 2000 mg/KgBB

Setelah diberikan sediaan uji maka dilakukan pengamatan terhadap kematian dan gejala toksisitas. Setelah ditemukan kematian pada hewan kemudian dicatat dan ditentukan dosis untuk uji utama. Pengujian utama dilakukan untuk menentukan kisaran nilai LD₅₀ suatu senyawa dengan 5 mencit untuk tiap tingkatan dosis uji. Kelima hewan uji tersebut terdiri atas satu ekor pada uji pendahuluan dan 4 ekor hewan uji yang baru. Pada setiap tingkatan dosis yang digunakan yaitu 50 mg, 300 mg dan 2000 mg/KgBB dan 5 hewan uji untuk kelompok kontrol dengan hanya diberikan akuadest. Uji pendahuluan menentukan dosis awal yang digunakan. Pengamatan dilakukan pada menit ke-0, 30, 60, 120, 240 selama 24 jam dan sekali setiap hari setelah itu selama 14 hari.

3.3.11 Pengamatan Hewan Uji

Untuk mengidentifikasi gejala toksisitas setelah pemberian sediaan uji, hewan uji diamati secara individual setidaknya 30 menit setelah pemberian sediaan uji, kemudian secara berkala setiap 4 jam selama 24 jam pertama, dan sehari sekali setelah itu selama 14 hari. Gejala yang diamati pada hewan uji berupa perubahan perilaku, *grooming* (kebiasaan membersihkan diri dengan cara menjilati tubuhnya), *letargi* (kelesuan), gelantung, *straub* (terjadinya ketegangan pada ekor mencit yang

tegak lurus dengan lantai dan terlihat kaku), *reflek pineal* (dapat dilakukan dengan cara mengelitiki telinga hewan uji), *reflek korneal* (dilakukan untuk mengetahui ada tidaknya reflek pada mata mencit), *tremor*, kejang, *ptosis* (seperti mengantuk dimana kelopak matanya tertutup setengah atau sepenuhnya), *piloereksi* (berdirinya rambut hewan uji), urinasi dan defekasi serta jumlah hewan yang mati selama uji. Pada penelitian ini penimbangan berat badan hewan uji dilakukan setiap hari selama 14 hari.

3.3.12 Penentuan Kisaran LD₅₀

Pedoman uji toksisitas praklinik secara *in vivo* menetapkan kriteria bahaya GHS (*Global Harmonised Classification System for Chemical Substances and Mixtures*) hasil toksisitas akut dinilai berdasarkan kriteria tersebut (BPOM RI, 2022). Penentuan kategori toksisitas akut menggunakan penggolongan klasifikasi seperti pada Tabel 5.

Tabel 5. Kriteria penggolongan sediaan uji

Tingkat Toksisitas	LD ₅₀ oral (pada tikus)	Klasifikasi
1	≤ 5 mg/kg	Super Toksik
2	5-50 mg/kg	Sangat Toksik
3	> 50 – 500 mg/kg	Toksik
4	> 500 – 2000 mg/kg	Toksik Sedang
5	> 2000-5000 mg/kg	Toksik Ringan
6	> 5000 mg/kg	Tidak Toksik

(BPOM RI, 2022).

*) Tabel ini berlaku juga untuk pengujian pada mencit

3.3.13 Pengamatan Indeks Organ

Setelah 14 hari pengujian kemudian hewan uji dilakukan pembedahan dengan melakukan *eutanasia* terlebih dahulu terhadap hewan uji, dengan menggunakan chamber CO₂. Setelah itu organ hati, ginjal, limpa dan jantung dibersihkan terlebih dahulu dengan cara dicuci bersih menggunakan NaCl fisiologis 0,9% lalu dipisahkan dari jaringan yang masi menempel kemudian dikeringkan

dengan menggunakan tissue, kemudian organ-organ tersebut ditimbang dan dilakukan pengamatan makroskopik terhadap organ hati, ginjal, limpa dan jantung dengan cara dilihat dari perubahan warna, bentuk, ukuran dan konsistensinya. Kemudian dilakukan penimbangan pada bobot organ absolut dan dicatat untuk dijadikan dasar perhitungan bobot organ relative dan indeks organ dapat dihitung menggunakan rumus sebagai berikut :

$$\text{Berat organ relatif} = \frac{\text{Berat organ mencit (gram)}}{\text{Berat badan mencit (gram)}} \times 100\%$$

3.3.14 Analisis Data

Analisis data dilakukan untuk mengetahui perbandingan aktivitas antioksidan dari ekstrak buah kelapa sawit merah, ekstrak daun salam koja dan ekstrak biji buah markisa berdasarkan perbedaan perbandingan konsentrasi ekstrak yang digunakan. Data diperoleh dan dianalisis secara statistik menggunakan Analysis of Varians (ANOVA) dengan rancangan acak lengkap (RAL) menggunakan program SPSS dengan taraf kepercayaan 95% ($\alpha \leq 0,05$). Apabila terdapat perbedaan maka dilanjutkan dengan uji lanjut Duncan untuk mengetahui perbedaan dari masing-masing perbandingan kombinasi ekstrak.

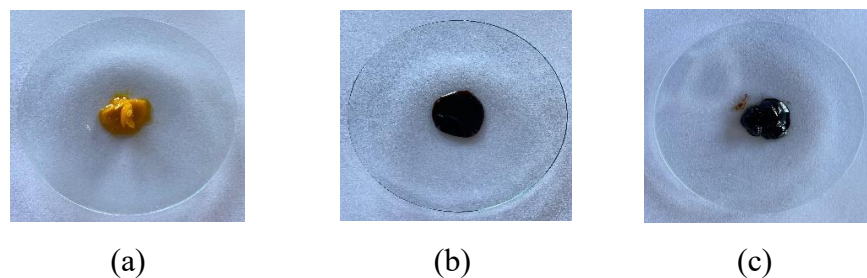
BAB IV HASIL DAN PEMBAHASAN

4.1 Hasil Determinasi Tanaman

Berdasarkan hasil determinasi nomor 996/IPH.11.02/If.11/1/2023 yang telah dilakukan, dinyatakan bahwa Buah kelapa sawit merah yang digunakan memiliki jenis dengan nama ilmiah *Elaeis guineensis* termasuk kedalam suku *Aracaceae*, daun salam koja yang digunakan memiliki jenis dengan nama ilmiah *Murraya koenigii* L. *Spreng* termasuk kedalam suku *Rutaceae* sedangkan biji buah markisa yang digunakan memiliki jenis dengan nama ilmiah *Passiflora edulis* var *edulis* Sims termasuk kedalam suku *Passifloraceae*. Lampiran 2, 3 dan 4 merupakan hasil tanaman yang telah dideterminasi.

4.2 Hasil Organoleptik Ekstrak

Karakteristik organoleptik pada ekstrak bertujuan untuk mengetahui kualitas mutu ekstrak. Karakteristik organoleptik pada ekstrak meliputi warna, rasa dan bau. Pada penelitian ini hasil uji organoleptik pada ekstrak buah kelapa sawit merah berwarna orange jingga, memiliki bau yang khas tetapi tidak kuat, memiliki rasa yang hambar dan berminyak. Hasil uji organoleptik pada ekstrak daun salam koja yaitu memiliki warna hitam kehijauan, memiliki rasa sedikit pahit dan memiliki bau khas seperti bau khas kari dari daun salam koja tersebut. Sedangkan untuk hasil uji organoleptik ekstrak biji buah markisa memiliki warna hitam pekat sedikit kecoklatan, memiliki bau yang khas, rasa yang pahit dan agak sepat. Uji organoleptik pada ekstrak dapat dilihat pada Gambar 6.



Gambar 6. Uji Organoleptik Ekstrak

Keterangan :

- (a) = Ekstrak Buah Kelapa Sawit Merah (BKSM)
- (b) = Ekstrak Daun Salam Koja (DSK)
- (c) = Ekstrak Biji Buah Markisa (BBM)

4.3 Hasil Penetapan Kadar Air Ekstrak

Pengujian kadar air merupakan metode yang sangat penting karena untuk menentukan kualitas juga ketahanan dari simplisia maupun ekstrak terhadap kerusakan yang mungkin terjadi. Kadar air yang lebih tinggi meningkatkan tingkat kerusakan yang dapat disebabkan oleh mikroorganisme pada simplisia dan ekstrak. Dengan berkurangnya kadar air maka akan mengurangi kemungkinan terjadinya hal seperti kerusakan pada simplisia maupun ekstrak yang diakibatkan oleh mikroorganisme. Metode gravimetri menguapkan air dari bahan kemudian menimbang sampai beratnya konstan, yang menunjukkan bahwa semua air sudah diuapkan. Metode ini digunakan untuk mengetahui kadar air dalam ekstrak (Ahmad Daud dkk., 2019). Hasil kadar air dari ketiga ekstrak dapat dilihat pada Tabel 6.

Tabel 6. Hasil Penetapan Kadar Air

Sampel	Rata-rata kadar air \pm SD (%)	Syarat Kadar Air
Ekstrak BKSM	2,8731 \pm 0,07	
Ekstrak DSK	3,3316 \pm 0,11	\leq 10%
Ekstrak BBM	4,5819 \pm 0,13	(BPOM, 2014).

Hasil kadar air pada ekstrak buah kelapa sawit merah setelah dilakukan pemanasan berulang selama 3 kali dengan suhu 105°C untuk mendapatkan nilai bobot konstan yaitu selisih tidak lebih dari 0,25%. Nilai selisih tidak lebih dari 0,25% dapat diartikan bobot dikatakan konstan apabila selisih pemanasan pertama dengan pemanasan selanjutnya adalah 0,25 gram pada setiap 100 gram simplisia. Sehingga untuk simplisia dengan bobot 2 gram maka syarat nilai bobot konstannya dengan selisih 0,005 gram. Hasil rata-rata kadar air ekstrak buah kelapa sawit merah adalah 2,8731% \pm 0,07. Pada hasil kadar air ekstrak daun salam koja didapatkan hasil nilai rata-rata dari kadar air ekstrak daun salam koja adalah 3,3316% \pm 0,11.

Pada hasil kadar air ekstrak biji buah markisa didapatkan hasil nilai rata-rata dari kadar air ekstrak biji buah markisa adalah $4,5819\% \pm 0,13$. Hasil yang diperoleh dapat dinyatakan bahwa pada ekstrak buah kelapa sawit merah, ekstrak daun salam koja dan ekstrak biji buah markisa memenuhi syarat kadar air yaitu $\leq 10\%$ (BPOM, 2014). Hasil perhitungan kadar air ekstrak dapat dilihat pada Lampiran 6.

4.4 Hasil Penetapan Kadar Abu Ekstrak

Pengujian kadar abu merupakan salah satu metode pengujian untuk mengetahui kandungan total mineral dan zat organik lainnya yang terkandung dalam sampel, dilakukan dengan menggunakan tanur dengan cara menguapkan senyawa organik dan turunannya pada suhu $600-800^{\circ}\text{C}$ sehingga yang tersisa hanya zat organiknya saja. Semakin rendah kadar abu suatu bahan, semakin tinggi kemurniannya. Faktor yang dapat mempengaruhi kualitas ekstrak dari masing-masing bahan baku adalah kandungan mineral pengotor yang melebihi batas persyaratan yang ditetapkan (Siswati, 2020). Mineral juga dapat berasal dari kompleks yang bersifat organik (Supriningrum dkk, 2019). Hasil kadar abu dari ketiga ekstrak dapat dilihat pada Tabel 7.

Tabel 7. Hasil Penetapan Kadar Abu

Sampel	Rata-rata kadar abu \pm SD (%)	Syarat Kadar Abu
Ekstrak BKSM	$3,8536 \pm 0,13$	
Ekstrak DSK	$4,3043 \pm 0,15$	$\leq 10,2\%$
Ekstrak BBM	$4,8406 \pm 0,04$	(FHI, 2009).

Hasil kadar abu pada ekstrak buah kelapa sawit merah yang dilakukan sebanyak 3 kali pengulangan yaitu didapatkan hasil nilai rata-rata dari kadar abu ekstrak buah kelapa sawit merah adalah $3,8536\% \pm 0,13$. Pada hasil kadar abu ekstrak daun salam koja didapatkan hasil nilai rata-rata dari kadar abu ekstrak daun salam koja adalah $4,3043\% \pm 0,15$. Pada hasil kadar abu ekstrak biji buah markisa didapatkan hasil nilai rata-rata dari kadar abu ekstrak biji buah markisa adalah $4,8406\% \pm 0,04$. Hasil yang diperoleh dapat dinyatakan bahwa pada ekstrak buah

kelapa sawit merah, ekstrak daun salam koja dan ekstrak biji buah markisa memenuhi syarat kadar abu yaitu $\leq 10,2\%$ (Depkes RI, 2009). Hasil perhitungan kadar abu ekstrak dapat dilihat pada Lampiran 7.

4.5 Hasil Skrining Fitokimia

Buah kelapa sawit merah, daun salam koja dan biji buah markisa dilakukan proses skrining fitokimia untuk mengetahui kandungan senyawa aktifnya. Uji fitokimia adalah metode kualitatif yang digunakan untuk mengidentifikasi kandungan senyawa aktif dalam sampel tertentu, sehingga memungkinkan pengenalan metabolit sekunder yang memiliki potensi sebagai antioksidan (Wibawa dkk., 2020). Uji kualitatif yang dilakukan mencakup uji alkaloid, flavonoid, tanin dan saponin. Hasil uji fitokimia dari masing-masing ekstrak dapat dilihat pada Tabel 8. Data hasil skrining fitokimia dari ketiga ekstrak tersebut dapat dilihat pada Lampiran 8.

Tabel 8. Hasil Uji Fitokimia

Sampel	Golongan Senyawa Kimia			
	Alkaloid	Flavonoid	Tanin	Saponin
Buah Kelapa Sawit Merah	(+)	(+)	(+)	(+)
Daun salam koja	(+)	(+)	(+)	(+)
Biji buah markisa	(+)	(+)	(+)	(+)

Keterangan : (+) : mengandung senyawa metabolik, (-) : tidak mengandung senyawa metabolik

Hasil skrining fitokimia yang diperoleh berdasarkan tabel diatas yaitu menunjukkan bahwa dari ketiga ekstrak tersebut mengandung senyawa alkaloid, flavonoid, tanin dan saponin. Berdasarkan hasil uji alkaloid ditemukan endapan berwarna kuning setelah penambahan reagen mayer dan adanya endapan jingga hingga coklat kehitaman setelah penambahan reagen dragendroft. Pada pengujian alkaloid dengan reagen bouchardart menunjukkan perubahan warna menjadi coklat kehitaman, hasil positif yang ditunjukkan oleh reagen mayer, bouchardat dan dragendroft mengidentifikasikan bahwa ekstrak mengandung senyawa alkaloid.

Senyawa alkaloid yang diidentifikasi merupakan hasil reaksi dengan reagen Mayer pada sampel uji. Hal ini terjadi karena nitrogen pada alkaloid bereaksi dengan ion kalium (K^+) dari kalium tetraiodomercurat (II), membentuk kompleks kalium alkaloid yang menghasilkan endapan coklat.

Hasil skrining pada pengujian flavonoid yang dilakukan pada ketiga ekstrak tersebut ditemukan adanya perubahan warna menjadi kuning jingga. Kandungan alkaloid dan flavonoid yang terdapat dalam daun salam koja (*Murraya koenigii* (Linn.) Spreng) memiliki potensi sebagai antioksidan. Senyawa flavonoid dapat berperan dengan melepas proton dari gugus hidroksil (OH), sementara senyawa alkaloid dapat terikat secara kovalen dengan atom nitrogen (N) pada gugus alkaloid. Hasil ini sesuai dengan penelitian Mustanir dkk (2019) terkait manfaat senyawa flavonoid dalam ekstrak daun salam koja. Kandungan flavonoid ini berperan sebagai antioksidan, memiliki sifat antimikroba, dan juga bersifat antiinflamasi. Biji markisa mengandung senyawa flavonoid dan polifenol yang berperan sebagai antioksidan dan antibakteri. Senyawa-senyawa ini bekerja dengan cara mendonorkan ion hidrogen untuk menetralkan efek toksik dari radikal bebas. Selain itu, dapat mengikat asam amino nukleofilik pada protein dan menginaktivasi enzim (Karnirius dkk., 2022).

Hasil skrining pada pengujian tanin yang dilakukan pada ketiga ekstrak tersebut pada penambahan larutan gelatin 1% menghasilkan perubahan warna menjadi endapan putih, sedangkan pada penambahan larutan 1% $FeCl_3$ menghasilkan perubahan warna menjadi hijau biru hingga kehitaman. Tanin terdiri dari senyawa polifenol yang memiliki kemampuan untuk menangkap radikal bebas maka dari itu semakin tinggi kandungan tanin, semakin besar aktivitas antioksidannya (Meiske dkk., 2012). Pada ekstrak yang mengandung tanin cenderung mengendapkan protein pada gelatin dan membentuk kopolimer yang tidak larut dalam air, yang ditandai dengan terbentuknya endapan putih. Berdasarkan hasil uji tanin yang diperoleh yaitu positif menunjukkan adanya perubahan warna menjadi hijau kehitaman karena senyawa fenolik yang teroksidasi.

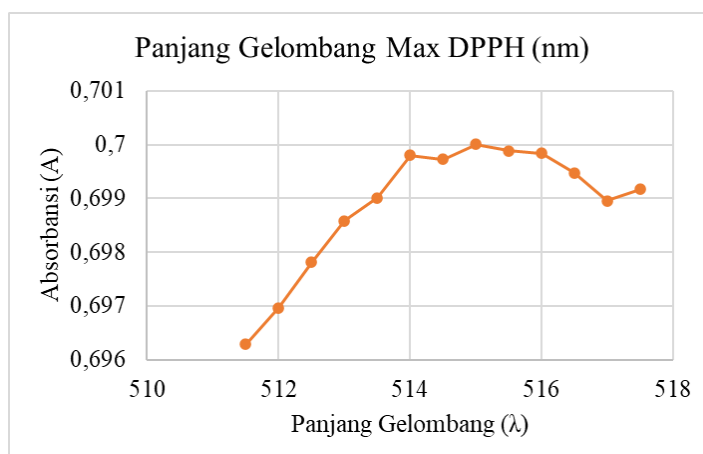
Hasil skrining pada pengujian saponin yang dilakukan pada ketiga ekstrak tersebut pada pengujian ini mendapatkan hasil yang positif yang ditunjukkan dengan adanya busa. Hal ini terjadi karena senyawa saponin yang terdapat pada ekstrak buah kelapa sawit dapat memiliki berbagai khasiat, seperti sebagai antibakteri, antivirus, sitotoksik atau antikanker serta efek hipokolesterolemia. Pada ekstrak daun salam koja, hasil yang positif ditunjukkan dengan timbulnya busa yang stabil selama 10 menit. Mekanisme kerja senyawa saponin adalah ketika HCl ditambahkan kedalam sampel untuk menghidrolisis saponin. Proses ini menghasilkan aglikon spesifik dari saponin, yang kemudian akan membentuk saraponin atau sapogenin. Kombinasi antara rantai sapogenin atau saraponin yang bersifat non-polar dengan rantai samping yang polar dan larut dalam air akan menyebabkan terbentuknya busa. Senyawa saponin dalam ekstrak biji buah markisa memiliki aktivitas sebagai antioksidan karena kemampuannya meredam superoksida, yang dapat mencegah kerusakan biomolekul akibat radikal bebas. Selain itu, saponin juga bermanfaat sebagai agen antijamur (Anggraeni Putri dkk., 2023).

4.6 Hasil Uji Aktivitas Antioksidan

4.6.1 Hasil Penentuan Panjang gelombang DPPH

Tujuan dari penetapan panjang gelombang maksimum adalah untuk menentukan panjang gelombang yang memberikan absorbansi maksimal pada DPPH dengan menggunakan alat spektrofotometer UV-Vis, sehingga dapat mencapai sensitivitas analisis yang optimal (Hariyani dkk., 2020). Panjang gelombang maksimum DPPH diukur dalam rentang 400-800 nm, dan panjang gelombang maksimum yang terdeteksi dalam penelitian ini adalah 515 nm dengan absorbansi maksimum mencapai 0,700008. Secara teoritis panjang gelombang maksimum DPPH yang menunjukkan absorbansi kuat adalah pada panjang gelombang 517 nm. Menurut Molyneux (2004), panjang gelombang DPPH biasanya berkisar antara 515-520 nm. panjang gelombang yang didapatkan pada penelitian ini yaitu 515 nm, sudah termasuk dalam rentang yang disebutkan. Pada beberapa penelitian didapatkan hasil panjang gelombang maksimum yang berbeda,

seperti pada penelitian (Nathania dkk., 2020) didapatkan sebesar 517 nm dan pada penelitian (Armin dkk., 2014) didapatkan sebesar 512 nm. Hasil yang berbeda tersebut dikarenakan adanya beberapa faktor salah satunya perbedaan deteksi dari alat pengukurannya. Data lengkap hasil penentuan panjang gelombang maksimum dapat dilihat pada Lampiran 9. Kurva penetapan panjang gelombang maksimum DPPH dapat dilihat pada Gambar 7.



Gambar 7. Kurva panjang gelombang DPPH

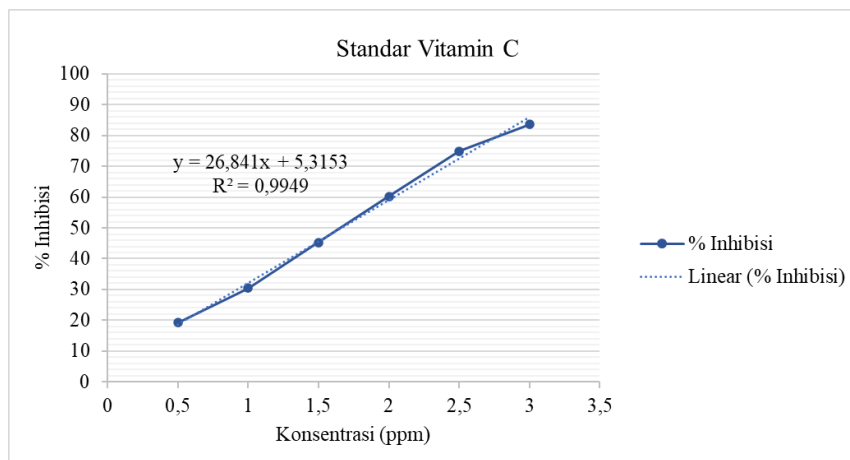
4.6.2 Hasil Penentuan Waktu Inkubasi Optimum DPPH

Lamanya sampel dengan larutan DPPH ketika harus bereaksi secara optimum untuk menghasilkan serapan yang stabil adalah tujuan dari penentuan waktu inkubasi optimum (Nathania dkk., 2020). Absorbansi yang stabil menunjukkan bahwa reaksinya sudah optimal. Untuk menemukan waktu inkubasi yang optimum, serapan diukur selama selama 60 menit dengan jeda waktu 10 menit diantara pengukuran untuk mendapatkan hasil yang terbaik pada tiap pengukuran untuk mendapatkan nilai yang terbaik. Berdasarkan hasil penelitian yang telah dilakukan, nilai yang paling optimum tercapai pada menit ke-30, dengan menunjukkan nilai absorbansi yang stabil sebesar 0,678. Waktu inkubasi optimum adalah ketika nilai absorbansi menjadi stabil atau perbedaan absorbansi per selang waktu menjadi lebih kecil (Sadeli, 2016). Pada menit ke-10 hingga ke-20 terjadi kenaikan serapan yang cukup besar, tetapi pada menit ke-30 hingga ke-50 serapan mulai stabil. Pada menit ke-60 terjadi penurunan dengan selisih yang sangat kecil. Penurunan nilai absorbansi seperti yang terlihat pada grafik terjadi karena senyawa

antioksidan mengikat radikal DPPD dengan memberikan atom hidrogen, sehingga dapat mengurangi jumlah radikal bebas (Nathania dkk., 2020). Data lengkap hasil penentuan waktu inkubasi optimum dapat dilihat pada Lampiran 9.

4.6.3 Hasil Pembuatan Deret Standar Larutan Vitamin C

Dalam penelitian ini, vitamin C (asam askorbat) digunakan sebagai pembanding karena merupakan salah satu antioksidan alami yang paling aman dan tidak menyebabkan toksisitas, harganya yang murah dan mudah didapatkan jika dibandingkan dengan jenis antioksidan alami lainnya. Asam askorbat merupakan antioksidan sekunder yang memiliki kemampuan menangkap radikal bebas dan mencegah terjadinya reaksi berantai (Nathania dkk., 2020). Tingkat konsentrasi yang digunakan untuk mendapatkan aktivitas antioksidan pada larutan vitamin C dibuat dalam deret standar 0,5 , 1 , 1,5 , 2 , 2,5 dan 3 ppm kemudian diukur persen inhibisi dan nilai IC_{50} . Vitamin C memiliki intensitas nilai IC_{50} yang kuat. Nilai IC_{50} dapat dihitung melalui peredaman radikal bebas DPPH. Besarnya konsentrasi antioksidan yang cukup untuk menghambat radikal bebas sebesar 50% disebut juga sebagai Nilai IC_{50} . Inhibisi (%) dalam perhitungan IC_{50} tingginya konsentrasi larutan sampel uji, maka semakin rendah absorbansi DPPH yang terukur (Nathania dkk., 2020). Aktivitas antioksidan yang tinggi ditunjukkan dengan semakin kecilnya nilai IC_{50} . Jika nilai IC_{50} dari senyawa antioksidan kurang dari 50 ppm, maka senyawa tersebut dianggap sangat kuat (Wardani dkk., 2020). Dari penelitian yang telah dilakukan nilai IC_{50} vitamin C yang diperoleh dari hasil rata-rata dari 3 kali pengulangan adalah 1,664 ppm dengan persamaan regresi linear pengulangan pertama $y = 26,841x + 5,3153$ dan koefisien determinasi R^2 sebesar 0,9949, nilai IC_{50} dari larutan vitamin C ditentukan dengan menggunakan persamaan regresi linear. Nilai IC_{50} vitamin C kurang dari 50 ppm, maka dapat dikatakan sebagai antioksidan yang sangat aktif. Data lengkap hasil pembuatan deret standar larutan vitamin C dapat dilihat pada Lampiran 9. Kurva konsentrasi nilai IC_{50} pada vitamin C dapat dilihat pada Gambar 8.



Gambar 8. Kurva konsentrasi nilai IC₅₀ vitamin C

4.6.4 Hasil Penentuan Aktivitas Antioksidan

Pengujian aktivitas antioksidan dilakukan secara kombinasi dari ketiga ekstrak yaitu ekstrak buah kelapa sawit merah, ekstrak daun salam koja dan ekstrak biji buah markisa. Kombinasi dari ketiga ekstrak ini menggunakan empat perbandingan yaitu (1:1:1) (1:1:2) (1:2:1) dan (2:1:1). Karena prosedur pengukurannya sederhana, membutuhkan waktu yang cukup singkat dengan menggunakan sampel yang relatif sedikit maka pada pengujian ini dilakukan menggunakan metode DPPH (*1,1-diphenyl-2-picrylhidrazyl*) (Hasanah dkk., 2017). Prinsip dari metode DPPH yaitu mengurangi jumlah intensitas warna DPPH yang akan bereaksi pada sampel yang nantinya akan menjadi warna kuning (Molyneux, 2004). Senyawa DPPH merupakan senyawa yang mempunyai gugus kromofor, nitrogen yang terkandung didalamnya tidak stabil dan berbentuk serbuk yang berwarna ungu. Pengujian ini dilakukan dengan menggunakan peralatan yang telah dilapisi *aluminium foil*. Hal tersebut dilakukan karena senyawa DPPH sangat peka terhadap cahaya dan mudah teroksidasi.

Sampel yang sudah dibuat induk larutan setiap masing-masing perbandingan kombinasi ekstrak dibuat variasi konsentrasi 1,5 , 2,5 , 3,5 , 4,5 dan 5,5 ppm kemudian diambil dari larutan induk yang sudah dibuat lalu pengujian dilakukan tiga kali ulangan. Nilai IC₅₀ menunjukkan pengujian aktivitas antioksidan pada parameter pengukuran aktivitas antioksidan. Tujuan variasi konsentrasi adalah untuk menghitung persen inhibisi yang diperoleh dari selisih

antara absorbansi sampel dan absorbansi larutan DPPH, yang kemudian diukur menggunakan spektrofotometer UV-Vis. Pengujian aktivitas antioksidan dapat dilihat berdasarkan nilai IC_{50} yang mengukur parameter aktivitas antioksidan. Nilai tersebut berasal dari persamaan regresi linear yang menggambarkan hubungan antara konsentrasi ekstrak sebagai sumbu x dan persen inhibisi sebagai sumbu y. Nilai ini dihitung dengan membandingkan selisih absorbansi blanko dan sampel, kemudian dibagi dengan absorbansi blanko. Aktivitas antioksidan diukur pada empat perbandingan yaitu (1:1:1) (1:1:2) (1:2:1) dan (2:1:1). Hasil nilai IC_{50} dari ketiga ekstrak dengan empat perbandingan kombinasi dapat dilihat pada Tabel 9. Hasil perhitungan persen inhibisi dapat dilihat pada Lampiran 9.

Tabel 9. Hasil nilai IC_{50} dari ketiga ekstrak dengan empat perbandingan kombinasi

Kombinasi Sampel	Nilai IC_{50} (ppm)	Keterangan
EBKSM : EDSK : EBBM (1:1:1)	5,2862	Sangat kuat
EBKSM : EDSK : EBBM (1:1:2)	3,3417	Sangat kuat
EBKSM : EDSK : EBBM (1:2:1)	3,6952	Sangat kuat
EBKSM : EDSK : EBBM (2:1:1)	4,6949	Sangat kuat
Vitamin C	1,6647	Sangat kuat

(Molyneux, 2004)

Keterangan: EBKSM = Ekstrak Buah Kelapa Sawit Merah

EDSK = Ekstrak Daun Salam Koja

EBBM = Ekstrak Biji Buah Markisa

Pada hasil pengukuran kadar antioksidan dengan menggunakan konsentrasi 1,5 , 2,5 , 3,5 , 4,5 dan 5,5 ppm yang terdapat pada lampiran 9 poin 8 menunjukkan bahwa semakin rendah nilai absorbansi yang teruku, persentase inhibisi akan semakin meningkat, jika persen inhibisinya besar maka akan didapatkan aktivitas antioksidan yang tinggi. Nilai IC_{50} , yang merupakan konsentrasi yang diperlukan untuk menghambat aktivitas pada radikal bebas DPPH sebanyak 50% dapat digunakan untuk mengukur tingkat aktivitas antioksidan. Berdasarkan nilai IC_{50} pada Tabel 9 menunjukkan bahwa dari kombinasi ekstrak tersebut dengan perbandingan (1:1:1, 1:1:2, 1:2:1, 2:1:1) dan vitamin C sebagai

pembanding memiliki nilai IC_{50} yang berbeda-beda. Didapatkan hasil nilai IC_{50} pada kombinasi ekstrak dengan perbandingan (1:1:1) sebesar 5,2862 ppm, pada kombinasi ekstrak dengan perbandingan (1:1:2) sebesar 3,3417 ppm, pada kombinasi ekstrak dengan perbandingan (1:2:1) sebesar 3,6952 ppm, dan pada kombinasi ekstrak dengan perbandingan (2:1:1) sebesar 4,6949 ppm serta hasil nilai IC_{50} pada pembanding vitamin C sebesar 1,6647 ppm dimana dari ketiga kombinasi ekstrak dengan empat perbandingan konsentrasi tersebut menurut Molyneux (2004) nilai tersebut termasuk dalam golongan yang sangat kuat karena nilai $IC_{50} \leq 50$ ppm.

Aktivitas antioksidan paling tinggi ditunjukkan oleh kombinasi ekstrak dengan perbandingan 1:1:2, karena memiliki nilai IC_{50} nya paling kecil. Kuatnya aktivitas antioksidan pada kombinasi ekstrak dengan perbandingan (1:1:2) yang mana konsentrasi biji buah markisa lebih banyak dari pada ekstrak buah kelapa sawit merah dan ekstrak daun salam koja. Hal ini terkait dengan keberadaan metabolit sekunder yang terlarut selama proses ekstraksi. Aktivitas antioksidan 3,3417 ppm menunjukkan bahwa sebanyak 33,417 μ g ekstrak dengan kombinasi 1:1:2 dapat menghambat 50% senyawa radikal bebas (DPPH). Dosis dari ketiga kombinasi ekstrak dengan perbandingan (1:1:2) yang dibutuhkan untuk menangkal 1 mM radikal bebas adalah sebanyak 0,066 mg/mmol.

Flavonoid adalah senyawa metabolit sekunder yang terdapat dalam biji buah markisa dan dapat mempengaruhi aktivitas antioksidan. Flavonoid mengandung gugus fenolik yang dapat mencegah kerusakan sel akibat stress oksidatif. Flavonoid adalah senyawa polar karena memiliki berat molekul yang relatif rendah. Oleh karena itu, pelarut polar seperti metanol cocok digunakan untuk mengekstraksi flavonoid dari biji buah markisa. Variasi dalam distribusi jumlah dan jenis golongan senyawa metabolit sekunder yang memiliki aktivitas antioksidan, serta kepolaran pelarut yang digunakan selama proses ekstraksi, menyebabkan adanya perbedaan dalam nilai aktivitas antioksidan dari berbagai kombinasi ekstrak. Faktor yang mempengaruhi rendahnya aktivitas antioksidan disebabkan karena ekstraksi dengan metode maserasi yang dilakukan pada ekstrak buah kelapa sawit merah dan ekstrak daun salam koja, belum menarik komponen kimia yang

memiliki sifat sebagai antioksidan secara keseluruhan dan adanya hasil yang berbeda dari penelitian sebelumnya dapat dikarenakan adanya perbedaan jenis buah dan daun yang didapat. Berdasarkan Molyneux (2004) faktor yang mempengaruhi penurunan aktivitas antioksidan pada sampel yaitu senyawa flavonoid yang masih mengikat glikosida. Data nilai IC_{50} dari ketiga kombinasi ekstrak berdasarkan perbedaan perbandingan konsentrasi ekstrak dapat dilihat pada Tabel 10.

Tabel 10. Nilai IC_{50} dari masing-masing kombinasi ekstrak

Kombinasi perbandingan ekstrak	Nilai $IC_{50} \pm SD$ (ppm)
EBKSM:EDSK:EBBM (1:1:1)	5,2862 \pm 0,035 ^d
EBKSM:EDSK:EBBM (1:1:2)	3,3417 \pm 0,014 ^a
EBKSM:EDSK:EBBM (1:2:1)	3,6952 \pm 0,009 ^b
EBKSM:EDSK:EBBM (2:1:1)	4,6949 \pm 0,021 ^c

Keterangan: superskrip yang berbeda pada baris yang berbeda menunjukkan hasil pengaruh yang berbeda ($p > 0,05$) terhadap rata-rata nilai IC_{50} .

Berdasarkan hasil uji sidik ragam ANOVA menggunakan aplikasi SPSS dengan metode Rancangan Acak Lengkap (RAL) hasil uji sidik ragam (ANOVA) dapat diperoleh nilai (Sig.) sebesar 0,000 lebih kecil dari nilai taraf nya (α) yaitu sebesar 0,05 , maka dapat disimpulkan bahwa data nilai IC_{50} terhadap perbedaan perbandingan konsentrasi ekstrak tidak homogen atau adanya pengaruh perbedaan yang signifikan antara pengaruh nilai IC_{50} terhadap perbandingan konsentrasi ekstrak, sehingga perlu dilakukan uji lanjut Duncan. Hasil yang diperoleh dari uji Duncan ini bahwa dari keempat kombinasi perbandingan ekstrak tersebut semuanya memberikan pengaruh yang berbeda terhadap nilai rata-rata IC_{50} . Hal ini terjadi karena berada pada subset yang berbeda. Tetapi pada kombinasi ekstrak dengan perbandingan 1:1:1 memberikan pengaruh tertinggi yaitu data tersebut berada pada subset 4. Pada perbandingan ekstrak 1:1:2 dan 1:2:1 memberikan pengaruh yang sama tetapi tidak nyata terhadap rata-rata nilai IC_{50} , karena data tersebut berada pada subset yang berbeda yaitu pada subset 1 dan 2. Hasil analisis nilai IC_{50} dari ketiga kombinasi ekstrak berdasarkan perbedaan perbandingan konsentrasi ekstrak dapat dilihat pada Lampiran 10.

4.7 Hasil Uji Toksisitas Akut

4.7.1 Pemeliharaan Hewan Uji

Uji toksisitas akut menggunakan mencit putih betina (*Mus musculus*) dengan galur DDY (*Deutschland Denken Yoken*), yang memiliki umur 6-8 minggu dan berat 20-30 gram perekornya. Jenis kelamin betina digunakan karena setelah dibandingkan dengan mencit jantan, mencit betina memiliki sensitifitas yang tinggi pada pengujian toksisitas tetapi dengan syarat bahwa mencit betina tidak dalam keadaan siklus estrus atau siklus birahi. Hewan uji yang digunakan adalah sebanyak 8 ekor mencit betina. Sebelum perlakuan dilakukan, hewan uji menjalani proses aklimatisasi selama 1 minggu. Selama proses aklimatisasi ini, bobot hewan uji ditimbang dan nilai *Coefficient of Variation* (CV) dihitung untuk menilai homogenitas bobot badan hewan uji. Semua mencit dilakukan penimbangan kembali setelah aklimatisasi untuk memastikan keberhasilan homogenitas dari hewan yang akan dilakukan penelitian. Nilai CV yang diperoleh sebelum aklimatisasi yaitu sebesar 3,75 % dan pada saat dilakukan aklimatisasi nilai CV yang didapat yaitu 5,03 %, dapat dinyatakan homogen bila nilai CV <15%. Perhitungan nilai CV dapat dilihat pada Lampiran 12.

4.7.2 Hasil Uji Pendahuluan

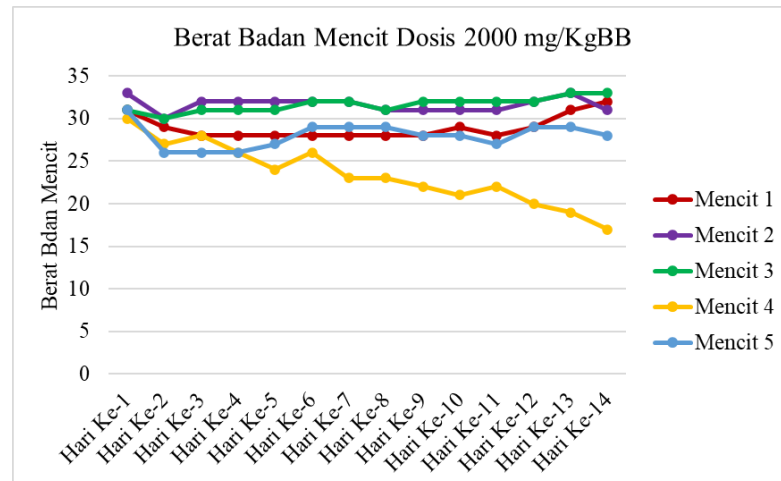
Uji pendahuluan dilakukan untuk menentukan dosis yang tepat yang akan digunakan dalam uji utama. Dalam pengujian ini digunakan masing-masing 1 ekor hewan uji pada setiap kelompoknya. Dosis awal yang digunakan yaitu 300 mg/KgBB karena dalam rangka mencari kisaran LD₅₀ dan dipilih karena belum ada pengujian sebelumnya. Dari hasil yang diperoleh pada uji pendahuluan tidak terdapat kematian, dan pada uji pendahuluan dengan dosis 2000 mg/KgBB juga tidak menyebabkan kematian, akan tetapi pada dosis ini terdapat gejala toksisitas yaitu *grooming*, *letargi* (Kelesuhan), tremor, *piloereksi* (Bulu hewan coba berdiri), *ptosis* (Kelainan pada kelopak mata) dan *lakrimasi* (Keluar air mata) sehingga dosis utama yang dipilih yaitu dimulai dari dosis 2000 mg/KbBB. Data gejala toksisitas pada hewan uji ini dapat dilihat pada Lampiran 13.

4.7.3 Hasil Pengamatan Berat Badan Hewan Uji

Berat badan hewan uji diamati selama periode 14 hari setelah diberikan perlakuan dan 1 hari sebelum dilakukan pemberian perlakuan. Penimbangan berat dilakukan dengan mengamati perubahan berat badan selama dilakukannya penimbangan pada hewan uji, serta untuk mengevaluasi dampak gejala toksisitas yang terjadi. Jika terjadi penurunan berat badan yang signifikan dan drastis hingga bisa menimbulkan perbedaan yang dapat diartikan terhadap kelompok dosis maka dapat dikatakan sebagai tanda bahwa kesehatan hewan coba tersebut dalam keadaan buruk atau sedang tidak baik-baik saja. Berdasarkan hasil pengamatan yang telah dilakukan mengalami kenaikan dan penurunan berat badan pada setiap kelompoknya. Pada minggu pertama dan kedua uji pendahuluan kelompok hewan uji kontrol normal dan kelompok dosis 2000 mg/KgBB mengalami kenaikan berat badan yang signifikan sebagai akibat dari pemberian pakan setiap harinya. Kandungan nutrisi dalam pakan mencit dan jumlah pakan yang dikonsumsi biasanya berperan dalam penambahan berat badan mencit. Pada minggu pertama pada kelompok dosis 300 mg/KgBB mengalami penurunan berat badan pada hewan uji. Penurunan berat badan tersebut terjadi karena mencit mengalami kondisi stress akibat perlakuan yang telah diberikan, tetapi pada minggu kedua pada dosis ini berat badan hewan uji mengalami kenaikan. Hal ini karena mencit sudah bisa melewati fase stress nya dan telah beradaptasi kembali dengan keadaan kondisi tubuhnya sehingga nafsu makan pun semakin meningkat.

Berdasarkan hasil pengamatan pada minggu pertama pada uji utama kelompok dosis 2000 mg/KgBB hewan uji berat badan menjadi turun secara drastis. Hal ini terjadi karena perlakuan yang diberikan pada mencit menyebabkan kondisi stres. Pada minggu kedua pun berat badan pada mencit menjadi turun terutama pada hari ke 13 dan 14 seperti yang terlihat pada Gambar 9. Hal ini dapat dipengaruhi oleh munculnya gejala toksisitas yang disertai dengan penurunan berat badan pada hewan uji tersebut. Pada ekstrak daun salam koja dan ekstrak biji buah markisa dapat membantu menurunkan berat badan karena pada tumbuhan tersebut mengandung serat yang cukup tinggi sehingga dapat menurunkan berat badan

karena mampu membuat rasa kenyang lebih lama (Hayati, 2021). Data rata-rata berat badan hewan uji pada setiap kelompok dapat dilihat pada Lampiran 14.



Gambar 9. Diagram rata-rata bobot badan mencit selama 14 hari

4.7.4 Hasil Pengamatan Gejala Toksisitas Pada Mencit

Pada penelitian ini uji toksisitas akut dilakukan menggunakan metode *fixed doses*. Tujuannya untuk mengetahui bagaimana suatu senyawa memiliki efek toksik dalam waktu yang singkat setelah diberikan perlakuan dengan dosis tertentu. Metode *fixed doses* dipilih karena hanya sedikit menggunakan hewan uji dibandingkan dengan metode konvensional lainnya, serta mudah diterapkan dengan dosis uji yang lebih sedikit dan waktu yang singkat dan efisien (BPOM RI, 2022).

Uji toksisitas akut pada uji pendahuluan dengan dosis 300 mg/KgBB setelah diberikan perlakuan kemudian mencit diobservasi pada waktu 30 menit pertama setelah pemberian sediaan uji dan secara periodik setiap 4 jam selama 24 jam pertama dan setelah itu sehari sekali selama 14 hari. Pada uji pendahuluan hasil pengamatan selama 14 hari pada 1 ekor mencit dengan dosis 300 mg/KgBB tidak ditemukan gejala toksisitas maupun kematian, kemudian dilanjutkan dengan 1 ekor mencit lainnya pada dosis 2000 mg/KgBB dan hasil pengamatan tersebut tidak ditemukan kematian tetapi muncul gejala toksisitas. Data gejala toksisitas dapat dilihat pada Tabel 11, 12 dan 13.

Table 11. Pengamatan Gejala Toksisitas pada Kelompok Kontrol Negatif

Waktu Pengamatan (Mencit)						
Kontrol Negatif						
Pengamatan	T0'	T30'	T60'	T120'	T240'	T1440'
Laju nafas (/menit)	160	162	151	146	142	150
Motorik	(++)	(++)	(++)	(++)	(+++)	(+++)
Grooming	(-)	(+)	(+)	(-)	(-)	(-)
Letargi	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)
Gelantung	(-)	(-)	(-)	(-)	(++)	(+++)
Straub	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)
Reflek Pineal	(+++)	(+++)	(+++)	(+++)	(+++)	(++)
Reflek Korneal	(+++)	(+++)	(++)	(+++)	(+++)	(++)
Tremor	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)
Kejang	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)
Piloereksi	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)
Ptoisis	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)
Lakrimasi	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)
Urinasi	(+)	(-)	(-)	(-)	(+)	(+)
Defekasi	(+)	(+)	(-)	(-)	(+)	(+)
Kematian	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)

Keterangan :

T₀-T₁₄₄₀: waktu 0 menit – 1440 menit, (-) : tidak terjadi, (+) : terjadi,

(++) : meningkat sedang, (+++) : meningkat kuat.

Table 12. Pengamatan Gejala Toksisitas pada Kelompok Uji Pendahuluan Dosis 300 mg/KgBB

Waktu Pengamatan (Mencit)						
Dosis 300 mg/KgBB						
Pengamatan	T0'	T30'	T60'	T120'	T240'	T1440'
Laju nafas (/menit)	162	160	150	145	148	154
Motorik	(++)	(++)	(++)	(++)	(+++)	(+++)
Grooming	(-)	(-)	(+)	(-)	(+)	(-)
Letargi	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)
Gelantung	(-)	(-)	(-)	(-)	(++)	(+++)
Straub	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)
Reflek Pineal	(+++)	(+++)	(++)	(+++)	(+++)	(++)
Reflek Korneal	(+++)	(+++)	(++)	(+++)	(++)	(++)
Tremor	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)
Kejang	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)

Waktu Pengamatan (Mencit)						
Dosis 300 mg/KgBB						
Pengamatan	T0'	T30'	T60'	T120'	T240'	T1440'
Piloereksi	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)
Ptosis	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)
Lakrimasi	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)
Urinasi	(+)	(-)	(-)	(-)	(+)	(+)
Defekasi	(+)	(-)	(-)	(+)	(+)	(+)
Kematian	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)

Keterangan :

T₀-T₁₄₄₀ : waktu 0 menit – 1440 menit, (-) : tidak terjadi, (+) : terjadi,

(++) : meningkat sedang, (+++) : meningkat kuat.

Table 13. Pengamatan Gejala Toksisitas pada Kelompok Uji Pendahuluan Dosis 2000 mg/KgBB

Waktu Pengamatan (Mencit)						
Dosis 2000 mg/KgBB						
Pengamatan	T0'	T30'	T60'	T120'	T240'	T1440'
Laju nafas (/menit)	165	164	147	145	148	155
Motorik	(-)	(+)	(+)	(++)	(+++)	(+++)
Grooming	(-)	(+)	(+)	(-)	(+)	(-)
Letargi	(+)	(+)	(-)	(-)	(-)	(-)
Gelantung	(-)	(-)	(-)	(-)	(++)	(++)
Straub	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)
Reflek Pineal	(++)	(+++)	(++)	(+++)	(++)	(++)
Reflek Korneal	(+++)	(+++)	(++)	(+++)	(++)	(++)
Tremor	(-)	(+)	(+)	(-)	(-)	(-)
Kejang	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)
Piloereksi	(-)	(+)	(-)	(-)	(-)	(-)
Ptosis	(-)	(-)	(-)	(+)	(-)	(-)
Lakrimasi	(-)	(-)	(+)	(-)	(-)	(-)
Urinasi	(+)	(-)	(-)	(-)	(+)	(+)
Defekasi	(+)	(-)	(-)	(+)	(+)	(+)
Kematian	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)

Keterangan :

T₀-T₁₄₄₀ : waktu 0 menit – 1440 menit, (-) : tidak terjadi, (+) : terjadi,

(++) : meningkat sedang, (+++) : meningkat kuat.

Pengamatan gejala klinis yang diamati setelah pemberian sediaan uji berdasarkan pada Tabel 11, 12 dan 13 adalah laju nafas, aktivitas motorik, *grooming*, *letargi*, gelantung, *straub*, reflek *pineal*, reflek *korneal*, tremor, kejang, *piloereksi*, *ptosis*, *lakrimasi*, *urinasi*, *defekasi* dan kematian pada hewan uji. Pengamatan yang dilakukan pertama kali yaitu mengecek laju nafas pada setiap kelompok hewan uji. Pada kelompok kontrol negatif, kelompok uji pendahuluan dosis 300 mg/KgBB laju nafas pada mencit masih dalam batas normal yaitu berada pada rentang 94-163x/menit. Sedangkan pada kelompok uji pendahuluan dosis 2000 mg/KgBB laju nafas pada mencit mengalami peningkatan pada saat awal pemberian yaitu pada waktu menit ke-0 dan menit ke-30, dalam hal ini dikarenakan pada pemberian dosis 2000 mg/KgBB dosis sediaan uji yang diberikan cukup tinggi dan lebih kental dari pemberian dosis sebelumnya sehingga memberikan rasa yang tidak nyaman kepada mencit.

Aktivitas motorik yang dapat dilihat yaitu pada kelompok kontrol negatif dan pemberian dosis 300 mg/KgBB aktivitas motoriknya menunjukkan perilaku bergerak dengan cepat dan memiliki aktivitas motorik yang aktif, sedangkan pada kelompok pemberian dosis 2000 mg/KgBB aktivitas motoriknya mengalami penurunan sampai mencit tertidur, hal ini karena adanya efek farmakologi dari kandungan biji buah markisa yang memiliki efek *sedatif* dan berkhasiat sebagai *analgetik* (Reskyani dkk., 2024). Penurunan aktivitas motorik terjadi pada waktu menit ke-0 dan pada waktu menit ke-30 tidak seperti biasanya, hal ini dikarenakan mencit mengalami shock akibat pemberian dosis perlakuan dan merasa tidak nyaman. Tetapi pada waktu menit ke-120 aktivitas motorik pada mencit kembali meningkat. Gejala lain yang terjadi yaitu *grooming*, adalah kebiasaan mencit membersihkan dirinya dengan cara menjilati bagian tubuhnya seperti wajah, tangan dan bulu-bulunya. Pada mencit jika terjadi frekuensi *grooming* yang terus meningkat dari biasanya berarti menunjukkan adanya tanda stimulasi pada sistem saraf pusat dan pada sistem saraf simpatik kemudian gejala tersebut dapat menjadi salah satu tanda bahwa mencit mengalami rasa sakit. Pada hasil pengamatan gejala toksisitas *grooming* muncul pada saat diwaktu-waktu tertentu. Sedangkan pada gejala toksik seperti reflek *pineal* dan reflek *korneal* menandakan bahwa adanya

rangsangan yang muncul melibatkan sistem saraf pusat yang terjadi akibat adanya sentuhan terhadap rasa nyeri.

Gejala toksisitas lain yang muncul yaitu *letargi* dimana gejala tersebut mencit mengalami kondisi seperti kelesuhan. Dari hasil pengamatan gejala toksisitas gejala *letargi* muncul ketika pada pemberian dosis 2000 mg/KgBB pada waktu ke-0 dan pada waktu ke-30 menit, hal ini terjadi karena mencit mengalami keadaan shock akibat pemberian dosis perlakuan dan merasa tidak nyaman. Gejala *letargi* tersebut sudah tidak muncul ketika waktu selanjutnya berjalan sampai waktu ke-24 jam. Selanjutnya dilakukan pengamatan gejala toksisitas yaitu dengan melakukan uji kesadaran menggunakan alat papan panggung dan melakukan uji gelantung. Kedua uji ini dilakukan pada saat waktu ke-6 jam pertama setelah pemberian sediaan uji dan pada saat waktu ke 24 jam. Hasilnya pada kelompok kontrol negatif, kelompok dosis 300 mg/KgBB dan kelompok dosis 2000 mg/KgBB pada waktu ke-6 jam pertama setelah pemberian sediaan uji, mencit memiliki kesadaran yang sangat baik dan uji gelantung yang dihasilkan menunjukkan meningkat sedang, hal ini terjadi karena mencit mengalami penurunan daya tahan karena telah dilakukan pemberian sediaan uji. Selanjutnya pada waktu 6 jam setelah 24 jam hasil uji kesadaran dan uji gelantung pada kelompok kontrol negatif dan kelompok dosis 300 mg/KgBB mengalami peningkatan, hal ini terjadi karena kandungan zat aktif dari alkaloid dan flavonoid yang terdapat dalam ekstrak buah kelapa sawit, ekstrak daun salam koja dan ekstrak biji buah markisa diduga dapat meningkatkan daya tahan tubuh. Zat-zat ini juga dapat menghambat enzim fosfodiesterase, yang menghasilkan pembentukan glukosa 6 fosfat, yang kemudian memberi tubuh lebih banyak energi untuk bertahan (Djamaludin dkk., 2021). Pada pemberian dosis 2000 mg/KgBB uji gelantung belum mengalami peningkatan, hal ini terjadi karena mencit mengalami penurunan daya tahan karena telah dilakukan pemberian sediaan uji dalam dosis yang cukup tinggi.

Selanjutnya gejala toksisitas lain yang muncul yaitu tremor, gejala ini muncul ketika pada waktu ke-30 dan waktu ke-60 pada pemberian kelompok dosis 2000 mg/KgBB, hal ini terjadi karena pemberian dosis yang cukup tinggi dan karena efek toksik yang muncul yang dapat menyebabkan terjadinya gangguan

pada sistem saraf pusat (cerebellum) dalam mengendalikan kontraksi pada otot sehingga terjadilah getaran pada otot (Ubang dkk., 2022).

Gejala toksisitas yang muncul selanjutnya adalah *piloereksi*, gejala ini merupakan gejala yang muncul akibat bulu hewan uji berdiri karena hewan uji tegang. Kondisi *piloereksi* dapat dikendalikan oleh saraf simpatik yang mempersarafi *arrector pili musculus* (APM) dan berfungsi sebagai pengatur suhu. Pada gejala ini muncul pada kelompok dosis 2000 mg/KgBB pada waktu ke-30 menit, hal ini dapat terjadi karena adanya efek toksisitas pada ekstrak yang muncul dan mengganggu sistem saraf sehingga menyebabkan terganggunya pertahanan pada suhu tubuh (Ubang dkk., 2022).

Selanjutnya gejala toksisitas yang muncul adalah *ptosis*, gejala ini merupakan keadaan dimana terjadinya abnormalitas pada mata, yaitu turunnya kelopak mata sepenuhnya atau hanya setengahnya atau mencit seperti mengantuk. Pada gejala ini muncul setelah pemberian sediaan uji pada kelompok dosis 2000 mg/KgBB dan muncul pada saat waktu ke-120 menit. Gejala ini dapat muncul akibat terjadinya penurunan aktivitas motorik pada hewan uji (Ubang dkk., 2022).

Gejala toksisitas yang muncul selanjutnya adalah *lakrimasi*, gejala toksisitas *larimasi* adalah dimana suatu kondisi produksi air mata berlebihan. Gejala ini muncul pada pemberian kelompok dosis 2000 mg/KgBB pada waktu ke-60 menit, hal ini terjadi karena adanya pengaruh terhadap sistem saraf otonom yang mengakibatkan produksi air mata yang berlebihan. Pengamatan yang terakhir yaitu frekuensi urinasi dan defekasi pada hewan uji, berdasarkan hasil pengamatan pada kelompok dosis 300 mg/KgBB dan kelompok dosis 2000 mg/KgBB mengalami frekuensi defekasi dan urinasi yang berlebihan, hal ini diakibatkan karena adanya kandungan asam dari biji buah markisa yang dapat menimbulkan ketidaknyamanan saluran pencernaan dan dapat menyebabkan iritasi pada lambung apabila diberikan dalam dosis yang terlalu tinggi sehingga muncul perangsangan pada saraf parasimpatis. Dalam hal ini dapat menyebabkan peristaltik usus dan sekresi getah lambung mengalami stimulasi aktivitas pada saluran pencernaan (Ubang dkk., 2022). Pengamatan gejala klinis yang terjadi pada hewan uji kemudian dilanjutkan sekurang-kurangnya selama 14 hari dengan disertai penimbangan berat badan

hewan uji serta pengamatan terhadap kematian yang terjadi untuk menentukan gejala toksisitas yang tertunda pada waktu 24 jam setelah pemberian sediaan uji.

Tujuan dari pengamatan selama 14 hari yaitu untuk melihat gejala toksisitas dan kematian yang muncul setelah 24 jam. Berdasarkan hasil pengamatan gejala toksisitas diatas yang diamati selama 14 hari tidak menunjukkan adanya gejala toksisitas yang berbahaya terhadap hewan uji pada kelompok dosis 2000 mg/KgBB. Hasil pengamatan gejala toksisitas selama 14 hari dapat dilihat pada Lampiran 13.

4.7.5 Hasil Pengamatan Indeks Organ

Pengamatan bobot organ hewan uji dilakukan setelah periode pengamatan selama 14 hari, setelah itu kemudian hewan uji dilakukan pembedahan dengan cara *eutanasia* menggunakan chamber CO₂. Cara tersebut digunakan karena untuk memberikan kematian yang cepat tanpa adanya rasa sakit dan beban stress. Karbon dioksida (CO₂) akan menyebabkan ketidaksadaran yang cepat lalu diikuti dengan kematian. Hal ini dilakukan untuk mengambil organ-organ hewan uji seperti jantung, hati, ginjal dan limpa setelah periode pengamatan selama 14 hari. Gejala toksisitas yang muncul dapat mempengaruhi perubahan pada organ-organ vital seperti jantung, hati, ginjal dan limpa. Hati dan ginjal khususnya rentan terhadap zat toksik karena peran penting mereka dalam proses metabolisme tubuh.

Fungsi hati yaitu mendetoksifikasi zat-zat racun yang masuk kedalam tubuh. Selanjutnya, organ ginjal mempunyai mekanisme kerja yang dapat mengeluarkan berbagai zat toksik dan zat asing lainnya dari dalam tubuh. Organ vital lainnya, seperti jantung mudah mengalami kelainan oleh berbagai jenis zat kimia karena jantung selalu dialiri zat-zat kimia dalam ruang jantung yang berpengaruh secara langsung pada otot jantung dan secara tidak langsung pada susunan saraf atau pembuluh darah. Sedangkan pada organ limpa dapat melindungi tubuh dari serangan patogen serta akan mempengaruhi fungsi dan kinerja dari sistem kekebalan tubuh (Ceriana & Putri Rejeki, 2023). Kemudian organ yang sudah diambil lalu ditimbang untuk mengetahui bobot dari setiap masing-masing organ kemudian dilakukan perhitungan indeks organ yang bertujuan untuk mengetahui adanya efek toksik pada organ dalam yang terjadi setelah pemberian

sediaan uji. Rata-rata hasil penimbangan berat organ dan indeks organ hewan uji dapat dilihat pada Tabel 14. Data dan hasil perhitungan indeks organ dapat dilihat pada Lampiran 16.

Table 14. Rata-rata Berat Organ Hewan Uji.

Jenis Organ	Kelompok Kontrol Negatif		Kelompok Uji Utama Dosis 2000 mg/KgBB	
	Berat organ (gram)	Indeks Organ (%)	Berat organ \pm SD (gram)	Indeks Organ \pm SD (%)
Jantung	0,09	0,26	0,29 \pm 0,35	0,91 \pm 1,07
Hati	1,50	4,41	1,85 \pm 0,37	6,80 \pm 0,98
Ginjal	0,37	1,08	0,38 \pm 0,08	1,40 \pm 0,24
Limpa	0,15	0,44	0,26 \pm 0,04	1,04 \pm 0,51

Berdasarkan Tabel 14, berat organ jantung pada kelompok kontrol negatif yaitu 0,09 gram. hasil rata-rata berat organ jantung dari ke-5 hewan uji adalah 0,29 \pm 0,35 gram, menunjukkan bahwa terdapat perbedaan yang sangat jauh yaitu pada hewan uji yang pertama. Indeks organ jantung pada kelompok kontrol negatif yaitu 0,26% sedangkan indeks organ rata-rata dari ke-5 hewan uji tersebut memiliki nilai yaitu 0,91 \pm 1,07 %, dapat dilihat bahwa hewan uji yang pertama memiliki nilai indeks yang lebih tinggi yaitu 2,81%. Dalam hal ini bisa terjadi karena adanya aktivitas mencit yang meningkat sehingga jantung bisa membesar dan bertambah bobotnya, adanya faktor lain yaitu karena usia mencit sudah mencapai dewasa sehingga terjadi penambahan jaringan otot jantung dan hal ini menyebabkan bobot jantung ikut bertambah (Mboro dkk., 2018). Berat badan mencit yang bertambah karena adanya suplai nutrisi dari ekstrak buah kelapa sawit, ekstrak daun salam koja dan ekstrak biji buah markisa dapat menyebabkan pembesaran jantung. Hal ini disebabkan oleh peningkatan volume dan konsentrasi darah yang berperan dalam mengedarkan nutrisi ke seluruh tubuh, yang akhirnya dapat mempengaruhi rasio jantung. Sedangkan untuk ke-4 hewan uji lainnya tidak terdapat perbedaan nilai yang begitu jauh. Dalam hal ini menunjukkan bahwa pada ekstrak buah kelapa sawit merah, ekstrak daun salam koja dan ekstrak biji buah markisa pada pemberian

sediaan uji dalam kelompok ini tidak mengakibatkan kelainan metabolisme yang dapat mempengaruhi ukuran dan kondisi jantung hewan uji.

Berat organ hati pada kelompok kontrol negatif yaitu 1,50 gram. Pada organ hati berat rata-rata dari ke-5 hewan uji tersebut adalah $1,85 \pm 0,37$ gram. Menurut Mboro dkk (2018) menjelaskan bahwa berat normal hati pada mencit yaitu berkisar antara 1,2 sampai 1,6 gram. Hal ini dapat dikatakan hasil penimbangan berat organ hati tidak masuk dalam rentang kisaran berat normal organ hati. Indeks organ hati pada kelompok kontrol negatif yaitu 4,41% sedangkan indeks organ rata-rata dari ke-5 hewan uji ini memiliki nilai $6,80 \pm 0,98\%$, dapat dilihat bahwa hewan uji ke-4 memiliki indeks organ hati yang lebih besar yaitu 8,25% dari pada ke-4 hewan uji lainnya. Terjadinya peningkatan pada organ hati tersebut dapat disebabkan karena terjadinya inflamasi (peradangan), pembengkakan pada vena aorta serta adanya perubahan lemak atau kolestasis. Hal ini seharusnya bisa dicegah dengan adanya pemberian ekstrak buah kelapa sawit, karena dalam ekstrak buah kelapa sawit terdapat vitamin E, yang larut dalam lemak dan memiliki sifat sebagai antiinflamasi (peradangan). Vitamin E berperan sebagai penangkal radikal bebas utama di dalam membran sel mamalia, sehingga membantu melindungi sel dari kerusakan (Charisma dan Arianing, 2021).

Berat organ ginjal pada kelompok kontrol negatif yaitu 0,37 gram. Pada organ ginjal berat rata-rata dari ke-5 hewan uji tersebut adalah $0,38 \pm 0,08$ gram. Menurut Mboro dkk (2018) berat normal ginjal pada hewan mencit yaitu berkisar antara 0,16 sampai 0,22 gram. Hal ini dapat dikatakan hasil penimbangan berat organ ginjal tidak masuk dalam rentang kisaran berat normal organ ginjal. Indeks organ ginjal pada kelompok kontrol negatif yaitu 1,08% sedangkan indeks organ rata-rata dari ke-5 hewan uji ini memiliki nilai $1,40 \pm 0,24\%$. Dari ke-5 hewan uji tersebut memiliki nilai yang tidak sangat berpengaruh dan tidak berbeda jauh. Dalam hal ini menunjukkan bahwa pada ekstrak buah kelapa sawit merah, ekstrak daun salam koja dan ekstrak biji buah markisa pada pemberian sediaan uji ini mengandung senyawa aktif dari antioksidan yang mampu menetralkan radikal bebas sehingga pertumbuhan organ ginjal terjadi dengan baik dan tidak mengakibatkan

kelainan metabolisme yang dapat mempengaruhi ukuran serta kondisi pada ginjal hewan uji.

Berat organ limpa pada kelompok kontrol negatif yaitu 0,15 gram. Pada berat organ limpa dari hasil rata-rata ke-5 hewan uji tersebut adalah $0,26 \pm 0,04$ gram, dari ke-5 hewan uji memiliki berat yang hampir tidak jauh berbeda, sedangkan pada berat hewan uji ke-4 memiliki berat yang lebih tinggi, hal ini bisa terjadi karena pakan mengandung zat-zat antinutrisi yang dapat memicu pembengkakan pada organ limpa. Akibatnya, fungsi limpa dapat terganggu dengan kontraksi yang berlebihan dan akan kehilangan banyak darah (Mboro dkk., 2018). Pada hewan uji ke-4 berat organ jantung, hati dan ginjal memiliki berat yang lebih kecil dari pada berat organ hewan uji lainnya, hal ini dapat terjadi karena pada organ-organ hewan uji ke-4 ini mengalami reaksi gejala toksisitas yang dapat mempengaruhi organ-organ vital tersebut. Indeks organ limpa pada kelompok kontrol negatif yaitu 0,44% sedangkan indeks organ limpa dari ke-5 hewan uji tersebut memiliki nilai rata-rata yaitu $1,04 \pm 0,51\%$. Dapat dilihat bahwa pada hewan uji ke-4 memiliki nilai yang paling tinggi. Limpa akan memproduksi sel limfosit untuk menghasilkan antibodi saat terpapar pakan yang mengandung zat antinutrisi atau penyakit. Fungsi limpa sebagai tempat cadangan darah, membuatnya mengalami kontraksi karena stres atau kekurangan zat asam, yang meningkatkan aktivitas organ tersebut. Akibatnya, rasio organ limpa juga meningkat (Mboro dkk., 2018).

4.7.6 Hasil Pengamatan Makroskopik Hewan Uji

Pada penelitian ini, dilakukan pengamatan organ-organ secara makroskopik pada semua kelompok hewan uji pada tahap uji pendahuluan dan uji utama. Setelah dilakukan pengamatan selama 14 hari, semua hewan uji dilakukan pembedahan dengan melakukan *eutanasia* terlebih dahulu terhadap hewan uji, dengan menggunakan chamber CO₂. Setelah dilakukan pembedahan hewan uji dilakukan pengamatan terhadap tanda organ tersebut mengalami toksisitas. Hasil pengamatan secara *makroskopik* menunjukkan bahwa pada kelompok uji pendahuluan dosis 2000 mg/KgBB terdapat perbedaan serta kelainan yaitu warna pada organ hati dari hewan uji kelompok ini memiliki warna yang lebih pucat dibandingkan dengan

hewan uji pada kelompok lain dan terjadinya perlemakan pada hati (*fatty liver*), hal ini terjadi karena tingginya kadar kolesterol dalam tubuh.

Pada ekstrak buah kelapa sawit merah mengandung lemak yang sangat tinggi termasuk lemak jenuh yang dapat berdampak pada kadar kolesterol, kenaikan berat badan dan tekanan darah (Siregar dkk, 2018 & Nor Azman dkk, 2018). Sedangkan untuk organ lainnya pada kelompok perlakuan yang diamati secara *makroskopik* pada warna, bentuk, ukuran dan baunya terlihat dalam keadaan normal. Pada kelompok uji utama dosis 2000 mg/KgBB pada hewan uji ke-4 terdapat perbedaan yaitu organ jantung pada hewan uji ini memiliki warna yang lebih pekat dari warna organ jantung hewan uji lainnya. Hal ini terjadi karena darah memperoleh warna merah terang saat mengikat oksigen. *Hemoglobin* memberikan warna merah pada darah, protein pernafasan yang mengandung besi dalam bentuk heme merupakan tempat terikatnya molekul-molekul oksigen. Ketika oksigen dilepaskan di dalam pembuluh darah, warna eritrosit akan berubah menjadi lebih gelap. Perubahan warna ini dapat digunakan untuk mengukur kejenuhan oksigen dalam darah arterial.

4.7.7 Hasil Penentuan Nilai *Lethal Dose 50* (LD₅₀)

Berdasarkan hasil pengujian toksisitas pada kombinasi ekstrak buah kelapa sawit merah, ekstrak daun salam koja dan ekstrak biji buah markisa yang telah dilakukan diperoleh kisaran LD₅₀ yaitu dari 2000 mg/KgBB, kisaran tersebut termasuk ke dalam GHS (*Global Harmonised Classification System for Chemical Substances and Mixtures*) dengan kategori tingkat toksisitas 4 yaitu toksik sedang. Hal tersebut dapat dibuktikan karena tidak adanya kematian dan gejala toksisitas yang berbahaya pada mencit setelah diberikan sediaan uji pada kombinasi formula ekstrak buah kelapa sawit merah, ekstrak daun salam koja dan ekstrak biji buah markisa pada dosis 2000 mg/KgBB sehingga tidak dilanjutkan dengan uji batas 5000 mg/KgBB.

BAB V

KESIMPULAN DAN SARAN

5.1 Kesimpulan

Berdasarkan hasil penelitian dapat disimpulkan bahwa:

1. Kombinasi pada ekstrak buah kelapa sawit merah, ekstrak daun salam koja dan ekstrak biji buah markisa yang dibuat dalam perbandingan (1:1:1), (1:1:2), (1:2:1) dan (2:1:1) didapatkan hasil aktivitas antioksidan yang lebih kuat pada perbandingan (1:1:2) dengan kategori sangat kuat, yang memiliki nilai rata-rata *Inhibitory Concentration* (IC₅₀) yaitu 3,34 ppm ± 0,01.
2. Kombinasi pada formula ekstrak buah kelapa sawit merah, ekstrak daun salam koja dan ekstrak biji buah markisa diperoleh kisaran nilai LD₅₀ 2000 mg/KgBB termasuk kedalam kategori tingkat toksisitas 4 yaitu toksik sedang menurut kriteria penggolongan sediaan uji
3. Pengamatan yang dilakukan selama 14 hari tidak ditemukannya gejala toksisitas yang berbahaya pada hewan uji.

5.2 Saran

1. Dalam penelitian selanjutnya perlunya dilakukan uji toksisitas akut menggunakan formula terbaik dari pengujian antioksidan yang didapat dengan perbandingan (1:1:2) pada kombinasi ekstrak tersebut.
2. Dalam penelitian ini perlunya dilakukan penelitian lanjutan mengenai uji aktivitas SGPT-SGOT pada hati mencit untuk mengetahui adanya gangguan dari fungsi hati.

DAFTAR PUSTAKA

- Abigail Jonathan, G. A. Ekawati dan N. M. Indri Hapsari Arihantana. (2020). Pengaruh Lama Penyimpanan Daun Salam Koja (*Murraya koenigii* (L) Spreng) Terhadap Total Fenol dan Aktivitas Antibakteri Pada Pertumbuhan *Salmonella enteritidis* ATCC 13067. *J. Ilmu dan Teknol. Pangan*, vol. 9, no. 4, p. 381.
- Amiani W. (2022). Kandungan Metabolit Sekunder dan Aktivitas Tanaman Bajakah Sebagai Agen Antioksidan. *Jurnal Health Sains*. 3 (4),516-522.
- Anggraeni Putri, P., Chatri, M., & Advinda, L. (2023). Characteristics of Saponin Secondary Metabolite Compounds in Plants Karakteristik Saponin Senyawa Metabolit Sekunder pada Tumbuhan. *Serambi Biologi*. 8(2), 251–258.
- Andulaa, A. M., Ruslan, R., Ys., H., & Puspitasari, D. J. (2017). Studi Perbandingan Analisis Vitamin E Minyak Sawit Merah Tersaponifikasi Antara Metode Spektrofotometri Uv-Vis Dan Kckt. *Kovalen*, 3(1), 50.
- Armadany, F. I. (2020). Uji Potensi Antiinflamasi Ekstrak Etanol Daun Bambu-Bambu (*Polygonum pulchrum* Blume) Dengan Metode Stabilisasi Membran Sel Darah Merah Secara In Vitro. *Majalah Farmasetika.*, 4(1 1), pp. 144–151.
- Armin, F., Ermadani, & Rasyid, R. (2014). Analisis Senyawa Fenolat dan Uji Aktivitas Antioksidan Buah Markisa (*Passiflora edulis* Sims) secara Spektrofotometri Visibel. *Jurnal Farmasi Higea*, 6(2), 117–125.
- Asmaningrum, H. P., & Pasaribu, Y. P. (2016). Penentuan Kadar Besi (Fe) Dan Kesadahan Pada Air Minum Isi Ulang Di Distrik Merauke. *Magistra: Jurnal Keguruan dan Ilmu Pendidikan*, 3(2), 95-104.
- Ayun, A. Q., Faridah, D. N., Yuliana, N. D., & Andriyanto, A. (2021). Pengujian Toksisitas Akut LD50 Infusa Benalu Teh (*Scurrula* sp.) dengan Menggunakan Mencit (*Mus musculus*). *Acta Veterinaria Indonesiana*, 9(1), 53–63.
- BPOM RI. (2022). *Panduan penyusunan protokol uji praklinik uji toksisitas akut*.

- Badan Pengawas Obat Dan Makanan Republik Indonesia. Indonesia, p. 1–23.
- BPOM RI. (2014). *Persyaratan Mutu Obat Tradisional*. Peraturan Kepala Badan Pengawas Obat dan Makanan Republik Indonesia. Indonesia, p. 1–25.
- Budi Prabowo, Rafli Septian D, Amalus Solecha, Mustati'Uliyah, M. Zidan Izani, Lilis Nur Afiah, Danang Suryo M., Maulana Taufik H., Rahma Amelia Universitas. (2014). Pemanfaatan Buah Markisa Menjadi Produk Olahan Bernilai Ekonomis di Kelurahan Sukorame Gresik. *Jurnal Indonesia Sosial Teknologi*: Vol. 2, No. 9, 1510-1518.
- Ceriana, R., & Putri Rejeki, D. (2023). Uji Toksisitas Makroskopis Pada Organ Ginjal, Hati, Jantung dan Limpa Mencit Hiperglikemia yang Diberi Ekstrak Etanol Kulit Buah Rambai (*Baccaurea motleyana*). *Journal of Pharmaceutical and Health Research*. 4(2), 183–189.
- Cahyani, E., Sandhi, P. E., & Susanthi, I. M. (2018). Uji Efek Antiinflamasi Ekstrak Etanol Daun Salam India (*Murraya koenigii* L) Terhadap Tikus (*Rattus norvegicus*) Jantan yang Diinduksi Karagenan 1%. *Jurnal Ilmiah Medicamento*, 4(1), 25–31.
- Cahyaningtyas, I. D. A. I. (2021). Uji Kadar Total Fenol dan Aktivitas Antioksidan Kombinasi Ekstrak Anggur (*Vitis vinifera* L.) dan Delima (*Punica granatum*) dengan Metode FRAP. *Fakultas Sains Dan Teknologi, Universitas Islam Negeri Maulana Ibrahim Malang*.
- Charisma, A. M., & Arianing, I. F. (2021). Pengaruh Vitamin E Terhadap Histopatologi Jantung Mencit (*Mus Muculus*) Yang Terpapar Asap Rokok. *LenteraBio : Berkala Ilmiah Biologi*. 10(3), 260–265.
- Darmawan, K. S., Udayana, I. G. B., Wirajaya, A. A. N. M., & Yuliantini, M. S. (2020). Pengaruh Konsentrasi Atonik dan Dosis Pupuk Kandang Sapi Terhadap Pertumbuhan Bibit Kelapa Sawit (*Elaeis guineensis* Jacq) Sistem Prenursery. *Gema Agro*, 25(1), 17–22.

- Daud, A., Suriati, S., & Nuzulyanti, N. (2019). Kajian Penerapan Faktor yang Mempengaruhi Akurasi Penentuan Kadar Air Metode Thermogravimetri. *Jurnal Ilmu-Ilmu Pertanian*, 24(2).
- Departemen Kesehatan RI. (1980). *Materia Medika Indonesia*. Jilid IV. Jakarta: Departemen Kesehatan RI.
- Departemen Kesehatan RI. (1994). *Persyaratan Obat Tradisional*. Jakarta: Departemen Kesehatan RI.
- Departemen Kesehatan RI. (2009). *Farmakope Herbal Indonesia Edisi I*. Jakarta : Departemen Kesehatan RI.
- Departemen Kesehatan RI. (2008). *Farmakope Herbal Indonesia Edisi I*. Jakarta : Departemen Kesehatan RI.
- Devitria, R., Elfia, M., & Cahyani, M. T. (2023). Uji Aktivitas Antioksidan Ekstrak Etanol Biji Jambu Bol (*Syzygium Malaccense* (L.) Merr. & Perry) Dengan Metode *1,1-Diphenyl-2-Picrylhydrazyl* (DPPH). *Jurnal Penelitian Dan Pengkajian Ilmiah Eksakta*, 2(1), 51–55.
- Djamaludin, M., Kristiana, R., & Permana, B. Y. (2021). Uji Toksisitas Akut Ekstrak Etanol Daun Salam (*Syzygium polyanthum*) Pada Mencit Galur DDY Y (*Mus musculus*). *Jurnal Kedokteran dan Kesehatan*. 4(4), 355–368.
- Estiasih., Teti, KGS Ahmadi, Tri Dewanti W, Jaya Mahar M, A. Zaki Mubarok, Elok Zubaidah, Jhauharotul Mukhlisiyyah dan Risma Puspitasari. (2013). Bioactive Compounds of Palm Fatty Acid Distillate (PFAD) from Several Palm Oil Refineries. *Advance Journal of Food Science and Technology* . 5(9): 1153-1159.
- Fachri, H. O., Adriatmoko, W., & Astuti, P. (2018). Khasiat Ekstrak Buah Markisa Kuning (*P. Edulis* Sims) sebagai Antiinflamasi Dilihat dari Jumlah Monosit pada Tikus Wistar Jantan (*Rattus norvegicus*). *Stomatognatic - Jurnal Kedokteran Gigi*, 15(2), 34.

- Fadlilaturrahmah, F., Amilia, J., Sukmawaty, Y., & Wathan, N. (2022). Identifikasi Fitokimia dan Uji Aktivitas Antiinflamasi In vitro Fraksi n- heksana Kapur Naga (*Calophyllum soulattri* Burm F) Dengan Metode Uji Penghambatan Denaturasi Protein Menggunakan Spektrofotometer Uv-Vis. *Jurnal Pharmascience*, 9(2), 355.
- Ginting, H., Dalimunthe, A., & Pratama, E. K. (2018). Kajian Ketoksikan Ekstrak Etanol Kulit Buah Markisah Ungu (*Passiflora Edulis* Sims.) Terhadap Hati Mencit. *Talenta Conference Series: Tropical Medicine (TM)*, 1(1), 257–263.
- Hamzah, F., S. Hadi, N. Hamzah, R.A. Jas, dan Z.I. Hardani. (2012). *Fraksi bioaktif pelepah kelapa sawit (Elaies guineensis Jacq.) pada beberapa bakteri dan jamur patogen serta analisis kelayakan finansial*. Pekanbaru: Laporan Penelitian Guru Besar Fakultas Pertanian Universitas Riau.
- Hanani, Endang. (2015). *Analisis Fitokimia*. Jakarta : Buku Kedokteran EGC.
- Hanani, Endang. (2017). *Analisis Fitokimia* . Jakarta: Buku Kedokteran EGC.
- Hanani, E., Mun'im, A. & Sekarini, R. (2005). Identifikasi Senyawa Antioksidan Dalam Spons Callyspongia sp Dari Kepulauan Seribu. *Majalah Ilmu Kefarmasian*, Vol. II, No.3, 127 - 133.
- Haryani, T. S., Triastinurmiatiningsih, & Sari, B. L. (2020). Uji Antioksidan Ekstrak *Padina australis* dan Efek Toksisitas Akut Terhadap Mencit (*Mus musculus*). *Fitofarmaka: Jurnal Ilmiah Farmasi*. 12(1), 1–8.
- Hasanah, Rusny, dan Masri. (2015). Analisis Pertumbuhan Mencit (*Mus musculus* L.) ICR Dari Hasil Perkawinan Inbreeding Dengan Pemberian Pakan AD1 dan AD2. *Jurnal Kesehatan dan Lingkungan*. Vol.2 No.6. Fakultas Sains dan Teknologi. UIN Alauddin Makassar.
- Hayati, I. (2021). Potensi Ekstrak Daun Salam Koja (*Murraya koenigii* L. Spreng) Terhadap Mortalitas *Pediculus humanus capitis*. *Jurnal Ilmiah Pharmacy*, 8(1), 36–45.

- Hikmawanti, N. P. E., & Dwitiyanti. (2019). Pemanfaatan Metode High-Throughput Micro Plate Untuk Skrining Kadar Fenolik Pada Ekstrak Dan Fraksi Biji Pepaya Muda (*Carica papaya*). 15–16.
- Issa, J., Tabares, I. (2019). Efek Pemberian Rebusan Kulit Markisa Ungu (*Passiflora edulis*) Sebagai Antidiabetik Terhadap Gambaran Hispatologi Pankreas Tikus yang Diinduksi Streptozotosin. Skripsi. Medan: Universitas Muhamadiyah Sumatera Utara.
- Karnirius Harefa, Barita Aritonang, & Ahmad Hafizullah Ritonga. (2022). Aktivitas Antibakteri Ekstrak Etanol Kulit Markisa Ungu (*Passiflora Edulis Sims*) Terhadap Bakteri Propionibacterium Acnes. *Jurnal Multidisiplin Madani*, 2(6), 2743–2758.
- Kurniawati, I. F., & Sutoyo, S. (2021). Review Artikel: Potensi Bunga Tanaman Sukun (*Artocarpus Altilis* [Park. I] Fosberg) Sebagai Bahan Antioksidan Alami. *Unesa Journal of Chemistry*, 10(1), 1–11.
- Kusumah, S. H., Pebrianti, S. A., & Maryatilah, L. (2021). Uji Aktivitas Antioksidan Buah dan Sirup Markisa Ungu Menggunakan Metode DPPH. *Jurnal Fakultas Teknik*, 2(1), 25–32.
- Lutfi Alhazami. (2022). Perbaikan Proses Produksi Minuman Markisa di Bantar Gebang. *JPM: Jurnal Pengabdian Masyarakat*, 2(3), 121–124.
- Maulana, R., Pamungkas, J., Astuti, Y. T. M., & Rochmiyati, S. M. (2023). Pengaruh Macam dan Dosis Sumber Pupuk Pospat Alam (Kotoran Walet , Guano , Sriti , RP) terhadap Pertumbuhan Bibit Kelapa Sawit di Pre Nursery. 1, 2217–2222.
- Meiske S. Sangi, Malangngi P. Liberty, dan Jessy J.E. Paendong. (2012). Penentuan Kandungan Tanin dan Uji Antioksidan Ekstrak Biji Buah Alpukat (*Persea americana* Mill.). *Jurnal MIPA Unsrat*. 1 (1) 5-10.
- Mustanir, M., Al-Qarana, T. R., Gusvianna, H., & Saidi, N. (2019). Analisa Potensi Ekstrak Daun Kari (*Murraya koenigii* L. Spreng). Talenta Conference Series:

Science and Technology (ST), 2(1), 1–8.

- Molyneux, P. (2004). The Use of the Stable Free Radical *Diphenylpicryl-hydrazyl* (DPPH) for Estimating Antioxidant Activity. *Songklanakarinn Journal of Science and Technology*, 26(December 2003), 211–219.
- Mboro, Y. M., Dima, A. O. M., & Ati, V. M. (2018). Profile of Growth and Percentage of Organ Weight Internal Mice (*Mus musculus* L.) Male Giving Moringa Leaf Extract (*Moringa oleifera* Lamk.). *Jurnal Biotropikal Sains*. 15(1), 57–73.
- Nathania, E. K., Maarisit, W., Potalangi, N. O., & Tapehe, Y. (2020). Uji Aktivitas Antioksidan Ekstrak Etanol Daun Kecubung Hutan (*Brugmansia Suaveolens* Bercht. & J. Presl) Dengan Menggunakan Metode DPPH (1,1-diphenyl-2-picrylhydrazyl). *Biofarmasetikal Tropis*, 3(2), 40–47.
- Nor Azman NH, Goon JA, Abdul Ghani SM, Hamid Z, Wan Ngah WZ. (2-18). Comparing palm oil, tocotrienol- rich fraction and α -tocopherol supplementation on the antioxidant levels of older adults. *Antioxidants*. 7(6):74.
- Nnaji, L.C., Okonkwo, I.F., Solomon, B.O., and Onyia, O.C. (2013). Comparative Study of BetaCarotene Content of Egg Yolk of Poultry. *Inter J Ari Biosci*. 2(1):1-3.
- Organization for Economic Co-Operation and Development (OECD). (2001). *OECD Guidelines for Testing for Chemicals Test No. 425: Acute Oral Toxicity: Up and Down Procedure*. Paris: OECD, 1-26.
- Organization for Economic Co-Operation and Development (OECD). (2001). *OECD Guidelines for Testing for Chemicals Test No. 420: Acute Oral Toxicity: Fixed Dose Procedure*. Paris : OECD, 4-8.
- Oktaria, D., & Marpaung, M. P. (2023). Penetapan Kadar Flavonoid Total Dan Aktivitas Antioksidan Ekstrak Akar Nipah (*Nypa fruticans* Wurmb) Dengan Metode Spektrofotometri UV-Vis. *Lantanida Journal*, 11(1), 36.

- Prayogi, H., Basyuni, M., & Putri, L. A. P. (2010). Keragaman Genetik Tiga Populasi Kelapa Sawit (*Elaeis guineensis* Jacq.) Tipe Pasifera Berdasarkan Marka Rapd. 1–8.
- Pustaka Afifah, D., Muflikhah, K., Ati, V. R. B., Tsani, R. M., Khasanah, D., Maulana, W., Akinpelu, B. A., Igbeneghu, O. A., Awotunde, A. I., Iwalewa, E. O., Oyedapo, O. O., Albright, R. C., Aripasha, A., Andriana, D., Purnomo, Y. ; M., Butenhoff, J. L., Basile, D. P., Anderson, M. D., Sutton, T. A. ; R. K., Chawla, L. S. (2019). Pengaruh Pemberian Sari Markisa Ungu (*Passiflora edulis* var *edulis*) Terhadap Profil Lipid Tikus Wistar Model Diabetes Melitus. *Jos.Unsoed.Ac.Id*, 14(1), 746.
- Rahmawan. 2011. *Prinsip Dasar Pengeringan*. Bogor : Jurusan Teknologi Industri Pertanian IPB.
- Randa Kurniawan, Stiadi, Y., & Emriadi. (2018). Ekstrak Kulit Buah Kuini (*Mangifera odorata* Griff) Sebagai Inhibitor Korosi Baja Dalam Medium Asam Klorida. *Jurnal Kimia Unand*, 7(1).
- Reskyani, M. Al, Handayani, S., Farmasi, F., Indonesia, U. M., Makassar, K., & Selatan, P. S. (2024). Uji Toksisitas Ekstrak Etanol Biji Markisa Ungu (*Passiflora edulis* Sims) dengan Metode Brine Shrimp Lethality Tes T. 2(1), 12–22.
- Rikantara, F. S., Utami, M. R., & Kasasiah, A. (2022). Aktivitas Antioksidan Kombinasi Ekstrak Daun Sirsak (*Annona muricata* L.) dan Ekstrak Daun Pepaya (*Carica papaya* L.) dengan Metode DPPH. *Lambung Farmasi: Jurnal Ilmu Kefarmasian*, 3(2), 124–133.
- Sadeli, Richard A. (2016). *Uji Aktivitas Antioksidan dengan Metode DPPH (1,1-diphenyl-2-picrylhydrazyl) Ekstrak Bromelain Buah Nanas (Ananas comosus (L.) Merr.)*. Skripsi. Yogyakarta: Universitas Sanata Dharma.
- Sakarkar D.M., Tembhume S.V., More B.H. (2018). 28 Days repeated dose toxicity study of ethanolic extract of *Murraya koenigii* in Wistar rats. *Ann. Pharmacol.*

Pharm ;2:1047.

Samudra, A. G., Ramadhani, N., Fitriani, D., & Putri, D. (2022). Perbandingan Metode Ekstraksi Maserasi Dan Sokletasi Terhadap Kadar Fenolik Total Ekstrak Etanol Sargassum Sp. *Seminar Nasional Hasil Penelitian Dan Pengabdian Kepada Masyarakat*, 500–511.

Satish Chand Saini , Dr. GBS Reddy , Pankaj Birari. (2013). *International Journal of Pharmaceutical Science Invention*, Volume 2, Issue 9, PP.34- 36.

Shalaby1, E. A., & * and Sanaa M. M. Shanab. (2014). *African Journal of Pharmacy and Pharmacology* Surfactants solubility, concentration and the other formulations effects on the drug release rate from a controlled-release matrix. 8(13), 364–371.

Singh, H., P.K, Omre., and Sandhya, M.M, S. (2014). Curry Leaves (*Murraya Koenigii* Linn. Spreng)- A Mircale Plant. *Indian Journal*. 4 (1): 46-52.

Siregar HA, Rahmadi HY, Wening S, Suprianto E. (2018). Komposisi asam lemak dan karoten kelapa sawit (*Elaeis oleifera*), interspesifik hibrida, dan Pseudo-backcross pertama di Sumatra Utara, Indonesia. *J Penelit Kelapa Sawit*. Aug 1;26(2):91-101. 3.

Siswati. (2020). Analisa Kadar Air dan Kadar Abu pada Simplisia Temu Giring (*Curcumae heyneana*) dan Simpliasia Kunyit (*Curcumae domestica*) di Balai Riset dan Standarisasi Industri Medan.Tugas Akhir. Jurusan Farmasi. Medan: Universitas Sumatera Utara.

Serlahwaty, D., & Sevian, A.N. (2016). *Uji aktivitas antioksidan ekstrak etanol 96% kombinasi buah strawberry dan tomat dengan metode ABTS*. Prosiding. Samarinda : Seminar Nasional Tumbuhan Obat Indonesia.

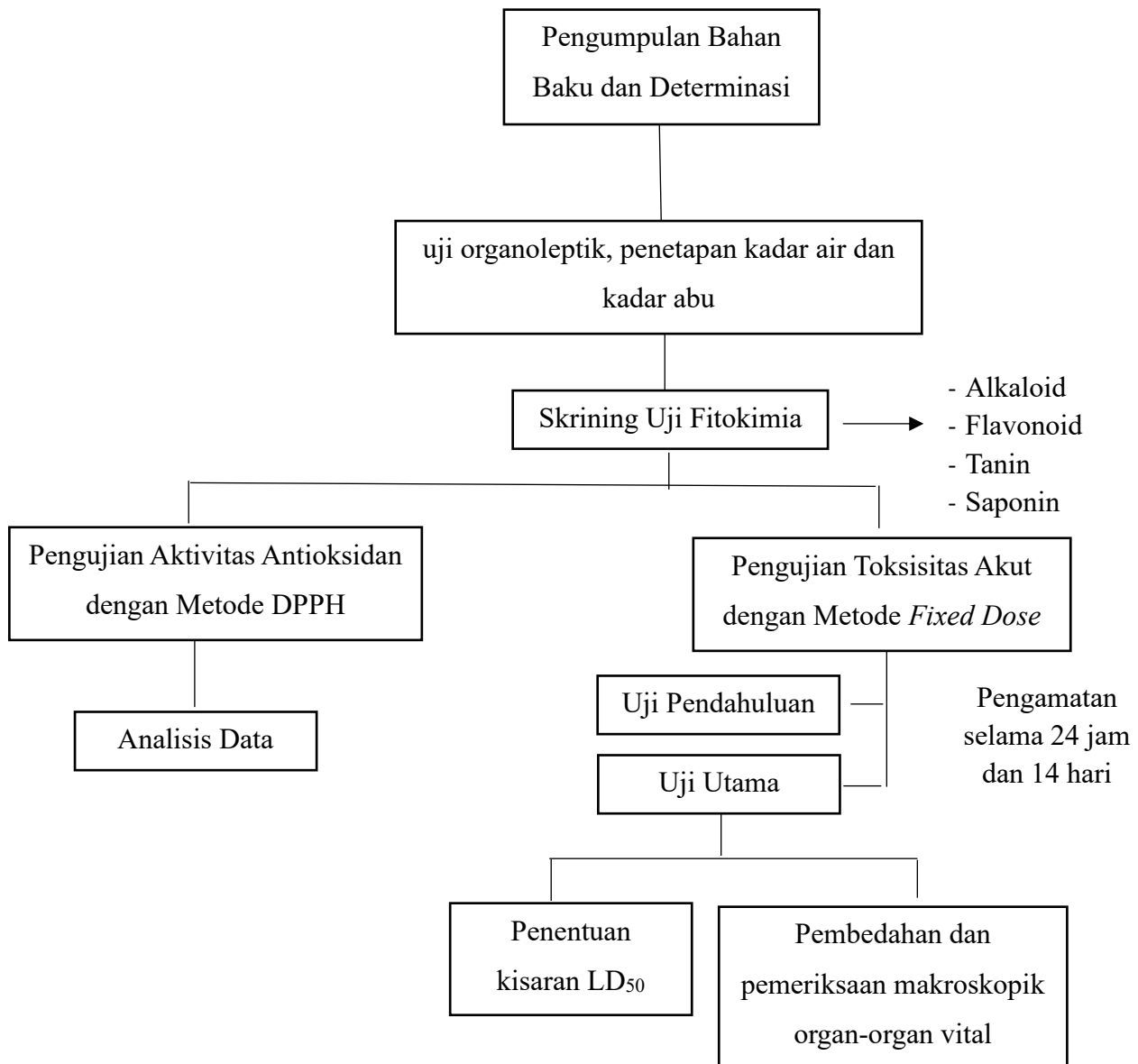
Sukma, F. F., Sahara, D., Ihsan, N. F., Halimatussakdiah, Pujiwahyuningsih, & Amna, U. (2018). Skrining Fitokimia Ekstrak Daun "Temurui" (*Murraya koenigii* (L.) Spreng) Kota Langsa, Aceh. *Jurnal Jeumpa*, 5 (1)- Juli 2018.

Jurnal Jeumpa, 5(1), 34–39.

- Sukweenadhi, J., Yunita, O., Setiawan, F., Siagian, M. T., Danduru, A. P., & Avanti, C. (2020). Antioxidant activity screening of seven Indonesian herbal extract. 21(5), 2062–2067.
- Supriningrum, R. F. (2019). Karakterisasi spesifik dan nonspesifik ekstrak etanol daun putat (*Planchonia valida*). *Al Ulum Jurnal Sains dan Teknologi*. 5(1), 6-12.
- Syahputra, E, Sarbino dan S. Dian. (2011). Weed Assessment di Perkebunan Kelapa Sawit Lahan Gambut. *Jurnal Teknologi Perkebunan & PSDL* (1): 7-42.
- Syamsul, E. S., Amanda, N. A., & Lestari, D. (2020). Perbandingan Ekstrak Lamur *Aquilaria malaccensis* Dengan Metode Maserasi dan Refluks. *Jurnal Riset Kefarmasian Indonesia*. 2(2), 97–104.
- Tristantini, D., Ismawati, A., Pradana, B. T., & Gabriel, J. (2016). Pengujian Aktivitas Antioksidan Menggunakan Metode DPPH pada Daun Tanjung (*Mimusops elengi* L). *Universitas Indonesia*, 2.
- Uswatul Khoirot & Emni Purwoningsih. (2019). *Efek Pemberian Rebusan Kulit Markisa Ungu (Passiflora edulis sims.) Sebagai Antidiabetik Terhadap Gambaran Hispatologi Pankreas Tikus yang Diinduksi Streptozotosin*. Skripsi. Medan: Fakultas Kedokteran Universitas Muhammadiyah Sumatera Utara
- Ubang, F., Siregar, V. O., & Herman, H. (2022). Efek Toksik Pemberian Ekstrak Etanol Daun Mekai (*Albertisia papuana* Becc.) Terhadap Mencit. *Proceeding of Mulawarman Pharmaceuticals Conferences*. 49–57.
- Utomo, D. S., Kristiani, E. B. E., & Mahardika, A. (2020). The Effect of Growth Location on Flavonoid, Phenolic, Chlorophyll, Carotenoid and Antioxidant Activity Levels in Horse Whip (*Stachytarpheta Jamaicensis*). *Bioma*, 22(2), 143–149.

- Veterinus, I. M. Et Al. (2021) .Kajian Pustaka : Penggunaan Mencit Sebagai Hewan Coba Di Laboratorium Yang Mengacu Pada Prinsip Kesejahteraan Hewan', 10(1), Pp. 134–145.
- Wahyuni, A. M., Afthoni, M. H., & Rollando, R. (2022). Pengembangan dan Validasi Metode Analisis Spektrofotometri UV Vis Derivatif untuk Deteksi Kombinasi Hidrokortison Asetat dan Nipagin pada Sediaan Krim. *Sainsbertek Jurnal Ilmiah Sains & Teknologi*, 3(1), 239–247.
- Wardani, Y. K., Kristiani, E. B. E., & Sucahyo. (2020). Korelasi Antara Aktivitas Antioksidan dengan Kandungan Senyawa Fenolik dan Lokasi Tumbuh Tanaman *Celosia argentea* Linn. *Bioma*. 22(2), 136–142.
- Wibawa, J. C., Wati, L. H., & Arifin, M. Z. (2020). Mekanisme Vitamin C Menurunkan Stres Oksidatif Setelah Aktivitas Fisik. *JOSSAE : Journal of Sport Science and Education*, 5(1), 57.
- Widodo, B. N., & Tukiran, T. (2021). Aktivitas Kombinasi Ekstrak Etanol Kulit Markisa (*Passiflora edulis* Sims) dan Kulit Alpukat (*Persea americana* Mill) Terhadap Kelarutan Kalsium Oksalat. *Jurnal Kimia*, 15(2), 121.
- Windiawati, Bina Lohita Sari, dan S. W. (2015). Aktivitas Antioksidan Ekstrak Etanol Teh Putih (*Camellia sinensis* L.) dan Benalu Teh (*Scurulla atropurpurea* BL.Dans). 1–8.
- Yasacaxena, L. N. Y., Defi, M. N., Kandari, V. P., Weru, P. T. R., Papilaya, F. E., Oktafera, M., & Setyaningsih, D. (2023). Review: Extraction of Temulawak Rhizome (*Curcuma xanthorrhiza* Roxb.) and Activity As Antibacterial. *Jurnal Jamu Indonesia*, 8(1), 10–17.
- Yusdiana, & Bagio. (2021). Fanik : Jurnal Faperta Uniki. *Produksi Dan Saluran Pemasaran Kakao Di Kecamatan Juli Kabupaten Bireuen*, 2(1), 11–16.
- Zainal, Z., Ong, A., May, C. Y., Chang, S. K., Rahim, A. A., & Khaza'ai, H. (2020). Acute and subchronic oral toxicity of oil palm puree in sprague–dawley rats. *International Journal of Environmental Research and Public Health*, 17(10).

LAMPIRAN

Lampiran 1. Alur Penelitian

Lampiran 2. Lembar Determinasi Buah Kelapa Sawit Merah



PT. PALAPA MUDA PERKASA

CHEMICALS PRODUCT AND CHEMICAL ANALYSIS SERVICE

Jalan Kalimulya No 23 Cilodong, Kota Depok Jawa Barat, 16417

Telepon : 0811 8397 999, Surat Elektronik : healthstroemp@gmail.com



Nomor : 996/IPH.11.02/If.11/I/2023
 Lampiran : -
 Perihal : Hasil identifikasi /determinasi Tumbuhan

Kepada Yth.
 Bpk./Ibu/Sdr(i)

FEBRI PADHILAH

UNIVERSITAS PAKUAN

Jl. Pakuan, RT.02/RW.06, Tegallega,
 Kecamatan Bogor Tengah, Kota Bogor,
 Jawa Barat 16129

Dengan hormat,

Bersama ini kami sampaikan hasil identifikasi / determinasi tumbuhan yang saudara kirimkan ke "PMP", adalah :

No.	No. Kol.	Jenis	Suku
1.	Biji Sawit	Elaeis Guineensis	Arecaceae

Demikian, semoga berguna bagi Saudara.

Depok, 14 Agustus 2023

Manager Quality

Muzdalifah Wahdhaniyyah

Lampiran 3. Lembar Determinasi Daun Salam Koja



PT. PALAPA MUDA PERKASA

CHEMICALS PRODUCT AND CHEMICAL ANALYSIS SERVICE

Jalan Kalimulya No 23 Cilodong, Kota Depok Jawa Barat, 16417

Telepon : 0811 8397 999, Surat Elektronik : healthstroemp@gmail.com



Nomor : 996/IPH.11.02/If.11/I/2023
 Lampiran : -
 Perihal : Hasil identifikasi /determinasi Tumbuhan

Kepada Yth.
 Bpk./Ibu/Sdr(i)

FEBRI PADHILAH

UNIVERSITAS PAKUAN

Jl. Pakuan, RT.02/RW.06, Tegallega,
 Kecamatan Bogor Tengah, Kota Bogor,
 Jawa Barat 16129

Dengan hormat,

Bersama ini kami sampaikan hasil identifikasi / determinasi tumbuhan yang saudara kirimkan ke "PMP", adalah :

No.	No. Kol.	Jenis	Suku
1.	Daun Salam Koja	<i>Murraya koenigii</i> L. Spreng	Rutaceae

Demikian, semoga berguna bagi Saudara.

Depok, 14 Agustus 2023

Manager Quality

Muzdalifah Wahdhaniyyah

Lampiran 4. Lembar Determinasi Biji Buah Markisa



PT. PALAPA MUDA PERKASA
 CHEMICALS PRODUCT AND CHEMICAL ANALYSIS SERVICE

Jalan Kalimulya No 23 Cilodong, Kota Depok Jawa Barat, 16417

Telepon : 0811 8397 999, Surat Elektronik : healthstroepmp@gmail.com



Nomor : 996/IPH.11.02/If.11/I/2023
 Lampiran : -
 Perihal : Hasil identifikasi /determinasi Tumbuhan

Kepada Yth.
 Bpk./Ibu/Sdr(i)

FEBRI PADHILAH

UNIVERSITAS PAKUAN
 Jl. Pakuan, RT.02/RW.06, Tegallega,
 Kecamatan Bogor Tengah, Kota Bogor,
 Jawa Barat 16129

Dengan hormat,

Bersama ini kami sampaikan hasil identifikasi / determinasi tumbuhan yang saudara kirimkan ke "PMP", adalah :

No.	No. Kol.	Jenis	Suku
1.	Biji buah markissa	<i>Passiflora edulis f. edulis</i> Sims	<u>Passifloraceae</u>

Demikian, semoga berguna bagi Saudara.

Depok, 14 Agustus 2023

Manager Quality

Muzdalifah Wahdhaniiyah

Lampiran 5. Surat Hasil Kaji Etik

**KOMITE ETIK PENGGUNAAN HEWAN PERCOBAAN
FAKULTAS MATEMATIKA DAN ILMU PENGETAHUAN ALAM
UNIVERSITAS PAKUAN
Jl. Pakuan PO BOX 452**

**SURAT KEPUTUSAN KOMITE ETIK
No. 005 /KEPHP-UNPAK/03-2024**

Komite Etik Penggunaan Hewan Percobaan Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam Universitas Pakuan, dalam upaya melindungi hak dan kesejahteraan subjek hewan percobaan dalam penelitian dengan teliti telah mengkaji rancangan penelitian berjudul

**Uji Antioksidan dan Uji Toksisitas Akut dari Kombinasi Ekstrak Buah Kelapa Sawit
Merah, Daun Salam Koja dan Biji Buah Markisa**

Pencruti Utama : Febri Padmiliah
Institusi : Program Studi Farmasi Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam Universitas Pakuan Bogor

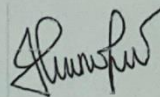
Dan MENERIMA rancangan penelitian tersebut.

Tanggal ditetapkan

Bogor, 16 Maret 2024

Sekretaris Komite Etik

Ketua Komite Etik



Nisa Najwa Rokhmah, M.Farm., Apt



Drh. Min Rahmawati, PhD

Lampiran 6. Perhitungan Kadar Air Ekstrak

Sampel	Ulangan	Bobot sampel (g)	Bobot cawan kosong (g)	Bobot cawan + sampel (g)	Bobot cawan setelah dipanaskan (g)	Kadar air (%)	Rata-rata kadar air \pm SD (%)
Ekstrak BKSM	1	2,0015	52,1191	54,1206	54,0972	2,9228	2,8731 \pm 0,07
					54,0653		
					54,0621		
	2	2,1817	55,6207	57,8024	57,7774	2,8234	
					57,7449		
					57,7408		
Ekstrak DSK	1	2,6331	52,3098	54,9429	54,8676	3,4142	3,3316 \pm 0,11
					54,8583		
					54,8530		
	2	2,1513	54,6571	56,8084	56,7683	3,2491	
					56,7368		
					56,7385		
Ekstrak BBM	1	2,7816	54,1875	56,9691	56,8516	4,6771	4,5819 \pm 0,13
					56,8397		
					56,8390		
	2	2,1084	55,5137	57,6221	57,5499	4,4868	
					57,5290		
					57,5275		

Rumus Kadar Air :

$$\text{Kadar air (\%)} = \frac{W_1 - W_2}{\text{Bobot sampel}} \times 100 \%$$

- Ekstrak BKSM

$$\text{Kadar air (\%)} = \frac{W_1 - W_2}{\text{Bobot sampel}} \times 100\% = \frac{54,1206 \text{ (g)} - 54,0621 \text{ (g)}}{2,0015 \text{ (g)}} \times 100\% = 2,9228\%$$

$$\text{Kadar air (\%)} = \frac{W_1 - W_2}{\text{Bobot sampel}} \times 100\% = \frac{57,8024 \text{ (g)} - 57,7408 \text{ (g)}}{2,1817 \text{ (g)}} \times 100\% = 2,8234\%$$

$$\text{Rata-rata kadar air } \pm \text{ SD (\%)} = 2,8731 \pm 0,07$$

Lampiran 7. Perhitungan Kadar Abu Ekstrak

Sampel	Ulangan	Bobot sampel (g)	Bobot cawan kosong (g)	Bobot cawan + isi (g)	Bobot cawan + isi setelah dipanaskan (g)	Kadar abu (%)	Rata-rata kadar abu \pm SD (%)
Ekstrak BKM	1	2,0279	25,5219	27,5498	25,6044	3,9498	$3,8536 \pm 0,13$
					25,6030		
					25,6020		
	2	2,0066	25,3526	27,3592	25,4301	3,7575	
					25,4297		
					25,4280		
Ekstrak DSK	1	2,0349	25,6105	26,6454	24,7076	4,4129	$4,3043 \pm 0,15$
					24,7047		
					24,7003		
	2	2,0211	25,2910	27,3121	25,3784	4,1957	
					25,3769		
					25,3758		
Ekstrak BBM	1	2,0611	24,5454	26,6065	24,6497	4,8711	$4,8406 \pm 0,04$
					24,6470		
					24,6458		
	2	2,0581	24,2885	26,3466	24,3897	4,8102	
					24,3881		
					24,3875		

Rumus Kadar Abu :

$$\text{Kadar abu (\%)} = \frac{\text{Bobot krus isi} - \text{Bobot krus kosong}}{\text{Bobot sampel}} \times 100 \%$$

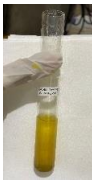
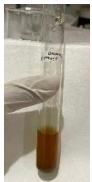




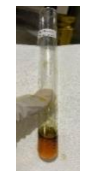





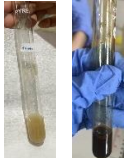





- Ekstrak BKSM

$$\text{Kadar abu (\%)} = \frac{25,6020 \text{ (g)} - 25,5219 \text{ (g)}}{2,0279 \text{ (g)}} \times 100\% = 3,9498\%$$

$$\text{Kadar abu (\%)} = \frac{25,4280 \text{ (g)} - 25,3526 \text{ (g)}}{2,0066 \text{ (g)}} \times 100\% = 3,7575\%$$

$$\text{Rata-rata kadar abu} \pm \text{SD (\%)} = 3,8536 \pm 0,13$$

Lampiran 8. Hasil Uji Fitokimia

Golongan Senyawa	Gambar		
	Ekstrak buah kelapa sawit merah	Ekstrak daun salam koja	Ekstrak biji buah markisa
Alkaloid	Mayer 	Mayer 	Mayer 
	Dragendrof 	Dragendrof 	Dragendrof 
	Bouchardat 	Bouchardat 	Bouchardat 
Flavonoid			
Tanin			
Saponin			

Lampiran 9. Data perhitungan dalam pengujian Aktivitas Antioksidan pada kombinasi ekstrak buah kelapa sawit merah, ekstrak daun salam koja dan ekstrak biji buah markisa

1. Perhitungan dalam pengujian Aktivitas Antioksidan

- Pembuatan Larutan DPPH 1 mM

Molaritas DPPH yang dibutuhkan 1 mM = 1.10^{-3} mM

Mr DPPH = 394,32 g/mol

Volume larutan = 100 mL

$$\text{Molaritas} = \frac{\text{Berat DPPH (g)}}{\text{Mr}} \times \frac{1000}{\text{Volume larutan}}$$

$$1.10^{-3} \text{ mM} = \frac{\text{Berat DPPH (g)}}{394,32 \text{ g/mol}} \times \frac{1000}{100}$$

$$\text{Berat DPPH} = \frac{1.10^{-3} \text{ mM} \times 394,32 \text{ g/mol}}{10}$$

$$= 0,039432 \text{ gram}$$

$$= 39,432 \text{ mg}$$

2. Pembuatan Larutan Standar Induk Vitamin C 100 ppm

100 mg \rightarrow 100 mL = 100 mg/0,1 L (1000 ppm)

Dibuat dalam 100 ppm dalam 100 mL

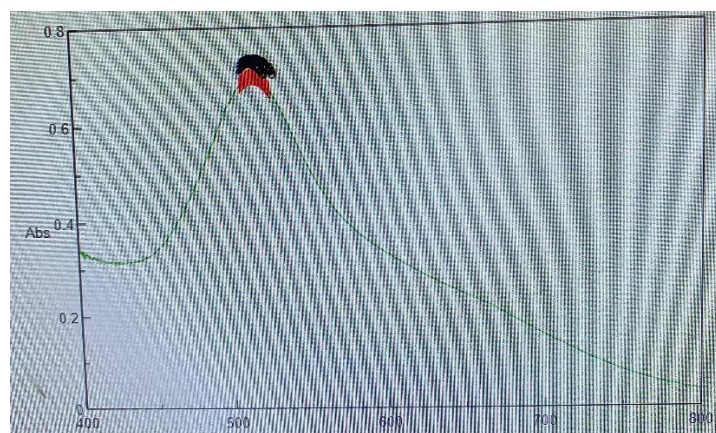
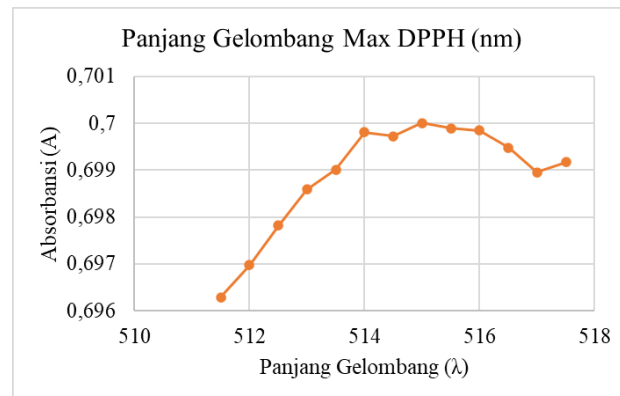
$$V_1 \times N_1 = V_2 \times N_2$$

$$V_1 \times 1000 \text{ ppm} = 100 \text{ mL} \times 100 \text{ ppm}$$

$$V_1 = 10 \text{ mL}$$

3. Penentuan Panjang Gelombang Maksimum DPPH

Panjang gelombang (nm)	Absorbansi (A)
513,5	0,69901
514	0,699806
514,5	0,699726
515	0,700008
515,5	0,69989
516	0,699843



4. Penentuan Waktu Inkubasi Optimum

Waktu (menit)	Absorbansi (A)
10	0,666
20	0,673
30	0,678
40	0,678
50	0,678
60	0,676

5. Perhitungan Deret Standar Konsentrasi Vitamin C

Larutan uji pembanding Vitamin C dibuat deret 0,5 , 1 , 1,5 , 2 , 2,5 dan 3 ppm, yang dibuat dengan cara melakukan pengenceran dari larutan stok Vitamin C 100 ppm

- Konsentrasi 0,5 ppm

$$V_1 \times N_1 = V_2 \times N_2$$

$$V_1 \times 100 \text{ ppm} = 10 \text{ mL} \times 0,5 \text{ ppm}$$

$$V_1 = 0,05 \text{ mL} \sim 50 \mu\text{L} \text{ (jumlah yang dipipet dari larutan 100 ppm)}$$

- Konsentrasi 1 ppm

$$V_1 \times N_1 = V_2 \times N_2$$

$$V_1 \times 100 \text{ ppm} = 10 \text{ mL} \times 1 \text{ ppm}$$

$$V_1 = 0,1 \text{ mL} \sim 100 \mu\text{L} \text{ (jumlah yang dipipet dari larutan 100 ppm)}$$

- Konsentrasi 1,5 ppm

$$V_1 \times N_1 = V_2 \times N_2$$

$$V_1 \times 100 \text{ ppm} = 10 \text{ mL} \times 1,5 \text{ ppm}$$

$$V_1 = 0,15 \text{ mL} \sim 150 \mu\text{L} \text{ (jumlah yang dipipet dari larutan 100 ppm)}$$

- Konsentrasi 2 ppm

$$V_1 \times N_1 = V_2 \times N_2$$

$$V_1 \times 100 \text{ ppm} = 10 \text{ mL} \times 2 \text{ ppm}$$

$$V_1 = 0,2 \text{ mL} \sim 200 \mu\text{L} \text{ (jumlah yang dipipet dari larutan 100 ppm)}$$

- Konsentrasi 2,5 ppm

$$V_1 \times N_1 = V_2 \times N_2$$

$$V_1 \times 100 \text{ ppm} = 10 \text{ mL} \times 2,5 \text{ ppm}$$

$$V_1 = 0,25 \text{ mL} \sim 250 \mu\text{L} \text{ (jumlah yang dipipet dari larutan 100 ppm)}$$

- Konsentrasi 3 ppm

$$V_1 \times N_1 = V_2 \times N_2$$

$$V_1 \times 100 \text{ ppm} = 10 \text{ mL} \times 3 \text{ ppm}$$

$$V_1 = 0,3 \text{ mL} \sim 300 \mu\text{L} \text{ (jumlah yang dipipet dari larutan 100 ppm)}$$

6. Perhitungan % Inhibisi Deret Standar Vitamin C

Abs blanko (A)	Konsentrasi (ppm)	Absorbansi Sampel (A)				% Inhibisi	Persamaan linier	IC ₅₀ (ppm)
		I	II	III	\bar{x}			
0,700008	0,5	0,564	0,565	0,566	0,565	19,2866	$y = 26,841x + 5,3153$ $R^2 = 0,9949$	1,6647
	1	0,491	0,487	0,485	0,487	30,4293		
	1,5	0,386	0,383	0,382	0,383	45,2863		
	2	0,279	0,278	0,277	0,278	60,2861		
	2,5	0,178	0,176	0,175	0,176	74,8574		
	3	0,117	0,115	0,113	0,115	83,5716		

$$\% \text{ Inhibisi} = \frac{\text{absorbansi blanko} - \text{absorbansi sampel}}{\text{absorbansi blanko}} \times 100\%$$

$$\text{Absorbansi blanko} = 0,700008$$

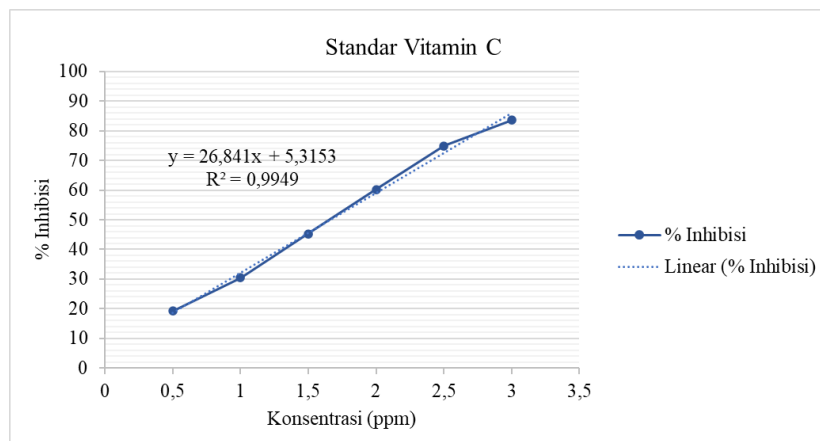
- Konsentrasi 0,5 ppm

$$\% \text{ Inhibisi } 0,5 \text{ ppm} = \frac{0,700008 - 0,565}{0,700008} \times 100\% = 19,2866\%$$

- Perhitungan IC₅₀

$$IC_{50} = \frac{50 - a}{b}$$

$$IC_{50} = \frac{50 - a}{b} = \frac{50 - 5,3153}{26,841} = 1,6647 \text{ ppm}$$



7. Perhitungan Deret Larutan Uji

Perhitungan larutan stok 100 ppm dalam labu 100 mL

ppm = mg/L

$$100 \text{ ppm} = \frac{\text{berat (mg)}}{0,1 \text{ L}}$$

Berat Ekstrak = 0,1 L x 100 ppm

$$= 10 \text{ mg} \rightarrow 0,01 \text{ gram}$$

Ekstrak yang akan diambil untuk larutan stok 100 ppm

Perbandingan Kombinasi	Ekstrak Buah Kelapa Sawit Merah	Ekstrak Daun Salam Koja	Ekstrak Biji Buah Markisa
EBKSM : EDSK : EBBM (1:1:1)	5 mg	5 mg	5 mg
EBKSM : EDSK : EBBM (1:1:2)	3,33 mg	3,33 mg	6,67 mg
EBKSM : EDSK : EBBM (1:2:1)	3,33 mg	6,67 mg	3,33 mg
EBKSM : EDSK : EBBM (2:1:1)	6,67 mg	3,33 mg	3,33 mg

Ket : EBKSM = Ekstrak Buah Kelapa Sawit Merah

EDSK = Ekstrak Daun Salam Koja

EBBM = Ekstrak Biji Buah Markisa

Larutan uji dibuat deret dengan konsentrasi 1,5 , 2,5 , 3,5 , 4,5 dan 5,5 ppm dari larutan stock 100 ppm

- Konsentrasi 1,5 ppm

$$V_1 \times N_1 = V_2 \times N_2$$

$$V_1 \times 100 \text{ ppm} = 10 \text{ mL} \times 1,5 \text{ ppm}$$

$$V_1 = 0,15 \text{ mL} \sim 150 \mu\text{L} \text{ (jumlah yang dipipet dari larutan 100 ppm)}$$

- Konsentrasi 2,5 ppm

$$V_1 \times N_1 = V_2 \times N_2$$

$$V_1 \times 100 \text{ ppm} = 10 \text{ mL} \times 2,5 \text{ ppm}$$

$$V_1 = 0,25 \text{ mL} \sim 250 \mu\text{L} \text{ (jumlah yang dipipet dari larutan 100 ppm)}$$

- Konsentrasi 3,5 ppm

$$V_1 \times N_1 = V_2 \times N_2$$

$$V_1 \times 100 \text{ ppm} = 10 \text{ mL} \times 3,5 \text{ ppm}$$

$$V_1 = 0,35 \text{ mL} \sim 350 \mu\text{L} \text{ (jumlah yang dipipet dari larutan 100 ppm)}$$

- Konsentrasi 4,5 ppm

$$V_1 \times N_1 = V_2 \times N_2$$

$$V_1 \times 100 \text{ ppm} = 10 \text{ mL} \times 4,5 \text{ ppm}$$

$$V_1 = 0,45 \text{ mL} \sim 450 \mu\text{L} \text{ (jumlah yang dipipet dari larutan 100 ppm)}$$

- Konsentrasi 5,5 ppm

$$V_1 \times N_1 = V_2 \times N_2$$

$$V_1 \times 100 \text{ ppm} = 10 \text{ mL} \times 5,5 \text{ ppm}$$

$$V_1 = 0,55 \text{ mL} \sim 550 \mu\text{L} \text{ (jumlah yang dipipet dari larutan 100 ppm)}$$

8. Perhitungan % Inhibisi Kombinasi Sampel

➤ Sampel EBKSM : EDSK : EBBM (1:1:1)

Abs blanko (A)	Konsentrasi (ppm)	Absorbansi Sampel (A)				% Inhibisi	Persamaan linier	IC ₅₀ (ppm)
		I	II	III	\bar{x}			
0,93829	1,5	0,743	0,742	0,741	0,742	20,9199	y = 7,7481x + 9,042 R ² = 0,9976	5,2862
	2,5	0,673	0,672	0,671	0,672	28,3803		
	3,5	0,610	0,607	0,606	0,607	35,3078		
	4,5	0,521	0,519	0,519	0,519	44,6866		
	5,5	0,459	0,456	0,452	0,455	51,5075		

$$\% \text{ Inhibisi} = \frac{\text{absorbansi blanko} - \text{absorbansi sampel}}{\text{absorbansi blanko}} \times 100\%$$

Absorbansi blanko = 0,93829

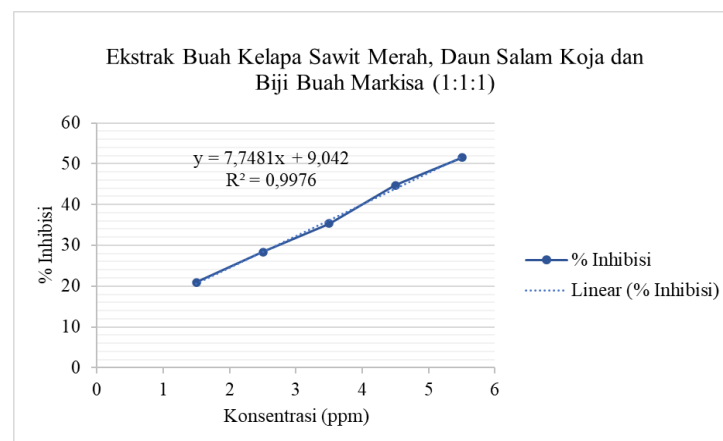
➤ Konsentrasi 1,5 ppm

$$\% \text{ Inhibisi } 1,5 \text{ ppm} = \frac{0,93829 - 0,742}{0,93829} \times 100\% = 20,9199\%$$

➤ **Perhitungan IC₅₀**

$$IC_{50} = \frac{50 - a}{b}$$

$$IC_{50} = \frac{50 - a}{b} = \frac{50 - 9,042}{7,7481} = 5,2862 \text{ ppm}$$



➤ **Sampel EBKSM : EDSK : EBBM (1:1:2)**

Abs blanko (A)	Konsentrasi (ppm)	Absorbansi Sampel (A)				% Inhibisi	Persamaan linier	IC ₅₀ (ppm)
		I	II	III	\bar{x}			
0,6510	1,5	0,457	0,456	0,455	0,456	29,9539	y = 10,384x + 15,3 R ² = 0,9925	3,3417
	2,5	0,386	0,385	0,384	0,385	40,8602		
	3,5	0,299	0,300	0,300	0,299	54,0706		
	4,5	0,249	0,247	0,246	0,247	62,0583		
	5,5	0,189	0,188	0,185	0,187	71,2749		

$$\% \text{ Inhibisi} = \frac{\text{absorbansi blanko} - \text{absorbansi sampel}}{\text{absorbansi blanko}} \times 100\%$$

Absorbansi blanko = 0,6510

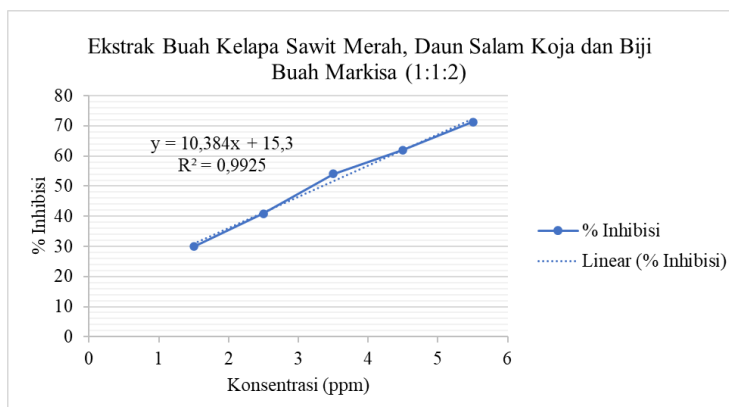
➤ Konsentrasi 1,5 ppm

$$\% \text{ Inhibisi 1,5 ppm} = \frac{0,6510 - 0,456}{0,6510} \times 100\% = 29,9539\%$$

➤ **Perhitungan IC₅₀**

$$IC_{50} = \frac{50 - a}{b}$$

$$IC_{50} = \frac{50 - 15,3}{10,384} = 3,3417 \text{ ppm}$$



➤ **Sampel EBKSM : EDSK : EBBM (1:2:1)**

Abs blanko (A)	Konsentrasi (ppm)	Absorbansi Sampel (A)				% Inhibisi	Persamaan linier	IC ₅₀ (ppm)
		I	II	III	\bar{x}			
0,90094	1,5	0,724	0,722	0,721	0,722	19,8614	y = 14,407x - 3,2367 R ² = 0,9906	3,6952
	2,5	0,638	0,637	0,637	0,637	29,2960		
	3,5	0,463	0,462	0,461	0,462	48,7202		
	4,5	0,335	0,333	0,332	0,333	63,0386		
	5,5	0,227	0,225	0,224	0,225	75,0260		

$$\% \text{ Inhibisi} = \frac{\text{absorbansi blanko} - \text{absorbansi sampel}}{\text{absorbansi blanko}} \times 100\%$$

Absorbansi blanko = 0,90094

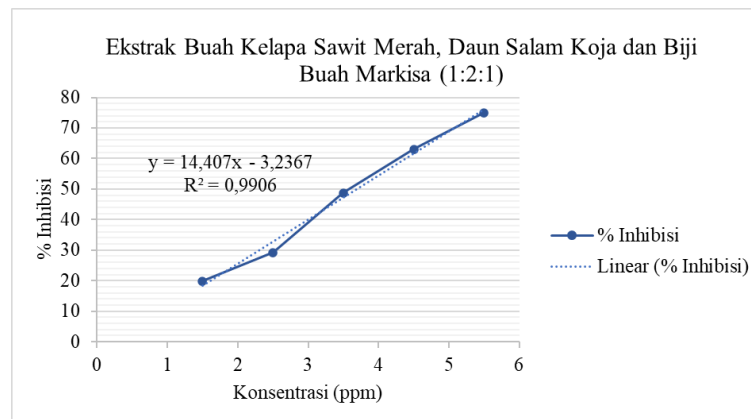
➤ Konsentrasi 1,5

$$\% \text{ Inhibisi } 1,5 \text{ ppm} = \frac{0,90094 - 0,722}{0,90094} \times 100\% = 19,8614\%$$

➤ **Perhitungan IC₅₀**

$$IC_{50} = \frac{50 - a}{b}$$

$$IC_{50} = \frac{50 - 3,2367}{14,407} = 3,6952 \text{ ppm}$$



➤ **Sampel EBKSM : EDSK : EBBM (2:1:1)**

Abs blanko (A)	Konsentrasi (ppm)	Absorbansi Sampel (A)				% Inhibisi	Persamaan linier	IC ₅₀ (ppm)
		I	II	III	\bar{x}			
0,93333	1,5	0,765	0,760	0,759	0,761	18,4639	y = 10,179x + 2,2104 R ² = 0,9942	4,6949
	2,5	0,678	0,674	0,673	0,675	27,6783		
	3,5	0,601	0,599	0,597	0,599	35,8211		
	4,5	0,487	0,485	0,483	0,485	48,0355		
	5,5	0,383	0,381	0,379	0,381	59,1784		

$$\% \text{ Inhibisi} = \frac{\text{absorbansi blanko} - \text{absorbansi sampel}}{\text{absorbansi blanko}} \times 100\%$$

$$\text{Absorbansi blanko} = 0,93333$$

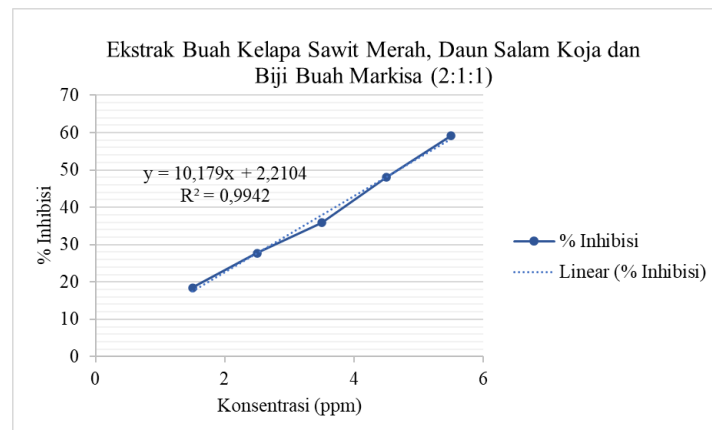
➤ Konsentrasi 1,5 ppm

$$\% \text{ Inhibisi 1,5 ppm} = \frac{0,93333 - 0,761}{0,93333} \times 100\% = 18,4639\%$$

➤ **Perhitungan IC₅₀**

$$IC_{50} = \frac{50 - a}{b}$$

$$IC_{50} = \frac{50 - 2,2104}{10,179} = 4,6949 \text{ ppm}$$



8. Perhitungan Dosis Ekstrak

$$\begin{aligned} \text{Dosis Ekstrak} &= \frac{\text{Nilai } IC_{50} \times \text{volume labu ukur}}{\text{Volume DPPH} \times \text{mol DPPH} \times 0,5} \\ &= \frac{0,0033 \text{ mg} \times 10 \text{ mL}}{1 \text{ mL} \times 1 \text{ mM} \times 0,5} \\ &= 0,066 \text{ mg/mMol} \end{aligned}$$

Lampiran 10. Hasil nilai IC₅₀ dari ketiga kombinasi ekstrak berdasarkan perbedaan perbandingan konsentrasi ekstrak.

➤ **Rata-rata nilai IC₅₀ terhadap perbedaan keempat kombinasi perbandingan ekstrak**

Tests of Between-Subjects Effects

Dependent Variable: Nilai IC50

Source	Type III Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
Corrected Model	7.252 ^a	3	2.417	4747.148	.000
Intercept	217.625	1	217.625	427384.769	.000
KombinasiEkstrak	7.252	3	2.417	4747.148	.000
Error	.004	8	.001		
Total	224.881	12			
Corrected Total	7.256	11			

a. R Squared = ,999 (Adjusted R Squared = ,999)

Hipotesis

H₀ : Setiap kombinasi perbandingan ekstrak memberikan pengaruh yang sama terhadap aktivitas antioksidan pada nilai IC₅₀

H₁ : Terdapat minimal satu kombinasi perbandingan ekstrak yang memberikan pengaruh berbeda terhadap aktivitas antioksidan pada nilai IC₅₀

Taraf nyata yang digunakan = 0,05

Kriteria keputusan :

Tolak H₀ (Terima H₁) jika Sig < α

Tolak H₁ (Terima H₀) jika Sig > α

Kesimpulan :

Berdasarkan hasil uji sidik ragam (ANOVA) didapat nilai signifikansi (Sig.) sebesar 0,000 lebih kecil dari nilai taraf nyata (α) sebesar 0,05 artinya terima H_1 tolak H_0 maka dapat disimpulkan bahwa terdapat minimal satu kombinasi perbandingan ekstrak yang memberikan pengaruh berbeda terhadap aktivitas antioksidan pada nilai IC_{50} , sehingga diperlukan uji lanjut yaitu dengan metode uji lanjut Duncan.

➤ Uji Lanjutan Duncan

Nilai IC_{50}

Duncan^{a,b}

Kombinasi Ekstrak	N	Subset			
		1	2	3	4
EBKSM:EDSK:EBBM (1:1:2)	3	3.341700			
EBKSM:EDSK:EBBM (1:2:1)	3		3.695100		
EBKSM:EDSK:EBBM (2:1:1)	3			4.694900	
EBKSM:EDSK:EBBM (1:1:1)	3				5.286225
Sig.		1.000	1.000	1.000	1.000

Means for groups in homogeneous subsets are displayed.

Based on observed means.

The error term is Mean Square(Error) = ,001.

a. Uses Harmonic Mean Sample Size = 3,000.

b. Alpha = ,05.

Tujuan dilakukannya uji lanjut Duncan untuk melihat perbedaan pengaruh secara jelas yang ditandai dengan nilai subset. Nilai subset yang berbeda menyatakan berbeda nyata sedangkan nilai subset yang sama menyatakan tidak berbeda nyata. Berdasarkan uji lanjut Duncan dapat disimpulkan bahwa dari keempat kombinasi

perbandingan ekstrak memiliki pengaruh yang berbeda nyata karena terdapat pada subset yang berbeda. Pada kombinasi ekstrak dengan perbandingan 1:1:1 memberikan pengaruh yang berbeda nyata tertinggi yaitu data tersebut berada pada subset 4. Sedangkan pada perbandingan ekstrak 1:1:2 dan 1:2:1 memberikan pengaruh yang sama tetapi tidak nyata terhadap rata-rata nilai IC_{50} , karena data tersebut berada pada subset yang berbeda yaitu pada subset 1 dan 2.

Lampiran 11. Perhitungan Dosis Sediaan Uji

➤ Dosis 300 mg/KgBB untuk mencit 28 gram

$$\frac{300 \text{ mg}}{1000 \text{ gram}} = \frac{x}{28 \text{ gram}}$$

$$X = \frac{300 \text{ mg} \times 28 \text{ gram}}{1000 \text{ gram}} = 8,4 \text{ mg} \sim 0,2 \text{ mL}$$

$$\frac{8,4 \text{ mg}}{0,2 \text{ mL}} = \frac{x}{1 \text{ mL}}$$

$X = 42 \text{ mg}/1 \text{ mL} \rightarrow 4,2 \%$ konsentrasi sediaan uji

Volume pemberian = 1 mL x 1 mencit = 1 mL untuk pemberian 1 ekor mencit

Volume sediaan uji yang diberikan yaitu sebanyak 1 mL untuk 1 ekor mencit, maka dibuat larutan stok sebanyak 10 mL yang dilarutkan dengan Na CMC 0,5%

Pembuatan larutan stok sediaan uji 10 mL

$$\frac{42 \text{ mg}}{1 \text{ mL}} = \frac{X}{10 \text{ mL}}$$

$$X = \frac{42 \text{ mg} \times 10 \text{ mL}}{1 \text{ mL}} = 420 \text{ mg ekstrak dalam 10 mL Na CMC}$$

Jadi untuk membuat sediaan 10 mL maka kombinasi formula yang perlu ditimbang yaitu 420 mg, untuk masing-masing ekstrak yang ditimbang adalah sebanyak 140 mg \sim 0,14 gram.

➤ Dosis 2000 mg/KgBB untuk mencit 31 gram

$$\frac{2000 \text{ mg}}{1000 \text{ gram}} = \frac{x}{31 \text{ gram}}$$

$$X = \frac{2000 \text{ mg} \times 31 \text{ gram}}{1000 \text{ gram}} = 62 \text{ mg} \sim 0,2 \text{ mL}$$

$$\frac{62 \text{ mg}}{0,2 \text{ mL}} = \frac{x}{1 \text{ mL}}$$

$X = 310 \text{ mg}/1 \text{ mL} \rightarrow 31 \%$ konsentrasi sediaan uji

- Volume pemberian = 1 mL x 1 mencit = 1 mL untuk pemberian 1 ekor mencit

Volume sediaan uji yang diberikan yaitu sebanyak 1 mL untuk 1 ekor mencit, maka dibuat larutan stok sebanyak 10 mL yang dilarutkan dengan Na CMC 0,5%

- Volume pemberian = 1 mL x 5 mencit = 5 mL untuk pemberian 5 ekor mencit

Volume sediaan uji yang diberikan yaitu sebanyak 5 mL untuk 5 ekor mencit, maka dibuat larutan stok sebanyak 10 mL yang dilarutkan dengan Na CMC 0,5%

Pembuatan larutan stok sediaan uji 10 mL

$$\frac{310 \text{ mg}}{1 \text{ mL}} = \frac{X}{10 \text{ mL}}$$

$$X = \frac{310 \text{ mg} \times 10 \text{ mL}}{1 \text{ mL}} = 3,100 \text{ mg ekstrak dalam 10 mL Na CMC}$$

Jadi untuk membuat sediaan 10 mL maka kombinasi formula yang perlu ditimbang yaitu 3,100 mg, untuk masing-masing ekstrak yang ditimbang adalah sebanyak 1,033 mg ~ 0,001033 gram.

Lampiran 12. Perhitungan CV Hewan Uji

1. Perhitungan CV Sebelum Aklimatisasi

Bobot Mencit (gram)	
30	27
29	29
27	29
29	28

Perhitungan : Jumlah 8 ekor mencit

: Rata-rata (\bar{x}) = 28,5

: SD = 1,06

$$CV = \frac{SD}{\bar{x}} \times 100 \% = \frac{1,06}{28,5} \times 100\% \\ = 3,75 \%$$

2. Perhitungan CV Setelah Aklimatisasi

Bobot Mencit (gram)	
31	32
27	30
31	29
30	30

Perhitungan : Jumlah 8 ekor mencit

: Rata-rata (\bar{x}) = 30

: SD = 1,51

$$CV = \frac{SD}{\bar{x}} \times 100 \% = \frac{1,51}{30} \times 100\% \\ = 5,03 \%$$

Lampiran 13. Gejala Toksisitas Uji Pendahuluan dan Uji Utama

Waktu Pengamatan (Mencit)						
Kontrol Negatif						
Pengamatan	T0'	T30'	T60'	T120'	T240'	T1440'
Laju nafas (/menit)	160	162	151	146	142	150
Motorik	(++)	(++)	(++)	(++)	(+++)	(+++)
Grooming	(-)	(+)	(+)	(-)	(-)	(-)
Letargi	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)
Gelantung	(-)	(-)	(-)	(-)	(++)	(+++)
Straub	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)
Reflek Pineal	(+++)	(+++)	(+++)	(+++)	(+++)	(++)
Reflek Korneal	(+++)	(+++)	(++)	(+++)	(+++)	(++)
Tremor	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)
Kejang	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)
Piloereksi	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)
Ptosis	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)
Lakrimasi	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)
Urinasi	(+)	(-)	(-)	(-)	(+)	(+)
Defekasi	(+)	(+)	(-)	(-)	(+)	(+)
Kematian	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)
Waktu Pengamatan (Mencit)						
Dosis 300 mg/KgBB						
Pengamatan	T0'	T30'	T60'	T120'	T240'	T1440'
Laju nafas (/menit)	162	160	150	145	148	154
Motorik	(++)	(++)	(++)	(++)	(+++)	(+++)
Grooming	(-)	(-)	(+)	(-)	(+)	(-)
Letargi	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)
Gelantung	(-)	(-)	(-)	(-)	(++)	(+++)
Straub	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)
Reflek Pineal	(+++)	(+++)	(++)	(+++)	(+++)	(++)
Reflek Korneal	(+++)	(+++)	(++)	(+++)	(++)	(++)
Tremor	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)
Kejang	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)
Piloereksi	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)
Ptosis	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)
Lakrimasi	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)
Urinasi	(+)	(-)	(-)	(-)	(+)	(+)
Defekasi	(+)	(-)	(-)	(+)	(+)	(+)
Kematian	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)

Waktu Pengamatan (Mencit)						
Dosis 2000 mg/KgBB						
Pengamatan	T0'	T30'	T60'	T120'	T240'	T1440'
Laju nafas (/menit)	165	164	147	145	148	155
Motorik	(-)	(+)	(+)	(++)	(+++)	(+++)
Grooming	(-)	(+)	(+)	(-)	(+)	(-)
Letargi	(+)	(+)	(-)	(-)	(-)	(-)
Gelantung	(-)	(-)	(-)	(-)	(++)	(++)
Straub	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)
Reflek Pineal	(++)	(+++)	(++)	(+++)	(++)	(++)
Reflek Korneal	(+++)	(+++)	(++)	(+++)	(++)	(++)
Tremor	(-)	(+)	(+)	(-)	(-)	(-)
Kejang	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)
Piloereksi	(-)	(+)	(-)	(-)	(-)	(-)
Ptosis	(-)	(-)	(-)	(+)	(-)	(-)
Lakrimasi	(-)	(-)	(+)	(-)	(-)	(-)
Urinasi	(+)	(-)	(-)	(-)	(+)	(+)
Defekasi	(+)	(-)	(-)	(+)	(+)	(+)
Kematian	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)

Keterangan :

T₀-T₁₄₄₀ : waktu 0 menit – 1440 menit, (-) : tidak terjadi, (+) : terjadi, (++) : meningkat sedang, (+++) : meningkat kuat.

Efek yang diamati	Waktu Pengamatan (Hari)													
	Dosis 2000 mg/Kg													
	H1	H2	H3	H4	H5	H6	H7	H8	H9	H10	H11	H12	H13	H14
Aktivitas motorik	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++
Grooming	++	+	+	-	-	-	+	-	-	-	+	+	+	+
Letargi	+	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	+	+	+
Gelantung	++	+++	+++	+++	++	++	++	++	++	+	+	-	-	-
Straub	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Reflek Pineal	+++	+++	++	++	++	+++	+++	+++	++	++	+++	+++	+++	+++
Reflek Korneal	+++	+++	+++	+++	+++	++	++	+++	+++	++	+++	+++	+++	+++
Tremor	++	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Kejang	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Piloereksi	+	-	-	-	-	-	-	-	++	++	+	+	+	+
Ptosis	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	+	++	++
Lakrimasi	+	-	-	+	-	-	+	+	-	-	-	-	-	-

Efek yang diamati	Waktu Pengamatan (Hari)													
	Dosis 2000 mg/Kg													
	H1	H2	H3	H4	H5	H6	H7	H8	H9	H10	H11	H12	H13	H14
Urinasi	++	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Defekasi	++	+	++	+	++	++	+	+	++	++	+	+	++	+
Kematian	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-

Keterangan :

H₁-H₁₄ : Hari ke-1 sampai Hari ke-14, (-) : Tidak terjadi, (+) : Terjadi, (++) : Meningkatkan sedang, (+++) : Meningkatkan kuat.

Lampiran 14. Data Berat Badan Hewan Uji Selama 14 Hari

Jumlah hewan uji	Dosis	Bobot Badan Periodik (gram)														
		0	d1	d2	d3	d4	d5	d6	d7	d8	d9	d10	d11	d12	d13	d14
1	K (-)	31	31	31	31	31	31	32	32	36	35	35	37	36	37	36
1	300	28	28	27	27	27	27	27	29	30	30	30	30	29	31	31
1	2000	31	31	30	32	31	32	31	32	34	34	33	34	33	34	35

Jumlah hewan uji ke	Dosis	Bobot Badan Periodik (gram)														
		0	d1	d2	d3	d4	d5	d6	d7	d8	d9	d10	d11	d12	d13	d14
1	2000	30	31	29	28	28	28	28	28	28	28	29	28	29	31	32
2	2000	33	33	30	32	32	32	32	32	31	31	31	31	32	33	31
3	2000	31	31	30	31	31	31	32	32	31	32	32	32	32	33	33
4	2000	29	30	27	28	26	24	26	23	23	22	21	22	20	19	17
5	2000	31	31	26	26	26	27	29	29	29	28	28	27	29	29	28
Rata-rata		30,8	31,2	28,4	29	28,6	28,4	29,4	28,8	28,4	28,2	28,2	28	28,4	29	28,2
SD		1,48	1,09	1,81	2,44	2,79	3,20	2,60	3,70	3,28	3,89	4,32	3,93	4,92	5,83	6,53

Lampiran 15 . Data Berat Organ Hewan Uji**Uji Pendahuluan****Data Berat Organ Hewan Uji**

Kelompok	Hewan Uji	Berat Organ Mencit (gram)			
		Jantung	Hati	Ginjal	Limpa
Kelompok Negatif	1	0,09	1,50	0,37	0,15
Kelompok Dosis 300 mg/KgBB	1	0,16	1,49	0,32	0,11
Kelompok Dosis 2000 mg/KgBB	1	0,11	1,80	0,40	0,27

Uji Utama Dosis**Data Berat Organ Hewan Uji****2000 mg/KgBB**

Kelompok	Hewan Uji	Berat Organ Mencit (gram)			
		Jantung	Hati	Ginjal	Limpa
Kelompok Dosis 2000 mg/KgBB	1	0,90	2,34	0,43	0,21
	2	0,13	1,98	0,47	0,24
	3	0,10	1,89	0,40	0,28
	4	0,09	1,32	0,28	0,31
	5	0,12	1,72	0,32	0,27
	Rata-rata	0,29	1,85	0,38	0,26
	SD	0,35	0,37	0,08	0,04

Lampiran 16. Data dan Perhitungan Indeks Organ Hewan Uji

Uji Pendahuluan

Indeks Organ Hewan Uji

Kelompok	Hewan Uji	Indeks Organ Mencit (%)			
		Jantung	Hati	Ginjal	Limpa
Kelompok Negatif	1	0,26	4,41	1,08	0,44
Kelompok Dosis 300 mg/KgBB	1	0,53	4,97	1,07	0,36
Kelompok Dosis 2000 mg/KgBB	1	0,33	5,45	1,21	0,81

Uji Utama Dosis

Indeks Organ Hewan Uji

2000 mg/KgBB

Kelompok	Hewan Uji	Indeks Organ Mencit (%)			
		Jantung	Hati	Ginjal	Limpa
Kelompok Dosis 2000 mg/KgBB	1	2,81	7,31	1,34	0,66
	2	0,42	6,39	1,51	0,77
	3	0,31	5,91	1,25	0,87
	4	0,56	8,25	1,75	1,94
	5	0,43	6,14	1,14	0,96
	Rata-rata	0,91	6,80	1,40	1,04
	SD	1,07	0,98	0,24	0,51


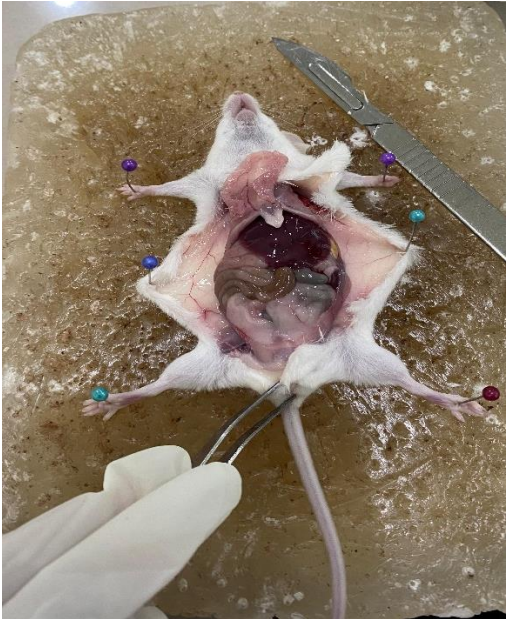
Perhitungan Indeks Organ Mencit


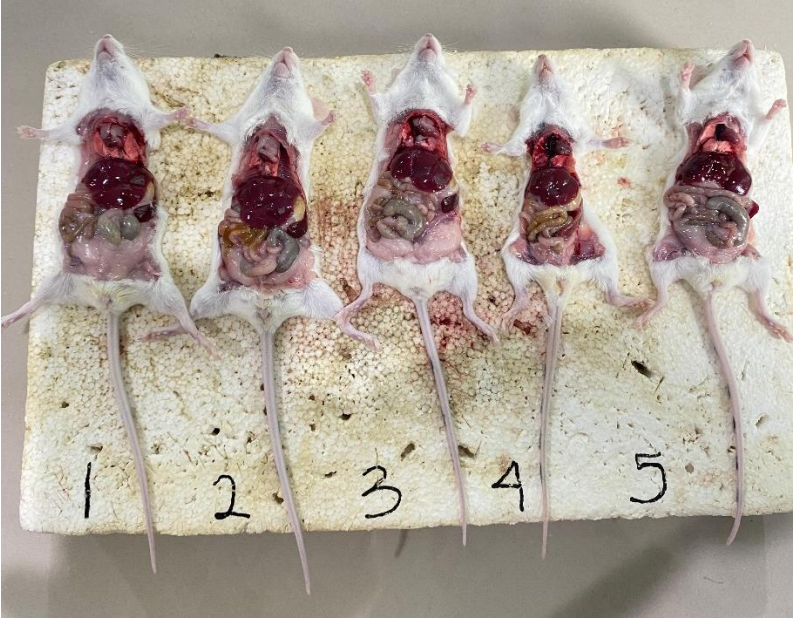
$$\text{Rumus} = \text{Berat organ relatif} = \frac{\text{Berat organ mencit (gram)}}{\text{Berat badan mencit (gram)}} \times 100\%$$

- Uji Pendahuluan
 - Kelompok Kontrol Negatif
 1. Organ jantung

$$\text{Berat organ relatif} = \frac{0,09 \text{ gram}}{34 \text{ gram}} \times 100\% = 0,26\%$$

Lampiran 17. Hasil Pembedahan Hewan Uji

Kelompok	Gambar Anatomi
Kontrol Negatif	 Anatomical dissection of a white rat on a white surface. The rat's abdominal cavity is open, revealing internal organs. Several colored pins (red, purple, blue, yellow, cyan) are used to hold the incision open. A pair of surgical forceps is visible on the right side of the rat.
(Uji Pendahuluan) Dosis 300 mg/KgBB	 Anatomical dissection of a white rat on a brown surface. The rat's abdominal cavity is open, revealing internal organs. Several colored pins (purple, blue, cyan, red) are used to hold the incision open. A pair of surgical forceps is visible at the bottom of the rat, held by a gloved hand.

Kelompok	Gambar Anatomi
(Uji Pendahuluan) Dosis 2000 mg/KgBB	 A photograph showing a mouse being dissected on a white surface. The mouse is pinned down with several colored pins (red, yellow, purple). A person wearing blue gloves is using surgical instruments to open the abdominal cavity. The internal organs, including the liver and intestines, are visible.
(Uji Utama) Dosis 2000 mg/KgBB	 A photograph showing five dissected mice arranged in a row on a white surface. Each mouse is pinned down and labeled with a number from 1 to 5. The abdominal cavities are open, revealing the internal organs. The mice appear to be of similar size and color (white).

Lampiran 18. Dokumentasi Penelitian



Timbangan



Tanur



Desikator



Oven



Lemari asam



Ekstrak yang digunakan



Proses pembuatan larutan



Proses pengerjaan uji antioksidan



Proses pengadukan dengan magnetic stirrer



Larutan sampel



Spektrofotometer



Larutan kombinasi sampel



Proses kadar abu



Na CMC



Proses pemeliharaan kandang



Kandang mencit



Larutan sediaan uji dosis 2000 mg/KgBB



Larutan sediaan uji dosis 300 mg/KgBB



Proses melakukan pembedahan



Proses menyonde mencit



Proses penimbangan hewan uji



Hasil pantauan menggunakan CCTV



Chamber CO₂



Kulkas



Chest Freezer



Proses penimbangan organ hewan uji



Organ-organ hewan uji