

AKTIVITAS ANTIOKSIDAN EKSTRAK ETANOL DAUN PULUTAN (*Urena lobata* L.) DENGAN METODE DPPH (2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl) DAN FRAP (Ferric Reducing Antioxidant Power)

Aufa Nabila Raya, Dian Novita Wulandari, Yudi Purnomo*

*Program Studi Farmasi, Fakultas Kedokteran Universitas Islam Malang

**Pusat Studi Integrasi Kedokteran Islam, Bioinformatika dan Obat Tradisional Indonesia (PSIKIBiOTI)

ABSTRAK

Pendahuluan: Radikal bebas yang berlebihan memicu stres oksidatif yang memegang peranan bagi penyakit degeneratif. Daun pulutan (*Urena lobata* L.) memuat senyawa fitokimia yang brekemungkinan sebagai antioksidan. Riset ini bermaksud untuk menelaah kinerja antioksidan sari etanolik daun pulutan melalui metode DPPH dan FRAP.

Metode: Simplisia daun pulutan disarikan memakai metode maserasi kinetik-suhu. Senyawa senyawa fitokimia pada ekstrak didiagnosis melalui skrining fitokimia. Aktivitas antioksidan diuji dengan metode DPPH dan FRAP, menggunakan asam askorbat dan asam galat sebagai pembanding. Nilai IC_{50} ditentukan melalui persamaan regresi linear, dan perbedaan antar kelompok ditelaah memakai uji *independent t-test*.

Hasil dan Pembahasan: Capaian skrining fitokimia memperlihatkan bahwa sari etanolik daun pulutan memuat senyawa flavonoid, fenol, alkaloid, triterpenoid, dan saponin. Ekstrak tersebut memperlihatkan aksi antioksidan dengan nilai IC_{50} sebesar 55,76 ppm pada metode DPPH (kategori kuat), sedangkan pada metode FRAP nilai IC_{50} jauh lebih tinggi, yaitu 439,36 ppm (kategori sangat lemah). Capaian ini memperlihatkan bahwa aktivitas antioksidan sari etanolik daun pulutan lebih dominan pada metode DPPH dibandingkan metode FRAP.

Simpulan: Sari etanolik daun pulutan memiliki aktivitas antioksidan dan cenderung bekerja lebih dominan melalui mekanisme penangkapan molekul tak berpasangan (*radical scavenging*) dibandingkan mekanisme daya reduksi (*reducing power*).

Kata Kunci: *Urena lobata*, Antioksidan, DPPH, FRAP, IC_{50}

Korespondensi: Yudi Purnomo (yudi.purnomo@unisma.ac.id)

Jl. M.T. Haryono 193, Kota Malang, 65144

ANTIOXIDANT ACTIVITY OF ETHANOL EXTRACTS FROM PULUTAN LEAVES (*Urena lobata* L.) USING THE DPPH (2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl) AND FRAP (Ferric Reducing Antioxidant Power) METHODS

Aufa Nabila Raya, Dian Novita Wulandari, Yudi Purnomo*

*Departement of Pharmacy, Faculty of Medicine, Universitas Islam Malang

**Center for the Integration of Islamic Medicine, Bioinformatics, and Indonesian Tradisional Medicine (CIIMBITM)

ABSTRACT

Background: Excess free radicals induce oxidative stress, aiding in the onset of degenerative diseases. Pulutan leaves (*Urena lobata* L.) contain secondary metabolites with potential antioxidant activity. The goal of this research was to evaluate the antioxidant activity of an ethanol extract of pulutan leaves using the DPPH and FRAP methods.

Methods: Crude extract from pulutan leaves was obtained via kinetic-temperature-assisted maceration. The secondary metabolite profile was determined through qualitative phytochemical screening. To evaluate antioxidant capabilities, DPPH and FRAP assays were employed, referencing both gallic acid and ascorbic acid as standard controls. Linear regression curves were utilized to calculate IC_{50} values, and statistical variations among experimental groups were evaluated using an independent t-test.

Results and Discussion: Phytochemical screening revealed the ethanol extract of pulutan leaves had flavonoids present, phenols, alkaloids, triterpenoids, and saponins. The extract exhibited antioxidant activity with an IC_{50} value of 55.76 ppm in the DPPH assay (classified as strong), whereas in the FRAP assay it showed a markedly higher IC_{50} value of 439.36 ppm (classified as very weak). These findings indicate that the antioxidant activity of the ethanol extract of pulutan leaves was more pronounced in the DPPH assay than in the FRAP assay.

Conclusion: The extract of pulutan leaves in ethanol shows antioxidant properties and appears to act primarily through the radical scavenging mechanism rather than the reducing power mechanism.

Keywords: *Urena lobata*, Antioxidant, DPPH, FRAP, IC_{50}

Corresponding author: Yudi Purnomo (yudi.purnomo@unisma.ac.id)

Jl. M.T. Haryono 193, Kota Malang, 65144

PENDAHULUAN

Molekul yang *unstable* dan fluktuatif akibat keberadaan satu atau lebih elektron tanpa pasangan dikenal sebagai molekul tak berpasangan [1]. Pembentukannya dapat dipicu oleh faktor endogen (seperti metabolisme selular, inflamasi, dan defisiensi nutrisi) maupun faktor eksogen (misalnya polusi, radiasi sinar UV, asap rokok, serta paparan bahan kimia berbahaya) [2]. Di dalam sistem biologis, molekul tak berpasangan umumnya dikelompokkan menjadi *Reactive Oxygen Species* (ROS) dan *Reactive Nitrogen Species* (RNS); akumulasi berlebih dari kedua jenis ini memicu stres oksidatif yang merusak tingkat sel maupun molekul, sehingga meningkatkan risiko penyakit akibat kemunduran fungsi otak seperti diabetes melitus, hipertensi, hingga kanker [3].

Antioksidan berfungsi vital dalam mempertahankan sel dari kerusakan yang dipicu oleh molekul tak berpasangan dengan cara memberikan atom hidrogen pada senyawa radikal sehingga menjadi stabil [4]. Secara klasifikasi, Rustaman et al. (2023) membedakan antioksidan menjadi jenis enzimatis seperti superoksida dismutase, katalase, dan glutathione peroksidase, serta non-enzimatis seperti vitamin C, vitamin E, dan senyawa fenolik [5]. Berdasarkan sumbernya, antioksidan dapat diperoleh secara endogen maupun dari luar tubuh melalui sumber alami seperti sayur-sayuran, buah-buahan, dan rempah-rempah yang kaya akan senyawa flavonoid, tanin, alkaloid, dan fenolik [4].

Pulutan (*Urena lobata* L.) merupakan salah satu tanaman yang secara empiris dipakai untuk pengobatan komplementer berbagai penyakit seperti kolik, malaria, gonore, demam, luka, sakit gigi, dan rematik [6]. Penelitian terdahulu menunjukkan bahwa sari etanolik daun pulutan mempunyai potensi inhibitor oksidasi kategori lemah [7], sementara fraksi etil asetat menunjukkan aktivitas inhibitor oksidasi kategori kuat yang dikendalikan oleh senyawa senyawa fitokimia seperti alkaloid, triterpenoid, flavonoid, dan fenolik [8]. Namun, penelitian sebelumnya hanya menggunakan metode DPPH yang mengevaluasi mekanisme donor hidrogen, sehingga mekanisme kerja inhibitor oksidasi lainnya belum pernah diteliti pada ekstrak daun pulutan.

Pengujian aktivitas inhibitor oksidasi dapat dilakukan dengan berbagai metode yang dibedakan berdasarkan mekanismenya menjadi transfer atom hidrogen (HAT) dan transfer elektron (ET) [9]. Metode DPPH yang termasuk dalam HAT memiliki keunggulan menggunakan radikal yang stabil dan mudah diterapkan, meskipun radikal DPPH hanya larut dalam pelarut organik [10]. Sebaliknya, metode FRAP yang termasuk dalam ET bekerja berdasarkan mekanisme reduksi-oksidasi dan unggul dalam menilai kapasitas reduksi inhibitor

oksidasi secara langsung tanpa memerlukan peralatan khusus, meskipun memiliki stabilitas reagen yang relatif rendah [9]. Penggunaan kedua metode tersebut memungkinkan evaluasi mekanisme kerja inhibitor oksidasi yang berbeda. Dengan demikian, penelitian ini bertujuan mengevaluasi aktivitas inhibitor oksidasi konsentrat daun pulutan (*Urena lobata* L.) dengan prosedur DPPH dan FRAP.

METODE

Desain Penelitian

Riset ini menggunakan jenis riset eksperimental laboratorium untuk mengenal muatan dan aksi inhibitor oksidasi pada ekstrak daun pulutan (*Urena lobata* L.) dengan metode DPPH (2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl) dan FRAP (*Ferric Reducing Antioxidant Power*)

Subyek/Sample Penelitian

Riset ini memakai sampel berupa simplisia daun pulutan (*Urena lobata* L.) sebanyak 50 gram, yang telah dideterminasi di UPT Laboratorium Herbal Materia Medica Batu, Malang, untuk mengonfirmasi identitas spesies tanaman. Sebagai pembandingan, digunakan asam askorbat (vitamin C) pada pengujian metode DPPH dan asam galat pada pengujian metode FRAP. Jumlah replikasi pengujian bervariasi sesuai tahapannya: skrining fitokimia dan pengujian FRAP dilakukan dengan tiga kali replikasi, sedangkan pengujian DPPH dilakukan dengan enam kali replikasi.

Kegiatan Pra Penelitian

Pra penelitian meliputi penyiapan alat dan bahan. Proses ekstraksi menggunakan *waterbath shaker* merek B-ONE dan *rotary vacuum evaporator* merek Heidolph, penimbangan menggunakan neraca analitik merek Ohaus. Pengukuran aktivitas inhibitor oksidasi menggunakan spektrofotometer UV-Vis merek Shimadzu (metode DPPH) dan *microplate reader* merek Biobase EL10C (metode FRAP). Bahan uji berupa simplisia daun pulutan yang telah dideterminasi sebagaimana disebutkan di atas, serta bahan kimia meliputi etanol 70% dan etanol p.a., akuades, HCl pekat, FeCl₃ 1%, serbuk magnesium, pereaksi Mayer, dan pereaksi Buchner untuk skrining fitokimia; serbuk DPPH dan vitamin C untuk pengujian DPPH; serta asam galat, TPTZ, dan buffer asetat untuk pengujian FRAP.

Kegiatan Saat Penelitian

Ekstraksi dilakukan melalui maserasi dengan modifikasi kinetik-suhu: simplisia direndam dalam etanol 70% (perbandingan 1:5), dipanaskan pada suhu 40°C menggunakan *waterbath*, dan diaduk memakai *shaker* pada kecepatan 400 rpm selama 24 jam. Konsentrat difiltrasi dan dikondensasi memakai *rotary vacuum evaporator* pada suhu 40°C. Ekstrak kental yang diperoleh diskriming

fitokimia untuk mengidentifikasi flavonoid, fenol, alkaloid, terpenoid/steroid, dan saponin [11]. Pengujian DPPH dilakukan dengan mereaksikan sampel/standar pada berbagai konsentrasi dengan larutan DPPH 40 ppm, didiamkan 30 menit, dan diukur nilai serapannya pada 515,5 nm [12]. Pengujian FRAP dilakukan dengan mereaksikan sampel/standar dengan reagen FRAP DYE, didiamkan dalam gelap selama 10 menit, dan diukur nilai serapannya pada 492 nm.

Analisa Data

Bagian ini mencantumkan mekanisme pencatatan data % inhibisi (DPPH) dan pembacaan reduksi (FRAP) pada berbagai konsentrasi dicatat dan diplot ke dalam kurva regresi linear ($y = bx + a$) menggunakan Microsoft Excel untuk memperoleh nilai IC_{50} . Data diuji prasyarat normalitas dan homogenitas; jika terpenuhi, dilanjutkan uji parametrik One Way ANOVA, dan jika inkompatibel dipakai uji non-parametrik Kruskal-Wallis. Perbedaan aktivitas inhibitor oksidasi antar sampel dan antar metode diuji dengan *Independent*

t-test menggunakan IBM SPSS Statistics 26 for Windows, dengan taraf signifikansi $p < 0,05$.

HASIL DAN ANALISA DATA

Rendemen Ekstrak Etanol Daun Pulutan

Capaian akhir sari etanolik daun pulutan dihitung dalam bentuk persentase rendemen sebagaimana disajikan pada Tabel 1.

Tabel 1. Persentase Rendemen Ekstrak Etanol Daun Pulutan Metode Maserasi Kinetik-Suhu.

Bobot Simplisia (g)	Bobot Ekstrak (g) ($\bar{x} \pm SD$)	n	% Rendemen ($\bar{x} \pm SD$)
50 gram	9,03 $\pm$ 0,96	3	18,07 $\pm$ 1,92

Identifikasi Metabolit Sekunder Ekstrak Etanol Daun Pulutan

Capaian pengukuran skrining fitokimia memperlihatkan bahwa sari etanolik daun pulutan memuat senyawa flavonoid, fenol, alkaloid, triterpenoid, dan saponin, sebagaimana disajikan pada Tabel 2.

Tabel 2. Pengujian metabolit sekunder ekstrak etanol daun pulutan

Uji Fitokimia	Perubahan warna	Hasil Uji	Pengamat	
			I	II
Flavonoid	Positif jika Warna jingga-merah muda	+	+	+
Fenol	Positif jika Warna lebih gelap dari blanko	+	+	+
Alkaloid	Positif jika adanya endapan	+	+	+
Terpenoid	Triterpenoid: Jingga	+	+	+
	Steroid: Hijau-kuning	-	-	-
Saponin	Positif jika adanya buih	+	+	+

Aktivitas Antioksidan Ekstrak Etanol Daun Pulutan dengan Metode DPPH

Aktivitas inhibitor oksidasi dinyatakan sebagai persentase penangkapan radikal bebas (% inhibisi)

pada berbagai konsentrasi, dengan nilai IC_{50} dihitung melalui persamaan regresi linear $y = 0,6315x + 13,469$ ($r = 0,992$). Nilai % inhibisi dan IC_{50} dituangkan pada Tabel 3.

Tabel 3. Nilai % Inhibisi dan IC_{50} Ekstrak Etanol Daun Pulutan dan Asam Askorbat (Metode DPPH)

Sampel	Konsentrasi (ppm)	n	% Inhibisi ($\bar{x} \pm SD$)	IC_{50} (ppm) ($\bar{x} \pm SD$)	Kategori
Ekstrak Etanol Daun Pulutan	12,5	6	22,66 $\pm$ 7,15	55,76 $\pm$ 2,93	Kuat
	25	6	31,53 $\pm$ 7,08		
	50	6	45,15 $\pm$ 7,37		
	100	6	78,87 $\pm$ 11,07		
Asam Askorbat	5	6	5,32 $\pm$ 1,40	18,16 $\pm$ 1,00	Sangat Kuat
	10	6	20,43 $\pm$ 0,14		
	15	6	40,09 $\pm$ 0,21		
	20	6	56,80 $\pm$ 0,28		
	25	6	73,53 $\pm$ 0,24		

Aktivitas Antioksidan Ekstrak Etanol Daun Pulutan dengan Metode FRAP

Nilai IC_{50} dihitung melalui persamaan regresi linear $y = 0,0976x + 7,3259$ ($r = 0,9972$). Nilai % inhibisi dan IC_{50} dituangkan pada Tabel 4

Tabel 4. Nilai % Inhibisi dan IC₅₀ Ekstrak Etanol Daun Pulutan dan Asam Galat (Metode FRAP)

Sampel	Konsentrasi (ppm)	n	% Inhibisi ($\bar{x} \pm SD$)	IC ₅₀ (ppm) ($\bar{x} \pm SD$)	Kategori
Ekstrak Etanol Daun Pulutan	10,42	3	6,75 $\pm$ 0,07	439,36 $\pm$ 1,89	Lemah
	20,83	3	8,67 $\pm$ 0,18		
	41,67	3	11,78 $\pm$ 0,32		
	83,33	3	17,74 $\pm$ 0,29		
	666,67	3	71,78 $\pm$ 0,34		
Asam Galat	0,13	3	6,20 $\pm$ 0,49	4,83 $\pm$ 0,07	Sangat Kuat
	0,26	3	8,09 $\pm$ 0,16		
	0,52	3	10,97 $\pm$ 0,18		
	1,04	3	16,41 $\pm$ 0,96		
	4,17	3	43,68 $\pm$ 0,49		

Perbandingan Aktivitas Antioksidan Ekstrak Etanol Daun Pulutan Metode DPPH dan FRAP

Aktivitas inhibitor oksidasi sari etanolik daun pulutan yang diperoleh melalui metode DPPH dan FRAP disajikan secara berdampingan pada Tabel 5.

Tabel 5. Perbandingan Aktivitas Antioksidan Ekstrak Etanol Daun Pulutan

Metode Pengujian	n	Nilai IC ₅₀ ($\bar{x} \pm SD$)	Kategori
DPPH (Scavenging)	6	55,76 $\pm$ 2,93	Kuat
FRAP (Reduksi Fe ³⁺)	3	439,36 $\pm$ 1,89	Lemah

Capaian penelaahan mengonfirmasi bahwa nilai IC₅₀ yang didapat melalui metode DPPH lebih rendah ketimbang metode FRAP. Setelah memenuhi asumsi uji prasyarat penelaahan—yaitu data terbukti berdistribusi normal ($p > 0,05$) dan memiliki varians yang homogen ($p > 0,05$)—evaluasi dilanjutkan menggunakan uji parametrik. Capaian pengukuran Independent t-test menghasilkan besaran yang berarti $p < 0,05$, yang membuktikan adanya perbedaan yang berarti secara statistik antara aktivitas inhibitor oksidasi sari etanolik daun pulutan yang diukur menggunakan metode DPPH dibandingkan metode FRAP.

PEMBAHASAN

Rendemen Ekstrak Etanol Daun Pulutan

Perolehan sari etanolik daun pulutan yang didapat pada riset ini (18,07%) jauh lebih tinggi dibandingkan capaian maserasi konvensional tanpa pengadukan dan pemanasan pada penelitian sebelumnya, yang hanya menghasilkan rendemen sebesar 3,241% [7]. Perbedaan ini menunjukkan bahwa penambahan pengadukan dan suhu pada proses maserasi mampu meningkatkan jumlah senyawa yang tertarik ke dalam pelarut. Secara teoritis, pemanasan membantu senyawa metabolit yang sukar larut pada suhu kamar menjadi lebih

larut, sekaligus mempercepat pemecahan dinding sel sehingga proses ekstraksi berlangsung lebih efisien [11]. Di sisi lain, peningkatan kecepatan pengadukan menipiskan lapisan film di sekitar partikel simplisia, sehingga perpindahan zat terlarut (*solute*) dari permukaan padatan ke pelarut menjadi lebih besar, sekaligus mencegah terjadinya supersaturasi di sekitar permukaan padatan dan aglomerasi partikel [11].

Jika dibandingkan dengan penelitian Yusrotul et al (2024) yang menggunakan maserasi kinetik saja (15,1%) dan maserasi suhu saja (19,8%), rendemen pada penelitian ini (18,07%) berada di antara keduanya [13]. Hal ini mengindikasikan bahwa kombinasi pengadukan dan suhu yang digunakan sudah cukup efektif dalam meningkatkan capaian ekstraksi, meskipun besarnya peningkatan tidak selalu identik antar penelitian, perbedaan ini dapat disebabkan oleh variasi jenis sampel, kandungan senyawa awal dalam simplisia, serta karakteristik dinding sel tanaman yang digunakan. Nilai koefisien keragaman (RSD) sebesar 10,6% yang dihitung dari data replikasi menunjukkan bahwa metode ekstraksi yang dipakai memberikan capaian yang tergolong konsisten dan bisa diulang.

Kandungan Metabolit Sekunder

Skrlining fitokimia pada sari etanolik daun pulutan mengonfirmasi keberadaan metabolit sekunder berupa saponin, triterpenoid, alkaloid, fenol, dan flavonoid. Terdeteksinya senyawa-senyawa ini sejalan dengan penggunaan etanol sebagai pelarut polar berdasarkan prinsip like dissolves like, di mana pelarut akan mengekstrak senyawa yang tingkat kepolarannya setara [14]. Kepolaran etanol membuatnya sangat efektif dalam mengisolasi flavonoid dan fenol yang berfungsi sebagai inhibitor oksidasi. Pembentukan warna jingga dalam pengujian flavonoid dipicu oleh reduksi flavonoid oleh Mg²⁺ dan HCl pekat yang menghasilkan kompleks [Mg(OAr)₆]⁴⁺ [15]. Dari sudut pandang teoritis, flavonoid mampu meredam pembentukan ROS dengan menghambat enzim NADPH oksidase serta xantin oksidase, sekaligus

mengkelat logam transisi (Fe^{2+} dan Cu^{2+}) untuk mencegah reaksi redoks yang dapat menghasilkan molekul tak berpasangan [16]. Sementara itu, uji fenol yang menghasilkan warna hijau kehitaman menunjukkan terbentuknya kompleks antara ion Fe^{3+} dan tanin; senyawa fenolik ini secara biologis berpotensi sebagai inhibitor oksidasi melalui kemampuannya mengendapkan protein dan mengkelat logam [14]. Capaian baik pada uji alkaloid dicirikan oleh endapan cokelat dari kompleks kalium-alkaloid—terbentuk melalui substitusi ligan oleh atom nitrogen yang memiliki mitra elektron bebas—dengan aktivitas inhibitor oksidasinya disumbang oleh gugus C-H, N-H, dan O-H yang menangkal ROS. Terakhir, triterpenoid berkontribusi sebagai inhibitor oksidasi melalui pengkelatan logam Fe^{2+} dan Cu^{2+} serta penangkapan spesies reaktif seperti superoksida [15].

Aktivitas Antioksidan Metode DPPH

Berdasarkan pengujian Independent t-test, termuat selisih yang beraarti ($p < 0,05$) pada aktivitas inhibitor oksidasi antara asam askorbat dan sari etanolik daun pulutan saat diuji menggunakan metode DPPH. Capaian tersebut mengonfirmasi bahwa potensi inhibitor oksidasi dari sari etanolik daun pulutan berbeda dari asam askorbat. Ekstrak daun pulutan mencatatkan nilai IC_{50} sebesar 55,76 ppm (kategori kuat), lebih besar dari nilai IC_{50} asam askorbat yang mencapai 18,16 ppm (kategori sangat kuat), sehingga secara statistik kapasitas inhibitor oksidasi asam askorbat terbukti lebih unggul. Keterandalan kedua nilai IC_{50} ini diperkuat oleh nilai koefisien korelasi regresi yang tinggi, yakni $r = 0,99$ untuk ekstrak dan $r = 0,97$ untuk asam askorbat, yang menandakan pertautan linear yang kuat antara konsentrasi sampel dan persentase inhibisinya pada rentang uji [2].

Perbedaan aktivitas ini sejalan dengan karakteristik dasar kedua bahan uji. Asam askorbat merupakan senyawa inhibitor oksidasi tunggal murni dengan empat gugus hidroksil (-OH) yang bisa menyumbangkan atom hidrogen secara maksimal kepada radikal DPPH, sehingga reaksi peredaman radikal berlangsung lebih cepat dan efisien [1]. Sebaliknya, ekstrak merupakan campuran senyawa kompleks yang diduga masih mengandung senyawa pengganggu yang dapat menghalangi proses penetralan radikal DPPH kondisi serupa turut dilaporkan pada penelitian inhibitor oksidasi tumbuhan lain terhadap vitamin C. Pola capaian yang sebanding juga dilaporkan pada penelitian daun pulutan lainnya: fraksi air memiliki IC_{50} sebesar 60,79 ppm (sekitar 25 kali lebih lemah dibandingkan vitamin C dengan IC_{50} 2,48 ppm), sedangkan fraksi n-butanol memperlihatkan IC_{50} sebesar 68,61 ppm dengan klasifikasi solid. Konsistensi temuan ini memperkuat bahwa senyawa aktif pada daun pulutan, meskipun berpotensi sebagai inhibitor oksidasi, secara alami tidak akan

pernah menyamai kekuatan senyawa murni seperti asam askorbat selama masih berada dalam bentuk ekstrak kasar [17]. Meski demikian, nilai IC_{50} ekstrak yang masih tergolong kategori kuat mengindikasikan bahwa kandungan senyawa fenolik dan flavonoid hasil skrining fitokimia tetap memberikan kontribusi nyata terhadap kapasitas penangkapan molekul tak berpasangan DPPH [18, 19].

Pemilihan asam askorbat sebagai pembanding didasarkan kesamaan mekanisme kerja dengan senyawa fenolik dan flavonoid yang diduga termuat dalam konsentrat, yaitu sama-sama meredam radikal DPPH melalui donasi atom hidrogen (*Hydrogen Atom Transfer/HAT*), pembanding ini relevan mengevaluasi potensi ekstrak sebagai agen donor hidrogen [9]. Salah satu keterbatasan metodologis yang perlu dicatat adalah waktu inkubasi 30 menit yang digunakan mengacu pada metode sebelumnya, tanpa dilakukan pengukuran kurva kinetika waktu reaksi secara khusus terhadap ekstrak maupun asam askorbat pada penelitian ini, sehingga belum dapat dipastikan secara empiris apakah durasi tersebut telah merepresentasikan kondisi kesetimbangan reaksi yang optimal bagi kedua sampel.

Aktivitas Antioksidan Metode FRAP

Capaian penelaahaan Independent t-test mengindikasikan selisih yang signifikan ($p < 0,05$) antara kemampuan mereduksi ion ferri pada ekstrak etanol daun pulutan dan asam galat, sehingga H1 pada hipotesis kedua diterima, ekstrak etanol daun pulutan mempunyai aksi inhibitor oksidasi yang berbeda dengan asam galat berdasarkan metode FRAP. Selisih nilai IC_{50} yang sangat besar antara ekstrak (439,36 ppm; kategori sangat lemah) dan asam galat (4,83 ppm; kategori sangat kuat) sekitar 91 kali lipat mengindikasikan bahwa mekanisme reduksi ion ferri kurang optimal dalam mendeteksi aktivitas inhibitor oksidasi ekstrak etanol daun pulutan. Hal ini berkaitan dengan kondisi reaksi FRAP yang berlangsung pada pH rendah (pH 3,6 dengan buffer asetat) [20].

Pada kondisi tersebut, gugus hidroksil pada senyawa flavonoid dan fenolik dalam ekstrak mengalami protonasi, kemampuannya untuk mentransfer elektron maupun atom hidrogen kepada ion Fe^{3+} menjadi berkurang secara signifikan. Berbeda halnya dengan asam galat yang memiliki struktur fenolat sederhana dan stabil, sehingga tetap mampu bereaksi optimal dengan reagen TPTZ- Fe^{3+} meskipun berada pada kondisi pH asam [21, 22]. Pola serupa juga dilaporkan pada penelitian lain aksi inhibitor oksidasi konsentrat etanol kulit biji dan buah bakau (*Xylocarpus granatum*) menunjukkan nilai RP_{50} (setara IC_{50} pada metode FRAP) masing-masing sebesar 4.455,63 ppm dan 15.556,32 ppm, jauh lebih lemah dibanding asam galat dengan RP_{50} sebesar 34,04 ppm [23]. Ini menegaskan bahwa dibandingkan senyawa fenolat standar tunggal,

ekstrak tumbuhan yang berupa campuran senyawa kompleks umumnya menunjukkan aktivitas yang lebih lemah di metode FRAP.

Perbandingan Aktivitas Antioksidan Metode DPPH dan FRAP

Capaian uji *Independent t-test* memperlihatkan perbedaan bermakna ($p < 0,05$) antara aktivitas inhibitor oksidasi ekstrak etanol daun pulutan yang diukur dengan metode DPPH dibandingkan metode FRAP, sehingga H1 pada hipotesis ketiga diterima. Nilai IC_{50} metode DPPH (55,76 ppm) yang jauh lebih kecil dibandingkan metode FRAP (439,36 ppm) membuktikan bahwa ekstrak etanol daun pulutan bekerja dominan melalui mekanisme penangkapan molekul tak berpasangan dibandingkan sebagai reduktor.

Hal ini bersangkutan dengan struktur senyawa yang termuat dalam ekstrak, seperti flavonoid, fenolik, dan tanin, yang secara struktural memiliki gugus -OH fenolik yang sangat optimal untuk mendonasikan atom hidrogen, sehingga lebih kompatibel dengan mekanisme kerja DPPH dibandingkan mekanisme reduksi Fe^{3+} pada FRAP yang berlangsung dalam kondisi pH rendah dan menyebabkan protonasi gugus hidroksil tersebut. Sebagai pembanding, fraksi n-butanol daun pulutan pada riset lain juga memperlihatkan aksi inhibitor oksidasi klasifikasi solid ($IC_{50} = 68,61 \mu g/mL$) menggunakan metode DPPH, yang semakin menegaskan bahwa profil senyawa aktif daun pulutan memang lebih terdeteksi secara optimal oleh metode yang berbasis donasi atom hidrogen dibandingkan metode berbasis transfer elektron [24, 25].

Dapat disimpulkan bahwa perbedaan nilai IC_{50} antara kedua metode terjadi karena adanya kesesuaian antara profil fitokimia ekstrak dengan mekanisme kerja masing-masing metode pengujian. Perlu dicatat bahwa penelitian ini belum melakukan penelaahan kuantitatif kadar flavonoid total dan fenol total, sehingga hubungan antara muatan senyawa bioaktif dengan aksi inhibitor oksidasi ekstrak belum dapat dijelaskan secara lebih mendalam [26]. Penelitian ini juga belum melakukan optimasi waktu inkubasi pada kedua metode, sehingga kondisi pengujian antara metode DPPH dan FRAP masih mengikuti prosedur atau standar yang berbeda.

SIMPULAN

Ekstrak etanol daun pulutan (*Urena lobata* L.) mengandung senyawa metabolit sekunder berupa flavonoid, fenol, alkaloid, triterpenoid, dan saponin. Ekstrak ini terbukti mempunyai aksi inhibitor oksidasi, dengan nilai IC_{50} pada metode DPPH sebesar $55,76 \pm 2,93$ ppm (kategori kuat), namun pada metode FRAP nilai IC_{50} jauh lebih tinggi yaitu $439,36 \pm 1,89$ ppm (kategori sangat lemah). Capaian penelaahan *independent t-test* memperlihatkan

perbedaan yang berarti ($p < 0,05$) antara aktivitas inhibitor oksidasi ekstrak dengan pembanding (asam askorbat dan asam galat), maupun antara metode DPPH dan FRAP itu sendiri. Dengan demikian, bisa disintesis bahwa ekstrak etanol daun pulutan mempunyai aksi inhibitor oksidasi yang bekerja lebih dominan memakai mekanisme penangkapan molekul tak berpasangan (*radical scavenging*) dibandingkan mekanisme daya reduksi ion logam (*reducing power*).

SARAN

1. Bagi risetir berikutnya, perlu dilaksanakan riset lanjutan memakai metode uji antioksidan berbasis transfer elektron lainnya, seperti CUPRAC atau ABTS, untuk memperkuat gambaran profil mekanisme kerja antioksidan daun pulutan secara lebih komprehensif.
2. Peneliti disarankan melakukan fraksinasi lebih lanjut terhadap ekstrak etanol daun pulutan untuk mengidentifikasi golongan senyawa spesifik (misalnya flavonoid atau fenolik) yang paling berkontribusi terhadap aktivitas penangkapan molekul tak berpasangan.
3. Peneliti selanjutnya perlu mengoptimalkan kondisi ekstraksi (suhu, waktu, dan rasio pelarut) agar dapat meningkatkan rendemen dan aktivitas reduksi ion logam (FRAP) yang saat ini masih tergolong lemah.
4. Bagi pemanfaatan praktis, capaian riset ini bisa dijadikan kerangka acuan produk berbasis konsentrat daun pulutan sebagai kandidat antioksidan alami, terutama untuk aplikasi yang mengandalkan mekanisme *radical scavenging*, dengan tetap mempertimbangkan uji keamanan dan efektivitas lebih lanjut sebelum diaplikasikan secara luas.

UCAPAN TERIMA KASIH

Ucapan terimakasih dihaturkan kepada Fakultas Kedokteran Universitas Islam Malang (FK UNISMA) dan Ikatan Orang Tua Mahasiswa (IOM) FK UNISMA yang sudah mendonasi riset dan kepada *peer reviewer* atau kepada orang dan tim yang membantu proses statistik atau proses penelitian khusus yang melibatkan hal khusus namun tidak dapat ditulis sebagai penulis jurnal.

DAFTAR PUSTAKA

- [1] Artati, Widarti, Hasan Z, et al. Aktivitas Antioksidan Dari Tiga Fraksi Pelarut Ekstrak Daun Dandang Gendis(EDDG). *J Media Anal Kesehat* 2024; 12: 56–65.
- [2] Amin S, Meylansyah R, Darmawan M, et al. Uji Aktivitas Antioksidan Umbi Bawang Lanang (*Allium sativum*) Terhadap Radikal Bebas Dpph (1,1-Difenil-2-Pikrihidrazil. *J Kesehat Bakti Tunas Husada J Ilmu-ilmu Keperawatan, Anal Kesehat dan Farm*

- 2025; 13: 216–223.
- [3] Theafelicia Z, Wulan SN. Perbandingan Berbagai Metode Pengujian Aktivitas Antioksidan (DPPH, ABTS dan FRAP) Pada Teh Hitam (*Camellia sinensis*). *J Teknol Pertan* 2023; 24: 35–44.
 - [4] Fadlilah AR, Lestari K. Review: Peran Antioksidan di Dalam Tubuh. *Farmaka J*; 21.
 - [5] Rustaman, Janitra RS, Azzahra AF, et al. Studi Potensi Senyawa Antioksidan dari Kulit Jeruk Nipis (*Citrus Aurantifolia*) secara in Silico. *Chim Nat Acta* 2023; 6: 127–135.
 - [6] Babu SS, Madhuri DB, Ali SL. A pharmacological review of urena lobata plant. *Asian J Pharm Clin Res* 2016; 9: 20–22.
 - [7] Putri HF, Muflihunna A, Razak R. Uji Aktivitas Antioksidan Ekstrak Etanol Daun Pulutan (*Urena lobata* Linn) Asal Kabupaten Barru dengan Menggunakan Metode DPPH. *Makassar Nat Prod J* 2023; 1: 235–245.
 - [8] Endrawati P, Rosidah A, Purnomo Y. Analisis Fenolik Dan Aktivitas Antioksidan Fraksi Etil Asetat Daun Pulutan (*Urena Lobata*). *J Kedokt Komunitas (Journal Community Med)*; 10.
 - [9] Pisoschi AM, Pop A. The role of antioxidants in the chemistry of oxidative stress: A review. *Eur J Med Chem*; 97, 10.1016/j.ejmech.2015.04.040 (2015).
 - [10] Nugraheni TS, Setiawan I, Putri AA, et al. Tinjauan Artikel: Macam-Macam Metode Pengujian Aktivitas Antioksidan Article Various methods for testing antioxidant activity. *J Pharm* 2024; 13: 39–50.
 - [11] Triyanti SB, Lestari FP, Fitriana PAN, et al. Pengaruh Metode Ekstraksi Maserasi, Sonikasi, dan Sokletasi Terhadap Nilai Rendemen Sampel Kulit Buah Naga (*Hylocereus polyrhizus*). *J Sains dan Edukasi Sains* 2025; 8: 71–78.
 - [12] Wulandari DN, Alhabsyie FAM, Saadah FD, et al. Antioxidant Potential of Garlic (*Allium sativum*) Ethanol Extract in Gel Formulation Assessed by DPPH Method. *J Ilmu Farm dan Farm Klin* 2026; 23: 51–60.
 - [13] Fauzah Y, Mirza DM, Purnomo Y. Pengaruh Modifikasi Maserasi Daun Pulutan (*Urena lobata*) Terhadap Jumlah Rendemen Dan Kadar Flavonoid Total. *Bio Komplementer Med* 2024; 11: 1.
 - [14] Saepudin S, Dewi L, Nurmallasari R, et al. Skrining Fitokimia dari Tiga Tanaman Famili Asteraceae dengan Berbagai Pereaksi Kimia. *Parapemikir J Ilm Farm* 2024; 13: 333–347.
 - [15] Fajriaty I, I H H, Andres, et al. Skrining Fitokimia Lapis Titpis Dari Ekstrak Etanol Daun Bintangur (*Calophyllum soulattri* Burm . F .). *J Pendidik Inform dan Sains* 2018; 7: 54–67.
 - [16] Chandimali N, Bak SG, Park EH, et al. Free radicals and their impact on health and antioxidant defenses: a review. *Cell Death Discov*; 11. Epub ahead of print 2025. DOI: 10.1038/s41420-024-02278-8.
 - [17] Arrofiqi MR, Sakti AS, Mayangsari FD. Kajian Literatur: Aplikasi Sejumlah Metode Ekstraksi Konvensional untuk Mengekstraksi Senyawa Fenolik dari Bahan Alam. *J Penelit Farm Herb* 2024; 7: 8–24.
 - [18] Saadah FD, Mirza DM, Wulandari DN. Potensi Antioksidan Fraksi N-Heksana Daun Ubi Jalar Ungu (*Ipomoea batatas* L.). *J Kesehat Islam Islam Heal J* 2024; 13: 55–64.
 - [19] Ramadhan H, Baidah D, Lestari NP, et al. Aktivitas Antioksidan Ekstrak Etanol 96% Daun, Buah dan Kulit Terap (*Artocarpus odoratissimus*) Menggunakan Metode Cuprac. *Farmasains J Ilm Ilmu Kefarmasian* 2020; 7: 7–12.
 - [20] Ahyani IN, Mahbub F, Kanalung ATP, et al. Penetapan Kadar Flavonoid Total Dan Uji Aktivitas Antioksidan Ekstrak Kulit Coklat Dengan Metode DPPH Dan FRAP. *Maj Farm* 2025; 21: 213.
 - [21] Maryam S, Pratama R, Effendi N, et al. Analisis Aktivitas Antioksidan Ekstrak Etanolik Daun Yodium (*Jatropha multifida* L.) Dengan Metode Cupric Ion Reducing Antioxidant Capacity (CUPRAC). *J Fitofarmaka Indones* 2016; 2: 90–93.
 - [22] Fitriani D, Rohama, Darsono PV, et al. Uji Aktivitas Antibakteri Ekstrak Daun Pulutan (*Urena lobata* L) Terhadap Bakteri *Staphylococcus aureus*. *J Surya Med* 2024; 10: 142–148.
 - [23] Yuliawati KM. Pengujian Aktivitas Antioksidan Menggunakan Metode FRAP

dan Penentuan Kadar Fenol Total pada Ekstrak Air Kulit Buah Naga Merah (*Hylocereus polyrhizus*). *J Pharmacopolium* 2022; 5: 205–210.

- [24] Berliansyah SZ, Dewi AR, Purnomo Y. Penentuan Kadar Fenol Total Dan Aktivitas Antioksidan Fraksi N-Butanol Daun Pulutan (*Urena lobata*). 2021; 1–8.
- [25] Ningsih AW, Jihan Fahiroh Nur Arifin, Retno Wulan Devitri, et al. Tinjauan Literatur: Efektivitas Maserasi sebagai Metode Ekstraksi Fitokimia. *OBAT J Ris Ilmu Farm dan Kesehat* 2025; 3: 228–242.
- [26] Duan M, Zhu Z, Pi H, et al. Mechanistic Insights and Analytical Advances in Food Antioxidants: A Comprehensive Review of Molecular Pathways, Detection Technologies, and Nutritional Applications. *Antioxidants*; 14. Epub ahead of print 2025. DOI: 10.3390/antiox14040438.