

**UJI AKTIVITAS ANTIRADIKAL DPPH (*1,1-difenil-2-pikrilhidrazil*) FRAKSI KLOOROFORM, ETIL ASETAT DAN AIR  
DARI HERBA ASHITABA (*Angelica keiskei*)**



Oleh

**NI MADE AYU DINDA PERMATASARI**

**K1A019048**

**PROGRAM STUDI FARMASI  
FAKULTAS KEDOKTERAN  
UNIVERSITAS MATARAM  
MATARAM**

**2023**

**UJI AKTIVITAS ANTIRADIKAL DPPH (1,1-difenil-2-pikrilhidrazil) FRAKSI KLOOROFORM, ETIL ASETAT DAN AIR DARI HERBA ASHITABA (*Angelica keiskei*)**

**ANTI-RADICAL DPPH (1,1-diphenyl-2-picrylhydrazyl) ACTIVITY TEST OF CHLOROFORM, ETHYL ACETATE, AND WATER FACTIONS FROM ASHITABA HERBS (*Angelica keiskei*)**

**N.M.A. Dinda Permatasari, Handa Muliasari, Nisa Isneni Hanifa**

**ABSTRACT**

Acne vulgaris is a chronic inflammation of the skin's pilosebaceous unit, caused by oxidative stress due to reactive oxygen species (ROS) release. Oxidative stress conditions can be treated using natural antioxidants, namely ashitaba (*Angelica keiskei*). In contrast to previous studies that tested column chromatography fraction of the macerated ethanol extract, this study examined the liquid-liquid partition fraction of 80% methanol sonicated extract of Ashitaba herb. This study aims to determine the antiradical activity of various fractions of Ashitaba herb extract against 1,1-diphenyl-2-picrylhydrazyl (DPPH) free radicals. 80% methanol extract of the Ashitaba herb was fractionated using chloroform, ethyl acetate, and water solvents. Each ashitaba herb fraction was identified for the content of flavonoids and phenolic compounds and the antiradical DPPH activity was tested with ascorbic acid standard using a UV-Vis spectrophotometer. The IC<sub>50</sub> value of each fraction was statistically analyzed using One-Way ANOVA and Posthoc Tukey. The results of phytochemical identification showed that ashitaba herb fractions positively contain flavonoids and phenolics. Antiradical activity of the chloroform, ethyl acetate, and water fractions against DPPH was indicated by IC<sub>50</sub> values of 164.22±5.68 ppm (moderate); 8.70±0.12 ppm (very strong); and 243.60±8.14 ppm (weak). Statistically, each ashitaba herb fractions were significantly different from ascorbic acid (IC<sub>50</sub> 2.37±0.05 ppm). The ethyl acetate fraction has the strongest antioxidant activity and is in the same category of antioxidant strength as the ascorbic acid standard.

**Keywords:** *Angelica keiskei*, Antioxidants, DPPH, Flavonoids, Fraction, Phenolics.

**ABSTRAK**

Akne vulgaris merupakan peradangan menahun pada unit pilosebasea kulit yang salah satunya disebabkan oleh stress oksidatif akibat pelepasan reactive oxygen species (ROS). Kondisi stress oksidatif dapat ditangani dengan menggunakan antioksidan alami, yaitu tanaman ashitaba (*Angelica keiskei*). Berbeda dengan penelitian sebelumnya yang menguji hasil fraksinasi kromatografi kolom dari ekstrak maserasi etanol herba ashitaba, penelitian ini menguji hasil fraksinasi partisi cair-cair dari ekstrak sonikasi metanol 80% herba ashitaba. Penelitian ini bertujuan untuk menentukan aktivitas antioksidan dari fraksi kloroform, etil asetat dan air ekstrak herba ashitaba terhadap radikal bebas 1,1-difenil-2-pikrilhidrazil (DPPH). Ekstrak metanol 80% herba ashitaba difraksinasi menggunakan pelarut kloroform, etil asetat dan air. Tiap-tiap fraksi herba ashitaba diidentifikasi kandungan senyawa flavonoid dan fenolik serta

diuji aktivitas penghambatan radikal DPPH dengan standar asam askorbat menggunakan spektrofotometer UV-Vis. Nilai IC50 tiap fraksi dihitung kemudian dianalisis secara statistik menggunakan One-Way ANOVA dengan perangkat lunak Statistical Program for Social Science (SPSS). Hasil identifikasi senyawa menunjukkan fraksi-fraksi herba ashitaba positif mengandung flavonoid dan fenolik. Aktivitas antiradikal DPPH dari fraksi kloroform, etil asetat dan air ditunjukkan dengan nilai IC50 secara berturut-turut sebesar sebesar 164.22±5.68 ppm (sedang); 8.70±0.12 ppm (sangat kuat); dan 243.60±8.14 ppm (lemah). Secara statistika, ketiga fraksi herba ashitaba berbeda signifikan dengan standar asam askorbat (IC50 2,37±0,05 ppm). Fraksi etil asetat memiliki aktivitas antioksidan paling kuat serta berada dalam kategori kekuatan antioksidan yang sama dengan standar asam askorbat.

**Kata kunci:** Angelica keiskei, Antioksidan, DPPH, Fenolik, Flavonoid, Fraksi.

## PENDAHULUAN

Akne vulgaris (AV) merupakan peradangan menahun pada unit pilosebacea kulit (PERDOSKI, 2017). Di Indonesia, khususnya Kota Mataram, Nusa Tenggara Barat, sebanyak 51,2% dari 162 subjek berusia 15-30 tahun menderita AV (Hidajat dkk., 2016). Pada usia pubertas, peningkatan hormon seksual menyebabkan pembesaran kelenjar minyak dan peningkatan produksi minyak pada kulit. Penyumbatan kantong kelenjar membentuk komedo yang menjadi media pertumbuhan bakteri *P. acnes*. Hal ini memicu pelepasan sel darah putih yang melepaskan radikal bebas selama proses eliminasi bakteri. Radikal bebas berinteraksi dengan sel dalam tubuh dan memicu stres oksidatif sehingga memperparah peradangan pada pasien AV (Garem dkk., 2014).

Peningkatan keparahan AV akibat stress oksidatif menyebabkan

penurunan kepercayaan diri dan perubahan perilaku yang berkaitan dengan kecemasan serta depresi (Bowe & Logan, 2010; Hothota dkk., 2016). Sediaan topikal sintetis meliputi antibakteri topikal, retinoid topikal, dan benzoil peroksida menimbulkan efek samping berupa iritasi kulit dan reaksi lokal seperti rasa terbakar, kemerahan serta kulit kering (PIONAS, 2015). Sediaan sintetis di atas dapat digantikan dengan bahan alam yang memiliki aktivitas antibakteri, antioksidan, dan antiinflamasi.

Kondisi stress oksidatif dapat ditangani dengan penggunaan antioksidan alami, salah satunya dari tanaman ashitaba. Pengujian aktivitas antioksidan pada tanaman ashitaba telah dilakukan oleh beberapa studi sebelumnya. Penelitian Srihari & Lingganingrum (2018) membandingkan aktivitas antioksidan ekstrak air daun segar dan kering ashitaba terhadap

radikal bebas DPPH dengan nilai EC50 berturut-turut sebesar 12,75 dan 23,53 ppm. Studi lain juga menyebutkan bahwa ekstrak etanol herba ashitaba memiliki nilai IC50 penangkalan radikal bebas DPPH senilai dengan vitamin E berturut-turut sebesar 19,38 dan 19,54 µg/mL (Haryoto dkk., 2018). Berdasarkan paparan di atas, pembuktian potensi ashitaba sebagai antioksidan masih terbatas pada ekstrak bagian tertentu tanaman. Adapun pengujian aktivitas antioksidan seluruh bagian tanaman (herba) meliputi ekstrak dan fraksi-fraksinya masih terbatas.

Berdasarkan uraian di atas, penelitian ini bertujuan untuk menentukan kandungan flavonoid dan fenolik serta aktivitas penghambatan radikal bebas DPPH dari fraksi kloroform, etil asetat dan air ekstrak metanol 80% herba ashitaba

#### **METODE PENELITIAN**

Alat yang digunakan dalam penelitian ini yaitu alat-alat gelas, ayakan mesh 70, batang pengaduk, blender, chamber, lampu UV 254 dan 366 nm, lemari asam, lemari pendingin, mikropipet, pipet tetes, rak tabung reaksi, rotary evaporator, sonikator,

spektrofotometer UV-Vis, timbangan analitik, dan water bath.

Bahan yang digunakan dalam penelitian ini yaitu aluminium klorida (AlCl<sub>3</sub>) 10% teknis, asam askorbat, asam galat, aquadest, DPPH (1,1-diphenyl-2-picrylhydrazyl), asam sulfat (H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>) pekat, besi (III) klorida (FeCl<sub>3</sub>) 10% teknis, etil asetat p.a, fraksi-fraksi dari ekstrak metanol herba ashitaba, kloroform p.a, kuersetin, metanol p.a, metanol 80% teknis, n-heksana teknis, plat silika gel 60 F254 (Merck), reagen Folin ciocalteu, dan serbuk magnesium (Mg).

#### **PROSEDUR PENELITIAN**

##### **1. Pengambilan Sampel dan Determinasi**

Herba ashitaba sebanyak 8 kg dikoleksi di Desa Sembalun Bumbung, Kecamatan Sembalun, Kabupaten Lombok Timur, NTB. Sampel ashitaba dideterminasi di Laboratorium Program Studi Biologi, Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam, Universitas Mataram.

##### **2. Pembuatan Simplisia**

Herba ashitaba segar yang telah dikoleksi ditimbang, lalu disortasi basah dan dicuci dengan air mengalir sambil

sesekali disikat. Setelah itu, sampel dirajang dan dikeringkan dengan cara dijemur dibawah sinar matahari menggunakan kain hitam. Sampel yang sudah kering kemudian disortasi kering dan dihaluskan dengan blender. Sampel yang telah halus diayak dengan ayakan mesh 70. Selanjutnya sampel disimpan dalam wadah plastik tertutup dan diberi silika gel.

### **3. Pembuatan Ekstrak**

Serbuk simplisia diekstraksi dengan metode sonikasi. Sebanyak 500 g sampel ditimbang dan ditambahkan dengan 5 L pelarut n-heksana (1:10) untuk proses deklorofilasi. Residu yang diperoleh diekstraksi kembali menggunakan metanol 80% untuk mendapatkan ekstrak metanol herba ashitaba. Setelah ekstraksi, filtrat dipisahkan dari residu menggunakan kain mori dan kertas saring. Seluruh kandungan metanol ditarik dari filtrat menggunakan rotary evaporator (40°C), lalu kandungan air diuapkan dengan waterbath (40°C).

### **4. Pembuatan Fraksi**

Ekstrak metanol herba ashitaba difraksinasi menggunakan metode partisi cair-cair dengan pelarut kloroform, etil asetat, dan air. Fraksinasi diawali dengan melarutkan 5 g ekstrak kental dengan 100 mL air suhu 40°C dan ditambahkan dengan 100 mL kloroform, lalu dikocok hingga terbentuk 2 lapisan. Bagian kloroform dan air dipisahkan dan ditampung dalam wadah. Prosedur diulangi sebanyak 2 kali. Bagian direfraksinasi menggunakan pelarut etil asetat dengan prosedur yang sama. Bagian etil asetat dan air dipisahkan dan ditampung dalam wadah. Tiap fraksi disatukan dan diuapkan di atas cawan porselen dalam waterbath.

### **5. Skrining Fitokimia**

#### **a. Identifikasi Flavonoid**

Tiap fraksi sebanyak 50 mg dilarutkan dalam 5 mL metanol. Larutan fraksi selanjutnya ditambahkan 10 tetes H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> pekat dan serbuk magnesium (Mg) secukupnya. Warna merah jingga menandakan adanya senyawa flavon, warna merah tua menandakan

adanya senyawa flavonol dan flavonon serta warna kuning jingga menandakan adanya senyawa kalkon dan auron (Harbone, 1998).

#### **b. Identifikasi Fenolik**

Tiap fraksi sebanyak 50 mg dilarutkan dalam 5 mL metanol. Larutan fraksi selanjutnya ditambahkan 5-8 tetes  $\text{FeCl}_3$  10%. Fraksi dikatakan positif mengandung fenolik jika terbentuk warna hijau, ungu, biru, atau hitam (Harbone, 1998).

### **6. Uji KLT**

Uji KLT diawali dengan aktivasi fase diam silika gel 60 GF<sub>254</sub> ukuran 10x5 cm selama 30 menit pada suhu 110°C dalam oven (Dewi dkk., 2018). Plat KLT teraktivasi diberi garis batas atas dan batas bawah masing-masing 1 cm. Sementara itu, eluen dari campuran pelarut kloroform-metanol-air (8:1:1) (Alawiyah & Senania, 2022) dijenuhkan dalam *chamber* hingga seluruh kertas saring terbasahi. Sampel yang terdiri dari ekstrak, fraksi kloroform, fraksi etil asetat, fraksi air dan standar ditimbang sebanyak 10 mg dan dilarutkan

dengan metanol p.a dalam *ependorf tube*. Kuersetin dan asam galat digunakan sebagai standar untuk uji identifikasi senyawa flavonoid dan fenolik. Sebanyak 10  $\mu\text{L}$  dari masing-masing sampel ditotolkan dengan pipa kapiler pada plat silika gel (Dewi dkk., 2018). Plat kemudian dilusi hingga batas atas. Bercak pada plat diamati di bawah lampu UV 254 dan 366 nm. Plat selanjutnya disemprot dengan penampak noda  $\text{AlCl}_3$  10% pada penentuan senyawa flavonoid dan penampak noda Folin-Ciocalteu pada penentuan senyawa fenolik.

### **7. Uji aktivitas antiradikal DPPH**

#### **a. Pembuatan larutan DPPH (1 mM)**

Sejumlah 19,7 mg serbuk DPPH ditimbang dan dicukupkan volumenya hingga 50 mL dengan metanol p.a. Larutan DPPH 1 mM disimpan dalam wadah tertutup dan diinkubasi pada suhu 40°C selama 30 menit (Utami, 2020).

#### **b. Pembuatan larutan kontrol**

Sejumlah 0,30 mL larutan DPPH 1 mM ditambahkan

dengan metanol p.a hingga 5 mL. Larutan tersebut diinkubasi pada suhu 25 °C selama operating time pada wadah gelap dan kondisi terhindar dari cahaya (Ipandi dkk., 2016).

**c. Pembuatan larutan standar asam askorbat**

Larutan induk 500 ppm dibuat dengan melarutkan 5 mg asam askorbat dengan metanol p.a hingga 10 mL kemudian dikocok hingga homogen (Sari, 2020). Larutan induk asam askorbat dibuat seri konsentrasi sebesar 1 ppm, 1,75 ppm, 2,5 ppm, 3,25 ppm, dan 3,5 ppm. Tiap konsentrasi dicukupkan volumenya dengan metanol p.a hingga 10 mL kemudian dihomogenkan (Utami, 2020).

**d. Pembuatan larutan uji fraksi herba ashitaba**

Larutan induk uji 1000 ppm dibuat dengan menimbang dan melarutkan 25 mg fraksi-fraksi herba ashitaba dalam 25 mL metanol p.a. kemudian dikocok hingga homogen. Fraksi kloroform dibuat seri konsentrasi

sebesar 10, 50, 90, 130, dan 170 ppm. Fraksi etil asetat dibuat seri konsentrasi sebesar 2, 6, 10, 14, dan 18 ppm. Fraksi air dibuat seri konsentrasi sebesar 50, 100, 150, 200, dan 250 ppm. Masing-masing larutan uji dicukupkan volumenya dengan metanol p.a. hingga 10 mL kemudian dihomogenkan (Sari dkk., 2020; Susiloningrum & Sari, 2021).

**e. Penentuan *operating time***

Sejumlah 4,70 mL larutan asam askorbat 1 ppm ditambahkan 0,30 mL larutan DPPH 1 mM. Absorbansi larutan diukur tiap 5 menit selama 1 jam pada panjang gelombang maksimum teoritis 517 nm. Blanko pembacaan dibuat dari 4,70 mL larutan asam askorbat 1 ppm dan 0,30 mL metanol p.a. (Utami, 2020).

**f. Penentuan panjang gelombang maksimum**

Sejumlah 0,30 mL larutan DPPH 1 mM dimasukkan ke dalam labu takar 5 mL, kemudian ditambahkan metanol p.a hingga tanda batas. Larutan diinkubasi

selama operating time dalam kondisi gelap. Absorbansi larutan diukur pada rentang panjang gelombang 400-600 nm terhadap blanko metanol p.a (Ipandi dkk., 2016; Utami, 2020).

**g. Pengukuran absorbansi larutan kontrol**

Absorbansi larutan control dibaca pada panjang gelombang maksimum yang diperoleh terhadap blanko metanol p.a dalam kondisi terhindar cahaya (Sari, 2020).

**h. Pengukuran absorbansi larutan standar dan uji**

Tiap variasi konsentrasi larutan standar dan uji dipipet sebanyak 4,70 mL ke dan ditambahkan 0,30 mL DPPH 1 mM. Larutan tersebut dikocok hingga homogen dan diinkubasi pada suhu 25°C selama *operating time*. Absorbansi larutan standar dan uji diukur pada panjang gelombang maksimum yang diperoleh. Blanko pembacaan dibuat dari 4,70 mL larutan standar dan uji masing-masing konsentrasi

dan 0,30 mL metanol p.a. (Utami, 2020)

**HASIL DAN PEMBAHASAN**

Pengumpulan sampel herba ashitaba dilakukan pada tanggal 23 Juli 2022 pukul 09.32 WITA di Dusun Jorong, Desa Sembalun Bumbung, Kecamatan Sembalun, Kabupaten Lombok Timur. Daerah dengan ketinggian 800-1200 mdpl ini menyediakan kondisi tanah dan udara yang sesuai untuk budidaya ashitaba (Pusat Studi Biofarmaka IPB, 2014). Herba ashitaba paling baik dipanen pada pagi hari setelah embun kering atau sekitar jam 08.00-10.00 pagi (Evans & Davis, 2019). Berdasarkan surat keterangan identifikasi nomor 15/UN18.7/LBL/2022 (lampiran 1), sampel yang digunakan benar adalah ashitaba (*Angelica keiskei*). Dari data berat basah herba sebesar 8,5 kg dan berat kering simplisia simplisia sebesar 1,254 kg, diperoleh rendemen simplisia sebesar 14,75%. Rendemen simplisia yang rendah dapat dipengaruhi oleh kadar air yang tinggi pada tanaman sehingga berat penyusutan yang diperoleh besar.

Pembuatan ekstrak herba ashitaba diawali dengan proses deklorofilasi. Deklorofilasi merupakan salah satu metode



pemurnian ekstrak dari senyawa *ballast* seperti lemak, klorofil dan zat warna dengan menggunakan pelarut non polar untuk menghilangkan zat pengganggu dan mengoptimalkan aktivitas senyawa dalam ekstrak (Nugroho dkk., 2013). Sebanyak 500 g serbuk simplisia dideklorofilasi dengan 5 L pelarut n-heksana (1:10) menggunakan metode sonikasi selama 30 menit pada suhu 40°C. Simplisia herba ashitaba terdeklorofilasi direkstraksi sebanyak 3 kali hingga pelarut n-heksana tidak dapat lagi menarik klorofil. Hal ini ditandai dengan perbedaan tidak signifikan antara warna filtrat terakhir dengan filtrat sebelumnya. Simplisia deklorofilasi diekstraksi menggunakan pelarut metanol 80% (1:10) dengan metode sonikasi selama 3 x 30 menit pada suhu 40°C. Metanol merupakan pelarut universal yang dapat melarutkan senyawa polar dan nonpolar. Hal tersebut berkaitan dengan struktur metanol (CH<sub>3</sub>OH) yang mengandung gugus hidrofil dan lipofil (Wardoyo dkk., 2021). Campuran air dan pelarut organik atau disebut juga pelarut biner dapat meningkatkan efisiensi ekstraksi dibandingkan pelarut absolut (Saifullah dkk., 2020).

Metanol 80% merupakan salah satu pelarut biner yang umum digunakan untuk mengekstraksi senyawa antioksidan alami secara efektif (Anwar dkk., 2010). Dari 463 g simplisia deklorofilasi, diperoleh 94 g ekstrak herba ashitaba dengan rendemen sebesar 20,30%. Ekstrak metanol 80% herba ashitaba difraksinasi menggunakan pelarut kloroform, etil asetat dan air dengan metode partisi cair-cair. Partisi cair-cair merupakan teknik pemisahan senyawa menggunakan dua pelarut yang tidak saling campur dalam corong pisah dimana senyawa akan terdistribusi ke dalam pelarut berdasarkan perbedaan koefisien partisinya (Srivastava dkk., 2021). Penggunaan pelarut dengan tingkat kepolaran berbeda memungkinkan senyawa dalam ekstrak terlarut secara selektif dalam pelarut dengan kepolaran yang sama sesuai prinsip *like dissolve like* (Perveen & Al-Taweel, 2019). Secara organoleptis, fraksi kloroform, etil asetat dan air secara berturut-turut memiliki warna hijau kehitaman, putih kekuningan, dan oranye kecoklatan. Adapun fraksi-fraksi tersebut memiliki aroma harum khas ashitaba dengan tekstur kental dan halus. Dari 5 g ekstrak kental diperoleh berat fraksi kloroform, etil

asetat, dan air kental sebesar 0,484 g, 0,15 g, dan 2,123 g. Sehingga dihasilkan rendemen fraksi kloroform, etil asetat, dan air sebesar 9,68%, 3% dan 42,46%.

Hasil skrining fitokimia pada fraksi-fraksi herba *Ashitaba* menunjukkan tiap fraksi herba *Ashitaba* positif mengandung senyawa flavonoid dan fenolik (Tabel 1).

**Tabel 1.** Hasil skrining fitokimia fraksi-fraksi herba *Ashitaba*

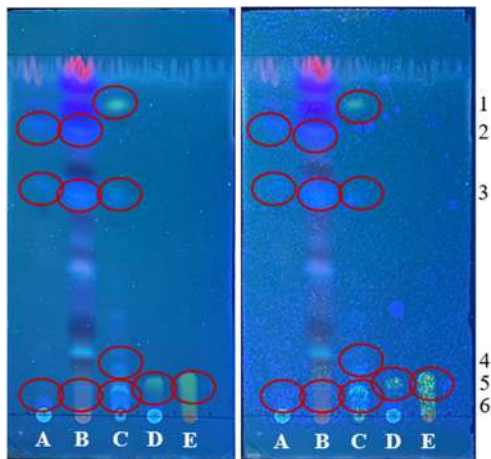
Senyawa	Sampel	Pereaksi	Hasil	Keterangan
Flavonoid	FAK-K	H <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> pekat + serbuk Mg	Hijau kemerahan (+)	Golongan flavonol dan flavonon
	FAK-EA		Merah jingga (+)	Golongan flavon
	FAK-A		Kuning jingga (+)	Golongan kalkon dan auron
Fenolik	FAK-K	FeCl <sub>3</sub> 10%	Hijau kehitaman (+)	Golongan ester/asam fenolat
	FAK-EA		Hitam (+)	Golongan ester/asam fenolat
	FAK-A		Hijau kebiruan (+)	Golongan tannin terkondensasi

Keterangan: (+): Teridentifikasi; (-): Tidak teridentifikasi; FAK-K: Fraksi *Angelica keiskei*-Kloroform; FAK-EA: Fraksi *Angelica keiskei*-Etil asetat; FAK-A: Fraksi *Angelica keiskei*-Air

Skrining fitokimia melalui uji tabung dilnjtkan dengan uji KLT. Identifikasi senyawa flavonoid dengan uji KLT menunjukkan indikasi positif pada seluruh sampel. Bercak berwarna kuning dan biru terlihat setelah proses elusi menggunakan campuran pelarut kloroform : metanol : air (8:1:1) di bawah sinar UV 366 nm (Harbone, 1998). Ekstrak metanol 80% herba *Ashitaba* (A), fraksi kloroform (B),

fraksi etil asetat (C), fraksi air (D), dan standar kuersetin (E) secara berurutan memberikan 3 bercak, 3 bercak, 4 bercak, 1 bercak, dan 1 bercak positif flavonoid (Gambar 1). Penyemprotan bercak dengan penampak bercak AlCl<sub>3</sub> 10% menghasilkan bercak yang berflouresensi kuning lebih jelas. Mekanisme reaksi antara flavonoid dan penampak bercak AlCl<sub>3</sub> didasarkan pada pembentukan

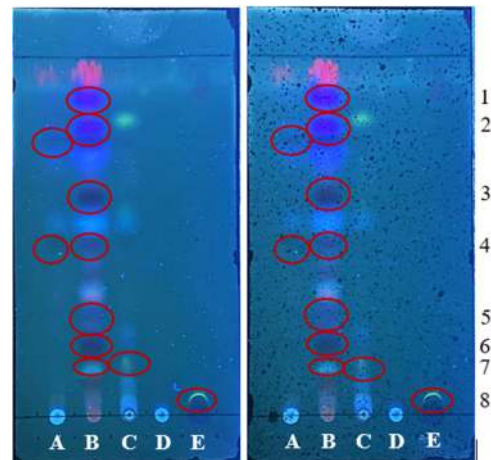
kompleks asam yang stabil antara gugus keto C-4 dan salah satu gugus hidroksil C-3 atau C-5 dari flavon dan flavonol dengan  $AlCl_3$ . Kompleks asam nonstabil juga dapat terbentuk dari interaksi  $AlCl_3$  dan gugus orto-dihidroksil dalam cincin A- atau B-flavonoid (Ahmed & Iqbal, 2018).



**Gambar 1.** Hasil KLT senyawa flavonoid

Senyawa fenolik teridentifikasi dalam sampel ekstrak (A), fraksi kloroform (B) dan fraksi etil asetat (C). Bercak dengan berbagai warna seperti biru, ungu, hitam, dan hijau ditemukan di bawah sinar UV 366 nm setelah proses elusi menggunakan campuran pelarut kloroform : metanol : air (8:1:1) (Harbone, 1998). Fraksi kloroform (B) dan ekstrak metanol herba ashitaba (A) menghasilkan 7 dan 2 bercak,

sedangkan fraksi etil asetat (C) dan standar asam galat (E) hanya menghasilkan 1 bercak positif fenolik (Gambar 2). Penampakan bercak Folin-Ciocalteu memberikan bercak yang berfluoresensi biru lebih jelas. Mekanisme reaksi penampakan bercak Folin-Ciocalteu terjadi melalui proses reduksi asam heteropoli fosfomolibdat-fosfotungstat dalam Folin-Ciocalteu oleh gugus hidroksi fenol menjadi kompleks molibdenum-tungsten berwarna biru (Nofita dkk., 2022). Akibat reaksi tersebut, perubahan warna biru menandakan adanya gugus fenil (Salamah dkk., 2017).



**Gambar 2.** Hasil KLT senyawa fenolik

Aktivitas antiradikal fraksi-fraksi herba ashitaba diuji menggunakan metode penghambatan radikal 2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl (DPPH).

Prinsip pengujian ini didasarkan pada pengukuran kemampuan senyawa antioksidan dalam menghambat radikal DPPH dengan bantuan instrumen Spektrofotometer UV-Vis (Kedare & Singh, 2011). Metode sederhana, cepat, dan akurat ini dapat digunakan untuk menguji antioksidan lipofilik dan hidrofilik. Akibat reaktivitasnya yang rendah, metode DPPH memungkinkan pengukuran senyawa dengan aktivitas antioksidan lemah maupun kuat (Gulcin, 2020; Kedare & Singh, 2011).

*Operating time* (OT) merupakan waktu yang diperlukan senyawa antioksidan untuk bereaksi secara sempurna dengan radikal bebas. Pembacaan absorbansi sampel pada *operating time* akan menjaga kestabilan absorbansi selama proses pengujian (Isnindar & Luliana, 2020). Absorbansi DPPH stabil pada menit ke-30 sampai menit ke-35, sehingga dapat disimpulkan bahwa *operating time* yang digunakan dalam penelitian ini adalah 30 menit. Hal ini sesuai dengan *operating time* yang direkomendasikan oleh Blois (1958) dalam metode awal DPPH. Waktu tersebut digunakan sebagai waktu

inkubasi untuk sampel yang akan diuji.

Panjang gelombang maksimum ditentukan berdasarkan nilai absorbansi terbesar DPPH pada spektrofotometer UV-Vis. Panjang gelombang maksimum akan memberikan serapan paling optimal yang menyebabkan perubahan serapan pada tiap konsentrasi sampel terdeteksi dengan lebih akurat (Lestari dkk., 2020; Nasution dkk., 2015). serapan maksimum DPPH diperoleh pada panjang gelombang 516 nm. Secara teoritis, DPPH mengalami penyerapan maksimum pada panjang gelombang 517 nm. Perbedaan panjang gelombang secara teoritis dengan hasil pengamatan dapat bergeser antara 0-4 nm (Prananta dkk., 2020).

Penentuan aktivitas antiradikal diawali dengan pengukuran larutan kontrol. Pengukuran absorbansi larutan kontrol bertujuan untuk mengetahui absorbansi awal DPPH sebelum penambahan sampel atau standar. Standar asam askorbat diperlukan untuk membuktikan metode yang digunakan dalam menentukan aktivitas antiradikal sampel sudah benar (Julizan dkk., 2019).

**Tabel 2. Aktivitas antiradikal DPPH standar dan fraksi-fraksi herba ashitaba**

Sampel	IC <sub>50</sub> (ppm)			$\bar{X} \pm SD$	CV (%)	Kategori
	Replikasi (R)					
	R <sub>1</sub>	R <sub>2</sub>	R <sub>3</sub>			
AA	2,42	2,31	2,37	2,37 ± 0,06	2,67	Sangat kuat
FAK-K	170,36	159,16	163,15	164,22 ± 5,68	3,46	Sedang
FAK-EA	8,66	8,59	8,83	8,70 ± 0,12	1,43	Sangat kuat
FAK-A	239,44	252,97	238,37	243,60 ± 8,14	3,34	Lemah

**Keterangan:** Asam Askorbat (AA), Fraksi *Angelica keiskei*-Kloroform (FAK-K), Fraksi *Angelica keiskei*-Etil Asetat (FAK-EA), dan Fraksi *Angelica keiskei*-Air (FAK-A)

Aktivitas antiradikal DPPH standar dan fraksi-fraksi herba ashitaba dijabarkan dalam Tabel 2. Standar deviasi yang rendah dari tiap data IC<sub>50</sub> fraksi menunjukkan tingkat akurasi pengukuran yang baik. Begitupula dengan koefisien variasi yang bernilai kurang dari 5% membuktikan tingkat presisi pengukuran yang baik dimana terdapat kesalahan acak dan sistematis yang rendah (Gandjar & Rohman, 2012). Standar dan fraksi etil asetat termasuk dalam kategori antioksidan sangat kuat, sedangkan fraksi kloroform dan air termasuk antioksidan sedang dan lemah.

Fraksi etil asetat memiliki aktivitas penghambatan radikal DPPH paling baik. Haryoto dkk. (2018) membuktikan bahwa fraksi semipolar dari ekstrak etanol 95% herba ashitaba dengan IC<sub>50</sub> sebesar

41,93 ppm memiliki aktivitas antioksidan paling kuat. Fraksi semipolar pada penelitian ini menunjukkan aktivitas antioksidan yang lebih kuat dibandingkan Haryoto dkk. (2018) yang meneliti aktivitas antioksidan dengan sampel yang sama.

Sesuai dengan identifikasi senyawa melalui uji tabung dan uji KLT, ketiga fraksi dari ekstrak metanol 80% herba ashitaba mengandung senyawa flavonoid dan fenolik. Senyawa flavonoid dan fenolik diduga merupakan senyawa yang berperan dalam aktivitas antioksidan. Li dkk. (2009) menguji korelasi antara aktivitas antioksidan dengan kandungan senyawa fenolik dalam ekstrak-ekstrak akar *Angelica sinensis* dan memperoleh nilai koefisien korelasi rata-rata sebesar 0,839. Koefisien korelasi yang

mendekati 1 menunjukkan korelasi positif peran senyawa fenolik dalam aktivitas antioksidan.

Berdasarkan paparan di atas, metabolit sekunder golongan fenolik seperti flavonoid dan polifenol berperan dalam menghambat radikal bebas. Senyawa fenolik (ArOH) dengan satu atau lebih gugus hidroksil (OH) yang terikat pada cincin benzena mampu memecah rantai ikatan pada radikal bebas. Senyawa tersebut memiliki dua jenis mekanisme penghambatan radikal bebas yaitu *Hydrogen Atom Transfer* (HAT) dan *Single-Electron Transfer* (SET). Mekanisme HAT terjadi ketika senyawa fenolik (ArOH) mendonorkan atom hidrogennya pada radikal bebas dan membentuk radikal fenolik (ArO<sup>•</sup>) yang stabil sehingga proses oksidasi dapat terhenti. Berbeda dengan HAT, mekanisme SET menjelaskan bahwa radikal bebas menjadi aseptor elektron tunggal dari senyawa fenolik (ArOH) dan menghentikan reaksi oksidasi berantai dengan mereduksi intermediet teroksidasi menjadi bentuk stabil (Tukiran dkk., 2018).

Dari uji *One-Way ANOVA*, diketahui bahwa terdapat setidaknya satu kelompok uji yang

berbeda signifikan dari kelompok uji lainnya terlihat dari nilai signifikansi 0,00 ( $p < 0,05$ ). Uji tersebut kemudian dilanjutkan dengan uji *Post-hoc Tukey* (Shankar, 2009). Uji *Post-hoc Tukey* membuktikan bahwa fraksi kloroform, etil asetat dan air berbeda signifikan dengan standar asam askorbat (sig. 0,00  $p < 0,05$ ). Dari analisis data tersebut dapat disimpulkan bahwa tiap fraksi herba ashitaba memiliki aktivitas antiradikal dengan tingkat berbeda. Fraksi etil asetat memiliki aktivitas antiradikal DPPH paling kuat dibandingkan fraksi-fraksi lainnya. Secara statistik, tidak ada fraksi uji yang memiliki aktivitas antioksidan setara dengan standar asam askorbat. Namun, fraksi etil asetat memiliki nilai  $IC_{50}$  mendekati standar asam askorbat dan berada dalam kategori kekuatan antioksidan yang sama.

## **KESIMPULAN**

Berdasarkan penelitian yang telah dilakukan, maka dapat disimpulkan bahwa fraksi kloroform, etil asetat dan air ekstrak metanol 80% herba ashitaba mengandung metabolit sekunder flavonoid dan fenolik dan aktivitas antioksidan terhadap radikal DPPH. Fraksi etil asetat memiliki aktivitas antioksidan paling kuat dibandingkan fraksi lainnya

dan berada dalam kategori kekuatan antioksidan yang sama dengan standar asam askorbat.

#### **DAFTAR PUSTAKA**

- Hidajat, D., Hidayati, A. R., & Cenderadewi, M. (2016). Karakteristik Pengetahuan dan Persepsi Penderita Akne Vulgaris di Kota Mataram. *Jurnal Kedokteran Unram*, 5(4), 4–10.
- PERDOSKI. (2017). *Panduan Praktik Klinis Bagi Dokter Spesialis Kulit dan Kelamin di Indonesia*. Perhimpunan Dokter Spesialis Kulit dan Kelamin Indonesia.
- PIONAS. (2015). *Sediaan Topikal untuk Akne*. Pusat Informasi Obat Nasional. <https://pionas.pom.go.id/ioni/bab-13-kulit/136-akne-dan-rosasea/1361-sediaan-topikal-untuk-akne>
- Bowe, W. P., & Logan, A. C. (2010). Clinical Implications of Lipid Peroxidation in Acne Vulgaris: Old Wine in New Bottles. *Lipids in Health and Disease*, 9(1), 141. <https://doi.org/10.1186/1476-511X-9-141>
- Garem, Y. F. El, Ahmed, R. A. M., Ragab, M. A., & AbouZeid, A. A. (2014). Study of Oxidative Stress in Different Clinical Severities of Acne Vulgaris. *Egyptian Journal of Dermatology and Venerology*, 34(1), 53. <https://doi.org/10.4103/1110-6530.137313>
- Haryoto, Fitriana, Y., Anggraini, D. A. R. L., & Khong, H. Y. (2018). Antioxidant and Inhibition of  $\alpha$ -Glucosidase Enzyme Activity of Extract and Their Fractions of Ashitaba (*Angelica keiskei*). *Medicinal Plants - International Journal of Phytomedicines and Related Industries*, 10(3). [https://www.researchgate.net/publication/327489275\\_Antioxidant\\_and\\_inhibition\\_of\\_alpha-glucosidase\\_enzyme\\_activity\\_of\\_extract\\_and\\_their\\_fractions\\_of\\_Ashitaba\\_Angelica\\_keiskei](https://www.researchgate.net/publication/327489275_Antioxidant_and_inhibition_of_alpha-glucosidase_enzyme_activity_of_extract_and_their_fractions_of_Ashitaba_Angelica_keiskei)
- Harbone, J. B. (1998). *Phytochemical Methods: A Guide to Modern Techniques of Plant Analysis* (3rd ed.). Chapman & Hall.
- Hosthota, A., Bondade, S., & Basavaraja, V. (2016). Impact of Acne Vulgaris on Quality of Life and Self-esteem. *Cutis*, 98(2), 121–124.
- Srihari, E., & Lingganingrum, F. S. (2018). Teh Hijau dari Daun Ashitaba: Aktifitas Antioksidan dan Mutusensori. *Prosiding*

- Seminar Nasional Teknik Kimia "Kejuangan" Pengembangan Teknologi Kimia untuk Pengolahan Sumber Daya Alam Indonesia*, 1(1), 1–6.
- Dewi, N. L. A., Adnyani, L. P. S., Pratama, R. B. R., Yanti, N. N. D., Manibuy, J. I., & Warditiani, N. K. (2018). Pemisahan, Isolasi, dan Identifikasi Senyawa Saponin dari Herba Pegagan (*Centella asiatica* L. Urban). *Jurnal Farmasi Udayana*, 7(2), 68–76.
- Alawiyah, A. L., & Senania, A. (2022). Antioxidant Activity and Bioactive Compounds of Ethyl Acetate Fractions from *Syzygium cumini* Wood Stem. *ALKIMIA: Jurnal Ilmu Kimia dan Terapan*, 5(1), 93–101. <https://doi.org/10.19109/alkimia.v5i1.7143>
- Utami, S. B. (2020). *Aktivitas Penghambatan Radikal Bebas dari Rebusan Daun Rengas (Amomum dealbatum Roxb.) Menggunakan Metode DPPH* [Skripsi]. Universitas Mataram.
- Susiloningrum, D., & Sari, D. E. M. (2021). Uji Aktivitas Antioksidan dan Penetapan Kadar Flavonoid Total Ekstrak Temu Mangga (*Curcuma mangga* Valetton & Zijp) dengan Variasi Konsentrasi Pelarut. *Cendekia Journal of Pharmacy*, 5(2), 117–127.
- Sari, L. P. I. P. (2020). *Optimasi Pelarut untuk Ekstraksi Daun Nagasari (Mesua ferrea L.) sebagai Anti Radikal Bebas dengan Metode Simplex Lattice Design* [Skripsi]. Universitas Mataram.
- Ipandi, I., Triyasmono, L., & Prayitno, B. (2016). Penentuan Kadar Flavonoid Total dan Aktivitas Antioksidan Ekstrak Etanol Daun Kajajahi (*Leucosyke capitellata* Wedd.). *Jurnal Pharmascience*, 3(1), 93–100.
- Evans, E., & Davis, J. (2019). *Harvesting Herbs Harvesting and Preserving Herbs for the Home Gardener*. <https://content.ces.ncsu.edu/harvesting-and-preserving-herbs-for-the-home-gardener#:~:text=Harvest>
- Pusat Studi Biofarmaka IPB. (2014). *Sehat Alami dengan Herbal: 250 Tanaman Berkhasiat Obat*. PT. Gramedia Pustaka Utama.
- Nugroho, A. E., Malik, A., & Pramono, S. (2013). Total Phenolic and Flavonoid Contents, and In Vitro



- Antihypertension Activity of Purified Extract of Indonesian Cashew Leaves (*Anacardium occidentale* L.). *International Food Research Journal*, 20(1), 299–305.
- Saifullah, M., McCullum, R., McCluskey, A., & Vuong, Q. (2020). Comparison of Conventional Extraction Technique with Ultrasound Assisted Extraction on Recovery of Phenolic Compounds from Lemon Scented Tea Tree (*Leptospermum petersonii*) Leaves. *Heliyon*, 6(4), 1–12. <https://doi.org/10.1016/j.heliyon.2020.e03666>
- Wardoyo, E. R. P., Hildayati, U., Rachmawati, & Kurniatuhadi, R. (2021). Phytochemical Analysis and Antifungi Activity of Methanol Extract of *Acalypha hispida* Burm. F. Flower Against to *Candida albicans* (Y116). *Journal of Physics: Conference Series*, 1940(1), 1–7. <https://doi.org/10.1088/1742-6596/1940/1/012056>
- Srivastava, A. K., Kannaujiya, V. K., Singh, R. K., & Singh, D. (2021). *Evolutionary Diversity as a Source for Anticancer Molecules*. Elsevier.
- Perveen, S., & Al-Taweel, A. (2019). *Pharmacognosy: Medicinal Plants*. IntechOpen.
- Ahmed, F., & Iqbal, M. (2018). Antioxidant activity of Ricinus Communis. *Organic & Medicinal Chemistry International Journal*, 5(3), 1–6. <https://doi.org/10.19080/omci.j.2018.05.555667>
- Anwar, F., Qayyum, H. M. A., Hussain, A. I., & Iqbal, S. (2010). Antioxidant Activity of 100% and 80% Methanol Extracts from Barley Seeds (*Hordeum vulgare* L.): Stabilization of Sunflower Oil. *Grasas y Aceites*, 61(3), 237–243. <https://doi.org/10.3989/gya.087409>
- Nofita, S. D., Ngibad, K., & Rodli, A. F. (2022). Determination of Percentage yield and Total Phenolic Content of Ethanol Extract from Purple Passion (*Passiflora edulis* f. *edulis* Sims) Fruit Peel. *Jurnal Pijar Mipa*, 17(3), 309–313. <https://doi.org/10.29303/jpm.v17i3.3461>
- Salamah, N., Ahda, M., Bimantara, S., & Hanar, R. (2017). Total Phenolic Content and In Vitro Evaluation of Antioxidant

- Activity of Ethanol Extract of Ganoderma amboinense. *National Journal of Physiology, Pharmacy and Pharmacology*, 8(1), 97–101. <https://doi.org/10.5455/njppp.2018.8.0518614102017>
- Kedare, S. B., & Singh, R. P. (2011). Genesis and Development of DPPH Method of Antioxidant Assay. *Journal of Food Science and Technology*, 48(4), 412–422. <https://doi.org/10.1007/s13197-011-0251-1>
- Isnindar, I., & Luliana, S. (2020). Synergism of Antioxidant Activity Combination of Buas-Buas (*Premnaserratifolia* Linn.), Meniran (*Phyllanthusniruri* L.), Secang (*Caesalpiniasappan*) and Roselle (*Hibiscus sabdarifa*) Extracts. *Traditional Medicine Journal*, 25(3), 140–145. <https://doi.org/10.22146/mot.51328>
- Gulcin, İ. (2020). Antioxidants and Antioxidant Methods: an Updated Overview. *Archives of Toxicology*, 94(3), 651–715. <https://doi.org/10.1007/s00204-020-02689-3>
- Blois, M. S. (1958). Antioxidant Determinations by The Use of A Stable Free Radical. *Nature*, 4617(1), 1–2.
- Lestari, Y. D., Permatasari, S., & Oktasari, &ade. (2020). Antioxidant Activity Testing of Extract Kweni Peel (*Mangifera odorata* Griff). *Indonesian Journal of Chemistry and Environment*, 3(2), 11–20.
- Nasution, P. A., Batubara, R., & Surjanto, S. (2015). Tingkat Kekuatan Antioksidan dan Kesukaan Masyarakat terhadap Teh Daun Gaharu (*Aquilaria Malaccensis* Lamk) Berdasarkan Pohon Induksi dan Non-Induksi. *Peronema Forestry Science Journal*, 4(1), 1–12.
- Prananta, Y. E., Rakhman, K. A., & Saleh, J. (2020). Antioxidant Activities of Red Jabon (*Anthocephalus macrophyllus*) Ethanol Extract. *IOP Conference Series: Earth and Environmental Science*, 415(1), 1–8. <https://doi.org/10.1088/1755-1315/415/1/012026>
- Julizan, N., Maemunah, S., Dwiyantri, D., & Al Anshori, J. (2019). Validasi Penentuan Aktifitas Antioksidan dengan Metode DPPH. *KANDAGA*, 1(1), 41–45.

Gandjar, I. G., & Rohman, A. (2012). *Kimia Farmasi Analisis* (2nd ed.). Pustaka Pelajar.

Li, X., Wu, X., & Huang, L. (2009). Correlation Between Antioxidant Activities and Phenolic Contents of Radix Angelicae Sinensis (Danggui). *Molecules*, 14(12), 5349–5361. <https://doi.org/10.3390/molecules14125349>

Shankar, R. (2009). *Process Improvement Using Six Sigma: A DMAIC Guide*. Quality Press.

Tukiran, Wardana, A. P., Hidayati, N., & Shimizu, K. (2018). An Ellagic Acid Derivative and Its Antioxidant Activity of Chloroform Extract of Stem Bark of *Syzygium polycephalum* Miq. (Myrtaceae). *Indonesian Journal of Chemistry*, 18(1), 26–34. <https://doi.org/10.22146/ijc.25467>