

**KAJIAN EKSTRAK KULIT TANAMAN HUJAN EMAS (*Senna multijuga*)
SEBAGAI *INGREDIENT* PANGAN FUNGSIONAL ANTIOKSIDAN**

(Skripsi)

Oleh

**Ocha Maharani
2114051013**



**JURUSAN TEKNOLOGI HASIL PERTANIAN
FAKULTAS PERTANIAN
UNIVERSITAS LAMPUNG
BANDAR LAMPUNG
2025**

ABSTRACT

STUDY OF GOLDEN RAIN PLANT (*Senna multijuga*) BARK EXTRACT AS AN ANTIOXIDANT FUNCTIONAL FOOD INGREDIENT

By

OCHA MAHARANI

The golden rain plant (*Senna multijuga*) contains antioxidant compounds found in its bark. Antioxidant compounds have physiological benefits, such as counteracting free radicals and preventing degenerative diseases. The way to obtain antioxidant compounds is by consuming functional foods. This study aims to determine the physical characteristics and antioxidant activity of the fraction resulting from chromatographic column elution of golden rain skin extract as a functional food ingredient. The research was conducted using descriptive method with 3 replicates in the testing process. Tests in the study consisted of the extraction and isolation process of golden rain skin, as well as antioxidant activity tests with DPPH (2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl) and FRAP (Ferric Reducing Antioxidant Power) methods. The results obtained from the study were the characteristics of the color of the solution and the shape of the fraction groups from different chromatographic columns, namely Fr1 yellow and amorphous solids, Fr2 concentrated yellow and concentrated extract, Fr3 dark brown and thick liquid, Fr4 green and liquid, and Fr5 concentrated green and thick liquid. Antioxidant activity testing with DPPH method obtained the percent inhibition value of the five fraction groups which ranged from 52.52-69.26%. The best fraction (fraction-1) tested with DPPH method obtained IC₅₀ value of 11.521 mg/L and testing with FRAP method obtained IC₅₀ value of 10.749 mg/L. The antioxidant activity of chromatography column fraction of chloroform extract of golden rain skin is categorized as very strong antioxidant.

Keywords: Antioxidant activity, extraction, golden rain, functional food

ABSTRAK

KAJIAN EKSTRAK KULIT TANAMAN HUJAN EMAS (*Senna multijuga*) SEBAGAI *INGREDIENT* PANGAN FUNGSIONAL ANTIOKSIDAN

Oleh

OCHA MAHARANI

Tanaman hujan emas (*Senna multijuga*) mengandung senyawa antioksidan yang terdapat pada bagian kulitnya. Senyawa antioksidan memiliki manfaat fisiologis, seperti menangkal radikal bebas dan mencegah penyakit degeneratif. Cara memperoleh senyawa antioksidan adalah dengan mengonsumsi pangan fungsional. Penelitian bertujuan untuk mengetahui karakteristik fisik dan aktivitas antioksidan fraksi hasil elusi kolom kromatografi ekstrak kulit hujan emas sebagai *ingredient* pangan fungsional. Penelitian dilakukan dengan metode deskriptif 3 kali ulangan dalam proses pengujiannya. Pengujian dalam penelitian terdiri dari proses ekstraksi dan isolasi kulit hujan emas, serta uji aktivitas antioksidan dengan metode DPPH (2,2-difenil-1-pikrilhidrazil) dan metode FRAP (*Ferric Reducing Antioxidant Power*). Hasil yang diperoleh dari penelitian berupa karaktersistik warna larutan dan bentuk kelompok fraksi hasil kolom kromatografi yang berbeda-beda yaitu Fr1 berwarna kuning dan berbentuk padatan amorf, Fr2 berwarna kuning pekat dan berbentuk ekstrak pekat, Fr3 berwarna cokelat gelap dan berbentuk cairan kental, Fr4 berwarna hijau dan berbentuk cairan, serta Fr5 berwarna hijau pekat dan berbentuk cairan kental. Pengujian aktivitas antioksidan dengan metode DPPH diperoleh nilai persen inhibisi dari kelima kelompok fraksi yaitu berkisar antara 52,52-69,26%. Fraksi terbaik (fraksi-1) yang dilakukan pengujian dengan metode DPPH memperoleh nilai IC₅₀ sebesar 11,521 mg/L dan pengujian dengan metode FRAP memperoleh nilai IC₅₀ sebesar 10,749 mg/L. Aktivitas antioksidan fraksi kolom kromatografi ekstrak kloroform kulit hujan emas tersebut dikategorikan dalam antioksidan sangat kuat.

Kata kunci: Aktivitas antioksidan, ekstraksi, hujan emas, pangan fungsional

**KAJIAN EKSTRAK KULIT TANAMAN HUJAN EMAS (*Senna multijuga*)
SEBAGAI *INGREDIENT* PANGAN FUNGSIONAL ANTIOKSIDAN**

Oleh

OCHA MAHARANI

Skripsi

Sebagai Salah Satu Syarat untuk Mencapai Gelar
SARJANA TEKNOLOGI PERTANIAN

Pada

**Jurusan Teknologi Hasil Pertanian
Fakultas Pertanian Universitas Lampung**



**FAKULTAS PERTANIAN
UNIVERSITAS LAMPUNG
BANDAR LAMPUNG
2025**

Judul Skripsi : **KAJIAN EKSTRAK KULIT TANAMAN
HUJAN EMAS (*Senna multijuga*)
SEBAGAI INGREDIENT PANGAN
FUNGSIONAL ANTIOKSIDAN**

Nama : **Ocha Maharani**

Nomor Pokok Mahasiswa : **2114051013**

Program Studi : **Teknologi Hasil Pertanian**

Fakultas : **Pertanian**



Dr. Ir. Subeki, M.Si., M.Sc.
NIP. 19680409 199303 1 002

Prof. Dr. Ir. Samsul Rizal, M.Si.
NIP. 19690225 199403 1 002

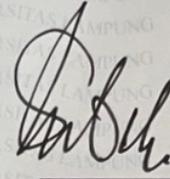
2. Ketua Jurusan Teknologi Hasil Pertanian

Dr. Erdi Suroso, S.T.P., M.T.A.
NIP. 19741006 199803 1 005

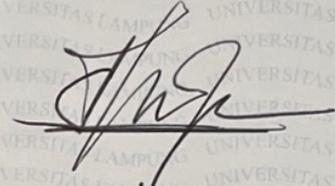
MENGESAHKAN

1. Tim Penguji

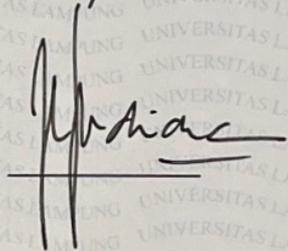
Ketua : Dr. Ir. Subeki, M.Si., M.Sc.



Sekretaris : Prof. Dr. Ir. Samsul Rizal, M.Si.



**Penguji
Bukan Pembimbing : Dr. Novita Herdiana, S.Pi., M.Si.**



2. Dekan Fakultas Pertanian



Dr. N. Kuswanita Futas Hidayat, M.P.
NIP. 19641118 198902 1 002

Tanggal Lulus Ujian Skripsi: 15 Mei 2025

PERNYATAAN KEASLIAN HASIL KARYA

Saya yang bertanda tangan di bawah ini:

Nama : Ocha Maharani

NPM : 2114051013

Dengan ini menyatakan bahwa apa yang tertulis dalam karya ilmiah ini adalah hasil kerja saya sendiri berdasarkan pada pengetahuan dan informasi yang telah saya dapatkan. Karya ilmiah ini tidak berisi material yang telah dipublikasikan sebelumnya atau dengan kata lain bukan hasil dari plagiat karya orang lain.

Demikianlah pernyataan ini saya buat dan dapat dipertanggungjawabkan. Apabila terdapat kecurangan dikemudian hari dalam karya ini, maka saya siap mempertanggungjawabkannya.

Bandar Lampung, 01 Mei 2025
Pembuat Pernyataan



Ocha Maharani
NPM. 2114051013

RIWAYAT HIDUP



Penulis dilahirkan di Desa Rajabasa Lama , Kecamatan Labuhan Ratu, Kabupaten Lampung Timur, Provinsi Lampung, pada tanggal 17 Juli 2002, sebagai anak kedua dari dua bersaudara, pasangan Bapak Subiyanto dan Ibu Wasini. Penulis memulai pendidikan di Taman Kanak-kanak (TK) Pertiwi 2 pada tahun 2008-2009, Sekolah Dasar (SD) di SD Negeri 2 Rajabasa Lama tahun 2009-2015, Sekolah Menengah Pertama (SMP) di SMP Negeri 1 Labuhan Ratu pada tahun 2015-2018, dan Sekolah Menengah Atas (SMA) di SMA Negeri 1 Way Jepara pada tahun 2018-2021. Tahun 2021, penulis terdaftar sebagai mahasiswa Jurusan Teknologi Hasil Pertanian Fakultas Pertanian Universitas Lampung melalui jalur Seleksi Nilai Masuk Perguruan Tinggi Negeri (SNMPTN) dan juga sebagai mahasiswa penerima beasiswa Kartu Indonesia Pintar (KIP) Kuliah.

Pada bulan Januari-Februari 2024, penulis melaksanakan Kuliah Kerja Nyata (KKN) di Desa Margo Bhakti, Kecamatan Way Serdang, Kabupaten Mesuji. Pada bulan Juli-Agustus 2024, penulis melaksanakan Praktik Umum (PU) di PT. Sinar Jaya Inti Mulya Kota Metro. Penulis telah menyelesaikan laporan PU dengan judul “Mempelajari Penanganan Bahan Baku dan Sistem Mutu Bahan Baku pada Produksi *Crude Palm Kernel Oil* (CPKO) di PT. Sinar Jaya Inti Mulya”. Selama menjadi mahasiswa penulis aktif menjadi bagian dari kegiatan Asistensi Praktikum di Jurusan Teknologi Hasil Pertanian FP UNILA pada mata kuliah Uji Sensori (2024/2025), Praktikum Analisis Hasil Pertanian (2024/2025), Teknologi Hasil Hutan (2024/2025), dan Teknologi Bahan Penyegar (2024/2025), serta penulis pernah menjadi bagian dari Unit Kegiatan Mahasiswa (UKM) Bulu Tangkis pada tahun 2022 dan penulis juga merupakan anggota penuh di Organisasi Himpunan Mahasiswa Jurusan Teknologi Hasil Pertanian FP UNILA.

SANWACANA

Bismillahirrahmaanirrahiim, puji dan syukur penulis panjatkan kepada Allah SWT. atas segala berkat, rahmat, kesehatan, pengetahuan, dan pertolongan-Nya sehingga penulis dapat menyelesaikan skripsi yang berjudul “Kajian Ekstrak Kulit Tanaman Hujan Emas (*Senna multijuga*) sebagai *Ingredient* Pangan Fungsional Antioksidan” ini dengan baik. Penyusunan tugas akhir yang merupakan salah satu syarat untuk memperoleh gelar Sarjana Teknologi Hasil Pertanian, Fakultas Pertanian, Universitas Lampung ini tidak terlepas dari keterlibatan berbagai pihak atas bimbingan, bantuan, dan dukungannya, sehingga pada kesempatan ini penulis ingin mengucapkan terimakasih yang sebesar-besarnya kepada :

1. Bapak Dr. Ir. Kuswanta Futas Hidayat, M.P., selaku Dekan Fakultas Pertanian, Universitas Lampung.
2. Bapak Dr. Erdi Suroso, S.T.P., M.T.A., selaku Ketua Jurusan Teknologi Hasil Pertanian, Fakultas Pertanian, Universitas Lampung.
3. Bapak Prof. Dr. Ir. Samsul Rizal, M.Si., selaku Koordinator Program Studi dan Dosen Pembimbing Kedua yang telah memberikan bimbingan, bantuan, kritik, saran, arahan dan nasihat selama proses penyelesaian skripsi penulis.
4. Bapak Dr. Ir. Subeki, M.Si., M.Sc., selaku Dosen Pembimbing Pertama dan Pembimbing Akademik yang telah memberikan bimbingan, bantuan, kritik, saran, arahan dan nasihat selama proses perkuliahan hingga penyelesaian skripsi penulis.
5. Ibu Dr. Novita Herdiana, S.Pi., M.Si., selaku Dosen Pembahas yang telah memberikan saran dan evaluasi dalam perbaikan dan penyelesaian skripsi ini.
6. Seluruh Bapak dan Ibu Dosen pengajar di Jurusan Teknologi Hasil Pertanian yang telah memberikan banyak ilmu dan wawasan kepada penulis.
7. Kedua orang tua saya tercinta Bapak Subiyanto dan Ibu Wasini serta nenek Suyatemi yang selalu mendukung, memberikan doa terbaik, semangat,

motivasi, serta kasih sayang kepada penulis sehingga penulis mampu menyelesaikan studinya sampai meraih gelar sarjana. Semoga selalu diberikan kesehatan, umur yang panjang dan selalu dalam lindungan Allah SWT.

8. Kakak penulis Vio Deka Ananda yang selalu mendoakan, memberikan semangat, dukungan dan arahan kepada penulis selama hidup.
9. Kepada seseorang yang tidak kalah penting yaitu Nanda Adinata yang telah menjadi salah satu penyemangat penulis, memberikan dukungan dan berkontribusi banyak dalam penyusunan skripsi ini, baik tenaga, pikiran, waktu, dan materi kepada penulis. Terima kasih telah menjadi bagian dari perjalanan hidup penulis, meluangkan banyak waktu untuk selalu menemani, menghibur, dan menjadi pendengar yang baik atas segala keluh kesah penulis.
10. Sahabat seperjuangan penulis Salsabila Risma Wardani dan Safira Aulia Kharisma Isti yang selalu menjadi sahabat baik penulis, menghibur, memberikan semangat, dukungan dan menampung segala keluh kesah penulis.
11. Rekan-rekan seperjuangan kuliah penulis Fransiska, Alma, Selvi, Noami, Prima, Putri, Aminah, Grace, dan rekan-rekan satu bimbingan yang selalu mendukung, membawa kebahagiaan, dan saling membantu selama penelitian berlangsung, serta Mba Melia dan Mba Cece yang telah banyak memberikan bantuan berupa ilmu, saran, tenaga, waktu, dan bimbingan dengan sabar.
12. Teman-teman Jurusan Teknologi Hasil Pertanian angkatan 2021 atas dukungan, motivasi, dan kebersamaannya.
13. Semua pihak yang telah berperan dalam penyusunan dan penyelesaian skripsi ini yang tidak dapat penulis sebutkan satu persatu.

Akhir kata, Penulis menyadari bahwa dalam penulisan skripsi ini masih jauh dari kata sempurna. Oleh sebab itu, penulis mengharapkan kritik, saran dan masukan yang bersifat membangun dan akan diterima dengan tangan terbuka. Penulis berharap semoga skripsi ini dapat memberikan manfaat untuk kita semua.

Bandar Lampung, 01 Mei 2025
Penulis,

Ocha Maharani

DAFTAR ISI

	Halaman
DAFTAR ISI	ix
DAFTAR TABEL	xi
DAFTAR GAMBAR	xii
I. PENDAHULUAN	1
1.1 Latar Belakang dan Masalah	1
1.2 Tujuan Penelitian.....	4
1.3 Kerangka Pemikiran	4
II. TINJAUAN PUSTAKA	8
2.1 Tanaman Hujan Emas (<i>Senna multijuga</i>).....	8
2.2 Pelarut.....	10
2.2.1 Etil asetat.....	10
2.2.2 Kloroform.....	11
2.2.3 Metanol	12
2.3 Antioksidan.....	13
2.4 Pangan Fungsional.....	15
2.5 Metode Ekstraksi	16
2.6 <i>Thin Layer Chromatography</i> (TLC).....	16
2.7 Kolom Kromatografi	17
2.8 DPPH (<i>2,2-difenil-1-pikrilhidrazil</i>).....	19
2.9 FRAP (<i>Ferric Reducing Antioxidant Power</i>)	20
III. BAHAN DAN METODE	21
3.1 Tempat dan Waktu Penelitian	21
3.2 Bahan dan Alat	21
3.3 Metode Penelitian.....	22
3.4 Pelaksanaan Penelitian	22
3.4.1 Ekstraksi dan isolasi kulit hujan emas (<i>Senna multijuga</i>)	22

3.4.2	Persiapan sampel pengujian aktivitas antioksidan metode DPPH.....	25
3.4.3	Persiapan sampel pengujian aktivitas antioksidan metode FRAP.....	25
3.5	Pengamatan.....	26
3.5.1	Aktivitas antioksidan metode DPPH.....	26
3.5.2	Aktivitas antioksidan metode FRAP.....	29
IV.	HASIL DAN PEMBAHASAN.....	34
4.1	Fraksi Ekstrak Kulit Hujan Emas.....	34
4.2	Aktivitas Antioksidan Metode DPPH.....	41
4.3	Aktivitas Antioksidan Metode FRAP.....	45
V.	KESIMPULAN DAN SARAN.....	51
5.1	Kesimpulan.....	51
5.2	Saran.....	51
	DAFTAR PUSTAKA.....	52
	LAMPIRAN.....	63

DAFTAR TABEL

Tabel	Halaman
1. Karakteristik fisik fraksi kolom kromatografi ekstrak kulit hujan emas	35
2. Persen inhibisi fraksi ekstrak kloroform kulit hujan emas metode DPPH	38
3. Hasil uji aktivitas antioksidan fraksi-1 metode DPPH.....	42
4. Nilai IC ₅₀ fraksi-1 ekstrak kloroform kulit hujan emas metode DPPH	43
5. Hasil uji aktivitas antioksidan fraksi-1 metode FRAP.....	46
6. Nilai IC ₅₀ fraksi-1 ekstrak kloroform kulit hujan emas metode FRAP.	48
7. Nilai absorbansi sampel fraksi ekstrak kloroform kulit hujan emas	64
8. Nilai inhibisi (%) sampel fraksi ekstrak kloroform kulit hujan emas ...	64
9. Nilai persen inhibisi fraksi ekstrak kloroform kulit hujan emas	65
10. Nilai absorbansi dan inhibisi (%) vitamin C metode DPPH	66
11. Nilai absorbansi sampel fraksi-1 metode DPPH.....	68
12. Nilai inhibisi (%) fraksi-1 metode DPPH	68
13. Hasil uji aktivitas antioksidan fraksi-1 metode DPPH.....	70
14. Nilai absorbansi dan inhibisi (%) vitamin C metode FRAP	71
15. Nilai absorbansi sampel fraksi-1 metode FRAP	73
16. Nilai inhibisi (%) fraksi-1 metode FRAP	73
17. Hasil uji aktivitas antioksidan fraksi-1 metode FRAP	75
18. <i>t-Test: two-sample assuming unequal variances</i> metode DPPH	76
19. <i>t-Test: two-sample assuming unequal variances</i> metode FRAP.....	77

DAFTAR GAMBAR

Gambar	Halaman
1. Tanaman hujan emas	9
2. Struktur kimia etil asetat	11
3. Struktur kimia kloroform	12
4. Struktur kimia metanol.....	13
5. Proses kolom kromatografi	18
6. Mekanisme reaksi antara DPPH dengan senyawa antioksidan.....	19
7. Diagram alir ekstraksi dan pengujian antioksidan kulit hujan emas...	24
8. Karakteristik fisik fraksi-1	38
9. Kurva hubungan antara % inhibisi dan konsentrasi fraksi-1 ekstrak kloroform kulit hujan emas metode DPPH	43
10. Kurva hubungan antara % inhibisi dan konsentrasi fraksi-1 ekstrak kloroform kulit hujan emas metode FRAP	47
11. Kurva hubungan antara % inhibisi dan konsentrasi vitamin C (kurva standar) metode DPPH.....	66
12. Kurva hubungan antara % inhibisi dan konsentrasi fraksi-1 ekstrak kloroform kulit hujan emas metode DPPH	69
13. Kurva hubungan antara % inhibisi dan konsentrasi vitamin C (kurva standar) metode FRAP	71
14. Kurva hubungan antara % inhibisi dan konsentrasi fraksi-1 ekstrak kloroform kulit hujan emas metode FRAP	74
15. Proses ekstraksi kulit hujan emas.....	78
16. Hasil TLC 135 tabung fraksi kolom kromatografi ekstrak kloroform kulit hujan emas	79
17. Proses pengujian aktivitas antioksidan metode DPPH.....	80
18. Proses pengujian aktivitas antioksidan metode FRAP.....	81

I. PENDAHULUAN

1.1 Latar Belakang dan Masalah

Radikal bebas merupakan salah satu bentuk senyawa reaktif yang secara umum diketahui sebagai senyawa yang memiliki satu atau lebih elektron tidak berpasangan (Maryam dkk., 2015). Menurut Pham-Huy *et al.* (2008) senyawa radikal bebas dapat berasal dari sumber eksternal seperti polusi asap kendaraan bermotor, asap pembakaran, asap rokok, dan radiasi. Apabila tubuh kelebihan radikal bebas dan tidak dapat dihancurkan secara bertahap, nantinya di dalam tubuh akan menghasilkan fenomena yang disebut dengan stres oksidatif. Stres oksidatif berperan utama dalam perkembangan penyakit kronis dan degeneratif. Kemudian, apabila jumlah radikal bebas meningkat dan terjadi stres oksidatif, senyawa antioksidan endogen yang diproduksi oleh tubuh untuk mencegah penyakit akibat radikal bebas tidak cukup untuk menetralsirkannya, sehingga dibutuhkan senyawa antioksidan dari luar tubuh (eksogen) (Dhurhanian dan Novianto, 2019). Menurut Wolfe and Liu (2007), salah satu cara memperoleh senyawa antioksidan eksogen secara aman dan alami yaitu dengan mengonsumsi pangan fungsional yang memiliki kandungan senyawa antioksidan.

Pangan fungsional merupakan produk pangan yang tidak hanya memenuhi kebutuhan gizi dasar, tetapi juga memberikan manfaat fisiologis tambahan, seperti menangkal radikal bebas dan mencegah penyakit degeneratif (Wolfe and Liu, 2007). Menurut Kaur and Kapoor (2001) dan Hasler (2002), salah satu sumber utama komponen bioaktif dalam pangan fungsional dapat berasal dari tanaman, karena banyak diantaranya mengandung senyawa metabolit sekunder seperti flavonoid, fenolik, tannin, dan alkaloid. Senyawa-senyawa tersebut memiliki aktivitas antioksidan yang tinggi, sehingga beberapa tanaman terutaman dalam

bentuk ekstraknya dapat menjadi bahan baku potensial dalam pengembangan produk pangan fungsional dengan kandungan antioksidan yang dapat menangkal radikal bebas di dalam tubuh. Menurut Silva *et al.* (2019) dan Oliveira *et al.* (2021), kandungan metabolit sekunder tersebut dapat ditemukan pada ekstrak tanaman genus *Senna* yaitu salah satunya pada ekstrak spesies *Senna multijuga* yang diketahui mengandung berbagai senyawa aktif seperti flavonoid, fenolik, dan antrakuinon.

Tanaman hujan emas (*Senna multijuga*) termasuk dalam famili *Fabaceae* yang memiliki tinggi pohon berkisar antara 10-15 meter (Irwin and Barneby, 1982). Spesies ini tersebar di hampir semua wilayah negara tropis, terutama di hutan hujan Atlantik Brasil. Spesies ini tergolong spesies pionir yang membutuhkan cahaya dan tidak dipengaruhi dengan kondisi fisik tanah (Lopes *et al.*, 2020). Tanaman *S. multijuga* termasuk jenis tanaman polong-polongan berukuran sedang yang ditemukan di berbagai negara Amerika Selatan dan daerah tropis di seluruh dunia, termasuk di negara Indonesia dengan kondisi daerah kering, lembap, curah hujan yang tinggi dan suhu rata-rata tahunan 17-28°C serta terdapat sinar matahari penuh seperti kondisi di daerah Jawa Barat, Jawa Timur, Sumatra, Kalimantan, dan Bali. Menurut Wandri *et al.* (2024), tanaman *S. multijuga* menunjukkan potensi pertumbuhan yang baik di Provinsi Lampung karena didukung oleh iklim tropis basah dan kondisi agroklimat yang sesuai, sehingga menjadikan Lampung sebagai lokasi yang cocok untuk budidaya tanaman ini, tetapi belum banyak dibudidayakan secara luas di Lampung. *S. multijuga* merupakan tanaman yang memiliki daun majemuk, bunga hermafrodit dengan kelopak kuning, memiliki buah berbentuk silinder berupa polong yang didalamnya berisi 20-32 biji berwarna hijau hingga coklat kehitaman (Ribeiro and Lovato, 2004). Menurut Prasathkumar *et al.* (2021), tanaman *S. multijuga* mulai dikenal dan beberapa bagian tanaman *S. multijuga* seperti akar, kulit batang, daun, biji dan buah mulai dijadikan objek penelitian untuk mengetahui manfaat, kegunaan, serta komponen yang terkandung di dalamnya, karena tanaman *S. multijuga* terutama ekstraknya diperkirakan memiliki berbagai manfaat yang berfungsi sebagai antioksidan, antiinflamasi, antimikroba, dan bioinsektisida alami.

Salah satu bagian tanaman *S. multijuga* yang dijadikan sebagai bahan penelitian di beberapa bidang yaitu kulit batangnya. Kulit tanaman tersebut diperkirakan terdapat kandungan senyawa antioksidan yang dapat menangkal radikal bebas dan berpotensi sebagai bahan baku pangan fungsional. Menurut Farid *et al.* (2020), bagian tanaman *Senna spp* termasuk batang dan kulitnya ditemukan kaya akan berbagai fitokimia, yaitu terdapat 350 senyawa yang beragam dapat diekstrak dari tanaman genus *Senna*. Fitokimia ini sebagian besar mencakup senyawa alkaloid, terpenoid, glikosida, tanin, saponin, steroid, flavonoid, antrakuinon, dan polifenol. Menurut Alshehri *et al.* (2022), berdasarkan banyaknya senyawa yang dapat diekstrak dari tanaman genus *Senna* tersebut, maka dilakukan penelitian terkait aktivitas farmakologis tanaman genus *Senna* yang meliputi antiinfeksi, antitumor, antimutagenik, antiplasmodial, antiinflamasi, antikanker, antidiabetik, aktivitas antihelmintik dan terutama sebagai antioksidan. Kemudian, terdapat beberapa eksperimen *in vitro*, *in vivo*, dan klinis membuktikan bahwa ekstrak dari tanaman genus *Senna* memiliki beragam manfaat dengan bertindak sebagai agen antioksidan dan antimikroba yang kuat.

Beberapa ekstrak bagian tanaman genus *Senna* yang telah diidentifikasi seperti ekstrak bagian kulit batangnya terdapat aktivitas antioksidan dan umumnya berkorelasi dengan kandungan fenolik dan flavonoid yang meliputi senyawa kimia seperti katekin, proantosianidin, scutel-larein, rutin, quercimeritrin, glikosida kaempferol, rhein, krisofan, aloin, dan fisikon (Alshehri *et al.*, 2022). Menurut Solanki *et al.* (2021), senyawa-senyawa golongan antioksidan tersebut dapat diketahui dengan pengujian aktivitas antioksidan metode DPPH, FRAP, CUPRAC, PMA, H₂O₂, dan ABTS. Adanya kandungan senyawa antioksidan dari beberapa ekstrak tanaman, baik tanaman pangan maupun non pangan dapat berpotensi menjadi salah satu bahan atau *ingredient* pada produk pangan fungsional yang pastinya bermanfaat baik bagi kesehatan. Umumnya golongan senyawa antioksidan alami yang ditemukan pada ekstrak suatu bahan pangan yaitu alkaloid, saponin, kuinon, steroid/triterpenoid, flavonoid, dan tannin (Rao *et al.*, 2013). Maka dari itu, diperkirakan beberapa senyawa golongan tersebut dapat juga ditemukan pada ekstrak bagian tanaman *Senna spp*, sehingga beberapa genus

Senna seperti *S. multijuga* berpotensi menjadi *ingredient* pangan fungsional dengan aktivitas antioksidan yang dapat menangkal radikal bebas di dalam tubuh, tetapi sampai saat ini belum diketahui pasti ada tidaknya aktivitas antioksidan yang dapat menjadi *ingredient* pangan fungsional dari ekstrak bagian tanaman *S. multijuga*. Oleh karena itu, perlu dilakukan penelitian terkait aktivitas antioksidan pada ekstrak kulit tanaman hujan emas (*Senna multijuga*) yang berpotensi sebagai *ingredient* pangan fungsional.

1.2 Tujuan Penelitian

Tujuan dari penelitian ini adalah sebagai berikut:

1. Mengetahui karakteristik fisik hasil elusi kolom kromatografi ekstrak kulit hujan emas (*Senna multijuga*)
2. Mengetahui aktivitas antioksidan fraksi hasil elusi kolom kromatografi ekstrak kulit hujan emas (*Senna multijuga*) sebagai *ingredient* pangan fungsional

1.3 Kerangka Pemikiran

Senna multijuga merupakan pohon atau semak yang ekstrak bagian tanamannya dapat bermanfaat sebagai anti-karsinogenik, anti-inflamasi, antioksidan, dan beberapa senyawa pelindung syaraf (de Oliveira *et al.*, 2023). Menurut penelitian Oza *et al.* (2020), antioksidan alami diteliti dari berbagai bagian tumbuhan seperti sayuran, buah, dan tanaman berkayu. Salah satu tanaman berkayu yang terdapat aktivitas antioksidan dibeberapa bagiannya yaitu tanaman hujan emas (*S. multijuga*). Aktivitas antioksidan tersebut dapat ditemukan pada bagian kulit batang tanaman yang nantinya akan berhubungan dengan kandungan senyawa flavonoid dan fenolik. Kandungan senyawa ini dapat berperan sebagai antioksidan dan memiliki aktivitas antibakteri. Menurut penelitian Oladeji *et al.* (2021), genus *Senna* mengandung metabolit penting seperti alkaloid, antrakuinon, flavonoid, tanin, glikosida, steroid, terpenoid, saponin, dan minyak atsiri. Ekstrak kasar dan metabolit terisolasi proses fraksinasi dari tanaman genus *Senna*

menunjukkan berbagai aktivitas farmakologis *in vitro* dan *in vivo* seperti antidiabetik, antigonore, antimikroba, antioksidan, antipiretik, antinosiseptif, antidepresan, dan antiinflamasi. Artinya bahwa ekstrak yang diperoleh dari tanaman genus *Senna*, termasuk juga dengan spesies *S.multijuga* diperkirakan memiliki aktivitas antioksidan apabila dilihat dari penelitian terdahulu yang telah dilakukan.

Prosedur ekstraksi dan isolasi suatu senyawa dapat dilakukan dengan beberapa tahap. Menurut penelitian Subeki dan Muhartono (2015), proses ekstraksi dan isolasi senyawa brusein-A dari buah Makasar (*Brucea javanica* (L.) Merr.) yang dapat dilakukan dengan proses awal yaitu maserasi 30 mL EtOH 70% selama 28 hari, selanjutnya filtrat disaring dengan kain saring dan diuapkan dengan menggunakan rotari evaporator menjadi 1 L. Filtrat pekat tersebut kemudian diekstrak dengan etil asetat (EtOAc) sehingga diperoleh fraksi air dan EtOAc. Fraksi EtOAc diuapkan hingga kering kemudian dimasukkan ke dalam silika gel kolom kromatografi dan juga dielusi dengan CHCl₃ (1 L), MeOH-CHCl₃ (3:97, 1 L), dan MeOH-CHCl₃ (1:4, 1 L) secara berurutan. Kemudian, cara yang sama dilakukan pengeringan fraksi MeOH-CHCl₃ (1:4). Setelah itu, dimasukkan ke dalam silika gel kolom kromatografi dan dielusi dengan heksan:EtOAc (3:7, 4 L) hingga diperoleh 10 fraksi dan pada fraksi 5 dapat diidentifikasi adanya senyawa brusein-A yang menandakan bahwa fraksi tersebut merupakan fraksi terbaik.

Penelitian yang dilakukan oleh Singh *et al.* (2019) mengenai pengujian aktivitas antioksidan pada ekstrak biji *Senna occidentalis* dilakukan secara bertahap dan diawali dengan proses ekstraksi menggunakan pelarut etanol terlebih dahulu hingga memperoleh ekstrak pekat. Ekstrak pekat tersebut dilakukan pengujian aktivitas antioksidan dengan berbagai konsentrasi yaitu 10-50 µl/mL. Pengujian aktivitas antioksidan pada penelitian ini menggunakan metode DPPH dan larutan standar asam askorbat yang diukur dengan spektrofotometer UV-Vis ganda pada panjang gelombang 517 nm. Hasil pengujian aktivitas antioksidan metode DPPH pada penelitian Singh *et al.* (2019), yaitu penghambatan tertinggi ditemukan pada konsentrasi 50 µl/mL dengan nilai 79,25% dan untuk nilai IC₅₀ ekstrak etanol

(AEA) diketahui sebesar 14,8 µg/ml. Hasil tersebut menunjukkan bahwa konsentrasi EAE 50 µg/mL paling ampuh dalam menunjukkan respon antioksidan dibandingkan dengan asam askorbat. Hal tersebut dapat disebabkan oleh kandungan flavonoid yang meningkatkan kemampuan menetralkan radikal bebas sehingga dapat diartikan bahwa ekstrak etanol biji *S.occidentalis* memiliki kandungan flavonoid yang merupakan salah satu golongan senyawa antioksidan. Menurut penelitian Kabila' *et al.* (2020), golongan senyawa antioksidan alami yang ditemukan pada ekstrak tanaman *S.occidentalis* dari genus *Senna* yaitu berupa senyawa flavonoid, alkaloid, steroid, dan saponin yang dapat diarahkan menjadi *ingredient* pangan fungsional antioksidan. Namun, harus dilakukan proses isolasi atau pemurnian senyawa terlebih dahulu untuk memperoleh senyawa murni yang diinginkan tanpa adanya senyawa lain yang tidak diinginkan.

Penelitian terkait aktivitas antioksidan pada tumbuhan genus *Senna* juga sudah dilakukan oleh Ita and Ndukwe (2017), namun genus *Senna* yang dijadikan penelitian untuk mengetahui aktivitas antioksidan ini adalah spesies *Senna alata* pada bagian akar tanamannya. Pengujian ini tetap diawali dengan tahap ekstraksi terlebih dahulu yaitu dimaserasi dalam 2,5 L aseton, etanol, dan air secara terpisah selama 24 jam untuk diperoleh ekstrak aseton (AcE), etanol (EtE), dan air (AqE). Selanjutnya, akan diuji aktivitas antioksidannya dengan metode DPPH dan ABTS, sehingga dapat diketahui bahwa menurut para peneliti ekstrak akar *S. alata* memiliki aktivitas antioksidan dan menunjukkan bahwa tanaman tersebut kaya akan fenolik dan flavonoid. Namun, dapat diketahui bahwa total fenolik dan flavonoid yang tinggi ditemukan pada ekstrak etanol (masing-masing 78,21 mg ekuivalen asam galat (GAE)/g dan 39,29 mg ekuivalen quercetin (QE)/g, IC₅₀ = 45,18 µg/ mL) dari pada ekstrak air dan aseton.

Penelitian mengenai aktivitas antioksidan tanaman genus *Senna* dengan metode DPPH lainnya juga dilakukan oleh Arrieta and Anges (2004). Penelitian tersebut melakukan pengujian aktivitas antioksidan pada ekstrak metanol kulit batang *Senna skinneri* dengan berbagai konsentrasi yaitu 2-20 µg/mL. Pengukuran absorbansi dalam penelitian ini dilakukan pada panjang gelombang 517 nm. Hasil

yang diperoleh menunjukkan bahwa metanol kulit batang *S. skinneri* memiliki aktivitas penangkal radikal bebas yang signifikan dengan nilai IC_{50} sebesar 8,41 $\mu\text{g/mL}$, sehingga dapat disimpulkan bahwa ekstrak kulit batang *S. skinneri* terdapat aktivitas antioksidan yang tergolong dalam kategori antioksidan sangat kuat dalam uji DPPH. Menurut Alshehri *et al.* (2022), teknik *in vitro* yang umum digunakan untuk mengetahui dan menentukan aktivitas antioksidan suatu ekstrak selain metode DPPH (2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl radical) yaitu metode FRAP (Ferric Reduction Antioxidant Power).

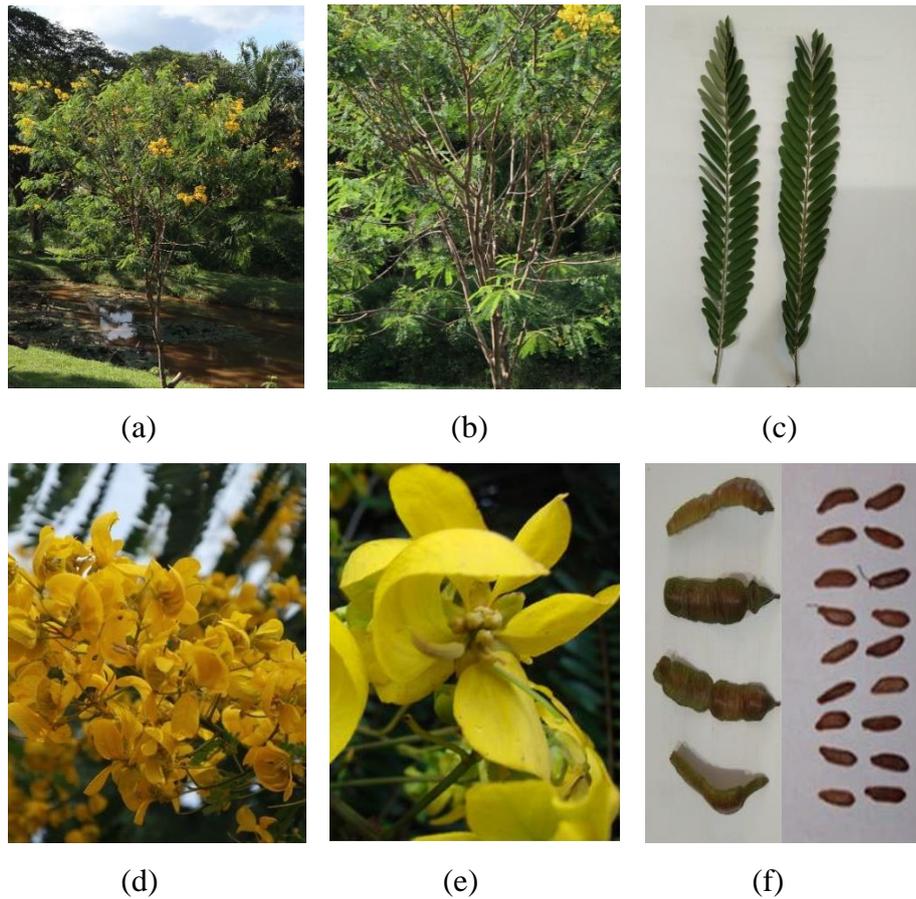
Penelitian mengenai aktivitas antioksidan menggunakan metode FRAP dan DPPH telah dilakukan oleh Sobeh *et al.* (2017) dengan sampel ekstrak metanol kulit pohon *Senna singueana* berbagai konsentrasi yaitu dari 500-2,5 $\mu\text{g/mL}$. Penelitian tersebut menghasilkan nilai IC_{50} ekstrak metanol kulit *S. singueana* pada metode FRAP sebesar 18,16 mM FeSO_4/mg ekstrak (epigallocatechin gallate sebagai kontrol positif sebesar 25 mM FeSO_4) dan nilai IC_{50} pada metode DPPH sebesar 20,8 $\mu\text{g/mL}$ (epigallocatechin gallate sebagai kontrol positif sebesar 3,50 $\mu\text{g/mL}$). Adanya aktivitas antioksidan pada ekstrak metanol kulit pohon *S. singueana* ini disebabkan oleh kandungan total fenolik yang tinggi karena ditemukan 474 mg ekuivalen asam galat (GAE)/mg ekstrak. Hasil serupa terdeteksi dalam ekstrak dari spesies *Senna* lainnya yang kaya akan proantosianidin.

Penelitian mengenai aktivitas antioksidan menggunakan metode FRAP lainnya juga dilakukan oleh Saliu (2021), yaitu dengan mengevaluasi aktivitas antioksidan dari ekstrak air akar *Senna podocarpa* menggunakan metode FRAP. Hasil yang diperoleh dalam penelitian tersebut menunjukkan bahwa ekstrak air akar *S. podocarpa* memiliki aktivitas antioksidan sebesar 0,49 mg/mL dalam uji FRAP. Aktivitas antioksidan dari ekstrak air akar *S. podocarpa* tersebut masuk dalam kategori antioksidan sangat kuat. Selain itu, analisis HPLC-DAD mengidentifikasi keberadaan senyawa fenolik seperti asam klorogenat (51,65 mg/g), asam kafeat (40,52 mg/g), dan flavonoid seperti quercitrin (40,31 mg/g), yang berkontribusi terhadap aktivitas antioksidan ekstrak akar *S. podocarpa*.

II. TINJAUAN PUSTAKA

2.1 Tanaman Hujan Emas (*Senna multijuga*)

Tanaman hujan emas (*Senna multijuga*) merupakan pohon yang dianggap sebagai tanaman pionir dan termasuk dalam famili *Fabaceae*. Tanaman hujan emas ini di negara lain dikenal sebagai november *shower*, *caqueira*, *alleluia*, *pau-fava*, *piúna*, *canafistula* atau *pau-cigarra*, *angico branco*, dan *acacia* (Amorim *et al.*, 2008). Tanaman *S. multijuga* dapat tumbuh setinggi 15 m, meskipun tanaman ini berasal dari Amerika Selatan bagian utara, tetapi tanaman ini telah menyebar ke daerah tropis di seluruh dunia termasuk tumbuh di seluruh wilayah Brazil, terutama di Hutan Atlantik. Selain itu, karena siklus pembungaannya yang panjang, tanaman ini sering digunakan sebagai tanaman hias di taman, trotoar, dan dalam proyek reboisasi campuran di daerah terdegradasi. Fakta bahwa *S. multijuga* memiliki siklus hidup yang pendek dibandingkan dengan spesies hutan lainnya, ditambah kemampuan untuk menjajah tanah yang buruk dengan cepat karena tidak peduli dengan kondisi fisik tanah, namun tanaman ini membutuhkan cahaya untuk masa pertumbuhannya (Lopes *et al.*, 2020). *S. multijuga* memiliki bunga dan buah yang mana pembungaan tanaman ini terjadi antara bulan Januari dan Mei, sedangkan buahnya matang antara bulan Maret dan Desember. Buah *S. multijuga* merupakan jenis polong-polongan atau kacang-kacangan kering dengan kulit biji tipis (de Oliveira *et al.*, 2023). Menurut Wolowski and Freitas (2010), tanaman *S. multijuga* memiliki tinggi pohon 10-15 m dan umumnya ditemukan pada ketinggian antara 50 dan 950 m, di lahan terbuka, tepi hutan, tepi sungai, dan di kawasan yang terganggu serta sedang beregenerasi. Bagian tanaman hujan emas disajikan pada Gambar 1.



Gambar 1. Tanaman hujan emas (*Senna multijuga*) (a) pohon, (b) percabangan, (c) daun, (d) bunga, (e) kelopak bunga, (f) buah dan biji.
Sumber: Wandri *et al.* (2024)

Secara taksonomi tanaman hujan emas diklasifikasikan sebagai berikut (Carvalho, 2000).

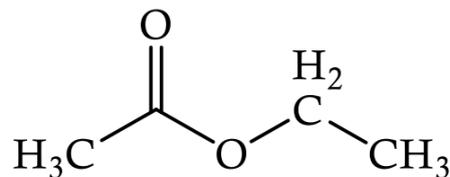
Kingdom : Plantae
 Subkingdom : Tracheobionta
 Superdivisi : Spermatophyta
 Divisi : Magnoliophyta (Angiospermae)
 Kelas : Magnoliopsida
 Subkelas : Rosidae
 Ordo : Fabales
 Famili : Fabaceae
 Genus : *Senna*
 Spesies : *Senna multijuga*

Buah tanaman *S. multijuga* berbentuk pipih, berupa polong dengan biji autokorik yang memiliki panjang rata-rata 154,0 mm (berkisar antara 121,0 hingga 188,0 mm), lebar rata-rata 15,4 mm (berkisar antara 12,0 hingga 18,0 mm), dengan permukaan mengkilap, gundul, berwarna coklat tua yang mengandung 20–32 biji. Bijinya berbentuk lonjong, terkompresi secara lateral, dengan panjang rata-rata 6,4 mm (berkisar antara 5,8 hingga 7,0 mm) dan lebar rata-rata 2,4 mm (berkisar antara 1,9 hingga 2,9 mm) (de Oliveira *et al.*, 2023). Tanaman ini memiliki daun majemuk, bunga hermafrodit dengan kelopak kuning yang dikelompokkan dalam malai ganda terminal. Adapun bentuk mahkota bunga yaitu membulat, tangkai benang sari pendek dan pada bagian ujungnya bewarna putih dengan garis coklat (Ribeiro and Lovato, 2004). Tanaman ini juga memiliki kandungan senyawa fitokimia seperti fenolik, terpenoid, steroid, tanin, alkaloid, flavonoid, dan saponin (Sharma, 2018).

2.2 Pelarut

2.2.1 Etil asetat

Etil asetat adalah salah satu jenis pelarut yang memiliki sifat semi polar, maka dari itu pelarut etil asetat ini dapat menarik senyawa polar dan nonpolar. Selain itu, etil asetat adalah turunan dari asam asetat yang umum digunakan dalam industri makanan dan bersifat mudah menguap. Etil asetat mempunyai ciri-ciri berupa cairan tidak berwarna, bening, berbau khas, dan mudah larut dalam air maupun pelarut organik. Etil asetat memiliki beberapa keunggulan salah satunya yaitu koefisien distribusi etil asetat lebih tinggi dibandingkan dengan pelarut lain seperti etanol. Etil asetat juga mempunyai kegunaan tidak hanya berperan sebagai pelarut saja, etil asetat ini memiliki peran sebagai bahan aditif yang berguna untuk peningkatan angka oktan bensin (ukuran kemampuan bahan bakar untuk menahan ketukan atau ledakan dini) dan dapat digunakan sebagai bahan kimia untuk keperluan umum. Etil asetat merupakan jenis ester yang paling banyak ditemukan pada golongannya dengan rumus molekul $\text{CH}_3\text{COOC}_2\text{H}_5$ (Nst *et al.*, 2015). Struktur kimia senyawa etil asetat dapat dilihat pada Gambar 2.



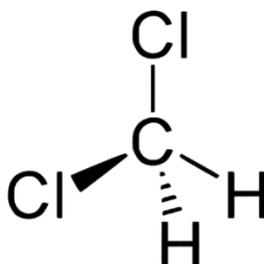
Gambar 2. Struktur kimia etil asetat.
Sumber: Kadarohman dkk. (2022)

Etil asetat biasanya sering digunakan sebagai pelarut dalam bidang ilmiah. Salah satunya yaitu digunakan pada proses ekstraksi suatu sampel untuk memperoleh komponen yang diinginkan dari sampel. Tujuan pemilihan pelarut etil asetat dalam suatu proses ekstraksi, karena etil asetat dapat menarik atau mengekstrak senyawa yang bersifat polar maupun non polar. Etil asetat juga mempunyai toksisitas yang rendah sehingga tidak menimbulkan risiko berbahaya (Evita dkk., 2022). Menurut Mailani dan Pratiwi (2022), esterifikasi adalah salah satu cara yang dapat dilakukan untuk memperoleh etil asetat. Reaksi esterifikasi biasanya menghasilkan etil asetat dengan mereaksikan etanol dan asam asetat menggunakan katalis untuk mempercepat reaksi pembentukan ester. Saat ini, dapat kita ketahui bersama bahwa etil asetat mempunyai beberapa manfaat serta target pasar yang lumayan luas yaitu termasuk dapat memberikan kesan rasa dan aroma buah apabila diaplikasikan pada industri makanan dan parfum, dapat dimanfaatkan dalam industri cat, tinta, plastik, PVC, serta industri lainnya.

2.2.2 Kloroform

Kloroform merupakan suatu senyawa organik dengan rumus molekul CHCl_3 . Kloroform dapat dikategori sebagai bahan kimia beracun sehingga di laboratorium industri dan sains kloroform terkenal sebagai anastesi (Aprira, 2022). Menurut Djunaidi dkk. (2021), kloroform merupakan salah satu pelarut yang memiliki kelarutan rendah dalam air sehingga berkemungkinan besar dapat digunakan sebagai pelarut organik. Selain itu, menurut Wiradnyani dkk. (2014), kloroform memiliki ciri utama tidak berwarna, mudah menguap, berbau menusuk dan tajam, serta bila terhirup akan menimbulkan efek mengantuk. Kloroform yang menjadi

pelarut semi polar umumnya mempunyai nilai indeks polaritas senilai 4,1, sehingga pelarut ini dapat menarik senyawa fenolik dan steroid. Struktur kimia senyawa kloroform dapat dilihat pada Gambar 3.



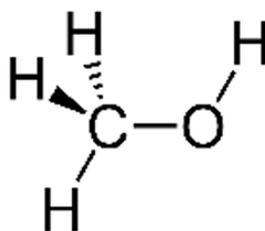
Gambar 3. Struktur kimia kloroform.
Sumber: Solomons *et al.* (2016)

Kloroform adalah pelarut pengestrak yang paling umum digunakan. Hal tersebut dikarenakan kloroform mempunyai kemampuan yaitu mudah diuapkan, sehingga dapat membantu dalam proses menghilangkan pelarut organik setelah dilakukan ekstraksi. Kloroform juga dapat digunakan sebagai pelarut untuk minyak, lemak, karet, lilin, lemak, dan bahan anastesi serta bahan baku untuk pembuatan senyawa organik lainnya dalam laboratorium atau industri kimia. Perlu diketahui, bahwa kloroform umumnya memiliki cita rasa yang manis dan terdapat kesan pedas sehingga kloroform dapat dimanfaatkan sebagai penambah cita rasa dalam produk pasta gigi tetapi tidak dianjurkan karena umumnya kloroform memiliki sifat toksisitas yang tinggi dan juga salah satu bahan yang bersifat karsinogenik sehingga apabila secara langsung maupun tidak langsung dikonsumsi atau kontak langsung dengan bagian tubuh dapat menyebabkan kerusakan hati dan ginjal apabila terpapar dalam jangka waktu panjang (Putra dkk., 2015).

2.2.3 Metanol

Metanol adalah pelarut universal yang dapat melarutkan senyawa polar dan non polar karena metanol memiliki gugus polar (-OH) dan gugus nonpolar (-CH₃). Metanol adalah suatu senyawa alkohol yang memiliki rantai karbon pendek, sehingga metanol memiliki sifat lebih mudah terbakar secara sempurna dan

menghasilkan emisi karbon monoksida yang lebih rendah. Metanol menjadi pelarut yang umum digunakan pada proses ekstraksi dengan metode maserasi untuk mengisolasi senyawa organik bahan alam. Metanol dapat menggantikan bahan baku fosil dan dapat dibuat dari beberapa bahan yang mudah ditemukan karena metanol tersebut dapat terbuat dari gas alam, biomassa, penyulingan kayu, gasifikasi batu bara, bahkan dapat menggunakan polusi yang dihasilkan oleh pabrik serta pembangkit listrik. Metanol memiliki rumus kimia CH_3OH dan dikenal juga sebagai metil alkohol yang berbentuk cairan bening (Permana dkk., 2021). Struktur kimia senyawa metanol dapat dilihat pada Gambar 4.



Gambar 4. Struktur kimia metanol.
Sumber: Asrori dkk. (2020)

Pelarut metanol juga menjadi pelarut yang umum digunakan untuk mengekstrak senyawa metabolit golongan flavonoid dan juga menjadi senyawa dengan sifat yang lebih polar untuk mengekstrak glikosida flavonoid (Yuliani dan Rasyid, 2019). Menurut Yuliarni dkk. (2022), metanol dapat melarutkan zat yang bersifat polar, seperti golongan fenol (asam fenolik, flavonoid, alkaloid, tannin, lignin) dan kemampuan tersebutlah yang menjadi salah satu kelebihan dari metanol. Namun, pelarut metanol juga memiliki kekurangan yaitu relatif lebih toksik dibandingkan dengan pelarut etanol. Selain itu, metanol juga dapat dengan mudah terbakar.

2.3 Antioksidan

Antioksidan adalah senyawa yang umumnya digunakan untuk mencegah berbagai penyakit degeneratif, seperti penyakit kardiovaskular, kanker, dan penyakit

lainnya dengan menghilangkan, membersihkan, menahan, dan menyerap radikal bebas. Selain itu, tubuh juga membutuhkan senyawa antioksidan ini sebagai substansi untuk menetralkan radikal bebas dan mencegah kerusakan sel normal, protein, dan lemak oleh radikal bebas. Kemudian, dapat diketahui bahwa senyawa antioksidan memiliki struktur molekul yang memungkinkan untuk menyumbangkan elektron kepada molekul radikal bebas tanpa mengganggu fungsinya, sehingga mampu memutus atau menghentikan reaksi berantai radikal bebas. Saat ini, jenis antioksidan yang paling sering dibutuhkan dan digunakan yaitu antioksidan alami dan umumnya antioksidan tersebut dapat ditemukan di tanaman hijau. (Pratiwi dkk., 2023).

Antioksidan alami biasanya dapat ditemukan pada tanaman seperti sayuran, buah-buahan biji bijian, kacang-kacangan, dan beberapa tanaman berkayu lainnya. Senyawa kimia yang termasuk dalam kelompok antioksidan dan ditemukan pada tanaman antara lain adalah berasal dari golongan polifenol, bioflavonoid, asam askorbat, vitamin E, beta-karoten, katekin, dan lain-lain. (Pratiwi dkk., 2023). Menurut Cömert *et al.* (2020); Sies, (2019), mikronutrien utama yang berperan sebagai antioksidan meliputi vitamin E (α -tokoferol), vitamin C (asam askorbat), dan β -karoten. Selain itu, terdapat juga beberapa senyawa metabolit sekunder, seperti senyawa fenolik, flavonoid, atau asam organik, yang bisa diperoleh dari tumbuhan. Menurut Choi *et al.* (2014), antioksidan yang berasal dari tumbuhan adalah kelompok besar senyawa bioaktif yang mencakup flavonoid, senyawa fenolik, senyawa mengandung sulfur, tanin, alkaloid, diterpen, fenolik, dan vitamin. Kandungan antioksidan alami pada tanaman saat ini lebih sering dimanfaatkan untuk kebutuhan dibidang pangan maupun non pangan, karena senyawa antioksidan tersebut berperan utama dalam menangkal atau meredam radikal bebas penyebab timbulnya penyakit degeneratif dan kerusakan sel tubuh. Menurut Lobo *et al.* (2010), mekanisme kerja antioksidan dalam menangkal radikal bebas yaitu dengan mendonorkan elektron kepada radikal bebas sehingga menghentikan reaksi berantai yang dapat merusak sel dan mengubah radikal menjadi bentuk yang lebih stabil dan tidak berbahaya.

2.4 Pangan Fungsional

Suatu makanan atau bahan pangan dapat disebut sebagai pangan fungsional jika mengandung komponen bioaktif yang memberikan manfaat kesehatan tambahan selain manfaat gizi yang ada di dalamnya. Istilah pangan fungsional di Indonesia merujuk pada pangan yang secara alami atau melalui proses mengandung satu atau lebih senyawa dengan fungsi fisiologis tertentu yang mendukung kesehatan. Hal tersebut seperti yang telah dibuktikan oleh beberapa literatur ilmiah. Fungsi fisiologis pada suatu komponen bioaktif dalam pangan fungsional mencakup sifat antioksidan, pencegahan hipertensi, peningkatan penyerapan kalsium, pencegahan kanker, dan penurunan kolesterol. (BPOM, 2021). Menurut Shahidi and Ambigaipalan (2015); Roberfroid (2007), komponen bioaktif dalam suatu pangan adalah senyawa alami yang bukan nutrien esensial, tetapi memiliki efek fisiologis positif terhadap kesehatan. Komponen bioaktif seperti flavonoid, karotenoid, polifenol, fitosterol, dan asam lemak omega-3 dalam makanan berperan penting dalam pencegahan penyakit degeneratif, sehingga menjadikan pangan tersebut berpotensi sebagai pangan fungsional.

Saat ini, banyak bahan pangan yang tidak hanya dijadikan sebagai makanan pokok atau camilan saja, tetapi juga dapat berfungsi sebagai *functional food* yang memberikan manfaat lebih dari sekadar pangan yang mengandung zat gizi yang dibutuhkan tubuh. Keanekaragaman tanaman di Indonesia sangat kaya, sehingga keanekaragaman tersebut dapat dimanfaatkan sebagai sumber utama untuk menghasilkan pangan fungsional karena memiliki senyawa bioaktif yang bermanfaat bagi kesehatan. Tanaman yang berpotensi sebagai bahan atau *ingredient* pangan fungsional dapat berasal dari tanaman pangan maupun non pangan yang dapat dihasilkan dari bagian tanamannya dan diperoleh melalui proses tertentu seperti ekstraksi untuk memperoleh komponen senyawa aktifnya dan kemudian dilakukan pengolahan lebih lanjut untuk dijadikan suatu produk atau bahan pangan. Hal tersebut terjadi karena saat ini banyak peneliti yang meneliti komponen suatu tanaman yang kemudian dilakukan diversifikasi untuk diarahkan ke pangan fungsional (Sihite dan Hutasoit, 2023).

2.5 Metode Ekstraksi

Ekstraksi adalah metode atau proses yang digunakan untuk memisahkan suatu zat dari campurannya dengan bantuan pelarut yang sesuai dan umumnya penggunaan pelarut tersebut biasanya disesuaikan berdasarkan tingkat kepolarannya.

Umumnya proses ekstraksi dilakukan untuk memperoleh senyawa suatu bahan. Pemilihan metode ekstraksi sangat ditentukan oleh karakteristik bahan serta senyawa yang ingin diisolasi. Proses ekstraksi akan berhenti ketika terjadi kesetimbangan antara konsentrasi senyawa dalam pelarut dan konsentrasi dalam sel tumbuhan (Muhkhriani, 2014).

Alur proses metode ekstraksi yang biasanya dilakukan yaitu bahan akan melalui proses pengeringan, penggilingan, dan pemilihan pelarut, baik pelarut yang bersifat polar (seperti air, etanol, dan metanol), semipolar (seperti etil asetat dan diklorometana), atau nonpolar (seperti n-heksana, petroleum eter, dan kloroform), yang disesuaikan dengan bahan serta jenis komponen senyawa aktif yang akan diambil. Berbagai metode ekstraksi yang dapat digunakan meliputi maserasi, *ultrasound-assisted solvent extraction*, perkolasi, soxhlet, refluks, dan distilasi uap. (Muhkhriani, 2014). Menurut Safitri dkk. (2018), terdapat dua cara ekstraksi, yaitu ekstraksi dingin dan ekstraksi panas. Ekstraksi dingin pada dasarnya dilakukan tanpa pemanasan selama proses berlangsung untuk menjaga agar senyawa yang diinginkan tetap utuh dan tidak rusak. Sementara itu, ekstraksi panas melibatkan pemanasan dalam prosesnya untuk mempercepat laju ekstraksi. Cara tersebut digunakan dengan menyesuaikan jenis bahan yang akan diekstraksi.

2.6 *Thin Layer Chromatography* (TLC)

TLC (*Thin Layer Chromatography*) atau yang bisa disebut juga dengan kromatografi lapis tipis merupakan salah satu metode yang dapat digunakan dengan tujuan untuk memisahkan dan memurnikan senyawa aktif suatu bahan. TLC ini termasuk metode yang praktis untuk digunakan serta cepat (Notonegoro dkk., 2022). Menurut Cai (2018), TLC adalah metode atau teknik pengujian yang

sensitif, cepat, dan ekonomis. Biasanya TLC ini digunakan untuk menentukan jumlah komponen dalam campuran, memverifikasi identitas dan kemurnian senyawa, memantau perkembangan reaksi, menentukan komposisi pelarut untuk pemisahan preparatif, serta sangat efektif dalam menganalisis fraksi yang diperoleh dari kromatografi kolom. Metode TLC ini sudah sangat lazim digunakan untuk analisis baik secara kualitatif maupun kuantitatif, bahkan dapat digunakan untuk uji aktivitas biologis bila digabungkan dengan bioautografi.

Metode TLC memiliki keunggulan dalam mengidentifikasi pemisahan komponen menggunakan pereaksi pewarna, fluoresensi, dan dapat dipakai pada radiasi sinar ultra violet. Prinsip kerja metode TLC ini yaitu senyawa polar akan larut dalam pelarut polar, sedangkan senyawa non-polar akan larut dalam pelarut non-polar. Hal tersebut membuktikan bahwa senyawa dan pelarut yang digunakan pada metode ini harus sesuai atau sejenis. Proses pengujian dengan metode TLC menggunakan dua fase yaitu fase gerak dan fase diam. Umumnya fase diam pada metode TLC menggunakan pelat inert yang terbuat dari silika gel atau aluminium oksida, sedangkan fase gerak pada metode ini biasanya menggunakan pelarut cair seperti kloroform, etanol, metanol dan pelarut lain (Pujianti dkk., 2023).

2.7 Kolom Kromatografi

Kolom kromatografi adalah salah satu metode kromatografi yang menggunakan zat penyarap atau yang biasa disebut dengan fase diam dalam wadah kaca berbentuk buret. Proses ini juga menggunakan pelarut yang berfungsi sebagai fase gerak dan nantinya fase gerak akan dilakukan proses penuangan dari atas kolom sehingga menetes atau keluar melalui bagian bawah kolom. Fase diam yang telah berada di dalam kolom nantinya akan dilewati oleh fase gerak yang dipengaruhi oleh adanya fase gerak (Syahmani dkk., 2017). Menurut Emilda dan Delfira (2023), kromatografi kolom adalah metode pemisahan kimia yang bergantung pada perbedaan distribusi zat antara fase gerak dan fase diam. Metode ini umumnya bertujuan untuk memisahkan berbagai senyawa dalam suatu campuran. Berdasarkan jenis fase diamnya, metode kromatografi dapat dibedakan

menjadi tiga yaitu kromatografi lapis tipis, kromatografi kolom, dan kromatografi kertas. Selanjutnya, apabila dilihat dari fase geraknya, terdapat empat metode, yaitu kromatografi gas, kromatografi cair, kromatografi partisi, dan kromatografi adsorpsi. Proses kolom kromatografi dapat dilihat pada Gambar 5.

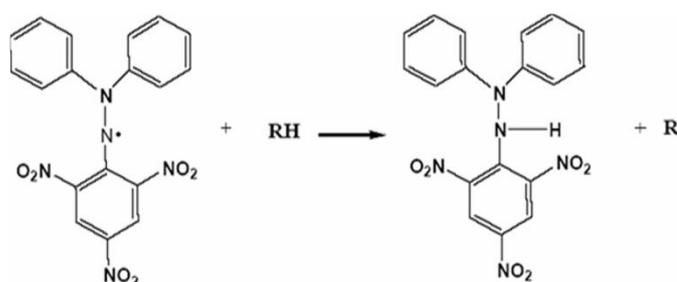


Gambar 5. Proses kolom kromatografi.
Sumber: Dokumentasi pribadi

Prinsip kerja kromatografi kolom umumnya didasarkan pada perbedaan daya serap atau absorbansi masing-masing senyawa dalam suatu campuran yang nantinya akan dipisahkan. Senyawa polar cenderung terserap lebih kuat pada gel silika, sehingga bergerak turun lebih lambat, sedangkan senyawa nonpolar memiliki daya serap yang lebih lemah dan bergerak lebih cepat. Senyawa dalam kolom terpisah membentuk pita serapan berdasarkan polaritasnya dan keluar dari kolom bersama pelarut (fase gerak) yang memiliki polaritas serupa. Pelarut atau fase gerak yang digunakan biasanya berupa pelarut murni atau campuran dari dua pelarut dengan perbandingan tertentu yang telah disesuaikan (Syahmani dkk., 2017). Menurut Fasya dkk. (2018), beberapa faktor yang dapat mempengaruhi efisiensi pemisahan pada metode kromatografi kolom yaitu jenis adsorben, eluen, diameter kolom, serta laju alir, sehingga saat melakukan pengujian dengan metode kolom kromatografi harus sangat diperhatikan agar tidak mempengaruhi prosesnya.

2.8 DPPH (2,2-difenil-1-pikrilhidrazil)

Metode DPPH merupakan singkatan dari *2,2-difenil-1-pikrilhidrazil*. Umumnya pengukuran antioksidan menggunakan metode DPPH yaitu dengan mengamati adanya perubahan warna dari radikal DPPH. Perubahan warna tersebut ditandai dengan memudarnya warna akibat adanya senyawa antioksidan yang mampu menetralkan molekul radikal bebas. Hal ini terjadi karena umumnya mekanisme kerja senyawa antioksidan dalam meredam radikal DPPH yaitu dengan mendonorkan elektronnya, sehingga radikal yang awalnya tidak stabil (elektron tidak berpasangan) menjadi stabil, perubahan tersebut dikarenakan elektron pada radikal bebas berpasangan berkat penyumbangan elektron dari antioksidan. Absorbansi DPPH pada rentang antara 515-520 nm. Metode peredaman radikal bebas DPPH ini didasarkan pada proses reduksi radikal bebas DPPH dalam larutan metanol yang memiliki warna dan ketika larutan DPPH yang berwarna ungu bertemu dengan senyawa pendonor elektron, DPPH akan mengalami reduksi dan menyebabkan warna ungu memudar sehingga berubah menjadi warna kuning yang berasal dari gugus pikril (Wulan dkk., 2019). Mekanisme reaksi antara DPPH dan senyawa antioksidan dapat dilihat pada Gambar 6.



Gambar 6. Mekanisme reaksi antara DPPH dengan senyawa antioksidan.
Sumber: Karim dkk. (2015)

Menurut Aryanti dkk. (2021), prinsip kerja metode DPPH didasarkan pada reaksi oksidasi-reduksi. DPPH merupakan radikal bebas yang dapat larut dalam senyawa polar seperti etanol dan metanol yang biasa disebut dengan radikal bebas sintetik. DPPH dapat bereaksi dengan dua mekanisme, yaitu sebagai donor atom hidrogen dan donor elektron. DPPH yang bersifat radikal akan mengambil atom

hidrogen dari senyawa antioksidan untuk mendapatkan pasangan elektron. DPPH termasuk ke dalam salah satu metode pengujian antioksidan yang sederhana, cepat, murah, dan sensitif. Metode DPPH ini tergolong metode yang mudah karena dianggap lebih sederhana dibandingkan metode lain untuk mengukur aktivitas antioksidan. Namun, metode tersebut memiliki kelemahan karena sangat rentan dipengaruhi oleh berbagai faktor. Selain itu, pelarut DPPH yang digunakan juga harus selalu disiapkan dalam kondisi yang baru.

2.9 FRAP (*Ferric Reducing Antioxidant Power*)

Metode FRAP (*Ferric Reducing Antioxidant Power*) adalah metode yang digunakan untuk menguji antioksidan dalam suatu bahan atau sampel terutama tumbuh-tumbuhan (Syarif dkk., 2015). Menurut Aryanti dkk. (2021), metode FRAP memiliki kelebihan yaitu murah, cepat, dan reagen yang digunakan cukup sederhana serta tidak menggunakan alat khusus untuk menghitung total antioksidan. Menurut Choirunnisa *et al.* (2016), kelemahan metode uji FRAP yaitu reagen bersifat kurang stabil sehingga harus dibuat baru dan harus segera digunakan. Selain itu, metode FRAP tidak spesifik dimana senyawa lain yang tidak memiliki kandungan antioksidan, namun memiliki potensial reduksi rendah dari $\text{Fe}^{3+}/\text{Fe}^{2+}$ dapat terdeteksi oleh metode FRAP ini.

Prinsip penetapan aktivitas antioksidan dengan metode pengujian FRAP yaitu kemampuan antioksidan dalam mereduksi kompleks ferri (Fe^{3+}) dari ferri-tripyridyl-triazine (TPTZ) menjadi kompleks ferro (Fe^{2+}) yang ditandai dengan perubahan warna menjadi hijau-biru dan dapat diukur pada panjang gelombang 720 nm. Reagen FRAP tidak berwarna terdiri dari campuran TPTZ, $\text{FeCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$, dan dapar asetat. Penambahan $\text{FeCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ diperlukan untuk membentuk senyawa kompleks Fe^{3+} , dan penambahan dapar asetat karena reaksi biasanya terjadi pada pH asam. Metode FRAP menggunakan senyawa antioksidan sebagai agen pereduksi (reduktan) dalam reaksi reduksi-oksidasi. Mekanisme kerja metode FRAP yaitu dengan cara menginaktivasi radikal bebas dengan transfer elektron (Aryanti dkk., 2021).

III. BAHAN DAN METODE

3.1 Tempat dan Waktu Penelitian

Penelitian ini dilaksanakan di Laboratorium Pengujian Mutu Hasil Pertanian, Pascasarjana Fakultas Pertanian dan Laboratorium Budidaya Perikanan, Jurusan Budidaya Perairan dan Kelautan, Fakultas Pertanian, Universitas Lampung pada bulan Desember tahun 2024 hingga Maret tahun 2025.

3.2 Bahan dan Alat

Bahan-bahan yang digunakan dalam penelitian ini yaitu simplisia kulit kayu hujan emas, alkohol 96%, kloroform, metanol p.a, etil asetat, heksan, *aluminium foil*, *cling wrap*, aquades, silika gel 100 g, aseton, bubuk DPPH (2,2 *diphenyl-1-picrylhydrazil*), asam askorbat, asam trikloroasetat (TCA), FeCl_3 , dapar fosfat (0,2 M, pH 6,6), kalium ferrisianida, NaOH, KH_2PO_4 , dan kertas saring.

Alat-alat yang digunakan dalam penelitian ini meliputi timbangan analitik, *vacuum rotary evaporator*, *laminar air flow*, vortex, oven, batang pengaduk, spatula, Erlenmeyer (*Pyrex*), pinset, pensil, penjepit tabung, pH meter, gelas ukur, gelas beaker, labu ukur, labu didih, labu pisah, mikropipet, pipet ukur, pipet volume, pipet tetes, *rubble bulb*, corong gelas, penangas air, sentrifuge, tabung reaksi, rak tabung reaksi, tabung sentrifuge, kuvet, vial gelap, pelat TLC (*Thin Layer Chromatography*), kolom kromatografi, dan spektrofotometer UV-Vis.

3.3 Metode Penelitian

Penelitian ini dilakukan dengan metode deskriptif 3 kali ulangan dalam proses pengujiannya yaitu fraksi terbaik hasil elusi kolom kromatografi yang memiliki persen penghambatan (% inhibisi) radikal bebas tertinggi dilakukan pengujian lebih lanjut terhadap aktivitas antioksidan dengan deret konsentrasi senyawa 0,25 ppm, 0,50 ppm, 0,75 ppm, 1 ppm, 1,25 ppm, dan 1,50 ppm yang bertujuan untuk mengetahui nilai IC₅₀ pada deret konsentrasi rendah. Data yang diperoleh dianalisis secara deskriptif dan ditampilkan dalam bentuk tabel serta grafik. Pengujian aktivitas antioksidan dilakukan dengan metode DPPH (*2,2-difenil-1-pikrilhidrazil*) dan metode FRAP (*Ferric Reducing Antioxidant Power*).

3.4 Pelaksanaan Penelitian

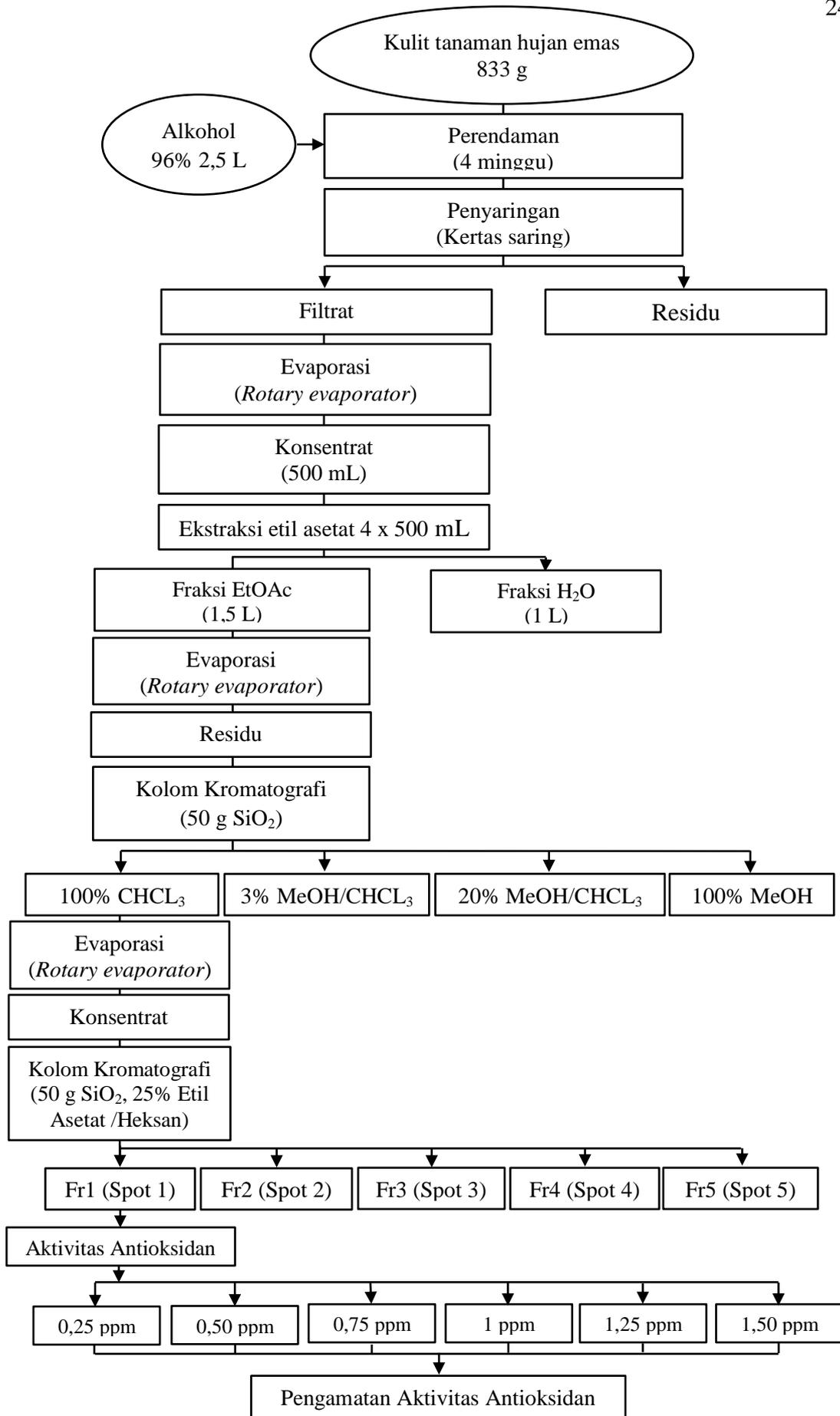
3.4.1 Ekstraksi dan isolasi kulit hujan emas (*Senna multijuga*)

Proses ekstraksi kulit hujan emas mengacu pada prosedur Subeki dan Muhartono (2015) yang telah dimodifikasi dengan tahap awal yaitu simplisia kulit hujan emas sebanyak 833 g direndam dalam pelarut alkohol 96% sebanyak 2,5 liter di dalam wadah maserasi yang tertutup rapat dan sesekali diaduk. Kemudian, dидiamkan selama 4 minggu pada suhu ruang dan dijauhkan dari paparan sinar matahari langsung. Setelah maserasi selama 4 minggu, disaring untuk mendapatkan filtrat. Filtrat ditampung dalam penampung/wadah maserasi. Filtrat yang didapatkan kemudian dipekatkan menggunakan *rotary vacuum evaporator* pada suhu 40°C hingga terbentuk ekstrak pekat sebanyak 500 mL. Kemudian, diekstrak menggunakan etil asetat sebanyak 4 kali dalam 500 mL yang nantinya menghasilkan fraksi etil asetat sebanyak 1,5 L dan fraksi air sebanyak 1 L. Selanjutnya, fraksi etil asetat dievaporasi dengan suhu 50°C selama 30 menit menggunakan *rotary evaporator* sehingga menghasilkan residu. Kemudian, residu yang dihasilkan dilakukan proses kolom kromatografi dengan silika 50 g dan eluen 100 % CHCl₃ sebanyak 1 L yang terpilih dari ketiga eluen lainnya berdasarkan metode TLC yaitu dengan melihat spot atau noda yang dihasilkan

pada plat TLC. Eluen 100 % CHCl_3 tersebut yang menghasilkan spot atau noda pada plat TLC sehingga digunakan dalam proses kolom kromatografi.

Hasil dari proses kolom kromatografi dengan eluen 100 % CHCl_3 dievaporasi kembali menggunakan *rotary evaporator* hingga diperoleh konsentrat.

Konsentrat yang diperoleh dilakukan fraksinasi kolom kromatografi menggunakan kombinasi eluen terbaik yaitu 25% etil asetat/heksan sebanyak 1 L dan diperoleh fraksi yang ditampung pada tabung reaksi sebanyak 135 tabung (kombinasi eluen terbaik diperoleh menggunakan pengujian metode TLC yaitu dengan melihat spot atau noda yang dihasilkan). Kemudian, fraksi-fraksi tersebut dilakukan pengujian dengan metode TLC (Gambar 16,Lampiran), sehingga menghasilkan pola pemisahan spot atau noda pada pelat TLC yang nantinya akan dikelompokkan berdasarkan letak spot yang sama atau sejajar. Pengujian tersebut menghasilkan 5 kelompok fraksi yaitu Fr1 (spot 1, tabung 13-23), Fr2 (spot 2, tabung 31-36), Fr3 (spot 3, tabung 49-54), Fr4 (spot 4, tabung 85-90), dan Fr5 (spot 5, tabung 125-130), lalu masing-masing fraksi tersebut akan dilanjutkan dengan pengujian aktivitas antioksidan dengan metode DPPH pada konsentrasi sampel 250 ppm untuk memperoleh fraksi terbaik dengan persen penghambatan (% inhibisi) radikal bebas tertinggi, yang kemudian dari pengujian tersebut diperoleh Fr1 (spot 1) sebagai fraksi terbaik. Selanjutnya, Fr1 (spot 1) dilakukan uji lanjut aktivitas antioksidan metode DPPH dan FRAP dengan deret konsentrasi senyawa yaitu 0,25 ppm, 0,5 ppm, 0,75 ppm, 1 ppm, 1,25 ppm, dan 1,50 ppm yang bertujuan untuk mengetahui nilai IC_{50} pada deret konsentrasi rendah dari ekstrak kulit hujan emas. Diagram alir proses ekstraksi, isolasi, dan pengujian aktivitas antioksidan kulit hujan emas dapat dilihat pada Gambar 7.



Gambar 7. Diagram alir ekstraksi dan pengujian antioksidan kulit hujan emas.
Sumber: Subeki dan Muhartono (2015) yang telah dimodifikasi

3.4.2 Persiapan sampel pengujian aktivitas antioksidan metode DPPH

Proses persiapan sampel dalam pengujian aktivitas antioksidan metode DPPH ini mengacu pada prosedur Wulan dkk. (2019) yang telah dimodifikasi dengan tahap yaitu sampel simplisia kulit hujan emas yang telah diekstraksi akan dilanjutkan ke proses kolom kromatografi dengan eluen 100% kloroform (CHCl_3) sehingga menghasilkan 5 fraksi yang telah dikelompokkan berdasarkan keberadaan letak spot atau noda dengan metode TLC. Kelima fraksi yang dihasilkan tersebut dievaporasi terlebih dahulu, lalu masing-masing fraksi dilakukan proses pembuatan larutan induk dengan metanol p.a berkonsentrasi 1000 ppm sebanyak 5 mL dan kemudian diencerkan menjadi larutan dengan konsentrasi 250 ppm. Proses pengenceran untuk mendapatkan larutan berkonsentrasi 250 ppm dapat dilakukan dengan memipet larutan induk sebanyak 0,25 mL, kemudian ditambahkan dengan metanol p.a sebanyak 0,75 mL hingga volume larutan menjadi 1 mL dan larutan sampel siap digunakan dalam pengujian aktivitas antioksidan untuk memperoleh fraksi terbaik. Fr1 (spot 1) yang merupakan fraksi terbaik (persen penghambatan radikal bebas tertinggi) disiapkan dengan berbagai konsentrasi dari larutan induk 10 ppm (dari larutan induk 1000 ppm diencerkan menjadi 10 ppm) sebanyak 5 mL yaitu 0,25 ppm, 0,5 ppm, 0,75 ppm, 1 ppm, 1,25 ppm, dan 1,50 ppm yang masing-masing volume larutannya sebanyak 5 mL. Setelah itu, sampel dapat dilanjutkan ke tahap berikutnya untuk dilakukan pengujian aktivitas antioksidan dengan deret konsentrasi.

3.4.3 Persiapan sampel pengujian aktivitas antioksidan metode FRAP

Proses persiapan sampel dalam pengujian aktivitas antioksidan metode FRAP ini mengacu pada prosedur Vijayalashmi and Ruckmani (2016) dan Maryam dkk. (2015) yang telah dimodifikasi dengan tahap yaitu sampel simplisia kulit hujan emas dilakukan proses maserasi dan menghasilkan filtrat yang kemudian dievaporasi dan diekstraksi dengan etil asetat sehingga menghasilkan fraksi etil asetat dan fraksi air. Kemudian, fraksi etil asetat yang diperoleh dilakukan proses evaporasi dan kolom kromatografi dengan eluen 100% kloroform (CHCl_3)

sehingga menghasilkan 5 fraksi yang dikelompokkan berdasarkan letak spot atau noda dengan metode TLC. Lalu, fraksi terbaik (persen penghambatan radikal bebas tertinggi) yang telah diidentifikasi terlebih dahulu dengan metode DPPH yaitu Fr1 (spot 1) dievaporasi kembali dan dilakukan proses pembuatan larutan induk berkonsentrasi 1000 ppm dengan metanol p.a sebanyak 5 mL. Kemudian, dari larutan induk diencerkan menjadi larutan berkonsentrasi 10 ppm dan dilanjutkan dengan pembuatan larutan berbagai konsentrasi yaitu 0,25 ppm, 0,5 ppm, 0,75 ppm, 1 ppm, 1,25 ppm, dan 1,50 ppm. Setelah itu, sampel dapat dilanjutkan ke tahap berikutnya untuk dilakukan pengujian aktivitas antioksidan dengan deret konsentrasi.

3.5 Pengamatan

3.5.1 Aktivitas antioksidan metode DPPH

Sampel fraksi ekstrak kloroform kulit hujan emas dianalisis aktivitas antioksidannya menggunakan metode DPPH mengacu pada prosedur Wulan dkk. (2019) yang telah dimodifikasi. DPPH (*2,2-difenil-1-pikrilhidrazil*) umumnya merupakan bubuk kristal berwarna gelap yang terdiri dari melokul radikal bebas yang stabil. Prinsip pengujian dengan metode DPPH sendiri adalah dengan mengukur perubahan warna radikal DPPH yang memudar karena adanya antioksidan yang berfungsi menetralkan molekul radikal bebas (Wulan dkk., 2019). Pengujian aktivitas antioksidan dengan metode DPPH terdapat beberapa tahapan, yaitu pembuatan reagen DPPH, larutan blanko, larutan standar vitamin C, pengukuran absorbansi dan penentuan nilai *Inhibition Concentration* (IC_{50}).

A. Pembuatan reagen DPPH

Tahapan pada proses pembuatan larutan DPPH 1 mM diawali dengan penimbangan serbuk DPPH sebanyak 9,9 mg yang dilakukan penimbangan langsung pada vial gelap. Kemudian, labu ukur yang akan digunakan dilapisi dengan *aluminium foil* sampai dibawah batas tanda yang digunakan. Selanjutnya,

serbuk DPPH yang telah ditimbang dan berada pada vial gelap dilarutkan langsung dengan metanol p.a. Setelah itu, larutan serbuk DPPH tersebut dimasukkan ke dalam labu ukur berkapasitas 25 mL, proses pelarutan diulangi hingga serbuk DPPH pada vial gelap terbilas sempurna. Selanjutnya, metanol p.a ditambahkan ke dalam labu ukur yang berisi larutan DPPH hingga mencapai tanda batas, lalu dihomogenkan. Larutan DPPH siap digunakan dan dapat disimpan dalam vial gelap atau labu ukur yang dilapisi *aluminium foil* untuk melindunginya dari paparan sinar matahari langsung.

B. Larutan blanko

Pembuatan larutan blanko dimulai dengan pengambilan 1 mL larutan DPPH 1 mM dan dimasukkan ke dalam labu ukur 10 mL. Kemudian, metanol p.a ditambahkan hingga mencapai tanda batas dan dihomogenkan. Setelah itu, larutan yang telah homogen dipindahkan ke vial gelap atau dapat tetap berada di labu ukur yang telah dilapisi dengan *aluminium foil*. Larutan yang dihasilkan berperan sebagai blanko atau kontrol negatif dengan konsentrasi larutan 0,1 mM, yang selanjutnya akan diukur nilai absorbansinya pada panjang gelombang 517 nm.

C. Larutan standar vitamin C

Pembuatan larutan standar vitamin C 100 ppm dimulai dengan menimbang 0,01 g asam askorbat dan dimasukkan ke dalam labu ukur 100 mL. Kemudian, dilarutkan dengan metanol p.a sampai tanda batas. Proses selanjutnya yaitu membuat deret larutan standar vitamin C dengan konsentrasi 2 ppm, 4 ppm, 6 ppm, 8 ppm, dan 10 ppm. Pembuatan deret larutan standar vitamin C tersebut dengan cara memipet masing-masing 0,2 mL; 0,4 mL; 0,6 mL; 0,8 mL; dan 1 mL dari larutan induk 100 ppm. Setelah itu, masing-masing dimasukkan ke dalam labu ukur 10 mL, lalu ditambahkan 4 mL metanol p.a, 1 mL larutan DPPH 1 mM, dan ditambahkan lagi dengan metanol p.a hingga mencapai tanda batas yang

setelah itu dihomogenkan. Absorbansi larutan vitamin C dapat diukur pada panjang gelombang 517 nm.

D. Pengukuran absorbansi

Tahap pengukuran absorbansi ekstrak kulit hujan emas diawali dengan memasukkan 1 mL larutan sampel dari setiap konsentrasi senyawa yang diuji secara terpisah ke dalam labu ukur 10 mL. Kemudian, masing-masing labu ukur ditambahkan 4 mL metanol p.a, 1 mL larutan DPPH 1 mM, dan dihomogenkan agar tercampur sempurna. Nilai absorbansi DPPH yang dihasilkan berfungsi sebagai acuan dalam penentuan nilai aktivitas antioksidan suatu sampel. Pengujian aktivitas antioksidan menggunakan metode DPPH dilakukan dengan mengukur absorbansi deret larutan uji dan deret larutan standar vitamin C menggunakan spektrofotometri UV-Vis pada panjang gelombang 517 nm, setelah melalui proses inkubasi selama 30 menit (Sulistiyani dkk., 2024). Apabila nilai absorbansi dari ekstrak kulit hujan emas telah diperoleh, kemudian dibandingkan dengan absorbansi DPPH untuk menentukan persentase aktivitas antioksidannya. Persentase inhibisi dapat dihitung menggunakan rumus berikut.

$$\% \text{ Inhibisi} = \frac{\text{Abs. kontrol} - \text{Abs. sampel}}{\text{Abs. kontrol}} \times 100$$

Keterangan:

Abs. kontrol = Absorbansi kontrol/blanko (nilai absorbansi DPPH)

Abs. sampel = Absorbansi sampel (nilai absorbansi sampel)

E. Penentuan nilai *Inhibition Concentration* (IC₅₀)

Aktivitas antioksidan ditentukan berdasarkan nilai IC₅₀. Penentuan nilai *Inhibition Concentration* (IC₅₀) dilakukan dengan menganalisis regresi linier yaitu

hubungan antara konsentrasi sampel dengan persen penangkapan radikal DPPH. IC_{50} adalah nilai yang menunjukkan konsentrasi ekstrak yang memiliki aktivitas antioksidan sebesar 50%. Analisis persentase inhibisi yang diperoleh dimasukkan ke dalam persamaan regresi dengan konsentrasi sampel. Nilai IC_{50} untuk setiap konsentrasi sampel dihitung menggunakan rumus persamaan regresi linier (Purwanto dkk., 2017). Hasil perhitungan aktivitas antioksidan dimasukkan ke dalam persamaan garis di bawah ini untuk membuat kurva standar.

$$y = bx + a$$

Keterangan:

x = konsentrasi (ppm) sebagai absis

y = nilai % aktivitas antioksidan/nilai persentase inhibisi sebagai ordinat

3.5.2 Aktivitas antioksidan metode FRAP

Pengujian aktivitas antioksidan menggunakan metode FRAP (*Ferric Reducing Antioxidant Power*) ini mengacu pada prosedur Vijayalashmi and Ruckmani (2016) dan Maryam dkk. (2015) yang telah dimodifikasi. Penentuan aktivitas antioksidan menggunakan metode FRAP digunakan untuk menentukan total kandungan antioksidan dari suatu bahan yang berdasarkan kemampuan senyawa antioksidan untuk mereduksi ion Fe^{3+} menjadi Fe^{2+} . Prinsip pengujian metode FRAP ini yaitu reaksi transfer elektron dari antioksidan ke senyawa Fe^{3+} -TPTZ. Pengukuran absorbansi dengan metode FRAP ini dilakukan pada panjang gelombang tertentu. Semakin tinggi absorbansi yang dihasilkan, maka semakin besar kemampuan reduksi suatu senyawa yang mengindikasikan aktivitas antioksidan yang lebih tinggi (Maryam dkk., 2015). Pengujian aktivitas antioksidan metode FRAP ini akan melalui beberapa tahap yaitu tahap persiapan reagen, persiapan larutan blanko, persiapan larutan standar asam askorbat, pengukuran absorbansi, dan penentuan *Inhibition Concentration* (IC_{50}).

A. Persiapan reagen

1. Larutan dapar fosfat 0,2 M, pH 6,6

Persiapan larutan dapar fosfat diawali dengan menimbang 2 gram NaOH dan dimasukkan ke dalam labu ukur. Setelah itu, dilarutkan dengan aquades hingga tepat 250 mL dalam labu ukur. Kemudian, sampel sebanyak 6,8 g KH_2PO_4 (Monopotasium fosfat) yang dilarutkan dengan aquades 250 mL dalam labu ukur. Selanjutnya, dipipet sebanyak 16,4 mL NaOH dimasukkan dalam labu ukur dan dicampurkan 50 mL KH_2PO_4 , selanjutnya diukur sampai pH 6,6 dan dicukupkan dengan aquades hingga 200 mL.

2. Larutan kalium ferisianida 1%

Pembuatan larutan kalium ferisianida 1% hanya dengan beberapa tahap. Proses pembuatan diawali dengan melarutkan 1 gram kalium ferisianida dalam aquades. Kemudian, dilakukan pengenceran dalam labu ukur 100 mL. Larutan kalium ferisianida 1% siap untuk digunakan.

3. Larutan FeCl_3 0,1%

Pembuatan larutan FeCl_3 0,1% dilakukan dengan proses pelarutan dan pengenceran. Proses pembuatannya diawali dengan melarutkan 0,1 gram FeCl_3 dalam aquades. Setelah itu, dilanjutkan dengan proses pengenceran dalam labu ukur 100 mL. Larutan FeCl_3 0,1% siap digunakan untuk proses selanjutnya.

4. Larutan asam trikloroasetat (TCA) 10%

Pembuatan larutan asam trikloroasetat (TCA) 10% sama dengan pembuatan larutan oksalat 1%, kalium ferisianida 1%, dan FeCl_3 0,1% yaitu dengan proses pelarutan dan pengenceran. Proses tersebut diawali dengan melarutkan 1 gram

TCA dalam aquades. Kemudian, dilanjutkan dengan proses pengenceran dalam labu ukur 10 mL. Setelah itu, larutan asam trikloroasetat (TCA) 10% siap untuk digunakan dalam proses pengujian aktivitas antioksidan.

B. Larutan blanko

Pembuatan larutan blanko dilakukan dengan proses pencampuran beberapa larutan pereaksi yaitu sebanyak 1 mL metanol p.a, 1 mL dapar fosfat 0,2 M, pH 6,6 dan 1 mL larutan $K_3Fe(CN)_6$ 1% dimasukkan ke dalam tabung reaksi, kemudian diinkubasi selama 20 menit pada suhu 50°C. Setelah itu, larutan ditambahkan TCA sebanyak 1 mL. Selanjutnya, disentrifuge pada kecepatan 3000 rpm selama 10 menit dan setelah proses sentrifuge selesai lapisan atas dipipet sebanyak 1 mL ke dalam labu ukur 5 mL. Kemudian, ditambahkan 1 mL aquades, 0,5 mL $FeCl_3$ 0,1% dan dicukupkan dengan metanol p.a hingga tanda batas. Larutan didiamkan selama 30 menit dan diukur absorbansinya menggunakan spektrofotometri UV-Vis pada panjang gelombang 720 nm.

C. Larutan standar asam askorbat

Pembuatan larutan standar 100 ppm diawali dengan penimbangan asam askorbat sebanyak 10 mg dan dimasukkan ke dalam labu ukur 100 mL. Selanjutnya, asam askorbat tersebut dilarutkan dengan metanol p.a hingga mencapai batas labu ukur 100 mL. Kemudian, dari larutan baku 100 ppm diambil masing-masing 0,2 mL; 0,4 mL; 0,6 mL; 0,8 mL; dan 1,0 mL lalu ditempatkan dalam labu ukur 10 mL yang berbeda dan diencerkan dengan metanol p.a hingga 10 mL yang kemudian dihomogenkan. Konsentrasi larutan standar 100 ppm asam askorbat yakni 2, 4, 6, 8 dan 10 ppm.

Konsentrasi larutan yang berbeda dalam seri tersebut masing-masing diambil sebanyak 1 mL dan dimasukkan ke dalam tabung reaksi. Selanjutnya, dilakukan perlakuan serupa di setiap tabung reaksi yaitu dengan menambahkan 1 mL dapar fosfat 0,2 M, pH 6,6 dan 1 mL larutan $K_3Fe(CN)_6$ 1% yang kemudian

dihomogenkan. Lalu, tabung-tabung reaksi tersebut diinkubasi pada suhu 50°C selama 20 menit. Setelah itu, larutan ditambahkan TCA sebanyak 1 mL dan dilanjutkan dengan proses sentrifuge pada kecepatan 3000 rpm selama 10 menit. Setelah proses sentrifuge selesai lapisan atas dipipet sebanyak 1 mL ke dalam labu ukur 5 mL. Kemudian, ditambahkan 1 mL aquades, 0,5 mL FeCl₃ 0,1% dan dicukupkan dengan metanol p.a hingga tanda batas. Larutan didiamkan selama 30 menit dan diukur absorbansinya menggunakan spektrofotometri UV-Vis pada panjang gelombang 720 nm.

D. Pengukuran absorbansi

Pengukuran absorbansi fraksi terbaik yang menghasilkan aktivitas antioksidan tertinggi dilakukan dengan beberapa tahap, yaitu diawali dengan masing-masing deret konsentrasi yang dibuat dipipet 1 mL, ditambahkan 1 mL dapar fosfat 0,2 M (pH 6,6) dan 1 mL K₃Fe(CN)₆ 1%. Setelah itu, diinkubasi selama 20 menit dengan suhu 50°C. Selanjutnya, ditambahkan 1 mL TCA lalu disentrifuge dengan kecepatan 3000 rpm selama 10 menit. Lalu, setelah disentrifuge larutan dipipet 1 mL lapisan bagian atas ke dalam labu ukur 5 mL yang kemudian ditambahkan 1 mL aquades, 0,5 mL FeCl₃ 0,1% dan dicukupkan dengan metanol p.a hingga tanda batas. Larutan didiamkan selama 30 menit dan diukur absorbansinya menggunakan spektrofotometri UV-Vis pada panjang gelombang 720 nm. Apabila nilai absorbansi dari sampel fraksi ekstrak kulit hujan emas telah diketahui, kemudian dibandingkan dengan absorbansi kontrol untuk menentukan persentase aktivitas antioksidannya. Berikut dapat dilihat rumus perhitungan persentase inhibisi pada metode FRAP (Magfira, 2018).

$$\% \text{ Inhibisi} = \frac{\text{Abs. sampel} - \text{Abs. kontrol}}{\text{Abs. sampel}} \times 100$$

Keterangan:

Abs. kontrol = Absorbansi kontrol/blanko (absorbansi yang berisi radikal yang utuh)

Abs. sampel = Absorbansi sampel (nilai absorbansi sampel)

E. Penentuan nilai *Inhibition Concentration* (IC₅₀)

Umumnya aktivitas antioksidan dinyatakan dengan *inhibition concentration* 50% atau IC₅₀ yaitu konsentrasi sampel ekstrak yang dapat mereduksi ion Fe sebanyak 50% dan sebelum dilakukan perhitungan nilai IC₅₀, harus diketahui terlebih dahulu persentase inhibisi sampel uji (Magfira, 2018). Hasil persentase inhibisi yang diperoleh dari perhitungan, dilanjutkan dengan perhitungan secara regresi linier (x,y) untuk mendapatkan nilai IC₅₀ yang dalam perhitungan ini x sebagai konsentrasi (ppm) dan y sebagai persentase aktivitas (%). IC₅₀ sampel dan pembanding diperoleh dengan persamaan regresi linear sebagai berikut.

$$y = bx + a$$

Keterangan:

x = konsentrasi (ppm) sebagai absis

y = nilai % aktivitas antioksidan/nilai persentase inhibisi sebagai ordinat

Nilai IC₅₀ didapatkan dari x setelah mengganti y dengan 50. Nilai IC₅₀ yang semakin kecil, menunjukkan semakin tinggi aktivitas antioksidan dari sampel tersebut (Magfira, 2018).

V. KESIMPULAN DAN SARAN

5.1 Kesimpulan

Berdasarkan hasil penelitian yang telah dilakukan diperoleh kesimpulan sebagai berikut.

1. Karakteristik fisik hasil elusi kolom kromatografi ekstrak kulit hujan emas fraksi-1 berwarna kuning berbentuk padatan amorf, fraksi-2 berwarna kuning pekat berbentuk ekstrak pekat, fraksi-3 berwarna cokelat gelap berbentuk cairan kental, fraksi-4 berwarna hijau berbentuk cairan, dan fraksi-5 berwarna hijau pekat berbentuk cairan kental.
2. Hasil elusi kolom kromatografi ekstrak kulit hujan emas fraksi terbaik yaitu fraksi-1 menunjukkan aktivitas antioksidan kuat dengan nilai IC_{50} pada metode DPPH sebesar 11,521 mg/L dan metode FRAP sebesar 10,749 mg/L.

5.2 Saran

Saran untuk penelitian selanjutnya adalah perlu dilakukan penelitian lebih lanjut terkait aktivitas antioksidan ekstrak kloroform kulit hujan emas dengan jenis metode pengujian lainnya seperti ABTS, CUPRAC, ORAC, CAA dan amprometri serta dilakukan pengaplikasian langsung ke bahan pangan untuk menjadi *ingredient* pangan fungsional dengan fraksi terbaik yang memiliki aktivitas antioksidan tertinggi.

DAFTAR PUSTAKA

- Alshehri, M. M., Quispe, C., Herrera-Bravo, J., Sharifi-Rad, J., Tutuncu, S., Aydar, E. F., Topkaya, C., Mertdinc, Z., Ozcelik, B., Aital, M., Kumar, N. V. A., Lapava, N., Rajkovic, J., Ertani, A., Nicola, S., Semwal, P., Painuli, S., González-Contreras, C., Martorell, M., Butnariu, M., Bagiu, I. C., Bagiu, R. V., Barbhai, M. D., Kumar, M., Daştan, S. D., Calina, D., and Cho, W. C. 2022. A review of recent studies on the antioxidant and anti infectious properties of *Senna* plants. *Oxidative Medicine and Cellular Longevity*. 2022(2): 1-38.
- Amaliah, R., Pusmarani, J., dan Nasir, N. H. 2024. Skrining fitokimia dan uji aktivitas antioksidan fraksi air, etil asetat dan n heksan kulit batang kayu Jawa (*Lannea grandis* (Dennst.) Engl) dengan metode FRAP (*Ferric Reducing Antioxidant Power*). *Jurnal Pharmacia Mandala Waluya*. 3(6): 364-374.
- Amorim, I. L. D., Davide, A. C., Ferreira, R. A., and Chaves, M. M. F. 2008. Morfologia de frutos, sementes, plântulas e mudas de *Senna multijuga* var. *lindleyana* (Gardner) H. S. Irwin and Barneby *leguminosae caesalpinioideae*. *Revista Brasil. Bot.* 31(3): 507-516.
- Aprira, 2022. Penggunaan ekstrak buah kecubung sebagai agen eutanasia mencit putih (*Mus musculus*). *Jurnal Pengelolaan Laboratorium Sains dan Teknologi*. 2(1): 28-34.
- Arrieta, J. and Anges, A. 2004. Antimicrobial, antioxidant and toxic effects of *Senna skinneri* Bentham, Irwin and Barneby (*Leguminosae*). *Journal of Medicinal Plants Research*. 13(8): 123–130.
- Aryanti, R., Perdana, F., dan Rizkio, R. A. M. S. 2021. Telaah metode pengujian aktivitas antioksidan pada daun teh hijau (*Camellia sinensis* (L.) Kuntze). *Jurnal Surya Medika (JSM)*. 7(1): 15-24.
- Asmorowati, H. dan Lindawati, N. Y. 2019. Penetapan kadar flavonoid total alpukat (*Persea americana* Mill.) dengan metode spektrofotometri. *Jurnal Ilmiah Farmasi*. 15(2): 51-63.
- Asrosi, M. R., Sutrisno., dan Wijaya, H. W. 2020. *Metanol dan Etanol: Produksi, Karakterisasi, Eksplorasi, dan Pemberdayaan Sumber Daya Alamnya*.

Prosiding SNKP 2020. Jurusan Kimia. Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam. Universitas Negeri Malang. Semarang. Hal. 179-196.

- Antolovich, M., Prenzler, P. D., Patsalides, E., McDonald, S., and Robards, K. 2002. Methods for testing antioxidant activity. *Analyst*. 127(1): 183–198.
- Badan Pengawas Obat dan Makanan. 2021. *Peraturan Badan Pengawas Obat dan Makanan Nomor 25 Tahun 2021 Tentang Penerapan Cara Pembuatan Obat Tradisional yang Baik*. BPOM. Jakarta.
- Bakti, T. E. K. dan Mahfur, M. 2023. Skrining fitokimia dan analisis kadar flavonoid total fraksi etil asetat kulit buah durian merah (*Durio graveolens* Becc.) dengan metode spektrofotometri Uv-Vis. *Journal of Pharmacy Science and Technology*. 4(1): 30-35.
- Brand-Williams, W., Cuvelier, M. E., and Berset, C. 1995. Use of a free radical method to evaluate antioxidant activity. *LWT-Food Science and Technology*. 28(1): 25–30.
- Cai, L. 2018. Thin Layer Chromatography. *Curr. Protoc. Essent. Lab. Tech.* 8(1): 631-638.
- Carvalho, D.A., Oliveira filho, A.T., Vilela, E. A., and Curi, N. 2000. Florística e estrutura da vegetação arbórea de um fragmento de floresta semidecidual às margens do Reservatório da Usina Hidrelétrica Dona Rita (Itambé do Mato Dentro, MG). *Acta Botânica Brasilica, São Paulo*. 14(1): 37-55.
- Chaves, N., Santiago, A., dan Alías, J. C. 2020. Role of phenolic compounds in plant defense against pathogens and herbivores. *Molecules*. 25(17): 4240.
- Chen, H., Xiao, H., and Pang, J. 2020. Parameter optimization and potential bioactivity evaluation of a *Betulin* extract from white birch bark. *Plants*. 9(3): 1-15.
- Choi, I., Cha, H., and Lee, Y. 2014. Physicochemical and antioxidant properties of black garlic. *Molecules*. 19(10): 16811–16823.
- Choirunnisa, A. R., Fidrianny, I., and Ruslan, K. 2016. Comparison of five antioxidant assays for estimating antioxidant capacity from three *Solanum* sp. extracts. *Asian Journal of Pharmaceutical and Clinical Research*. 9(2): 123–128.
- Cömert, E. D., Mogol, B. A., and Gökmen, V. 2020. Relationship between color and antioxidant capacity of fruits and vegetables. *Current Research in Food Science*. 2(3): 1–10.
- Cowan, M. M. 1999. Plant products as antimicrobial agents. *Clinical Microbiology Reviews*. 12(4): 564-582.

- Dai, J. and Mumper, R. J. 2010. Plant phenolics: extraction, analysis and their antioxidant and anticancer properties. *Molecules*. 15(10): 7313–7352.
- Damayanthi, E., Lestari, R., dan Suprihatin. 2011. Penentuan aktivitas antioksidan dengan metode DPPH pada ekstrak tanaman obat. *Jurnal Ilmu Kefarmasian Indonesia*. 9(2): 136–142.
- de Oliveira, T. C. T., Morales-Silva, T., Brandao-Dias, P. F. P., Egan, S. P., Zaldívar-Riveron, A., Oliveira, G. M., da Silva, V. H. D., and Faria, L. D. B. 2023. The relationship between host plant traits and biodiversity across three sympatric seed-feeding tri-trophic systems in a tropical region of Brazil. *Insect Conservation and Diversity*. 16(5): 1-3.
- Dhurhanian, C. E. dan Novianto, A. 2019. Uji kandungan fenolik total dan pengaruhnya terhadap aktivitas antioksidan dari berbagai bentuk sediaan sarang semut (*Myrmecodia pendens*). *Jurnal Farmasi dan Ilmu Kefarmasian Indonesia*. 5(2): 62.
- Djumidar., Razak, A. R., Ridhay, A., Sumarni, N. K., Syamsuddin., Jusman., Nurhaeni., dan Rahim, E. A. 2022. Aktivitas antibakteri ekstrak kulit batang tumbuhan johar (*Senna siamea* Lam) pada berbagai polaritas pelarut. *Kovalen: Jurnal Riset Kimia*. 8(2): 184-195.
- Djunaidi, M. C., Bhakti, D. K., Hastuti, R., dan Maharani, N. D. 2021. Pemisahan logam timbal dalam limbah cair simulasi menggunakan *Supported Liquid Membranes* (SLM) berpendukung dengan senyawa pembawa sinergi D2EHPA. *Greensphere: J. Environ. Chem*. 5(1): 1-8.
- Dutra, R. C., Leite, D. F. P., Bicca, M. A., Yunes, R. A., and Calixto, J. B. 2009. Antinociceptive and anti-inflammatory effects of the ethanol extract of the roots of *Senna multijuga* (Fabaceae). *Journal of Ethnopharmacology*. 120(2): 212–216.
- Emilda. dan Delfira, N. 2023. Pemanfaatan silika gel 70-230 *mesh* bekas sebagai pengganti fase diam kromatografi kolom pada praktikum kimia organik. *Indonesian Journal of Laboratory*. 6(1): 45-51.
- Evita, D., Nofita., dan Ulfa, A. M. 2022. Efektivitas ekstrak etil asetat daun kemangi (*Ocimum sanctum* L.) sebagai larvasida nyamuk *Aedes aegypti*. *Jurnal Farmasi Malahayati*. 5(1): 10-21.
- Fan, S., Yang, G., Zhang, J., Li, J., and Bai, B. 2020. Optimization of ultrasound-assisted extraction using response surface methodology for simultaneous quantitation of six flavonoids in flos *Sophorae immaturus* and activity. *Molecules*. 25(8): 1-24.
- Farid, A., Kamel, D., Montaser, S. A., Ahmed, M. M., El Amir, M., and El Amir, A. 2020. Synergetic role of senna and fennel extracts as antioxidant, anti-

inflammatory and anti-mutagenic agents in irradiated human blood lymphocyte cultures. *J.Radiat. Res.Appl. Sci.* 13(1): 191–199.

- Fasya, A. G., Tyas, A. P., dan Mubarakah, F. A. 2018. Variasi diameter kolom dan rasio sampel-silika pada isolasi steroid dan triterpenoid alga merah *Eucheuma cottonii* dengan kromatografi kolom basah. *Journal Of Chemistry.* 6 (2): 57-64.
- Gulcin, I. 2020. Antioxidants and antioxidant methods: an updated overview. *Archives of Toxicology.* 94(3): 651–715.
- Harborne, J.B. 1998. *Textbook of Phytochemical Methods. A Guide to Modern Techniques of Plant Analysis.* 5th Edition, Chapman and Hall Ltd. London. Hal. 21-72.
- Hasan, H., Thomas, N. A., Hiola, F., Ramadhani, F. N., dan Ibrahim, P. A. S. 2022. Skrining fitokimia dan uji aktivitas antioksidan kulit batang matoa (*Pometia pinnata*) dengan metode *1,1-Diphenyl-2 picrylhidrazyl* (DPPH). *Indonesian Journal of Pharmaceutical Education.* 2(1): 52-66.
- Hasler, C. M. 2002. Functional foods: benefits, concerns and challenges a position paper from the American council on science and health. *The Journal of Nutrition.* 132(12): 3772–3781.
- Hidayati, S. dan Masykuroh, A. 2023. Uji aktivitas antioksidan ekstrak etanol bunga pulutan (*Urena Lobata* L.) menggunakan metode DPPH. *Jurnal Komunitas Farmasi Nasional.* 3(1): 494-508.
- Hostettmann, K. and Marston, A. 1995. *Saponins.* Cambridge University Press. New York. Hal. 564.
- Ikshar, I., Salempa, P., dan Hermawati, N. 2022. Isolasi dan identifikasi senyawa metabolit sekunder ekstrak metanol daun tumbuhan tembelekan (*Lantana camara* Linn.). *Jurnal Chemica.* 23(2): 32-43.
- Irwin, H. S. and Barneby, R. C. 1982. The American *cassiinae*. a synoptical revision of *leguminosae* tribe *cassieae* subtrib *cassiinae* in the new world. *Mem. New York Bot. Gard.* 35(2): 455-918.
- Ita, B. and Ndukwe, G. 2017. Antioxidant activity of *Senna alata* root extracts. *Journal of Natural Products and Resources.* 3(1): 94–96.
- Jiménez-Moreno, N., Volpe, F., Moler, J. A., Esparza, I., and Ancín-Azpilicueta, C. 2019. Impact of extraction conditions on the phenolic composition and antioxidant capacity of grape stem extracts. *Antioxidants.* 8(12): 1-17.

- Kabila', B., Sidhu, M. C., and Ahluwalia, A. S. 2020. The identification of phytochemicals of medicinal important in *Senna occidentalis* (L.) link. *Plant Archives*. 20(2): 4773-4781.
- Kadarohman, A., Salim, G., Salim, A. H., Safitri, A., Gustiawan, K. H., Sardjono, R. E., Peatiwi, A., Muftiasih, A. Surani., and Khumaisah, L. L. 2022. Fructone synthesis from ethanol and acetic acid. *Indo. J. Chem. Sci.* 11(3): 251-258.
- Karim, K., Jura, M. R., dan Sabang, S. M. 2015. Uji aktivitas antioksidan ekstrak daun patikan kebo (*Euphorbia hirta* L.). *J. Akad. Kim.* 4(2): 56-63.
- Kaur, C. and Kapoor, H. C. 2001. Antioxidants in fruits and vegetables the millennium's health. *International Journal of Food Science and Technology*. 36(7): 703–725.
- Kedare, S. B. and Singh, S. P. 2011. Genesis and development of DPPH of antioksidant assay. *J Food Sci Technol.* 48(4): 412-422.
- Khoerunnisa, A. dan Kurniawansyah, I. S. 2018. A review: the natural antioxidant activity of black mulberry and its others function. *Farmaka.* 16(2): 353-364.
- Lobo, V., Patil, A., Phatak, A., and Chandra, N. 2010. Free radicals, antioxidants and functional foods: impact on human health. *Pharmacognosy Reviews.* 4(8): 118–126.
- Lopes, E. C. S., Dalmolin, Â. C., Allama, I. B., Pereira, K. F., Aitken II, W. M., Dos Santos, A. P., and Mielke, M. S. 2020. Effects of root deformation and light availability on growth and biomass allocation of *Senna multijuga* seedlings (Rich) H. S. Irwin & Barneby. *Revista Árvore.* 44(7): 1-9.
- Magfira. 2018. Analisis Penghambatan Ekstrak Etanol Batang Kembang Bulan (*Tithonia ediversifolia*) Terhadap Reaksi Oksidasi dari Radikal Bebas Dengan Metode DPPH ABTS dan FRAP. *Skripsi.* Universitas Hasanuddin. Makassar. Hal. xi-86.
- Mailani, D. P. dan Pratiwi, N. 2022. Pra rancangan pabrik etil asetat dari asam asetat dan etanol dengan proses esterifikasi menggunakan katalis amberlyst-15 kapasitas 57.000 ton/tahun. *Jurnal Tugas Akhir Teknik Kimia.* 4(2): 73-77.
- Mani, A. S., Prasad, Y. R., Siddhanadham, A. S., and Aparna, B. 2017. Phytochemical and antioxidant activity screening of chloroform leaf and aerial part extracts of *Tephrosia villosa*. *World Journal of Pharmaceutical and Life Sciences.* 3(9): 181-184.

- Maryam, St., Baits, M., dan Nadia, A. 2015. Pengukuran aktivitas antioksidan ekstrak etanol daun kelor (*Moringa oleifera* Lam.) menggunakan metode FRAP (*Ferric Reducing Antioxidant Power*). *Jurnal Fitofarmaka Indonesia*. 2(2): 115-118.
- Meyer, V. R. 2010. *Practical High-Performance Liquid Chromatography*. John Wiley and Sons. Hal. 432.
- Mokgotho, M. P., Gololo, S. S., Masoko, P., Mdee, L. K., Mbazima, V., Shai, L. J., Bagla, V. P., Eloff, J. N., and Mampuru, L. 2013. Isolation and chemical structural characterisation of a compound with antioxidant activity from the roots of *Senna italica*. *Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine*. 2013(1): 1-7.
- Molyneux, P. 2004. The use of the stable free radical diphenylpicryl hydrazyl (DPPH) for estimating antioxidant activity. *Songklanakarinn J. Sci. Technol.* 26(2): 212-219.
- Mukhriani. 2014. Ekstraksi, pemisahan senyawa, dan identifikasi senyawa aktif. *Jurnal Kesehatan*. 7(2): 361-367.
- Mustafa, A. A. and Omer, A. A. H. 2024. Assessment of the antimicrobial; and antioxidant activities and total phenolic content of crude extracts from *Senna italica* Sudan. *Omdurman Islamic University Journal(OIUIJ)*. 20(1): 10-18.
- Naes, I. S., Ma'sum, Z. dan Fitri. 2023. Rancang alat reaktor esterifikasi pada pembuatan etil asetat dari ethanol dan asam asetat dengan Proses sterifikasi. *Sentikuin*. 6(1): A15.1-A15.7.
- Notonegoro, H., Djamaludin, H., Setyaningsih, I., dan Tarman, K. 2022. Fraksinasi flavonoid spirulina platensis dengan metode kromatografi lapis tipis dan aktivitas inhibisi enzim α -glukosidase. *Jurnal Kelautan Tropis*. 25(3): 299-308.
- Nst, S. L. A., Sutri, R., dan Iriany. Pembuatan etil asetat dari hasil hidrolisis, fermentasi dan esterifikasi kulit pisang raja (*Musa paradisiaca* L.). *Jurnal Teknik Kimia USU*. 4(1): 1-6.
- Nugroho, A. 2017. *Teknologi Bahan Alam*. Lambung Mangkurat University Press. Banjarmasin. Hal. xiv-155.
- Ogbole, O., Adeniji, J., Ajaiyeoba, E., Kamdem, R., and Choudhary, M. 2014. Anthraquinones and triterpenoids from *Senna siamea* (*Fabaceae*) Lam inhibit poliovirus activity. *African Journal of Microbiology Research*. 8(21): 2091-2097.

- Oladeji, O. S., Adelowo, F. E., and Oluyori, A. P. 2021. The genus *Senna* (*Fabaceae*): a review on its traditional uses, botany, phytochemistry, pharmacology and toxicology. *South African Journal of Botany*. 138(2): 1-32.
- Oliveira, R. S., Coelho, É. M. P., Barbosa, M. C., Mito, M. S., Mantovanelli, G. C., and Ishii-Iwamoto, E. L. 2021. The activity of the antioxidant defense system of the weed species *Senna obtusifolia* L. and its resistance to allelochemical stress. *Journal of Chemical Ecology*. 47(1): 1-12.
- Oza, M. J., Yogesh, A., dan Kulkami. 2020. Formononetin alleviates diabetic cardiomyopathy by inhibiting oxidative stress and upregulating SIRT1 in rats. *Asian Pacific Journal of Tropical Biomedicine*. 10(6): 254-262.
- Permana, E., Desriyanti, R., Marlinda, L., dan Murti, S. D. S. 2021. Sintesis metanol dari hidrogenasi karbon monoksida dengan katalis Cu/ZnO/Al₂O₃. *Jurnal Teknologi*. 13(2): 217-226.
- Pham-Huy, L. A., He, H., and Pham-Huy, C. 2008. Free radicals, antioxidants in disease and health. *International Journal of Biomedical Science*. 4(2): 89-96.
- Prasathkumar, M., Raja, K., Vasanth, K., Khusro, A., Sadhasivam, S., Sahibzada, M. U. K., Gawwad, M. R. A., Al Farraj, D. A., and Elshikh, M. S. 2021. Phytochemical screening and in vitro antibacterial, antioxidant, anti-inflammatory, anti-diabetic, and wound healing attributes of *Senna auriculata* (L.) Roxb. leaves. *Arabian Journal of Chemistry*. 14: 1-13.
- Pratap, G. P., Husain, M. K., Vallepu, N., and Gidivada, S. 2024. Synthesis of silver nanoparticles using *Senna sophera* (L.) Roxb. leaf extract and study of antibacterial and anticancer properties. *Plant Science Today*. 11(4): 1189-1199.
- Pratiwi, A. R., Yusran., Islawati., dan Artati. 2023. Analisis kadar antioksidan pada ekstrak daun binahong hijau *Anredera cordifolia* (Ten.) steenis. *Bioma : Jurnal Biologi Makassar*. 8(2): 66-74.
- Pratiwi, R. I., Kalsum, U., dan Suleman, A. W. 2024. Uji aktivitas antioksidan fraksi ekstrak kulit bawang putih (*Allium Sativum* L.) dengan metode FRAP (*Ferri Reducing Antioxid Power*). *Journal of Pharmaceutical and Health Research*. 5(2): 91-98.
- Prayoga, G. 2013. Fraksinasi, Uji Aktivitas Antioksidan dengan Metode DPPH dan Identifikasi Golongan Senyawa Kimia dari Ekstrak Teraktif Daun Sambang Darah (*Excoecaria cochinchinensis* Lour). *Skripsi*. Fakultas Farmasi. Program Studi Sarjana Ekstensi Indonesia. Universitas Indonesia. Hal. 1-76.

- Pujiati, L., Sugiyanto., dan Hasana, A. R. 2023. Uji identifikasi rhodamin b pada lipint di toko kosmetik kota x menggunakan metode kromatografi lapis tipis. *SENTRI: Jurnal Riset Ilmiah*. 2(11): 4554-4564.
- Purnamasari, I., Rohama., dan Noval. 2024. Uji aktivitas antioksidan ekstrak daun pepaya Jepang (*Cnidocolus acanitifolius*) dengan metode FRAP. *Jurnal Surya Medika (JSM)*. 10(1): 244-252.
- Purwanto, D., Bahri, S., dan Ridhay, A. 2017. Uji aktivitas antioksidan ekstrak buah purnajiwa (*Kopsia arborea* Blume.) dengan berbagai pelarut. *Kovalen*. 3(1): 24-32.
- Puspitasari, E. dan Ningsih, I. Y. 2016. Kapasitas antioksidan ekstrak buah salak (*Salacca zalacca* (Gaertn.) Voss) varian gula pasir menggunakan metode penangkapan radikal DPPH. *Pharmacy*. 13(1): 16-126.
- Puspita, S. I., Marlina, E. dan Daniel. 2019. Isolasi dan karakterisasi senyawa flavonoid pada fraksi etil asetat daun *Macaranga lamellata* whitmore. *Jurnal Atomik*. 4(1): 1-5.
- Putra, I. B. G. A. R. E., Laksmiani, N. P. L., dan Widjaja, I. N. K. 2015. Optimasi metode ekstraksi cair-cair senyawa-senyawa pada tablet ekstasi ditentukan dengan spektrofotodensitometer. *Journal of Legal and Forensic Sciences*. 5(1): 4-10.
- Rale, S. D., Hasim., and Falah, S. 2018. Antioxidant activity, inhibition α -glucosidase of ethanol extract of *Strychnos nitida* G. Don and identification of active compounds. *Current Biochemistry*. 5(3): 11-20.
- Rao, V. S., Raju, M. A., and Kammakshamma. J. 2013. Phytochemical screening and antioxidant activity of bark extracts of *Chionanthus zeylanica* linn., as an important medicinal plant in eastern ghats. *International Journal of Drug Development and Research*. 5(2): 311-316.
- Ribeiro, R. A. and Lovato, M. B. 2004. Mating system in a neotropical tree species, *Senna multijuga* (Fabaceae). *Genetics and Molecular Biology*. 27(3): 418-424.
- Riyanto, A., Aulia, M., Asni, N., Putri, E. D. S., dan Rukmana, D. M. 2024. Eksplorasi potensi pigmen dalam daun pandan (*Pandanus odoratissimus*) melalui kromatografi kolom. *Journal of Polymer Chemical Engineering and Technology*. 2(1): 37-42.
- Roberfroid, M. B. 2007. Prebiotics: the concept revisited. *The Journal of Nutrition*. 137(3): 830S–837S.

- Rusli, N., Saehu, M. S., dan Fatmawati. 2023. Aktivitas antioksidan fraksi etil asetat daun *Meistera chinensis* dengan metode DPPH (1,1-difenil-2-pikrilhidrazil). *Jurnal Mandala Pharmacoon Indonesia*. 9(1): 44-48.
- Safitri, I., Nuria, M. C., dan Puspitasari, A. D. 2018. Perbandingan kadar flavonoid dan fenolik total ekstrak metanol daun beluntas (*Pluchea indica* L.) pada berbagai metode ekstraksi. *Jurnal Inovasi Teknik Kimia*. 3(1): 31-36.
- Saliu, J. A. 2021. Hypoglycemic potentials and phenolic characterization of aqueous extract of *Senna Podocarpa* leaf. *Acta Scientific Nutritional Health*. 5(3): 21-27.
- Shahidi, F. and Ambigaipalan, P. 2015. Phenolics and polyphenolics in foods, beverages and spices: antioxidant activity and health effects-a review. *Journal of Functional Foods*. 18: 820-897.
- Shahidi, F., and Zhong, Y. 2015. Measurement of antioxidant activity. *Journal of Functional Foods*. 18: 757-781.
- Sharma, A., Bejarno, P. I. A., Navarrete, A. M., Oza. G., Iqbal, H. M. N., Taketa, A. C., and Villarreal, M. L. 2018. Multidisciplinary investigations on *Galphimia glauca*: a mexican medicinal plant with pharmacological potential. *Molecules*. 23(2985): 1-22.
- Sies, H. 2019. *Oxidative Stress*. In *Stress: Physiology, Biochemistry, and Pathology*. Hal. 153-163.
- Sihite, N. W. dan Hutasoit, M. S. 2023. Potensi bahan pangan lokal Indonesia sebagai pangan fungsional dan manfaatnya bagi kesehatan :review. *Jurnal Riset Gizi*. 11(2): 133-138.
- Silva, J. G. A., Monteiro, J. A., Ferreira, E. B., Fernandes, M. I. B., Pessoa, C. D., Sampaio, C. D. E. G., and Vasconcelos Silva, M. G. D. E. 2019. Total phenolic content, antioxidant and anticancer activities of four species of *Senna* Mill. from Northeast Brazil. *International Journal of Pharmacy and Pharmaceutical Sciences*. 11(2): 138-143.
- Singh, V. V., Jain, J., and Mishra, A. K. 2019. Evaluation of anticonvulsant and antioxidant activity of *Senna occidentalis* seeds extracts. *Journal of Drug Delivery and Therapeutics*. 9(2): 183-187.
- Sitarek, P., Sikora, J., Dudzic, M., Boczkowski, D., Osicka, W., Ghorbanpour, M., and Kowalczyk, T. 2023. *Plant Secondary Metabolites of the Genus Senna. Biological Properties in the Context of Medical Research*. Mérillon, J.M., Ramawat, K.G. (eds) *Plant Specialized Metabolites. Reference Series in Phytochemistry*. Springer, Cham. Hal. 1-29.

- Snyder, L. R., Kirkland, J. J., and Dolan, J. W. 2012. *Practical HPLC method development* (2nd ed.). John Wiley and Sons. Hal. vii-412.
- Sobeh, M., Mahmoud, M. F., Hasan, R. A., Cheng, H., El-Shazyl, A., dan Wink, Micheal. 2017. *Senna singueana*: antioxidant, hepatoprotective, antiapoptotic properties and phytochemical profiling of a methanol bark extract. *Molecules*. 22: 1-15.
- Solanki, B. R., Khaniya, H. K., Mankad, A., and Maitreya, B. 2021. Phytochemical analysis and antioxidant activities of *senna occidentalis* (L.) leaves. *Towards Excellence: An Indexed, Refereed dan Peer Reviewed Journal of Higher Education*. 13(4): 1007-1024.
- Solomons, T. W. G., Fryhle, C. B., and Snyder, S. A. 2016. *Organic Chemistry* (12th ed.). Wiley. Hal. 1-1264.
- Subeki, S. dan Muhartono. 2015. Senyawa brusein-a dari buah Makasar (*Brucea javanica* (L.) Merr.) sebagai antiproliferasi terhadap sel kanker payudara T47D. *MKB*. 47(1): 22-28.
- Sultana, B., Anwar, F., and Ashraf, M. 2009. Effect of extraction solvent/technique on the antioxidant activity of selected medicinal plant extracts. *Molecules*. 14(6): 2167-2180.
- Sumarni, F., Saleh, C., dan Pratiwi, R. 2019. Uji fitokimia dan uji aktivitas antioksidan (metode DPPH) dari daun biriba (*Rollinia mucosa* (Jacq.) Baill.). *Jurnal Atomik*. 4(1): 9-13.
- Surya, R. P. A. dan Luhurningtyas, F. P. 2021. Aktivitas antioksidan ekstrak etanol 70% dan 96% buah parijoto asal Bandungan dan profil kromatografinya. *Pharmaceutical and Biomedical Sciences Journal*. 3(1): 39-44.
- Syahmani, S., Leny, L., Iriani, R., dan Elfa, N. 2017. Penggunaan kitin sebagai alternatif fase diam kromatografi lapis tipis dalam praktikum kimia organik. *Jurnal Vidya Karya*. 32(1): 1-11.
- Syarif, S., Kosman, R., dan Inayah, N. 2015. Uji aktivitas antioksidan terong Belanda (*Solanum betaceum* Cav.) dengan metode FRAP. *As-Syifaa*. 7(1): 26-33.
- Tawaha, K., Alali, F. Q., Gharaibeh, M., Mohammad, M., and El-Elimat, T. 2007. Antioxidant activity and total phenolic content of selected Jordanian plant species. *Food Chemistry*. 104(4): 1372–1378.
- Vijayalakshmi, M. and Ruckmani, K. 2016. Ferric reducing anti-oxidant power assay in plant extract. *J. Pharmacol. Ther.* 11: 570-572.

- Wandri, R., Alam, S., Ayundra., S. D., Apriansa, A., Asmono, D., Subeki., Fitriana, Y., Hasibuan, R., and Suharjo, R. 2024. First report: *Senna multijuga* Subsp. *multijuga* (Fabales: *Fabaceae*) as an attractant and bioinsecticide for *Oryctes rhinoceros* (Coleoptera: *Scarabaeidae*). *Agriculture*. 14(9): 1-16.
- Wiradnyani, N. K., Wartini, N. M., dan Admadi, B. 2014. Komposisi Senyawa Penyusun Minuman Sinom (*Curcuma domestica* val.-*tamarindus indica* L.). *Media Ilmiah Teknologi Pangan*. 1(1): 10-23.
- Wolfe, K. and Liu, R. H. 2007. *Cellular Antioxidant Activity* (CAA) assay for assessing antioxidants, foods, and dietary supplements. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 55(22): 8896-8907.
- Wolouski, M. and Freitas, L. 2010. Sistema reprodutivo e polinização de *Senna multijuga* (*Fabaceae*) em Mata Atlântica Montana. *Rodriguésia*. 61(2): 167-179.
- Wulan, W., Yudistira, A., dan Rotinsulu, H. 2019. Uji aktivitas antioksidan dari ekstrak etanol daun *Mimosa pudica* Linn. menggunakan metode DPPH. *Pharmacon*. 8(1): 106-113.
- Yuliani, H. dan Rasyid, M. I. 2019. Efek perbedaan pelarut terhadap uji toksisitas ekstrak pineung nyen teusale. *Jurnal Fitofarmaka Indonesia*. 6(2): 347-352.
- Yuliarni, F. F., Lestari, K. A. L., Arisawati³, D. K., Sari, R. D. W., dan Ratna, K. K. 2022. Evaluasi ekstrak jamur kuping (*Auricularia*) menggunakan pelarut etanol dan metanol. *Jurnal Teknologi Technoscientia*. 14(2): 129-137.