

## Aktivitas Antioksidan Ekstrak Etanol Kulit Biji dan Buah Bakau (*Xylocarpus granatum* J.Koenig) dengan Metode DPPH dan FRAP

### Antioxidant Activity of Ethanol Extracts from Mangrove (*Xylocarpus granatum* J.Koenig) Seed Coat and Fruit by DPPH and FRAP Assays

I Gusti Agung Ayu Kusuma Wardani<sup>1\*</sup>, Ketut Agus Adrianta<sup>1</sup>, Ni Nyoman Wahyu Udayani<sup>1</sup>, Ni Nyoman Yudianti Mendra<sup>1</sup>, Ni Luh Gede Erica Fridayana<sup>2</sup>, Ni Made Dharma Shantini Suen<sup>3</sup>

<sup>1</sup>Departemen Farmakologi dan Farmasi Klinik, Fakultas Farmasi, Universitas Mahasaraswati Denpasar, Jl.Kamboja, No. 11 A, Denpasar, 80233, Indonesia

<sup>2</sup>Program Studi Sarjana Farmasi, Fakultas Farmasi, Universitas Mahasaraswati Denpasar, Jl.Kamboja, No. 11 A, Denpasar, 80233, Indonesia

<sup>3</sup>Departemen Farmasetika, Fakultas Farmasi, Universitas Mahasaraswati Denpasar, Jl.Kamboja, No. 11 A, Denpasar, 80233, Indonesia

**Diajukan:** 21-06-2024

**Direview:** 14-02-2025

**Disetujui:** 28-04-2025

**Kata Kunci:** antioksidan, bakau, buah, kulit biji, radikal bebas

**Keywords:** antioxidant, banang-banang, fruit, seed coat, free radical

#### Korespondensi:

I Gusti Agung Ayu Kusuma Wardani

[kusumawardani@unmas.ac.id](mailto:kusumawardani@unmas.ac.id)



Lisensi: CC BY-NC-ND 4.0

Copyright ©2025 Penulis

#### Abstrak

Senyawa radikal bebas merupakan suatu molekul yang mempunyai sifat reaktif dan tidak stabil, sehingga senyawa ini mampu menyebabkan kerusakan biomolekul dengan merusak integritas DNA, protein dan lipid. Kondisi ini memicu terjadinya stres oksidatif yang mengakibatkan timbulnya penyakit degeneratif. Manusia membutuhkan asupan antioksidan dari luar ketika antioksidan endogen tidak cukup untuk menangkal radikal bebas. Penelitian sebelumnya menunjukkan tingginya aktivitas antioksidan pada biji bakau. Potensi antioksidan dari kulit biji dan buah bakau masih belum dieksplorasi secara mendalam, baik dengan menggunakan metode DPPH maupun FRAP. Penelitian ini bertujuan untuk mengetahui aktivitas antioksidan ekstrak kulit biji dan buah bakau (*Xylocarpus granatum* J.Koenig) menggunakan metode DPPH dan FRAP. Penelitian ini merupakan penelitian kuantitatif dengan metode pendekatan eksperimental laboratorium. Pengujian aktivitas antioksidan menggunakan metode DPPH dan FRAP. Asam galat digunakan sebagai standar pembanding aktivitas antioksidan. Hasil pengujian aktivitas antioksidan ekstrak etanol kulit biji, buah dan asam galat diperoleh nilai IC<sub>50</sub> sebesar 10,83 µg/mL, 4,91 µg/mL dan 0,793 µg/mL (DPPH) dan RP<sub>50</sub> sebesar 4.455,63 µg/mL, 15.556,32 µg/mL dan 34,04 µg/mL (FRAP). Perbedaan metode uji dapat mempengaruhi aktivitas antioksidan dari masing-masing ekstrak, tergantung pada jenis radikal bebas, pelarut radikal bebas, aksesibilitas sterik dan pH pengujian.

#### Abstract

Free radical compounds are molecules that possess reactive and unstable properties, which can damage biomolecules by disrupting the integrity of DNA, proteins and lipids. This condition can trigger oxidative stress, which can result in degenerative diseases. Humans require antioxidant intake from external sources when their own endogenous antioxidants are insufficient to counteract free radicals. Previous studies have demonstrated the high antioxidant activity of mangrove seeds. However, the antioxidant potential of mangrove seed coats and fruits remains underexplored, particularly when assessed using the DPPH and FRAP methods. This study aims to evaluate the antioxidant activity of seed coat and fruit extracts of *Xylocarpus granatum* J. Koenig using the DPPH and FRAP methods. This research is quantitative research with laboratory experimental approach. Antioxidant activity testing using DPPH and FRAP methods. Gallic acid was used as a comparison standard for antioxidant activity. The results obtained from the antioxidant activity testing of the ethanol extracts of seed shell, fruit and gallic acid were IC<sub>50</sub> values of 10.83 µg/mL, 4.91 µg/mL and 0.793 µg/mL (DPPH) and RP<sub>50</sub> of 4,455.63 µg/mL, 15,556.32 µg/mL and 34.04 µg/mL (FRAP). It is acknowledged that discrepancies in testing methodologies can influence the antioxidant activity of each extract, contingent on the nature of the free radical, the solvent, steric accessibility, and the pH of the medium.

**Cara mensitasi artikel** (citation style: AMA 11thEd.):

Wardani, IGA, Adrianta, KA, Udayani, NNW, Mendra, NNY, Fridayana, NLGE, Suen, NMDS. Aktivitas Antioksidan Ekstrak Etanol Kulit Biji dan Buah Bakau (*Xylocarpus granatum* J.Koenig) dengan Metode DPPH dan FRAP. *J. Ilm. Medicam.*, 2025;11(1), 86-98, DOI: [10.36733/medicamento.v11i1.9426](https://doi.org/10.36733/medicamento.v11i1.9426)

## PENDAHULUAN

Radikal bebas adalah molekul yang sangat reaktif dan tidak stabil karena memiliki satu atau lebih elektron tidak berpasangan. Dalam upaya mencapai stabilitas, radikal bebas cenderung sangat reaktif dalam menarik elektron dari molekul lain, sehingga mengakibatkan kerusakan pada biomolekul seperti lipid, protein, dan DNA. Hal ini dapat meningkatkan stres oksidatif dan memicu timbulnya penyakit degeneratif.<sup>1</sup>

Penyakit degeneratif merupakan masalah kesehatan yang signifikan di Indonesia. Adapun contoh penyakit degeneratif meliputi gagal ginjal, diabetes melitus dan stroke. Prevalensi penyakit-penyakit ini terus meningkat dari waktu ke waktu. Menurut data dari Riskesdas, prevalensi stroke meningkat dari 7% pada tahun 2013 menjadi 10,9% pada tahun 2018. Begitu pula, prevalensi gagal ginjal kronis naik dari 2% menjadi 4%, dan diabetes mellitus dari 1,8% menjadi 1,9% dalam periode yang sama. Pada masa pandemi COVID-19, prevalensi penyakit degeneratif diperkirakan akan semakin meningkat akibat dampak negatif yang meluas di berbagai bidang kehidupan, termasuk ekonomi, psikologis, sosial, spiritual, dan kesehatan, yang dapat memicu timbulnya penyakit degeneratif.<sup>2</sup> Tubuh manusia membutuhkan antioksidan eksternal ketika produksi antioksidan internal tidak cukup untuk menangkal radikal bebas. Konsumsi makanan yang mengandung agen antioksidan dapat membantu mengurangi jumlah radikal bebas dalam tubuh.<sup>3</sup>

Indonesia merupakan salah satu negara tropis, memiliki kekayaan tanaman obat yang telah lama dimanfaatkan secara tradisional untuk mengatasi berbagai penyakit. Salah satu tanaman yang digunakan sebagai obat oleh masyarakat Indonesia adalah bakau (*Xylocarpus granatum* J. Koenig). Secara tradisional, bakau digunakan untuk mengobati diabetes, asma, hepatitis, diare, penyakit kulit, infeksi dan penyakit mata.<sup>4</sup> Penelitian sebelumnya menunjukkan tingginya aktivitas antioksidan pada biji bakau dengan nilai IC<sub>50</sub> sebesar 7,94 ppm.<sup>5</sup> Potensi antioksidan dari kulit biji dan buah bakau masih belum dieksplorasi secara mendalam, baik dengan menggunakan metode DPPH maupun FRAP. Kulit biji dan buah bakau mengandung senyawa bioaktif yang memiliki aktivitas farmakologi. Bagian biji bakau mengandung tanin yang memiliki sifat antibakteri, sementara kulit bijinya kaya akan flavonoid yang berperan sebagai antioksidan, karena kulit biji dari *X. granatum* memiliki kandungan flavonoid.<sup>6</sup> Flavonoid dikenal sebagai senyawa yang efektif dalam menangkal radikal bebas.<sup>7</sup> Selain itu, kulit biji dan buah bakau juga mengandung senyawa limonoid, turunan triterpenoid yang memiliki aktivitas farmakologi beragam, termasuk sebagai antioksidan.<sup>8</sup> Senyawa fenolik dalam buah *X. granatum* juga memiliki aktivitas antioksidan.<sup>9</sup>

Pengukuran aktivitas antioksidan dapat dilakukan melalui mekanisme transfer atom hidrogen (HAT) dan transfer elektron (ET). Metode HAT menilai kemampuan antioksidan dalam menangkap radikal bebas melalui donasi atom hidrogen, contoh TRAP, ORAC,  $\beta$ -Caroten bleaching assay. Metode ET mengukur aktivitas antioksidan dalam mereduksi radikal bebas melalui transfer elektron, contohnya pada metode FRAP, DMPD, FIC, CUPRAC dan lain-lain. Beberapa metode, seperti DPPH dan ABTS, menggabungkan kedua mekanisme ini untuk hasil yang lebih komprehensif. Penelitian ini menggunakan metode DPPH dan FRAP untuk menentukan aktivitas antioksidan ekstrak kulit biji dan buah bakau.<sup>10</sup>

Berdasarkan hal tersebut, penelitian mengenai pengujian aktivitas antioksidan dari ekstrak etanol kulit biji dan buah bakau perlu dilakukan untuk mengetahui aktivitas antioksidan ekstrak kulit biji dan buah bakau (*X. granatum* J.Koenig) menggunakan metode DPPH dan FRAP.

## METODE PENELITIAN

### Alat dan Bahan Penelitian.

**Alat.** Alat yang digunakan yaitu timbangan analitik (Ohaus®), gelas kimia (Pyrex®), gelas ukur (Pyrex®), labu ukur (Pyrex®), kaca arloji, erlenmayer (Pyrex®), tabung reaksi (Iwaki®), corong kaca (Pyrex®), batang pengaduk, spatula logam, pipet mikro, kertas saring, cawan porselin, penangas air, lampu bunsen dan instrumen yang digunakan yaitu spektrofotometer UV-Vis (Shimadzu UV-Vis 1800®), rotary evaporator (Buchi R-300®), dan elmasonik (Elma®), *centrifuge* (Ohaus®), *multichannel pipettor* 200  $\mu$ L (Rainin®), *microplate reader* (Occuris®).

**Bahan.** Bahan yang digunakan yaitu simplisia kulit biji dan buah bakau yang berasal dari Taman Hutan Raya (TAHURA) yang berlokasi di Balai Pengelolaan Hutan Mangrove Wilayah Pemongan, Kuta, Denpasar, etanol 80% (Bratacem), metanol p.a. (Merck®), baku DPPH (*2,2-difenil-1-pikrilhidrazil*) (Sigma®), aquadest (Sekawan Bali Sejahtera®), HCl pekat (SAP Chemicals®), reagen dragendroff (Nitro Kimia®), pereaksi mayer (SAP Chemicals®), FeCl<sub>3</sub> 1% (SAP Chemicals®), kloroform (Merck®), asam asetat anhidrat (Merck®), asam sulfat pekat (SAP Chemicals®), Fe (III) 6H<sub>2</sub>O, 2,4,6-Tris(2-pyridyl)-1,3,5-triazine (TPTZ) (Sigma®), Sodium Asetat (Merck®), Asam Asetat Glasial (Merck®), Galic Acid (Sigma®).

### Prosedur Penelitian

Penelitian ini termasuk jenis eksperimental laboratorium yang dilakukan secara kuantitatif untuk menentukan aktivitas antioksidan dari ekstrak etanol kulit biji dan buah bakau menggunakan metode DPPH dan FRAP.

### Ekstraksi

Proses ekstraksi dilakukan berdasarkan penelitian yang telah dilakukan oleh Sholihah et al. (2017) dengan modifikasi. Serbuk simplisia kulit biji bakau ditimbang sebanyak 50 g dan dilarutkan dengan pelarut etanol 80% sebanyak 500 mL. Ekstraksi dilakukan menggunakan elmasonik selama 10 menit dengan suhu 40°C. Filtrat disaring menggunakan kertas *whatman* dengan bantuan corong buchner (Filtrat 1). Filtrat yang diperoleh ditampung pada beaker glass dan ditutup dengan aluminium foil. Ekstraksi dilakukan sebanyak 3 kali. Filtrat yang telah terkumpul dievaporasi pada suhu 40°C hingga diperoleh ekstrak kental.

### Skrining fitokimia

Skrining fitokimia pada ekstrak etanol kulit biji bakau meliputi skrining alkaloid, flavonoid, saponin, tanin, triterpenoid dan steroid. Pembuatan larutan uji ekstrak kulit biji bakau dilakukan dengan cara melarutkan 500 mg ekstrak etanol kulit biji bakau (*X. granatum*) dalam 50 mL etanol 80%.<sup>12</sup> **Pemeriksaan alkaloid** dilakukan dengan memasukkan larutan ekstrak uji sebanyak 2 mL ke dalam cawan porselin dan diuapkan di atas penangas air hingga menghasilkan residu. Residu tersebut selanjutnya dilarutkan dalam 5 mL HCl 2N. Larutan residu ini kemudian dibagi ke dalam tiga tabung reaksi. Pada tabung pertama ditambahkan HCl encer sebagai blanko, pada tabung kedua ditambahkan 3 tetes pereaksi Dragendorff, dan pada tabung ketiga ditambahkan 3 tetes pereaksi Mayer. Terbentuknya endapan jingga pada tabung kedua dan endapan kuning pada tabung ketiga menunjukkan adanya alkaloid.<sup>13</sup> **Pengujian flavonoid** dilakukan dengan cara mengambil masing-masing larutan uji ekstrak kulit biji bakau sebanyak 2 mL kemudian dimasukkan ke dalam tabung reaksi dan dipanaskan selama 5 menit, selanjutnya ditambahkan 0,1 g logam Mg dan 5 tetes HCl pekat. Jika larutan terbentuk warna kuning jingga hingga warna merah, maka positif mengandung flavonoid.<sup>14</sup> **Pemeriksaan saponin** dengan cara, ekstrak ditambahkan 2 mL aquades kemudian dikocok kuat-kuat sampai terbentuk busa, selanjutnya diteteskan HCl 10%. Hasil positif ditunjukkan dengan terbentuknya buih yang stabil.<sup>15</sup> **Pengujian tanin** dilakukan dengan cara mengambil masing-masing sebanyak 2 mL larutan uji ekstrak kulit biji bakau dimasukkan ke dalam 2 tabung reaksi, tabung 1 sebagai kontrol dan tabung 2 dipanaskan ± 5 menit, selanjutnya ditambahkan 3 tetes FeCl<sub>3</sub> 1%. Jika larutan uji terbentuk warna biru kehitaman atau coklat kehijauan maka positif mengandung tanin.<sup>14</sup> **Pengujian kandungan steroid dan triterpenoid** dilakukan menggunakan reaksi Lieberman-Burchard. Larutan ekstrak kulit biji bakau sebanyak 2 mL dimasukkan ke dalam cawan porselin dan diuapkan di atas penangas air hingga diperoleh residu. Residu tersebut kemudian dilarutkan dalam 0,5 mL kloroform dan ditambahkan 0,5 mL asam asetat anhidrat. Sebanyak 2 mL asam sulfat pekat ditambahkan secara perlahan melalui dinding tabung. Pembentukan cincin kecoklatan atau violet pada perbatasan larutan menunjukkan adanya triterpenoid, sedangkan munculnya cincin biru kehijauan menunjukkan adanya steroid.<sup>12</sup>

### Pengujian Aktivitas Antioksidan dengan Metode DPPH

Prosedur pengujian dilakukan sesuai Blois (1988) dengan modifikasi.<sup>16</sup> Larutan induk ekstrak etanol kulit biji dan buah bakau dibuat dengan konsentrasi 100 µg/mL dengan menimbang 5 mg ekstrak kental

dimasukkan ke dalam labu ukur kemudian dilarutkan dengan metanol p.a. ad 50 mL, dikocok hingga homogen. Kemudian dibuat larutan standar dengan cara, larutan ekstrak etanol kulit biji bakau dibuat dengan konsentrasi 2, 3, 4, 5, 6, 7 µg/mL, larutan buah bakau dibuat dengan konsentrasi 2, 4, 6, 8, 10 dan asam galat dengan konsentrasi 0,0; 0,5; 0,6; 0,7; 0,8; 0,9; 1,0 µg/mL. Sebanyak 5 mg serbuk DPPH dimasukkan ke dalam labu tentukur 50 ml ditambahkan metanol p.a. ad 50 mL, dikocok hingga homogen, untuk membuat larutan baku induk DPPH konsentrasi 100 µg/mL. Larutan baku DPPH tersebut kemudian dipipet sebanyak 8 mL dimasukkan ke dalam labu ukur 20 mL dan ditambahkan metanol p.a. sampai tanda batas, dikocok hingga homogen, untuk membuat larutan baku kerja DPPH konsentrasi 40 µg/mL. Selanjutnya, larutan baku DPPH ini dipipet sebanyak 4 mL dimasukkan ke dalam kuvet, diamati spektrum serapan pada panjang gelombang 400-800 nm dengan spektrofotometer UV-Vis. Metanol p.a. digunakan sebagai larutan blanko. Kurva serapan yang dihasilkan dapat digunakan untuk menentukan panjang gelombang maksimum.

Larutan DPPH 40 µg/mL dipipet sebanyak 2 mL dimasukkan ke dalam tabung reaksi, ditambah 2 mL metanol p.a., dikocok dan didiamkan selama 30 menit, selanjutnya dimasukkan ke dalam kuvet. Absorbansi diamati pada panjang gelombang maksimum 516 nm dengan spektrofotometer UV-Vis. Untuk pengukuran aktivitas perendaman radikal bebas, sebanyak 2 mL larutan DPPH 40 µg/mL dipipet dan dimasukkan ke dalam tabung reaksi, kemudian ditambahkan sebanyak 2 mL larutan uji dari setiap konsentrasi yang berbeda. Campuran tersebut dikocok hingga homogen dan dibiarkan selama 30 menit. Absorbansi diukur pada panjang gelombang maksimum menggunakan spektrofotometer UV-Vis. Absorbansi masing-masing larutan dicatat dan digunakan untuk menghitung persentase perendaman serta nilai IC<sub>50</sub>.

### Pengujian Aktivitas Antioksidan dengan Metode FRAP

Pembuatan larutan sampel dilakukan dengan menimbang 100 mg ekstrak kental kulit biji dan buah bakau, kemudian dimasukkan ke dalam labu tentukur dan dilarutkan dengan metanol p.a. hingga volume 1 mL, kemudian dikocok hingga homogen dengan konsentrasi 100.000 µg/mL. Selanjutnya, untuk pembuatan larutan standar, asam galat sebanyak 10 mg ditimbang dan dilarutkan dengan 10 mL aquadest.

Untuk pembuatan reagen FRAP, larutan natrium asetat 300 nM dibuat dengan menimbang 0,19 g natrium asetat dan dilarutkan dengan 50 mL aquadest, kemudian ditambahkan 1,6 mL asam asetat glasial dan diaduk dengan aquadest hingga volume total 100 mL, disimpan pada suhu 80°C. Larutan TPTZ disiapkan dengan cara melarutkan 0,031 g TPTZ dalam 8 mL HCl 40 mM, kemudian ditambahkan HCl 40 mM hingga volume total mencapai 10 mL. Larutan Fe (III) dibuat dengan melarutkan 0,0541 g FeCl<sub>3</sub>.6H<sub>2</sub>O dalam 5 mL aquadest dan kemudian diaduk hingga volume total mencapai 10 mL.

Untuk pengukuran aktivitas antioksidan, larutan sampel dan standar dipipet sebanyak 20 µL ke dalam 96-well plate, dimulai dari konsentrasi terbesar hingga terkecil. Setiap konsentrasi dimasukkan ke dalam tiga well (triplo). Kemudian, larutan FRAP sebanyak 280 µL dimasukkan ke dalam well yang berisi larutan sampel dan standar. Proses penambahan larutan dilakukan dalam suasana gelap, kemudian well plate ditutup dengan aluminium foil dan diinkubasi selama 10 menit pada suhu ruang dalam keadaan gelap. Pembacaan dilakukan menggunakan *microplate reader* pada panjang gelombang 492 nm.<sup>17</sup>

### Pengolahan dan Analisis Data.

Pengolahan dan analisis data dilakukan secara kuantitatif dengan menghitung aktivitas antioksidan pada ekstrak etanol kulit biji dan buah bakau. Parameter yang digunakan untuk menginterpretasikan hasil uji aktivitas antioksidan adalah IC<sub>50</sub> (*Inhibition Concentration* 50%) untuk metode DPPH dan RP<sub>50</sub> (*Reducing Power* 50) untuk metode FRAP. IC<sub>50</sub> merupakan konsentrasi larutan sampel yang mampu mengurangi aktivitas DPPH sebesar 50%. Untuk menghitung nilai IC<sub>50</sub>, data persentase perendaman digunakan dengan rumus berikut:

$$\% \text{ Inhibisi (peredaman) } = \frac{(\text{absorbansi kontrol} - \text{absorbansi sampel})}{\text{absorbansi kontrol}} \times 100\%^{18}$$

Aktivitas antioksidan pada ekstrak kulit biji dan buah bakau dianalisa dengan menggunakan persamaan regresi linear. Pada metode DPPH, persentase perendaman pada setiap konsentrasi digunakan untuk membuat kurva regresi, menghasilkan persamaan  $y = bx + a$ , dimana konsentrasi ekstrak ( $\mu\text{g/mL}$ ) sebagai sumbu x dan nilai persentase perendaman sebagai sumbu y, selanjutnya digunakan untuk menghitung  $IC_{50}$ . Nilai  $IC_{50}$  yang lebih kecil menunjukkan aktivitas antioksidan yang lebih tinggi. Suatu senyawa dikategorikan mempunyai aktivitas antioksidan sangat kuat jika nilai  $IC_{50} < 50 \mu\text{g/mL}$ , kuat jika  $IC_{50}$  antara 50-100  $\mu\text{g/mL}$ , sedang jika  $IC_{50}$  antara 101-150  $\mu\text{g/mL}$ , dan lemah jika  $IC_{50}$  antara 151-200  $\mu\text{g/mL}$ .<sup>18</sup>

Pada metode FRAP, kurva regresi dibuat menggunakan *GraphPad* dengan syarat  $R \geq 0,95$ . Persen *reducing power* merupakan kemampuan sampel dalam mereduksi oksidan.  $RP_{50}$  merupakan konsentrasi sampel yang mampu mereduksi oksidan sebesar 50%. Nilai Top absorbansi standar diperoleh dari nilai Top pada *Best-Fit Values* menggunakan *GraphPad* yang dianggap nilainya setara dengan 100% *reducing power*. Adapun rumus persen *reducing power* sebagai berikut:

$$\% \text{ reducing power} = \frac{(\text{Absorbansi sampel} - \text{Absorbansi blanko})}{\text{Top absorbansi standar}} \times 100\%^{17}$$

Nilai Top absorbansi standar diperoleh dari nilai Top pada *Best-Fit Values* menggunakan *GraphPad* yang dianggap nilainya setara dengan 100% *reducing power*.

## HASIL DAN PEMBAHASAN

Hasil skrining fitokimia ekstrak etanol kulit biji dan buah bakau menunjukkan hasil positif terhadap senyawa alkaloid, flavonoid, saponin, tanin dan triterpenoid (**Tabel 1**). Identifikasi alkaloid menunjukkan hasil positif yang ditandai dengan pembentukan endapan jingga akibat reaksi dengan pereaksi *Dragendorff*. Proses ini melibatkan pertukaran ligan, dimana nitrogen pada alkaloid dengan pasangan elektron bebas membentuk ikatan kovalen koordinat dengan ion  $K^+$  dari kalium tetraiodobismutat, menghasilkan kompleks kalium-alkaloid yang mengendap.<sup>19</sup> Identifikasi flavonoid menunjukkan warna jingga hingga merah akibat reaksi flavonoid dengan logam Mg, yang membentuk garam flavilium berwarna khas.<sup>20</sup>

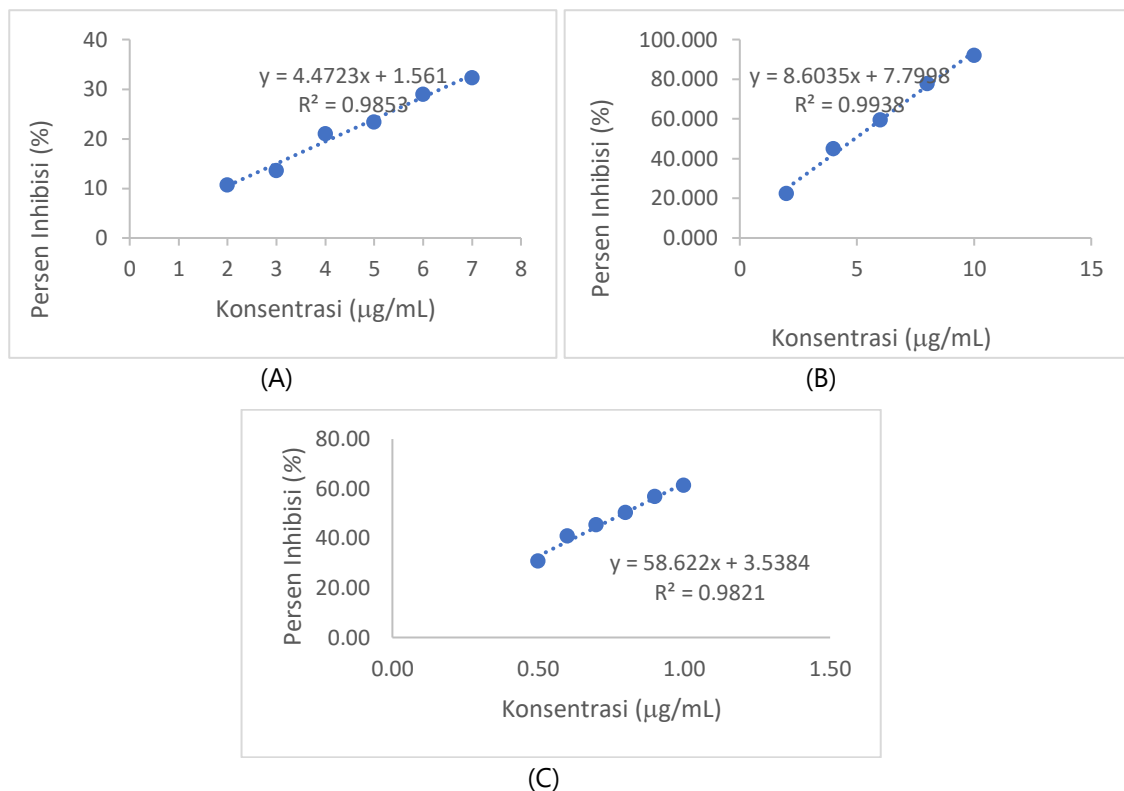
Saponin teridentifikasi melalui pembentukan busa, yang terjadi karena keberadaan gugus glikosil polar dan gugus steroid atau triterpenoid nonpolar. Senyawa ini bersifat aktif permukaan dan membentuk misel ketika dikocok dengan air, di mana gugus polar menghadap keluar dan gugus nonpolar menghadap ke dalam, sehingga tampak berbusa.<sup>19</sup> Identifikasi tanin menunjukkan hasil positif yang ditandai dengan perubahan warna menjadi biru kehitaman, mengindikasikan keberadaan tanin terkondensasi.<sup>21</sup>

Uji steroid dan triterpenoid menggunakan metode Liebermann-Burchard menunjukkan hasil yang khas, di mana reaksi triterpenoid menghasilkan warna merah-ungu kecoklatan, sedangkan steroid menghasilkan warna hijau-biru. Perbedaan warna ini disebabkan oleh variasi gugus pada atom C4 dalam struktur senyawa.<sup>19</sup>

**Tabel 1.** Hasil Pengujian Skrining Fitokimia Ekstrak Etanol Kulit Biji dan Buah Bakau

Metabolit sekunder	Hasil		Keterangan	Reaksi Positif (Pustaka)
	Kulit Biji	Buah		
Alkaloid	Positif	Positif	Endapan jingga	Endapan kuning-jingga <sup>13</sup>
Flavonoid	Positif	Positif	Warna kuning/jingga	Warna kuning, jingga atau merah <sup>22</sup>
Saponin	Positif	Positif	Busa stabil	Busa konsisten <sup>22</sup>
Tannin	Positif	Positif	Warna biru kehitaman	Warna biru kehitaman <sup>23</sup>
Triterpenoid/ Steroid	Positif mengandung triterpenoid	Positif mengandung triterpenoid	Warna kecoklatan mengandung triterpenoid. Warna kehijauan mengandung steroid	Cincin kecoklatan atau violet menunjukkan adanya triterpenoid. Cincin biru kehijauan menunjukkan adanya steroid <sup>24</sup>





**Gambar 2.** Kurva Regresi Linier (A) Asam Galat, (B) Ekstrak Etanol Kulit Biji Bakau, (C) Ekstrak Etanol Buah Bakau

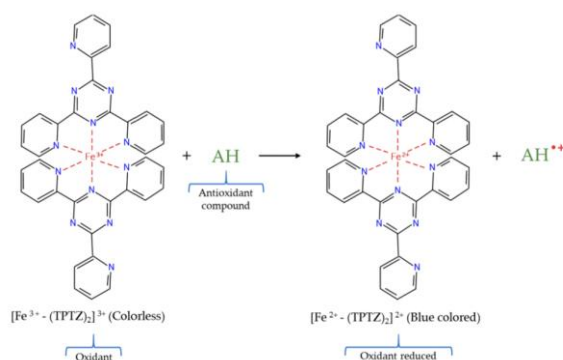
**Tabel 2.** Hasil Pengujian Antioksidan Ekstrak Kulit Biji dan Buah Bakau menggunakan Metode DPPH

No	Sampel	Konsentrasi ( $\mu\text{g/mL}$ )	% Inhibisi $\pm$ SD
1	Asam Galat	0,00	0,00 $\pm$ 0,00
		0,50	30,68 $\pm$ 0,26
		0,60	40,85 $\pm$ 0,13
		0,70	45,29 $\pm$ 0,45
		0,80	50,28 $\pm$ 0,09
		0,90	56,75 $\pm$ 0,17
		1,00	61,18 $\pm$ 0,29
		<b>IC<sub>50</sub> = 0,793 <math>\mu\text{g/mL}</math></b>	
2	Ekstrak Kulit Biji Bakau	2	10,68 $\pm$ 0,56
		3	13,65 $\pm$ 0,28
		4	21,07 $\pm$ 0,19
		5	23,44 $\pm$ 0,51
		6	28,93 $\pm$ 0,49
		7	32,34 $\pm$ 0,08
		<b>IC<sub>50</sub> = 10,83 <math>\mu\text{g/mL}</math></b>	
3	Ekstrak Buah Bakau	2	22,50 $\pm$ 0,36
		4	45,01 $\pm$ 0,61
		6	59,63 $\pm$ 0,17
		8	77,84 $\pm$ 0,23
		10	92,12 $\pm$ 0,46
<b>IC<sub>50</sub> = 4,91 <math>\mu\text{g/mL}</math></b>			

Analisis statistik persen inhibisi (peredaman) dari ekstrak kulit biji dan buah bakau menunjukkan data terdistribusi normal dengan nilai  $p > 0,05$ . Hasil analisis *Independent T-Test* menunjukkan terdapat perbedaan bermakna ( $p < 0,05$ ) persen inhibisi antara ekstrak kulit biji bakau dengan ekstrak buah bakau dengan nilai  $p$  sebesar 0,001 dengan metode DPPH.

**Aktivitas Antioksidan dengan Metode FRAP**

Pengujian aktivitas antioksidan dengan metode FRAP pertama kali dilaporkan oleh Benzie dan Strain<sup>31</sup>, merupakan salah satu metode berbasis transfer elektron.<sup>32</sup> Prinsip kerja dari metode FRAP yaitu mengukur kemampuan antioksidan dalam mereduksi ion ferri ( $Fe^{3+}$ ) menjadi ion ferro ( $Fe^{2+}$ ). Reagen FRAP yang digunakan dalam penelitian ini adalah kompleks ferri 2,4,6-tripiridil-s-triazin [ $Fe^{3+}-(TPTZ)_2$ ]<sup>3+</sup>, yaitu garam besi yang dihasilkan dari campuran 2,4,6-tripiridil-s-triazin (TPTZ) dan  $FeCl_3$  dalam medium asam. Kompleks ferri tak berwarna [ $Fe^{3+}-(TPTZ)_2$ ]<sup>3+</sup> dapat direduksi oleh senyawa antioksidan menjadi kompleks ferro berwarna biru tua [ $Fe^{2+}-(TPTZ)_2$ ]<sup>2+</sup> (**Gambar 3**).<sup>33</sup> TPTZ merupakan suatu *colorants* dan  $Fe(III)$  merupakan radikal bebas. Proses pengujian dilakukan pada pH asam.<sup>34</sup> Pengujian antioksidan pada metode DPPH dan FRAP memiliki karakteristiknya masing-masing.<sup>10,35</sup>



**Gambar 3.** Reaksi Reduksi pada Metode FRAP<sup>33</sup>

Ekstrak etanol kulit biji dan buah bakau memiliki aktivitas antioksidan yang ditunjukkan dengan nilai *Reducing Power 50* ( $RP_{50}$ ) sebesar 4.455,63  $\mu g/mL$  dan 15.556,32  $\mu g/mL$  (secara berturut-turut) (**Tabel 3**), yang ditandai dengan adanya perubahan warna menjadi biru pada uji FRAP. Standar yang digunakan dalam pengujian ini adalah asam galat, dimana nilai  $RP_{50}$  yang dihasilkan sebesar 34,04  $\mu g/mL$ . Nilai *Reducing Power* merupakan nilai yang menunjukkan kemampuan aktivitas antioksidan dalam mereduksi kompleks ferri ( $Fe^{3+}$ ) dari 2,4,6-Tris(2-pyridyl)-1,3,5-triazine (TPTZ) menjadi kompleks ferro ( $Fe^{2+}$ ). Adapun kurva persen *reducing power* dari asam galat, ekstrak etanol kulit biji dan buah bakau dapat dilihat pada **Gambar 4**.

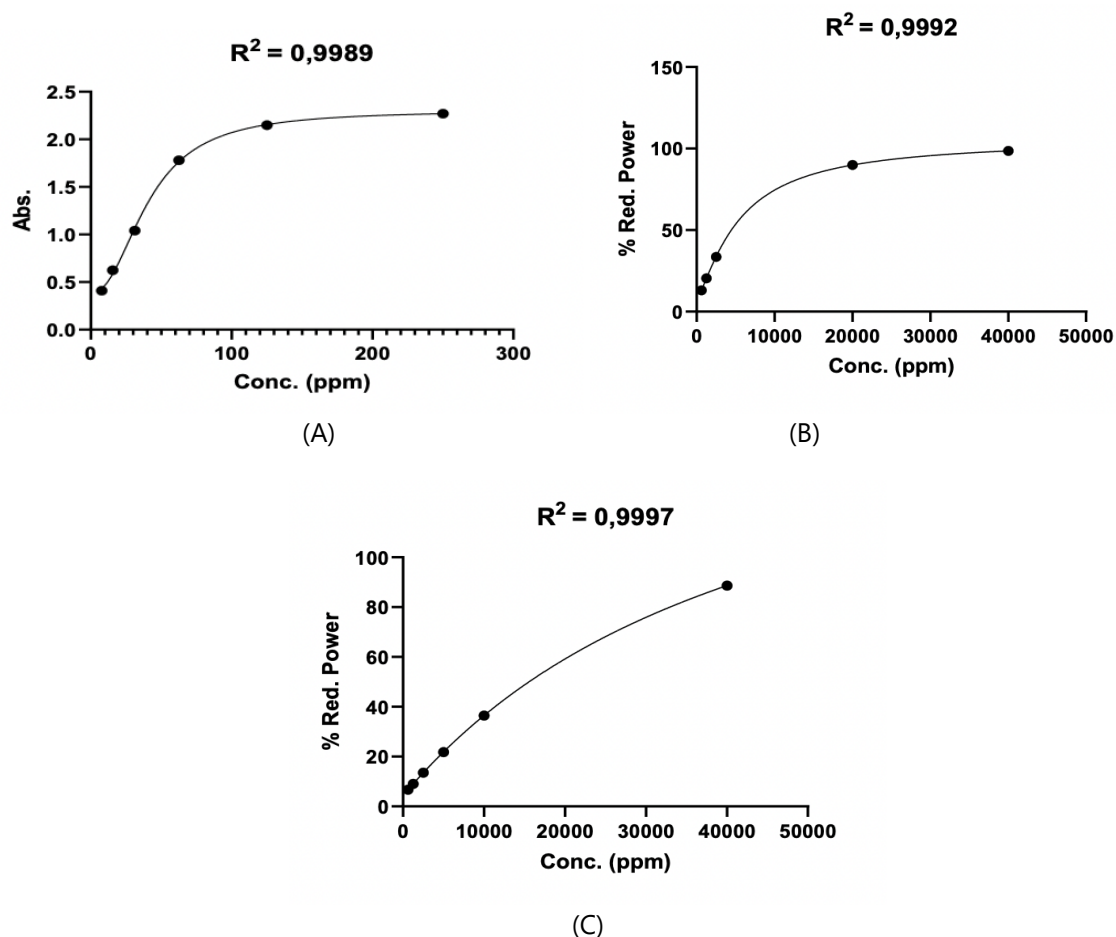
**Tabel 3.** Hasil Pengujian Antioksidan Ekstrak Kulit Biji dan Buah Bakau menggunakan Metode FRAP

No	Sampel	Konsentrasi ( $\mu g/mL$ )	% <i>Reducing Power</i> $\pm$ SD
1	Asam Galat	250,00	98,48 $\pm$ 0,38
		125,00	93,24 $\pm$ 0,89
		62,50	77,30 $\pm$ 1,11
		31,25	45,16 $\pm$ 0,20
		15,63	27,11 $\pm$ 0,04
		7,81	17,80 $\pm$ 0,14
		<b><math>RP_{50} = 34,04 \mu g/mL</math></b>	
2	Ekstrak Kulit Biji Bakau	40.000	98,50 $\pm$ 1,26
		20.000	89,95 $\pm$ 1,31
		2.500	33,61 $\pm$ 1,85
		1.250	20,48 $\pm$ 0,67
		625	13,08 $\pm$ 0,16
<b><math>RP_{50} = 4.455,63 \mu g/mL</math></b>			
3	Ekstrak Buah Bakau	40.000	88,66 $\pm$ 0,78
		10.000	36,49 $\pm$ 0,96
		5.000	21,78 $\pm$ 0,56
		2.500	13,53 $\pm$ 0,04
		1.250	9,08 $\pm$ 0,25
		625	6,72 $\pm$ 0,17
<b><math>RP_{50} = 15.556,32 \mu g/mL</math></b>			



Analisis statistik persen *reducing power* dari ekstrak kulit biji dan buah bakau menunjukkan data tidak terdistribusi normal dengan nilai  $p < 0,05$ . Hasil analisis *Mann Whitney* menunjukkan terdapat perbedaan bermakna ( $p < 0,05$ ) persen *reducing power* antara ekstrak kulit biji bakau dengan ekstrak buah bakau dengan nilai  $p$  sebesar 0,047 dengan metode FRAP.

Berdasarkan hasil pengujian aktivitas antioksidan ekstrak kulit biji dan buah bakau dengan metode DPPH dan FRAP menunjukkan bahwa perbedaan metode uji dapat mempengaruhi aktivitas antioksidan dari masing-masing ekstrak. Hal ini disebabkan oleh mekanisme reaksi setiap metode dalam meredam radikal bebas berbeda-beda, tergantung pada jenis radikal bebas, pelarut radikal bebas, aksesibilitas sterik dan pH. Metode DPPH dan FRAP memiliki kelebihan dan kekurangannya masing-masing.<sup>33</sup>



**Gambar 4.** Kurva Persen *Reducing Power* (A) Asam Galat, (B) Ekstrak Etanol Kulit Biji Bakau, (C) Ekstrak Etanol Buah Bakau

### Potensi Metabolit Sekunder Ekstrak sebagai Antioksidan

Potensi aktivitas antioksidan ekstrak etanol kulit biji dan buah bakau disebabkan oleh adanya metabolit sekunder yang terkandung pada ekstrak. Hasil skrining fitokimia ekstrak kulit biji dan buah bakau menunjukkan adanya kandungan metabolit sekunder diantaranya senyawa flavonoid, alkaloid, tanin, saponin dan triterpenoid. Hal ini diperkuat oleh hasil penelitian yang dilakukan oleh Ansyori (2024) terkait uji aktivitas antioksidan pada ekstrak biji buah nyirih yang mana pada ekstrak tersebut mengandung senyawa metabolit sekunder yakni flavonoid, alkaloid, tanin, saponin yang menyebabkan ekstrak tersebut memiliki aktivitas antioksidan dengan kategori sangat kuat dengan nilai  $IC_{50}$  yang didapatkan yaitu sebesar  $8,27 \mu\text{g/mL}$ .<sup>36</sup>

Flavonoid yang terkandung dalam ekstrak bakau merupakan suatu senyawa polifenol yang terdiri dari 15 atom karbon dan memiliki mekanisme kerja sebagai antioksidan dengan menstimulasi enzim superoksida

dismutase (SOD) dan catalase (CAT) melalui peningkatan sintesis Nrf2 sehingga mengakibatkan berkurangnya jumlah radikal bebas. Mekanisme kerja lain dari flavonoid yaitu dengan menyumbangkan atom hidrogen yang berasal dari cincin aromatiknya ke radikal bebas sehingga mengurangi radikal bebas yang memiliki sifat toksik, kemudian menghasilkan radikal flavonoid yang lebih stabil dan tidak toksik. Potensi antioksidan ini terjadi karena senyawa flavonoid memiliki struktur stabil yang memungkinkan untuk mengurangi radikal bebas yang sangat reaktif menjadi radikal aroksil yang kurang reaktif.<sup>37</sup>

Selain mengandung flavonoid, ekstrak etanol kulit biji dan buah bakau juga mengandung alkaloid yang merupakan salah satu senyawa metabolit sekunder yang mengandung atom nitrogen. Senyawa alkaloid pada ekstrak bakau memiliki aktivitas antioksidan dengan mekanisme kerja menghambat sintesis protein dari enzim NADPH-oksidadase (NOX), menurunkan ekspresi p47phox atau subunit NADPH-oksidadase non-enzimatik lainnya dan meningkatkan sintesis Nrf2 yang menyebabkan terjadinya peningkatan ekspresi dari dismutase superoksida mitokondria (SOD2) dan katalase sehingga terjadi penurunan stres oksidatif.<sup>38</sup>

Tanin termasuk golongan senyawa polifenol yang memiliki struktur senyawa stabil yang terdiri dari cincin benzena (C<sub>6</sub>) yang berikatan dengan gugus hidroksil (-OH). Senyawa tanin pada ekstrak bakau memiliki mekanisme kerja dengan menyumbangkan atom hidrogennya ke radikal bebas sehingga terjadi reaksi kimia yang menyebabkan senyawa yang semula radikal berubah menjadi non radikal.<sup>39</sup>

Saponin yang terkandung dalam ekstrak bakau dapat mengurangi radikal superoksida melalui pembentukan intermediet hidropersida sehingga dapat mencegah kerusakan molekuler akibat adanya radikal bebas.<sup>40</sup> Menurut penelitian Chen et al. (2014) senyawa saponin memiliki aktivitas antioksidan yang ditandai dengan peningkatan kadar SOD dan T-AOC yang menyebabkan terhambatnya pembentukan lipid peroksida pada tikus dengan kerusakan hati setelah pemberian ekstrak *radix trichosanthis* yang mengandung senyawa saponin.<sup>41</sup>

Senyawa triterpenoid dapat menyumbangkan atom hidrogen (H) sehingga mengubah radikal bebas menjadi non reaktif. Senyawa triterpenoid mampu menghambat reaksi ROS, mereduksi ion logam dan memodulasi fosforilasi protein yang dihubungkan dengan penghambatan aktivitas enzim dan penghambatan peroksidasi lipid.<sup>39</sup>

### **Keuntungan dan Kerugian Pengujian Aktivitas Antioksidan dengan Metode DPPH dan FRAP**

Metode DPPH dan FRAP memiliki keunggulan dalam pengujian aktivitas antioksidan, seperti kesederhanaan prosedur, waktu analisis yang cepat, dan tidak memerlukan peralatan khusus. Namun, metode DPPH memiliki keterbatasan karena radikal DPPH hanya larut dalam pelarut organik, khususnya alkohol, sehingga kurang sesuai untuk mengukur antioksidan hidrofilik. Selain itu, radikal DPPH tidak menyerupai radikal peroksil yang berperan dalam peroksidasi lipid pada sistem biologis, sehingga kurang representatif untuk sampel tertentu. Penggunaannya pada sampel emulsi juga terbatas karena hasil pengujian dapat dipengaruhi oleh distribusi antioksidan dalam berbagai fase. Kendala lain pada metode ini adalah kemungkinan presipitasi protein dalam larutan alkohol, yang dapat mengganggu hasil pengujian.<sup>10,33,35</sup>

Metode FRAP juga memiliki beberapa keterbatasan yang perlu diperhatikan. Senyawa dengan potensial redoks lebih rendah dari Fe<sup>3+</sup>/Fe<sup>2+</sup> dapat berkontribusi pada nilai FRAP, sehingga menghasilkan kapasitas antioksidan yang lebih tinggi dari sebenarnya. Metode ini juga tidak dapat mendeteksi antioksidan dengan gugus -SH seperti glutation serta senyawa antioksidan yang bekerja melalui transfer hidrogen, seperti karotenoid dan beberapa protein. Uji FRAP membutuhkan pH 3,6 untuk menjaga kelarutan kation besi, yang dapat menyebabkan presipitasi protein. Keterbatasan lainnya adalah ketidakmampuannya dalam mengukur kapasitas antioksidan terhadap berbagai jenis radikal bebas karena tidak menggunakan radikal bebas dalam proses pengujiannya. Selain itu, Fe<sup>2+</sup> dalam metode ini bersifat pro-oksidan dan dapat menghasilkan radikal bebas tambahan seperti OH• yang memicu reaksi oksidasi lebih lanjut. Interferensi juga dapat terjadi akibat adanya zat yang menyerap pada panjang gelombang pengujian, sehingga mempengaruhi akurasi pengukuran absorbansi.<sup>10,33,35</sup>

## SIMPULAN

Ekstrak etanol kulit biji dan buah bakau (*X. granatum*) menunjukkan aktivitas antioksidan yang signifikan dengan nilai IC<sub>50</sub> sebesar 10,83 µg/mL dan 4,91 µg/mL serta nilai RP<sub>50</sub> sebesar 4.455,63 µg/mL dan 15.556,32 µg/mL, hasil uji dari metode DPPH dan FRAP. Penggunaan kedua metode ini memberikan gambaran komprehensif tentang potensi antioksidan ekstrak, yang dipengaruhi oleh jenis radikal bebas, pelarut, dan kondisi pengujian. Hasil ini membuka peluang untuk pengembangan ekstrak bakau sebagai sumber antioksidan alami dalam produk kesehatan dan kosmetik.

## UCAPAN TERIMA KASIH

Ucapan terimakasih disampaikan kepada Fakultas Farmasi Universitas Mahasaraswati Denpasar yang telah mendukung dan mendanai penelitian serta penulisan karya ilmiah ini.

## KONFLIK KEPENTINGAN

Tidak ada konflik kepentingan antar penulis dalam naskah ini.

## DAFTAR PUSTAKA

1. Arnanda QP, Nuwarda RF. Penggunaan Radiofarmaka Teknisium-99M dari Senyawa Glutation dan Senyawa Flavonoid Sebagai Deteksi Dini Radikal Bebas Pemicu Kanker. *Farmaka*. 2019;17(2):236-243.
2. Linda O, Rahayu LS. Prevensi Awal dan Lanjutan Penyakit Degeneratif untuk Usia Dewasa di Masa Pandemi COVID-19. *Jurnal Arsip Pengabdian Masyarakat*. 2021;2(1):107-115.
3. Amanda KA, Mustofa S, Nasution SH. Review Efek Antioksidan pada Kemuning (*Murraya paniculata* (L.) Jack). *Majority*. 2019;8(2):265-272.
4. Henny, Diba F, Anwari S. Tumbuhan Mangrove yang Berpotensi sebagai Obat di Kawasan PT. Kandelial Alam Kecamatan Kubu Kabupaten Kubu Raya. *Jurnal Hutan Lestari*. 2017;5(4):1100-1110.
5. Wardani IGAA, Jawi IM, Senapathi TGA, et al. The Effect of *Xylocarpus granatum* J. Koenig Seed Extract Cream on the Number of Fibroblast and Re-Epithelialization in IIA Degree Burn Wound Healing. *Indonesian Journal of Pharmacy*. 2022;33(4):653-665. doi:https://doi.org/10.22146/ijp.3461
6. Yin ZZ, Khine WW, Thu HM. Investigation on Phytochemical Constituents and Antimicrobial Activity of *Xylocarpus granatum* J. Koenig. *Myanmar Korea Conference Research Journal*. 2018;3(3):1180-1186.
7. Noviarni I, Batubara I, Putri SP. Antiglycation and Antioxidant Activity from Methanol Extract and Fraction of *Xylocarpus granatum* Stem. *Jurnal Kimia Sains dan Aplikasi*. 2020;23(1):21-27. doi:10.14710/jksa.23.1.21-27
8. Dey D, Quispe C, Hossain R, et al. Ethnomedicinal Use, Phytochemistry, and Pharmacology of *Xylocarpus granatum* J. Koenig. *Evidence-based Complementary and Alternative Medicine*. 2021;2021:1-16. doi:10.1155/2021/8922196
9. Ramadani N, Andayani R, Marliza H. Penentuan Kadar Fenolat Total Ekstrak Kulit Buah Nyireh (*Xylocarpus Granatum* J.Koenig) Dengan Spektrofotometri Uv-Visibel. *Katalisator*. 2020;5(2):106-111.
10. Theafelicia Z, Wulan SN. Perbandingan Berbagai Metode Pengujian Aktivitas Antioksidan (DPPH, ABTS, dan FRAP) pada teh Hitam (*Camellia sinensis*). *Jurnal Teknologi Pertanian*. 2023;1(24):35.
11. Sholihah M, Ahmad U, Budiastira IW. Application of Ultrasonic Wave to Increase Extraction Yield and Effectiveness of Antioxidant from *Mangosteen* Rind. *Jurnal Keteknik Pertanian*. 2017;05(2):161-168. doi:10.19028/jtep.05.2.161-168
12. Puspitasari L, Swastini D a., Arisanti CI a. Skrining Fitokimia Ekstrak Etanol 95% Kulit Buah Manggis (*Garcinia mangostana* L.). *Jurnal Farmasi Udayana*. 2013;2(3):1-5.
13. Departemen Kesehatan Republik Indonesia. *Materia Medika Indonesia Jilid V*. Departemen Kesehatan RI; 1989.
14. Ergina, Nuryanti S, Pursitasari ID. Uji Kualitatif Senyawa Metabolit Sekunder Pada Daun Palado (*Agave Angustifolia*) yang Diekstraksi Dengan Pelarut Air dan Etanol. *J Akad Kim*. 2014;3(3):165-172.
15. Hendrawan, Zuraida I, Pamungkas BF. Aktivitas Antibakteri Ekstrak Metanol *Xylocarpus granatum* dari Pesisir Muara Badak. *Jurnal Ilmu Perikanan Tropis*. 2015;20(2):15-22.
16. Blois M. Antioxidant determinations by the use of a stable free radical. *Nature*. 1958;181:1199-1200.

17. Tang J, Dunshea FR, Suleria HAR. LC-ESI-QTOF/MS characterization of phenolic compounds from medicinal plants (Hops and Juniper Berries) and their antioxidant activity. *Foods*. 2020;9(1):1-25. doi:10.3390/foods9010007
18. Hernady MJ, Yani L. Penelusuran Pustaka Potensi Aktivitas Antioksidan Ekstrak Daun Murbei (*Morus alba* L.) dengan Metode DPPH. *Bandung Conference Series: Pharmacy*. 2024;4(1):78-84. doi:10.29313/bcsp.v4i1.11929
19. Habibi AI, Firmansyah RR, Setyawati SM. Skrining Fitokimia Ekstrak n-Heksam Korteks Batang Salam (*Syzygium polyanthum*). *Indonesian Journal of Chemical Science*. 2018;7(1):1.
20. Meigaria KM, Mudianta IW, Martiningsih NW. Skrining Fitokimia dan Uji Aktivitas Antioksidan Ekstrak Aseton Daun Kelor (*Moringa oleifera*). *Jurnal Wahana Matematika dan Sains*. 2016;10(2):1.
21. Yanti S, Vera Y. Skrining Fitokimia Ekstrak Daun Belimbing Wuluh (*Averrhoa Bilimbi*). *Indonesian Health Scientific Journal*. 2019;4(2):41-46.
22. Agada R, Usman WA, Shehu S, Thagariki D. In vitro and in vivo inhibitory effects of *Carica papaya* seed on  $\alpha$ -amylase and  $\alpha$ -glucosidase enzymes. *Heliyon*. 2020;6(3):e03618. doi:10.1016/j.heliyon.2020.e03618
23. Ergina, Nuryanti S, Pursitasari ID. Uji Kualitatif Senyawa Metabolit Sekunder Pada Daun Palado (*Agave angustifolia*) Yang Diekstraksi Dengan Pelarut Air Dan Etanol. *J Akad Kim*. 2014;3(3):165-172.
24. Puspitasari L, Swastini DA., Arisanti CIA. Skrining Fitokimia Ekstrak Etanol 95% Kulit Buah Manggis (*Garcinia mangostana* L.). *Garuda Portal*. 2013;961:5.
25. Paat SFA, Antasionasti I. Uji Aktivitas Antioksidan Dari Ekstrak Etanol Kulit Buah Lemon Suanggi (*Citrus lemon* L.) Dengan Metode Dpph (1,1-diphenil-2-picrylhydrazyl). 2022;11:1315-1320.
26. Setiawan F, Yunita O, Kurniawan A. Uji aktivitas antioksidan ekstrak etanol kayu secang dan FRAP. *Media Pharmaceutica Indonesiana*. 2018;2(2):82-89.
27. Widyasanti A, Rohdiana D, Ekatama N. *Antioxidant Activities of White Tea Extract (Camellia Sinensis) Using DPPH (2,2 Diphenyl-1-Picrylhydrazyl) Method*. Vol 1.; 2016. <http://ejournal.upi.edu/index.php>
28. Petrina R, Alimuddin AH, Harlia. Uji Aktivitas Antioksidan dan Toksisitas Kulit Biji Pinang Sirih (*Areca catechu* L.). *Jurnal Kimia Khatulistiwa*. 2017;6(2):70-77.
29. Armin F, Dewi YY, Mahyuddin. Penentuan Kadar Senyawa Fenolat dan Uji Aktivitas Antioksidan pada Buah Terung Belanda (*Cyphomandra Betacea* (Cav.) Sendtn) secara Spektrofotometri Visibel. *Jurnal Farmasi Higea*. 2011;3(1):1-15.
30. Hidayati JR, Fitri M, Hasibuan BZ, et al. Antioxidant Activity and Bioactive Coumpounds Extract of *Xylocarpus granatum* Fruit from Pengudang Village, Riau Island. *J Mar Biotechnol Immunol*. 2025;3(1):3026-1457.
31. Benzie IFF, Strain JJ. The ferric reducing ability of plasma (FRAP) as a measure of "antioxidant power": the FRAP assay. *Anal Biochem*. 1996;239:70-76.
32. Gulcin I. Antioxidants and antioxidant methods: An updated overview. *Arch Toxicol*. 2020;94:651-715.
33. Echegaray N, Pateiro M, Munekata PES, et al. Measurement of antioxidant capacity of meat and meat products: Methods and applications. *Molecules*. 2021;26(13):1-21. doi:10.3390/molecules26133880
34. Indriyah SIN, Permatasari DAI, Pratama KJ. Penetapan Kadar Fenolik Serta Uji Aktivitas Antioksidan Ekstrak dan Fraksi Batang Bajakah Kalalawit (*Uncaria Gambir* Roxb) Dengan Metode FRAP. *Jurnal Kesehatan Tradisional*. 2023;1(2):147-158. doi:10.47861/usd.v1i2..347
35. Rumpf J, Burger R, Schulze M. Statistical evaluation of DPPH, ABTS, FRAP, and Folin-Ciocalteu assays to assess the antioxidant capacity of lignins. *Int J Biol Macromol*. 2023;233:1-9. doi:10.1016/j.ijbiomac.2023.123470
36. Ansyori AK, Tamrin M, Sa'adah H. Uji Aktivitas Antioksidan Ekstrak Etanol Biji Buah Nyirih (*Xylocarpus granatum*) Dengan Metode Dpph Secara Spektrofotometri UV-Vis. 2024;6(2):233-248.
37. Rodriguez PH, Baquero LP, Larrota HR. *Flavonoids*. Elsevier Inc.; 2019. doi:10.1016/B978-0-12-814774-0.00014-1
38. Macaakova K, Afonso R, Saso L, Mladenka P. The influence of alkaloids on oxidative stress and related signaling pathways. *Free Radic Biol Med*. 2019;134(January):429-444. doi:10.1016/j.freeradbiomed.2019.01.026
39. Vrianty D, Laila RQ, Widowati W, et al. Comparison of Antioxidant and Anti-Tyrosinase Activities of Pineapple (*Ananas comosus*) Core Extract and Luteolin Compound Perbandingan Aktivitas Antioksidan

- dan Anti-Tirosinase pada Ekstrak Bonggol Nanas (*Ananas comosus*) dan Senyawa Luteolin 1 2 2 1 1 1. *Jurnal Kedokteran Brawijaya*. 2019;30(4):240-246.
40. Kumaradewi DAP, Subaidah WA, Andayani Y, Al-Mokaram A. Phytochemical Screening and Activity Test of Antioxidant Ethanol Extract of Buni Leaves (*Antidesma bunius* L. Spreng) Using DPPH Method. *Jurnal Penelitian Pendidikan IPA*. 2021;7(2):275. doi:10.29303/jppipa.v7i2.675
41. Chen Y, Miao Y, Huang L, et al. Antioxidant activities of saponins extracted from Radix Trichosanthis: An in vivo and in vitro evaluation. *BMC Complement Altern Med*. 2014;14(1):1-8. doi:10.1186/1472-6882-14-86