

UJI AKTIVITAS ANTIOKSIDAN METODE DPPH DAN NILAI SPF EKSTRAK ETANOL DAUN BELIMBING WULUH (*Averrhoa bilimbi* L.)

ANTIOXIDANT ACTIVITY TEST OF DPPH METHOD AND SPF ETHANOL EXTRACT OF BELIMBING WULUH LEAVES (*Averrhoa bilimbi* L.)

Eka Ratna Ningsih¹, Laeli Fitriyati^{1*}, Titi Pudji Rahayu¹, Naelaz Zukhruf Wakhidatul Kiromah¹

ARTICLE INFO

Submitted: 3-11-2023

Revised: 13-12-2024

Accepted: 31-12-2024

¹Fakultas Ilmu Kesehatan, Universitas Muhammadiyah Gombong, Kebumen

*Laeli Fitriyati

Email: laeli.fitriyati.lf@gmail.com



ABSTRAK

Radikal bebas adalah senyawa tidak stabil yang merusak sel tubuh, terutama akibat paparan radiasi UV yang menyebabkan hiperpigmentasi, penuaan dini, hingga kanker kulit. Antioksidan dapat menetralkan radikal bebas, tetapi antioksidan sintetik sering memiliki efek samping, sehingga diperlukan alternatif alami yang lebih aman. Indonesia memiliki keanekaragaman hayati yang kaya, termasuk belimbing wuluh (*Averrhoa bilimbi* L.), yang diketahui mengandung senyawa flavonoid dan fenolik dengan potensi antioksidan tinggi. Namun, penelitian tentang aktivitas antioksidan, nilai SPF, serta kandungan fenolik dan flavonoid total dari ekstrak etanol 70% daun belimbing wuluh dengan metode DPPH belum dilakukan secara komprehensif. Penelitian ini bertujuan mengevaluasi aktivitas antioksidan, nilai SPF, serta kadar fenolik dan flavonoid total dari ekstrak etanol 70% daun belimbing wuluh. Metode penelitian meliputi pembuatan simplisia, ekstraksi menggunakan etanol 70%, dan pengujian aktivitas antioksidan dengan metode DPPH. Kadar fenolik total diukur menggunakan pereaksi *Folin-Ciocalteu*, flavonoid total menggunakan $AlCl_3$, dan nilai SPF diuji secara *in vitro* menggunakan spektrofotometer UV-Vis. Data dianalisis secara deskriptif menggunakan Microsoft Excel. Hasil penelitian menunjukkan kadar fenolik total ekstrak etanol daun belimbing wuluh sebesar 95.37 mg GAE/g dan flavonoid total sebesar 6.91 mg QE/g. Aktivitas antioksidan sangat kuat dengan nilai IC_{50} sebesar 21.53 ppm, sedangkan nilai SPF mencapai 30.63, yang memberikan proteksi selama 5.11 jam terhadap radiasi UV. Berdasarkan hasil tersebut, ekstrak etanol daun belimbing wuluh terbukti sebagai antioksidan sangat kuat dengan kemampuan memberikan perlindungan kulit yang efektif terhadap sinar matahari.

Kata Kunci : Fenolik, Flavonoid, Antioksidan, SPF

ABSTRACT

Free radicals are unstable compounds that can damage body cells, primarily due to UV radiation, which leads to hyperpigmentation, premature aging, and even skin cancer. Antioxidants can neutralize free radicals, but synthetic antioxidants often have adverse side effects, necessitating safer natural alternatives. Indonesia's rich biodiversity includes *Averrhoa bilimbi* L. (bilimbi), known to contain flavonoids and phenolic compounds with high antioxidant potential. However, studies on the antioxidant activity, SPF value, and total phenolic and flavonoid contents of 70% ethanol extracts of bilimbi leaves using the DPPH method have not been extensively conducted. This study aims to evaluate the antioxidant activity, SPF value, and total phenolic and flavonoid contents of the 70% ethanol extract of bilimbi leaves. The research methods included preparing the simplicia, extracting using 70% ethanol, and testing antioxidant activity using the DPPH method. Total phenolic content was determined using Folin-Ciocalteu reagent, total flavonoid content using $AlCl_3$, and SPF value *in vitro* using a UV-Vis spectrophotometer. Data were analyzed descriptively using Microsoft Excel. The results showed that the total phenolic content of the bilimbi leaf ethanol extract was 95.37 mg GAE/g, and the total flavonoid content was 6.91 mg QE/g. The antioxidant activity was categorized as very strong, with an IC_{50} value of 21.53 ppm, while

the SPF value reached 30.63, providing 5.11 hours of UV protection. Based on these findings, the ethanol extract of bilimbi leaves is a very strong antioxidant and effectively protects the skin from UV radiation.

Keyword : Phenolic, Flavonoid, Antioxidant, SPF

1. PENDAHULUAN

Radikal bebas merupakan senyawa tidak stabil dan bersifat sangat reaktif karena memiliki elektron tidak berpasangan pada orbit terluarnya (Syahara and Vera, 2020). Radikal bebas dapat terbentuk melalui metabolisme sel normal, radiasi *ultra violet* dan zat pemicu radikal seperti polusi (Kusbandari *et al.*, 2017). Radiasi *ultra violet* meningkatkan produksi ROS (*Reactive Oxygen Species*) yang berperan dalam kerusakan sel dalam tubuh (Ikrima *et al.*, 2020). Radiasi *ultra violet* yang dipaparkan oleh sinar matahari menjadi penyebab kulit mengalami hiperpigmentasi, penuaan dini, hingga kanker kulit (Pramiastuti, 2019). Produksi radikal bebas dapat dihambat dengan penggunaan antioksidan (Mangkasa *et al.*, 2018).

Antioksidan adalah zat yang berfungsi untuk menetralkan radikal bebas dan mencegah reaksi autooksidasi sehingga tidak terjadi oksidasi berlebihan dalam tubuh (Berawi and Agverianti, 2017). Antioksidan bekerja dengan cara mendonorkan satu elektron ke suatu senyawa yang bersifat oksidan (Mustiqawati *et al.*, 2022). Antioksidan bekerja sebagai filter pada permukaan kulit, menyerap atau memantulkan sinar *ultra violet* sehingga dapat melindungi kulit dari paparan sinar matahari (Utami *et al.*, 2019). Efektivitas suatu zat dalam melindungi kulit dari radiasi *ultra violet* ditunjukkan dengan nilai SPF (*Sun Protection Factor*) (Hassan *et al.*, 2017). Semakin tinggi aktivitas antioksidan maka nilai SPF akan semakin tinggi (Suharsanti, 2019).

Tubuh dapat memproduksi antioksidan namun produksinya menurun seiring bertambahnya usia, sehingga diperlukan antioksidan dari luar tubuh (Maesaroh *et al.*, 2018). Antioksidan terbagi menjadi dua jenis yaitu alami dan sintetik (Arbain *et al.*, 2017). Antioksidan sintetik diperoleh dari senyawa kimia seperti *Butyl Hidroksi Anisol* (BHA), *Butyl Hidroksi Toluene* (BHT), dan *Terbutyl Hidroksi Quinon* (TBHQ) (Dhiru, 2013). Penggunaan antioksidan kimia relatif mahal dan dapat memberikan efek samping yang buruk seperti merusak paru-paru, hati dan bersifat karsinogen jika digunakan dalam jangka waktu yang lama (Fitriana *et al.*, 2015). Antioksidan alami dari tanaman menjadi alternatif yang dapat digunakan (Arbain *et al.*, 2017).

Indonesia memiliki kekayaan alam yang melimpah terutama jenis floranya yang sangat beragam (Sari *et al.*, 2019). Tanaman belimbing wuluh (*Averrhoa bilimbi* L.) banyak tumbuh di Indonesia namun pemanfaatannya belum maksimal (Yanti and Vera, 2019). Belimbing wuluh (*Averrhoa bilimbi* L.) mengandung senyawa metabolit sekunder yaitu alkaloid, flavonoid, tannin, saponin dan steroid (Yanti and Vera, 2019). Flavonoid termasuk senyawa fenolik yang banyak didapati pada tumbuhan dan berpotensi sebagai antioksidan (Arbain *et al.*, 2017).

Hasil penelitian Rahardhian *et al.*, (2019) menunjukkan etanol 70% merupakan pelarut paling optimal untuk menghasilkan jumlah rendemen, kandungan fenolik total dan flavonoid total karena memiliki tingkat kepolaran paling mendekati senyawa bioaktif pada daun belimbing wuluh (*Averrhoa bilimbi* L.). Penelitian Raja Arifin and Jumal (2021) menunjukkan kadar fenolik total ekstrak etanol 90% daun belimbing wuluh (*Averrhoa bilimbi* L.) yaitu 126.4 ± 0.35 mg GAE/g dan kadar flavonoid total 32.80 ± 0.37 mg QE/g. Aktivitas antioksidan sangat kuat diuji dengan DPPH 0.0019 ± 0.0003 μ g/ml. Metode DPPH (*2,2-Diphenyl-1-Picrylhydrazyl*) termasuk metode uji antioksidan *in vitro* menggunakan spektrofotometri UV-Vis sebagai pengukur absorbansi sehingga proses pengujiannya sederhana dan mudah dilakukan (Kusmiati *et al.*, 2018). Pengujian nilai SPF pada penelitian Raja Arifin and Jumal (2021) belum dilakukan. Berdasarkan latar belakang diatas, peneliti melakukan uji aktivitas antioksidan dengan metode DPPH (*2,2-Diphenyl-1-Picrylhydrazyl*), uji nilai SPF (*Sun Protection Factor*), penentuan kadar fenolik total dan flavonoid total ekstrak etanol 70% daun belimbing wuluh (*Averrhoa bilimbi* L.) yang belum pernah dilakukan.

2. METODE

Alat dan Bahan

Alat yang digunakan adalah beaker glass, erlenmeyer, gelas ukur (*Iwaki*), neraca analitik (*Excellent*), spektrofotometer UV-Vis (*Rittun (Ultra-3000 Series UV-Vis Spectro photometer)*), lampu UV (*WFH203B*), tabung reaksi (*Iwaki*), blender (*Philips*), labu takar (*Iwaki*), *vortex* (*Dlab*), pipet volum (*Iwaki*), pipet ukur (*Iwaki*), pipet tetes, pipet *pump*, *micropipe dragonlabt*, *waterbath* (*memmert*). batang pengaduk, kuvet, sendok logam, kaca arloji, toples kaca, pengaduk kayu, ayakan nomor 40 *mesh*, kertas saring.

Bahan yang digunakan adalah daun belimbing wuluh (*Averrhoa bilimbi* L.) berasal dari desa Bumirejo Kecamatan Kebumen, Kabupaten Kebumen, etanol 70% (Merck®), asam galat (Sigma®), pereaksi *Folin-Ciocalteu* (Merck®), Na₂CO₃ 7% (Merck®), kuersetin (Sigma®), AlCl₃ 10% (Merck®), kalium asetat 1M (Merck®), etanol p.a (Merck®), akuades (Smartlab®).

Pembuatan Simplisia

Daun belimbing wuluh (*Averrhoa bilimbi* L.) melalui tahapan sortasi basah, pencucian menggunakan air mengalir sebanyak tiga kali, pengeringan dibawah sinar matahari ditutup kain hitam, sortasi kering dan penggilingan sampai diperoleh serbuk halus dan diayak dengan ayakan nomor 40 mesh.

Pembuatan Ekstrak

Serbuk simplisia daun belimbing wuluh (*Averrhoa bilimbi* L.) dengan bobot 250 gram direndam dengan etanol 70% sebanyak 2500 ml selama 3 hari dan diaduk setiap 1x24 jam selama 15 menit. Penyaringan dilakukan menggunakan kain untuk memisahkan ampas dan filtratnya. Filtrat yang didapatkan kemudian diuapkan menggunakan *waterbath* sampai pelarut habis dan didapatkan ekstrak kental dari daun belimbing wuluh (*Averrhoa bilimbi* L.) (Wulan *et al.*, 2019). Ekstrak kental yang diperoleh ditimbang dan dihitung rendemen (Suhendra *et al.*, 2019).

Penentuan Kadar Fenolik Total

Timbang 10 mg asam galat dan larutkan dengan etanol p.a sampai 10 ml sehingga diperoleh larutan standar 1000 ppm, kemudian dibuat menjadi seri konsentrasi 2; 4; 6; 8; 10 ppm. Timbang 10 mg ekstrak kental etanol daun belimbing wuluh (*Averrhoa bilimbi* L.) dan larutkan dengan etanol p.a sampai 10 ml sehingga diperoleh larutan ekstrak 1000 ppm, kemudian diencerkan menjadi konsentrasi 100 ppm. Masing-masing konsentrasi larutan standar dan ekstrak diambil sebanyak 5 ml dan ditambahkan dengan 0.4 ml pereaksi *Folin-Ciocalteu* lalu dikocok dan dibiarkan sekitar 4-8 menit. Lalu ditambahkan 3 ml larutan Na₂CO₃ 7% kocok hingga homogen dan tambahkan aquadest hingga diperoleh volume 10 ml. Campuran diinkubasi 2 jam pada suhu kamar kemudian diukur absorbansinya pada panjang gelombang 744.8 nm (Mukhrani *et al.*, 2019). Kadar fenolik total dihitung menggunakan rumus sebagai berikut:

$$\text{Kadar fenolik total} = \frac{C \times V \times Fp}{g}$$

C : Kadar fenolik (nilai X)

V : Volume ekstrak yang digunakan (ml)

FP: Faktor pengenceran

g : Berat sampel yang digunakan

Penentuan Kadar Flavonoid Total

Timbang 10 mg kuersetin dan larutkan dengan etanol p.a sampai 10 ml sehingga diperoleh larutan standar 1000 ppm, kemudian dibuat menjadi seri konsentrasi 2; 4; 6; 8; 10 ppm. Timbang 10 mg ekstrak etanol daun belimbing wuluh (*Averrhoa bilimbi* L.) dan larutkan dengan etanol p.a sampai 10 ml sehingga diperoleh larutan ekstrak 1000 ppm, kemudian diencerkan menjadi konsentrasi 100 ppm. Masing-masing konsentrasi larutan standar dan ekstrak sebanyak 5 ml ditambahkan 3 ml etanol p.a, 0.2 ml AlCl₃ 10% dan 0.2 ml kalium asetat 1M. Setelah itu sampel diinkubasi selama 30 menit pada suhu kamar. Campuran diukur absorbansinya pada spektrofotometer UV-Vis dengan panjang gelombang 440 nm (Mukhrani *et al.*, 2019). Kadar flavonoid total dihitung menggunakan rumus sebagai berikut:

$$\text{Kadar flavonoid total} = \frac{C \times V \times Fp}{g}$$

C : Kadar kuersetin (nilai X)

V : Volume ekstrak yang digunakan (ml)

FP: Faktor pengenceran

g : Berat sampel yang digunakan

Uji Aktivitas Antioksidan

Larutan kontrol konsentrasi 40 ppm dibuat dengan cara menimbang kristal DPPH sebanyak 2 mg dengan timbangan analitik kemudian dimasukkan ke dalam labu takar 50 ml dan ditambahkan pelarut metanol p.a hingga tanda batas kemudian dihomogenkan.

Larutan stok ekstrak dan vitamin E konsentrasi 1000 ppm dibuat dengan cara menimbang 25 mg ekstrak/vitamin E dan dilarutkan dengan metanol p.a hingga 25 ml. Larutan stok 1000 ppm diambil sebanyak 20; 40; 60; 80; 100 µl kemudian ditambahkan metanol p.a sampai 10 ml sehingga didapatkan larutan uji dengan konsentrasi 2; 4; 6; 8; 10 ppm.

Larutan DPPH sebanyak 2 ml tambahkan dengan 1 ml larutan ekstrak etanol daun belimbing wuluh (*Averrhoa bilimbi* L.) maupun vitamin E dari berbagai konsentrasi kemudian divortex dan diinkubasi pada suhu kamar selama 30 menit di tempat gelap. Lalu diukur pada panjang gelombang maksimum 515 nm. sebanyak tiga kali pengulangan. Aktivitas antioksidan dihitung berdasarkan nilai persen inhibisi (IC₅₀). Persen inhibisi dihitung dengan rumus sebagai berikut:

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

Uji Nilai SPF

Pembuatan larutan induk 1000 ppm dengan cara melarutkan 10 mg ekstrak menggunakan 10 ml etanol, diultrasonifikasi selama 5 menit dan disaring. Kemudian dibuat larutan uji dengan konsentrasi 400 ppm dengan cara mengambil larutan induk sebanyak 4 ml dan ditambahkan etanol sampai 10 ml. Pemilihan 400 ppm berdasarkan penelitian sebelumnya oleh Suharsanti *et al* (2019) yang melakukan uji SPF pada belimbing wuluh dengan konsentrasi 300 ppm. Konsentrasi dinaikkan menjadi 400 ppm untuk melihat efek dari kenaikan konsentrasi terhadap nilai SPF. Penentuan nilai SPF secara *in vitro* dengan metode Spektrofotometer UV-Vis. Absorbansi diukur pada kisaran panjang gelombang 290-320 nm pada interval 5 nm dan etanol sebagai kontrol negatif (Suharsanti *et al.*, 2019). Nilai SPF dihitung menggunakan persamaan berikut:

$$\text{SPF} = \text{CF} \times \sum_{290}^{320} \text{EE}(\lambda) \times \text{I}(\lambda) \times \text{absorbansi}(\lambda)$$

CF : Faktor Kolerasi = 10

EE : Efisiensi Eritema

I : Spektrum intensitas matahari

Abs : Nilai absorbansi/serapan yang terbaca

Nilai EExI adalah konstanta dengan besaran sebagai berikut (**Tabel 1**) (Suhesti *et al.*, 2021):

Tabel 1. Nilai EExI pada Panjang Gelombang 290-320 nm

Panjang Gelombang (λ)	EExI
290	0,0150
295	0,0817
300	0,2874
305	0,3278
310	0,1864
315	0,0839
320	0,0180
Total	1

Analisis Data

Data hasil uji kadar fenolik total, flavonoid total, uji aktivitas antioksidan dan uji nilai SPF (*Sun Protection Factor*) diperoleh dari pengukuran absorbansi dengan 3 kali replikasi pada panjang gelombang maksimal. Perhitungan kadar Fenolik total, kadar flavonoid total, nilai aktivitas antioksidan dan nilai SPF dilakukan dengan *Microsoft Excel* kemudian ditampilkan dalam bentuk deskriptif dan grafik.

3. HASIL DAN PEMBAHASAN

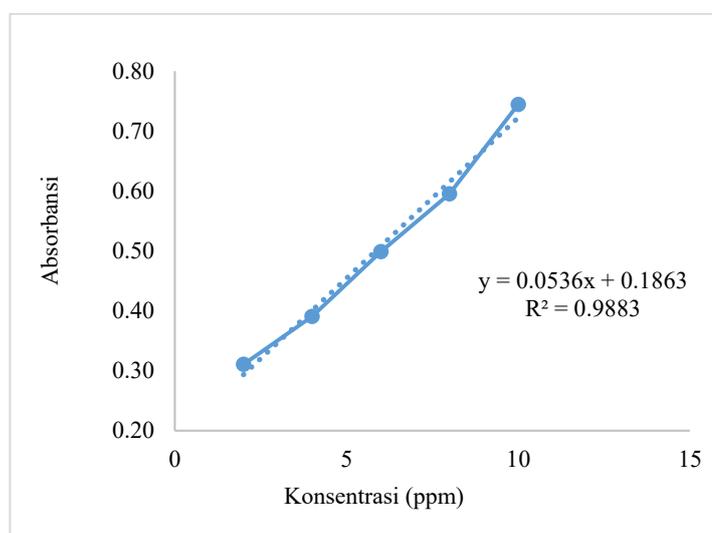
Penentuan Kadar Fenolik Total

Kadar fenolik total pada daun belimbing wuluh (*Averrhoa bilimbi* L.) ditentukan dengan menggunakan metode *Folin-Ciocalteu*. Asam galat digunakan sebagai standar karena merupakan senyawa fenolik turunan asam hidroksibenzoat yang tergolong asam fenolik sederhana (Kupina *et al.*, 2019). Masing-masing konsentrasi larutan asam galat dan larutan ekstrak ditambahkan dengan pereaksi *Folin-Ciocalteu* dan Na₂CO₃. Bahan penyusun pereaksi *Folin-Ciocalteu* yaitu asam fosfomolibdat dan asam fosfotungstat, akan tereduksi oleh ion fenolat dalam suasana basa membentuk kompleks molibdenum-tungsten yang berwarna biru (Dhurhanian and Novianto, 2019). Penambahan Na₂CO₃ bertujuan untuk membentuk suasana basa supaya terjadi disosiasi proton pada senyawa fenolik menjadi ion fenolat (Change *et al.*, 2021). Inkubasi larutan selama 2 jam kemudian diukur absorbansinya pada panjang gelombang 744.8 nm (Mukhriani *et al.*, 2019). Hasil pengukuran absorbansi larutan asam galat dapat dilihat pada **Tabel 2**.

Tabel 2. Hasil Pengukuran Absorbansi Larutan Asam Galat

Konsentrasi (ppm)	Absorbansi			Average ± SD
	R1	R2	R3	
2	0.3104	0.3106	0.3108	0.3106 ± 0.0002
4	0.3906	0.3906	0.3906	0.3906 ± 0.0000
6	0.4985	0.4989	0.4989	0.4988 ± 0.0002
8	0.5948	0.5950	0.5955	0.5951 ± 0.0004
10	0.7442	0.7445	0.7445	0.7444 ± 0.0002

Hasil pengukuran absorbansi larutan asam galat selanjutnya digunakan untuk membuat persamaan kurva baku. Berdasarkan **Gambar 1**, persamaan kurva baku yang dihasilkan adalah $y = 0.0536x + 0.1863$ dan koefisien regresi $R^2 = 0.9883$. Persamaan kurva baku digunakan untuk menghitung kadar fenolik total. Ekstrak etanol daun belimbing wuluh (*Averrhoa bilimbi* L.) memiliki kandungan fenolik total yang tergolong tinggi yaitu sebesar 95.37 mg GAE/g (*Miligram Gallic Acid Equivalent* (satuan yang digunakan untuk menyatakan kandungan fenolik total dalam bentuk ekuivalen asam galat (*gallic acid*), yaitu senyawa standar yang digunakan dalam pengukuran fenolik)) (**Tabel 3**).

**Gambar 1. Kurva Baku Larutan Asam Galat**

Kadar fenolik total dipengaruhi oleh polaritas pelarut yang digunakan dalam ekstraksi dimana semakin tinggi kelarutan senyawa fenol dalam pelarut polar maka semakin tinggi kadar fenolik ekstrak yang diperoleh (Indra *et al.*, 2019). Senyawa fenolik mempunyai aktivitas antioksidan karena gugus hidroksi pada cincin aromatik berperan sebagai donor hidrogen yang mampu meredam oksigen reaktif (Suhendra *et al.*, 2019). Mekanisme fenolik sebagai antioksidan yaitu dengan mengikat radikal bebas dan mendonorkan atom hidrogennya melalui proses transfer elektron, sehingga fenol berubah menjadi radikal fenoksil (Asih *et al.*, 2022). Kelompok senyawa fenolik yang paling banyak ditemukan di dalam jaringan tumbuhan adalah flavonoid (Utomo *et al.*, 2020).

Tabel 3. Hasil Penentuan Kadar Fenolik Total

Absorbansi			Rata-rata ± SD	Kadar Fenolik Total
R1	R2	R3		
0.6975	0.6975	0.6975	0.6975 ± 0.0000	95.37 mgGAE/g

Penentuan Kadar Flavonoid Total

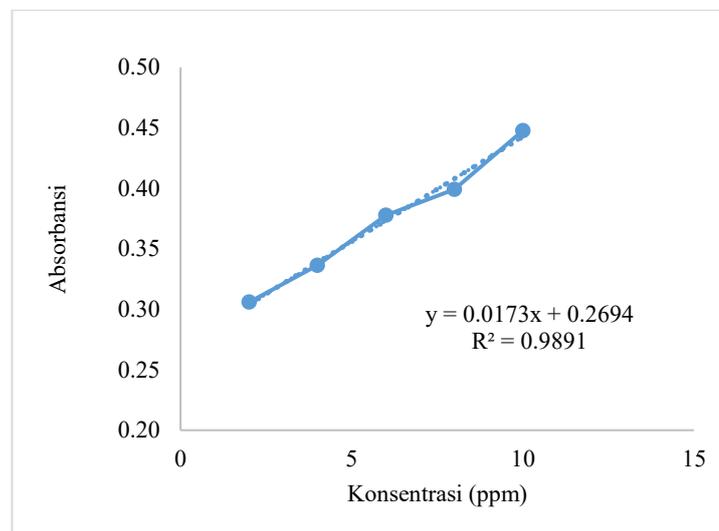
Kadar flavonoid total pada daun belimbing wuluh (*Averrhoa bilimbi* L.) ditentukan dengan metode kolorimetri $AlCl_3$. Prinsip dari metode ini yaitu $AlCl_3$ membentuk kompleks asam yang stabil dengan C-4 gugus keton, serta dengan C-3 atau C-5 gugus hidroksil dari flavon dan flavonol (Fachriyah *et al.*, 2020). Kuersetin digunakan sebagai standar karena merupakan flavonoid golongan flavonol (Wirasti, 2019). Masing-masing konsentrasi larutan kuersetin dan larutan ekstrak direaksikan dengan $AlCl_3$ dan kalium asetat. Penambahan $AlCl_3$ bertujuan untuk membentuk kompleks antara aluminium klorida dengan kuersetin sehingga terjadi pergeseran panjang gelombang ke arah sinar

tampak (visibel) yang ditandai dengan perubahan warna larutan menjadi lebih kuning (Asmorowati, 2019). Penambahan kalium asetat berfungsi untuk mempertahankan panjang gelombang pada sinar tampak (visibel) (Asmorowati, 2019). Inkubasi larutan selama 30 menit kemudian diukur absorbansinya pada panjang gelombang 440 nm (Mukhriani *et al.*, 2019). Hasil pengukuran absorbansi larutan kuersetin dapat dilihat pada **Tabel 4**.

Tabel 4. Hasil Pengukuran Absorbansi Larutan Kuersetin

Konsentrasi (ppm)	Absorbansi			Average ± SD
	R1	R2	R3	
2	0.3056	0.3057	0.306	0.3058 ± 0.0001
4	0.3362	0.3364	0.3365	0.3364 ± 0.0002
6	0.3775	0.3776	0.3778	0.3776 ± 0.0002
8	0.3987	0.3992	0.399	0.3990 ± 0.0003
10	0.4472	0.4477	0.448	0.4476 ± 0.0004

Hasil pengukuran absorbansi larutan kuersetin selanjutnya digunakan untuk membuat persamaan kurva baku. Berdasarkan **Gambar 2**, persamaan kurva baku yang dihasilkan adalah $y = 0.0173x + 0.2694$ dan koefisien regresi $R^2 = 0.9891$. Persamaan kurva baku digunakan untuk menghitung kadar flavonoid total. Ekstrak etanol daun belimbing wuluh (*Averrhoa bilimbi* L.) memiliki kandungan flavonoid total yaitu sebesar 6.91 mg QE/g (*Miligram Quercetin Equivalent* (satuan yang digunakan untuk menyatakan kadar flavonoid total dalam bentuk ekuivalen kuersetin (*quercetin*), yaitu senyawa standar yang digunakan untuk mengukur flavonoid)) (**Tabel 5**).



Gambar 2. Kurva Baku Larutan Kuersetin

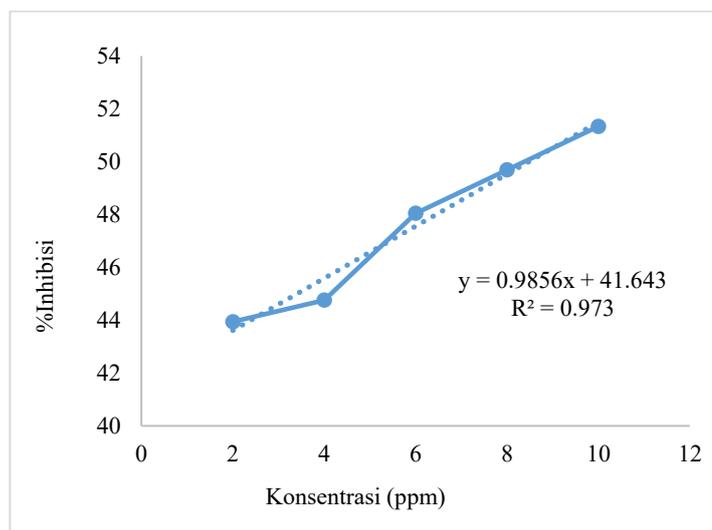
Kadar fenolik daun belimbing wuluh (*Averrhoa bilimbi* L.) lebih tinggi dibandingkan dengan kadar flavonoidnya karena senyawa fenolik terdistribusi secara luas di seluruh bagian tanaman mencakup flavonoid, tanin, tokoferol, kumarin, lignin, turunan asam sinamat dan asam organik polifungsional (Dhurhania and Novianto, 2019). Kadar fenolik total dan flavonoid total daun belimbing wuluh (*Averrhoa bilimbi* L.) lebih tinggi dibandingkan dengan buah belimbing wuluh (*Averrhoa bilimbi* L.) yang memiliki kadar fenolik total 63.52 mg GAE/g dan flavonoid total 2.95 mg QE/g (Utami *et al.*, 2019). Hasil kadar fenolik dan flavonoid berbeda dengan penelitian sebelumnya karena kandungan senyawa metabolit sekunder tanaman berbeda-beda di setiap bagian, jaringan, dan umur tanaman, serta dipengaruhi oleh faktor-faktor lingkungan seperti temperatur, nutrisi, ketersediaan air dan kadar CO₂ (Neldawati, 2013). Mekanisme flavonoid sebagai antioksidan secara langsung adalah gugus OH akan mendonorkan ion hidrogennya sehingga dapat menetralkan efek toksik dari radikal bebas. Flavonoid sebagai antioksidan secara tidak langsung yaitu dengan meningkatkan ekspresi gen antioksidan endogen (Kusuma, 2015). Semakin tinggi kandungan fenolik dan flavonoid maka semakin tinggi aktivitas antioksidannya (Indra *et al.*, 2019).

Tabel 5. Hasil Penentuan Kadar Flavonoid Total

R1	Absorbansi		Rata-rata ± SD	Kadar Fenolik Total
	R2	R3		
0.3889	0.3889	0.3889	0.3889 ± 0.0000	6.91 mgQE/g

Uji Aktivitas Antioksidan Metode DPPH

Uji aktivitas antioksidan ekstrak etanol daun belimbing wuluh (*Averrhoa bilimbi* L.) dilakukan menggunakan metode DPPH karena relatif singkat, mudah dan telah digunakan secara luas (Wulansari *et al.*, 2018). Prinsip metode DPPH adalah atom hidrogen dari senyawa antioksidan akan berikatan dengan elektron bebas pada senyawa yang bersifat radikal (Setiawan *et al.*, 2018). Hasil absorbansi dirata-rata dan dihitung persen penghambatannya kemudian dibuat kurva baku hubungan antara konsentrasi (x) dengan % inhibisi (y). Persamaan regresi linear digunakan untuk menghitung nilai IC_{50} . Nilai IC_{50} didapatkan dari nilai x setelah mengganti $y = 50$ (Jabbar *et al.*, 2019). Regresi linear yang dihasilkan oleh vitamin E adalah $y = 0.9856x + 41.643$ dengan $R^2 = 0.973$ seperti pada **Gambar 3**.



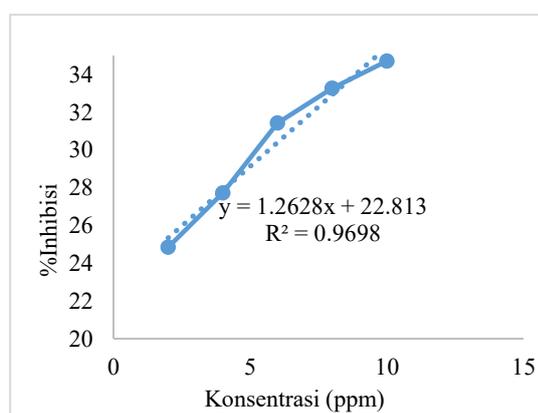
Gambar 3. Kurva Baku Vitamin E

Hasil perhitungan menunjukkan bahwa nilai IC_{50} vitamin E adalah 8.48 ppm tergolong antioksidan sangat kuat. Hasil nilai IC_{50} larutan vitamin E dapat dilihat pada **Tabel 6**.

Tabel 6. Hasil Uji Aktivitas Antioksidan Vitamin E

Konsentrasi (ppm)	Absorbansi			Average \pm SD	%inhibisi	IC_{50} (ppm)
	R1	R2	R3			
2	0.273	0.273	0.273	0.273 ± 0.0000	43.943	8.48
4	0.269	0.269	0.269	0.269 ± 0.0000	44.764	
6	0.253	0.253	0.253	0.253 ± 0.0000	48.049	
8	0.245	0.245	0.245	0.245 ± 0.0000	49.692	
10	0.237	0.237	0.237	0.237 ± 0.0000	51.335	
Kontrol	0.487	0.487	0.487	0.487 ± 0.0000		

Regresi linear ekstrak etanol daun belimbing wuluh (*Averrhoa bilimbi* L.) adalah $y = 1.2628x + 22.813$ dengan $R^2 = 0.9698$ seperti pada **Gambar 4**.



Gambar 4. Kurva Baku Ekstrak Daun Belimbing Wuluh

Nilai IC₅₀ ekstrak etanol daun belimbing wuluh (*Averrhoa bilimbi* L.) adalah 21.53 ppm tergolong antioksidan sangat kuat. Hasil nilai IC₅₀ larutan ekstrak dapat dilihat pada **Tabel 7**.

Tabel 7. Hasil Uji Aktivitas Antioksidan Ekstrak Daun Belimbing Wuluh

Konsentrasi (ppm)	Absorbansi			Average ± SD	%inhibisi	IC ₅₀ (ppm)
	R1	R2	R3			
2	0.366	0.366	0.366	0.366 ± 0.0000	24.846	21,53
4	0.352	0.352	0.352	0.352 ± 0.0000	27.721	
6	0.334	0.334	0.334	0.334 ± 0.0000	31.417	
8	0.325	0.325	0.325	0.325 ± 0.0000	33.265	
10	0.318	0.318	0.318	0.318 ± 0.0000	34.702	
Kontrol	0.487	0.487	0.487	0.487 ± 0.0000		

Aktivitas antioksidan ekstrak etanol daun belimbing wuluh (*Averrhoa bilimbi* L.) lebih tinggi dibandingkan ekstrak eter dan ekstrak metanol buah belimbing wuluh (*Averrhoa bilimbi* L.) dengan IC₅₀ berturut-turut sebesar 50.36 ppm dan 40,01 ppm (Hasim *et al.*, 2019). Penelitian Utami *et al.* (2019) menunjukkan hasil aktivitas antioksidan ekstrak etanol 70% buah belimbing wuluh (*Averrhoa bilimbi* L.) memiliki nilai IC₅₀ sebesar 279.99 ppm. Hasil uji aktivitas antioksidan pada penelitian ini lebih tinggi dibandingkan penelitian sebelumnya karena daun belimbing wuluh memiliki kadar fenyawa fenolik dan flavonoid yang lebih tinggi dibandingkan dengan buahnya dan pelarut etanol 70% yang digunakan memiliki kepolaran paling mendekati senyawa metabolit sekunder pada daun belimbing wuluh (Rahardhian *et al.*, 2019). Semakin tinggi aktivitas antioksidan maka nilai SPF akan semakin tinggi karena antioksidan memiliki kemampuan menyerap dan memantulkan sinar *ultra violet* (Suharsanti *et al.*, 2019).

Penentuan Nilai SPF

Penentuan nilai SPF (Sun Protection Factor) ekstrak etanol daun belimbing wuluh (*Averrhoa bilimbi* L.) dilakukan secara *in vitro* menggunakan spektrofotometri UV-Vis. Nilai SPF diperoleh berdasarkan persamaan mansur yang diukur pada panjang gelombang 290-320 nm yang mewakili sinar UVB (Pramiastuti, 2019). Sinar UVB mampu menembus lapisan epidermis yang menyebabkan eritema pada kulit (Adawiyah, 2019). Hasil perhitungan nilai SPF ekstrak etanol daun belimbing wuluh (*Averrhoa bilimbi* L.) pada konsentrasi 400 ppm tergolong proteksi ultra yaitu sebesar 30.63 sehingga dapat melindungi kulit selama 5.11 jam dibawah sinar matahari. Hasil penentuan nilai SPF dilihat pada **Tabel 8**.

Tabel 8. Hasil Penentuan Nilai SPF

λ	Absorbansi			Rata-rata ± SD	Abs x EE x I	CF	
	R1	R2	R3				
290	3.063	3.063	3.063	3.063 ± 0.0000	0.0459	10	
295	3.063	3.063	3.063	3.063 ± 0.0000	0.2502		
300	3.063	3.063	3.063	3.063 ± 0.0000	0.8803		
305	3.063	3.063	3.063	3.063 ± 0.0000	1.0041		
310	3.063	3.063	3.063	3.063 ± 0.0000	0.5709		
315	3.059	3.059	3.059	3.059 ± 0.0000	0.2567		
320	3.059	3.059	3.059	3.059 ± 0.0000	0.0551		
Jumlah					3.0632		
SPF 30,63							

Penelitian Suharsanti *et al.* (2019) menunjukkan daun belimbing wuluh (*Averrhoa bilimbi* L.) pada konsentrasi 300 ppm memiliki nilai SPF 28.12. Hasil penentuan nilai SPF pada penelitian ini lebih tinggi karena konsentrasi larutan uji yang dibuat lebih tinggi. Senyawa fenolik berperan sebagai bahan aktif tabir surya yang bekerja dengan mekanisme fotoprotektif karena gugus aromatik yang terdapat pada senyawa fenol dapat menyerap kuat pada spektrum sinar ultra violet (Pramiastuti, 2019). Mekanisme senyawa fenolik khususnya flavonoid sebagai tabir surya yaitu gugus kromofor pada senyawa flavonoid akan menyerap sinar ultra violet sehingga intensitas radiasi yang terpapar ke kulit akan berkurang (Whenny *et al.*, 2018).

4. KESIMPULAN

Berdasarkan hasil penelitian yang telah dilakukan dapat disimpulkan bahwa ekstrak etanol 70% daun belimbing wuluh (*Averrhoa bilimbi* L.) memiliki kadar fenolik total sebesar 95.37 mg GAE/g dan kadar flavonoid total sebesar

6.91 mg QE/g, memiliki aktivitas antioksidan sangat kuat dengan nilai IC₅₀ 21.53 ppm dan memiliki nilai SPF 30.63 yang tergolong proteksi ultra dapat melindungi kulit selama 5.11 jam. Peneliti selanjutnya disarankan melakukan uji toksisitas untuk mengetahui keamanan ekstrak etanol 70% daun belimbing wuluh (*Averrhoa bilimbi* L.).

5. DAFTAR PUSTAKA

- Adawiyah, R. (2019). Penentuan Nilai Sun Protection Factor secara In Vitro pada Ekstrak Etanol Akar Kalakai (*Stenochlaena palustris* Bedd) dengan Metode Spektrofotometer UV-Vis. *Jurnal Surya Medika*, 4(2), 26–31.
- Arbain, C., & Nur Mita, L. R. (2017). Uji Aktivitas Tabir Surya Ekstrak Daun Belimbing Hutan (*Cnestis palala* (Lour.) Merr). *Proceeding of the 5th Mulawarman Pharmaceuticals Conferences, April 2017*, 23–24.
- Asih, D. J., Kadek Warditiani, N., Gede, I., Wiarsana, S., & Kunci, K. (2022). Aktivitas Antioksidan Ekstrak Amla (*Phyllanthus emblica/Embllica officinalis*). *Jurnal Ilmiah Multidisiplin Indonesia*, 1(6), 674–687.
- Asmorowati, H. (2019). Penetapan Kadar Flavonoid Total Buah Alpukat Biasa (*Persea americana* Mill.) dan Alpukat Mentega (*Persea americana* Mill.) dengan Metode Spektrofotometri UV-Vis. *Jurnal Ilmiah Farmasi*, 15(2), 51–63. <https://doi.org/10.20885/jif.vol15.iss2.art1>
- Berawi, K. N., & Agverianti, T. (2017). Efek Aktivitas Fisik pada Proses Pembentukan Radikal Bebas sebagai Faktor Risiko Aterosklerosis Physical Activity Effects on Free Radicals Development as Risk Factor of Atherosclerosis. *Majority*, 6(2), 85–90.
- Change, G., Cimino, M., York, N., Alifah, U., Mayssara A. Abo Hassanin Supervised, A., Chinatown, Y., Staff, C., & Change, G. (2021). Penentuan Fenolik Total, Flavonoid Total dan Aktivitas Antioksidan Ekstrak Bawang Lanang (*Allium sativum* L.). *Paper Knowledge . Toward a Media History of Documents*, 3(2), 6.
- Dhiru. (2013). *Live Blood Analysis*.
- Dhurhanian, C. E., & 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. <https://doi.org/10.20473/jfiki.v5i22018.62-68>
- Fachriyah, E., Kusriani, D., Haryanto, I. B., Wulandari, S. M. B., Lestari, W. I., & Sumariyah, S. (2020). Phytochemical Test, Determination of Total Phenol, Total Flavonoids and Antioxidant Activity of Ethanol Extract of Moringa Leaves (*Moringa oleifera* Lam). *Jurnal Kimia Sains Dan Aplikasi*, 23(8), 290–294. <https://doi.org/10.14710/jksa.23.8.290-294>
- Fitriana, W., Fatwawati, S dan Ersam, T. (2015). *Uji Aktivitas Antioksidan terhadap DPPH dan ABTS dari Fraksi-Fraksi Daun Kelor*.
- Hasim, H., Arifin, Y. Y., Andrianto, D., & Faridah, D. N. (2019). Ekstrak Etanol Daun Belimbing Wuluh (*Averrhoa bilimbi*) sebagai Antioksidan dan Antiinflamasi. *Jurnal Aplikasi Teknologi Pangan*, 8(3), 86. <https://doi.org/10.17728/jatp.4201>
- Ikhwan Rizki, M., Auliani, S., Khairunisa, A., Fadlilaturrahman, F., & Normaedah, N. (2022). Penetapan Kadar Flavonoid Total dan Nilai SPF dari Ekstrak Kering Daun Cempedak (*Artocarpus integer*). *Jurnal Insan Farmasi Indonesia*, 5(1), 76–86. <https://doi.org/10.36387/jifi.v5i1.868>
- Ikrima, K., Amalia, R., Mutakin, & Levita, J. (2020). Peran Spesies Oksigen Reaktif Pada Inflamasi Serta Antioksidan Alami Sebagai Fitoterapi. *Farmaka*, 17(3), 198–211.
- Indra, I., Nurmalasari, N., & Kusmiati, M. (2019). Fenolik Total, Kandungan Flavonoid, dan Aktivitas Antioksidan Ekstrak Etanol Daun Mareme (*Glochidion arborescense* Blume.). *Jurnal Sains Farmasi & Klinis*, 6(3), 206. <https://doi.org/10.25077/jsfk.6.3.206-212.2019>
- Jabbar, A., Wahyuni, W., Malaka, M. H., & Apriliani, A. (2019). Aktivitas Antioksidan Ekstrak Etanol Buah, Daun, Batang Dan Rimpang Pada Tanaman Wualae (*Etilingera elatior* (Jack) R.M Smith). *Jurnal Farmasi Galenika (Galenika Journal of Pharmacy) (e-Journal)*, 5(2), 189–197. <https://doi.org/10.22487/j24428744.2019.v5.i2.13671>
- Kupina, S., Fields, C., Roman, M. C., & Brunelle, S. L. (2019). Determination of Total Phenolic Content Using The Folin-C Assay: Single-Laboratory Validation, First Action. *Journal of AOAC International*, 102(1), 320–321. <https://doi.org/10.5740/jaoacint.2017.13>
- Kusmiati, Wijaya, I. G. A. K., & Yadi. (2018). Uji Potensi Antioksidan Ekstrak Lutein Bunga Kenikir (*Tagetes erecta*) Berwarna Kuning dan Jingga Dengan metode FRAP dan DPPH. *Pros Sem Nas Masy Biodiv Indon*, 4, 274–279. <https://doi.org/10.13057/psnmbi/m040231>
- Kusuma, A. S. W. (2015). The Effect of Ethanol Extract of Soursop Leaves (*Annona muricata* L.) to Decreased Levels of Malondialdehyde. *J Majority* |, 4(3), 14–18.

- Maesaroh, Dikdik Kurnia, J. A. A. (2018). *Chimica et Natura Acta. Chimica et Natura Acta*, 6(2), 93–100.
- Mangkasa, M. Y., Johnly, A. R., & Audy, D. W. (2018). Uji Fitokimia dan AKtivitas Antioksidan dari Ekstrak Daun Bawang Kucai (*Allium tuberosum* Rottl . Ex Spreng). *Phamacon Jurnal Ilmiah Farmasi*, 7(4), 12–22.
- Mukhriani, M., Rusdi, M., Arsul, M. I., Sugiarna, R., & Farhan, N. (2019). Kadar Fenolik dan Flavonoid Total Ekstrak Etanol Daun Anggur (*Vitis vinifera* L). *Ad-Dawaa' Journal of Pharmaceutical Sciences*, 2(2). <https://doi.org/10.24252/djps.v2i2.11503>
- Mustiqawati, E., Supardi, S., & Juniadin, J. (2022). Uji Aktivitas Antioksidan Ekstrak Etanol Daun Belimbing Wuluh (*Averrhoa bilimbi*). *Jurnal Sains & Kesehatan*, 1(1), 11–15.
- Neldawati, R. dan G. (2013). Analisis Nilai Absorbansi dalam Penentuan Kadar Flavonoid untuk Berbagai Jenis Daun Tanaman Obat. *Pillar of Physics*, 2, 76–83.
- Pramiastuti, O. (2019). Penentuan Nilai SPF (Sun Protection Factor) Ekstrak Dan Fraksi Daun Kecombrang (*Etlingera Elatior*) Secara in Vitro Menggunakan Metode Spektrofotometri. *Parapemikir: Jurnal Ilmiah Farmasi*, 8(1), 14. <https://doi.org/10.30591/pjif.v8i1.1281>
- Raja Arifin, R. N. A., & Jumal, J. (2021). Antioxidant Activity of *Averrhoa bilimbi* Linn. Leaves Extract Using Two Different Types of Solvents. *Malaysian Journal of Science Health & Technology*, 76–82
- Rahardhian, M. R. R., Murti, B. T., Wigati, D., Suharsanti, R., & Putri, C. N. (2019). Solvent concentration effect on total flavonoid and total phenolic contents of *Averrhoa bilimbi* leaf extract. *Pharmaciana*, 9(1), 137. <https://doi.org/10.12928/pharmaciana.v9i1.8793>
- Sari, A. K., Ayuhecacia, N., & Febrianti, D. R. (2019). Analisis Kuantitatif Kadar Flavonoid Ekstrak Etanol Daun Belimbing Wuluh (*Averrhoa bilimbi* L.) di Banjarmasin dengan Metode Spektrofotometer UV-Vis. *Jurnal Insan Farmasi Indonesia*, 2(1), 7–17. <https://doi.org/10.36387/jifi.v2i1.315>
- Setiawan, F., Yunita, O., & Kurniawan, A. (2018). Uji Aktivitas Antioksidan Ekstrak Etanol Kayu Secang dan FRAP. *Media Pharmaceutica Indonesiana*, 2(2), 82–89.
- Suharsanti, R., Sugihartini, N., Lukitaningsih, E., & Radix Rahardhian, M. R. (2019). In vitro assessment of total phenolic, total flavonoid and sunscreen activities of crude ethanolic extract of belimbing wuluh (*Averrhoa bilimbi*) fruits and leaves. *Journal of Global Pharma Technology*, 11(4), 308–313.
- Suhendra, C. P., Widarta, I. W. R., & Wiadnyani, A. A. I. S. (2019). Pengaruh Konsentrasi Etanol terhadap Aktivitas Antioksidan Ekstrak Rimpang Ilalang (*Imperata cylindrica* (L) Beauv.) pada Ekstraksi Menggunakan Gelombang Ultrasonik. *Jurnal Ilmu Dan Teknologi Pangan (ITEPA)*, 8(1), 27. <https://doi.org/10.24843/itepa.2019.v08.i01.p04>
- Suhesti, I., Setiyanto, R., Islami, N. N., & Anggia, C. (2021). Uji Aktivitas Antioksidan dan SPF (*Sun Protection Factor*) Lendir Bekicot (*Achatina fulica*) Menggunakan Spektrofotometer UV-Vis. *Media Farmasi: Jurnal Ilmu Farmasi*, 18(2), 70.
- Suryadinata, R. V. (2018). Pengaruh Radikal Bebas Terhadap Proses Inflamasi pada Penyakit Paru Obstruktif Kronis (PPOK). *Amerta Nutrition*, 2(4), 317. <https://doi.org/10.20473/amnt.v2i4.2018.317-324>
- Syahara, S., & Vera, Y. (2020). Penyuluhan Pemanfaatan Buah Tomat Sebagai Produk Kosmetik Antioksidan Alami Di Desa Manunggang Julu. *Education and Development Institut*, 8(1), 21–22.
- Utami, S., Endrini, S., Nafik, S., Lestari, I. M. T., Anindya, D., Bakar, E. A., Rozy, F., Said, F. F., Afifah, E., Arumwardana, S., Nufus, H., Rihibiha, D. D., Kusuma, H. S. W., Wibowo, S. H. B., & Widowati, W. (2019). In vitro antioxidant and anti-obesity activities of freeze-dried canarium sp., *averrhoa bilimbi* L. and *malus domestica*. *Indonesian Biomedical Journal*, 11(3), 320–326. <https://doi.org/10.18585/inabj.v11i3.728>
- Utomo, D. S., Kristiani, E. B. E., & Mahardika, A. (2020). Pengaruh Lokasi Tumbuh Terhadap Kadar Flavonoid, Fenolik, Klorofil, Karotenoid Dan Aktivitas Antioksidan Pada Tumbuhan Pecut Kuda (*Stachytarpheta Jamaicensis*). *Bioma*, 22(2), 143–149.
- Whenny, Rolan Rusli, L. R. (2018). Aktivitas Tabir Surya Ekstrak Daun Cempedak (*Artocarpus Champeden Spreng*). *Angewandte Chemie International Edition*, 6(11), 951–952., 1(Mi), 5–24.
- Wirasti. (2019). Penetapan Kadar Fenolik Total, Flavonoid Total, dan Uji Aktivitas Antioksidan Ekstrak Daun Benalu Petai (*Scurrula atropurpurea* Dans.) Beserta Penapisan Fitokimia Wirasti. *Journal of Pharmaceutical and Medicinal Sciences*, 4(1), 1–5.
- Wulan, W., Yudistira, A., & Rotinsulu, H. (2019). Uji Aktivitas Antioksidan dari Ekstrak Etanol Daun Mimosa pudica Linn. Menggunakan Metode DPPH. *Pharmacon*, 8(1), 106. <https://doi.org/10.35799/pha.8.2019.29243>

- Wulansari, D., Chairul, D., Botani, B., Penelitian, P., & Abstrak, B.-L. (2018). Penapisan Aktivitas Antioksidan Dan Beberapa Tumbuhan Obat Indonesia Menggunakan Radikal 2,2-Diphenyl-1 Picrylhydrazyl (Dpph) Antioxidant Screening Activity of Several Indonesian Medicinal Plants Using 2,2-Difenil 1-1 Picrylhidrazy (Dpph). *Majalah Obat Tradisional*, 16(1), 2011.
- Yanti, S., & Vera, Y. (2019). Skrining fitokimia ekstrak daun belimbing wuluh (*Averrhoa bilimbi*). *Jurnal Kesehatan Ilmiah Indonesia (Indonesian Health Scientific Journal)*, 4(2), 41–46.