

## Perbandingan Metode Ekstraksi terhadap Kadar Flavonoid dan Aktivitas Antioksidan Ekstrak Etanol Daun Pulai (*Alstonia scholaris*) dengan Metode 2,2-difenil-1-pikrilhidrazil (DPPH)

Sri Wahyuningsih <sup>1\*</sup>, Nur Indah Sari <sup>2</sup>, Hilmianti Wahid <sup>2</sup>, Azima <sup>3</sup>

<sup>1</sup> Program Studi Kimia, Jurusan Kimia, Fakultas MIPA, Universitas Negeri Makassar, Makassar, Indonesia

<sup>2</sup> Program Studi Sarjana Farmasi, Fakultas Farmasi, Universitas Megarezky, Makassar, Indonesia

<sup>3</sup> Program Studi DIII Farmasi, Fakultas Ilmu Kesehatan, Universitas Sulawesi Barat, Majene, Indonesia

\*Corresponding author: Sri Wahyuningsih email: sri.wahyuningsih@unm.ac.id

Submitted: 06-08-2025

Revised: 28-12-2025

Accepted: 11-01-2026

DOI: 10.29408/sinteza.v6i1.31992

### ABSTRACT

Pulai leaves (*Alstonia scholaris*) are known to contain various secondary metabolites such as flavonoids, so the choice of extraction method is a factor that affects the quality and quantity of bioactive compounds produced. This study aims to compare the total flavonoid content and antioxidant activity of ethanol extracts of pulai leaves obtained through two different extraction methods, namely maceration and reflux. This study is a laboratory experimental study using 96% ethanol solvent in both extraction methods. The flavonoid content was determined quantitatively using UV-Vis spectrophotometry with quercetin as the standard. The antioxidant activity test was performed using the 2,2-diphenyl-1-picrylhydrazil (DPPH) method based on the IC<sub>50</sub> value. The results showed that the extract obtained using the reflux method had a higher flavonoid content of 17.11±0.03 mgQE/g and an IC<sub>50</sub> value of 7.84±0.02 ppm, while the maceration method produced a flavonoid content of 8.42±0.02 mgQE/g and an IC<sub>50</sub> value of 12.53±0.17 ppm. As a positive control, vitamin C had an IC<sub>50</sub> value of 5.26±0.08 ppm. Based on these results, the extraction of pulai leaves (*Alstonia scholaris*) using the reflux method proved to be more effective in extracting flavonoid compounds and had higher antioxidant activity compared to the maceration method.

**Keywords:** Pulai Leaves, Flavonoid, Antioxidant, Maceration

### PENDAHULUAN

Radikal bebas adalah atom atau molekul yang memiliki satu elektron yang tidak berpasangan, yang bisa membuat senyawa atau molekul lain menjadi lebih mudah bereaksi. Pembentukan radikal bebas terjadi melalui proses metabolisme akibat radiasi sinar UV, pencemaran lingkungan seperti asap rokok bahan kimia pada makanan, dan kontaminan lainnya (Anggarani et al., 2023). Radikal bebas merupakan molekul yang tidak stabil dan sangat reaktif karena mengandung satu atau lebih elektron tidak berpasangan pada orbit terluarnya. Untuk mencapai kestabilan, ia bereaksi dengan molekul lain di sekitarnya, yang dapat merusak sel sehat dan memicu penyakit seperti penuaan dini, kanker, dan gangguan degeneratif. Oleh karena itu tubuh membutuhkan sistem pertahanan untuk menetralkannya (Ayu et al., 2024).

Metabolit sekunder yang dapat berpotensi sebagai antioksidan, diantaranya adalah alkaloid, flavonoid, senyawa fenol, steroid dan terpenoid (Ayu et al., 2024). Guna mencegah semakin banyaknya pertumbuhan radikal bebas, oleh karena itu, membutuhkan antioksidan. Antioksidan dapat mencegah oksidasi dengan melawan radikal bebas dan melindungi sel dari kerusakan yang disebabkan oleh oksidasi (Anggarani et al., 2023). Antioksidan adalah senyawa-senyawa pemberi elektron atau senyawa-senyawa yang dapat menahan radikal bebas yang akan menyerang sel DNA, menghambat dan mengatasi berbagai jenis penyakit kronis yang diakibatkan oleh radikal bebas. Selain itu, antioksidan akan memberikan elektron (Azima et al., 2024). Antioksidan merupakan senyawa yang dalam konsentrasi rendah mampu menghambat ataupun menunda proses oksidasi pada senyawa yang rentan teroksidasi. Mekanisme kerja antioksidan dapat berupa penghambatan aktivitas enzim oksidatif, berinteraksi langsung



dengan oksidan sebelum menimbulkan kerusakan pada molekul lain, mengkelat ion logam sehingga tidak memicu reaksi oksidasi, maupun berperan dalam mendukung sistem biologis, contohnya pada proses pengikatan protein oleh ion besi (Fahrurrozi et al., 2021).

Senyawa bioaktif meliputi alkaloid, flavonoid, tanin, saponin, serta steroid dapat diperoleh dari tanaman seperti daun pulai (*Alstonia scholaris*) yang banyak ditemukan di Kalimantan. Iklim tropis yang mendominasi di Kalimantan sangat mendukung pertumbuhan tanaman-tanaman endemik yang berpotensi sebagai bahan dasar obat tradisional. Daun pulai (*Alstonia scholaris*) dikenal memiliki sejumlah senyawa metabolik yang berperan penting dalam aktivitas biologis, terutama aktivitas antipiretik, antioksidan, antiparasit, antimikroba, antikanker, antidiabetes, dan antiinflamasi. Senyawa yang terdapat dalam flavonoid dari daun pulai (*Alstonia scholaris*) memiliki fungsi sebagai senyawa yang bertindak sebagai antioksidan dan berperan dalam menjaga sel-sel tubuh akibat kerusakan yang disebabkan oleh stres oksidatif (Suryadi et al., 2024).

Efektivitas senyawa bioaktif seperti flavonoid dalam suatu ekstrak sangat ditentukan oleh teknik ekstraksi yang digunakan. Pemilihan metode ekstraksi yang tepat akan berpengaruh terhadap kuantitas dan kualitas senyawa yang berhasil diekstraksi dari bahan alam. Perbedaan suhu, waktu, dan teknik kerja dari masing-masing metode ekstraksi dapat memengaruhi efektivitas pelarutan senyawa bioaktif. Beberapa metode ekstraksi seperti maserasi, perkolasi, sonikasi, sokletasi, destilasi dan refluks telah digunakan untuk meningkatkan kualitas dan hasil ekstraksi (Wicaksono et al., 2023).

Metode ekstraksi dikenal dengan dua prinsip kerja yaitu dengan cara dingin dan panas. Metode maserasi paling sering digunakan dengan cara perendaman pada suhu ruang. Metode ini cocok untuk senyawa yang mudah rusak oleh panas, namun bisa kurang efisien dalam mengekstraksi senyawa yang terperangkap dalam matriks sel (Aryanti et al., 2021). Metode maserasi merupakan teknik ekstraksi konvensional yang dilakukan dengan cara perendaman simplisia dalam pelarut pada suhu ruang selama waktu tertentu. Metode ini mengandalkan proses difusi pasif, yaitu perpindahan senyawa dari dalam sel tumbuhan ke pelarut berdasarkan perbedaan konsentrasi. Karena tidak melibatkan panas, maserasi umumnya cocok untuk mengekstraksi senyawa-senyawa yang sensitif terhadap suhu tinggi seperti vitamin dan minyak atsiri. Namun, efisiensi metode ini relatif rendah, terutama untuk senyawa yang berada dalam struktur dinding sel atau kompleks dengan komponen lain seperti protein dan polisakarida (Syamsul et al., 2020).

Sebaliknya, metode refluks menggunakan pemanasan berkelanjutan dalam sistem tertutup sehingga pelarut dapat terus menguap dan terkondensasi kembali tanpa kehilangan volume. Pemanasan dalam metode refluks dapat meningkatkan energi kinetik molekul pelarut, mempercepat penetrasi pelarut ke dalam jaringan tanaman, serta meningkatkan kelarutan senyawa bioaktif seperti flavonoid dan fenolik (Issusilaningtyas et al., 2023). Proses ini juga membantu penghancuran struktur dinding sel (lisis sel) dan mempermudah pelepasan senyawa aktif yang terikat dalam matriks sel. Namun, pengaturan suhu dan waktu tetap penting dalam metode refluks sesuai dengan karakteristik senyawa target yang bersifat termolabil namun cukup stabil pada suhu ekstraksi terkendali. Senyawa dalam ekstrak dapat rusak pada suhu di atas 60°C (Pratiwi, 2024).

Berdasarkan peran penting antioksidan dalam upaya melawan radikal bebas, studi ini dilakukan untuk mengetahui perbedaan kadar flavonoid dari ekstrak etanol daun pulai (*Alstonia scholaris*) yang diperoleh dari teknik ekstraksi maserasi dan refluks. Senyawa flavonoid yang diperoleh dari teknik ekstraksi yang berbeda ini akan diukur kemampuannya sebagai antioksidan alami. Oleh sebab itu, penelitian ini bertujuan untuk mengetahui perbandingan kadar flavonoid ekstrak daun pulai (*Alstonia scholaris*) dari metode ekstraksi maserasi dan refluks terhadap aktivitas antioksidan menggunakan metode DPPH.

## METODE

### Bahan dan Alat

Bahan yang digunakan dalam penelitian ini yaitu  $\text{AlCl}_3$  (Brataco), asam klorida pekat 37% (p.a) (Merck®), akuades (Brataco), daun pulai (*Alstonia scholaris*), DPPH (Sigma-Aldrich®), dragendorff (Merck®), etanol 96% (Intraco), etanol p.a (Merck®),  $\text{FeCl}_3$  10% (Merck®), kuarsetin (Sigma-Aldrich®), serbuk magnesium (Merck®), vitamin C (Sigma-Aldrich®).

Alat yang digunakan dalam penelitian ini yaitu batang pengaduk (Iwaki), blender, cawan porselin (Pyrex®), corong pisah (Pyrex®), gelas kimia (Pyrex®), gelas ukur (Pyrex®), kertas saring, kuvet, labu ukur (Pyrex®), pipet tetes, *rotary evaporator* (Eyela OSB-1200), statif, seperangkat alat refluks (Pyrex®), spektrofotometri UV-Vis (Lambada 365®), tabung reaksi (Pyrex®), timbangan analitik (Newtech), toples kaca.

### Jalannya Penelitian

#### Preparasi Sampel

Sampel Daun Pulai diambil pada pagi hari jam 8.00 WITA di daerah Sungai Bakar, Kec. Bajuin, Kabupaten Tanah Laut, Kalimantan. Sampel daun yang diambil berdasarkan kriteria daun dewasa dengan kondisi segar, berwarna hijau bukan hijau muda ataupun hijau tua, tidak mengalami kerusakan fisik dan berasal dari tanaman sehat.

#### Ekstraksi Daun Pulai Dengan Metode Maserasi

Daun pulai yang telah diambil dicuci bersih, dirajang kemudian dikeringkan. Pengeringan dilakukan dibawah sinar matahari tidak langsung dan kemudian simplisia kering dihaluskan agar memperoleh serbuk simplisia. Sebanyak 300 gram simplisia daun pulai (*Alstonia scholaris*) diekstraksi menggunakan metode maserasi dengan pelarut, etanol 96% dengan pelarut sebanyak 3000 ml. Maserasi dilakukan selama 3×24 jam dan dilakukan pengadukan secara berkala. Setelah selesai proses maserasi, sampel disaring untuk memisahkan filtrat dan residu. Seluruh filtrat yang didapatkan dari masing-masing proses ekstraksi dipekatkan dengan rotary evaporator sampai mendapatkan ekstrak maserasi (EM) (Suryadi et al., 2024).

#### Ekstraksi Daun Pulai Dengan Metode refluks

Serbuk simplisia daun pulai ditimbang sebanyak 300 gram, namun karena kapasitas alat refluks terbatas, ekstraksi dilakukan secara bertahap dalam tiga kali perlakuan, masing-masing menggunakan 100 gram serbuk simplisia yang diekstraksi dengan 3000 mL etanol 96%. Setiap batch diekstraksi dengan metode refluks pada suhu 50°C selama 2 jam. Setelah selesai, ketiga hasil ekstraksi digabung dan kemudian diuapkan menggunakan rotary evaporator hingga diperoleh ekstrak refluks (ER) (Issusilaningtyas et al., 2023).

#### Uji kualitatif fitokimia

##### Flavonoid

Ekstrak sebanyak 0,1 gram ditambahkan serbuk Mg 0,2 gram lalu ditambahkan 5 mL asam klorida pekat. Apabila terbentuk warna jingga, merah atau kuning menunjukkan adanya flavonoid (Hasan et al., 2022)

##### Alkaloid

Ekstrak sebanyak 50 mg dilarutkan dengan beberapa mL HCl dan dilakukan penyaringan. Filtrat diuji dengan cara lima tetes filtrat dimasukkan dalam tabung reaksi dan ditambahkan dua atau tiga tetes HCl 2N serta dua tetes pereaksi Dragendorff. Jika terbentuk endapan berwarna coklat kemerahan dari warna jingga, hal ini menunjukkan adanya senyawa alkaloid (Suryadi et al., 2024)

### Tanin

Ekstrak sebanyak 0,1 gram ditambahkan 10 mL aquadest lalu disaring dan filtratnya ditambahkan reagen  $\text{FeCl}_3$  10% sebanyak 10 tetes. Hasil positif menunjukkan adanya tanin ditandai dengan warna biru tua atau hitam (Suryadi et al., 2024)

### Saponin

Ekstrak sebanyak 0,1 gram dalam tabung reaksi ditambahkan 10 mL aquadest panas lalu dikocok kuat selama 1 menit. Saponin positif jika terbentuk busa yang stabil tidak kurang dari 10 menit setinggi 1-10 cm dan dengan penambahan 1 tetes HCL 2 N buih tidak hilang (Suryadi et al., 2024)

### Uji kadar flavonoid total

#### Pembuatan larutan baku standar

Kuersetin sebanyak 10 mg dimasukkan dalam labu takar 100 mL dan dilarutkan dengan etanol p.a sampai garis tanda batas. Larutan ini sebagai larutan baku standar kuersetin dengan konsentrasi 100 ppm.

#### Penentuan panjang gelombang (maks) kuersetin

Larutan baku kuersetin sebanyak 1 mL dilarutkan dengan pelarut etanol p.a hingga volume 5 mL dalam labu ukur. Larutan baku kuersetin konsentrasi 100 ppm diinkubasi selama 30 menit pada panjang gelombang 400-800 nm menggunakan alat spektrofotometri UV-Vis. Hasil panjang gelombang maksimum 432,10 nm diperoleh menggunakan alat spektrofotometri UV-Vis dan digunakan untuk mengukur serapan dari sampel.

#### Penentuan linearitas kurva kalibrasi kuersetin

Penentuan kurva baku kuersetin dibuat seri konsentrasi sebesar 30, 40, 50, 60 dan 70 ppm. Seri konsentrasi larutan baku kuersetin diambil masing-masing sebanyak 1 mL, kemudian direaksikan dengan 1 mL  $\text{AlCl}_3$  dan 1 mL natrium asetat. Selanjutnya diukur dengan spektrofotometri UV-Vis dengan panjang gelombang 432,10 nm. Penentuan kurva kalibrasi baku pembandingan menggunakan rumus  $y = bx + a$ .

#### Penentuan kadar flavonoid ekstrak

Ekstrak sebanyak 25 mg dilarutkan dalam 25 mL etanol p.a. Larutan stok ekstrak diambil sebanyak 1 mL ditambahkan  $\text{AlCl}_3$  10 % sebanyak 1 mL dan asam asetat 5% sebanyak 8 mL. Sampel diinkubasi selama 30 menit pada suhu kamar. Absorbansi ditentukan menggunakan metode spektrofotometri UV-Vis pada panjang gelombang 432,10 nm dan dicatat hasil nilai absorbansinya.

$$\text{Kadar flavonoid} = \frac{CxV}{m}$$

Ket:

C = konsentrasi kuersetin (ppm/1000 mL)

V = volume total ekstrak

m = berat sampel (mg)

### Pengujian aktivitas antioksidan

#### Pembuatan larutan stok DPPH

Sebanyak 5 mg serbuk DPPH dilarutkan dengan etanol p.a kemudian dimasukkan dalam labu ukur 50 mL lalu dicukupkan hingga tanda batas, sehingga didapatkan larutan DPPH dengan konsentrasi 100 ppm

#### Penentuan panjang gelombang maksimum

Penentuan panjang gelombang maksimum dilakukan untuk mengetahui pada serapan berapa zat yang dapat terbaca oleh spektrofotometer secara maksimal. Larutan stok DPPH sebanyak 1 mL ditambahkan 2 mL etanol p.a dalam vial. Larutan stok DPPH dimasukkan dalam kuvet dan diukur pada panjang gelombang 400-800 nm menggunakan spektrofotometer UV-Vis. Hasil panjang gelombang maksimum diperoleh 516,50 nm.

#### Pengukuran serapan blanko

Larutan DPPH konsentrasi 100 ppm dipipet sebanyak 1 mL lalu ditambahkan dengan etanol p.a 2 mL. Larutan dihomogenkan dan diinkubasi, selanjutnya diukur absorbansi pada panjang gelombang 516,50 nm dan dilakukan replikasi sebanyak 3 kali.

#### Pembuatan larutan seri konsentrasi ekstrak

Masing-masing ekstrak dari ekstraksi maserasi dan refluks ditimbang sebanyak 5 mg dan dilarutkan dengan pelarut etanol p.a kemudian dimasukkan kedalam labu ukur 10 mL lalu dicukupkan sampai tanda batas sehingga diperoleh larutan konsentrasi 500 ppm. Larutan stok diambil masing-masing sebanyak 5 mL kemudian di masukkan dalam labu ukur 25 mL dan dicukupkan hingga tanda batas sehingga diperoleh larutan stok 100 ppm. Setelah itu, larutan stok diambil sebanyak 0,1 mL, 0,2 mL, 0,3 mL, 0,4 mL, dan 0,5 mL lalu diencerkan dengan etanol p.a dalam labu ukur 5 mL sehingga diperoleh larutan dengan konsentrasi 2 ppm, 4 ppm, 6 ppm, 8 ppm, dan 10 ppm.

#### Pembuatan larutan kontrol positif vitamin C

Sebanyak 5 mg serbuk vitamin C dilarutkan dengan akuades secukupnya kemudian dimasukkan dalam labu ukur 10 mL lalu dicukupkan dengan etanol p.a sampai tanda batas, sehingga diperoleh larutan konsentrasi 500 ppm. Larutan vitamin C sebanyak 5 mL dimasukkan dalam labu ukur 25 mL dan dicukupkan hingga tanda batas sehingga diperoleh larutan stok 100 ppm. Setelah itu, larutan vitamin C diambil sebanyak 0,1 mL, 0,2 mL, 0,3 mL, 0,4 mL, dan 0,5 mL lalu diencerkan dengan etanol p.a dalam labu ukur 5 mL sehingga diperoleh larutan dengan konsentrasi 2 ppm, 4 ppm, 6 ppm, 8 ppm, dan 10 ppm.

#### Penentuan aktivitas antioksidan DPPH

Masing-masing larutan seri konsentrasi 2 ppm, 4 ppm, 6 ppm, 8 ppm, dan 10 ppm diambil sebanyak 2 mL dan ditambahkan 1 mL larutan DPPH 100 ppm. Masing-masing larutan dicampurkan hingga homogen dan diinkubasi selama 30 menit lalu diukur absorbansinya menggunakan spektrofotometer UV-Vis pada panjang gelombang 516,50 nm lalu di replikasi sebanyak 3 kali.

#### Perhitungan nilai IC<sub>50</sub>

Nilai IC<sub>50</sub> ditentukan dari nilai absorbansi konsentrasi masing-masing larutan sampel uji. Dari data tersebut dihasilkan persen inhibisi yang akan dihitung berdasarkan persamaan  $y = a + bx$ . Aktivitas antioksidan sampel ditentukan oleh besarnya hambatan radikal bebas DPPH melalui perhitungan presentasi inhibisi serapan DPPH dengan menggunakan rumus sebagai berikut :

$$IC_{50} = \frac{50-a}{b}$$

#### Analisis Data

Data aktivitas antioksidan diperoleh dari nilai IC<sub>50</sub> tiap ekstrak yang diolah dengan analisis data SPSS yang sebelumnya dilakukan uji normalitas dan homogenitas. Uji normalitas menggunakan Shapiro-Wilk, jika data terdistribusi normal dan homogen maka dilakukan uji One way ANOVA. Setelah uji ANOVA dilanjutkan dengan uji *post hoc* Tukey HSD untuk mengetahui pasangan kelompok yang berbeda signifikan.

#### HASIL DAN PEMBAHASAN

Pada penelitian ini, dilakukan perbandingan dua metode ekstraksi, yaitu maserasi dan refluks, terhadap rendemen, kadar flavonoid, dan aktivitas antioksidan dari ekstrak etanol daun pulai (*Alstonia scholaris*). Hasil rendemen daun pulai ekstrak maserasi (EM) dan ekstrak refluks (ER) seperti terlihat pada tabel 1. Perbedaan ini dapat dijelaskan melalui prinsip dasar dari masing-masing metode. Maserasi dilakukan pada suhu ruang, sehingga proses difusi senyawa dari simplisia ke dalam pelarut berjalan secara pasif dan lambat. Sementara itu, metode refluks melibatkan pemanasan konstan yang mampu mempercepat proses ekstraksi, memecah dinding sel tanaman, dan meningkatkan kelarutan senyawa bioaktif dalam pelarut etanol. Metode refluks pada penelitian ini menggunakan suhu 40°C selama 2 jam untuk mencegah degradasi senyawa termolabil. Etanol dipilih karena bersifat

polar berkat gugus –OH yang dapat membentuk ikatan hidrogen dengan senyawa polar lain seperti flavonoid, sehingga memudahkan pelarutan senyawa aktif. Selain itu, etanol termasuk pelarut polar protik karena dapat mendonorkan proton ( $H^+$ ) melalui gugus –OH (Octavia, 2023). Selain itu, penelitian Issusilaningtyas et al., (2023), juga menunjukkan bahwa metode refluks menghasilkan rendemen ekstrak daun sirih lebih tinggi dibandingkan maserasi, karena adanya panas yang memudahkan pelarut melarutkan senyawa aktif (Issusilaningtyas et al., 2023).

Tabel 1. Hasil Rendemen

Sampel	Pelarut	Metode ekstraksi	Berat sampel kering (g)	Berat ekstrak kental (g)	Rendemen (%)
Daun pulai	Etanol 96 %	Maserasi	300	30,86	10,29
Daun pulai	Etanol 96 %	Refluks	300	41,05	13,68

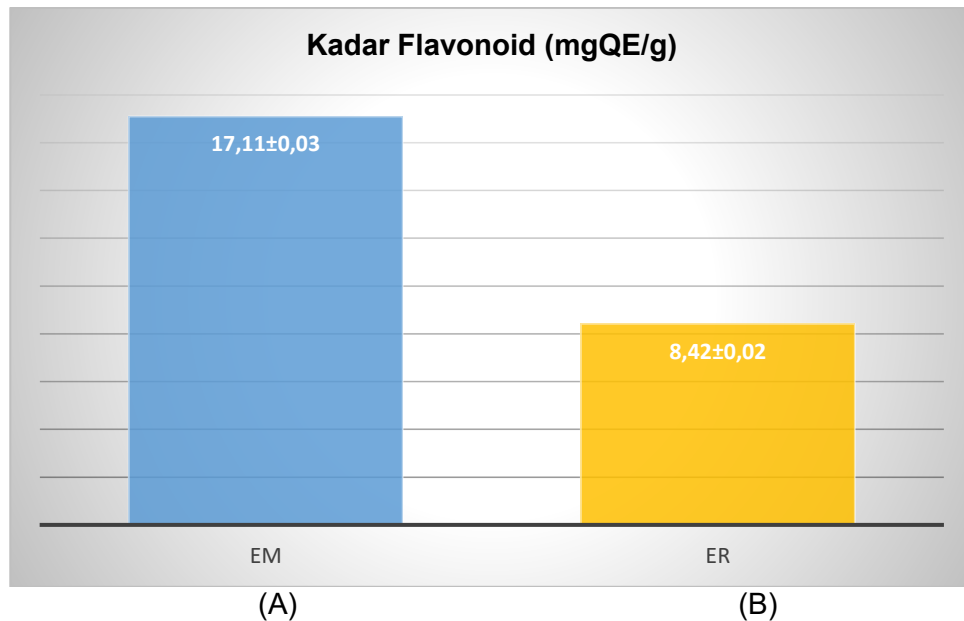
Uji fitokimia secara kualitatif terhadap ekstrak hasil kedua metode menunjukkan adanya senyawa metabolit sekunder yang serupa, yakni flavonoid, tanin, alkaloid, dan saponin. Hasil secara kualitatif ekstrak daun pulai (*Alstonia scholaris*) dapat dilihat pada tabel 2. Ini menandakan bahwa kedua metode berhasil mengekstraksi senyawa penting yang memiliki efek farmakologis. Senyawa flavonoid menjadi fokus utama karena berperan sebagai antioksidan yang efektif dalam menetralkan radikal bebas.

Tabel 2. Hasil Skrining Fitokimia

Senyawa metabolit	Parameter	Perubahan yang terjadi	
		EM	ER
Alkaloid Dragendorff Reagent	Endapan putih atau kekuningan (Suryadi et al., 2024)	Endapan putih (+)	Endapan putih (+)
Flavonoid Mg + HCl pekat	Terbentuknya warna orange, merah, atau kuning pada larutan (Suryadi et al., 2024)	Warna orange (+)	Warna orange (+)
Tanin FeCl <sub>3</sub>	Warna biru tua atau hitam (Hasan et al., 2022)	Warna hitam (+)	Warna hitam (+)
Saponin HCl	Buih tidak hilang (Zuraida, 2018)	Buih tidak hilang (+)	Buih tidak hilang (+)

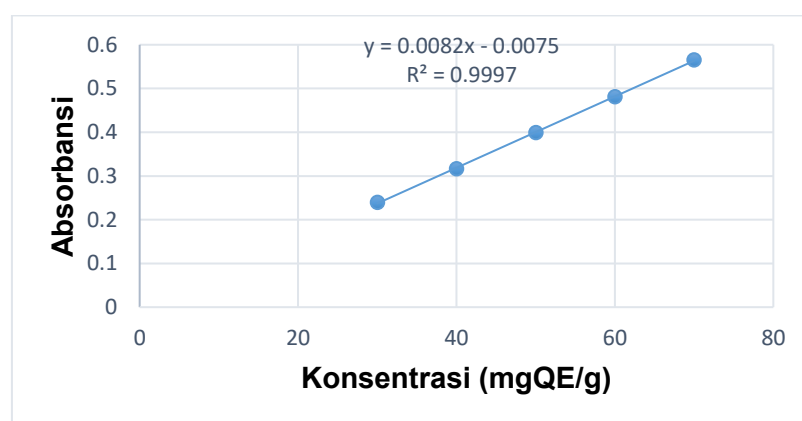
Keterangan : EM= Ekstrak Daun Pulai Metode Maserasi ER= Ekstrak Daun Pulai Metode Refluks

Data kadar flavonoid total dalam penelitian ditampilkan pada gambar 1. Grafik tersebut menyajikan perbandingan kadar flavonoid antar metode ekstraksi, yang diperoleh berdasarkan hasil pengukuran spektrofotometri UV-Vis menggunakan standar kuersetin.



Gambar 1. (A) Ekstrak Daun Pulai metode ekstraksi maserasi (EM), (B) Ekstrak Daun Pulai metode ekstraksi refluks (ER).

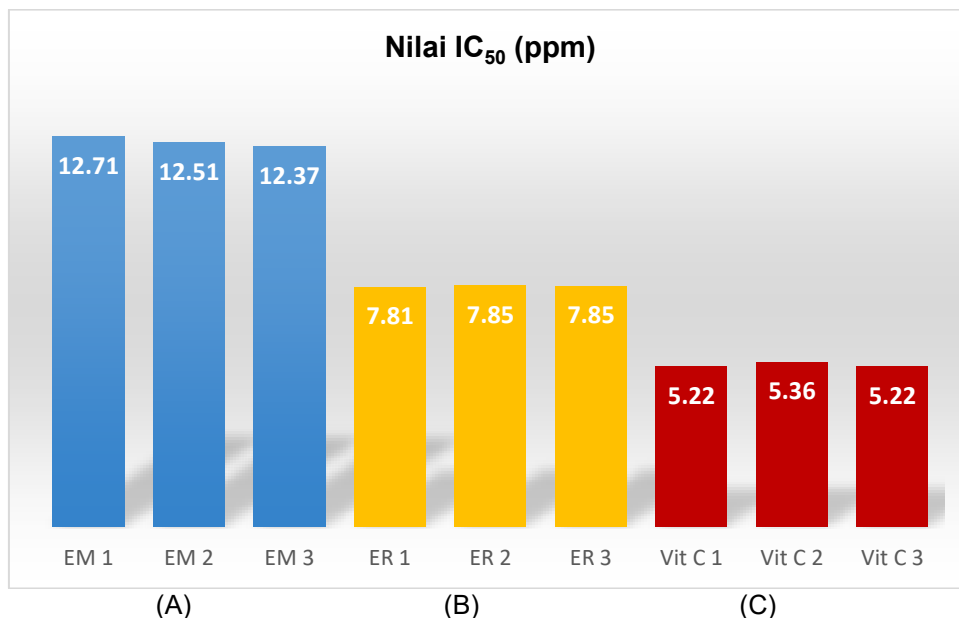
Nilai kadar flavonoid dihitung dari absorbansi masing-masing ekstrak dengan menggunakan persamaan regresi dari larutan standar (Gambar 2), dan dinyatakan dalam satuan miligram ekuivalen kuersetin per gram sampel (mgQE/g). Hasil ini mengindikasikan bahwa metode refluks lebih mampu mengekstrak senyawa flavonoid, yang bersifat semi-polar, karena bantuan panas dalam metode refluks membantu meningkatkan difusi dan pelarutan senyawa. Temuan ini sesuai dengan penelitian Pratiwi (2023), yang melaporkan bahwa pemanasan dalam metode refluks meningkatkan kelarutan senyawa flavonoid pada ekstrak daun kelor (Pratiwi, 2023). Penelitian oleh Syamsul *et.al* (2020), juga mendukung hasil ini, ekstrak etanol daun sirsak yang diekstraksi dengan refluks memiliki kadar flavonoid lebih tinggi dibandingkan dengan metode tanpa pemanasan (Syamsul *et.al*, 2020).



Gambar 2. Kurva Baku Kuersetin

Pengujian aktivitas antioksidan dengan metode DPPH seperti terlihat pada Gambar 3. Nilai  $IC_{50}$  yang lebih rendah menandakan aktivitas antioksidan yang lebih kuat. Berdasarkan klasifikasi menurut Amin (2025), ekstrak dengan nilai  $IC_{50} < 50$  ppm dikategorikan memiliki aktivitas antioksidan sangat kuat. Maka dari itu, dapat disimpulkan bahwa daun pulai memiliki potensi sebagai antioksidan alami yang sangat baik, dan metode refluks memberikan aktivitas yang lebih tinggi. Hal ini disebabkan oleh

keberhasilan metode refluks dalam mengekstraksi lebih banyak senyawa flavonoid yang dikenal sebagai antioksidan kuat. Senyawa tersebut memiliki gugus hidroksil yang mampu menyumbangkan elektron atau proton untuk menetralkan radikal bebas melalui mekanisme transfer elektron (Susanty, 2016).



Gambar 3. (A) Ekstrak Daun Pulai metode ekstraksi maserasi (EM), (B) Ekstrak Daun Pulai metode ekstraksi refluks (ER), (C) Vitamin C

Gambar 3 menunjukkan nilai IC<sub>50</sub> masing-masing ekstrak daun pulai dengan metode ekstraksi maserasi dan refluks yang direplikasi 3 kali. Hasil penelitian menunjukkan nilai IC<sub>50</sub> EM sebesar 12,53±0,17 ppm, ER dengan nilai 7,84±0,02 ppm dan vitamin C sebagai kontrol positif dengan nilai IC<sub>50</sub> 5,26±0,08 ppm. Vitamin C dijadikan sebagai kontrol positif karena diketahui bahwa vitamin C ini memiliki aktivitas antioksidan dengan kategori sangat kuat. Berdasarkan nilai IC<sub>50</sub> diketahui bahwa EM dan ER memiliki aktivitas antioksidan dengan kategori sangat kuat karena nilai IC<sub>50</sub> dibawah < 50 ppm (Azima et al, 2024). Untuk mengetahui ada tidaknya perbedaan aktivitas antioksidan berdasarkan perbandingan metode ekstraksi, maka dilakukan uji statistik menggunakan SPSS. Nilai uji normalitas diperoleh (sig. > 0,05) yang menunjukkan data terdistribusi normal menggunakan uji Shapiro-Wilk sehingga dilanjutkan menggunakan uji One Way ANOVA. Hasil uji ANOVA menunjukkan nilai sig < 0,05 sehingga dilanjutkan dengan uji *post hoc* Tukey HSD. Uji lanjut Tukey HSD menunjukkan bahwa terdapat perbedaan signifikan antara EM dan ER (p = 0,006), EM dan Vitamin C (p = 0,001), serta ER dan Vitamin C (p = 0,032). Hal ini mengindikasikan bahwa metode ekstraksi berpengaruh nyata terhadap nilai IC<sub>50</sub>.

Perbedaan metode ekstraksi seperti maserasi dan refluks memiliki pengaruh nyata (sig. < 0,05) terhadap hasil rendemen, kadar flavonoid, dan aktivitas antioksidan (nilai IC<sub>50</sub>). Maserasi dilakukan tanpa pemanasan, sehingga proses difusi senyawa aktif dari jaringan tanaman ke pelarut terjadi secara lambat dan cenderung menghasilkan rendemen serta kadar flavonoid yang lebih rendah. Sebaliknya, metode refluks memanfaatkan pemanasan dalam sistem tertutup yang mampu meningkatkan kelarutan dan difusi senyawa bioaktif, termasuk flavonoid dan senyawa fenolik (Syamsul et al., 2020). Dalam penelitian ini, ekstrak refluks (ER) menunjukkan kadar flavonoid lebih tinggi dibanding maserasi (EM), yang sejalan dengan aktivitas antioksidan yang lebih kuat berdasarkan nilai IC<sub>50</sub> yang lebih rendah.

Proses tersebut berkaitan dengan hukum difusi Fick, laju difusi berbanding lurus dengan suhu dan gradien konsentrasi. Pada suhu lebih tinggi, seperti dalam refluks, viskositas pelarut menurun dan kelarutan senyawa meningkat, sehingga difusi menjadi



lebih cepat dan efisien. Hasilnya secara langsung dapat meningkatkan hasil rendemen, kadar flavonoid total, serta aktivitas antioksidan dari suatu ekstrak, mengingat flavonoid memiliki gugus hidroksil aromatik yang mampu menyumbangkan elektron untuk menetralkan radikal bebas (Triyanti et al., 2025). Oleh karena itu, pemilihan metode ekstraksi sangat penting karena memengaruhi keberhasilan isolasi senyawa aktif dan efektivitas biologisnya. Hal ini menunjukkan bahwa kandungan flavonoid berkorelasi positif terhadap potensi antioksidan. Meskipun proses refluks melibatkan pemanasan, flavonoid secara umum cukup stabil terhadap suhu sedang dan waktu ekstraksi yang terkontrol, sehingga tidak terjadi degradasi signifikan selama proses berlangsung (Issusilaningtyas et al., 2023). Suhu yang digunakan 40°C relatif rendah ini, penting untuk mencegah degradasi senyawa termolabil, meningkatkan difusi pelarut ke dalam matriks sampel, dan mempercepat pelepasan metabolit sekunder tanpa merusak struktur kimianya (Wahyuningsih, 2024). Hal ini sejalan dengan penelitian Pratiwi (2024), dengan melakukan perbandingan suhu refluks terhadap aktivitas antioksidan ekstrak daun salam. Hasil yang diperoleh menunjukkan suhu refluks 58°C memiliki aktivitas antioksidan kuat sedangkan pada suhu 78°C menunjukkan aktivitas antioksidan sangat lemah (Pratiwi, 2024). Oleh karena itu, pemilihan metode ekstraksi yang tepat tidak hanya mempengaruhi jumlah senyawa yang terekstraksi, tetapi juga efektivitas biologisnya dari bahan alam, khususnya untuk pengembangan produk fitofarmaka berbasis tanaman seperti daun pulai.

## KESIMPULAN

Berdasarkan hasil penelitian yang telah dilakukan, dapat disimpulkan bahwa perbandingan metode ekstraksi berpengaruh terhadap kadar flavonoid dan aktivitas antioksidan ekstrak etanol daun pulai (*Alstonia scholaris*). Metode refluks menghasilkan kadar flavonoid yang lebih tinggi sebesar  $17,11 \pm 0,03$  mgQE/g, dibandingkan dengan metode maserasi sebesar  $8,42 \pm 0,02$  mgQE/g. Aktivitas antioksidan yang diuji dengan metode DPPH juga menunjukkan bahwa ekstrak hasil refluks memiliki nilai  $IC_{50}$   $7,84 \pm 0,02$  ppm, dibandingkan ekstrak hasil maserasi sebesar  $12,53 \pm 0,17$  ppm. Dengan demikian, ekstraksi daun pulai (*Alstonia scholaris*) menggunakan metode refluks terbukti lebih efektif dalam mengekstraksi senyawa flavonoid dan memiliki aktivitas antioksidan yang lebih tinggi dibandingkan metode maserasi. Hasil ini menunjukkan bahwa ekstrak daun pulai dengan ekstraksi metode refluks memiliki potensi sebagai sumber antioksidan alami yang sangat kuat dan dapat dikembangkan sebagai bahan aktif fitofarmaka dalam formulasi sediaan sebagai antioksidan.

## DAFTAR PUSTAKA

- Amin, S., & Assafa, Z. (2025). Peran Senyawa Polifenol dalam Mekanisme Antioksidan: Tinjauan dari Aspek Kimia Medisinal. *Jurnal Ilmiah Ilmu Kesehatan*, 3(2), 2025.
- Anggarani A. M., Ilmiah, M., Mahfudhah, D. N. (2023). Indonesian Journal of Chemical Science Literature Review of Antioxidant Activity of Several Types of Onions and Its Potential as Health Supplements. In *J. Chem. Sci* (Vol. 12, Issue 1). <http://jojournal.unneis.ac.id/sju/index.php/iics>
- Aryanti, R., Perdana, F., Rizkio, R. A. M. (2021). Telaah metode pengujian aktivitas pada daun teh hijau (Came liasine nsis). *Jurnal Surya Me dika*, 7 NO 1, 15–24.
- Ayu, I., Widiastriani, P., Nyo man, N., Udayani, W., Afriyanchika, G., Triansyah, P., Putu, N., Mahita, E., Dewi, K., Luh, N., Wulandari, W. E., Agung, A., & Prabandari, S. S. (2024). Artikel Review: Peran Antioksidan Flavonoid dalam Menghambat Radikal Bebas. *Journal Syifa Science s and Clinical Research (JSSCR)*, 6(2). <https://doi.org/10.37311/jsscr.v6i2.27055>
- Azima, Wahyuningsih, S., Ilyas, I. K., Agung, Y. C. (2024). Formulasi dan Uji Aktivitas Antioksidan Sediaan Lip Balm dari Ekstrak Etanol Umbi Wortel (*Daucus carota* L.) dengan Metode DPPH (2,2-diphenyl 1-piclylhydrazyl). *Journal of Experimental and Clinical Pharmacy*, 4(2): 167-185

- Fahrurrozi, A. L. (2021). Uji Aktivitas Antio ksidan E kstrak E tano l Daun Pe tai Cina (Le ucae na glauca (L.) Be nth.) De ngan Me to de DPPH (2,2-Diphe nyl-1-picrylhidrazyl). *Sinteza Jurnal Famasi Klinis dan Sains Bahan Alam* (Vol. 1, Issue 1).
- Hasan, H., Tho mas, N. A., Hio la, F., Ramadhani, N. F., & Ibrahim, A. S. (2022). Skrining Fito kimia dan Uji Aktivitas Antio ksidan Kulit Batang Mato a (Po me tia pinnata) De ngan Me to de 1,1-Diphe nyl-2 picrylhidrazyl (DPPH). *Indo ne sian Jo urnal o f Pharmace utical E ducatio n*, 2(1), 67–73. <https://doi.org/10.37311/ijpe.v2i1.10995>
- Issusilaningtyas, E., Azzahra, F., Ro chmah, N. N., Fao ziyah, R. A., & Aji, A. P. (2023). Pe rbandingan me to de e kstraksi mase rasi dan re fluks te rhadap kadar flavo no id dan antio ksidan daun je ruju (*Acanthus e bracte atus* Vahl). *Jurnal Ko munitas Farmasi Nasio nal*, 3(2)
- Mustapa. (2024). *Kimia Analisis Kualitatif*. Jakarta: Tahta Media Group
- Octavia, M., Amin, A., Waris, R., Yuliana, D. (2023). Identifikasi Organoleptip dan Kelarutan Ekstrak Etanol Daun Pecut Kuda (*Stachytarpheta jamaicensis* [L.] Vahl) Pada Pelarut Dengan Kepolaran Berbeda. *Makassar Natural Product Journal*. 1(4)
- Pratiwi, A. H., Artati, Y. (2023). Analisis Kadar Antioksidan Pada Ekstrak Daun Binahong Hijau *Anre de ra co rdifo lia* (Te n.) Ste e nis. *Bioma : Jurnal Biologi Makassar* <https://jojournal.unhas.ac.id/index.php/bioima>
- Pratiwi, F. K. D. (2024). Pengaruh Suhu Refluks Terhadap Aktivitas Antioksidan Pada Ekstrak Daun Salam (*Syzygium polyanthum*) dan Formulasinya Sebagai Sediaan Serum Wajah. *Indonesian Journal of Health Science*, 4(2).
- Suryadi, A. M. A., Pakaya, M. S., Mustapa, A. M., Makkulawu, A., & Hio la, F. (2024). Standarisasi dan Analisis Kandungan Flavono id To tal Daun Pulaui (*Alsto nia scho laris* L.). *Jo urnal Syifa Scie nce s and Clinical Re se arch*, 6(1). <https://doi.org/10.37311/jsscr.v6i1.15546>
- Susanty. & Bachmid, F. (2016). Pe rbandingan Me to de E kstraksi Mase rasi dan Re fluks te rhadap Kadar Fe no lik dari E kstrak To ngko l Jagung (*Ze a mays* L.) *Konversi*, 3(2)
- Syamsul, E. S., Amanda, N. A., Le stari, D. (2020). Perbandingan Ekstrak kst Lamur *Aquilaria malacce nsis* Dengan Metode Maserasi dan Refluks. *Jurnal Riset Kefarmasian Indonesia*, 2(2)
- Triyanti, S. B., Le stari, F. P., Fitriana, P. A. N., Ro stiana, H. R., Silalahi, D. D., Syalsabina, T. D., Putri, R. Y., & Saputra, I. S. (2025). Pe ngaruh Me to de E kstraksi Mase rasi, So nikasi, dan So kle tasi Te rhadap Nilai Re nde me n Sampe l Kulit Buah Naga (*Hylo ce re us po lyrhizus*). *Jurnal Sains Dan E dukasi Sains*, 8(1), 71–78. <https://doi.org/10.24246/juse.s.v8i1p71-78>
- Wahyuningsih, S., Yunita, I., Sundari, U. Y., Pagalla, D. B., Kalalinggi, S. Y., Alpian, et. Al. 2024. *Ekstraksi Bahan Alam*. Padang: Gita Lantera Bekasi.
- Wicaksono, S., Santo so, J., Prabandari, S. (2023). Pe ngaruh Pe rbe daan Me to de E kstraksi Te rhadap Kadar Flavono id To tal E kstrak Daun Ke lo r (*Mo ringa o le ife ra* L.) De ngan Me to de Spe ktro fo to me tri UV-Vis. *Parapemikir: Jurnal Ilmiah Farmasi*, 10(10)
- Zuraida. (2018). Aktivitas Antioksidan dan Komponen Fitokimia Fraksi N-Heksana Kulit Kayu Pulaui *Alsto nia scho laris* R.Br Sebagai Sumber Hasil Hutan Bukan Kayu Alternatif *Jo urnal Pe ne litian Hutan Dan Ko nse rvasi Alam*, 15(1): 15-24.