

BAB I

PENDAHULUAN

1.1 Latar Belakang

Berbagai penyakit seperti diabetes melitus, kanker, penyakit kardiovaskular, penyakit neurodegeneratif, dan penuaan dini, diketahui memiliki kaitan yang erat dengan radikal bebas. Radikal bebas merupakan molekul atau atom yang memiliki elektron tidak berpasangan pada kulit terluarnya sehingga sangat reaktif (Agustikawati dkk., 2017). Radikal bebas dapat berupa *Reactive Oxygen Species* (ROS) dan *Reactive Nitrogen Species* (RNS) yang diperoleh dari dalam maupun luar tubuh (Satria dkk., 2023). Kadar radikal bebas yang tinggi dalam sel biologis dapat mengakibatkan stres oksidatif yang mengganggu fungsi sel, penuaan, dan menimbulkan berbagai penyakit (Munteanu dan Aptrei, 2021). Apabila kadar radikal bebas melebihi batas kemampuan antioksidan seluler, maka diperlukan antioksidan eksogen yang mampu membantu menetralkan radikal bebas untuk mengurangi stres oksidatif (Agustikawati dkk., 2017). Beberapa bahan antioksidan sintetik yang beredar dipasaran berupa BHA (Butil Hidroksi Anisol), BHT (Butil Hidroksi Toluena), dan PG (Propil Galat) diketahui dapat menimbulkan efek karsinogenik sehingga penggunaan antioksidan alami mengalami peningkatan (Rahayu dkk., 2015).

Indonesia merupakan negara yang memiliki kekayaan sumber daya alam hayati yang sangat melimpah. Salah satu tanaman yang dapat digunakan sebagai obat tradisional yaitu mengkudu. Mengkudu (*Morinda citrifolia* Linn) biasa dikenal sebagai Noni yang hampir semua bagian tanamannya digunakan untuk pengobatan penyakit (Pandy dkk., 2020). Beberapa penelitian telah melaporkan bahwa mengkudu menunjukkan aktivitas antioksidan, antiinflamasi, antitumor, dan antidiabetes (Li dkk., 2020). Metabolit sekunder yang telah diidentifikasi dari tanaman mengkudu seperti flavonoid, lignan, kumarin, dan antrakuinon, serta senyawa non-fenolik berupa polisakarida, triterpenoid, iridoid, dan steroid. Pada buah mengkudu mengandung senyawa utama seperti skopoletin (kumarin), rutin (flavonoid), *damnachantal* (*anthraquinone*), *asperuloside* (iridoid), dan asam ursolat (triterpenoid) (Ferlinahayati dkk., 2023). Akan tetapi, efektivitas ekstraksi senyawa antioksidan dari buah mengkudu dapat dipengaruhi oleh metode ekstraksi dan jenis pelarut yang digunakan.

Salah satu metode ekstraksi yang dapat digunakan yaitu *Microwave Assisted Extraction* (MAE) yang banyak diterapkan untuk isolasi polifenol tanaman. Ekstraksi menggunakan MAE dapat dilakukan dalam waktu yang singkat, penggunaan pelarut dan limbah, dan energi yang dibutuhkan lebih sedikit sehingga keefektifan dalam ekstraksi (Choommongkol dkk., 2022). Yang dilakukan oleh Putranto (2018), aktivitas antioksidan pada ekstraksi menggunakan metode *Microwave Assisted Extraction* (mg/mL) menunjukkan aktivitas yang lebih tinggi dibandingkan menggunakan maserasi (IC_{50} 6,689 $\pm$ 0,27 mg/mL). Selain itu,



penggunaan pelarut yang berbeda juga dapat menunjukkan aktivitas antioksidan yang berbeda pula. Dalam uji DPPH (2,2-diphenyl-1-picryl-hydrazyl) yang dilakukan oleh El Mannoubi (2023), ekstrak aseton memiliki aktivitas radikal terbaik dengan nilai IC_{50} sebesar 0,732 mg/mL, kemudian ekstrak etanol memiliki nilai IC_{50} 1,223 mg/mL dan metanol memiliki nilai IC_{50} sebesar 1,699 mg/mL. Hal tersebut juga dibuktikan oleh penelitian yang dilakukan Wang dkk. (2022) bahwa variasi pelarut ekstraksi dapat mempengaruhi kandungan fitokimia dan aktivitas biologis ekstrak. Dalam penelitian tersebut diperoleh aktivitas antioksidan ekstrak etanol memiliki aktivitas antioksidan tertinggi dan kandungan senyawa skopoletin tertinggi. Sedangkan ekstrak yang dibuat dengan etil asetat sebagai salah satu contoh pelarut non-polar menunjukkan aktivitas antioksidan terendah serta memiliki kandungan skopoletin terendah. Hasil penelitian tersebut menunjukkan adanya korelasi yang erat antara tingkat kandungan bahan aktif dan polaritas pelarut ekstraksi, yang dapat mempengaruhi kapasitas antioksidan ekstrak.

Berdasarkan uraian di atas, penelitian ini bertujuan untuk menguji aktivitas antioksidan dari variasi ekstrak buah mengkudu yang diperoleh secara *Microwave-Assisted Extraction* terhadap radikal DPPH (2,2-diphenyl-1-picryl-hydrazyl). Dengan adanya variasi jenis pelarut dalam ekstraksi yang dilakukan, diharapkan dapat diketahui pelarut yang menghasilkan ekstrak dengan aktivitas antioksidan tertinggi.

1.2 Rumusan Masalah

Berdasarkan uraian di atas, maka penelitian ini merumuskan permasalahan yaitu bagaimana pengaruh variasi jenis pelarut terhadap aktivitas antioksidan ekstrak buah mengkudu (*Morinda citrifolia* L.) berdasarkan aktivitasnya dalam menangkal radikal DPPH?

1.3 Tujuan Penelitian

Tujuan penelitian ini yaitu untuk mengetahui pengaruh variasi jenis pelarut terhadap aktivitas antioksidan ekstrak buah mengkudu (*Morinda citrifolia* L.) berdasarkan aktivitasnya dalam menangkal radikal DPPH.



BAB II

METODE PENELITIAN

2.1 Alat dan bahan

2.1.1 Alat

Alat yang digunakan dalam penelitian ini yaitu alat-alat gelas (Pyrex®), botol coklat, cawan porselen, *chamber* (Camag®), desikator, lampu UV 366 nm, *microplate*, *microplate reader* (BioTek®), *microwave* (Panasonic®), mikropipet (Biohit®), oven dehidrator (Papalole®), pipet tetes, *rotary evaporator* (Heidolph®), timbangan analitik (Ohaus®), vial, dan *waterbath* (Mettler®).

2.1.2 Bahan

Bahan yang digunakan dalam penelitian ini yaitu asam askorbat (vitamin C), *aquadest*, baku skopoletin (Merck®), buah mengkudu (*Morinda citrifolia* L.), DPPH (2,2-difenil-1-pikrilhidrazil), etanol, etil asetat, kalium hidroksida 10%, kertas perkamen, kertas saring, kloroform, lempeng KLT silika gel 60 GF₂₅₄, metanol, n-heksan, natrium hidroksida 2,5 N, dan silika gel.

2.2 Metode kerja

2.2.1 Pengambilan dan penyiapan sampel

Sampel yang digunakan adalah buah mengkudu (*Morinda citrifolia* L.) diperoleh di Kota Makassar, Tamalanrea Indah. Sampel yang dipilih yaitu buah yang masih muda dan berwarna putih kehijauan. Kemudian dilakukan identifikasi buah mengkudu di Laboratorium Farmakognosi, Fakultas Farmasi, Universitas Hasanuddin. Selanjutnya, sampel dicuci dengan air mengalir untuk menghilangkan kotoran pada buah. Setelah itu, buah dipotong hingga ukuran kecil lalu dikeringkan menggunakan oven. Ketika sampel simplisia telah kering, selanjutnya dilakukan sortasi kering. Terakhir, bahan simplisia dimasukkan ke dalam wadah penyimpanan yang sesuai.

2.2.2 Ekstraksi simplisia

Langkah pertama yaitu sampel ditimbang sebanyak 30 gram dan dimasukkan ke dalam labu Erlenmeyer. Setelah itu, ditambahkan pelarut *aquadest*, etanol, dan n-heksan sebanyak 450 mL ke dalam lima labu Erlenmeyer masing-masing berisi simplisia. Selanjutnya proses ekstraksi *microwave Assisted Extraction* (MAE) selama 4 menit. Ekstrak dianalisis menggunakan *rotary evaporator*.



2.2.3 Uji kualitatif dengan KLT

Ekstrak dilarutkan dalam etanol kemudian ditotolkan pada lempeng silika gel GF254 dan dielusi dengan menggunakan fase gerak heksan : etil asetat (1:1). Setelah itu, lempeng dibiarkan kering dan diamati di bawah sinar UV. Hasil positif adanya kumarin ditandai dengan spot noda yang berfluoresensi biru terang pada sinar UV 366.

2.2.4 Pembuatan larutan stok

Larutan DPPH (2,2-difenil-1-pikrilhidrazil) dibuat dengan menimbang DPPH sebanyak 10 mg, lalu dilarutkan dalam 10 mL metanol dan disimpan dalam vial gelap sehingga diperoleh larutan DPPH dengan konsentrasi 1000 ppm. Larutan tersebut selanjutnya diencerkan hingga 40 ppm dengan dipipet sebanyak 0,4 mL larutan DPPH 1000 ppm dalam labu tentukur 10 mL kemudian ditambahkan metanol hingga tanda batas (Fadhli dkk., 2020; Hasti dan Makbul, 2022).

Vitamin C digunakan sebagai antioksidan pembanding dibuat dengan menimbang sebanyak 10 mg, lalu dilarutkan dalam 10 mL metanol sehingga diperoleh konsentrasi 1000 ppm. Kemudian larutan tersebut diencerkan hingga konsentrasi 100 ppm. Pengujian dilakukan dalam 6 seri konsentrasi yaitu 12 ppm, 10 ppm, 8 ppm, 6 ppm, 4 ppm, dan 2 ppm dengan masing-masing dilakukan pengulangan sebanyak 3 kali (Fadhli dkk., 2020; Nasution dan Manullang, 2020).

2.2.5 Pembuatan larutan uji

Pembuatan larutan uji dilakukan dengan menimbang ekstrak sebanyak 10 mg, lalu dilarutkan dalam 10 mL metanol sehingga diperoleh konsentrasi 1000 ppm. Kemudian dibuat 6 seri konsentrasi melalui pengenceran bertingkat yaitu 1000 ppm, 500 ppm, 250 ppm, 125 ppm, 62,5 ppm, dan 31,25 ppm. Masing-masing pengujian konsentrasi dilakukan pengulangan sebanyak 3 kali (Fadhli dkk., 2020; Hasti dan Makbul, 2022).

2.2.6 Pengujian aktivitas antioksidan metode DPPH

Pengujian antioksidan dilakukan dengan metode DPPH menggunakan alat *microplate reader*. *Microplate 96 well* yang digunakan memiliki baris A sampai H dan tiap baris memiliki 12 sumur. Langkah pertama yaitu larutan uji dengan konsentrasi 1000 ppm dipipet sebanyak 120 μ L, lalu dimasukkan ke dalam masing-masing sumur

an pada baris B hingga H dimasukkan 120 μ L metanol. Larutan sebanyak 120 μ L, lalu dimasukkan ke dalam sumur baris B. B dipipet sebanyak 120 μ L, lalu dimasukkan ke baris C dan ris F. Pada sumur baris F dipipet sebanyak 120 μ L lalu dibuang. ersebut diperoleh larutan dengan konsentrasi sumur baris A (500 ppm), baris C (250 μ g/mL), baris D (125 μ g/mL), baris E (62,5 μ g/mL), baris F (31,25 μ g/mL). Selanjutnya baris G diisi dengan 120 μ L



metanol dan H diisi dengan 200 μ L metanol. Kemudian, baris A hingga G ditambahkan larutan DPPH dengan konsentrasi 40 ppm sebanyak 80 μ L. Baris H hanya berisi metanol sebagai blangko. Perlakuan yang sama untuk larutan vitamin C dengan konsentrasi 12 ppm, 10 ppm, 8 ppm, 6 ppm, 4 ppm, dan 2 ppm. Selanjutnya larutan diinkubasi selama 30 menit pada suhu ruangan dan terlindung dari cahaya untuk memaksimalkan reaksi antara senyawa yang berpotensi sebagai antioksidan dengan radikal DPPH (Pratiwi dkk., 2023), kemudian absorbansinya diukur pada panjang gelombang 517 nm dengan *microplate reader* (Fadhli dkk., 2020; Hasti dan Makbul, 2022).

2.2.7 Penentuan persentase penghambatan dan nilai IC₅₀

Persentase penghambatan ditentukan dari persamaan berikut (Fadhli dkk., 2020) :

$$\% \text{penghambatan} = \frac{\text{absorbansi kontrol} - \text{absorbansi sampel}}{\text{absorbansi kontrol}} \times 100$$

Untuk menentukan nilai IC₅₀ masing-masing konsentrasi sampel diplot dan persen inhibisinya pada sumbu x dan y pada persamaan regresi linear. Nilai IC₅₀ dihitung dengan persamaan berikut (Putranto dkk., 2018):

$$\text{IC}_{50} = \frac{50-b}{a}$$

Keterangan :

IC₅₀ = Inhibitor concentration 50% (mg/mL)

50 = nilai tetapan untuk penentuan IC₅₀

a = nilai pada persamaan $y = ax + b$

b = nilai pada persamaan $y = ax + b$

2.3 Pengumpulan data dan analisis data

Data yang diperoleh kemudian dikumpulkan dan dilakukan analisis statistik menggunakan *software graphpad* versi 9.

