

BAB I PENDAHULUAN

1.1 Latar Belakang

Seiring dengan berkembangnya teknologi, kehidupan manusia semakin mudah. Namun, tanpa disadari semakin banyak pula penyakit yang berkembang akibat dari pola hidup yang tidak sehat seperti kurang olahraga, makan makanan tidak sehat, dan terpapar bahan kimia (Tsatsakis *et al.*, 2019). Hal ini yang menyebabkan timbulnya radikal bebas dalam tubuh. Radikal bebas yang berlebih didalam tubuh dapat menyebabkan kerusakan membran sel, menghalangi kerja enzim, mencegah pembelahan sel, dan merusak DNA (Kurutas, 2015).

Radikal bebas merupakan atom atau molekul yang mengandung satu atau lebih elektron tidak berpasangan (Unsal *et al.*, 2021). Efek buruk dari radikal bebas berlebih dilaporkan menjadi pemicu awal munculnya berbagai penyakit kronis dan degeneratif (Kehrer & Klotz, 2015). Antioksidan berperan penting dalam meminimalkan kerusakan yang diakibatkan oleh radikal bebas (Rad *et al.*, 2020). Antioksidan dapat bersifat endogen dan eksogen. Beberapa antioksidan eksogen tidak dapat diproduksi oleh tubuh dan harus diperoleh dari makanan, termasuk vitamin C, vitamin E, dan bahan kimia seperti polifenol dan flavonoid (Willcox & Catignani, 2004).

Antioksidan mengandung senyawa fenol yang tinggi dan memiliki efek samping yang relatif lebih rendah dibandingkan dengan obat sintetik (Unsal *et al.*, 2021). Penggunaan bahan antioksidan dari tanaman saat ini menjadi alternatif lain penggunaan antioksidan sintetik. Salah satunya ialah mengkudu (*Morinda citrifolia* L.). Beberapa penelitian melaporkan khasiat dari mengkudu yaitu sebagai antijamur (Wang *et al.*, 2002), Antioksidan (Zin *et al.*, 2002), antibakteri (Barat *et al.*, 2012), antiinflamasi, penghambat lipoksigenase (Liu *et al.*, 2001), anti-arthritis (Saraswati *et al.*, 2012) antibakteri (Sina *et al.*, 2021), dan anti kanker (Chan-Blanco *et al.*, 2006).

Buah mengkudu (*M. Citrifolia* L.) memiliki banyak kandungan fitokimia berkhasiat. Kandungan buah mengkudu yaitu asam amino (alanine, arginin, leusin), β -karoten, kumarin (eskuletin, isoscooletin, scooletin), asam kaproat, asam kaprilat, antosianin, catekin, epikatekin, glikosida, asperulosidic acid, morindacin, dan beberapa vitamin seperti asam askorbat, vitamin E, dan vitamin K (West *et al.*, 2011; Su *et al.*, 2005; Almeida *et al.*, 2019). Penelitian lain melaporkan bahwa ekstrak air, etanol, dan metanol buah mengkudu mengandung steroid, glikosida jantung, fenol, tanin, terpenoid, alkaloid, karbohidrat, flavonoid, gula pereduksi, dan lipid (Nagalingam *et al.*, 2012).

Qualitas ekstrak terkait erat dengan metode ekstraksi. Penelitian Li *et al* (2020) melaporkan bahwa dari tiga metode ekstraksi *de Hot Water Extraction* (HWE), *Ultrasonic-assisted Extraction* *Electric Field-assisted Extraction* (PEFAE). Metode UAE yang mengandung komponen kimia lebih tinggi dan aktivitasnya lebih baik dibandingkan metode lainnya (Li *et al.*, 2020).



Menurut penelitian sebelumnya dilaporkan bahwa ekstrak buah mengkudu yang diperoleh secara maserasi menggunakan etanol 95% memiliki aktivitas antioksidan sebesar $1,52 \pm 0,04$ mg/mL terhadap radikal DPPH (Boontha *et al.*, 2016). Pada penelitian lain dengan sampel *Ficaria kochi* menggunakan metode ultrasonikasi melaporkan bahwa ekstrak metanol memiliki aktivitas antioksidan yang lebih tinggi dibandingkan dengan ekstrak air. Ekstrak metanol yang diperoleh pada kondisi suhu 40°C dan waktu 10 menit menghasilkan aktivitas penangkal DPPH (IC_{50}) sebesar 97,004 mg/mL (Shahidi, 2022). Berdasarkan penelitian Singh & Singh (2013), aktivitas antioksidan tertinggi pada ekstrak metanol dengan IC_{50} sebesar $75,5 \pm 8,3$ $\mu\text{g/mL}$ dan terendah pada ekstrak akuades sebesar $219,9 \pm 5,3$ $\mu\text{g/mL}$.

Buah mengkudu telah diketahui memiliki aktivitas antioksidan yang cukup tinggi, namun penelitian tentang aktivitas antioksidan buah mengkudu yang diperoleh secara *Ultrasound-Assisted Extraction* terhadap radikal DPPH masih sedikit. Oleh sebab itu penelitian ini bertujuan untuk mengetahui dan menguji aktivitas antioksidan variasi ekstrak buah mengkudu yang diperoleh secara UAE terhadap radikal DPPH.

1.2 Rumusan Masalah

Berdasarkan uraian di atas, maka dirumuskan masalah yaitu bagaimana pengaruh variasi jenis pelarut terhadap aktivitas antioksidan ekstrak buah mengkudu yang diperoleh secara UAE berdasarkan aktivitasnya dalam menangkal radikal DPPH?

1.3 Tujuan Penelitian

Berdasarkan rumusan masalah di atas, maka tujuan penelitian ini adalah untuk mengetahui pengaruh variasi jenis pelarut terhadap aktivitas antioksidan Ekstrak buah mengkudu yang diperoleh secara UAE berdasarkan aktivitasnya dalam menangkal radikal DPPH.



BAB II METODE PENELITIAN

2.1 Penyiapan Alat dan Bahan

Alat yang digunakan dalam penelitian ini yaitu alat-alat gelas (Pyrex®), botol cokelat, cawan porselen, *chamber* (Camag®), ElisaReader (BioTek®), lampu UV 366 nm, mikropipet (Biohit®), *moisture analyzer* (Kem®), oven dehidrator (Papalole®), *rotary evaporator* (Heidolph®), timbangan digital (Denver®), tip (Biologix®) ultrasonikasi (Elma®), *waterbath* (Memmer®), *96 well plate*.

Bahan yang digunakan dalam penelitian ini yaitu akuades, asam askorbat, buah mengkudu (*M. citrifolia* L.), etanol, etil asetat, klorofom, lempeng KLT silika gel GF254 nm, metanol, heksan, radikal *1,1-diphenyl-2-picrylhydrazyl* (DPPH), silika gel 60.

2.2 Prosedur Penelitian

2.2.1 Penyiapan sampel

Sampel buah mengkudu (*M. citrifolia* L.) yang diperoleh di Kota Makassar diidentifikasi spesiesnya dengan melakukan determinasi tanaman di Laboratorium Farmakognosi, Fakultas Farmasi, Universitas Hasanuddin. Buah mengkudu yang dipilih yaitu buah yang berwarna putih dan bertekstur keras. Buah mengkudu disortasi basah. Kemudian dilakukan pencucian sampel untuk menghilangkan kotoran pada buah. Setelah itu, sampel dipotong hingga kecil untuk memudahkan pada saat proses ekstraksi. Sampel kemudian dikeringkan menggunakan oven dehidrator pada suhu 50°C selama 48 jam. Selanjutnya dilakukan pengukuran kadar air dengan menggunakan *moisture analyzer*. Sampel tersebut dimasukkan kedalam wadah dan disimpan untuk proses selanjutnya.

2.2.2 Ekstraksi sampel

Sebanyak 30 g simplisia buah mengkudu (*M. citrifolia* L.) diekstraksi menggunakan pelarut akuades, etanol, kloroform, metanol, dan heksan masing-masing sebanyak 900 mL di dalam labu Erlenmeyer. Selanjutnya proses ekstraksi dilakukan secara UAE selama 30 menit.

Ekstrak yang diperoleh disaring lalu dipekatkan dengan menggunakan *rotary evaporator* pada suhu 50°C. Ekstrak kental yang didapatkan kemudian diuapkan diatas *waterbath* lalu disimpan dalam wadah berisi silika gel. Ekstrak kental yang diperoleh dihitung persen rendemennya menggunakan rumus sebagai berikut.

$$\text{Rendemen (\%)} = \frac{\text{Bobot ekstrak (g)}}{\text{wt simplisia (g)}} \times 100\% \dots \dots \dots (1)$$



Langkah-langkah metode KLT

Langkah-langkah metode Kromatografi Lapis Tipis (KLT). Masing-masing senyawa standar dan sampel dilarutkan dalam etanol kemudian diaplikasikan pada lempeng silika gel GF 254 dengan menggunakan pipa kapiler. Setelah itu, elusi dilakukan dengan menggunakan campuran heksan: etil asetat (1:1) dielusi dalam *chamber*. Setelah itu

dimasukkan lempeng silika ke dalam chamber. Selanjutnya lempeng silika diangkat dari *chamber* lalu diamati dibawah sinar UV pada gelombang 366 nm. Noda yang terbentuk diamati dan dilingkari, dilakukan perhitungan nilai Rf.

2.2.4 Uji Aktivitas Antioksidan

2.2.4.1 Pembuatan larutan DPPH

Larutan DPPH dibuat dengan cara menimbang DPPH sebanyak 4 mg kemudian dilarutkan dalam 100 mL metanol pa sehingga diperoleh konsentrasi 40 µg/mL, larutan dimasukkan ke dalam vial coklat.

2.2.4.2 Pembuatan larutan stok ekstrak

Larutan stok masing-masing ekstrak *M.citrofolia* 1000 µg/mL dibuat dengan cara ditimbang seksama 10 mg ekstrak dilarutkan dalam 10 mL metanol.

2.2.4.3 Pembuatan larutan stok asam askorbat

Larutan stok asam askorbat dibuat dengan menimbang seksama 10 mg asam askorbat dilarutkan dalam 10 mL metanol pa sehingga diperoleh larutan asam askorbat dengan konsentrasi 1000 µg/mL. Larutan tersebut kemudian diencerkan hingga 100 µg/mL dengan mencuplik sebanyak 1 mL dari larutan asam askorbat pada konsentrasi 1000 µg/mL kemudian dicukupkan volumenya dengan menggunakan metanol pa hingga 10 mL.

2.2.5 Pengukuran Aktivitas Pengikatan Radikal bebas DPPH dengan Asam Askorbat dan Larutan Uji

Pengujian antioksidan dilakukan dengan menggunakan *microplate reader* (plate terdiri dari baris A-H) dengan metode DPPH pada panjang gelombang 517 nm. Pengujian dilakukan pada larutan uji asam askorbat, kelima ekstrak dan blangko dibuat dengan cara dicuplik larutan stok sesuai yang tertera pada Tabel 1 dan Tabel 2. Baris A-G ditambahkan DPPH sebanyak 80 µL, lalu larutan uji diinkubasi pada suhu kamar dalam gelap selama 30 menit. Selanjutnya sampel dibaca menggunakan alat *microplate reader* (Fadhli *et al.*, 2020).

Tabel 1. Perbandingan volume larutan uji untuk ekstrak, pelarut dan radikal uji antioksidan

Konsentrasi	Volume sampel uji (µL)	Volume metanol (µL)	Volume radikal (µL)
-	-	120	80
120	120	120	80
120	120	120	80
120	120	120	80
120	120	120	80
120	120	120	80

Tabel 2. Perbandingan volume asam askorbat, pelarut dan radikal uji antioksidan

Konsentrasi (µg/mL)	Volume asam askorbat (µL)	Volume metanol (µL)	Volume radikal (µL)
Blangko (B)	-	120	80
2	4	196	80
4	8	192	80
6	12	188	80
8	16	184	80
10	20	180	80
12	24	176	80

2.3 Analisis Data

2.3.1 Perhitungan % inhibisi

Besarnya aktivitas dihitung dengan menggunakan rumus sebagai berikut (Sam-ang *et al.*, 2022).

$$\% \text{Inhibisi} = \frac{(\text{AbsKontrol} - \text{AbsSampel})}{\text{Absorbansi Kontrol}} \times 100\%$$

2.3.2 Perhitungan nilai IC₅₀

Nilai *inhibitory concentration* (IC₅₀) dihitung berdasarkan persamaan regresi linear konsentrasi sampel dan persen inhibisi. Nilai IC₅₀ dapat ditentukan dengan plot konsentrasi sampel (sumbu x) versus persentase aktivitas penangkal radikal (sumbu y) dan dihitung sebagai IC₅₀ ± SD. Perhitungan IC₅₀ dapat dituliskan dengan cara mengubah nilai y = 50; y = bx + a; 50 = bx + a.

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

$$\text{IC}_{50} = x$$

Kategori aktivitas antioksidan ekstrak dan asam askorbat berdasarkan nilai IC₅₀ ditentukan sesuai dengan **Tabel 3**.

Tabel 3. Kategori aktivitas antioksidan berdasarkan nilai IC₅₀ (Molyneus, 2004)

Nilai IC ₅₀ (µg/mL)	Kategori
< 50	Sangat kuat
50-100	Kuat
150	Sedang
200	Lemah
300	Sangat lemah

