

Pengaruh Rasio Bahan dan Pelarut terhadap Kadar Flavonoid dan Aktivitas Penangkapan Radikal Bebas Ekstrak Daun Mengkudu (*Morinda citrifolia*)

The effect of Material to Solvent Ratio to The Flavonoid Content and Free Radical Scavenging Activity of Extract of Morinda Citrifolia L Leaves

Penulis Septiana Laksmi Ramayani^{1*}, Fitria Rohmawati², Yasmine Savira Rahmadani²

Afiliasi ¹Prodi D3 Farmasi, Politeknik Kesehatan Kementerian Kesehatan Surakarta, Jl. Ksatrian No 2 Danguan, Klaten, Indonesia.
²Prodi D3 Farmasi, Politeknik Katolik Mangunwijaya, Jl. Gajahmada No.91, Kembang Sari, Kec. Semarang Tengah, Kota Semarang, Jawa Tengah 50133, Indonesia.

Kata Kunci

- Mengkudu, daun
- kadar flavonoid
- aktivitas penangkap radikal

Keywords

- *Morinda citrifolia. Leaves*
- *total flavonoid content*
- *free radical scavenging activity*

Diterima 25 November 2021

Direvisi 17 Mei 2022

Disetujui 3 Agustus 2022

*Penulis Koresponding

Septiana Laksmi Ramayani

email:

septianaLR@gmail.com

ABSTRAK

Senyawa flavonoid dalam daun Mengkudu (*Morinda citrifolia*) berkhasiat sebagai penangkap radikal bebas. Penelitian ini dilakukan untuk mengetahui pengaruh rasio bahan dan pelarut (1:5; 1:10 dan 1:20) terhadap kadar flavonoid dan aktivitas penangkapan radikal bebas. Ekstraksi dilakukan dengan metode *Microwave Assisted Extraction* dan pengujian aktivitas penangkapan radikal bebas menggunakan pereaksi 1,1-difenil-2-pikrilhidrazil (DPPH). Hasil penelitian menunjukkan rasio bahan-pelarut pengaruh bermakna pada rendemen, kadar flavonoid dan aktivitas penangkapan radikal bebas. Rasio bahan-pelarut 1:20 menghasilkan rendemen, kadar flavonoid dan aktivitas penangkapan radikal bebas tertinggi dibandingkan rasio bahan-pelarut lainnya.

ABSTRACT

The flavonoid compound in Noni leaves (Morinda citrifolia) are efficacious as free radical scavengers. This research aimed to know the influence of the ratio of materials and a solvent (M:S=1:10; M:S=1:15; M:S=1:20) on the flavonoid content and free radical scavenging activity of extract of noni leaves. Extraction was carried out using the Microwave Assisted Extraction method and the free radical scavenging activity were determined by 1,1-diphenyl-2-picrylhydrazyl (DPPH). The results showed that the material-solvent ratio had a significant effect on the yield, total flavonoid content, and free radical scavenging activity. The material to solvent ratio 1: 20 resulted in the highest yield, total flavonoid content, and free radical scavenging activity compared to other solvent-solvent ratios.



PENDAHULUAN

Radikal bebas merupakan molekul tidak stabil dalam metabolisme sel normal (perubahan kimia yang terjadi di dalam sel). Radikal bebas yang melebihi kapasitas tubuh, maka menimbulkan kondisi yang disebut stress oksidatif yang dapat mengubah kondisi fisiologis tubuh dan mengakibatkan beberapa penyakit (Haider *et al.* 2020). Antioksidan menetralkan radikal bebas dengan melepaskan beberapa elektronnya sendiri. (Halliwell & Gutteridge 2000). Senyawa antioksidan dapat diperoleh secara alami, salah satunya adalah berasal dari mengkudu (*Morinda citrifolia*).

Tanaman mengkudu mengandung sekitar 160 senyawa fitokimia dengan senyawa fenolik menjadi kelompok utama mikronutrien fungsional dan berpengaruh nyata terhadap aktivitas antioksidannya (Zin *et al.* 2007). Daun mengkudu mengandung 5 glikosida flavonol yang merupakan golongan senyawa polifenol (Rohman *et al.* 2007). Hasil identifikasi kromatografi lapis tipis, menunjukkan bahwa ekstrak daun mengkudu memberikan efek tajam dan pita yang terdefinisi dengan baik dengan R_f 0,5 dan warna kuning yang sama dengan rutin sebagai baku pembandingnya. Rutin merupakan glikosida flavonoid yang banyak digunakan sebagai standar dalam identifikasi flavonoid dalam daun (Setyani dan Setyowati, 2018). Boontha *et al.* 2016 melaporkan bahwa daun dan buah mengkudu memiliki aktivitas sebagai DPPH *radical scavenging* sebesar $1,35 \pm 0,02$ mg/mL sedangkan pada buah mengkudu sebesar $1,52 \pm 0,04$ mg/mL. Kadar rutin daun mengkudu adalah $0,54 \pm 0,17$ % sedangkan pada buah mengkudu sebesar $0,42 \pm 0,09$ %. Hal ini menunjukkan daun mengkudu memiliki aktivitas yang lebih besar daripada buah mengkudu karena kandungan rutin pada daun juga lebih besar dibandingkan pada buah mengkudu.

Senyawa flavonoid dalam daun mengkudu dapat dihasilkan melalui proses ekstraksi, salah satunya secara *Microwave Assisted Extraction* (MAE). Tambun *et al.* 2021 menyebutkan bahwa metode ekstraksi MAE dapat menghasilkan rendemen terbesar pada ekstraksi daun sirsak dibandingkan metode maserasi dan sokletasi. *Assisted Extraction* (MAE) menggunakan energi gelombang mikro untuk meningkatkan reaksi selektif secara cepat dan efisien melalui pemanasan pelarut. Efisiensi MAE salah satunya dipengaruhi oleh rasio bahan dan pelarut (Kataoka, 2019). Efisiensi proses ekstraksi ditunjukkan jika semakin sedikit pelarut yang digunakan namun dapat menghasilkan kadar dan aktifitas yang tinggi. Tujuan penelitian ini untuk mengetahui pengaruh rasio bahan dan pelarut

terhadap kadar flavonoid dan aktivitas penangkapan radikal bebas ekstrak daun mengkudu.

METODE

Alat

Spektrofotometer UV-Vis (Shimadzu UV-1800), *microwave* (Metrowealth), *moisture analyzer* (Ohaus), timbangan analitik (Ohaus), alat gelas (Pyrex).

Bahan

Serbuk daun mengkudu (Materia Medika Batu), Methanol p.a (Merck), 1,1-difenil-2-pikrilhidrazil (DPPH), kuersetin (Sigma aldrich), $AlCl_3$ (Merck), CH_3COOH .

Tatacara penelitian

1. Ekstraksi Daun Mengkudu

Ekstraksi dilakukan secara maserasi berbantu *microwave / Microwave Assisted Extraction* (MAE). Sebanyak 40 gram serbuk simplisia daun mengkudu diekstraksi menggunakan etanol 96% dengan variasi rasio antara bahan dan pelarut 1:5, 1:10, 1:20 (b/v). Waktu yang diperlukan dalam proses ekstraksi yaitu selama 2 menit, suhu $<50^\circ C$ serta kekuatan daya 700 W. Selama proses ekstraksi, secara berkala larutan diradiasi dalam *microwave* yaitu radiasi 10 detik kemudian dua menit dimatikan. Filtrat selanjutnya diuapkan hingga terbentuk ekstrak kental daun mengkudu dan dilakukan kontrol kualitas meliputi uji organoleptis, perhitungan rendemen dan susut pengeringan.

2. Uji Kualitatif Senyawa Flavonoid

Uji kualitatif dilakukan dengan uji Shinoda menggunakan serbuk Mg dan HCl pekat (Hanani, 2015).

3. Penetapan Kadar Total Senyawa Flavonoid

Kadar flavonoid ditentukan menggunakan $AlCl_3$ dengan metode kolorimetri (Chang *et al.*, 2003). Sebanyak 1 mL larutan ekstrak dan larutan standar kuersetin masing-masing dimasukkan dalam tabung. $AlCl_3$ 10% sebanyak 1 mL dan 8 mL CH_3COOH 5% dihomogenkan dan didiamkan 14 menit. Panjang gelombang yang digunakan adalah 413,90 nm. Kadar flavonoid dihitung ekuivalen dengan kuersetin (KE)/gram ekstrak (Ramayani 2021).

4. Penentuan Aktivitas Penangkapan Radikal Bebas

Penangkapan radikal bebas dilakukan menggunakan pereaksi 2,2-difenil-1-pikrilhidrazil (DPPH) (Molyneux,



2004). Sebanyak 0,1 mL larutan ekstrak (20 ppm) kemudian dicampur dengan larutan DPPH 0,075mM 4,0 mL. Panjang gelombang yang digunakan adalah 517,15 nm. Larutan blanko yang digunakan adalah larutan DPPH. Aktivitas penangkapan radikal bebas ditentukan dengan persamaan 1.

$$\text{Aktivitas penangkapan radikal bebas} = \frac{\text{absorbansi blanko} - \text{absorbansi sampel}}{\text{absorbansi blanko}} \times 100\% \dots\dots (1)$$

5. Analisis data

Hasil penentuan kadar total senyawa flavonoid dan aktivitas antioksidan di analisa secara statistika dengan metode *Analysis of Variance* (Anova) dan uji *Post-Hoc Test* dengan taraf kepercayaan 95%.

HASIL DAN PEMBAHASAN

Serbuk daun mengkudu yang digunakan berasal dari *Materia Medica Batu* yang ditunjukkan dengan surat determinasi dari UPT Laboratorium Herbal *Materia Medica Batu*. Serbuk simplisia memiliki pemerian berupa serbuk halus, bau khas mengkudu, warna hijau tua dan rasa pahit dengan susut pengeringan sebesar 7,57%. Kandungan alkaloid xeronin dalam daun mengkudu menyebabkan rasa pahit (Afandi 2013). Pada **Tabel 1** dapat dilihat hasil ekstraksi daun mengkudu.

Hasil ekstraksi menunjukkan perbedaan rasio bahan dan pelarut menghasilkan organoleptis yang sama. Terbentuknya warna hijau kehitaman pada ekstrak diakibatkan karena adanya kandungan klorofil pada daun yang berubah menjadi kehitaman karena adanya proses pemanasan pada pemekatan ekstrak. Rasio bahan-pelarut berpengaruh terhadap rendemen dan susut pengeringan yang dihasilkan. Rendemen terbesar ditunjukkan dengan rasio bahan pelarut pada rasio 1:20 yang merupakan rasio bahan-pelarut terbesar. Hasil ini sesuai dengan hasil penelitian Sabtu *et al.* (2016), rendemen ekstrak daun kadok tertinggi dihasilkan pada rasio bahan-pelarut 1: 30 yang merupakan rasio bahan-

pelarut tertinggi. Semakin banyak pelarut menyebabkan semakin besar kontak bahan dengan pelarut, senyawa yang terekstrak semakin banyak sehingga rendemen semakin tinggi. Hasil analisa stistik menunjukkan rendemen ekstrak daun mengkudu dengan rasio bahan – pelarut 1: 5 berbeda signifikan terhadap rasio bahan-pelarut 1:10 dan 1:20, sedangkan rasio bahan-pelarut 1:10 tidak berbeda signifikan dengan rasio bahan-pelarut 1:15. Perbedaan tidak signifikan antara rasio bahan-pelarut 1:10 dan 1: 20 disebabkan karena pada kondisi jumlah pelarut dinaikkan dalam jumlah tertentu terjadi kondisi setimbang atau jenuh sehingga pelarut di luar sel tidak dapat menarik senyawa di dalam sel sehingga rendemen akan relatif menjadi konstan (Ahmad *et al* 2008).

Ekstrak daun mengkudu selanjutnya dilakukan uji kualitatif untuk memastikan adanya senyawa flavonoid dalam ekstrak yang dihasilkan. Inti benzopiron flavonoid direduksi oleh serbuk Mg dan HCL pekat sehingga terbentuk garam flavilium yang berwarna merah atau jingga. Hasil uji kualitatif menunjukkan bahwa ekstrak daun mengkudu dengan berbagai perbandingan rasio bahan-pelarut menunjukkan hasil positif mengandung senyawa flavonoid. Perubahan warna hijau kehitaman pada ekstrak menjadi kuning jingga menunjukkan bahwa flavonoid dalam daun mengkudu merupakan golongan flavonol (Hanani 2015).

Uji kuantitatif senyawa flavonoid menggunakan larutan pereaksi aluminium klorida dan asam asetat dengan metode kolorimetri. Larutan baku yang digunakan adalah kuersetin. Senyawa kompleks akan terbentuk antara $AlCl_3$ dan gugus hidroksil pada atom C-2 atau C-5 dan gugus keto pada atom C-4 pada kuersetin, sehingga terbentuk warna larutan yang lebih kuning yang menunjukkan panjang gelombang bergeser ke arah *visible* (nampak) dan dapat dipertahankan menggunakan senyawa penstabil asam asetat (Chang *et al*, 2002). Hubungan konsentrasi dan absorbansi kuersetin dapat dilihat pada **Gambar 1**.

Tabel 1. Hasil Ekstraksi Daun Mengkudu dengan Berbagai Rasio Bahan dan Pelarut

Rasio Bahan - Pelarut	Parameter Kontrol Kualitas		
	Organoleptis	Rendemen (%)	Susut Pengeringan (%)
1:5 (A)	Ekstrak kental, hijau	12,89 ± 0,44 ^a	3,93 ± 0,12 ^a
1:10 (B)	kehitaman,	17,06 ± 0,83 ^b	1,66 ± 0,59 ^b
1: 20 (C)	khas daun mengkudu, pahit	17,25 ± 0,83 ^b	2,29 ± 0,51 ^b

Subscript berbeda $p < 0,05$



Hubungan konsentrasi dan absorbansi kuersetin yang dihasilkan memiliki nilai korelasi korelasi 0,999. Nilai korelasi mendekati 1 menunjukkan hubungan linearitas yang baik antara absorbansi dengan konsentrasi. Semakin besar konsentrasi, semakin besar absorbansi yang dihasilkan. Persamaan regresi linier yang diperoleh selanjutnya untuk menetapkan kadar flavonoid dalam sampel. Pada **Tabel 2** dapat dilihat kadar flavonoid ekstrak daun mengkudu.

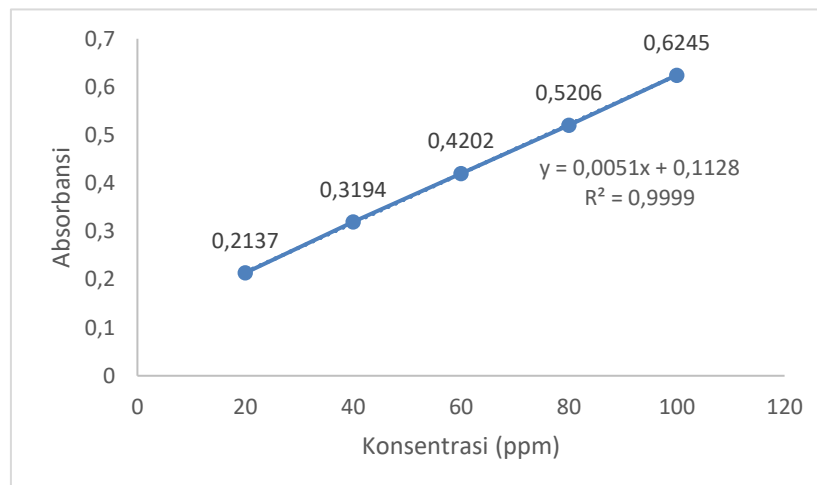
Tabel 2 menunjukkan rasio bahan – pelarut yang semakin tinggi menghasilkan kadar senyawa yang semakin besar. Hasil analisa statistik menunjukkan perbedaan rasio bahan dan pelarut berpengaruh bermakna pada kadar flavonoid yang dihasilkan. Kadar flavonoid tertinggi ditunjukkan dengan rasio bahan – pelarut 1:20. Hasil ini selaras dengan hasil rendemen yang diperoleh, yaitu rendemen tertinggi pada rasio bahan – pelarut 1: 20. Hasil ini menunjukkan semakin tinggi rendemen, semakin tinggi kadar senyawa yang terkandung.

Aktivitas penangkapan radikal bebas dievaluasi

menggunakan spektrofotometer UV-Vis dengan metode DPPH. DPPH merupakan senyawa radikal bebas. Prinsip pengujian dengan DPPH adalah reaksi penghilangan warna dari DPPH oleh senyawa antioksidan.

Ekstrak daun mengkudu dengan berbagai rasio bahan-pelarut mampu melunturkan warna ungu DPPH. Larutan DPPH berubah menjadi warna kuning yang menunjukkan ekstrak daun mengkudu mampu menangkap radikal bebas. Aktivitas penangkapan radikal bebas ekstrak daun mengkudu disebabkan adanya kandungan senyawa flavonoid. Flavonoid dapat menstabilkan *Reactive Oxygen Species* ROS karena mengandung gusus hidroksil (Panche *et al.* 2016).

Uji aktivitas penangkapan radikal bebas memiliki prinsip yaitu pengukuran absorbansi radikal bebas DPPH yang mengalami penurunan akibat penambahan senyawa antioksidan (Thangraj 2016). Larutan blanko yang digunakan adalah DPPH. Pada **Tabel 3** dapat dilihat aktivitas penangkapan radikal bebas ekstrak daun mengkudu.



Gambar 1. Hubungan Konsentrasi dan Absorbansi Larutan Kuersetin

Tabel 2. Kadar flavonoid Ekstrak Daun Mengkudu dengan Berbagai Perbandingan Rasio Bahan-Pelarut

Rasio Bahan – Pelarut	Kadar Flavonoid (mgKE/g ekstrak)
1:5	2,803 ± 0,063 ^a
1:10	3,621 ± 0,224 ^b
1:20	4,368 ± 0,224 ^c

Subscript berbeda $p < 0,05$



Tabel 3. Aktivitas Penangkapan Radikal Bebas Ekstrak Daun Mengkudu dengan Berbagai Perbandingan Rasio Bahan-Pelarut

Rasio Bahan-Pelarut	Rata-Rata Aktivitas Penangkapan Radikal Bebas
1:5	7,11 ± 0,32 ^a
1:10	11,50 ± 0,35 ^b
1:20	14,87 ± 0,34 ^c

Subscript berbeda $p < 0,05$

Rasio bahan – pelarut yang semakin tinggi menghasilkan aktivitas penangkapan radikal bebas semakin tinggi juga. Analisa statistik menunjukkan bahwa perbedaan rasio bahan – pelarut memiliki pengaruh bermakna terhadap aktivitas penangkapan radikal bebas, dengan hasil tertinggi ditunjukkan pada rasio bahan – pelarut 1 : 20. Hasil ini selaras dengan hasil rendemen dan kadar senyawa yang dihasilkan. Rasio bahan – pelarut 1:20 menghasilkan rendemen dan kadar senyawa yang paling tinggi. Flavonoid yang mengandung gugus hidroksil dapat menetralkan radikal bebas dengan pengikatan radikal bebas dan atau dengan mengkhelat ion logam. Khelasi logam dapat mencegah generasi radikal yang merusak biomolekul target (Kumar dan Pandey, 2013). Semakin tinggi kadar senyawa flavonoid dalam ekstrak maka semakin besar aktivitas penangkapan radikal bebas (Hardiningtyas *et al* 2014). Hal ini menunjukkan bahwa adanya korelasi antara jumlah rendemen ekstrak, kadar total senyawa dan aktivitas yang dihasilkan.

SIMPULAN

Perbedaan rasio bahan – pelarut dalam proses ekstraksi daun mengkudu berpengaruh bermakna pada kadar flavonoid dan aktivitas penangkapan radikal bebas yang dihasilkan, terdapat korelasi antara kadar senyawa dan aktivitas yang dihasilkan. Rasio bahan pelarut tertinggi 1:20 menghasilkan kadar flavonoid dan aktivitas penangkapan radikal bebas tertinggi dibandingkan rasio bahan-pelarut lainnya.

DAFTAR PUSTAKA

- Afandi, Mochammad 2013. Aplikasi Pakan Komersil Yang Disubstitusikan Tepung Silase Daun Mengkudu Dengan Inokulan Khamir Laut Sebagai Pakan Ikan Sidat (*Anguilla bicolor*). [Skripsi]. Surabaya: Fakultas Teknik dan Ilmu Kelautan, Universitas Hang Tuah.
- Ahmad AL, CY Chan, SRA Shukor and MD Mashitah. 2008. Recovery of oil and carotenes from palm oil Mill. effluent. *Chemical Engineering Journal*. 141: 383-386.
- Boontha S, Chumchuensanoi A, Charachit W, Deepaen C, Jareontanakul C, 2016, Comparative Evaluation on Rutin Content, Radical Scavenging Activity and Propoerties of Tablet Prepared from Noni Leaf and Fruit Extracts, *International Journal of Science*.13 (1) : 17-25
- Chang C C, Yang, M H, Chern, J C. 2002. Estimation of Total Flavonoid Content in Propolis by Two Complementary Colorimetric Methods. *Journal of Food and Drug Analysis*. 10: 178-182
- Dewi, Shinta R, Ulya, Nailly, dan Argo, Bambang D. 2018. Kandungan Flavonoid dan Aktivitas Antioksidan Ekstrak *Pleurotus ostreatus*. *Jurnal Rona Teknik Pertanian*. 11(1):1-11
- Haider K, Haider M R, Neha K, Yas M S, 2020, Free Radical Scavenger: An Overview on Heterocyclic Advances and Medicinal Prospects, *European Journal of Medicinal Chemistry*, Vol. 201.
- Halliwell B dan Gutteridge, J M C. 2000. *Free Radical in Biology and Medicine*. Oxford University Press. New York.
- Hanani E, 2015. *Analisis Fitokimia*. Buku Kedokteran EGC. Jakarta.
- Hardiningtyas S, D, Purwaningsih, S, Handharyani, E, 2014, Aktivitas Antioksidan dan Efek Hepatoprotektif Daun Bakau Api-api Putih, *JPHPI*, 17 (1):80-91.
- Kataoka H, 2019, *Pharmaceutical Analysis: Sample Preparation*, Encyclopedia of Analytical Science, Third Edition: 107-116
- Kumar S, Pandey A K, 2013, Chemistry and Biological Activities of Flavonoids: An Overview, *The Scientific World Journal*, Volume 2013, Hindawi Publishing Corporasion, India
- Panche A N, Diwan A D, Chandra S R, 2016, Flavonoid: An Overviwe, *J. Nutr Sci*. 5(47):1-15
- Ramayani S L, Permatasari, E A, Novitasari, I, Maryana, 2021, Pengaruh Metode Ekstraksi Terhadap Kadar Total Fenolik, Kadar flavonoid dan Aktivitas Antioksidan Ekstrak Daun Mengkudu (*Morinda citrifolia* (L.)), *Jurnal Ilmu Farmasi dan Farmasi Klinik (JIFKK)*, 18(1), 40-46



- Rohman A, Riyanto, S, Hidayati, N, K, 2007, Aktivitas Antioksidan, Kandungan Fenolik Total dan Flavonoid Total Daun Mengkudu, *Agritech*, 27 (4):147-151
- Sabtu R, Awang M A, Hairon H, Talib N A, Aziz R, Suan C L dan Taher Z M, 2016, Extraction of Piper Sarmentosum Leaves (Kadok): Effect of Particle Sizes, Raw Material to Solvent Ratio and Time on Yield of Extract, *6th International Conference on Biotechnology for The Wellness Industry*, Malaysia: Institute of Bioproduct Development, Faculty of Chemical and Energy Engineering, Universiti Teknologi Malaysia
- Setyani, W, Setyowati, H, 2018, Phytochemical investigation of noni (*Morinda citrifolia* L) leaves extract applicated for sunscreen product, *Malaysian Journal of Fundamental and Applied Sciences*, 164-167.
- Tambun R, Alexander V, Ginting Y, 2021, Performance comparison of maceration method, soxhletation method, and microwave -assisted extraction in extracting active compounds from soursop leaves (*Annona muricata*): A review, *IOP Conference Series: Material Science and Engineering* 1122 : 012095
- Thangraj P. 2016. *Pharmacologycal Assay of Plant-Based Natural Products*. Springer International Publisher. Switzerland.
- Zin, Z M, Hamid A A, Osman A, Saari N, Misran A, 2007, Isolation and Identification of Antioxidative Compound from Fruit of Mengkudu (*Morinda citrifolia* L.), *International Journal of Food Properties*, 10:2, 363-373

