

AUTENTIKASI AKTIVITAS ANTIOKSIDAN EKSTRAK ETANOL DAUN MENGKUDU (*Morinda citrifolia* L.) BERDASARKAN ELEVASI TEMPAT TUMBUH DI KABUPATEN PEMALANG

Muhammad Yogi Risnandar
Prodi Farmasi, STIKES Muhammadiyah Pekajangan Pekalongan
Email: myogirisnandar06@gmail.com

Abstract

Growth place elevation is affecting the secondary metabolite content on tree. The aim of this research is to authenticate differences of antioxidant activity from noni leaves (*Morinda Citrifolia* L.) ethanolic extract based on it. Antioxidant activity has been tested by DPPH method. The result showed that three ethanolic extract of it different IC_{50} by significant value $p < 0.05$. The value of IC_{50} successively ranges from 0-500 mdpl (Ulujami), 500-1000 mdpl (Randudongkal), and >1000 mdpl (Belik) were 591.19 ± 2.65 ($\mu\text{g} / \text{mL}$), 451.54 ± 10.77 ($\mu\text{g} / \text{mL}$), and 292.47 ± 2.85 ($\mu\text{g} / \text{mL}$) but lower when compared with IC_{50} vitamin C value of 9.79 ± 0.03 ($\mu\text{g} / \text{mL}$). The value of total phenol were for their 28.5 ± 1.0 (Ulujami), 39.5 ± 1.0 (Randudongkal), 75.83 ± 0.58 mg GAE/g extract (Belik). While value of total flavonoid are 18.97 ± 0.02 (Ulujami), 22.81 ± 0.02 (Randudongkal), and 31.04 ± 0.07 mg QE/g extract (Belik).

Keyword: Antioxidant, Noni Leaves, DPPH, Total Phenol, Total Flavonoid.

1. PENDAHULUAN

Dunia kesehatan banyak membicarakan tentang radikal bebas dan antioksidan. Dikarenakan sebagian besar terjadinya penyakit disebabkan oleh reaksi oksidasi di dalam tubuh yang berlebihan. Radikal bebas dapat menyebabkan gangguan fungsi sel, kerusakan struktur sel, molekul termodifikasi yang tidak bisa dideteksi oleh sistem imun, dan bahkan mutasi. Semua bentuk gangguan tersebut dapat memicu timbulnya berbagai penyakit (Winarsi, 2007). Akan tetapi gangguan-gangguan tersebut dapat dihambat dengan senyawa antioksidan. Antioksidan merupakan suatu senyawa yang dapat menghambat reaksi negatif dari radikal bebas didalam tubuh dengan cara mendonorkan satu elektronnya.

Antioksidan dapat diperoleh secara alami maupun sintesis. Antioksidan alami dapat diperoleh dari berbagai tanaman dan biasanya senyawa yang berpotensi sebagai antioksidan pada umumnya berupa senyawa fenolik, Flavonoid, alkaloid, steroid, dan senyawa golongan polifenolik. (Nurjanah dkk., 2011; Ramle dkk., 2008). Antioksidan sintesis yang berupa BHA (*butyl hidroxy anisol*), BHT (*butyl hidroxy toluene*), PG (*propil galat*), dan TBHQ (*tert-butyl hidroquinon*) mempunyai efektifitas yang tinggi, namun kurang aman bagi kesehatan sehingga penggunaannya diawasi dengan ketat diberbagai Negara. Oleh karena itu, perlu dicari sumber antioksidan alami yang lebih aman dari pada antioksidan sintetis untuk

dikembangkan misalnya antioksidan yang berasal dari rempah-rempah, buah, atau tanaman (Pujimulyani, 2003).

Mengkudu (*Morinda citrifolia* L.) adalah salah satu tanaman yang memiliki banyak manfaat untuk pengobatan dan juga memiliki khasiat sebagai antioksidan. Berdasarkan literatur yang ada bahwa daun mengkudu (*Morinda citrifolia* L.) mengandung senyawa polifenol, alkaloid dan flavonoid (Hidayati dkk., 2007). Mengkudu biasanya tumbuh secara liar dan berbuah sepanjang tahun. Mengkudu tumbuh pada tanah yang berkapur tanpa tergantung pada keadaan tanah. Di Jawa tumbuh pada daerah dengan elevasi 1-1500 mdpl, tetapi dapat ditanam pada daerah dengan elevasi lebih dari 1500 mdpl, pada umumnya dekat pantai, batuan (*limestone*), dan secara lokal melimpah.

Metabolit sekunder merupakan hasil dari tanaman yang khas dan dijumpai sebagai terpenoid, glikosida (seroid dan fenolik), dan alkaloid. Metabolit sekunder yang terdapat pada suatu tanaman dapat dipengaruhi oleh faktor dalam dan faktor luar : Faktor dalam, meliputi: genetik, morfologi, mutasi, poliploidi, pengaruh hibridisasi, dan pengaruh mikrobial. Faktor luar, meliputi: iklim dan cahaya matahari, pengaruh tinggi tempat, nutrisi, umur tumbuhan, dan parasite (Pratiwi, 2012). Pengaruh tinggi tempat merupakan salah satu faktor luar yang mempengaruhi kualitas dari kandungan metabolit sekunder. Metabolit sekunder yang terkandung pada daun mengkudu

memiliki fungsi sebagai antioksidan. Dalam penelitian akan dilakukan uji total fenol, total flavonoid dan uji aktivitas antioksidan dari daun mengkudu (*Morinda citrifolia* L.) yang diperoleh berdasarkan perbedaan elevasi tempat tumbuh yang bertujuan untuk membuktikan apakah terdapat perbedaan aktivitas antioksidan daun mengkudu (*Morinda citrifolia* L.) yang diperoleh berdasarkan perbedaan elevasi tempat tumbuh dengan menggunakan metode penangkapan radikal bebas DPPH.

2. METODE PENELITIAN

A. Alat dan bahan

Alat yang digunakan adalah neraca analitik (OHAUS), bejana maserasi, kertas saring, gelas beaker, gelas ukur, tabung reaksi, labu ukur, corong kaca, kaca arloji, spatula, mikropipet, pipet volume, *rotary evaporator*, cawan porselen, oven, incubator, dan *spektrofotometer UV-Vis*.

Bahan bahan yang digunakan adalah daun mengkudu, serbuk DPPH (*1,1-diphenyl-2-picrylhydrazyl*), etanol 96%, methanol p.a, aquades, serbuk vitamin C, serbuk magnesium, asam klorida, asam galat, Na_2CO_3 , kuersetin, AlCl_3 , natrium asetat, pereaksi meyer, pereaksi dragendorff, follin-ciocalteu, dan besi (III) klorida.

B. Preparasi Sampel

Sampel yang digunakan adalah daun mengkudu yang diperoleh berdasarkan perbedaan elevasi

tempat yaitu elevasi 0-500 mdpl (Ulujam), 500-1000 mdpl (Randudongkal), dan >1000 mdpl (Belik) masing masing dipetik sebanyak 2 kg. sampel disortasi basah, dicuci, dirajang, dikeringkan dengan cara dijemur dibawah sinar matahari dengan ditutupi kain hitam diatasnya selama kurang lebih 7 hari. Disortasi kering, kemudian dihaluskan dengan diblender, lalu disaring dengan ayakan mesh 40 untuk mendapatkan serbuknya.

C. Ekstraksi

Ditimbang sebanyak 200 g sampel daun mengkudu masing-masing dimaserasi dengan etanol 96% sebanyak 1200 mL selama 5 hari setiap harinya dilakukan pengadukan 1 jam sekali. Maserat yang didapatkan kemudian disaring hingga diperoleh filtrat 1. Residunya disari kembali dengan etanol 96% sebanyak 600 ml selama tiga hari lalu disaring dan diperoleh filtrat 2. Filtrat 1 dan filtrat 2 dicampurkan jadi satu lalu diuapkan menggunakan *rotary evaporator* pada suhu 60⁰ C dan dilanjutkan pengentalan ekstrak menggunakan oven pada suhu 50⁰C hingga menghasilkan ekstrak kental. Perlakuan untuk semua sampel daun mengkudu sama.

D. Penapisan fitokimia

a. Flavonoid

Ditimbang sebanyak 0,5 g ekstrak ditambahkan serbuk magnesium 0,1 mg dan 0,4 mL amil alkohol (campuran asam klorida 37 % dan etanol 96%

dengan volume yang sama) dan 4 mL alkohol setelah itu campuran dikocok.

b. Fenol

Sejumlah 1 gram ekstrak dilarutkan dengan 6 ml etanol 96%. Diambil sejumlah 1 ml filtrat setelah itu ditambahkan 2 tetes larutan FeCl₃ 5%.

c. Saponin

Sejumlah 0,5 gram ekstrak daun mengkudu dimasukkan ke dalam tabung reaksi, ditambahkan 10 ml air panas, didinginkan dan kemudian dikocok kuat-kuat selama 10 detik.

d. Alkaloid

Sejumlah 0,5 gram ekstrak daun mengkudu ditambahkan 1 ml asam klorida 2N dan 9 ml aquades, dipanaskan di atas penangas air selama 2 menit, didinginkan dan disaring. Filtrat yang diperoleh digunakan untuk uji alkaloid. Diambil sejumlah 2 tabung reaksi, lalu masing-masing dimasukkan 0,5 ml filtrat. Pada masing-masing tabung reaksi ditambahkan 2 tetes pereaksi Mayer, dan Dragendorff.

e. Tannin

Ditimbang Sejumlah 1 gram ekstrak daun mengkudu dididihkan selama 3 menit dalam 10 ml aquades lalu didinginkan dan disaring. Filtrat diencerkan sampai hampir tidak berwarna, lalu ditambahkan 1-2 tetes pereaksi besi (III) klorida.

E. Uji total fenol

Kurva baku asam galat dibuat dengan cara menimbang 50 mg asam galat, dilarutkan dalam etanol sampai volume akhir 50 mL, kemudian dibuat varian konsentrasi 25, 50, 100, 150, 200, 300 µg/mL. Dari masing-masing konsentrasi larutan asam galat dipipet 0,2 mL lalu ditambah 15,8 mL aquades dan 1 mL Reagen Folin-Ciocalteu dan dikocok sampai homogen serta didiamkan selama 8 menit. Ditambahkan 3 mL larutan Na₂CO₃ 10% lalu dikocok homogen, dan selanjutnya didiamkan selama 2 jam pada suhu kamar. Ukur serapan pada panjang gelombang serapan maksimum 765 nm, lalu dibuat kurva kalibrasi hubungan antara konsentrasi asam galat (µg/mL) dengan serapan.

Sebanyak 100 mg ekstrak dilarutkan sampai 10 mL dengan etanol 96% sehingga diperoleh konsentrasi 10 mg/mL. Dari konsentrasi 10 mg/mL dipipet 1 mL dan diencerkan dengan aquades hingga 10 mL dan diperoleh konsentrasi ekstrak 1 mg/mL. Dipipet 0,2 mL ekstrak, ditambahkan 15,8 mL aquades dan 1 mL reagen Folin-Ciocalteu lalu dikocok. Didiamkan selama 8 menit kemudian ditambahkan 3 mL Na₂CO₃ 10% ke dalam campuran. Didiamkan larutan selama 2 jam pada suhu kamar. Diukur serapannya dengan spektrofotometer UV-Vis pada panjang gelombang serapan

maksimum 768 nm (Marjoni dkk., 2015).

F. Uji total flavonoid

Sebanyak 10 mg kuersetin sebagai pembanding ditimbang dan dilarutkan dalam 100 mL metanol sebagai larutan stok. Selanjutnya kuersetin dibuat pengenceran dengan konsentrasi 10, 20, 30, 40, 50 µg/mL sebagai larutan kuersetin pembanding. Sebanyak 0,5 mL larutan kuersetin diencerkan dengan 1,5 mL metanol lalu ditambahkan 0,1 mL aluminium (III) klorida 10%, 0,1 mL Natrium asetat 1 M dan 2,8 mL aquadest. Selesai diinkubasi selama 30 menit dengan suhu 25°C, absorbansi dari larutan pembanding diukur menggunakan spektroskopi UV sinar tampak dengan panjang gelombang 436 nm. Absorbansi yang diperoleh dari masing-masing larutan pembanding, dibuat kurva kalibrasi dan diperoleh regresi persamaan linier.

Ditimbang sebanyak 20 mg sampel lalu dilarutkan pada 10 mL etanol hingga diperoleh konsentrasi 2000 µg/mL. Sebanyak 0,5 mL sampel uji ditambahkan 1,5 mL metanol, lalu ditambahkan 0,1 mL aluminium (III) klorida 10%, 0,1 mL natrium asetat 1 M, dan 2,8 mL aquadest. Diinkubasi pada suhu 25°C selama 30 menit, absorbansi diukur dengan menggunakan spektrofotometer UV-Vis pada panjang gelombang maksimum (Salmia, 2016).

G. Uji aktivitas antioksidan

a. Pembuatan larutan stok DPPH

Ditimbang sebanyak 2.5 mg DPPH lalu dilarutkan dalam 25 mL etanol 96% hingga diperoleh konsentrasi sebesar 100 µg/mL.

b. Pemuatan Larutan blanko

Etanol 96% dipipet sebanyak 3 mL lalu dimasukkan dalam tabung reaksi dan ditambahkan 1,0 mL larutan DPPH kemudian dikocok hingga homogen, diinkubasi pada suhu 37°C selama 30 menit setelah itu diukur absorbansinya pada panjang gelombang maksimum. Skinning panjang gelombang dilakukan dengan menggunakan larutan blanko pada rentang panjang gelombang 500-600 nm.

c. Pengujian sampel

Ditimbang sebanyak 25 mg ekstrak lalu dilarutkan dalam 25 mL etanol 96% hingga diperoleh konsentrasi 1000 µg/mL. Dilakukan pengenceran pada larutan tersebut hingga diperoleh larutan dengan konsentrasi, 25 µg/mL, 50 µg/mL, 75 µg/mL dan 100 µg/mL. sebanyak 1 mL masing-masing larutan konsentrasi sampel tersebut lalu dimasukan dalam tabung reaksi kemudian ditambah 1 mL DPPH 100 µg/mL dan diencerkan dengan 2 mL etanol 96%. Larutan dihomogenkan, kemudian diinkubasi pada suhu 37°C selama 30 menit. Masing-masing larutan tersebut diukur absorbansinya pada panjang

gelombang maksimum. Pengujian pembandingan vitamin C dilakukan dengan prosedur yang sama hanya saja varian konsentrasi yang digunakan 2,5 µg/mL, 5 µg/mL, 7,5 µg/mL, dan 10 µg/mL (Syaifuddin, 2015).

Data hasil absorbansi dari masing-masing sampel digunakan untuk mencari % inhibisinya. Berikut adalah rumus untuk mencari % inhibisi:

$$\% \text{ Inhibisi} = \frac{A_{\text{blanko}} - A_{\text{sampel}}}{A_{\text{blanko}}} \times 100\%$$

Keterangan:

A blanko = Absorbansi pada DPPH tanpa sampel (blanko).

A sampel = Absorbansi pada DPPH setelah ditambah sampel.

Setelah presentase inhibisi didapatkan dari masing-masing konsentrasi pada sampel, hasil perhitungan dimasukkan ke dalam persamaan linier dengan persamaan : $Y = ax + b$.

Keterangan:

Y = % Inhibisi, x= Konsentrasi (µg/ml) a = Gradien, b = Konstanta

Persamaan linier yang diperoleh digunakan untuk menghasilkan nilai %IC₅₀. Aktivitas antioksidan dinyatakan dalam inhibition concentration 50% atau IC₅₀ yaitu peredaman radikal DPPH oleh konsentrasi sampel sebanyak 50%. Nilai %IC₅₀ merupakan konsentrasi yang didapatkan pada saat % inhibisi sebesar 50 dari persamaan $Y = ax + b$. Pada saat % Inhibisi = 50, maka rumus untuk menghitung nilai %IC₅₀ persamaannya menjadi: $50 = ax + b$,

dimana Harga x adalah %IC₅₀ dengan satuan µg/ml.

3. HASIL DAN PEMBAHASAN

Preparasi sampel adalah prosedur awal yang dilakukan dalam penelitian ini. Daun mengkudu (*Morinda citrifolia* L.) yang digunakan berasal dari tiga tempat yang berbeda. Dipetik berdasarkan perbedaan rentang elevasi tempat tumbuh, yaitu : pada rentang elevasi 0-500 mdpl diperoleh di Kecamatan Ulujami (UL), pada rentang elevasi 500-1000 mdpl diperoleh di Kecamatan Randudongkal (RD), dan pada rentang lebih dari 1000 mdpl diperoleh di Kecamatan Belik (BL), Kabupaten Pematang Jaya.

Sebanyak 200 g sampel diekstraksi menggunakan metode maserasi pelarut yang digunakan adalah etanol 96%. Etanol 96% digunakan karena merupakan pelarut polar, sehingga dapat menarik senyawa yang bersifat polar. Dasar lain dari pemilihan pelarut yaitu, kemudahan dalam penggunaan, efisien, selektivitas dan penerapan yang luas (Dai dan Mumper, 2010). Menurut Schirmer, (1990) Etanol 96% memiliki indeks polaritas 5,2 sehingga dapat menarik senyawa-senyawa fenolik yang cenderung polar seperti teori like dissolve like menurut Wagner, (2013), dimana senyawa yang memiliki sifat polar cenderung akan menarik senyawa yang bersifat polar pula, begitu juga sebaliknya. Selain itu kelebihan dari etanol 96% yaitu aman bagi lingkungan, dan dapat mencegah pertumbuhan kapang pada konsentrasi lebih dari 20%.

Hasil yang didapatkan dari proses maserasi selanjutnya disaring menggunakan kain *flannel* yang bertujuan untuk memisahkan filtrat dengan ampasnya. Kemudian ampas diambil dan dimaserasi lagi dengan 600 mL etanol 96% selama 3 hari. Filtrat I dan filtrat II yang diperoleh dijadikan satu dan dipekatkan dengan menggunakan alat *rotary evaporator* pada suhu 60°C, selanjutnya diuapkan lagi dengan menggunakan oven dengan suhu 50°C. Tujuan dari penguapan ini untuk menghilangkan pelarut etanol 96% yang masih terdapat dalam ekstrak sehingga dihasilkan ekstrak kental.

Ekstrak tersebut diuji penapisan fitokimianya yang bertujuan untuk mengidentifikasi senyawa aktif yang ada pada suatu sampel. Penapisan dilakukan pada masing-masing ekstrak etanol daun mengkudu yang diperoleh di elevasi 0-500 mdpl Ulujami (UL), 500-1000 mdpl Randudongkal (RD), dan lebih dari 1000 mdpl Belik (BL). Hasil uji penapisan fitokimia ekstrak dapat dilihat pada tabel 3.1

Tabel 3.1 Hasil penapisan fitokimia ekstrak etanol daun mengkudu (UL, RD, dan BL).

Senyawa	UL	RD	BL
Fenol	+	+	+
Tanin	+	+	+
Flavonoid	+	+	+
Alkaloid	+	+	+
Saponin	+	+	+

Keterangan : + (Terdeteksi), - (Tidak terdeteksi).

Penetapan kandungan total fenolik menggunakan metode folin-ciocalteu.

Prinsip dari reaksi metode ciocalteu adalah oksidasi-reduksi dalam suasana basa menggunakan reagen folin ciocalteu dan natrium karbonat. Asam fosfomolibdat-fosfotungstate akan direduksi oleh ion fenolat dalam reagen folin-ciocalteu selama proses oksidasi fenol menjadi senyawa kompleks molybdenum-tungsten berwarna biru yang diukur menggunakan spektrofotometri visibel terhadap panjang gelombang maksimum. Melalui disosiasi proton dalam suasana basa akan membentuk Ion fenolat yang didapatkan dari senyawa alkali yaitu dengan penambahan natrium karbonat (Haci dkk., 2009).

Penentuan persamaan regresi linier terlebih dahulu dilakukan pembuatan kurva baku asam galat yang selanjutnya digunakan untuk menentukan jumlah kandungan total fenol terhadap sampel. Pembuatan kurva kalibrasi asam galat dilakukan dengan mengukur serapan yang diberikan oleh larutan uji dengan menggunakan variasi konsentrasi 25, 50, 100, 150, 200 dan 300 µg/mL pada panjang gelombang maksimum. Panjang gelombang maksimum yang diperoleh yaitu 760 nm. Persamaan linier yang didapatkan adalah $y = 0.001x + 0.0895$ dengan linieritas sebesar 0.9977. Penentuan kandungan total fenol pada setiap sampel ekstrak etanol daun mengkudu (*Morinda citrifolia* L.) dilakukan pengukuran absorbansi terhadap setiap sampel pada panjang gelombang maksimum. Absorbansi yang diperoleh pada setiap sampel selanjutnya dimasukkan dalam persamaan regresi

linier yang sudah diperoleh. Hasil total fenol dapat dilihat pada tabel 3.2.

Tabel 3.2 Kandungan total fenol ekstrak etanol daun mengkudu (UL, RD, dan BL)

Wilayah pengambilan	$\bar{x}$ Total Fenol (mg GAE/g ekstrak)
UL	28.5 ± 1.0
RD	39.5±1.0
BL	75.83±0.58

Hasil uji total fenol seperti yang terdapat pada tabel 3.2 diketahui bahwa sampel dengan kandungan total fenol tertinggi adalah ekstrak etanol daun mengkudu yang terdapat pada elevasi lebih dari 1000 mdpl di Belik, diikuti pada elevasi 500-1000 mdpl di Randudongkal dan 0-500 mdpl di Ulujami.

Penetapan kandungan total flavonoid ditentukan berdasarkan metode kolorimetri. Menurut Sari dan Ayuchecaria (2017) bahwa penambahan pereaksi berupa $AlCl_3$ berfungsi untuk membentuk reaksi antara $AlCl_3$ dengan golongan flavonoid membentuk kompleks antara gugus hidroksil dan keton yang bertetangga atau dengan gugus hidroksil yang saling bertetangga. $AlCl_3$ akan bereaksi dengan gugus keton pada C-4 dan gugus OH pada C-3 atau C-5 pada senyawa flavon atau flavonol membentuk senyawa kompleks yang stabil berwarna kuning. Pembandingan yang digunakan adalah kuersetin. Pemilihan kuersetin sebagai standar disebabkan karena kuersetin adalah flavonoid golongan flavonol. Mempunyai gugus keto yang terletak

pada atom C-4 dan juga gugus hidroksil pada atom C-3 dan C-5 yang bertetangga (Azizah, dkk., 2014). Warna yang dihasilkan dari larutan standar kuersetin adalah kuning. Semakin besar konsentrasi kuersetin yang digunakan semakin pekat warna kuning yang didapatkan.

Pembuatan kurva kalibrasi kuersetin dilakukan dengan mengukur serapan yang diberikan oleh larutan uji dengan konsentrasi 10, 20, 30, 40, dan 50 µg/mL pada panjang gelombang maksimum. Panjang gelombang maksimum yang didapatkan adalah 437.9 nm. Persamaan regresi linier yang didapatkan dalam penentuan kandungan total flavonoid adalah $y = 0.0138x + 0.0231$ dengan linieritas sebesar 0.9991.

Penetapan kandungan total flavonoid pada ekstrak etanol daun mengkudu (*Morinda citrifoli* L.) dilakukan dengan mengukur absorbansi pada setiap sampel. Absorbansi yang diperoleh pada setiap sampel selanjutnya dimasukkan kedalam persamaan regresi linier yang telah diperoleh.

Tabel 3.3 Kandungan total flavonoid ekstrak etanol daun mengkudu (UL, RD, dan BL)

Wilayah pengambilan	$\bar{x}$ Total Flavonoid (mg QE/g ekstrak)
UL	18.97±0.02
RD	22.81±0.02
BL	31.04±0.07

Hasil uji total flavonoid seperti yang terdapat pada tabel 3.3 diketahui bahwa sampel dengan kandungan total

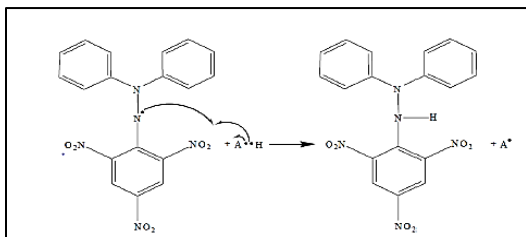
flavonoid tertinggi adalah ekstrak etanol daun mengkudu yang terdapat pada elevasi lebih dari 1000 mdpl di Belik, diikuti pada elevasi 500-1000 mdpl di Randudongkal dan 0-500 mdpl di Ulujami.

Penentuan aktivitas antioksidan ekstrak etanol daun mengkudu (*Morinda citrifoli* L.) dilakukan dengan menggunakan metode DPPH (1,1-diphenyl-2-picrylhydrazyl). Metode ini merupakan metode yang relatif cepat, mudah, sederhana, dan hanya memerlukan sedikit sampel serta tidak membutuhkan biaya yang tinggi dalam menentukan kemampuan antioksidan menggunakan radikal bebas DPPH (1,1-diphenyl-2-picrylhydrazyl). Analisis dari DPPH (1,1-diphenyl-2-picrylhydrazyl) digunakan sebagai uji dalam mencari kemampuan menangkap radikal suatu senyawa dalam ekstrak tumbuhan. DPPH (1,1-diphenyl-2-picrylhydrazyl) memiliki komponen yang berwarna ungu yang tidak berdimerisasi dan berbentuk kristalin.

Prinsip metode DPPH yaitu pengurangan intensitas warna DPPH karena berkurangnya jumlah DPPH yang bereaksi dengan sampel menjadi DPPH-H. Antioksidan akan bekerja menghambat radikal bebas dengan cara mendonorkan atom hydrogen yang dimilikinya sehingga radikal DPPH menjadi tereduksi.

Larutan blanko digunakan untuk pengukuran panjang gelombang maksimum yaitu larutan DPPH yang dilarutkan dengan etanol 96% bertujuan untuk mendapatkan serapan DPPH

terhadap panjang gelombang maksimum. *Scanning* dalam menentukan panjang gelombang maksimum dilakukan pada panjang gelombang visible antara 400-800 nm. Penentuan panjang gelombang diperoleh hasil panjang gelombang 516,5 nm.



Gambar 3.1 Reaksi radikal DPPH dengan antioksidan (Sayuti & Yenrina, 2015)

Vitamin C digunakan sebagai pembanding karena vitamin C merupakan produk antioksidan yang sering dijumpai dan sering digunakan oleh masyarakat. Selain itu vitamin C juga memiliki gugus pendonor elektron. Gugus tersebut terletak pada atom C₂ dan C₃, adanya gugus ini memungkinkan vitamin C untuk menangkap radikal bebas DPPH.

Tabel 3.4 Nilai IC₅₀ ekstrak etanol daun mengkudu (UL, RD, dan BL) dan Vitamin C

Wilayah pengambilan	IC ₅₀ (µg/mL)
UL	591.19 ± 2.65
RD	451.54 ± 10.77
BL	292.47 ± 2.85
Vitamin C	9.79 ± 0.03

Hasil uji aktivitas antioksidan seperti yang terdapat pada tabel 3.4 diketahui bahwa ekstrak yang memiliki aktivitas

antioksidan tertinggi adalah ekstrak etanol daun mengkudu yang diperoleh dari elevasi lebih dari 1000 mdpl (BL), diikuti oleh ekstrak etanol daun mengkudu yang diperoleh dari elevasi 500-1000 mdpl (RD), dan ekstrak etanol daun mengkudu yang diperoleh dari elevasi 0-500 mdpl (UL). Namun aktivitas antioksidan ekstrak etanol daun mengkudu yang diperoleh dari elevasi lebih dari 1000 mdpl masih lebih rendah jika dibandingkan dengan pembanding Vitamin C.

Suatu senyawa dapat dikatakan sebagai antioksidan sangat kuat apabila nilai IC₅₀ kurang dari 50 µg/ml, kuat apabila nilai IC₅₀ antara 50-100 µg/ml, sedang apabila nilai IC₅₀ berkisar antara 100-150 µg/ml, lemah jika nilai IC₅₀ berkisar antara 150-200 µg/ml dan sangat lemah jika nilai IC₅₀ lebih dari 200 µg/ml (Septiana, 2017). Melihat dari batasan ini maka dapat dinyatakan bahwa vitamin C mempunyai aktivitas antioksidan yang sangat kuat. Ekstrak etanol daun mengkudu dari semua elevasi tempat tumbuh mempunyai aktivitas antioksidan yang sangat lemah.

Perbedaan hasil dari nilai IC₅₀ ekstrak etanol daun mengkudu semua elevasi dan vitamin C dianalisa secara statistic menggunakan uji ANOVA satu jalur. Hasil uji ANOVA menunjukkan bahwa nilai IC₅₀ antara ekstrak etanol daun mengkudu yang diperoleh dari semua elevasi tempat tumbuh dan vitamin C memiliki nilai signifikansi (*p-value*) 0.000. artinya nilai *p-value* <0.05, sehingga dapat dikatakan bahwa sampel berbeda secara signifikan.

Penetapan kandungan total fenol dan total flavonoid bertujuan untuk mengetahui korelasi antara aktivitas antioksidan dengan kandungan total fenol dan flavonoid ekstrak etanol daun mengkudu (*Morinda citrifoli* L.). Penetapan kandungan senyawa total fenol dan total flavonoid adalah dasar dilakukannya penelitian aktivitas antioksidan, karena diketahui bahwa senyawa fenol berperan dalam mencegah terjadinya reaksi oksidasi.

Dari hasil penelitian dapat diketahui bahwa semakin tinggi nilai total fenol dan nilai total flavonoidnya maka semakin kuat kapasitas antioksidannya. Berdasarkan referensi yang ada juga menyatakan hal yang sama, yaitu terdapat korelasi yang kuat antara total fenol dan kapasitas, antara lain penelitian yang dilakukan oleh Perwiratami dkk. (2014).

Pada penelitian ini, terdapat perbedaan aktivitas antioksidan yang signifikan dari ketiga ekstrak etanol daun mengkudu yang diperoleh berdasarkan elevasi tempat tumbuh. Hasil tersebut sesuai dengan pendapat Karamoy (2009) bahwa pengaruh utama dari ketinggian tempat berkaitan dengan proses metabolisme tanaman, seperti proses biokimia dan sintesis senyawa metabolit sekunder. Hal tersebut dapat mempengaruhi karakter morfologi, pertumbuhan, ataupun kandungan zat aktif terhadap suatu tanaman.

Sedangkan semakin rendah elevasi tempat, intensitas cahaya matahari dan suhu semakin tinggi maka kandungan antioksidan teroksidasi sehingga

kandungan antioksidan mengkudu (*Morinda citrifoli* L.) pada elevasi 0-500 mdpl tersisa sedikit dibandingkan elevasi 500-1000 mdpl, dan elevasi >1000 mdpl. Hal ini sesuai dengan pendapat Fatchurrozaq dkk. (2013) yang menyatakan bahwa semakin rendah ketinggian tempat, intensitas sinar matahari dan temperatur semakin tinggi maka vitamin C semakin mudah teroksidasi.

Daun mengkudu (*Morinda citrifoli* L.) yang tumbuh pada elevasi berbeda memberikan hasil kandungan antioksidan yang berbeda pula. Hal ini seperti pendapat Fitter dan Hay (1990) bahwa pertumbuhan dan metabolisme suatu tanaman dipengaruhi oleh temperatur lingkungan, dan temperatur lingkungan tergantung pada elevasi diatas permukaan tanah.

4. SIMPULAN

Dari penelitian yang telah dilakukan dapat disimpulkan bahwa:

1. Aktivitas antioksidan ekstrak etanol daun mengkudu (*Morinda citrifoli* L.) dari ketiga elevasi tempat tumbuh terdapat perbedaan yang bermakna dengan nilai signifikansi ($p < 0.05$). Hasil uji kandungan antioksidan (IC_{50}) berturut-turut dari yang terendah sampai tertinggi yaitu sebesar 591.19 ± 2.65 ($\mu\text{g/mL}$) di wilayah UL, 451.54 ± 10.77 ($\mu\text{g/mL}$) di wilayah RD, dan sebesar 292.47 ± 2.85 ($\mu\text{g/mL}$) di wilayah BL. Ketiga elevasi tempat tumbuh mengkudu (*Morinda citrifoli* L.) memiliki aktivitas antioksidan yang

sangat lemah apabila dibandingkan dengan aktivitas antioksidan vitamin C yang memiliki nilai IC_{50} sebesar 9.79 ± 0.03 ($\mu\text{g/mL}$).

2. Nilai total fenol ekstrak etanol daun mengkudu (*Morinda citrifolia* L.) masing-masing sebesar 28.5 ± 1.0 UL, 39.5 ± 1.0 RD, dan 75.83 ± 0.58 (mg GAE/g ekstrak) BL. Sedangkan nilai total flavonoid ekstrak etanol daun mengkudu (*Morinda citrifolia* L.) masing-masing sebesar 18.97 ± 0.02 UL, 22.81 ± 0.02 RD, dan 31.04 ± 0.07 (mg QE/g ekstrak) BL.

5. REFERENSI

- Azizah, Dyah Nur, dkk., 2014, Penetapan Kadar Flavonoid Metode AlCl_3 pada Ekstrak Metanol Kulit Buah Kakao (*Theobroma cacao* L.), *Kartika Jurnal Ilmiah farmasi*, **vol. 2** : p. 45-49
- Dai, J., Mumper, J., 2010, Plant Phenolics Extraction, Analysis and Their Antioxidant and anticancer Properties, *Molecules*, **vol. 15** : p. 7313-7352.
- Fatchurrozak, dkk., 2015, Pengaruh Ketinggian Tempat Terhadap Kandungan Vitamin C dan Zat Antioksidan Pada Buah *Carica Pubescens* di Dataran Tinggi Dieng, **vol. 1**: p.15-22.
- Fitter, A.H., & R. K. M. Hay, 1991, *Fisiologi Lingkungan Tanaman*, Yogyakarta: Gadjah Mada University Press.
- Haci, I.A.E., dkk., 2009, In Vitro Antioxidant Activity and Total Phenolic Content In Methanol Crude Extract From The Algerian Medicinal Plant, *Limoniastrum feei*, *Scientific study and research*, **vol. 4** : p. 329-336.
- Hidayati, Nurul K., dkk., 2007, Aktivitas Antioksidan, Kandungan Fenolik Total, dan Flavonoid Total Daun Mengkudu (*Morinda citrifolia* L.), *Agritech*, **vol. 27** : p. 147-151, No. 4 desember 2007.
- Karamoy, L., 2009, Hubungan Antara Iklim dengan Pertumbuhan kedelai (*Glicine Max* L. Merrill), *Soil Environment*, **vol. 7**: p. 65-68.
- Marjoni M. R., Afrinaldi, Novita A. D., 2015, Kandungan Total Fenol dan Aktivitas Antioksidan Ekstrak Air Daun Kersen (*Muntingia calabura* L.), *Jurnal Kedokteran Yarsi*, **vol. 23(3)** : p. 187-196.
- Nurjanah, Izzati L., Abdullah A, 2011, Aktivitas Antioksidan dan Komponen Bioaktif Kerang Pisau (*Solen spp.*), *Ilmu Kelautan*, **16(3)**: p. 119-124.
- Perwiratami, Suzery M., Cahyono B., 2014, Korelasi Fenolat Total dan Flavonoid Total Dengan Antioksidan Dari Beberapa Sediaan Ekstrak Buah Tanjung (*Mimusops Elengi*). *Chem. Prog.* **Vol. 7(1)**. 34-39.
- Pratiwi, Anistia, Wahyu, 2012, Pengaruh Periode Cekaman Air Terhadap Pertumbuhan dan Kandungan Metabolit Sekunder Rosela Merah dan Rosela Ungu, *Skripsi*, Universitas Sebelas Maret Surakarta.
- Pujimulyani, D., 2003, Pengaruh Bleaching terhadap Sifat Antioksidasi Sirup Kunir Putih

- (Curcuma mangga val.), Agritech, **vol. 23** : p. 137-134.
- Ramle, S. F. M., Kawamura, F., Sulaiman, O., Hashim, R., 2008, Study On Antioxidant Activities, Total Phenolic Compound, And Antifungal Properties Of Some Malaysian Timbers From Selected Hardwoods Species. *International Conferences Of Environmental Research And Technologi*. P. 472-475
- Salmia, 2016, Analisis Kadar Flavonoid Total Ekstrak Kulit Batang Kedondong Bangkok (Spondias dulcis) dengan Metode Spektrofotometri UV-Vis. *Skripsi*. Universitas Islam Negri Alaudin Makassar.
- Sari, Anna Khumaira, dan Ayuchecaria Noverda, 2017, Penetapan Kadar Fenolik Total dan Flavonoid Total Ekstrak Beras Hitam (*Oryza sativa* L.) Dari Kalimantan selatan, *Jurnal Ilmiah Ibnu Sina*, **vol. 2** : p. 327-335.
- Sayuti K., Yenrina R., 2015. *Antioksidan Alami dan Sintetik*. Padang: Andalas University Press.
- Schirmer, R.E., 1990, Modern Methods Of Pharmaceutical Analysis, 2nd Edition, **vol. III**, CRC Press Inc., Boca Raton, Florida.
- Septiana E., Simanjuntak P., 2017, Pengaruh Kondisi Kultur yang Berbeda Terhadap Aktivitas Antioksidan Metabolit Sekunder Kapang Endofit Turmeric Asal Akar Kunyit, *Traditional Medicine Journal* (22)1: p. 31-36.
- Syaifuddin, 2015, Uji Aktivitas Antioksidan Bayam Merah (*Alternanthera amoena* Voss) Segar dan Rebus Dengan Metode DPPH (1,1 –Diphenyl-2-Picylhydrazyl), *Skripsi*, Universitas Islam Negeri Walisongo.
- Wagner, K.M., 2013, Like Dissolves Like, Princeton University Chemistry Department, p. 1-5.
- Winarsi, H., 2007, *Antioksidan Alami dan Radikal Bebas*, Yogyakarta: Penerbit Kanisius.