

BAB III

METODE PENELITIAN

A. Metode Penyesuaian dengan Pendekatan Studi Literatur

1. Deskripsi Metode Pendekatan Studi Literatur

Studi literatur adalah suatu penelusuran dan penelitian kepustakaan dengan membaca buku, jurnal dan terbitan-terbitan lain yang berkaitan dengan topik penelitian untuk menghasilkan suatu tulisan. (Marzali, 2016)

Studi literatur dilakukan atas kesadaran bahwa pengetahuan akan bertambah terus menerus (berakumulasi), bahwa topik penelitian masyarakat dan daerah penelitian sudah pernah diteliti peneliti sebelumnya.

Proses dalam melaksanakan pendekatan lain studi literatur adalah sebagai berikut:

- a. Mencari artikel penelitian yang terkait dengan jenis penelitian yang digunakan dengan melakukan pencarian artikel di situs website google cendekia/google scholar serta melakukan pengecekan jurnal terakreditasi di situs website *Schimago Jr* untuk jurnal internasional dan sinta untuk jurnal nasional dengan memasukkan nomor ISSN
- b. Melakukan perbandingan dari artikel-artikel penelitian-penelitian sebelumnya dengan merujuk pada simpulan umum pada masing-masing artikel tanpa melakukan analisis statistik atau analisis mendalam pada data dan hasil penelitiannya.

c. Menyimpulkan hasil perbandingan artikel disesuaikan dengan tujuan penelitian.

2. Informasi jumlah dan jenis artikel

Pada Studi literatur ini dilakukan studi literatur terhadap artikel-artikel penelitian atau jurnal penelitian yang membahas tentang “Aktivitas Antioksidan Ekstrak buah mengkudu (*Morinda Citrifolia L*) dengan metode DPPH dan FRAP” yang dipublikasi sepuluh tahun terakhir dengan predikat nasional/internasional.

Jurnal ini diunduh dari google cendekia dan melakukan pengecekan di situs website sinta dan *schimago Jr* untuk mengetahui jurnal yang akan direview terakreditasi atau tidak. Penelitian dengan metode literatur review ini terdiri dari 3 jurnal nasional terakreditasi SINTA dan 2 jurnal internasional terindeks di *schimago jr*.

Tabel 3.1 Informasi Jumlah dan Jenis Artikel

	Jurnal Nasional			Jurnal Internasional	
	Artikel 1	Artikel 2	Artikel 3	Artikel 4	Artikel 5
Nama jurnal	Jurnal Kimia Sains dan Aplikasi	Jurnal <i>Pharmascience</i>	Jurnal Ilmu-Ilmu Peternakan	<i>Life Science Journal</i>	<i>African Journal of Biotechnology</i>
ISSN	1410-8910	2355-5386	0852-3681	-	1684-5315
DOI	-	-	-	10.5530/pj.2017.6.141	10.5897/AJB2013.12073
Skor	S5	S1	S2	Q4	Q3
H-Index	1	25	3	23	79

3. Identitas Artikel

Memaparkan isi dari artikel yang ditelaah dengan isi sebagai berikut:

a. Artikel Pertama

Judul Artikel	:Identifikasi Senyawa Aktif Ekstrak Buah Mengkudu (<i>Morinda citrifolia</i> L.) dan Potensinya sebagai Antioksidan
Nama Jurnal	: Jurnal Kimia Sains dan Analisis
Penerbit	:Fakultas Farmasi, Universitas 17 Agustus 1945 Jakarta
Volume dan Halaman	: 5; 2019; 206-212
Tahun terbit	: 2019
Penulis artikel	: Sogandi, Rabima
ISI ARTIKEL	
Tujuan Penelitian	:Untuk mengekstraksi dan melakukan fraksinasi buah mengkudu, mengetahui aktivitas antioksidan ekstrak buah mengkudu, serta mengidentifikasi jenis senyawa bioaktif yang berperan sebagai antioksidan
Metode Penelitian	:
Jenis penelitian	: Experimental laboratorium

- Populasi dan sampel : Populasi : Buah mengkudu yang diperoleh dari BALITRO dan determinasi dilakukan di LIPI
- Sampel : 2,5 kg buah mengkudu yang diekstraksi menggunakan teknik maserasi
- Instrumen : *Rotary Evaporator* untuk memisahkan ekstrak buah mengkudu dengan pelarut, Spektrofotometer UV-Vis untuk mengukur nilai absorbansi DPPH, kromatografi gas untuk menentukan senyawa bioaktif yang terdapat pada fraksi kloroform ekstrak buah mengkudu.
- Metode analisis UV- :
1. Identifikasi metabolit sekunder antrakuinon menggunakan uji Brontrager, alkaloid menggunakan pereaksi mayer, dragendorf, dan *bouchardat*, tanin FeCl_3 1%, flavonoid, steroid dan triterpenoid dan golongan saponin.
 2. Fraksinasi ekstrak etanol buah mengkudu menggunakan fraksi etanol, fraksi kloroform dan fraksi n-heksan untuk mengetahui % inhibisi aktivitas antioksidan dengan metode DPPH menggunakan spektrofotometer UV-Vis.
 3. Identifikasi senyawa bioaktif dianalisis menggunakan GCMS (*Agilent Technologies 7890*). Jenis kolom yang digunakan adalah HP

Ultra 2. Capillary Coloumn (30 m x 0.20 mm LD, 0.11 pm *film thickness*) dengan kondisi temperatur kolom 250°C, helium sebagai gas pembawa memiliki laju alir 30 cm/detik, rasio 1/30, temperatur sumber ion 230°C, dan suhu ion permukaan adalah 280°C.

Hasil Penelitian :

1. Identifikasi senyawa fitokimia buah mengkudu. Hasil skrining senyawa fitokimia terhadap ekstrak etanol dan hasil fraksinasi ekstrak buah mengkudu memberikan hasil positif yang berbeda pada setiap fraksinya. Ekstrak etanol mengandung senyawa antrakuinon, alkaloid, tannin, flavonoid, steroid, saponin, dan fenolik sedangkan untuk fraksi heksan mengandung, antrakuinon, alkaloid, flavonoid, triterpenoid, saponin dan senyawa fenol.

Fraksi klorofom mengandung antrakuinon, alkaloid, flavonoid, steroid, triterpenoid, saponin, dan fenolik. Fraksi etil asetat mengandung antrakuinon, alkaloid, flavonoid, triterpenoid, dan saponin. Sedangkan fraksi air mengandung senyawa antrakuinon, alkaloid, dan triterpenoid.

2. Hasil uji aktivitas antioksidan menggunakan metode peredaman radikal DPPH menunjukkan bahwa fraksi klorofom buah mengkudu memiliki aktivitas antioksidan paling kuat, hal ini ditunjukkan dengan nilai inhibisi ekstrak klorofom yakni 78,19%, diikuti dengan fraksi heksan 61,59%, dan fraksi etanol 59,19%. Oleh sebab itu, fraksi klorofom dipilih untuk dilakukan analisis lebih lanjut dengan

GCMS untuk mengidentifikasi jenis kandungan senyawa bioaktifnya. Sebagai pembanding digunakan vitamin C dengan aktivitas inhibisi sebesar 87,92%. Vitamin C bekerja dengan mereduksi dua radikal bebas dari DPPH melalui pelepasan dua atom hidrogennya, sehingga dapat membentuk DPPH yang nonradikal.

3. Identifikasi senyawa bioaktif menggunakan GCMS.

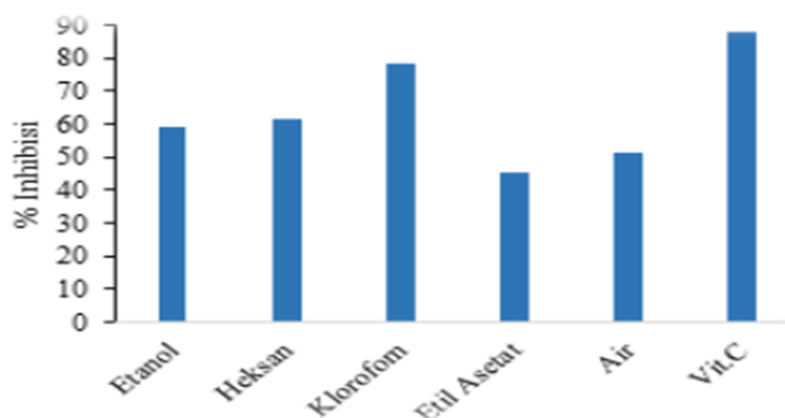
Hasil identifikasi senyawa bioaktif menggunakan GCMS menunjukkan adanya beberapa senyawa turunan dari alkaloid, terpenoid dan steroid.

Kemampuan fraksi klorofom ekstrak buah mengkudu sebagai antioksidan terjadi karena adanya kandungan berupa senyawa *hexadecanoic acid* merupakan golongan asam palmitat dengan % kandungan 13,17%, *squalene* merupakan golongan terpenoid dengan persen kandungan 13,32 %, *pyridin-3-carboxamide* merupakan golongan alkaloid dengan persen kandungan 8,05%, dan *beta-sitosterol* merupakan golongan steroid dengan persen kandungan 7,19 %

Tabel 3.2 Kandungan Senyawa fitokimia buah mengkudu

Senyawa Fitokimia	Fraksi				
	Etanol	Heksa n	Kloroform	Etil Asetat	Air
Antrakuion on	+	+	+	+	+
Alkaloid	+	+	+	+	+
Tannin	+	-	-	-	-
Flavonoid	+	+	+	+	-
Steroid	+	-	+	-	-
Triterpenoid	-	+	+	+	+
Saponin	+	+	+	+	-
Fenolik	+	+	+	-	-

Keterangan: (+) memberikan reaksi positif, (-) memberikan reaksi negatif



Gambar 3.1 Aktivitas antioksidan masing-masing fraksi buah mengkudu.

Tabel 3.3 Hasil GCMS fraksi etil asetat Buah Mengkudu

Nama Senyawa	Kandungan (%)	Golongan
<i>n-hexadecanoic acid</i>	13,17 %	Asam Palmitat
<i>Squalene</i>	13,32%	Terpenoid
<i>Pyridin-3-carbocamide, oxime, N-(2-trifluoromethylphenyl)</i>	8,05 %	Alkaloid
<i>Beta-sitosterol</i>	7,19 %	Steroid

Kesimpulan :

Berdasarkan penelitian pada artikel ini menunjukkan bahwa ekstrak buah mengkudu (*Morinda citrifolia L*) memiliki aktivitas antioksidan dengan

persen inhibisi tertinggi terdapat pada fraksi kloroform yaitu sebesar 78,19%. Hasil identifikasi kandungan metabolit sekunder terbesar pada buah mengkudu dalam fraksi kloroform adalah senyawa *n-Hexadecanoic acid* (asam palmitat), *Squalene*(Terpenoid), *Pyridin-3-carboxamide, oxime, N-(2-trifluoromethylphenyl)*, dan *Beta – sitosterol*.

b. Artikel kedua

Judul Artikel :Kandungan Total Fenolik, Total Flavonoid, dan Aktivitas Antioksidan Ekstrak Etanol Buah Mengkudu (*Morinda citrifolia* L.)

Nama Jurnal : Jurnal *Pharmascience*

Penerbit :Program Studi Farmasi Fakultas MIPA Universitas Lambung Mangkurat

Volume dan Halaman : Vol 3, No. 1, Februari 2016, hal: 83 - 92

Tahun terbit : 2016

Penulis artikel : Khoerul Anwar, Liling Triyasmono

ISI ARTIKEL

Tujuan Penelitian :Untuk menentukan kandungan total fenolik, total flavonoid, dan aktivitas antioksidan ekstrak etanol buah mengkudu.

Metode Penelitian :

Jenis penelitian : Experimental Laboratorium

Populasi dan sampel :

1. Populasi : Buah mengkudu masak yang kulit buahnya masih keras dan belum lembek.
2. Sampel : Serbuk kering buah mengkudu yang dimaserasi menggunakan etanol 70%.

Instrumen : Spektrofotometer UV-Vis

Metode analisis :

1. Analisis kualitatif flavonoid total menggunakan Kromatografi Lapis Tipis (KLT), Fase diam yang digunakan adalah *silica gel* 60 F254 dan fase gerak n-butanol:asam asetat glasial:akuades (3:1:1 v/v/v).
2. Analisis kuantitatif digunakan untuk pengujian aktivitas antioksidan dilakukan dengan spektrofotometri menggunakan metode DPPH (Sugiat *et al.*, 2010). Ekstrak dilarutkan dalam metanol sehingga didapat seri konsentrasi 50, 100, 200, 300, dan 400 ppm. Sebanyak 1,0 ml sampel ekstrak ditambahkan dengan 1,0 ml larutan DPPH (100 ppm) dan metanol 4,0 ml, kemudian dihomogenkan menggunakan vortex. Campuran larutan ini diinkubasi selama 30 menit pada suhu 37°C dan terlindung dari cahaya matahari. Kemudian absorbansinya diukur pada panjang gelombang 517 nm. Standar rutin digunakan sebagai pembanding dengan konsentrasi 5; 7,5; 10; 12,5 dan 15 ppm.

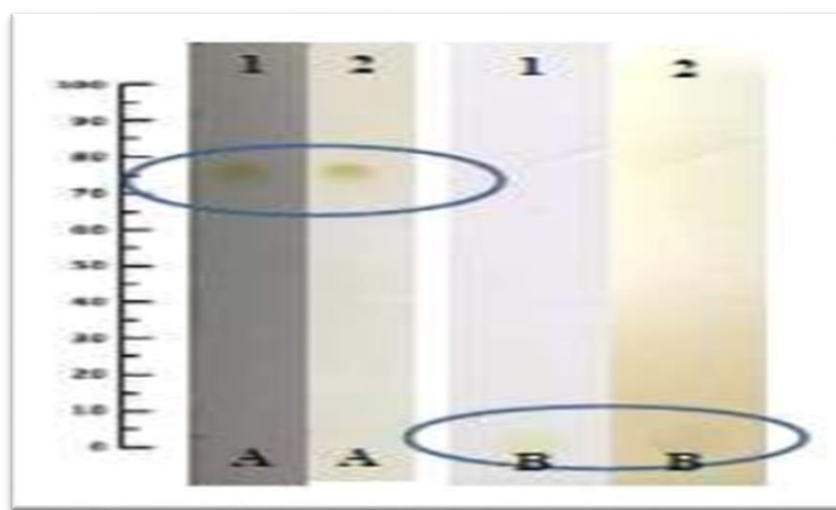
Hasil penelitian :

1. Berdasarkan hasil pengujian menggunakan KLT, diketahui bahwa terdapat kandungan senyawa fenolik dalam ekstrak etanol buah

mengkudu, dimana warna bercak dari coklat muda menjadi kelabu.

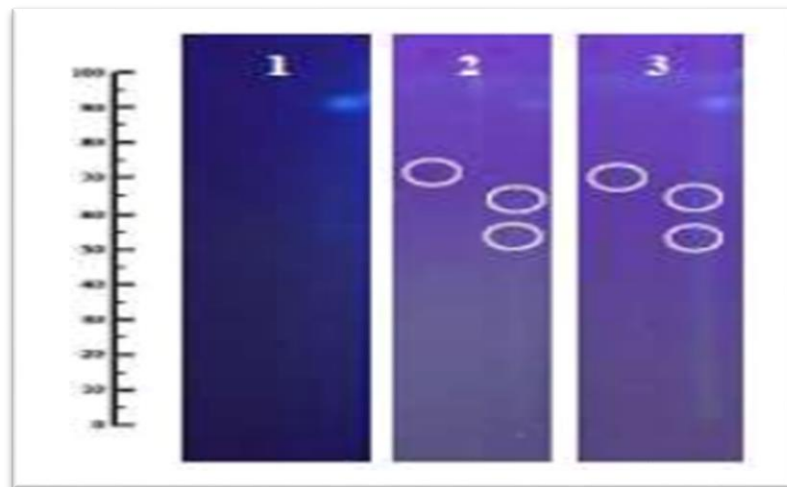
Kandungan total fenolik dalam ekstrak etanol buah mengkudu sebesar $14,44 \pm 0,82$ mg ekivalen pirogalol (PE)/g ekstrak.

2. Kadar total flavonoid ekstrak etanol buah mengkudu, yaitu sebesar $5,69 \pm 0,21$ mg ekivalen rutin (RE)/g ekstrak.
3. IC_{50} ekstrak etanol buah mengkudu sebesar $104,73 \pm 4,56$ $\mu\text{g/mL}$



Gambar 3.2 Hasil analisis kualitatif senyawa fenolik ekstrak etanol buah mengkudu.

Keterangan: KLT menggunakan fase diam *silika gel* 60 F254, fase gerak butanol-asam asetat glasial-air (3:1:1 v/v/v) dan jarak elusi 8 cm, (A) standar rutin, (B) ekstrak etanol buah mengkudu tanpa pengembangan. Pengamatan (1) pada sinar visibel tanpa penyemprotan FeCl_3 , (2) pada sinar visibel setelah penyemprotan FeCl_3 .



Gambar 3.3 Analisis kualitatif flavonoid ekstrak etanol buah mengkudu.

Keterangan: KLT menggunakan fase diam *silika gel* 60 F254, fase gerak n-butanol:asam asetat glasial:air (3:1:1 v/v/v), (A) standar rutin, (B) ekstrak etanol buah mengkudu. Pengamatan di bawah UV 366, (1) sebelum penyemprotan, (2) uap NH_3 , (3) disemprot sitroborat

Kesimpulan :

Berdasarkan penelitian pada artikel ini menunjukkan bahwa ekstrak buah mengkudu (*Morinda citrifolia* L) memiliki metabolit sekunder fenol dan flavonoid. Berdasarkan tingkat kekuatan antioksidan, ekstrak etanol buah mengkudu memiliki aktivitas antioksidan sedang $104,73 \pm 4,56$ (IC_{50} 101-250 $\mu\text{g/mL}$).

c. Artikel ketiga

Judul Artikel :Aktivitas antioksidan ekstrak tepung daun dan buah mengkudu (*Morinda citrifolia*)

Nama Jurnal : Jurnal Ilmu-ilmu Peternakan

Penerbit : Universitas Kahuripan Kediri

Volume dan Halaman : Vol 28, No. 2 hal : 105 – 111

Tahun terbit : 2018

Penulis artikel : David Kurniawan

ISI ARTIKEL

Tujuan Penelitian : Untuk mengetahui aktivitas antioksidan dari ekstrak tepung buah mengkudu..

Metode Penelitian :

Jenis penelitian : Experimental Laboratorium

Populasi dan sampel :

1. Populasi : Buah mengkudu yang telah matang.
2. Sampel : Hasil ekstraksi tepung mengkudu

Instrumen : Rotary evaporator, Spektrofotometer UV-Vis

Metode analisis :

1. Kandungan total fenol ekstrak tepung mengkudu ditentukan dengan metode *Folin-Ciocalteu* dan penentuan kadar total fenol berdasarkan equivalen asam galat modifikasi metode Kaur and Mondal (2014).
2. Kadar total flavonoid ekstrak tepung mengkudu ditentukan dengan metode Aluminium klorida dan penentuan kadar flavonoid berdasarkan equivalen quersetin modifikasi metode (Kumar *et al.* 2008).
3. Aktivitas antioksidan ditentukan dengan metode uji aktivitas penangkalan DPPH (1,1-Diphenyl-2picrylhydrazyl) berdasarkan efektivitas penangkalan ekstrak tanaman mengkudu terhadap DPPH modifikasi metode (Kaur and Mondal, 2014).

Hasil penelitian :

1. Kandungan total fenol tertinggi terdapat pada tepung buah mengkudu. Secara berurutan kandungan total fenol pada buah, daun dan kombinasi daun-buah; 1,670 mg/g asam galat, 1,095 mg/g GAE, 1,237 mg/g GAE. Perbedaan kandungan total fenol antara tepung buah dan tepung daun mengkudu merupakan hal yang mungkin terjadi karena pada dasarnya komposisi senyawa bioaktif yang ada pada keduanya berbeda.
2. Data kandungan senyawa antioksidan tepung mengkudu menunjukkan bahwa pada tepung mengkudu dengan metode ekstraksi metanol menunjukkan pengaruh yang berbeda sangat nyata ($P < 0,01$) terhadap kandungan flavonoid. Kandungan flavonoid pada penelitian ini berurutan dari yang tertinggi terdapat pada tepung daun, tepung buah-daun dan tepung buah yaitu sebesar 0,0438, 0,0137 dan 0,0017 mg/g QE.
3. Data kandungan senyawa antioksidan tepung mengkudu menunjukkan bahwa pada tepung mengkudu dengan metode ekstraksi metanol memberikan pengaruh yang berbeda sangat nyata ($P < 0,01$) terhadap aktivitas antioksidan. Hasil uji DPPH pada penelitian ini berurutan dari yang tertinggi terdapat pada tepung buah, tepung buah-daun dan tepung daun yaitu sebesar 84,03, 54,34 dan 37,54%. Aktivitas penangkalan radikal bebas DPPH tertinggi terdapat pada tepung buah.

Tabel 3.4 Kandungan senyawa antioksidan tepung mengkudu dengan metode ekstraksi metanol

Variabel	Perlakuan		
	Tepung Buah	Tepung Daun	Tepung Buah-Daun (1:1)
Total Fenol (mg/g GAE)	1,670 ± 0,102 ^a	1,095 ± 0,241 ^b	1,327 ± 0,120 ^a
Flavonoid (mg/g EQ)	0,0017 ± 0,0001 ^a	0,0438 ± 0,0013 ^c	0,0137 ± 0,0021 ^b
Penangkalan DPPH (%)	84,03 ± 1,60 ^a	37,54 ± 8,51 ^c	54,34 ± 3,70 ^b

Keterangan: Notasi yang berbeda menunjukkan perbedaan yang sangat nyata ($P < 0,01$).

Kesimpulan :

Berdasarkan review artikel pada jurnal ini kandungan metabolit sekunder pada tepung buah mengkudu yang merupakan hasil ekstraksi dari buah mengkudu, total fenol 1.670 mg/g ekuivalen asam galat, flavonoid 0,0017 mg/g QE dan Hasil uji DPPH sebesar 84,03%.

d. Artikel keempat

Judul Artikel : *In vitro & ex vivo Acetylcholinesterase Inhibitory Activity of Morinda citrifolia Linn (Noni) Fruit Extract*

Nama Jurnal : Pharmacogn J.

Penerbit : *Department of Pharmacology, Faculty of Pharmacy, Sri Ramachandra University, Porur, Chennai – 600116, Tamil Nadu, INDIA*

Volume dan Halaman : Vol 9, No. 6, hal : 900-905

Tahun terbit : 2017

Penulis artikel : Srikanth Jeyabalan 1, Kavimani
Subramanian, Uma Maheswara Reddy
Cheekala, Chitra Krishnan

ISI ARTIKEL

Tujuan Penelitian :

Untuk mengidentifikasi aktivitas pelindung saraf ekstrak buah mengkudu (MCFE) secara *in vitro* dan *ex vivo* model hewan dengan penghambatan asetilkolinesterase (AChE) sebagai target enzim yang digunakan untuk pengobatan penyakit Alzheimer

Metode Penelitian :

Jenis penelitian : Experimental Laboratory

Populasi dan sampel : Ekstrak standar buah mengkudu diambil dari Amsar Goa Pvt Ltd, Goa

Instrumen : Spektrofotometer UV-Vis

Metode analisis :

1. Aktivitas peredaman radikal bebas dari ekstrak Buah Mengkudu oleh Yohozowa dkk menggunakan pewarnaan ekstrak etanol radikal *1,1-difenil-2-pikrilhidrazil* (DPPH).
Quercetin digunakan sebagai kontrol positif dan larutan etanol DPPH digunakan sebagai kontrol.
2. Aktivitas AChE dievaluasi menggunakan *Acetylthiocholine iodide* sebagai substrat dan *5, 5 - Dithiobis [2 – asam nitrobenzoic]* sebagai

kromogen. Homogenat otak mencit bersumber dari enzim asetilkolinesterase.

3. Analisis statistik

Semua aktivitas dilakukan sebanyak rangkap tiga dan data dinyatakan sebagai rata-rata $\pm$ *standard error mean* (SEM). Konsentrasi penghambatan radikal bebas hingga 50%, (IC_{50}) dievaluasi secara grafis dengan metode regresi non linier menggunakan *software Graph Pad Prism* (Ver. 5.0). ANOVA diikuti oleh tes jarak berganda Duncan digunakan untuk membandingkan pengobatan dan kelompok kontrol. Hubungan respon dosis diperoleh dengan regresi linier. Tingkat kepercayaan 95% ($p < 0,05$) signifikan secara statistik

Hasil penelitian :

1. Uji antioksidan *in vitro*

Standar untuk DPPH radikal bebas terhadap Quercetin aktivitas antioksidan menghasilkan penghambatan persentase maksimum 88,12 % $\pm$ 1,04 dibandingkan dengan peredaman radikal DPPH terhadap Buah Mengkudu menghasilkan penghambatan sebesar 76,77 % $\pm$ 1,10.

2. Penghambatan *in vitro* enzim AChE

Persentase maksimum penghambatan diperoleh pada buah mengkudu dosis 800 μ g / ml yang menghasilkan penghambatan maksimum 76,77 % $\pm$ 1,10. Demikian pula pada asetilkolin *in vitro*

uji penghambatan esterase dari neostigmin obat standar ditemukan menghasilkan penghambatan maksimum $88,12 \pm 1,04$ dengan dosis $800 \mu\text{g} / \text{ml}$.

3. Penghambatan *ex vivo* enzim AChE

Standar neostigmin obat menunjukkan persentase penghambatan $62,1\pm2,5$. Ekstrak Buah mengkudu menunjukkan persentase penghambatan $37,8\% \pm 2,1$ & $46,8\% \pm 2,9$ pada dosis 100 & 200 mg/kg masing-masing dan membuktikan persentase ketergantungan dosis-usia penghambatan aktivitas asetilkolinesterase.

Tabel 3.5 Profil penghambatan aktivitas ekstrak buah mengkudu aktivitas antioksidan terhadap DPPH sebagai peredam radikal bebas

<i>Treatment groups</i>	<i>Dose ($\mu\text{g}/\text{ml}$)</i>	<i>DPPH decolouration (% inhibition)</i>
<i>Morinda Citrifolia</i> <i>L</i>	25	58.85 ± 0.09
	50	62.51 ± 0.05
	100	65.34 ± 1.93
	200	68.65 ± 0.41
	400	72.84 ± 0.68
	800	76.77 ± 1.10
Quercetin	25	52.12 ± 0.72
	50	67.28 ± 0.46
	100	75.98 ± 0.95
	200	81.82 ± 1.02
	400	84.54 ± 1.24
	800	88.12 ± 1.04
<i>Ascorbid acid</i>	25	-
	50	-
	100	-
	200	-
	400	-
	800	-

Semua pengujian dilakukan sebanyak tiga replikasi. Penghambatan enzim dinyatakan sebagai persentase kontrol. Setiap nilai mewakili rata-rata $\pm$ SEM.

Tabel 3.6 Aktivitas Anticholinesterase buah mengkudu secara In Vitro.

<i>Treatment groups</i>	<i>Dose ($\mu\text{g/ml}$)</i>	<i>AChE inhibition (%)</i>
<i>Morinda Citrifolia</i>	25	58.85 $\pm$ 0.09
	50	62.51 $\pm$ 0.05
	100	65.34 $\pm$ 1.93
	200	68.65 $\pm$ 0.41
	400	72.84 $\pm$ 0.68
	800	76.77 $\pm$ 1.10
Neostigmine	25	52.12 $\pm$ 0.72
	50	67.28 $\pm$ 0.46
	100	75.98 $\pm$ 0.95
	200	81.82 $\pm$ 1.02
	400	84.54 $\pm$ 1.24
	800	88.12 $\pm$ 1.04

Semua pengujian dilakukan dalam sebanyak tiga replikasi. Penghambatan enzim dinyatakan sebagai persentase kontrol. Setiap nilai mewakili mean $\pm$ SEM.

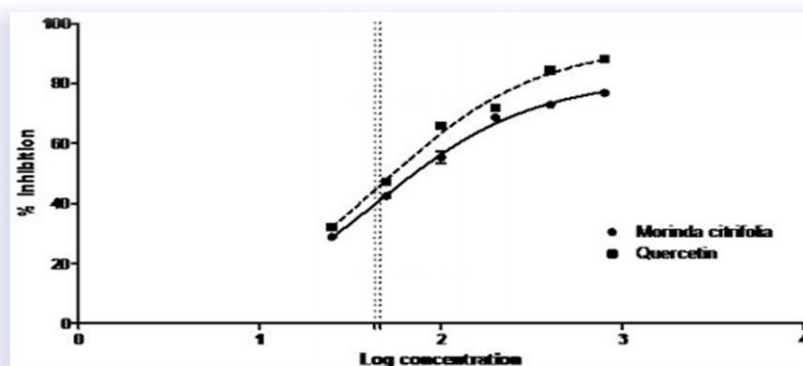
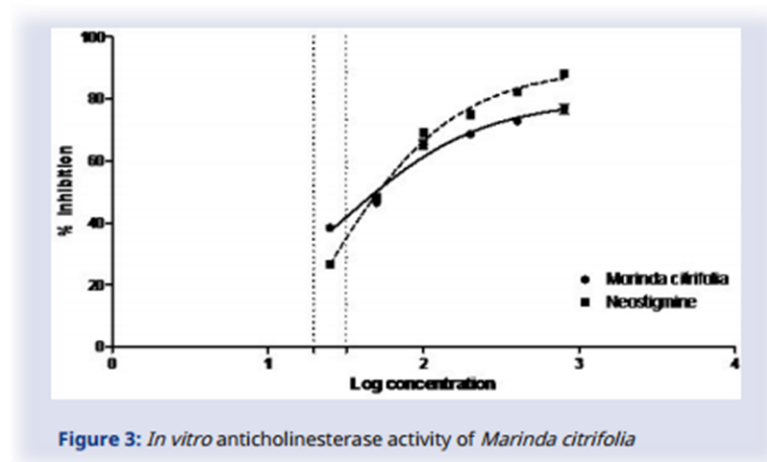


Figure 2: DPPH scavenging assay of *Morinda citrifolia* fruit extract

Gambar 3.4 Uji Peredaman radikal DPPH Ekstrak Buah Mengkudu



Gambar 3.5 Aktivitas antikolinesterase ekstrak buah mengkudu secara *in vitro*

Kesimpulan :

Berdasarkan review artikel pada jurnal ini, dilakukan uji antioksidan secara *in vitro* nilai IC_{50} dan quercetin standar sebesar 46,22 $\mu\text{g/ml}$ dibandingkan dengan ekstrak buah mengkudu memiliki nilai IC_{50} sebesar 43,14 $\mu\text{g/ml}$ pada pengujian aktivitas antioksidan terhadap peredaman radikal bebas DPPH.

e. Artikel kelima

Judul Artikel : *Effect of maturity and harvest season on antioxidant activity, phenolic compounds and ascorbic acid of Morinda citrifolia L. (noni) grown in Mexico (with track change*

Nama Jurnal : *African Journal of Biotechnology*

Penerbit : *Rubio Pharma y Asociados S.A de C.V. Laboratorio de Investigaciones en*

Bioactivos y Alimentos Funcionales (LIBAF), Hermosillo, Sonora, México.

Volume dan Halaman : Volume 12(29), halaman 4630-4639,
 Tahun terbit : 2013
 Penulis artikel : Iloki Assanga S. B., Lewis Luján L.M,
 Rivera-Castañeda E.G., Gil- Salido, A. A.
 Acosta-Silva A. L., Meza-Cueto, C. Y. and
 Rubio-Pino J. L.

ISI ARTIKEL

Tujuan Penelitian : Untuk mengetahui Pengaruh kematangan
 dan musim panen buah *Morinda citrifolia* L
 (noni) terhadap aktivitas antioksidan,
 senyawa fenolik dan asam askorbat di
 Meksiko

Metode Penelitian :

Jenis penelitian : Experimental Laboratorium

Populasi dan sampel :

Buah dipanen dari koperasi pertanian di Tepic, Nayarit, Meksiko
 (lintang 21.4167, bujur: -105.1833, ketinggian: 30 m dpl). Sampel
 dikumpulkan pada musim dingin-musim semi (Februari-Maret); musim
 semi-musim panas (Mei-Juni); dan musim gugur (November) 2010.

Instrumen : Spektrofotometer UV-Vis, KCKT

Metode analisis :

1. Penentuan aktivitas antioksidan dengan melakukan peredaman radikal DPPH.

Absorbansi campuran radikal DPPH dan sampel ekstrak buah mengkudu diukur menggunakan pembacaan spektrofotometer lempeng mikro *Thermo Scientific* pada panjang gelombang 517 nm. Radikal DPPH berfungsi sebagai kontrol absolut (Kosong). Asam askorbat (35 μ M), BHA (6,95 μ M), dan Kontrol (125 μ M) digunakan sebagai standar aktivitas antioksidan.

Pemberian konsentrasi ekstrak Penghambatan 50% (IC_{50}) dihitung dari grafik plot persentase penghambatan terhadap konsentrasi ekstrak.

IC_{50} yang lebih rendah nilai tersebut menunjukkan semakin tinggi aktivitas antioksidan.

2. Uji daya antioksidan pereduksi besi (FRAP)

Uji kekuatan antioksidan pereduksi besi dilakukan seperti yang dijelaskan sebelumnya oleh Benzie dan Strain (1996). Reagen FRAP dibuat dalam larutan *buffer* asetat (pH 3,6), 10 mM 2,4,6 tripiridil-s-triazin (TPTZ) dalam larutan 40 mM HCL dan 20 mM besi (III) klorida dengan proporsi 10: 1: 1 (v/v), masing-masing. Reagen FRAP disiapkan dalam keadaan segar dan sebelum digunakan dihangatkan hingga 37°C dalam penangas air. 5 μ l sampel dengan 0,5 sampai 2 mg/ ml diencerkan dengan 20 μ l air suling ditambahkan ke 150 μ l reagen FRAP. Absorbansi campuran diukur menggunakan

pembaca spektrofotometer pelat mikro *Thermo Scientific* pada 595 nm setelah 4 menit. Kurva standar dibuat dengan larutan besi (II) sulfat, dan hasilnya dinyatakan sebagai ekstrak kaya polifenol $\mu\text{M Fe (II)}$ / mg.

3. Penentuan total polifenol.

Sekitar 1 g *pulp* pada berbagai tingkat kematangan dihomogenisasi dan diekstraksi dengan 10 ml air suling pada suhu kamar. Kemudian disentrifugasi (5000 rpm, 5 menit). Supernatan dikumpulkan dan diambil sebagai ekstrak air. 500 μl ekstrak pada konsentrasi yang berbeda (0,5 sampai 2 mg/ml) ditentukan dengan metode *Folin-Ciocalteu* seperti yang dijelaskan oleh Singleton dan Rossi (1965) menggunakan asam galat sebagai standar dan hasilnya dinyatakan sebagai μg setara asam galat (GAE) /g bobot sampel.

4. Analisis senyawa fenolik.

Ekstraksi dan analisis HPLC untuk senyawa fenolik dimodifikasi dari *Rodríguez-Delgado et al.*, (2001).

1 g daging buah segar dicampur dengan 10 ml etil asetat; campuran dikocok sedikit selama 30 menit dan kemudian disentrifugasi pada 5000 rpm selama 5 menit (HERMLE mod 236HK). Supernatan dibuang dan proses ekstraksi diulang dua kali. Filtrat gabungan diuapkan sampai kering di bawah vakum menggunakan evaporator berputar (Buchi, Swiss) dan dilarutkan dalam 2 ml metanol: air (50:50 v/v). Kemudian, ekstrak disaring melalui filter nilon 0,22 μM

(*Millipore*) dan disimpan pada suhu -20°C sampai analisis. HPLC dilakukan pada Varian 240 pada panjang gelombang deteksi 280 nm, pada laju alir 1 ml / menit, pada ukuran sampel 20 μl , dan pada kolom C-18 (Varian *Microsorb* 100, 5 μM , $4.6 \times 150\text{mm}$) dipasangkan dengan kartrid pelindung C-18 (Varian, 5 μM , $4.3 \times 10\text{ mm}$), dengan fase gerak A (Asam asetat: air 2% v / v) dan B (metanol) dalam gradien. Standar asam galat, katekin, *aesculetin*, *scopoletin*, rutin dan quercetin disuntikkan untuk identifikasi senyawa ini dalam sampel dengan perbandingan waktu retensi, dan kurva standar kalibrasi digunakan untuk menghitung konsentrasi yang ada dalam buah mengkudu (*Morinda citrifolia* L). Kandungan senyawa fenolik masing-masing dinyatakan dalam μg per g berat sampel.

5. Analisis asam askorbat

Penentuan asam askorbat berdasarkan metode yang dijelaskan oleh Doner dan Hicks (1981) dengan beberapa modifikasi. Untuk ekstraksi, campuran disiapkan dengan 1 g ekstrak buah dan 10 ml asam metafosfat dan asam asetat. Larutan dikocok sedikit selama 30 menit tanpa cahaya, dan kemudian disentrifugasi dengan kecepatan 5000 rpm selama 5 menit (HERMLE mod 236HK). Supernatan disaring melalui filter nilon 0,22 μM filter (*Millipore*) dan disimpan pada suhu -20°C untuk analisis selanjutnya. 20 μl diinjeksikan ke sistem HPLC yang terdiri dari modul pengiriman pelarut model

Varian ProStar 240, dan detektor UV-Vis Varian ProStar 325 dengan perangkat lunak *Galaxie*, versi 1.9. Pemisahan dilakukan pada kolom analitik C18 fase balik (Varian *Microsorb* 100, 5 μ M, 4,6 $\times$ 150mm) ditambah dengan pelindung *cartridge* C-18 (5 μ M, 4,3 $\times$ 10 mm) di ruangan suhu. Metode isokratis digunakan, dengan KH 2 PO 4 (0,05 N): asetonitril: (99: 1 v / v) sebagai fase gerak pada laju aliran 1,0 ml/menit.

Asam askorbat terdeteksi oleh UV pada 268 nm. Konsentrasi AA dihitung menggunakan kurva standar dan hasilnya dinyatakan sebagai mg / 100 g berat sampel (FW).

6. Analisis statistik

Hasil percobaan dinyatakan sebagai mean, SD dari tiga sampling independen dalam rangkap tiga. Analisis multifaktorial varians (ANOVA), signifikansi statistik, regresi linier dan Analisis koefisien korelasi Pearson dilakukan di NCSS, 2007.

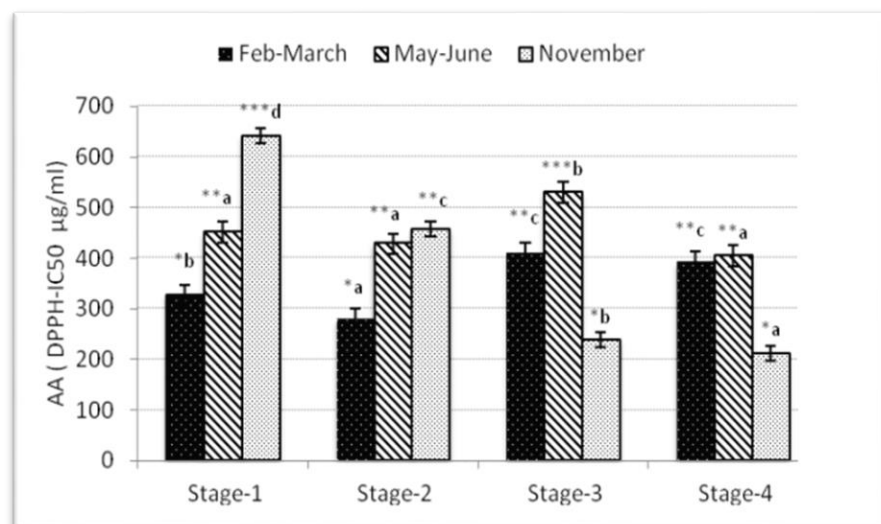
Nilai $P < 0,05$ dianggap signifikan oleh uji Tukey jarak berganda

Hasil penelitian :

1. Penentuan aktivitas antioksidan dengan melakukan peredaman radikal DPPH.

Aktivitas peredaman radikal bervariasi tidak teratur dengan derajat kematangan dan panen musiman. Untuk bulan Februari hingga Maret, aktivitas antioksidan meningkat signifikan ($P < 0,05$) pada tahap 2, dan menurun signifikan ($P < 0,05$) pada tahap 3 dan 4. Pada

bulan Mei hingga Juni, aktivitas antioksidan tetap cukup konstan antara tahap kematangan; satu-satunya yang penting perbedaan adalah penurunan yang signifikan terdeteksi di tahap 3. Untuk saat ini, aktivitas antioksidan masuk kategori sedang, jika dibandingkan dengan aktivitas yang lebih tinggi untuk buah yang belum matang ditemukan terdapat pada bulan Februari-Maret dan buah matang pada bulan November.

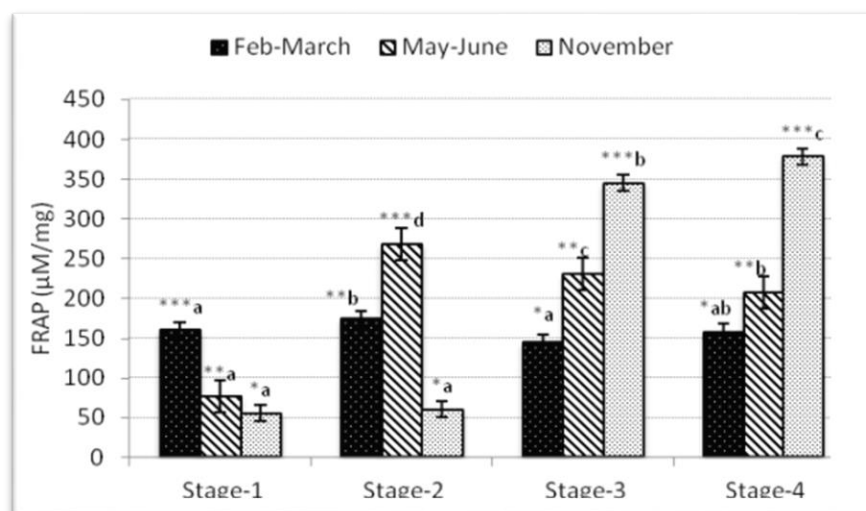


Gambar 3.6 Aktivitas antioksidan oleh radikal DPPH pada berbagai tahapan dan pola musim.

Keterangan : Data diatas adalah mean (rata-rata) dari tiga independen sampling masing-masing dengan tiga pengulangan sebanyak tiga replikasi ($n = 9$). Berarti dengan huruf yang berbeda menunjukkan perbedaan yang signifikan antara tahapan dalam musim yang sama (Hal • 0,05, uji Tukey). *, **, ***Berarti signifikan di $P < 0,05$. Tes Tukey yang sama tahap kematangan tetapi musim yang berbeda. IC_{50} asam askorbat dan Kontrol masing-masing adalah $35 \mu M$ dan $125 \mu M$.

2. Uji daya antioksidan pereduksi besi (FRAP)

Variasi musim yang paling dramatis disajikan dalam bentuk buah matang dimana nilai FRAP pada bulan November menunjukkan meningkat hampir tiga kali lipat dibandingkan Februari-Maret. Selama Februari-Maret dan Mei-Juni, buah pada tahap 3 mengalami penurunan daya reduksi dibandingkan pada tahap 2; hasil serupa itu diamati dalam aktivitas antioksidan yang diukur dengan DPPH pengujian kadar logam. Daya reduksi maksimum diamati di pada bulan November, sedangkan pada tahap 3 dan 4 minimal penurunan daya reduksi ditemukan pada tahap pertama kematangan dalam waktu yang bersamaan. dapat disimpulkan bahwa kematangan buah mengukudu pada tahap 1 daya pereduksi terendah dari semua waktu panen.



Gambar 3.7 Pengurangan daya reduksi (FRAP) dalam berbagai tahap dan musim kematangan.

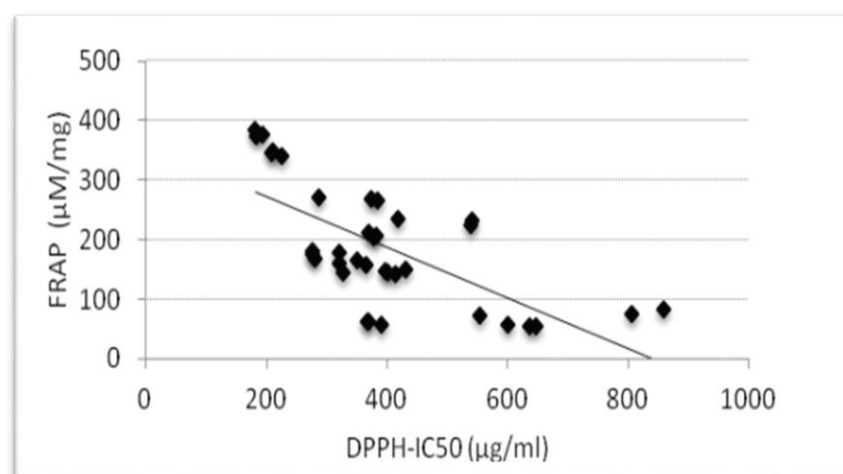
Keterangan : Data diatas adalah mean (rata-rata) dari tiga independen sampling masing-masing dengan tiga ulangan dalam rangkap tiga (n=9). Berarti dengan huruf yang berbeda menunjukkan perbedaan yang signifikan antara tahapan dalam musim yang sama (Hal • 0,05, uji Tukey). *, **, *** Hal ini berarti

signifikan di $P < 0.05$, uji Tukey dilakukan pada tahap kematangan yang sama tetapi musim yang berbeda.

3. Perbandingan nilai IC_{50} ekstrak buah mengkudu metode DPPH dan FRAP.

Peredaman radikal DPPH dan daya reduksi FRAP menunjukkan hasil yang baik korelasi dengan sedikit perbedaan antara buah yang berbeda pengembangan (Gambar 3.7). Korelasi antara DPPH (IC_{50}) dan daya pereduksi (FRAP) cukup negatif ($r = -0,684$, $P < 0,01$) dalam mengkudu pada berbagai derajat kematangan di musim yang berbeda.

Hal ini menunjukkan bahwa, semakin rendah nilai IC_{50} , semakin tinggi aktivitas antioksidannya. Baik catechin dan scopoletin menunjukkan korelasi negatif yang signifikan terhadap DPPH. Scopoletin dan katekin menunjukkan aktivitas antioksidan lebih kuat karena struktur kimianya.

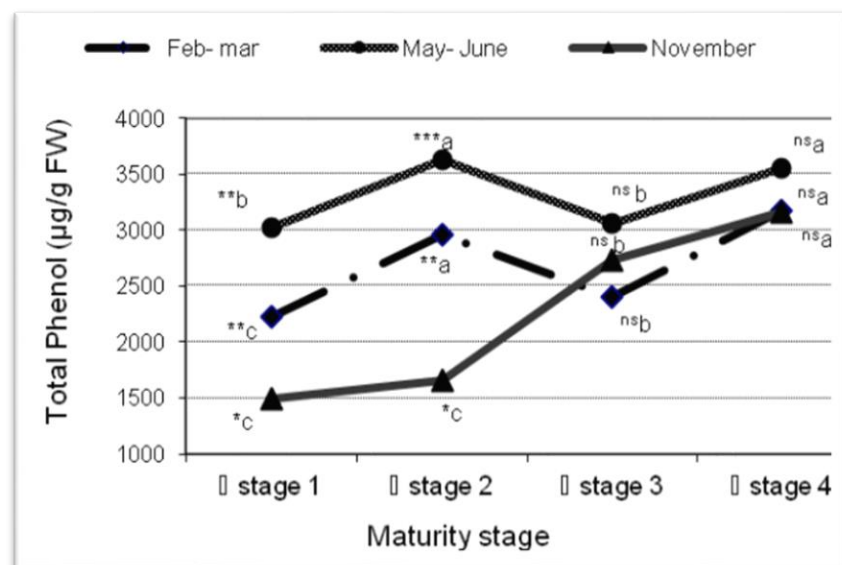


Gambar 3.8 Korelasi ekstrak buah mengkudu antara pengurangan daya reduksi (FRAP $\mu\text{M/mg}$) dengan aktivitas peredaman radikal

(DPPH-IC₅₀ µg/ml) dalam berbagai tahap dan musim kematangan.

4. Total polifenol

Kandungan fenolik total buah mengkudu bervariasi dengan perbedaan tahap kematangan dan musim, pada kisaran 1426,5 sampai 3647,0 µg asam galat/g FW (Gambar 2.8). Total fenolik berubah tidak teratur. Selama Februari-Maret dan Mei-Juni, total fenol meningkat secara signifikan ($P < 0,05$) pada tahap 2, menurun secara signifikan ($P < 0,05$) pada tahap 3 dan kemudian meningkat lagi di tahap 4.



Gambar 3.9 Perubahan total fenol selama proses kematangan dan pola musim.

Keterangan : Data diatas adalah sarana tiga independen contoh; masing-masing dengan tiga pegulangan sebanyak rangkap tiga ($n=9$). Berarti dengan huruf yang berbeda menunjukkan secara signifikan berbeda antar tahapan dalam musim yang sama ($P < 0,05$, uji Tukey). ns = tidak signifikan dan Artinya signifikan pada $P < 0,05$, Uji Tukey pada tahap kematangan yang sama tetapi berbeda musim.

5. Kandungan fenolik

Pada Mei-Juni, control scopoletin relatif rendah dibanding semua tahap kematangan. Nilai katekin dan kontrol menunjukkan perubahan selama tahap kematangan dan musim. Umumnya, katekin dan kontrol sudah diberikan jumlah yang tinggi di tahap 2 dan 4; profil tersebut muncul untuk tidak bergantung pada pola musim, dan berhubungan kuat dengan kandungan total fenolik. Penelitian ini ditemukan nilai rata-rata ($\mu\text{g/g}$) untuk katekin, scopoletin dan kontrol hampir serupa antara Februari-Maret dan Novem-ber. Namun demikian, hasil ini tidak diamati pada Mei-Juni; di musim ini, katekin dan *scopoletin* memiliki jumlah yang rendah, sedangkan kontrol sangat tinggi ditemukan pada buah mentah.

Tabel 3.7 Kandungan fenolik (HPLC) pada berbagai tahap perkembangan dan musim pasca panen buah mengkudu.

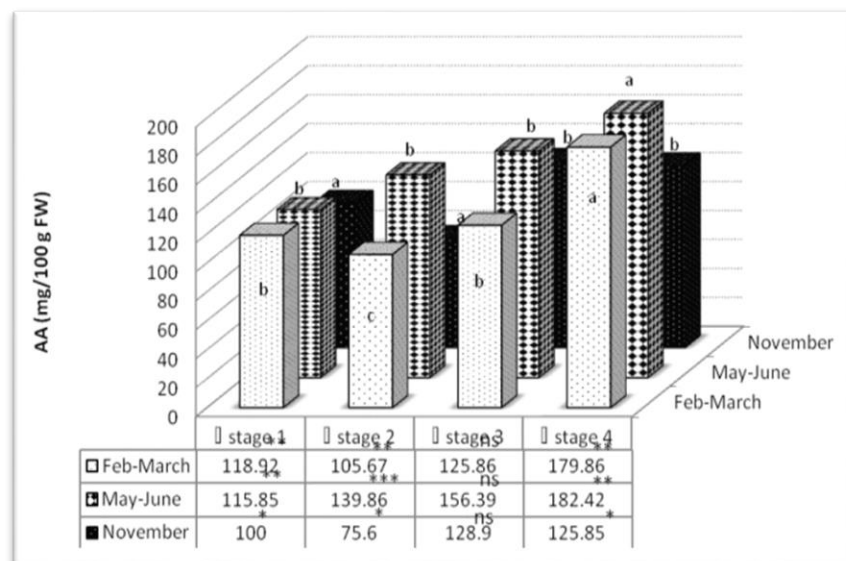
Kematan ngan	Kandungan fenolik	Musim panen		
		Februari- maret	Mei-juni	November
(µg/g FW)				
Tahap 1	Catechin	36.88± 6.1 b	26.16± 2.2 b	38.58± 0.7 b
	Scopoletin	40.59± 7.1 */**	26.67± 6.0 ns **	55.65± 8.8a *
	Rutin	29.61 ± 4.0 b **	116.76±24 .6 a *	29.86± 0.6 c **
	Total fenol	2596.8± 240.6	3022.8 • 257.3 b **	1426.5 • 159.5 * b
Tahap 2	Catechin	48.34± 3.9 a *	28.15± 1.3 ab **	41.05± 7.8 b ***
	Scopoletin	58.47± 7.1 * 74.13± 14.4	24.26± 2.2 ns **	43.52± 0.6 b **
	Rutin	a * 2930.6±177	47.18± 0.4 bc **	59.28± 1.9 b **

	Total fenol	.5 a **	3557.0 •	1663.2 •
			107.8 a ***	208.6 b
Tahap 3	Catechin	33.73± 2.3 b ns	31.63± 5.4 ab ns	38.18± 4.1 b ns
	Scopoletin	51.21± 1.2* 43.20± 5.2	25.03± 3.8 ns **	47.54± 6.6 b *
	Rutin	abns 2372.2±	28.70± 6.2 c ns	35.29± 5.3 c ns
	Total fenol	167.3 b	3074.9 •	2729.6 •
			85.0 b	248.4 a
Tahap 4	Catechin	42.67± 4.9 a ns	45.47± 2.4 a ns	ns 53.75± 3.9 a
	Scopoletin	45.76± 8.1 * *	31.67± 0.7 ns	65.16± 5.4 a
	Rutin	72.98± 11.1 a ns	65.22± 13.9 b ns	ns 81.34± 7.6 a
	Total fenol	3099.9± 250.2 a	3647.0 •	3053.2 •
			281.0 a	248.6 a
Rata- rata tahap kemata ngan	Catechin	40.41± 6.46	31.15± 8.69	40.43± 7.29
	Scopoletin	48.88± 8.47	26.90± 3.33	52.96± 9.57
	Rutin	54.98± 22.45	64.47± 36.38	51.44± 23.68
	Total fenol	2749.88	3325.43	2218.13

Data tersebut adalah mean (rata-rata) dari tiga independen sampling masing-masing dengan tiga pengulangan dalam tiga replikasi (n = 9). Hal ini berarti dengan huruf yang berbeda dalam kolom yang sama menunjukkan perbedaan yang signifikan antara tahapan dalam musim yang sama ($P > 0,05$, uji Tukey). *, **, *** Berarti signifikan, ns tidak signifikan pada $P < 0,05$, uji Tukey pada tahap kematangan yang sama tetapi berbeda musim.

6. Kandungan asam askorbat

Asam askorbat dalam buah mengkudu berubah dengan pematangan (75,60 menjadi 182,42 mg / 100 g, dan relatif rendah dibandingkan dengan jambu biji.



Gambar 3.10 Kandungan asam askorbat buah mengkudu pada berbagai tahap tingkat kematangan.

Keterangan: Data tersebut adalah sarana tiga pengambilan sampel independen, masing-masing dengan tiga pengulangan dalam tiga replikasi ($n = 9$). hal ini berarti huruf yang berbeda menunjukkan perbedaan nyata antara tahapan dalam musim yang sama ($P < 0,05$, uji Tukey), *, **, *** Berarti signifikan pada $P < 0,05$, Uji Tukey pada tahap kematangan yang sama tetapi berbeda musim. ns tidak signifikan.

Kesimpulan :

Berdasarkan review artikel ini, dilakukan analisis data Analisis multifaktorial varians (ANOVA), signifikansi statistik, regresi linier dan Analisis koefisien korelasi Pearson, Nilai $P < 0,05$ dianggap signifikan oleh uji jarak berganda Tukey.

Perubahan iklim seperti suhu tinggi yang dijumpai pada Mei-Juni meningkatkan produksi total polifenol dan asam askorbat. Selama bulan Februari-Maret dan Mei-Juni, buah-buahan dari tahap menengah dan matang menunjukkan aktivitas antioksidan dan kandungan polifenol total tertinggi dibandingkan dengan tahap

lainnya, sedangkan pada bulan November, buah-buahan masak mencapai khasiat antioksidan terbesar, kandungan total fenolik dan asam askorbat. Total polifenol dan asam askorbat mencapai jumlah tertinggi selama bulan Mei, meskipun aktivitas antioksidan sedang dibandingkan dengan nilai yang lebih besar pada bulan Februari-Maret atau November tergantung pada tingkat kematangan.

Tingkat kematangan buah mengkudu dengan adanya kandungan asam askorbat, tergantung pada musim panen. Pengaruh kematangan buah mengkudu terhadap metode DPPH menggunakan senyawa kimia asam askorbat, terdapat pada bulan Februari hingga Maret aktivitas antioksidan meningkat signifikan ($P < 0,05$) pada tahap 2 nilai IC_{50} sebesar 290 $\mu\text{g/ml}$, dan menurun signifikan ($P < 0,05$) pada tahap 3 dan 4 nilai IC_{50} sebesar 410 $\mu\text{g/ml}$ dan 390 $\mu\text{g/ml}$. Hal ini nilai IC_{50} masuk kategori lemah. Kemudian nilai IC_{50} paling tinggi menggunakan metode DPPH terdapat pada bulan November tahap 3 dan tahap 4 sebesar 220 $\mu\text{g/ml}$ dan 200 $\mu\text{g/ml}$. sedangkan pada metode FRAP, Daya reduksi maksimum diamati pada bulan November pada tahap 3 dan 4 sebesar 340 $\mu\text{M/mg}$ dan 375 $\mu\text{M/mg}$ penurunan daya reduksi ditemukan pada tahap pertama kematangan dalam waktu panen secara bersamaan.