

TOTAL FENOLIK DAN AKTIVITAS ANTIOKSIDAN EKSTRAK DAN FRAKSI DAUN MIMBA (*AZADIRACHTA INDICA A. JUSS*)

*Total Phenolic and Antioxidant Activity of Extract and Fractions of Neem Leaves
(Azadirachta Indica A. Juss)*

Lia Puspitasari^{1*}, Rifki Maulana Hifna², Rosario Trijualiamos Manalu²

¹Program Studi S1 Farmasi, Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam, Universitas
Sebelas Maret, Surakarta

²Program Studi S1 Farmasi, Fakultas Farmasi, Institut Sains dan Teknologi Nasional, Jakarta
Selatan

*Corresponding author: lia.puspitasari@staff.uns.ac.id

ABSTRAK

Tubuh membutuhkan antioksidan untuk menetralkan stres oksidatif yang disebabkan oleh radikal bebas. Dampak negatif dari stres oksidatif antara lain berupa munculnya berbagai macam penyakit degeneratif. Daun mimba (*Azadirachta indica* A. Juss) diketahui memiliki antioksidan alami yang mampu menghambat oksidasi radikal bebas, sehingga bermanfaat untuk kesehatan. Tujuan dari penelitian ini yaitu untuk mengukur aktivitas antioksidan dan kandungan total fenolik daun mimba. Ekstraksi dengan maserasi menggunakan etanol 95% dan fraksinasi bertingkat dengan pelarut n-heksan, etil asetat, dan air. Penapisan fitokimia meliputi uji metabolit sekunder. Aktivitas antioksidan diuji dengan metode DPPH dan FRAP, serta total fenolik diuji menggunakan metode Folin-Ciocalteu. Ekstrak daun mimba terbukti positif mengandung senyawa alkaloid, fenolik, flavonoid, terpenoid, glikosida, dan saponin. Hasil aktivitas antioksidan menunjukkan nilai IC₅₀ ekstrak etanol 95%, fraksi air, n-heksana, dan etil asetat daun mimba masing-masing 109,695; 117,161; 147,269; 131,462 ppm pada DPPH dan 82,315; 115,661; 326,554; 737,732 ppm pada FRAP. Total fenolik ekstrak etanol 95%, fraksi air, n-heksana, dan etil asetat daun mimba sebesar 66006,470; 45288,380; 13108,640; 9795,110 mg TAE/kg sampel asam tanat. Dapat disimpulkan bahwa ekstrak dan fraksi daun mimba memiliki aktivitas antioksidan kuat sampai lemah.

Kata Kunci: *Azadirachta indica*, DPPH, Folin-Ciocalteu, FRAP, IC₅₀

ABSTRACT

The body requires antioxidants to combat oxidative stress resulting from free radicals. Neem leaves (*Azadirachta indica* A. Juss) are recognized for their natural antioxidant properties that can prevent oxidative damage from free radicals. This study aimed to assess the antioxidant properties and total phenolic concentration of neem leaves. The extract was created through maceration using 95% ethanol followed by fractionation with n-hexane, ethyl acetate, and water. Phytochemical analysis involved testing for secondary metabolite compounds. Antioxidant activity was evaluated using the DPPH and FRAP methods. The Folin-Ciocalteu

method was used to determine total phenolic content. The leaf extract displayed positive results, revealing the presence of alkaloids, phenolics, flavonoids, saponins, terpenoids, and glycosides. The antioxidant activity assessment yielded IC_{50} values for the 95% ethanol extract, water, n-hexane, and ethyl acetate fractions at 109.695; 117.161; 147.269; and 131.462 ppm for DPPH, and 82.315; 115.661; 326.554; and 737.732 ppm for FRAP, respectively. The total phenolic content of the 95% ethanol extract and fractions of water, n-hexane, and ethyl acetate from neem leaves was 66006.470; 45288.380; 13108.640; 9795.110 mg TAE/kg based on the tannic acid standard. It can be concluded that the extracts and fractions derived from neem leaves exhibit strong to weak antioxidant activity.

Key words: *Azadirachta indica*, DPPH, Folin-Ciocalteu, FRAP, IC_{50}

PENDAHULUAN

Azadirachta indica A.Juss atau mimba termasuk keluarga Meliaceae, merupakan tumbuhan cemara tropis atau subtropis yang hampir semua bagiannya mengandung senyawa bioaktif (Li'aini *et al.*, 2021). Sebagian besar dari tanaman mimba berkhasiat obat dan dalam rumah tangga juga dapat digunakan sebagai pestisida (Simatupang *et al.*, 2023). Penelitian mengenai ekstrak etanol daun mimba telah terbukti memberikan beberapa aktivitas positif, antara lain dapat menurunkan konsentrasi urea pada tikus uji yang berkorelasi terhadap pengobatan pada penyakit ginjal maupun hipertensi, serta aman karena tidak memberikan efek negatif berupa kerusakan dan menurunnya fungsi ginjal maupun hati (Seriana *et al.*, 2021). Trivedi *et al.* (2019) dalam penelitiannya membuktikan bahwa tanaman mimba juga efektif dalam pengobatan karena memiliki aktivitas antibakteri, antivirus, antimalaria, antikanker dan antioksidan. Pada penelitian yang dilakukan oleh Spano & Zollo (2012), mimba juga terbukti berperan dalam pencegahan kanker karena dapat mengubah lingkungan tumor seperti menurunkan angiogenesis dan meningkatkan toksisitas sel.

Berdasarkan hasil studi, ekstrak kulit pohon dan juga daun mimba memiliki

aktivitas antioksidan yang menjanjikan. Ekstrak daun mimba dapat mengurangi stress oksidatif dengan mengurangi tingkat peroksida lipid dan meningkatkan pengurangan kandungan *glutathione* dan aktivitas berbagai enzim antioksidan (Simatupang *et al.*, 2023). Hasil pengujian aktivitas antioksidan ekstrak etanol 60% daun mimba dengan metode DPPH (2,2-Difenil-1-pikrilhidrazil) memberikan nilai IC_{50} antara 83,28 ppm sampai 90,39 ppm, sedangkan pada ekstrak metanol memberikan nilai IC_{50} sebesar 97,241 ppm (Simatupang *et al.*, 2023). Menurut Li'aini *et al.* (2021), beberapa faktor yang menyebabkan nilai aktivitas antioksidan daun mimba antara lain polaritas pelarut yang digunakan, konsentrasi, dan juga faktor lingkungan (Li'aini *et al.*, 2021). Daun mimba diketahui mengandung senyawa yang memberikan efek antioksidan antara lain tanin, triterpen, flavonoid, steroid, saponin, dan alkaloid (Ruwandha *et al.*, 2021). Selain itu pada penelitian Naz *et al.* (2022) juga diketahui bahwa kandungan total fenolik berkaitan erat dengan aktivitas ekstrak daun mimba dalam menetralkan radikal bebas yang berperan dalam reaksi oksidatif (Naz *et al.*, 2022).

Berdasarkan hal tersebut, walaupun telah ditemukan penelitian mengenai berbagai aktivitas dari tanaman mimba,

namun belum ada penelitian mengenai aktivitas antioksidan fraksi daun mimba yang berasal dari daerah Jawa Barat, Indonesia. Daun diambil sebagai objek penelitian karena pengolahannya yang relatif lebih mudah, serta merupakan pengembangan penelitian terdahulu mengenai aktivitas antioksidan ekstrak daun mimba. Pada penelitian ini akan diuji aktivitas antioksidan fraksinya. Pengkhususan wilayah Jawa Barat dipilih sebagai lokasi pengambilan sampel karena pasokan sampel yang memadai untuk penelitian. Sampel dari satu daerah akan memberikan data yang lebih konsisten dan juga mengurangi variabel yang tidak terkendali akibat perbedaan kondisi lingkungan.

Berdasarkan pertimbangan tersebut, maka dilakukan pengujian aktivitas antioksidan dan fenolik total terhadap ekstrak etanol dan fraksi daun mimba dari daerah Jawa Barat menggunakan metode DPPH dan FRAP (*Ferric ion reducing antioxidant power*) yang dimodifikasi dengan reagen orto-fenantrolin. Reagen orto-fenantrolin adalah suatu agen pengompleks yang sangat stabil membentuk kompleks dengan Besi (II) yang berwarna merah jingga (Lexia & Ngibad, 2021). Melalui penelitian ini diharapkan dapat diperoleh data mengenai aktivitas antioksidan ekstrak dan fraksi serta nilai total fenolik daun mimba yang diperoleh dari daerah Jawa Barat.

METODE PENELITIAN

Bahan

Bahan yang digunakan antara lain simplisia daun mimba yang diperoleh dari BALITTRO, Bogor, Jawa Barat, DPPH (2,2-Difenil-1- Pikrilhidrazil), asam tanat p.a (Merck), orto- fenantrolin (Merck), *buffer* asetat, n-heksan, etil asetat, akuades,

HCl 2 N, Bouchardat LP, Mayer LP, FeCl₃, etanol 95%, serbuk Zinc, HCL pekat, CH₃COOH glasial, H₂SO₄, Molish LP, Na₂CO₃ 2%, Folin Ciocalteu, metanol, Vitamin C, Na-asetat trihidrat, orto fenantrolin monohidrat, dan FeSO₄.

Determinasi Tumbuhan Mimba.

Daun mimba yang digunakan dalam penelitian terlebih dahulu dilakukan proses identifikasi. Determinasi dilakukan di Laboratorium Badan Riset dan Inovasi Nasional (BRIN), Cibinong, Bogor.

Ekstraksi

Simplisia daun mimba diekstraksi dengan maserasi menggunakan etanol 95% (1:10). Maserasi dilakukan 3 x 24 jam dan diaduk secara berkala setiap 12 jam. Ekstrak cair diuapkan pelarutnya menggunakan *rotary evaporator* (RV 06-mlikawerke model VR-2B) pada suhu 40°C sampai volume menyusut. Selanjutnya dipekatkan dengan *waterbath* (SMIC) hingga bobot konstan yang akan digunakan untuk pengujian.

Fraksinasi

Sejumlah ekstrak etanol 95% daun mimba yang diperoleh dari prosedur ekstraksi kemudian dilakukan fraksinasi cair-cair. Proses fraksinasi menggunakan pelarut n-heksan dan etil asetat. Ekstrak kental etanol 95% disuspensikan dalam 100 mL akuades bebas CO₂, kemudian diaduk sampai homogen dan dimasukkan pada corong pisah.

Pada proses fraksinasi menggunakan campuran n-heksan dan air dengan perbandingan 1:1, campuran dikocok dan dibiarkan selama 15 menit hingga terbentuk dua lapisan, yaitu lapisan air di bagian bawah dan n-heksan di bagian atas. Kedua lapisan tersebut kemudian dipisahkan. Pelarut n-heksan ditambahkan kembali ke

lapisan air yang telah dipisahkan, dan proses fraksinasi diulang hingga diperoleh fraksi n-heksan yang jernih. Seluruh lapisan n-heksan yang terbentuk dari beberapa kali fraksinasi kemudian digabungkan.

Setelah fraksi n-heksan terpisah, kemudian dilakukan fraksinasi dengan campuran etil asetat dan air (1:1). Prosedur yang dilakukan sama dengan fraksinasi sebelumnya, proses pemisahan dilakukan berulang hingga diperoleh fraksi etil asetat bening. Residu akhir yang diperoleh merupakan fraksi air. Ketiga fraksi kemudian diuapkan menggunakan *rotary evaporator* (40°C) hingga volume menyusut, dan dipekatkan menggunakan *waterbath* hingga bobot konstan.

Penapisan Fitokimia

Alkaloid

Ekstrak 10 mg ditimbang, lalu ditambahkan 1 mL HCl 2N dan 9 mL air, kemudian dipanaskan dengan penangas air 2 menit, didinginkan, kemudian disaring. Filtrat selanjutnya diuji dengan pereaksi alkaloid (mayer, dragendorff, dan bouchardat). Sebanyak 3 tetes filtrat ditambahkan 2 tetes pereaksi dalam tabung reaksi.

Fenolik

Ekstrak 40 mg dan 10 tetes FeCl₃ 1% ditambahkan, hasil positif berupa endapan biru kehitaman atau hijau kehitaman (Manongko *et al.*, 2020).

Flavonoid

Ekstrak 0,5 g dan 1-2 mL etanol 95% ditambahkan kemudian diaduk, selanjutnya ditambah 0,5 g Mg dan 2 mL HCL pekat (Departemen Kesehatan Republik Indonesia, 2020).

Saponin

Ekstrak 0,5 g ditambah air panas sebanyak 10 mL, setelah dingin kemudian dikocok kuat sampai terbentuk buih, selanjutnya ditambahkan HCl 1 tetes.

Steroid dan Terpenoid

Ekstrak 40 mg ditambahkan dengan CH₃COOH glasial 10 tetes dan H₂SO₄ 2 tetes. Campuran kemudian dikocok perlahan dan dibiarkan beberapa menit (Departemen Kesehatan Republik Indonesia, 2020).

Glikosida

Larutan uji sebanyak 0,1 mL dimasukkan dalam tabung reaksi lalu diuapkan dengan penangas air hingga menguap sebagian. Sisa larutan ditambah 2 mL air dan 2 tetes Molish. Kemudian akan terbentuk cincin berwarna ungu pada batas cairan ketika ditambah 2 mL asam sulfat.

Kandungan Total Fenolik

Penetapan kandungan total fenolik dilakukan dengan menggunakan persamaan kurva kalibrasi dari absorbansi larutan standar asam tanat. Larutan standar 1000 ppm disiapkan dengan cara menimbang 10,0 mg asam tanat dan melarutkannya dalam etanol p.a hingga mencapai volume 10,0 mL. Sebanyak 2,5 mL dari larutan stok tersebut diencerkan menggunakan etanol p.a hingga volume 25,0 mL untuk memperoleh konsentrasi 100 ppm. Dari larutan ini disiapkan deret konsentrasi sebesar 10, 20, 30, 40, dan 50 ppm. Masing-masing larutan diambil sebanyak 5,0 mL, dicampurkan dengan 0,4 mL pereaksi Folin–Ciocalteu, dikocok, lalu didiamkan selama 8 menit. Penambahan 3 mL larutan Na₂CO₃ 2% dilakukan setelahnya, lalu campuran dikocok hingga homogen dan ditambah air suling hingga mencapai volume akhir 10,0 mL. Campuran dibiarkan selama 2 jam pada

suhu kamar sebelum dilakukan pengukuran absorbansi pada panjang gelombang maksimum 750 nm menggunakan spektrofotometer UV-Vis. (Shimadzu) (Werdiningsih & Fitria, 2024).

Untuk pengujian kandungan total fenolik sampel, 500,0 mg ekstrak dilarutkan dalam 4 mL Na₂CO₃ 2%, 0,2 mL pereaksi folin ciocalteu 10%, dan 0,2 mL metanol p.a (1:1). Larutan sampel kemudian direaksikan dengan prosedur yang sama seperti larutan standar asam tanat. Semua pengukuran absorbansi dilakukan tiga kali (Werdiningsih & Fitria, 2024).

Aktivitas Antioksidan Metode DPPH

Pengujian aktivitas antioksidan metode DPPH dilakukan melalui beberapa langkah. Pertama, larutan DPPH dibuat dengan melarutkan 9,85 mg serbuk DPPH dalam etanol p.a hingga volume mencapai 25 mL. Selanjutnya, larutan uji disiapkan dengan mencampurkan 2,5 g ekstrak dan fraksi dalam 25 mL metanol, kemudian diekstraksi menggunakan ultrasonik selama 30 menit pada suhu 20°C. Setelah itu, dibuat deret konsentrasi sampel dengan konsentrasi 100 µg/mL, 160 µg/mL, dan 200 µg/mL masing-masing sebanyak 5 mL.

Pengujian antioksidan sampel dilakukan dengan mencampurkan 2 mL ekstrak dan fraksi dari tiap deret konsentrasi dengan 2 mL larutan DPPH berkonsentrasi 50 ppm, yang kemudian didiamkan di tempat gelap selama 30 menit sebelum serapan warnanya diukur menggunakan spektrofotometer UV-Vis pada panjang gelombang 517 nm. Sebagai kontrol positif, vitamin C sebanyak 2,5 g dilarutkan dalam 25 mL metanol, disonikasi selama 30 menit pada suhu 20°C, dan diuji dengan cara serupa (Monangin *et al.*, 2024). Nilai persentase inhibisi atau hambatan terhadap DPPH dihitung berdasarkan rumus:

$$\% \text{inhibisi} = \frac{(AK-AS)}{AK} \times 100 \dots\dots\dots(1)$$

Dimana AK merupakan absorbansi kontrol dan AS adalah absorbansi sampel.

Aktivitas Antioksidan Metode FRAP

Pada metode FRAP, aktivitas antioksidan juga dianalisis melalui serangkaian tahapan. Buffer asetat dengan pH 3,6 dibuat dengan melarutkan 0,775 g CH₃COONa.3H₂O dan 4 mL asam glasial, kemudian ditambahkan akuades hingga volume mencapai 250 mL. Larutan orto fenantrolin 0,2% (10 mmol) disiapkan dengan melarutkan ± 0,2 g orto fenantrolin dalam akuades hingga 100 mL. Larutan FeCl₃ 20 µmol/mL dibuat dengan melarutkan 0,5407 g FeCl₃.6H₂O dalam akuades hingga volume 100 mL, sedangkan larutan pembanding vitamin C dibuat dengan melarutkan 75 mg vitamin C dalam akuades hingga volume 100 mL. Larutan standar FeSO₄ 7H₂O 10 mmol/L disiapkan dengan melarutkan 0,2781 g FeSO₄ 7H₂O dalam akuades hingga 100 mL.

Sebanyak 1 gram ekstrak dan fraksi dilarutkan dalam etanol hingga mencapai volume 10 mL untuk keperluan pengujian. Larutan tersebut diambil sebanyak 0,2 mL, kemudian dicampurkan dengan 0,6 mL akuades, serta masing-masing 6 mL larutan FeCl₃.6H₂O (20 µmol/mL) dan orto-fenantrolin 0,2%. Campuran diaduk menggunakan vortex dan diinkubasi selama 30 menit pada suhu ruang dalam kondisi gelap. Setelah proses inkubasi, absorbansinya diukur menggunakan spektrofotometer UV-Vis pada panjang gelombang 510 nm (Farah *et al.*, 2023).

Analisis Data

Aktivitas antioksidan dari ekstrak dan fraksi daun mimba dianalisis melalui nilai *Inhibition Concentration* (IC_{50}), yang dihitung berdasarkan persamaan regresi linier antara konsentrasi sampel uji (x) dan persentase inhibisi radikal bebas (y). Persamaan regresi yang diperoleh berbentuk $y = bx + a$, dan nilai IC_{50} ditentukan dengan mencari nilai x saat y diset menjadi 50% (Rahmiati, Sari, dan Wahyuni, 2023).

HASIL

Determinasi

Hasil determinasi pada daun mimba diperoleh bahwa sampel daun yang digunakan merupakan *Azadirachta indica* A. Juss dari famili Meliaceae (No. B-813/V/DI.05.07/3/2022).

Ekstraksi

Hasil rendemen ekstrak dan fraksi daun mimba dapat dilihat pada Tabel 1.

Tabel 1. Hasil Rendemen Ekstrak dan Fraksi Daun Mimba

| Rendemen Ekstrak | | | | | |
|--------------------------|-------------|-----------|--------------|----------------|-------------------|
| Bobot Serbuk (g) | Pelarut | Bobot (g) | Rendemen (%) | Bentuk | Warna |
| 1000,01 | Etanol 95% | 71,13 | 7,11 | Ekstrak Kental | Hijau Kehitaman |
| Rendemen Fraksi | | | | | |
| Bobot Ekstrak Kental (g) | Pelarut | Bobot (g) | Rendemen (%) | Bentuk | Warna |
| 71,13 | Air | 23,1 | 32,5 | Ekstrak Kental | Cokelat Kehitaman |
| | n-heksana | 5,8 | 8,15 | Ekstrak Kental | Hijau Kecokelatan |
| | Etil Asetat | 3,3 | 4,64 | Ekstrak Kental | Cokelat Kehitaman |

Penapisan Fitokimia

Hasil penapisan fitokimia ekstrak etanol 95% daun mimba dapat dilihat pada Tabel 2.

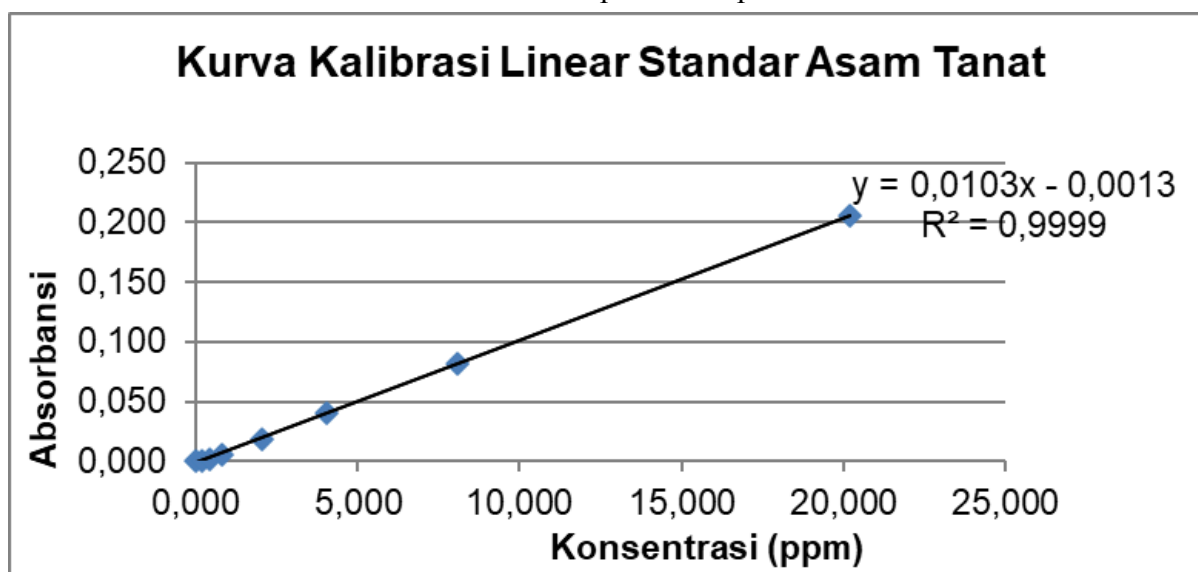
Tabel 2. Penapisan Fitokimia Ekstrak Etanol 95% Daun Mimba

| Senyawa Kimia | Ekstrak Etanol 95% | Keterangan |
|---------------|--------------------|-----------------------------------|
| Alkaloid | + (M) | Endapan putih |
| Alkaloid | + (D) | Endapan merah jingga |
| Alkaloid | + (B) | Endapan cokelat |
| Fenolik | + | Endapan biru kehitaman |
| Flavonoid | + | Warna merah gelap |
| Saponin | + | Buih stabil |
| Terpenoid | + | Warna merah keunguan |
| Steroid | - | Tidak memberikan warna hijau-biru |
| Glikosida | + | Cincin ungu pada batas cairan |

Keterangan: (+) hasil positif, (-) hasil negatif, (M) Mayer, (D) Dragendorff, (B) Bouchardat

Uji Total Fenolik

Hasil kurva kalibrasi standar asam tanat dapat dilihat pada Gambar 1. Sementara hasil uji total fenolik ekstrak dan fraksi daun mimba dapat dilihat pada Tabel 3.



Gambar 1. Kurva Kalibrasi Baku Standar Asam Tanat

Tabel 3. Hasil Total Fenolik Ekstrak dan Fraksi Daun Mimba

| Sampel | Absorbansi | Fenolik (ppm) | RSD | Total fenolik (mg TAE/kg) |
|--------------------|------------|---------------|-------|---------------------------|
| Ekstrak Etanol 95% | 0,230 | 22,489 | 0,003 | 66006,470 |
| Fraksi Air | 0,157 | 15,430 | 0,002 | 45288,380 |
| Fraksi n-heksana | 0,045 | 4,466 | 0,011 | 13108,640 |
| Fraksi Etil Asetat | 0,033 | 3,337 | 0,029 | 9795,110 |

Keterangan: Absorbansi dan konsentrasi fenolik (ppm) diperoleh dari nilai rata-rata pengujian 3 kali replikasi sampel. TAE: *Tanic Acid Equivalent*

Uji Antioksidan

Hasil pengujian aktivitas antioksidan dengan DPPH dan FRAP dapat dilihat pada Tabel 4.

Tabel 4. Hasil Uji Aktivitas Antioksidan Daun Mimba

| Sampel | IC50 (ppm) | |
|--------------------|------------|---------|
| | DPPH | FRAP |
| Ekstrak Etanol 95% | 109,695 | 82,315 |
| Fraksi Air | 117,161 | 115,661 |
| Fraksi n-Heksana | 147,269 | 326,554 |
| Fraksi Etil Asetat | 131,462 | 737,732 |
| Vitamin C | 3,284 | 6,468 |

PEMBAHASAN

Daun mimba sebagai sampel uji yang diperoleh dari BALITTRO terlebih dahulu menjalani proses determinasi. Berdasarkan hasil determinasi, sampel yang digunakan adalah tanaman *Azadirachta indica* A. Juss. Tujuan dilakukan determinasi adalah untuk memastikan identitas yang benar dari sampel tersebut sebelum digunakan lebih lanjut sebagai sampel penelitian.

Selanjutnya, daun mimba diekstraksi dengan cara maserasi. Metode maserasi dipilih karena dalam prosedurnya menggunakan peralatan yang mudah didapat, sederhana, namun juga memiliki kemampuan untuk menarik senyawa kimia dari tumbuhan secara optimal (Asworo & Widwastuti, 2023). Metode maserasi sering diterapkan pada ekstraksi daun dari berbagai tanaman, seperti daun kelor, daun anggur, daun kopi, dan daun jambu. Pada proses maserasi daun mimba, pelarut yang digunakan adalah etanol 95%, sesuai dengan penelitian Fitriah (2017) yang juga menggunakan pelarut serupa untuk ekstraksi daun mimba. Etanol 95% diharapkan dapat menarik senyawa metabolit sekunder secara maksimal yang berfungsi sebagai antioksidan (Hakim & Saputri, 2020).

Rendemen dipengaruhi oleh beberapa faktor seperti jenis pelarut, metode ekstraksi, durasi ekstraksi, dan sifat fisikokimia senyawa aktif. Dalam penelitian ini, ekstraksi daun mimba dengan etanol 95% menghasilkan rendemen sebesar 7,11%, yang mencerminkan efisiensi metode ini dalam mengekstraksi senyawa aktif yang ada pada daun mimba.

Penelitian ini menggunakan tidak hanya ekstrak etanol 95%, tetapi juga fraksi daun mimba sebagai sampel uji.

Fraksinasi dilakukan untuk memisahkan senyawa berdasarkan perbedaan tingkat kepolaran. Ekstrak kental daun mimba dipartisi menggunakan corong pisah dengan tiga jenis pelarut, yaitu n-heksana, air, dan etil asetat. Penggunaan pelarut n-heksana yang bersifat nonpolar bertujuan untuk menarik senyawa nonpolar (klorofil, steroid, dan terpenoid) yang mungkin masih ada dalam ekstrak etanol daun mimba. Etil asetat digunakan untuk memisahkan senyawa dari golongan flavonoid atau polifenol, sementara pelarut air melarutkan senyawa polar seperti golongan fenol (Mahardika *et al.*, 2020).

Hasil fraksinasi menunjukkan bahwa fraksi air memiliki rendemen terbesar, yaitu 32,5%, dibandingkan fraksi lainnya. Rendemen yang tinggi pada fraksi air menunjukkan dominasi kandungan senyawa polar dalam daun mimba, dan hal ini mengindikasikan potensi biologis yang kuat dari golongan senyawa tersebut. Hasil ini sejalan dengan fungsi metabolit sekunder polar yang sering dikaitkan dengan aktivitas antioksidan. Hasil lengkap rendemen daun mimba dapat dilihat pada Tabel 1.

Salah satu tahapan awal yang krusial dalam penelitian ini adalah uji penapisan fitokimia terhadap ekstrak daun mimba. Tujuan dari penapisan ini adalah untuk mengidentifikasi kandungan senyawa metabolit sekunder dalam sampel. Uji fitokimia dilakukan pada ekstrak etanol 95% daun mimba dan mencakup berbagai pengujian terhadap kelompok metabolit sekunder. Hasil analisis menunjukkan bahwa ekstrak tersebut mengandung senyawa alkaloid, fenolik, flavonoid, saponin, terpenoid, dan glikosida. Sementara itu, senyawa steroid tidak terdeteksi dalam pengujian tersebut. Hasil penapisan fitokimia dapat dilihat

pada Tabel 2. Hasil ini sejalan dengan penelitian yang dilakukan oleh Simatupang (2023), yang juga menemukan bahwa daun mimba positif mengandung metabolit sekunder yang serupa (Simatupang *et al.*, 2023).

Kandungan senyawa fenolik merupakan salah satu faktor penting yang berperan dalam menentukan aktivitas antioksidan pada tanaman tradisional. Senyawa fenolik umumnya terdiri atas satu atau lebih gugus fenol yang terikat pada struktur cincin aromatik. Keberadaan gugus hidroksil dalam struktur tersebut menyebabkan senyawa ini mudah mengalami oksidasi. Dalam proses ini, senyawa fenolik mampu membentuk radikal fenoksi yang stabil melalui donasi atom hidrogen kepada radikal bebas (Maryam & Suhaenah, 2023).

Untuk mengetahui jumlah senyawa fenolik dalam sampel, dilakukan pengujian kadar total fenolik. Hasil pengujian menunjukkan bahwa ekstrak etanol 95% memiliki jumlah senyawa fenolik tertinggi, yaitu 66006,47 mg TAE/kg. Rincian hasil pengujian total fenolik dapat dilihat pada Tabel 3. Persamaan regresi linier yang digunakan untuk menentukan kandungan total fenolik adalah $y = 0,0103x - 0,0013$, dengan koefisien korelasi (r) sebesar 0,9999. Grafik kurva kalibrasi baku standar untuk penentuan total fenolik dapat dilihat pada Gambar 1.

Pengujian total fenolik dan hubungannya dengan aktivitas antioksidan pada tanaman tradisional yang memiliki kedekatan kekerabatan dengan mimba juga telah diteliti sebelumnya. Penelitian oleh Ahmad *et al.* (2012) mengeksplorasi kandungan total fenolik dan aktivitas antioksidan pada daun mindi (*Melia azedarach* Linn.), yang menunjukkan bahwa ekstrak etanol daun mindi juga

memiliki kandungan total fenolik terbesar dibandingkan ekstrak eter dan ekstrak air. Hal ini kemungkinan disebabkan karena tingginya kandungan gugus hidroksil yang terdapat pada ekstrak etanol. Selain daun mindi, telah dilakukan pula penelitian mengenai kandungan fenolik dan antioksidan pada kulit pohon mahoni (*Swietenia macrophylla*) dengan hasil uji nilai fenolik yang tinggi pada ekstrak etanol (Borah *et al.*, 2022). Mindi, Mahoni, dan Mimba merupakan beberapa tanaman yang termasuk ke dalam famili *Meliaceae*.

Aktivitas antioksidan suatu tanaman memiliki korelasi positif dengan kandungan total senyawa fenolik yang dimilikinya. Evaluasi aktivitas antioksidan pada ekstrak dan fraksi daun mimba dilakukan menggunakan dua metode, yaitu DPPH dan FRAP. Pada metode DPPH, pengujian didasarkan pada kemampuan senyawa antioksidan untuk mendonorkan atom hidrogen guna menstabilkan elektron bebas dari radikal DPPH. Proses ini mengubah radikal diphenylpicrylhydrazyl menjadi bentuk non-radikal diphenylpicrylhydrazine, yang ditandai dengan perubahan warna larutan dari ungu menjadi kuning (Mutmainna Tamrin *et al.*, 2024). Sementara itu, metode FRAP mengukur aktivitas antioksidan berdasarkan kemampuan senyawa uji dalam mereduksi kompleks ferri-tripiryridyl-triazine (Fe(III)-TPTZ) menjadi ferro-tripiryridyl-triazine (Fe(II)-TPTZ). (Nwachukwu *et al.*, 2021).

Pada pengujian antioksidan dengan metode FRAP, digunakan ligan fenantrolin sebagai pengganti TPTZ, namun dengan prinsip kerja yang serupa, yaitu mereduksi besi (III)-fenantrolin menjadi besi (II)-fenantrolin. Kompleks ini menghasilkan warna merah jingga yang

berasal dari ion $[\text{Fe}(\text{C}_{12}\text{H}_8\text{N}_2)_3]^{2+}$ (Munteanu & Apetrei, 2021). Penggunaan orto fenantrolin sebagai pengganti TPTZ karena fenantrolin dapat membentuk kompleks yang cukup stabil dengan Fe^{2+} dibandingkan TPTZ. Fenantrolin juga lebih umum digunakan dalam analisis kimia, sehingga bisa menjadi alternatif yang lebih ekonomis dan praktis.

Pengukuran aktivitas antioksidan dilakukan berdasarkan nilai IC_{50} , yaitu konsentrasi sampel yang diperlukan untuk menghambat 50% aktivitas radikal bebas. Hasil uji menggunakan metode DPPH dan FRAP menunjukkan bahwa ekstrak etanol 95% memiliki nilai IC_{50} terendah, masing-masing sebesar 109,695 ppm dan 82,315 ppm, yang mengindikasikan aktivitas antioksidan tertinggi dibandingkan fraksi lainnya. Hal ini kemungkinan disebabkan oleh kandungan total fenolik yang tinggi dalam ekstrak tersebut, serta adanya senyawa bioaktif lain seperti alkaloid, flavonoid, dan terpenoid dalam sampel daun mimba yang juga berfungsi sebagai antioksidan (Seriana *et al.*, 2021).

Rincian hasil pengujian aktivitas antioksidan menggunakan metode DPPH dan FRAP disajikan pada Tabel 4. Berdasarkan nilai IC_{50} yang diperoleh, ekstrak dan fraksi daun mimba menunjukkan variasi tingkat aktivitas antioksidan yang berkisar dari kategori kuat hingga lemah. Kriteria pengelompokan nilai IC_{50} mencakup: < 50 ppm (sangat kuat), 50–100 ppm (kuat), 100–200 ppm (sedang), dan > 200 ppm (lemah) (Parentek *et al.*, 2024).

Metode DPPH dan FRAP merupakan dua pendekatan yang paling umum digunakan dalam penelitian antioksidan. Penggunaan uji DPPH dan FRAP secara bersamaan memberikan

keunggulan untuk mengevaluasi aktivitas antioksidan karena mencakup berbagai mekanisme reaksi yang berbeda. DPPH merupakan metode uji antioksidan yang sederhana serta cocok untuk mengevaluasi aktivitas penangkapan radikal bebas, terutama untuk senyawa lipofilik. Metode FRAP lebih relevan untuk senyawa hidrofilik yang memiliki kapasitas reduksi total. Beberapa contoh penelitian lain yang juga menggunakan lebih dari satu metode uji dalam penentuan aktivitas antioksidan yaitu sebagaimana penelitian Rohmah (2022) yang meneliti aktivitas antioksidan *Zingiber zerumbet* (L.) Roscoe ex Sm. dengan metode PPH, FIC, FRAP, dan ABTS, serta Guediri *et al.* (2021) yang meneliti aktivitas antioksidan *Solanum nigrum* dengan metode DPPH, FRAP, dan juga voltametri (Guediri *et al.*, 2021; Rohmah, 2022).

Berdasarkan hasil penelitian, kedua metode uji antioksidan ini menunjukkan hasil yang berkorelasi dengan nilai total fenolik, sehingga dapat disimpulkan pula bahwa kandungan senyawa fenolik berperan penting dalam aktivitas antioksidan pada daun mimba.

KESIMPULAN

Berdasarkan hasil penelitian, ekstrak etanol 95% daun mimba mengandung senyawa metabolit sekunder berupa alkaloid, fenolik, flavonoid, saponin, terpenoid, dan glikosida. Kadar total fenolik untuk ekstrak etanol 95%, fraksi air, n-heksana, dan etil asetat daun mimba masing-masing adalah 66006,470; 45288,380; 45288,380; 9795,110 mg TAE/kg sampel asam tanat. Hasil uji aktivitas antioksidan menggunakan metode DPPH dan FRAP menunjukkan nilai IC_{50} untuk ekstrak etanol 95%, fraksi air, n-heksana, dan etil asetat adalah 109,695;

117,161; 147,269; dan 131,462 ppm pada DPPH, serta 82,315; 115,661; 326,554; dan 737,732 ppm pada FRAP. Berdasarkan hasil yang diperoleh, dapat disimpulkan bahwa daun mimba (*Azadirachta indica* A. Juss) menunjukkan aktivitas antioksidan dengan tingkat potensi yang bervariasi, mulai dari kategori kuat hingga lemah.

UCAPAN TERIMA KASIH

Penulis menyampaikan apresiasi dan terima kasih kepada Program Studi S1 Farmasi Universitas Sebelas Maret (UNS) serta Institut Sains dan Teknologi Nasional (ISTN) atas dukungan dan fasilitas yang diberikan dalam pelaksanaan penelitian ini.

DAFTAR PUSTAKA

- Ahmad, D., Avanapu, S. R., Shaik, R., & Ibrahim, M. (2012). Phytochemical Studies and Antioxidant Activity of *Melia azedarach* Linn Leaves by DPPH Scavenging Assay. *International Journal of Pharmaceutical Applications*, 3(1), 271–276.
- Asworo, R. Y., & Widwastuti, H. (2023). Pengaruh Ukuran Serbuk Simplisia dan Waktu Maserasi terhadap Aktivitas Antioksidan Ekstrak Kulit Sirsak. *Indonesian Journal of Pharmaceutical Education*, 3(2), 256–263. <https://doi.org/10.37311/ijpe.v3i2.19906>
- Borah, A., Selvaraj, S., Holla, S. R., & De, S. (2022). Extraction and Characterization of Total Phenolic and Flavonoid Contents from Bark of *Swietenia macrophylla* and Their Antimicrobial and Antioxidant Properties. *Arabian Journal of Chemistry*, 15(12), 104370. <https://doi.org/10.1016/j.arabjc.2022.104370>
- Departemen Kesehatan Republik Indonesia. (2020). *Farmakope Indonesia* (VI). Jakarta: Kementerian Kesehatan Republik Indonesia
- Farah, V., Nurhasanah, D., & Putra, N. (2023). Peredaman Radikal Bebas Ekstrak Etanol Daun Rosella (*Hibiscus sabdariffa* L.) dengan Metode Frap. *Journal of Pharmaceutical*, 1(1), 21–29. <https://doi.org/10.30989/jop.v1i1.866>
- Fitriah, R. (2017). Uji aktivitas antibakteri ekstrak n- heksana, etil asetat dan etanol daun mimba (*Azadirachta indica* A. Juss) terhadap *Streptococcus mutans*. *Borneo Journal Pharmascientech*, 1(2), 1–10. <http://jurnalstikesborneolestari.ac.id/index.php/borneo/article/view/103>
- Guediri, I., Boubekri, C., Smara, O., & Lanez, T. (2021). Total Phenolic Contents and Determination of Antioxidant Activity by DPPH, FRAP, and Cyclic Voltammetry of the Fruit of *Solanum nigrum* (Black nightshade) Growing in the South of Algeria. *Asian Journal Of Research in Chemistry*, 14(1), 1–9. <https://doi.org/10.5958/0974-4150.2021.00008.0>
- Hakim, A. R., & Saputri, R. (2020). Narrative Review: Optimasi Etanol sebagai Pelarut Senyawa Flavonoid dan Fenolik. *Jurnal Surya Medika (JSM)*, 6(1 SE-Articles), 177–180. <https://doi.org/10.33084/jsm.v6i1.1641>
- Lexia, N., & Ngibad, K. (2021). Aplikasi Spektrofotometri terhadap Penentuan Kadar Besi Secara Kuantitatif dalam Sampel Air. *Jurnal Pijar Mipa*, 16(2), 242–246. <https://doi.org/10.29303/jpm.v16i2.1908>
- Li'aini, A. S., Wibawa, I. P. A. H., & Lugrayasa, I. N. (2021). Karakterisasi Aktivitas Antioksidan

- Ekstrak Daun Mimba (*Azadirachta Indica* A. Juss) dari Desa Jagaraga, Kecamatan Sawan, Kabupaten Buleleng, Bali. *Buletin Plasma Nutfah*, 27(1), 51. <https://doi.org/10.21082/blpn.v27n1.2021.p51-56>
- Mahardika, R. G., Roanisca, O., & Sari, F. I. P. (2020). Fenolik Total Fraksi Etil Asetat Daun Pelawan (*Tristanopsis merguensis* Griff.). *Jurnal Sains Dan Edukasi Sains*, 3(1), 8–14. <https://doi.org/10.24246/juses.v3i1p8-14>
- Manongko, P. S., Sangi, M. S., & Momuat, L. I. (2020). Uji Senyawa Fitokimia dan Aktivitas Antioksidan Tanaman Patah Tulang (*Euphorbia tirucalli* L.). *Jurnal MIPA*, 9(2), 64. <https://doi.org/10.35799/jmuo.9.2.2020.28725>
- Maryam, S., & Suhaenah, A. (2023). Analisis Kandungan Senyawa Fenolik dan Tanin Pada Isolat Fungi Endofit (IFEBK20) Bunga Kersen (*Muntingia calabura* L) dengan Metode Spektrofotometri UV-Vis. *Makassar Pharmaceutical Science Journal*, 1(2), 35–42. <https://journal.farmasi.umi.ac.id/index.php/mpsj>
- Monangin, S. M., Yudistira, A., & Rumondor, E. M. (2024). Uji Aktivitas Antiosidan Ekstrak Etanol Spons *Aaptos aaptos* yang Diperoleh dari Pantai Parentek Kabupaten Minahasa. *Pharmacon*, 13(2), 580–585. <https://doi.org/10.35799/pha.13.2024.55063>
- Munteanu, I. G., & Apetrei, C. (2021). Analytical Methods Used in Determining Antioxidant Activity: A Review. *International Journal of Molecular Sciences*, 22(7). <https://doi.org/10.3390/ijms22073380>
- Mutmainna Tamrin, Achmad Kadri Ansyori, & Hayatus Sa'adah. (2024). Uji Aktivitas Antioksidan Ekstrak Etanol Biji Buah Nyirih (*Xylocarpus granatum*) dengan Metode DPPH secara Spektrofotometri UV-Vis. *Jurnal Riset Kefarmasian Indonesia*, 6(2), 233–248. <https://doi.org/10.33759/jrki.v6i2.527>
- Naz, H., Aisha Akram, N., Ashraf, M., Ingo Hefft, D., & Latief Jan, B. (2022). Leaf Extract of Neem (*Azadirachta indica*) Alleviates Adverse Effects of Drought in Quinoa (*Chenopodium quinoa* Willd.) Plants through Alterations in Biochemical Attributes and Antioxidants. *Saudi Journal of Biological Sciences*, 29(3), 1367–1374. <https://doi.org/10.1016/j.sjbs.2022.01.038>
- Nwachukwu, I. D., Sarteshnizi, R. A., Udenigwe, C. C., & Aluko, R. E. (2021). A Concise Review of Current In Vitro Chemical and Cell-Based Antioxidant Assay Methods. *Molecules (Basel, Switzerland)*, 26(16). <https://doi.org/10.3390/molecules26164865>
- Parentek, P., Minahasa, K., Rumondor, E. M., Yudistira, A., & Wewengkang, D. S. (2024). Penentuan Nilai IC 50 Karang Lunak *Lobophytum sp.* dan *Sarcophyton sp.* 7(2), 78–83. <https://doi.org/10.35799/pmj.v7i2.58117>
- Rahmiati, N., Sari, R., & Wahyuni, T. S. (2023). Phytochemical and Antioxidant Activity Evaluation of Lime (*Citrus aurantifolia*) Juice Powder. *Jurnal Farmasi Galenika (Galenika Journal of Pharmacy) (e-Journal)*, 9(2), 197–207. <https://doi.org/10.22487/j24428744.2023.v9.i2.16347>
- Rohmah, J. (2022). Antioxidant Activities Using DPPH, FIC, FRAP, And ABTS Methods From Ethanolic Extract Of Lempuyang Gajah Rhizome (*Zingiber zerumbet* (L.)

- Roscoeex Sm.). *Jurnal Kimia Riset*, 7(2), 152–166. <https://doi.org/10.20473/jkr.v7i2.34493>
- Ruwandha, D., Fitriyani, D., & Iskandar, D. (2021). Uji Aktivitas Tanin Daun Mimba (*Azadirachta indica*) terhadap Bakteri *Salmonella typhi*. *Jurnal Kimia Riset*, 6(1 SE-Articles), 77–85. <https://doi.org/10.20473/jkr.v6i1.24848>
- Seriana, I., Akmal, M., Darusman, D., Wahyuni, S., Khairan, K., & Sugito, S. (2021). Neem Leaf (*Azadirachta indica* A. Juss) Ethanolic Extract on the Liver and Kidney Function of Rats. *TheScientificWorldJournal*, 2021, 7970424. <https://doi.org/10.1155/2021/7970424>
- Simatupang, G. M. K., Limanan, D., Ferdinal, F., & Yulianti, E. (2023). Identifikasi Fitokimia dan Kapasitas Total Antioksidan Daun Mimba (*Azadirachta indica* A. Juss) serta Uji Toksisitasnya terhadap Larva *Artemia salina* Leach. *Tarumanagara Medical Journal*, 5(1), 59–66. <https://doi.org/10.24912/tmj.v5i1.24383>
- Spano, D., & Zollo, M. (2012). Tumor microenvironment: A main actor in the metastasis process. *Clinical and Experimental Metastasis*, 29(4), 381–395. <https://doi.org/10.1007/s10585-012-9457-5>
- Trivedi, A., Fatima, N., Husain, I., & Misra, A. (2019). An Update on the Therapeutic Potential of Neem and Its Active Constituents: a Panacea for All Diseases. *Era's Journal Of Medical Research*, 6(1), 110–117. <https://doi.org/10.24041/ejmr2019.116>
- Werdiningsih, W., & Fitria, F. (2024). *Analisis Kadar Senyawa Tanin Ekstrak Etanol Daun Pepaya Jepang* (*Cnidocolus aconitifolius*) Menggunakan Metode Spektrofotometri UV-Vis. 12(2), 2506–2517. <https://doi.org/10.33394/bioscientist.v12i2.13979>