

doi DOI : 10.35311/jmpi.v11i1.723

Uji Aktivitas Antioksidan Ekstrak Daun Murbei (*Morus alba*) Menggunakan Metode BCB, CUPRAC, dan FRAP

Mirawati Salampe^{1*}, Sitti Rahimah¹, Syamsu Nur¹, Sukamto S. Mamada², Frans Syukur Biring¹, Kurnia Keyzia¹, Friska Nissa Matandung¹, Deslin Payung¹, Annisa Amirah Rahman¹, Nurzadrina Wahyuddin¹, Velyostri Ivone P.¹

¹Fakultas Ilmu Kesehatan, Universitas Almarisah Madani, Indonesia

²Fakultas Farmasi, Universitas Hasanuddin, Indonesia

Sitasi: Salampe, M., Rahimah, S., Nur, S., Mamada, S. S., Biring, F. S., Keyzia, K., Matandung, F. N., Payung, D., Rahman, A. A., Wahyuddin, N., & Ivone, V. P. (2025). Uji Aktivitas Antioksidan Ekstrak Daun Murbei (*Morus alba*) Menggunakan Metode BCB, CUPRAC, dan FRAP. *Jurnal Mandala Pharmacon Indonesia*, 11(1), 149–157. <https://doi.org/10.35311/jmpi.v11i1.723>

Submitted: 20 Desember 2024

Accepted: 11 April 2025

Published: 10 Juni 2025

*Penulis Korespondensi:
Mirawati Salampe
Email:
mirnasalampe@gmail.com



Jurnal Mandala Pharmacon Indonesia is licensed under a Creative Commons Attribution 4.0 International License

ABSTRAK

Morus alba dikenal sebagai sumber senyawa antioksidan alami yang dapat menangkal radikal bebas yang berkontribusi terhadap penyakit degeneratif. Penelitian ini bertujuan untuk mengidentifikasi aktivitas antioksidan dari ekstrak metanol dan fraksi daun *M. alba* menggunakan metode BCB, CUPRAC, dan FRAP. Ekstraksi dilakukan menggunakan pelarut metanol, kemudian difraksinasi dengan *n*-heksana, etil asetat, *n*-butanol, dan air. Metode BCB digunakan untuk menentukan IC₅₀, metode CUPRAC untuk mengukur kapasitas antioksidan dalam GAEAC (*Gallic Acid Equivalent Antioxidant Capacity*), dan metode FRAP untuk menilai kemampuan reduksi ion besi dalam FeEAC (*Ferri Sulfate Equivalent Antioxidant Capacity*). Pengujian aktivitas antioksidan pada metode FRAP dilakukan dengan reagen dapar asetat, TPTZ, dan FeCl₃ yang diukur menggunakan *microplate reader* pada panjang gelombang 595 nm berdasarkan kemampuan sampel dalam mereduksi ion besi. Metode CUPRAC menggunakan reagen CuCl₂ 10 mM, *neocuproine* 7,5 mM, dan ammonium sulfat 1 M. Hasil uji BCB menunjukkan bahwa fraksi *n*-heksana memiliki aktivitas antioksidan tertinggi dengan IC₅₀ sebesar 64,85 ppm dibandingkan dengan etil asetat (437,23 ppm). Pada CUPRAC, ekstrak metanol menunjukkan kapasitas tertinggi (342,74 µM/g), diikuti oleh etil asetat (342,43 µM/g). Uji FRAP menunjukkan fraksi etil asetat memiliki aktivitas tertinggi (809,28 mmol/g), diikuti oleh metanol (761,03 mmol/g), dan *n*-butanol (613,03 mmol/g). Ekstrak metanol, fraksi etil asetat, dan *n*-butanol menunjukkan kemampuan signifikan dalam mereduksi ion Cu²⁺ dan Fe³⁺ dibandingkan dengan *n*-heksana dan air. Hasil ini menunjukkan bahwa aktivitas antioksidan ekstrak *M. alba* bervariasi tergantung pada fraksi dan metode yang digunakan. Oleh karena itu, pemilihan metode yang tepat sangat penting dalam mengevaluasi potensi antioksidan dari suatu sampel.

Kata Kunci : *Morus alba*, Aktivitas Antioksidan, BCB, CUPRAC, FRAP

ABSTRACT

Morus alba is known as a source of natural antioxidant compounds that can neutralize free radicals contributing to degenerative diseases. This study aims to identify the antioxidant activity of methanol extract and fractions of *M. alba* leaves using BCB, CUPRAC, and FRAP methods. Extraction was carried out using methanol as a solvent, followed by fractionation with *n*-hexane, ethyl acetate, *n*-butanol, and water. The BCB method was used to determine IC₅₀, the CUPRAC method to measure antioxidant capacity in GAEAC (*Gallic Acid Equivalent Antioxidant Capacity*), and the FRAP method to assess the reduction ability of iron ions in FeEAC (*Ferri Sulfate Equivalent Antioxidant Capacity*). Antioxidant activity testing by the FRAP method was conducted with acetate buffer, TPTZ, and FeCl₃ reagents, measured using a microplate reader at a wavelength of 595 nm based on the sample's ability to reduce iron ions. The CUPRAC method used CuCl₂ 10 mM, *neocuproine* 7.5 mM, and ammonium sulfate 1 M reagents. The BCB test results showed that the *n*-hexane fraction had the highest antioxidant activity with an IC₅₀ of 64.85 ppm compared to ethyl acetate (437.23 ppm). In the CUPRAC method, the methanol extract showed the highest capacity (342.74 µM/g), followed by ethyl acetate (342.43 µM/g). The FRAP test showed that the ethyl acetate fraction had the highest activity (809.28 mmol/g), followed by methanol (761.03 mmol/g), and *n*-butanol (613.03 mmol/g). The methanol extract, ethyl acetate fraction, and *n*-butanol showed significant ability to reduce Cu²⁺ and Fe³⁺ ions compared to *n*-hexane and water. These results indicate that the antioxidant activity of *M. alba* extract varies depending on the fraction and method used. Therefore, selecting the appropriate method is crucial in evaluating the antioxidant potential of a sample.

Keywords : *Morus alba*, Antioxidant Activity, BCB, CUPRAC, FRAP

PENDAHULUAN

Kesadaran akan pentingnya menjaga kesehatan dan mencegah penyakit terus meningkat. Hal ini mendorong pencarian sumber alami yang kaya akan antioksidan. Radikal bebas yang dihasilkan dari aktivitas metabolisme serta paparan faktor eksternal seperti polusi, radiasi, dan gaya hidup yang kurang sehat dapat menyebabkan stres oksidatif. Kondisi ini berkontribusi terhadap berbagai penyakit degeneratif, termasuk kanker, gangguan kardiovaskular, diabetes, dan penyakit neurodegeneratif (Lü *et al.*, 2010; Halliwell, 2024). Oleh karena itu, keberadaan senyawa antioksidan yang mampu menetralkan radikal bebas sangat diperlukan untuk menjaga kesehatan dan mengurangi risiko penyakit.

Tanaman telah lama dikenal sebagai sumber utama senyawa antioksidan alami. Salah satu tanaman yang banyak dikaji karena potensinya adalah murbei putih (*Morus alba*) yang dibudidayakan secara luas di berbagai wilayah dunia, termasuk Asia dan Eropa. Daun *M. alba* tidak hanya memiliki nilai gizi tinggi tetapi juga mengandung beragam senyawa bioaktif, seperti flavonoid, polifenol, dan asam fenolik yang berperan sebagai antioksidan kuat. Beberapa penelitian telah menunjukkan bahwa ekstrak daun *M. alba* memiliki kapasitas antioksidan yang signifikan (Thabti *et al.*, 2012), tetapi informasi mengenai efektivitas masing-masing fraksi ekstraknya masih terbatas.

Komponen antioksidan utama dalam daun *M. alba* diketahui lebih banyak terdapat dalam fraksi yang larut dalam pelarut polar, seperti polifenol dan flavonoid yang memiliki kapasitas antioksidan tinggi. Ekstrak daun *M. alba* mengandung polifenol dengan aktivitas penangkal radikal bebas yang kuat. Flavonol utama yang teridentifikasi dalam ekstrak ini adalah rutin, *isoquercitrin*, dan astragalina, dengan *isoquercitrin* sebagai komponen dominan. Kandungan total flavonol dalam ekstrak daun *M. alba* hampir setara dengan kadar yang ditemukan dalam ekstrak komersial (Kim *et al.*, 2014; Thabti *et al.*, 2012).

Selain komposisi kimianya, metode ekstraksi juga mempengaruhi aktivitas antioksidan daun *M. alba* secara *in vitro*. Studi sebelumnya menunjukkan bahwa ekstrak daun murbei menunjukkan peningkatan kemampuan menangkap radikal ABTS⁺ dan DPPH seiring bertambahnya konsentrasi ekstrak (Cui *et al.*, 2019). Flavonoid yang diekstrak menggunakan etil asetat menunjukkan nilai IC₅₀/EC₅₀ terendah, menandakan potensi antioksidan yang lebih tinggi. Selain itu, ekstrak air daun murbei putih dilaporkan mengandung kadar senyawa fenolik

lebih tinggi dibandingkan dengan ekstrak alkoholiknya.

Korelasi antara aktivitas antioksidan dengan total kandungan fenolik (TPC) dan flavonoid (TFC) semakin menegaskan peran senyawa fenolik sebagai agen antioksidan utama dalam *M. alba* (Polumackanycz, Wesolowski and Viapiana, 2021). Meskipun beberapa studi menunjukkan bahwa ekstrak daun *M. alba* memiliki kapasitas antioksidan yang tinggi, informasi mengenai efektivitas masing-masing fraksi serta perbedaan aktivitasnya berdasarkan metode pengujian masih terbatas (Wang *et al.*, 2013; Kim *et al.*, 2016). Oleh karena itu, penelitian ini bertujuan untuk mengevaluasi dan membandingkan aktivitas antioksidan ekstrak metanol serta fraksi daun *M. alba* menggunakan tiga metode berbeda, yaitu BCB (*β-Carotene Bleaching*), CUPRAC (*Cupric Reducing Antioxidant Capacity*), dan FRAP (*Ferric Reducing Antioxidant Power*).

Masing-masing metode memiliki prinsip kerja yang berbeda, sehingga hasilnya dapat memberikan gambaran yang lebih menyeluruh mengenai kapasitas antioksidan dari ekstrak tersebut. Metode BCB digunakan untuk mengukur kemampuan senyawa dalam mencegah oksidasi beta-karoten, CUPRAC menilai aktivitas antioksidan berdasarkan transfer elektron dengan reagen Cu(II)-*neocuproine*, sementara FRAP mengevaluasi daya reduksi terhadap ion besi (Prieto *et al.*, 2012; Apak *et al.*, 2008; Skroza *et al.*, 2022).

Dalam penelitian ini, dua pertanyaan utama yang ingin dijawab adalah fraksi ekstrak daun *M. alba* mana yang memiliki aktivitas antioksidan paling tinggi dan bagaimana perbedaan hasil aktivitas antioksidan jika dianalisis menggunakan metode yang berbeda. Dengan menjawab pertanyaan tersebut, penelitian ini diharapkan dapat memberikan wawasan lebih mendalam mengenai potensi *M. alba* sebagai sumber antioksidan alami serta mendukung pengembangan produk berbasis tanaman yang bermanfaat bagi kesehatan.

METODE PENELITIAN

Alat

Alat yang digunakan dalam penelitian ini terdiri dari batang pengaduk, botol cokelat, cawan porselin (Pyrex®), corong (Pyrex®), gelas kimia (Iwaki®), gelas ukur (Iwaki®), kaca arloji, labu tentukur (Pyrex®), mikrotube, mikropipet (Dragonlab micropipette®, Socorex, Eppendorf®), pipet volume, pipet tetes, serta sendok tanduk. Selain itu, digunakan juga beberapa instrumen laboratorium seperti spektrofotometer UV-Vis (Shimadzu UV-1800), timbangan analitik (Mettler Toledo®), vial,

microplate (Biologix®), microplate reader (FlexA-200®), pH meter, dan rotary evaporator (Buchi R-100®).

Bahan

Bahan yang digunakan dalam penelitian ini meliputi simplisia daun murbei, aluminium foil, ammonium sulfat, asam galat, aquadest, etanol 96%, metanol, *n*-heksana, etil asetat, *n*-butanol, serta beberapa reagen seperti *beta*-carotene, *linoleic acid*, kloroform, *acetate buffer*, tembaga(II) klorida (CuCl₂), TPTZ, FeCl₃·6H₂O, FeSO₄, asam asetat (CH₃COOH), asam klorida (HCl), besi(III) klorida (FeCl₃), natrium asetat, dan kertas saring.

Proses Ekstraksi dan Fraksinasi

Proses ekstraksi daun *Morus alba* dimulai dengan pengeringan dan penghalusan daun menjadi serbuk yang kemudian diekstraksi menggunakan pelarut metanol melalui metode maserasi. Ekstrak metanol yang diperoleh disaring dan diuapkan menggunakan *rotary evaporator* untuk menghasilkan ekstrak kental.

Selanjutnya, dilakukan fraksinasi bertingkat dengan pelarut berdasarkan kepolarannya. Ekstrak metanol dilarutkan kembali dalam air dan diekstraksi menggunakan corong pisah dengan *n*-heksana untuk memisahkan senyawa non-polar. Kemudian lapisan air yang tersisa diekstraksi dengan etil asetat yang diikuti oleh *n*-butanol, dan selanjutnya diperoleh fraksi sisa (air). Setiap fraksi yang diperoleh dari proses ini diuapkan untuk menghilangkan pelarut dan kemudian dilakukan pengujian aktivitas antioksidan (Abubakar and Haque, 2020).

Uji Aktivitas Antioksidan dengan Metode *Beta*-Carotene Bleaching (BCB)

Larutan beta-karoten disiapkan dengan melarutkan 1 mg beta-karoten dalam 1 mL kloroform, kemudian ditambahkan 50 mL asam linoleat dan 100 mL air distilasi. Campuran ini dihomogenkan dan dihangatkan pada suhu 40°C hingga kloroform menguap dan membentuk emulsi beta-karoten. Selanjutnya, sebanyak 200 µL emulsi beta-karoten diambil dan ditambahkan 20 µL masing-masing fraksi *n*-heksana dan etil asetat ke dalam sumur microplate. Sebagai kontrol, disiapkan sumur kosong yang hanya berisi emulsi beta-karoten tanpa penambahan fraksi.

Campuran ini disimpan pada suhu kamar selama 30 menit, lalu absorbansi awal (A₀) diukur menggunakan *microplate reader* pada panjang gelombang 470 nm. Setelah 30 menit, absorbansi (A₁) diukur kembali pada panjang gelombang yang sama. Data absorbansi digunakan untuk menghitung laju

degradasi (*degradation rate*) beta-karoten dalam setiap sampel (Ashraf *et al.*, 2013; Olugbami, Gbadegesin and Odunola, 2014; Wang *et al.*, 2017).

Pengujian Aktivitas Antioksidan dengan Metode CUPRAC (*Cupric Reducing Antioxidant Capacity*)

Larutan stok asam galat disiapkan dengan melarutkan 5 mg asam galat dalam aquadest hingga volume 5 mL untuk menghasilkan konsentrasi 5.878 µM. Dari larutan stok tersebut, diambil 1 mL dan dicampurkan dengan aquadest hingga volume 10 mL, menghasilkan konsentrasi 587,8 µM. Larutan ini kemudian diencerkan lebih lanjut untuk menghasilkan seri konsentrasi 2.204 µM hingga 70.538 µM. Reagen CUPRAC disiapkan dengan mencampurkan CuCl₂, *neocuproine*, dan ammonium sulfat, kemudian volume disesuaikan dengan aquadest hingga 5 mL. Pada pengujian sampel ekstrak dan fraksi daun murbei, 10 mg ekstrak atau fraksi dilarutkan dalam etanol 96% hingga volume 10 mL. Sebanyak 0,5 mL larutan sampel dipipet, kemudian dicampurkan dengan 3 mL reagen CUPRAC, dan volume disesuaikan hingga 5 mL dengan aquadest. Larutan tersebut diinkubasi selama 30 menit sebelum diukur absorbansinya menggunakan spektrofotometer UV-Vis pada panjang gelombang 454 nm (Nur *et al.*, 2022).

Aktivitas antioksidan sampel dihitung dengan mengukur absorbansi sampel yang dibandingkan dengan seri konsentrasi larutan standar asam galat. Hasilnya dihitung sebagai *Galic Acid Equivalent Antioxidant Capacity* (GAEAC) dalam µM/g sampel menggunakan kurva kalibrasi ($y = bx + a$). Aktivitas antioksidan yang diperoleh digunakan untuk menghitung daya reduksi sampel dengan rumus:

$$GAEAC = \frac{(C \times V \times Fp)}{Bs}$$

Keterangan:

C : Konsentrasi sampel (µM)
V : Volume akhir (mL)
Fp : Faktor pengenceran
Bs : Berat sampel (gram)

Pengujian Aktivitas Antioksidan dengan Menggunakan Metode FRAP (*Ferric Reducing Antioxidant Power*)

Larutan stok ekstrak dan fraksi daun murbei disiapkan dengan melarutkan 10 mg ekstrak atau fraksi dalam etanol 96%, kemudian volume disesuaikan hingga 10 mL. Larutan stok FeSO₄ dibuat dengan melarutkan 10 mg FeSO₄ dalam etanol 96% dan diencerkan menjadi 100 µg/mL.

Larutan reagen FRAP disiapkan melalui pembuatan tiga larutan: larutan dapar asetat pH 3,6,

larutan TPTZ 1 mM, dan larutan FeCl₃ 0,02 M, yang dibuat sesuai prosedur yang telah ditentukan. Untuk pengukuran aktivitas antioksidan, pertama dibuat seri konsentrasi FeSO₄ (5 ppm hingga 25 ppm) yang dicampurkan dengan reagen FRAP, kemudian diinkubasi dan absorbansinya diukur pada panjang gelombang 595 nm menggunakan microplate reader. Pengukuran aktivitas antioksidan pada ekstrak dan fraksi daun murbei dilakukan dengan cara yang serupa, yaitu 50 µL larutan sampel ditambahkan ke dalam microplate, dicampur dengan reagen FRAP, diinkubasi, dan setelah itu absorbansinya diukur (Sulistyowati *et al.*, 2023).

FeEAC (*Ferri Sulfate Equivalent Antioxidant Capacity*) sampel dihitung dengan membandingkan absorbansi sampel dengan kurva kalibrasi larutan standar FeSO₄ menggunakan persamaan $y=bx+a$, di mana y adalah absorbansi sampel dan x adalah aktivitas antioksidan yang dihitung. Aktivitas antioksidan sampel dihitung dalam µMol/gram sampel menggunakan rumus:

$$\text{FeEAC} = \frac{(X \times \frac{1}{1000} \times V_s \times F_p)}{B_s}$$

Keterangan:

- X : Konsentrasi sampel
- V_s : Volume sampel (mL)
- F_p : Faktor pengenceran
- B_s : Berat sampel (gram)

Analisis Data

Setelah perhitungan nilai GAEAC dan FeEAC, hasil yang diperoleh dianalisis secara statistik menggunakan SPSS dengan metode *one-way ANOVA* untuk melihat perbedaan yang signifikan aktivitas antioksidan antara ekstrak dan fraksi daun *M. alba*, dengan nilai $p < 0.05$.

HASIL DAN PEMBAHASAN

Hasil Pengujian Aktivitas Antioksidan dari Fraksi *n*-Heksana dan Etil Asetat Ekstrak Metanol *Morus Alba* Menggunakan Metode BCB

Daun *M. alba* memiliki kandungan senyawa bioaktif yang dikenal dengan kemampuannya sebagai antioksidan. Antioksidan memiliki peran penting dalam melindungi tubuh dari stres oksidatif yang diakibatkan oleh radikal bebas. Daun murbei kaya akan flavonoid, alkaloid, dan asam fenolat, yang semuanya berkontribusi dalam mengurangi kerusakan sel akibat oksidasi. Penelitian menunjukkan bahwa ekstrak daun *M. alba* memiliki kapasitas tinggi untuk menetralkan radikal bebas sehingga mengurangi risiko kerusakan DNA dan sel secara keseluruhan (Przeor *et al.*, 2020).

Beberapa senyawa dalam daun *M. alba* memiliki potensi sebagai antioksidan alami yang

sangat efektif. Kandungan polifenol seperti *phenolic glycoside* dan *phenolic acid (protocatechuic acid-glucoside dan caffeoylquinic)* telah diidentifikasi dalam ekstrak daun *M. alba* (Martín-García *et al.*, 2022). Dengan profil bioaktif yang kaya akan senyawa antioksidan, daun *M. alba* menjadi bahan yang menjanjikan untuk pengembangan obat herbal yang ditujukan untuk pencegahan penyakit akibat stres oksidatif.

Beta-carotene bleaching assay adalah metode yang digunakan untuk menilai tingkat aktivitas antioksidan suatu senyawa atau ekstrak, terutama dalam mencegah oksidasi lipid. Prinsip dasar dari metode ini adalah memantau degradasi (pemudaran) warna orange yang dihasilkan oleh beta-karoten ketika teroksidasi oleh radikal bebas. Beta-karoten adalah pigmen alami yang rentan terhadap oksidasi, terutama ketika terpapar radikal bebas yang memicu peroksidasi lipid. Dalam penelitian ini, beta-karoten dilarutkan dalam fase lipid (dengan asam linoleat) dan kemudian ditambahkan dengan agen pengoksidasi seperti radikal peroksida. Antioksidan yang ditambahkan ke dalam campuran akan melindungi beta-karoten dari pemudaran atau degradasi. Pengukuran dilakukan menggunakan *microplate reader* dengan memantau penurunan absorbansi pada panjang gelombang sekitar 460 nm. Semakin sedikit degradasi beta-karoten, semakin tinggi kapasitas antioksidan sampel yang diuji (Prieto *et al.*, 2012; Lage *et al.*, 2013).

Berdasarkan hasil penelitian, nilai IC₅₀ ekstrak *n*-heksana daun *M. alba* sebesar 64,85 ppm mengindikasikan bahwa ekstrak tersebut memiliki aktivitas antioksidan yang kuat. IC₅₀ adalah konsentrasi dimana 50% radikal bebas berhasil dihambat oleh senyawa atau ekstrak tertentu. Semakin kecil nilai IC₅₀, semakin tinggi tingkat aktivitas antioksidannya. Dengan nilai IC₅₀ sebesar 64,85 ppm, fraksi *n*-heksana daun *M. alba* termasuk dalam kategori antioksidan yang kuat karena dapat menetralkan radikal bebas pada konsentrasi yang relatif rendah (Suriyaprom *et al.*, 2021).

Flavonoid adalah senyawa bioaktif esensial dengan sifat antioksidan yang sangat baik yang ditemukan dalam daun *M. alba*. Telah dilaporkan bahwa ada tiga senyawa baru yang teridentifikasi dalam daun *M. alba* (kaempferol-7-O-glukosida, quercetin-3-O-rhamnosida-7-O-glukosida, dan quercetin 3-O-β-glukosida-7-O-α-rhamnosida) dan 10 senyawa lain yang sudah dikenal (1-asam caffeoylquinat, 5-asam caffeoylquinat, 4-asam caffeoylquinat, asam kafeat, rutin, quercetin-3,7 - d - O - β - d glukopiranosida, quercetin - 3 - O - glukosida, quercetin - 3 - O - (6-malonyl) - β - d - glukopiranosida, kaempferol-3-O-glukopiranosil

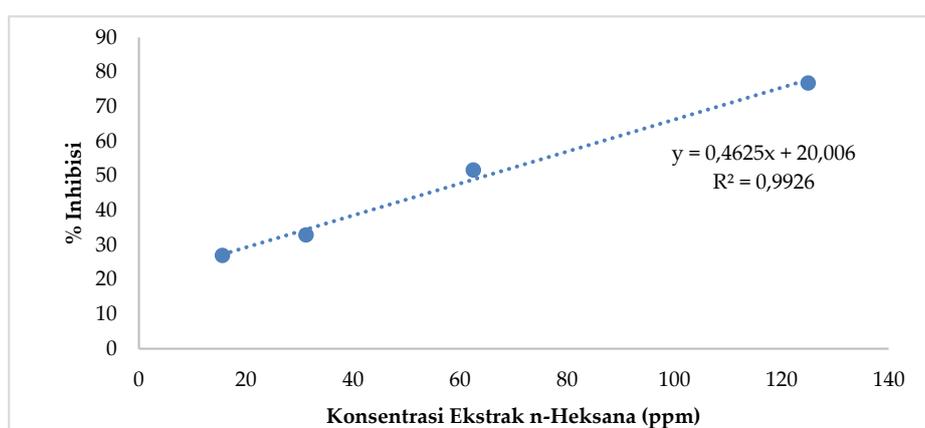
(1,6)-β - d - glukopiranosida, dan kaempferol- 3 - O - (6-malonyl) glukosida) (Thabti *et al.*, 2012).

Beberapa senyawa baru termasuk turunan flavan (moracinflavan A-G) dan turunan 2-arilbenzofuran (moracinfurol A dan B) juga diperoleh dari daun *M. alba*. Senyawa alkaloid,

fenolik, flavonoid, tanin, dan terpen juga telah teridentifikasi. Senyawa rutin, apigenin, dan quercetin merupakan tiga konstituen bioaktif tertinggi diantara kelas fitokimia utama dalam daun *M. alba*. Selain itu, ditemukan keberadaan alkaloid, fitosterol, dan glikosida (Chen *et al.*, 2021).

Tabel 1. Hasil Pengukuran Antioksidan Dari Fraksi *N*-Heksana *M. Alba* Menggunakan Metode BCB

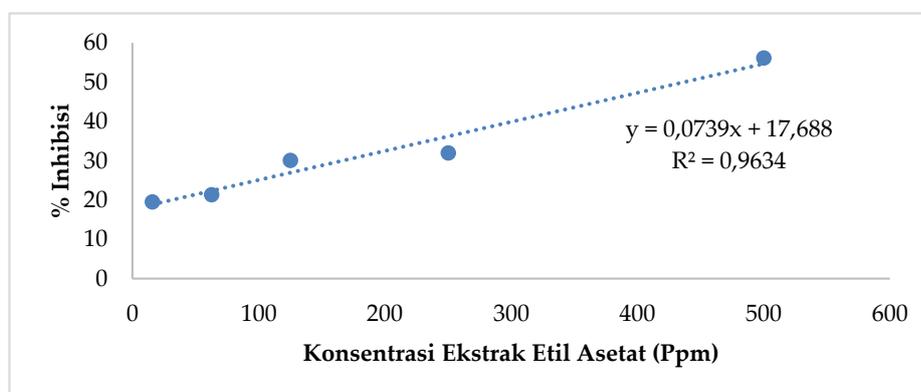
No.	Konsentrasi (ppm)	Degradation Rate			Rata-rata
1	Blanko	0.010256852	0.011758	0.010691	0.010902088
2	15.625	0.008911	0.007252	0.007728	0.007963284
3	31.25	0.007277293	0.007015	0.007645	0.00731235
4	62.5	0.004684	0.003343	0.007769	0.005265383
5	125	0.002964	0.002003461	0.002604	0.002523943



Gambar 1. Grafik Hasil Pengukuran Aktivitas Antioksidan Fraksi *n*-Heksana dengan Metode *Beta-carotene Bleaching Assay* (BCB)

Tabel 2. Hasil Pengukuran Antioksidan dari Fraksi Etil Asetat *Morus alba* Menggunakan Metode BCB

No.	Konsentrasi (ppm)	Degradation Rate			Rata-rata
1	15.625	23.96438	13.67644	20.75453	19.46512
2	62.5	17.64511	21.54833	24.85289	21.34878
3	125	24.78242	32.15932	33.29162	30.07779
4	250	31.65623	30.80622	33.31282	31.92509
5	500	54.12016	60.53989	53.61559	56.09188



Gambar 2. Grafik Hasil Pengukuran Aktivitas Antioksidan Fraksi Etil Asetat dengan Metode BCB

Nilai IC₅₀ dari fraksi etil asetat daun *M. alba* sebesar 437,23 ppm menunjukkan bahwa aktivitas

antioksidan dari fraksi ini sangat lemah. IC₅₀ sebesar 437,23 ppm mengindikasikan fraksi ini memerlukan

konsentrasi yang lebih tinggi untuk menghambat 50% radikal bebas sehingga aktivitas antioksidannya tergolong moderat hingga rendah.

Meskipun hasil penelitian menunjukkan bahwa fraksi etil asetat tidak memiliki aktivitas antioksidan yang signifikan, studi lain melaporkan adanya aktivitas yang ditemukan pada fraksi tersebut dengan metode ABTS, DPPH, dan *reducing power* secara berturut-turut: 37,73; 145; 868 ppm (Cui *et al.*, 2019). Hasil studi lain menunjukkan ekstrak etil asetat daun *M. alba* memiliki kandungan *caffeic*, *chlorogenic*, *p-coumaric acid*, *apigenin*, *luteolin*, dan *epicatechin* (Ibrahim, Ibrahim and Abdul-Jalil, 2023).

Hasil Pengujian Aktivitas Antioksidan dari Ekstrak Daun *M. Alba* Menggunakan Metode CUPRAC dan FRAP

Metode CUPRAC dan FRAP adalah dua teknik yang sering digunakan untuk mengevaluasi kapasitas antioksidan dalam sampel. Metode CUPRAC mengukur kemampuan antioksidan untuk mereduksi ion Cu^{2+} menjadi Cu^+ , menghasilkan kompleks berwarna yang diukur pada panjang gelombang 450 nm. Reaksi kimia yang terjadi pada metode CUPRAC adalah $\text{Cu}^{2+} + 2\text{e}^- \rightarrow \text{Cu}^+$. Ion Cu^{2+}

yang berwarna biru direduksi menjadi Cu^+ yang tidak berwarna. Kemudian $\text{Cu}^+ + \text{Neocuproine} \rightarrow [\text{Cu}(\text{neocuproine})_2]^+$. Ion Cu^+ yang terbentuk kemudian berikatan dengan neocuproine membentuk kompleks berwarna yang dapat dianalisis secara spektrofotometri pada panjang gelombang sekitar 450 nm (Apak *et al.*, 2008, 2010; Özyürek, Güçlü and Apak, 2011).

Sementara metode FRAP mengevaluasi kemampuan senyawa antioksidan dalam mengubah ion Fe^{3+} menjadi Fe^{2+} pada kondisi asam yang menghasilkan kompleks biru pada panjang gelombang 593 nm. Reaksi kimia yang terjadi pada metode FRAP adalah $\text{Fe}^{3+} + \text{TPTZ} + \text{e}^- \rightarrow \text{Fe}^{2+}\text{-TPTZ}$ (berwarna biru). Ion Fe^{3+} yang direduksi menjadi Fe^{2+} kemudian berikatan dengan TPTZ membentuk kompleks biru yang dapat diukur pada panjang gelombang 593 nm (Gohari *et al.*, 2011; Wojtunik-Kulesza, 2020).

Kedua metode ini dapat digunakan untuk menganalisis potensi antioksidan ekstrak daun *Morus alba* dan memberikan gambaran kuantitatif tentang kemampuannya melawan stres oksidatif yang disebabkan oleh radikal bebas.

Tabel 3. Pengukuran Antioksidan dari Ekstrak Metanol, Fraksi *n*-Heksana, Fraksi Etil Asetat, Fraksi *n*-Butanol, Fraksi Air Daun *M. alba* Menggunakan Metode CUPRAC dan FRAP

No.	Sampel	GAEAC CUPRAC ($\mu\text{M/g}$)	FeEAC FRAP (mmol/gram)
1	Ekstrak metanol	342,74	761,03
2	Fraksi <i>n</i> -heksana	159,71	603,03
3	Fraksi etil asetat	342,43	809,28
4	Fraksi <i>n</i> -butanol	335,95	613,03
5	Fraksi air	119,28	431,53

Berdasarkan data pada Tabel 3, aktivitas antioksidan yang diukur menggunakan metode CUPRAC menunjukkan bahwa ekstrak metanol memiliki nilai GAEAC tertinggi, yaitu 342,74 $\mu\text{M/g}$, diikuti oleh fraksi etil asetat dan fraksi *n*-butanol yang memiliki nilai GAEAC sebesar 342,43 dan 335,95 $\mu\text{M/g}$. Sedangkan fraksi *n*-heksana dan fraksi air menunjukkan nilai GAEAC yang lebih rendah, masing masing 159,71 $\mu\text{M/g}$ dan 119,28 $\mu\text{M/g}$. Aktivitas antioksidan yang tinggi pada ekstrak metanol dan fraksi etil asetat menunjukkan bahwa senyawa yang memiliki kapasitas antioksidan dalam daun *M. alba*, seperti polifenol dan flavonoid lebih larut dalam pelarut polar dan memiliki kemampuan lebih baik dalam mereduksi ion Cu^{2+} (Nur *et al.*, 2022).

Hasil yang serupa juga terlihat pada pengujian menggunakan metode FRAP yang mengukur kapasitas mereduksi ion Fe^{3+} . Fraksi etil

asetat memiliki nilai FeEAC tertinggi, yaitu 809,28 mmol/g, diikuti oleh ekstrak metanol (761,03 mmol/g) dan fraksi *n*-butanol (613,03 mmol/g). Sementara fraksi *n*-heksana dan fraksi air menunjukkan nilai FeEAC yang lebih rendah, yaitu 603,03 dan 431,53 mmol/g. Hasil ini menunjukkan bahwa fraksi etil asetat tidak hanya memiliki aktivitas antioksidan yang tinggi pada pengujian CUPRAC, tetapi juga pada pengujian FRAP. Kedua metode ini menunjukkan bahwa senyawa-senyawa aktif dalam fraksi etil asetat memiliki kemampuan yang lebih baik dalam menangkap dan menetralkan radikal bebas, baik dalam bentuk Cu^{2+} maupun Fe^{3+} yang kemungkinan terkait dengan kandungan flavonoid dan polifenol dalam fraksi tersebut (Kim *et al.*, 2014; Thabti *et al.*, 2012).

Analisis statistik *one-way ANOVA* pada kedua nilai GAEAC dan FeEAC menunjukkan

bahwa ekstrak metanol dan fraksi etil asetat memiliki kapasitas antioksidan yang tidak berbeda signifikan. Sementara itu, fraksi *n*-butanol meskipun memiliki nilai GAEAC dan FeEAC yang lebih rendah dibandingkan dengan ekstrak metanol dan fraksi etil asetat, tetapi menunjukkan aktivitas antioksidan yang berbeda signifikan dibandingkan dua fraksi lainnya (*n*-heksana dan air). Temuan ini sejalan dengan hasil penelitian yang melaporkan bahwa ekstrak etil asetat, dan butanol *M. alba* menunjukkan aktivitas penangkap radikal yang tinggi. Kemampuan ekstrak tanaman untuk meredam radikal bebas terbukti erat kaitannya dengan konsentrasi total fenolnya (Kim *et al.*, 2014).

Sebaliknya, fraksi *n*-heksana dan fraksi air menunjukkan nilai GAEAC dan FeEAC yang lebih rendah. Hal ini mengindikasikan bahwa pelarut non-polar seperti *n*-heksana dan pelarut sangat polar seperti air kurang efektif dalam mengekstraksi senyawa antioksidan yang signifikan.

Aktivitas antioksidan dari ekstrak *n*-heksana dan air tergolong lemah. Hal ini didukung oleh penelitian sebelumnya yang menunjukkan bahwa senyawa non-polar dalam *n*-heksana tidak memiliki aktivitas antioksidan yang signifikan. Sementara itu, air sebagai pelarut polar mungkin tidak cukup efektif untuk mengekstraksi senyawa antioksidan hidrofilik yang lebih larut dalam pelarut seperti etil asetat atau metanol. Penelitian lain juga mengindikasikan bahwa aktivitas antioksidan dari ekstrak *n*-heksana dan air lebih rendah dibandingkan dengan ekstrak dari pelarut polar atau non-polar lainnya (Fatimah and Sundu, 2020; Melsi, Nopiyanti and Rejeki, 2022; Rizki *et al.*, 2022).

Dengan demikian, hubungan antara hasil GAEAC dan FeEAC mengindikasikan bahwa fraksi dengan nilai GAEAC dan FeEAC tinggi, seperti ekstrak metanol dan fraksi etil asetat memiliki kapasitas antioksidan yang kuat, yang kemungkinan terkait dengan kandungan senyawa flavonoid dan polifenol. Sebaliknya, fraksi dengan nilai yang lebih rendah, seperti *n*-heksana dan air, menunjukkan potensi antioksidan yang lebih lemah akibat keterbatasan kemampuan pelarut dalam mengekstraksi senyawa yang mempunyai kapasitas antioksidan.

KESIMPULAN

Berdasarkan hasil penelitian, fraksi *n*-heksana daun *Morus alba* menunjukkan aktivitas antioksidan yang kuat dengan nilai IC₅₀ sebesar 64,85 ppm pada pengujian dengan metode BCB. Sebaliknya, fraksi etil asetat menunjukkan aktivitas antioksidan yang lebih lemah dengan IC₅₀ 437,23

ppm. Pengujian lebih lanjut menggunakan metode CUPRAC dan FRAP mengonfirmasi bahwa ekstrak metanol, fraksi etil asetat, dan fraksi *n*-butanol menunjukkan aktivitas antioksidan yang signifikan lebih tinggi dibandingkan dengan fraksi *n*-heksana dan air. Fraksi etil asetat memiliki kapasitas mereduksi ion Fe³⁺ dan Cu²⁺ tertinggi, diikuti oleh ekstrak metanol.

Hasil penelitian ini menunjukkan bahwa *Morus alba* memiliki potensi sebagai sumber senyawa antioksidan yang dapat digunakan untuk pengembangan produk kesehatan, terutama yang berfokus pada pencegahan kerusakan akibat radikal bebas. Penelitian lebih lanjut dapat dilakukan untuk mengidentifikasi senyawa bioaktif spesifik yang bertanggung jawab atas aktivitas antioksidan ini dan mengeksplorasi potensi aplikasinya dalam pengobatan atau suplemen kesehatan.

UCAPAN TERIMA KASIH

Ucapan terima kasih kepada Kemenristek Dikti atas pendanaan melalui Program Penelitian Dasar Unggulan Perguruan Tinggi (PDP) Tahun 2024. Dukungan ini telah menjadi landasan penting dalam pelaksanaan penelitian kami yang berfokus pada uji aktivitas antioksidan ekstrak daun *Morus alba* menggunakan berbagai metode analisis. Pendanaan ini tidak hanya membantu kami dalam merealisasikan tujuan penelitian, tetapi juga berkontribusi pada pengembangan ilmu pengetahuan dan inovasi di bidang farmasi. Kami berharap hasil penelitian ini dapat memberikan sumbangsi dan kontribusi bagi masyarakat serta mendorong kemajuan ilmu pengetahuan di Indonesia.

DAFTAR PUSTAKA

- Abubakar, A. R. and Haque, M. (2020) 'Preparation of Medicinal Plants: Basic Extraction and Fractionation Procedures for Experimental Purposes.', *Journal of pharmacy & bioallied sciences*. India, 12(1), pp. 1–10. doi: 10.4103/jpbs.JPBS_175_19.
- Apak, R. *et al.* (2008) 'Cupric ion reducing antioxidant capacity assay for food antioxidants: vitamins, polyphenolics, and flavonoids in food extracts.', *Methods in molecular biology (Clifton, N.J.)*. United States, 477, pp. 163–193. doi: 10.1007/978-1-60327-517-0_14.
- Apak, R. *et al.* (2010) 'Cupric ion reducing antioxidant capacity assay for antioxidants in human serum and for hydroxyl radical scavengers.', *Methods in molecular biology (Clifton, N.J.)*. United States, 594, pp. 215–239. doi:

- 10.1007/978-1-60761-411-1_15.
- Ashraf, M. F. *et al.* (2013) 'Assessment of antioxidant and cytotoxicity activities of saponin and crude extracts of *Chlorophytum borivilianum*.', *TheScientificWorldJournal*. United States, 2013, p. 216894. doi: 10.1155/2013/216894.
- Chen, C. *et al.* (2021) 'Morus alba L. Plant: Bioactive Compounds and Potential as a Functional Food Ingredient', *Foods*, 10(3). doi: 10.3390/foods10030689.
- Cui, H. *et al.* (2019) 'Flavonoids from *Morus alba* L. Leaves: Optimization of Extraction by Response Surface Methodology and Comprehensive Evaluation of Their Antioxidant, Antimicrobial, and Inhibition of α -Amylase Activities through Analytical Hierarchy Process.', *Molecules (Basel, Switzerland)*. Switzerland, 24(13). doi: 10.3390/molecules24132398.
- Fatimah, N. and Sundu, R. (2020) 'UJI Aktivitas Antioksidan Fraksi N-Heksan Daun Afrika (*Vernonia amygdalina* Del.) DENGAN METODE DPPH', 5(2), pp. 298–308.
- Gohari, A. *et al.* (2011) 'Antioxidant Activity of some Medicinal Species using FRAP Assay', *Journal of Medicinal Plants*, 10, pp. 54–60.
- Halliwell, B. (2024) 'Understanding mechanisms of antioxidant action in health and disease', *Nature Reviews Molecular Cell Biology*, 25(1), pp. 13–33. doi: 10.1038/s41580-023-00645-4.
- Ibrahim, R. M., Ibrahim, N. M. and Abdul-Jalil, T. Z. (2023) 'Polyphenolic Profiles and Cytotoxic Effect of Iraqi *Morus alba* leaves Ethyl Acetate Extract', *Biomedical and Pharmacology Journal*, 16(1), pp. 429–440. doi: 10.13005/bpj/2624.
- Kim, S. B. *et al.* (2014) 'Pyrrole alkaloids from the fruits of *Morus alba*.', *Bioorganic & medicinal chemistry letters*. England, 24(24), pp. 5656–5659. doi: 10.1016/j.bmcl.2014.10.073.
- Lage, M. Á. P. *et al.* (2013) 'A new microplate procedure for simultaneous assessment of lipophilic and hydrophilic antioxidants and pro-oxidants, using crocin and β -carotene bleaching methods in a single combined assay: Tea extracts as a case study', *Food Research International*, 53(2), pp. 836–846. doi: <https://doi.org/10.1016/j.foodres.2012.11.026>.
- Lü, J.-M. *et al.* (2010) 'Chemical and molecular mechanisms of antioxidants: experimental approaches and model systems.', *Journal of cellular and molecular medicine*. England, 14(4), pp. 840–860. doi: 10.1111/j.1582-4934.2009.00897.x.
- Martín-García, B. *et al.* (2022) 'The Establishment of Ultrasonic-Assisted Extraction for the Recovery of Phenolic Compounds and Evaluation of Their Antioxidant Activity from *Morus alba* Leaves', *Foods*, 11(3). doi: 10.3390/foods11030314.
- Melsi, K., Nopiyanti, V. and Rejeki, E. S. (2022) 'Uji Aktivitas Antioksidan Fraksi N-Heksan, Etil Asetat, Dan Air Ekstrak Daun Biwa (*Eriobotrya japonica* (Thunb.) Lindl.) DENGAN METODE DPPH', *As-Syifaa Jurnal Farmasi*, 14(2), pp. 83–88. doi: 10.56711/jifa.v14i2.851.
- Nur, S. *et al.* (2022) 'Profil Aktivitas Antioksidan dari Ekstrak Buah Kersen (*Muntingia calabura* L.) dengan Metode TAC dan CUPRAC', *JPSCR: Journal of Pharmaceutical Science and Clinical Research*, 7(1), p. 79. doi: 10.20961/jpscr.v7i1.56653.
- Olugbami, J. O., Gbadegesin, M. A. and Odunola, O. A. (2014) 'In vitro evaluation of the antioxidant potential, phenolic and flavonoid contents of the stem bark ethanol extract of *Anogeissus leiocarpus*.', *African journal of medicine and medical sciences*. Nigeria, 43(Suppl 1), pp. 101–109.
- Özyürek, M., Güçlü, K. and Apak, R. (2011) 'The main and modified CUPRAC methods of antioxidant measurement', *TrAC Trends in Analytical Chemistry*, 30(4), pp. 652–664. doi: <https://doi.org/10.1016/j.trac.2010.11.016>.
- Polumackanycz, M., Wesolowski, M. and Viapiana, A. (2021) 'Morus alba L. and *Morus nigra* L. Leaves as a Promising Food Source of Phenolic Compounds with Antioxidant Activity.', *Plant foods for human nutrition (Dordrecht, Netherlands)*. Netherlands, 76(4), pp. 458–465. doi: 10.1007/s11130-021-00922-7.
- Prieto, M. A. *et al.* (2012) ' β -Carotene assay revisited. application to characterize and quantify antioxidant and prooxidant activities in a microplate.', *Journal of agricultural and food chemistry*. United States, 60(36), pp. 8983–8993. doi: 10.1021/jf302218g.
- Przeor, M. *et al.* (2020) 'Functional Properties and Antioxidant Activity of *Morus alba* L. Leaves var. *Zolwinska Wielkolistna* (WML-P)-The Effect of Controlled Conditioning Process.', *Antioxidants (Basel, Switzerland)*. Switzerland, 9(8). doi: 10.3390/antiox9080668.
- Rizki, M. *et al.* (2022) 'Penetapan Kadar Fenolik Total dan Uji Aktivitas Antioksidan Fraksi dari Ekstrak Etanol Daun Cempedak (*Artocarpus integer*) dengan Metode DPPH', *MPI (Media*

- Pharmaceutica Indonesiana*), 4, pp. 168–178. doi: 10.24123/mpi.v4i2.4937.
- Skroza, D. *et al.* (2022) 'Investigation of Antioxidant Synergisms and Antagonisms among Phenolic Acids in the Model Matrices Using FRAP and ORAC Methods', *Antioxidants*, 11(9). doi: 10.3390/antiox11091784.
- Sulistyowati *et al.* (2023) 'Phytocompounds and in vitro antiaging activity of ethanolic extract and fractions of *Rubus fraxinifolius* Poir. leaves', *Journal of Pharmacy and Pharmacognosy Research*, 11(4), pp. 595–610. doi: 10.56499/jppres23.1614_11.4.595.
- Suriyaprom, S. *et al.* (2021) 'Evaluation of Antioxidant and Antibacterial Activities of White Mulberry (*Morus alba* L.) Fruit Extracts.', *Plants (Basel, Switzerland)*. Switzerland, 10(12). doi: 10.3390/plants10122736.
- Thabti, I. *et al.* (2012) 'Identification and quantification of phenolic acids and flavonol glycosides in Tunisian *Morus* species by HPLC-DAD and HPLC-MS', *Journal of Functional Foods*, 4(1), pp. 367–374. doi: <https://doi.org/10.1016/j.jff.2012.01.006>.
- Wang, H. F. *et al.* (2017) 'Anti-oxidant activity and major chemical component analyses of twenty-six commercially available essential oils', *Journal of Food and Drug Analysis*, 25(4), pp. 881–889. doi: 10.1016/j.jfda.2017.05.007.
- Wojtunik-Kulesza, K. A. (2020) 'Approach to Optimization of FRAP Methodology for Studies Based on Selected Monoterpenes.', *Molecules (Basel, Switzerland)*. Switzerland, 25(22). doi: 10.3390/molecules25225267.