

**ANALISIS AKTIVITAS ANTIOKSIDAN EKSTRAK DAUN KEDONDONG
(*Spondias dulcis*) MENGGUNAKAN *RESPONSE SURFACE METHODOLOGY*
[ANALYZING THE ANTIOXIDANT ACTIVITY OF AMBARELLA LEAF EXTRACT
(*Spondias dulcis*) USING *RESPONSE SURFACE METHODOLOGY*]**

Ruben Patrick Adhiwijaya¹, Marcellia Sugata², Juandy Jo^{3*}
^{1,2,3}Program Studi Biologi, Universitas Pelita Harapan, Tangerang, Indonesia
*Korespondensi penulis: juandy.jo@uph.edu

ABSTRACT

Antioxidants are substances that mitigate the impacts of free radicals on the body, in which they can be extracted from plants. One common Indonesian plant that has a potential to be used as a source of antioxidants is the ambarella plant (Spondias dulcis). The aim of this research is to measure the antioxidant activity of ambarella leaf's extract via response surface methodology to determine the optimum conditions required to facilitate maximum extraction. Ambarella leaves were dried and soaked in methanol by using various combinations of time, methanol concentration and solid:solvent ratio (SSR). Antioxidant activity was measured using the DPPH test. The Response Surface Methodology (RSM) was utilized to determine the optimum conditions. The obtained optimum conditions were 26.5 hours, 82.2% methanol and a solid:solvent ratio of 1:14.6.

Keywords: *Spondias dulcis*; antioxidant; DPPH; Response Surface Methodology; Minitab

ABSTRAK

Antioksidan adalah sejenis senyawa yang dapat meminimalkan pengaruh radikal bebas dalam tubuh, dimana senyawa tersebut dapat diekstraksi dari tanaman. Salah satu tanaman di Indonesia yang memiliki potensi digunakan sebagai sumber antioksidan adalah kedondong (*Spondias dulcis*). Tujuan penelitian ini adalah untuk mengukur aktivitas antioksidan ekstrak daun kedondong, serta menemukan kondisi yang optimum untuk ekstraksi daun kedondong dengan menggunakan *response surface methodology*. Daun kedondong dikeringkan lalu dimaserasi menggunakan berbagai kombinasi parameter waktu, konsentrasi pelarut metanol, dan *solid:solvent ratio* (SSR). Aktivitas antioksidan ekstrak lalu diukur menggunakan uji DPPH. *Response Surface Methodology* (RSM) digunakan untuk menemukan kondisi yang optimum. Kondisi maserasi yang optimum adalah 26,5 jam, konsentrasi pelarut metanol 82,2% dan SSR 1:14,6.

Kata kunci: *Spondias dulcis*; antioksidan; DPPH; Response Surface Methodology; Minitab

PENDAHULUAN

Meskipun ekspektasi hidup rata-rata manusia diperkirakan akan meningkat seiring dengan perkembangan medis dan sains, zaman modern memiliki banyak masalah yang berpotensi meningkatkan angka kematian. Aktivitas manusia dan

kondisi lingkungan yang buruk dapat menghasilkan *reactive oxygen spesies* dan *reactive nitrogen spesies* dalam jumlah besar. Hal ini akan mengganggu keseimbangan proses oksidasi-antioksidasi dalam tubuh, yang berujung pada timbulnya penyakit (Crimmins, 2015; Xu *et*

al., 2017). Oleh karena itu, senyawa antioksidan diperlukan untuk membantu proses antioksidasi dalam tubuh.

Salah satu sumber daya alam yang memiliki senyawa antioksidan adalah tanaman, seperti kedondong (*Spondias dulcis*). Berbagai bagian dari tanaman kedondong dikenal sebagai makanan dan bahan obat tradisional. Daun kedondong sendiri mengandung senyawa polifenolik (seperti flavonoid), saponins serta tannins, yang diketahui memiliki aktivitas antioksidan dan antimikrobal (Morton, 1987; Islam *et al.*, 2013).

Kondisi optimal untuk mengekstraksi flavonoid dari daun kedondong dibutuhkan untuk memaksimalkan kegunaan antioksidan dari ekstrak daun kedondong. Dalam hal ini, metode *Response Surface Methodology* (RSM) dapat digunakan untuk menentukan kondisi optimal tersebut (Aydar, 2017). Pada penelitian ini, penentuan kondisi optimal untuk mengekstraksi senyawa antioksidan dari daun kedondong dilakukan dengan menggunakan metode RSM. Selain itu, aktivitas antioksidan dari berbagai ekstrak daun kedondong diukur menggunakan uji DPPH.

BAHAN DAN METODE

Bahan

Sampel yang digunakan adalah daun dari tanaman kedondong (*Spondia dulcis*). Daun dipetik dari ranting-ranting pohon kedondong dewasa di wilayah Tangerang, Indonesia. Bahan yang digunakan adalah metanol (Merck, Jerman) dengan berbagai konsentrasi: 60%, 70%, 80%, dan 100%, DPPH (Merck, Jerman), serta asam askorbat (Merck, Jerman).

Pengeringan Sampel

Daun kedondong ditimbang, lalu diletakkan di atas nampan besi dan dikeringkan dalam oven pada suhu 60°C selama satu malam. Setelah dikeringkan, daun kedondong dipindahkan ke gelas piala dan diletakkan dalam desikator sampai akan digunakan untuk maserasi.

Ekstraksi Sampel Menggunakan RSM

Parameter-parameter yang diuji dengan metode RSM dapat dilihat pada Tabel 1, sedangkan kombinasi parameter yang diuji dapat dilihat pada Tabel 2. Daun kedondong kering dimaserasi sesuai dengan kombinasi parameter tersebut. Lima belas *vial* masing-masing diisi dengan 1 g daun kedondong kering, lalu ditambahkan dengan metanol sesuai dengan kombinasi kondisi yang ditentukan. Kombinasi nomor 4, 13, dan 14 digunakan sebagai pengulangan dari *center point*.

Tabel 1. Parameter yang digunakan

Parameter	-1	0	1
X1: Waktu Ekstraksi (jam)	24	27	30
X2: Konsentrasi Metanol (%)	60	80	100
X3: <i>Solid:Solvent Ratio</i>	1:5	1:15	1:25

Keterangan: -1, 0 dan 1 mewakili masing-masing variasi per parameter.

Tabel 2. Kombinasi parameter yang diuji

No.	X1	X2	X3
1	0	-1	1
2	-1	0	-1
3	0	1	1
4	0	0	0
5	-1	-1	0
6	1	1	0
7	0	-1	-1
8	1	0	-1
9	-1	1	0
10	1	-1	0
11	1	0	1
12	-1	0	1
13	0	0	0
14	0	0	0
15	0	1	-1

Pengeringan Ekstrak

Setelah maserasi, ekstrak dipisahkan dari daun kedondong, lalu dituang ke dalam cawan petri. Selanjutnya, cawan petri berisi ekstrak diletakkan di atas lubang *water bath* yang diatur agar stabil pada suhu 70°C. Uap air dari *water bath* dapat membantu proses penguapan pelarut. Cawan petri dibiarkan terbuka agar tidak terjadi pengembunan. Selama proses pengeringan, suhu cawan petri perlu dijaga

agar tidak melebihi 70°C karena suhu tinggi dapat menyebabkan kerusakan ekstrak. Setelah semua pelarut menguap, ekstrak padat dikeruk dengan spatula dan dimasukkan ke dalam *microtube*.

Uji Antioksidan (Uji DPPH)

Analisis aktivitas antioksidan menggunakan metode uji DPPH diadaptasi dari metode yang digunakan oleh Seo *et al.* (2014). Larutan DPPH dibuat dengan cara melarutkan 5 mg DPPH dalam 100 mL metanol 70% untuk membuat larutan konsentrasi 50 ppm (0,05 mg/mL). Larutan sampel-DPPH dibuat dengan melarutkan 250 ppm dari ekstrak sebanyak 0,75 mL dengan 0,75 mL larutan DPPH. Campuran sampel-DPPH lalu diinkubasi dalam gelap selama 30 menit. Larutan sampel-DPPH diukur absorbansinya pada panjang gelombang 517 nm menggunakan *UV-visible spectrophotometer*. Larutan asam askorbat 50 ppm dalam metanol 70%, digunakan sebagai kontrol positif dan akuades digunakan sebagai kontrol negatif.

Persen (%) inhibisi DPPH dihitung dengan rumus berikut:

$$\frac{[1 - (\text{Absorbansi Sampel})]}{(\text{Absorbansi Blanko})} \times 100\%$$

Analisis RSM

Persentase inhibisi DPPH yang sudah didapatkan lalu dicatat dan dimasukkan ke dalam perangkat lunak

Minitab (ver 19.2020.1, Amerika Serikat) untuk dianalisis. Data dianalisis menggunakan opsi “*Analyze Response Surface*” dan “*Response Optimizer*”. Pilihan “*Analyze Response Surface*” akan memunculkan table ANOVA, tabel koefisien, serta keterangan model. Opsi “*Response Optimizer*” akan menampilkan grafik kondisi optimum yang didapatkan berdasarkan model.

Hasil yang diharapkan dari uji dengan RSM adalah: (i) *p value* yang signifikan ($p < 0,05$) untuk semua faktor parameter yang digunakan; (ii) adanya titik maksimum yang terdapat dalam jangka parameter yang digunakan; (iii) nilai *composite desirability* (D) yang mendekati 1; (iv) nilai *determination coefficient* (R^2) yang mendekati 1; serta (v) nilai *lack of fit* yang tidak signifikan ($p > 0,05$). *Composite desirability* (D) adalah nilai yang menunjukkan seberapa ideal semua respons yang didapatkan. Nilai D yang paling rendah adalah 0, yang berarti tidak ideal. Nilai D yang paling tinggi adalah 1, yang berarti sangat ideal. *Determination coefficient* mengukur persentase variasi respons yang dapat dijelaskan oleh model. Terakhir, *lack of fit* mengukur keberhasilan model dalam menghasilkan data yang cocok pada titik-titik baru yang tidak digunakan saat merancang dan menguji model, dengan cara membandingkan

banyak kesalahan dalam model yang disebabkan oleh model itu sendiri atau terjadi secara acak. Jika *lack of fit* memiliki *p value* yang lebih kecil dari 0,05, maka dapat dinyatakan bahwa model tidak cukup baik (Wu *et al.*, 2011; Tummala *et al.*, 2015; Domingo *et al.*, 2019).

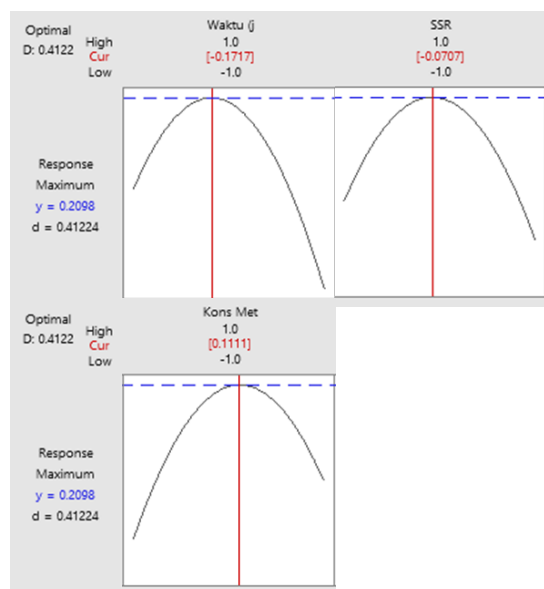
HASIL DAN PEMBAHASAN

Setelah uji DPPH dilakukan, absorbansi dari larutan sampel-DPPH diukur, lalu persentase inhibisi DPPH dihitung. Persentase inhibisi DPPH dari masing-masing kombinasi kondisi (Tabel 2) ditampilkan di Tabel 3.

Tabel 3. Hasil respons inhibisi ekstrak daun kedondong dengan uji DPPH

Waktu (jam)	Konsentrasi		Respons Inhibisi (%)
	Metanol (%)	Solid:solvent ratio	
27	60	1:25	19,37%
24	80	1:5	20,19%
27	100	1:25	20,00%
27	80	1:15	19,52%
24	60	1:15	19,96%
30	100	1:15	19,48%
27	60	1:5	19,42%
30	80	1:5	19,30%
24	100	1:15	19,82%
30	60	1:15	19,27%
30	80	1:25	19,50%
24	80	1:25	19,54%
27	80	1:15	19,90%
27	80	1:15	23,42%
27	100	1:5	20,01%

Setelah nilai respons inhibisi dimasukkan ke dalam Minitab, didapatkan kurva optimal seperti yang ditampilkan pada Gambar 1. Hasil pengujian dari Minitab disajikan pada Tabel 4.



Gambar 1. Kurva optimal untuk parameter waktu, konsentrasi metanol dan *solid:solvent ratio*, untuk melakukan ekstraksi daun kedondong

Tabel 4. Hasil pengujian tiap kondisi ekstraksi daun kedondong menggunakan RSM yang dianalisis dengan Minitab

Kondisi	p value
Waktu	0,635
Konsentrasi Metanol	0,753
SSR	0,901
Waktu*Waktu	0,378
Kons*Kons	0,423
SSR*SSR	0,423
Waktu*Kons	0,904
Waktu*SSR	0,769
Kons*SSR	0,989
Lack of Fit	0,997
Istilah	Persentase
Determination Coefficient (R2)	34,41%

SSR = *solid:solvent ratio*; Kons = konsentrasi metanol. Tanda "*" menunjukkan interaksi antara dua parameter

Berdasarkan Gambar 1, respons yang didapatkan menunjukkan keberadaan titik optimum yang jelas, seperti yang dapat dilihat dari posisi garis merah. Titik optimum parameter waktu adalah [-0,1717], titik optimum parameter konsentrasi metanol adalah [0,111], dan titik optimum parameter SSR adalah [-0,0707]. Jika dikonversi menjadi nilai yang asli menggunakan perbandingan, titik optimum waktu menjadi 26,5 jam, titik optimum konsentrasi metanol menjadi 82,2%, dan titik optimum *solid:solvent ratio* menjadi 1:14,6.

Titik optimum yang diperoleh didukung oleh hasil penelitian-penelitian sebelumnya. Hasil penelitian Che Sulaiman *et al.* (2017) menunjukkan bahwa kadar flavonoid dalam ekstrak dapat menurun seiring waktu karena dapat terjadi polimerasi flavonoid sehingga tidak terdeteksi oleh uji DPPH. Chew *et al.* (2011) menyatakan bahwa konsentrasi pelarut dapat memengaruhi kadar zat fitokimia dalam ekstrak. Pelarut yang polar akan melarutkan senyawa yang polar. Wong *et al.* (2013) menyatakan bahwa nilai SSR yang tinggi dapat meningkatkan kemungkinan sampel berinteraksi dengan pelarut serta dapat menghasilkan gradasi konsentrasi yang mendukung laju difusi zat fitokimia, sehingga dapat meningkatkan kadar zat fitokimia dalam ekstrak.

Hasil yang kurang optimal dari penelitian ini adalah didapatkan nilai D yang rendah, sehingga ada kemungkinan kurva yang didapatkan tidak sesuai dengan model yang digunakan. Selain itu, *p value* dari semua kondisi yang diuji tidak ada yang $<0,05$ (Tabel 4). Terlebih lagi, ketiga pengulangan *center point* dalam penelitian ini menampilkan nilai respons inhibisi yang bervariasi. Selain itu, *p value* sebesar 0,997 menunjukkan bahwa *lack of fit* tidak signifikan dan kesalahan dalam model tidak disebabkan oleh model itu sendiri. Nilai R² yang didapatkan juga sangat rendah sehingga model dalam penelitian ini hanya dapat menjelaskan 34,41% dari semua variasi yang muncul.

Hasil yang kurang optimal dapat disebabkan oleh beberapa hal, seperti kesalahan dalam memilih parameter atau kesalahan dalam prosedur penelitian. Penelitian Che Sulaiman *et al.* (2017), Chew *et al.* (2011), dan Wong *et al.* (2013) menunjukkan bahwa parameter waktu, konsentrasi pelarut dan SSR memang memengaruhi zat fitokimia, sehingga kemungkinan besar kesalahan terletak dalam prosedur yang dilakukan.

KESIMPULAN

Kurva yang didapatkan pada penelitian ini menunjukkan kondisi optimal dengan sangat jelas serta memiliki *p value* untuk *lack of fit* yang tidak signifikan, tetapi

nilai D dan R² masih kurang baik. Kondisi optimal untuk ekstraksi senyawa antioksidan dari daun kedondong adalah 26,5 jam untuk parameter waktu, metanol 82,2% untuk parameter konsentrasi pelarut metanol dan perbandingan 1:14,6 untuk parameter *solid:solvent ratio* (SSR).

SARAN

Saran untuk penelitian selanjutnya adalah melakukan lebih banyak pengulangan untuk mendapatkan titik optimum yang lebih akurat serta melakukan pengukuran kadar flavonoid dari daun kedondong untuk dikorelasikan dengan hasil uji antioksidan dari daun kedondong.

UCAPAN TERIMA KASIH

Kami berterima kasih kepada Novanka, S.Si. dan Ignatius Gareth Widodo, S.Si. untuk semua bantuan selama pelaksanaan penelitian ini. Kami juga berterima kasih kepada Hans Victor, M.Si. untuk bantuan dan bimbingannya dalam menggunakan metode RSM dan menggunakan perangkat lunak Minitab.

DAFTAR PUSTAKA

Aydar, A. Y. (2018). Utilization of Response Surface Methodology in Optimization of Extraction of Plant Materials. *Statistical Approaches with Emphasis on Design of Experiments Applied to Chemical Processes*.
<https://doi.org/10.5772/intechopen.73690>

- Che Sulaiman, I., Basri, M., Masoumi, H., Chee, W., Ashari, S., & Ismail, M. (2017). Effects of temperature, time, and solvent ratio on the extraction of phenolic compounds and the anti-radical activity of *Clinacanthus nutans* Lindau leaves by response surface methodology. *Chemistry Central Journal*, 11, 54. <https://doi.org/10.1186/s13065-017-0285-1>
- Chew, K., Ng, S., Thoo, Y., Khoo, M., Wan Aida, W., & Ho, C. (2011). Effect of ethanol concentration, extraction time and extraction temperature on the recovery of phenolic compounds and antioxidant capacity of *Centella asiatica* extracts. *International Food Research Journal*, 18, 571-578.
- Crimmins, E. (2015). Lifespan and Healthspan: The Past, Present, Promise. *The Gerontologist*, 55(6), 901-911. <https://doi.org/10.1093/geront/gnv130>
- Domingo, C., De Vera, W., Pambid, R., & Austria, V. (2019). Playing with the Senses: Application of Box-Behnken Design to Optimize the Bukayo Formulation. *Food Research*, 3(6), 833-839. [https://doi.org/10.26656/fr.2017.3\(6\).190](https://doi.org/10.26656/fr.2017.3(6).190)
- Islam, S. M. A., Ahmed, K. T., Manik, M. K., Wahid, M. A., & Kamal, C. S. I. (2013). A comparative study of the antioxidant, antimicrobial, cytotoxic and thrombolytic potential of the fruits and leaves of *Spondias dulcis*. *Asian Pacific Journal of Tropical Biomedicine*, 3(9), 682-691. [https://doi.org/10.1016/s2221-1691\(13\)60139-2](https://doi.org/10.1016/s2221-1691(13)60139-2)
- Morton, J. (1987). *Ambarella*. Retrieved January 23, 2021 from https://hort.purdue.edu/newcrop/morton/ambarella_ars.html
- Seo, J., Lee, S., Elam, M., Johnson, S., Kang, J., & Arjmandi, B. (2014). Study to find the best extraction solvent for use with guava leaves (*Psidium guajava* L.) for high antioxidant efficacy. *Food Science & Nutrition*, 2(2), 174-180. <https://doi.org/10.1002/fsn3.91>
- Tummala, S., Kuppusamy, G., Kumar, M., Krishnamurthy, P., Yamjala, K., Tripuraneni, N., & Prakash, A. (2015). Formulation and optimization of oxaliplatin immuno-nanoparticles using Box-Behnken design and cytotoxicity assessment for synergistic and receptor-mediated targeting in the treatment of colorectal cancer. *Artificial Cells, Nanomedicine, and Biotechnology*, 44(8). <https://doi.org/10.3109/21691401.2015.1111226>
- Wong, B., Tan, C., & Ho, C. (2013). Effect of solid-to-solvent ratio on phenolic content and antioxidant capacities of “Dukung Anak” (*Phyllanthus niruri*). *International Food Research Journal*, 20(1), 325-330.
- Wu, L., Yick, K., Ng, Z., & Yip, J. (2011). Shape characterization for optimisation of bra cup moulding. *Journal of Fiber Bioengineering and Informatics*, 4(3), 235-243. <https://doi.org/10.3993/jfbi09201103>
- Xu, D., Li, Y., Meng, X., Zhou, T., Zhou, Y., Zheng, J., Zhang, J., & Li, H. (2017). Natural antioxidants in foods and medicinal plants: extraction, assessment, and resources. *International Journal of Molecular Sciences*, 18(1), 96. <https://doi.org/10.3390/ijms18010096>