

Penentuan Kadar Flavonoid Total dan Klasifikasi Serbuk Daun Murbei (*Morus alba* L.) Berbeda Ketinggian Tempat Tanam

Abim Syaifullah¹, Nia Kristiningrum^{1*}, Dian Agung Pangaribowo¹, Lestyo Wulandari¹

¹Fakultas Farmasi, Universitas Jember

Keywords:

Flavonoid
Kemometrik
Morus alba L.

ABSTRACT

Mulberry (*Morus alba* L.) is a plant from the Moraceae family which has a high flavonoid content. This research aims to determine the ability of NIR spectroscopy and chemometrics to classify mulberry leaf powder based on different planting heights and determine the total flavonoid content using the Uv-Vis spectrophotometric method. The classification of mulberry leaf powder originating from the lowlands, midlands, and highlands provides valid results using NIR spectra and chemometric data from the LDA and SIMCA models with an accuracy value of 100%. The average results of determining total flavonoid content using Uv-Vis spectrophotometry showed that the highest levels were in the highlands, followed by the medium and lowlands with total flavonoid levels respectively, namely 6.453 ± 1.194 mg QE/g powder; 5.889 ± 0.944 mg QE/g powder; and 5.177 ± 0.998 mg QE/g powder. The results of the One Way ANOVA test showed that the total flavonoid content of mulberry leaf powder from different altitude areas did not have a significant difference.



Journal of Agropharmacy is licensed under [Creative Commons Attribution-ShareAlike 4.0 International](https://creativecommons.org/licenses/by-sa/4.0/)

Email Koresponden Penulis: niakristiningrum.farmasi@unej.ac.id

1. PENDAHULUAN

Indonesia merupakan salah satu negara dengan sumber daya alam yang melimpah, salah satunya adalah spesies tanaman yang cukup tinggi mencapai 30.000 jenis, sehingga berpotensi digunakan sebagai terapi pengobatan tradisional. Kecenderungan untuk kembali pada tren "back to nature" sehingga permintaan terhadap obat tradisional meningkat (Munadi E, 2017). Hasil Riset Kesehatan Dasar (Riskesdas) tahun 2018 bahwa penggunaan obat tradisional oleh masyarakat Indonesia sebesar 31,4% meningkat bila dibandingkan tahun 2013 sebesar 30,4%. Ada berbagai cara untuk melakukan pengolahan obat tradisional, salah satunya adalah dengan dibuat teh herbal. Teh herbal merupakan sebutan untuk minuman teh yang dibuat dari ramuan tanaman selain *Camellia sinensis*. Salah satu contoh teh herbal yang dikonsumsi masyarakat Indonesia adalah teh daun murbei (*Morus alba* L.).

Murbei (*Morus alba* L) merupakan salah satu tanaman dari keluarga Moraceae yang dimanfaatkan sebagai teh herbal. Penelitian sebelumnya yang telah dilakukan menunjukkan setelah pemberian teh daun murbei pada pasien *Diabetes melitus* Tipe 2 berusia 30 – 70 tahun dapat menurunkan kadar gula darah postprandial 90 menit setelah dikonsumsi (Banu dkk, 2015).

Salah satu kandungan fitokimia yang banyak ditemukan pada daun murbei adalah flavonoid (Chan dkk, 2016). Senyawa flavonoid pada daun murbei memiliki aktivitas sebagai antioksidan, antimikroba, antiinflamasi, dan antidiabetes. Kandungan fitokimia dalam tanaman dipengaruhi oleh beberapa faktor, salah satunya adalah ketinggian tempat tanam (Azkiyah dkk, 2019). Kriteria ketinggian wilayah di Indonesia terbagi atas tiga wilayah, yaitu dataran rendah (0 – 200 mdpl), dataran sedang (201 – 700 mdpl),

dan dataran tinggi (>700 mdpl). Berdasarkan hal diatas perlu dilakukan penentuan kandungan flavonoid total pada daun murbei, selain itu perlu dibuat model klasifikasi untuk mempermudah menentukan kualitas daun murbei berdasarkan ketinggian tempat tanamnya.

Model klasifikasi daun murbei dapat dilakukan menggunakan Spektroskopi *Near Infrared* (NIR). Spektroskopi NIR merupakan metode analisis berdasarkan vibrasi atom pada molekul. Kelebihan dari spektroskopi NIR adalah metode yang non-invasif pada sampel, waktu analisis yang cepat, dan dapat diaplikasikan pada sampel dengan berbagai variasi kondisi, bentuk, dan ketebalan. Namun spektroskopi NIR memiliki kelemahan antara lain spektra yang perlu interpretasi lebih lanjut dikarenakan spektrum saling tumpang tindih dan sensitivitas cukup rendah. Berdasarkan hal tersebut, spektroskopi NIR dikombinasikan dengan metode kemometrik menunjukkan kapasitas baik untuk mengidentifikasi secara cepat spesies tanaman yang berbeda untuk memprediksi konstituen utama, serta memastikan kualitas dan autentifikasi dari tanaman (Gad dkk, 2012). Beberapa metode kemometrik yang digunakan adalah *Soft Independent Modelling of Class Analogy* (SIMCA), *Support Vector Machine Classification* (SVM), dan *Linear Discriminant Analysis* (LDA) (Rohman A, 2014). Sampel yang digunakan berupa sampel serbuk karena memiliki kelebihan yaitu proses pengolahan sampel yang lebih mudah, waktu pengolahan lebih singkat, dapat menjaga kualitas sampel, dan banyak digunakan sebagai sediaan obat tradisional seperti teh herbal (Elfahmi dkk, 2014).

Berdasarkan latar belakang tersebut, maka pada penelitian ini dilakukan penentuan kadar flavonoid total serbuk daun murbei yang berasal dari ketinggian tempat tanam yang berbeda dengan menggunakan metode spektrofotometri Uv-Vis. selain itu juga dilakukan pemodelan klasifikasi serbuk daun murbei dengan menggunakan metode NIR dan Kemometrik

2. METODE

2.1. Bahan

Bahan yang digunakan dalam penelitian ini adalah sampel (*training set* dan *test set*) serbuk daun murbei (*Morus alba* L.) yang diambil dari tempat tanam yang berbeda (dataran rendah, dataran sedang, dan dataran tinggi). Kuersetin (Sigma-Aldrich), Aluminium Klorida 1% (Merck), Kalium Asetat 0,1M (UPT BPPTK LIPI), Etanol 96%, aquadest, dan kertas saring. Lokasi pengambilan sampel daun murbei dapat dilihat pada tabel 1.

2.2. Alat

Alat yang digunakan dalam penelitian ini adalah timbangan analitik (Ohaus), timbangan *micro analytical balance* (Sartorius), ultra sonikator (Elmasonic), alat penyerbuk (blender), mikropipet (socorex), kuvet, oven, ayakan mesh 100, Spektroskopi NIR (*Brimrose Luminar 3070*), perangkat lunak *The Unscrambler 10,4* (Camo), perangkat lunak SPSS versi 22 dan spektrofotometer UV-vis (Hitachi U-1800).

2.3. Metode

Penentuan Kadar Air Serbuk Simplisia

Penentuan kadar air pada serbuk simplisia dilakukan menggunakan metode gravimetri. Sampel ditimbang kurang lebih 200 mg kemudian dimasukkan dalam oven pada suhu 100°C – 105°C selama 1 jam, kemudian didinginkan dalam desikator sampai suhu ruang. Setelah dingin sampel ditimbang dan dicatat massanya, langkah di atas dilakukan secara berulang sampai massa sampel menjadi konstan, kemudian dihitung kadar airnya.

Penetapan Kadar Flavonoid Total dengan Metode Spektrofotometri Uv-Vis

Standar kuersetin dalam etanol dibuat dengan seri konsentrasi 20 ppm, 40 ppm, 60 ppm, 80 ppm, 100 ppm, 120 ppm, dan 150 ppm. Sampel serbuk daun murbei ditimbang sebanyak 100 mg dan dilarutkan dengan etanol 96%, diultrasonik selama ± 15 menit, kemudian disaring. Masing-masing larutan standar dan sampel dipipet sejumlah 0,1 ml sampel, ditambahkan dengan 0,2 ml kalium asetat 0,1M, 0,2 ml aluminium klorida 1%, 0,3 ml etanol dan 0,2 ml aquadest. Setelah itu diinkubasi selama 30 menit pada suhu 25°C. Serapannya diukur pada panjang gelombang 429 nm menggunakan spektrofotometri Uv-Vis (Aminah dkk, 2016).

Pembentukan Model Kemometrik Klasifikasi

Masing-masing sampel serbuk daun murbei yang berasal dari wilayah yang berbeda ketinggian tempat tanam diukur spektrumnya dengan menggunakan spektroskopi Near Infrared (NIR). Hasil spektrum NIR yang didapatkan (*training set*) dibuat model kemometrik klasifikasi menggunakan perangkat lunak *The Unscrambler X 10.4*. Model kemometrik yang digunakan adalah SIMCA, SVM, dan LDA. Masing-masing model yang telah terbentuk kemudian divalidasi.

Tabel 1. Lokasi Pengambilan Sampel Daun Murbei.

No	Kode	Lokasi (Kecamatan & kabupaten)	Dataran	Identitas sampel
1	R1	Kaliwates, Jember	Rendah	Training Set
2	R2	Sumbersari, Jember	Rendah	Training Set
3	R3	Rambipuji, Jember	Rendah	Training Set
4	R4	Ngadiluwih, Kediri	Rendah	Training Set
5	R5	Wirolegi, Jember	Rendah	Training Set
6	S1	Doko, Blitar	Sedang	Training Set
7	S2	Selopuro, Blitar	Sedang	Training Set
8	S3	Sumberwringin, Bondowoso	Sedang	Training Set
9	S4	Maesan, Bondowoso	Sedang	Training Set
10	T1	Sumberwringin, Bondowoso	Tinggi	Training Set
11	T2	Selorejo, Blitar	Tinggi	Training Set
12	T3	Wonosari, Malang	Tinggi	Test Set
13	T4	Ngajum, Malang	Tinggi	Test Set
14	T5	Wonosari, Malang	Tinggi	Test Set

3. HASIL DAN PEMBAHASAN

Sampel daun murbei yang diambil pada penelitian ini adalah berdasarkan tiga ketinggian yang berbeda, yaitu dataran rendah (<200 mdpl), dataran sedang (201 – 700 mdpl), dan dataran tinggi (>700 mdpl). Sampel yang diperoleh yaitu sebesar 14 sampel, terdiri dari 11 sampel *training set* dan 3 sampel *test set*. Selanjutnya sampel dideterminasi di UPT Pengembangan Pertanian Terpadu Politeknik Jember. Hasil determinasi menunjukkan bahwa hasil spesimen tersebut adalah spesies *Morus alba* L.

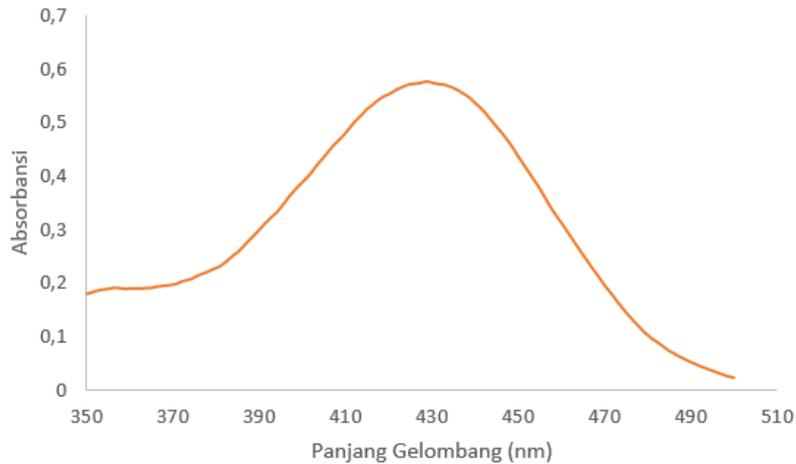
3.1 Penentuan Kadar Air Serbuk Simplisia

Tujuan dari penentuan kadar air adalah untuk memastikan bahwa serbuk simplisia memenuhi persyaratan kadar air yang telah ditetapkan oleh BPOM RI yaitu dibawah 10% (BPOM, 2014). Hasil penentuan kadar air menunjukkan bahwa semua sampel memiliki kadar air dibawah 10%, dengan demikian semua sampel telah memenuhi persyaratan kadar air.

3.2 Penetapan Kadar Flavonoid Total dengan Metode Spektrofotometri Uv-Vis

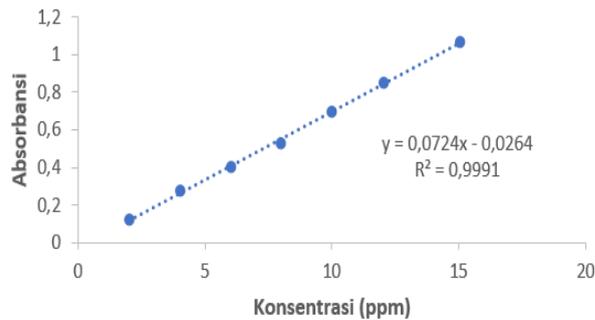
Penentuan kadar flavonoid total dilakukan menggunakan spektrofotometer UV-Vis dengan metode kolorimetri. Kadar flavonoid total dipilih karena flavonoid merupakan senyawa mayor atau senyawa yang banyak terdapat dalam serbuk daun murbei, sehingga dapat digunakan sebagai acuan untuk standarisasi kualitas sampel serbuk daun murbei dari berbagai kategori ketinggian (Syahidan dkk, 2019). Prinsip penentuan kadar flavonoid total dengan kolorimetri adalah terjadi pembentukan kompleks asam yang stabil dengan gugus keton pada C-4 atau gugus hidroksil pada C-3 atau C-5 dari flavon dan flavonol (Chang dkk, 2002).

Penentuan panjang gelombang maksimum dilakukan pada konsentrasi 8 ppm. Hasilnya menunjukkan intensitas spektrum yang maksimum pada panjang gelombang 429 nm. Selanjutnya hasil panjang gelombang maksimum digunakan untuk penentuan kadar flavonoid total pada serbuk daun murbei. Spektra larutan serbuk daun murbei dapat dilihat pada gambar 1.



Gambar 1. Spektrum larutan standar kuersetin.

Hasil kurva kalibrasi menunjukkan persamaan regresi linier yaitu $y = 0,0724x - 0,0264$ dengan nilai koefisien korelasi sebesar 0,9991. Kurva baku kuersetin ditunjukkan pada (Gambar 2).



Gambar 2. Kurva Baku Kuersetin.

Kadar flavonoid total dalam sampel dinyatakan dalam berat miligram ekuivalen kuersetin tiap gram serbuk (mg QE/g serbuk). Hasil penentuan kadar flavonoid total serbuk daun murbei dapat dilihat pada Tabel 2.

Tabel 2. Hasil Penentuan Kadar Flavonoid Total Menggunakan Spektrofotometri Uv-Vis.

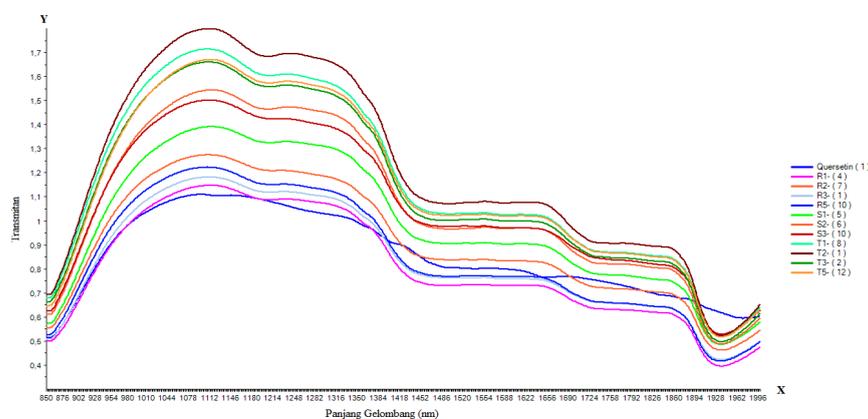
No	Kode	Rata-rata mg QE/g Serbuk
1	R1	6,422 ± 0,166
2	R2	4,499 ± 0,017
3	R3	6,051 ± 0,022
4	R5	4,749 ± 0,106
5	S1	5,217 ± 0,056
6	S2	4,939 ± 0,059
7	S3	6,716 ± 0,151
8	T1	5,532 ± 0,078
9	T2	5,131 ± 0,097
10	T3	6,896 ± 0,083
11	T5	6,553 ± 0,098
12	R4	4,163 ± 0,053
13	S4	6,687 ± 0,087
14	T4	8,115 ± 0,035

Berdasarkan hasil penentuan kadar flavonoid total sampel *training set* dan *test set* serbuk daun murbei pada dataran tinggi lebih besar dibandingkan dengan sampel pada dataran rendah dan sedang. Hasil tersebut menunjukkan bahwa serbuk daun murbei yang tanam pada dataran tinggi lebih berpotensi sebagai sumber flavonoid. Rata-rata kandungan flavonoid total serbuk daun murbei pada dataran rendah sebesar 5,177 ± 0,998 mg QE/g serbuk, dataran sedang sebesar 5,889 ± 0,944 mg QE/g serbuk, dan dataran tinggi sebesar 6,453 ± 1,194 mg QE/g serbuk.

Pada penelitian ini didapatkan hasil kandungan flavonoid total yang bervariasi, hal tersebut dikarenakan adanya faktor lain yang mempengaruhi jumlah kandungan flavonoid total seperti ketinggian tempat, kelembaban dan intensitas cahaya tempat tanam (Sholekah, 2017). Sebagai data pendukung dilakukan uji statistik *One Way ANOVA* dengan tingkat kepercayaan 95% menggunakan perangkat lunak SPSS versi 22, tujuannya adalah untuk melihat apakah terdapat perbedaan yang bermakna dari kandungan flavonoid total serbuk daun murbei pada tiga ketinggian yang berbeda (rendah, sedang, dan tinggi). Hasil pengujian statistik *One Way ANOVA* didapatkan nilai signifikansi sebesar 0,208 yang menunjukkan bahwa tidak ada perbedaan yang bermakna dari rata-rata kandungan flavonoid total serbuk daun murbei pada tiga ketinggian yang berbeda.

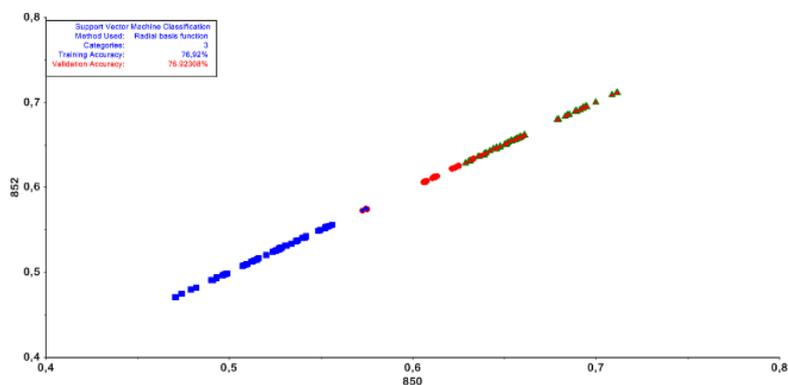
3.3 Pembentukan Model Kemometrik Klasifikasi

Hasil spektrum yang diperoleh dari spektroskopi NIR digunakan untuk membuat model kemometrik klasifikasi. Berdasarkan gambar 3 spektrum NIR antara standar kuersetin dengan sampel memiliki karakteristik pada nilai transmitan, dimana nilai transmitan tertinggi adalah kategori dataran tinggi, lalu dataran sedang dan rendah.

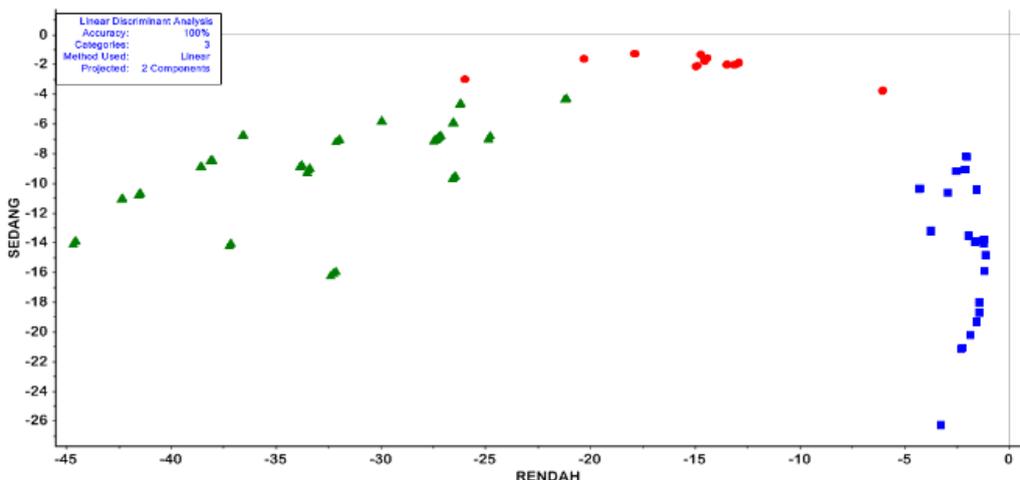


Gambar 3. Spektrum NIR Gabungan (Standar dan Sampel).

Penentuan model kemometrik klasifikasi menggunakan data *training set* sebanyak 11 sampel dengan tiga macam kategori (dataran rendah, sedang, dan tinggi). Algoritma kemometrik yang digunakan pada penelitian ini adalah SIMCA, SVM, dan LDA. Pembentukan model kemometrik klasifikasi ditunjukkan pada gambar 4 dan 5. Berdasarkan hasil pembentukan model kemometrik klasifikasi bahwa model kemometrik LDA dan SIMCA dapat memprediksi model dengan akurasi 100%, sedangkan model SVM hanya 76,92%. Model SVM belum mampu mengelompokkan semua sampel pada kategori yang sesuai dikarenakan model klasifikasi SVM secara teori digunakan untuk mengatasi permasalahan klasifikasi berdasarkan dua kategori (Luts dkk, 2010). Gambar 4 menunjukkan bahwa untuk pengelompokan pada kategori dataran rendah, sedang dan tinggi terdapat data yang *overlap* sehingga tidak dapat membedakan kategori dengan baik



Gambar 4. Hasil Pemodelan Klasifikasi SVM.



Gambar 5. Hasil Pemodelan Klasifikasi LDA.

Keberhasilan model klasifikasi yang terbentuk kemudian diuji dengan validasi internal dan eksternal. Validasi digunakan untuk memperkirakan seberapa akurat model prediksi yang dibuat agar dapat diaplikasikan (Berrar D., 2018). Validasi dilakukan pada model kemometrik yang sudah terpilih yaitu LDA dan SIMCA. Validasi internal dilakukan dengan mengeluarkan satu set data *training set*, dan data tersisa digunakan untuk membuat validasi silang. Pada penelitian ini dilakukan pengeluaran set data pada set R₁, S₂, dan T₃ secara bergantian. Hasil yang didapatkan menunjukkan bahwa model kemometrik LDA dan SIMCA memiliki akurasi 100% dan tidak ada sampel yang masuk kedalam kategori yang salah. Validasi eksternal dilakukan menggunakan 3 sampel *test set* yang telah diketahui kategorinya. Berdasarkan hasil validasi eksternal diperoleh hasil akurasi sebesar 100% untuk kedua model tersebut. Ringkasan hasil validasi model terpilih dapat dilihat pada Tabel 3.

Tabel 3. Hasil Validasi Model Terpilih.

Model Kemometrik	Validasi internal	Validasi eksternal
SIMCA	100%	100%
LDA	100%	100%

4. KESIMPULAN

Metode spektroskopi NIR dan kemometrik dapat digunakan untuk mengklasifikasikan kandungan flavonoid total serbuk daun murbei berdasarkan ketinggian tempat tanam yang berbeda. Berdasarkan hasil uji statistik *One Way ANOVA* kandungan flavonoid total serbuk daun murbei dari tiga ketinggian tempat tanam yang berbeda menunjukkan hasil yang tidak mempunyai perbedaan signifikan.

5. UCAPAN TERIMA KASIH

Ucapan terimakasih kepada Fakultas Farmasi Universitas Jember atas dukungan sarana dan prasarana hingga terselesaikannya penelitian ini.

6. DAFTAR PUSTAKA

Aminah, N. Tomahayu, dan Z. Abidin. 2016. Penetapan kadar flavonoid total ekstrak etanol kulit buah alpukat (*persea americana mill.*) dengan metode spektrofotometri uv-vis. *Jurnal Fitofarmaka Indonesia*. 4(2):226–230.

Azkiyah, D. R. Dan T. Tohari. 2019. Pengaruh Ketinggian Tempat Terhadap Pertanaman, Hasil, dan Kandungan Steviol Glikosida pada Tanaman Stevia (*Stevia rebaudiana*). *Vegetalika*. 8(1):1-12.

Banu, S., N. R. Jabir, N. C. Manjunanth, M. S. Khan, G. M. Ashraf, M. A. Kamal, dan S. Tabrez. 2015. Reduction of Post-prandial Hyperglycemia by Mulberry Tea in Type-2 Diabetes Patient. *Saudi Journal of Biological Sciences*. 22(1):32-36.

Berrar, D. 2018. Cross-validation. *Encyclopedia of Bioinformatics and Computational Biology*. 1:542–545.

BPOM RI. 2014. *Peraturan Kepala BPOM Nomor 12 tahun 2014 Tentang Persyaratan Mutu Obat Tradisional*.

- Chan, E. W. C., P. Y. Lye, dan S.K Wong. 2016. Phytochemistry, Pharmacology, and Clinical Trials of *Morus alba*. *Chinese Journal of Natural Medicines*. 14(1):17-30.
- Chang, C., M. Yang, H. Wen, dan J. Chern. 2002. Estimation of total flavonoid content in propolis by two complementary colorimetric methods. *Journal of Food and Drug Analysis*. 10(3):178–182.
- Elfahmi, H. J. Woerdenbag, dan O. Kayser. 2014. Jamu: Indonesian traditional herbal medicine towards rational phytopharmacological use. *Journal of Herbal Medicine*. 4(2):51–73.
- Gad, H. A., S. H. El-Ahmady, M. I. Abou-Shoer, dan M. M. Al-Azizi. 2012. Application of chemometrics in authentication of herbal medicines: a review. *Phytochemical Analysis*. 24(1):1–24.
- Luts, J., F. Ojeda, R. Van de Plas Raf, B. De Moor, S. Van Huffel, dan J. A. K. Suykens. 2010. A tutorial on support vector machine-based methods for classification problems in chemometrics. *Analytica Chimica Acta*. 665(2):129–145.
- Munadi, E. 2017. *Tanaman Obat, Sebuah Tinjauan Singkat*. Dalam Info Komoditi Tanaman Obat Badan Pengkajian dan Pengembangan Perdagangan Kementerian Perdagangan Republik Indonesia.
- Ozaki, Y. 2012. Near-infrared spectroscopy — its versatility in analytical. *Anal. Chem*. 28(June):545–562.
- Rohman, A. 2014. *Statistika dan Kemometrika Dasar Dalam Analisis Farmasi*. Edisi 1. Yogyakarta: Pustaka Belajar
- Sholekah, F. F. 2017. Perbedaan Ketinggian Tempat Terhadap Kandungan Flavonoid Dan Beta Karoten Buah Karika (*Carica Pubescens*) Daerah Dieng Wonosobo. *Prosiding Seminar Nasional Pendidikan Biologi Dan Biologi*. 75–82.
- Syahidan, H. H. dan Y. W. Wardhana. 2019. Review jurnal: parameter standarisasi tanaman herbal untuk pengobatan. *Farmaka*. 17(1):263–272.