

Identifikasi fitokimia dan kapasitas total antioksidan daun mimba (*Azadirachta indica* A. Juss) serta uji toksisitasnya terhadap larva *Artemia salina* Leach

Gita Manerlin Kasihita Simatupang¹, David Limanan^{2,*}, Frans Ferdinal²,
Eny Yulianti²

¹ Fakultas Kedokteran Universitas Tarumanagara, Jakarta, Indonesia

² Bagian Biokimia dan Biologi Molekuler Fakultas Kedokteran Universitas Tarumanagara, Jakarta, Indonesia

*korespondensi email: davidl@fk.untar.ac.id

ABSTRAK

Tanaman mimba atau *Azadirachta indica* A. Juss termasuk dalam family Meliaceae yang sejak zaman kuno sudah digunakan sebagai obat tradisional untuk berbagai penyakit manusia dalam rumah tangga. Tanaman ini juga dikenal akan kandungan antioksidannya. Ketidakseimbangan antioksidan dan oksidan dapat menyebabkan kematian sel sehingga terjadi penurunan enzim katalase yang menjadikan stress oksidatif. Oleh sebab itu, dibutuhkan daun mimba (*Azadirachta indica* A. Juss) sebagai antioksidan eksogen. Studi ini untuk mengetahui peranan daun mimba dengan melakukan uji fitokimia, kapasitas antioksidan dan uji toksisitas. Pada studi ini, daun mimba dikeringkan lalu dijadikan bubuk, kemudian diekstraksi menggunakan metanol dengan menggunakan metode maserasi untuk didapatkan simplisia-metanol. Hasil studi pada uji fitokimia didapatkan daun mimba mengandung alkaloid, antosianin, betasianin, kardioglikosida, kumarin, flavonoid, glikosida, fenolik, kuinon, saponin, steroid, terpenoid dan tannin. Uji kapasitas antioksidan didapati $IC_{50} = 97,241 \mu\text{g/mL}$. Uji toksisitas didapatkan $LC_{50} = 123,596 \mu\text{g/mL}$. Daun mimba memiliki efek antioksidan kuat dan sitotoksitas terhadap larva *Artemia salina* Leach. Daun mimba dapat dijadikan kandidat obat anti kanker.

Kata kunci: daun mimba; *Azadirachta indica* A. Juss; fitokimia; antioksidan; uji toksisitas; larva *Artemia salina* Leach

ABSTRACT

The neem plant, or *Azadirachta indica* A. Juss, belongs to the Meliaceae family and has been used since ancient times as a traditional medicine for various human ailments in the household. This plant is also known for its antioxidant content. An imbalance between antioxidants and oxidants can cause cell death, resulting in a decrease in the catalase enzyme, which causes oxidative stress. Therefore, neem leaves (*Azadirachta indica* A. Juss) are needed as exogenous antioxidants. This study is to determine the role of neem leaves by conducting phytochemical, antioxidant capacity, and toxicity tests. In this study, neem leaves were dried and then powdered, then extracted using methanol using the maceration method to obtain simplicia-methanol. The results of studies on phytochemical tests showed that neem leaves contain alkaloids, anthocyanins, betacyanins, cardioglycosides, coumarins, flavonoids, glycosides, phenolics, quinones, saponins, steroids, terpenoids, and tannins. The antioxidant capacity test found $IC_{50} = 97.241 \mu\text{g/mL}$. The toxicity test obtained $LC_{50} = 123.596 \mu\text{g/mL}$. Neem leaves have a strong antioxidant effect and cytotoxicity against *Artemia salina* Leach larvae. Neem leaves can be used as candidates for anti-cancer drugs.

Keywords: Mimba leaves; *Azadirachta indica* A. Juss; phytochemical; antioxidant; toxicity test; *Artemia salina* Leach larvae

PENDAHULUAN

Tanaman mimba (*Azadirachta indica* A. Juss.) termasuk di dalam famili *Meliaceae*. Tanaman ini dapat ditemukan di negara beriklim tropis seperti Indonesia.¹ Tanaman ini dikenal dengan sebutan Neem atau Nim dan dapat mencapai ketinggian 8 hingga 15 meter. Di Indonesia, tanaman mimba memiliki nama daerah, seperti imba atau mimba (Jawa); membha atau mempheuh (Madura); intaran atau mimba (Bali). Mimba merupakan tanaman yang tumbuh dengan baik di dataran rendah pada tanah yang miskin, dangkal, berpasir, berbatu dan kering dengan suhu udara yang panas. Tanaman ini tumbuh di pulau Jawa dan Madura dengan ketinggian hingga 300 meter di atas permukaan laut. Biasanya, tanaman mimba digunakan sebagai pengendali hama tanaman ataupun sebagai obat tradisional.¹

Tanaman mimba memiliki batang simpodial dengan kulit batang yang mengandung gum, serta daun yang rasanya pahit. Hampir dari seluruh bagian tanaman mimba berkhasiat sebagai obat yang digunakan untuk mengobati penyakit manusia. Namun, tanaman mimba ini juga dapat digunakan sebagai pestisida dalam rumah tangga. Daun tanaman ini mengandung senyawa-senyawa diantaranya adalah β -sitosterol,

hiperoside, nimbolide, quercetin, quercitrin, rutin, azadirachtin, dan nimbine. Beberapa diantaranya ternyata memiliki aktivitas anti kanker. Flavonoid, flavon glikosida, dihidroklonal, tanin, dan lain-lain juga merupakan unsur penting dari kulit kayu, daun, buah dan bunga mimba.²

Di Eropa, '*Materia Medica*' telah mengakui pohon mimba sebagai '*Panacea of all Disease*'. Namun di India, tanaman ini terkenal dengan banyak nama lain seperti '*Divine Tree*', '*Heal All*', '*Nature's Drugstore*', dan '*Village Dispensary*'. Penggunaan secara tradisional dan *ayurvedic* meliputi pengobatan demam, kusta, malaria, dan TBC.¹ Selain dari pada itu, beberapa studi mengenai daun mimba menunjukkan bahwa daun ini dapat menurunkan kadar glukosa darah pada hewan yang diabetes. Ekstrak daun dan kulit kayu daun mimba telah dipelajari untuk aktivitas antioksidannya dan hasil studi sebelumnya menunjukkan bahwa semua ekstrak/fraksi kulit pohon dan daun mimba yang diuji memiliki sifat antioksidan yang signifikan. Daun mimba mengandung flavanoid dan berbagai bahan lain yang berperan penting dalam menghambat perkembangan kanker. Sejumlah besar studi epidemiologis

mengemukakan bahwa kadar flavonoid yang tinggi berkemungkinan memiliki korelasi dengan penurunan risiko kanker.³

Kandungan fitokimia dan antioksidan daun mimba yang dapat berperan dalam anti kanker membuat peneliti ingin melihat lebih jauh mengenai kemampuan daun mimba dalam menghambat radikal bebas dan efeknya dalam penghambatan sel yang sedang membelah.

METODE PENELITIAN

Studi ini menggunakan desain studi eksperimental *in vitro* untuk uji fitokimia dan uji kapasitas total antioksidan, serta *bioassay* berupa uji toksisitas ekstrak daun mimba. Daun mimba yang sudah terkumpul dikeringkan, kemudian diekstraksi dengan metode maserasi dengan methanol, lalu dilakukan evaporasi hingga didapatkan ekstrak berbentuk pasta. Ekstrak ini digunakan untuk pengujian. Uji skrining fitokimia meliputi tes alkaloid, antosianin, betasianin, kardio glikosida, kumarin, flavonoids, glikosida, fenolik, kuinon, saponin, steroid, terpenoid, dan tanin. Uji kapasitas total antioksidan menggunakan senyawa 1,1-difenil-2-pikrilhidrazil (DPPH), sedangkan uji toksisitas menggunakan metode *Brine Shrimp Lethality Test* (BSLT). Studi ini

dilaksanakan di Laboratorium Departemen Biokimia dan Biologi Molekuler Fakultas Kedokteran, Universitas Tarumanagara pada November 2019 – April 2020. Sampel yang digunakan untuk studi ini adalah daun mimba dari Kecamatan Grati, Kabupaten Pasuruan, Jawa Timur.

HASIL DAN PEMBAHASAN

Uji fitokimia ekstrak daun mimba

Uji fitokimia terhadap ekstrak daun mimba didapatkan hasil senyawa alkaloid, antosianin, betasianin, kardioglikosida, kumarin, flavonoid, glikosida, fenolik, kuinon, saponin, steroid, terpenoid dan tanin yang positif (Tabel 1). Hasil yang serupa didapatkan oleh Ramadass *et al*⁴ yang menyatakan bahwa ekstrak daun mimba mengandung senyawa alkaloid, glikosida, flavonoid, saponin, tannin dan fenolik. Studi oleh Dash *et al*⁵ mendapatkan di dalam daun mimba mengandung senyawa glikosida, alkaloid, flavonoid, tanin dan saponin. Selain itu, Itelima *et al*⁶ menemukan senyawa positif untuk alkaloid, kardio glikosida, flavonoid, fenolik, saponin, tanin, terpenoid dan steroid. Alkaloid, flavonoid, glikosida dilaporkan menimbulkan berbagai efek biologis seperti anti-inflamasi, anti-alergi, antioksidan, anti-diabetes, aktivitas anti-

virus dan anti-kanker, aktivitas anti-kusta, aktivitas antimikroba. Galeane *et al*⁷ menyatakan bahwa adanya senyawa flavonoid dan saponin yang menunjukkan

daun mimba berpotensi sebagai antimikroba, anti-inflamasi, antioksidan, dan antivirus.

Tabel 1. Uji fitokimia ekstrak daun mimba

Senyawa	Hasil Uji	Reagent/Metode
Alkaloid	(+)	Mayer & Wagner
Antosianin dan Betasianin	(+)	NaOH
Kardio glikosida	(+)	Keller Kiliani
Kumarin	(+)	Fluorescence
Flavanoids	(+)	Alkaline Reagent
Glikosida	(+)	Borntrager test
Fenolik	(+)	Folin Ciocalteau
Kuinon	(+)	H ₂ SO ₄
Saponin	(+)	Foam test
Steroid	(-)	Libermann Burchard
Terpenoid	(+)	Libermann Burchard
Tanin	(+)	Ferric Chloride

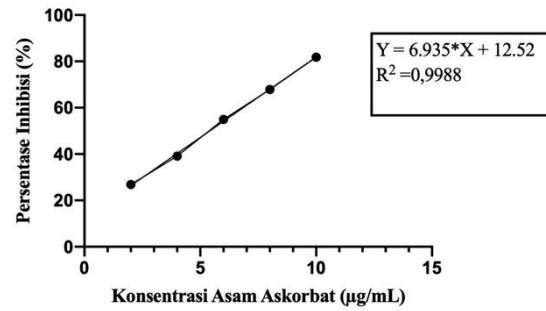
Perbandingan uji kapasitas total antioksidan vitamin C dan daun mimba

Vitamin C (asam askorbat) digunakan sebagai pembanding kapasitas total antioksidan daun mimba. Hasil uji pada vitamin C dengan berbagai konsentrasi didapatkan nilai absorbansi, lalu dicari persen inhibisi. Setelah didapatkan persen inhibisi. dibuat kurva standar untuk

menentukan persamaan linier, yang digunakan untuk menentukan nilai IC₅₀ vitamin C. (Tabel 2) Dari kurva persentase inhibisi, didapatkan persamaan linier $y = 6,935X + 12,52$ dengan $R^2 = 0,9988$ (Gambar 1). Kemudian IC₅₀ vitamin C dicari dengan menggunakan persamaan linier dan diperoleh nilai IC₅₀ vitamin C sebesar 5,404 µg/mL.

Tabel 2. Hasil presentasi inhibisi dan IC₅₀ asam askorbat

Kadar Standar Asam Askorbat (µg/mL)	Persentase Inhibisi (%)	IC ₅₀ (µg/mL)
2	26,85	
4	39,11	
6	54,96	5,40
8	61,86	
10	81,81	



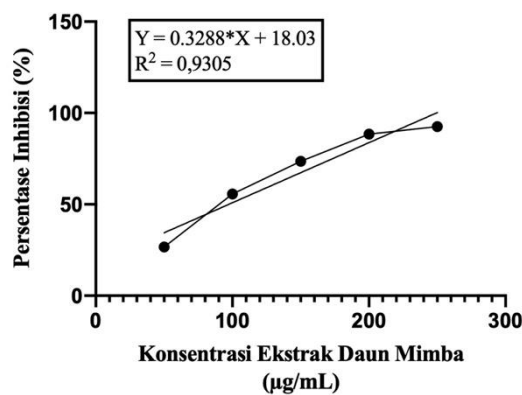
Gambar 1. Kurva Persentase Inhibisi Asam Askorbat

Berdasarkan hasil uji kapasitas total antioksidan ekstrak daun mimba dengan konsentrasi 50 µg/mL, 100 µg/mL, 150 µg/mL, 200 µg/mL, dan 250 µg/mL, dilakukan pencarian nilai absorbansi dengan menggunakan alat spektrofotometer yang dilanjutkan dengan menghitung persen inhibisinya (Tabel 3).

Kurva persentase inhibisi ekstrak daun mimba, didapatkan persamaan linier: $y = 6,3288X + 18,03$ dengan $R^2 = 0,9305$ (Gambar 2). Kemudian IC_{50} daun mimba dicari dengan menggunakan persamaan linier tersebut, sehingga diperoleh IC_{50} daun mimba sebesar 97,241 µg/mL.

Tabel 3. Persentase inhibisi dan IC_{50} ekstrak daun mimba

Konsentrasi ekstrak daun mimba (µg/mL)	Persentase inhibisi (%)	IC_{50} (µg/mL)
50	26,667	
100	55,676	
150	73,514	97,241
200	88,378	
250	92,523	



Gambar 2. Kurva persentase inhibisi ekstrak daun mimba

Nilai IC_{50} digunakan untuk menyatakan kapasitas total antioksidan ekstrak daun mimba. Nilai ini merupakan konsentrasi efektif yang dibutuhkan untuk meredam 50% dari total radikal bebas DPPH. Hasil IC_{50} untuk daun mimba sebesar 97,241 $\mu\text{g/mL}$, sedangkan IC_{50} untuk asam askorbat sebesar 5,404 $\mu\text{g/mL}$. Semakin kecil nilai IC_{50} menunjukkan aktivitas antioksidan semakin tinggi. Berdasarkan hasil yang didapat, dapat dilihat bahwa IC_{50} daun mimba lebih tinggi dibandingkan IC_{50} asam askorbat, sehingga antara daun mimba dengan asam askorbat, asam askorbat lebih efektif untuk menangkal radikal bebas. Tristantini *et al*⁸ menyatakan bahwa kapasitas total antioksidan yang berdasarkan IC_{50} , bila nilai <50 ppm termasuk sifat antioksidan yang sangat kuat, 50-100 ppm termasuk dalam sifat antioksidan yang kuat, 100 ppm-150 ppm termasuk antioksidan yang bersifat sedang dan 150 ppm hingga 200 ppm mempunyai sifat antioksidan yang lemah. Abdulkadir *et al*⁹ juga memperoleh nilai IC_{50} sebesar 55,07 $\mu\text{g/mL}$ sehingga dapat dikatakan bahwa ekstrak daun mimba memiliki sifat antioksidan yang kuat. Vitamin C yang berlebihan dapat menyebabkan diare, sedangkan ekstrak dari daun mimba dapat mengobati diare. Hal ini sejalan dengan studi oleh Thakurta *et al*¹⁰ yang juga menyatakan bahwa

ekstrak daun mimba dapat mengobati diare. Hal ini menjadi keuntungan daun mimba dibandingkan dengan vitamin C.

Uji toksisitas daun mimba

Setelah dilakukan pemeriksaan dengan konsentrasi ekstrak daun mimba, didapatkan jumlah larva yang hidup dan mati, lalu dicari angka persentase mortalitas *Artemia salina* (Tabel 4). Kemudian dibuat kurva dalam bentuk logaritma konsentrasi ekstrak daun mimba terhadap persentase mortalitas larva *Artemia salina*. Pada kurva diperoleh persamaan linier terhadap konsentrasi ekstrak daun mimba $y = 63,39X - 82,68$ dan $R^2 = 0,9899$ (Gambar 5). Kemudian persamaan linier yang didapat digunakan untuk menghitung Lethality Concentration 50 (LC_{50}) dari ekstrak daun mimba dan diperoleh LC_{50} ekstrak daun mimba sebesar 123.596 $\mu\text{g/mL}$.

Lethal concentration (LC_{50}) digunakan sebagai parameter pada uji toksisitas metode Brine Shrimp Lethality Test (BSLT). *Brine Shrimp Lethality Test* dianggap sebagai alat yang berguna untuk penilaian awal toksisitas dan bioaktivitas yang diberikan oleh ekstrak tumbuhan. Menurut indeks toksisitas Meyer¹¹, ekstrak dengan $LC_{50} < 1000 \mu\text{g} / \text{mL}$ dianggap beracun atau toksik, sedangkan ekstrak dengan $LC_{50} > 1000 \mu\text{g} / \text{mL}$

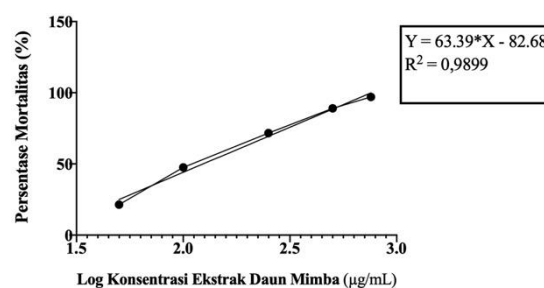
dianggap sebagai tidak beracun atau non toksik. Dari hasil uji toksisitas yang didapat, didapati hasil 123,596 µg/mL dimana menurut kriteria atau indeks toksisitas Meyer¹¹.

Brine Shrimp Lethality Test diketahui dapat menjadi metode penapisan awal untuk mengidentifikasi senyawa antikanker dari suatu tanaman, yang memiliki arti bahwa semakin kecil hasil LC₅₀, semakin tinggi pula tingkat toksisitas tanaman tersebut sehingga memiliki potensi untuk menjadi antikanker. Hasil studi menunjukkan bahwa ekstrak daun mimba termasuk dalam toksisitas sedang dan dapat sebagai kandidat anti kanker. Studi Al-Emran *et al*¹² didapati LC₅₀ sebesar 37.15 µg/mL

yang termasuk dalam kategori toksik. Sejalan dengan studi oleh Al-Emran *et al* dimana ekstrak daun nimba menyebabkan kematian sel kanker prostat (PC-3) dengan menginduksi apoptosis yang dibuktikan dengan peningkatan *dose-dependent* dalam fragmentasi DNA dan penurunan dalam viabilitas sel.¹² Hal ini diperkuat juga oleh studi dari Sastry *et al*¹³ dimana senyawa nimbolid yang didapat dari ekstrak daun mimba digunakan sebagai senyawa utama untuk anti kanker. Hal ini jelas menunjukkan bahwa adanya bioaktif kuat yang mungkin sangat berguna sebagai antiproliferatif, antitumor, pestisida dan agen bioaktif lainnya.

Tabel 4. Angka mortalitas larva *Artemia salina* pada konsentrasi ekstrak daun mimba

Konsentrasi (µg/mL)	Angka Mortalitas (%)	LC ₅₀ (µg/mL)
50	21,429	
100	47,619	
250	71,739	123,596
500	89,091	
750	97,101	



Gambar 3. Angka mortalitas *Artemia salina* terhadap konsentrasi ekstrak daun mimba

KESIMPULAN

Hasil uji fitokimia pada ekstrak daun mimba didapatkan memiliki senyawa alkaloid, antosianin dan betasianin, kardio glikosida, kumarin, flavonoid, glikosida, fenolik, kuinon, steroid, saponin, terpenoid dan tannin. Kapasitas total antioksidan ekstrak daun mimba didapatkan IC_{50} sebesar 97,241 $\mu\text{g/mL}$ dan termasuk antioksidan kuat. Uji toksisitas didapatkan LC_{50} sebesar 123,596 $\mu\text{g/mL}$, bersifat toksisitas terhadap larva *Artemia salina* Leach dan dapat menjadi kandidat obat anti kanker.

DAFTAR PUSTAKA

- Puri HS. *Neem: The Divine Tree Azadirachta Indica*. Amsterdam: Taylor & Francis; 2005.
- Turang A. *Mengenal tanaman mimba*. Sulawesi Utara: Balai Pengkajian Teknologi Pertanian Sulawesi Utara; 2016.
- Alzohairy MA. Therapeutics Role of *Azadirachta indica* (Neem) and Their Active Constituents in Diseases Prevention and Treatment. *Evid Based Complement Alternat Med*. 2016;2016:7382506.
- Ramadass N, Subramainan N. Study of phytochemical screening of Neem (*Azadirachta indica*). *Int J Zool Stud*. 2018;3(1):209-12.
- Dash SP, Dixit S, Sahoo S. Phytochemical and biochemical characterizations from leaf extracts from *Azadirachta indica*: An important medicinal plant. *Biochem Anal Biochem*. 2017;6(2):[4p].
- Itelima JU, Nwokedi VC, Ogbonna AI, Nyam MA. Phytochemical screening and antimicrobial activity evaluation of aqueous and ethanolic extracts of the leaf of *Azadirachta indica* Juss (neem) on some microorganisms. *World J Microbiol*. 2016;3(1):56-60.
- Galeane MC, Martins CHG, Massuco J, Bauab TM, Sacramento LVS. Phytochemical screening of *Azadirachta indica* A. Juss for antimicrobial activity. *Afr J Microbiol Res*. 2017;11(4):117-22.
- Tristantini D, Ismawati A, Pradana BT, Gabriel J. Pengujian aktivitas antioksidan menggunakan metode DPPH pada Daun Tanjung (*Mimusops elengi* L). *Prosiding Seminar Nasional Teknik Kimia "Kejuangan"*. 2016:1-7.
- Abdulkaddir AR, Mat N, Jahan MS. *In-vitro* antioxidant potential in leaf, stem and bark of *Azadirachta indica*. *Pertanika J Trop Agric Sci*. 2017; 40 (4): 497 – 506.
- Thakurta P, Bhowmik P, Mukherjee S, Hajra TK, Patra A, Bag PK. Antibacterial, antisecretory and antihemorrhagic activity of *Azadirachta indica* used to treat Cholera and Diarrhea in India. *J Ethnopharmacol*. 2007;111(3):607-12.
- Meyer BN, Ferrigni NR, Putnam JE, Jacobsen LB, Nichols DE, McLaughlin JL. Brine Shrimp: A convenient general bioassay for active plant constituents. *Planta Medica*. 1982;45(5):31-4.
- Al-Emran A, Shaded SM, Ahmed F, Saha SK, Das SC, Bachar SC. Evaluation of Brine shrimp lethality and antimicrobial activity of *Azadirachta indica* leaf extract on some drug resistance bacteria in Bangladesh. *Pharmacol J*. 2011;3(20):66-71.
- Sastry BS, Babu KS, Babu TH, Chandrasekhar S, Srinivas PV, Saxena AK, et al. Synthesis and biological activity of amide derivatives of nimbolide. *Bioorg Med Chem Lett*. 2006;16(16):4391-4.