

UJI AKTIVITAS ANTIOKSIDAN DARI DAUN CENGKEH (*Eugenia Carryophyllus*) DENGAN METODE DPPH

Johnly Alfrets Rorong^{1*}

¹Jurusan Kimia, Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam,
Universitas Sam Ratulangi, Manado

Diterima 10-09-2008; Diterima setelah direvisi 10-10-2008; Disetujui 17-10-2008

ABSTRACT

Rorong, J. A., 2008. The test of the antioxidant activity from *Eugenia carryophyllus* leaves.

Clove (*Eugenia carryophyllus*) is a traditional food ingredient characterized by its specific and refreshing aroma. This study was intended to determine the antioxidative effects of clove leaves. Clove leaves was extracted sequentially with hexane, methanol and ethanol. The antioxidative effects of the extracts were determined by 1,1-diphenyl-2-picrylhydrazyl (DPPH) scavenging and reducing power assay. Total phenolic content of ESME extracts the highest compared with EHS and EEM were 0,851; 1,8575 and 1,237 mg/kg respectively, which expressed as gallic acid equivalent. The addition of methanol extracts of clove leaves in the reaction mixture showed the highest scavenging activity in 1,1-diphenyl-2-picrylhydrazyl (DPPH) radical and reducing power. These results suggest that the ethanolic extract of clove leaves contains compounds having antioxidative activities.

Keywords : clove, autooxidation, photooxidation, solvent extraction, DPPH

PENDAHULUAN

Tanaman cengkeh (*Eugenia carryophyllus*) merupakan tanaman perkebunan/industri yang banyak ditemukan di kawasan timur Indonesia misalnya di Sulawesi Utara. Tanaman yang termasuk dalam famili *Myrtaceae* ini banyak ditemukan di dataran rendah dengan ketinggian 200 – 900 di atas permukaan laut. Tinggi dari tanaman cengkeh dapat mencapai 5 – 10 m. Daun dari tanaman tersebut berbentuk bundar telur atau oval sedangkan warnanya adalah kehijauan dan kemerah-merahan (Hernani dan Rahardjo, 2005) Tanaman cengkeh mempunyai sifat yang khas karena semua bagian pohon mengandung minyak, mulai dari akar, batang, daun sampai bunga (Ketaren, 1985).

Pemanfaatan tanaman cengkeh di Sulawesi Utara sebagian besar hanya mencakup bagian bunganya saja sedangkan bagian daun hanya dianggap sebagai limbah, padahal di dalam daun cengkeh terkandung suatu komponen minyak atsiri dan komponen fenolik yang selama ini kurang dimanfaatkan secara maksimal. Komponen fenolik merupakan antioksidan alami yang bermanfaat bagi kesehatan manusia.

Antioksidan merupakan senyawa penting dalam menjaga kesehatan tubuh karena berfungsi sebagai penangkap radikal bebas dalam tubuh. Radikal bebas dapat menginduksi penyakit

kanker, aterosklerosis, dan penuaan dini (Hernani dan Rahardjo, 2005).

Pada umumnya, antioksidan dibagi menjadi dua jenis yaitu antioksidan sintetik dan antioksidan alami. Antioksidan sintetik yang banyak digunakan berbahaya bagi kesehatan karena bersifat racun jika dikonsumsi dengan konsentrasi yang berlebihan. Oleh karena itu, diperlukan antioksidan alami yang cenderung tidak memiliki efek samping dan bermanfaat bagi kesehatan (Sarastani, 2002). Menurut Pratt dan Hudson dalam Trilaksani (2003), senyawa antioksidan alami tumbuhan adalah senyawa fenolik atau polifenolik yang dapat berupa golongan flavonoid, tokoferol dan asam-asam polifungsional. Senyawa fenolik dapat ditemukan dalam rempah seperti daun cengkeh. Daun cengkeh mengandung saponin, flavonoid, tanin, dan minyak atsiri (Anonimous, 2006). Menurut Sastrohamidjojo (2002), dalam minyak daun cengkeh terdapat komponen fenolik seperti eugenol dan eugenol asetat. Selain itu terdapat juga karyofilin, dan seskuiterpen.

Berdasarkan beberapa fakta tentang antioksidan alami tersebut dan kurangnya informasi tentang aktivitas antioksidan dalam daun cengkeh, perlu dilakukan penelitian untuk menentukan aktivitas antioksidan, penentuan total fenol, dan uji kandungan flavonoid dari daun cengkeh.

Salah satu metode untuk menentukan aktivitas antioksidan adalah dengan menggunakan radikal bebas DPPH (*1,1-diphenyl-2-picrylhidrazil*). Metode DPPH digunakan untuk menguji kemampuan suatu komponen sebagai penangkap radikal bebas dalam suatu bahan atau ekstrak. Keunggulan dari metode DPPH adalah dapat dikerjakan secara cepat dan sederhana (Pamarti, 2005).

BAHAN DAN METODE

Bahan dan Alat

Daun cengkeh dipetik langsung dari perkebunan cengkeh di kelurahan Paal IV, kecamatan Tikala, Manado. Beberapa bahan kimia yang digunakan dalam penelitian ini adalah etanol (C_2H_5OH), metanol (CH_3OH), heksana (C_6H_6), etil asetat ($CH_3COOC_2H_5$), aluminium klorida ($AlCl_3$), aquades, natrium karbonat (Na_2CO_3), reagen Folin-Ciocalteu diperoleh dari Merck (Darmstadt, Germany), 1,1-difenil-2-pikrilhidrazil (DPPH) diperoleh dari Sigma Chemical Co. Alat yang digunakan adalah alat penggiling, ayakan 65 mesh, alat-alat gelas laboratorium, vortex, kolom kromatografi dengan diameter kolom 1,5 cm dan panjang 50 cm, pengaduk magnet, pemanas listrik, timbangan analitik, mikropipet, rotari evaporator dan spektrofotometer UV-Vis Milton Roy 501.

Preparasi Sampel

Daun cengkeh dibersihkan, dikering anginkan selama 5 hari selanjutnya diblender lalu diayak dengan menggunakan ayakan 65 mesh. Serbuk yang diperoleh disimpan dalam kantong plastik pada suhu $-20^{\circ}C$ sebelum dilakukan analisis.

Ekstraksi Daun Cengkeh

Serbuk daun cengkeh diekstraksi secara maserasi dan soxhletasi menggunakan pelarut etanol 95 %. Sebanyak 25 g serbuk daun cengkeh dimasukkan ke dalam Erlenmeyer 250 ml kemudian ditambahkan pelarut etanol sebanyak 200 ml. Ekstraksi dilakukan 2 kali dengan menggunakan pengaduk magnet selama 24 jam. Selanjutnya, larutan disaring dengan menggunakan kertas saring kemudian kedua ekstrak digabung sehingga diperoleh ekstrak etanol maserasi (EEM) atau disebut ekstrak I. Dengan cara yang sama dilakukan ekstraksi menggunakan soxhlet dengan pelarut heksana sehingga diperoleh ekstrak heksana soxhletasi

(EHS) atau disebut ekstrak II. Selanjutnya, ampas cengkeh hasil soxhletasi dimaserasi dua kali dengan menggunakan etanol selama 24 jam sehingga diperoleh ekstrak soxhletasi maserasi etanol (ESME) atau disebut ekstrak III. Ketiga ekstrak ditimbang dan disimpan pada suhu $-20^{\circ}C$ sebelum digunakan untuk pengujian.

Efek Konsentrasi Ekstrak Daun Cengkeh

Perbedaan konsentrasi ekstrak etanol maserasi (EEM), ekstrak soxhletasi heksana (EHS), ekstrak soxhletasi maserasi etanol (ESME) yang akan diuji adalah 50, 100, 150, 200, dan 500 ppm serta aktivitas penangkap radikal dalam DPPH ditentukan menurut metode yang diuraikan oleh Burda dan Oleszek (2001).

Penentuan Aktivitas Penangkap Radikal Bebas DPPH

Dipersiapkan sebanyak 2 mL larutan 1,1-difenil-2-pikrilhidrazil (DPPH) 0,2 mM (milimolar) dalam etanol dan ditambahkan 2 mL ekstrak daun cengkeh. Berubahnya warna larutan dari ungu ke warna kuning menunjukkan efisiensi penangkap radikal. Selanjutnya lima menit terakhir menjelang 30 menit, absorbansi diukur pada $\lambda = 517$ nm dengan spektrofotometer UV-Vis Milton Roy 501. Aktivitas penangkapan radikal bebas dihitung sebagai persentase berkurangnya warna DPPH dengan menggunakan persamaan :

Aktivitas penangkap radikal bebas =

$$\left(1 - \frac{\text{abs Sampel}}{\text{abs Kontrol}} \right) \times 100\%$$

Penentuan Kandungan Total Fenol Ekstrak Daun Cengkeh

Sebanyak 0,4 mL ekstrak daun cengkeh dimasukkan ke dalam tabung reaksi, ditambahkan 0,1 mL air dan 0,1 mL larutan Folin-Ciocalteu reagen 50%, campuran divortex selama 3 menit. Selanjutnya, ditambahkan 2 mL larutan Na_2CO_3 2%, campuran disimpan dalam ruang gelap selama 30 menit. Absorbansi larutan ekstrak dibaca pada $\lambda = 750$ nm dengan spektrofotometer UV-Vis Milton Roy 501. Hasilnya dinyatakan sebagai mg asam galat/kg ekstrak.

Analisa Statistika

Semua eksperimen dilakukan dengan dua kali ulangan dan data yang diperoleh diolah menggunakan Rancangan Acak Lengkap (RAL) dengan dua kali ulangan. Pengujian dilanjutkan dengan uji beda rata-rata DMRT dan dianalisis menggunakan software SPSS.

HASIL DAN PEMBAHASAN

Preparasi Sampel

Dalam penelitian ini, daun cengkeh dikeringkan selama ± 5 hari dengan tujuan untuk menghilangkan kandungan air dalam pelarut yang berakibat ekstraksi menjadi lebih sulit, memerlukan waktu yang lama, rendemen ekstraksi yang lebih rendah sehingga efektivitas dan efisiensi ekstraksi berkurang (Pomeranz dan Meloan, 1994). Tingkat kemudahan ekstraksi bahan kering ditentukan oleh ukuran partikel dari bahan tersebut, makin kecil ukuran partikel, makin besar permukaannya sehingga makin banyak bagian sampel yang berinteraksi dengan pelarut (Pomeranz dan Meloan, 1994). Oleh karena itu, daun cengkeh yang telah dikeringkan selanjutnya dihaluskan dengan blender dan diayak dengan ukuran 65 mesh.

Ekstraksi Daun Cengkeh

Komponen yang dapat berfungsi sebagai antioksidan dalam daun cengkeh diekstraksi

dengan soxhlet menggunakan pelarut heksana. Hasil ekstraksi yang diperoleh disebut ekstrak heksan soxhletasi (EHS). Selanjutnya, residu dari hasil soxhletasi dimaserasi dengan pelarut etanol dan hasilnya disebut ekstrak soxhletasi maserasi etanol (ESME). Untuk ekstrak etanol maserasi (EEM), serbuk daun cengkeh diekstraksi dengan cara maserasi menggunakan pelarut etanol. Kedua jenis pelarut dipakai untuk memisahkan komponen polar dan komponen nonpolar dalam daun cengkeh yang memiliki aktivitas sebagai antioksidan. Kombinasi metode soxhletasi dan maserasi digunakan supaya dapat memisahkan komponen utama dalam daun cengkeh yaitu eugenol yang dapat berfungsi sebagai antioksidan. Komponen eugenol dipisahkan dengan heksana pada soxhletasi dan dilanjutkan dengan etanol pada maserasi untuk memisahkan komponen fenol lainnya.

Pada metode maserasi serbuk daun cengkeh direndam dalam etanol selama 24 jam sambil diaduk dengan pengaduk magnet, yang bertujuan meningkatkan efisiensi dari ekstraksi. Untuk meningkatkan rendemen, residu hasil maserasi diekstrak sekali lagi dengan pelarut dan perlakuan yang sama. Soxhletasi serbuk daun cengkeh dilakukan dengan pemanasan selama 4 jam. Setelah ekstrak diperoleh, penghilangan pelarut dilakukan dengan evaporator. Tabel 1. menunjukkan persentase rendemen dari ketiga ekstrak.

Tabel 1. Persentase Rendemen Ekstrak Daun Cengkeh

Jenis ekstraksi	Rendemen (%)
EHS	30,08
ESME	23,2
EEM	26,4

Keterangan: EHS (ekstrak heksana soxhletasi)
 ESME (ekstrak soxhletasi metanol etanol)
 EEM (ekstrak etanol maserasi)

Dari ketiga cara ekstraksi pada Tabel 1 dapat dilihat bahwa rendemen tertinggi diberikan oleh ekstrak heksana soxhletasi (EHS) diikuti ekstrak etanol maserasi (EEM) kemudian ekstrak soxhletasi maserasi (ESME). Dari data tersebut diketahui bahwa komponen terbanyak dalam daun cengkeh adalah komponen nonpolar.

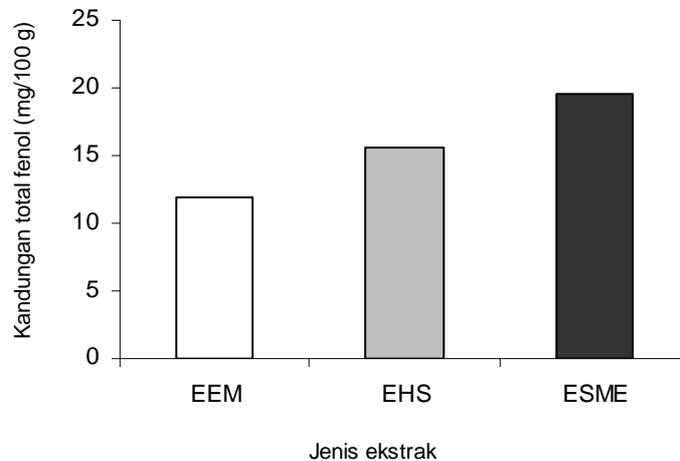
Kandungan Total Fenol Ekstrak Daun Cengkeh

Kemampuan antioksidatif dari ekstrak daun cengkeh disebabkan oleh adanya senyawa-senyawa kimia yang dapat berperan sebagai antioksidan. Tingginya aktivitas antioksidan dalam ekstrak daun cengkeh berhubungan langsung dengan total fenol dari masing-masing ekstrak.

Penentuan total fenol dengan metode Folin-Ciocalteu (Huang dan Yen, 2002) dilakukan untuk mengetahui potensi antioksidan dalam suatu ekstrak. Metode Folin-Ciocalteu telah banyak dipakai dalam penelitian, reagen Folin-Ciocalteu tidak bersifat spesifik terhadap senyawa fenol dan warna yang dihasilkan bergantung pada gugus hidroksi dan kedudukan gugus tersebut dalam struktur molekul (Julkunen-Tiito, 1985). Vitamin E, flavonoid, asam fenolat, termasuk dalam senyawa fenolik (Andarwulan *et al.*, 1996).

Dalam penelitian ini, total fenol dalam ekstrak daun cengkeh diukur dengan standar asam galat (mg/kg). Penggunaan asam galat sebagai

standar dikarenakan senyawa ini mempunyai gugus hidroksi dan ikatan rangkap yang terkonjugasi pada masing-masing cincin benzena menyebabkan senyawa ini sangat efektif membentuk senyawa kompleks dengan reagen Folin-Ciocalteu, sehingga reaksi yang terjadi lebih sensitif dan intensif (Julkunen-Tiito, 1985). Konsentrasi larutan standar asam galat yang digunakan adalah 30, 60, 90, 120, 150 ppm sehingga diperoleh persamaan garis linear $y = 0,0049x + 0,0605$ dengan koefisien korelasi (R^2) 0.9977. Dari persamaan tersebut diperoleh total fenol dalam ketiga ekstrak yang ditunjukkan pada Gambar 1,

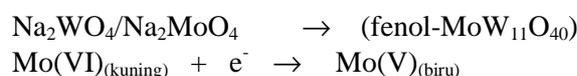


Gambar 1. Kandungan Total Fenol Ekstrak Daun Cengkeh. EHS: ekstrak heksan sokhletasi, ESME: ekstrak sokhletasi maserasi etanol dan, EEM: ekstrak etanol maserasi

Dari Gambar 1 dapat dilihat bahwa ESME memiliki kandungan total fenol tertinggi diikuti EEM kemudian EHS. Rendahnya total fenol dari EHS dibandingkan EEM diduga karena senyawa fenol dalam ekstrak bersifat polar sehingga ekstrak yang larut dalam etanol lebih banyak. Menurut Larson (1988), komponen fenolik seperti flavonoid, asam fenolik dan komponen fenol lainnya yang dikenal sebagai "antioksidan primer" dari tanaman bersifat relatif polar.

Total fenol dalam ekstrak ditentukan berdasarkan kemampuan senyawa fenolik bereaksi dengan reagen Folin - Ciocalteu yang

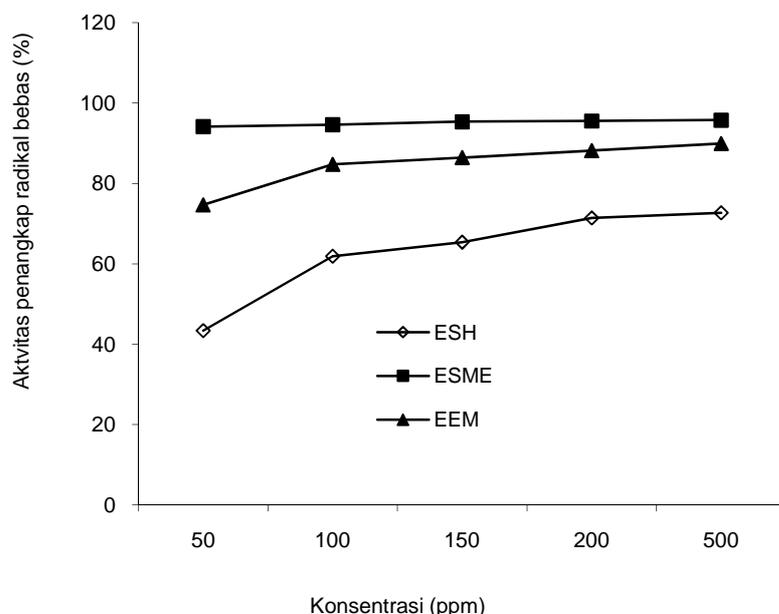
mengandung asam fosfomolibdat - fosfotungstat, sehingga dihasilkan senyawa kompleks molibdenum - tungsten yang berwarna biru. Semakin tua intensitas warna larutan menunjukkan total fenol dalam fenol makin besar. Warna biru yang dihasilkan sangat bergantung pada gugus hidroksi dan kedudukan gugus OH⁻ dalam struktur molekul tidak hanya ditentukan oleh jumlah senyawa fenolik tetapi juga oleh variasi struktur dan agen pereduksi nonfenolik. Oleh karena itu, hasil analisis yang diperoleh merupakan hasil relatif dari senyawa fenolik (Julkunen - Tiito, 1985).



Efek Konsentrasi Ekstrak Daun Cengkeh Terhadap Aktivitas Antioksidan

Salah satu metode untuk menentukan aktivitas antioksidan suatu bahan adalah dengan metode radikal bebas (DPPH). Hasil uji

penangkap radikal bebas pada ketiga ekstrak menunjukkan bahwa semua ekstrak memiliki kemampuan sebagai penangkap radikal bebas (Gambar 2).



Gambar 2. Aktivitas Penangkap Radikal Bebas Ekstrak Daun Cengkeh. EHS: ekstrak heksan sokhletasi, ESME: ekstrak sokhletasi maserasi etanol dan, EEM: ekstrak etanol maserasi

Dari Gambar 2 dapat dilihat bahwa ESME memiliki aktivitas tertinggi diikuti oleh EEM kemudian EHS. Hal ini menunjukkan bahwa banyaknya rendemen tidak selamanya mempengaruhi aktivitas antioksidan dari suatu ekstrak. ESME pada konsentrasi 50, 100, 150, 200, 500 ppm tidak terdapat perbedaan yang signifikan ($p < 0.05$) demikian juga dengan EEM pada konsentrasi 100, 150, 200, 500 ppm.

Komponen eugenol merupakan komponen utama dalam daun cengkeh dan memiliki aktivitas antioksidan. Eugenol juga dapat larut dalam pelarut organik seperti eter, kloroform, alkohol, dan asam asetat glasial. Selain itu, eugenol juga dapat larut dalam minyak yang merupakan komponen nonpolar (Winholz, 1976). EHS memiliki aktivitas terendah diduga karena komponen antioksidan dalam ekstrak tersebut hanyalah eugenol yang dapat larut dalam pelarut heksana yang bersifat nonpolar sedangkan pada EEM diduga terdapat komponen antioksidan lainnya yang dapat larut dalam pelarut etanol yang bersifat polar selain eugenol, hal ini dibuktikan

dengan tingginya aktivitas pada EEM. Dari data yang diperoleh, ESME memiliki aktivitas yang lebih tinggi daripada EHS dan EEM, diasumsikan bahwa dalam ESME terdapat komponen antioksidan selain eugenol. Pada saat ekstraksi sokhletasi dilakukan, komponen eugenol ikut larut dalam heksana yang bersifat nonpolar. Hal ini mengindikasikan bahwa pada ekstraksi maserasi selanjutnya komponen eugenol telah berkurang sehingga jika ESME di uji aktivitas penangkap radikal bebas seharusnya aktivitas dari ESME adalah rendah. Namun demikian, ternyata aktivitas dari ESME tinggi sehingga diduga terdapat komponen antioksidan lain yang bersifat nonpolar dalam ESME selain eugenol.

Berdasarkan grafik pada Gambar 2 diketahui bahwa aktivitas penangkap radikal bebas dari ekstrak dipengaruhi oleh besarnya konsentrasi. Meningkatnya konsentrasi akan menyebabkan meningkat pula aktivitas antioksidan dari ekstrak. Hal tersebut juga terdapat pada hubungan antara total fenol dan

aktivitas penangkap radikal bebas dari ekstrak (Gambar 1).

Menurut Gordon (2001), DPPH merupakan radikal sintesis yang dapat larut dalam pelarut organik polar seperti etanol dan metanol. Dalam penelitian ini, uji DPPH dilakukan dengan mengamati penurunan absorbansi pada panjang gelombang 515 – 517 nm dengan spektroskopi UV-Vis. Penurunan nilai absorbansi sebagai akibat dari penurunan intensitas warna dari larutan yaitu dari warna ungu ke warna kuning. Penurunan intensitas warna ini terjadi karena penambahan radikal hidrogen dari senyawa antioksidan pada elektron yang tak berpasangan pada radikal nitrogen dalam struktur senyawa DPPH. Makin cepat nilai absorbansi turun atau makin cepat perubahan warna dari larutan, makin potensial antioksidan tersebut dalam mendonorkan hidrogen (Yen dan Duh, 1994). Menurut Jadhav *et al.* (1996), antioksidan yang bersifat mendonorkan radikal hidrogen merupakan antioksidan pemutus rantai, atau dikenal sebagai antioksidan primer. Antioksidan primer akan bereaksi dengan radikal peroksil yang selanjutnya diubah menjadi radikal yang lebih stabil atau nonradikal.

KESIMPULAN

Dari hasil penelitian yang didapatkan dapat disimpulkan bahwa Semua ekstrak daun cengkeh memiliki aktivitas sebagai penangkap radikal bebas atau antioksidan. Untuk aktivitas tertinggi adalah ekstrak soxhletasi maserasi etanol (ESME) diikuti ekstrak etanol maserasi (EEM) kemudian ekstrak soxhletasi heksan (ESH). Untuk analisis kandungan total fenol dari ekstrak diperoleh bahwa semua ekstrak memiliki senyawa fenol dengan kandungan total fenol tertinggi adalah ESME kemudian EEM dan ESH.

DAFTAR PUSTAKA

- Anonim. 2006. *Tanaman Obat Indonesia, Cengkeh*. <http://www.iptek.net.id/ind>.
- Andarwulan dan Fardianz. 1996. *Isolasi dan Antioksidan Alami dari Jinten (Cucum cyrumin Linn)*. Prosiding Widya Karya Nasional, Khasiat Makanan Tradisional. Jakarta.
- Burda, S. dan W. Oleszek. 2001. Antioxidant and Antiradical Activities of Flavonoid. *J. Agric. Food Chem.* (49): 2774-2779.
- Gordon, M.H 1990. *The Mechanism of Antioxidants Action in vitro*. Di dalam: B.J.F. Hudson, editor. *Food Antioxidants*. Elsevier Applied Science, London.
- Hernarni dan Rahardjo. 2005. *Tanaman Berkhasiat Antioksidan*. Penebar Swadaya. Jakarta.
- Huang, C. Y. dan G. C. Yen. 2002. *Antioxidant Activity of Phenolic Compounds Isolated from Mesona Procumbens Hemsl*. *J. Agric. Food Chem.* 50 : 2993-2997.
- Jadhav, S. J., Ninbalkar, S. S., Kulkarni, A.D., dan Mahari, D. L. 1996. *Lipid Oxidation in Biological and Food System*. New York.
- Julkunan – Tiito, R. 1985. *Phenolic Constituen in The Leaves of Northern Willows*. *Methods for The Analysis of Certain Phenolics*. *J. Agric. Food Chem.*33: 213-217.
- Larson, R. A. 1988. The Antioxidants of Higher Plants. *Phytochemistry*.(27): 969-972.
- Ketaren, S. 1986. *Pengantar Teknologi Minyak dan Lemak Pangan*. Universitas Indonesia.
- Pamarti, M. 2005. *Aktivitas Antioksidatif Ekstrak Biji Pinang (Areca catechu L.) dan Stabilitasnya Terhadap Panas*. [Skripsi]. Fakultas Pertanian, Universitas Gadjah Mada, Yogyakarta.
- Pomeranz, Y. dan Meloan C. E. 1994. *Food Analysis. Theory and Practice 3rd ed*. Chapman dan Hall, International Thamson Publ. Co., New York.
- Pratt, D. E. 1992. *Natural Antioxidant from Plant Material*. Di dalam: M. T. Huang, C. T. Ho, dan C. Y. Lee, editor. *Phenolic Compounds in Food and their Effects on Health*. American Society. Washington DC.
- Sastrohamidjojo, H. 2002. *Diktat Kimia Minyak Atsiri, hal 121-160*, Fakultas MIPA, Universitas Gadjahmada, Yogyakarta
- Trilaksani, W. 2003. *Antioksidan : Jenis, sumber, mekanisme kerja, dan peran pada kesehatan*. http://rudycr.tripod.com/sem2023/wini_trilaksani.htm (14 September 2006).