

AKTIVITAS ANTIFOTOOKSIDAN DAN KOMPOSISI FENOLIK DARI DAUN CENGKEH (*Eugenia aromatic L.*)

Meiske Lumingkewas¹, Jeanette Manarisip¹, Fetty Indriaty¹, Amelia Walangitan¹, Judith Mande¹ dan Edi Suryanto²

¹Balai Riset dan Standarisasi Industri, Manado

²Jurusan Kimia Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam Universitas Sam Ratulangi

ABSTRACT

Lumingkewas dkk., 2014. Phenolic Composition and Antiphotooxidant from clove leaf (*Eugenia aromatic L.*)

The objectives of the present research were evaluated effect of solvent extraction on antiphotooxidative from clove leaf (*Eugenia aromatic L.*). A certain quantity of powdered sample was extracted with methanol 80%, ethanol 80% and aseton 80%. After evaporation the extracts were dissolved in methanol and assayed for phenolic, flavonoid and condensed tannin content. Singlet oxygen quenching and free radical activity of each extracts of spices at 500 ppm level were evaluated using 1,1-diphenyl-2-picrylhydrazyl (DPPH) free radical. Anti-photooxidative activity test was conducted using linoleic acid as substrates each containing 5 ppm erythrosine as a photosensitizer. The result showed that solvent was significantly having effect on total phenolic, flavonoid and condensed tannin content. Methanol extract possessed highest total flavonoid and condensed tannin content than aseton and etanol. Methanol extract of clove leaf was found to have the highest anti-photooxidative effect, followed by aseton and ethanol. In addition, ekstrak methanol showed any difference in it free radical scavenger effect than that of ethanol and aseton extracts. This results show that clove methanol extract has the best activity on photooxidation of linoleic acid and scavenger of free radical DPPH. These results suggest that the methanolic extract of clove leaf contains some compounds having singlet oxygen quenching and free radical scavenging activities on linoleic acid and free radical DPPH

Kata kunci: Clove leaf, phenolic, antiphotooxidant, singlet oxygen

ABSTRAK

Lumingkewas et al., 2014. Komposisi fenolik dan aktivitas antifotooksidan dari daun cengkeh (*Eugenia Aromatic L.*)

Penelitian ini bertujuan untuk mempelajari pengaruh pelarut ekstraksi terhadap aktivitas antifotooksidan dan komposisi fenolik yang terdapat pada ekstrak daun cengkeh. Serbuk daun cengkeh diekstraksi dengan metanol 80%, etanol 80% dan aseton 80%. Setelah evaporasi, ekstrak daun cengkeh dilakukan pengujian untuk kandungan fenolik, flavonoid dan tannin terkondensasi. Aktivitas penstabilan oksigen singlet dan radikal bebas dari ekstrak dievaluasi dengan menggunakan asam linoleat sebagai substrat yang mengandung 5 ppm eritrosin sebagai fotosensitizer dan radikal bebas 1,1-diphenyl-2-picrylhydrazyl (DPPH). Hasil penelitian ini menunjukkan bahwa pelarut ekstraksi memiliki efek sangat signifikan terhadap kandungan fenolik, flavonoid dan tannin terkondensasi. Pelarut ekstrak metanol memiliki kandungan flavonoid dan tannin terkondensasi paling tinggi daripada aseton dan etanol. Ekstrak metanol daun cengkeh ditemukan mempunyai efek antifotooksidatif diikuti ekstrak etanol dan aseton. Selain itu, pelarut methanol juga menunjukkan suatu perbedaan dalam penangkalan radikal bebas DPPH. Berdasarkan analisis komposisi fenolik dalam daun cengkeh dengan HPLC teridentifikasi senyawa eugenol, asam galat, kuersetin, rutin dan kaempferol. Hasil ini menyimpulkan bahwa ekstrak metanol daun cengkeh mengandung beberapa senyawa fenolik yang mempunyai aktivitas sebagai penstabilan oksigen singlet dan penangkalan radikal bebas.

Keywords: Daun cengkeh, fenolik, antifotooksidan, oksigen singlet

PENDAHULUAN

Produk tanaman edibel dan non edibel mengandung sejumlah besar senyawa fenolik yang terdiri dari fenol sederhana, asam fenolat,

asam fenilasetat, asam sinamat, kumarin, isokumarin, kromon, lignan, flavonoid, lignin, tanin, benzofenon, xanton, stilben, kuinon dan betacianin (Dey & Harbone, 1989). Senyawa

¹Balai Riset dan Standarisasi Industri, Manado
Email: meiske.lumingkewas@yahoo.com

fenolik terbukti pelindung melawan efek bahaya radikal bebas dan diketahui pula mampu menurunkan resiko kanker, penyakit jantung koroner, stroke, arterosclerosis, osteoporosis, inflamasi dan penyakit neurodegeneratif lain yang dapat dihubungkan dengan stress oksidatif (Ames & Shigenaga, 1993; Shahidi & Naczki, 1995)

Senyawa fenolik dalam tanaman berhubungan erat dengan aktivitas antioksidannya. Efek antioksidan fenolik terutama disebabkan sifat-sifat reaksi reduksi-oksidasi (redox) dan merupakan hasil berbagai kemungkinan mekanisme seperti aktivitas penangkalan (*scavenging*) radikal bebas, aktivitas pengkelat (*chelating*) logam transisi dan aktivitas penstabilan (*quenching*) oksigen singlet (Silva dkk., 2000).

Selama ini yang sudah banyak diketahui kerusakan aroma dan rasa disebabkan oleh terjadinya reaksi oksidasi pada lemak tidak jenuh oleh oksigen di udara dan didukung dengan adanya panas, baik selama pengolahan maupun penyimpanan, namun yang belum banyak disadari adalah terjadinya reaksi oksidasi yang diinduksi oleh adanya cahaya atau disebut fotooksidasi (Frankel, 1985). Fotooksidasi ini melibatkan oksigen singlet yang dihasilkan dari oksigen triplet (molekul oksigen yang ada di udara) dengan bantuan suatu zat yang berperan sebagai sensitiser (Bradley & Min, 1992). Sensitiser ini berfungsi mengubah energi cahaya menjadi energi kimia yang selanjutnya memulai reaksi oksidasi. Pada bahan makanan ternyata terdapat beberapa zat yang bisa berperan sebagai sensitiser yaitu: riboflavin, mioglobin, klorofil dan pigmen lainnya (Min dan Boff, 2002). Oksidasi oleh oksigen singlet ini bisa terjadi bahkan pada suhu rendah sekalipun, karena energi aktivasinya memang rendah. Ini menjadi masalah yang sangat serius ketika produk makanan biasanya diolah dan dipajang (*display*) di bawah cahaya yang bersumber dari lampu. Kemasan dan pencahayaan yang memadai memberikan daya tarik tersendiri bagi konsumen untuk membeli, namun hal ini jika tidak dikendalikan juga memicu terjadinya reaksi oksidasi oksigen singlet yang bisa menyebabkan kerusakan aroma dan rasa serta berkurangnya vitamin (Min & Boff, 2002). Dampak reaksi oksidasi oksigen singlet ini makin besar

terutama pada produk berbentuk serbuk dan disimpan dalam waktu beberapa bulan, misalnya susu formula untuk bayi, makanan instan dan bumbu-bumbu penyedap dalam bentuk serbuk.

Cengkeh merupakan rempah rempah yang memiliki kandungan senyawa fenolik yang banyak dimanfaatkan sebagai bumbu masak dalam berbagai masakan. Penggunaan biji cengkeh sebagai sumber antioksidan alam telah dilaporkan oleh Shan dkk. (2004). Sejalan dengan itu, Rorong (2011) melaporkan bahwa ekstrak daun cengkeh mempunyai aktivitas antioksidan. Hasil penelitian lain menunjukkan bahwa minyak atsiri yang diperoleh dari distilasi uap biji cengkeh dapat mencegah oksidasi lipida dan senyawa yang berkontribusi sebagai antioksidan adalah eugenol dan eugenil asetat walaupun aktivitasnya tidak sekuat α -tokoferol dan BHT (Lee & Shibamoto, 2001). Senyawa eugenol dilaporkan dapat berperan dalam menghambat peroksidasi lipida dalam kehadiran ion logam Fe^{2+} . Efek ekstrak daun cengkeh dan eugenol telah dipelajari untuk aktivitas antioksidannya dalam banyak penelitian, tetapi tidak ada data yang tersedia untuk efek fotooksidasi terhadap asam linoleat sebagai model bahan pangan dan komposisi fenolik yang bukan minyak atsiri. Penelitian ini bertujuan untuk mempelajari pengaruh ekstrak daun cengkeh dalam beberapa pelarut ekstraksi terhadap aktivitas antifotooksidasi dan komposisi fenolik dari daun cengkeh.

BAHAN DAN METODE

Bahan dan alat

Bahan yang digunakan dalam penelitian ini adalah daun cengkeh VCO yang diperoleh diperoleh Kabupaten Minahasa. Beberapa bahan kimia yang digunakan dalam penelitian ini adalah berkualifikasi pro analisis: etanol, metanol, aseton, khloroform, kuersetin, amilum, natrium karbonat, reagen Folin-Ciocalteu, kalium iodida, asam asetat, natrium tiosulfat, etil asetat, kaempferol, rutin, myricetin, katekin, aluminium khlorida, eritrosin, asam linoleat, asam galat, asam khlorida dan vanillin. Alat yang digunakan untuk pengujian adalah desikator, alat-alat gelas, *vortex mixer*, pengaduk magnet, timbangan analitik, oven, gelas

Erlenmeyer, mikro pipet, rotari evaporator dan HPLC.

Preparasi bahan

Pertama-tama daun cengkeh yang masih segar dianalisis kadar airnya. Selanjutnya dikeringanginkan sampai kering selama empat minggu. Setelah kering daun rempah-rempah digiling dengan alat pengiling dan diayak sampai 40 mesh dan dianalisis kembali kadar airnya.

Ekstraksi daun cengkeh

Sebanyak 100 g serbuk daun cengkeh dimasukkan ke dalam gelas Erlenmeyer yang berkapasitas 1 L, kemudian ditambahkan pelarut metanol 80% sebanyak 500 mL. Ekstraksi dilakukan 2x dengan menggunakan pengaduk magnet selama 24 jam. Selanjutnya dievaporasi untuk menghilangkan pelarutnya dengan rotari evaporator sehingga diperoleh ekstrak metanol (EM). Dengan cara yang sama dilakukan dengan pelarut etanol 80% dan aseton 80%, selanjutnya diperoleh ekstrak etanol (EE) dan ekstrak aseton (AE). Ketiga ekstrak kemudian ditimbang dan disimpan pada $-10\text{ }^{\circ}\text{C}$ sebelum digunakan untuk analisis komponen fenolik dan pengujian aktivitas antioksidan.

Penentuan kandungan total fenolik

Kandungan total fenol dalam ekstrak volatil ditentukan dengan metode Jeong dkk. (2005). Sampel ekstrak sebanyak 1 mL ditambahkan dengan 1 mL reagen Folin-Ciocalteu (50%) dalam tabung reaksi dan kemudian campuran ini divortex selama 3 menit. Setelah interval waktu 3 menit, 1 mL larutan Na_2CO_3 2% ditambahkan. Selanjutnya campuran disimpan dalam ruang gelap selama 30 menit. Absorbansi ekstrak dibaca dengan spektrofotometer pada λ 750 nm. Hasilnya dinyatakan sebagai ekuivalen asam galat dalam mg/kg ekstrak. Kurva kalibrasi dipersiapkan pada cara yang sama menggunakan asam galat sebagai standar.

Penentuan tanin terkondensasi

Kandungan tanin terkondensasi sampel ditentukan menurut metode Julkunen-Tinto (1985). Sebanyak 0,1 mL ekstrak daun kunyit dimasukkan dalam tabung reaksi yang dibungkus aluminium foil, lalu ditambahkan 3 mL larutan vanilin 4% (b/v) dalam metanol dan divorteks. Segera sesudah ditambahkan 1,5 mL HCl pekat dan divorteks lagi. Absorbansi dibaca pada λ 500 nm setelah campuran diinkubasi selama 20 menit pada suhu kamar. Hasilnya diplotkan terhadap kurva standar katekin yang dipersiapkan dengan cara yang sama. Kandungan tanin terkondensasi dinyatakan sebagai mg/kg ekstrak.

Penentuan kandungan total flavonoid

Prosedur penentuan kandungan flavonoid menggunakan metode Meda *et al.* (2005). Lima mililiter ekstrak daun cengkeh ditambahkan dengan 5 mL aluminium klorida 2% yang telah dilarutkan dalam metanol, kemudian divortek dan ditera pada λ 415 nm. Kandungan total flavonoid dinyatakan sebagai ekuivalen kuersetin dalam mg/kg ekstrak. Kurva kalibrasi dipersiapkan pada cara yang sama menggunakan kuersetin sebagai standar.

Penentuan penangkal radikal bebas DPPH

Aktivitas penangkal radikal bebas dari ekstrak rempah-rempah diuji kemampuannya untuk menangkal radikal bebas 1,1-difenil-2-pikrilhidrazil (DPPH). Penentuan aktivitas penangkal radikal bebas diukur dengan metode Espin dkk. (2000). Dua milliliter larutan DPPH 93 μM dalam etil asetat ditambahkan 0,5 mL VCO 100% dan 500 $\mu\text{g/mL}$ ekstrak rempah-rempah. Larutan DPPH tersebut kemudian diinkubasi dalam ruang gelap. Tingkat berkurangnya warna dari larutan menunjukkan efisiensi penangkal radikal. Lima menit terakhir dari 30 menit, absorbansi diukur pada λ 517 nm. Aktivitas penangkal radikal bebas dihitung sebagai presentase berkurangnya warna DPPH dengan menggunakan persamaan: $1 - \text{absorbansi sampel} / \text{absorbansi kontrol} \times 100\%$.

Aktivitas penstabilan oksigen singlet pada fotooksidasi asam linoleat

Penentuan kemampuan penstabil oksigen singlet menggunakan metode Lee dkk. (1997) dengan sedikit dimodifikasi. Pengaruh ekstrak dari masing-masing rempah-rempah terhadap oksidasi oksigen singlet asam linoleat 0,03 M menggunakan konsentrasi 500 µg/mL yang dipersiapkan dalam etanol dan mengandung eritrosin (5 µg/mL) sebagai sensitiser. Sampel dari campuran tersebut sebanyak 10 mL diambil dan dimasukkan ke dalam botol serum yang berukuran 30 mL yang dilengkapi dengan penutup karet dan aluminium foil. Botol tersebut kemudian diletakkan dan disimpan di dalam kotak cahaya (70 x 50 x 60 cm) dengan intensitas cahaya 4.000 lux selama 5 jam. Angka peroksida diukur dengan metoda AOCS (1990). Penelitian yang sama dilakukan pada kondisi tanpa cahaya.

Analisis komponen ekstrak menggunakan HPLC

Analisis senyawa fenolik ditentukan dengan metoda Mien & Mohamed (2001). Sampel kering dilarutkan dengan 20 mL metanol 70% kemudian ditambahkan 5 mL HCl 6 M dan divortex. Campuran ini dengan hati-hati direflux pada 90 °C selama 2 jam. Ekstrak didinginkan, disaring menggunakan penyaring Buchner. Kemudian filtrat yang diperoleh ditambah 50 mL metanol dan disaring lagi dengan kertas Whatman (0,45 µm) sebelum diinjeksikan pada HPLC. Sebanyak 20 µL diinjeksikan pada peralatan HPLC dengan menggunakan alat penyuntik Hamilton (ukuran loop 20 µL). Pemisahan dilakukan pada Nova-Pak C-18 4 µm dengan panjang kolom 150 mm x 3,9 mm. Deteksi dilakukan dengan detektor UV pada panjang gelombang 365 nm (Shimadzu model SPM 10 PV). Fase gerak berupa pelarut metanol/air dengan perbandingan 50:50 (v/v), pada kondisi pH 2,5 dengan asam trifluoroasetat pada kecepatan pemisahan dari setiap analisa dipertahankan pada 1,0 mL/menit. Konsentrasi

dinyatakan sebagai µg/mL dengan menggunakan larutan standar katekin, rutin, myricetin, kuersetin dan kaempferol. Konsentrasi dihitung dengan perbandingan luas area standar dengan sampel.

HASIL DAN PEMBAHASAN

Kandungan air

Serbuk daun cengkeh dipersiapkan dari bahan segar yang telah dikeringkan secara diangin-anginkan dalam ruang tanpa cahaya. Daun cengkeh yang digunakan untuk bahan sampel dalam eksperimen ini adalah bahan segar dengan kematangan seperti umumnya digunakan untuk rempah-rempah, karena itu, kandungan airnya sangat tinggi (47,24). Setelah dikeringkan, digiling dan diayak menghasilkan berbagai serbuk. Dari hasil pengeringan diperoleh bahwa kandungan air dari daun cengkeh adalah 8,14%. Oleh karena itu, proses pengeringan rempah-rempah yang diperlakukan dengan cara dikering anginkan dalam kondisi yang sama. Kandungan air dari serbuk terutama dipengaruhi oleh struktur jaringan dan efisiensi dari proses pengeringan.

Rendemen

Ekstraksi yang dilakukan secara berurutan dengan pelarut metanol 80%, etanol 80% dan aseton 80% untuk memisahkan senyawa-senyawa dengan tingkat polaritasnya. Ekstraksi menggunakan aseton dapat melarutkan senyawa yang semi polar, etanol dapat melarutkan senyawa yang polar dan metanol akan melarutkan senyawa yang lebih polar. Tujuan ketiga pelarut ini adalah untuk mencari komponen yang dapat berperan sebagai penstabilan oksigen singlet yang terdapat dalam ekstrak daun cengkeh dengan tingkat perbedaan polaritas. Tabel 1. menunjukkan hasil ekstraksi dari ketiga pelarut. Hasil ekstraksi pelarut tertinggi diperoleh dari ekstrak aseton daun cengkeh sebesar 19,45 % dan terendah terdapat pada ekstrak etanol daun cengkeh (15,42 %).

Tabel 1. Rendemen dari ekstrak etanol, metanol dan aseton daun cengkeh

Jenis pelarut ekstraksi	(%)
Metanol	18,30
Etanol	15,42
Aseton	19,45

Dari hasil ini dapat dilihat bahwa jenis pelarut yang digunakan berpengaruh pada rendemen ekstraksi. Dari ketiga jenis pelarut yang diteliti menunjukkan bahwa menunjukkan peningkatan rendemen dengan urutan pelarut ekstraksinya adalah aseton, metanol dan etanol. Hal ini kemungkinan disebabkan karena senyawa yang terdapat dalam daun cengkeh ini lebih banyak yang bersifat lebih polar dan semipolar daripada polar, sehingga metanol dan aseton yang bersifat polar dan semipolar memberikan rendemen yang lebih banyak. Komponen yang diduga berkontribusi terhadap

jumlah ekstrak metanol dan aseton adalah klorofil, minyak atsiri, oleoresin dan lemak.

Kandungan fenolik, flavonoid dan tanin

Skrening kandungan fitokimia dalam penelitian ini ditentukan berdasarkan kandungan fenolik, flavonoid dan tanin terkondensasi dalam pelarut metanol 80%, etanol 80% dan aseton 80% disajikan dalam Tabel 2. Dari ketiga pelarut yang diuji, semua ekstrak memiliki kandungan fenolik, flavonoid dan tanin yang signifikan. Hasil ini mengindikasikan bahwa ketiga pelarut yang diuji mampu mendapat komponen-komponen yang kaya dalam fitokimia fenolik, flavonoid dan tanin. Dari data secara kuantitatif menunjukkan bahwa kandungan total fenolik, flavonoid dan tanin pada ekstrak daun cengkeh kelihatan sangat berbeda diantara jenis pelarut yang digunakan (Tabel 2).

Tabel 2. Kandungan total fenolik, flavonoid dan tanin terkondensasi dalam ekstrak daun cengkeh

Jenis pelarut ekstraksi	Kandungan ($\mu\text{g/mL}$)		
	fenolik	flavonoid	tannin
Etanol (EE)	$45,92 \pm 0,01$	$6,80 \pm 0,02$	$7,61 \pm 0$
Metanol (EM)	$47,76 \pm 0,02$	$4,54 \pm 0,02$	$7,50 \pm 0,01$
Aseton (EA)	$50,76 \pm 0,02$	$6,30 \pm 0,01$	$7,78 \pm 0,01$

Dari tiga jenis pelarut yang dipilih paling tinggi, kandungan total fenolik ditemukan pada aseton ($50,76 \pm 0,02 \mu\text{g/mL}$) diikuti oleh metanol ($47,76 \pm 0,02 \mu\text{g/mL}$) sedangkan yang terendah ditemukan dalam etanol ($45,92 \pm 0,01 \mu\text{g/mL}$). Untuk kandungan total flavonoid tertinggi ditemukan pada ekstrak etanol diikuti oleh aseton dan metanol, kandungannya berturut-turut adalah $6,80 \pm 0,01$; $4,54 \pm 0,02$ dan $4,54 \pm 0,02 \mu\text{g/mL}$. Sebaliknya, kandungan tanin terkondensasi tidak menunjukkan perbedaan yang signifikan dalam ketiga pelarut ekstraksi yang digunakan pada penelitian ini. Dari data tersebut dapat disimpulkan bahwa ekstrak daun cengkeh baik menggunakan pelarut etanol, metanol dan aseton memiliki kandungan fenolik, flavonoid dan tannin. Oleh karena, ketiga jenis pelarut ini memungkinkan digunakan sebagai

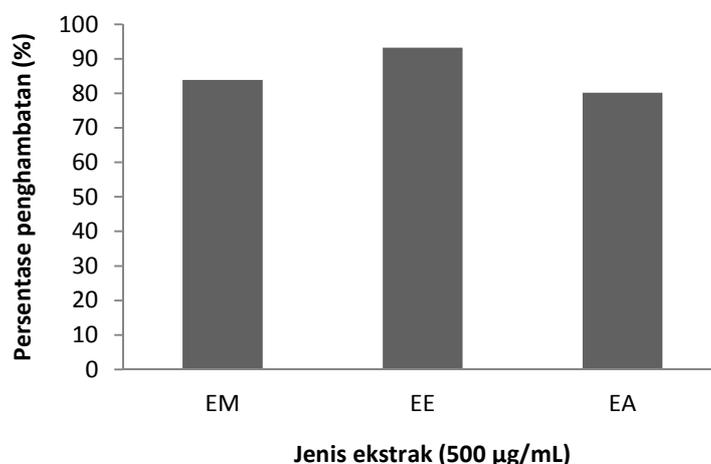
salah satu teknik ekstraksi senyawa fenolik dalam banyak rempah-rempah.

Fotooksidasi asam linoleat

Pengaruh $500 \mu\text{g/mL}$ dari ketiga jenis pelarut ekstraksi terhadap angka peroksida asam linoleat yang diberikan cahaya sebesar 4000 lux dapat dilihat pada Gambar 1. Ketiga ekstrak mempunyai pengaruh yang paling kuat untuk penstabil (*quencher*) oksigen singlet dalam asam linoleat sebagai model selama 5 jam penyinaran cahaya fluoresen ($p < 0.05$). Eritrosin yang diberi cahaya (kontrol) menunjukkan perubahan angka peroksida yang terus meningkat selama penyinaran 5 jam sedangkan asam linoleat yang diberikan eritrosin tanpa menggunakan cahaya (TC) tidak menunjukkan perubahan angka

peroksida secara signifikan ($p < 0,05$) (data tidak ditunjukkan). Fotosensitizer seperti eritrosin (Sen) dapat menyerap cahaya dan mentransformasikan menjadi keadaan tereksitasi selanjutnya berubah menjadi sensitiser pada keadaan triplet ($^3\text{Sen}^*$) yang kurang stabil. Sensitiser dapat memindahkan energinya ke oksigen pada keadaan triplet yang lebih stabil. Karena tingkat energi sensitiser sangat tinggi sehingga dapat mengubah oksigen triplet menjadi oksigen singlet. Selanjutnya oksigen

singlet dapat menyerang ikatan rangkap yang terdapat dalam asam linoleat. Yang dkk. (2002) melaporkan bahwa eritrosin dapat menurunkan *headspace* (oksigen triplet) dalam minyak kedele dengan meningkatnya konsentrasi selama penyinaran 4 jam. Penelitian lain, menunjukkan bahwa pengaruh eritrosin terhadap metil linoleat bisa membentuk hidroperoksida, hidroperoksida ini merupakan produk utama akibat terjadinya fotooksidasi oleh sensitiser (Pan dkk., 2005)



Gambar 1. Aktivitas 500 µg/mL ekstrak daun cengkeh terhadap fotooksidasi asam linoleat dengan waktu penyinaran cahaya fluoresen (4000 lux) selama 5 jam pada suhu kamar. (EM: ekstrak metanol, EE: ekstrak etanol dan EA: ekstrak aseton)

Dari data tersebut diperoleh bahwa semua ekstrak memiliki kemampuan untuk menghambat oksidasi oksigen singlet di atas 50%. Ekstrak etanol daun cengkeh memperlihatkan pelarut pengeksrak yang cukup signifikan untuk menstabilkan oksigen singlet diikuti ekstrak metanol dan aseton. Dari Gambar 1 juga dapat diperoleh bahwa pelarut etanol memberikan kontribusi kuat sebagai penstabil oksigen singlet daripada pelarut metanol dan aseton. Hasil penelitian ini tidak sejalan dengan kandungan total senyawa fenolik pada kedua jenis pelarut yang lebih dominan mengekstraksi senyawa fenolik dan flavonoid.

Berdasarkan Gambar 1, diduga kuat senyawa dalam ketiga jenis pelarut dapat berfungsi sebagai penstabil oksigen singlet adalah senyawa fenolik dari kelompok senyawa fenolik sederhana, flavonoid dan tanin.

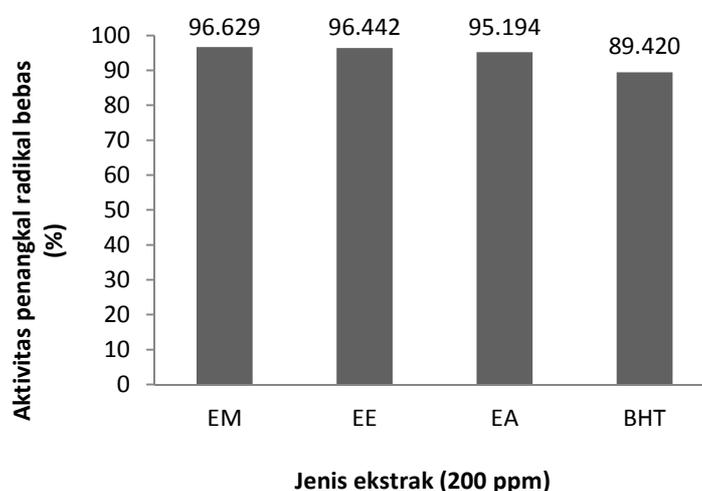
Kandungan total fenolik, flavonoid dan tanin terkondensasi dalam daun cengkeh, walaupun besar kecilnya kandungan senyawa fenolik bukanlah syarat penentu dalam pengujian aktivitas penstabil oksigen singlet. Flavonoid telah dilaporkan dapat bereaksi dengan oksigen singlet ($^1\text{O}_2$). Mukai dkk. (2005) melaporkan bahwa katekin dalam teh dan epimernya dapat berperan sebagai penstabil oksigen singlet secara fisik. Tournaire dkk. (1993) mempelajari reaktivitas 13 flavonoid terseleksi (dari kelompok flavonol, flavon, flavanon dan flavan) dengan oksigen singlet dan mencoba menentukan hubungan struktur dengan aktivitas. Senyawa flavonoid dalam kelompok flavonol lebih kuat reaktivitas terhadap oksigen singlet daripada flavon, flavanon dan flavan. Selain itu, juga menemukan bahwa flavonoid lebih efektif

sebagai penstabil secara fisik dibandingkan kimiawi.

Efek pelarut ekstraksi terhadap radikal bebas DPPH

Aktivitas penangkal (*scavenging*) radikal bebas dari ekstrak daun cengkeh dievaluasi dengan pengujian radikal bebas 1,1-difenil-2-pikrilhidrazil (DPPH). Senyawa radikal DPPH biasanya digunakan sebagai substrat untuk mengevaluasi aktivitas antioksidatif dari ekstrak

tanaman. Radikal DPPH adalah radikal bebas stabil dan menerima satu elektron atau hidrogen menjadi molekul yang stabil (Matthaus, 2002). Pengujian aktivitas penangkal radikal bebas DPPH secara spektrofotometer dilakukan dengan mereaksikan ekstrak dengan larutan DPPH. Berkurangnya absorbansi dari larutan radikal bebas DPPH dan diikuti perubahan warna dari ungu menjadi kuning. Hal ini dapat terjadi ketika radikal bebas DPPH ditangkal oleh antioksidan melalui donor hidrogen ke bentuk molekul DPPH yang stabil (Juntachote & Berghofer, 2005).



Gambar 2. Aktivitas 500 µg/mL ekstrak daun cengkeh terhadap penangkal radikal bebas DPPH

Aktivitas penangkal radikal bebas DPPH dari ekstrak daun cengkeh disajikan pada Gambar 2. Hasil uji aktivitas penangkalan radikal bebas DPPH dari 3 jenis pelarut ekstraksi seperti etanol, metanol dan aseton menunjukkan bahwa ketiga jenis pelarut memiliki kemampuan sebagai penangkal radikal bebas di atas 50%. Dari gambar tersebut diperoleh bahwa ketiga jenis pelarut ekstraksi tidak menunjukkan perbedaan yang signifikan dalam menangkal radikal bebas DPPH pada tingkat konsentrasi yang sama ($p > 0,05$), kecuali dengan antioksidan sintesis BHT berbeda nyata dengan ketiga ekstrak ($p < 0,05$). Oleh karena itu, ekstrak daun cengkeh memiliki kemampuan tinggi untuk melepaskan satu elektron atau atom hidrogen kepada radikal difenilpikrilhidrazil (violet) sehingga terbentuk senyawa non radikal

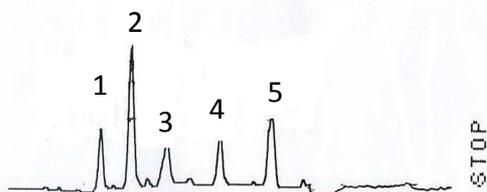
difenilpikrilhidrazil yang berwarna kuning (Molyneux, 2004).

Komposisi senyawa fenolik ekstrak

Hasil uji aktivitas menunjukkan bahwa ekstrak metanol (EM) lebih unggul dari ekstrak etanol (EE) dan ekstrak aseton (EA) sebagai penangkal radikal bebas sedangkan EE memiliki kemampuan yang kuat sebagai penstabil oksigen singlet. EM dipilih untuk dianalisis komposisi fenoliknya dengan HPLC. Perbedaan senyawa fenolik secara normal memiliki karakteristik kromatografik dan spektral UV-vis yang spesifik. Senyawa fenolik utama dalam daun cengkeh dicoba dalam penelitian ini diidentifikasi menggunakan HPLC dengan perbandingan standar senyawa fenolik dan data

literatur. Ekstrak EM sebagai ekstrak terpilih selanjutnya dilakukan pengujian dengan HPLC. Hasil analisis dengan HPLC dapat dilihat kromatogramnya dalam Gambar 3. Adapun tujuan analisis ini untuk mengetahui komposisi senyawa fenolik yang terdapat pada daun cengkeh yang diduga mempunyai sifat sebagai penstabil oksigen singlet dan penangkal radikal bebas. Pengujian dengan HPLC pada EM diketahui adanya lima puncak dengan waktu retensi (Rf) yang berbeda yaitu 1,348; 1,797; 2,312; 3,002 dan 3,925 (Gambar 3).

Kelompok senyawa kimia utama dan komponen yang mewakili senyawa fenolik diidentifikasi dalam EM sebagian besar termasuk asam fenolik, flavonoid, minyak atsiri aromatik dan tannin. Gambar 4 menggambarkan struktur kimia dari senyawa fenolik yang teridentifikasi dalam EM. Tabel 3 menunjukkan hasil analisis secara kuantitatif dari senyawa fenolik utama yang teridentifikasi dalam perbedaan ekstrak daun cengkeh.



Gambar 3. Profil HPLC dari ekstrak metanol daun cengkeh. 1. asam galat, 2. eugenol 3. kuersetin, 4 rutin dan 5 kaempferol

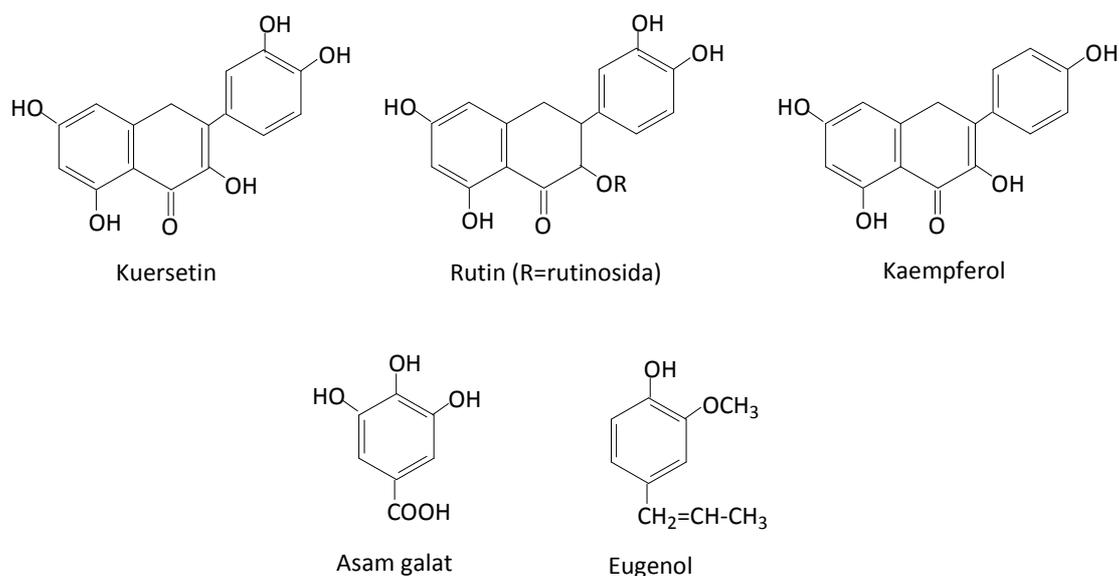
Cengkeh termasuk family Myrtaceae. Analisis HPLC menunjukkan bahwa sejumlah besar minyak atsiri (senyawa aromatik) dan flavonoid hadir dalam ekstrak EM. Puncak utama (2) dan puncak minor (1, 3, 4 dan 5) diidentifikasi berturut-turut sebagai asam galat (1), kuersetin (3), rutin (4) dan kaempferol (5). Puncak utama diidentifikasi sebagai eugenol (2).

Selain itu, puncak 1 dengan mudah diidentifikasi sebagai asam galat (1) menggunakan struktur autentiknya. Ekstrak daun cengkeh juga mengandung komponen tannin. Hasil penentuan ini menunjukkan bahwa banyak puncak yang sangat minor yang tidak dapat terdeteksi pada waktu retensi berturut-turut adalah 2,017; 2,638 dan 3,557 terutama bercirikan komponen tannin.

Tabel 3. Analisis kuantitatif dari senyawa fenolik utama dalam ekstrak metanol

No.	Senyawa fenolik	Hasil ($\mu\text{g/mL}$)
1.	Asam galat	7,28
2.	Eugenol	270
3.	Kuersetin	8,79
4.	Rutin	11,37
5.	Kaempferol	15,19

Tabel 3. menunjukkan bahwa EM dari daun cengkeh mempunyai kandungan tertinggi eugenol ($270 \mu\text{g/mL}$) diikuti dengan kaempferol, rutin, kuersetin dan asam galat berturut-turut adalah $15,19$; $11,37$; $8,79$ dan $7,28 \mu\text{g/mL}$. Asam galat dan derivatnya (tannin) dan beberapa flavonoid (kaempferol, kuersetin dan rutin) memiliki banyak gugus hidroksi terutama gugus orto dihidroksi (struktur katekol) dengan potensi aktivitas penangkal radikal bebas. Oleh karena itu, senyawa-senyawa tersebut memberi kontribusi secara signifikan pada aktivitas antioksidan dan antifotooksidan paling kuat dari ekstrak daun cengkeh dalam penelitian ini. Eugenol dan derivatnya secara normal mengandung satu gugus hidroksi dan mempunyai aktivitas penangkal radikal bebas yang relatif rendah daripada senyawa fenolik lainnya yang mengandung banyak gugus hidroksi. Akan tetapi, disana merupakan tingkat paling tinggi dari senyawa minyak atsiri seperti eugenol dan asetil eugenol dalam ekstrak daun cengkeh juga membuat sesuatu kontribusi positif yang penting pada aktivitas antioksidan ekstrak daun cengkeh (Shan dkk., 2005)



Gambar 4. Struktur kimia dari senyawa fenolik yang teridentifikasi dalam ekstrak metanol daun cengkeh

DAFTAR PUSTAKA

- Ames, B.N. & Shigenaga, M.K. 1993. Oxidants are a Major Contributor in Cancer and Aging. Dalam B. Haliwell and O.I. Aruoma (Eds). DNA and Free Radicals, West Sussex, U.K: Ellis Horwood Ltd., AOAC. 1990."Official and Tentative Methods". American Oil Chemists Society, Champaign, IL.
- Bradley, D.G. & Min, D.B. 1992. Singlet Oxygen Oxidation of Foods. *Crit. Rev. Food Sci. Nutr.* 31, 211-236.
- Dey, P.M. & Harbone, J.B. 1989. *Methods in Plant Biochemistry: Plant Phenolics*. London: Academic Press
- Espin, J.C., Soler-Rivas, C. & Wichers, H.J. 2000. Characterization of The Total Free Radical Scavenger Capacity of Vegetable Oils and Oil Fractions Using 2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl Radical. *J. Agric. Food Chem.* 48, 648-656.
- Frankel E.N. 1985. *Chemistry of Autoxidation: Mechanism, Products and Flavor Significance*. In: Min DB, Smouse TH (eds). Flavor chemistry of fats and oils. Champaign, Ill: American Oil Chemists' Society. p 1-34.
- Jeong, S.M., Kim, S.Y., Kim, D.R., Jo, S.C., Nam, K.C., Ahn, D.U & Lee, S.C. 2004. Effect of Heat Treatment on the Antioxidant Activity of Extracts from Citrus Peels. *J. Agric. Food Chem.* 52, 3389-3393.
- Julkunen-Tiitto, R. 1985. Phenolics Constituents in the Leaves of Northern Willows: Methods for the Analysis of Certain Phenolics. *J. Agric. Food Chem.* 33, 213-217.
- Juntachote, J. & Berghofer, E. 2005. Antioxidant Properties and Stability of Ethanol extracts of Holy basil and Galangal. *Food Chemistry.* 92, 193-202.
- Lee, K.H., Jung, M.Y. & Kim, S.Y. 1997. Quenching Mechanism and Kinetics of Ascorbyl Palmitate for the Reduction of the Photosensitized Oxidation of Oils. *J. Am. Oil Chem. Soc.* 74, 1053-1057.
- Lee, K-G. & Shibamoto, T. 2001. Antioxidant property of aroma extract isolated from clove bud (*Syzygium aromaticum* (L) Merr. Et Perry). *Food Chemistry.* 74, 443-448
- Matthaus, B. 2002. Antioxidant Activity of Extracts Obtained from Residues of Different Oilseeds. *J. Agric. Food Chem.* 50, 3444-3452.
- Meda, A., C.E. Lamien, M. Romito, J., Miliogo & Nacoulina, O.G. 2005. Determination of the Total Phenolic., Flavonoid, and Proline Contents in Burkina Fasan Money, as well as their Radical

- Scavenging Activity. *Food Chemistry*. 91,571-577.
- Min, D.B. & Boff, J.M. 2002. Chemistry and Reaction of Singlet Oxygen in Foods. *Food Science and Food Safety*. 1, 58-72.
- Miean, K.H & Mohamed, S. 2001. Flavonoid (Myricetin, Quercetin, Kaempferol, Luteolin, and Apigenin) Content of Edible Tropical Plants. *J. Agric Food Chem.*49, 3106-3112.
- Molyneux, P. 2004. The use of The Stable Free Radical Diphenylpicrylhydrazyl (DPPH) for Estimating Antioxidant Activity. *Songklanakarinn J. Sci Technol*. 26, 211-219
- Mukai, KN, Souichi, K. & Ohara. 2005. Kinetic study of the quenching reaction of singlet oxygen by tea catechins in ethanol solution, *Free Radical Biology and Medicine*. 39, 752-761
- Tournaire C., Croux, S., Maurette, M-T., Beck, I., Hocquaux, M., Braun, A.M. & Oliveros, E. 1993. Antioxidant activity of flavonoids: efficiency of singlet oxygen ($^1\Delta_g$) quenching. *J. Photochem. Photobiol*, 19, 205-215
- Yang, W.T., J.H. Lee & Min, D.B. 2002. Quenching Mechanisms and Kinetics of α -Tocopherol and β -Carotene on the Photosensitizing Effect of Synthetic Food Colorant FD&C Red No. 3. *J. Food. Sci.* 67, 507-510.
- Pan, X., Ushio, H. & Ohshima, T. 2005. Effects of Molecular Configurations of Food Colorants on their Efficacies as Photosensitizers in Lipid Oxidation. *Food Chemistry*. 92, 37-44.
- Rorong, J.A. 2008. Uji aktivitas antioskidan dari daun cengkeh (*Eugenia carryophyllus* Thumb) dengan metode DPPH. *Chemistry Progress*. 2, 111-116
- Shahidi, F. & Naczki, M., 1995. *Food Phenolics: Sources, Chemistry, Effects and Applications*. Lancaster: Technomic Publication Company, Inc.
- Silva, F.A.M., Borges, F., Guimarães, C., Lima, J.L.F.C., Matos, C. & Reis, S. 2000. Phenolics acid and derivatives: studies on the relationship among structure, radical scavenging activity and physiochemical parameters *J. Agric. Food Chem.* 48, 2122-2126.
- Shan, B., Cai, Y.Z., Sun M., & Corke, H. 2005. Antioxidant Capacity of 26 Spice Extracts and Characterization of Their Phenolic Constituents. *J. Agric. Food Chem.* 53, 7749-7759.