

UJI AKTIVITAS ANTIOKSIDAN DAN TOTAL FENOLIK DARI HASIL PARTISI PETROLEUM ETER, ETIL ASETAT DAN AIR DAUN TIGA (*Allophylus cobbe* L.)

Lidya Hutabalian¹⁾, Vanda S. Kamu¹⁾, Max R.J. Runtuwene¹⁾

¹⁾Jurusan Kimia, FMIPA, Universitas Sam Ratulangi, Manado

ABSTRACT

*A research aimed to determine total phenolic and antioxidant activity of methanol extract and fractions obtained from partition of tiga leaves (*Allophylus cobbe* L.) using petroleum ether, ethyl acetate and water had been done. The results showed that total phenolic content in methanol extract was 50,905 mg/g and in petroleum ether, ethyl acetate, and water fraction were 47,572; 121,064; and 62,968 mg/g respectively. Antioxidant activity which expressed in IC_{50} value of methanol extract was 683.318 $\mu\text{g/mL}$ and of petroleum ether, ethyl acetate, and water fraction were 593,235; 462,872; and 508,297 $\mu\text{g/mL}$ respectively.*

Keywords : Tiga leaves, phenolic, antioxidant, DPPH.

ABSTRAK

Telah dilakukan penelitian untuk menentukan kandungan total fenolik dan aktivitas antioksidan ekstrak metanol, hasil partisi petroleum eter, etil asetat dan air daun tiga (*Allophylus cobbe* L.). Hasilnya menunjukkan bahwa ekstrak metanol memiliki kandungan total fenolik dengan nilai sebesar 50,905 mg/g dan hasil partisi petroleum eter, etil asetat dan air memiliki kandungan total fenolik, dengan nilai berturut-turut 47,572; 121,064; dan 62,968 mg/g. Aktivitas antioksidan ekstrak metanol memiliki nilai IC_{50} sebesar 683,318 $\mu\text{g/mL}$ dan hasil partisi petroleum eter, etil asetat dan air memiliki nilai IC_{50} berturut-turut 593,235; 462,872; dan 508,297 $\mu\text{g/mL}$.

Kata kunci : Daun Tiga, fenolik, antioksidan, DPPH.

PENDAHULUAN

Indonesia merupakan negara yang memiliki berbagai jenis tumbuhan yang berguna untuk menjaga daya tahan tubuh dari serangan penyakit. Salah satu penyebab adanya penyakit dalam tubuh adalah radikal bebas. Radikal bebas adalah atom atau gugus yang memiliki satu atau lebih elektron tidak berpasangan (Droge, 2002). Radikal bebas yang terbentuk dalam tubuh akan menghasilkan radikal bebas baru melalui reaksi berantai yang akhirnya jumlahnya terus bertambah dan menyerang sel-sel tubuh (Khlifi dkk., 2005). Dalam melindungi tubuh dari serangan radikal bebas, diperlukan suatu bahan baku obat tradisional dari luar tubuh yang berfungsi sebagai antioksidan untuk menangkal radikal bebas dengan melengkapi kekurangan elektron dari radikal bebas sehingga menghambat terjadinya reaksi berantai (Windono dkk., 2001).

Antioksidan bertindak sebagai penyumbang radikal hidrogen atau bertindak sebagai akseptor radikal bebas (Jadhav dkk., 1996). Sumber-sumber antioksidan dapat berupa antioksidan alami maupun antioksidan sintetik. Contoh antioksidan alami yaitu fenolik, flavonoid, tanin, dan vitamin E sedangkan contoh antioksidan sintetik yaitu BHA (*butylated hidroxyanisole*) dan BHT (*butylated hydroxytoluene*) (Takashi dan Takayuki, 1997).

Tumbuh-tumbuhan dapat dijadikan sebagai bahan baku obat tradisional yang digunakan oleh masyarakat untuk berbagai macam tujuan seperti menjaga kesehatan tubuh secara keseluruhan dan menyembuhkan penyakit tertentu (Liu, 1999). Salah satu tumbuhan obat yang mempunyai aktivitas antioksidan yaitu

daun tiga. Daun tiga merupakan tumbuhan yang diyakini oleh masyarakat Minahasa Tenggara sebagai obat yang dapat menyembuhkan gangguan kesehatan seperti panas dan batuk.

Najoan dkk (2016), melaporkan bahwa daun tiga mengandung senyawa fenolik, flavonoid, steroid, dan saponin yang diekstraksi secara maserasi dan sokletasi dengan pelarut etanol 60% serta 80%. Selain itu, telah diuji aktivitas antioksidannya, didapatkan bahwa ekstrak etanol 80% daun tiga yang dimaserasi memiliki nilai IC_{50} lebih kecil yaitu 255,77 $\mu\text{g/mL}$ dibandingkan dengan ekstrak etanol 60% yang dimaserasi, serta ekstrak etanol 60% dan 80% yang disokletasi. Semakin kecil nilai IC_{50} , semakin besar aktivitas antioksidannya.

Dari penelitian tersebut dapat menjadi informasi awal untuk melakukan penelitian lebih lanjut, maka dilakukan penelitian kandungan fenolik secara kuantitatif dan uji aktivitas antioksidan terhadap daun tiga (*Allophylus cobbe* L.) yang di ekstraksi maserasi dengan pelarut metanol serta partisi dengan menggunakan pelarut yang kepolarannya bertingkat yaitu pelarut petroleum eter, etil asetat dan air. Metode uji aktivitas antioksidan yang digunakan pada penelitian ini adalah metode DPPH (2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl).

METODE PENELITIAN

Alat-alat yang digunakan adalah neraca analitik, alat-alat gelas, oven, blender, ayakan 65 *mesh*, kertas saring, *rotary evaporator*, corong pisah, cawan petri, rak tabung reaksi, vortex, aluminium foil, desikator, mikropipet, botol vial dan spektrofotometer UV-Vis.

Bahan yang digunakan adalah daun tiga (*Allophylus cobbe* L.) yang diperoleh dari Desa Molompar Satu, Kecamatan Tombatu Timur, Kabupaten Minahasa Tenggara, Provinsi Sulawesi Utara, bahan kimia yang digunakan adalah pelarut organik teknis (petroleum eter, etil asetat dan metanol yang redestilasi), aquades. Reagen Folin-Ciocalteu, natrium karbonat, asam galat dan DPPH.

Preparasi Sampel

Sampel daun tiga (*Allophylus cobbe* L.) dikering-anginkan selama 1 minggu. Setelah itu, dimasukkan ke dalam oven bersuhu 40⁰C hingga benar-benar kering. Setelah kering sampel diblender hingga berbentuk serbuk lalu diayak dengan ayakan 65 mesh.

Ekstraksi Maserasi

Sebanyak 50 g serbuk daun tiga (*Allophylus cobbe* L.) diekstraksi dengan cara maserasi selama 3 x 24 jam menggunakan pelarut metanol sebanyak 600 mL. Selanjutnya disaring hingga diperoleh filtrat. Filtrat yang diperoleh kemudian dievaporasi menggunakan rotary evaporator. Kemudian dikeringkan dalam oven pada suhu 40⁰C hingga diperoleh ekstrak pekat.

Partisi

Sebanyak 2 g ekstrak pekat yang dihasilkan dari proses maserasi dilarutkan dalam 50 ml aquades. Larutan selanjutnya dipartisi dengan menambahkan 25 mL petroleum eter, dikocok dalam corong pisah dan didiamkan hingga terdapat dua lapisan (aquades pada bagian bawah dan petroleum eter dibagian atas). Kedua lapisan yang terbentuk kemudian

dipisahkan, diambil lapisan petroleum eter. Proses penambahan pelarut petroleum eter yang terbentuk dalam air diulangi sampai petroleum eter menjadi bening. Lapisan aquades kemudian dipartisi kembali dengan cara yang sama menggunakan pelarut etil asetat. Hasil partisi diuapkan menggunakan alat rotary evaporator pada suhu 40⁰C hingga diperoleh hasil partisi pekat.

Penentuan Kandungan Total Fenolik (Conde et al, 1997)

Kandungan total fenolik ekstrak dan hasil partisi daun tiga (*Allophylus cobbe* L.) ditentukan dengan metode Folin Ciocalteu. Sebanyak 0,1 mL larutan ekstrak dan hasil partisi ditambahkan 0,1 mL reagen Folin Ciocalteu 50%. Kemudian divortex, lalu ditambahkan 2 mL larutan natrium karbonat (Na₂CO₃) 2%. Selanjutnya, campuran diinkubasi dalam ruangan gelap selama 30 menit. Diukur absorbansi pada panjang gelombang 750 nm menggunakan spektrofotometer UV-Vis. Kandungan total fenolik dinyatakan sebagai mg ekuivalen asam galat/g ekstrak.

Pengujian Aktivitas Antioksidan (Muaja dkk, 2017)

Larutan ekstrak, hasil partisi dan DPPH dibuat terlebih dahulu. Ekstrak dan hasil partisi sampel dilarutkan dalam metanol dan larutan DPPH dibuat dengan konsentrasi 0,4 mM. Larutan sampel yang telah dibuat diencerkan dengan berbagai variasi konsentrasi dengan total volume 1 mL dan dimasukkan ke dalam tabung reaksi sebagai larutan uji dan dibuat juga untuk blanko. Selanjutnya, ke dalam tabung reaksi larutan uji ditambahkan 0,2 mL larutan DPPH dan diinkubasi

selama 30 menit dalam kondisi gelap. Setelah 30 menit, blanko dan larutan uji diukur absorbansinya dengan menggunakan spektrofotometer UV-Vis pada panjang gelombang 517 nm. Nilai absorbansi dari setiap variasi konsentrasi dicatat dan dihitung % *scavenging*nya dan nilai IC₅₀. Pengujian dilakukan sebanyak dua kali.

Perhitungan nilai IC₅₀ dinyatakan dengan persamaan regresi linear dan perhitungan % *scavenging* dinyatakan dengan persamaan sebagai berikut :

$$\% \text{ scavenging} = \left(\frac{A_{kontrol} - A_{sampel}}{A_{kontrol}} \right) \times 100\%$$

Keterangan:

A_{kontrol} = Absorbansi DPPH

A_{sampel} = Absorbansi DPPH + sampel

HASIL DAN PEMBAHASAN

Ekstraksi

Sampel daun tiga dijadikan sebagai serbuk dalam proses ekstraksi. Serbuk diperoleh dengan dihaluskan menggunakan blender, yang bertujuan untuk memperkecil ukuran sampel. Semakin kecil ukuran sampel, semakin besar luas permukaan sehingga dapat mempengaruhi interaksi sampel dengan pelarut maka proses ekstraksi secara maserasi berlangsung optimal dan menghasilkan ekstrak yang maksimal. Hasil proses ekstraksi maserasi serbuk daun tiga, diperoleh ekstrak 5,8199 g dengan rendemen 11,6398 %.

Pada proses maserasi, sampel mengalami pemecahan dinding sel dan membran sel akibat perbedaan tekanan

antara di dalam dan di luar sel sehingga metabolit sekunder yang ada dalam sitoplasma akan terlarut dalam pelarut atau terjadi proses difusi. Penggunaan pelarut metanol pada proses maserasi, bertujuan untuk mengekstrak senyawa metabolit sekunder yang terkandung dalam daun tiga. Menurut Harborne (1987), pelarut metanol diduga mempunyai sifat yang dapat melarutkan semua jenis komponen yang berupa senyawa polar, non polar dan semi polar.

Partisi

Dalam ekstrak metanol masih terdapat berbagai kelompok senyawa metabolit sekunder sehingga perlu dilakukan pemisahan senyawa melalui proses partisi. Dalam proses partisi ekstrak metanol daun tiga dilakukan dengan menggunakan pelarut petroleum eter, etil asetat dan air. Hasil partisi yang diperoleh dapat dilihat dalam Tabel 2.

Tabel 2. Rendemen hasil partisi daun tiga

Hasil Partisi	Massa (g)	Rendemen (%)
PE	0,3246	16,23
EA	0,0723	3,615
A	0,3238	16,19

Keterangan : PE = Petroleum Eter; EA = Etil Asetat; A = Air

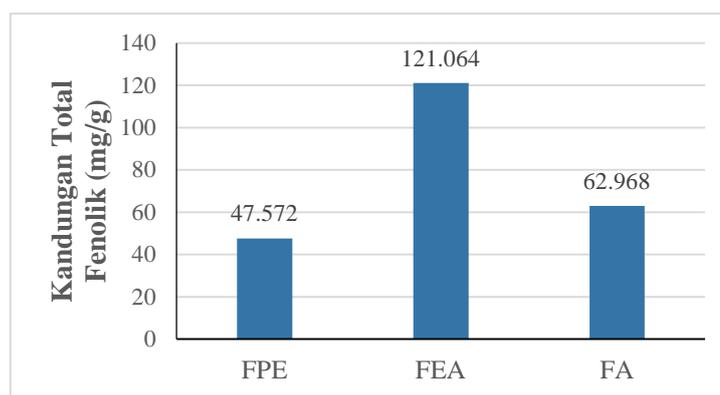
Berdasarkan data pada Tabel 2, hasil partisi petroleum eter mempunyai rendemen tertinggi kemudian diikuti hasil partisi air, dan hasil partisi etil asetat. Tingginya rendemen menunjukkan bahwa pelarut petroleum eter mampu mengekstrak lebih banyak

komponen bioaktif dari sampel daun tiga. Hal ini disebabkan banyaknya jumlah senyawa metabolit sekunder bersifat non polar yang terkandung dalam daun tiga. Tingginya rendemen hasil partisi petroleum eter mungkin disebabkan adanya komponen klorofil yang terdapat pada daun tiga. Petroleum eter merupakan pelarut non polar yang mampu melarutkan senyawa-senyawa yang tak larut air seperti lipida, klorofil, dan karotenoid (Wala dkk., 2015).

Kandungan Total Fenolik

Uji kandungan total fenolik dengan metode Folin-Ciocalteu bertujuan untuk mengetahui jumlah

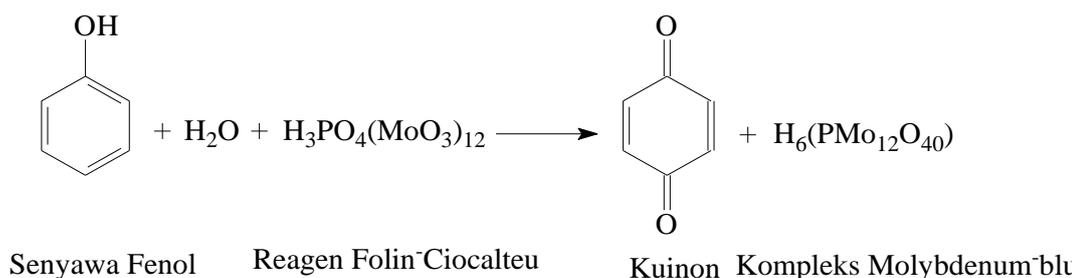
fenol yang terkandung dalam ekstrak metanol, hasil partisi petroleum eter, etil asetat dan air daun tiga. Metode ini didasarkan pada kemampuan ekstrak dan hasil partisi untuk mereduksi reagen Folin-Ciocalteu (kuning) yang mengandung senyawa fosfomolibdat dan asam fosfotungstat menghasilkan senyawa kompleks molibdenum-tungstat berwarna biru (Julkunen-Tiito, 1985). Semakin biru intensitas warna larutan menunjukkan kandungan total fenol dalam sampel semakin besar (Larson, 1988). Hasil kandungan total fenolik hasil partisi petroleum eter, etil asetat dan air dengan konsentrasi 1000 µg/mL dapat dilihat pada Gambar 1.



Gambar 1. Kandungan total fenolik dari hasil partisi daun tiga (FPE = Hasil Partisi Petroleum Eter; FEA = Hasil Partisi Etil Asetat; dan FA = Hasil Partisi Air)

Hasil kandungan total fenolik untuk ekstrak metanol sebesar 50,905 mg/g. Berdasarkan Gambar 1, dapat diketahui bahwa kandungan total fenolik tertinggi yaitu hasil partisi etil asetat (FEA) sebesar 121,064 mg/g diikuti dengan hasil partisi air (FA) 62,968 mg/g, dan hasil partisi petroleum eter (FPE) 47,572 mg/g. Hal ini dikarenakan pelarut etil asetat dapat melarutkan senyawa fenolik yang lebih banyak sehingga menunjukkan sebagian besar senyawa fenolik yang terdapat

pada daun tiga merupakan senyawa yang bersifat semipolar. Rohman dkk (2006) melaporkan bahwa pelarut etil asetat sangat cocok untuk mengekstraksi senyawa fenolik. Hasil kandungan total fenolik dalam ekstrak metanol (EM) memiliki nilai yang rendah, diduga komponen-komponen yang bersifat polar seperti karbohidrat ikut terekstrak dan menyebabkan total fenol per berat sampel menjadi rendah (Septiana dan Asnani, 2012).

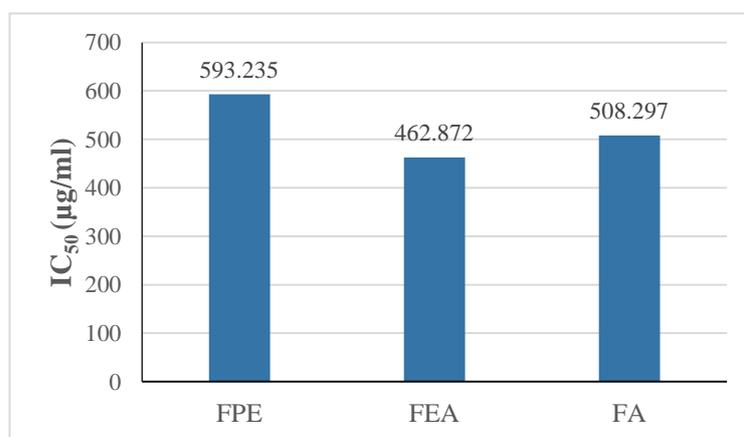


Gambar 2. Reaksi Senyawa Fenol dengan Reagen Folin-Ciocalteu (Hardiana dkk., 2012)

Aktivitas Antioksidan

Pada pengujian aktivitas antioksidan menggunakan metode

Muaja dkk (2017). Data hasil dari aktivitas antioksidan dapat dilihat pada Gambar 3.



Gambar 3. IC₅₀ dari hasil partisi daun tiga (FPE = Hasil Partisi Petroleum Eter; FEA = Hasil Partisi Etil Asetat; dan FA = Hasil Partisi Air)

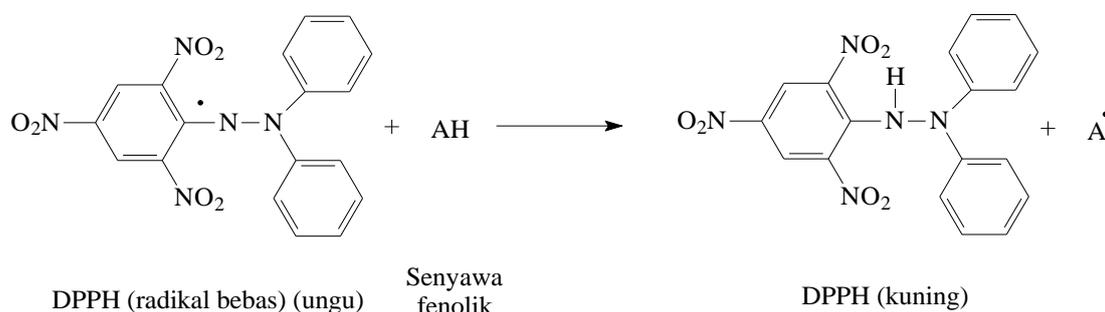
Hasil nilai IC₅₀ untuk ekstrak metanol sebesar 683,318 µg/ml. Berdasarkan Gambar 6, menunjukkan bahwa hasil partisi etil asetat (FEA) memiliki nilai IC₅₀ yang paling rendah yaitu 462,872 µg/ml, diikuti oleh hasil partisi air (FA) 508,297 µg/ml, dan hasil partisi petroleum eter (FPE) 593,235 µg/ml. Semakin rendah nilai IC₅₀, maka semakin besar aktivitas antioksidan dari sampel. Hasil ini menunjukkan bahwa tingginya aktivitas antioksidan berbanding lurus dengan kandungan fenolik dari sampel.

Penentuan nilai aktivitas antioksidan menggunakan metode

DPPH. Metode DPPH dipilih karena metode ini merupakan metode yang sederhana, mudah, cepat dan peka serta hanya memerlukan sedikit sampel untuk uji aktivitas antioksidan. Prinsip dari metode uji aktivitas antioksidan ini adalah pengukuran penangkapan radikal DPPH oleh suatu senyawa yang mempunyai aktivitas antioksidan dengan menggunakan spektrofotometer UV-Vis sehingga akan diketahui nilai aktivitas peredaman radikal bebas yang dinyatakan dengan IC₅₀ (*Inhibitory Concentration*). Nilai IC₅₀ didefinisikan sebagai besarnya konsentrasi senyawa uji yang dapat meredam radikal bebas sebanyak 50% (Molyneux, 2004). Hasil

reaksi antara penangkap radikal bebas DPPH dengan senyawa antioksidan dapat diketahui melalui perubahan

warna dari ungu pekat menjadi kuning akibat terjadi resonansi struktur penangkap radikal bebas DPPH.



Gambar 4. Reaksi antara penangkal radikal (AH) dengan radikal bebas DPPH (Landeng dkk., 2017)

KESIMPULAN

Kandungan total fenolik tertinggi terdapat pada hasil partisi etil asetat diikuti dengan hasil partisi air, dan hasil partisi petroleum eter. Hasil partisi etil asetat memiliki aktivitas antioksidan lebih tinggi dibandingkan dengan hasil partisi air dan hasil partisi petroleum eter.

DAFTAR PUSTAKA

- Azizah, D.N., Kumolowati, E., dan Faramayuda, F. 2014. Penetapan Kadar Flavonoid Metode $AlCl_3$ pada Ekstrak Metanol Kulit Buah Kakao (*Theobroma cacao* L.). *Kartika Jurnal Ilmiah Farmasi*. **2(2)** : 45-49
- Cahyanta, A.N. 2016. Penetapan Kadar Flavonoid Total Ekstrak Daun Pare Metode Kompleks Kolorimetri dengan Pengukuran Absorbansi secara Spektrofotometri. *e-Journal Politeknik Tegal*. **5(1)** : 58-61
- Conde, E., Cadahia, E., Garcia-Vallejo, M. C., Simon, B. F., and Adrados, J. R. G. 1997. Low Molecular

Weight Polyphenols in Cork of *Quercus suber*. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. **45(7)** : 2695-2700

- Droge, W. 2002. Free Radicals in The Physiological Control of Cell Function. *Physical Review*. **82(1)** : 47-95
- Grotewold, E. 2006. *The Science of Flavonoids*. New York : Springer
- Harborne, J. B. 1987. *Uji Fitokimia*. Bandung : Institut Teknologi Bandung
- Hardiana, R., Rudiyanayah., dan Zaharah, T. A. 2012. Aktivitas Antioksidan Senyawa Golongan Fenol dari Beberapa Jenis Tumbuhan Famili Malvaceae. *JKK*. **1(1)** : 8-13
- Jadhav, S.J., Nimbalkar, S.S., Kulkarni, A.D., dan Madhavi, D.L. 1996. Lipid Oxidation in Biological and Food Systems. Dalam D. L. Madhavi, S.S. Deshpande and D.K. Salunkhe (eds). *Food*

- Antioxidants Technological, Toxicological, and Health, Drespctives.* Marcel Dekker, Inc, New York
- Khelifi, S., Hachimi, Y., Khalil, A., Essafi, N., dan Abbouyi, A. 2005. In Vitro Antioxidant Effect of *Globularia alypum* L. Hydromethanolic Extract. *Indian Journal of Pharmacology*. **37(4)** : 227-231
- Landeng, P. J., Suryanto, E., dan Momuat, L. I. 2017. Komposisi Proksimat dan Potensi Antioksidan dari Biji Jagung Manado Kuning (*Zea mays* L.) *Chemistry Progress*. **10(1)** : 36-44
- Larson, R.A. 1988. The Antioxidants of Hinghest Plants. *Phytochemistry*. **27(4)** : 969-977
- Liu, K. 1999. *Soybeans : Chemistry, Technology, and Utilization*. New York : Chapman and Hall
- Markham, K.R. 1988. *Cara Mengidentifikasi Flavonoid (Terjemahan)*. Bandung : ITB Press
- Maukar, M. A., Runtuwene, M. R. J., dan Pontoh, J. 2013. Analisis Kandungan Fitokimia daru Uji Toksisitas Ekstrak Metanol Daun Soyogik (*Sauraula bracteosa* DC) dengan menggunakan Metode Maserasi. *Jurnal Ilmiah Sains*. **13(2)** : 98-101
- Molyneux, P. 2004. The Use of Stable Free Radical diphenylpicrylhydrazyl (DPPH) for Estimating Antioxidant Activity. *Journal of Materials Science & Technology*. **26(2)** : 211- 219
- Muaja, M. G. D., Runtuwene, M. R. J., dan Kamu, V. S. 2017. Aktivitas Antioksidan Ekstrak Metanol dari Daun Soyogik (*Sauraula bracteosa* DC). *Jurnal Ilmiah Sains*. **17(1)** : 68-72
- Najoan, J. J., Runtuwene, M. J. R., dan Wewengkang, D. S. 2016. Uji Fitokimia dan Aktivitas Antioksidan Ekstrak Etanol Daun Tiga (*Allophylus cobbe* L.). *Jurnal Ilmiah Farmasi*. **5(1)** : 266-274
- Rohman, A., Riyanto, S., dan Utari, D. 2006. Aktivitas Antioksidan, Kandungan Fenolik Total dan Kandungan Flavonoid Total Ekstrak Etil Asetat Buah Mengkudu serta Fraksi-Fraksinya. *Majalah Farmasi Indonesia*. **17(3)** : 136-142
- Salunkhe, D.K., Chavan, J.K., dan Kadam, S.S. 1990. *Dietary Tannins Consequences and Remedies*. Boca Raton : CRC Press
- Septiana, A.T., dan Asnani, A. 2012. Kajian Sifat Fisikokimia Ekstrak Rumput Laut Coklat *Sargassum duplicatum* Menggunakan Berbagai Pelarut dan Metode Ekstraksi. *AGROINTEK*. **6(1)** : 22-28

- Takashi, M., dan Takayuki, S. 1997. Antioxidative Activities of Natural Compounds Found in Plants. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. **45(5)** : 1819-1822
- Wala, M.E., Suryanto, E., dan Wewengkang, D.S. 2015. Aktivitas Antioksidan dan Tabir Surya Fraksi dari Ekstrak Lamun (*Syringodium Isoetifolium*). *Jurnal Ilmiah Farmasi*. **4(4)** : 282-289
- Windono, T., Soediman, S., Yudawati, U., Ermawati, E., Srielita., dan Erowati, T. I. 2001. Uji Perendam Radikal Bebas terhadap 1,1-Diphenyl-2 Picrylhydrazil (DPPH) dari Ekstrak Kulit Buah dan Biji Anggur (*Vitis vinifera* L.) Probolinggo Biru dan Bali. *Artocarpus*. **1(1)** : 34-43