

PENGARUH METODE EKSTRAKSI TERHADAP KADAR FENOLAT TOTAL DAN AKTIVITAS ANTIOKSIDAN DAUN SALAM (*Syzygium polyanthum* (Wight) Walp.)

Verawati, Dedi Nofiandi, Petmawati

STIFI Perintis Padang

Email : verawati81apt@gmail.com

Submitted : 21-02-2017, Reviewed: 27-02-2017, Accepted: 29-03-2017

ABSTRACT

*The research about influence of extraction method on phenolic content and antioxidant activity of Bay leaves (*Syzygium polyanthum* (Wight) Walp) has been conducted. Extraction methods used were maceration, percolation and soxhletation with ethanol 70% used as solvent extraction. Total phenolic level were determined by using Folin Ciocalteu method whereas antioxidant activity with DPPH radical scavenging method. . The highest extractive value was obtained from percolation method at 59.8% followed by maceration at 44.4% and soxhletation 22%. The highest levels of phenolic content was obtained from percolation (103,91mg/g), followed by soxhletation (72.80 mg/g) and maceration (69.76 mg/g). The antioxidant activity was shown by IC₅₀ values, the percolation method amounted to 49.67 µg/ml; soxhletation 49.98 µg/ml and maceration 35.05 µg/ml. Based on the results of statistical analysis SPSS 17 using one-way ANOVA known that the extraction method significantly affect phenolic content and antioxidant activity of the extract of bay leaves.*

Keywords : *Syzygium polyanthum, bay leaves, phenolic, antioxidant, extraction*

ABSTRAK

Telah dilakukan penelitian mengenai pengaruh metode ekstraksi terhadap kadar fenolat total dan aktivitas antioksidan daun Salam (*Syzygium polyanthum* (Wight) Walp.). Metode ekstraksi yang digunakan yaitu maserasi, perkolasi dan sokletasi dengan pelarut ekstraksi etanol 70%. Kadar fenolat total ditentukan dengan metode Folin Ciocalteu sedangkan aktivitas antioksidan dengan metode perangkapan radikal DPPH. Kadar ekstrak tertinggi diperoleh dari metode perkolasi sebesar 59,8% diikuti sokletasi 44,4% dan maserasi 22%. Kadar fenolat tertinggi diperoleh dari ekstrak perkolasi (103,91mg/g), diikuti metode sokletasi (72,80 mg/g) dan maserasi (69,76 mg/g). Aktivitas antioksidan ditunjukkan dengan nilai IC₅₀, pada metode perkolasi sebesar 49,67 µg/ml; sokletasi 49,98 µg/ml dan maserasi 35,05 µg/ml. Berdasarkan hasil analisa statistika SPSS 17 menggunakan ANOVA satu arah diketahui bahwa metode ekstraksi berpengaruh nyata terhadap kadar fenolat dan aktivitas antioksidan ekstrak daun salam.

Kata kunci : *Syzygium polyanthum, daun salam, fenolat, antioksidan, ekstraksi*

PENDAHULUAN

Daun Salam (*Syzygium polyanthum* (Wight) Walp.) merupakan salah satu rempah-rempah Indonesia yang digunakan secara luas sebagai bumbu masak dan obat tradisional. Secara empiris daun salam telah diakui berkhasiat untuk mengatasi diare, asam urat, kencing manis, menurunkan kadar kolesterol dan menurunkan tekanan darah (Aljamal, 2010). Beberapa khasiat ini telah dibuktikan secara praklinis menggunakan hewan percobaan.

Beragam aktivitas dari tumbuhan obat disebabkan karena adanya kandungan metabolit sekunder di dalamnya seperti fenolat, alkaloid, saponin, steroid, terpenoid tannin dan sebagainya (Sarker, 2007). Fenolat merupakan golongan metabolit sekunder yang distribusinya cukup luas pada tanaman. Golongan fenolat memiliki berbagai aktivitas antioksidan, antibakteri, anti-inflamasi, antikanker. Kandungan fenolat dalam tumbuhan berperan sebagai antioksidan alami yang dapat menangkal berbagai oksidan dan radikal bebas yang berbahaya bagi kesehatan (Balasundram, 2006). Antioksidan dapat melindungi sel dari kerusakan oksidatif, mencegah berbagai penyakit degenerative seperti kanker, penyakit kardiovaskuler, katarak, diabetes, Alzheimer dan Parkinson (Blanco, 2013).

Kadar fenolat dan aktivitas antioksidan dari ekstrak tumbuhan dipengaruhi oleh berbagai faktor salah satunya metode ekstraksi. Pada penelitian ini dilakukan beberapa metode ekstraksi terhadap daun salam sehingga dapat diketahui metode yang paling tepat untuk diterapkan pada proses ekstraksi daun salam ini.

METODE PENELITIAN

Alat dan Bahan

Alat yang digunakan dalam penelitian antara lain perkolator, soklet, rotavapor, spektrofotometer UV-Vis dan seperangkat alat-alat gelas standar laboratorium. Bahan yang digunakan antara lain daun salam, reagen Folin Ciocalteu, radikal DPPH (1,1-diphenyl-2-picrilhydrazil), etanol, natrium karbonat dan asam galat.

Pengambilan dan Penyiapan sampel tumbuhan

Daun salam diambil di Kebun Tanaman Obat (KTO) Universitas Andalas. Daun dikeringanginkan di ruangan teduh yang tidak terpapar cahaya matahari langsung. Setelah kering daun kemudian diserbukkan dengan grinder. Daun ditimbang 3x50 g untuk diekstraksi dengan metode yang berbeda.

Ekstraksi Daun Salam

Sampel segar dibersihkan, dicuci kemudian dikering anginkan. Setelah kering kemudian diserbukkan. Timbang 3x50 gram yang masing-masingnya digunakan untuk

ekstraksi dengan metode yang berbeda yaitu maserasi, perkolasi dan sokletasi. Filtrat hasil ekstraksi dipisahkan dengan *rotary evaporator* sehingga diperoleh ekstrak kental. Ekstrak ditimbang dan dihitung persentase rendemennya.

Karakterisasi Ekstrak (DepKes, 2008)

Terhadap masing-masing ekstrak yang diperoleh, dilakukan karakterisasi antara lain :

- a. Pemeriksaan organoleptis meliputi bau, rasa, aroma dan bentuk
- b. Pemeriksaan atau skrining komponen metabolit sekunder dengan metode Culvenor dan Simes yang dimodifikasi (Kulip *et al.*, 2010)
- c. Susut pengeringan

Penentuan Kadar Fenolat Total Ekstrak (Pourmorad, 2006)

- a. Pembuatan kurva kalibrasi

Senyawa fenolat standar (asam galat) dibuat dalam beberapa seri konsentrasi larutan yaitu 20, 40, 60, 80, 100 µg/mL dalam campuran methanol dan aquades (1:1). Dari masing-masing larutan dipipet 0,5 mL kemudian dicampurkan dengan 5 mL reagen Folin-Ciocalteu (diencerkan 1:10) dengan aquades tambahkan 4 mL larutan natrium karbonat 1 M biarkan selama 15 menit, ukur serapan pada panjang gelombang serapan maksimum (751,5 nm) dengan spektrofotometer UV-Vis. Berdasarkan data konsentrasi dan serapan larutan standar, dibuat kurva kalibrasi yang menunjukkan persamaan garis lurus $y = a + bx$

- b. Penentuan kadar fenolat total ekstrak daun salam

Masing-masing ekstrak daun salam dibuat dalam konsentrasi 200 ppm dan dipipet 0,5 mL masukkan ke dalam vial, tambahkan 5 mL pereaksi Folin-Ciocalteu (diencerkan 1:10 dengan aquades) kemudian tambahkan 4 mL larutan natrium karbonat 1 M kocok homogen, biarkan pada suhu kamar selama 15 menit dan tentukan kadar senyawa fenolat dengan mengukur serapan pada panjang gelombang serapan maksimum (751,5 nm) dengan spektrofotometer UV-Vis.

Uji Aktivitas antioksidan

Aktivitas antioksidan ditentukan dengan metode perangkapan radikal DPPH dengan metode Sahu (Sahu, 2013) yang telah dimodifikasi. Asam galat digunakan sebagai standar pembandingan aktivitas antioksidan dari ekstrak daun salam. Sebanyak 2 ml dari masing-masing larutan asam galat (1,2,3,4 dan 5 µg / ml) dan dari masing-masing ekstrak (20, 40, 60, 80, 100 µg / ml) ditambah dengan 4 ml larutan DPPH (35 µg / ml). Sebagai kontrol digunakan campuran 2 ml metanol ditambah 4 ml larutan DPPH 35 µg / ml. Semua larutan dibiarkan di tempat gelap selama 30 menit, kemudian diukur absorban tiap larutan pada panjang gelombang

517 nm dengan menggunakan spektrofotometer UV-Vs. Persentase inhibisi antioksidan terhadap radikal DPPH dihitung dengan menggunakan persamaan :

$$\% \text{ inhibisi} = \frac{\text{Abs kontrol} - \text{Abs sampel}}{\text{Abs kontrol}} \times 100\%$$

Berdasarkan data % inhibisi dapat diperoleh nilai IC₅₀ yaitu konsentrasi terendah sampel yang dapat menghambat radikal DPPH sebesar 50% (Molyneux, 2004)

HASIL DAN PEMBAHASAN

Sampel yang digunakan dalam penelitian ini adalah daun salam (*Syzygium polyanthum* Wigh Walp.). Daun salam diambil di kebun tumbuhan obat (KTO) Universitas Andalas Padang. Daun salam segar yang telah diambil dicuci dengan air, ditiriskan dan dikeringanginkan. Pengeringan dilakukan untuk mencegah reaksi enzimatik yang dapat menyebabkan terjadinya penguraian atau pengrusakan senyawa didalam sampel daun tersebut. Selain itu proses pengeringan dapat membuat simplisia menjadi lebih awet dan tahan lama. Daun salam kering dijadikan serbuk dan diekstraksi dengan metode yang berbeda yaitu maserasi, perkolasi dan sokletasi.

Perbedaan metode ini kemungkinan akan menghasilkan rendemen ekstrak yang berbeda dan profil kandungan kimia yang berbeda pula (Cannel, 1998.). Metode maserasi merupakan cara ekstraksi dingin yang memiliki keuntungan yaitu menggunakan peralatan atau botol maserasi sederhana, pelaksanaannya mudah tanpa perlakuan khusus yaitu dengan merendam sampel dalam pelarut pengestraksi sambil sesekali diaduk. Metode perkolasi juga merupakan cara ekstraksi dingin namun membutuhkan alat khusus yang disebut perkolator. Keuntungannya metode ini dapat menyari lebih sempurna dibandingkan metode maserasi namun pelarut yang digunakan banyak dan waktunya lama. Sokletasi adalah metode ekstraksi panas yang tidak sesuai bagi sampel tumbuhan yang mengandung senyawa termolabil. Selain itu juga membutuhkan alat khusus yaitu soklet. Namun metode ini memiliki keuntungan yaitu penggunaan pelarut sedikit, waktu singkat dan menyari lebih sempurna. Pelarut pengestraksi yang digunakan adalah etanol 70 % karena sampel dalam bentuk kering, kandungan air relatif sedikit tujuannya untuk mempermudah membuka pori-pori sampel. Etanol merupakan pelarut universal karena mampu mengekstraksi senyawa non polar dan polar. Etanol juga bersifat tidak toksik sehingga aman digunakan.

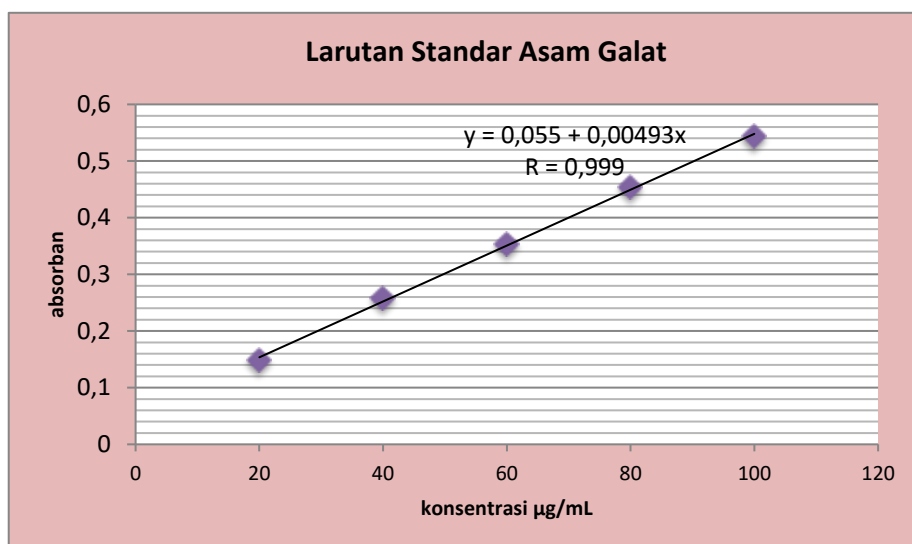
Tabel 1. Data Ekstrak daun salam (*Syzygium polyanthum* (Wight) Walp.)

Metode Ekstraksi	Ekstrak kental (g)	Rendemen (%)	Organoleptis	% Susut Pengerinan	Fitokimia
Maserasi	11	22	Kental, hijau	11,7	Fenolik,
Perkolasi	29,9	59,8	kecoklatan,	10,2	flavonoid,
Sokletasi	22,2	44,4	beraroma khas	9,9	steroid, saponin

Berdasarkan tabel 1, metode perkolasi memberikan rendemen ekstrak yang lebih tinggi, yang berarti metode ini dapat mengekstraksi metabolit sekunder lebih maksimal. Susut penguapan menunjukkan kadar senyawa mudah menguap di dalam ekstrak. Susut penguapan paling tinggi diperoleh pada metode maserasi, hal ini menunjukkan bahwa jumlah senyawa yang mudah menguap masih banyak ditemukan pada metode maserasi, sedangkan pada metode perkolasi walaupun merupakan metode ekstraksi dingin, tetapi karena proses ekstraksi berlangsung lebih lama dibandingkan maserasi sehingga mengakibatkan semakin banyak senyawa volatil yang menguap selama proses ekstraksi berlangsung. Metode sokletasi merupakan ekstraksi panas yang mengakibatkan kehilangan senyawa-senyawa volatil lebih besar sehingga persentase susut penguapan semakin kecil.

Pemeriksaan komponen fitokimia dilakukan dengan metode Culvenor Fitzgerald dan Simes, menunjukkan ketiga tipe ekstrak memiliki komponen fitokimia yang sama yaitu fenolik, flavonoid dan steroid. Skrining fitokimia ini merupakan informasi awal yang bersifat kualitatif mengenai gambaran kandungan zat metabolit sekunder dalam bahan alam. Untuk mengetahui lebih lanjut pengaruh metode ekstraksi ini terhadap komponen kimia ekstrak secara kuantitatif dilakukan penentuan kadar fenolat total dengan metode Folin Ciocalteu.

Senyawa standar fenolat yang digunakan dalam penelitian ini adalah asam galat. Asam galat merupakan senyawa golongan fenolat yang bersifat stabil, murni, murah dan mudah didapat. Berdasarkan data konsentrasi dan serapan asam galat yang telah direaksikan dengan reagen Folin Ciocalteu pada panjang gelombang 751 nm dibentuk kurva kalibrasi sehingga diperoleh persamaan regresi yang digunakan untuk menghitung kadar fenolat total dalam ekstrak daun salam.



Gambar 1. Kurva kalibrasi standar asam galat

Berdasarkan kurva kalibrasi pada gambar 1 diperoleh persamaan regresi $y = 0,055 + 0,00493x$. Koefisien korelasi $r = 0,999$, angka ini mendekati 1 yang berarti terdapat korelasi yang sangat tinggi antara absorban dan kadar senyawa serta menunjukkan linieritas hubungan antara keduanya. Nilai batas deteksi (BD) = $3,939 \mu\text{g/mL}$ dan batas kuantisasi (BK) = $13,133 \mu\text{g/mL}$. Batas deteksi adalah jumlah analit terkecil yang dapat dideteksi oleh alat sedangkan batas kuantisasi adalah jumlah analit terkecil yang dapat diukur secara cermat dan seksama pada alat.

Tabel 2. Hasil penentuankadar fenolat total ekstrak daun salam

Tipe ekstrak	Absorban	Kadar ($x \pm \text{SD}$)
Maserasi	0,212	$69,764 \text{ mg/g} \pm 0,114^{\text{a}}$
	0,211	
	0,211	
Perkolasi	0,221	$103,911 \text{ mg/g} \pm 0,958^{\text{a,b}}$
	0,228	
	0,230	
Sokletasi	0,212	$72,800 \text{ mg/g} \pm 1,467^{\text{b}}$
	0,225	
	0,213	

Berdasarkan Tabel 2 diperoleh kadar fenolat total tertinggi pada metode perkolasi, diikuti maserasi dan sokletasi. Hal ini berbeda dengan kadar ekstraktif dari tiap metode dimana maserasi memiliki rendemen yang lebih rendah daripada sokletasi. Kemungkinan senyawa fenolat yang terdapat dalam daun salam bersifat termolabil sehingga dikarenakan adanya pemanasan selama proses sokletasi mengakibatkan terjadinya degradasi dan perusakan senyawa-senyawa fenolat tersebut. Oleh karena itu walaupun rendemen ekstrak pada metode

soketasi cukup tinggi namun kadar senyawa golongan fenolatnya rendah, dapat diduga bahwa metode sokletasi tidak tepat digunakan untuk mengekstraksi komponen fenolat dari daun salam. Analisa statistik menggunakan program SPSS 17 dengan ANOVA satu arah memperlihatkan perbedaan yang signifikan ($p < 0,05$) antara metode maserasi, perkolasi dan sokletasi, hal ini menunjukkan bahwa metode ekstraksi mempengaruhi perolehan kadar fenolat total ekstrak.

Untuk pengujian aktivitas antioksidan sampel dipakai metode DPPH, karena merupakan metode sederhana, mudah, peka hanya memerlukan sedikit sampel dengan waktu relatif singkat. DPPH merupakan radikal bebas yang stabil pada suhu kamar dan mudah teroksidasi karena cahaya dan udara. Senyawa yang mempunyai aktivitas antioksidan akan bereaksi dengan DPPH yang ditunjukkan dengan perubahan warna dari ungu violet menjadi kuning karena terjadi donor atom hidrogen dari antioksidan ke DPPH lalu diukur absorbannya pada panjang gelombang 519 nm. Besarnya aktivitas antioksidan ditandai dengan nilai IC_{50} , yaitu larutan sampel yang dibutuhkan untuk menghambat 50 % radikal bebas DPPH.

Tabel 3. Hasil penentuan aktivitas antioksidan ekstrak daun salam

Sampel	Konsentrasi Sampel ($\mu\text{g/mL}$)	% Inhibisi	Persamaan regresi	IC_{50} ($\mu\text{g/mL}$)
Ekstrak maserasi	20	48,536	$y=37,98+0,34x$	35,057
	40	50,385		
	60	51,618		
	80	68,413		
	100	73,806		
Ekstrak perkolasi	20	14,638	$y=2,05+0,96x$	49,673
	40	46,379		
	60	64,561		
	80	79,815		
	100	94,453		
Ekstrak sokletasi	20	39,291	$y=25,32+0,49x$	49,984
	40	42,527		
	60	51,926		
	80	62,096		
	100	78,891		
Asam galat (pembanding)	1	17,385	$y=4,43+15,11x$	3,015
	2	36,638		
	3	55,603		
	4	55,891		
	5	83,333		

Semakin kecil nilai IC_{50} maka makin baik aktivitas antioksidan zat. Berdasarkan Tabel 3 menunjukkan bahwa ekstrak daun salam dengan metode maserasi

memiliki aktivitas antioksidan yang lebih kuat dibandingkan metode perkolasi dan sokletasi. Apabila dibandingkan dengan aktivitas antioksidan pembanding asam galat dengan nilai IC_{50} 3,015 $\mu\text{g/mL}$ ekstrak daun salam dengan metode maserasi masih lebih kecil. Hal ini karena pada penelitian ini yang diuji masih berupa hasil ekstraksi belum merupakan senyawa murni.

Berdasarkan hasil penelitian ini tidak diperoleh hasil yang bersesuaian antara kadar fenolat total dengan aktivitas antioksidan dari masing-masing ekstrak. Hal ini mungkin dikarenakan bahwa yang memberikan aktivitas antioksidan tidak hanya senyawa golongan fenolat saja tetapi dapat pula diberikan oleh senyawa-senyawa golongan lain seperti, minyak atsiri, steroid, terpenoid.

SIMPULAN

Berdasarkan hasil penelitian yang telah dilakukan dapat disimpulkan bahwa perbedaan metode ekstraksi mempengaruhi perolehan kadar fenolat dan aktivitas antioksidan daun salam Rendemen ekstrak dan kadar fenolat tertinggi diperoleh pada metode perkolasi sedangkan aktivitas antioksidan paling baik dihasilkan oleh ekstrak dari metode maserasi.

DAFTAR PUSTAKA

- Aljamal, A. 2010. Effects of Bay Leaves on Blood Glucose and Lipid Profiles on the Patients with Type 1 Diabetes. *World Academy of Science, Engineering and Technology*, 69, 211–214.
- Balasundram, N., Sundram, Kk., & Samman, S. 2006. Phenolic compounds in plants and agricultural by-products : Antioxidant activity , occurrence , and potential uses. *Food Chemistry*, 99, 191–203.
- Blanco-rios, A. K., Medina-juarez, L. A., & Gonzalez-aguilar, G. A. 2013. Antioxidant Activity of the Phenolic and Oily Fractions of Different Sweet Bell Peppers. *J. Med. Chem. Soc*, 57(2), 137–143.
- Cannell, R. 1998. *Natural Products Isolation*. Humana Press. New Jersey
- DepKes. 2008. Farmakope Herbal Indonesia. Departemen Kesehatan RI. Jakarta
- Kulip, J., Lam, N. F., Manshoor, N., Julius, A., Said, I. M., Gisil, J., Tukin, W. F. 2010. Medicinal plants in Maliau Basin, Sabah, Malaysia. *Journal Of Tropical Biology And Conservation*, 6, 21–33.
- Molyneux, P. 2004. The use of the stable free radical diphenylpicryl- hydrazyl (DPPH) for estimating antioxidant activity. *J.Sci.Technol*, 26(2), 211–219.
- Pourmorad, F., Hosseinimehr, S. J., & Shahabimajid, N. 2006. Antioxidant activity , phenol and flavonoid contents of some selected Iranian medicinal plants, 5(June), 1142–1145.
- Sahu, R. K., Kar, M., & Routray, R. 2013. Journal of Medicinal Plants Studies DPPH Free Radical Scavenging Activity of Some Leafy Vegetables used by Tribals of Odisha , India, 1, 21–27.
- Sarker, S. D. 2007. *Chemistry for Pharmacy Students General , Organic and Natural Product Chemistry*. Willey & Sons, London.