

Analisis Antioksidan dari Berbagai Fraksi Daun Cokelat (*Theobroma cacao* L.)

Mauizatul Hasanah¹, Suci Amaliani, Yopi Rikmasari

Sekolah Tinggi Ilmu Farmasi Bhakti Pertiwi Palembang

Jl. Ariodillah III No. 22A Ilir Timur I Palembang, Sumatera Selatan

e-mail : ¹ mauizatulhasanah@gmail.com

ABSTRAK

Telah dilakukan penelitian analisis antioksidan dari berbagai fraksi daun cokelat (*Theobroma cacao* L.) dengan metode DPPH (2,2-Difenil-1-Pikrilhidrazil). Tujuan penelitian ini untuk mengetahui aktivitas antioksidan dari berbagai fraksi daun cokelat. Sampel segar daun cokelat diekstraksi dengan pelarut etanol 70% kemudian difraksinasi. Fraksinasi dilakukan dengan berbagai pelarut berdasarkan kepolarannya menghasilkan fraksi n-heksan, fraksi etil asetat, fraksi air. Metode uji antioksidan dengan pereaksi DPPH (2,2-Difenil-1-Pikrilhidrazil) terhadap fraksi etil asetat, fraksi n-heksan, dan fraksi air pada beberapa konsentrasi yaitu 100 ppm, 80 ppm, 60 ppm, 40 ppm, 20 ppm, pada Spektrofotometri UV-Vis. Hasil penelitian menunjukkan adanya aktivitas antioksidan berupa nilai IC₅₀ pada berbagai fraksi diperoleh fraksi etil asetat adalah 41,76 ppm, fraksi n-heksan adalah 70,05 ppm, fraksi air adalah 109,4 ppm. Aktivitas antioksidan tertinggi ditunjukkan pada fraksi etil asetat.

Kata kunci : Antioksidan, daun cokelat (*Theobroma cacao* L.), DPPH (2,2-Difenil-1-Pikrilhidrazil), , ekstraksi, fraksinasi, IC₅₀

PENDAHULUAN

Radikal bebas merupakan salah satu faktor penyebab timbulnya beberapa penyakit. Radikal bebas yang sangat aktif dapat merusak struktur dan fungsi tubuh. Radikal bebas, terserap ke dalam tubuh, berasal dari berbagai sumber, seperti makanan, polusi, dan lain-lain. Suatu senyawa yang dapat berfungsi sebagai penetralisir atau peredam efek negatif dari radikal bebas, adalah antioksidan. Antioksidan mampu mencegah penyakit degenerative, serta mampu menghambat peroksidase lipid pada makanan. Antioksidan alami umumnya mempunyai gugus hidroksil dalam struktur molekulnya, sumber antioksidan alami dapat ditemukan pada sayuran, dan buah-buahan (Youngson, 2003).

Antioksidan dihasilkan dari berbagai sumber bahan, baik sintetik maupun alami. Sumber antioksidan alami, bisa berasal dari berbagai jenis sayuran, buah-buahan atau tanaman lain, pada berbagai bagian tanaman

yang mengandung senyawa dengan aktivitas antioksidan.

Indonesia adalah negara dengan jenis tanaman dan tumbuhan beragam yang bisa tumbuh. Salah satu komoditi tumbuhan yang telah dibudidayakan dalam bentuk perkebunan dengan luas lahan yang besar di Indonesia adalah tanaman cokelat. Tanaman cokelat, pada umumnya dimanfaatkan untuk menghasilkan buah cokelat, namun pemanfaatan bagian lain dari tanaman masih perlu terus dikaji, seperti pemanfaatan daun cokelat. Pemanfaatan semua bagian tanaman, dapat meningkatkan kemanfaatan dan penggunaan dari tanaman tersebut, sehingga semakin menarik untuk dibudidayakan dan dikembangkan sebagai produk bahan mentah untuk produk lain.

Daun kakao mengandung senyawa bioaktif berupa senyawa fenolat dan flavonoid yang berperan sebagai antioksidan. Menurut Minifie (1970), daun kakao mengandung *theobromine*, *kafein*, *anthocianin*, *leucoanthochianin*, dan *catechol* yang

jumlahnya bervariasi yang dipengaruhi oleh umur daun dan umur tanaman.

Penelitian Osman dkk, (2004) menunjukkan hasil bahwa polifenol yang terkandung di dalam daun kakao terdiri atas epigalo katekin galat (EGCG), epigalo katekin (EGC), epi katekin galat (ECG), dan epi katekin (EC), dengan jumlah dari masing-masing senyawa tersebut dipengaruhi oleh umur daun. Daun muda mengandung total polifenol 19,0% dan kafein 2,24% dari ekstrak daun kakao, total katekin 9,75% dari total polifenol. Pada daun tua mengandung total polifenol 28,4%, dan kafein 1,33% dari ekstrak daun kakao, total katekin 5,25% dari total polifenol.

Salah satu faktor yang mempengaruhi mutu ekstrak tumbuhan obat adalah pelarut yang digunakan untuk ekstraksi. Pelarut yang digunakan untuk ekstraksi adalah etanol (Badan POM, 2004), Sedangkan penggunaan pelarut etil asetat karena etil asetat merupakan pelarut yang mudah diuapkan, tidak higroskopis, dan memiliki toksistas rendah (USP, 2007; Rowe dkk, 2009), sedangkan n-heksan sebagai pelarut yang bersifat stabil, mudah menguap, dan selektif dalam melarutkan zat.

Ekstraksi dilakukan dengan cara metode maserasi kemudian dilakukan fraksinasi untuk memisahkan senyawa berdasarkan kepolarannya, sifat antioksidannya diuji menggunakan pereaksi DPPH (2,2-diphenil-1-pikril hidrazil) secara Spektrofotometri UV-Vis.

METODE PENELITIAN

Alat

Destilasi vakum, *rotary evaporator*, corong pisah, maserator, pipet mikron 0,2 ml (Socorex), alat gelas, Spektrofotometri UV-Vis (SHIMADZU -1700).

Bahan

Daun Cokelat (*Theobroma cacao* L.), pereaksi 2,2-difenil-1-pikrilhidrazil (DPPH)

(Sigma Aldrich), etanol *absolute* (Merck), aquadest, metanol (Merck), etil asetat 99,5% (Merck), n-heksan 90% (Merck), alumunium foil, kapas, kertas saring, kloroform, kloroform amoniak, asam sulfat 2N, pereaksi mayer, logam Mg, HCl pekat, FeCl₃, CHCl₃, norit, asam asetat anhidrat 10%, H₂SO₄ pekat, dan pasir bersih.

Sampel

Daun cokelat (*Theobroma cacao* L.), berasal dari daerah Talang Ratu, Palembang, Sumatera Selatan. Herbarium tanaman dilakukan di Herbarium Universitas Andalas (ANDA) Jurusan Biologi FMIPA Unand, Padang, Sumatera Barat. Sampel yang diambil adalah sampel daun yang berwarna hijau tua, sampel diambil secara mekanik dengan cara manual, kemudian sampel dimasukkan ke dalam wadah tertutup untuk dibawa ke laboratorium dan di analisis.

Prosedur

Pembuatan Ekstrak Kental

Sampel segar daun cokelat (*Theobroma cacao* L) diekstraksi dengan metode perendaman (maserasi) menggunakan pelarut etanol 70% (pelarut etanol dibuat dari etanol absolut p.a). Maserat yang diperoleh kemudian dipadatkan hingga diperoleh ekstrak kental. Pemekatan maserat dilakukan dengan melakukan penguapan pelarut terlebih dahulu dengan alat destilasi vakum, dilanjutkan dengan pemekatan hingga menjadi ekstrak kental dengan alat *rotary evaporator*. Ekstrak kental kemudian difraksinasi dengan pelarut yang berbeda tingkat kepolaran, yaitu air, etil asetat dan n-heksan.

Fraksinasi

Ekstrak kental etanol daun cokelat, dilarutkan terlebih dahulu pelarut air (aquadest) sebanyak 200 mL aquadest, difraksinasi dengan 200 mL n-heksan, pada

alat corong pisah. Terbentuk dua lapisan, fraksi cair air dan fraksi cair n-heksan, dipisahkan, fraksinasi dilakukan berulang.

Fraksi air difraksinasi lagi dengan 200 mL etil asetat, terbentuk lapisan fraksi cair etil asetat dan fraksi cair air. Fraksi cair masing – masing dipekatkan, dengan menggunakan alat destilasi vakum terlebih dahulu, lalu dilanjutkan dengan *rotary evaporator*, hingga diperoleh fraksi kental, yaitu fraksi etil asetat, fraksi n-heksan dan fraksi air.

Identifikasi Golongan Senyawa Kimia pada Fraksi

Identifikasi golongan senyawa kimia pada fraksi dilakukan masing – masing untuk fraksi etil asetat, fraksi n-heksan dan fraksi air, meliputi identifikasi alkaloid, flavonoid, fenolik, saponin, terpenoid dan steroid.

Analisis Aktivitas Antioksidan

Analisis aktivitas antioksidan dilakukan dengan melakukan reaksi sampel uji berbagai fraksi dengan pereaksi radikal bebas DPPH (Molyneux, 2003). Prinsip analisis adalah dengan mengamati model reaksi aktivitas antioksidan, dengan mereaksikan larutan uji sampel fraksi yang mengandung senyawa antioksidan dengan senyawa radikal bebas berupa pereaksi DPPH. Pengamatan dilakukan dengan mengamati penurunan konsentrasi DPPH berupa penurunan nilai absorbansi pada instrument Spektrofotometri UV-Vis.

Analisis aktiitas antioksidan dilakukan terhadap fraksi daun cokelat berbagai konsentrasi larutan uji. Larutan uji dibuat pada berbagai variasi konsentrasi, yaitu konsentrasi 20, 40, 60, 80 dan 100 ppm. Diambil dari masing – masing larutan uji pada berbagai konsetrasi sebanyak 0,2 mL, kemudian direaksikan selama 30 menit dengan larutan pereaksi DPPH 0,05 mM sebanyak 3,8 mL. Reaksi diamati, diperoleh absorbansi DPPH pada Spektrofotometri UV-Vis, pada panjang gelombang maksimum DPPH, yaitu 516,2 nm.

Analisis aktivitas antioksidan sampel diketahui dengan menghitung nilai % inhibisi, % penghambatan radikal bebas oleh sampel, yaitu dengan memasukkan nilai pada persamaan perbandingan selisih absorbansi DPPH sebelum dan setelah reaksi, terhadap DPPH sebelum reaksi. Nilai % Inhibisi dibuat kurvanya terhadap konsentrasi larutan uji, untuk dihitung besar nilai IC_{50} , yaitu nilai konsentrasi pada saat %inhibisi bernilai 50 (Blois, 1958).

Analisis Data

Data nilai absorbansi DPPH sebelum dan sesudah reaksi, digunakan untuk menghitung nilai %inhibisi, lalu dihitung nilai IC_{50} sebagai kekuatan aktivitas antioksidan. Analisis data dilakukan dengan mentabulasi nilai IC_{50} fraksi, dan menuliskan narasi untuk menjelaskan perbedaannya. Nilai aktivitas antioksidan ditentukan intensitasnya berdasarkan nilai IC_{50} , semakin rendah nilai IC_{50} , maka semakin tinggi intensitas aktivitas antioksidan sampel.

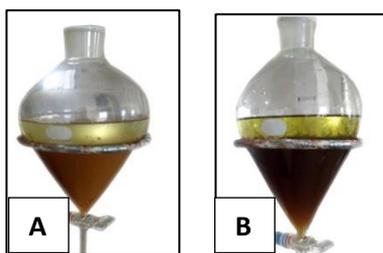
HASIL DAN PEMBAHASAN

Ekstrak kental etanol daun cokelat di fraksinasi dengan menggunakan pelarut yang memiliki perbedaan tingkat kepolarannya. Pelarut yang digunakan adalah n-heksan (non-polar), etil asetat (semi polar) dan air (polar) (Gambar 1).

Proses fraksinasi dilakukan untuk memisahkan senyawa kimia berdasarkan tingkat kepolarannya. Setelah proses fraksinasi dilakukan, maka didapat beberapa fraksi dari masing-masing pelarut yang digunakan yaitu fraksi n-heksan, fraksi etil asetat, dan fraksi air. Etil asetat adalah salah satu pelarut yang baik mudah menguap, tidak higroskopis, dan memiliki toksisitas rendah (Rowe dkk, 2009), n-heksan adalah pelarut yang bersifat stabil, mudah menguap, dan selektif dalam melarutkan zat. Hasil fraksinasi terhadap ekstrak kental daun cokelat, menggunakan pelarut n-heksan, etil asetat,

dan air diperoleh fraksi kental n-heksan dengan rendemen 30,76%, fraksi kental etil

asetat dengan rendemen 27,12% dan fraksi kental air dengan rendemen 41,32%.



Gambar 1. Proses fraksinasi, fraksinasi etil asetat – air (A) dan fraksinasi n-heksan – air (B)

Sampel segar, fraksi kental air, fraksi kental n-heksan, dan fraksi kental etil asetat daun cokelat (*Theobroma cacao* L.) dianalisis kandungan golongan senyawa kimianya untuk mengetahui senyawa metabolit sekunder apa saja yang terkandung didalam tumbuhan tersebut. Hasil pemeriksaan pendahuluan

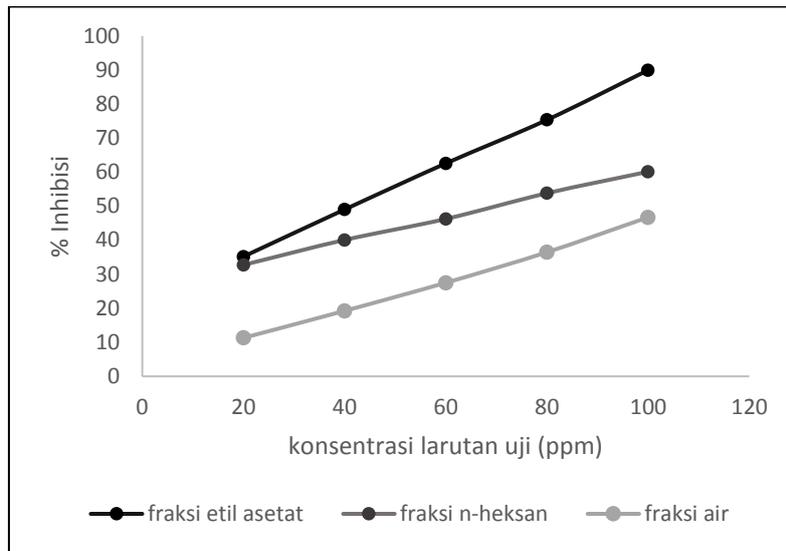
kandungan kimia sampel segar daun cokelat (*Theobroma cacao* L.) dengan pereaksi kimia menunjukkan bahwa pada tumbuhan positif mengandung alkaloid, flavonoid, fenolik, dan saponin. Kandungan golongan senyawa kimia pada masing – masing fraksi ditunjukkan pada Tabel 1.

Tabel 1. Hasil Pemeriksaan Golongan Senyawa Kimia Sampel Segar dan Fraksi Daun Cokelat

Sampel	Alkaloid	Flavonoid	Fenolik	Saponin	Terpenoid	Steroid
Sampel Segar	+	+	+	+	-	-
Fraksi n- heksan	-	-	+	-	-	-
Fraksi Etil Asetat	+	+	+	-	-	-
Fraksi Air	-	+	-	-	-	-

Analisis aktivitas antioksidan dilakukan menggunakan metode DPPH pada instrument Spektrofotometri UV-Vis, metode sangat mudah dapat dilakukan dalam waktu yang cukup singkat dan menggunakan sampel dalam jumlah yang sedikit. Aktivitas antioksidan metode DPPH ditunjukkan oleh hambatan serapan radikal DPPH pada panjang gelombang serapan maksimum 516,2 nm. Pengujian aktivitas antioksidan metode DPPH ini dilakukan setelah dibiarkan selama 30 menit dan dilakukan ditempat gelap karena DPPH (2,2-difenil-1-pikrilhidrazil) sangat pekat terhadap cahaya. Aktivitas antioksidan terlihat dari penurunan serapan larutan DPPH akibat adanya penambahan sampel (Molyneux, 2003).

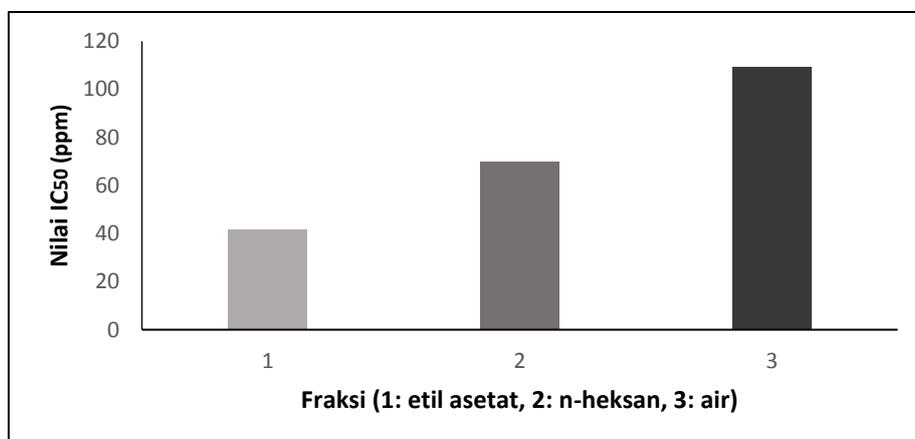
Pengukuran aktivitas antioksidan dari ekstrak kental daun cokelat (*Theobroma cacao* L.) ini dibuat beberapa konsentrasi yaitu 100, 80, 60, 40 dan 20 ppm. Pengujian efek aktivitas antioksidan dari masing-masing fraksi n-heksan, fraksi etil asetat, dan fraksi air menunjukkan adanya aktivitas antioksidan, pada fraksi n-heksan pada konsentrasi 100, 80, 60, 40, dan 20 ppm berturut-turut adalah 60,11%, 53,80%, 46,24%, 40,07% dan 32,73% terhadap fraksi etil asetat pada konsentrasi 100, 80, 60, 40 dan 20 ppm berturut-turut adalah 89,95%, 75,34%, 62,55%, 49,01%, dan 35,18% terhadap fraksi air pada konsentrasi 100, 80, 60, 40, dan 20 ppm berturut-turut adalah 46,72%, 36,47%, 27,50%, 19,24%, dan 11,30%, tampak pada Gambar 2.



Gambar 2. Kurva %inhibisi Fraksi Daun Cokelat terhadap Konsentrasi Larutan Uji Fraksi

Hasil perhitungan persen inhibisi, didapatkan hasil bahwa nilai persen inhibisi pada fraksi etil asetat lebih besar dibandingkan dengan nilai persen inhibisi pada ekstrak kental, fraksi n-heksan, dan fraksi air. Selanjutnya dari perhitungan persen inhibisi ekstrak kental dan ketiga fraksi akan dicari kurva kalibrasi untuk menentukan nilai IC_{50} dari ekstrak kental dan masing-masing fraksi. IC_{50} merupakan nilai yang menunjukkan kemampuan penghambatan proses oksidasi sebesar 50% suatu konsentrasi sampel, nilai IC_{50} yang semakin kecil menunjukkan semakin tingginya aktivitas

antioksidan. Untuk menentukan nilai IC_{50} dilakukan dengan memasukkan nilai hasil perhitungan kedalam persamaan linier dengan konsentrasi (X) (ppm) sebagai absis dan nilai persentase inhibisi sebagai (Y) ordinat, nilai IC_{50} dari perhitungan pada saat % inhibisi sebesar 50% dengan persamaan $Y = aX + b$. Nilai IC_{50} ekstrak daun cokelat terhadap beberapa fraksi etil asetat, fraksi n-heksan, dan fraksi air berturut-turut adalah, 41,76 ppm, 70,05 ppm dan 109,4 ppm, dengan perbandingan sebagaimana terlihat pada Gambar 3,



Gambar 3. Perbandingan Nilai IC_{50} Fraksi

Fraksi etil asetat mengandung senyawa flavonoid dan fenolik, tingginya total polifenol pada pelarut etil asetat disebabkan golongan polifenol yang terlarut karena berat molekul yang sama dengan pelarut etil asetat, seperti tanin dan flavonol (Nur dan Astawan, 2011).

Senyawa golongan fenol dan flavonoid diketahui sangat berperan dalam aktivitas antioksidan, semakin besar kandungan fenol dan flavonoid maka semakin besar aktivitas antioksidannya. Fraksi n-heksan mengandung golongan senyawa flavonoid dan fenol, namun senyawa yang lebih banyak larut pada n-heksan adalah jenis senyawa non polar seperti lemak lilin, dan minyak terlarut dalam pelarut n-heksan. Fraksi air memiliki aktivitas antioksidan yang paling rendah, juga mengandung senyawa fenol dan flavonoid.

Aktivitas antioksidan pada senyawa flavonoid bervariasi dan pada umumnya flavonoid bersifat sebagai antioksidan. Donasi atom hidrogen dari senyawa flavonoid mampu menangkap dan meredam radikal bebas di dalam tumbuh, sehingga memproteksi tubuh dari berbagai penyakit yang timbul dikarenakan peran radikal bebas (Cost dkk, 2001).

Senyawa fenol merupakan suatu senyawa yang memiliki cincin aromatik yang mengandung satu atau lebih atom hidroksil (Harbone, 1987). Senyawa fenolik dapat berperan sebagai tabir surya untuk mencegah efek yang merugikan akibat radiasi UV pada kulit karena senyawa fenolik umumnya berperan sebagai antioksidan.

SIMPULAN

Aktivitas antioksidan (IC_{50}) dari fraksi etil asetat, fraksi n-heksan dan fraksi air daun coklat (*Theobroma cacao* L.) berturut-turut adalah 41,76 ppm, 70,05 ppm, dan 109,4 ppm. Aktivitas antioksidan tertinggi ditunjukkan pada fraksi etil asetat.

DAFTAR PUSTAKA

- Badan POM . 2004. *Monografi ekstrak tumbuhan obat indonesia*. Jakarta: Badan Pengawas Obat dan Makanan Republik Indonesia.
- Blois, MS. 1958. Antioxidant determinations by the use of a stable free radical. *Nature*.
- Cost. P, M. Calomme, J.B. Sindambiwe, T.D. Bruyne, K. Cinanga, L. Pieter, A.J. Vlietinck, and D.V. Berghe. 2001. Cytotoxicity and Lipid peroxidation Inhibiting Activity of Flavonoid. *Planta Med*.
- Culvenor, C.C.J. dan J.S. Fitzgerald. 1963. A Field method for alkaloid screening of plant. *Journal Pharmacy Science*.
- Harbone, J.B. 1987. *Metode fitokimia, penuntun cara modern menganalisa tumbuhan*, diterjemahkan oleh K. Padmawinata. Bandung : ITB press.
- Majewska, M. Skrzycki, M. Podsiad, M. And Czeczot, H. 2011. Evaluation of antioxidant potential of flavonoids an in vitro study. *Acta poloniae pharmaceutica – drug research*, (68), (4).
- Minifie, B.W. 1970. Chocolate, cacao and confectionary. *Great britain at the pitman press, Bath, London*.
- Molyneux. 2003. The use of the stable free radical diphenylpicrylhydrazyl (DPPH) for estimating antioxidant activity. *Songklanakarinn Journa. Science Technology*. 26: 211-219.
- Osakabe, N, C.Sanbongi, M. Natsume, T.Takaziwa, S.Gomi, and T.Osawa, 1998. Antioxidative polyphenols isolated from theobroma cacao. *Journal Agriculture Food Chemistry*.
- Osman, H., Nassarudin, R. dan Lee, S.L 2004. Extracts of cacao (*Theobroma cacao* L.) leaves and their antioxidant potential.
- Rowe, R. C. P. J. Shekey, and M. E Quinn. 2009. *Handbook of Pharmaceutical Exipient (Sixth Edition)*. USA: Pharmaceutical Press and American Pharmacist Association.

Simes, J.J.H., Tracey, J.G. Webb, I.G. and Dunstan, W.J. 1959. *An australia phaytochemical survey saponins and esters australian flowering plant*. Australia : Commonwealth Scintific and Industrial Research Organization.

USP Convection. 2007. United states of pharmacopeia national formulary, USP 30/ NF 25. Twinbrook Parkway: *United States Pharmacopeial Convection*.

Youngson, Robert. 2003. *Antioksidan: manfaat Vitamin C dan E bagi kesehatan*. Jakarta: Penerbit Arcan.

