



ISOLASI ASAM FERULAT DARI DAUN MINDI (*Melia azedarach L.*) DAN UJI AKTIVITAS ANTIOKSIDAN

Isolation of Ferulic Acid from Leaves of Mindi (Melia azedarach L.) and Its Antioxidant Activity Test

Andriyani Budi Listyo*, Dewi Kusriani, dan Enny Fachriyah

Departemen Kimia, Fakultas Sains dan Matematika, Universitas Diponegoro
Jl. Prof. Soedarto, Tembalang, Kota Semarang, Jawa Tengah, 50275, Indonesia

Untuk korespondensi: Telp: 081360526239, e-mail: andriyanibudi9@gmail.com

Received: June 22, 2017

Accepted: May 16, 2018

Online Published: May 21, 2018

DOI : 10.20961/jkpk.v3i1.11858

ABSTRAK

Mindi (*Melia azedarach L.*) merupakan salah satu tumbuhan yang berasal dari famili *Meliaceae* dan telah diketahui mempunyai aktivitas biologis karena adanya senyawa bioaktif salah satunya asam ferulat. Pada penelitian ini telah dilakukan isolasi asam ferulat beserta uji aktivitas antioksidannya dari daun mindi. Penelitian ini bertujuan untuk mengisolasi asam ferulat pada ekstrak etanol daun mindi, menentukan kadar asam ferulat dan uji aktivitas antioksidan secara kualitatif. Metode yang digunakan pada penelitian ini adalah fraksinasi dengan hidrolisis (asam dan basa) dan tanpa hidrolisis, penentuan kadar asam fenolat dengan instrument TLC Scanner dan uji aktivitas antioksidan secara kualitatif dengan metode peredaman radikal DPPH. Berdasarkan identifikasi menggunakan TLC dan TLC Scanner, bahwa dari fraksi hidrolisis basa (HB), hidrolisis asam (HA) dan tanpa hidrolisis (HA) ekstrak etanol daun mindi diduga mengandung senyawa asam ferulat. Hasil analisis dengan TLC Scanner diketahui kadar asam ferulat pada fraksi HB, HA dan TH masing-masing 15,57%; 12,17%; dan 9,56%. Hasil penelitian menunjukkan bahwa pengaruh hidrolisis mempengaruhi kadar asam fenolat dimana pada fraksi HB menghasilkan kadar asam ferulat lebih tinggi dibanding fraksi HA dan TH. Pada uji aktivitas antioksidan yang dilakukan secara kualitatif menunjukkan bahwa isolat asam ferulat yang terkandung pada ketiga fraksi aktif meredam radikal DPPH.

Kata Kunci: *Melia azedarach L.*, asam ferulat, TLC Scanner, DPPH

ABSTRACT

Mindi (*Melia azedarach L.*) is one of a plant from *Meliaceae* family and has been known for its bioactive compound, such as ferulic acid. On this study, the isolation of ferulic acid and antioxidant activity test has been conducted. The aim of this study was to isolate the ferulic acid on ethanol extract of *Melia azedarach L.* leaves, determine the ferulic acid content and antioxidant activity test qualitatively. The method used in this research was isolation with hydrolysis (acid and base) and without hydrolysis, determining the phenolic acid content using TLC scanner instrument and antioxidant activity test qualitatively using DPPH radical reduction method. According to the identification using TLC and TLC scanner, the base hydrolysis fraction (HB), acid hydrolysis (HA), and without hydrolysis (HA) of ethanol extract from *Melia azedarach L.* was suspected contain the ferulic acid compound. The analysis result using TLC scanner was known to have ferulic acid content on HB, HA, and TH fraction of 15.57%, 12.17%, and 9.56%, respectively. This study showed that hydrolysis affected the phenolic acid content where the HB fraction produced higher ferulic acid than HA and TH fraction. The antioxidant activity test that

has been conducted qualitatively showed that ferulic acid isolates contained on each fraction actively reduce the DPPH radical.

Keywords: *Melia azedarach L*, ferulic acid, TLC Scanner, DPPH

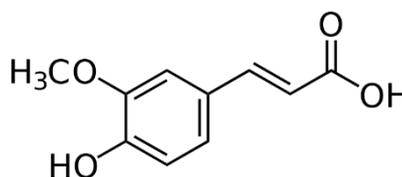
PENDAHULUAN

Tanaman mindi (*Melia azedarach L.*) adalah salah satu tanaman berfamili Meliaceae, yang merupakan tanaman asli dari Mexico dan Argentina. Tanaman ini dapat tumbuh di Indonesia yang beriklim tropis [1]. Dalam kehidupan sehari-hari, tanaman mindi digunakan secara tradisional untuk obat malaria, diabetes, batuk, penyakit kulit, dan lain-lain [2]. Penelitian lain menyatakan bahwa ekstrak daun mindi memiliki aktivitas sebagai, antioksidan antibakteri, analgesic [3], antidiabetes, antihipertensi, antireumatik [1], insektisida, rodentisida, dan fungisida [4].

Pada daun mindi terdapat kandungan metabolit sekunder antara lain alkaloid, tannin, saponin, fenolik, glikosida, steroid, terpenoid dan flavonoid dimana dalam ekstrak etanol daun mindi mengandung senyawa fenolik dalam jumlah yang banyak [5]. Kandungan senyawa fenolik ekstrak daun mindi yang berhasil diidentifikasi dengan HPLC mengandung komponen mayoritas asam protokatekat serta asam galat, asam siringat, asam ferulat, asam quinat dan asam sinapat yang merupakan golongan asam fenolat [6].

Asam ferulat merupakan salah satu jenis asam fenolat yang terkandung dalam tanaman yang berasal dari metabolisme fenilalanin dan tirosin. Asam ferulat banyak ditemukan pada biji dan daun dalam bentuk

bebas dan terikat dengan lignin dan biopolimer lainnya. Asam ferulat memiliki inti fenolik dan diperpanjang rantai samping konjugasi sehingga mudah membentuk resonansi stabil fenoksi radikal yang menyumbang potensi antioksidan kuat [7]. Struktur asam ferulat ditunjukkan pada Gambar 1.



Gambar 1. Struktur asam ferulat

Ekstrak etanol daun mindi telah dilaporkan memiliki aktivitas antioksidan yang ditunjukkan dengan harga IC₅₀ sebesar 0.0054 µg/ml [5]. Daun dari tanaman mindi belum banyak diteliti tentang isolasi senyawa asam fenolat, oleh karena itu pada penelitian ini akan dilakukan isolasi asam ferulat dan uji aktivitas antioksidan secara kualitatif dari daun mindi.

Berdasarkan informasi di atas, penelitian mengenai isolasi asam ferulat dan uji aktivitas antioksidan isolat asam ferulat belum banyak dilakukan. Penelitian ini akan dilakukan isolasi asam ferulat serta aktivitas antioksidannya secara kualitatif dengan metode DPPH dari isolat asam ferulat. Hasil penelitian ini nantinya diharapkan dapat memperoleh isolat asam ferulat yang terkandung dalam daun Mindi (*Melia*

azedarach L.) dan aktivitasnya sebagai antioksidan.

METODE PENELITIAN

1. Bahan dan alat.

Bahan yang diperlukan dalam penelitian ini yaitu daun Mindi (*Melia azedarach* L.) dari daerah Purworejo, Jawa Tengah, n-heksana, etanol, akuades, amonia, amil alkohol, serbuk magnesium, anhidrida asam asetat, pereaksi Meyer, pereaksi Dragendorff, asam sulfat p.a, natrium hidroksida p.a, natrium bikarbonat p.a, eter, asam klorida p.a, metanol p.a, kloroform p.a, natrium asetat p.a, natrium sulfat anhidrat, plat silika gel GF254, asam asetat p.a, pereaksi FeCl_3 2 %, Na_2CO_3 p.a, etil asetat p.a, asam galat p.a, asam ferulat p.a, asam pirogalol p.a, asam salisilat p.a, asam kafeat p.a, indikator universal, dan 1,1-difenil-2-pikrilhidrazil (DPPH).

Alat yang digunakan dalam penelitian ini terdiri dari gelas beker, erlenmeyer, gelas ukur, pipet tetes, cawan porselin, pipet gondok, pengaduk, corong gelas, tabung reaksi, corong pisah, chamber KLT, lampu UV 254 nm dan 365 nm, *rotary evaporator*, botol vial, neraca analitis dan TLC Scanner.

2. Persiapan Sampel

Sampel penelitian berupa daun mindi yang diperoleh di sekitar daerah Purworejo. Daun mindi yang diperoleh dibersihkan dengan air dan dikeringkan dengan diangin-anginkan tanpa terkena sinar matahari dan dihaluskan dengan cara diblender sehingga menjadi serbuk.

3. Pembuatan Ekstrak Etanol-Air

Serbuk daun Mindi sebanyak 1,180 kg dimaserasi dengan pelarut etanol 96% hingga jernih dengan pergantian pelarut setiap 24 jam, kemudian dipisahkan ekstrak dan ampasnya. Ekstrak yang diperoleh kemudian dipekatkan dengan *rotary evaporator* sehingga diperoleh ekstrak kental etanol dan ditimbang. Ekstrak kental etanol dilarutkan kembali dengan etanol kemudian dilakukan penghilangan klorofil dengan menambahkan akuades panas (1:1), didiamkan hingga klorofil memisah dan disaring.

Ekstrak etanol-air diekstraksi dengan pelarut n-heksana menggunakan corong pisah hingga membentuk dua lapisan. Lapisan n-heksana dan lapisan etanol-air dipisahkan

4. Penapisan Fitokimia

Simplisia daun mindi dilakukan uji penapisan fitokimia untuk mengetahui kandungan golongan senyawa kimianya. Uji penapisan fitokimia meliputi uji alkaloid, uji flavonoid, uji tanin, uji saponin, uji steroid dan triterpenoid

5. Isolasi Asam Fenolat

Isolasi asam fenolat dilakukan terhadap ekstrak etanol-air melalui tiga macam, yaitu hidrolisis asam, hidrolisis basa dan tanpa hidrolisis [8].

a. Hidrolisis Asam

Sebanyak 80 mL ekstrak etanol-air dicampur dengan H_2SO_4 2N dalam penangas air selama 2 jam. Hasil hidrolisis lalu diekstraksi dengan 80 mL eter untuk memisahkan asam fenolat dengan senyawa

lain sebanyak empat kali. Fraksi eter selanjutnya diuapkan dengan dengan *rotary evaporator* hingga volume 80 mL dan diekstraksi dengan NaHCO_3 20% untuk memisahkan asam fenolat dengan senyawa fenol lainnya. Lapisan air diasamkan dengan H_2SO_4 10% lalu diekstraksi dengan eter sebanyak empat kali. Fraksi eter selanjutnya diuapkan sampai kering. Residu dilarutkan dalam 1 mL metanol dan selanjutnya disebut fraksi HA [8].

b. Hidrolisis Basa

Sebanyak 75 mL ekstrak etanol-air dicampur dengan NaOH 1 N pada suhu kamar dan ruang gelap selama 24 jam. Hasil hidrolisis dilakukan penambahan H_2SO_4 10% kemudian diekstraksi dengan 75 mL eter untuk memisahkan asam fenolat dengan senyawa lain sebanyak empat kali. Fraksi eter selanjutnya diuapkan dengan *rotary evaporator* hingga volume 80 mL dan diekstraksi dengan NaHCO_3 20% untuk memisahkan asam fenolat dengan senyawa fenol lainnya. Lapisan air diasamkan dengan H_2SO_4 10% lalu diekstraksi dengan eter sebanyak empat kali. Fraksi eter selanjutnya diuapkan sampai kering. Residu dilarutkan dalam 1 mL metanol dan selanjutnya disebut fraksi HB [8].

c. Tanpa Hidrolisis

Sebanyak 75 mL ekstrak etanol-air diasamkan dengan H_2SO_4 10% kemudian diekstraksi dengan 75 mL eter untuk memisahkan asam fenolat dengan senyawa lain sebanyak empat kali. Fraksi eter selanjutnya diuapkan dengan *rotary evaporator* hingga volume 80 mL dan diekstraksi dengan NaHCO_3 20%

untuk memisahkan asam fenolat dengan senyawa fenol lainnya. Lapisan air diasamkan dengan H_2SO_4 10% lalu diekstraksi dengan eter sebanyak empat kali. Fraksi eter selanjutnya diuapkan sampai kering. Residu dilarutkan dalam 1 mL metanol dan selanjutnya disebut fraksi TH [8].

6. Pemisahan Asam Fenolat

Pemisahan asam fenolat dilakukan terhadap fraksi HB, HA, dan TH menggunakan kromatografi lapis tipis (KLT) dengan plat silika gel GF254 dan eluen campuran dengan perbandingan tertentu. Noda yang terbentuk pada KLT disemprot dengan pereaksi FeCl_3 . Noda yang diperoleh selanjutnya dibandingkan dengan standar asam galat, asam kafeat, asam ferulat dan asam pirogalol. Noda yang memiliki R_f sejajar dengan senyawa pembanding diidentifikasi dengan TLC *Scanner* dan dilakukan pemisahan dengan KLT Preparatif dengan eluen yang telah ditentukan untuk memperoleh isolat asam fenolat. Pada KLT preparative diperoleh pita-pita isolat. Kemudian pita-pita isolat yang terjerap di plat silika dikeruk dan dilarutkan kembali dengan pelarut fraksi HA, HB, dan TH dan disaring untuk memisahkan isolat dari silika gel. Kemudian pelarut diuapkan untuk mendapatkan isolat.

7. Identifikasi Asam Fenolat Menggunakan TLC Scanner

Identifikasi dilakukan menggunakan TLC *Scanner* terhadap fraksi HB, HA, TH dan asam ferulat standar yang dibuat variasi konsentrasi 50, 100, 250, 500, 1000 ppm dalam metanol. Selanjutnya masing-masing

5 µL senyawa standar dengan variasi konsentrasi, fraksi HB, HA dan TH dianalisis dan diukur luas areanya menggunakan TLC *Scanner* untuk menentukan kadar senyawa yang terkandung dalam setiap fraksi.

8. Uji Aktivitas Antioksidan Dengan Metode DPPH

Pengujian aktivitas antioksidan dilakukan terhadap isolat asam ferulat dari fraksi HB, HA dan TH dengan metode DPPH menggunakan KLT. Isolat asam ferulat ditotolkan pada plat KLT kemudian dielusi menggunakan eluen yang cocok. Setelah itu lempeng dikeringkan dan disemprot dengan larutan DPPH 0,5 mM. Isolat yang aktif sebagai antioksidan akan menghasilkan perubahan warna dari ungu menjadi kuning dalam jangka waktu tertentu.

HASIL DAN PEMBAHASAN

1. Preparasi Sampel dan Uji Skrining

Sampel daun mindi 3 kg didapatkan serbuk daun mindi sebanyak 1,180 kg. Pada uji skrining didapatkan bahwa serbuk daun mindi mengandung senyawa alkaloid flavonoid, steroid, tannin, saponin dan fenolik

2. Pembuatan Ekstrak Etanol Air

Ekstrak etanol-air dibuat dengan mengekstraksi daun mindi terlebih dahulu melalui metode maserasi. Serbuk daun mindi dimaserasi dengan pelarut etanol 96 %terlebih dahulu untuk melarutkan seluruh senyawa yang terkandung dalam daun mindi. Pemilihan pelarut etanol karena etanol merupakan pelarut universal sehingga semua senyawa organik dalam daun akan

terambil [9]. Filtrat maserasi diuapkan dengan rotary evaporator.

Ekstrak etanol dihilangkan klorofilnya dengan penambahan akuades (1:1). Tahap ini perlu dilakukan dengan harapan agar tidak mengganggu tahapan proses isolasi lanjutan. Filtrat hasil penyaringan dari proses ini merupakan ekstrak etanol air yang diperoleh sebesar 132,85 gram atau sekitar 225 mL. Ekstrak etanol air kemudian dipartisi dengan n-heksana untuk menghilangkan senyawa-senyawa yang bersifat non polar.

3. Penapisan Fitokimia

Uji pendahuluan menggunakan penapisan fitokimia dilakukan sebagai langkah awal untuk memperoleh gambaran mengenai golongan yang terkandung dalam sampel. Penapisan fitokimia dilakukan terhadap serbuk daun mindi. Hasil penapisan fitokimia dapat dilihat pada tabel 1.

Tabel 1. Hasil uji penapisan fitokimia serbuk daun mindi (*Melia azedarach* L.)

Uji	Hasil
Alkaloid	+
Flavanoid	+
Triterpenoid	-
Steroid	+
Saponin	+
Tanin	+
Fenolik	+

4. Isolasi Senyawa Asam Fenolat

Ekstrak etanol-air diisolasi dalam tiga macam isolasi, yaitu hidrolisis basa (HB), hidrolisis asam (HA), dan tanpa hidrolisis (TH). Untuk mengambil asam fenolat dari bentuk ester dilakukan dengan hidrolisis basa. Pada tahap ini digunakan NaOH 1N untuk mengambil asam fenolat dari bentuk

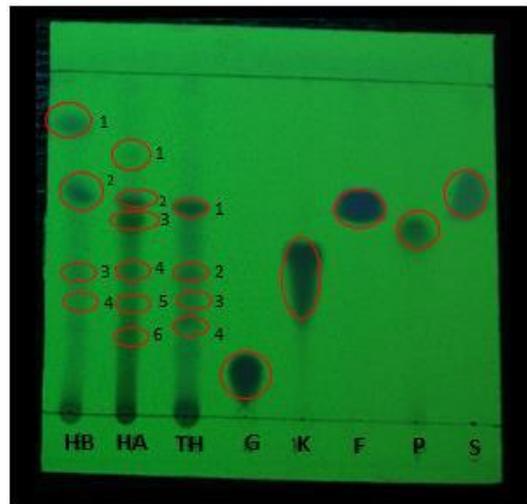
ester Karena gugus ester akan mengalami hidrolisis dengan NaOH dan air.

Untuk membebaskan asam fenolat dari bentuk glikosida dilakukan hidrolisis asam. Pada tahap ini digunakan H₂SO₄ 2N untuk mengambil asam fenolat dari bentuk glikosida. Isolasi asam fenolat dalam bentuk tanpa hidrolisis bertujuan untuk mengambil asam fenolat bebas. Fraksi HB, HA, dan TH hasil hidrolisis masing-masing sebesar 1,05 gram, 1,26 gram dan 1,38 gram. Dari ketiga fraksi tersebut (HB, HA dan TH) dilarutkan dalam metanol. Selanjutnya dari ketiga fraksi tersebut, dilakukan pemisahan isolat menggunakan KLT.

5. Pemisahan Asam Fenolat

Pemisahan asam fenolat dilakukan dengan menggunakan KLT dengan fase diam silika gel GF254 3x8 cm dan eluen campuran kloroform:etil asetat:asam asetat (50:50:3) sebagai fase gerak. Pada tahap ini fraksi HB menghasilkan 4 noda, fraksi HA menghasilkan 6 noda, dan fraksi TH menghasilkan 4 noda. Pada ketiga fraksi mempunyai satu noda yang sejajar dan memiliki kemiripan R_f, sehingga dapat disimpulkan bahwa dalam ketiga fraksi tersebut diduga mengandung senyawa yang sama.

Identifikasi selanjutnya dengan membandingkan sampel dan asam fenolat standar (asam ferulat, asam pirogalol, asam galat, asam kafeat dan asam salisilat). Hasil yang diperoleh dari ketiga fraksi tersaji pada Gambar 2. menunjukkan bahwa noda dengan R_f yang sejajar sebelumnya, memiliki kemiripan R_f dengan asam fenolat standar yaitu asam ferulat dengan R_f = 0,62.



Gambar 2. Hasil KLT pada fraksi HB, HA, TH, dan senyawa standar dengan eluen campuran

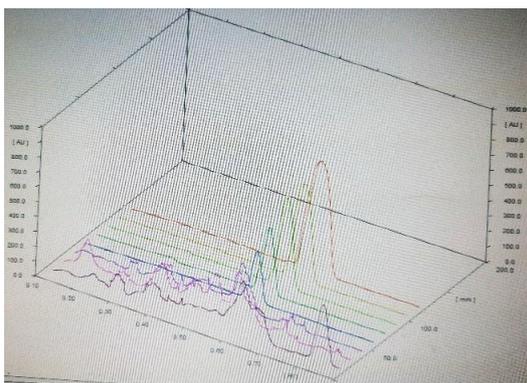
Keterangan :

- G : asam galat pembanding
- K : asam kafeat pembanding
- F : asam ferulat pembanding
- P : asam pirogalol pembanding
- S : asam salisilat pembanding
- HB : fraksi hidrolisis basa
- TH : fraksi tanpa hidrolisis
- HA : fraksi hidrolisis asam

Fraksi HB, TH, dan HA selanjutnya dilakukan pemisahan menggunakan KLT preparatif sehingga diperoleh isolat asam ferulat.

6. Identifikasi Asam fenolat dengan TLC Scanner

Identifikasi asam fenolat dilakukan menggunakan TLC Scanner pada panjang gelombang 254 nm. Dari data TLC Scanner menghasilkan harga R_f dan luas area dari sampel dan asam ferulat standar yang telah di KLT campuran eluen kloroform: etil asetat: asam asetat (50:50:3). Peak hasil analisis TLC Scanner antara harga R_f dan luas area dari sampel dan asam ferulat standar ditunjukkan pada Gambar 3.



Gambar 3. Peak hasil analisis TLC Scanner

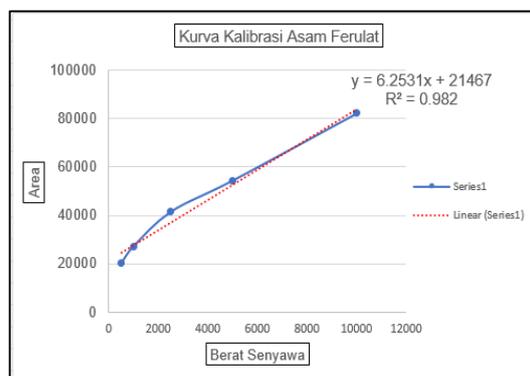
Harga Rf sampel dibandingkan dengan Rf asam ferulat standar yang ditunjukkan dalam tabel 2.

Tabel 2. Hasil Analisis TLC Scanner

No	Nama Senyawa	Rt
1	F50	0,53
2	F100	0,53
3	F250	0,54
4	F500	0,55
5	F1000	0,56
6	HB	0,57
7	HA	0,56
8	TH	0,53

Pada hasil tersebut dapat disimpulkan bahwa Rf asam ferulat standar memiliki kemiripan dengan salah satu Rf dari masing-masing fraksi tersebut yaitu 0,56 sehingga dapat disimpulkan bahwa ketiga fraksi tersebut diduga mengandung asam ferulat. TLC Scanner juga dapat digunakan untuk analisis kuantitatif dengan bantuan persamaan linier kurva kalibrasi standar yang diperoleh dari korelasi berat senyawa dan area senyawa standar (asam ferulat) yang dapat dilihat pada Gambar 4. Dari persamaan $y = 6.2531x + 21467$ dapat digunakan untuk menentukan kadar

senyawa asam ferulat pada ketiga fraksi dan didapatkan masing-masing fraksi HB 15,57%; fraksi HA 12,17 %; dan fraksi TH 9,56 %. Dapat disimpulkan bahwa asam ferulat fraksi HB memiliki kadar asam ferulat terbesar.



Gambar 4. Grafik Kurva Kalibrasi Asam Ferulat

7. Uji Aktivitas Antioksidan Dengan Metode DPPH

Hasil aktivitas antioksidan isolat asam ferulat dari fraksi HB, HA dan TH yang dilakukan menggunakan KLT dengan eluen campuran kloroform : etil asetat : asam asetat (50:50:3) menunjukkan perubahan warna dari violet menjadi kuning pada noda. Hasil dari uji aktivitas antioksidan dengan metode DPPH menunjukkan bahwa isolat asam ferulat yang terkandung pada tiga fraksi tersebut aktif meredam radikal DPPH.

KESIMPULAN

Dari hasil analisis KLT dan TLC Scanner terhadap fraksi HB, fraksi HA dan fraksi TH diduga mengandung senyawa asam ferulat. Kadar asam ferulat didapatkan dari ketiga fraksi tersebut yaitu fraksi HB 15,57 %, fraksi HA 12,17 %, dan fraksi TH 9,56 %. Hasil dari uji aktivitas antioksidan

secara kualitatif menunjukkan bahwa isolat asam ferulat yang terkandung pada tiga fraksi tersebut aktif meredam radikal DPPH.

UCAPAN TERIMA KASIH

Atas selesainya penelitian ini ucapan terima kasih disampaikan kepada Dosen-dosen Departemen Kimia FSM Universitas Diponegoro khususnya Bidang Kimia Organik atas bimbingan dan arahan selama penelitian ini berlangsung, serta teman-teman riset Laboratorium Organik atas semangat dan dukungan sehingga penelitian ini dapat terlaksana dengan lancar.

DAFTAR RUJUKAN

- [1] Sharma, D. a. Y. P., "Preliminary and Pharmacological Profile of Melia azedarach L.: An Overview", *Journal of Applied Pharmaceutical Science*, Vol. 3, No. 12, pp. 133-138, 2013.
- [2] Azam, M. M., et al., "Pharmacological Potentials of Melia azedarach L. A review", *American Journal of BioScience*, Vol. 1, pp. 44-49, 2013.
- [3] Asadujjaman, et al., "Assessment of Bioactivities of Ethanolic Extract of Melia azedarach (Meliaceae) Leaves", *Journal of Coastal Life Medicine*, Vo. 1, pp. 118-122, 2013.
- [4] Mishra, G. et al., "Melia azedarach: A Review", *Medicinal Chemistry & Analysis*, Vol. 3, No. 2, pp. 53-56, 2013.
- [5] Ahmed, M. F., et al., 2012, "Phytochemical Studies and Antioxidant Activity of Melia azedarach Linn Leaves By DPPH Scavenging Assay", *Journal of Pharmaceutical Applications*, Vol. 3, No. 1, pp. 271-276, 2012.
- [6] Akacha M., et al., "Phytochemically Evaluation and Net Anti-oxidant Activity of Tunisian Melia azedarach Leaves Extract from their ProAntidex Parameter", *Bangladesh J Pharmacol*, Vol. 11, pp. 301-307, 2016.
- [7] Graft Ernst, "Antioxidant Potential of Ferulic Acid. Free Radical Biology and Medicine", Vol. 13, No. 4, pp. 435-448, 1992.
- [8] Zadernowski, R., et al., "Phenolic Acids of Borage (*Borago officinalis* L.) and Evening Primrose (*Oenothera biennis* L.)", Paper No. J10057 in *Journal AOCS* 79, Vol. 7, No. 4, pp. 335-338, 2002.
- [9] Harborne, J.B., "Phytochemical Methods, A Guide to Modern Technique of Plant Analysis 3th", Chapman & Hall, pp. 13-14, 1987.