

SUPLEMEN EKSTRAK DAUN SIRIH, *Piper betle*, Lin DALAM MENURUNKAN KADAR MALONDIALDEHID PADA TIKUS WISTAR

I W. Suirta* , I. A. R. A. Asih

*Progam Studi Kimia Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam Universitas Udayana
Kampus Bukit Jimbaran, Jimbaran, Bali, Indonesia*

*e-mail: wayansuirta@unud.ac.id

ABSTRAK

Suplemen ekstrak daun sirih, *Piper betle*, Lin dibuat dengan cara ekstraksi maserasi daun sirih dengan etanol 96%. Hasil uji fitokimia pada ekstrak daun sirih menunjukkan adanya senyawa metabolit sekunder seperti : terpenoid, steroid, fenolik dan saponin. Hasil uji aktivitas antioksidan menunjukkan bahwa fraksi n heksana lebih aktif sebagai antioksidan (IC_{50} 26,73 mg/L) dibanding fraksi dietil eter (IC_{50} 114,54 mg/L). Hasil analisis kadar MDA menunjukkan daun sirih mempunyai kemampuan yang sangat baik dalam menurunkan kadar MDA. Kadar MDA dengan penambahan allopurinol (sebagai control positif) adalah $0,41 \pm 0,0021 \mu\text{L/mL}$, sementara dengan penambahan daun sirih $0,44 \pm 0,0021 \mu\text{L/mL}$. Dari hasil identifikasi struktur didapatkan senyawa aktif antioksidan seperti: kavikol, eugenol, kariofilena dan isoeugenol.

Kata kunci : daun sirih, malondialdehid, *Piper betle*, tikus wistar

ABSTRACT

Betel leaf extract supplements, *Piper betle* Lin , was made by extracting maceration of betel leaves with ethanol 96%. Phytochemical screening of betle leaf extract obtained secondary metabolites such as : terpenoids, steroids, phenolics, and saponins . The results of the antioxidant activity test test showed that n-hexane fraction was more reactive as an antioxidant (IC_{50} 26,73 mg/L) than the diethyl ether fraction (IC_{50} 114,54 mg/L). The MDA analysis showed that the betel leaves have a very good ability to reduce MDA levels. The concentration of MDA with addition of allopurinol (as positive control) was $0,41 \pm 0,0021 \mu\text{L/mL}$, while with addition of betel leaves the level was $0,44 \pm 0,0021 \mu\text{L/mL}$. The structure identification obtained active antioxidant compounds such as: cavicol, eugenol, caryophyllene and isoeugenol.

Keywords : betel leaf, malondialdehyde, *Piper betle*, wistar rat

PENDAHULUAN

Keadaan stress oksidatif biasanya terjadi bila jumlah radikal bebas lebih tinggi dibandingkan jumlah antioksidan dalam tubuh. Stress oksidatif tubuh dapat ditentukan dengan mengukur salah satu parameternya, yaitu kadar malondialdehid (MDA) dalam plasma. Semakin tinggi kadar MDA plasma maka semakin tinggi stress oksidatif yang terjadi dalam sel-sel tubuh. Konsentrasi MDA dalam material biologi telah digunakan secara luas sebagai indicator kerusakan oksidatif pada lemak tak jenuh sekaligus merupakan indikator keberadaan radikal bebas .(Aliahmat N.S., et al, 2012). Tingginya kadar radikal bebas dalam tubuh dapat ditunjukkan oleh rendahnya aktivitas enzim antioksidan dan tingginya kadar malondialdehid (MDA). Malondialdehid merupakan senyawa aldehid hasil peroksidasi lipid yang biasanya digunakan sebagai biomarker biologis peroksidasi lipid dan

menggambarkan derajat stress oksidatif. (Winarsih H, 2007).

Daun sirih mempunyai prospek dalam industry masa depan seperti untuk pelembab kulit, pasta gigi, *paan masala*, parfum, penyegar ruangan, deodorant, sabun, cream wajah, cream antiseptic, lotion, minuman dingin, chocolate, incense sticks, karminatif, agen digestif, tonik dan obat. Daun sirih secara tradisional telah dimanfaatkan sebagai obat berbagai penyakit seperti : susah bernapas, bengkak dan bisul, konjungtivitis, konstipasi, sakit kepala, reumatik, luka atau patah tulang (Guha P., 2006.). Daun sirih juga mengandung banyak vitamin dan mineral, juga ada enzim seperti enzim diastase dan katalase dan juga ada beberapa asam amino esensial seperti: lisin, histidin dan arginin. Daun sirih juga sering digunakan sebagai antiseptic dan stimulant. Ekstrak air daun sirih sering digunakan sebagai obat inflamasi, obat batuk dan masalah dalam system pencernaan. Sirih

berkhasiat menghilangkan bau badan yang ditimbulkan bakteri dan cendawan. Daun sirih juga bersifat menahan perdarahan, menyembuhkan luka, dan gangguan saluran pencernaan, meluruhkan dahak dan hemeostatik. Minyak atsiri pada daun sirih sebagai obat antibakteri, antiprotozoa, dan antifugal. Selain itu minyaknya dapat membunuh atau menghambat pertumbuhan bakteri typhoid, kolera, tuberkulosis. (Peter K.V. Ed).

Srinivasan et al. (2015) telah mengidentifikasi 5 isolat aktif di dalam ekstrak etanol daun sirih. Hasil identifikasi dengan HPLC didapatkan senyawa seperti : asam kafeat, asam p-kumarat, rutin, eugenol dan hidroksikavikol. Hidroksi kavikol merupakan senyawa fenolik komponen mayor yang ditemukan dalam ekstrak daun sirih. Adanya gugus fenol ini menyebabkan hidroksi kavikol mempunyai aktivitas yang baik sebagai antioksidan. Amonkar A.J., et al., (1986) telah meneliti bahwa senyawa hidroksi kavikol yang terdapat pada daun sirih dapat digunakan sebagai antimutagenik yang diuji pada *Salmonella typhimurium* strains TA98.

Pin KY., et al, (2010), telah meneliti aktifitas antioksidan dan antiinflamasi pada ekstrak daun sirih piper betle dengan variasi pelarut yang berbeda polaritas seperti air, etanol, etil asetat dan heksana. Hasil uji menunjukkan semua ekstrak aktif sebagai antioksidan dan antiinflamasi dan fraksi air merupakan yang paling aktif. Pradhan et al.,(2013), meneliti bahwa didalam daun sirih terkandung beberapa senyawa seperti : moisture (85,4%), protein (3,1%), lemak (0,8%), karbohidrat (6,1%), serat (2,3%), mineral (2,3%), gula reduksi (0,38 – 1,46%), semua vitamin dan juga iodine. Aliahmat N.S., et al., 2012, telah meneliti aktivitas enzim antioksidan dan kadar malondialdehid pada tikus wistar yang diberi ekstrak daun sirih, fraksi yang kaya tokotrienol dan klorella vulgaris.

Berdasarkan latar belakang diatas maka rumusan masalah penelitian adalah: Senyawa apa yang diperoleh dari hasil pemurnian fraksi ekstrak daun sirih sebagai senyawa antioksidan. Apakah ekstrak daun sirih dapat menurunkan kadar malondialdehid pada tikus yang mengalami stress.

MATERI DAN METODE

Bahan penelitian

Bahan penelitian yang digunakan adalah daun sirih yang diambil di Desa Wongaya Gede, Tabanan, Bali. Hewan uji yang digunakan adalah tikus jantan wistar dengan berat 150-250 gram. Bahan kimia yang digunakan dalam ekstraksi dan kromatografi : n heksana, aseton, dietil eter, etil asetat, n butanol, methanol , etanol. Bahan kimia yang digunakan analisis MDA adalah : larutan asam trikloroasetat (TCA) 20 % ; larutan asam tiobarbiturat (TBA) 0,67% dan larutan standar tetraetoksipropan (TEP)

Alat penelitian.

Alat untuk pengambilan darah : spuit, jarum suntik, kapas , alkohol, tabung EDTA 5 ml. Alat untuk analisis radikal bebas dengan analisis lemak peroksida (MDA) adalah : tabung reaksi ukuran 5 ml, labu ukur, gelas piala, pipet mikro, sentrifuge, vorteks, penangas air , seperangkat alat untuk ekstraksi, seperangkat alat kromatografi lapis tipis, kromatografi kolom, Spektrofotometer UV-Vis dan GCMS.

Prosedur Kerja

Ekstraksi daun sirih dengan cara maserasi

Daun sirih dipotong menjadi bagian yang kecil-kecil, kemudian dikeringkan di udara terbuka pada suhu kamar (28 – 30°C). Setelah kering daun sirih dibelender dan diayak sehingga didapatkan daun sirih berbentuk serbuk. Serbuk daun sirih kemudian diekstraksi dengan cara maserasi menggunakan pelarut etanol selama 1 hari. Ekstrak hasil maserasi kemudian diuapkan pelarutnya dengan rotary vacuum evaporator sehingga didapatkan ekstrak kental etanol.

Pemisahan dan pemurnian ekstrak daun sirih

Ekstrak kental etanol kemudian dipisahkan dengan cara kromatografi kolom elusi gradient dengan menggunakan berbagai eluen seperti : n-heksana, dietil eter, dan metanol. Ekstrak yang diperoleh kemudian diuapkan pelarutnya dengan *rotary vacuum evaporator*. Hasil pemisahan kromatografi kolom dilakukan untuk uji kadar malondialdehid dan analisis senyawa aktif antioksidan.

Menentukan kadar malondialdehid

Perlakuan terhadap hewan uji

Penelitian dilakukan dengan menggunakan 20 tikus wistar, dibagi menjadi 4 kelompok, tiap kelompok terdiri dari 5 tikus (n=5). Kelompok 1(K1) : tikus diberi makanan standar/pellet (50 g/ kg bb/ hari) . Kelompok 2 (K2) / control negatif : tikus diberi makanan standar/pellet (50 g/ kg bb/ hari) ditambah potassium oksonat (750 mg/kg bb/ hari). Kelompok 3 (K3)/control positif: tikus diberi makanan standar/pellet (50 g/ kg bb/ hari) ditambah potassium oksonat (750 mg/kg bb/ hari) ditambah allopurinol (5,0 mg/ kg bb/ hari). Kelompok 4 (KP) : tikus diberi makanan standar/pellet (50 g/ kg bb/ hari) ditambah potassium oksonat (750 mg/kg bb/ hari) ditambah ekstrak daun sirih (300 mg/ kg bb/ hari).

Prosedur Analisis MDA Plasma

Plasma darah diambil sebanyak 1 ml, dimasukkan ke dalam tabung reaksi dan ditambahkan 1 ml TCA 20% dingin, kemudian divorteks dan disentrifuge dengan kecepatan 3000 rpm selama 10 menit. Supernatant diambil, dimasukkan ke dalam tabung reaksi lain yang sudah berisi 2 ml TBA 0,67%, kemudian dimasukkan ke dalam penangas air dengan suhu 95-100⁰C selama 10 menit. Setelah itu tabung reaksi dikeluarkan dan didinginkan dalam bejana berisi air es. Hasil reaksi diambil sebanyak 1 ml dimasukkan dalam kuvet dan dibaca serapannya pada pajang gelombang 532 nm pada alat spektrofotometer UV-Vis. Hasilnya dihitung dengan membandingkan absorbansi dengan kurva standar memakai tetraetoksipropan, menggunakan persamaan $Y = aX + b$.

Identifikasi senyawa aktif antioksidan

Hasil pemisahan kromatografi kolom kemudian diidentifikasi senyawanya dengan alat spektrofotometer GCMS

HASIL DAN PEMBAHASAN

Ekstraksi Daun Sirih dengan Cara Maserasi

Sebanyak 500 g daun sirih kering yang telah digiling berbentuk serbuk diekstraksi dengan cara maserasi menggunakan pelarut

etanol 96% sebanyak 2 L. Maserasi dilakukan ulangan 3 kali dengan pelarut yang sama. Ekstrak kental yang didapat berwarna hijau dengan berat 30,5 g. Ekstrak yang diperoleh kemudian dilakukan uji fitokimia dan dimurnikan dengan cara kromatografi kolom elusi gradient.

Uji Fitokimia Ekstrak Daun Sirih.

Hasil uji fitokimia dari ekstrak daun sirih menunjukkan adanya senyawa terpenoid, steroid, fenolik dan saponin. Data tertera pada Tabel 1.

Tabel 1. Hasil uji fitokimia ekstrak daun sirih

No	Gol Senyawa	Pereaksi	Hasil
1	Alkaloid	Meyer	-
2	Terpenoid	Liebermen	+(ungu)
3	Steroid	Burchard	+(biru)
4	Flavonoid	Liebermen	-
5	Fenolik	Burchard	+(biru)
6	Saponin	Mg/HCl FeCl ₃ Akuades/HCl	+(busa)

Pemurnian Ekstrak Daun Sirih dengan Kromatografi Kolom Elusi Gradient dan Uji Aktivitas Antioksidan.

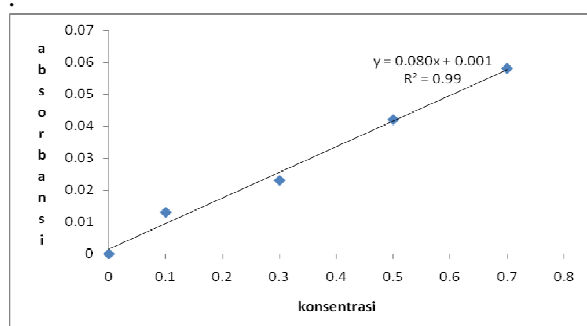
Ekstrak daun sirih dimurnikan dengan cara kromatografi kolom elusi gradient. Fase diam dalam kolom menggunakan silica gel G 200-300 mesh. Elusi gradient menggunakan eluen n-heksana, dietil eter dan methanol. Fraksi hasil kolom kemudian diuji aktifitas antioksidan dengan menggunakan kromatografi lapis tipis dengan penampak noda larutan 0,4 mM DPPH dalam pelarut metanol. Hasil uji menunjukkan fraksi n-heksana dan fraksi dietil eter positif sebagai antioksidan dengan terbentuknya noda warna kuning latar belakang jingga, sedangkan fraksi methanol negative sebagai antioksidan. Fraksi yang positif sebagai antioksidan kemudian diuji aktifitas antioksidannya dengan alat spektrofotometri UV-Vis menggunakan DPPH sebagai radikal scavenger. Fraksi n heksana lebih aktif sebagai antioksidan (IC₅₀ 26,73 mg/L) dibanding fraksi dietil eter (IC₅₀ 114,54 mg/L)

Penetapan Kadar MDA

Analisis kadar MDA dengan menggunakan spektrofotometer UV-Vis. Metode ini banyak digunakan dalam mengukur keberadaan radikal bebas dan peroksidasi lipid. Metode ini didasarkan pada reaksi antara kompleks MDA dengan TBA dalam suasana asam membentuk kompleks MDA-TBA yang berwarna merah jambu yang kemudian diukur intensitasnya dengan spektrofotometer pada panjang gelombang 532 nm. Senyawa 1,1,3,3-tetraetoksipropana (TEP) digunakan dalam pembuatan kurva standar karena TEP dapat dioksidasi dalam suasana asam menjadi senyawa aldehid yang dapat bereaksi dengan TBA. Kurva standar dari senyawa TEP dibuat pada variasi konsentrasi seperti pada Tabel 2.

Tabel 2. Kurva standar senyawa TEP

Konsentrasi TEP(μL/mL)	Absorbansi	Persamaan regresi
0,1	0,013	Y=0,080x+0,001
0,3	0,023	R ² = 0,99
0,5	0,042	
0,7	0,058	



Gambar 1. Kurva standar senyawa TEP Kadar MDA pada tikus coba setelah perlakuan pemberian ekstrak daun sirih fraksi n-heksana seperti pada Tabel 3.

Tabel 3. Kadar MDA tikus coba

Perlakuan	Absorbansi	konsentrasi MDA μL/mL
K1(tanpa perlakuan)	0,041; 0,042; 0,044; 0,043; 0,042	0,52 ± 0,001
K2(PO)	0,065; 0,067; 0,064; 0,067; 0,066	0,81 ± 0,0012
K3(PO+All)	0,031; 0,033; 0,035; 0,037; 0,033	0,41 ± 0,0021
K4(PO+ Sirih)	0,032; 0,035; 0,038; 0,037; 0,038	0,44 ± 0,0021

Senyawa potassium oksonat (PO) dapat meningkatkan kandungan MDA di dalam darah akibat peningkatan pembentukan ROS oleh reaksi oksidasi enzimatik dengan enzim NADH/NADPH oksidase, xantin oksidase dan endothelial NO sintase. Allopurinol (All) adalah enzim inhibitor dari xantin oksidase sehingga dapat menghambat pembentukan ROS dan menurunkan MDA. Pemberian ekstrak daun sirih secara signifikan dapat menurunkan kadar MDA. Daun sirih mengandung senyawa turunan fenol yang dapat berfungsi sebagai enzim penghambat xantin oksidase.

Analisis Senyawa Aktif Daun Sirih dengan Spektrofotometer GCMS

Hasil analisis kromatografi gas ekstrak daun sirih fraksi n-heksana terdapat beberapa puncak dengan kelimpahan relative yang cukup tinggi. Setelah dianalisis dengan spektroskopi massa dapat diidentifikasi beberapa senyawa. Hasil identifikasi menunjukkan terdapat beberapa senyawa dari golongan senyawa alkana dengan kelimpahan yang relative kecil seperti: dietoksi etana, pentadekana, heptadekana, oktadekana, nonadekana, dan beberapa merupakan derivate alkana. Terdapat juga beberapa golongan dari asam karboksilat seperti : asam dekanat, asam tetradekanat, asam heptadekanat, asam oktadekanat, asam dodekanat. Hasil analisis spektroskopi massa juga dapat menganalisis beberapa senyawa yang berperan aktif sebagai senyawa antioksidan seperti pada Tabel 4. Komponen yang banyak terkandung seperti : Kavikol (1.59%), Senyawa eugenol dan derivatnya (3.98%).

Tabel 4. Senyawa aktif antioksidan pada ekstrak n-heksana daun sirih.

No	Waktu retensi	% area	Senyawa
1	17.903	1.59	Cavicol
2	21.328	3.44	Eugenol
3	24.780	0.18	Kariofilena
4	25.338	0.36	Isoeugenol

KESIMPULAN

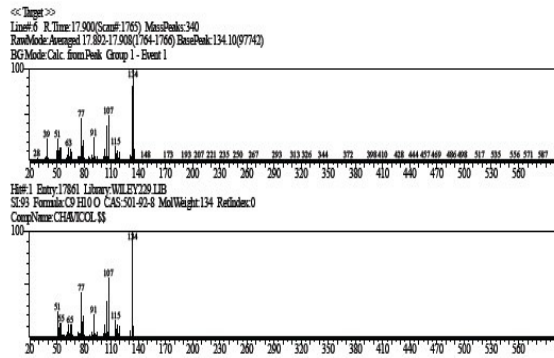
Kesimpulan yang didapat pada penelitian ini adalah, ekstrak daun sirih aktif dalam menurunkan kadar malondialdehid dan senyawa aktif yang teranalisis adalah: kavikol, eugenol, isoeugenol dan kariofilen.

UCAPAN TERIMAKASIH

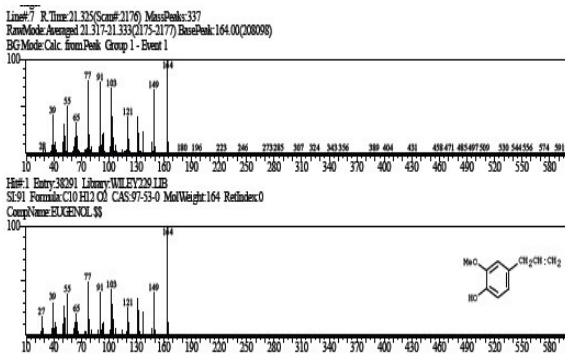
Terimakasih penulis sampaikan kepada : teman-teman sejawat di Jurusan Kimia Universitas Udayana atas kerjasama dan sarannya, DIPA BLU Universitas Udayana atas dana yang telah diberikan.

DAFTAR PUSTAKA

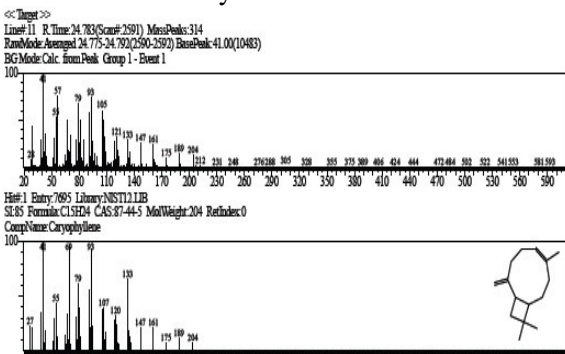
- Aliahmat N.S., Razman M.N., Wan Junisam W.Y., Suzanah M, Wan Zurinah W.N., Yasmin A.M.N. 2012. Antioxidant enzyme activity and malondialdehyde levels can be modulated by *Piper betle*, tocotrienol rich fraction and chlorella vulgaris in aging C57Bl/6 mice. *Clinic (Sao Paulo)*, 67(12): 1447-1454.
- Amonkar A.J., Nagabhushan M., Souza A. V. D., Bhide, S. V. 1986. Hydroxychavicol: A New Phenolic Antimutagen from Betel Leaf. *Food and Chemical Toxicology*, 24(12):1321 – 1324.
- Guha P. 2006. Betel Leaf: The Neglected Green Gold of India. *J. Hum. Ecol.*, 19(2): 87 – 93.
- Baser, K. H. C., Buchbauer, G. 2015. *Handbook of Essential Oils, Science, Technology and Applications*. CRC Press ISBN 9781466590465.
- Peter K. V., Edited, Woodhead Publishing in Food Science and Technology. *Handbook of Herb and Spices*, 2.
- Pin K. Y., Chuah A. L., Rashih A. A., Mazura M. P., Fadzureena J., Vimala S., Rasadah M. A. 2010. Antioxidant and Anti-inflammatory Activities of Extracts of Betel Leaves (*Piper Betle*) from Solvents with Different Polarities, *Journal of Tropical Forest Science*, 22(4): 448 – 455.
- Preethy T. T., Aswathi K. K., Renisha, J. M., and Asha V. P. 2016. Betel Vine Leaves – A Green Treasure House of Useful Chemical. *International Journal of Recent Scientific Research*, Vol 7(3): 9216 – 9221.



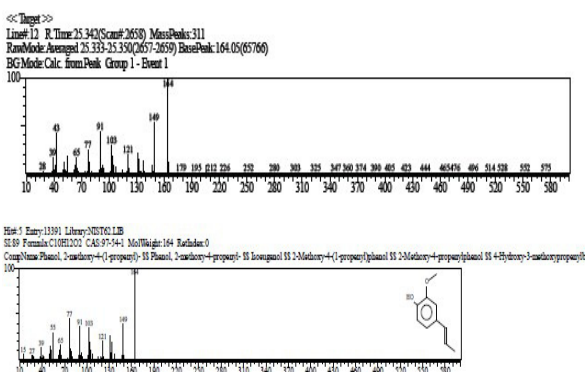
Gambar 2. Senyawa kavikol dan data base Willey 229 LIB



Gambar 3. Senyawa eugenol dan data base Willey 229 LIB



Gambar 4. Senyawa kariofilena, data base Willey 229 LIB



Gambar 5. Senyawa isoeugenol, data base Willey 229 LIB

Pradhan D., Suri K. A., Pradhan D. K., Biswasroy P. 2013. Golden Heart of the Nature: Piper betle L. *Journal of Pharmacognosy and Phytochemistry*, 1(6); 147-167.

Srinivasan S., Sbramanian I. P., Sorimuthu P. S. 2015. Isolation and Characterization

of Major Phytochemicals from The Leaves of Piper Betle, linn. *International Journal of Pharmacy*, 5(4): 1215-1233.

Winarsih H. 2007. *Antioksidan alami dan radikal bebas*. Penerbit Kanisius, ISBN 979-979-21-1612-0, cetakan ke-5.