



ISOLATION OF ANTIOXIDANT COMPOUNDS OF METHANOL EXTRACT OF NUTMEG LEAVES (*Myristica fragrans* Houtt)

Nurmilasari, Binawati Ginting*, Hira Helwati

Jurusan Kimia, Fakultas MIPA, Universitas Syiah Kuala, Banda Aceh, 23111, Indonesia

*Email: binawati@chem.unsyiah.ac.id

Abstract. The antioxidant activity from methanol extract of nutmeg leaves (*Myristica fragrans* Houtt) was performed using 2,2-diphenyl-1-picrylhydrazil (DPPH). Antioxidant assay using DPPH of the methanol extract at a concentration of 25 ppm, 50 ppm and 100 ppm, showed high antioxidant activity with $IC_{50} = 36.31$ ppm and Vitamin C showed antioxidant activity with $IC_{50} = 3.657$ ppm. The methanol extract of nutmeg leaves were partitioned with chloroform to obtain chloroform extract of the leaves with $IC_{50} = 28.30$ ppm. Isolation of the active compounds from the chloroform extract of the nutmeg leaf using column chromatography yielded 6 mix fractions MFMD 1, MFMD 2, MFMD 3, MFMD 4, MFMD 5 and MFMD 6. The test results of antioxidant activity in very strong category is fractions MFMD 4, MFMD 3, MFMD 2, MFMD 6 and MFMD 5 with IC_{50} of each are 26.590 ppm, 27.239 ppm, 29.639 ppm, 39.766 ppm and 55.436 ppm, while antioxidant activity in a weak category is fraction MFMD 1 with IC_{50} is 126.270 ppm. This shows that the fraction of the leaf has a better inhibitory activity, because some of the active compound contained in the fraction can synergize in inhibiting free radicals, so that the IC_{50} value of the fraction is stronger than the extract.

Kata Kunci: Antioxidant, chromatography, Nutmeg (*Myristica fragrans* Houtt), methanol extract, leaves

I PENDAHULUAN

Indonesia kaya akan beragam jenis tanaman yang dapat digunakan sebagai obat-obatan. Pemanfaatan tanaman sebagai obat tradisional terus meningkat dan kebutuhan akan obat-obatan mendorong peneliti untuk mencari senyawa-senyawa kimia yang terkandung pada tanaman berkhasiat yang dapat digunakan sebagai obat alami [1]. Tanaman obat kini banyak mendapat perhatian peneliti untuk menemukan senyawa aktif yang dapat memberikan efek fisiologi tertentu. Senyawa aktif di dalam tanaman umumnya terkandung dalam bentuk metabolit sekunder diantaranya alkaloid, flavonoid, steroid, terpenoid, kumarin dan tanin. Senyawa-senyawa aktif tersebut juga dapat memberikan aktivitas biologis tertentu [2]. Pala (*Myristica fragrans* Houtt) dikenal sangat bermanfaat sebagai obat tradisional, juga sering digunakan sebagai bumbu rempah-rempah. Tanaman rempah dan obat sudah lama dikenal mengandung komponen fitokimia yang berperan penting untuk pencegahan dan pengobatan berbagai penyakit [3]. Pala merupakan tanaman asli Indonesia yang berasal dari kepulauan Banda dan Maluku [4]. Pala

dengan genus *Myristica* merupakan salah satu dari famili *Myristicaceae* yang banyak dimanfaatkan sebagai obat-obatan. Terdapat 23 jenis tanaman yang tergolong famili *Myristicaceae* yang merupakan tanaman asli Indonesia terutama dari daerah Maluku, 9 jenis di antaranya tergolong genus *Myristica* [4,5]. Di provinsi Aceh pala terbanyak dihasilkan di daerah Aceh Selatan. Bioaktivitas kandungan metabolit sekunder tanaman pala terutama bagian buah sudah banyak diteliti, seperti yang dilaporkan bahwa pada ekstrak etanol biji pala, dimana ekstrak ini menunjukkan aktivitas antikanker [6], antiinflamasi dan aktivitas penghambatan produksi NO (Nitrit Oksida) [7]. Aktivitas penghambatan NO juga ditunjukkan oleh senyawa neolignan dari ekstrak kloroform [8] dan ekstrak methanol [9], sedangkan ekstrak metanol fulli pala mengandung senyawa neolignan yang menunjukkan aktivitas antikanker [10].

Bioaktivitas bagian lain tanaman pala seperti daun, batang dan akar masih belum diteliti secara maksimal karena pemanfaatan tanaman pala masih terfokus pada buahnya saja. Beberapa penelitian tentang senyawa metabolit

sekunder pada daun pala telah dilaporkan antara lain [11], menyatakan bahwa pada minyak daun pala mengandung 20 jenis komponen senyawa dengan komposisi utama yaitu β -pinen 22,69 %, α -pinen 14,06% dan α -tujen 13,93% dan menunjukkan aktivitas antimikroba dan antikanker. Uji fitokimia ekstrak metanol daun pala juga telah dilaporkan mengandung senyawa alkaloid, flavonoid, terpenoid dan tanin, sedangkan ekstrak etil asetat mengandung senyawa flavonoid dan mempunyai aktivitas antifungi terhadap *Candida albicans* [12], kemudian juga telah dilaporkan bahwa ekstrak etil asetat daun pala mempunyai aktivitas antibakteri terhadap *Staphylococcus aureus* dan *Escherichia coli*, sedangkan ekstrak metanol daun pala tidak aktif [13].

Selain itu, khasiat tanaman pala juga digunakan untuk aktivitas antioksidan [14,15,16,17, 18,19,20, 21]. Antioksidan merupakan senyawa yang dapat menghambat kerusakan oksidatif makromolekul biologis akibat oksidasi berbagai radikal bebas atau biasa disebut *Reactive Oxygen Species* (ROS), dimana karakter utama senyawa antioksidan adalah kemampuannya untuk menangkap dan menstabilkan radikal bebas [6]. Aktivitas antioksidan daun pala telah dilaporkan oleh [14], dimana ekstrak air daun pala (*aqueous extract*) memiliki kemampuan mengikat elektron bebas (*radical scavenging activity*) lebih baik dari BHA (*butylated hydroxyanisole*), tetapi kurang aktif dibandingkan BHT (*butylated hydroxytoluene*) dan dapat digunakan sebagai aktivitas antioksidan serta mempunyai potensi sebagai antikanker. [19], juga melaporkan bahwa ekstrak metanol daun pala bersifat sebagai antioksidan dengan EC_{50} 423,1 μ g/mL.

Ginting melaporkan bahwa hasil isolasi total alkaloid ekstrak metanol daun pala mempunyai aktivitas antioksidan yang kuat dengan IC_{50} sebanyak 82,34 ppm [22]. Ginting juga melaporkan bahwa ekstrak metanol daun pala menunjukkan aktivitas antioksidan dengan nilai IC_{50} sebesar 24,60 ppm, ekstrak etil asetat memiliki nilai IC_{50} sebesar 26,17 ppm dan ekstrak *n*-heksana memiliki nilai IC_{50} yang lebih tinggi yaitu 27,67 ppm [23]. Selain itu, ditemukan juga senyawa flavonoid jenis *dihydrocaemferol* atau *3,5,7,4'-tetrahydroxy-dihydroflavonol* yang aktif sebagai antioksidan dengan IC_{50} 9,75 ppm, [15] dan juga mempunyai aktivitas antikanker dengan IC_{50} 5,3209 μ g/mL [24]. Berdasarkan uraian diatas akan dilakukan isolasi fraksi-fraksi dari ekstrak metanol daun pala yang aktif sebagai

antioksidan melalui tahapan maserasi, kromatografi lapis tipis (KLT) dan kromatografi kolom dengan matrik silika gel. Sampel daun pala diambil dari Desa Paya Peulumat, kecamatan Labuhan Haji Timur, kabupaten Aceh Selatan.

II METODOLOGI

Peralatan yang digunakan dalam penelitian ini yaitu, blender, erlenmeyer, gelas ukur, labu ukur, gelas kimia, corong pisah, timbangan analitik, tabung reaksi, rak tabung, alat maserasi, perangkat *vacuum rotary evaporator*, oven, peralatan Kromatografi Kolom Gravitasi, peralatan destilasi, pipet tetes, pipet mikro. Untuk instrument yang digunakan berupa UV visible (Model Shimadzu UV-160A). Bahan-bahan yang digunakan dalam penelitian ini adalah: *n*-heksana teknis, metanol teknis, reagen Liberman-Bourchard (asam asetat glasial- H_2SO_4 (P)), reagen Mayer (kalium tetra iodo merkurat), reagen Dragendorf ($Bi(NO_3)_3$) dan reagen Wagner (I_2 dalam KI). Bahan yang digunakan untuk uji antioksidan adalah metanol p.a, serbuk DPPH dan vitamin C.

Material Tumbuhan

Sampel yang digunakan dalam penelitian ini adalah daun pala (*Myristica fragrans* Houtt) yang belum menguning tua yang diperoleh dari Desa Paya Peulumat, kecamatan Labuhan Haji Timur, kabupaten Aceh Selatan.

Ekstraksi Daun Pala

Ekstraksi daun pala diawali dengan preparasi sampel dengan cara daun pala dikeringanginkan dan selanjutnya dihaluskan menggunakan blender sampai berupa serbuk. Selanjutnya 3 kg serbuk dimaserasi dengan metanol selama 24 jam. Maserasi residu diulang sampai diperoleh filtrat jernih. Setelah itu disaring dan diperoleh filtrat serta residu. Filtrat metanol di uapkan dengan *rotatory evaporator* sehingga didapatkan ekstrak metanol. Ekstrak metanol dipartisi dengan petroleum eter lalu dipisahkan lapisan metanol dan lapisan petroleum eter. Lapisan metanol diuapkan sehingga diperoleh ekstrak metanol pekat. Ekstrak metanol yang diperoleh dipartisi dengan *n*-heksana kemudian dipisahkan lapisan metanol dan lapisan *n*-heksana. Lapisan metanol diuapkan dan diperoleh ekstrak metanol. Ekstrak metanol kemudian diekstraksi dengan etil asetat sehingga diperoleh lapisan yang larut dan lapisan yang tidak larut. Lapisan yang tidak larut selanjutnya diuapkan kemudian ditambahkan HCl 5N dan dipartisi dengan kloroform. Setelah itu dipisahkan lapisan asam dan lapisan kloroform. Lapisan

asam ditambah NaOH 25% dan dipartisi kembali dengan kloroform kedua. Lapisan kloroform kedua diuapkan hingga diperoleh ekstrak kloroform sebanyak 3,86 g, sebagian diuji aktivitas antioksidan dan sebagian lagi untuk isolasi.

Uji Antioksidan [25]

1. Pembuatan larutan DPPH 0,4 mM
Serbuk DPPH (BM 394,32 g/mol) ditimbang sebanyak 7,9 mg, selanjutnya dilarutkan dengan metanol dalam labu takar 50 mL, ditutup kemudian dihomogenkan. Larutan disimpan dalam botol gelap dan selalu dibuat yang baru setiap akan digunakan.
2. Pembuatan variasi larutan ekstrak tanaman pala dan vitamin C
Untuk membuat variasi konsentrasi ekstrak metanol daun pala terlebih dahulu dibuat larutan induk 500 ppm yaitu dengan melarutkan masing-masing ekstrak sebanyak 5 mg ke dalam etanol sampai volume mencapai 10 mL. Selanjutnya dari larutan induk dibuat variasi konsentrasi larutan 25 ppm, 50 ppm dan 100 ppm. Variasi konsentrasi uji aktivitas antioksidan pada ekstrak ditunjukkan pada Tabel 1.

Tabel 1 Variasi konsentrasi uji aktivitas antioksidan pada ekstrak

Konsentrasi (ppm)	Larutan induk yang diambil (μ L)	Larutan DPPH (mL)	Keterangan
25	250	1	Ditambahkan metanol sampai 5 mL
50	500	1	
100	1000	1	

Tabel 2 Variasi konsentrasi uji aktivitas antioksidan pada vitamin C

Konsentrasi (ppm)	Larutan induk yang diambil (μ L)	Larutan DPPH (mL)	Keterangan
3	25	1	Ditambahkan metanol sampai 5 mL
6	50	1	
9	75	1	
12	100	1	
15	125	1	

Sebagai pembandingan dilakukan uji aktifitas antioksidan dari vitamin C, karena vitamin C merupakan senyawa yang memiliki aktifitas antioksidan yang sangat tinggi. Larutan induk vitamin C dibuat dengan melarutkan 3 mg vitamin C dilarutkan dengan metanol sampai volumenya tepat 5 mL. Selanjutnya diencerkan menjadi 3

ppm, 6 ppm, 9 ppm, 12 ppm dan 15 ppm. Selanjutnya dihomogenkan dengan vortex mixer dan diinkubasi selama 30 menit pada suhu 37°C, diukur serapannya pada panjang gelombang 517 nm. Variasi konsentrasi uji aktivitas antioksidan pada vitamin C ditunjukkan pada Tabel 2.

3. Pembuatan Larutan blanko
Sebanyak 1 mL larutan DPPH 0,4 mM dan volumenya ditepatkan 5 mL dengan metanol dalam tabung reaksi (yang ditutup dengan aluminium foil), kemudian dihomogenkan dengan vortex mixer dan diinkubasi selama 30 menit pada suhu 37 °C. Selanjutnya diukur serapannya pada panjang gelombang 517 nm menggunakan instrumen UV-Vis.
4. Uji antioksidan ekstrak daun pala dan Vitamin C
Ekstrak metanol pada konsentrasi 25 ppm sebanyak 250 μ L, konsentrasi 50 ppm sebanyak 500 μ L dan konsentrasi 100 ppm sebanyak 1000 μ L, masing-masing ditambah larutan DPPH 0,4 mM sebanyak 1 mL lalu volumenya ditepatkan 5 mL dengan metanol dan wadah ditutup dengan aluminium foil. Selanjutnya dihomogenkan dengan menggunakan *vortex mixer* dan diinkubasi selama 30 menit pada suhu 37 °C. Selanjutnya dibaca serapannya pada λ = 517 nm.
5. Cara perhitungan IC_{50}
Nilai IC_{50} adalah konsentrasi antioksidan dalam ppm (μ g/mL) yang mampu menghambat 50% radikal bebas. Nilai IC_{50} diperoleh dari perpotongan garis antara 50% daya hambat dengan sumbu konsentrasi, kemudian dimasukkan dalam persamaan $Y=a+bX$ dimana $Y=50$ dan nilai X menunjukkan IC_{50} . Persentase inhibisi dihitung dengan persamaan (1).

$$\%inhibisi = \frac{\text{serapan blanko} - \text{serapan sampel}}{\text{serapan blanko}} \times 100 \quad (1)$$

Ekstrak dinyatakan aktif apabila nilai IC_{50} kurang dari 100 ppm (μ g/mL) [27].

III HASIL DAN PEMBAHASAN

Ekstraksi Daun Pala

Ekstraksi daun pala diawali dengan preparasi sampel yaitu masing-masing sampel dikeringanginkan dan selanjutnya dihaluskan menggunakan blender sampai berupa serbuk. Pada proses maserasi untuk pemilihan pelarut didasarkan pada prinsip "*Like Dissolve Like*". Penggunaan berbagai jenis pelarut dengan perbedaan tingkat kepolarannya dilakukan untuk memperoleh ekstrak dengan hasil

optimal dari senyawa yang belum diketahui jenisnya yaitu senyawa polar, semi polar dan non polar [28]. Ekstraksi senyawa metabolit sekunder daun pala dilakukan secara bertingkat. Proses maserasi sampel daun pala dilakukan dengan perendaman selama 24 jam menggunakan pelarut metanol. Perendaman residu dilakukan sampai diperoleh filtrat jernih. Filtrat metanol dipekatkan dengan penguapan menggunakan *rotary evaporator* sehingga diperoleh ekstrak metanol. Ekstrak metanol pekat yang diperoleh dipartisi dengan petroleum eter untuk menghilangkan zat klorofil dan lemak. Lapisan metanol yang telah dipisahkan dengan lapisan petroleum eter dipartisi dengan *n*-heksana sehingga diperoleh ekstrak *n*-heksana. Lapisan metanol yang sudah diuapkan, diekstraksi dengan etil asetat sehingga diperoleh bagian yang tidak larut dan bagian yang larut dengan etil asetat.

Bagian yang tidak larut ditambahkan HCl 5 N untuk membuat alkaloid netral menjadi garam alkaloid. Lapisan asam dipartisi lanjut dengan kloroform untuk menarik komponen senyawa yang non alkaloid. Lapisan asam dan lapisan kloroform dipisahkan sehingga diperoleh lapisan asam yang positif alkaloid. Senyawa alkaloid pada lapisan asam dinetralkan dengan NaOH 25% dan dipartisi kembali dengan kloroform sehingga diperoleh fraksi kloroform, dilanjutkan dengan pemekatan menggunakan *rotary evaporator* hingga diperoleh ekstrak kloroform. Ekstrak kloroform sebagian diuji aktivitas antioksidan dan sebagian lagi untuk isolasi. Rendemen ekstrak metanol dari daun pala diperoleh sebesar 17,4%. Hasil ini lebih tinggi dari yang telah dilaporkan oleh Ref. [14] (13,92%) dan Ref. [13] (13,09%). Perhitungan rendemen dari ekstrak daun pala ditunjukkan pada Tabel 3.

Tabel 3 Hasil ekstraksi daun pala (*M. fragrans*)

Sampel	Berat kering (g)	Berat Rendemen (%)*
Eks. Metanol Daun Pala	521,15	7,54

Keterangan: * dihitung terhadap 521,15 g simplisia kering daun tanaman pala
(% Rendemen ekstrak = (Berat ekstrak / berat sampel) × 100)

Uji fitokimia

Uji fitokimia suatu sampel dilakukan mengetahui kandungan metabolit sekunder yang terkandung dalam sampel tersebut sehingga bisa menjadi pedoman penting dalam isolasi senyawa metabolit sekunder. Kandungan fitokimia dalam suatu sampel dilihat berdasarkan reaksi yang menunjukkan

hasil positif dengan reagen tertentu. Uji fitokimia senyawa alkaloid, dilakukan dengan menggunakan tiga pereaksi yaitu Dragendorf, Mayer dan Wagner. Alkaloid bereaksi dengan Dragendorf menunjukkan hasil positif jika terbentuk endapan merah, dengan Mayer akan menghasilkan endapan putih dan reaksi dengan Wagner akan menghasilkan endapan coklat. Uji fitokimia senyawa steroid dan terpenoid dapat diuji dengan menggunakan pereaksi Liebermann-Burchard. Perubahan warna menjadi merah setelah direaksikan dengan pereaksi Liebermann-Burchard menunjukkan hasil positif mengandung terpenoid, sedangkan perubahan warna menjadi hijau atau biru menunjukkan adanya senyawa steroid. Senyawa flavonoid dapat diuji dengan cara residu di ekstrak dengan etanol kemudian ditambahkan HCl dan serbuk Mg sehingga menghasilkan warna merah muda atau ungu yang menunjukkan adanya flavonoid [2]. Hasil uji fitokimia sampel segar dan ekstrak dari daun pala ditunjukkan pada Tabel 4.

Berdasarkan tabel menunjukkan bahwa hasil uji fitokimia sampel segar daun pala mengandung senyawa metabolit sekunder golongan alkaloid, terpenoid, dan flavonoid, sedangkan ekstrak metanol daun pala mengandung senyawa alkaloid dan flavonoid. Hasil uji fitokimia pada daun sedikit berbeda dari yang pernah dilaporkan oleh Ref. [12] yang menyatakan bahwa metabolit sekunder yang terdapat pada ekstrak metanol daun yaitu alkaloid, flavonoid, terpenoid dan tanin. Hal ini diperkirakan karena sampel yang diperoleh berasal dari tempat yang berbeda sehingga kandungan metabolit sekunder berbeda.

Tabel 4 Hasil uji fitokimia daun pala (*M. fragrans*)

Jenis Metabolit Sekunder	Sampel Segar Daun	Ekstrak Metanol Daun
Alkaloid		
-Dragendorf	-	-
-Wagner	+	+
-Meyer	+	+
Steroid	-	-
Terpenoid	+	-
Flavonoid	+	+
Saponin	-	-

Keterangan: (+) menunjukkan hasil positif dan (-) menunjukkan hasil negatif

Uji aktifitas antioksidan ekstrak metanol daun pala

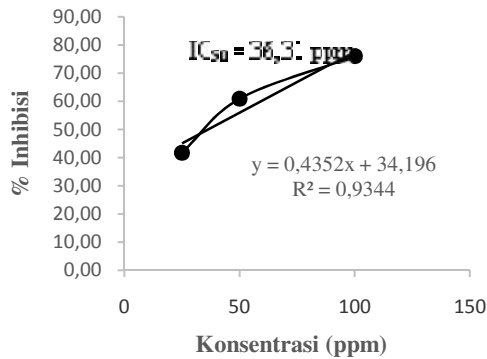
Pengujian aktivitas antioksidan dari ekstrak metanol daun pala menggunakan DPPH. Pengujian aktifitas antioksidan ekstrak metanol daun pala dilakukan dengan memvariasikan konsentrasi ekstrak sebesar 25 ppm, 50 ppm dan 100 ppm. Sebagai kontrol positif

digunakan vitamin C dengan variasi konsentrasi 3 ppm, 6 ppm, 9 ppm, 12 ppm dan 15 ppm. Aktivitas antioksidan dapat ditentukan berdasarkan nilai IC_{50} (*Inhibition Concentration*). Hasil uji aktivitas antioksidan ekstrak metanol daun pala ditunjukkan pada Tabel 5 dan kurva hubungan % inhibisi terhadap konsentrasi ekstrak metanol daun pala ditunjukkan pada Gambar 1.

Tabel 5 Hasil uji aktivitas antioksidan ekstrak metanol daun pala

Sampel	Abs. kontrol (DPPH)	Konsentrasi (ppm)	Abs. rata-rata	% I	Nilai IC_{50} (ppm)
Ekstrak metanol	0,927	25	0,540	41,75	36,31
Daun Pala	0,927	50	0,362	60,95	
	0,927	100	0,222	76,05	

Note : Abs. = Absorban; I = Inhibisi



Gambar 1 Kurva hubungan % inhibisi terhadap konsentrasi ekstrak metanol daun pala

Nilai IC_{50} menunjukkan konsentrasi terkecil dari suatu senyawa yang dapat menghambat 50% radikal bebas. Nilai IC_{50} juga menunjukkan kekuatan dari suatu senyawa sebagai antioksidan. Aktivitas antioksidan menurut Ref. [29], dikategorikan sebagai sangat kuat, kuat, sedang dan lemah tergantung pada rentang nilai IC_{50} seperti terlihat pada Tabel 6. Berdasarkan Tabel 6 ini maka aktivitas antioksidan pada ekstrak daun pala dikategorikan pada tingkatan sangat kuat dengan nilai $IC_{50} < 50$ ppm.

Tabel 6 Tingkatan kekuatan antioksidan berdasarkan nilai IC_{50} [27] (Jun, 2006)

Nilai IC_{50} (ppm)	Aktivitas Antioksidan
<50	Sangat kuat
50 – 100	Kuat
100 – 150	Sedang
150 – 200	Lemah

Aktivitas Antioksidan, Senyawa Hasil Isolasi dan Pemurnian Ekstrak Kloroform Daun Pala

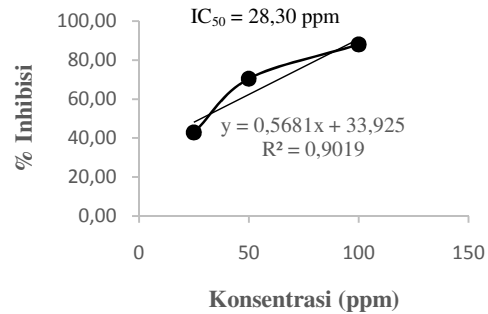
Hasil uji fitokimia awal, ekstrak metanol daun pala dominan mengandung senyawa alkaloid, sehingga tertarik untuk dilakukan pemisahan

senyawa alkaloid dengan menarik senyawa tersebut menggunakan pelarut kloroform. Hasil uji aktivitas antioksidan ekstrak kloroform daun pala menunjukkan bahwa % inhibisi ekstrak kloroform daun pala pada konsentrasi 25 ppm, 50 ppm dan 100 ppm berturut-turut yaitu 42,72%, 70,44% dan 88,03%. Hasil uji aktivitas antioksidan ekstrak kloroform daun pala ditunjukkan pada Tabel 7 dan kurva hubungan % inhibisi terhadap konsentrasi ekstrak kloroform daun pala dapat dilihat pada Gambar 2.

Tabel 7 Hasil uji aktivitas antioksidan ekstrak kloroform daun pala

Sampel	Abs. kontrol (DPPH)	Konsentrasi (ppm)	Abs. rata-rata	% I	Nilai IC_{50} (ppm)
Ekstrak kloroform	0,927	25	0,531	42,72	28,29
Daun Pala	0,927	50	0,274	70,44	
	0,927	100	0,111	88,03	

Note : Abs. = Absorbansi; I = Inhibisi



Gambar 2 Kurva hubungan % inhibisi terhadap konsentrasi ekstrak kloroform daun pala.

Menurut parameter tingkatan kekuatan antioksidan (Tabel 6), pada Gambar 2 menunjukkan bahwa ekstrak kloroform daun pala mempunyai aktivitas antioksidan yang sangat kuat (<50 ppm) dengan nilai IC_{50} 28,30 ppm. Jika dibandingkan dengan beberapa tanaman yang dikenal berpotensi mengandung antioksidan alami seperti tomat dan cabe [30], ternyata IC_{50} ekstrak kloroform daun pala lebih kuat dan berpotensi sebagai antioksidan. Oleh karena itu, ekstrak kloroform daun pala berpotensi untuk dilakukan pemisahan komponen-komponen senyawa metabolit sekundernya.

Komponen senyawa alkaloid pada ekstrak dipisahkan dengan kromatografi kolom menggunakan fase diam silika gel 60 mesh dan fasa gerak kloroform: metanol (9:1) secara gradien elusi. Fraksi-fraksi yang diperoleh dianalisis dengan Kromatografi Lapis Tipis (KLT) untuk melihat pola noda dari masing-masing fraksi pada plat KLT menggunakan

eluen kloroform : metanol (9:1). Fraksi yang mempunyai kromatogram yang sama digabung, sehingga diperoleh enam fraksi gabungan yaitu fraksi MFMD 1 (*Myristica fragrans* Metanol Daun 1) sampai fraksi MFMD 6 (*Myristica fragrans* Metanol Daun 6). Fraksi-fraksi gabungan ini dipekatkan dan dilakukan analisis fitokimia. Sifat fraksi dan hasil uji fitokimia ekstrak kloroform daun pala dapat dilihat pada Tabel 8.

Tabel 8 Fraksi gabungan hasil kromatografi kolom ekstrak kloroform daun pala

No	Kelompok Fraksi	Berat Fraksi (mg)	Warna	Kandungan Senyawa
1.	MFMD 1 (1-24)	200	Merah kehitaman	Alkaloid, Terpenoid
2.	MFMD 2 (25-40)	160	Merah kehitaman	Alkaloid, Terpenoid
3.	MFMD 3 (41-71)	150	Merah kehitaman	Alkaloid
4.	MFMD 4 (72-127)	570	Coklat kemerahan	Alkaloid, Flavonoid
5.	MFMD 5 (128-169)	520	Coklat kemerahan	Alkaloid, Flavonoid
6.	MFMD 6 (170-234)	690	Coklat	Flavonoid

Tabel 8. menunjukkan bahwa pada fraksi yang positif mengandung senyawa alkaloid adalah fraksi MFMD 1, fraksi MFMD 2, fraksi MFMD 3, fraksi MFMD 4 dan fraksi MFMD 5 sedangkan fraksi MFMD 6 tidak mengandung alkaloid tetapi hanya mengandung senyawa flavonoid. Rekromatografi kolom terhadap fraksi MFMD 1 dengan jumlah bobotnya 200 mg dilakukan menggunakan eluen kloroform: metanol (9:1) dan diperoleh lima fraksi gabungan yang dimonitor dengan KLT menggunakan eluen kloroform : metanol (9:1). Hasil rekromatografi kolom fraksi MFMD 1 daun pala ditunjukkan pada Tabel 9.

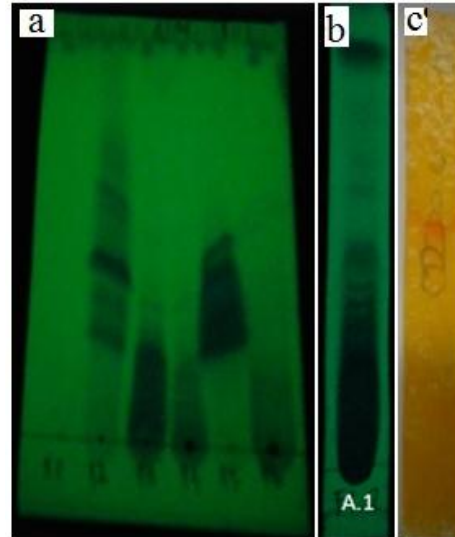
Tabel 9 Hasil rekromatografi kolom fraksi MFMD 1 daun pala

No	Fraksi MFMD 1	No. Fraksi	Fase Gerak	Bobot (mg)
1.	MFMD 1.1	1-19	K : M (9:1)	67,1
2.	MFMD 1.2	20-26	K : M (9:1)	4,6
3.	MFMD 1.3	27-33	K : M (9:1)	26,0
4.	MFMD 1.4	34-62	K : M (9:1)	4,6
5.	MFMD 1.5	63-70	K : M (9:1)	13,1

Note: K = Kloroform, M = Metanol

Fraksi MFMD 1 yang sebelumnya dilakukan rekromatografi kolom dan di monitor dengan KLT menggunakan eluen kloroform:metanol (9:1) setelah di analisis kembali, ternyata pola noda pada proses penggabungan menggunakan KLT, diduga sudah tidak stabil seperti terlihat pada noda yang tidak membentuk suatu pola noda yang tajam (Gambar 3.a). Oleh karena itu dilakukan KLT dengan berbagai eluen dan diperoleh pola noda yang baik dengan

menggunakan pelarut diklorometana 100% (Gambar 3.b). Hasil KLT pelarut diklorometana ini disemprot dengan Dragendorf untuk melihat adanya alkaloid dengan timbulnya noda berwarna *orange* seperti pada Gambar 3.c.



Gambar 3 (a) Kromatogram KLT Fraksi MFMD 1 Daun Pala dengan Eluen Kloroform: Metanol (9:1), (b) Kromatogram KLT Fraksi MFMD 1 dengan Eluen Diklorometana 100%, (c) Kromatogram KLT Fraksi MFMD 1.1 Daun Pala dengan Eluen Diklorometana 100% (disemprot dengan Dragendorf).

Tabel 10 Hasil rekromatografi kolom fraksi MFMD 2 daun pala

No	Fraksi MFMD 2	No. Fraksi	Fase Gerak	Bobot (mg)
1.	MFMD 2.1	1-9	DCI : EA (9:1)	16,1
2.	MFMD 2.2	10-17	DCI : EA (9:1)	8,8
3.	MFMD 2.3	18-20	DCI : EA (9:1)	3,7
4.	MFMD 2.4	21-29	DCI : EA (9:1)	7,7
5.	MFMD 2.5	30-40	DCI : EA (9:1)	20,4
6.	MFMD 2.6	41-47	DCI : EA (9:1)	32,5
7.	MFMD 2.7	48-49	DCI : EA (9:1)	4,5
8.	MFMD 2.8	50-56	DCI : EA (9:1)	9,1

Note: DCI = Diklorometana, EA= Etil asetat

Pemurnian selanjutnya dilakukan pada fraksi MFMD 2 dengan berat sebanyak 160 mg menggunakan eluen diklorometana:etil asetat (9:1) dan diperoleh delapan fraksi gabungan yaitu fraksi MFMD 2.1 sampai fraksi MFMD 2.8. Hasil rekromatografi kolom fraksi MFMD 2 ditunjukkan pada Tabel 10. Rekromatografi kolom fraksi MFMD 2 gabungan di monitor dengan KLT menggunakan eluen diklorometana:etil asetat (9:1), juga menghasilkan bentuk pola noda yang diduga tidak stabil setelah disemprot dengan dragendorf, terlihat dari noda yang tidak penuh dan berada di bagian bawah.

Tabel 11 Hasil rekromatografi kolom fraksi MFMD 3, MFMD 4 dan MFMD 5 daun pala

No	Fraksi	No. Fraksi Gabungan	Fase Gerak	Bobot (mg)
Fraksi MFMD 3				
1.	MFMD 3.1	1-15	E : M (9:1)	37,1
2.	MFMD 3.2	16-27	E : M (9:1)	29,8
3.	MFMD 3.3	28-32	E : M (9:1)	18,7
4.	MFMD 3.4	32-45	E : M (9:1)	60,7
Fraksi MFMD 4				
1.	MFMD 4.1	1-3	K : M (9:1)	5,2
2.	MFMD 4.2	4	K : M (9:1)	2,3
3.	MFMD 4.3	5-6	K : M (9:1)	4,1
4.	MFMD 4.4	7	K : M (9:1)	3,4
5.	MFMD 4.5	8-10	K : M (9:1)	5,5
6.	MFMD 4.6	11-15	K : M (9:1)	7,8
7.	MFMD 4.7	16-27	K : M (9:1)	34,0
8.	MFMD 4.8	28-40	K : M (9:1)	50,7
9.	MFMD 4.9	41-46	K : M (9:1)	14,1
Fraksi MFMD 5				
1.	MFMD 5.1	1-9	E : M (9:1)	17,5
2.	MFMD 5.2	10-11	E : M (9:1)	1,5
3.	MFMD 5.3	18-20	E : M (9:1)	19,8
4.	MFMD 5.4	21-29	E : M (9:1)	18,6
5.	MFMD 5.5	30-40	E : M (9:1)	22,0
6.	MFMD 5.6	41-47	E : M (9:1)	17,6
7.	MFMD 5.7	48-49	E : M (9:1)	7,9
8.	MFMD 5.8	50-56	E : M (9:1)	13,0
9.	MFMD 5.9	57-64	E : M (9:1)	27,1
10.	MFMD 5.10	65-75	E : M (9:1)	42,2

Note: K = Kloroform, M = Metanol; DCI = Diklorometana, EA= Etil asetat

Rekromatografi kolom fraksi MFMD 3 menggunakan eluen etil asetat:metanol (9:1) diperoleh empat fraksi gabungan yaitu fraksi MFMD 3.1 sampai fraksi MFMD 3.4. Pemurnian fraksi MFMD 4 menggunakan eluen Kloroform: Metanol (9:1) diperoleh sembilan fraksi gabungan yaitu fraksi MFMD 4.1 sampai fraksi MFMD 4.9. Pada pemurnian

fraksi MFMD 5 dengan eluen etil asetat: metanol (9:1) diperoleh sepuluh fraksi gabungan yaitu fraksi MFMD 5.1 sampai fraksi MFMD 5.10 sehingga fraksi MFMD 5.2 (10-11) diperoleh senyawa tunggal. Dari hasil uji fitokimia senyawa tunggal yang diperoleh diduga merupakan senyawa flavonoid, namun senyawa MFMD 5.2 memiliki bobot 1,5 mg sehingga tidak cukup untuk dilakukan uji aktivitas antioksidan dan elusidasi struktur. Hasil rekromatografi kolom fraksi MFMD 3, MFMD 4 dan MFMD 5 ditunjukkan pada Tabel 11. Ketiga fraksi ini juga menunjukkan hal yang sama seperti pada fraksi MFMD 1 dan MFMD 2 dimana pola noda yang ditunjukkan oleh fraksi gabungan diduga tidak stabil sehingga tidak dilakukan pemurnian lebih lanjut. Ketidakstabilan suatu senyawa disebabkan oleh faktor internal (sifat struktur) dan pengaruh faktor luar (lingkungan) seperti sinar, panas, uap, oksigen dan terkontaminasi dengan senyawa lain. Kestabilan karena lingkungan dapat diproteksi namun ketidakstabilan karena faktor struktur tidak dapat diproteksi. Apabila suatu senyawa mempunyai atom dengan keelektronegatifan tinggi seperti nitrogen (N) biasanya merupakan *highly oxygenated compound* yang dapat mengikat senyawa lain. Kemungkinan besar alkaloid tertentu yang terikat pada komponen yang lain seperti itu, menyebabkan senyawa itu tidak stabil [2]. Hasil uji aktivitas antioksidan fraksikloroform daun pala ditunjukkan pada Tabel 12.

Tabel 12 Hasil uji aktivitas antioksidan fraksi MFMD 1 sampai fraksi MFMD 6

Fraksi Kloroform Daun Pala	Abs. kontrol (DPPH)	Konsentrasi (ppm)	Abs. rata-rata	% Inhibisi	Nilai IC ₅₀ (ppm)
MFMD 1	0,852	25	0,793	7,88	126,270
		50	0,633	10,90	
		100	0,558	34,51	
MFMD 2	0,852	25	0,144	68,30	29,639
		50	0,112	72,05	
		100	0,081	90,49	
MFMD 3	0,852	25	0,162	66,19	27,239
		50	0,122	70,88	
		100	0,107	87,44	
MFMD 4	0,852	25	0,182	63,84	26,590
		50	0,171	66,19	
		100	0,161	81,10	
MFMD 5	0,852	25	0,098	73,70	55,436
		50	0,065	77,57	
		100	0,051	94,01	
MFMD 6	0,852	25	0,123	70,76	39,766
		50	0,110	72,29	
		100	0,076	91,08	

Berdasarkan Tabel 12 menunjukkan bahwa hasil uji aktifitas antioksidan fraksi MFMD 1 sampai MFMD 6, nilai IC₅₀ keenam fraksi bervariasi dari kategori sangat kuat sampai lemah (Tabel 6). Fraksi dengan aktivitas sangat kuat adalah fraksi MFMD 4, fraksi MFMD 3, fraksi MFMD 2, MFMD 6 dan MFMD 5 dengan nilai IC₅₀ masing-masing berturut-turut 26,590 ppm, 27,239 ppm, 29,639 ppm, 39,766 ppm dan 55,436 ppm, sedangkan aktivitas antioksidan yang lemah padafraksi MFMD 1 dengan nilai IC₅₀ yaitu 126,270 ppm. Hal ini menunjukkan bahwa fraksi daun memiliki aktivitas penghambatan yang lebih baik, karena adanya beberapa senyawa aktif yang terdapat dalam fraksi dapat bersinergi dalam menghambat radikal bebas, sehingga nilai IC₅₀ dari fraksi lebih kuat dari ekstraknya. [24] melaporkan bahwa ekstrak *n*-heksana akar pala memiliki aktivitas antioksidan yang sangat kuat sedangkan fraksi-fraksinya memiliki aktivitas yang lemah dalam menghambat radikal bebas.

KESIMPULAN

Ekstrak metanol dan ekstrak kloroform daun pala mempunyai aktifitas antioksidan yang kuat dengan nilai IC₅₀ berturut-turut yaitu 36,31 ppm dan 28,30 ppm. Isolasi fraksi-fraksi aktif dari ekstrak kloroform daun pala menunjukkan aktifitas antioksidan yang sangat kuat berturut-turut yaitu fraksi MFMD 4, fraksi MFMD 5, fraksi MFMD 6, MFMD 3 dan MFMD 2 dengan nilai IC₅₀ masing-masing 26,590 ppm, 27,239 ppm, 29,639 ppm, 39,766 ppm dan 55,436 ppm.

UCAPAN TERIMAKASIH

Ucapan terima kasih penulis sampaikan kepada Kemenristekdikti yang telah memberikan dana penelitian hibah bersaing.

DAFTAR PUSTAKA

1. Dermawan, R., 2013, Peran Battra dalam Pengobatan Tradisional Pada Komunitas Dayak Agabag di Kecamatan Lumbis Kabupaten Nunukan. e.jurnal Sosiologi Konsentrasi 1(4) : 50-61, ISSN 0000-0000.
2. Harborne, J.B., 1987, *Metode Fitokimia: Penentuan Cara Moderen Menganalisa Tumbuhan*. Terjemahan dari *Phytochemical Methods* oleh Kosasih Padmawinata. ITB. Bandung.
3. Winarti, C dan Nanan N., 2005, Peluang Tanaman Rempah dan Obat sebagai Sumber Pangan Fungsional, Balai Besar Penelitian dan Pengembangan Pascapanen Pertanian, Jalan Tentara Pelajar No. 12, Bogor 16111, *Jurnal Litbang Pertanian*, 24(2)
4. Nurdjannah, N, 2007, *Teknologi Pengolahan Pala*. Badan Penelitian dan Pengembangan Pasca Panen Pertanian.
5. Aprijani, 2005, *Review: Biologi dan Konservasi Marga Myristica di Indonesia, Jurusan Biologi FMIPA Universitas Negeri Manado (UNIMA)*, Tondano 95187, ISSN: 1412-033X, Volume 6, Nomor 2 April 2005
6. Prakash, E dan Dwijendra, K. Gupta, 2013, Cytotoxic Activity of Ethanolic Extract of *Myristica fragrans* (Houtt) against seven Human Cancer Cell Lines. *Journal of Food and Nutrition Science*. Volume 1(1), Hal. 1-3.
7. Dewi, K., Budi Widyarto, Pande Putu Erawijantari, Wahyu Widowati, 2015, *In vitro* study of *Myristica fragrans* seed (Nutmeg) ethanolic extract and quercetin compound as anti-inflammatory agent, *International Journal of Research in Medical Sciences Dewi K et al. Int J Res Med Sci.* 3(9):2303-2310 www.msjonline.org
8. Cao, G.Y, Xiu-Wei Yang, Wei Xu, Fei Li, 2013, New inhibitors of nitric oxide production from the seeds of *Myristica fragrans*, *Journal of Food and Chemical Toxicology*, Volume 62. Hal. 167–171.
9. Cao, G.Y, Wei Xu, Xiu-Wei Yang, Frank J. Gonzalez, Fei Li, 2015, New neolignans from the seeds of *Myristica fragrans* that inhibit nitric oxide production, *Journal of Food Chemistry*, Volume 173. Hal. 231–237
10. Acuña, U.M, Peter J. Blanco Carcache, Susan Matthew, Esperanza J. Carcache de Blanco, 2016, New acyclic bis phenylpropanoid and neolignans, from *Myristica fragrans* Houtt., exhibiting PARP-1 and NF- κ B inhibitory effects, *Journal of Food Chemistry*, Volume 202. Hal. 269–275.
11. Hellen, M, Vargheese, T.N, Kumari, J, Abiramy, Sajina, Sree, J, 2012, Phytochemical Analysis and Anticancer Activity of Essential Oil From *Myristica fragrans*, *International Journal of Current Pharmaceutical Review and Research*.
12. Ginting^a, B., 2013, Aktifitas Antifungi Ekstrak Daun Pala (*Myristica fragrans* Houtt), *Prosiding Seminar Nasional Kimia* tahun 2013.
13. Ginting^b, B, T. Barus, P, Simanjuntak, L. marpaung., 2014, Isolasi dan Sifat Antioksidan Total Flavonoid Daun Pala (*Myristica fragrans* Houtt), *Prosiding Seminar Nasional Kimia*, Samarinda
14. Akinboro, A, Kamaruzzaman, M. B, Asmawi, M. Z, Sulaiman, S. F, Sofiman, O. H, 2011, Antioxidans in Aqueous extract of *Myristica fragrans* (Houtt) Suppress Mitosis and Cyclophosphamide-induce chromosomal aberrations in *Allium cepa* L. Cells, *Journal of Zhejiang University-SCIENCE B (Biomedicine)*

- & *Biotechnology*). ISSN 1673-1581 (Print); ISSN 1862-1783(Online).www.zju.edu.cn/jzus;
15. Ginting^c, B, T. Barus, P, Simanjuntak, L. marpaung., 2013, Isolasi dan Dan Penentuan Aktivitas Antioksidan Total Alkaloid Daun Pala (*Myristica fragrans* Houtt), *Prosiding Seminar Nasional Yusuf Bansen*.
 16. Gupta, A. D, Bansal, V. K, Babu, V, Maithil, N., 2013. Chemistry, Antioxidan and Antimicrobial Potential of Nutmeg (*Myristica fragrans* Houtt). *Journal of Engineering and Biotechnology*
 17. Pillai S. P, Roziahaman M., Amin M. S., Zeyad D., Mahmoud N., 2012. Antioxidant and antiangiogenic activities of the essential oils of *Myristica fragrans* and *Morinda citrifolia*. *Asian Pacific Journal of Tropical Medicine*, Hal. 294-298
 18. Chakraborty, P, Lavanya P. and Jayanthi A., 2015, Bioactivity of *Myristica fragrans* Methanol Extract, *Journal of Pharmaceutical Research*, Volume 4, Issue 9, 1145-1157. Research Article ISSN 2277- 7105.
 19. Sulaiman, F. S, Ooi, L. K, 2012, Antioxidant and Anti Food-Born Bacterial Activities of Extracts from Leaf and Different fruit Parts of *Myristica fragrans* Houtt, *Food Control*
 20. Lima K. Rafaela, Cardoso, M. G, Andrade, M.A, Guimaraes, P. L, Batista, L. R, Nelson, D. L, 2012, Bactericidal and Antioxidant Activity of Essential Oils From *Myristica fragrans* Houtt and *Salvia microphylla* H.B.K, *J Am Oil Chem Soc* (2012) 89:523-528 DOI 10.1007/s11746-011-1938-1
 21. Kazeem MI., Akanji MA., Hafizur Rahman M., Choudhary MI., 2012. Antiglycation, antioxidant and toxicological potential of polyphenol extracts of alligator pepper, ginger and nutmeg from Nigeria. *Asian Pacific Journal of Tropical Biomedicine*. Volume 2(9). Hal. 727-732.
 22. Ginting^c, B, T. Barus, P, Simanjuntak, L. marpaung., 2013, Isolasi dan Sifat Antioksidan Total Alkaloid Daun Pala (*Myristica fragrans* Houtt), *Prosiding SNYUBe*
 23. Ginting^d, B, T. Barus, P, Simanjuntak, L. marpaung., 2016, Isolation and Identification of Flavonoid Compound from Nutmeg Leaves (*Myristica fragrans* Houtt), *Asian Journal Of Chemistry*
 24. Ginting^f, B, Mustanir, Hira H., Lidya S.D., Siti H., Nurmilasari, Ummu S., 2016, Kajian Fitokimia dan Pengembangan Obat Kanker dari Tanaman Pala (*Myristica fragrans* Houtt), Kementerian Kesehatan Republik Indonesia, Balai Penelitian dan Pengembangan Kesehatan, Balai Besar Penelitian dan Pengembangan.
 25. Ginting^g, B, Mustanir, Hira H., Lidya S.D., Era L., Rohmat M., 2017, Antioxidant Activity of n-Hexana Extract of Nutmeg Plants from South Aceh Province, *Jurnal Natural*, Vol.17, No.1, 2017 pISSN 1411-8513, eISSN 2541-4062.
 26. Ramaswamy, V, N.Varghese, A.Simon, 2011, An Investigation on Cytotoxic and Antioxidant Properties of *Clitoria Ternatea* L. *International Journal of Drug Discovery*. Vol.3 : 74-77. ISSN : 0975-4423
 27. Awe, F.B., T. N. Fagbemi, B. O. T. Ifesan, A. A. Badejo, Antioxidant properties of cold and hot water extracts of cocoa, Hibiscus flower extract, and ginger beverage blends, 2013, *Food Research International* 52, 490-495
 28. Simorangkir, M. 2015 Isolasi dan Elusidasi Struktur Kimia Senyawa Alkaloid dari Buah Ranti Hitam (*Solanum blumei* Ness ex Blume) yang Bersifat Anti kanker. Program Doktor Ilmu Kimia, Fakultas MIPA Universitas Sumatera Utara, Medan.
 29. Jun, M., H.Y., Houng, J., Wang, X., C.S. 2006. Comparison of Antioxidant Activities of Isoflavones from Kudzu Root (*Pueraria lobata* Ohwi). *The Journal of Food Science*. Institute of Technologist. 2117-2122.
 30. Astuti, Sari. 2016. Uji Aktivitas Antioksidan Ekstrak Kloroform Daun Tomat (*solanum lycopersicum* L.) Daun Cabai Merah (*capsicum annum* L.) dan Daun Ciplukan (*physalis angulata* L.) dengan Metode DPPH. FMIPA Universitas Sebelas Maret, Surakarta.