

The Antioxidant Activities, Phenolic Total and Cytotoxicity of Extract and Fractions of *Aloe Vera* Linn)

Nike Rizky Prahesti, Meiny Suzery, Bambang Cahyono*)

1Chemistry Department, Faculty of Sciences and Mathematics, Diponegoro University, Jl. Prof. Sudharto SH, Kampus Tembalang, Semarang 50275 (Telp/fax 024-76480824)

*Corresponding author: bambang_cahyono@undip.ac.id

ABSTRACT

Aloe vera is known containing compounds which have potencies as antioxidants, such as group of anthraquinones (especially emodin and aloin), flavonoids, tannins, saponins, and sterols. In this research, comparison of total phenolics content, antioxidant activity and cytotoxicity of the methanolic extract and its fractions had been conducted. The *Aloe vera* extract was fractionated using a solvent gradient system to obtain fractions of *n*-hexane, dichloromethane, ethyl acetate and water. The analysis of total phenolic and activity were performed on extracts or fractions that showed a positive result to the phenolic test. Total phenolic content was determined by the *Folin - Ciocalteu* method, determination of antioxidant activity was by DPPH radical reduction and determination of cytotoxicity was by BSLT (*Brine Shrimp Lethality Test*). The results showed that the yield of methanol extract, fractions *n*-hexane, fraction of dichloromethane, ethyl acetate and water fraction were 0.580% ; 0.006% ; 0.093% ; 0.0092% and 0.410% respectively. Methanolic extract, ethyl acetate fraction and the water fraction showed positive result on phenolic test. Total phenolic compounds from water fractions was (16. mg gallic acid equivalent/g extract or fraction) which had greater level than E_{met} and F_{ea} (12.47 and 0.89). Fraction of water had the highest antioxidant activity (IC_{50} 433 mg/L) compared to E_{met} (IC_{50} 519.23 mg/L) and F_{ea} (IC_{50} 1311.36 mg/L). All of three samples had cytotoxic potency, water fraction (F_{air}) was the most active sample (LC_{50} 5.209 ppm) compared to E_{met} (LC_{50} 18.383 ppm) and F_{ea} (LC_{50} 56.486 ppm). Overall it can be proposed that the water fraction is the most active fraction compared to the other fractions or extracts.

Keywords: *Aloe vera*, fractionation, total phenolics, free radical reduction, BSLT (*Brine Shrimp Lethality Test*)

ABSTRAK

Aloe vera telah diketahui mengandung senyawa-senyawa yang berpotensi sebagai antioksidan, seperti senyawa golongan antrakuinon (khususnya emodin dan aloin), flavonoid, tannin, saponin, dan sterol. Dalam penelitian ini dikaji perbandingan kadar fenolat total, aktivitas antioksidan dan sitotoksitasnya pada ekstrak metanolat dan fraksi-fraksinya. Ekstrak *Aloe vera* (E_{met}), difraksinasi dengan sistem gradient pelarut sehingga untuk peroleh fraksi *n*-heksana (F_{Hex}), diklorometana (F_{DCM}), etil asetat (F_{EA}) dan air (F_{air}). Analisis fenolat total dan aktivitas dilakukan terhadap ekstrak atau fraksi yang menunjukkan test positif terhadap uji fenolat. Jumlah fenolat total ditentukan dengan metode *Folin-Ciocalteu*, penentuan aktivitas antioksidan melalui peredaman radikal DPPH dan penentuan sitotoksitas dengan BSLT (*Brine Shrimp Lethality Test*). Hasil penelitian menunjukkan bahwa rendemen per berat basah dari E_{met} , F_{Hex} , F_{DCM} , F_{EA} dan F_{air} berturut turut adalah 0,580%; 0,006%, 0,093%, 0,009% dan 0,410%. Uji fenolat hanya positif terhadap E_{met} , F_{EA} dan F_{air} . Senyawa fenolat total dari fraksi air (16,5mg ekuivalen asam galat/g fraksi) memiliki kadar yang lebih besar dibanding E_{met} dan F_{ea} (12,47 dan 0,89). Fraksi air juga memiliki aktivitas antioksidan tertinggi (IC_{50} 433 mg/L) dibanding E_{met} (IC_{50} 519,23 mg/L) dan F_{ea} (IC_{50} 1311,36 mg/L). Ketiga sampel uji berpotensi sebagai sitotoksik, fraksi air (F_{air}) merupakan sampel uji paling aktif (LC_{50} 5,209 ppm) dibanding dengan E_{met} (LC_{50} 18,383ppm) dan F_{ea}

(LC₅₀ 56,486 ppm). Secara keseluruhan dapat diusulkan bahwa fraksi air merupakan fraksi yang paling aktif dibanding dengan fraksi atau ekstrak yang lain.

Kata kunci: *Aloe vera*, fraksinasi, total fenolat, peredaman radikal bebas, BSLT

Pendahuluan

Tanaman lidah buaya atau *Aloe vera* Linn (*Liliaceae*), yang tumbuh subur didaerah tropis [1] hingga kini masih menarik sebagai bahan penelitian diseluruh penjuru dunia [2]. Ekstrak dari tanaman *Aloe vera* memiliki senyawa metabolit sekunder sebagai antioksidan, antitumor, antikanker, antimikroba, antiinflamasi, antidiabetes [3]. *Aloe vera* mengandung golongan senyawa metabolit sekunder, seperti antrakuinon, lignin, tanin, saponin, sterol, flavonoid [4]. Dilihat dari strukturnya, metabolit tersebut dapat memiliki bagian fenolik maupun non fenolik. Beberapa senyawa yang telah dilaporkan tersebut diduga sangat erat hubungannya dengan aktivitas antioksidan [5].

Usaha untuk memperoleh bahan yang lebih aktif dibanding dengan *crude* total, secara teoritis dapat dilakukan melalui proses fraksinasi. Pada penelitian ini proses fraksinasi dilakukan dengan cara ekstraksi cair-cair, sehingga akan diperoleh ekstrak metanolat, fraksi *n*-heksan, fraksi diklorometana, fraksi etil asetat dan fraksi air. Semua ekstrak dan fraksi tersebut telah diperbandingkan harga kadar senyawa fenolat total, aktivitas antioksidan dan sitotoksisitasnya. Penelitian seperti ini sangat penting dilakukan untuk dapat membandingkan hasil dari ketiga indikator tersebut yang selanjutnya dapat untuk menentukan perlu tidaknya proses fraksinasi dilakukan.

Metodologi

Bahan kimia. Asam galat, kuersetin dan DPPH dari Merck,

Penyiapan bahan. Tanaman *Aloe vera* segar dilakukan pencucian, pemisahan antara daging dengan kulit *Aloe vera*, pengurangan kadar air dengan cara diangin-anginkan semalaman.

Penyediaan Ekstrak dan Fraksi-fraksi. Proses ekstraksi dilakukan dengan merendam 1 kg *Aloe vera* dalam larutan metanol 4L selama 4x24 jam, kemudian disaring. Filtrat yang diperoleh dipekatkan

dengan *rotary evaporator* hingga pekat (selanjutnya disebut sebagai E_{met}). Ekstrak ini selanjutnya difraksinasi dengan metode ekstraksi cair-cair menggunakan pelarut *n*-heksana:air (1:1), diklorometana dan etil asetat, sehingga diperoleh berturut-turut fraksi pekat *n*-heksan (F_{hex}), fraksi diklorometana (F_{DCM}), fraksi etil asetat (F_{EA}) dan fraksi air (F_{air}) setelah dievaporasi pelarutnya.

Analisis Kualitatif senyawa Fenolat. Sebanyak 1 mg ekstrak dan fraksi-fraksi *Aloe vera* ditambahkan 1 mL aquades dalam tabung reaksi. Campuran dikocok dan dipanaskan sampai mendidih. Larutan yang telah dipanaskan ditempatkan pada plat tetes dan ditambahkan dengan larutan FeCl₃. Hasil positif adanya senyawa fenolat ditunjukkan dengan adanya warna coklat, hijau, ungu, biru atau hitam pekat pada larutan [6].

Analisis fenolat total. Analisis kuantitatif fenolat total dilakukan sesuai menggunakan metode yang dilakukan oleh Lim dan Quah [7] terhadap ekstrak atau fraksi yang menunjukkan tes positif adanya senyawa fenolat. Asam galat digunakan untuk standart. Sebanyak 0,2 mL (ekstrak atau fraksi 1000 ppm dalam metanol) dari masing-masing fraksi dan ekstrak *Aloe vera* diencerkan dengan aquades 15,8 mL dan direaksikan dengan 1 mL reagen *Folin-Ciocalteu* selanjutnya dihomogenkan serta didiamkan selama 8 menit. Setelah pengocokan dan pendiaman, sebanyak 3 mL Na₂CO₃ 20% ditambahkan ke dalam masing-masing larutan, dikocok sampai homogen dan didiamkan selama 30 menit pada suhu ruang. Masing-masing larutan kemudian ditentukan absorbansi pada $\lambda=763,5$ nm menggunakan Spektrofotometer. Kandungan total fenolat dinyatakan sebagai jumlah mg asam galat ekuivalen tiap g ekstrak atau tiap g fraksi.

Penentuan Aktivitas Antioksidan. Penentuan aktivitas antioksidan menggunakan metode dari Brand-Willams dkk [8].

Uji Sitotoksisitas menggunakan metode BSLT. Penetasan larva *A. salina* Leach dilakukan dengan

cara larva *A. salina* Leach dimasukkan ke dalam air laut buatan dan larva dibiarkan selama 48 jam di bawah pencahayaan lampu agar menetas sempurna. Masing-masing sampel dibuat larutan induk dengan melarutkan 0,125 g ekstrak metanolat, fraksi etil asetat, dan fraksi air kedalam air laut sampai volume 50 mL dengan labu takar, selanjutnya di buat dengan berbagai konsentrasi 10, 100, 1000 ppm. Sebanyak 10 ekor larva *A. salina* dimasukkan ke dalam botol vial yang berisi air laut dan ekstrak. Kontrol dibuat dari air laut buatan. Pengamatan dilakukan setelah 24 jam dengan menghitung jumlah larva yang mati dari total larva yang dimasukkan dalam botol vial [9]. Dalam menentukan LC_{50} dilakukan dengan menggunakan analisis probit.

Hasil dan Pembahasan

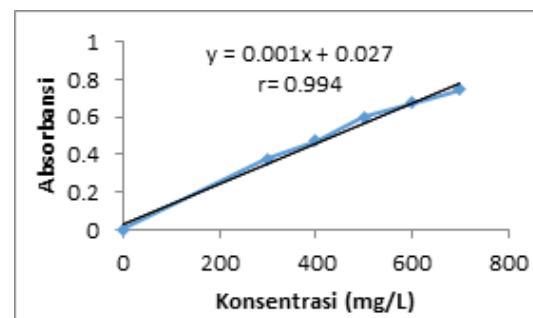
Hasil ekstraksi dan analisis kualitatif senyawa fenolat

Ekstrak kering metanolat (E_{met}) dari *Aloe vera* diperoleh dengan rendemen sebanyak 0,58% dari sampel basah. Ivanovic dkk [10] melaporkan ekstrak *Aloe vera* dapat diperoleh dengan rendemen antara 0,09-1,5% dengan pelarut metanol 20%. Rendemen dari fraksi *n*-heksana, fraksi diklorometana, fraksi etil asetat, dan fraksi air masing-masing sebesar 0,006%, 0,0093%, 0,0092% dan 0,4129%. Dilihat dari rendemen F_{hex} , F_{DCM} dan F_{EA} yang jauh lebih kecil dibanding dengan F_{air} , dapat diduga bahwa fraksinasi dengan gradient pelarut hanya akan mengeliminasi 0,0248% (bandingkan dengan 0,4129% dari fraksi air).

Senyawa-senyawa fenolat telah dilaporkan sangat berhubungan dengan aktivitas antioksidan [11]. Hasil analisis keberadaan senyawa fenolat dari ekstrak dan fraksi *Aloe vera* menunjukkan bahwa hanya ekstrak metanolat, fraksi etil asetat dan fraksi air yang menunjukkan positif terhadap tes fenolat ditandai dengan adanya perubahan warna dari kuning menjadi coklat pekat. Dari hasil penelitian ini dapat diduga bahwa senyawa-senyawa fenolat dari *Aloe vera* tidak dapat terambil dalam pelarut non polar. Untuk selanjutnya, pembahasan hanya akan difokuskan terhadap ekstrak atau fraksi yang menunjukkan tes positif terhadap fenolat.

Hasil Analisis fenolat total terhadap ekstrak dan fraksi *Aloe vera*

Pengukuran kandungan fenolat total dilakukan dengan penambahan pereaksi *Folin-Ciocalteu*. Pembentukan kompleks antara reagen *Folin-Ciocalteu* dengan gugus fenolik dapat menghasilkan produk berwarna biru, menyerap pada panjang gelombang maksimum 763,5 nm. Asam galat digunakan sebagai standar fenolat karena banyaknya publikasi yang menggunakan senyawa ini sebagai standart sehingga mempermudah memberikan gambaran mengenai kualitas bahan yang dianalisis. Kurva kalibrasi total fenolat dari asam galat telah dibuat khusus untuk penelitian ini (gambar 1). Harga r yang mendekati angka satu menunjukkan semua pekerjaan penelitian untuk keperluan ini memberikan hasil yang sangat analitis secara statistik. Hasil regresi dengan persamaan $y=0.001x+0.027$ dapat digunakan untuk analisis total fenolat sampel ekstrak dan fraksi *Aloe vera*.



Gambar 1. Kurva kalibrasi asam galat dengan pereaksi *Folin-Ciocalteu*

Hasil penentuan kadar fenolat total ekstrak metanolat dan faksi-fraksi *Aloe vera* (tabel 1) menunjukkan bahwa fraksi air merupakan sampel uji yang memiliki kandungan fenolat total lebih besar dibanding dengan yang lain.

Tabel 1 Hasil penentuan kadar fenolat total ekstrak dan fraksi *Aloe vera*

Sampel	Absorbansi	Senyawa fenolat total (GAE/ Ekstrak)
E_{met}	0,041	12,47
F_{ea}	0,028	0,98
F_{air}	0,044	16,50

Sekali lagi, perbedaan harga fenolat total yang sangat kecil antara ekstrak metanol asal dengan fraksi air, menunjukkan bahwa ekstraksi bertingkat yang dilakukan untuk purifikasi fenolat tidak perlu dilakukan. Juga, jumlah fenolat dalam fraksi etil asetat yang jauh lebih kecil dibanding dengan dua sampel uji sangat mendukung statement terakhir ini.

Hasil Uji Aktivitas Antioksidan

Pengujian aktivitas peredaman radikal bebas dengan metode DPPH dilakukan dengan mekanisme pendonoran atom hidrogen dari senyawa fenolat untuk meredam radikal bebas [12]. Panjang gelombang maksimum pada larutan DPPH yang diperoleh adalah 515,5 nm dengan absorbansi 0,652. Nilai IC₅₀ larutan standar kuersetin, ekstrak methanol, fraksi etil asetat, dan fraksi air dapat dilihat pada table 2. Nilai tersebut diperoleh melalui persamaan regresi linier diatas dengan memasukkan % peredaman sebesar 50% kedalam persamaan.

Ketiga sampel uji mempunyai nilai IC₅₀ yang lebih besar dari 200 mg/L, sehingga dapat diklasifikasikan sebagai antioksidan yang memiliki aktivitas rendah [13]. Aktivitas antioksidan yang ditunjukkan ketiga sampel uji sangat berbeda dengan hasil yang dilaporkan oleh Sultana dkk [14], di mana ekstrak metanol yang memiliki IC₅₀ 77,6-80,1 mg/L, diduga perbedaan asal muasal sampel dan cara ekstraksi menjadi penyebab perbedaan aktivitas ini.

Table 2. persamaan regresi linier peredaman radikal dan harga IC₅₀

No	Sampel uji	Persamaan linier	IC ₅₀ (mg/L)
1	Kuersetin	y=0.6173x+ 36.656 (0.976)	21.6
2	E _{met}	y=0.082x+6.595 (0.988)	519,2
3	F _{ea}	y=0.033x+6.395 (0.958)	1311,4
4	F _{air}	y=0.097x+7.009 (0.974)	433,0

Uji Sitotoksisitas dengan metode BSLT

Uji sitotoksisitas terhadap ekstrak metanol, fraksi etil asetat dan fraksi air dilakukan dengan metode *Brine Shrimp Lethality Test* (BSLT) pada konsentrasi 10 100, 1000 mg/L dan sebagai kontrol digunakan air laut buatan (larutan garam). Dari hasil penelitian, jumlah larva *Artemia salina* yang mati dihitung dengan analisis probit sehingga diperoleh LC₅₀ (*Letal Concentration*) dari ekstrak atau fraksi *Aloe vera*. Diperoleh ekstrak metanol dengan LC₅₀ 18, 383 mg/L, fraksi etil asetat 56,486 mg/L, fraksi air sebesar 5,209 mg/L. Hasil penelitian ini menunjukkan bahwa ketiga sampel uji dapat dikategorikan sebagai bahan yang berpotensi sitotoksik dengan nilai LC₅₀ dibawah 100 ppm [15]. Fraksi air memiliki nilai LC₅₀ paling besar dibandingkan dengan sampel uji yang lain, sedangkan penelitian yang dilakukan oleh Thu dkk [16] melaporkan bahwa aktivitas sitotoksik dari *Aloe vera* memiliki LC₅₀ 33,85 ppm.

Kesimpulan dan Saran

Data-data rendemen, skrining fitokimia, data total fenolat, antioksidan dan data aktivitas, dari ekstrak methanol aloe vera beserta fraksi-fraksinya. Fraksi air merupakan sampel uji yang yang memiliki total fenolat dan aktivitas terbaik dibandingkan dua sampel uji yang lain. Bagaimanapun, mengingat ekstrak methanol asal juga menunjukkan data yang hampir sama dengan fraksi air, maka dapat disarankan agar teknik fraksinasi terhadap ekstrak *Aloe vera* tidak perlu dilakukan.

Daftar Pustaka

[1] Ratee Maenthaisong, Nathorn Chaiyakunapruk, Surachet Niruntraporn, Chuenjid Kongkaew, (2007), The efficacy of aloe vera used for burn wound healing: A systematic review, *Burns*, 33 (6), 713-718 <http://dx.doi.org/10.1016/j.burns.2006.10.384>

[2] Tanwi Choche, Shubhnagee Shende, Pramod Kadu, (2014), Extraction and identification of bioactive components from *Aloe barbadensis* Miller, *Research and Reviews: Journal of Pharmacogsoy and Phytochemistry*, 2 (1), 14-23

[3] Enas Ali Kamel Mohamed, (2011), Antidiabetic, antihypercholestermic and antioxidative effect

- of Aloe vera gel extract in alloxan induced diabetic rats, *Australian Journal of Basic and Applied Sciences*, 5 (11), 1321-1327
- [4] Swagata Das, Biswajit Mishra, Kamaldeep Gill, Md Saquib Ashraf, Abhay Kumar Singh, Mou Sinha, Sujata Sharma, Immaculata Xess, Krishna Dalal, Tej Pal Singh, Sharmistha Dey, (2011), Isolation and characterization of novel protein with anti-fungal and anti-inflammatory properties from Aloe vera leaf gel, *International Journal of Biological Macromolecules*, 48 (1), 38-43 <http://dx.doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2010.09.010>
- [5] Arun Patidar, R. K. Bhayadiya, M. Nimita, J. K. Pathan, P. K. Dubey, (2012), Isolation of Aloin from Aloe vera, its characterization and evaluation for antioxidant activity, *International journal of pharmaceutical research and development*, 2 (4), 24-28
- [6] Jeffrey Barry Harborne, (1987), *Metode fitokimia*, Edisi ke-2. Padmawinata K, Soediro I, penerjemah. Bandung: Institut Teknologi Bandung. Terjemahan dari: *Phytochemical Methods*,
- [7] Y. Y. Lim, E. P. L. Quah, (2007), Antioxidant properties of different cultivars of *Portulaca oleracea*, *Food Chemistry*, 103 (3), 734-740 <http://dx.doi.org/10.1016/j.foodchem.2006.09.025>
- [8] W. Brand-Williams, M. E. Cuvelier, C. Berset, (1995), Use of a free radical method to evaluate antioxidant activity, *LWT - Food Science and Technology*, 28 (1), 25-30 [http://dx.doi.org/10.1016/S0023-6438\(95\)80008-5](http://dx.doi.org/10.1016/S0023-6438(95)80008-5)
- [9] B. N. Meyer, N. R. Ferrigni, J. E. Putnam, L. B. Jacobsen, D. E. Nichols, J. L. McLaughlin, (1982), Brine shrimp: a convenient general bioassay for active plant constituents, *Planta medica*, 45 (5), 31-34 DOI: 10.1055/s-2007-971236
- [10] Jasna Ivanović, Irena Žižović, Slobodan D Petrović, Dejan Skala, (2009), The analysis of different processes of extraction: yield of extracts obtained from aloe vera (*Aloe barbadensis* Miller) and sweet bay (*Laurus nobilis* L.) and the exergy analysis of applied processes, *Chemical Industry and Chemical Engineering Quarterly*, 15 (4), 271-278
- [11] Jin Dai, Russell J. Mumper, (2010), Plant Phenolics: Extraction, Analysis and Their Antioxidant and Anticancer Properties, *Molecules*, 15 (10), 7313
- [12] Mohamad Rafi, Niken Widyastuti, Elly Suradikusumah, Latifah Kosim Darusman, (2012), Aktivitas Antioksidan, Kadar Fenol dan Flavonoid Total dari Enam Tumbuhan Obat Indonesia (Antioxidant Activity, Total Phenol and Flavonoid From Six Indonesian Medicinal Plants), *Jurnal Bahan Alam Indonesia*, 8 (3), 159-165
- [13] Evi Mintowati Kuntorini, Maria Dewi Astuti, Norma Milina, (2011), Struktur Anatomi dan Kerapatan Sel Sekresi serta Aktivitas Antioksidan Ekstrak Etanol dari Rimpang Temulawak (*Curcuma Xanthorrhiza* Roxb) Asal Kecamatan Pengaron Kabupaten Banjar Kalimantan Selatan, *Jurnal Bioscientiae*, 8 (1), 28-37
- [14] Bushra Sultana, Farooq Anwar, Muhammad Ashraf, (2009), Effect of Extraction Solvent/Technique on the Antioxidant Activity of Selected Medicinal Plant Extracts, *Molecules*, 14 (6), 2167
- [15] M. A. Morshed, Azim Uddin, Akhlaqur Rahman, Tahrim Hasan, Saurov Roy, A. Al-Amin, Rajibul Ahsan, Rezuanul Islam, (2011), In vitro antimicrobial and cytotoxicity screening of *Terminalia arjuna* ethanol extract, *International Journal of Biosciences (IJB)*, 1 (2), 31-38
- [16] K Thu, Yin Y Mon, Tin A Khaing, Ohn M Tun, Study on Phytochemical Properties, Antibacterial Activity and Cytotoxicity of Aloe vera L,