

## UJI AKTIVITAS ANTIOKSIDAN DAN BIOTRANSFORMASI EKSTRAK ETANOL DAN HEKSANA DAUN KELAPA SAWIT UNTUK SUPLEMEN KESEHATAN

### ANTIOXIDANT ACTIVITY TEST AND BIOTRANSFORMATION OF PALM LEAF ETHANOL AND HEXANE EXTRACTS FOR HEALTH SUPPLEMENTS

Irma Kresnawaty<sup>1)\*</sup>, Galuh Wening Permatasari<sup>1)</sup>, Widodo<sup>2)</sup>, Djoko Santoso<sup>1)</sup>

<sup>1)</sup>Pusat Penelitian Kelapa Sawit Unit Bogor  
Jl. Taman Kencana No.1 Bogor, Jawa Barat, Indonesia 16128  
Email : irmakresnawati83@gmail.com

<sup>2)</sup>Jurusan Biologi, Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam, Universitas Brawijaya, Malang, Jawa Timur, Indonesia

Makalah: Diterima 25 Mei 2023; Diperbaiki 6 September 2023; Disetujui 1 November 2023

#### ABSTRACT

*Oil palm fronds and leaves are wastes of oil palm plantations which are abundantly available in Indonesia and contain polyphenolic compounds which have high economic potential and health value. However, the potential for polyphenols from oil palm leaf extract (OPLE), which has antioxidant activity, has not been utilized optimally until now. In this research, an antioxidant food supplement from OPLE which is rich in polyphenolic compounds was developed. OPLE was prepared using ethanol as a solvent and concentrated by vacuum evaporation, then separated by liquid-liquid column chromatography and identified by LC-MS. The total phenolic yield of the ethanol extract of palm leaves contained was higher phenolic content than the hexane extract, while the phenolic content and antioxidant content of the oldest leaf were higher than the 17th leaf. Separation of the active antioxidant ingredients was carried out by liquid-liquid column chromatography with chloroform eluent: methanol = 4: 1 v/v which is expected to separate the active compounds. The content of flavonoids contained in this fraction is 6-Methoxy-2-[2-(3'-methoxyphenyl) ethyl] chromone. Biotransformation using tannase enzyme produced the increase of flavonoid content and antioxidant of oil palm extracts.*

*Keywords : antioxidant, biotransformation, immunomodulator, OPLE, supplement*

#### ABSTRAK

Pelepah dan daun kelapa sawit merupakan limbah perkebunan kelapa sawit yang tersedia melimpah di Indonesia dan mengandung senyawa polifenol yang memiliki potensi ekonomi dan nilai kesehatan yang tinggi. Namun demikian, potensi polifenol dari *oil palm leaf extract* (OPLE) yang memiliki aktivitas antioksidan tersebut hingga saat ini belum dimanfaatkan secara optimal. Dalam penelitian ini dikembangkan suplemen pangan antioksidan dari OPLE yang kaya senyawa polifenol. OPLE dibuat menggunakan pelarut etanol dan dipekatkan dengan evaporasi vakum, kemudian dipisahkan dengan kromatografi kolom cair-cair dan dilakukan identifikasi senyawa tersebut dengan LC-MS. Hasil total fenolik ekstrak etanol daun sawit mengandung kadar fenolik yang lebih tinggi dibandingkan ekstrak heksana, sementara kadar fenolik dan kadar antioksidan daun tertua lebih tinggi dibandingkan dengan daun ke-17. Pemisahan bahan aktif antioksidan dilakukan dengan kromatografi kolom cair-cair dengan eluen kloroform : metanol = 4: 1 v/v diharapkan dapat memisahkan senyawa-senyawa aktif. Kandungan flavonoid yang terkandung di fraksi tersebut adalah 6-Methoxy-2-[2-(3'-methoxyphenyl) ethyl] chromone. Biotransformasi menggunakan enzim tannase menghasilkan peningkatan kadar flavonoid dan antioksidan ekstrak daun sawit.

Kata kunci: antioksidan, biotransformasi, imunomodulator, OPLE, suplemen

#### PENDAHULUAN

Berdasarkan data Dirjen Perkebunan 2020, luas perkebunan sawit terus meningkat dan diperkirakan mencapai 14.996.010 hektar (Direktorat Jenderal Perkebunan, 2020). Perluasan areal sawit di Indonesia tentu berdampak pada peningkatan limbah daun dan pelepah sawit per tahun. Di areal PTPN VII, pelepah sawit yang dipotong dan dibuang dari setiap pohon mencapai 20.739 BK/ha/tahun (Fakhri *et al.*, 2014). Terdapat beberapa data terkait dengan daun dan pelepah sawit yang paling melimpah adalah bahan kering sebesar 48,78%, bahan ekstrak tanpa

nitrogen (BETN) sebesar 51,87%, serat kasar 31,09%, lignin 16,9%, dan lain-lain termasuk protein kasar 5,3% dan silika 0,6% (Imsya, 2008).

Hal yang menarik dari hasil analisis HPLC ekstrak daun kelapa sawit atau *Oil Palm Leaves Extract* (OPLE) adalah kandungan utama flavonoid yang mirip dengan kandungan teh, yakni epigallocatechin sebanyak 800 mg/kg, catechin 3 g/kg, epicatechin 100 mg/kg, epigallocatechin gallate 2.8 g/kg, epicatechin gallate 500 mg/kg dan glukosida (Jaffri *et al.*, 2011). Penelitian lain juga melaporkan bahwa OPLE memiliki senyawa yang bersifat antioksidan dan fitoestrogenik lain seperti vitamin E,

asam ferulic, asam klorogenik, dan senyawa biofenol lain seperti asam galat dan asam protokatekuik (Namvar *et al.*, 2012). Fitokimia dalam OPLE memiliki nilai lebih sebagai bahan baku farmasi maupun kosmetik (Tow *et al.*, 2021). Secara *In vitro*, flavonoid dan turunannya menghambat berbagai faktor transkripsi, yang memodulasi diferensiasi, proliferasi, aktivasi sel imun dan meningkatkan pembentukan sel T regulator. Beberapa flavonoid memberikan efek anti-inflamasi melalui inhibisi NF- $\kappa$ B dan NLRP3, penghambatan produksi sitokin pro-inflamasi, IL-1 $\beta$ , IL-2, IL-6, TNF- $\alpha$ , IL-17A, *down regulasi* kemokin, dan pengurangan ROS dan nitrogen reaktif. Namun demikian, beberapa laporan telah menunjukkan bahwa beberapa flavonoid meningkatkan respons imun dengan meningkatkan radikal oksigen dan nitrogen, produksi antibodi, aktivitas sitotoksik melawan tumor dengan meningkatkan reseptor aktivator dan menurunkan regulasi reseptor inhibition (Ciz *et al.*, 2012; Ribeiro *et al.*, 2015; Ribeiro *et al.*, 2015; Bukhari *et al.*, 2014; Bukhari *et al.*, 2015)

Dengan memanfaatkan kandungan flavonoid yang melimpah pada OPLE, salah satunya melalui upaya biotransformasi dapat menjadi salah satu sumber antioksidan yang menjanjikan. Biotransformasi dapat dilakukan melalui modifikasi beberapa reaksi enzimatik, seperti hidrosilase, glikotransferase, dan metiltransferase sehingga menghasilkan flavonoid dalam jumlah besar, dengan struktur dan properti molekul yang bervariasi (Bukhari *et al.*, 2014). Walaupun riset terkait dengan efisiensi OPLE sebagai sumber antioksidan sudah cukup banyak dilakukan, namun hingga saat ini belum banyak ditemukan suplemen kesehatan flavonoid berbahan dasar OPLE yang beredar di pasaran, maka tujuan dari penelitian ini untuk memanfaatkan kandungan antioksidan pada OPLE dan mengolahnya menjadi suplemen kesehatan. Diharapkan riset ini dapat meningkatkan manfaat atau *added value* limbah daun dan pelepah sawit secara ekonomi, menjadikan alternatif sumber antioksidan yang potensial dan terjangkau bagi masyarakat luas, serta membantu pemerintah dalam mencapai kebutuhan suplemen kesehatan. Penelitian ini bertujuan untuk menganalisa kadar flavonoid, fenolik dan aktivitas antioksidan ekstrak etanol dan heksana daun sawit yang nantinya akan digunakan sebagai suplemen Kesehatan kaya antioksidan.

## BAHAN DAN METODE

### Bahan

Bahan yang digunakan adalah Daun sawit dari kebun percobaan Pusat Penelitian Kelapa Sawit Unit Bogor (PPKS-UB) dengan varietas DxP tahun tanam 2008, etanol, aseton, kertas saring Whatman, silika gel, metanol, kloroform, AlCl<sub>3</sub>, quercetin, Folin-Ciocalteu, asam galat, Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub>, 2-difenil-1-pikrilhidrazil (DPPH), asam askorbat, enzim tannase, buffer fosfat dan alat gelas umum laboratorium.

### Pembuatan Preparat Daun Kering Kelapa Sawit

Sampel daun diambil dari pelepah kelapa sawit di kebun percobaan Ciomas, PPKS-UB, dengan karakteristik masih segar dan tandan buahnya telah dipanen. Setelah dipisahkan dari lidinya, helai daun dicuci bersih dengan air lalu dipotong dengan ukuran panjang 5 cm dan segera dikeringkan dengan suhu diatur pada 30-50°C hingga kering. Setelah itu, dihaluskan hingga menjadi bubuk menggunakan *blender*.

### Ekstraksi OPLE Dari Daun Kelapa Sawit

Senyawa polifenol diekstraksi dari sampel bubuk daun kering sawit dengan pelarut etanol dan heksana dengan sedikit modifikasi metode Ahmad *et al.* (2018). Alat sokletasi dipasang, kemudian serbuk daun sawit 5 g dibungkus dengan kertas saring, diikat dengan benang, dimasukkan kedalam labu alas bulat pada soklet. Sokletasi dilakukan pada suhu 70°C sampai tetesan siklus tidak berwarna lagi. Ekstrak cair yang diperoleh kemudian dipematkan dengan menggunakan rotary evaporator pada suhu 40°C sampai diperoleh ekstrak kental etanol. Maserat disaring menggunakan filter Whatman dan dipematkan menggunakan evaporator vakum atau *rotary evaporator*. Kandungan fitokimia (total fenolik, dan total flavonoid) dianalisis. Ekstrak kemudian difraksinasi menggunakan kolom kromatografi silika gel dengan variasi pelarut. Fraksi disampling setiap 5 mL dengan kecepatan alir 1 mL/menit. Kemudian setiap fraksi diukur kandungan total fenolik, flavonoid dan diuji komposisinya dengan kromatografi lapis tipis. Beberapa ekstrak dengan komposisi total fenolik tertinggi diuji aktivitas antioksidannya.

### Uji Kandungan Total Flavonoid

Sebanyak 2% AlCl<sub>3</sub> dilarutkan dalam etanol kemudian dicampurkan dengan ekstrak sawit dengan rasio 1:1. Setelah dinkubasi selama 1 jam pada suhu kamar, absorbansi campuran diukur pada panjang gelombang 420 nm dengan senyawa standar *quercetin* (50–500 mg/mL). Konsentrasi flavonoid yang diperoleh dalam mg ekuivalen *quercetin* per gram berat kering sample (mg QE/g d.w.), sementara kandungan total flavonoid dihitung menggunakan rumus :

$$TFC = (c \times V) / m$$

Dimana c = konsentrasi sample dari kurva kalibrasi (mg/ mL), V = volume pelarut etanol (mL), dan m berat kering sampel (g) (Suryati *et al.*, 2016).

### Uji Kandungan Total Fenolik

Sebanyak 100 mL ekstrak ditambahkan 0,2 mL larutan Folin-Ciocalteu dan dinkubasi selama 5 menit di ruang gelap pada suhu kamar. Kemudian ditambahkan 0,6 mL Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> dengan konsentrasi 0.2 mM dan dinkubasi selama 120 menit. Absorbansi campuran diukur pada menggunakan spektrofotometer pada 765 nm dengan senyawa

standar asam gallat (50–500 mg/mL). Konsentrasi fenolik yang diperoleh dalam mg equivalent asam gallat per gram berat sample kering (mg GAE/g d.w.) (Meda *et al.*, 2005).

### Purifikasi Flavonoid Ester

Reaksi dihentikan dengan memindahkan biokatalis dan molecular sieves melalui sentrifugasi. Ekstrak flavonoid yang terpurifikasi diperoleh dengan menggunakan kromatografi kolom silica gel 60A (Merck; Art. 9385), menggunakan pelarut campuran kloroform–metanol dengan peningkatan kepolaran eluen (7:3); (5:5) dan (3:7) v/v. Eluat ditampung sebanyak 10 fraksi ke dalam botol vial. Masing-masing fraksi dianalisa kandungan flavonoid dan antioksidannya menggunakan spektrofotometer. Struktur kimia flavonoid ester ditentukan dengan LC-MS (Oliveira *et al.*, 2009).

### Pengukuran Aktivitas Antioksidan dari OPLE

Aktivitas antioksidan diperiksa berdasarkan penangkapan radikal bebas menggunakan 2,2-difenil-1-pikrilhidrazil (DPPH). Larutan DPPH 0,01 M dibuat dengan melarutkan 39,5 mg DPPH dalam 100 ml metanol. Kemudian dibuat larutan kontrol DPPH dengan cara dipipet 0,1 mL larutan DPPH 0,01 M diencerkan dengan metanol p.a sampai 5 mL. Sampel dilarutkan sesuai dengan pelarutnya sehingga diperoleh konsentrasi 0, 20, 40, 60, 80, 100, 200 ppm. Sebagai baku pembanding, dibuat larutan vitamin C dengan konsentrasi 0,1; 2,5; 5,0; 7,5; dan 10 ppm. Uji aktivitas antioksidan dilakukan dengan menambahkan 0,1 mL DPPH 0,01 M ke dalam deret sampel dan baku pembanding vitamin C, lalu diinkubasi pada suhu 37°C selama 30 menit. Absorban larutan diperiksa dengan menggunakan spektrofotometer UV-VIS pada panjang gelombang 515 nm. Warna DPPH akan berubah dari ungu menjadi kuning apabila ekstrak mengandung antioksidan. Aktivitas antioksidan dihitung berdasarkan persentase inhibisi (*inhibition concentration*) yang diwakili oleh nilai IC<sub>50</sub>.

### Analisis LC-MS

Pengukuran senyawa hasil ekstraksi menggunakan LC-MS dengan detector ESI dengan rasio pemisahan *postcolumn* 2:1. Spektrum massa diperoleh menggunakan instrumen ion trap ESI

source. Nitrogen digunakan sebagai auxiliary gas, sementara helium sebagai collision gas. Spektra ESI MS diperoleh dalam bentuk positif dan negatif ion, dengan kondisi pengujian : *spray voltage*, 4.0 kV; *capillary temperature* 350°C; *capillary voltage* –10 V; *tube lens offset* –30 V. Analisis full scan MS analysis dalam rentang m/z 50–1000.

### Biotransformasi Enzimatis

Ekstrak yang diperoleh dari daun sawit digunakan sebagai substrat untuk hidrolisis enzimatis menggunakan tannase dari *Paecilomyces variotii*. Ekstrak kering sebanyak (5 mg) dilarutkan dalam 1 mL buffer fosfat (pH 7,4; 75 mM) dan diinkubasi dengan 5 mg tannase pada 40°C selama 30 menit. Proses hidrolisis dihentikan dengan menempatkan reaksi di dalam penangas es selama 15 menit. Hasil biotransformasi dilanjutkan untuk uji antioksidan dengan DPPH (Macedo *et al.*, 2011).

## HASIL DAN PEMBAHASAN

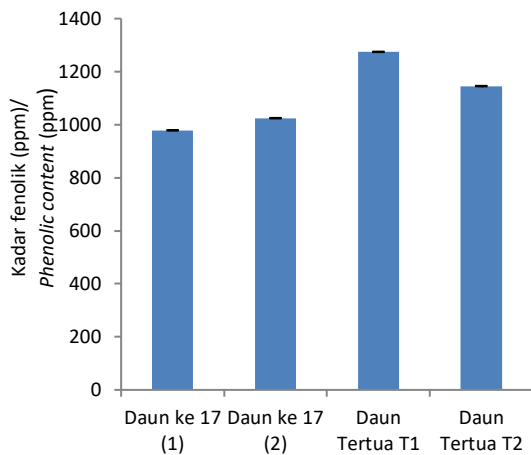
### Produksi OPLE dari Daun Kelapa Sawit

Proses ekstraksi senyawa aktif antioksidan menggunakan dua pelarut etanol dan heksana. Sample dihancurkan untuk memecahkan membran sel sehingga lebih memungkinkan pelarut kontak dengan senyawa bahan aktif sehingga meningkatkan *yield*. Teknik ekstraksi menggunakan teknik soxhletasi (Gambar 1) dengan tujuan untuk dapat menghasilkan ekstrak yang lebih banyak, pelarut yang digunakan lebih sedikit (efisiensi bahan), waktu yang digunakan lebih cepat, dan sampel diekstraksi secara sempurna karena dilakukan berulang-ulang, tetapi tidak mengurangi aktivitas biologis (Heinrich, 2004). Setelah proses ekstraksi dan pemekatan menggunakan *rotary evaporator* sampel dianalisa kandungan total fenolik dan kadar antioksidan (Gambar 2-5). Hasil total fenolik ekstrak etanol daun sawit mengandung kadar fenolik yang lebih tinggi dibandingkan ekstrak heksana.

Kadar fenolik daun tertua lebih tinggi dibandingkan dengan daun ke-17, dimana daun ke-17 mengandung 963,75 ppm (pada pokok 1) dan 1175,417 ppm (pada pokok 2), sementara daun tua mengandung total fenolik 1724,538 ppm ( pokok 1) dan 1720,417 ppm (pokok 2) (Gambar 2).

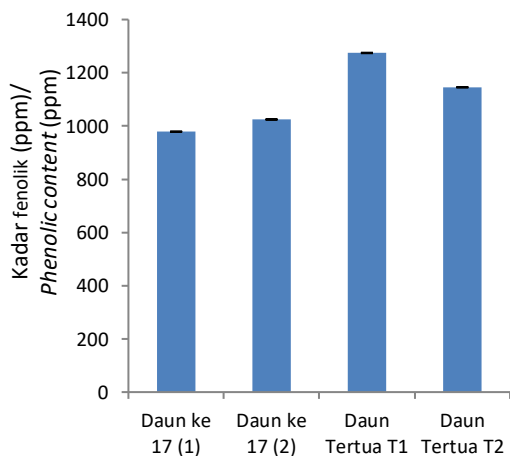


Gambar 1. Tahapan ekstraksi senyawa antioksidan dengan pelarut etanol dan pemekatan dengan *rotary evaporator*



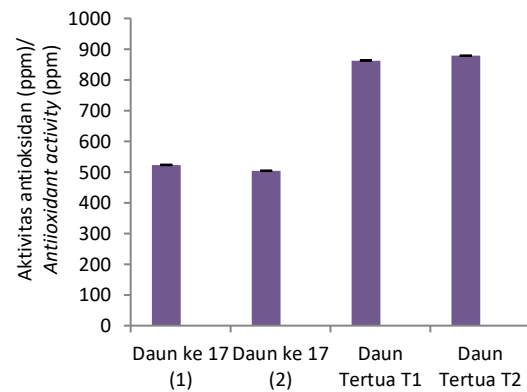
Gambar 2. Kadar fenolik ekstrak etanol daun sawit

Daun tua menghasilkan akumulasi total fenolik yang lebih tinggi dibandingkan daun ke-17. Usia ternyata mempengaruhi jumlah senyawa fenolik yang terkandung di dalamnya. Senyawa fenolik sebagai metabolit sekunder makin terakumulasi seiring dengan bertambahnya usia tanaman. Namun, peran penting dan luas dari metabolit sekunder telah dipahami dan terakumulasi sebagai respons terhadap tekanan lingkungan termasuk serangan patogen, radiasi UV, cahaya tinggi, defisiensi nutrisi, dll. Menurut Bryant *et al.* (1983) konversi karbon untuk pembentukan metabolit sekunder merupakan proses perlindungan tanaman dalam menanggapi stres, misalnya, pembentukan fenil amida dan akumulasi antosianin dan poliamina sebagai respons terhadap stres lingkungan (Akula *et al.*, 2011). Hasil ekstraksi dengan pelarut heksana menghasilkan kadar total fenolik yang lebih rendah dari pelarut etanol. Nilai total fenolik ekstrak heksana untuk daun ke-17 yaitu 978,75 ppm (pokok 1) dan 1024,583 ppm (pokok 2), sementara daun tertua 1274,583 ppm dan 1145,417 ppm (pokok 2) (Gambar 3). Hal ini diduga karena polaritas senyawa-senyawa fenolik relatif polar dengan adanya gugus -OH pada cincin aromatic.

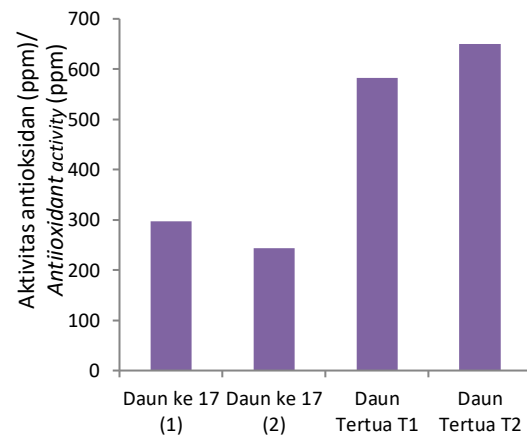


Gambar 3. Kadar fenolik ekstrak heksana daun sawit

Kadar antioksidan ekstrak etanol untuk daun ke-17 yaitu 523,199 ppm (pokok 1) dan 504,109 ppm (pokok 2), sementara daun tertua 863,168 ppm dan 878,621 ppm (pokok 2) (Gambar 4). Sebanding dengan kadar total fenolik yang lebih rendah, aktivitas antioksidan ekstrak heksana juga lebih rendah dibandingkan ekstrak etanol dengan nilai sebagai berikut : daun ke-17 yaitu 296,855 ppm (pokok 1) dan 5244,133 ppm (pokok 2), sementara daun tertua 582,584 ppm dan 649,551 ppm (pokok 2) (Gambar 5). Kadar antioksidan untuk ekstrak etanol dan heksana ditentukan oleh gugus -OH yang berperan dalam aktivitas antioksidan.



Gambar 4. Aktivitas antioksidan ekstrak etanol daun sawit



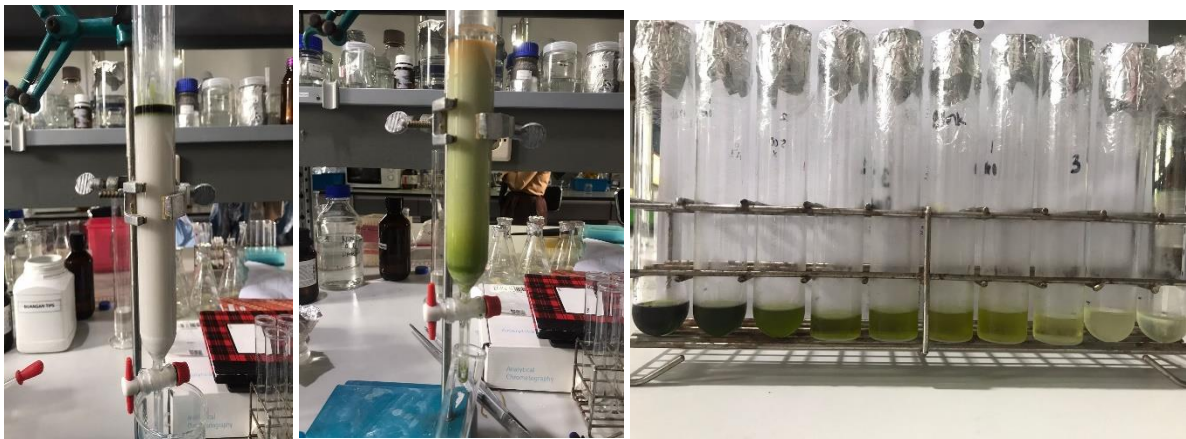
Gambar 5. Aktivitas antioksidan ekstrak etanol daun sawit

Gugus-gugus -OH pada struktur senyawa fenolik menyumbangkan atom H sebagai donor radikal bebas sehingga umumnya menjadikan senyawa fenolik memiliki berbagai manfaat di antaranya: antioksidan, antiinflamasi, antidiabetik, imunoregulasi, antikanker, antimikrobia, melindungi dari penyakit jantung dan sebagainya. Struktur molekul dari senyawa ini dapat memberi elektronnya pada molekul radikal bebas tanpa mengganggu fungsinya dan dapat memutus reaksi berantai dari radikal bebas. Dalam kemampuannya menangkalkan radikal bebas, senyawa

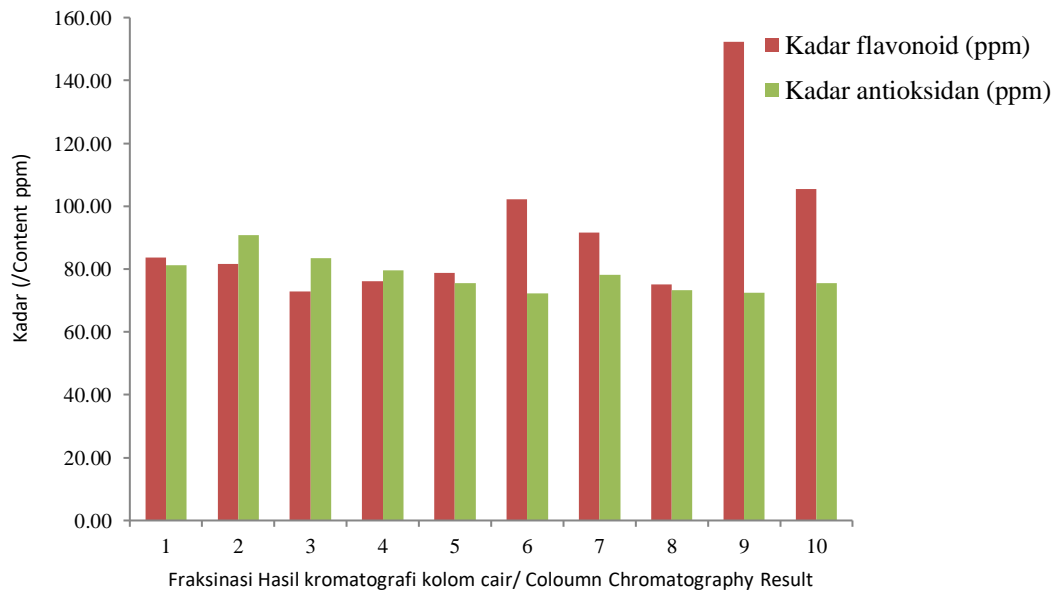
fenolik termasuk antioksidan primer yang berfungsi mencegah pembentukan radikal bebas selanjutnya dengan melepas hidrogen sehingga disebut donor hidrogen atau *scavenger* radikal bebas (Guinda *et al.*, 2015), namun ada juga yang termasuk antioksidan sekunder dengan menangkap radikal bebas kemudian mengubahnya menjadi lebih stabil, umumnya dengan mengkhelat ion atau meredam pembentukan oksigen single. Kemampuan antioksidan senyawa fenolik terbentuk karena adanya hubungan aktifitas atau *structure activity relationship* (SAR), jumlah dan posisi gugus hidroksil, adanya ikatan rangkap dan glikosilasi (Yin *et al.*, 2018).

Pemisahan bahan aktif antioksidan dilakukan dengan kromatografi kolom cair-cair untuk memperoleh yang lebih murni dengan aktivitas antioksidan yang tinggi dengan eluen kloroform : metanol = 4: 1 v/v diharapkan dapat memisahkan senyawa-senyawa aktif (Gambar 6). Dari 10 fraksi yang dihasilkan kadar flavonoid tertinggi diperoleh pada fraksi ke-9, 6 dan 10. Sedangkan aktivitas antioksidan pada fraksi ke-2 dan ke-3 (Gambar 7).

Kandungan flavonoid yang terkandung di fraksi yaitu 6-Methoxy-2-[2-(3'-methoxyphenyl) ethyl] chromone. Senyawa ini telah dilaporkan memiliki beberapa aktivitas biologis, seperti inhibitor acetylcholinesterase, sitotoksik, antibakteri, dan aktivitas neuroprotektif.



Gambar 6. Proses kromatografi kolom sample ekstrak etanol sampel daun sawit

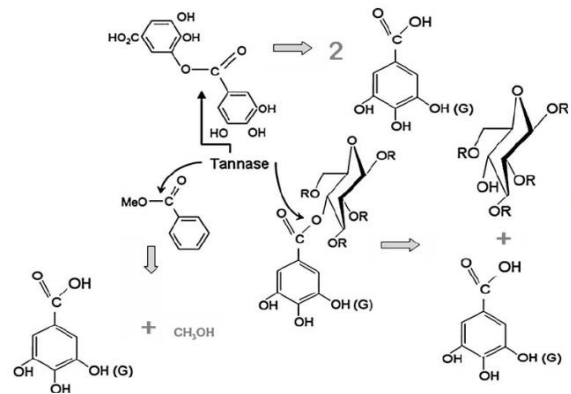


Gambar 7. Kadar flavonoid dan antioksidan hasil fraksinasi kromatografi kolom sample ekstrak etanol sampel daun sawit

Tabel 1. Kandungan senyawa terpenoid, flavonoid dan polifenol hasil pemisahan ekstrak daun sawit dengan kromatografi kolom cair

Kandungan senyawa	Ulangan 2						
	Fraksi 1	Fraksi 2	Fraksi 3	Fraksi 4	Fraksi 5	Fraksi 6	Fraksi 7
Terpenoid	5,6,7,7 $\alpha$ -Tetrahydro-4,4,7 $\alpha$ -trimethyl-2(4H)-benzofuranone	3-Tert-butyl-4-methoxyphenol_1	1,1,6-Trimethyl-1,2-dihydronaphthalene	5,6,7,7 $\alpha$ -Tetrahydro-4,4,7 $\alpha$ -trimethyl-2(4H)-benzofuranone	Ginsenoside F3	1,1,6-Trimethyl-1,2-dihydronaphthalene	Arteannuin A
	Arteannuin A	6,17-Epoxyalthanol-5,15-diacetate-3-phenylacetate	1,4-Diethyl-1,4-dimethyl-2,5-cyclohexadiene	Curculigo saponin A	Platycodigenin_1	4-Methoxypropiofenone	Blumenol C glucoside
	Curculigo saponin A	Digiprolactone	Cuminic aldehyde	Digiprolactone	$\alpha$ -Ionone	5,6,7,7 $\alpha$ -Tetrahydro-4,4,7 $\alpha$ -trimethyl-2(4H)-benzofuranone	Digiprolactone
	Ginsenoside F3	Dihydroactinidiolide	Dictamnol	Erythrocentaurin	-	Curculigo saponin A	$\alpha$ -Ionone
	$\alpha$ -Ionone	Ginsenoside F5	Digiprolactone	Genipin	-	Dictamnol	-
	-	$\alpha$ -Ionone	Dihydroactinidiolide	Ginsenoside F3	-	Digiprolactone	-
			Erythrocentaurin	Pseudoionone_2		Erythrocentaurin	
Flavonoid	-	-	Naringenin-4',7-dimethyl ether	6-Methoxy-2-[2-(3'-methoxyphenyl) ethyl] chromone	6-Methoxy-2-[2-(3'-methoxyphenyl) ethyl] chromone	6-Methoxy-2-[2-(3'-methoxyphenyl) ethyl] chromone	-
			Rhamnazin	Naringenin-4',7-dimethyl ether		Naringenin-4',7-dimethyl ether	
Polifenol	-	-	-	-	-	-	-

Biotransformasi dilakukan menggunakan enzim tannase. Tannase, atau dikenal juga tannin acyl-hydrolase (TAH) (E.C 3.1.1.20) merupakan enzim hidrolitik ekstraseluler yang mengkatalisis hidrolisis dan sintesis ikatan tannin yang mudah terhidrolisis (substrat asam tannin) dan memfasilitasi pelepasan asam galat dan glukosa (Gambar 7) (Shao *et al.*, 2020). Tannase merupakan enzim yang penting dalam memodifikasi struktur catechin teh sehingga dapat meningkatkan kualitas dan bioaktivitasnya. Teh yang ditambahkan tannase menunjukkan aktivitas antioksidan yang lebih tinggi dibandingkan teh hitam biasa karena inhibisi yang efektif dari nitrosamine yang bersifat karsinogenik dan mutagenik. Selain itu juga meningkatkan ketahanan warna dan sifat organoleptik, serta meningkatkan *uptake* seluler dari catechin teh (Govindarajan *et al.*, 2016). Tannase menghidrolisis Epicatechin gallate (ECG) dan Epigallocatechin-3-gallate (EGCG) menjadi Epigallocatechin (EGC), Epicatechin (EC) (Gutha *et al.*, 2010). Senyawa ini memiliki aktivitas antioksidan melalui mekanisme scavenging radikal bebas. Secara umum, radical scavenging activity sample hasil biotransformasi meningkat dengan peningkatan metabolit sekunder yang larut air seperti ECG dan GA (Ong dan Mohamad Annuar, 2017).



Gambar 8. Reaksi enzim tannase pada senyawa flavonoid

Biotransformasi dengan enzim tannase menunjukkan adanya peningkatan kadar antioksidan dan fenolik (Tabel 2 dan 3). Hal ini menunjukkan ada indikasi positif bahwa biotransformasi berhasil tetapi perlu ditingkatkan dengan penambahan waktu inkubasi atau jumlah enzim yang digunakan.

Tabel 2. Hasil analisa antioksidan hasil biotransformasi ekstrak daun sawit menggunakan enzim tannase

Kode sampel	Ulangan	Konsentrasi antioksidan (ppm)	Rata-rata ((ppm))
Ekstrak Heksana	1	159,34	157,97
	2	156,61	
	3	157,97	
Ekstrak Etanol	1	250,69	262,96
	2	276,60	
	3	261,60	
Ekstrak Heksana + Tannase	1	376,13	371,14
	2	369,32	
	3	367,95	
Ekstrak Etanol + Tannase	1	286,14	290,23
	2	291,60	
	3	292,96	

Tabel 3. Hasil analisa flavonoid hasil biotransformasi ekstrak daun sawit menggunakan enzim tannase

Kode Sampel	Ulangan	[Flavonoid] (%)	Rata-rata
Ekstrak Heksana	1	0,10	0,09
	2	0,09	
	3	0,08	
Ekstrak Etanol	1	0,13	0,13
	2	0,14	
	3	0,13	
Ekstrak Heksana + Tannase	1	0,10	0,09
	2	0,09	
	3	0,09	
Ekstrak Etanol + Tannase	1	0,14	0,15
	2	0,15	
	3	0,15	

## KESIMPULAN DAN SARAN

### Kesimpulan

Hasil total fenolik ekstrak etanol daun sawit mengandung kadar fenolik yang lebih tinggi dibandingkan ekstrak heksana, sementara kadar fenolik dan kadar antioksidan daun tertua lebih tinggi dibandingkan dengan daun ke-17. Pemisahan bahan aktif antioksidan dilakukan dengan kromatografi kolom cair-cair dengan eluen kloroform : metanol = 4: 1 v/v diharapkan dapat memisahkan senyawa-senyawa aktif. Kandungan flavonoid yang terkandung di fraksi tersebut adalah 6-Methoxy-2-[2-(3'-methoxyphenyl) ethyl] chromone. biotransformasi menggunakan enzim tannase menghasilkan peningkatan kadar flavonoid dan antioksidan ekstrak daun sawit.

### Saran

Pengujian masih perlu dilanjutkan dengan menggunakan enzim tannase untuk menghasilkan flavonoid dengan aktivitas antioksidan yang lebih tinggi.

## DAFTAR PUSTAKA

- Ahmad N, Hasan ZAA, Muhamad H, Bilal SH, Yusof NZ, Idris Z. 2018. Determination of total phenol, flavonoid, antioxidant activity of oil palm leaves extracts and their application in transparent soap. *Journal Oil Palm Research*. 30(2) : 315–325.
- Akula R dan Ravishankar GA. 2011. Influence of abiotic stress signals on secondary metabolites in plants. *Plant Signal Behaviour* 6(11): 1720-31.
- Bryant, JP, Chapin FSI, Klein DR. 1983. *Carbon/nutrient balance of boreal plants in relation to vertebrate herbivory*. *Oikos*. 40: 357-68.
- Bukhari SN, Tajuddin Y, Benedict VJ, Lam KW, Jantan I, Jalil J, Jasamai, M. 2014. Synthesis and evaluation of chalcone derivatives as inhibitors of neutrophils' chemotaxis, phagocytosis and production of reactive oxygen species. *Chemical Biology & Drug Design*. 83(2): 198-206.
- Ciz, MP, Denev M, Kratchanova O, Vasicek G, Ambrozova, Lojek A. 2012 Flavonoids inhibit the respiratory burst of neutrophils in mammals. *Oxidative Medicine and Cellular Longevity*. Volume 2012. Article ID 181295
- De Oliveira EB, Humeau C, Chebil, L, Maia ER, Dehez F, Maigret B, Engasser JM. 2009. A molecular modelling study to rationalize the regioselectivity in acylation of flavonoid glycosides catalyzed by *Candida antarctica* lipase B. *Journal Molecular Catalysis B: Enzymatic*. 59(1-3): 96-105.
- Direktorat Jenderal Perkebunan. 2020. *Palm Oil Area by Province in Indonesia, 2013-2020*. Kementerian Pertanian RI.
- Elisabeth J dan Ginting, SP. 2003. Pemanfaatan hasil samping industri kelapa sawit sebagai bahan pakan ternak sapi potong, *Prosiding. Lokakarya Nasional Sistem Integrasi Kelapa Sawit*. 110–119.
- Fakhri S, Budiansyah A, dan Kaswari, T. 2014. Pengenalan ransum komplit pellet. *Jurnal. Pengabdian Masyarakat*. 29(4): 11–16.
- Govindarajan RK, Khanongnuch C, Mathivanan K, Shyu DJ, Sharma KP, De-Mandal S. 2021. In-vitro biotransformation of tea using tannase produced by *Enterobacter cloacae*. *Journal Food Science and Technology*. 58 : 3235-3242.
- Guinda A, Castellano M, Santos-Lozano JM, Delgado-Hervás T, Gutiérrez-Adán T, Rada M. 2015. Determination of major bioactive compounds from olive leaf. *Food Science Technology*. 64(1), 431-438.
- Gutha LR, Casassa LF, Harbertson JF, Naidu RA. 2010. Modulation of flavonoid biosynthetic pathway genes and anthocyanins due to virus infection in grapevine (*Vitis vinifera* L.) leaves. *BMC Plant Biology*. 10: 1-18.
- Hassan OA dan Ishida M. 1992. Status of utilization of selected fibrous crop residues and animal performance with special emphasis on processing of oil palm frond (OPF) for ruminant feed in Malaysia. *Tropical Agriculture Research Series*. 24 :135–143.
- Imsya A. 2008. Konsentrasi N-amonia, Kecernaan bahan kering dan kecernaan bahan organik pelepah sawit hasil amoniasi secara in vitro. *Prodising. Seminar. Nasional Teknol. Peternak dan Vet*. 111–115. 13-14 Agustus 2008
- Jaffri JM, Mohamed S, Rohimi N, Ahmad IN, Noordin MM, Manap YA. 2011. Antihypertensive and cardiovascular effects of catechin-rich oil palm (*Elaeis guineensis*) leaf extract in nitric oxide-deficient rats. *Journal Medicinal Food*. 14(7/8): 775–78.
- Jin Y, Li P, dan Wang F. 2018.  $\beta$ -glucans as potential immunoadjuvants: A review on the adjuvanticity, structure-activity relationship and receptor recognition properties. *Vaccine*. 36(35): 5235-5244.
- Meda A, Lamien CE, Romito M, Millogo J, Nacoulma OG. 2005. Determination of the total phenolic, flavonoid and proline contents in *Burkina Fasan* honey, as well as their radical scavenging activity. *Food Chemistry*. 91(3): 571–577.
- Namvar F, Mohamed S, Fard SG, Behravan, J,



- Mustapha NM, Alitheen, NBM, Othman F. 2012. Polyphenol-rich seaweed (*Euचेuma cottonii*) extract suppresses breast tumour via hormone modulation and apoptosis induction. *Food chemistry*. 130(2): 376-382.
- Ong CB dan Annuar MS. 2017. Polyphenolic composition and in vitro antioxidant activities of native-and tannase-treated green tea extracts. *International Journal of Food Science & Technology*. 52(3): 748-756.
- Ribeiro D, Mreitas JL, Lima FC, Fernandes E. 2015. Proinflammatory Pathways: The Modulation by Flavonoids. *Medical Research Review*. 35(5): 877-936.
- Ribeiro D, Freitas M, Tomé SM., Silva AM, Laufer S, Lima JL, Fernandes E. 2015. Flavonoids inhibit COX-1 and COX-2 enzymes and cytokine/chemokine production in human whole blood. *Inflammation*. 38 :858-870.
- Saroni Arwa P, Zeraik ML, Farias-Ximenes V, Da-Fonseca LM, Da-Silva Bolzani V, Siqueira-Silva, DH. 2015. Redox-active biflavonoids from *Garcinia brasiliensis* as inhibitors of neutrophil oxidative burst and human erythrocyte membrane damage. *Journal. Ethnopharmacol.* 174 :410-418.
- Shao Y, Zhang YH, Zhang F, Yang QM, Weng HF, Xia Q, Xiao AF. 2020. Thermostable tannase from *Aspergillus niger* and its application in the enzymatic extraction of green tea. *Molecules*. 25(4) :952.
- Suryati S, Dillasamola D, dan Rahadiant F. 2016. The effect of ethanolic extract of *Vernonia amygdalina*, del leaves on serum creatinin level of male white mice. *Jurnal Sains Farmakologi Klinik*. 3(1): 79-83.
- Tow WK, Goh APT, Sundralingam UD, Palanisamy UD, Sivasothy Y. 2021. Flavonoid composition and pharmacological properties of *Elaeis guineensis* jacq. leaf extracts: A systematic review. *Pharmaceuticals*. 14(10): 1-20.