

IDENTIFIKASI KANDUNGAN SENYAWA ANTIOKSIDAN DALAM KAYU SECANG (*CAESALPINIA SAPPAN*)

(IDENTIFICATION OF ANTIOXIDANT COMPOUND IN SECANG WOOD (*CAESALPINIA SAPPAN*))

Yemirta

Balai Besar Kimia dan Kemasan, Kementerian Perindustrian RI
Jl. Balai Kimia No.1 Pekayon, Pasar Rebo, Jakarta Timur

Email : ye_mirta@yahoo.com

ABSTRAK

Telah diisolasi dua senyawa aktif antioksidan dari kayu secang (*Caesalpinia sappan*). Isolasi dilakukan melalui beberapa tahap pemisahan menggunakan kromatografi kolom dan kromatografi lapisan tipis. Analisis struktur dari kedua isolat dilakukan dengan menggunakan spektrofotometer *UV-Vis*, *FT-IR* dan *GC-MS*. Spektrum *UV-Vis* yang dihasilkan oleh kedua isolat mempunyai panjang gelombang masing-masing 287 nm dan 447 nm. Spektrum *FT-IR* dari kedua isolat memberikan pita serapan pada daerah sidik jari antara 1700 cm^{-1} hingga 1500 cm^{-1} . Sedangkan hasil analisis *GC-MS* salah satu isolat ini mempunyai puncak dan pola fragmentasi yang mirip (yaitu $M^+ = 270$).

Kata kunci : Antioksidan, Kayu secang, Isolasi, Kromatografi kolom, Kromatografi lapis tipis

ABSTRACT

Two antioxidant compounds have been isolated from secang wood (Caesalpinia sappan). Isolation was done by two separation stages. First step using thin layer chromatography and then using column chromatography. The isolated compounds were analyzed using UV-Vis, FT-IR and GC-MS spectrophotometer to detect their structures. Detection using UV-Vis showed the resulted spectra wavelength of 287 nm and 447 nm respectively. By the FT-IR, the spectra range at $1700 - 1500\text{ cm}^{-1}$, while the isolated compounds analysis using GC-MS produced similar peaks and fragmentation patterns ($M^+ = 270$).

Key words : Antioxidant, Secang wood, Isolation, Column chromatography, Thin layer chromatography

PENDAHULUAN

Uji fito kimia yang pernah dilakukan terhadap tanaman secang menyatakan kandungan senyawa triterpenoid, flavonoid, fenolik dan steroidnya positif. Senyawa fenol banyak ditemukan di bagian kayu, senyawa alkaloid banyak ditemukan pada batang dan daunnya, sedangkan buahnya banyak mengandung tanin yaitu kira-kira 40 %.

Sebagaimana diketahui bahwa tanaman yang banyak mengandung senyawa flavonoid dan fenolik akan mempunyai aktivitas antioksidan. Beberapa sifat medis dan aktivitas biologi yang pernah diteliti dari tanaman ini dapat dihubungkan dengan aktivitas antioksidan yang dipunyainya. Hasil penelitian *in vivo* yang pernah dilakukan terhadap tikus menyatakan

bahwa ekstrak kayu secang ini dapat mencegah terjadinya oksidasi dari lemak di dalam jaringan. (Badami *et al.*, 2003)

Berdasarkan laporan berbagai penelitian, kayu secang mengandung senyawa homoiso-flavonoid, pewarna merah saponin, tanin, asam galat dan brazilin. Batang dan daun tumbuhan ini mengandung alkaloid, flavonoid, tanin, brazilin, saponin dan fitosterol serta buahnya mengandung tanin. Beberapa senyawa fenolat telah diisolasi dan diidentifikasi dari secang diantaranya brazilin, sappankalokon, saponin A, saponin B dan 3-hidroksi sappanon (Saitoh *et al.*, 1986).

Antioksidan merupakan suatu senyawa yang memperlambat atau mencegah proses

menghentikan reaksi berantai. (Aquino *et.al.*, 2002)

Selain gugus fenol, gugus flavonoid juga dapat menghambat peroksidasi lipid dengan cara meredam radikal peroksil yang sekaligus mengakhiri reaksi radikal dan memadamkan O₂ tunggal. Ada beberapa kelas flavonoid yang memiliki aktivitas antioksidan yaitu flavon, flavanon, isoflavon, flavonol, flavan-3 ol dan antosianin.

Antioksidan dapat juga digunakan sebagai *food supplement* antara lain: vitamin A (karoten, likopen), C dan E, flavonoid (quercetin) senyawa selen (Se) dan Seng (Zn), ubiquinon (co-enzim Q10), pycnogenol (OPC) dan asam amino berisi belerang yaitu asetil/sistein, metionin dan taurin.

BAHAN DAN METODE

Bahan

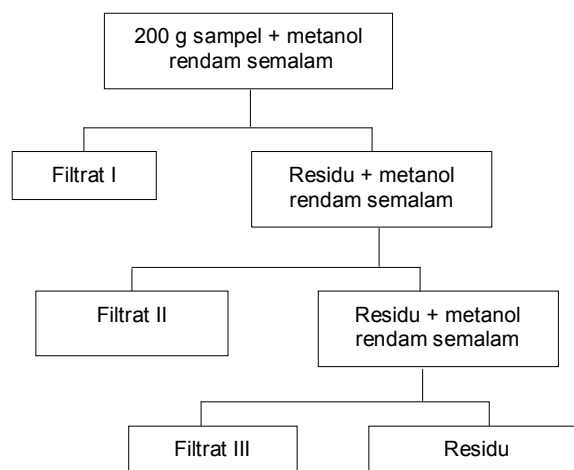
Bahan baku yang digunakan pada penelitian ini adalah kayu secang yang diperoleh dari pedagang di pasar Beringharjo Yogyakarta. Bahan kimia yang digunakan adalah : pelarut metanol, *n*-heksan, etil asetat, kloroform, BHA, BHT, β-karoten, asam linoleat, tween 80, air bebas ion, DPPH, silika gel F₂₅₄ dan silika gel 60 g. Pertama-tama persiapan bahan baku dengan proses ekstraksi dengan metode perendaman atau maserasi Kayu secang yang sudah berupa serpihan kayu dihancurkan dengan *crusher* kemudian dihaluskan dengan *blender* sehingga membentuk serbuk kayu yang halus.

Peralatan yang digunakan dalam penelitian ini adalah *crusher*, *blender*, alat-alat gelas, *rotary evaporator*, kolom kromatografi, *chamber*, *water bath*, lampu UV. Masing – masing isolat dianalisis struktur kimianya dengan spektrofotometer UV-Vis, FT-IR dan GC-MS.

Motode

Ekstraksi Serbuk Kayu Secang (Maserasi/Perendaman)

Dua ratus gram serbuk kayu secang direndam dengan 400 mL metanol kemudian diinapkan selama 24 jam, disaring, dan filtrat dikumpulkan filtrat dalam erlenmeyer. Residu direndam lagi dengan metanol, dan diinapkan selama 24 jam. Lakukan cara yang sama sehingga didapatkan filtrat dari rendaman kayu secang selama 3 x 24 jam (seperti Gambar 4)



Gambar 4. Alur proses ekstraksi

Untuk proses ekstraksi dengan pelarut kloroform dan etil asetat, dilakukan juga dengan cara perendaman seperti proses ekstraksi dengan pelarut metanol. Setelah didapatkan ekstrak dalam bentuk filtrat, selanjutnya dilakukan proses penguapan pelarut, dimana masing-masing pelarut diuapkan dengan *rotary evaporator* pada temperatur dan tekanan yang sesuai untuk masing-masing pelarut sampai didapatkan ekstrak kasar yang sudah kering.

Identifikasi Awal dengan Kromatografi Lapisan Tipis (KLT)

Sebelum dilakukan pemisahan dengan kromatografi kolom masing-masing ekstrak terlebih dahulu diuji dengan Kromatografi Lapisan Tipis, dengan menggunakan plat silika gel 60 F₂₅₄ sebagai fase diam, dan sebagai fase gerak digunakan campuran *n*-heksan dengan etil asetat dengan perbandingan mulai (9:2). Setelah dilakukan penotolan dan proses KLT akan didapatkan beberapa noda dan masing-masing noda dihitung nilai R_f-nya dengan menggunakan persamaan (1).

$$R_f = \frac{\text{Jarak batas bawah dengan noda}}{\text{Jarak batas bawah dengan batas atas}} \dots(1)$$

Isolasi dengan Kromatografi Kolom

Pertama disiapkan kolom kromatografi dengan silika gel, kemudian masukkan ekstrak kasar dari kayu secang. Isolasi dilakukan dengan menambahkan eluen dengan perbandingan *n*-heksan : etil asetat = (11:2), (8: 2), (7:3), (6:4) dan (4:6)

Setiap eluen yang keluar ditampung dengan botol sampel, dimana setiap botol berisi 5 mL eluen. Kemudian pelarut dalam setiap botol diuapkan, dan dilakukan lagi uji KLT. Botol yang mempunyai nilai Rf yang sama digabung, dilakukan kristalisasi, dan ditimbang setelah terjadi pengkristalan. Untuk isolat yang mempunyai lebih dari satu spot dilakukan lagi isolasi dengan kolom yang lebih kecil dan fase gerak yang berbeda (2:8 dan (2:11)).

Spektrofotometer UV-Vis

Sampel yang akan dianalisa dilarutkan dengan metanol, kemudian absorbansi sampel diukur pada panjang gelombang λ 200 nm sampai λ 900 nm. Catat panjang gelombang (λ) disaat mempunyai nilai absorbansi maksimum.

Spektrofotometer FT-IR

Sampel berupa kristal dicampur dengan KBr kemudian digerus sampai halus dan tercampur homogen. Campuran di atas dibuat pelet yang tipis dan transparan, kemudian dianalisa dengan menggunakan FT-IR.

Analisis GC-MS

Sampel yang akan dianalisis dilarutkan dengan metanol. Alat GC-MS diatur kondisinya. Satu L sampel diinjeksikan ke alat apabila alat telah mencapai kondisi operasi yang diinginkan dan rekam kromatogram yang dihasilkan.

HASIL DAN PEMBAHASAN

Hasil Ekstraksi Sampel dan Kromatografi Lapisan Tipis (KLT)

Hasil ekstraksi dengan menggunakan 3 jenis pelarut, diperoleh persentase ekstrak kasar seperti yang tertera pada Tabel 1.

Pemilihan 3 jenis pelarut dilakukan dengan tingkat kepolaran yang berbeda, ini sangat berguna untuk menentukan jenis pelarut mana yang mempunyai persentase yang terbesar dan mempunyai sifat *radical scavenger* serta aktivitas antioksidan yang terbaik. Hasil KLT dari ketiga ekstrak kasar yang didapatkan ternyata menunjukkan hasil pemisahan yang sama dimana ketiganya mempunyai dua spot yang terpisah baik (tidak bewarna) sementara satu spot masih tetap di bawah (tidak terangkat) dengan warna coklat. Ini menandakan ketiga ekstrak tersebut mengan-

Tabel 1. Hasil Ekstraksi dengan 3 Jenis Pelarut

No	Jenis pelarut	Warna ekstrak	% ekstrak
1	Metanol	Merah kecoklatan	10,13
2	Etil asetat	Oranye	4,8
3	Kloroform	Oranye kekuningan	0,41

Tabel 2. Hasil KLT Ekstrak Kasar

No	Jenis ekstrak	Rf
1	Metanol	0,5 dan 0,13
2	Etil asetat	0,46 dan 0,14
3	Kloroform	0,46 dan 0,15

andung minimal 2 komponen yang mirip (karena mempunyai nilai Rf yang hampir sama), dan masih mempunyai komponen-komponen lain yang belum terpisahkan dengan menggunakan eluen *n*-heksan:etil asetat (2:11). Nilai Rf dari masing-masing spot dapat dilihat pada Tabel 2.

Hasil Isolasi Ekstrak Kasar Metanol

Empat gram ekstrak kasar metanol yang diisolasi didapatkan pada botol ke 25 sampai botol ke 42 isolat yang mempunyai nilai Rf yang sama yaitu 0,37. Setelah digabung dan diuapkan pelarutnya didapatkan isolat bewarna putih, dengan berat 66,0 g (Isolat I). Sedangkan untuk botol-botol lain yang mempunyai noda pemisahan yang sama digabung, didapat hasil pemisahan dan nilai Rf seperti pada Tabel 3.

Untuk isolat yang belum terpisah baik dengan jumlah yang lebih banyak yaitu isolat E dilakukan lagi isolasi sampai didapatkan hasil KLT seperti pada Tabel 4.

Tabel 3. Hasil KLT Isolasi dari Ekstrak Metanol

No	Isolat	Rf	Berat (mg)
1	I	0,37	66,0
2	C	2 noda belum terpisah bagus	40,3
3	D	4 noda belum terpisah bagus	48,5
4	E	4 noda belum terpisah bagus	224,1

Tabel 4. Hasil KLT Isolat E

No	Isolat	Rf	Berat (mg)
1	II	0,67	114.
2	III	0,22 dan 0,3	43,5

Setelah dilakukan kristalisasi, yaitu dengan melarutkan masing-masing isolat dalam pelarut metanol dan dibiarkan sampai metanolnya menguap, maka didapatkan isolat II berupa kristal yang berwarna kuning oranye sedangkan untuk isolat III berupakristal yang berwarna oranye dalam jumlah yang lebih sedikit apabila dibandingkan dengan isolat II.

Hasil Analisis dengan Spektrofotometer UV-Vis

Untuk menentukan panjang gelombang (λ) maksimum dari sampel (isolat II) maka dilakukan pengukuran absorbansi sampel dengan menggunakan spektrofotometer UV-Vis pada panjang gelombang (λ) diantara 200 nm sampai 900. Ternyata sampel (isolat II) yang dilarutkan dengan menggunakan pelarut metanol mempunyai serapan maksimum pada panjang gelombang (λ) 287 nm. Gugus yang mempunyai serapan maksimum pada sekitar panjang gelombang (λ) 287 nm ini diperkirakan gugus fenol, yang diketahui merupakan gugus yang aktif sebagai antioksidan. (Dudley *et.al.*, Schwarz *et.al.*, 2001)

Hasil Analisis dengan FT-IR

Hasil analisis dari isolat II dengan FT-IR memberikan pita serapan di daerah bilangan gelombang : 2945 cm^{-1} dan 2865 cm^{-1} , yang merupakan vibrasi ulur dari $-\text{CH}_2-$ dan $-\text{CH}_3$ alifatik yang didukung oleh adanya vibrasi tekuk pada pita serapan di daerah bilangan gelombang 1392 cm^{-1} . Daerah serapan pada bilangan gelombang 2800 cm^{-1} hingga 3000 cm^{-1} merupakan daerah karakteristik C-H alifatik, sedangkan daerah serapan 2500 cm^{-1} hingga 3000 cm^{-1} merupakan daerah serapan OH dan COOH. Pita serapan di daerah bilangan gelombang 1330 cm^{-1} menunjukkan adanya gugus keton (gugus C=O). Pada pita serapan di daerah bilangan gelombang 1644 cm^{-1} menunjukkan adanya gugus alkena (C=C). Pada sampel juga timbul pita serapan di daerah bilangan gelombang 1614 cm^{-1} , sedangkan pita serapan pada bilangan gelombang 1555 cm^{-1}

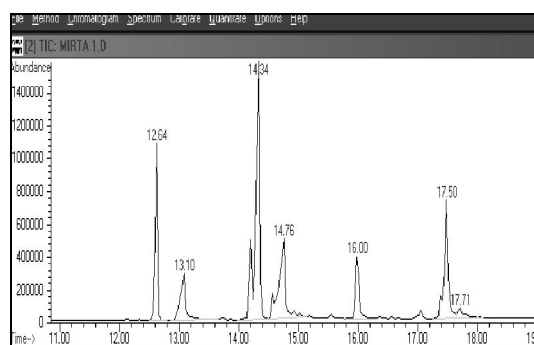
menunjukkan adanya cincin aromatik. (Dudley *et.al.*; Lemmens *et.al.*, 1992; Schwarz *et.al.*, 2001)

Hasil Analisis dengan GC-MS

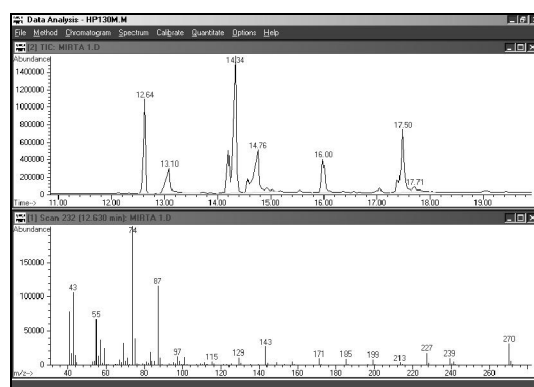
Sesuai dengan alat yang digunakan yaitu gabungan GC (*Gas Chromatography*) dengan MS (*Mass Spectro-meter*) maka pada analisis ini akan dibedakan atas 2 bagian : pengukuran dengan GC bertujuan untuk memisahkan komponen-komponen kimia dalam sampel, sedangkan MS bertujuan untuk menentukan berat molekul dengan pola fragmentasi.

Dari analisis isolat II dengan kromatografi gas ini, didapatkan kromatogram seperti Gambar 5, dimana isolat tersebut belum murni karena masih terdiri dari beberapa komponen, setiap komponen mempunyai waktu retensi yang berbeda-beda yang berarti komponen tersebut mempunyai sifat yang berbeda pula.

Berdasarkan bentuk puncaknya, dimana puncak dengan waktu retensi 12,64; 13,10 dan 16,00 menit mempunyai bentuk yang lebih baik diantara puncak-puncak yang lain maka untuk pembahasan lebih lanjut akan dilihat pola



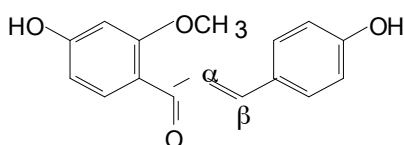
Gambar 5. Kromatogram GC dari Isolat II



Gambar 6. Bentuk Fragmentasi dari Puncak dengan Rt 12,64

Tabel 5. Nilai m/z dan perkiraan gugus molekul

m/z	Perkiraan gugus molekul berdasarkan massanya
87	$\text{CH}_2=\text{CH}-\overset{+\text{OH}}{\text{C}}-\text{OCH}_3$
74	$\text{CH}_2=\text{C}(\text{OH})\text{CCH}_3^+$
55	C_4H_7^+
43	CH_3CO^+ atau C_3H_7^+



Gambar 7. Struktur kimia 4-4'-dihidroksi-2'-metoksikalkon

fragmentasi dari masing-masing puncak tersebut, dan dengan membandingkan nilai M^+ nya dengan nilai M^+ yang ada pada literatur sehingga kemungkinan-kemungkinan bentuk struktur molekulnya dapat diperkirakan. Untuk komponen yang mempunyai waktu retensi 12,64 menit, mempunyai pola fragmentasi seperti Gambar 6, dimana komponen tersebut mempunyai nilai $M^+ = 270$, dengan nilai m/z dan perkiraan gugus molekulnya seperti pada Tabel 5.

Dari literatur diketahui bentuk senyawa yang terdapat dalam kayu secang (*Caesalpinia sappan* L) yang mempunyai nilai $M^+ = 270$ adalah senyawa homoisoflavonoid dengan nama 4-4'-dihidroksi-2'-metoksikalkon (Namikoshi *et.al.*, 1987). Adapun rumus molekul dari senyawa ini adalah $\text{C}_{16}\text{H}_{14}\text{O}_4$ dan mempunyai struktur molekul seperti Gambar 7.

Berdasarkan struktur molekul tersebut, diperkirakan senyawa 4-4'-dihidroksi-2'-metoksikalkon mempunyai aktivitas antioksidan karena mempunyai 2 gugus OH yang berperan penting dalam memberikan aktivitas antioksidan. Yang bersifat lebih polar mempunyai gugus OH yang lebih banyak sehingga sifat antioksidannya lebih baik.

KESIMPULAN

Ekstrak metanol dari kayu secang mengandung beberapa komponen, ini terlihat

dari hasil isolasinya masing-masing mempunyai nilai Rf 0,37 dan 0,67. Untuk komponen yang mempunyai nilai Rf 0,67 mempunyai serapan maksimum pada panjang gelombang (λ) 287 nm ini diperkirakan gugus fenol. Dari hasil GC-MS diperkirakan salah satu komponen kimia yang terkandung dalam kayu secang adalah 4-4'-dihidroksi-2'-metoksikalkon.

DAFTAR PUSTAKA

- [1] Aquino R, Caceres A, Morelli S, Rastelli L. 2002. An Extract of *Tagetes lucida* and its Phenolic Constituents as Antioxidants, *J. Nat. Prod.* 65, 1773-1776.
- [2] Badami S, Shudeer M. Sujay R.R. Elango K, Suresh B. 2003. Antioxidant Activity of *Caesalpinia sappan* Heartwood. *J.S.S. College of Pharmacy, Rocklands, Ootacamund-643 001, Tamilnadu, India.*
- [3] Dudley W.H, Fleming I. *Spectroscopic Methods in Organic Chemistry* 3rd ed. McGRAW-HILL Book Company (UK) Limited
- [4] Lemmens R.H.M.J, Wulijarni, Soetjipto N, 1992, Plant Resources of South-East Asia No.3 Dye and Tanin-Producing Plants, *Prosea Bogor*, 60-62.
- [5] Namikoshi M, Nakata H, Saitoh T. Homoisoflavonoids From *Caesalpinia Sappan*. 1987. Faculty of Pharmaceutical Sciences, Teikyo University, Sagamiko, Kanagawa 199-01, Japan, *Phytochemistry*, 26 (6), 1831-1833.
- [6] Saitoh T, Shakashita S, Nakata H, Shimikawa T, Kinjo J, Yamahara J, Yamasaki M and Nohora T. 1986. 3-Benzylchroman derivative related to brazilin from *Sappan lignum*, *Chem. Phar.Bull.* 34; 2506-2511.
- [7] Schwarz K, Bertelsen G, Nissen L.R, Gardner P.T, Heinonen M.I, Hopia A, Huynh-Ba T, Lambelet P, McPhai D, Skibsted L.H, Tijburg L. 2001. Investigation of Plant Extracts for the Protection of Processed Foods Against Lipid Oxidation: Comparison of Antioxidant Assays Based on Radical Scavenging, Lipid Oxidation and Analysis of the Principal Antioxidant Compounds, *Eur Food Technology* 212: 319-328.