

ISOLASI SENYAWA ASAM LEMAK DAN UJI BIOAKTIVITAS ANTIOKSIDAN DARI TUMBUHAN KACANG KAYU (*Cajanus cajan* (L) Millsp) DARI PULAU POTERAN-MADURA

Debora Ariyani^{1*}, Dini Nur Fauzia², Taslim Ersam³

¹Jurusan D3 Teknik Pengolahan Migas, STT Migas Balikpapan
Jl. Transad, KM 8 Balikpapan 76125

²Jurusan D3 Teknik Pengolahan Migas, STT Migas Cilacap
Jl. Seto No. 1B Gumilir Cilacap 53231

³Jurusan Kimia, Institut Teknologi Sepuluh Nopember
Jl. Kampus ITS keputih, Sukolilo Surabaya 60111

*Email : debora.ariyani88@gmail.com

ABSTRAK

Radikal bebas merupakan molekul atau atom yang tidak stabil karena memiliki satu atau lebih elektron yang tidak berpasangan. Ketika radikal bebas ini mengambil elektron dari sel tubuh manusia, dapat menyebabkan perubahan struktur DNA (*Deoxyribo Nucleic Acid*) sehingga timbul sel-sel mutan. Zat yang dapat menunda atau mencegah terjadinya reaksi oksidasi radikal bebas adalah antioksidan. Dalam penelitian ini dilakukan isolasi senyawa asam lemak dari tumbuhan kacang kayu (*Cajanus cajan* (L) Millsp) yang terdapat di Pulau Poteran-Madura serta menentukan bioaktivitas antioksidannya. Selain itu pada penelitian ini dilakukan uji pendahuluan antioksidan aktivitas, antioksidan dari turunan senyawa terpenoid secara menggunakan DPPH (2,2-difenil-1-pikrilhidrazil). Metode isolasi yang digunakan adalah maserasi dengan pelarut metanol yang kemudian difraksinasi. Ekstrak pekat metanol difraksinasi dengan Kromatografi Cair Vakum (KCV) menggunakan eluen metilen klorida dan etil asetat yang berdasarkan perbedaan kepolarannya. Fraksi yang dihasilkan kemudian dimurnikan dengan rekristalisasi menggunakan pelarut etil asetat dan n-heksana. Senyawa murni yang diperoleh dilakukan uji titik leleh, serta dilakukan uji pendahuluan bioaktivitas antioksidan dengan metode DPPH.

Kata Kunci: *Cajanus cajan*, Antioksidan, DPPH (2,2-difenil-1-pikrilhidrazil)

PENDAHULUAN

Radikal bebas merupakan molekul atau atom yang tidak stabil karena memiliki satu elektron yang tidak berpasangan. Radikal bebas ini berbahaya karena sangat reaktif mencari pasangan elektronnya. Radikal bebas dapat dihasilkan dari hasil metabolisme tubuh dan faktor eksternal seperti asap rokok, hasil penyinaran ultra violet, zat kimiawi dalam makanan dan polutan lain (Jati, 2008). Radikal bebas yang mengambil elektron dapat menyebabkan perubahan struktur DNA (*Deoxyribo Nucleic Acid*), sehingga timbul sel-sel mutan. Bila perubahan DNA ini terjadi bertahun-tahun, maka dapat menyebabkan penyakit kanker. Tubuh manusia dapat menghasilkan antioksidan, tetapi jumlahnya seringkali tidak cukup untuk menetralkan radikal bebas yang masuk ke dalam tubuh, maka diperlukan makanan yang dapat menghasilkan antioksidan, maka diperlukan makanan yang dapat menghasilkan antioksidan. Zat yang dapat menunda atau mencegah

terjadinya reaksi oksidasi radikal bebas dalam oksidasi lemak adalah antioksidan (Kochar dan Rosell, 1990).

Sampai saat ini telah diketahui beberapa senyawa baru hasil isolasi tumbuhan obat dari golongan alkaloid, terpenoid, flavonoid dan santon yang memiliki aktivitas antioksidan secara *in vitro* dan *in vivo*. yang positif mempunyai aktivitas antioksidan melalui uji DPPH (Awouafack, 2012). Di Indonesia salah satu pulau penghasil tumbuhan yang mengandung senyawa antioksidan adalah pulau Poteran-Madura. Pulau Poteran merupakan pulau kecil terluar yang terletak di Pulau Madura.

Beberapa tumbuhan yang terdapat di pulau Poteran tersebut diantaranya: Kacang kayu (*Cajanus cajan* (L.) Millsp), Mimba (*Azadirachta indica*), Cabe Jamu (*Piper retrofractum*, Vahl), Kesambi (*Schleichera aleosa*), Saga (*Adenanthera pavonima*), Waru (*Hibiscus tiliaceus*), Pulai (*Alstonia scholaris*), Kelor (*Moringa oleifera*), Sukun (*Artocarpus altius*), Juwet (*Syzygium*

cumini). Pada penelitian ini dipilih tumbuhan kacang kayu (*Cajanus cajan* (L.) Millsp) yang dimanfaatkan oleh penduduk sekitar sebagai obat gangguan pada kulit, demam, herpes, cacangan, batuk berdahak, luka dan memar. Pada penelitian ini akan dilakukan penentuan aktivitas senyawa dari tanaman kacang kayu asal Pulau Poteran (*Cajanus cajan* (L.) Millsp) dari famili *fabacea*. Kacang kayu ini berpotensi mengandung senyawa terpenoid yang diharapkan dapat berpotensi sebagai antioksidan.

METODOLOGI PENELITIAN

Alat

Alat-alat yang digunakan dalam penelitian ini yaitu seperangkat alat gelas (gelas beker, gelas ukur, gelas vial kecil, gelas vial besar, erlenmeyer, labu bundar, dan corong kaca), bejana maserasi, chamber KLT, kaca arloji, pipet tetes, pipet kapiler, pinset, spatula, cawan porselen, cawan petri, *hot plate*, penyaring Buchner, pompa vakum, *rotary vacuum evaporator*, neraca analitik, timbangan digital, seperangkat alat kromatografi cair vakum (KCV), seperangkat alat kromatografi kolom grafitasi (KKG), seperangkat alat kromatografi lapis tipis (KLT), plat tetes, pipa kapiler, *Fisher John Melting Point Apparatus*, botol semprot, spektrofotometer UV, spektrofotometer IR, lampu UV 254 dan 366 nm, dan spektrometer ¹H-NMR dan ¹³C-NMR.

Bahan

Bahan yang akan digunakan untuk isolasi senyawa terdiri dari tumbuhan *Cajanus cajan* (L.) Millsp., pelarut organik seperti n-heksana, metilen klorida, kloroform, etil asetat, aseton, metanol, aquades, etanol, kapas steril, aluminium foil, kertas saring Whatman 40, silica gel 60 (35-70 mesh) untuk kromatografi kolom, plat silica gel Merck 60 F254 0,25 mm ukuran 20 x 20 cm dengan aluminium sebagai fasa diam, plat silica gel Merck 60 F254 0,5 ukuran 20 x 20 cm dengan kaca sebagai penyangga fasa diam, pereaksi penampak noda serum sulfat, larutan FeCl₃ 1% dalam metanol, HCl pekat, natrium hidroksida, aluminium klorida, natrium asetat, asam borat, larutan buffer asetat, L-ascorbic acid, 2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl (DPPH).

Prosedur Penelitian

Isolasi Senyawa Asam Lemak:

Serbuk halus tumbuhan *C. cajan* (L.) Millsp. (2,25 kg) dimaserasi dengan metanol

selama 3 x 24 jam. Ekstrak metanol pekat (2x40 gram) difraksinasi dengan kromatografi cair vakum (KCV) dengan eluen n-heksana : etil asetat yang ditingkatkan kepolarannya (5-100%) menghasilkan 10 fraksi gabungan (A-J). Fraksi yang terdiri dari senyawa yang non polar lain ditunjukkan pada fraksi B, C dan D. Sementara fraksi E, F, G, dan H, senyawa-senyawa yang terkandung terdistribusi secara merata. Fraksi I dan J terdiri dari beberapa senyawa yang memiliki tingkat kepolaran yang tinggi. Kromatogram fraksi gabungan memperlihatkan profil noda berwarna ungu yang intens pada fraksi D, sehingga pada fraksi D ini diperkirakan terdapat senyawa target terpenoid yang cukup banyak. Pada saat dilakukan pelarutan fraksi D ini terbentuk endapan putih. Endapan ini ditampung lalu dikeringkan lalu diuji monitoring KLT. Hasil monitoring KLT menunjukkan noda tunggal. Lalu direkristalisasi sehingga diperoleh padatan putih (30 mg) disebut sebagai senyawa 1.

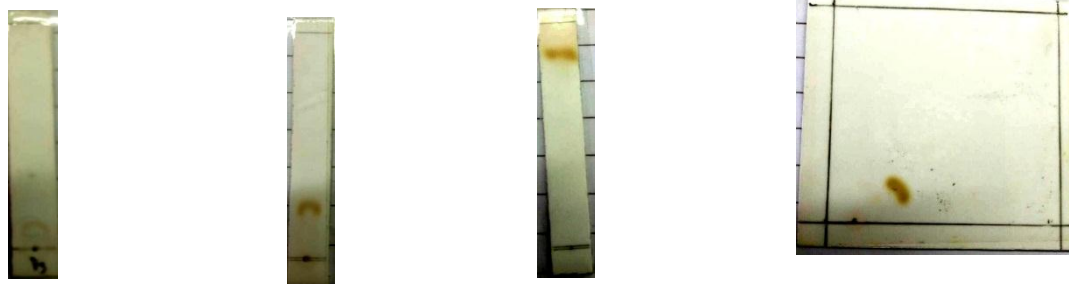
Untuk mengetahui kemurnian senyawa hasil isolasi dilakukan uji KLT tiga eluen yang berbeda kepolarannya dan pengukuran titik leleh. Kemudian dilanjutkan dengan analisis spektroskopi yang meliputi UV – Vis, IR, ¹H-NMR dan ¹³C-NMR.

Penentuan Aktifitas antioksidan :

Satu mL larutan sampel senyawa 1 dengan konsentrasi yang bervariasi dimasukkan ke dalam tabung reaksi dan ditambahkan 3 mL larutan DPPH 0.004% (b/v) dalam metanol. Campuran dikocok kuat dan diinkubasi pada suhu 37°C selama 30 menit lalu diukur absorbansnya menggunakan spektrofotometer UV-tampak pada λmaks 515.5 nm. Asam askorbat digunakan sebagai kontrol positif. Nilai konsentrasi penghambat 50% (IC₅₀) dihitung menggunakan persamaan regresi linear hubungan antara konsentrasi dan % inhibisi.

HASIL DAN PEMBAHASAN

Berdasarkan serangkaian proses fraksinasi yang telah dilakukan terhadap ekstrak metanol berhasil diperoleh senyawa terpenoid. Senyawa ini diperoleh sebagai padatan berwarna putih dengan titik leleh 137°C. Hasil KLT uji tiga eluen untuk menunjukkan bahwa senyawa 1 tersebut merupakan senyawa murni dapat dilihat pada gambar berikut yang disertai KLT 2 dimensi:



HX:MC 12

Gambar 1. Uji 3 Eluen dan uji 2 dimensi

Senyawa **1** diperoleh sebagai padatan jarum berwarna putih dengan titik leleh 74-75 °C. Spektrofotometer Inframerah juga mendukung keberadaan terpen dengan terdapatnya serapan untuk beberapa gugus fungsi. Adanya gugus hidroksi pada 3413.77 cm^{-1} , serapan pada daerah 2848,67; 2916,17 dan 2954.74 cm^{-1} menunjukkan sistem CH sp^3 alifatik dan serapan pada 1735,81 dan 1708,81 cm^{-1} menunjukkan adanya karbonil (C=O).

Data pergeseran (δ) $^1\text{H-NMR}$ dan $^{13}\text{C-NMR}$ merupakan data penting untuk menentukan struktur hasil isolasi karena dari data tersebut dapat diketahui jenis, lingkungan dan integrasi (jumlah) proton maupun karbon. Pengukuran NMR dilakukan dengan menggunakan pelarut kloroform (CDCl_3), Senyawa **1** dengan frekuensi 400 MHz.

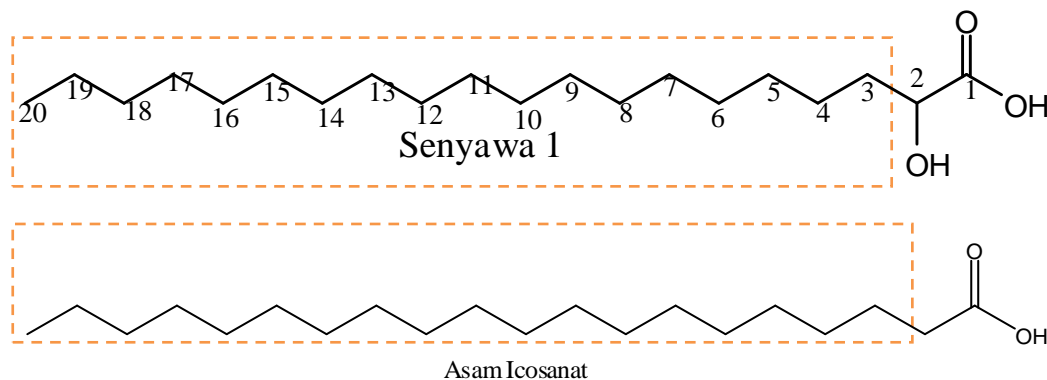
Dari data pergeseran (δ) $^1\text{H-NMR}$ senyawa **1** dapat memberi informasi adanya 40 jenis proton, sedangkan data pergeseran (δ) $^{13}\text{C-NMR}$ senyawa hasil isolasi dapat diketahui informasi adanya 20 jenis karbon.

Berdasarkan spektrum NMR membuktikan bahwa senyawa **1** adalah turunan asam lemak. Karakteristik senyawa ini adalah adanya sinyal proton pada pergeseran sinyal 1 proton metilen (CH_2) pada pergeseran δ_{H} 1,5 ppm (3H, *m*) juga teramati pada senyawa ini. Satu sinyal proton

pada pergeseran δ_{H} 0,87 ppm (3H, *t*). Sinyal singlet dengan puncak tinggi pada pergeseran δ_{H} 1,23 ppm (32H, *s*) yang membentuk konstanta kopling yang besar mengindikasikan adanya struktur rantai panjang senyawa **1** merupakan ciri khas dari rantai asam lemak.

Spektrum $^{13}\text{C-NMR}$ senyawa **1** memperlihatkan adanya sinyal karbonil pada δ_{C} 178 ppm, 18 sinyal metilen ditunjukkan pada δ_{C} 31,9 ppm dan 22,7-29,8 ppm dan sinyal 1 metil terdapat pada pergeseran δ_{C} 14,2 ppm. Sekelompok sinyal pada pergeseran kimia yang khas dan sesuai ikatan rantai panjang yang terletak pada pergeseran δ_{H} 1,23 ppm (32H, *s*) merupakan ciri khas dari asam lemak. Pada C_1 terikat dengan gugus hidroksi (OH) pada pergeseran δ_{C} 1,56 (2H, *m*). Sinyal karbon singlet pada 178,2 ppm menunjukkan daerah khas karbonil yang dapat memperkuat data IR pada bilangan gelombang 1735,81 cm^{-1} . Berdasarkan data-data tersebut, maka dihipotesis bahwa senyawa **1** memiliki kerangka dasar asam lemak.

Data ^1H dan $^{13}\text{C-NMR}$ yang diperoleh pada senyawa **1** memiliki kemiripan dengan data senyawa asam icosanat yang ditemukan dari tanaman *Debregeasia orientalis* (XIAO Yan-hua, *et. al.*, 2008) yang ditunjukkan pada Gambar 2. struktur senyawa **1** adalah 2-Hidroksi asam icosanat.



Gambar 2. Perbandingan struktur senyawa **1** dengan Asam icosanat (Xiao Yan-hua, *et. al.*, 2008)

Pada uji pendahuluan aktifitas antioksidan terhadap senyawa **1** dilakukan secara kualitatif menggunakan reagen 2,2 difenil-1- pikrilhidrazil (DPPH) yang hasilnya dimonitoring menggunakan KLT. Reagen DPPH berfungsi sebagai sumber radikal bebas dimana prinsipnya yaitu terjadi reaksi penangkapan hidrogen dari suatu zat antioksidan (Miller, 2010). Dalam penelitian ini, zat antioksidan yang akan diuji adalah senyawa santon, sehingga senyawa santon akan mengorbankan dirinya membentuk senyawa radikal karena salah satu atom hidrogennya ditangkap oleh reagen DPPH, sehingga terbentuk DPPH yang stabil serta senyawa antioksidan radikal tak reaktif.

Hasil uji positif secara kualitatif yang diamati secara visual dari senyawa terpenoid yang bersifat antioksidan dengan menggunakan plat KLT. Terbentuknya noda berwarna kuning tua kecoklatan dari reagen DPPH yang telah direaksikan dengan senyawa terpenoid dari *Cajanus cajan* karena warna asli dari reagen DPPH sendiri sebelum direaksikan dengan senyawa terpenoid adalah berwarna ungu tua. Jika ekstrak pekat positif memiliki bioaktivitas sebagai antioksidan.

Perubahan warna dari senyawa **1** tersebut membuktikan bahwa telah terjadi reaksi penangkapan hidrogen dari senyawa santon oleh reagen DPPH. Warna ungu dari reagen DPPH sendiri, lama-lama akan pudar dan berubah menjadi kuning kecoklatan. Dengan demikian, semakin kuat kapasitas antioksidan suatu senyawa, maka semakin pudar warna ungu yang dihasilkan. Uji DPPH merupakan metode yang mudah untuk mengamati sejumlah kecil molekul antioksidan karena reaksi dapat diamati secara visual menggunakan KLT. Senyawa **1** diketahui memiliki data absorbansi pada konsentrasi 319 µg/mL terdapat selisih nilai absorbansi besar dan mendekati nilai absorbansi blanko. Nilai % inhibisi senyawa **1** pada larutan dengan konsentrasi 319 µg/mL rendah, yang menunjukkan senyawa tersebut tidak aktif sebagai antioksidan.

KESIMPULAN

Berdasarkan hasil penelitian dapat disimpulkan bahwa :

1. Senyawa turunan asam lemak telah berhasil diisolasi dari ekstrak metanol tumbuhan kacang kayu (*Cajanus cajan* (L.) Millsp.) anggota famili *fabaceae*.
2. Berdasarkan uji pendahuluan aktifitas antioksidan yang telah dilakukan diketahui

bahwa senyawa (1) bersifat tidak aktif sebagai antioksidan.

UCAPAN TERIMA KASIH

Penulis mengucapkan terimakasih kepada Dit.Litabmas Dikti atas dana penelitian unggulan perguruan tinggi. Kepala laboratorium NPCS ITS. Analis laboratorium instrumentasi kimia ITS atas bantuan analisa spektrofotometri IR.

DAFTAR PUSTAKA

- Awouafack Maurice D, Tane Pierre dan Eloff Jacobus N. 2012. Two new antioxidant flavones from the twigs of *Eriosema robustum* (*Fabaceae*). *Journal of Phytochemical Society of Europe*. In Press.
- Jati, S.H. 2008. Efek Antioksidan Ekstrak Etanol 70% Daun Salam (*Syzygium polyanthum* [Wight.] Walp.) Pada Hati Tikus Putih Jantan Galur Wistar Yang Diinduksi Karbon tetraklorida (CCl₄). Skripsi Fakultas Farmasi, Universitas Muhammadiyah Surakarta, Surakarta.
- Kochar, S.P., & Rosell, B. 1990. Detection Estimation and Evaluation of Antioxidant in Food System. In Food Antioxidant. Hudson, B.J.F. (Ed). London : Elsevier Applied Science.
- Xiao Yan-hua, Cao h ui, Zhang Guo-in. (2008). *Chem ICAL Constituents of Debregeasia Orientalis*. China: Academic Journal electronic Publishing Huouse.