

Uji Fitokimia dan Potensi Antioksidan Ekstrak Etanol Kayu Secang (*Caesalpinia sappan* L.)

Wahyu Widowati*

Pusat Penelitian Ilmu Kedokteran, Universitas Kristen Maranatha, Bandung
Jl Prof. drg. Suria Sumatri MPH no 65 Bandung 40164 Indonesia

Abstrak

Penyakit degeneratif dan penyakit kronis sering disebabkan oleh stres oksidatif yang dipicu oleh radikal bebas. Untuk mencegah terjadinya stres oksidatif diperlukan antioksidan. Kayu secang (*Caesalpinia sappan* L.) sering dikonsumsi sebagai minuman seduhan karena dipercaya dapat menyembuhkan berbagai jenis penyakit. Penelitian ini bertujuan menguji kadar senyawa fitokimia dan kadar total fenol ekstrak etanol dalam kayu secang dengan menggunakan standar epigalokatekin (EGC) dan epikatekin galat (ECG), serta menguji aktivitas antioksidan dengan menggunakan metode pemerangkapan radikal bebas 1,1-difenil-2-pikrilhidrazil (DPPH). Penelitian ini membandingkan aktivitas antioksidan dalam ekstrak kayu secang dengan EGC dan ECG dalam 6 level konsentrasi (100; 50; 25; 12,5; 6,25; 3,125 µg/ml). Data dianalisis dengan menggunakan analisis rancangan acak lengkap dan dilanjutkan dengan uji jarak berganda Duncan. Uji fitokimia secara kualitatif serta uji total fenol menggunakan standar ECG dan EGC. Hasil penelitian menunjukkan ekstrak kayu secang mengandung senyawa terpenoid, fenol sangat tinggi, tetapi tidak mengandung steroid dan tanin. Ekstrak kayu secang mengandung kadar total fenol ekuivalen EGC adalah 849,11 µg/mg dan ekuivalen ECG 825,11 µg/mg. Ekstrak kayu secang memiliki aktivitas antioksidan tinggi yaitu 80,46-89,13%.

Kata kunci: DPPH, antioksidan, kayu secang, total fenol, stres oksidatif

*Korespondensi : wahyu_w60@yahoo.com

Phytochemical Assay and Antioxidant Potency of Sappan Wood Ethanolic Extract (Caesalpinia sappan L.)

Abstract

Degenerative and chronic diseases are often caused by oxidative stress triggered by free radicals. To prevent oxidative stress, antioxidant is required. Sappan wood extract (*Caesalpinia sappan* L.) is often consumed as brewed drink as people believe that it can heal many kinds of disease. This research was carried out to evaluate the concentration of phytochemical and phenolic compound total in Sappan wood extract by using epicatechin gallate (EGC) and epigallocatechin (ECG), and to evaluate antioxidant activity of the extract with 1,1-diphenyl-2-picryl-hydrazyl (DPPH) free radical scavenging activity. This research compared the antioxidant activity of sappan wood extract with EGC and ECG in 6 concentration levels (100; 50; 25; 12.5; 6.25; 3.125 $\mu\text{g/ml}$). The data were analyzed using complete randomized design analysis followed by Duncan post hoc test. Phytochemical assay was studied qualitatively, whereas phenolic was measured by using EGC and ECG as standard. The results showed that sappan wood extract contained high level of terpenoid and phenolic compound total but did not contain tannin and steroid. Sappan wood extract contained EGC equivalent phenolic compound was 849.11 $\mu\text{g/mg}$ and ECG equivalent was 825.11 $\mu\text{g/mg}$; it also exhibited high antioxidant activity, which was 80-89.13%.

Keywords: DPPH, antioxidant, free radical, phenolic total, oxidative stress

Pendahuluan

Senyawa radikal bebas merupakan produk samping metabolisme normal tubuh seperti metabolisme sel, fagositosis, metabolisme asam arakidonat, ovulasi, dan fertilisasi. Produksi radikal bebas terutama *Reactive Oxygen Species* (ROS) mengalami peningkatan selama kondisi patologis.¹ Radikal bebas dapat menyerang lipid, protein/enzim, karbohidrat, DNA dalam sel atau jaringan. Radikal bebas dapat menyebabkan oksidasi yang memicu kerusakan membran, modifikasi protein, kerusakan DNA dan kematian sel yang diinduksi oleh fragmentasi DNA dan peroksidasi lipid. Kerusakan oksidatif terkait yang

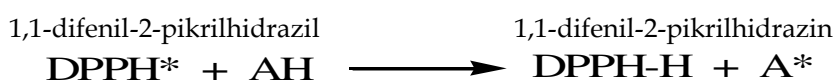
diakibatkan produksi ROS tidak hanya terlibat dalam toksisitas xenobiotik tetapi juga dalam mekanisme patofisiologi dalam *aging*, beberapa penyakit jantung (aterosklerosis), katarak, disfungsi kognitif, kanker (neoplastik), retinopati diabetik, penyakit inflamasi kronis, disfungsi organ, kerusakan pembuluh vaskuler, penyakit neurodegeneratif^{1,2}, asma, obstruktif paru-paru kronis, hipertensi, influenza, infark miokard, pneumonia.³ Olahraga berlebihan, peradangan atau ketika tubuh terpapar polusi lingkungan seperti asap rokok, asap kendaraan, bahan pencemar, toksin, pestisida, radiasi matahari, radiasi ultra violet dapat menghasilkan radikal bebas.³

Bila produksi radikal bebas dalam tubuh terus meningkat karena pengaruh eksternal, sistem pertahanan antioksidan tubuh tidak akan efektif lagi bekerja sebagai pelindung serangan radikal bebas sehingga terjadi stres oksidatif, untuk mencegah terjadinya stres oksidatif diperlukan suplemen antioksidan.^{1,3} Antioksidan juga sering diistilahkan sebagai peredam dan pemerangkap (*scavenger*) radikal bebas yaitu molekul yang dapat bereaksi dengan radikal bebas dan berfungsi menetralkan radikal bebas.³ Terdapat dua jenis antioksidan berdasarkan mekanismenya yaitu: 1). pemutus rantai pembentukan radikal bebas dengan cara mendonasikan elektron untuk menstabilkan radikal bebas; 2). antioksidan preventif adalah antioksidan enzimatis yang memerangkap inisiasi radikal bebas sebelum terjadi reaksi berantai oksidasi.³ Berdasarkan pembentukan dan asalnya antioksidan dalam tubuh makhluk hidup digolongkan menjadi dua golongan yaitu antioksidan endogen dan antioksidan eksogen. Antioksidan endogen adalah antioksidan secara alami terdapat dalam tumbuhan, hewan, manusia terdapat baik intra maupun ekstraselular. Antioksidan eksogen yaitu antioksidan yang ditambahkan dari luar, pada produk makanan sering ditambahkan antioksidan untuk

menghambat kerusakan oksidatif sedangkan hewan, manusia sering mengonsumsi antioksidan untuk menghambat terjadinya stres oksidatif.¹⁻⁵ Bila kadar antioksidan seluler dalam tubuh kurang sehingga tidak efektif memerangkap radikal bebas maka diperlukan antioksidan eksogen. Beberapa senyawa alamiah eksogen yang terdapat dalam makanan antara lain tokoferol, β -karoten, asam askorbat dan senyawa mikronutrien seng (Zn), selenium (Zn).⁵

Salah satu pengujian aktivitas antioksidan dengan pengujian pemerangkapan radikal bebas DPPH, apabila radikal bebas DPPH direaksikan dengan antioksidan atau sampel yang mengandung antioksidan akan terjadi reaksi penangkapan hidrogen (H) dari antioksidan oleh radikal bebas DPPH berwarna ungu menjadi 1,1-difenil-pikrilhidrazin berwarna kuning dibandingkan dengan absorbansi kontrol (1,1-difenil-2-pikrilhidrazil).⁶

Kayu secang (*Caesalpinia sappan L.*) sebagai minuman herbal digunakan untuk pengobatan darah kotor, antiadiabetik, antitumor, antimikroba, antivirus, antikoagulan, antiinflamasi, sebagai imunostimulan, bersifat sitotoksik.^{7,8} Ekstrak metanol kayu secang mengandung brazilin, protosappanin A dan sappanone B.⁹



Bahan dan Cara

Bahan yang digunakan adalah kayu secang dari Yogyakarta, DPPH (SIGMA) dan metanol PA (Merck), Follin-Ciolateu (Sigma), Na_2CO_3 (Merck). Alat yang digunakan dalam penelitian ini adalah mesin pembuat serbuk, pisau, timbangan, kertas saring, ayakan berukuran 180 mesh, erlenmeyer, alat ekstraksi maserasi, rotary vacuum evaporator, beaker glass, timbangan analitik, tabung eppendorf, tabung vial 1 ml, evaporator, penangas air, mikropipet, stopwatch, termometer, timbangan, spektrofotometer, corong, labu ukur, batang pengaduk, gelas piala.

Pembuatan ekstrak

Kayu secang dikeringkan kemudian diekstraksi menggunakan etanol 96 % yang telah didestilasi dengan teknik maserasi. Sebanyak 1 kg kayu secang yang telah digiling dengan ukuran 60 mesh direndam dalam 5 L etanol yang telah didestilasi selama 24 jam. Filtrat etanol ditampung, selanjutnya ampas kayu secang ditambah lagi 5 L etanol dilakukan sampai 4 kali perendaman. Filtrat tumpangan I, II, III, dan IV dievaporasi, diperoleh ekstrak etanol kayu secang.

Uji fitokimia (modifikasi cara Farnsworth)

Uji fitokimia secara kualitatif modifikasi cara Farnsworth meliputi kadar fenol, flavonoid, saponin, triterpenoid, steroid, terpenoid, tanin, alkaloid.¹¹

Uji total fenol

Sebanyak 25 μL sampel maupun standard EGC, ECG direaksikan dengan

125 μL Follin-Ciolateu 10 % dan 100 μL Na_2CO_3 7,5 % pada *microplate*. Setelah itu campuran diinkubasi pada suhu 45-50°C selama 10 menit, kemudian diukur nilai absorbansinya pada panjang gelombang 760 nm dengan menggunakan *microplate reader*.⁹ Berdasarkan nilai absorbansi standar EGC, ECG ditentukan persamaan regresi linier $Y = a + bx$, kemudian kadar sampel ekstrak kayu secang dihitung berdasarkan persamaan regresi linier dari EGC dan ECG.

Uji aktivitas antioksidan

Sebanyak 200 μL DPPH 0,077 mmol ditambahkan dengan 50 μL sampel (pada *microplate*). Campuran diinkubasi pada suhu kamar selama 30 menit lalu diukur nilai absorbansinya pada panjang gelombang 517 nm dengan menggunakan *microplate reader*. Untuk kontrol negatif digunakan DPPH sebanyak 250 μL , sedangkan untuk blanko digunakan metanol absolut sebanyak 250 μL .⁶

Aktivitas antioksidan metode DPPH (%):

$$1 - \frac{\text{absorbansi sampel}}{\text{absorbansi kontrol negatif}} \times 100$$

Hasil dan Pembahasan

Uji kadar senyawa fitokimia ekstrak kayu secang secara kualitatif dapat dilihat pada Tabel 1.

Hasil uji fitokimia (Tabel 1) menunjukkan bahwa ekstrak kayu secang mengandung fenol sangat tinggi (++++), kadar terpenoid sangat tinggi (++++), kadar flavonoid tinggi (+++),

namun tidak mengandung steroid dan tanin.

Uji total fenol ekstrak kayu secang menggunakan standar EGC dan ECG dapat dilihat pada Tabel 2. Ekstrak kayu secang mengandung total fenol yang tinggi baik standar EGC maupun ECG.

Hasil penelitian aktivitas antioksidan pemerangkapan radikal bebas DPPH dari ekstrak kayu secang dengan pembanding antioksidan EGC,

ECG pada berbagai konsentrasi (100, 50, 25, 12,5, 6,25, 3,125 µg/mL) dengan menggunakan analisis varians (ANOVA) menunjukkan terdapat pengaruh nyata antara jenis antioksidan dan konsentrasi ($P < 0,01$) terhadap aktivitas pemerangkapan radikal bebas DPPH, dilanjutkan uji jarak berganda Duncan (UJBD).¹¹ Rata-rata dan hasil uji jarak berganda Duncan dapat dilihat pada Tabel 3.

Tabel 1. Hasil Uji Fitokimia Ekstrak Kayu Secang

Bahan	Uji Fitokimia							
	Terpe- noid	Fenol	Steroid	Triter- penoid	Flavo- -noid	Tanin	Alka- loid	Saponin
Ekstrak kayu secang	++++	++++	-	++	+++	-	++	+

Keterangan +++++ : kadar sangat tinggi
 +++ : kadar tinggi
 ++ : kadar cukup
 + : kadar rendah
 - : tidak mengandung

Tabel 2. Rerata Kadar Total Fenol Ekstrak Kayu Secang

Bahan	Total fenol EGC (µg/mg)	Total fenol ECG (µg/mg)
Ekstrak kayu secang	849,11	825,11

Tabel 3. Rerata, Standar Deviasi dan UJBD Aktivitas Antioksidan Pemerangkapan DPPH Ekstrak Kayu Secang

Bahan antioksidan	Rata-rata aktivitas pemerangkapan DPPH
Ekstrak kayu secang 100 µg/mL	80,46±0,33 b
Ekstrak kayu secang 50 µg/mL	80,80±0,37 b
Ekstrak kayu secang 25 µg/mL	86,35±1,27 c
Ekstrak kayu secang 12,5 µg/mL	89,13±0,36 cde
Ekstrak kayu secang 6,25 µg/mL	86,35±2,21 c
Ekstrak kayu secang 3,125 µg/mL	53,86±2,06 a
EGC 100 µg/mL	95,13±2,36f
EGC 50 µg/mL	94,35±0,68ef
EGC 25 µg/mL	94,35±1,22ef
EGC 12,5 µg/mL	96,88±2,64f
EGC 6,25 µg/mL	93,37±3,23 ef
EGC 3,125 µg/mL	92,20±4,73 def
ECG 100 µg/mL	97,86±0,34 f
ECG 50 µg/mL	92,39±2,11 def
ECG 25 µg/mL	95,91±3,56 f
ECG 12,5 µg/mL	93,18±2,70 ef
ECG 6,25 µg/mL	87,72±1,55 cd
ECG 3,125 µg/mL	84,80±8,50 bc

Keterangan : Huruf kecil yang sama menunjukkan tidak berbeda nyata pada taraf 5%

Hasil penelitian menunjukkan bahwa aktivitas antioksidan pemerangkapan DPPH tertinggi adalah ECG konsentrasi 100 µg/ml (97,86 %) dan EGC 100 µg/ml (95,13 %), EGC 12,5 µg/ml (96,88%). Aktivitas antioksidan ekstrak kayu secang tertinggi pada konsentrasi 12,5 µg/ml (89,13%) lebih rendah dibanding EGC dan ECG. Ekstrak kayu secang memiliki aktivitas antioksidan yang kuat (>70%) pada semua konsentrasi kecuali konsentrasi terendah 3,125 µg/ml kategori aktivitas sedang sebesar 53,86%.

Ekstrak kayu secang memiliki aktivitas antioksidan kuat pada konsentrasi 6,25-100 µg/ml sebesar 80,46-89,13% hal ini diduga karena kadar fenol yang sangat tinggi (++++) dan kadar flavonoid yang tinggi (+++) berdasarkan hasil uji fitokimia (Tabel 1). Senyawa fenol yang terdapat dalam tanaman memiliki berbagai aktivitas biologi termasuk aktivitas antioksidan. Terdapat hubungan positif antara aktivitas antioksidan dan kadar total fenol.¹³ Aktivitas antioksidan dari senyawa fenol dikarenakan kemampuan

mengkelat logam yang tinggi. Senyawa fenol memiliki gugus hidroksil (OH) dan karboksil (COO) yang mampu mengikat logam berat Fe dan Cu.¹⁴ Terdapat korelasi yang tinggi antara total fenol dan aktivitas antioksidan, menunjukkan bahwa total fenol berperan besar dalam menyumbangkan aktivitas antioksidan dari berbagai jenis sayuran.¹⁵ Ekstrak tanaman *Mellilotus officinalis* mengandung kadar total fenol dan flavonoid tertinggi dibanding *Adiantum capillus-veneris*, *Plantago major*, *Equisetum maximum*, *Urtica dioica* menunjukkan aktivitas antioksidan pemerangkapan DPPH tertinggi, kadar fenol yang tinggi akan meningkatkan ketersediaan gugus hidroksil yang mampu memerangkap radikal bebas.¹⁶ Terdapat korelasi antara kadar total fenol dan aktivitas pemerangkapan DPPH dengan $r = 0,87$.¹⁰ Senyawa flavonoid merupakan senyawa fenol yang terdapat pada berbagai jenis tanaman dan paling banyak terdapat pada buah dan sayuran menunjukkan aktivitas antioksidan yang potensial.¹⁷ Senyawa flavonoid merupakan senyawa yang memiliki aktivitas antioksidan khususnya dalam memerangkap radikal bebas.¹⁸ Ekstrak kayu secang mengandung 5 senyawa yang terkait flavonoid mempunyai aktivitas antioksidan primer dan sekunder yaitu 1) brazilin; 2) isomer brazilin; 3) 1',4'-dihidrospiro [benzofuran-3(2H),3'-[3H-2]benzopiran]-1',6', 6',7'-tetrol ; 4). 3-[[4,5 dihidroksi-2-(hidroksimetil) fenil]metil]-2-3-dihidro-3,6-benzofurandiol; 5) (7R,7S)-7,8-dihidro-3,7,10,11 tetrahidroksi- 6H- di benz[b,d] oksosin-7-

metanol (7R-,7S-protosappanin B).¹⁹ Brazilin memiliki aktivitas penghambatan lipase dengan nilai *inhibitory concentration* (IC₅₀) sebesar 6 µM, protosappanin A sebesar 100 µM. Nilai IC₅₀ aktivitas antioksidan brazilin 8,8 µM tidak berbeda nyata dengan protosappanin A (9,1 µM) dan (+) katekin (10,2 µM), sedangkan sappanone B (14,5 µM).⁹

Berdasarkan uji fitokimia (Tabel 1), ekstrak kayu secang mengandung terpenoid sangat tinggi (++++). Aktivitas antioksidan yang tinggi dari ekstrak kayu secang diduga karena kandungan terpenoid, hal ini sesuai dengan penelitian sebelumnya bahwa aktivitas antioksidan tanaman dapat berasal dari senyawa terpenoid yaitu monoterpen, diterpen.²⁰ Berneol adalah senyawa terpenoid yang memiliki aktivitas antioksidan mampu memerangkap radikal bebas secara *in vivo* pada hewan hipertensi.²¹

Hasil uji kadar total fenol menunjukkan bahwa ekstrak kayu secang mengandung kadar fenol yang tinggi 849,11 µg EGC/mg dan 825,11 µg ECG/mg (Tabel 2), hal ini sesuai dengan hasil uji fitokimia (Tabel 1) ekstrak kayu secang mengandung kadar fenol sangat tinggi (++++).

Simpulan

Ekstrak kayu secang mengandung senyawa terpenoid, fenol sangat tinggi, mengandung flavonoid tinggi, tidak mengandung steroid dan tanin. Ekstrak kayu secang mengandung kadar total fenol ekuivalen EGC 849,11 µg/mg dan

ekivalen ECG 825,11 µg/mg, juga memiliki aktivitas antioksidan tinggi yaitu 80,46-89,13%, namun lebih rendah dibanding EGC dan ECG.

Daftar Pustaka

1. Singh RP, Sharad S, Kapur S. Free radicals and oxidative stress in neurodegenerative diseases: relevance of dietary antioxidants. *JACM* 2004; 5(3):218-25.
2. Bobrowski K. Free radicals in chemistry, biology and medicine : contribution of radiation chemistry. *Nukleonik* 2005; 50(3):S67-S76.
3. Scheibmeir HD, Christensen K, Whitaker SH, Jegaethesan J, Clancy R, Pierce JD. A review of free radicals and antioxidants for critical care nurses. *Intensive and Critical Care Nurs* 2005; 21:24-8.
4. Arivazhagan P, Thilakavathy T, Panneerselvam C. Antioxidant lipoate and tissue antioxidants in aged rats. *J Nutr Biochem.* 2000;11:122-7.
5. Aqil F, Ahmad I, Mehmood Z. Antioxidant and free radical scavenging properties of twelve traditionally used Indian medicinal plants. *Truk J Biol* 2006; 30:177-83.
6. Unlu, GV, Candan F, Sokmen A, DafeferaD, Polissiou M, Sokmen M, Donmez E, Tepe B. Antimicrobial and antioxidant activity of the essential oil and methanol extracts of *Thymus pectinatus* Fisch. et Mey. Var. *pectinatus* (Lamiaceae). *J. Agric. Food Chem.* 2003; 51:63-7.
7. Badami S, Moorkoth S, Suresh B. *Caesalpinia sappan* a medicinal and dye yielding plant. *Nat Product radiance* 2004;3(2):75-82.
8. Sundari D, Widowati L, Winarno MW. Informasi khasiat, keamanan dan fitokimia tanaman secang (*Caesalpinia sappan* L.) warta tumbuhan obat Indonesia. *The Journal on Indonesian Medicinal Plants* 1998;4(3):1-2.
9. Batubara I, Mitsugana T, Ohashi H. Brazilin from *Caesalpinia sappan* wood as an antiacne agent. *J Wood Sci.* 2010; 56:77-81.
10. Siger A, Nogla-Kalucka M, Lmapart-Szczapa E. The content and antioxidant activity of phenolic compounds in cold-pressed plant oils. *J. Food Lipids* 2007; 15:137-49.
11. Ye Deng, Chin Y-W, Chai H-B, de Blanco EC, Kardono LBS, Riswan S, Soejarto DD, Farnsworth NR, Kinghorn DA. Phytochemical and Bioactivity Studies on Constituents of the Leaves of *Vitex Quinata*. *Phytochem Letters* 2011; 4(3):213-7.
12. Steel, RA, Torrie JH. Prinsip dan prosedur statistika suatu pendekatan biometric. PT Jakarta: Gramedia Pustaka Utama; 1993.
13. Wojdylo A, Oszmianski J, Azemerys R. Antioxidant activity and phenolic compound in 32 selected herbs. *Food Chem* 2007;105:940-9.
14. Michalak A. Phenolic compound and their antioxidant activity in plants growing under heavy metal stress. *Pholis J Environ Stud.* 2006;15(4):523-30.
15. Alajire AA, Azeez L. Total antioxidant activity, phenolic, flavonoid and ascorbic content of Nigerian vegetables. *African J Food Sci Technol.* 2011;2(2):022-9.
16. Pourmorad F, Hosseinimehr SJ, Shahabimajd N. Antioxidant activity, phenolic and flavonoid contents some selected Iranian medicinal plants. *African J Biotech.* 2006;5(11):1142-5.
17. Karimi E, Jaafar HJE, Ahmad S. Phenolics and flavonoids profiling and

- antioxidant activity of three varieties of Malaysian indigenous medicinal herb *Labisia pumila* Benth. *J Med Plants Res.* 2011;5(7):1200-6.
18. Breyera A, Elstnerb M, Gillessenc T, Weiserd D, Elstner E. Glutamate-induced cell death in neuronal HT22 cells is attenuated by extracts from St. John's wort (*Hypericum perforatum* L.). *Phytomed.* 2007;14:250-5.
19. Safitri R. Karakterisasi sifat antioksidan in vitro beberapa senyawa yang terkandung dalam tumbuhan secang (*Caesalpinia sappan* L.). Disertasi Program Pasca Sarjana Universitas Padjadjaran. Bandung; 2002.
20. Grassmann J. Terpenoids as plant antioxidants. *Vitam Horm.* 2005;72:505-35.
21. Kumar MS, Kumar S, Raja B. Antihypertensive and antioxidant potential of borneol-A natural terpene in L-NAME-induced hypertensive rats. *Int J Pharm Biol Archives* 2010;1(3):271-9.