

ISOLASI SKOPOLETIN DARI BUAH MENKGUDU (*Morinda citrifolia* L) DAN UJI AKTIVITAS ANTIOKSIDANNYA

*Isolation of Scopoletin from Mengkudu Fruit (*Morinda citrifolia* L) and Measurement its Antioxidant Activity*

Sugeng Riyanto dan Abdul Rohman

ABSTRAK

Skopoletin telah diisolasi dari fraksi kloroform ekstrak metanol buah mengkudu (*Morinda citrifolia* L) yang strukturnya dikonfirmasi dengan spektroskopi inframerah dan spektrometri massa. Skopoletin menunjukkan aktivitas penangkapan radikal 2,2'-difenil-1-pikrilhidrazil (DPPH) dengan nilai IC_{50} 348,79 $\mu\text{g/mL}$, 35 kali lebih lemah dibandingkan dengan vitamin E (IC_{50} 9,77 $\mu\text{g/mL}$). Skopoletin juga mempunyai aktivitas antioksidan yang lebih lemah dibandingkan dengan vitamin menggunakan metode linoleat-tiosianat.

Kata kunci: skopoletin, antioksidan, DPPH, dan linoleat-tiosianat

ABSTRACT

Scopoletin has been isolated from chloroform fraction of methanolic extract of Mengkudu fruit (*Morinda citrifolia* L). Its structure was confirmed using infra red spectroscopy and mass spectroscopy. Scopoletin revealed a scavenging activity of 2,2'-diphenyl-1-picrylhydrazil (DPPH) radical by IC_{50} 348.79 $\mu\text{g/mL}$, 35 times lower than that of vitamin E (IC_{50} 9.77 $\mu\text{g/mL}$). Furthermore, scopoletin also showed an antioxidant activity which was lower than that of vitamin E by using linoleic-thiocyanate method.

Keywords: scopoletin, antioxidant, DPPH, and linoleic-thiocyanate

PENDAHULUAN

Mengkudu telah digunakan untuk pengobatan oleh orang Polnesia selama lebih dari 2000 tahun lalu dan dilaporkan mempunyai efek terapeutik luas seperti antibakteri, antivirus, antitumor, antelmintik, analgesik, hipotensif, anti-inflamasi dan peningkatan sistem imun (Wang dkk., 2002).

Kurang lebih 160 senyawa telah diidentifikasi dari tanaman Mengkudu ini, dengan komponen mikronutrien yang utama adalah senyawa-senyawa fenolik, asam-asam organik, dan alkaloid. Diantara senyawa fenolik yang ada, yang paling penting untuk dilaporkan adalah antrakuinon (damnakanthal, morindon, morindin), dan juga aukubin dan asperulosid (Blanco dkk., 2005).

Beberapa senyawa aktif telah diidentifikasi dari buah mengkudu ini antara lain skopoletin (suatu kumarin fenolik), polisakarida, asam askorbat, β -karoten, l-arginin, proxironin, dan proxeroninase (Sjabana dan Bahalwan, 2002). Wang dkk. (1999) melaporkan adanya 2 glikosida (rutin dan asam asperulosidat) dan ester asam lemak trisakarida [2,6-di-O-(β -D-glukopiranosil)-1-O-oktanoil- β -D-glukopiranosida

yang diisolasi dari fraksi tidak larut butanol ekstrak etanol buah mengkudu. Senyawa-senyawa fenolik telah dilaporkan mempunyai aktivitas antioksidan karena sifat-sifat redoksnya. Senyawa fenolik beraksi sebagai agen pereduksi, pemberi hidrogen, peredam oksigen singlet, dan juga sebagai pengkelat logam yang potensial (Kahkonen dkk., 1999).

Salah satu kandungan buah mengkudu adalah skopoletin atau 7-hidroksi-6-metoksikumarin (Wang dkk. 2002). Penelitian ini bertujuan untuk mengisolasi skopoletin dan kemudian menguji aktivitas antioksidannya karena senyawa skopoletin merupakan senyawa fenolik.

METODE PENELITIAN

Bahan

Bahan yang digunakan dalam penelitian ini adalah buah mengkudu (tidak terlalu muda dan belum masak) yang berasal dari daerah Sewon, Bantul, Yogyakarta. Radikal 2,2'-difenil-1-pikrilhidrazil (DPPH) diperoleh dari Sigma. Co. Silika gel GF₂₅₄, silika gel (230-240 mesh), etanol, metanol, kloroform, etil asetat, amonia (E. Merck), heksana (Water

associates), aqua bidestilata (Ika Pharmindo), vitamin E, dan asam linoleat.

Alat

Alat yang digunakan dalam penelitian ini adalah: rotavapor (Heidolph VV 2000), kolom kromatografi dari gelas, neraca elektrik. Pengukur titik lebur (Buchi *Melting Point* B-540), spektrofotometer UV-VIS (Genesys-20), FTIR 8300 dengan sistem DRS 8000 (Shimadzu), GC-MS (Shimadzu GC-17A, MS QP5000), inkubator, dan *delivery pipet* (Gilson pipetmen).

Cara Penelitian

Isolasi skopoletin dari buah Mengkudu. Sebanyak lebih kurang 15 kg buah mengkudu dimaserasi dengan metanol dan selanjutnya disaring dengan penyaring vakum. Sari dikumpulkan, diendapkan lalu diuapkan menggunakan rotavapor pada suhu 60°C. Ekstrak metanol buah mengkudu selanjutnya dipartisi dengan kloroform. Ekstrak kloroform hasil partisi (9,50 gram) selanjutnya difraksinasi dengan kromatografi kolom (75 x 3,5 cm) menggunakan fase diam silika gel (80-120 mesh) dengan elusi gradien menggunakan campuran heksan-kloroform-metanol (Gambar 1). Skopoletin yang diperoleh dari fraksi 6 selanjutnya dimurnikan dengan rekristalisasi.

Uji kemurnian Skopoletin. Uji kemurnian skopoletin dilakukan dengan (i) pengamatan titik lebur; (ii) penentuan jumlah bercak dengan kromatografi lapis tipis menggunakan fase diam silika gel GF₂₅₄ sedangkan fase gerak menggunakan sistem pelarut dengan tingkat polaritas yang berbeda-beda, dan deteksinya dilakukan dengan lampu ultraviolet pada 254 dan 366 nm; dan (iii) penentuan jumlah kromatogram dengan kromatografi gas.

Identifikasi Skopoletin. Identifikasi skopoletin dilakukan dengan spektrofotometri inframerah dan spektrometri massa.

Uji aktivitas antioksidan skopoletin

i. Uji penangkapan radikal DPPH

Aktivitas penangkapan radikal DPPH dilakukan sebagaimana dalam Kikuzaki dkk. (2002) dengan cara: sebanyak 100 µL skopoletin dengan berbagai konsentrasi (konsentrasi yang memberikan nilai IC₅₀ yakni konsentrasi skopoletin yang memberikan persen penangkapan radikal senilai 50 % dibandingkan kontrol melalui suatu persamaan garis regresi linier), ditambah dengan 1,0 mL DPPH 0,4 mM, dan 3,90 mL etanol. Campuran selanjutnya divorteks dan dibiarkan selama 30 menit. Absorbansi larutan diukur pada panjang gelombang 517 nm terhadap blanko yang terdiri

atas 100 µL skopoletin dan 4,90 mL etanol. Dilakukan juga pengukuran absorbansi kontrol yang terdiri atas 1,0 mL DPPH dan 4,0 mL etanol. Sebagai pembanding digunakan vitamin E. Besarnya aktivitas penangkapan radikal dihitung dengan rumus:

$$\text{Persen (\%)} \text{ penangkapan radikal} = \frac{(\text{Abs blanko} - \text{Abs sampel})}{\text{Abs blanko}} \times 100$$

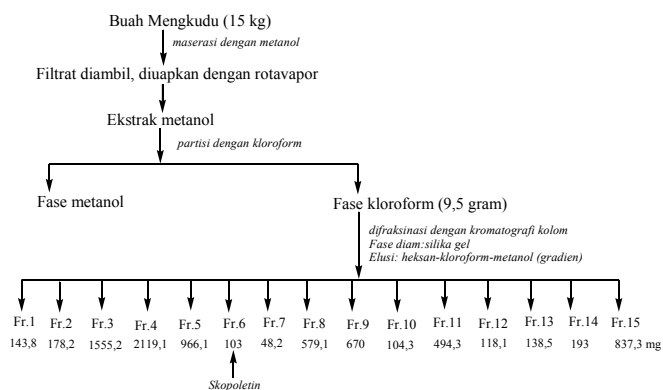
ii. Uji Aktivitas antioksidan dengan metode linoleat-tiosianat

Aktivitas antioksidan skopoletin dengan metode linoleat-tiosianat dilakukan sebagaimana dalam Osawa dan Namiki (1981). Sebanyak 100 µL skopoletin dengan konsentrasi 1% ditambah dengan 130 µL asam linoleat, 10 mL etanol dan 10 mL buffer fosfat pH 7. Campuran selanjutnya diencerkan dengan aquades sampai volume 25 mL. Campuran selanjutnya diinkubasi dalam *conical flask* pada suhu 40°C, dan setiap 24 jam sekali diukur kandungan peroksidanya dengan cara diambil 100 µL larutan di atas, ditambah 9,5 mL etanol; 200 µL larutan amonium tiosianat 30 %; dan 200 µL fero klorida (20 mM dalam 3,5 % HCl), divorteks selama 3 menit, dan diukur absorbansinya pada panjang gelombang 490 nm. Dilakukan juga pengukuran absorbansi kontrol seperti semua proses di atas dengan tanpa penambahan skopoletin. Hasil aktivitas antioksidan skopoletin dibandingkan dengan vitamin E 1%.

HASIL DAN PEMBAHASAN

Isolasi dan Pemurnian Skopoletin

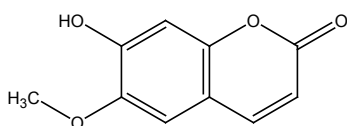
Isolasi skopoletin dilakukan dengan cara fraksinasi ekstrak kloroform hasil partisi ekstrak metanol buah mengkudu dengan kromatografi kolom yang berisi fase diam silika gel dan elusinya dilakukan secara gradien menggunakan campuran heksan-kloroform-metanol sebagaimana dalam Gambar 1.



Gambar 1. Skema isolasi skopoletin dari buah Mengkudu

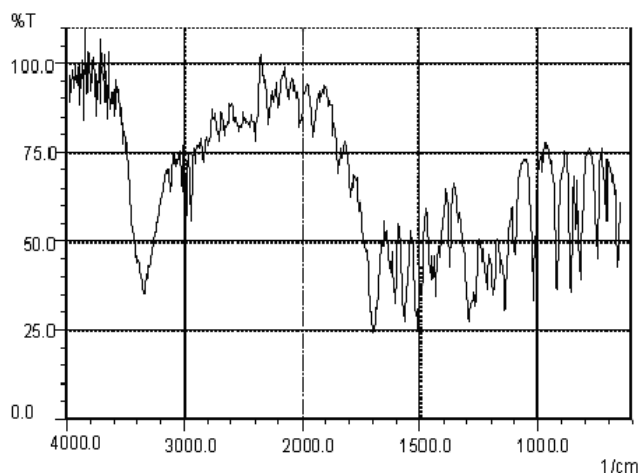
Kristal skopoletin yang diperoleh dari fraksi 6 dilakukan pemurnian dengan cara rekristalisasi hingga diperoleh kristal yang murni. Pengujian kemurnian kristal dilakukan dengan uji titik lebur, kromatografi lapis tipis, dan kromatografi gas. Jarak titik lebur kristal berkisar: $205 \pm 0,5^{\circ}\text{C}$. Kristal yang telah dimurnikan mempunyai satu bercak dengan uji KLT, dan mempunyai 1 kromatogram dengan uji kromatografi gas.

Skopoletin atau 7-hidroksi-6-metoksikumarin (Gambar 2) merupakan salah satu senyawa yang telah dilaporkan terdapat dalam buah mengkudu (Wang dkk., 2002). Penelitian yang dilakukan oleh Lee dkk. (2001) menyebutkan bahwa skopoletin mempunyai titik lebur $202 - 204^{\circ}\text{C}$.



Gambar 2. Struktur skopoletin

Konfirmasi struktur skopoletin dilakukan dengan spektroskopi inframerah dan dengan spektroskopi massa. Hasil spektrum inframerah kristal ditunjukkan oleh Gambar 3.

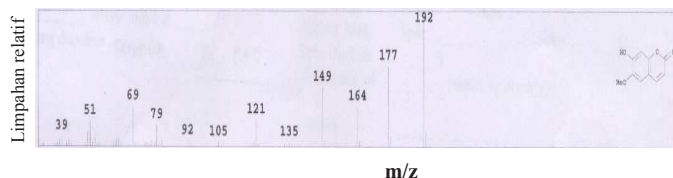


Gambar 3. Hasil spektrum inframerah kristal

Spektrum inframerah skopoletin (Gambar 3) menunjukkan adanya pita kuat sekitar 1700 cm^{-1} (-C=O); pita lebar dan cukup kuat di 3300 cm^{-1} (OH bonded); pita medium di $3100\text{-}3000\text{ cm}^{-1}$ ($\text{=C-H alilik/vinilik stretching}$); pita medium di 1600 cm^{-1} (cincin aromatik); pita di $900\text{-}800\text{ cm}^{-1}$ ($\text{=CH aromatik out-of-plane bending}$); pita medium di 1650 cm^{-1} (C=C, alkene); pita medium di $2900\text{-}3000\text{ cm}^{-1}$ ($\text{C-H alifatis stretching}$); pita di 1375 dan 1450 cm^{-1} ($\text{C-H bending dari -CH}_3$); pita medium di 1150 cm^{-1} menunjukkan adanya ikatan C-O.

Gambar 4 merupakan spektrum massa skopoletin. Dari spektrum MS skopoletin ini, diperoleh m/z dan kelimpahan relatif (%) sebagai berikut: 192 (100); 177 (70); 164 (37,5);

149 (75); 135 (4,2); 121 (37,5); 107 (4,2); 93 (4,2); 79 (33,3); 69 (79,2); 51 (50); 39 (25).



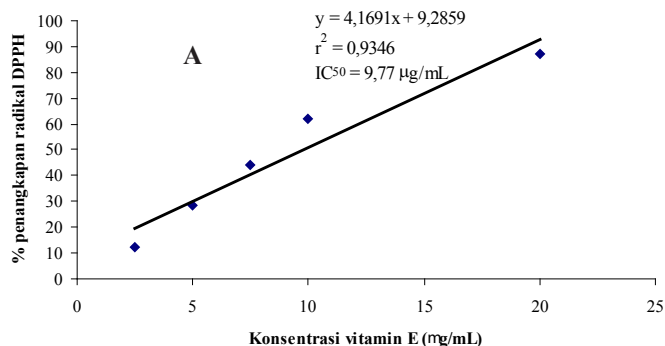
Gambar 4. Spektrum massa skopoletin

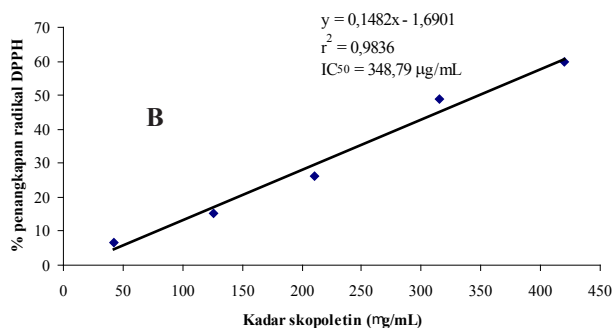
Ion molekul (M^+) muncul pada m/z 192 sebagai puncak dasar (*base peak*). Pada m/z 177 menunjukkan adanya radikal CH_3 yang lepas dari ion molekul. (M-15), dan pada m/z 164 (M-28) kemungkinan lepasnya molekul netral C=O . Pada m/z 149 kemungkinan berasal dari m/z 164 yang melepaskan radikal CH_3 . Sebagai pembanding, digunakan data EI-MS skopoletin hasil penelitian Lee dkk. (2001): m/z (%): 192 (M, 100), 177 (58), 164 (26), 149 (44), 121 (18), 79 (16), 69 (32).

Aktivitas Antioksidan Skopoletin

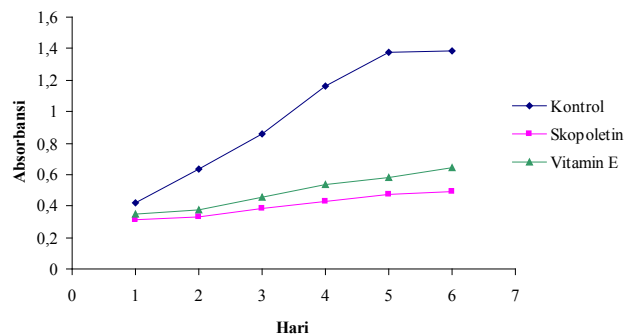
Uji Penangkapan Radikal DPPH. Penentuan aktivitas antioksidan menggunakan metode penangkapan radikal DPPH didasarkan pada kemampuan suatu senyawa uji untuk mengurangi intensitas warna radikal DPPH pada 515 nm (Prior dkk., 2005). Parameter yang digunakan untuk aktivitas antioksidan dengan metode penangkapan radikal DPPH ini adalah nilai IC_{50} yakni konsentrasi skopoletin yang dibutuhkan untuk mengurangi intensitas warna radikal DPPH sebesar 50% (Zou dkk., 2004). Nilai IC_{50} diperoleh dari suatu persamaan regresi linier yang menyatakan hubungan antara konsentrasi ekstrak uji dengan persen penangkapan radikal. Semakin kecil nilai IC_{50} , semakin aktif ekstrak/fraksi (senyawa uji) tersebut sebagai antioksidan (Prior dkk., 2005).

Hasil penentuan aktivitas antioksidan skopoletin melalui uji penangkapan radikal DPPH beserta pembanding vitamin E dapat dilihat pada Gambar 5.





Gambar 5. Aktivitas antioksidan skopoletin (A) dan vitamin E (B) melalui uji penangkapan radikal DPPH



Gambar 6. Grafik absorbansi skopoletin, vitamin E, dan kontrol selama 7 hari

Nilai IC_{50} vitamin E (9,77 $\mu\text{g/mL}$) lebih kecil dibandingkan dengan nilai IC_{50} skopoletin (348,79 $\mu\text{g/mL}$). Hal ini menunjukkan bahwa vitamin E mempunyai kemampuan menangkap radikal yang lebih baik (± 35 kali) dibandingkan dengan skopoletin.

Penentuan aktivitas antioksidan dengan metode linoleat-tiosianat

Dalam sistem linoleat-tiosianat, sebagai sumber radikal adalah asam linoleat yang merupakan asam lemak tidak jenuh. Radikal merupakan senyawa oksidator yang dengan adanya feroklorida dalam sistem tersebut akan mengoksidasi ion fero menjadi ion feri yang dengan adanya ion tiosianat akan menghasilkan warna merah dari kompleks feri-tiosianat yang dapat diukur intensitasnya pada panjang gelombang 490 nm.

Adanya senyawa yang bersifat sebagai antioksidan akan mampu menangkap radikal sehingga radikal bebas yang terbentuk menjadi lebih sedikit. Adanya penurunan jumlah (konsentrasi) radikal bebas ini menyebabkan ion fero yang dioksidasi menjadi feri lebih sedikit, sehingga kompleks feri tiosianat yang terbentuk sedikit dan absorbansinya menjadi lebih kecil. Dengan demikian, semakin aktif suatu senyawa sebagai antioksidan dengan metode linoleat-tiosianat ini, maka semakin kecil absorbansi yang dihasilkan dibandingkan dengan kontrol.

Gambar 6 merupakan hasil pengukuran aktivitas antioksidan skopoletin dengan pembanding vitamin E menggunakan metode linoleat-tiosianat selama 7 hari.

Aktivitas antioksidan skopoletin dengan metode linoleat-tiosianat lebih lemah dibanding dengan vitamin E. Hal ini dapat dilihat dari Gambar 6 yang mana absorbansi skopoletin lebih besar dibandingkan dengan vitamin E.

KESIMPULAN

Skopoletin dapat diisolasi dengan cara fraksinasi ekstrak kloroform hasil partisi ekstrak metanol buah mengkudu. Aktivitas antioksidan skopoletin menggunakan metode uji penangkapan radikal DPPH adalah lebih kecil (IC_{50} 348,79 $\mu\text{g/mL}$) dibandingkan dengan vitamin E (9,77 $\mu\text{g/mL}$). Demikian juga dengan metode linoleat-tiosianat, skopoletin menunjukkan aktivitas antioksidan yang lebih lemah dibandingkan vitamin E.

DAFTAR PUSTAKA

- Blanco, Y.C., Vaillant, F., Perez, A.M., Reynes, M., Brillouet, J.M., dan Brat, P., (2005). The Noni Fruit (*Morinda citrifolia* L.) : A review of agricultural reseach, nutritional and therapeutic properties, *Journal of Food Composition and Analysis*, in Press.
- Kahkonen, M.P., Hopia, A.I., Vuorela, H.J., Rauha, J.P., Pihlaja, K., Kujala, T.S., dan Heinonen, M., (1999). Antioxidant activity of extracts containing phenolic compounds, *J. Agric. Food Chem.*, **47**: 3954-3962.
- Kikuzaki, H., Hisamoto, M., Hirose, K., Akiyama, K dan Taniguchi, H., (2002). Antioxidants properties of ferulic acid and its related compounds, *J. Agric. Food Chem.*, **50**: 2161-2168.
- Lee, C.K., Lee, P.H. dan Kuo, Y.H., (2001). The Chemical Constituents from the Aril of *Cassia fistula* L., *J. Chin. Chem. Soc.*, **48**: 1053-1058.
- Osawa, T., dan Namiki, M., (1981). A Novel Type of Antioxidant Isolated from Leaf Wax of Eucalyptus Leaves, *J. Agric. Biol. Chem.*, **45**: 735-739.
- Prior, R.L., Wu, X. dan Schaich, K., (2005). Standardized methods for the determination of antioxidant capacity and phenolics in foods and dietary supplements, *J. Agric. Food Chem.*, **55**: 2698A-J.

- Syabana, D. dan Bahalwan, R.R., (2002). *Seri Referensi Herbal: Pesona Tradisional dan Ilmiah Buah mengkudu (Morinda citrifolia, L)*, hal.4-11 .Salemba Medika, Jakarta.
- Wang, M., Kikuzaki, H., Boyd, C. D., Maunakea, A., Fong, S. F., Ghai, G., Rosen, R. T., Nakatani, N., Ho, C. T., (1999). Novel trisaccharide fatty acid ester identified from the fruits of *Morinda citrifolia* (noni), *J. Agric. Food Chem*, **47** (12): 4880-4882.
- Wang, M.Y., West, B.J., Jensen, C.J., Nowicki, D., Chen, S., Palu, A.K., dan Anderson, G., (2002). *Morinda citrifolia* (Noni): A literature review and recent advances in Noni research, *Acta Pharmacologica Sinica*, **23** (13): 1127 – 1141.
- Zou, Y., Lu, Y. dan Wei, D., (2004). Antioxidant activity of Flavonoid-rich extract of *Hypericum perforatum* L in vitro, *J. Agric. Food Chem*, **52**: 5032-5039.