
Asam Protokatekuat dari Ekstrak Etil Asetat Biji Honje (*Etlingera elatior*) dan Uji Aktivitas Antioksidannya

Protocatechuic Acid from Ethyl Acetate Extract of Honje (*Etlingera elatior*) Seeds and Antioxidant Activity Test

Dede Sukandar¹, Ibnu Umarudin Umedi¹, Siti Nurbayti¹, Tarso Rudiana^{1,2},
Ahmad Fathoni¹

¹Program Studi Kimia FST UIN Syarif Hidayatullah Jakarta
Jalan Ir. H. Juanda No 95 Ciputat 15412 Indonesia Telp. (62-21) 7493606

²Proram Studi Kimia FSF Universitas Matlaul Anwar
Jl. Raya Labuan Km. 23 Pandeglang Banten 42273, Indonesia

E-mail: sukandarkimia@uinjkt.ac.id

Received: February 2018; Revised: March 2018; Accepted: May 2018; Available Online: May 2018

Abstrak

Telah dilakukan penelitian untuk mengetahui struktur senyawa fenolik yang memiliki aktivitas antioksidan dari ekstrak etil asetat biji honje (*E. elatior*). Isolasi senyawa fenolik dilakukan dengan metode maserasi, fraksinasi dengan kromatografi kolom gravitasi (KKG), dan kromatografi lapis tipis (KLT). Uji aktivitas antioksidan menggunakan metode DPPH (2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl) dan penentuan struktur senyawa menggunakan spektroskopi UV-Vis, FTIR, NMR, dan MS. Isolat yang diperoleh berupa *gum* kuning sebanyak 18 mg dari 3 kg sampel kering. Hasil uji aktivitas antioksidan menunjukkan isolat dari ekstrak etil asetat memiliki aktivitas yang sangat kuat dengan IC₅₀ 1,32 µg/mL. Hasil analisis dengan spektroskopi UV-Vis, FTIR, NMR, dan MS menunjukkan isolat sesuai dengan rumus molekul C₇H₆O₄ yang dikenal dengan asam protokatekuat (asam 3,4-dihidroksi benzoat).

Kata kunci: Antioksidan, DPPH, fenolik, honje (*Etlingera elatior*)

Abstract

The research has been conducted to find out the structure of phenolic compounds which have antioxidant activity from honje seed (*E. elatior*) ethyl acetate extract. Isolation of phenolic compounds was conducted by using maceration, fractionation method using gravity column chromatography, and thin layer chromatography. Antioxidant activity test was conducted by using DPPH method (2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl) and structure elucidation by using UV-Vis spectroscopy, FTIR, NMR and MS. The isolate obtained was 18 mg of yellow gum from 3 kg of dried sample. The result of antioxidant activity test showed that isolate from ethyl acetate extract had very strong activity with IC₅₀ 1,32 µg/mL. The results of analysis with UV-Vis spectroscopy, FTIR, NMR, and MS showed that the isolate according to the C₇H₆O₄ molecular formula known as protocatechuic acid (3,4-dihydroxy benzoic acid).

Keyword: antioxidant, DPPH, phenolic, honje (*Etlingera elatior*)

DOI: <http://dx.doi.org/10.15408/jkv.v4i1.7225>

1. PENDAHULUAN

Honje atau kecombrang (*E. elatior*) sejak lama dikenal dan dimanfaatkan oleh manusia secara tradisional sebagai bahan

pencita rasa makanan di berbagai negara (Mikail, 2010). Berdasarkan literatur, bunga *E. elatior* digunakan untuk mencegah penuaan dini dan juga menghilangkan dahak dan batuk (Sukandar *et al.*, 2011). Bunga *E. elatior* juga

mengandung senyawa-senyawa alkaloid, saponin, tannin, fenolik, flavonoid, triterpenoid, steroid, glikosida dan minyak atsiri (Naufalin *et al.*, 2005). Penelitian yang dilakukan oleh Rusanti *et al.*, (2017), menunjukkan bahwa fraksi etil asetat dari ekstrak biji *E. elatior* memiliki aktifitas sitotoksitas terhadap sel kanker leukimia P-388 dengan nilai IC₅₀ sebesar 19.210 µg/mL. Senyawa yang diduga berperan terhadap adanya aktivitas ini adalah senyawa fenolik, yaitu flavonoid (resveratrol, lapakol, apigenin, krisin termetilasi, 6,2'-dihidroksiflavanon, 3-hidroksi-3,4'-dimetoksiflavanon, dan 4'-hidroksi-5,7-dimetoksiflavanon) (Rusanti *et al.*, 2017).

Senyawa yang dapat menunda, menghambat atau mencegah oksidasi bahan atau senyawa yang mudah teroksidasi oleh radikal bebas dan mengurangi stres oksidatif disebut antioksidan (Dai and Mumper, 2010). Senyawa fenolik termasuk ke dalam golongan antioksidan primer, yaitu antioksidan yang mampu menangkap radikal bebas (Pokorny, 2007). Radikal bebas diduga merupakan penyebab kerusakan sel yang mendasari timbulnya penyakit kanker (Risky dan Suyatno, 2014). Antioksidan telah terbukti bermanfaat dalam pencegahan sel kanker (Chaudhary, 2015).

Hal tersebut diatas yang mendasari perlunya dilakukan penelitian lebih lanjut tentang isolasi dan elusidasi struktur senyawa fenolik pada ekstrak etil asetat biji *E. elatior* yang pada penelitian sebelumnya (Rusanti *et al.*, 2017) diketahui memiliki aktivitas sitotoksik dan juga memiliki potensi sebagai senyawa antioksidan.

2. METODE PENELITIAN

Alat dan Bahan

Alat yang digunakan adalah alat penghalus (*grinding mill*), alat-alat gelas, botol vial, kuvet, timbangan analitik, penangas air listrik, kertas saring, plat kaca, pisau *cutter*, *chamber*, dan kromatografi kolom gravitasi. Peralatan lain yang digunakan adalah *rotary evaporator* Heidolph2, pompa vakum, lampu ultraviolet (UV) dengan λ 254 dan 366 nm, pipa kapiler, Spektrofotometer UV-Vis Perkin Elmer Lambda 25, FTIR Shimadzu Prestige 21, MS Waters TQD-ESI-MS/MS dan NMR JEOL JNMECA 500 yang beroperasi pada 500 MHz (¹H) dan 125 MHz (¹³C).

Bahan yang digunakan adalah biji *E. elatior* yang berasal dari Desa Cintaratu

Kecamatan Parigi Kabupaten Pangandaran. Beberapa pelarut yang digunakan antara lain metanol, etil asetat, *n*-heksana, kloroform, dan aseton yang berkualitas teknis terdestilasi, metanol-*d* (CD₃OD), FeCl₃, silika gel G 60 (70-230 mesh) Merck, kromatografi lapis tipis (KLT) menggunakan aluminium berlapis Sigel Kieselgel 60 GF₂₅₄ 0.25 mm (Merck) dan larutan DPPH (2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl) (Merck).

Rancangan Penelitian

Metode yang dilakukan dalam penelitian ini meliputi ekstraksi dengan cara maserasi, uji aktivitas antioksidan menggunakan metode DPPH *free radical scavenger*, uji senyawa fenolik menggunakan metode pereaksi penampak noda FeCl₃, isolasi dengan metode kromatografi kolom gravitasi (KKG) dan kromatografi lapis tipis (KLT), serta elusidasi struktur senyawa fenolik menggunakan instrumen UV-VIS, FTIR, NMR dan MS.

Ekstraksi

Biji *E. elatior* kering sebanyak 3 kg dihaluskan menggunakan *grinding mill*. Sampel yang sudah halus dimaserasi secara bertahap dimulai dengan pelarut *n*-heksana, setelah selesai dilanjutkan dengan pelarut etil asetat dan terakhir dengan pelarut metanol selama masing-masing 1 x 24 jam. Filtrat *n*-heksana, etil asetat dan metanol biji *E. elatior* kemudian diuapkan dengan *vacuum rotary evaporator* pada suhu 50 °C sehingga diperoleh ekstrak etil asetat kasar, dihitung massanya dan diuji aktivitas antioksidannya.

Isolasi

Ekstrak etil asetat yang positif mengandung senyawa fenolik, yang ditandai dengan pereaksi penampak noda FeCl₃ 5% dalam metanol dan menghasilkan noda berwarna biru kehitaman, diisolasi dengan menggunakan metode kromatografi.

Ekstrak etil asetat (30 g) difraksinasi menggunakan KKG dengan fasa diam silika gel GF₆₀. Sampel dielusi setiap 100 mL dengan perbandingan gradien kedua campuran pelarut yang dimulai dengan *n*-heksana:etil asetat (10:0) sampai (0:10) dan etil asetat:metanol (10:0) sampai (0:10). Fraksinasi dengan KKG menghasilkan 11 fraksi [A (1,663 g), B (0,308 g), C (0,099 g), D (0,104 g), E (0,880 g), F (0,499 g), G (1,004 g), H (5,723 g), I (3,394 g), J (10,754 g) dan K (4,541 g)]. Selanjutnya,

pada fraksi F5 yang positif mengandung senyawa fenolik, dilakukan pemisahan lebih lanjut dengan KKG menggunakan eluen *n*-heksan:etil asetat dari (10:0) sampai (0:10). Hasil analisis KKG menghasilkan 8 fraksi [E1 (38.4 mg), E2 (52.4 mg), E3 (76.1 mg), E4 (46 mg), E5 (185 mg), E6 (36.5 mg), E7 (30.8 mg) dan E8 (51.6 mg)]. Tahapan selanjutnya permurnian fraksi E5 dengan cara KLT preparatif dan dielusi menggunakan eluen kloroform:aseton (8:2) hingga diperoleh isolat I (18 mg) berwarna kuning. Terhadap isolat I diuji kemurniannya menggunakan KLT 2 dimensi dengan eluen pertama yaitu kloroform:aseton:asam asetat (8:1,75:0,25) dan eluen kedua yaitu kloroform:aseton:asam asetat (7:2,75:0,25).

Karakterisasi

Elusidasi struktur isolat I menggunakan data spektrum UV, FTIR, ¹H NMR, ¹³C NMR dan MS serta isolat I diuji kembali aktivitas antioksidannya.

Uji Aktivitas Antioksidan

Ekstrak etil asetat sebanyak 10 mg dilarutkan dan dibuat larutan sampel dengan konsentrasi 1.000, 640, 320, 160, 80, 40, 20, 10 dan 5 ppm dan diuji aktivitas antioksidannya. Pada uji aktivitas antioksidan isolat, sebanyak 1 mg isolat dilarutkan dan dibuat larutan sampel dengan konsentrasi 5; 2.5; 1.25; 0.625; 0.3125 dan 0.156 ppm. Larutan sampel masing-masing konsentrasi sebanyak 2 mL dimasukkan ke dalam tabung reaksi dan ditambahkan 2 mL DPPH 0.002 %. Larutan sampel dihomogenkan dengan menggunakan vorteks dan diinkubasi selama 30 menit dalam ruang gelap. Nilai absorbansi larutan sampel ditentukan dengan spektrofotometer UV-Vis pada panjang gelombang 512-520 nm. Pengujian dilakukan pengujian sebanyak dua kali (duplo). Sebagai larutan blanko digunakan 2 mL metanol dan 2 mL DPPH 0.002 %. Selanjutnya ditentukan nilai persentase inhibisi yang dihitung dengan rumus sebagai berikut:

$$\% \text{ Inhibisi} = \frac{A_{\text{blanko}} - A_{\text{sampel}}}{A_{\text{sampel}}} \times 100$$

Nilai IC₅₀ ditentukan menggunakan persamaan regresi linier $y = ax + b$, dimana y adalah % inhibisi yang bernilai 50, a (*slope*) dan b (*intercept*) didapat dari persamaan kurva regresi dimana % inhibisi sebagai sumbu y dan

konsentrasi sampel sebagai sumbu x serta x adalah konsentrasi sampel yang akan ditentukan nilai IC₅₀ nya.

3. HASIL DAN PEMBAHASAN

Hasil uji aktivitas antioksidan menunjukkan bahwa ekstrak etil asetat biji *E. elatior* memiliki aktivitas antioksidan dengan nilai IC₅₀ yaitu 99.36 µg/mL. Menurut Mardawati *et al.* (2008), suatu senyawa dikatakan sebagai antioksidan sangat kuat jika nilai IC₅₀ kurang dari 50 µg/mL, kuat untuk IC₅₀ bernilai 50-100 µg/mL, sedang jika IC₅₀ bernilai 100-150 µg/mL, dan lemah jika IC₅₀ adalah 151-200 µg/mL. Setelah dilakukan tahap isolasi dan didapatkan isolat I (18 mg), kemudian dilakukan tahap elusidasi struktur menggunakan spektroskopi UV, FTIR, ¹H NMR, ¹³C NMR dan MS.

Hasil analisis spektroskopi UV-Vis isolat I pada panjang gelombang 200-400 nm menunjukkan adanya 2 serapan pada panjang gelombang maksimum (λ_{maks}) 293 nm (pita I) (-C=C-C=C-) dan 256 nm (pita II) (-C=C-C=O). Analisis UV-Vis juga dilakukan menggunakan pereaksi geser yaitu penambahan NaOH dan NaOAc+H₃BO₃. Pada penambahan NaOH terjadi pergeseran batokromik pada pita I (+8) dan pita II (+19) yang menandakan isolat I mempunyai gugus hidroksi pada cincin aromatik (Mudjirahmini and Ersam, 2007). Pereaksi geser berikutnya yaitu menggunakan NaOAc+H₃BO₃. Adanya NaOAc+H₃BO₃ akan membentuk kompleks dengan gugus *orto* dihidroksi pada semua posisi atom C. Adanya pergeseran batokromik lebih kecil dari 12 nm pada pita I isolat I menunjukkan adanya gugus *orto* dihidroksi

Analisis dengan FTIR menunjukkan adanya vibrasi dari gugus fungsi O-H (3394 cm⁻¹), C=O (1724 cm⁻¹), C=C aromatik (1579 cm⁻¹), C-O (1124 cm⁻¹); C-H aromatik (945, 896, dan 783 cm⁻¹).

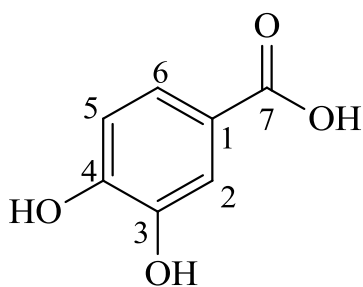
Analisis dengan ¹H NMR menunjukkan adanya tiga sinyal proton aromatik pada δ_{H} 6.77 (1H, *d*, $J=8.4$ Hz); 7.38 (1H, *dd*, $J=1.9, 8.4$ Hz) dan 7.43 (1H, *d*, $J=1.9$ Hz) ppm. Sinyal proton *double doublet* pada δ_{H} 7.38 (1H, *dd*, $J=1.9, 8.4$ Hz) mengindikasikan proton ini mempunyai kopling *orto* dengan proton pada δ_{H} 6.77 (1H, *d*, $J=8.4$ Hz) dan kopling meta dengan sinyal proton pada δ_{H} 7.43 (1H, *d*, $J=1.9$ Hz). Analisis dengan ¹³C NMR menunjukkan adanya tujuh sinyal karbon aromatik *sp*² diantaranya tiga

sinyal karbon tersier pada δ_c 115,6; 117,8; 123,6 ppm, tiga sinyal karbon kuartener pada δ_c 121,9; 145,9; 150,7 dan satu sinyal karbon karbonil pada δ_c 170,6 ppm (Tabel 1).

Tabel 1. Data NMR untuk isolat I (500 MHz untuk 1H dan 125 MHz untuk ^{13}C pada CD_3OD)

Senyawa isolat I		
Posisi	δ_H ppm (multiplisitas, J Hz)	δ_C ppm
1	-	121.9
2	7.43 (1H, d, 1,9)	115.6
3	-	145.9
4	-	150.7
5	6.77 (1H, d, 8,4)	117.8
6	7.38 (1H, dd, 1,9; 8,4)	123.6
7	-	170.6

Hasil interpretasi berdasarkan data spektrum 1H NMR dan ^{13}C NMR isolat I dibandingkan dengan senyawa pembanding hasil ekstrak MeOH tanaman *Bistorta manshuriensis* (Chang *et al.*, 2009), maka struktur senyawa isolat I yang disarankan adalah asam protokatekuat (asam 3,4-dihidroksi benzoat) dengan rumus molekul $C_7H_6O_4$.

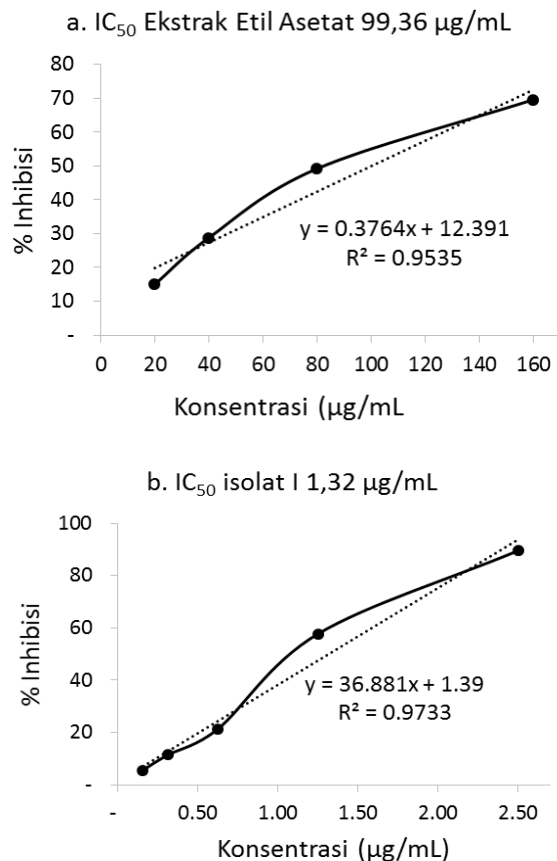


Gambar 1. Struktur senyawa asam protokatekuat isolat I

Analisis dengan MS menunjukkan isolat mempunyai massa $m/z = 155.09 [M+H]^+$ sesuai rumus molekul $C_7H_6O_4$ yang dikenal dengan asam protokatekuat (asam 3,4-dihidroksi benzoat).

Hasil uji aktivitas antioksidan isolat I yang diduga asam protokatekuat mempunyai nilai IC_{50} sebesar 1.32 $\mu g/mL$. Aktivitas antioksidan isolat I lebih kuat dibandingkan dengan ekstrak etil asetatnya sebesar 99.36

$\mu g/mL$. Hal ini dikarenakan sampel ekstrak yang diuji belum murni dan masih terdapat senyawa lain yang bersifat antagonis yang dapat menurunkan aktivitas antioksidan dibandingkan dengan senyawa murninya.



Gambar 2. Nilai IC_{50} : a. ekstrak etil asetat b. isolate I biji *E. elatior*

Asam protokatekuat mempunyai aktivitas antioksidan dan antiinflamasi. Penelitian yang dilakukan Liu *et al.* (2002) menunjukkan asam protokatekuat yang diekstrak dari *Hibiscus sabdariffa* memiliki aktivitas antitoksik. Senyawa ini memiliki efek pada sel kanker lambung dalam penelitian *in vitro* dan *in vivo* (Lin *et al.*, 2007). Senyawa ini juga mampu melawan sel HL-60 leukemia, sel HSG 1 (Babich *et al.*, 2002) dan tumor pada kulit tikus (Nakamura *et al.*, 2000). Berdasarkan hasil penelitian sebelumnya dapat disimpulkan bahwa asam protokatekuat mempunyai aktivitas biologis salah satunya antioksidan. Hal ini terbukti bahwa senyawa asam protokatekuat yang telah diisolasi dari ekstrak etil asetat biji *E. elatior* mempunyai aktivitas antioksidan yang sangat kuat dengan nilai IC_{50} sebesar 1.32 $\mu g/mL$.

4. SIMPULAN

Senyawa asam protokatekuat hasil isolasi dari ekstrak etil asetat biji *E. elatior* memiliki aktivitas antioksidan dengan nilai IC₅₀ sebesar 1.32 µg/mL yang menandakan bahwa senyawa ini mempunyai aktivitas antioksidan yang sangat kuat.

UCAPAN TERIMAKASIH

Terimakasih kepada LP2M melalui dana hibah penelitian pengembangan ilmu pengetahuan (Sains) yang telah memberikan bantuan dana pada penelitian ini. Ketua PLT yang telah memfasilitasi sarana dan prasarana laboratorium. Terimakasih kepada Dr. Sofa Fajriah, M.Si di LIPI Serpong untuk pengukuran NMR, Harold Eka Atmaja, M.Si di Lab Farmakokinetik UNPAD untuk pengukuran ESI-MS/MS. Drs. Erizal di BATAN PAIR untuk pengukuran FTIR.

DAFTAR PUSTAKA

- Babich H, Sedletcaia A, Kenigsberg B. 2002. In vitro cytotoxicity of protocatechuic acid to cultured human cells from oral tissue: involvement in oxidative stress. *Pharmacol. Toxicol.* 91 (5): 245–253.
- Chang SW, Kim KH, Lee IK, Choi SU, Ryu SY, Lee KR. 2009. Phytochemical constituents of *Bistorta manshuriensis*. *Natural Product Sciences.* 15(4): 234-240.
- Chaudhary S. 2015. Evaluation of antioxidant and anticancer activity of extract and fractions of *Nardostachys jatamansi* DC in breast carcinoma. *BMC Complementary and Alternative Medicine.* 15:50.
- Dai J, Mumper RJ. 2010. Plant Phenolics: Extraction, analysis and their antioxidant and anticancer properties. *Molecules.* 15(10): 7313-7352.
- Lin HH, Chen JH, Huang CC, Wang CJ. 2007. Apoptotic effect of 3,4-dihydroxybenzoic acid on human gastric carcinoma cells involving JNK/p38 MAPK signaling activation. *International Journal of Cancer.* 120 (11): 2306–2316.
- Liu CL, Wang JM, Chu CY, Cheng MT, Tseng TH. 2002. In vivo protective effect of protocatechuic acid on tert-butyl hydroperoxide-induced rat hepatotoxicity. *Food Chem Toxicol.* 40 (5): 635–41.
- Mardawati E, Achyar CS, Marta MDH. 2008. Kajian aktivitas antioksidan ekstrak kulit manggis (*Garcinia mangostana* L) dalam rangka pemanfaatan limbah kulit manggis di Kecamatan Puspahiang Kabupaten Tasikmalaya. *Abstrak.* Bandung (ID): Universitas Padjajaran.
- Mikail HG. 2010. Pytochemical screening, elemental analysis and acute toxicity of aqueous extract of *Allium sativum* L. bulbs in experimental rabbits. *Journal of Medicinal Plants Research.* 4 (4): 322-6.
- Mudjirahmini D, Ersam T. 2007. Turunan 4-fenilkumarin dari fraksi polar ekstrak etil asetat pada batang *Garnicia Ballca* Miq. *Akta Kimindo.* 3(1): 55-60.
- Nakamura Y, Torikai K, Ohto Y, Murakami A, Tanaka T, Ohigashi H. 2000. A simple phenolic antioxidant protocatechuic acid enhances tumor promotion and oxidative stress in female ICR mouse skin: dose-and timing-dependent enhancement and involvement of bioactivation by tyrosinase. *Carcinogenesis.* 21 (10): 1899–1907.
- Naufalin R, Jenie BSL, Kusnandar F, Sudarwanto M, Rukmini H. 2005. Aktivitas antibakteri ekstrak bunga kecombrang terhadap bakteri patogen dan perusak pangan. *Jurnal Teknologi dan Industri Pangan.* 16(2): 119-125.
- Pokorny J. 2007. Are the natural antioxidants better and safer thansynthetic antioxidants. *Journal of Lipid Science and Technology.* 109: 629 – 642.
- Risky TA, Suyatno. 2014. Aktivitas antioksidan dan antikanker ekstrak metanol tumbuhan paku *Adiantum philippensis* L. *Jurnal UNESA Chem.* 3(1): 89-95.
- Rusanti A, Sukandar D, Rudiana T, Adawiah. 2017. Profil fraksi sitotoksik terhadap sel murine leukimia P-388 dari ekstrak biji honje (*Etltingera elatior*). *Jurnal Kimia Valensi.* 3(1): 79-87.
- Sukandar D, Radiastuti N, Muawanah A, Hudaya A. 2011. Antioxidant activity from water extract of kecombrang flower (*Etltingera elatior*). *Jurnal Kimia Valensi.* 2(2): 393–398.