

ISOLASI FLAVONOID DARI BIJI KAKAO (*Theobroma cacao*)

Bustanul Arifin*, Afrizal, Hasnirwan, Rio Rinaldo

Laboratorium Kimia Organik Bahan Alam, Jurusan Kimia FMIPA,
Universitas Andalas Padang

email : ba_arifin@yahoo.co.id

ABSTRAK

Telah dilakukan isolasi senyawa flavonoid dari biji cacao (*Theobroma cacao*) pada fraksi etil asetat. Isolasi dilakukan dengan maserasi menggunakan metanol dan dilakukan fraksinasi dengan n-heksan dan etil asetat. Fraksi etil asetat dilakukan kolom kromatografi bertekanan tinggi (*flash colom chromatography*). Hasil isolasi berupa kristal bewarna kuning dan telah memberikan noda tunggal dengan beberapa eluen menggunakan kromatografi lapisan tipis (TLC). Kromatografi kertas dua arah didapatkan Rf 0,45 menggunakan eluen BAA (4:1:5) dan Rf 0,48 menggunakan eluen asam asetat 15%. Spektroskopi ultraviolet dengan menggunakan pelarut metanol memberikan serapan pada λ_{maks} 281 dan 328 nm. Menggunakan pereaksi geser NaOCH₃ serapan λ_{maks} 290 dan 411 nm, AlCl₃ λ_{maks} 293 dan 385 nm dan HCl λ_{maks} 280 dan 330 nm, NaOOCCH₃ serapan λ_{maks} 281 dan 330 nm dan H₃BO₃ serapan λ_{maks} 295 dan 381 nm. Spektroskopi infra merah (IR) memberikan serapan pada angka gelombang 3407,6; 2360,4; 1663,3; 409,8 cm⁻¹. Berdasarkan data tersebut diperkirakan senyawa hasil isolasi dari λ_{maks} 281 dan 328 nm adalah suatu flavonol yang tersubstitusi dengan gugus hidroksi pada posisi 7, 3' dan 4'.

Kata kunci: isolasi, flavonoid, cacao

PENDAHULUAN

Kekayaan alam yang melimpah pada sumber daya alam hayati, telah dimanfaatkan oleh masyarakat Indonesia untuk berbagai keperluan, antara lain sebagai bahan baku industri, pangan dan sebagai obat. Banyak jenis tumbuhan yang sudah dimanfaatkan sejak lama sebagai makanan dan obat-obatan tradisional tapi belum diketahui senyawa kimia yang terkandung di dalamnya (Gunawan dkk, 1983; Achmad dkk, 1990).

Penggunaan tumbuhan obat untuk menyembuhkan berbagai macam penyakit telah lama dilakukan manusia. Hal ini mendorong para ahli untuk mengkaji kandungan tumbuhan tersebut yang berperan sebagai sumber obat. Sampai saat ini masih banyak potensi tumbuhan obat yang belum diteliti. Dari sekian banyak spesies tumbuhan, hanya sedikit yang telah dikaji secara fitokimia dan lebih sedikit lagi yang telah mengkaji aktivitas biologis dan farmakologisnya (Gunawan dkk, 1983; Achmad dkk, 1990).

Kandungan kimia yang memberikan efek fisiologi dan farmakologi lebih dikenal dengan senyawa aktif. Senyawa aktif ini merupakan hasil metabolisme sekunder dari tumbuhan itu sendiri dimana penyebaran dan jumlahnya dalam tiap bagian tumbuhan tidak sama. Hal ini mendorong para ahli untuk melakukan penelitian tentang isolasi, sintesis, uji bioaktivitas dan pemanfaatannya lebih lanjut (Gunawan dkk, 1983; Achmad dkk, 1990; Geissman, 1962).

Salah satu tumbuhan yang digunakan sebagai bahan makanan dan obat tradisional adalah biji kakao. Bagian biji kakao banyak dimanfaatkan oleh masyarakat yang berguna sebagai antioksidan yang dapat mengurangi pembentukan radikal bebas penyebab kanker. Kakao juga mengandung senyawa bioaktif yang bermanfaat mencegah terjadinya penimbunan kolesterol pada dinding pembuluh darah (Achmad dkk, 1990).

Biji kakao mengandung banyak senyawa kimia seperti glukosa, fruktosa, sukrosa, tanin, lemak dan protein. Sedangkan

metabolit sekunder yang ada pada tanaman ini seperti steroid, terpenoid, fenolik, kumarin, alkaloid dan flavonoid. Penelitian yang telah dilaporkan bahwa dalam biji kakao terdapat flavonoid, merupakan antioksidan yang sangat bagus (Achmad dkk, 1990).

Berdasarkan hal tersebut di atas serta kandungan senyawa aktif yang telah dilaporkan, maka penelitian ini dilakukan untuk mengisolasi salah satu dari senyawa metabolit sekunder tersebut yaitu flavonoid. Penelitian ini dilakukan dengan metoda ekstraksi secara maserasi dengan menggunakan pelarut metanol, fraksinasi dengan n-heksan dan etil asetat, pemisahan dan pemurnian komponen kimia dengan kromatografi, serta karakterisasi senyawa dengan melakukan pemeriksaan secara konvensional dan spektrofotometri.

Penelitian ini bertujuan untuk mengisolasi, mengidentifikasi dan mengkarakterisasi senyawa flavonoid dari biji kakao (*Theobroma cacao*). Masalah yang dibahas pada penelitian ini adalah mengisolasi senyawa flavonoid, kemudian diidentifikasi jenis flavonoid yang didapatkan. Jenis flavonoid hasil isolasi dikarakterisasi untuk memperkirakan struktur senyawa tersebut.

METODE PENELITIAN

Alat dan Bahan

Peralatan yang digunakan untuk pengerjaan isolasi adalah seperangkat alat distilasi, seperangkat alat *rotary evaporator* (Betracher Lamag), lemari pengering atau oven (Fisher Scientific Isotemp oven, model 630 F), lampu UV ($\lambda = 254$ nm dan 366 nm), *melting point apparatus* (Fisher Jhon), spektrofotometer UV-Vis (Type UV-160 A; Shimadzu), kolom kromatografi (50 cm x 2,5 cm i.d), plat KLT (silika gel 60 F₂₅₄), gelas ukur berbagai ukuran, botol berbagai ukuran, chamber, plat tetes, corong pisah, kapiler, aluminium foil, kromatografi kertas dan kertas saring.

Bahan-bahan yang digunakan untuk uji fitokimia adalah HCl pekat, logam Mg, asam asetat, logam natrium, AlCl₃, natrium asetat, H₃BO₃, aseton, akuades. Sedangkan bahan-bahan untuk pengerjaan isolasi adalah biji kakao (*Theobroma cacao*), metanol, etil asetat, n-heksana dan silika gel 60 F₂₅₄.

Persiapan Sampel

Sampel diambil di kota Pariaman, Propinsi Sumatera Barat sebanyak 2 kg. Bagian

yang diisolasi adalah biji kakao (*Theobroma cacao*).

Uji Pendahuluan Flavonoid

Sampel segar daun sebanyak 2 gram dipotong halus, dimasukkan ke dalam sebuah tabung reaksi, kemudian dimaserasi dengan metanol dan dipanaskan di atas penangas air selama 15 menit. Hasil maserasi dalam kondisi panas disaring dan dimasukkan ke dalam tabung reaksi lainnya. Tambahkan beberapa tetes larutan HCl pekat dan beberapa butir bubuk Mg ke dalam ekstrak metanol. Terbentuknya warna merah menandakan adanya senyawa flavonoid (Harbone 1987a, 1987b; Harbone dkk 1975).

Isolasi Senyawa Flavonoid

Sampel dimaserasi pada temperatur kamar menggunakan pelarut metanol beberapa kali sampai ekstraksi sempurna. Hasil maserasi dipekatkan dengan rotary evaporator pada suhu 40°C. Ekstrak pekat tersebut difraksinasi dengan n-heksana, kemudian dilanjutkan fraksi dengan etil asetat. Setiap fraksi yang didapatkan dilakukan uji terhadap senyawa flavonoid. Fraksi yang positif flavonoid (fraksi etil asetat) dipekatkan dengan rotary evaporator.

Ekstrak pekat dari fraksi etil asetat sebanyak 5 gram dilakukan kolom kromatografi bertekanan tinggi menggunakan eluen n-heksana, etil asetat dan metanol dengan sistem kepolaran bertingkat. Hasil kromatografi kolom tersebut selanjutnya diuji dengan KLT dengan menggunakan pengungkap noda uap yodium. Untuk fraksi yang mempunyai pola noda dan harga R_f yang sama digabung menjadi satu fraksi dan selanjutnya dipekatkan dengan rotari evaporator. Fraksi yang positif flavonoid dilakukan kolom kromatograf kembali dengan berbagai eluen dengan sistem kepolaran beryingkat.

Fraksi yang diperoleh dilakukan uji flavonoid dan dilakukan kromatografi kertas untuk menentukan adanya senyawa flavonoid. Fraksi yang positif terhadap uji flavonoid dimurnikan dengan kromatografi kertas preparatif menggunakan eluen n-butanol:asam asetat:air (4:1:5). Hasil isolasi senyawa yang didapatkan dilakukan karakterisasi untuk mengetahui strukturnya (Harbone 1987a, 1987b).

Karakterisasi senyawa hasil isolasi

Untuk menentukan golongan flavonoid, hasil isolasi diperiksa dengan metoda

kromatografi kertas 2 arah, dengan eluen campuran n-butanol, asam asetat, dan air (4 : 1 : 5) serta asam asetat 15 %. Kemudian dibandingkan dengan kromatogram standar. Untuk menentukan strukturnya digunakan analisis spektroskopi spektrofotometer ultraviolet dan infra merah. Khusus untuk spektrofotometer ultraviolet dilakukan penambahan pereaksi geser natrium metoksida (NaOCH_3), aluminium klorida/asam klorida (AlCl_3/HCl) dan natrium asetat/asam borat ($\text{NaOOCCH}_3/\text{H}_3\text{BO}_3$) (Harbone 1987a, 1987b).

HASIL DAN PEMBAHASAN

Salah satu metabolit sekunder yang terdapat dalam sampel adalah senyawa flavonoid. Hal ini dibuktikan dengan Sianidin test menggunakan HCl pekat dan bubuk Mg menghasilkan warna merah muda. Fraksi etil asetat memberikan warna merah dengan pereaksi Mg/HCl berarti mengandung senyawa flavonoid.

Fraksi etil asetat dilakukan kolom kromatografi, hasil kromatografi kolom ditampung dalam vial 10 mL dan di KLT. Berdasarkan hasil KLT, fraksi-fraksi yang memiliki pola noda dan Rf yang sama digabung diperoleh 8 fraksi. Fraksi yang mengandung flavonoid adalah fraksi 5, 6, dan 7, sedangkan fraksi lainnya mengandung flavonoid. Selanjutnya dilakukan pemurnian terhadap fraksi 5 dengan kromatografi kolom kembali dan diperoleh 4 fraksi. Fraksi yang mengandung flavonoid adalah fraksi 1, 2 dan 4 sedangkan fraksi 3 tidak mengandung flavonoid. Selanjutnya fraksi 1 dilakukan pemurnian dengan kromatografi kertas preparatif menggunakan eluen n-butanol:asam asetat:air (4:1:5).

Hasil kromatografi kertas preparatif diperoleh senyawa murni kristal/bubuk berwarna kuning. Senyawa hasil isolasi memberikan noda tunggal dengan eluen yaitu eluen n-heksana : etil asetat (5 : 5) Rf 0,45 eluen n-heksana : etil asetat (2 : 8) Rf 0,55 eluen etil asetat : aseton (5 : 5) Rf 0,75 serta etil asetat : metanol (1 : 1) Rf 0,88. Kromatografi kertas dua arah didapatkan Rf 0,45 menggunakan eluen BAA (4:1:5) dan Rf 0,48 menggunakan eluen asam asetat 15%.

Sedangkan senyawa hasil isolasi memberikan puncak pada panjang gelombang 328 nm sebagai puncak I dan 281 nm sebagai puncak II. Bila menggunakan pereaksi geser maka akan berpeluang mengalami pergeseran panjang gelombang. Pada pita I terjadi

pergeseran batokromik sebesar 83 nm dan pita II pergeseran batokromik sebesar 9 nm, setelah penambahan pereaksi geser NaOMe. Hal ini menindikasikan bahwa senyawa flavonoid hasil isolasi tidak memiliki gugus $-\text{OH}$ yang tersubstitusi pada cincin B, kemungkinan adanya gugus hidroksi pada cincin A.

Penambahan AlCl_3 akan membentuk kompleks yang tahan asam antara gugus hidroksi dan keton, dan kompleks yang tidak tahan asam antara gugus hidroksi yang bertetangga (gugus orto-hidroksi). Jadi spektrum AlCl_3 berguna untuk mendeteksi 5-OH dan orto-dihidroksida. Sedangkan penambahan HCl akan memutus kompleks yang tidak tahan asam, jadi spektrum AlCl_3/HCl hanya merupakan pengaruh gugus hidroksi-keto dan mendeteksi ada atau tidaknya 5-OH saja.

Spektrum UV senyawa hasil isolasi dengan penambahan AlCl_3 , terjadi pergeseran batokromik sebesar 57 nm dan pita II pergeseran batokromik sebesar 12 nm, menunjukkan tidak adanya gugus hidroksi yang berdekatan dengan gugus keton, dan gugus orto-dihidroksi pada cincin B. Hal ini diperkuat dengan tidak adanya pergeseran setelah penambahan AlCl_3/HCl .

Penambahan pereaksi geser yaitu NaOAc merupakan basa yang lebih lemah dari pada NaOMe, karena itu spektrum NaOAc hanya dapat mendeteksi ada atau tidaknya gugus hidroksi yang paling asam, terutama untuk gugus 7-OH atau yang setara. Spektrum NaOAc/ H_3BO_3 berguna untuk mendeteksi ada atau tidaknya gugus orto-dihidroksi antara 2 gugus hidroksi paling asam berdekatan (6,7-OH atau 7,8-OH pada cincin A dan 3',4'-OH pada cincin B), karena NaOAc/ H_3BO_3 menjembatani kedua gugus tersebut.

Dari spektrum UV senyawa hasil isolasi dengan penambahan NaOAc didapatkan pergeseran batokromik sebesar 2 nm, hal ini diperkirakan karena adanya 7-OH. Setelah penambahan NaOAc/ H_3BO_3 terjadi pergeseran batokromik sebesar 53 nm dan pita II pergeseran batokromik sebesar 14 nm, diperkirakan karena adanya orto-dihidroksi pada cincin B. Data ini diperkuat dengan pereaksi geser AlCl_3/HCl .

Mengacu pada hasil analisa preaksi geser terhadap spektrum UV senyawa hasil isolasi, maka diperkirakan bahwa senyawa ini termasuk jenis senyawa flavonol yang memiliki gugus hidroksi pada posisi 7, 3' dan 4'.

Spektrum IR senyawa hasil isolasi serapan melebar pada angka gelombang 3407,6 cm^{-1} yang merupakan gugus OH dan diperkuat

dengan adanya serapan yang kuat pada daerah sidik jari 1054 cm^{-1} , yang khas untuk gugus C-O alkohol.

Munculnya serapan pada angka gelombang $1663,3\text{ cm}^{-1}$ menindikasikan adanya gugus C=O, yang khas untuk keton siklik. Pada angka panjang gelombang 1610 cm^{-1} memperlihatkan adanya gugus C=C aromatik, adanya cincin benzen pada $409,8\text{ cm}^{-1}$, adanya C-H alifatik pada angka gelombang 2932 cm^{-1} , dan pada angka gelombang 1026 cm^{-1} memperlihatkan adanya serapan stretching C-O-C.

Senyawa hasil isolasi dengan kromatografi kertas 2 arah dengan eluen n-butanol:asam asetat:air (4:1:5) Rf 0,45 dan asam asetat 15% Rf 0,48. Pola noda yang dihasilkan dibandingkan indentik dengan flavonol-O-glikosida.

Berdasarkan hasil penerjemahan spektrum yang dihasilkan, senyawa hasil isolasi pada sistem deteksi UV, IR, dan KkT 2 arah menunjukkan bahwa senyawa hasil isolasi merupakan senyawa flavonol yang memiliki gugus OH pada posisi 7, 3' dan 4'.

KESIMPULAN

Berdasarkan penelitian yang telah dilakukan terhadap biji kakao, maka dapat disimpulkan bahwa:

1. Hasil isolasi dari fraksi etil asetat diperoleh senyawa flavonoid berupa bubuk berwarna kuning, hasil kromatografi lapisan tipis dengan eluen n-heksana:etil asetat (5 : 5) memberikan harga Rf 0,45 menggunakan eluen n-heksana : etil asetat (2 : 8) Rf 0,55 dengan eluen etil asetat : aseton (5 : 5) Rf 0,75 serta etil asetat : metanol (1 : 1) Rf 0,88.
2. Senyawa hasil isolasi dengan kromatografi kertas dua arah didapatkan Rf 0,45 menggunakan eluen BAA (4:1:5) dan Rf 0,48 menggunakan eluen asam asetat 15%.
3. Analisa data pemeriksaan kimia, kromatografi kertas 2 arah, spektrometri UV dan IR disimpulkan bahwa senyawa hasil isolasi adalah senyawa flavonoid golongan flavonol.
4. Analisa spektrum UV dengan pereaksi geser menunjukkan bahwa senyawa flavon memiliki gugus OH pada posisi C₇, C_{3'}, dan C_{4'}.

Untuk lebih sempurnanya penelitian ini, maka dapat disarankan penelitian ini lebih lanjut melakukan pengukuran spektroskopi massa dan spektroskopi NMR serta uji efek fisiologis dan farmakologis terhadap senyawa hasil isolasi.

DAFTAR RUJUKAN

- Achmad, S.A., E.H. Hakim dan L. Makmur. (1990). Flavonoid dan Phyto Medica, Kegunaan dan Prospek. *Phyto Medica*, Vol. I.
- Cody, V. , E. Middleton, J. B. Harborne and A. Berez. (1987). *Flavonoids in Biology and Medicine II, Biochemical Cellular and Medicinal Properties*. Alan R. Liss, Inc. , New York.
- Geissman, T. A.. (1962). *The Chemistry of Flavonoid Compunds*. Pergamon Press, New York.
- Gunawan, D . , Dj. Wahyono, I. A. Donatus, Taroen dan Mulyono. (1983). *Risalah Simposium Penelitian Tumbuhan Obat III*, Proceeding: Simposium Penelitian Tumbuhan Obat Indonesia, Yogyakarta, 12-15 September 1983, Fakultas Farmasi Universitas Gajah Mada, Yogyakarta
- Harbone, J.B. (1987a). *Metoda Fitokimia*, Terbitan ke-2 ITB, Bandung.
- Harbone, J. B. , T.J.. Mabry and H. Mabry. (1975) *The Flavonoids*, Chapman and Hall, London.
- Harbone, J.B. (1987b). *Phytochemical Methods* (Metoda Fitokimia, Penuntun Cara Moderen Menganalisis Tumbuhan), Terbitan ke-2, diterjemahkan oleh Kosasih Padmawinata, Penerbit ITB, Bandung.