

**ISOLASI DAN IDENTIFIKASI SENYAWA ANTIOKSIDAN
DARI EKSTRAK METANOL KAYU SECANG (*Caesalpinia sappan*)**

**ISOLATION AND IDENTIFICATION OF ANTIOXIDANT
COMPOUNDS FROM METHANOL EXTRACT OF SAPPAN WOOD
(*Caesalpinia sappan*)**

**Agung Wibawa Mahatva Yodha^{1,2}, Muamar Abdillah², Astrid Indalifiany²,
Elfahmi³, Agus Chahyadi³, Sahidin^{2*}**

1. Department of Pharmacy, Politeknik Bina Husada, Kendari, Indonesia
2. Faculty of Pharmacy, Universitas Halu Oleo, Kendari, Indonesia
3. Pharmaceutical Biology Research Group, School of Pharmacy, Bandung Institute of Technology, Bandung, Indonesia

Submitted: 14-10-2021

Revised: 20-11-2021

Accepted: 31-12-2021

*Corresponding author
Sahidin

Email:
sahidin02@yahoo.com

ABSTRAK

Ekstrak kayu secang (*Caesalpinia sappan*) memiliki sifat antioksidan yang lebih baik dibandingkan asam askorbat. Secara empiris, kayu secang sering kali dimanfaatkan sebagai obat tradisional di kalangan masyarakat. Sebagai upaya mendukung pemanfaatan tumbuhan tersebut maka perlu diisolasi dan diidentifikasi senyawa aktif antioksidan dari ekstrak metanol kayu secang. Ekstrak diperoleh dengan metode maserasi dan evaporasi. Senyawa aktif antioksidan pada pengamatan KLT-DPPH diisolasi menggunakan kromatografi vakum cair hingga diperoleh dua senyawa murni. Hasil identifikasi LC-MS/MS kedua senyawa tersebut, masing-masing menunjukkan puncak pada waktu retensi 6,35 menit dengan fragmentasi puncak ion molekul pada m/z 271,09; 257,15; 167,03; 151,06; 123,12 dan 104,06 yang diterjemahkan sebagai *Alpinetine* dan pada waktu retensi 5,75 menit dengan fragmentasi puncak ion molekul pada m/z 287,09, 177,06, 164,05, 123,04 dan 110,04 yang diterjemahkan sebagai *3-Deoxysappanone B*. Aktivitas antioksidan secara kuantitatif menunjukkan *Alpinetine* dan *3-Deoxysappanone B* masing-masing mampu menangkap radikal DPPH dengan nilai IC_{50} sebesar 20,11 μ M dan 15,28 μ M.

Kata Kunci: *Caesalpinia sappan*, antioksidan, *Alpinetine*, *3-Deoxysappanone*

ABSTRACT

*Sappan wood extract (Caesalpinia sappan) provides better antioxidant properties than ascorbic acid. Empirically, Sappan wood is often used as traditional medicine. To support the utilization of Sappan wood, the isolation and identification of active antioxidant compounds from the methanol extract of Sappan wood had been conducted from this study. Extraction was performed with maceration and evaporation methods. The spots of active antioxidant compounds in TLC-DPPH observations were isolated using liquid vacuum chromatography to obtain two pure compounds. The results of the LC-MS/MS identification of the two compounds, respectively, exhibited peak fragmentation of molecular ions at m/z 271.09, 257.15, 167.03, 151.06, 123.12, and 104.06 at the retention time of 6.35 minutes which were translated as *Alpinetine* and peak fragmentation of molecular ion at m/z 287.09, 177.06, 164.05, 123.04 and 110.04 at a retention time of 5.75 minutes which were translated as *3-Deoxysappanone B*. The antioxidant activity quantitatively showed that *Alpinetine* and *3-Deoxysappanone B* were capable of scavenging DPPH radicals with IC_{50} values of 20.11 M and 15.28 M, respectively.*

Keywords: *Caesalpinia sappan*, antioxidant, *Alpinetine*, *3-Deoxysappanone*

1. PENDAHULUAN

Tradisi dan budaya masyarakat di pedesaan, menjadikan tumbuhan sebagai obat-obatan. Pemanfaatan tumbuhan sebagai pengobatan dan pencegahan dari penyakit juga disarankan oleh WHO (*World Health Organization*) (Sari dan Suhartati, 2016). Penyakit kronis yang disebabkan oleh aktivitas radikal bebas selalu terjadi lingkungan masyarakat (Phanm-Huy et al., 2008). Radikal bebas adalah agen pengoksidasi, memiliki elektron tidak berpasangan, sehingga membuatnya menjadi molekul yang mudah bereaksi dengan molekul lain khususnya sel dalam tubuh (Güez et al., 2017).

Radikal bebas dapat diatasi dengan penggunaan agen antioksidan. Antioksidan merupakan zat penangkap atau peredam radikal bebas dengan cara bereaksi dengan dengan radikal bebas sehingga radikal bebas tersebut dapat dinetralkan (Yemirta, 2010). Secang (*Caesalpinia sappan* L.) memiliki kandungan fenolik dan flavonoid sebagai agen antioksidan penangkap radikal bebas. Zat sisa yang dihasilkan dari senyawa antioksidan alami lebih mudah terdegradasi dibandingkan senyawa antioksidan sintetik (Sari dan Suhartati, 2016).

Bagian yang dapat dimanfaatkan dari tanaman *C. Sappan* sebagai bahan obat tradisional adalah kayu yang telah dipotong-potong atau diserut (Cahyaningtyas et al., 2019). Hasil penelitian menjelaskan bahwa kemampuan antioksidan kayu *C. sappan* lebih baik dibandingkan vitamin C dan vitamin E (Sari dan Suhartati, 2016), selain itu kurangnya sitotoksitas terhadap sel mamalia menjadikan ekstrak kayu *C. sappan* aman untuk digunakan sebagai minuman herbal maupun obat tradisional lainnya (Xu dan Lee 2004; Sireeratawong et al., 2010).

Kemampuan pengobatan dengan pemanfaatan tanaman *C. sappan* disebabkan karena kandungan senyawa kimia didalamnya seperti terpenoid, steroid, alkaloid, fenolik, flavonoid, dan saponin (Asfar dan Yasser, 2018). Menurut Batubara (2010), Chang (2012) dan Zanin (2012), beberapa senyawa kimia yang berhasil di isolasi tersebut memiliki efek antioksidan. Oleh karena itu, penelitian ini memiliki tujuan untuk melakukan isolasi dan identifikasi senyawa dari kayu secang (*C. sappan*) yang memiliki aktivitas sebagai antioksidan.

2. METODE

Ekstraksi

Kayu secang (*C. sappan*) dikumpulkan dari Kecamatan Palangga, Kabupaten Konawe Selatan, Provinsi Sulawesi Tenggara. Kayu diserut, dirajang dan dikeringkan pada suhu kamar, selanjutnya digiling menjadi serbuk simplisia halus menggunakan penggiling (SMJIMA Model FFC-15-3A). Bahan yang digiling (1 kg) diekstraksi dengan menggunakan pelarut etanol 96%. Proses ekstraksi diulang sebanyak tiga kali dengan masing-masing pelarut sebanyak 7 liter. Ekstrak disaring melalui kertas saring Whatman no. 3 dan filtratnya dipisahkan menggunakan *rotary evaporator* (Buchi Labotec rotavapor model R-205, Jerman). Ekstrak pekat kemudian dipindahkan ke dalam gelas kimia yang telah ditimbang, dikeringkan dan diketahui massa ekstrak pekat yang dihasilkan (25 g).

Penentuan Senyawa Penghambat Radikal Bebas

Plat kromatografi lapis tipis (KLT) disiapkan dan ditotol dengan ekstrak selanjutnya dielusi dalam sistem pelarut n-heksan/etil asetat (5:5). Untuk penentuan senyawa aktif, plat

disemprot dengan 0,2% 2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl (DPPH) (HIMEDIA, Mumbai, India) dalam methanol dan diinkubasi selama 30 menit pada suhu ruang. Spot senyawa aktif antioksidan diamati pada hasil reaksi positif yang ditunjukkan dengan munculnya spot kuning dengan latar belakang ungu.

Isolasi Senyawa Aktif

Sebanyak 25 gram ekstrak ethanol difraksinasi menggunakan fasa gerak n-heksan : etilasetat dengan peningkatan polaritas gradien. Fasa gerak n-heksan : etilasetat dengan perbandingan; 5:5, 3:7, 2:8, 1:9 (v/v) masing-masing 500 mL dialirkan pada kromatografi vakum cair yang dikemas dengan fasa diam silika gel 60 GF₂₅₄. Setelah elusi, senyawa antioksidan dari fraksi yang dihasilkan dievaluasi kembali secara kualitatif menggunakan metode KLT-DPPH. Fraksi yang dielusi dengan n-heksan : etilasetat (3:7) dan n-heksan : etilasetat (2:8) ternyata mengandung senyawa utama yang memiliki aktivitas antioksidan. Oleh karena itu, fraksi dipilih untuk direkristalisasi lebih lanjut sehingga diperoleh masing-masing senyawa aktifnya sebesar 0,072 g dan 0,054 g. Senyawa aktif selanjutnya diidentifikasi dan dievaluasi aktivitasnya secara kuantitatif.

Identifikasi Senyawa Aktif

Struktur senyawa aktif antioksidan ditentukan menggunakan analisis LC-MS/MS, Xevo G2-XS QTOF (Waters Corporation, Milford, USA) yang dilengkapi dengan sumber ionisasi elektropray (ESI) digabungkan dengan analisis UPLC (Ultra Performance LC) dilakukan dengan menggunakan Waters Acquity. Kolom HSS T3 C18 fase terbalik (2,1 x 100 mm, ukuran partikel 1,8 µm) digunakan dan dipertahankan pada suhu 40°C. Fase gerak terdiri dari A (0,1% asam format dalam air) dan B (asetonitril dalam asam format 0,1%). Elusi gradien dilakukan pada laju alir 0,3 mL/menit dengan volume injeksi 1 µL. Gradiennya adalah sebagai berikut: 5% B (0-8 mnt), 40% B (8-11 mnt), dan 100% B (11-16 mnt). Rentang data dari 50-1200 m/z. Semua data LC-MS diolah, diambil puncaknya dan dianalisis menggunakan platform informatika UNIFI. Intensitas setiap ion menghasilkan matriks yang terdiri dari nilai m/z, waktu retensi (RT) dan luas puncak. Variabel yang menarik kemudian diidentifikasi menggunakan perangkat lunak UNIFI (Yuk et al, 2016).

Evaluasi Aktivitas Antioksidan

Sebanyak 1 mL larutan 0,1 mM DPPH (HIMEDIA) dalam metanol dicampur dengan 2 mL larutan senyawa dalam metanol pada konsentrasi yang berbeda (10-50 µM). Campuran tersebut kemudian diinkubasi pada suhu kamar selama 30 menit di tempat gelap. Absorbansi diukur terhadap metanol sebagai blanko pada 517 nm menggunakan spektrofotometer UV-Vis (Jenway, 6800 Double Beam Spectrophotometer, UK). Penggunaan metanol sebagai blanko karena merupakan pelarut yang digunakan untuk melarutkan DPPH dan senyawa murni. Aktivitas penghambat radikal bebas DPPH yang lebih tinggi ditunjukkan dengan menurunnya nilai absorbansi campuran reaksi. Kontrol positif yang digunakan adalah vitamin C (Sigma-Aldrich®). Sampel disiapkan dan diukur dalam 3 pengulangan. Persentase aktivitas penghambat radikal DPPH masing-masing senyawa dihitung sebagai % inhibisi DPPH (I%) dengan menggunakan persamaan berikut:

$$I\% = [(A_0 - A_s) / A_0] \times 100\% \quad (1)$$

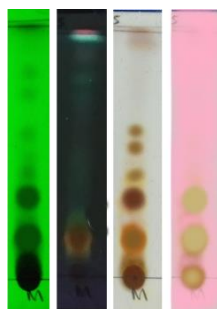
Ao adalah absorpsi kontrol, dan As adalah absorpsi larutan sampel yang diuji.

Analisis Data

Analisa data aktivitas antioksidan dianalisis menggunakan persamaan regresi (regresi linier sederhana) yaitu $y = ax + b$. Analisis regresi merupakan suatu model matematis yang dapat digunakan untuk mengetahui bentuk hubungan antar dua variabel atau lebih. Analisis regresi bertujuan untuk membuat perkiraan atau prediksi nilai suatu variabel (variabel pendan/terikat) melalui variabel yang lain (variabel independen/bebas). Koefisien determinasi berguna untuk mengetahui seberapa besar variabel dependen/terikat (Y) dapat dijelaskan oleh variabel independen/bebas (X). Semakin besar nilai R^2 , maka semakin baik variabel independen memprediksi variabel dependen. Besarnya nilai *R square* antara 0 sampai 1. Setelah mendapatkan nilai absorbansi dan % inhibisi terhadap DPPH, selanjutnya dilakukan penentuan nilai IC_{50} dengan memasukkan konsentrasi sebagai x dan % inhibisi sebagai y sehingga diperoleh nilai a dan b pada persamaan regresi $y = ax + b$. Selanjutnya disubstitusikan nilai y dengan 50 pada persamaan tersebut, dan nilai x yang akan diperoleh sebagai nilai IC_{50} . Nilai IC_{50} (*Inhibition Concentration*) merupakan nilai konsentrasi yang mampu menghambat 50% radikal bebas dimana nilai ini diperoleh melalui ekstrapolasi dari analisis regresi linear (Tantry et al, 2012). Sampel dinyatakan sebagai antioksidan sangat kuat jika nilai $IC_{50} < 50$ ppm, kuat jika nilai IC_{50} 51-100 ppm, sedang jika nilai IC_{50} 101-150, lemah jika nilai IC_{50} 151-200 ppm, dan dinyatakan tidak aktif jika mempunyai nilai $IC_{50} > 200$ ppm (Artanti et al, 2018).

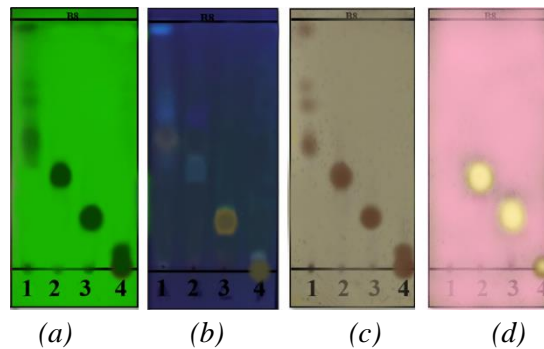
3. HASIL DAN PEMBAHASAN

Serbuk kayu secang sebanyak 1 kg di rendam dengan pelarut metanol dengan rasio 1:7 (metode maserasi). Maserasi di lakukan selama 3x24 jam dan diremaserasi menggunakan pelarut yang sama. Filtrat dikentalkan dengan *vacuum rotary evaporator* pada tekanan rendah dengan suhu pemanas dibawah 40°C sampai didapatkan ekstrak kental. Ekstrak kental didapatkan sebesar 25 gram atau 2.5%. Komponen yang ada dalam ekstrak kental serta pola pemisahannya dianalisis dengan kromatografi lapis tipis (KLT). Pangamatan kromatogram plat KLT ditunjukkan pada Gambar 1.



(a) (b) (c) (d)

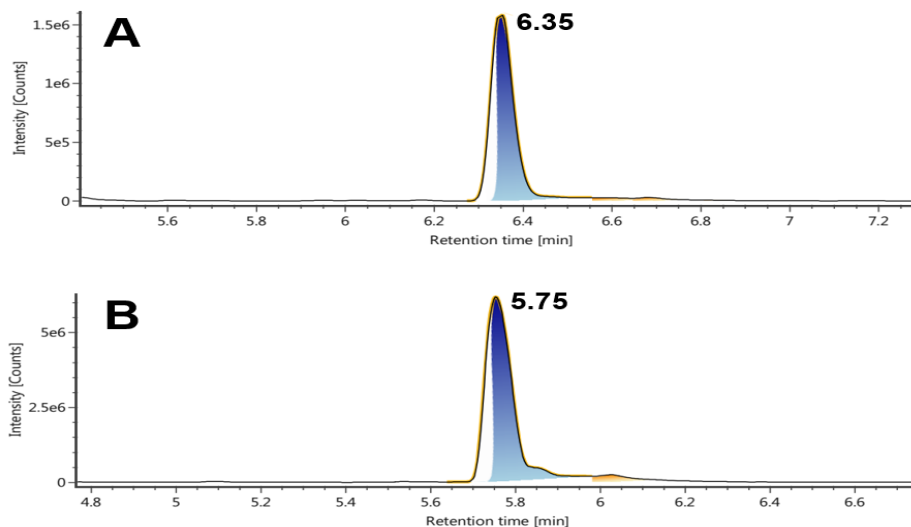
Gambar 1. Kromatogram Ekstrak; Fasa gerak heksan:etilasetat (1:1),
a = pengamatan plat KLT menggunakan sinar ultraviolet 254 nm,
b = KLT diamati dengan sinar ultraviolet pada 366 nm,
c = pewarnaan $CeSO_4$ -Asam sulfat setelah dipanaskan hingga 105°C
d = pengamatan senyawa aktif pada penyemprotan DPPH



Gambar 2. Kromatogram hasil KVC; Fasa gerak heksan:etilasetat (1:2),
a = pengamatan plat KLT menggunakan sinar ultraviolet 254 nm,
b = KLT diamati dengan sinar ultraviolet pada 366 nm,
c = pewarnaan CeSO_4 -Asam sulfat setelah dipanaskan hingga 105°C
d = pengamatan senyawa aktif pada penyemprotan DPPH

Kromatogram menunjukkan pemisahan senyawa-senyawa metabolit sekunder yang terdistribusi berdasarkan tingkat kepolarannya. Senyawa metabolit sekunder yang bertanggung jawab memberikan aktivitas antioksidan diamati menggunakan teknik KLT-DPPH. Munculnya spot kuning dengan latar belakang ungu menandakan hasil reaksi positif senyawa aktif antioksidan. Senyawa aktif tersebut diisolasi dengan teknik kromatografi vakum cair (KVC). Senyawa murni ditunjukkan dengan terbentuknya spot tunggal pada penampakan kromatogram KLT hasil fraksi pemisahan KVC. Dari empat fraksi KVC, fraksi 2 (F2) dan fraksi 3 (F3) masing-masing menunjukkan spot tunggal serta mengandung senyawa aktif antioksidan berdasarkan pengamatan KLT-DPPH (Gambar 2). Kedua fraksi tersebut, direkristalisasi lebih lanjut sehingga diperoleh berat isolat masing-masing sebesar 0.072 g dan 0.054 g.

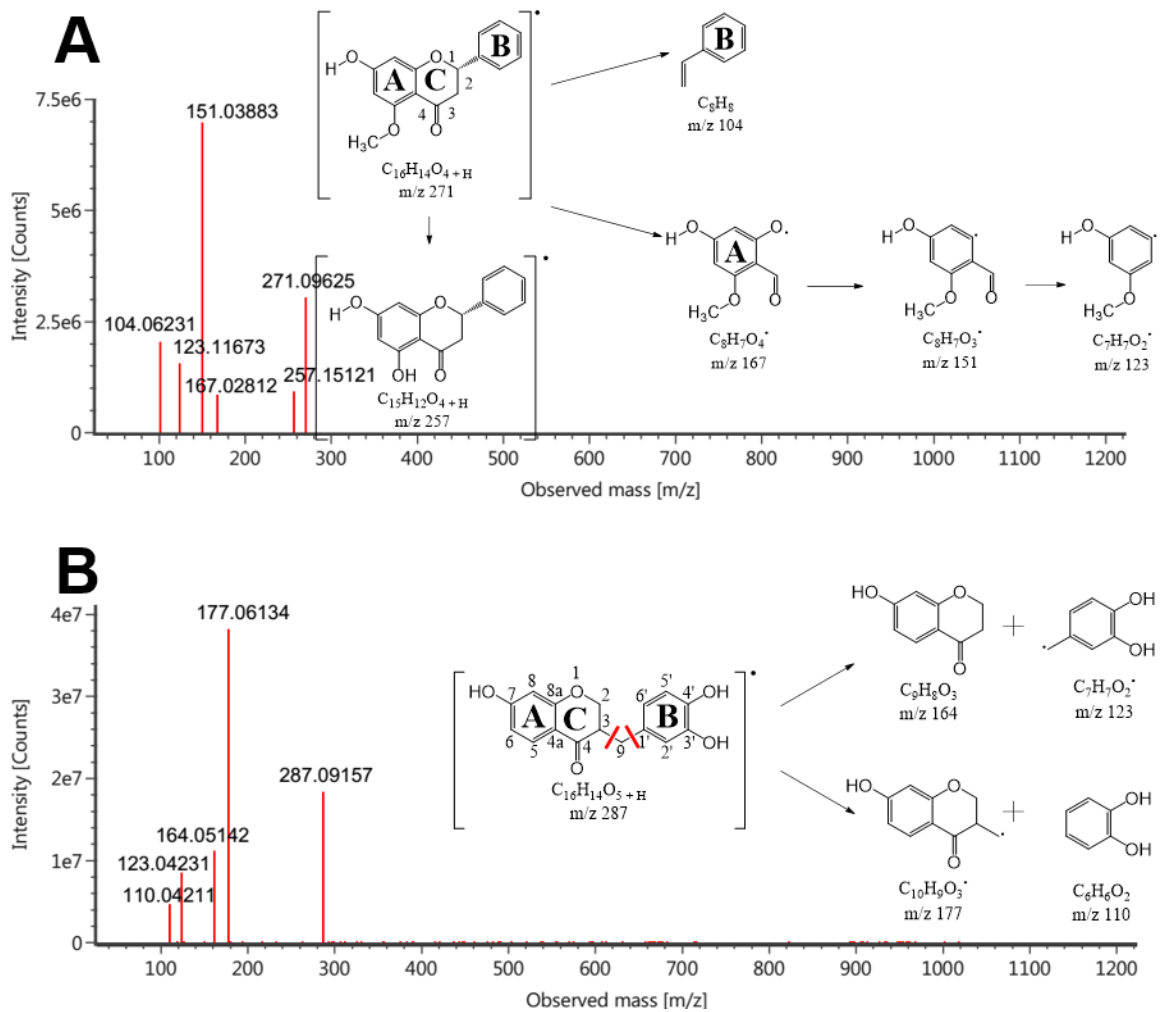
Senyawa aktif selanjutnya diidentifikasi dengan LC-MS/MS. Kromatogram *Liquid Chromatography*, menunjukkan puncak senyawa metabolit sekunder pada retensi 6.35 untuk F2 dan 5.75 untuk F3 (Gambar 3).



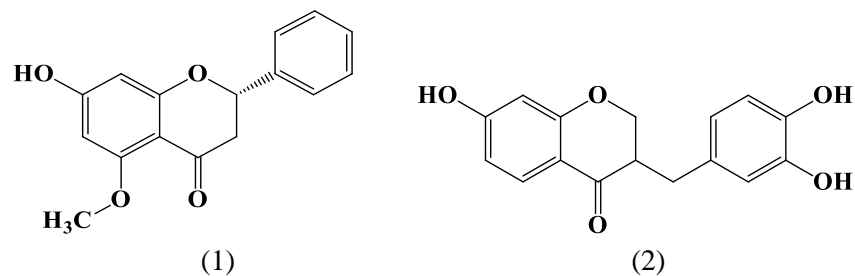
Gambar 3. Kromatogram LCMS-MS senyawa F2 (A) dan senyawa F3 (B).

Pada waktu retensi 6.35 menit, hasil Spektrometri Massa Ionisasi Elektrosprai senyawa **F2** dalam mode ion positif, puncak $[M+H]^+$ pada m/z 271.09 dapat dikonfirmasi berat molekulnya menjadi 270, sehingga rumus molekul yang paling mungkin sebagai komposisi dari struktur senyawa yang disimpulkan oleh perangkat lunak Spektrofotometer Massa adalah $C_{16}H_{14}O_4$. Fragmen ion pada m/z 257.15 dihasilkan dari ion fragmen m/z 271.09 dengan hilangnya gugus metilen ($-CH_2$). Fragmentasi ion m/z 104.06, dan 167.03 dihasilkan oleh reaksi Retro Diels-Alder yang dimana terjadi pemecahan fragmen pada cincin-C menghasilkan fragmen $^{1,3}A$ dan $^{1,3}B$, ini merupakan metode fragmentasi khas untuk flavonoid. Spektrum MS pada cincin $^{1,3}A$ menunjukkan jalur fragmentasi secara berturut-turut m/z : 167.03 \rightarrow 151.04 \rightarrow 123.12 (dengan hilangnya gugus -O dan -CO, pada masing-masing fragmentasi). Hasil pola fragmentasi yang diperoleh ([Gambar 4](#)) mirip dengan pola fragmentasi *Alpinetin* yang memiliki pola fragmentasi m/z 271.09, 257.15, 167.03, 151.06, 123.1169 dan 104.06 sehingga disimpulkan senyawa F2 merupakan senyawa *Alpinetin* (Qiu et al., 2019).

Pada waktu retensi 5.75 menit, hasil Spektrometri Massa Ionisasi Elektrosprai senyawa **F3** dalam mode ion positif, puncak $[M+H]^+$ pada m/z 287.09 dapat dikonfirmasi berat molekulnya menjadi 286, sehingga rumus molekul yang paling mungkin sebagai komposisi dari struktur senyawa yang disimpulkan oleh perangkat lunak Spektrofotometer Massa adalah $C_{16}H_{14}O_5$. Fragmen ion pada m/z 164.05 dan 123.04 dihasilkan dari ion fragment m/z 287.09 dengan terjadinya pemutusan ikatan C3-C9 sehingga menghasilkan fragment cincin A-C dan fragment cincin B berikatan dengan gugus metilen ($-CH_2$). Sedangkan fragmen ion pada m/z 177.06134 dan 110.04211 dihasilkan dari ion fragment m/z 287.09157 dengan terjadinya pemutusan ikatan C9-C1' sehingga menghasilkan fragment cincin A-C berikatan dengan gugus metilen ($-CH_2$) dan fragment cincin B. Senyawa **F3** menunjukkan fragmen ion pada m/z 287.09, 177.06, 164.05, 123.04 dan 110.04 ([Gambar 4](#)) sehingga disimpulkan memiliki struktur *3-Deoxysappanone B* (Nirmal et al., 2015). Senyawa **F3** merupakan senyawa golongan homoisoflavonoid tipe sappanin untuk pola fragmentasinya yaitu terjadi pemutusan ikatan C3-C9 atau C9-C1' sehingga menghasilkan fragment A-C dan fragment B (Yadav, 2021).



Gambar 4. Fragmentasi LCMS-MS senyawa F2 (A) dan senyawa F3 (B).



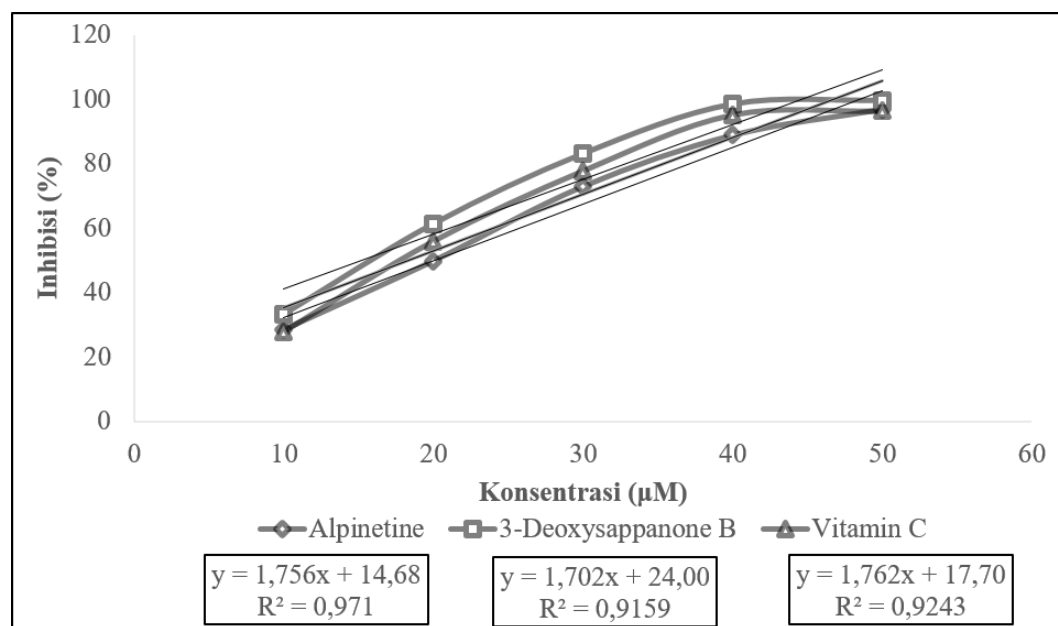
Gambar 5. Struktur molekul Alpinetine (1) dan 3-Deoxysappanone B (2)

Senyawa alpinetin dan 3-Deoxysappanone B ditetapkan aktivitas antioksidan secara kuantitatif dengan menggunakan parameter IC₅₀ yaitu konsentrasi sampel untuk menghambat 50% radikal bebas. Nilai IC₅₀ yang semakin kecil menunjukkan semakin kuat aktivitas antioksidan (Faisal et al., 2019). Aktivitas antioksidan secara kuantitatif dapat diperoleh melalui pengamatan serapan DPPH dengan memantau nilai absorbansinya pada panjang

gelombang optimum 517 nm dalam pelarut metanol (Clarke et al., 2013). Data menunjukkan penghambatan radikal bebas DPPH meningkat seiring meningkatnya konsentrasi senyawa yang diujikan (Tabel 1).

Tabel 1. Persen Inhibisi, Persamaan Linear, Koefisien Determinasi dan Nilai IC₅₀ Alpinetine, 3-Deoxysappanone B dan Vitamin C

Konsentrasi (µM)	Inhibition (%)			Persamaan Linear, Koefisien Determinasi (R ²) dan Nilai IC ₅₀ (µM)		
	Alpinetine	3-Deoxy sappanone B	Vitamin C	Alpinetine	3-Deoxy sappanone B	Vitamin C
10	28,5	33,1	27,8	y = 1.756x + 14.68 R ² = 0.971 IC ₅₀ = 20.11	y = 1.702x + 24.00 R ² = 0.916 IC ₅₀ = 15.28	y = 1.762x + 17.70 R ² = 0.924 IC ₅₀ = 18.33
20	49,8	61,2	55,9			
30	72,9	83	77,7			
40	88,8	98,4	95,1			
50	96,8	99,6	96,3			



Gambar 6. Kurva Regresi Linier antara Konsentrasi dan % Inhibisi Alpinetine, 3-Deoxysappanone B dan Vitamin C (10-50 µM).

Persamaan regresi linier untuk alpinetine adalah $y = 1.756x + 14.68$ dengan $R^2 = 0.971$, untuk 3-deoxysappanone B adalah $y = 1.702x + 24.00$ dengan $R^2 = 0.916$, sedangkan untuk vitamin C regresi linearnya adalah $y = 1.762x + 17.70$ dengan $R^2 = 0.924$ (Gambar 6). Nilai R^2 0.971 pada alpinetine menjelaskan bahwa variabel bebas memberikan pengaruh

sebanyak 97,1 % terhadap variabel terikat dan 2,9 % dipengaruhi oleh faktor diluar variabel bebas. Nilai R^2 0.916 pada 3-deoxysappanone B menunjukkan bahwa variabel bebas memberikan pengaruh sebesar 91,6 % terhadap variabel terikat dan 8.4 % dipengaruhi oleh faktor lain. Nilai R^2 0.924 pada vitamin C menunjukkan variabel bebas memberikan pengaruh sebanyak 92,4 % terhadap variabel terikat sedangkan 7.6 % merupakan pengaruh faktor lain. Nilai R^2 (*R Square*) atau koefisien determinasi pada senyawa yang diuji mendekati nilai 1, sehingga hasil regresi memenuhi angka kriteria linieritas yang layak. Semakin tinggi nilai R^2 yang dihasilkan maka akan semakin baik variabel bebas dalam memprediksi variabel terikat (Sutanto, 2006).

Pengujian aktivitas antioksidan dikerjakan pada tempat gelap untuk menghindari paparan sinar matahari atau cahaya penyebab rusaknya larutan. Larutan kontrol (blanko) memiliki fungsi dalam menentukan potensi antioksidan sampel dan berfungsi untuk menentukan absorbansi DPPH sebelum direduksi oleh sampel. Selisih antara absorbansi sampel yang telah direduksi DPPH dengan absorbansi blanko adalah radikal DPPH residual yang terbaca pada spektrofotometer UV-Vis. Semakin besar perbedaannya, semakin besar aktivitas antioksidan suatu sampel.

Penggunaan baku banding vitamin C sebagai kontrol positif adalah karena vitamin C merupakan antioksidan alami dan berfungsi sebagai antioksidan sekunder yang mempunyai gugus hidroksi bebas yang dapat menangkap radikal bebas dan mencegah terjadinya reaksi berantai. Berdasarkan hasil yang diperoleh bahwa semakin tinggi konsentrasi vitamin C maka semakin meningkat aktivitas peredamannya dalam menghambat radikal bebas. Hal ini terjadi karena banyaknya atom hidrogen dari gugus hidroksil yang diberikan kepada radikal DPPH sehingga DPPH tereduksi menjadi DPPH-H yang ditandai dengan terjadinya perubahan warna dari ungu menjadi kuning. Selain itu, vitamin C memiliki dua gugus hidroksil yang mengakibatkan lebih mudah dalam mendonorkan atom hidrogennya dan digolongkan sebagai antioksidan yang kuat.

Penggunaan standar pembanding vitamin C sebagai kontrol positif karena vitamin C merupakan antioksidan alami dan bekerja sebagai antioksidan sekunder yang memiliki gugus hidroksi bebas yang dapat menghambat radikal bebas serta mencegah reaksi berlanjutan. Hasil penelitian menunjukkan bahwa semakin tinggi konsentrasi vitamin C maka aktivitas penghambatannya semakin meningkat. Hal ini diakibatkan oleh banyaknya atom hidrogen yang diberikan kepada radikal DPPH untuk tereduksi menjadi DPPH-H. Secara fisik perubahan ditandai dengan warna ungu DPPH menjadi warna kuning DPPH-H. Vitamin C tergolong dalam antioksidan kuat, hal ini akibat dua gugus hidroksil dalam strukturnya yang menjadikan vitamin C mudah dalam mendonorkan atom hidrogen.

Senyawa alpinetin dan 3-deoxysappanone B juga memiliki gugus hidroksil dalam kerangka struktur molekulnya. Gugus tersebut memberikan peran penting dalam mereduksi DPPH menjadi DPPH-H sehingga menunjukkan aktivitas peredamannya dalam menghambat radikal bebas. Berdasarkan hasil pengukuran senyawa alpinetin, 3-deoxysappanone B dan vitamin C masing-masing memiliki nilai IC_{50} sebesar 20.11, 15.28 dan 18.33 μ M. Nilai IC_{50} senyawa 3-deoxysappanone B yang lebih kecil dari vitamin C menunjukkan aktivitas antioksidan yang lebih kuat dalam menghambat radikal bebas.

4. KESIMPULAN

Hasil dari penelitian ini memberikan penjelasan bahwa senyawa antioksidan dari kayu secang yang berhasil di isolasi dan ditentukan strukturnya adalah senyawa alpinetin dan 3-deoxysappanone B. Masing-masing merupakan antioksidan kuat berdasarkan nilai IC₅₀ sebesar 20.11 dan 15.28 µM.

5. UCAPAN TERIMAKASIH

Terimakasih kepada Kementerian Keuangan melalui program Lembaga Pengelola Dana Penelitian (LPDP) yang telah memberikan dukungan dana penelitian. Terimakasih kepada Universitas Halu Oleo yang telah memberikan fasilitas sehingga penelitian ini dalam terlaksana.

6. DAFTAR PUSTAKA

- Artanti, A. N. & Renita L. (2018). Uji Aktivitas Antioksidan Ekstrak Ethanol Daun Family Solanum Menggunakan Metode Reduksi Radikal Bebas DPPH. *Journal of Pharmaceutical Science and Clinical Research*. 2.
- Asfar, A. M. I. A & Yasseer M. (2018). Isolasi Senyawa Flavonoid dari Kayu Sepang (*Caesalpinia sappan* L.) dengan Metode Ultrasonic Assisted Solvent Extraction Dan Karakterisasinya Dengan Metode Gas Chromatography Mass Spectrometry (GCMS). Prosiding Seminar Hasil Penelitian (SNP2M) 2018.
- Batubara, I., Tohru M. & Hideo O. (2010). Brazilin from *Caesalpinia sappan* wood as an antiacne agent. *Journal of Wood Science*. 56.
- Cahyaningtyas, D. M., Nony P. & Rinda B. (2019). Uji Aktivitas Antibakteri Ekstrak Etanolik Kayu Secang (*Caesalpinia sappan* L.) terhadap *Staphylococcus aureus*. *Jurnal Biomedika*, 12(02).
- Chang, T.S, Shih-Yu C. & Hsiou-Yu D. (2012). Melanogenesis Inhibition by Homoisoflavavone Sappanone A from *Caesalpinia sappan*. *Journal Molecules*. 13. ISSN 1422-0067.
- Clarke, G., Kang N. T., Christophe W. & Jeffrey F. (2013). High Correlation of 2,2diphenyl-1-picrylhydrazyl (DPPH) Radical Scavenging, Ferric Reducing Activity Potential and Total Phenolics Content Indicates Redundancy in Use of All Three Assays to Screen for Antioxidant Activity of Extracts of Plants from the Malaysian Rainforest. *Antioxidants*. 2.
- Faisal, H. & Sri H. (2019). Comparison of Antioxidant Activity of Ethanol Extract of Fruit and Okra Leaves (*Abelmoschus esculentus* L. Moench) by DPPH and ABTS Methods. *Indonesian Journal of Pharmaceutical and Clinical Research (IDJPCR)*. 02 (02).
- Guez, C. M., Raul D. S., Paula F., Maria F. M. L., Jonathalline A. D., Aline A. B., Margareth L. A., Luisa Z., Luis F. S. D., Michel M. M. (2017). Evaluation of Basil Extract (*Ocimum Basilicum* L.) On Oxidative, Anti-Genotoxic and Anti-Inflammatory Effects in Human Leukocytes Cell Cultures Exposed to Challenging Agents. *Brazilian Journal of Pharmaceutical Sciences*. 53 (1), 1-12. <https://doi.org/10.1590/s2175-97902017000115098>
- Mokgotho M. P, Gololo S. S, Masoko P, Mdee L. K, Mbazima V, Shai L. J, Bagla V. P, Eloff J. N, & Mampuru L. (2013). Isolation and Chemical Structural Characterisation of a Compound with Antioxidant Activity from the Roots of *Senna italica*. *Evid Based Complement Alternat Med*. 519174. doi: 10.1155/2013/519174. PMID: 23843877. PMCID: PMC3703421.
- Nirmal, N. P., Mithun S.R., Rangbhatla G.S.V.P. & Mehraj A. (2015). Brazilin from *Caesalpinia sappan* heartwood and its pharmacological activities: A review. *Asian Pacific Journal of Tropical Medicine*. 08 (06).
- Pham-Huy, L. A., He H., Pham-Huy C. (2008). Free Radicals, Antioxidants in Disease and Health. *International Journal Biomedical Science*. 04 (02).
- Qiu, J., Hongyu W., Feng F., Xiaoying H., Caihong W., Shenghui C. & Zheng X. (2019). Metabolic Profiling of Alpinetin in Rat Plasma, Urine, Bile and Feces after Intragastric Administration. *Molecules*. 24 (3458)
- Santoso, U. (2006). *Antioksidan*. Sekolah Pasca Sarjana Universitas Gadjah Mada. Yogyakarta.

- Sari, R. & Suhartati. (2016). Secang (*Caesalpinia sappan* L.): Tumbuhan Herbal Kaya Antioksidan. *Info Teknis EBONI*, 13 (01).
- Sireeratawong S, Piyabhan P, Singhalak T, Wongkrajang Y, Tamsiririrkkul R, Punsrirat J, Ruangwises N, Saraya S, Lerdvuthisophon N, & Jaijoy K. (2010). Toxicity Evaluation of Sappan Wood Extract in Rats. *Journal of the Medical Association of Thailand*.
- Tantry, M., A. Mohammed M. R., Seema A. & Ikhlas A. K. (2012). 5,6- Dihydropyranobenzopyrone: A Previously Undetermined Antioxidant Isolated from *Polygonum amplexicaule*. Elsevier. 10 (1).
- Wahyuni, Diantini A, Ghozali M, Subarnas A, Julaeha E, Amalia R, & Sahidin I. (2021). Phytochemical Screening, Toxicity Activity and Antioxidant Capacity of Ethanolic Extract of *Etlingera alba* Rhizome. *Pak J Biol Sci*. 24(7):807-814. doi: 10.3923/pjbs.2021.807.814. PMID: 34486300.
- Xu, H. X. & Lee S. F. (2004). The antibacteria principle of *Caesalpinia sappan*. *Phytotherapy Research: PTR*. 18 (08).
- Yadav, S. K. (2021). New Convenient Synthesis of 8-C-Methylated Homoisoflavones and Analysis of Their Structure by NMR and Tandem Mass Spectrometry. *International Journal of Organic Chemistry*. 11(46-54).
- Yemirta. (2010). Identifikasi Kandungan Senyawa Antioksidan dalam kayu *C. sappan* L. (*Caesalpinia sappan*). *Jurnal Kimia dan Kemasan*. 32 (02).
- Yuk, J., Patel, D. N., Isaac, G., Smith, K., Wrona, M., Olivos, H. J., & Yu, K. (2016). Chemical Profiling of Ginseng Species and Ginseng Herbal Products Using UPLC/QTOF-MS. *J. Braz. Chem. Soc*. 27(8): 1476–1483. doi: 10.5935/0103-5053.20160189
- Zanin, J. L. B., Bianca A. C., Paloma S. M, Marcello H. S., Joao H. G. L., Patricia S., Claudio V. & Marisi G.S. (2012). The Genus *Caesalpinia* L. (*Caesalpinaceae*): Phytochemical and Pharmacological Characteristics. *Journal Molecules*. 17. ISSN 1420-3049