

Pemisahan dan Identifikasi Isomer Tokotrienol dari Tokotrienol Rich Fraction (TRF)

Segregation and Identification of Tocotrienol Isomer from Tocotrienol Rich Fraction (TRF)

Widiyasri Lodu^{1*}, Ferry Fredy Karwur²

¹Program Pasca Sarjana Magister Biologi, Universitas Kristen Satya Wacana,
Jln.Diponegoro 52-60, Salatiga 50711

²Fakultas kedokteran dan ilmu keperawatan, Universitas Kristen Satya Wacana,
Jln.Diponegoro 52--60, Salatiga 50711

*Corresponding author: ferry.karwur.staff.uksw.edu

Abstract: Palm oil is the largest agricultural product produced by Indonesia. Palm oil contains a large group of vitamin E which are tocopherol and tocotrienol which have been widely reported their efficacy in inhibiting the growth and development of diseases such as antioxidants, anti-cancer, cholesterol inhibitors, prevent premature aging, and cardioprotective effects. This study aims to segregate and identify the intensity of each isomer of Tocotrienol Rich Fraction (TRF). Segregation and identification are done through using column chromatography, UV-visible spectrophotometer, and HPLC. The spectral pattern of TRF shows the presence of tocotrienol isomers at wavelengths of 292-298 nm. Five spectra patterns identified with the highest intensity were demonstrated by the γ -tocotrienol isomers at 10.86 min, δ -tocotrienol at the minute of 9.36, α -tocotrienol at the minute of 12:42, α -tocopherol at 21.11 and α -T1 at 17.35 with 0 intensity.

Keywords: Tocotrienol Rich Fraction, column chromatography, spectrophotometer UV, high pressure liquid chromatography (HPLC)

1. PENDAHULUAN

Indonesia merupakan Negara yang kaya akan keanekaragaman hayati, Indonesia dilaporkan memiliki lebih dari 30.000 spesies tanaman tingkat tinggi. Hingga saat ini spesies tanaman yang diketahui berkhasiat terhitung 7000 spesies, kurang dari 300 spesies yang digunakan sebagai bahan baku industri farmasi regular (Saifuddin., 2011).

Bahan baku yang digunakan sebagai bahan farmasi regular ini mengandung senyawa-senyawa yang dikenal dengan metabolit sekunder yang merupakan senyawa kimia yang terbentuk dalam tanaman. Senyawa yang tergolong ke dalam kelompok metabolit sekunder ini antara lain steroid, flavonoid, alkaloid, saponin dan terpenoid. Dua kelompok vitamin E tokoferol dan tokotrienol termasuk dalam golongan terpenoid. Kelompok vitamin E yang pertama kali ditemukan adalah tokoferol dan telah banyak dilaporkan kebermanfaatannya sebagai antioksidan, adjuvant dan prevent terhadap berbagai penyakit (Guthrie *et al.*, 1998., Nesaretnam *et al.*, 2008; Yap *et al.*, 2008; Agarwal *et al.*, 2004; Srivasta *et al.*, 2006; Khee *et al.*, 2014., Khor *et al.*, 2015). Kehadiran tokotrienol sebagai salah satu kelompok

vitamin E lainnya merupakan hal yang mendapat perhatian karena kebermanfaatannya yang tidak kalah penting dari tokoferol.

Tokotrienol adalah komponen vitamin E alami selain tokoferol dengan sifat utama antioksidan larut lemak yang melindungi membran sel dari kerusakan oksidatif. Tokotrienol memiliki 4 isomer yang berbeda yaitu α -, β -, γ - dan δ - tokotrienol dan memiliki rantai samping poliprenil dengan 3 ikatan tak jenuh pada posisi 3', 7' 11' yang tersambung dengan karbon nomor 2 dari pusat kiral. Rantai samping ini memberikan sifat non-polar pada keseluruhan molekul, dan dalam konteks sel memfasilitasi akses lapisan berlemak pada membran sel (Das *et al.*, 2008). Tokotrienol dan tokoferol menjadi bahan kombinasi dalam beberapa penelitian yang bertujuan untuk melihat potensi isomer dalam memerangi radikal bebas, menghambat kanker, kardioprotektif, dan penuaan dini. Salah satu campuran tokoferol dan tokotrienol terkandung dalam Tokotrienol rich fraction terdiri dari 70% tokotrienol dan 20-30% α -T (Sundram *et al.*, 2003; Cho Susan *et al.*, 2009). Oleh sebab itu penelitian ini bertujuan untuk memisahkan dan mengidentifikasi kandungan isomer pada TRF dengan menggunakan kromatografi kolom dan identifikasi isomer dengan menggunakan

spektroskopi UV-tampak dan kromatografi cair kinerja tinggi (KCKT) dari sampel Tokotrienol Rich Fraction yang didapatkan dari Davos Life Pte Ltd Singapura.

2. BAHAN DAN METODE

2.1 Bahan

Sampel yang digunakan adalah tokotrienol rich fraction yang diperoleh dari Davos Life Pte Ltd singapur, bahan kimia yang digunakan adalah methanol, ethanol, aseton, heksana, petroleum eter, asam askorbat, KOH silica gel 60. Sedangkan alat yang digunakan adalah waterbath inkubasi, vortex, evaporator, gas N₂, kromatografi kolom, spektrofotometer UV- tampak berkas rangkap Varian Cary 50, dan kromatografi cair kinerja tinggi (KCKT) LC-20AB (Shimadzu, Kyoto)

2.2 Metode

2.2.1 Saponifikasi

Saponifikasi dilakukan pada tokotrienol kaya fraksi (TRF) bertujuan untuk memisahkan asam lemak bebas dengan fraksi yang tidak tersabunkan. Saponifikasi dilakukan sesuai dengan metode (Peterson *et al.*, 2017; Kgs Ahmadi *et al.*, 2012) yang sudah dimodifikasi. Saponifikasi menggunakan asam askorbat untuk mencegah oksidasi. 10 gr tokotrienol kaya fraksi dilarutkan dalam 100 mL methanol setelah difilter larutan ditambahkan 10 mL asam askorbat 0.5% dan divortex, setelah divortex larutan dihomogenkan dengan diinkubasi ke waterbath dengan suhu 80°C selama 20 Menit dan ditambahkan 1 mL KOH 50%. Setelah larutan hasil inkubasi didinginkan, dilanjutkan dengan evaporasi, hasil evaporasi di keringkan dengan menggunakan gas N₂.

2.2.2 Pemisahan tokotrienol

Isolasi tokotrienol dilakukan berdasarkan metode yang telah dimodifikasi. Sampel hasil saponifikasi dilarutkan dalam 1 mL heksana 100%, untuk dilakukan pemisahan dengan kromatografi kolom (diameter 1, 8 cm x panjang 30 cm). Fase diam yang digunakan adalah silica gel 60 dengan ukuran partikel (0,04 -0,063 mm) yang telah diaktifkan dalam heksana 100%. Sebanyak 1 mL sampel dimasukkan kedalam kromatografi kolom yang telah diisi silica gel 60, sedangkan fase gerak pada awalnya dielusi dengan heksana 100% selanjutnya dielusi lagi dengan heksana:dietil eter (95%:5%;v/v). Sampel di tampung setiap 3 menit, sampel hasil kromatografi kolom kemudian dikeringkan menggunakan N₂.

2.2.3 Identifikasi isomer tokotrienol

2.2.3.1 Spektroskopi

Identifikasi isomer tokotrienol murni dianalisis menggunakan spektrofotometer UV- tampak berkas rangkap varian cary 50. Umumnya vitamin E memiliki serapan pada panjang gelombang 265 nm – 318 nm (

Rowels *et al.*) dan tokotrieol memiliki serapan pada panjang gelombang 292 nm bentuk alfa (α), 294 nm bentuk beta (β), 298 nm bentuk gamma (γ) dan 298 nm bentuk delta (δ) (Ng MH *et al.*, 2012); Podda *et al.*, 1996).

2.2.3.2 Kromatografi cair kinerja tinggi (KCKT)

Sampel hasil identifikasi spektroskopi di analisis menggunakan kromatografi cair kinerja tinggi (KCKT) LC-20AB (Shimadzu, Kyoto) yang dilengkapi dengan *photodiode detector array* (PDA) pada panjang gelombang 292-298 nm. Jenis kolom yang digunakan adalah Oktadasil Silica (ODS atau C¹⁸)(250x4,6mm) fase terbalik, dengan injeksi sampel sebanyak 20 μ L, sampel yang akan dianalisis, terlebih dahulu disaring dengan Whatman membran filter PTFE (politetrafluoetilena) 0.2 μ L. Kemudian dilarut ke dalam methanol 100%. Fase gerak yang digunakan adalah methanol 100%, dengan laju aliran rata-rata 1 mL /menit dan tekanan 100 psi (Ng MH *et al.*, 2004).

3. ANALISIS DATA

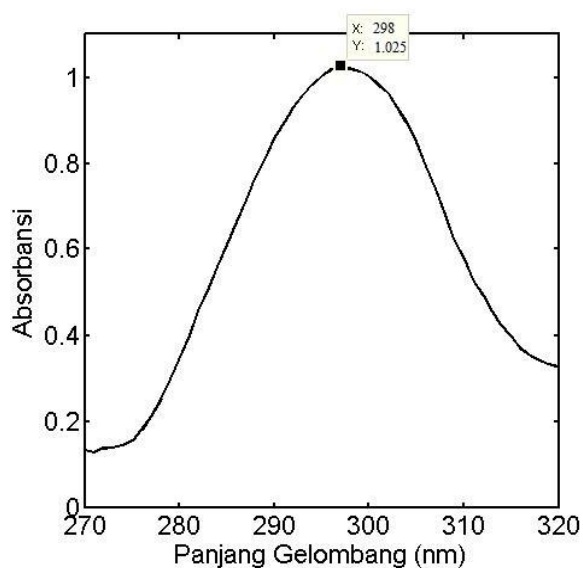
Data spektrum dan kromatogram di analisis menggunakan program OriginPro 9.00 SR2b87, kemudian hasilnya dibandingkan dengan literatur.

4. HASIL DAN PEMBAHASAN

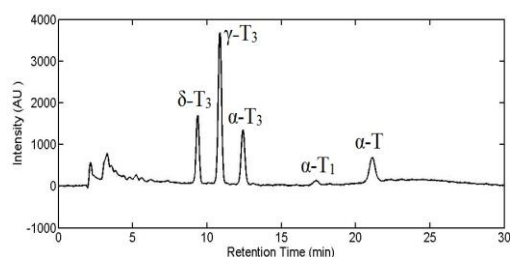
4.1 Identifikasi isomer tokotrienol

Hasil identifikasi isomer tokotrienol menggunakan spektrofotometer UV- tampak berkas rangkap Varian Cary 50, pada panjang gelombang 292-298 nm dalam pelarut etanol terlihat pada Gambar 1. Absorpsi maksimum dimiliki isomer γ - tokotrienol pada panjang gelombang 298 nm menunjukkan hasil yang sama dengan absorpsi isomer tokotrienol menurut (Ng MH *et al.*, 2012) yaitu pada panjang gelombang 298 nm dalam pelarut etanol.

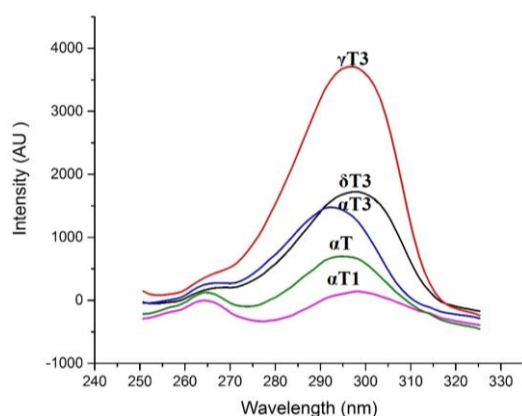
Analisis kehadiran tokotrienol dengan KCKT berhasil diidentifikasi dengan adanya kemunculan 5 peak pada profil kromatogram dalam pelarut 100% methanol (Gambar 2) dan diinterpretasikan dalam pola spektra masing-masing peak dan intensitas. Pada peak 292-298 nm (Gambar 3), lima (5) peak yang teridentifikasi dengan intensitas tertinggi γ -tokotrienol (3750) pada peak 28nm, δ -tokotrienol (1750) pada peak 298nm, α -tokotrienol (1480) pada peak 292nm, α - tokoferol (500) dan, α -T1 (0). Isomer tokotrienol memiliki intensitas yang tinggi dibandingkan dengan kandungan tokoferol dan α -T1 (*tococromanol*) (Ng, MH *et al.*, 2004; Ng MH *et al.*, 2012).



Gambar 1. Pola Spektra Isomer Tokotrienol pada spektrofotometer UV- tampak berkas rangap Varian Cary 50, pada panjang gelombang 292-298 nm dalam pelarut etanol yang diisolasi dari Tokotrienol Rich Fraction (TRF) Pada Panjang Gelombang 298 nm.



Gambar 2. Profil kromatogram isomer tokotrienol dalam pelarut 100% methanol.



Gambar 3. Profil pola spektra masing-masing peak isomer dan intensitas.

5. KESIMPULAN

Dalam penelitian ini dapat diidentifikasi kandungan *Tokotrienol rich fraction* terdiri dari γ -tokotrienol, δ -tokotrienol α -tokotrienol, α - tokoferol dan, α -T1. Dilihat dari intensitas masing- masing isomer maka

dapat disimpulkan bahwa isomer tokotrienol yang terdiri dari γ -tokotrienol, δ -tokotrienol dan, α -tokotrienol merupakan isomer yang memiliki intensitas yang tinggi. Dengan demikian ekstrak tokotrienol rich fraction yang didominasi oleh isomer tokotrienol dapat digunakan dalam penelitian selanjutnya yang berhubungan dengan penghambatan kolesterol yang akan dikombinasikan dengan ekstrak bahan alam lainnya.

6. DAFTAR PUSTAKA

- Agarwal MK., Agarwal ML., Athar M., Gupta S. (2014) . Tocotrienol Rich Fraction of Palm Oil Activates p53, Modulates Bax/Bcl2 Ratio And Induces Apoptosis Independent Of Cell Cycle Association. *Cell cycles* 3:2, 205-201.
- Das S, Lekli I, Das M, Szabo G, Varadi J, Juhasz B, Bak I, Nesaretam K, Tosaki A, Powell SR, Das DK. (2008). Cardioprotection with palm oil tocotrienols: comparison of different isomers. *Am J Physiol Heart Circ*, 1;294 (2):H970-8.
- Frega N, Mozzon M, Bocci F. (1998) Identification and Estimation of tocotrienols in the Annatto Lipid Fraction by Gas Chromatography–Mass Spectrometry. *JAACS*, 75(2):1723-1727.
- Guthrie N, Gapor A, Chambers AF, Carroll KK. (1997) Inhibition of proliferation of estrogen receptor-negative MDA-MB-435 and positive MCF-7 human breast cancer cell by palm oil tocotrienols and tamoxifen, alone and in combination. *J.Nut*, 127:544S-548.
- Kgs Ahmadi, Sri Kumalaningsih, Susingsih Wijana., Santoso I. (2012) Optimizing Vitamin E Purification from Unsaponifiable Matter of Palm Fatty Acids Distillate by Low Temperature Solvent Crystallization. *Journal of Food Science and Engineering* , 557-563.
- Khee SGS., Yusof YAM., Makpol S. (2014). Expression of Senescence Associated microRNAs and Target Genes in Cellular Aging and Modulation by Tocotrienol Rich Fraction. *Oxidative Medicine and Cellular longevity*, 1-12.
- Khor SC., Rasak AM., Ngah WZN., Yusof YAM., Karim NA., Makpol S. 2016. The Tocotrienol Rich Fraction is Superior to Tocopherol in Promoting Myogenic Differentiation in the Prevention of Replicative Senescence of Myoblast. *Plos one* 11(2) :e0149265.
- Lampi AM, Analysis of Tocopherols and Tocotrienols by HPLC. (2007). *Journal American Oil Chemists Society*. DOI: 10.21748/lipidlibrary.41389.2007
- Ng MH., Choo, YM., MA,AN., Chuah,CH., Hashim, MA. (2004). Separation Of Vitamin E Tocopherol, Tocotrienol, and Tocomonoenol) In Palm Oil. *Lipids*, 39 (10): 1031-1035.
- Ng MH, Choo Yuen May. (2012). Chromatographic Analyses of Tocopherols and Tocotrienols in Palm Oil. *Journal of Chromatographic . Science*, 50:283–286.
- Nesaretam K, Selvaduray KR, Razak GA, Veerasenan SD, Gomez PA. (2010).



Effectiveness of tocotrienols -rich fraction combined with tamoxifen in the management of women with early breast cancer: a pilot clinical trial. *Breast Cancer Res*, 12(5) :R81.

- Podda M, Weber C, Traber MG, Packer L. (1996). Simultaneous determination of tissue tocopherols, tocotrienols, ubiquinol, and ubiquinones. *J.lipid Res*, 37(4):893-901.
- Peterson, Jensen, Hoffman., Fogelfors. (2007). Oat Tocols: Saponification vs Direct Extraction and Analysis in High- Oil Genotypes. *Cereal Chem*, 84 (1); 56-60.
- Rowells S., Oral E & Muratoglu K. (2011). Detection Of Vitamin E in Irradiated UHMWPE By Uv-visible Spectroscopy.
- Srivasta JK., Gupta S. (2006). Tocotrienol Rich Fraction Of Palm Oil Induces Cell Cycle Arrest And Apoptosis Selectively In Human Prostate Cancer Cels. *Biochemical and biophysical research communications*, 346 ; 447-453.
- Saifudin A. 2014. *Senyawa Alam Metabolit Sekunder Teori, Konsep, dan Teknik Pemurnian*. Yogyakarta. Deepublish CV Budi Utama.
- Whittle KJ, Dunphy PJ, Pennock JF. (1996). The isolation and properties of δ -tocotrienol from Hevea latex. *Biochem J*, 100(1):138-45.
- Yap WN, Chang PN, Han HY, Lee DT, Ling MT, Wong YC, et al. (2008). γ -Tocotrienol suppresses prostate cancer cell proliferation and invasion through multiple-signalling pathways. *British journal of cancer*, 99 (11):1832-41.

DISKUSI

Ria Yulia Gloria

Pertanyaan:

Apa kelemahan dan kelebihananya?

Jawaban:

Vit E sebagai antioksidan, antikanker, dsb. Penelitian yang dilakukan perbedaannya pada penelitian ini dilakukan langsung dari TRF sedangkan penelitian sebelumnya dari VCo

Rina Astuti

Penanya:

Apakah hanya ada di kelapa sawit? dalam bentuk cair atau bagaimana?

Jawaban:

Tidak, tetapi paling baik pada kelapa sawit.