

Pendahuluan Purifikasi dan Standarisasi Bahan Alam

Ketentuan Perkuliahan

- Hadir tepat waktu dan sesuai jadwal.
- Jumlah kehadiran 75 % Untuk mengikuti UTS dan UAS (maksimal 3x absen). 2x sebelum UTS dan 1x sebelum UAS.
- Toleransi keterlambatan 20 menit. Lebih dari itu ada tugas tambahan resume materi.
- Pertemuan mengikuti yang ada di RPS

Ketentuan Perkuliahan

Rencana Evaluasi				
Basis Evaluasi	:	Komponen Evaluasi	Bobot (%)	Deskripsi
Aktivitas Parsitipatif	:	Observasi aktivitas mahasiswa	15	Aktivitas partisipatif mahasiswa dalam kehadiran dan keaktifan di kelas
Hasil Proyek	:	Laporan hasil Project (team based project)	35	Laporan project kelompok berupa tugas penyusunan makalah terkait konsep ekstraksi, fraksinasi dan isolasi
Kognitif/Pengetahuan	:			
		1. Quiz/Tugas	10	Hasil penilaian quiz/tugas dari mahasiswa
		2. Ujian Tengah Semester (UTS)	20	Ujian tengah semester dilaksanakan secara bersama sesuai jadwal
		3. Ujian Akhir Semester (UAS)	20	Ujian akhir semester dilaksanakan secara bersama sesuai jadwal
	Jumlah Nilai	100		

Ketentuan Project

- Membuat **Makalah** terkait dengan konsep ekstraksi, fraksinasi dan isolasi bahan alam
- Dikerjakan dalam Kelompok, setiap kelas dibagi menjadi 6 kelompok (setiap kelompok dengan tema berbeda)
- Makalah dipresentasikan pada Pertemuan ke-7
- Makalah Wajib dikumpulkan (Hard File) H-2 sebelum jadwal presentasi
- Makalah dikumpulkan dalam bentuk pdf di google drive sharing materi
- Setiap mahasiswa dalam kelompok wajib memberikan kontribusi

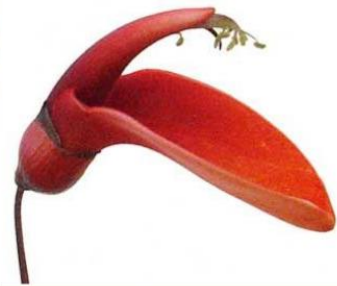
Ketentuan Project

- Susunan makalah :
 - Cover
 - Kata Pengantar
 - Daftar Isi
 - Bab I Pendahuluan
 - Latar Belakang
 - Rumusan Masalah
 - Tujuan
 - Bab II Pustaka
 - Bab III Pembahasan
 - Bab IV Penutup
 - Kesimpulan
 - Saran
 - Daftar Pustaka (Harvard style)

Pendahuluan

- Ethnomedicine...
- Etnomedisin adalah cabang antropologi medis yang membahas tentang asal mula penyakit, sebab-sebab dan cara pengobatan menurut kelompok masyarakat tertentu.
- Aspek etnomedisin merupakan aspek yang muncul seiring perkembangan kebudayaan manusia dibidang antropologi medis, etnomedisin memunculkan terminologi yang beragam.
- Sistem pengobatan yang menjadi fokus dalam kajian etnomedisin meliputi cara memahami dan mengelompokkan suatu penyakit, tindakan pencegahan, diagnosis, penyembuhan (baik secara gaib, agama, ilmiah, maupun **bahan-bahan yang dapat menyembuhkan**) dan penyembuh.

Ethnomedicine Traditional system



Etnofarmasi

- Etnofarmasi adalah kajian ilmu interdisipliner mengenai aspek-aspek farmasi yang terdapat pada suatu komunitas etnis masyarakat pada suatu daerah tertentu.
- Etnofarmasi melibatkan kajian pengenalan, pengelompokan, dan pengetahuan darimana obat tersebut dihasilkan (etnobiologi), preparasi sediaan obat (etnofarmasetik), aplikasi sediaan obat (etnofarmakologi), dan aspek sosial dari penggunaan pengetahuan perobatan dalam etnis tersebut (etnomedisin).

Periode Prasejarah

- Berdasarkan penelitian, ditemukan fosil manusia tertua di Ethiopia pada tahun 1967. Penemu fosil tersebut adalah Arambourg dan Coppens. Fosil manusia tertua tersebut diberi nama sementara *Paraustralopithecus aethopicus*. Diperkirakan manusia jenis ini juga pernah tinggal di Indonesia.
- Pada masa selanjutnya ada genus manusia lebih modern yang pernah mendiami Indonesia, yaitu *Pithecantropus*. Di Indonesia jenis manusia ini diwakili oleh *Pithecantropus erectus* yang terdiri atas empat laki-laki dan dua perempuan serta *Pithecantropus soloensis* yang terdiri atas lima laki-laki dan tujuh perempuan.
- *Pithecantropus* di Indonesia jumlahnya terlalu sedikit untuk dapat mengetahui penggunaan biomedisin sebagai terapi pengobatan.



- Manusia purba pada masanya juga dijangkiti oleh penyakit yang beraneka ragam. Saat penelitian ditemukan bahwa *Pithecanthropus erectus* menderita *exostosis* pada femurnya yang mungkin didahului oleh inflamasi. Hal itu dapat disimpulkan bahwa berbagai golongan penyakit juga sudah ada buktinya sejak zaman Neolitik.



- Golongan penyakit juga sudah ada buktinya sejak zaman Neolitik. Penyakit-penyakit tersebut antara lain, ialah penyakit genetik dan kongenital, penyakit neoplastis, penyakit infeksi dan parasit, penyakit traumatis, penyakit metabolisme dan penyakit degeneratif.

Periode Sebelum Kolonial (Sebelum Tahun 1600)



- Pada abad ke-8 ditemukan bukti mengenai penggunaan tanaman secara internal (oral) dan eksternal (topikal).
- Tahun 825M pada dinding candi Borobudur terdapat relief pohon Kalpataru, yakni pohon mitologis yang melambangkan 'kehidupan abadi'.
- Pada relief tersebut di bawah pohon Kalpataru terdapat orang sedang menghancurkan bahan-bahan untuk pembuatan jamu.
- Selain itu, pada dinding candi Borobudur juga ditemukan relief perempuan yang sedang mencampur tanaman untuk pemulihan dan perawatan tubuh.

- Dokumen lama atau naskah kuno lain ditemukan di Bali yang ditulis pada daun lontar kering.
- Pada umumnya ditulis dalam bahasa Sanskerta atau bahasa Jawa kuno. Sebagai contoh istilah *usada* atau *usadi* yang berarti ‘obat’, ditemukan dalam kitab *Kakawin Ramayana*, sarga 1–9 tahun 898–910 M.
- Pada tahun 1460–1550M, Dan Hyang Dwijendara, seorang yang memiliki pengetahuan tentang pengobatan tradisional, telah mengembangkan sistem pengobatan yang disebut *Agen Balian Sakti*.

Periode Kolonial (Tahun 1600--1942)

- Masyarakat suku Jawa menulis resep jamu obat tradisional dari tanaman dan dikenal sebagai Serat atau Primbon . Salah satu yang terkenal adalah Serat Centhini yang didokumentasikan oleh Kanjeng Gusti Pangeran Adipati Anom Amengkunegara III, Pangeran Sunan Pakubuwono IV (1788—1820).
- Selain itu, ada naskah-naskah kuno lain yang menceritakan tanaman obat Jawa, seperti Serat Kawruh Bab “Jampi-Jampi” yang diterbitkan tahun 1831, Serat Centhini (1814), Serat Wulang Wanita (Paku Buwono IX), Candra Rini (Mangku Negara IV, 1792), buku Nawaruci Paraton.

Naskah Jamu oleh Orang Eropa (era kolonial)

- *Historia Naturalist et Medica Indiae* (Yacobus Bontius, awal abad ke-17, 1627-1658): berisi 60 deskripsi tanaman obat Indonesia
- *Herbarium Amboinense* (Gregorius Rhumpius, awal abad ke-18, 1741-1755): tentang obat herbal tradisional di Maluku
- Horsfield mempublikasikan monograf tentang tanaman obat dari pulau Jawa pada tahun 1816
- *Het Javaansche Receptenboek* (Buku Resep Pengobatan Jawa) (Van Hien, 1872)
- *Indische Planten en Haar Geneeskracht* (Tumbuhan Asli dan Kekuatan Penyembuhannya) (Kloppenburger-Versteegh, 1907)
- *De Nuttige Planten van Indonesie* (K. Keyne, 1913)
- *Heilkunde und Volkstum auf Bali* (W. Weck, 1937)

Periode Jepang (Tahun 1942--1945)

- Seminar pertama tentang jamu diselenggarakan di Solo pada tahun 1940. Setelah itu dilanjutkan dengan pembentukan Panitia Jamu Indonesia yang dipimpin oleh Prof. Dr. Sato, Kepala Jawatan.
- Kesehatan Rakyat. Panitia ini bertugas untuk mengimbau para pengusaha jamu secara sukarela mendaftarkan resep pribadi mereka untuk diperiksa dan dinilai oleh Jawatan Kesehatan Rakyat. Pada akhir tahun 1944, diumumkan beberapa tanaman obat terpilih pada harian *Asia Raya*, antara lain biji kopi dan daun pepaya untuk disentri, daun ketepeng, kulit batang pule, daun sirih, bunga belimbing wuluh, dan cengkih untuk penyakit TBC.

Periode Kemerdekaan

- Bung Karno memberikan perhatian yang cukup besar dalam pengembangan obat tradisional. Tahun 1965 ketika berpidato pada Dies Natalis Universitas Gajah Mada, Yogyakarta, presiden memperkenalkan enam orang sinse dari Cina yang khusus didatangkan untuk mengobati penyakit ginjal yang dideritanya.
- Pada tahun 1949, seorang staf pengajar farmakologi di Universitas Indonesia membuat laporan daftar tanaman berkhasiat pengganti obat impor, antara lain johar, kecubung, upas raja, kolkisin, dan lidah buaya. Kemudian pada tahun 1950, Werkgroep voor Minidinale Plante didirikan untuk memfasilitasi penelitian-penelitian tanaman obat di Indonesia.

- Menurut UU No. 9 tahun 1960, tentang Pokok-Pokok Kesehatan, obat tradisional yang telah diramu dan siap untuk dipasarkan lazim disebut sebagai JAMU (Jawa)
- Jamu adalah warisan budaya bangsa Indonesia, ini didasarkan pada bukti-bukti sejarah.
- Beberapa tanaman yang umumnya digunakan untuk meracik jamu kala itu, diantaranya:
 - *Aegle marmelos* (L.) Correa → maja
 - *Antidesma bunius* (L.) Sprengel → buni
 - *Borassus flabilifer* L. → lontar
 - *Calophyllum inophyllum* L. → nyamplung
 - *Datura metel* L. → kecubung
 - *Syzygium cumini* (L.) Skeels → jamblang

Purifikasi Bahan Alam

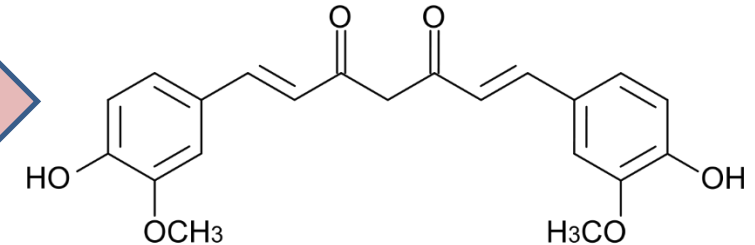
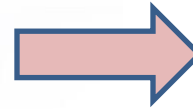
- Purifikasi : Pemurnian/Pembersihan
- Purifikasi BA : metode untuk mendapatkan komponen bahan alam murni bebas dari komponen kimia lain yang tidak dibutuhkan.
- Untuk tingkatan kemurnian (purity) suatu struktur senyawa tertentu, kemurnian bahan harus 95-100%



Standardisasi Bahan Alam

- Standarisasi adalah serangkaian parameter, prosedur dan cara pengukuran yang hasilnya merupakan unsur-unsur terkait seperti paradigma mutu yang memenuhi standar dan jaminan stabilitas produk.
- Standar adalah sesuatu yang dibakukan dan disusun berdasarkan konsekuensi semua pihak terkait dengan memperhatikan syarat-syarat kesehatan, keamanan, keselamatan lingkungan, berdasarkan pengalaman, perkembangan masa kini dan masa yang akan datang untuk memperoleh manfaat yang sebesar-besarnya.
- **Serangkaian parameter, prosedur, cara** dan hasil pengujian yang erat kaitannya dengan penetapan mutu, baik dari segi kimia, fisika, dan biologi.
- **Keberadaan senyawa aktif → Stabilitas senyawa aktif**
Tujuan Standardisasi: Keseragaman, keberadaan senyawa aktif, kesamaan dosis, stabilitas senyawa aktif dan mencegah pemalsuan.
- **Apakah Standardisasi Perlu Dilakukan? → digunakan sebagai obat → Keseragaman: Bahan baku dan Produk → Efek farmakologi → Kepercayaan**

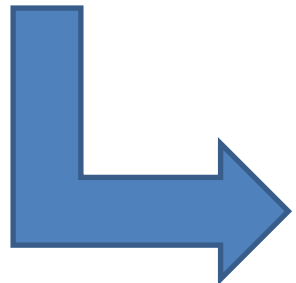
Purifikasi dan Standarisasi Bahan Alam



Kunyit/Temulawak

**Kurkumin
(fenolik)**

Kurkuminoid



Antikanker, Antibakteri, Antioksidan, antidiabetes

Permasalahan yang mungkin timbul?

- Senyawa aktif sering belum diketahui
- Tersusun dari berbagai kandungan kimia
- Variabel kandungan kimia dalam tanaman
- Prosedur analisis selektif belum pasti
- Senyawa pembanding masih jarang
- Proses produksi mempengaruhi

PARAMETER STANDAR UMUM

1. Bahan/material
 - a. Kebenaran jenis (identifikasi)
 - b. Kemurnian (bebas kontaminasi kimia&biologi)
 - c. Aturan penstabilan (wadah, penyimpanan, transportasi)
2. Bahan & produk untuk obat
 - a. Quality (mutu)
 - b. Safety (Aman)
 - c. Efficacy (Manfaat)
3. Bahan → kandungan kimia → respon biologis
Spesifikasi kimia: informasi komposisi (jenis dan kadar) senyawa kandungan.

SIMPLISIA

Simplisia yang akan digunakan untuk Obat:

Bahan Baku: memenuhi persyaratan yg tercantum dlm monografi terbitan depkes (MMI, FHI, FI)

Produk: (langsung dikonsumsi: jamu)

- memenuhi persyaratan dalam monografi
- memenuhi persyaratan produk kefarmasian sesuai peraturan yang berlaku.

Genetic variability in *Morinda citrifolia*



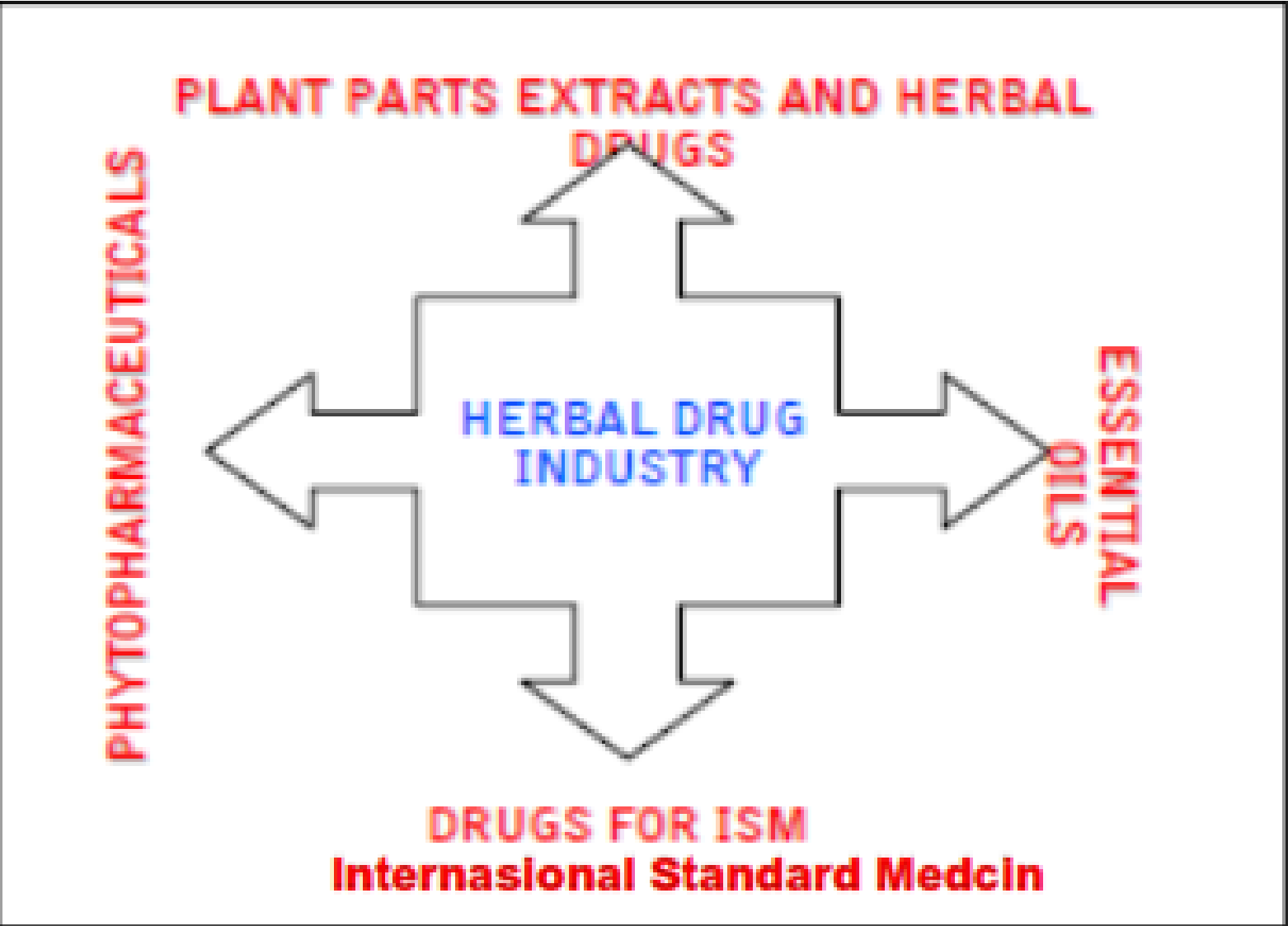
Genetic variability in *Centella asiatica*



PENEMUAN, Purifikasi dan Standarisasi Bahan Alam

- Berdasar topik pengembangan bahan alam ialah ada dua hal sebagai pokok bahasan; pertama tentang penemuan dan kedua adalah pengembangannya.
- Sebagai dasarnya akan diberikan dasar dasar isolasi dan dasar-dasar standarisasi.
- Purifikasi → Isolasi berarti memisahkan bahan aktif dari tumbuhan, hewan, maupun bahan lain yang dapat digunakan untuk pengobatan.

PENGEMBANGAN BAHAN ALAM



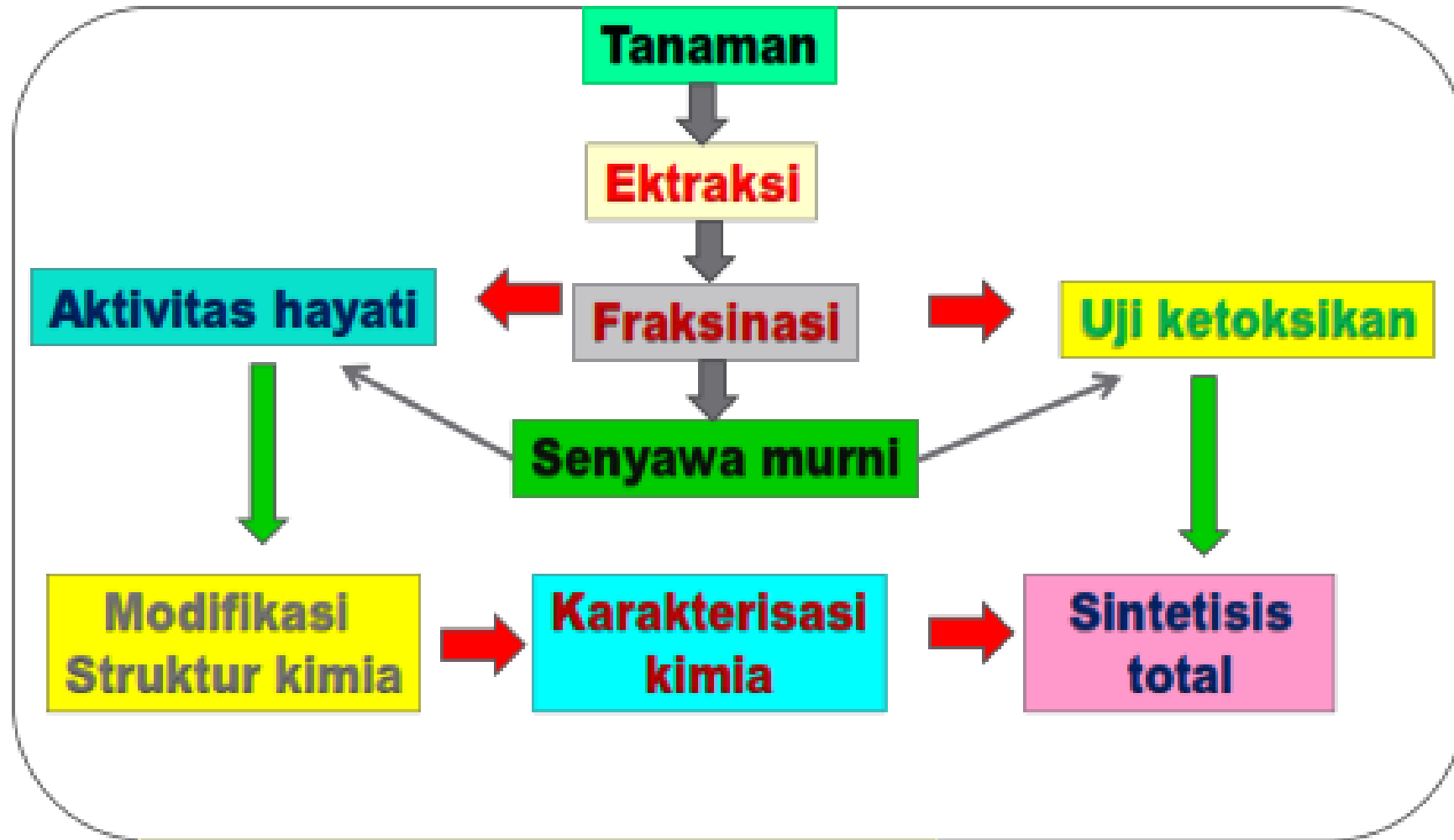
GP guidelines for medicinal plants preparation/production



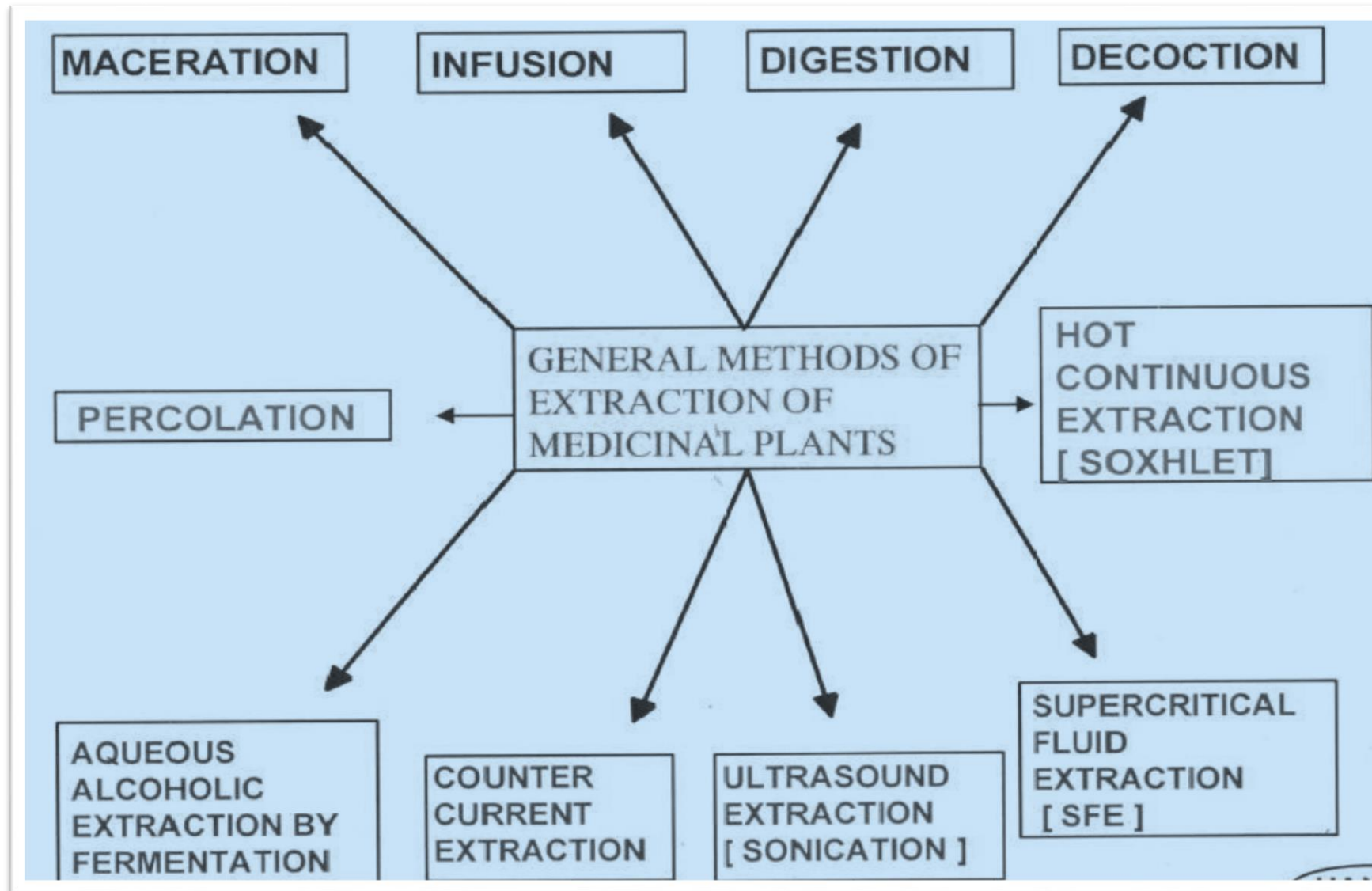
- GAP: Good Agricultural Practice (**Agro medisn**)
- GHP: Good Harvesting Practices
- GSP: Good Sourcing Practices
- GEP: Good Extraction Practices
- GPP: Good Processing Practices
- GMP: Good Manufacturing Practices

Dang Van Giap
2009

Pedoman umum cara Penemuan Obat bahan alam

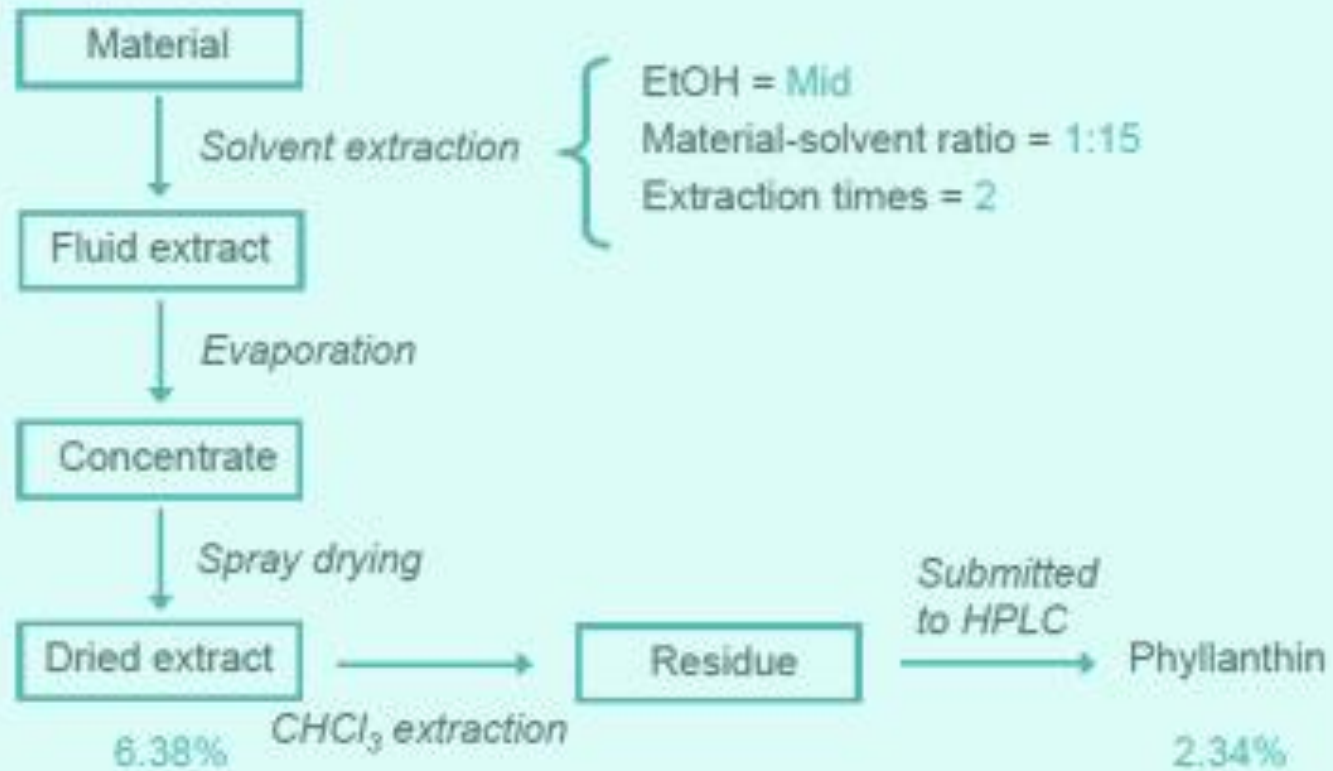


Berbagai cara ekstraksi Umum



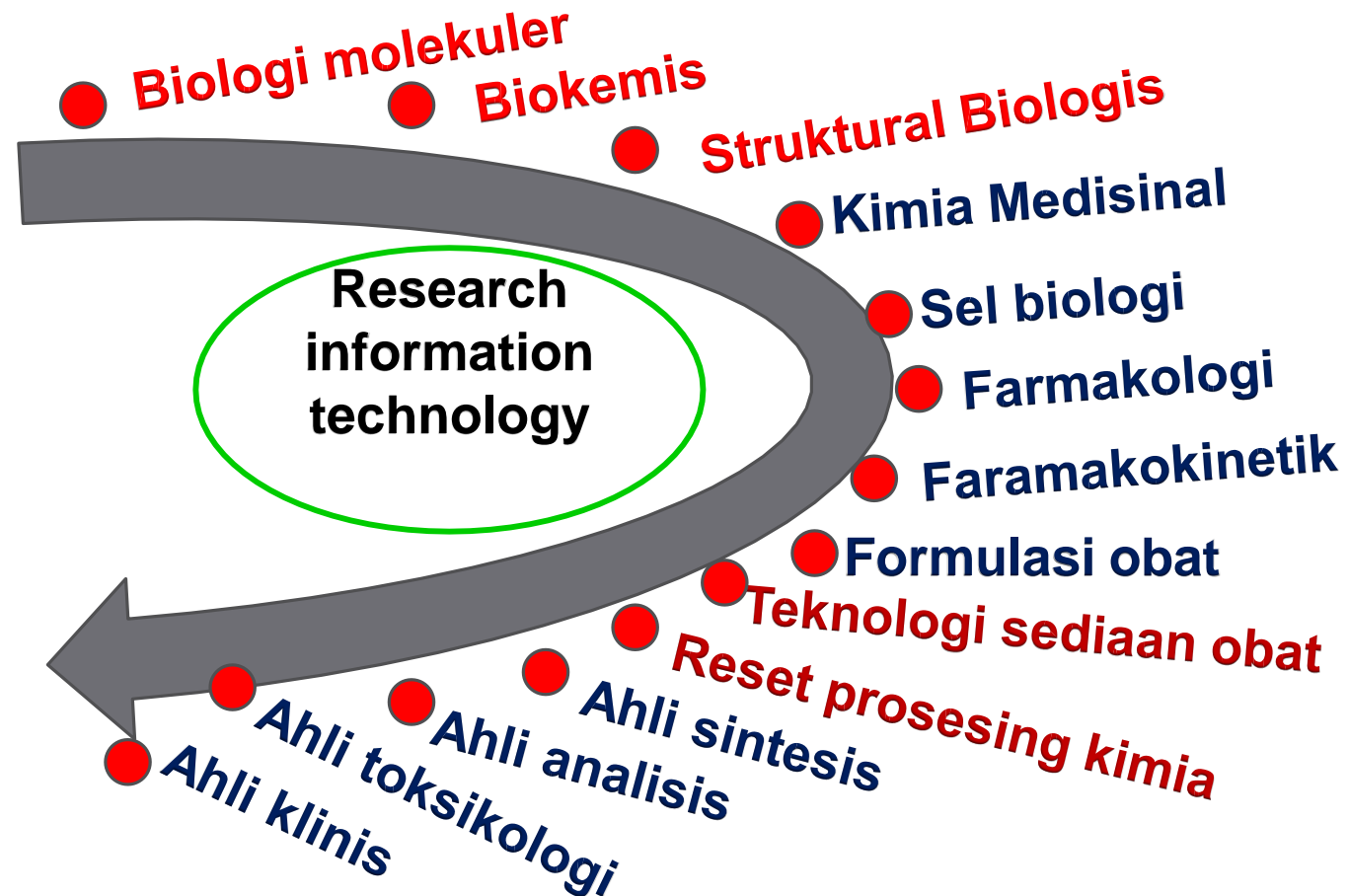
Salah satu bagan ekstraksi

The extraction process with its optimized parameters



Rangkuman *Scientist* dalam proses penemuan obat baru

- Ilmuwan (**Actelion**) dari Swiss, sebanyak 345 para ahli telah terlibat dalam penemuan suatu obat (dalam th. 2009), dan dapat menemukan 120 senyawa obat, scientis yang berpartisipasi adalah:



Bahan Baku

- **Bahan adalah simplisia, sediaan galenik, bahan tambahan atau bahan** lainnya, baik yang berkhasiat maupun yang tidak berkhasiat,
- Ketentuan diatas menunjukkan bahwa hasil ekstraksi adalah sediaan galenik yang berubah maupun yang tidak berubah, yang digunakan dalam pengolahan obat tradisional,
- Sedangkan bahan yang belum mengalami pengolahan adalah simplisia, walaupun tidak semua bahan tersebut masih terdapat didalam produk ruahan.
- **Produk ruahan adalah bahan atau campuran bahan yang telah selesai diolah** yang masih memerlukan tahap pengemasan untuk menjadi produk jadi.

Asal bahan Baku alam

- Asal bahan baku dapat berasal dari:
- **Tanaman dari daratan**
 - a. Daun, bunga, kelopak bunga.
 - b. Buah, getah buah, dan biji
 - c. Ranting
 - d. Batang atau kulit batang
 - e. Akar , batang dalam tanah atau rhizom.
 - f. Dapat berupa seluruh tanaman.
- **Tanaman atau hewan laut**
- **Dikenal dengan marin chemistry.**

Sambiloto



FAKTOR-FAKTOR YANG MEMPENGARUHI MUTU SIMPLISIA DAN EKSTRAK SAMBILOTO

- Mutu simplisia dipengaruhi oleh karakter genetik (varietas) dan ekologi (budidaya, kondisi lahan, ekofisiologi serta penanganan pasca panen) (Gupta 1991 dan Vijesekera, 1991).
- Setiap tanaman menghendaki kondisi lingkungan tumbuh tertentu agar dapat memproduksi dengan baik. Selain dan lingkungan tumbuh, produksi juga ditentukan oleh cara budidaya tanaman.
- Apa-bila cara budidaya kurang tepat, maka hasil produksi kurang optimal baik dari segi mutu atau kuantitasnya. Diharapkan cara budidaya mengikuti (GAP/ Good Agricultural Practices).

Pemupukan dan Ekosistem

- Menurut Emmyzar et al. (1996) mutu simplisia sambiloto tertinggi diperoleh pada pemupukan dengan dosis 100 jg urea + 100 kg TSP + 50 kg KCl per hektar dengan jarak tanam 40 x 20 cm
- Pengaruh ekosistem dominan pada tanaman sambiloto. Kualitas dan kuantitas komponen aktif sambiloto dipengaruhi oleh faktor ekosistem yaitu kandungan air dalam media tumbuh (Naiola et al. 1996),
- Ketinggian tempat, kualitas cahaya dan temperatur (Vanhaelen et al. 1991). Oleh karena itu faktor ekofisiologi harus optimal supaya menghasilkan simplisia yang berkualitas (Gupta, 1991 dan Vanhaelen et al. 1991), sehingga sintesis metabolit sekundernya dapat me-ningkat.

Cara Budidaya

- Menurut Januwati dan Yusron (2004) tanaman sambiloto dapat dibudidayakan di daerah basah (Bogor) pada lahan tanpa naungan sampai naungan sedang (0-30%).
- Di atas naungan 30%, produksi akan menurun sekitar 50%. Sedangkan untuk kandungan air dalam media, untuk menghasilkan mutu simplisia tinggi maka pemberian air per-tanaman yang optimal adalah 4 mm/ hari.
- Dari hasil tersebut dihasilkan produksi simplisia sebanyak 6,39 g/tan atau 357,84 kg/ha (Januwati *et al.*, 2005).

Pemanenan tanaman sambiloto

- Panen merupakan salah satu tahapan dalam proses budidaya tanaman obat. Waktu dan cara panen merupakan periode kritis sehingga sangat menentukan kualitas dan kuantitas hasil panen.
- Setiap jenis tanaman memiliki waktu dan cara panen yang berbeda. Pemanenan tanaman sambiloto dapat dilakukan pada umur 3-4 bulan setelah tanam dengan cara dipangkas dengan menggunakan gunting stek.
- Pada saat itu tanaman sudah berbunga tapi belum keluar buah, karena pada fase awal pembungaan diperoleh kandungan bahan aktifnya yang tinggi.

Waktu panen, dan Waktu pengangkutan

- Waktu panen dan pengangkutan juga harus diperhatikan, diusahakan bahan hasil panen tidak terkena panas yang berlebihan.
- Jika terkena panas maka kemungkinan bahan mengalami fermentasi dan hal ini dapat menyebabkan bahan busuk sehingga mutu simplisia kurang baik.
- Mutu ekstrak dipengaruhi oleh mutu simplisia, peralatan yang digunakan serta prosedur ekstraksi (ukuran bahan, jenis pelarut, konsentrasi pelarut, nisbah bahan dengan pelarut, suhu, lama ekstraksi, pengisatan, pe-murnian dan pengeringan ekstrak (Vijesekera, 1991).

Pembersihan dan Pengeringan

- Sambiloto yang baru dipanen langsung disortir, kemudian dicuci sampai bersih dengan menggunakan air bersih.
- Pencucian dilakukan secara berulang-ulang sampai bahan benar-benar bersih. Selanjutnya bahan ditiriskan kemudian siap untuk dikeringkan/dijemur.
- Penjemuran sambiloto dapat dilakukan dengan menggunakan sinar matahari, oven, *fresh dryer* maupun kombinasi matahari dengan alat/blower.
- Pengeringan adalah suatu metode untuk mengeluarkan atau menghilangkan air dari suatu bahan dengan menggunakan energi panas (Buckle et al., 1987).
- Tujuan dari pengeringan yaitu untuk memperoleh bahan dengan masa simpan panjang. Menurut Henderson (1976) pengeringan dapat memberikan beberapa keuntungan antara lain, memperpanjang masa simpan dan mengurangi penurunan mutu sebelum diolah lebih lanjut,
- Memudahkan dalam proses pengangkutan, menimbulkan aroma khas pada bahan tertentu dan mutu hasil lebih baik serta memiliki nilai ekonomi lebih tinggi.

Ukuran partikel dan ekstraksi

- Ukuran partikel bahan yang digunakan dalam ekstraksi berpengaruh terhadap bahan aktif ekstrak. Pengecilan ukuran bahan bertujuan untuk memperbesar luas permukaan pori-pori simplisia, sehingga kontak antara partikel simplisia dengan pelarut semakin besar.
- Jaringan simplisia dapat mempengaruhi efektifitas ekstraksi. Simplisia yang memiliki jaringan yang longgar akan lebih mudah diekstraksi dibandingkan dengan bahan yang memiliki jaringan yang kompak.
- Menurut Sumaryono (1996), simplisia yang memiliki jaringan yang kompak sebelum diekstraksi perlu dibasahi atau dikembangkan terlebih dahulu. Untuk sambiloto, menurut Sembiring et al. (2005), ukuran simplisia sambiloto untuk ekstraksi yang optimal adalah ukuran 60 mesh.

Pelarut yang optimal

- Pemilihan pelarut merupakan faktor penting dalam proses ekstraksi. Jenis pelarut yang digunakan harus memiliki daya pelarutan yang tinggi dan tidak berbahaya atau beracun.
- Menurut Depkes (1986), pelarut yang dipilih harus menguntungkan artinya dalam jumlah sedikit sudah dapat melarutkan zat aktif suatu bahan.
- Waktu untuk menguapkan pelarut lebih singkat sehingga kerusakan zat aktif yang tidak tahan panas dapat dikurangi. Jenis pelarut yang digunakan menurut Kirk dan Othmer (1957) adalah murah dan selektif terhadap bahan aktif yang diinginkan. Menurut Sembiring et al. (2005) jenis pelarut yang optimal untuk mengekstrak sambiloto adalah etanol 70%.
- Jumlah bahan dan jumlah pelarut yang digunakan dalam proses ekstraksi dapat mempengaruhi rendemen ekstrak yang dihasilkan. Semakin tinggi jumlah pelarut yang digunakan, maka kemampuan pelarut untuk mengekstrak suatu bahan semakin tinggi karena kontak antara bahan dengan pelarut semakin besar.

Pelarut

- Menurut Suryandari (1981), semakin besar volume pelarut yang digunakan maka jumlah oleoresin yang terekstraksi semakin banyak dan akan bertambah terus sampai larutan jenuh. Perbandingan antara bahan dengan pelarut untuk ekstraksi sambiloto adalah 1:10 (Sembiring et al., 2005).
- Lama ekstraksi berpengaruh terhadap mutu ekstrak. Semakin lama waktu ekstraksi, maka kesempatan bahan bersentuhan dengan pelarut semakin lama hingga larutan mencapai titik jenuh (Suryandari, 1981).
- Untuk mendapatkan residu kadar bahan aktif dibawah satu persen, maka dibutuhkan waktu ekstraksi yang lebih lama (Bernardini,1983). Untuk simplisia sambiloto lama ekstraksi untuk menghasilkan rendemen dan kadar bahan aktif optimal adalah 6 jam (Sembiring et al, 2005).
- Sisa pelarut dipengaruhi oleh kondisi pemisahan dan penguapan pelarut dalam alat vacuum rotary dan oven vacuum pump. Sisa pelarut dalam ekstrak dapat mempengaruhi kualitas produk.
- Menurut FDA (*Food and Drug Administration*), batasan sisa pelarut dalam ekstrak adalah sebesar 1,046%. Penguapan sisa pelarut dalam ekstrak dilakukan sampai bobot tetap.

Perbedaan mutu simplisia Sambiloto karena pengeringan

Parameter	Jenis Pengering		
	Matahari	Matahari/ Blower	Blower
Kadar air (%)	10,35	10,40	8,70
Kadar abu tak larut asam (%)	0,04	0,06	0,07
Kadar abu (%)	8,25	7,93	7,68
Kadar sari air (%)	21,40	26,83	20,46
Kadar sari alkohol (%)	12,39 1	14,42	11,55

Pengaruh ukuran serbuk

Parameter	Ukuran serbuk		* Standar MMI
	40 mesh	60 mesh	
Kadar sari air (%)	31,20	38,00	Min 18,00
Kadar sari alkohol (%)	16,12	19,81	Min 9,70
Kadar abu (%)	0,58	0,39	Maks 12,00

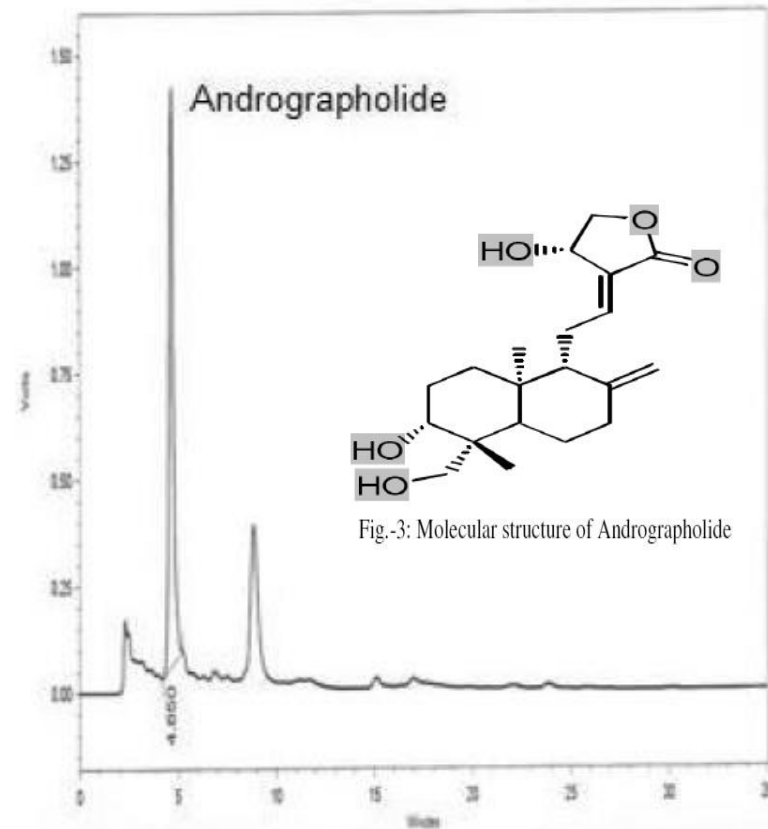
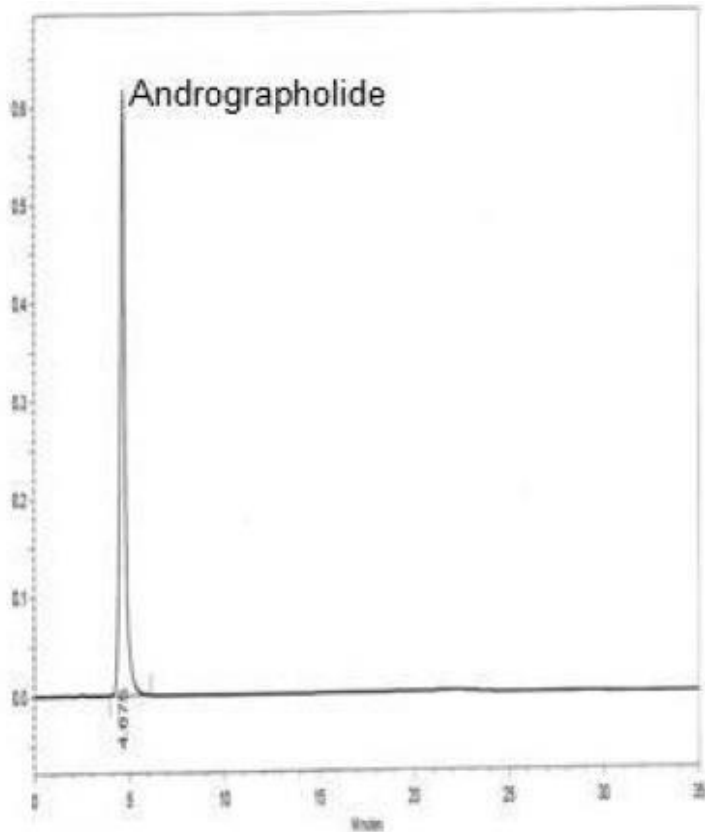
Kedua data tersebut menunjukkan bahwa dalam mengolah atau memformulasi obat tradisional harus memikirkan segala aspek untuk menghasilkan mutu produksi yang baik.

Cara pengolahan tersebut tidak hanya untuk satu jenis obat sehingga faktornya yang berpengaruhpun agak berbeda, sehingga harus dicermati isi senyawa aktif dari masing jenis bahan baku

Hasil KLT ekstrak daun Sambilito pada UV 254

S. No.	Part	Solvent System	Spraying Reagent	Spot Colour Under UV	Rf Value (Rf x 100)
1.	Pet ether extract	Chloroform Methanol (7:3)	Iodine Vapour	Yellow	50
2.	Acetone extract	Chloroform Methanol (7:3)	Iodine Vapour	Brown Brown Brown Brown	68 58 42 25
3.	Alcoholic extract	Chloroform Methanol (7:3)	Iodine Vapour	Light Brown Violet Light Brown Light Brown Violet	88 62 45 30 20

Hasil analisis dengan HPLC Sambiloto



**Fase diam C-18, fase gerak metanol-air (8:2),
detektor UV-254.**

POSTEST

bit.ly/Postest_PSBA

BIOSINTESIS

Metabolit Primer dan Sekunder

Fungsi Metabolit Bagi Tumbuhan

1. Sumber energi metabolisme dan transfer energy
 - Pembentukan gula merupakan cadangan energi dalam organisme, selain itu juga berupa ATP
2. Bahan dasar (building blocks) sel dan pendukung struktur
 - Gula (selulosa, hemiselulosa)
 - Lipid (fosfolipid)
 - Fenilpropan (lignin, lignifikasi di pepohonan)
 - Protein (membran mikrotubulus, dan mikrofilamen)
3. Sumber informasi genetic
 - DNA-RNA.
4. Katalis reaksi metabolisme
 - Enzim: hidrolase, transferase, sintetase dll

Fungsi Metabolit Bagi Tumbuhan

5. Penolak predator dan pathogen
 - Penolak kimiawi: zat pahit, racun, antimikroba

6. Aksi allelopati
 - Merupakan fenomena pelepasan senyawa kimia oleh tumbuhan (disebut allelomon) yang dapat melukai tumbuhan lain sehingga tdk tumbuh didaerahnya, sebagai mekanisme kompetisi makanan
 - Allelomon meliputi senyawa minyak atsiri, fenolik, alkaloid, steroid dan kumarin. Contoh adalah juglon

PENGERTIAN METABOLIT PRIMER DAN METABOLIT SEKUNDER

- Sebuah hubungan kolektif yang terintegrasi dari reaksi kimia yang dimediasi secara enzimatik dan ditata secara rapi dalam rangka mencapai tujuan tertentu disebut sebagai **metabolisme antara**, sedangkan jalur yang terlibat diistilahkan sebagai **jalur metabolisme**.
- Tujuan tertentu, misalnya: semua makhluk hidup mengubah dan menginterkoneksi sejumlah besar senyawa organik untuk melangsungkan kehidupan, tumbuh dan bereproduksi. Makhluk hidup memiliki kemampuan menyediakan energi dalam bentuk ATP dan pasokan gugus pembangun untuk merancang jaringan tubuhnya.
- Beberapa biomolekul yang sangat penting diantaranya adalah karbohidrat, protein, lemak, dan asam nukleat: **karbohidrat** tersusun atas unit gula, **protein** dibuat dari asam amino, **asam nukleat** tersusun berdasarkan nukleotida dan **lemak** terbentuk oleh 3 rantai asam lemak yang berikatan dengan gliserol.

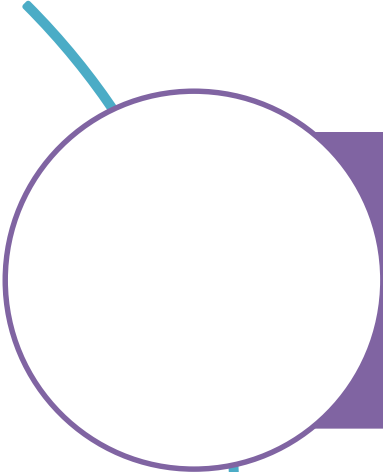
PENGERTIAN METABOLIT PRIMER DAN METABOLIT SEKUNDER

- Biosintesis → proses pembentukan suatu metabolit (produk metabolisme) dari molekul yg sederhana → kompleks yg terjadi pada organisme hidup
- Metabolisme → Metabolit → Primer & Sekunder
- Umumnya senyawa bioaktif dari metabolit sekunder dipelajari jalur biosintesisnya → modifikasi dari jalur → metabolit dapat dibuat lebih


JALUR BIOSINTESIS

- Jalur biosintesis adalah gambaran langkah-langkah reaksi kimia yang terjadi ketika organisme hidup menciptakan molekul kompleks baru dari prekursor yang lebih sederhana dan lebih kecil.
- Kata “biosintesis” berasal dari dua kata dasar yaitu “Bio” yang menunjukkan bahwa reaksi berlangsung dalam organisme hidup yang berbeda dengan reaksi di dalam laboratorium; “sintesis” yang menunjukkan bahwa bahan awal yang sederhana direaksikan untuk membentuk produk yang lebih besar:
- Jalur biosintesis adalah ringkasan dari reaksi kimia ini, dipecah oleh setiap langkah untuk mendeskripsikan suatu jalur; seperti enzim, koenzim, dan kofaktor yang digunakan dalam setiap reaksi.

PENGERTIAN METABOLIT PRIMER DAN METABOLIT SEKUNDER



Metabolit primer adalah hasil metabolisme primer: respirasi, fotosintesis, konversi energi, dan metabolisme lain yang vital untuk kelangsungan hidup organisme.



Metabolit sekunder adalah hasil metabolisme dari metabolit primer membentuk derivat yang tidak diketahui gunanya bagi organisme tersebut atau tidak berguna bagi kelangsungan hidup organisme

PENGERTIAN METABOLIT PRIMER DAN METABOLIT SEKUNDER

METABOLISME PRIMER



- Proses essential bagi tumbuhan
- Tanpa adanya metabolisme primer tumbuhan akan terganggu pertumbuhan, perkembangan serta reproduksinya → mati
- E.g. Respirasi dan Fotosintesis

METABOLISME SEKUNDER



- Non essential bagi tumbuhan
- Tanpa metabolit sekunder tdk menyebabkan kematian secara langsung bertahan hidup
- E.g. Ketahanan terhadap penyakit, estetika atau bahkan tidak memberikan efek bagi tumbuhan sama sekali

PENGERTIAN METABOLIT PRIMER DAN METABOLIT SEKUNDER

METABOLISME PRIMER



- Senyawa² yg diproduksi dan terlibat pada jalur metabolisme
- Glikolisis, siklus krebs, fotosintesis
- Protein, KH, Lipid, as. Amino, nukleotida, dan asetil coA

METABOLISME SEKUNDER



- u/proses pertumbuhan
- Unik pd setiap tumbuhan
- Fx: mekanisme pertahanan (protectant) → melindungi tumbuhan dari serangan hama; attractan (penarik) dan repelant (penolak) dari serangga herbivora
- Eg. Senyawa bioaktif dan senyawa aromatik; Antibiotik

PENGERTIAN METABOLIT PRIMER DAN METABOLIT SEKUNDER

METABOLISME PRIMER



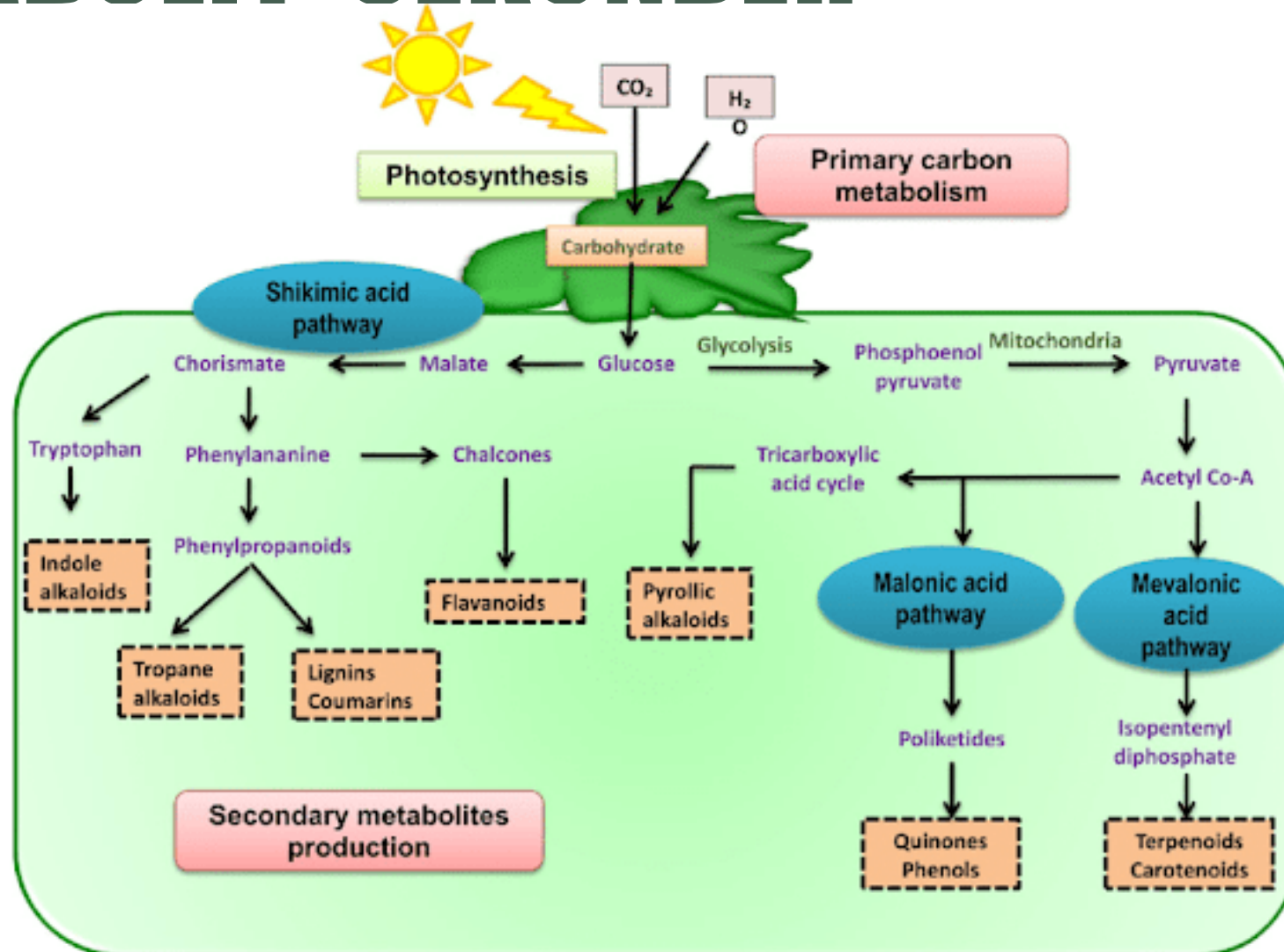
- Polimer alam
- Polisakarida
- Protein
- Lemak
- Asam Nukleat
- Karakteristik: Tersebar merata d/ tiap tumbuhan
- Fx universal sbg energi enzim, etc

METABOLISME SEKUNDER

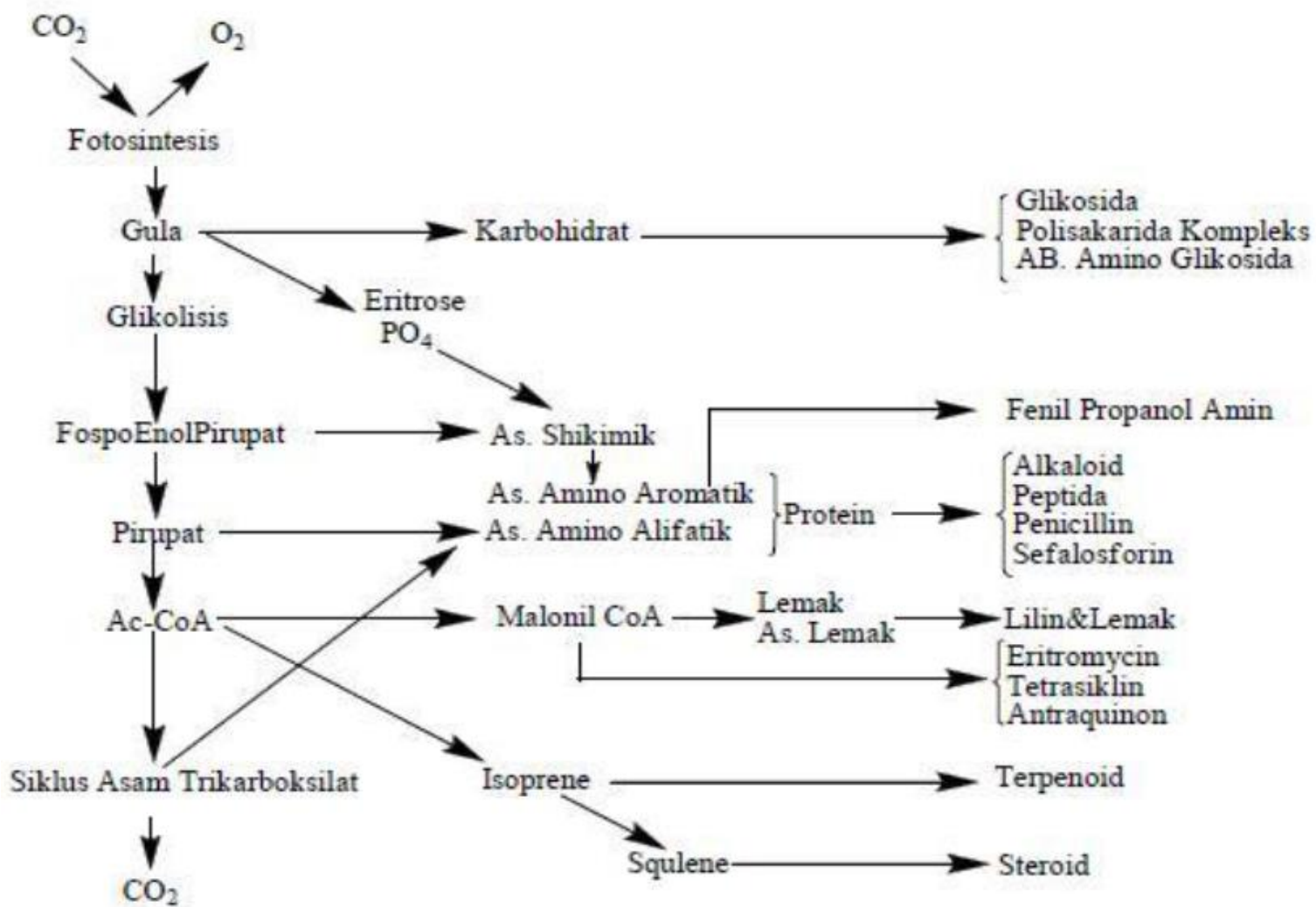


- Terpenoid
- Steroid
- Flavonoid
- Poliketida
- Alkaloid
- Karakteristik: tersebar tdk merata d/ tiap organisme

PENGERTIAN METABOLIT PRIMER DAN METABOLIT SEKUNDER



Kaitan Metabolit Primer dan Sekunder



Bagan Hubungan Biosintesis Metabolit Primer Menjadi Metabolit Sekunder

Karbohidrat

- Merupakan makromolekul yg terdiri atas H, C, dan O, sering jg disebut sebagai gula hidrokarbon
- Jika dilihat dr jumlah monomer penyusunnya, dapat dibedakan menjadi 4 keompok, yaitu:
 1. Monosakarida, terdiri dr 1 monomer
 2. Disakarida, terdiri dr 2 monomer
 3. Oligosakarida, terdiri dr 3 - 10 monomer
 4. Polisakarida terdiri dr lebih dr 10 monomer.

Protein

- Merupakan senyawa makromolekul yg terdiri dari atom H, C, O, S, dan N.
- Berdasarkan fungsi utamanya, dibedakan menjadi 2:
 1. Protein structural, berfungsi menyusun bagian di dalam sel seperti protein perifer dan protein integral yg menyusun membrane sel
 2. Protein fungsional yaitu kelompok enzim

Asam Nukleat

- Bagian yg tersusun dari C, H, O, dan P.
- Tersusun dari 3 bagian, yaitu basa nitrogen, gula ribose dan fosfat.
- Berdasarkan fungsi utamanya dibedakan menjadi:
 1. Sebagai energi kimia (ATP, UTP, GTP)
 2. Sebagai komponen regulator (cGMP, cAMP)
 3. Sebagai komponen materi genetic (RNA, DNA) Sebagai kofaktor (FAD, koenzim A, NAD)

Lipid

- Golongan senyawa metabolit primer yg bersifat hidrofobik (anti air).
- Dibedakan menjadi 3 kelompok:
 1. Sterol, merupakan penyusun membrane sel makhluk hidup
 2. Kolesterol
 3. Lemak, tersusun atas asam lemak dan gliserol

Mengapa Metabolit Sekunder

I. Produk buangan

- Dasar: melimpahnya MS di tumbuhan, tdk esensial bagi kehidupan organisme, dan tidak adanya organ ekskresi di tumbuhan.
- Kontra: bbrp tumb. memiliki sistem ekskresi berupa presipitasi dan eksudasi

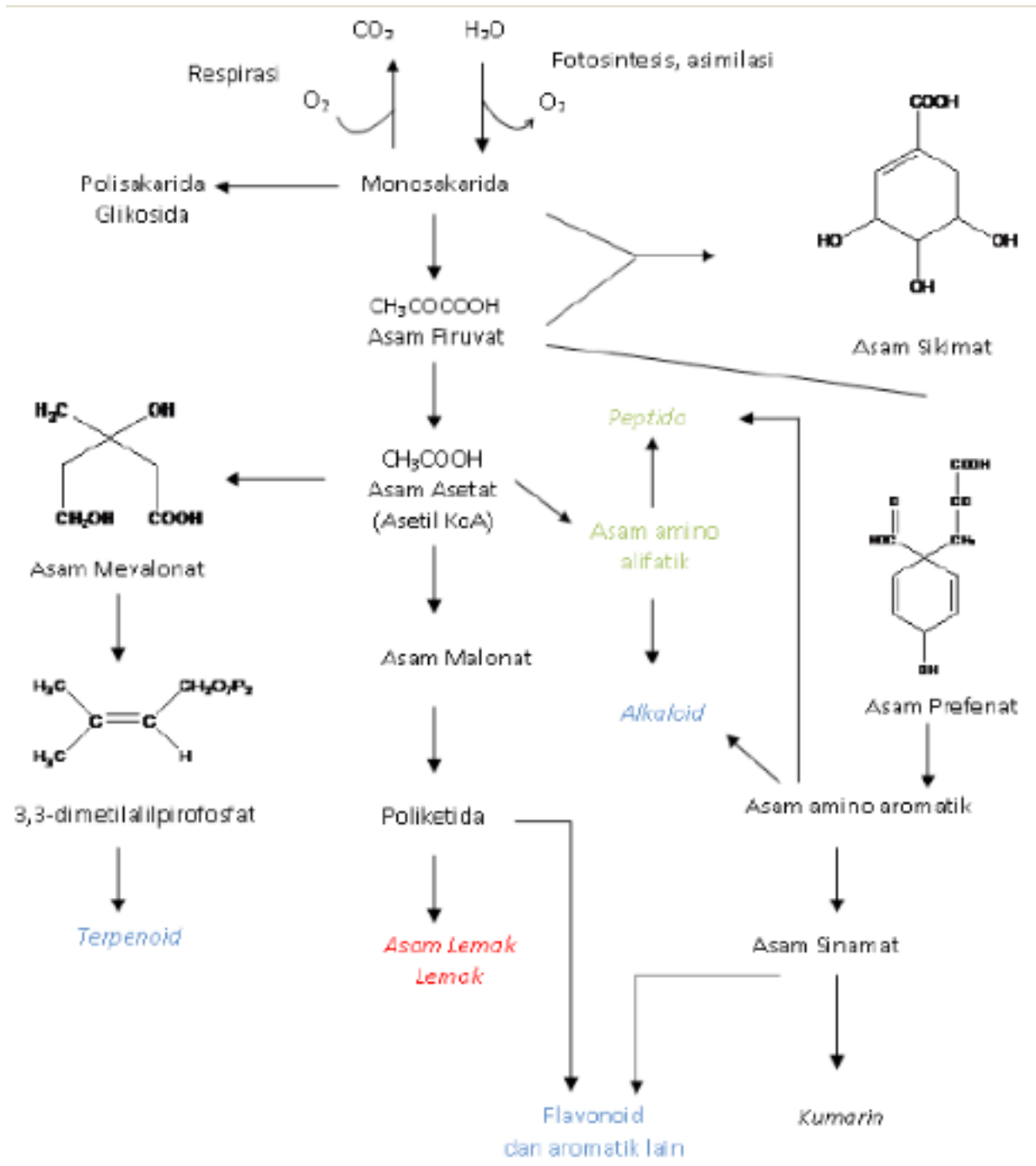
Mengapa Metabolit Sekunder

2. Fungsi internal tumbuhan

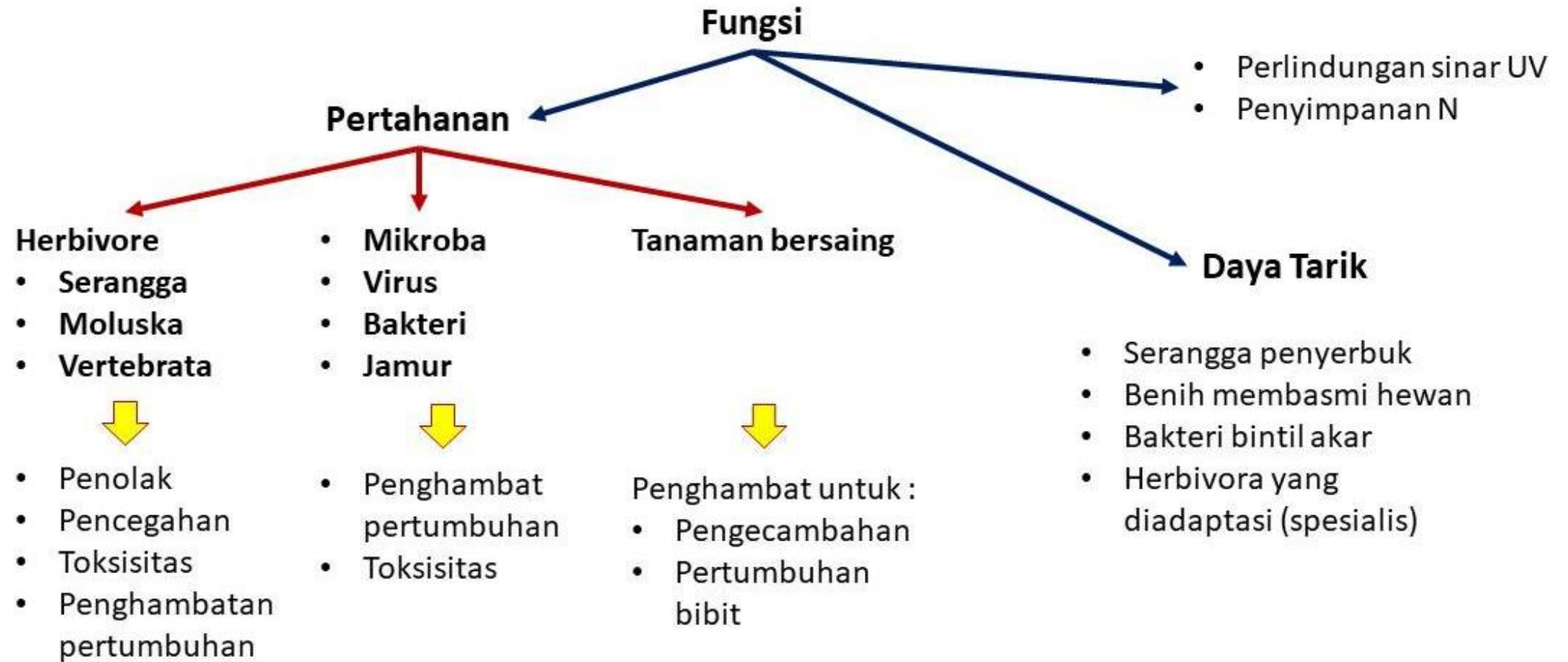
- Dasar: bbrp MS merupakan zat antara MP, sebagai cadangan energi dan prekursor metabolisme penting, sebagai bentuk mekanisme transport

3. Kelebihan metabolisme primer

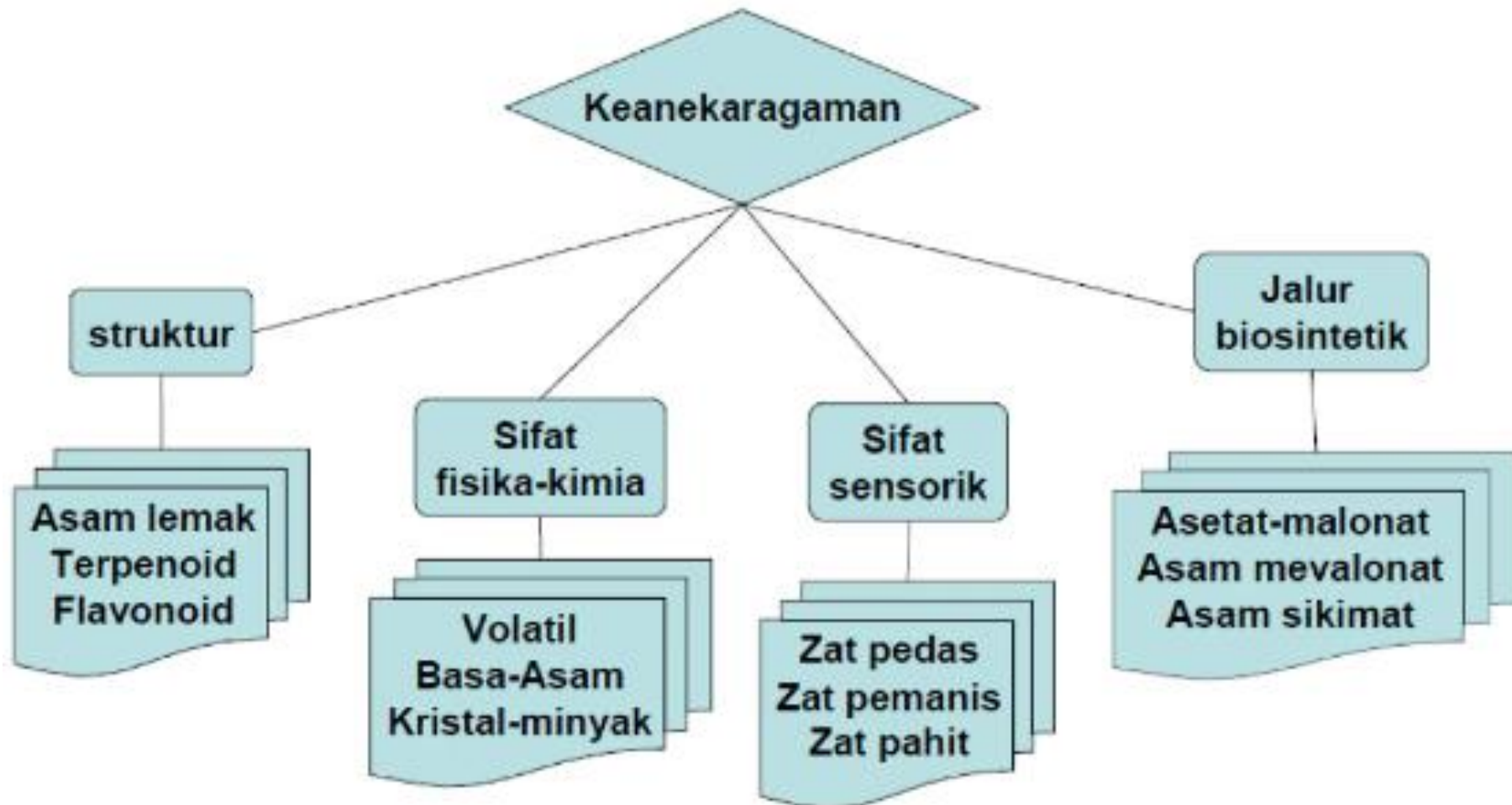
- Dasar: dalam keadaan berlimpahnya substrat bagi metabolisme dapat terjadi produksi MP yang berlebihan, sehingga pembentukan MS kelebihan produksi.



Metabolit Sekunder Tanaman



Keanekaragaman Metabolit Sekunder



BEBERAPA FUNGSI PENTING METABOLIT SEKUNDER:

- Antibiotik (flavonoid), Antidiare (tannin),
- Sebagai agen pewarna untuk menarik atau memberi peringatan pada spesies lainnya
- Fitoalexan (sebagai bahan racun) yang memberikan pertahanan melawan predator
- Merangsang sekresi senyawa-senyawa lainnya seperti alkaloid, terpenoid, senyawa fenolik, glikosida, tanin, gula dan asam amino

Berdasarkan Senyawa Pembangunnya (Building Block) Maka Jalur Biosintesis Metabolit Sekunder Dalam Tumbuhan Dapat Dibagi Menjadi 3 Jalur Yaitu:

- Jalur asam asetat (*Acetate Pathway*)
- Jalur asam sikimat (*shikimic acid pathway*)
- Jalur asam mevalonat dan deoksisilulosa (*mevalonate acid and deoxyxylulose pathway*)

JALUR ASAM ASETAT

- Asetil KoA dibentuk oleh reaksi dekarboksilasi oksidatif dari jalur glikolitik produk asam piruvat. Asetil Ko-A juga dihasilkan oleh proses β -oksidasi asam lemak, secara efektif membalikkan proses dimana asam lemak itu sendiri disintesis dari asetil-KoA.
- Metabolit sekunder penting yang terbentuk dari jalur asetat meliputi senyawa fenolik, prostaglandin, dan antibiotik makrolida, serta berbagai asam lemak dan turunan pada antarmuka metabolisme primer / sekunder.

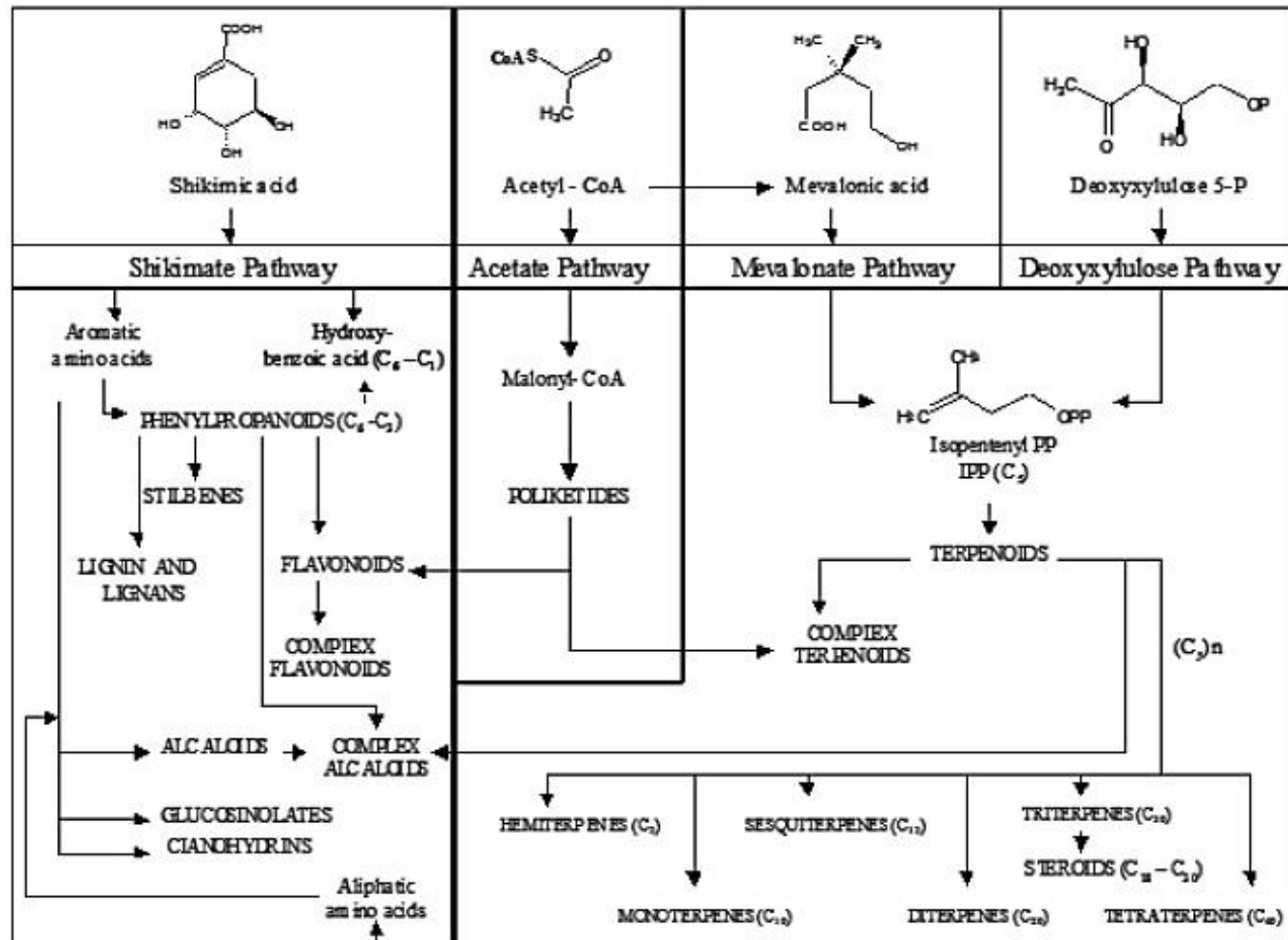
JALUR ASAM SIKIMAT

- Asam shikimat diproduksi dari kombinasi fosfoenolpiruvat, jalur glikolitik antara dan erythrose 4-fosfat dari jalur pentosa fosfat. Reaksi siklus pentosa fosfat dapat digunakan untuk degradasi glukosa, tetapi mereka juga fitur dalam sintesis gula oleh fotosintesis.
- Jalur sikimat mengarah ke berbagai senyawa fenolik, turunan asam sinamat, lignan, dan alkaloid

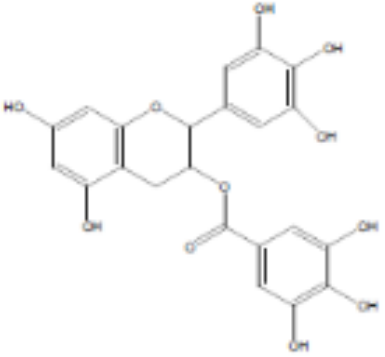
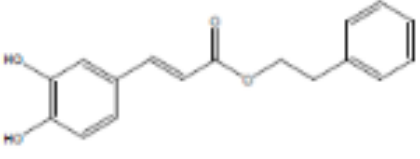
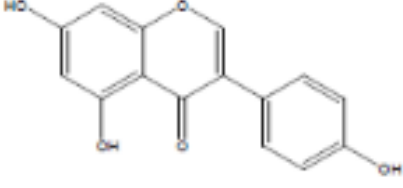
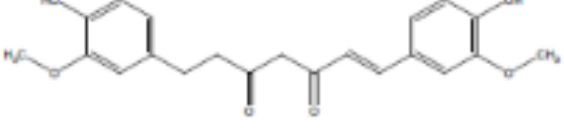
JALUR ASAM MEVALONAT DAN DEOKSISILULOSA

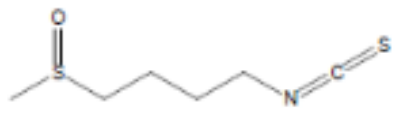
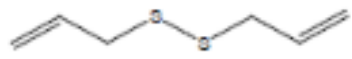
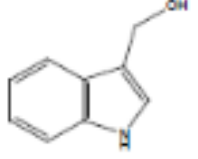
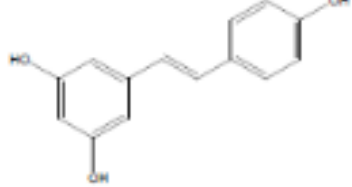
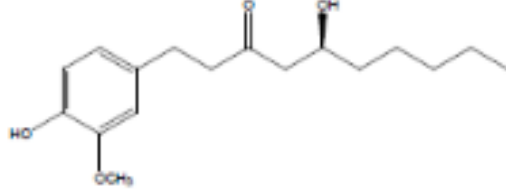
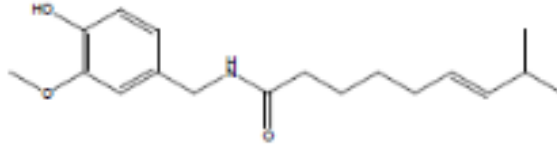

- Asam mevalonik sendiri terbentuk dari tiga molekul asetil Ko-A, tetapi saluran jalur mevalonatasetat menjadi serangkaian senyawa yang berbeda daripada jalur asetat.
- Deoksisilulosa pospat muncul dari kombinasi dua intermediet jalur glikolitik, yaitu asam piruvat dan gliseraldehida-3-fosfat.
- Jalur fosfat mevalonat dan deoksisilulosa bersama-sama bertanggung jawab untuk biosintesis dari arah besar metabolit terpenoid dan steroid.

METABOLIT SEKUNDER DARI BEBERAPA JALUR BIOSINTESIS



CONTOH METABOLIT SEKUNDER TANAMAN

Daun teh		Epigallocatechin-3galat
Madu		Asam kafeicfenetil eter
Kedelai		Genistein
Kunyit		curcumin

Sumber	Struktur	Nama senyawa
Brokoli		Sulforapen
Bawang putih		Dialil sulfida
Kubis		Sindol-3karbinol
Anggur		Resveratrol
Jahe		Gingerol
Cabe		Capsaicin
Tomat		Likopen



**STIKES
NOTOKUSUMO
YOGYAKARTA**

PURIFIKASI DAN STANDARISASI BAHAN ALAM

PERTEMUAN 3

STANDARISASI PARAMETER NON SPESIFIK DAN SPESIFIK BAHAN ALAM

apt. Bayu Bakti Angga Santoso, M.Pharm.Sci.



PROFESIONAL, TERAMPIL, CERDAS, BERETIKA



CAPAIAN

- Mahasiswa mampu memahami paradigma standarisasi parameter non spesifik dan spesifik bahan alam
- Ceramah dan diskusi tanya jawab
- 2 x 50 menit
- **Pengetahuan:** Mahasiswa mampu menjelaskan tentang paradigma standarisasi parameter non spesifik dan spesifik bahan alam melalui ujian UTS secara tepat.



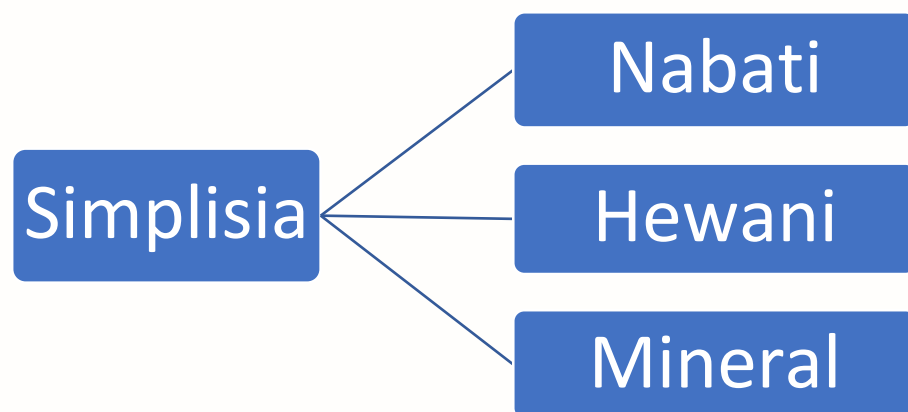
Standarisasi?

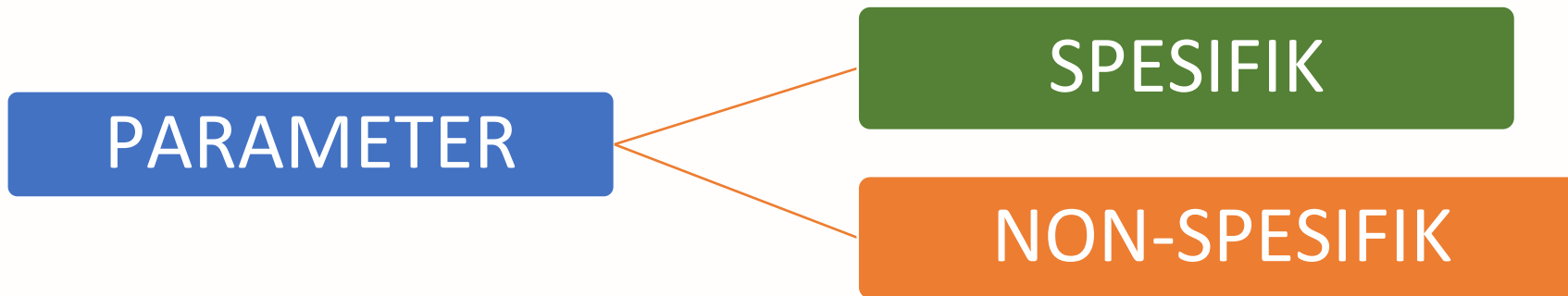
Kemenkes 2000 Buku Parameter Standar Umum Ekstrak Tumbuhan Obat

Standardisasi dalam kefarmasian tidak lain adalah **serangkaian parameter, prosedur dan cara pengukuran** yang hasilnya merupakan unsur-unsur terkait paradigma **mutu kefarmasian**, mutu dalam artian **memenuhi syarat standar (kimia, biologi dan farmasi)**, termasuk jaminan (**batas-batas**) stabilitas sebagai produk kefarmasian umumnya. Persyaratan mutu ekstrak terdiri dari berbagai parameter standar umum dan parameter standar spesifik. Pemerintah melakukan fungsi pembinaan dan pengawasan serta melindungi konsumen untuk tegaknya trilogi "mutu-keamanan-manfaat". Pengertian standardisasi juga berarti proses menjamin bahwa produk akhir (obat, ekstrak atau produk ekstrak) mempunyai nilai parameter tertentu yang konstan (ajeg) dan ditetapkan (dirancang dalam formula) terlebih dahulu

SIMPLISIA

Simplisia adalah **bahan alamiah yang dipergunakan sebagai obat yang belum mengalami pengolahan apapun juga dan kecuali dikatakan lain, berupa bahan yang telah dikeringkan** (Materia Medika Indonesia)



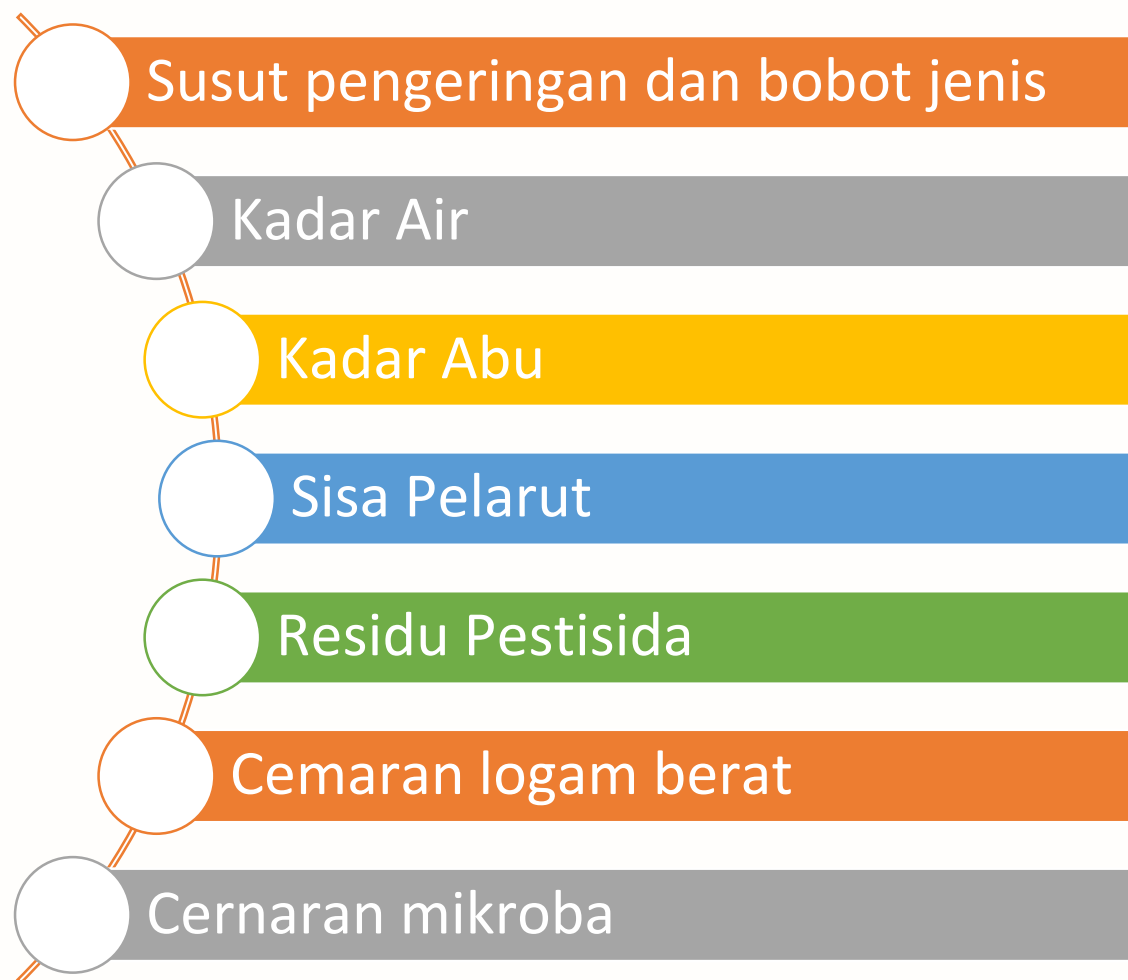


Standarisasi parameter spesifik merupakan aspek yang berfokus pada senyawa atau golongan senyawa terhadap aktivitas farmakologi

standarisasi parameter non spesifik merupakan parameter yang tidak berhubungan langsung dengan aktivitas farmakologis tetapi dapat mempengaruhi aspek keamanan dan stabilitas ekstrak serta sediaan yang dihasilkan



Parameter Non-Spesifik





Parameter Spesifik

- Identitas
- Organoleptik
- Senyawa terlarut dalam pelarut tertentu
- Uji Kandungan

Susut Pengeringan

- **Tujuan** Memberikan batasan maksimal (rentang) tentang besarnya senyawa yang hilang pada proses pengeringan
- Pengukuran sisa zat setelah pengeringan pada **temperatur 105°C selama 30 menit atau sampai berat konstan**, yang dinyatakan sebagai nilai prosen. Dalam hal khusus (jika bahan tidak mengandung minyak menguap/atsiri dan sisa pelarut organik menguap) identik dengan kadar air, yaitu kandungan air karena berada di atmosfer/lingkungan udara terbuka.

Perhitungan Susut Pengeringan

$$\text{Susut pengeringan} = \frac{\text{Berat sebelum pemanasan} - \text{Berat akhir}}{\text{Berat sebelum pemanasan}} \times 100\%$$

Bobot Jenis

- **PENGERTIAN** ρ masa per satuan volume pada suhu kamar tertentu
- **PRINSIP** (25°C) yang ditentukan dengan alat khusus piknometer atau alat lainnya
- **TUJUAN** Memberikan batasan tentang besarnya masa per satuan volume yang merupakan parameter khusus ekstrak cair sampai ekstrak pekat (kental) yang masih dapat dituang

Gunakan piknometer bersih, kering dan telah dikalibrasi dengan menetapkan bobot piknometer dan bobot air yang baru dididihkan pada suhu 25°C



Atur hingga suhu ekstrak cair lebih kurang 20°C, masukkan ke dalam piknometer. Atur suhu piknometer yang telah diisi hingga suhu 25°C, buang kelebihan ekstrak cair dan ditimbang



Kurangkan bobot piknometer kosong dari bobot piknometer yang telah diisi. Bobot jenis ekstrak cair adalah hasil yang diperoleh dengan membagi bobot ekstrak dengan bobot air, dalam piknometer pada suhu 25°C.

$$\text{Bobot Jenis} = \frac{W_2 - W_0}{W_1 - W_0} \times \rho_{\text{air}}$$

Keterangan :

W_0 : Piknometer Kosong (g)

W_1 : Piknometer + Air (g)

W_2 : Piknometer + Sampel

ρ_{air} : 1 g/mL

<https://www.youtube.com/watch?v=3WZ1C1t7wGI>

PENGERTIAN

Pengukuran kandungan air yang berada di dalam bahan, dilakukan dengan cara yang tepat diantara cara titrasi, destilasi atau gravimetri.

TUJUAN

Memberikan batasan minimal atau rentang tentang besarnya kandungan air di dalam bahan.

NILAI

Maksimal atau rentang yang diperbolehkan. Terkait dengan kemurnian dan kontaminasi

METODE

Titrasi

Destilasi

Gravimetri

PENGERTIAN

Pengukuran kandungan air yang berada di dalam bahan, dilakukan dengan cara yang tepat diantara cara titrasi, destilasi atau gravimetri.

TUJUAN

Memberikan batasan minimal atau rentang tentang besarnya kandungan air di dalam bahan.

NILAI

Maksimal atau rentang yang diperbolehkan. Terkait dengan kemurnian dan kontaminasi

METODE

Titrasi

Destilasi

Gravimetri

a. Metode Titrasi

Alat :

- Buret dilengkapi tabung pendingin untuk melindungi dari pengaruh kelembaban udara.
- Labu titrasi kapasitas ± 60 ml, dilengkapi 2 elektroda platina
- Sebuah pipa pengalir nitrogen
- Sebuah sumbat berlubang untuk ujung buret
- Tabung pengering

Titrasi langsung

- Masukkan ± 20 ml metanol P ke labu titrasi
- Titrasi dengan pereaksi Karl Fischer hingga titik akhir tercapai
- Masukkan zat dengan cepat yang telah ditimbang seksama yang diperkirakan mengandung 10-50 mg air ke dalam labu titrasi, aduk selama 1 menit.

Titration with Karl Fischer reagent that has been known its equivalence.
Calculate the amount of water in mg with the formula :

$$V \times F$$

V : Volume Karl Fischer reagent at titration

F : Factor of water equivalence

Titrasi Tidak Langsung

- Masukkan \pm 20 ml metanol P ke labu titrasi
- Titrasi dengan pereaksi Karl Fischer hingga titik akhir tercapai
- Masukkan zat dengan cepat yang telah ditimbang seksama yang diperkirakan mengandung 10-50 mg air, campur.
- Tambahkan pereaksi Karl Fischer berlebihan dan diukur seksama.
- Biarkan beberapa waktu hingga reaksi sempurna.
- Titrasi kelebihan pereaksi dengan larutan baku air-metanol.

Hitung jumlah dalam mg, air, dengan rumus :

$$FV1 - aV2$$

F : faktor kesetaraan air pereaksi Karl Fischer yang diukur saksama

V1 : Volume pereaksi Karl Fischer (ml)

a : kadar air dalam mg tiap ml dari larutan baku air-metanol.

V2 : Volume larutan baku air-metanol (ml)

Pereaksi Karl Fischer

Larutkan 63 g Iodium P dalam 100 ml piridina mutlak P, dinginkan dalam es, alirkan belerang dioksida P hingga bobot bertambah 32,3 g sambil dilindungi dari pengaruh kelembaban udara.

Tambahkan metanol mutlak P secukupnya hingga 500 ml, biarkan selama 24 jam.

Lakukan pembakuan sbb : Masukkan \pm 20 ml metanol mutlak P ke dalam labu titrasi. Titrasi dengan pereaksi Karl Fischer tanpa mencatat volume yang digunakan. Masukkan air yang ditimbang saksama sejumlah yang cocok.

Titration with Karl Fischer reagent. Calculate the equivalent of water in mg per ml of reagent. Karl Fischer reagent must be standardized before use.

Karl Fischer reagent must be stored in a refrigerator at a temperature between 2°C and 8°C, protected from light.

1 ml of Karl Fischer reagent is equivalent to ± 5 mg of water.

Larutan baku air-metanol

- Encerkan 2 ml air dengan metanol secukupnya hingga 1.000 ml
- Titrasi 25 ml larutan dengan pereaksi Karl Fischer
- Hitung kadar air dalam mg tiap ml dengan rumus : $VF/25$

V : volume pereaksi Karl Fischer (ml)

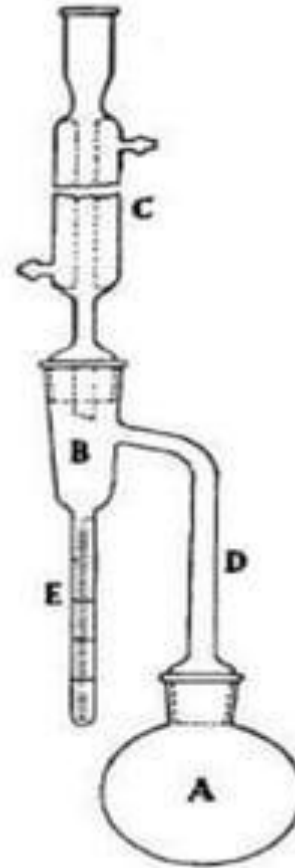
F : faktor kesetaraan air

b. Metode Destilasi

b.1. Alat :

- 1 labu 500 ml dihubungkan dengan pendingin balik dengan pertolongan alat penampung.
- Tabung penerima 5 ml berskala 0,1 ml.
- Pemanas, sebaiknya pemanas listrik yang suhunya dapat diatur atau tangas minyak.
- Bagian atas labu tabung sebaiknya dibungkus dengan asbes.

ALAT PENETAPAN KADAR AIR (DESTILASI TOLUENA)



Keterangan gambar :

- A. Labu 500 ml
- B. Alat penampung
- C. Pendingin air terbalik
- D. Labu tabung penyambung yang dibungkus dengan asbes
- E. Tabung penerima 5 ml berskala 0,1 ml

b.2. Pereaksi

- Toluen. Sejumlah Toluen P, kocok dengan sedikit air, biarkan memisah, buang lapisan air suling.

b.3. Prosedur Kerja

1.

Bersihkan semua alat yang dipakai lalu dikeringkan dalam lemari pengering.

2.

Masukkan ekstrak yang telah ditimbang seksama yang mengandung 2-4 ml air ke dalam labu kering.

3.

Jika ekstrak berupa ekstrak kental, timbang dalam sehelai lembaran logam dengan ukuran yang sesuai dengan leher labu.

4.

Masukkan ± 200 ml toluen ke dalam labu. Hubungkan alat. Tuang toluen melalui alat pendingin. Panaskan labu hati-hati selama 15 menit.

5.

Setelah toluen mulai mendidih, suling dgn kecepatan ± 2 tetes per detik, hingga sebagian air tersuling, kemudian naikan kecepatan penyulingan hingga 4 tetes per detik.

6.

Setelah semua air tersuling, cuci bagian dalam pendingin dengan toluen. Lanjutkan penyulingan selama 5 menit. Biarkan tabung penerima pendingin hingga suhu kamar.

7.

Jika ada tetes air yang melekat pada pendingin tabung penerima, gosok dengan karet yang diikatkan pada sebuah kawat tembaga dan basahi dengan toluen hingga tetesan turun.

8.

Setelah air dan toluen memisah sempurna, baca volume air. Hitung kadar air dalam persen.

c. Metode Gravimetri

Masukkan ± 10 gram ekstrak dan timbang seksama dalam wadah yang telah ditara. Keringkan dalam suhu 105°C selama 5 jam dan ditimbang.

Lanjutkan pengeringan dan timbang pada jarak 1 jam sampai perbedaan antara 2 penimbangan berturut-turut tidak lebih dari 0,25%.



PRINSIP Bahan dipanaskan pada temperatur dimana senyawa organik dan turunannya terdestruksi dan menguap. Sehingga tinggal unsur mineral dan anorganik.

TUJUAN Memberikan gambaran kandungan mineral internal dan eksternal yang berasal dari proses awal sampai terbentuknya ekstrak.

KADAR ABU - PROSEDUR



PENETAPAN KADAR ABU TOTAL

Pijarkan/panaskan dan ditara krus silikat

Timbang saksama 2 sampai 3 g bahan uji

Masukkan bahan uji ke dalam krus silikat

pijarkan perlahan-lahan hingga arang habis, dinginkan dan timbang.

Jika arang tidak dapat dihilangkan, tambahkan air panas, aduk, saring melalui kertas saring bebas abu

Pijarkan kertas saring beserta sisa penyaringan dalam krus yang sama

Masukkan filtrat ke dalam krus, uapkan dan pijarkan hingga bobot tetap suhu $800 \pm 25^\circ$.
Kadar abu total dihitung terhadap berat bahan uji, dinyatakan dalam % b/b.

PENETAPAN KADAR ABU **TIDAK LARUT ASAM**

Abu yang diperoleh pada Penetapan Kadar Abu Total

Ditambahkan 25 mL asam klorida encer LP selama 5 menit dan didihkan

Masukkan bahan uji ke dalam krus silikat

pijarkan perlahan-lahan hingga arang habis, dinginkan dan timbang.

Jika arang tidak dapat dihilangkan, tambahkan air panas, aduk, saring melalui kertas saring bebas abu

Pijarkan kertas saring beserta sisa penyaringan dalam krus yang sama

Masukkan filtrat ke dalam krus, uapkan dan pijarkan hingga **bobot tetap** suhu $800 \pm 25^\circ$.
Kadar abu total dihitung terhadap berat bahan uji, dinyatakan dalam % b/b.



PERHITUNGAN KADAR ABU

$$\text{Kadar abu total} = \frac{\text{Berat abu sisa pijar}}{\text{Berat simplisia}} \times 100\%$$

PENGERTIAN DAN PRINSIP

Menentukan kandungan sisa pelarut tertentu (yang memang ditambahkan) yang secara umum dengan kromatografi gas. Untuk ekstrak cair berarti kandungan pelarutnya, misalnya kadar alkohol.

TUJUAN

Memberikan jaminan bahwa selama proses tidak meninggalkan sisa pelarut yang memang seharusnya tidak boleh ada. Sedangkan untuk ekstrak cair menunjukkan jumlah pelarut (alkohol) sesuai dengan yang ditetapkan.

NILAI

Maksimal yang diperbolehkan, namun dalam hal pelarut berbahaya seperti kloroform nilai harus negatif sesuai batas deteksi instrumen. Terkait dengan kemurnian dan kontaminasi

Kecuali dinyatakan lain dalam masing-masing monografi, lakukan penetapan dengan cara destilasi. Cara ini sesuai untuk penetapan sebagian besar ekstrak cair dan tingtura kapasitas labu destilasi umumnya 2 sampai 4 kali cairan yang akan dipanaskan dan kecepatan destilasi diatur sedemikian sehingga diperoleh destilat yang jernih

Destilat yang keruh dapat dijernihkan dengan pengocokan menggunakan talk P atau kalsium karbonat P, saring, setelah itu suhu filtrat diatur dan kandungan etanol ditetapkan dari bobot jenis.

Mencegah buih yang mengganggu dalam cairan selama destilasi. tambahkan **asam kuat** seperti **asam fosfat P, asam sulfat P atau asam tanat P** atau kalsium klorida P sedikit berlebih, atau sedikit parafin P atau minyak silikon sebelum destilasi.

Mencegah gejolak selama destilasi dengan **penambahan keping• keping berpori dari bahan yang tidak larut seperti silikon karbida P, atau manik-manik.**

PARAMETER SISA PELARUT

Cara Destilasi (Penetapan Kadar Etanol) yang diperkirakan mengandung etanol 30% atau kurang



Pipet tidak kurang dari 25ml cairan uji ke dalam alat destilasi



Catat destilasi hingga diperoleh destilat \pm 2ml lebih kecil dari volume cairan uji yang dipepet



Atur suhu destilat hingga sama dengan suhu pada waktu pemipetan



Jika arang tidak dapat dihilangkan, tambahkan air panas, aduk, saring melalui kertas saring bebas abu

PARAMETER SISA PELARUT

Cara Destilasi (Penetapan Kadar Etanol) yang diperkirakan mengandung etanol 30% atau kurang



Tambahkan air secukupnya hingga volume sama dengan volume cairan uji



Tetapkan bobot jenis cairan pada suhu 25* C seperti tertera pada penetapan bobot jenis



Hitung persentasi dalam volume dari etanol dalam cairan menggunakan table bobot jenis dan kadar etanol

PARAMETER SISA PELARUT

Cara Destilasi (Penetapan Kadar Etanol) yang diperkirakan mengandung **etanol lebih 30%**



Diambil \pm dua kali volume cairan uji.

Kumpulkan destilat hingga ± 2 ml lebih kecil dari dua kali volume cairan uji yang dipipet \square atur suhu sama dengan cairan uji

Tambahkan air secukupnya hingga volume dua kali volume cairan uji yang dipipet, campur, dan tetapkan bobot jenis.

Hitung persentasi dalam volume dari etanol dalam cairan menggunakan table bobot jenis dan kadar etanol

Kadar etanol dalam volume destilat, sama dengan setengah kadar etanol dalam cairan uji etanol atau kurang.

PARAMETER SISA PELARUT

Cara Destilasi (Penetapan Kadar Etanol) yang diperkirakan mengandung **etanol lebih 30%**



Pipet 25ml cairan uji, masukkan ke dalam corong pisah tambahkan air volume sama



Jenuhkan campuran dengan natrium klorida P, tambahkan 25 heksana P dan Kocok kocok untuk mengekstraksi zat mudah menguap lain yang mengganggu



Pisahkan lapisan bawah ke dalam corong pisah kedua



Ulangi ekstrak dua kali, tiap kali dengan 25 ml heksana p

PARAMETER SISA PELARUT

Cara Destilasi (Penetapan Kadar Etanol) yang diperkirakan mengandung etanol lebih 50%



Encerkan cairan uji dengan air hingga kadar etanol $\pm 25\%$



Jenuhkan campuran dengan natrium klorida P, tambahkan 25 heksana P dan Kocok kocok untuk mengekstraksi zat mudah menguap lain yang mengganggu



Pisahkan lapisan bawah ke dalam corong pisah kedua



Ulangi ekstrak dua kali, tiap kali dengan 25 ml heksana p

Alat kromatografi gas dilengkapi dengan detektor ionisasi nyala dan kolom kaca 1,8 m X 4 mm berisi fase diam S3 dengan ukuran partikel 100 mesh hingga 120 mesh.

Gunakan nitrogen P atau helium P sebagai gas pembawa.

Sebelum digunakan kolom di kondisikan semalam pada suhu 235°C alirkan gas pembawa dengan laju aliran lambat. Atur aliran gas pembawa dan suhu (lebih kurang 120°C) sehingga baku internal asetonitril tereluasi dalam waktu 5 menit sampai 10 menit.

Larutan

Larutan baku I. Encerkan 5,0 ml etanol mutlak P dengan air hingga 250,0 ml. Larutan baku internal. Encerkan 5,0 ml asetonitril P dengan air hingga kadar etanol lebih kurang 2% v/v.

Larutan uji II. Pipet masing-masing 10 ml larutan uji I dan larutan baku internal ke dalam labu tentukur 100 ml, encerkan dengan air sampai tanda,

Larutan baku II. Pipet masing-masing 10 ml larutan baku I dan larutan baku internal ke dalam labu tentukur 100 ml, encerkan dengan air sampai tanda.

Prosedur. Suntikkan masing-masing 2 kali, lebih kurang 0,5 ml larutan uji II dan larutan baku II ke dalam kromatograf. rekam kromatogram dan tetapkan perbandingan respons puncak. Hitung persentase etanol dalam contoh dengan rumus:

$$\frac{2R_u}{R_s D}$$

D= Faktor pengenceran Lar. Uji 1

R_u = Perbandingan respon puncak etanol & Asetonitril Lar. Uji II

R_s = Perbandingan respon puncak etanol & Asetonitril Lar. Baku

II

PARAMETER SISA PESTISIDA PENGERTIAN DAN PRINSIP

Menentukan kandungan sisa pestisida yang mungkin saja pernah ditambahkan atau mengkontaminasi pada bahan simplisia pembuatan ekstrak.

TUJUAN

Memberikan jaminan bahwa ekstrak tidak mengandung pestisida melebihi nilai yang ditetapkan karena berbahaya (toksik) bagi kesehatan.



Jika kandungan kimia pengganggu analisis yang bersifat **non polar relatif kecil** seperti pada ekstrak yang diperoleh dengan penyari air atau etanol berkadar **kurang dari 20%**, **analisis** dapat dilakukan secara **semi kuantitatif** menggunakan **metode kromatografi lapis tipis** secara langsung tanpa melalui tahap pembersihan lebih dahulu atau menggunakan kromatografi gas jika tidak terdapat kandungan kimia dengan unsur N seperti klorofil, alkaloid dan amina non polar lain.



Ekstrak yang diperoleh dengan pelarut etanol berkadar tinggi dan tidak mengandung senyawa nitrogen non polar dapat dicoba menggunakan metode kromatografi lapis tipis atau kromatografi gas secara langsung tanpa pembersihan. Jika tidak dapat dilakukan karena banyaknya kandungan kimia pengganggu maka harus dilakukan pengujian sesuai metode baku. Agar memudahkan penelusuran kembali jika ada masalah analisis maka penomoran dan perincian terhadap analisis disesuaikan dengan buku aslinya.

PENGERTIAN

Menentukan kandungan logam berat secara spektroskopi

DAN PRINSIP

serapan atom atau lainnya yang lebih valid.

TUJUAN

Memberikan jaminan bahwa ekstrak tidak mengandung logam berat tertentu (Hg, Pb, Cd dll.) melebihi nilai yang ditetapkan karena berbahaya (toksik) bagi kesehatan.



Uji cemar Logam berat □ menunjukkan bahwa cemar logam yang dengan **ion sulfida** menghasilkan warna pada kondisi penetapan, tidak melebihi batas logam berat yang dipersyaratkan, dinyatakan dalam % (bobot) timbal dalam zat uji, ditetapkan dengan membandingkan secara visual seperti yang tertera pada perbandingan visual dalam Spektrofotometri dan Hamburan Cahaya dengan pembanding **Larutan baku timbal**.

Tetapkan jumlah logam berat menggunakan **Metode I**, kecuali dinyatakan lain dalam masing-masing monografi.

Metode I digunakan untuk zat yang pada kondisi penetapan memberikan larutan jernih dan tidak berwarna.

Metode III digunakan untuk zat yang pada kondisi Metode I tidak menghasilkan larutan jernih dan tidak berwarna, atau untuk zat yang karena sifat alam yang kompleks, mengganggu pengendapan logam oleh ion sulfida, untuk **minyak digesti basah**, hanya digunakan bila Metode I dan Metode III tidak dapat digunakan.

Pereaksi khusus

Larutan persediaan timbal (II) nitrat. Larutkan 159,8 timbal (II) nitrat P Dalam 100 ml air yang telah ditambah 1 ml asam nitrat P, kemudian encerkan dengan air hingga 1000 ml. Buat dan simpan larutan ini dalam wadah kaca yang bebas dari garam-garam timbal yang larut.

Larutan baku timbal. Buat larutan segar dengan mengencerkan, 10,0 ml Larutan persediaan timbal (II) nitrat dengan air hingga 100 ml. Tiap ml Larutan baku timbal setara dengan 10 mg timbal. Larutan pembandingan yang dibuat dari 100 ml Larutan baku timbal dalam 1 g zat uji setara dengan 1 bagian timbal persepjuta.

Metode I

Ke dalam tiap tabung dari 3 tabung yang masing-masing berisi *Larutan baku*, *Larutan uji* dan *Larutan monitor* tambahkan 10 ml hidrogen sulfida LP yang dibuat segar, campur, diamkan selama 5 menit. Amati permukaan dari atas pada dasar putih: warna yang terjadi pada *Larutan uji* tidak lebih gelap dari warna yang terjadi pada *Larutan baku*, dan intensitas warna pada *Larutan monitor* sama atau lebih kuat dari *Larutan baku*. (*Catatan Bila warna pada Larutan monitor lebih muda dari warna Larutan baku, gunakan Metode III sebagai ganti Metode I untuk zat uji.*)



PENGERTIAN

Menentukan (identifikasi) adanya mikroba yang patogen

PRINSIP

secara analisis mikrobiologis

TUJUAN

Memberikan jaminan bahwa ekstrak tidak boleh mengandung mikroba patogen dan tidak mengandung mikroba non patogen melebihi batas yang ditetapkan karena berpengaruh pada stabilitas ekstrak dan berbahaya (toksik) bagi kesehatan.

Pertumbuhan koloni bakteri aerob mesofil setelah cuplikan diinokulasikan pada media lempeng agar dengan cara tuang dan diinkubasi pada suhu yang sesuai.

Media Dan Preaksi

Media

Plate Count Agar (PCA)

Preaksi

Pepton Dilution Fluid (PDF)

Fluid Casein Digest Soy Lecithin Polysorbate (FCDSLPL)

Minyak mineral (Parafin cair)

Tween 80 dan 20.

Peralatan Khusus

Stomacher atau blender

Alat hitung koloni

Siapkan 5 buah tabung atau lebih yang telah diisi dengan 9 ml pengenceran PDF.



Hasil homogenisasi dipipet pengenceran 10^{-1} sebanyak 1 ml ke dalam tabung yang berisi pengenceran PDF pertama hingga pengenceran 10^{-2} , dikocok hingga homogen.



Buat pengenceran selanjutnya hingga 10^{-6} atau sesuai dengan yang diperlukan.

Setiap pengencaran dipipet 1 ml ke dalam cawan petri dan dibuat duplo.



Tiap cawan petri dituangkan 15-20 ml media PCA ($45\pm 1^{\circ}\text{C}$), cawan petri digoyang dan diputar hingga suspensi tersebar merata.



Untuk mengetahui sterilitas media dan pengencer dibuat uji blangko (kontrol).

Satu cawan hanya diisi 1 ml pengenceran dan media agar, dan cawan yang lain diisi pengencer dan media.



Setelah media memadat, cawan petri diinkubasi pada suhu 35-37°C selama 24-48 jam dengan posisi terbalik.



Jumlah koloni yang tumbuh diamati dan dihitung.

Pertumbuhan bakteri coliform setelah cuplikan diinokulasikan pada media cair yang sesuai, adanya reaksi fermentasi dan pembentukan gas di dalam tabung Durham.

Pereaksi Khusus

Pepton Dilution Fluid (PDF)
Mac Conkey Broth (MCB)
Brilliant Green Lactose Bile Broth (BGLB)
Eosin Methylene Blue Agar (EMBA)
Violet Red Bille Agar (VRBA)
Methyl Red-Voges Proskauer (MR-VP) Medium
Trypton Broth
Simmon's Citrate Agar
Nutrient Agar

Peralatan Khusus

Stomacher atau Blender atau Cawan Mortir
Pipet ukur
Tabung Durham.

PROSEDUR

Siapkan 5 tabung reaksi berisi 9 ml PDF.



Hasil homogenisasi pada penyiapan dipipet 1 ml pengenceran 10^{-1} ke dalam tabung PDF pertama diperoleh suspensi dengan pengenceran 10^{-2} , dikocok sampai homogen.



Dibuat pengenceran selanjutnya hingga 10^{-6} .

PROSEDUR

Siapkan 3 tabung berisi 9 ml MCB yang dilengkapi tabung durham.



Tiap tabung dimasukkan 1 ml suspensi pengenceran, kemudian diinkubasi pada suhu 37°C selama 24-48 jam.



Setelah 24 jam dicatat dan diamati adanya gas yang terbentuk di dalam tiap tabung, kemudian inkubasi dilanjutkan hingga 48 jam dan dicatat tabung-tabung yang menunjukkan gas positif.

UJI KONFIRMASI

PROSEDUR

Tabung yang menunjukkan uji prakiraan positif dipindahkan 1 sengkeli ke dalam tabung berisi 10 ml BGLB yang telah dilengkapi tabung Durham.



Seluruh tabung diinkubasi pada suhu 37°C selama 24-48 jam, dilakukan pengamatan terhadap pembentukan gas.



Jumlah tabung yang positif gas dicatat dan hasil pengamatan tersebut dirujuk ke tabel Nilai Duga Terdekat (NDT)/Minimal Presumptif Number (MPN), angka yang diperoleh pada tabel MPN menyatakan jumlah bakteri coliform dalam tiap gram.

PARAMETER CEMARAN KAPANG, KHAMIR DAN AFLATOKSIN

PENGERTIAN DAN PRINSIP

Menentukan adanya jamur secara mikrobiologis dan adanya aflatoksin dengan KLT.

TUJUAN

Memberikan jaminan bahwa ekstrak tidak mengandung cemaran jamur melebihi batas yang ditetapkan karena berpengaruh pada stabilitas ekstrak dan aflatoksin yang berbahaya bagi kesehatan.

PARAMETER CEMARAN KAPANG, KHAMIR DAN AFLATOKSIN

Pereaksi/Media Khusus

Media

Potato Dextrose Agar (PDA) atau
Czapek Dox Agar (CDA) atau
Malt Agar
Air Suling Agar 0,05% (ASA)
Kloramfenikol 100 mg/liter media.

Peralatan Khusus

Lemari aseptik
Stomacher atau blender
Pipet ukur mulut lebar

Siapkan 3 buah tabung yang masing-masing telah diisi 9 ml ASA



Dipipet 1 ml pengenceran 10^{-1} ke dalam tabung ASA pertama hingga diperoleh pengenceran 10^{-2} , dan dikocok sampai homogen. Dibuat pengenceran selanjutnya hingga 10^{-4}



Dari masing-masing pengenceran dipipet 0.5 ml, dituangkan pada permukaan PDA, segera digoyang sambil diputar agar suspensi tersebar merata dan dibuat duplo

PARAMETER CEMARAN KAPANG, KHAMIR DAN AFLATOKSIN



Untuk mengetahui sterilitas media dan pengenceran, dilakukan uji blangko, ke dalam satu cawan petri dituangkan media dan dibiarkan memadat.



Ke dalam cawan petri lainnya dituangkan media dan pengencer, kemudian dibiarkan memadat. Seluruh cawan petri diinkubasi pada suhu 20-25°C selama 5-7 hari.



Sesudah 5 hari inkubasi, dicatat jumlah koloni jamur yang tumbuh, pengamatan terakhir pada inkubasi 7 hari.

Uji Cemar an Aflatoksin

Pengertian dan prinsip

Pemisahan isolat aflatoksin secara Kromatografi Lapis Tipis.

Pereaksi khusus.

Media dan pengenceran Media Yeast Extract Sucrose Broth (YES).

Peralatan khusus.

Lemari aseptik

Lampu Ultra violet

Mikropipet 10ml

Uji Cemar an Aflatoksin

Kultur *Aspergillus flavus* hasil isolat dan identifikasi dari ekstrak diinokulasikan pada permukaan media YES.



Tabung diinokulasikan pada suhu 25°C selama satu minggu dalam posisi miring untuk mendapatkan permukaan yang luas. Biakan diautoklaf pada suhu 121°C selama 15 menit, biakan dibiarkan sampai dingin.



Ambil media biakan menggunakan pipet pasteur dan dimasukkan ke dalam tabung reaksi kecil atau vial.

Thadap media biakan, ekstrak yang diuji dan Baku Aflatoksin dilakukan Kromatografi Lapis Tipis sebagai berikut:

Lempeng Silika gel (Lempeng pralapis) Kiesel gel 60, Merck.

Baku Aflatoksin

Merupakan campuran siap pakai terdiri dari 5,0 ug Aflatoksin 81; 1,5 ug Aflatoksin 82; 5,0 ug Aflatoksin G1; 1,5 ug Aflatoksin G2 dalam larutan campuran benzene : acetonitril (98 : 2)

Eluen

Campuran kloroform : aseton : n-heksan (85 : 15 : 20)

Penampak bercak

Bercak berwarna biru atau hijau kebiruan setelah lempeng diletakkan dibawah cahaya ultraviolet (366 nm), menandakan aflatoksin positif.



Parameter Spesifik

- Identitas
- Organoleptis
- Senyawa terlarut dalam pelarut tertentu



Parameter Spesifik - Identitas

- Identitas simplisia:
 - Deskripsi tata nama tumbuhan:
 - - Nama lain tumbuhan
 - - Bagian tumbuhan yang digunakan (akar, daun, biji dan lain-lain)
 - - Nama Indonesia tumbuhan
 - -Tanggal pengambilan
 - Informasi terkait simplisia

Parameter Spesifik - Organoleptis

- Parameter yang dideskripsikan dengan sederhana menggunakan panca indera meliputi bau, warna, rasa dan bentuk yang seobjektif mungkin



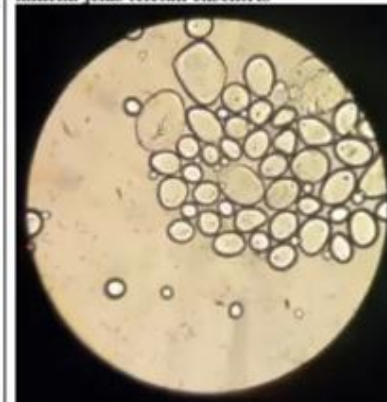
Parameter Spesifik - Mikroskopis

AMILUM

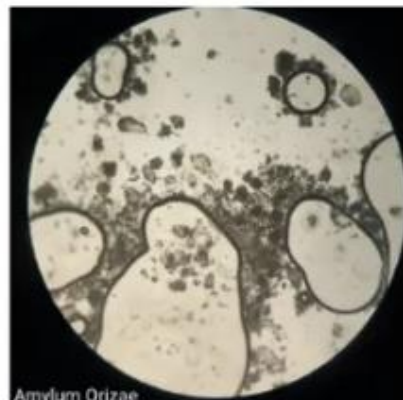
Nama simplisia : *Amylum Manihot*
Nama spesies : *Manihot utilissima* Pohl
Nama Suku : Euphorbiaceae
Makroskopis : warna putih, tidak berbau dan tidak berasa
Mikroskopis : pati seperti topi baja



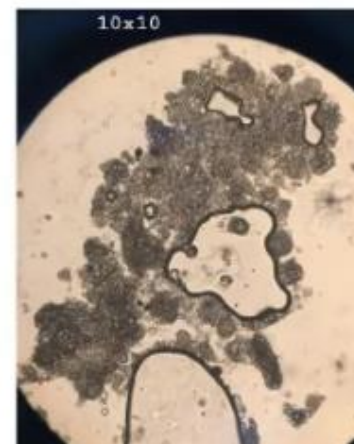
Nama simplisia : *Amylum solani*
Nama spesies : *Solanum tuberosum* L.,
Nama suku : Solanaceae
Makroskopis : putih, serbuk agak kasar, tidak berbau tidak berasa
Mikroskopis : pati bulat tidak beraturan, hilus titik, lamella jelas teletak eksentris



Nama simplisia : *Amylum Oryzae*
Nama spesies :
Nama Suku :
Makroskopis :
Mikroskopis :



Nama simplisia : *Amylum tritici*
Nama spesies :
Nama Suku :
Makroskopis :
Mikroskopis :





Parameter Spesifik - Senyawa terlarut dalam pelarut

- **PENGERTIAN DAN PRINSIP**

Melarutkan ekstrak dengan pelarut (alcohol atau air) untuk ditentukan jumlah solut yang identik dengan jumlah senyawa kandungan secara gravimetri. Dalam hal tertentu dapat diukur senyawa terlarut dalam pelarut lain misalnya heksana, diklorometan. metanol.

- **TUJUAN**

Memberikan gambaran awal jumlah senyawa kandungan.

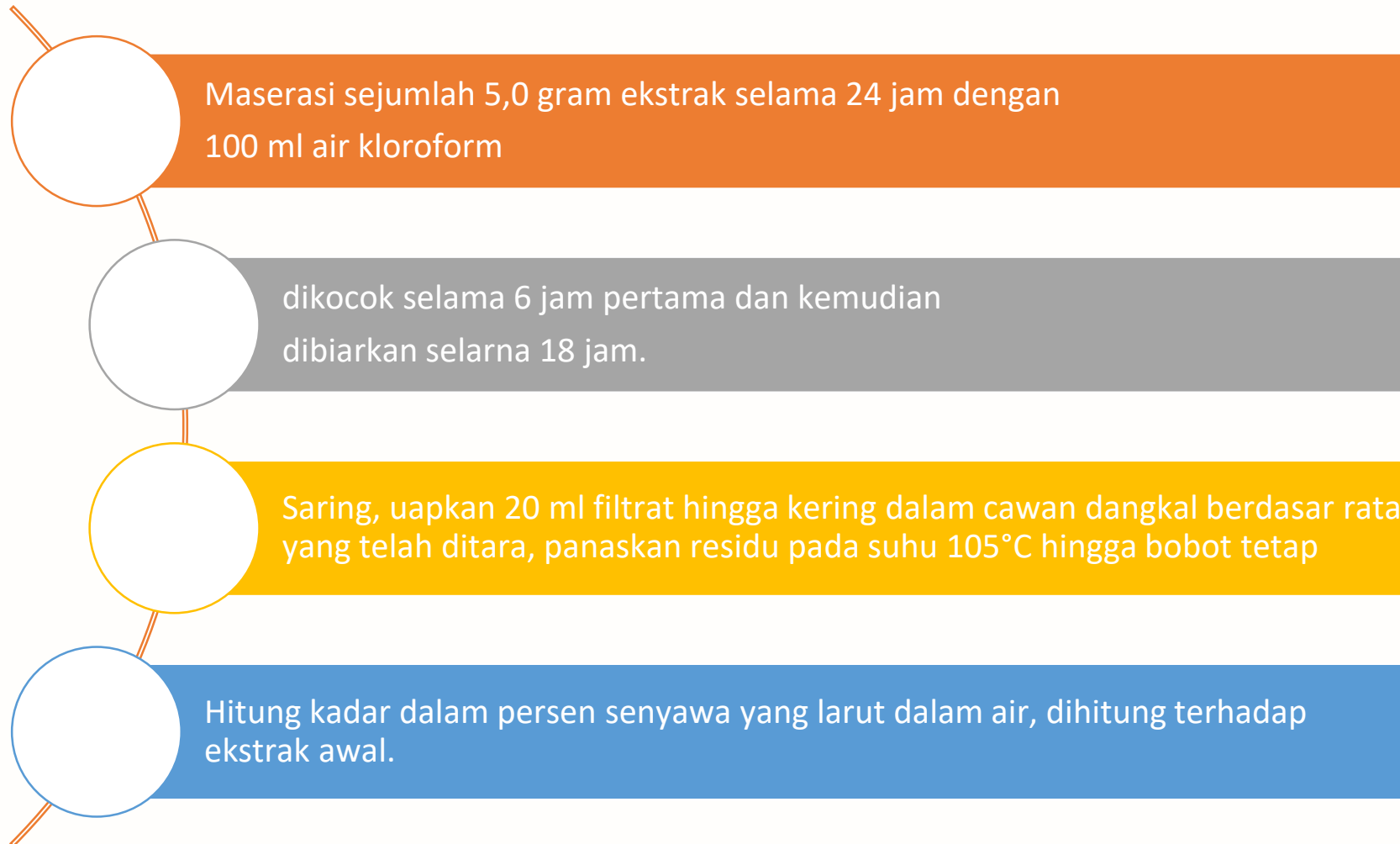


Parameter Spesifik - Senyawa terlarut dalam pelarut

- Melarutkan ekstrak atau simplisia dengan pelarut(alkohol/air) untuk ditentukan jumlah larutan yang identik dengan jumlah senyawa kandungan secara gravimetrik. Dalam hal tertentu dapat diukur senyawa terlarut dalam pelarut lain misalnya heksana, diklorometan, metanol. °
- **Tujuannya** untuk memberikan gambaran awal jumlah senyawa kandungan



Parameter Spesifik - Senyawa terlarut dalam pelarut Kadar senyawa yang larut dalam air.





Parameter Spesifik - Senyawa terlarut dalam pelarut Kadar senyawa yang larut dalam etanol..

Maserasi sejumlah 5,0 gram ekstrak selama 24 jam dengan 100 ml etanol (95%)

dikocok selama 6 jam pertama dan kemudian dibiarkan selama 18 jam

Saring cepat dengan menghindari penguapan etanol, kemudian uapkan 20 ml filtrat hingga kering dalam cawan dangkal berdasar rata yang telah ditara, panaskan residu pada suhu 105°C hingga bobot tetap.

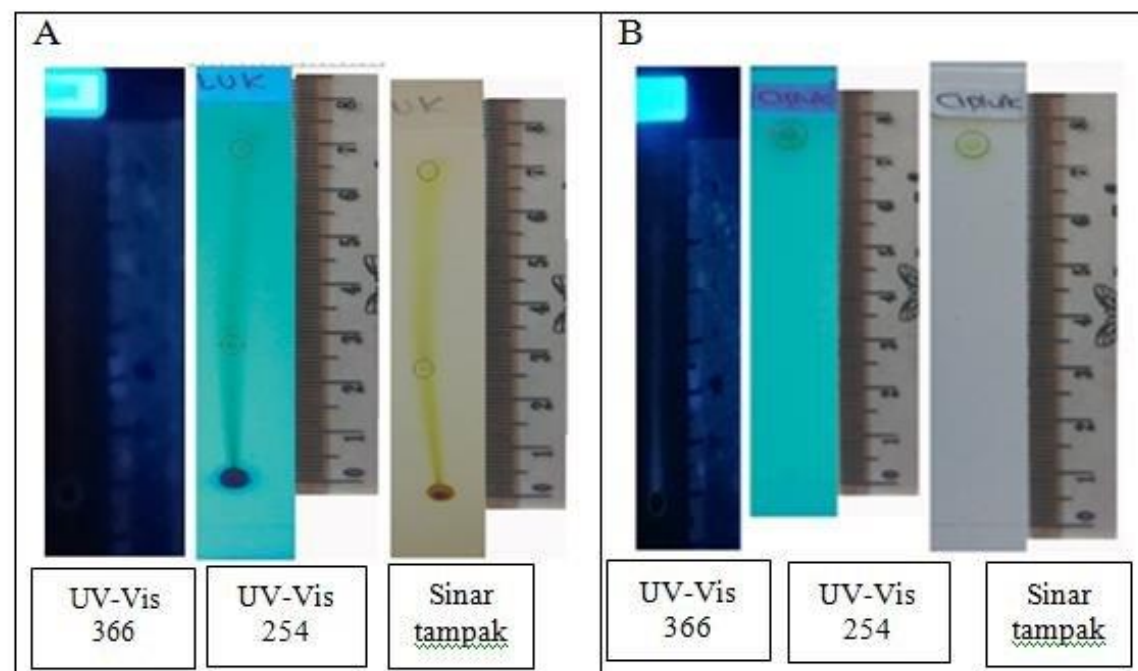
Hitung kadar dalam persen senyawa yang larut dalam etanol (95%), dihitung terhadap ekstrak awal.

Parameter Uji Kandungan Kimia



Parameter Uji Kandungan Kimia

- Uji kandungan simplisia: profil kromatogram (bertujuan untuk memberikan gambaran awal profil kromatografi suatu senyawa (komposisi kandungan kimia) dengan dibandingkan dengan senyawa baku atau standar





Kadar total golongan kimia

- Kadar Total Flavonoid
- Kadar Total Kalkon
- Kadar Total terpenoid
- Dsb



Kadar kandungan kimia tertentu

Penetapan Kadar Aflatoksin B1, B2, G1, dan G2 pada Olahan Kacang Tanah dengan Metode HPLC

Andalusia Trisna Salsabila [✉], Rike Maya Wardhani, Ary Chodijayanti, Puryani, Damat, Rista Anggriani

Jurusan Teknologi Pangan, Fakultas Pertanian Perternakan, Universitas Muhammadiyah Malang, Indonesia



**STIKES
NOTOKUSUMO
YOGYAKARTA**

PURIFIKASI DAN STANDARISASI BAHAN ALAM

PERTEMUAN 4 PURIFIKASI DAN STANDARISASI SENYAWA FENOLIK PADA BAHAN ALAM

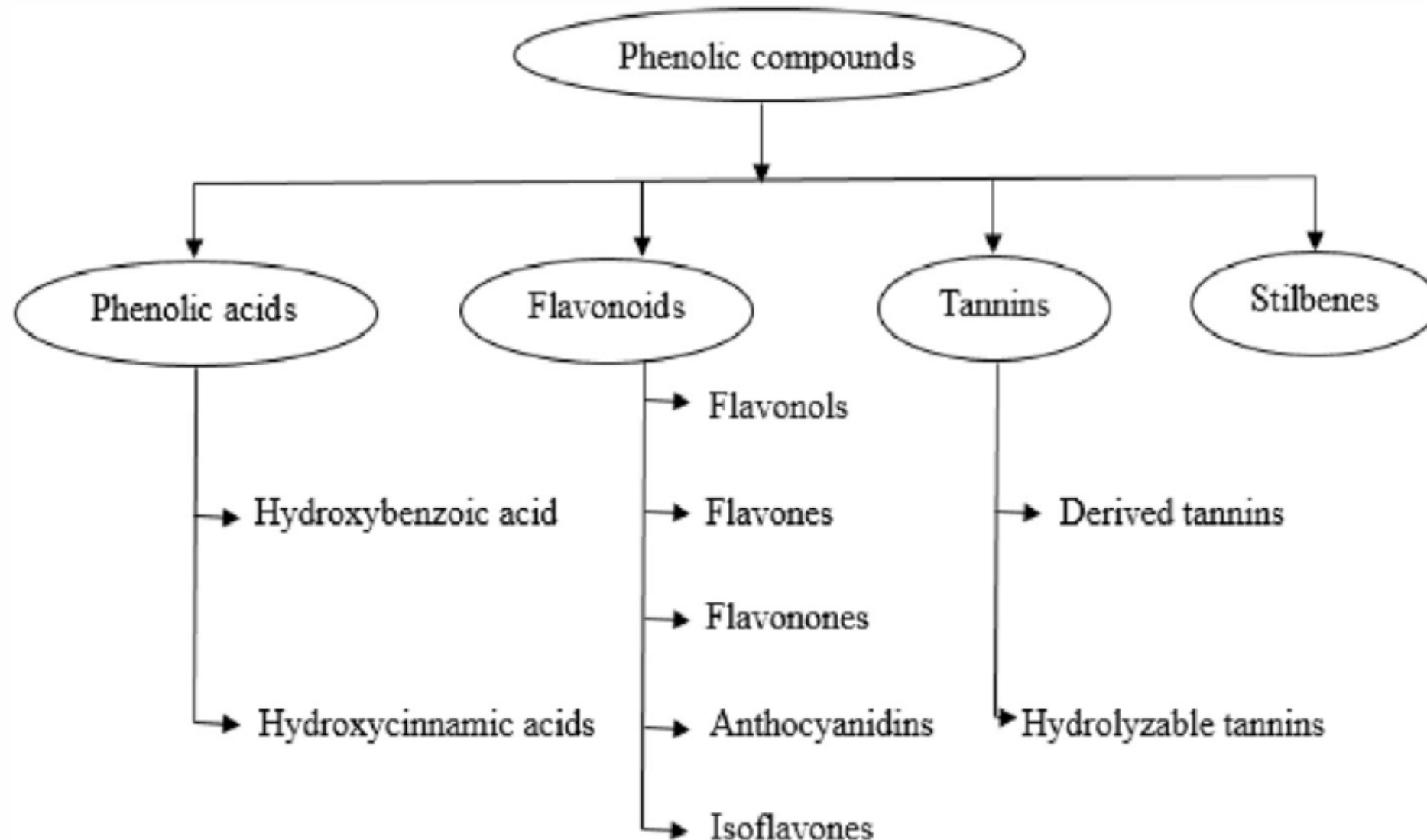
apt. Bayu Bakti Angga Santoso, M.Pharm.Sci.

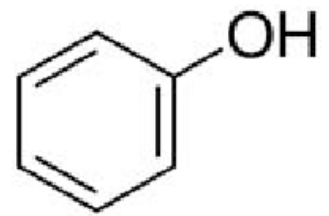


Senyawa Fenolik

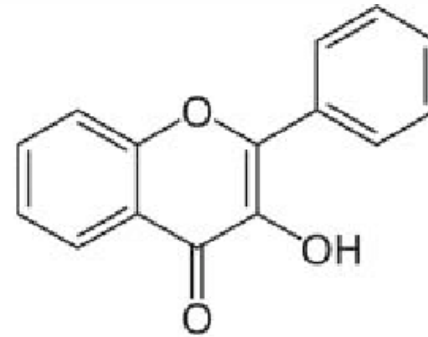
- Senyawa fenolik merupakan kelompok senyawa terbesar yang berperan sebagai antioksidan pada tumbuhan. Senyawa fenolik merupakan senyawa metabolit sekunder yang terdapat dalam tumbuhan dengan karakteristik memiliki **cincin aromatik** yang mengandung satu atau **dua gugus hidroksi (OH)**.
- Senyawa fenolik alami umumnya berupa polifenol yang membentuk senyawa eter, ester, atau glikosida, antara lain flavonoid, tanin, tokoferol, kumarin, lignin, turunan asam sinamat

Pengelompokkan Senyawa Fenolik

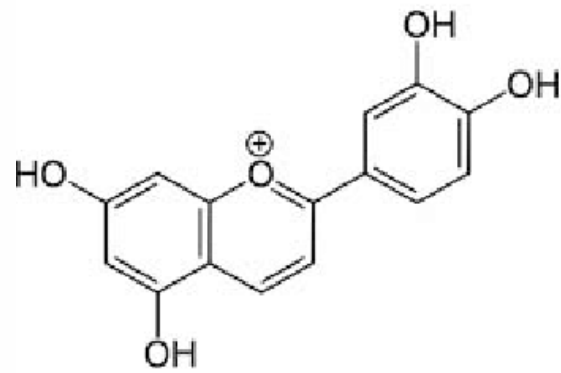




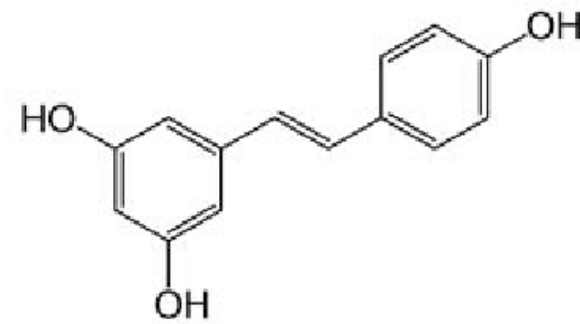
Phenol



Flavonoids

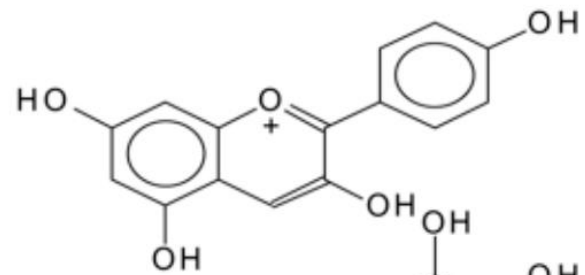


Anthocyanins

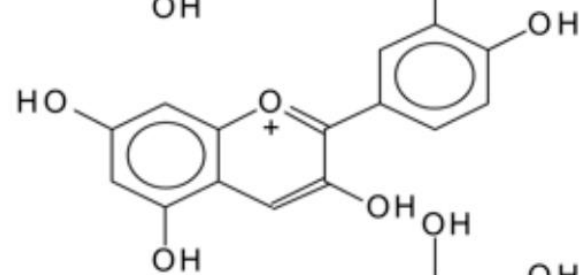


Stilbenes

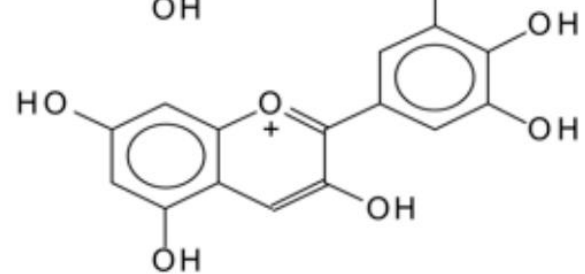
Beberapa jenis senyawa antosianin dalam buah-buahan



Pelargonidin



Cyanidin



Delphinidin

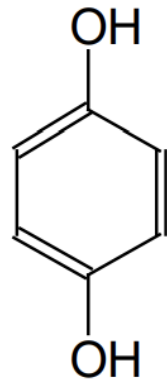




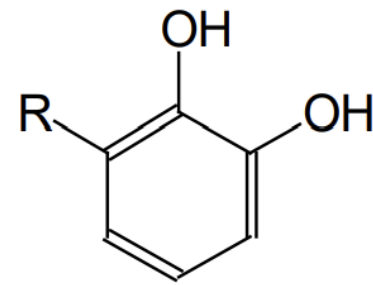
Dalam tumbuhan, kelompok senyawa fenolik memiliki beberapa fungsi:

- Pembangun dinding sel (lignin)
- Pigmen bunga (antosianin)
- Pengendali tumbuh (flavonol)
- Pertahanan (flavonoid)
- Menghambat dan memacu perkecambahan (fenol sederhana)
- Bau-bauan (vanilin, metil salisilat)

Fenol sederhana dan asam fenolat

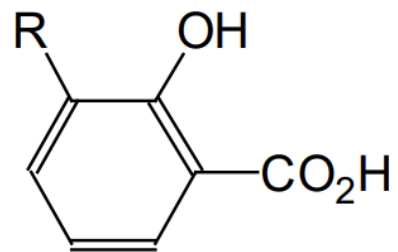


hidrokuinon



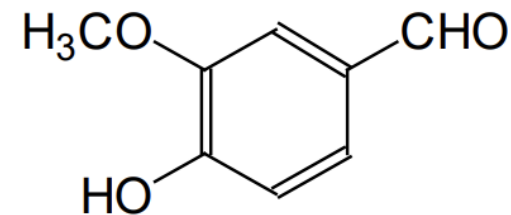
R = H, katekol

R = OH, pirogalol



R = H, asam salisilat

R = OH, asam protokatekuat

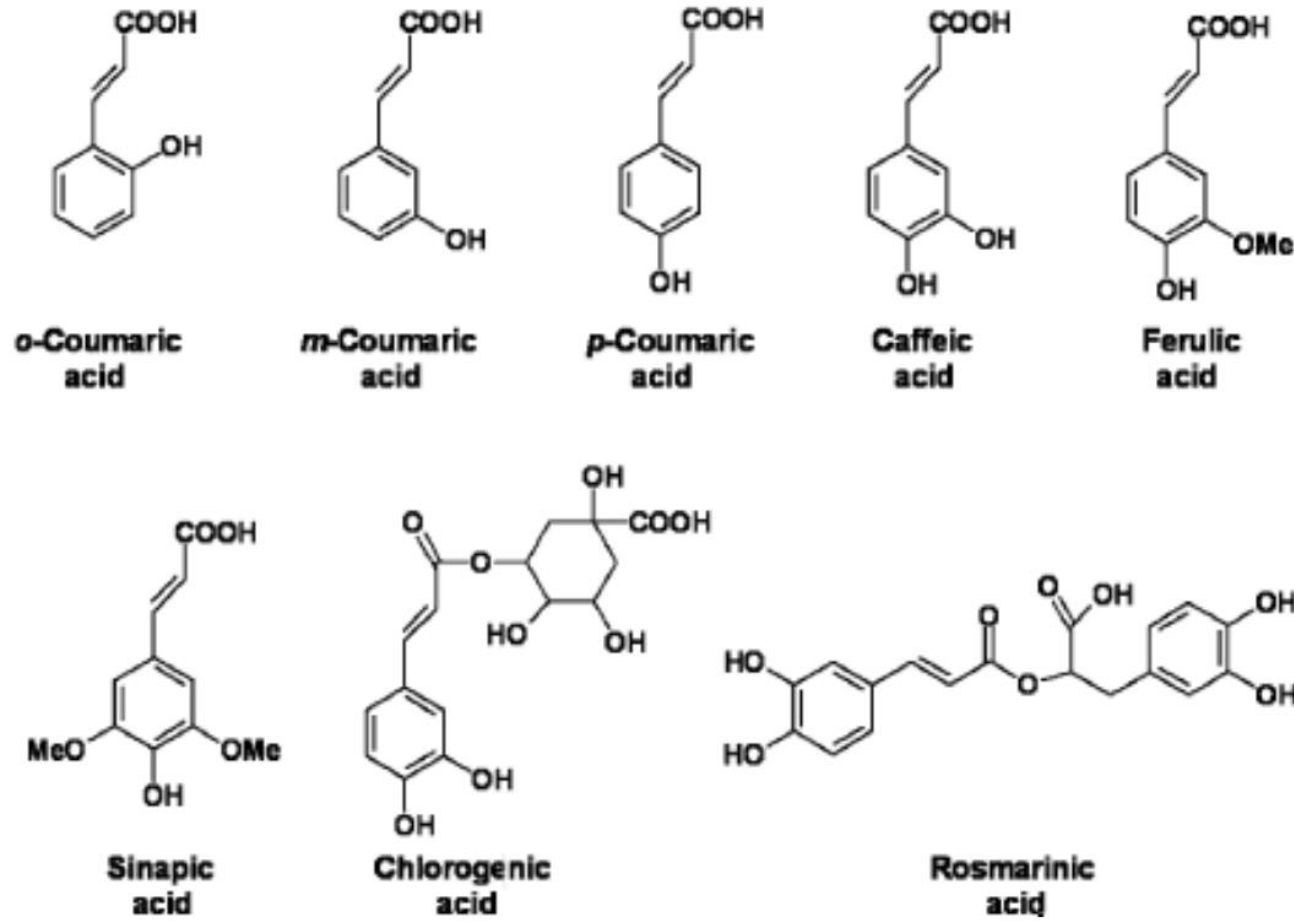
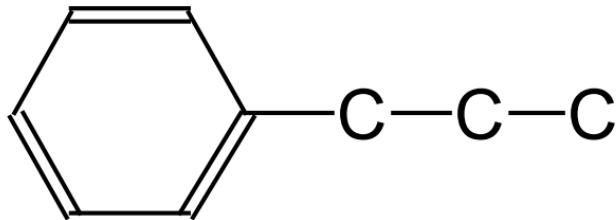


vanillin

Fenilpropanoid



Fenilpropanoid → senyawa fenolik yang memiliki kerangka dasar karbon terdiri cincin benzene (C6) yang terikat pada ujung rantai karbon propana (C3).

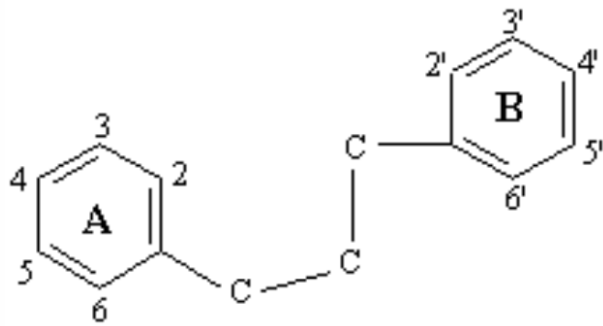


Gambar 4.2 Beberapa senyawa turunan asam hidroksisinat suatu fenil propanoid

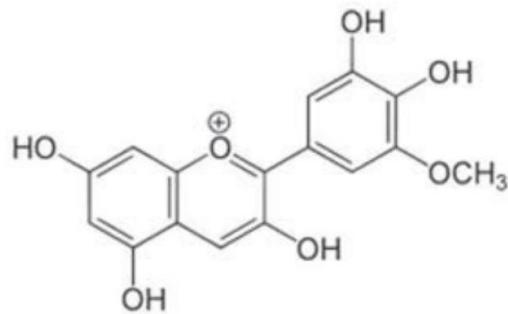
Flavonoid



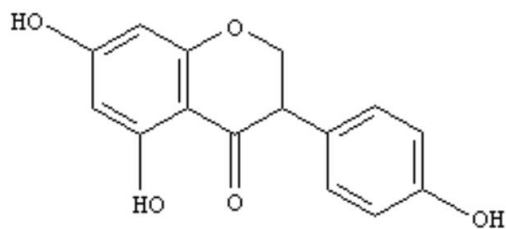
Flavonoid merupakan kelompok senyawa fenolik terbesar di alam.. Flavonoid mempunyai kerangka dasar karbon yang terdiri dari 15 atom karbon yang membentuk susunan C6-C3-C6.



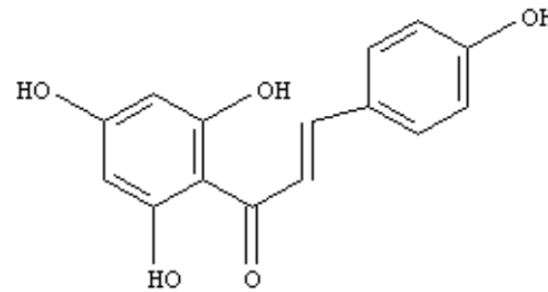
e. Antosianin



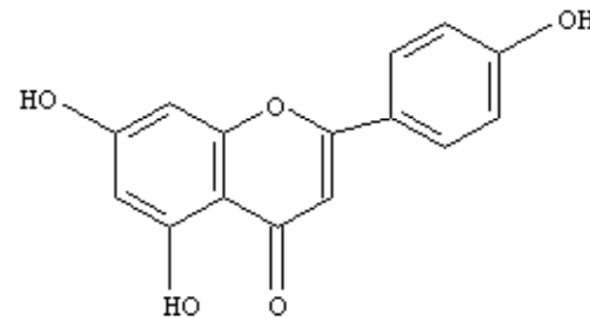
f. Isoflavon



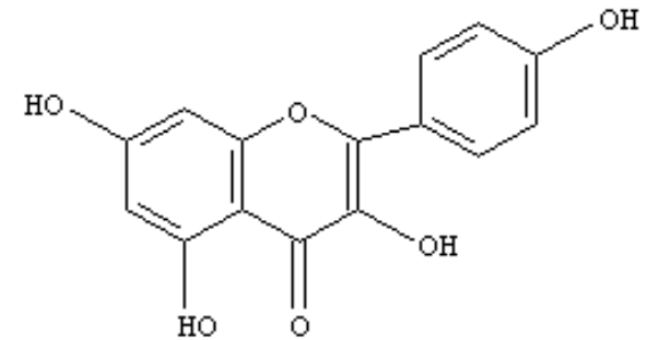
a. Kalkon



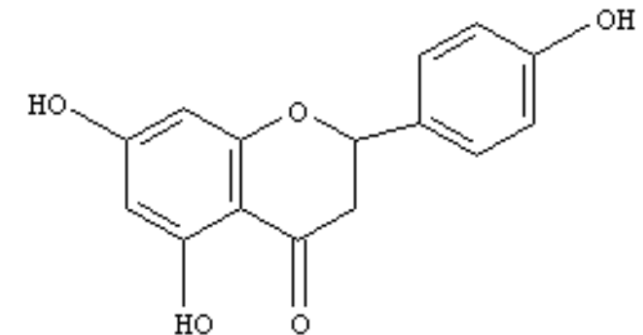
b. Flavon



c. Flavonol



d. Flavanon



Metode Ekstraksi Senyawa Fenolik



A. Fenol sederhana dan asam fenolat

- Hidrolisis dalam suasana asam dengan HCl 2M selama 30 menit (mendidih)
- Hidrolisis dalam suasana basa dengan NaOH 2M selama 4 jam dan selanjutnya diasamkan sebelum ekstraksi (suhu kamar)
- Ekstraksi dengan eter

B. FENILPROPANOID

- Diekstrak dalam suasana asam atau basa
- Isolasi dengan eter dan EtAc

C. FLAVONOID

- Dapat diekstraksi dengan etanol 70%

Metode Identifikasi Senyawa Fenolik



A. Fenol sederhana dan asam fenolat

- KLT silika gel (asam asetat- CHCl_3 dan Etil asetat-benzena); selulosa MN 300 (benzena-MeOH-asam asetat dan asam asetat-air)
- Deteksi dengan UV dengan pereaksi Folin-Ciocalteu, pereaksi Gibs, uap NH_3 , Vanilin-HCl
- GC-MS
- HPLC

B. FENILPROPANOID

Identifikasi

- Kromatografi Lapis Tipis (sesulosa)
- Kromatografi kertas
- Spektrofotometer UV-Vis

C. FLAVONOID

- Warna berubah dengan penambahan basa atau amonia
- Diidentifikasi dengan KLT (BAA-HAc 5%) spektrofotometer UV-Vis (pereaksi geser)



- Bila ditinjau dari jalur biosintesisnya, senyawa fenolik dapat dibedakan atas dua jenis senyawa utama yaitu
- Senyawa fenolik yang berasal dari jalur **asam asetat mevalonate dan jalur asam sikimat.**
- Kelompok senyawa fenolik yang berasal **dari jalur asam asetat mevalonat** adalah **senyawa poliketida**
- Kelompok senyawa fenolik yang berasal dari **jalur asam asetat** adalah **fenil propanoid.**
- Ditemukan juga senyawa fenolik yang berasal dari kombinasi dua jalur biosintesis ini yaitu senyawa flavonoid.



Sifat dan ciri dari senyawa fenolik diantaranya:

- Cenderung mudah larut dalam pelarut polar
- Bila murni, tak berwarna
- Jika kena udara akan teroksidasi menimbulkan warna gelap
- Membentuk kompleks dengan protein
- Sangat peka terhadap oksidasi enzim
- Mudah teroksidasi oleh basa kuat
- Menyerap sinar UV-Vis



Ekstraksi Senyawa Fenolik

<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC8058613/>

- Metode Konvensional
 - Maserasi, Rebusan, Perkolasi, Infus, digesti, Soxhlet, dekoktasi dll
- Metode Non Konvensional
 - Supercritical CO₂ Extraction (SC-CO₂), Microwave-assisted Extraction (MAE), Ultrasound-assisted Extraction (UAE), Enzymeassisted Extraction (EAE), Pressurized Fluid Extraction (PFE),



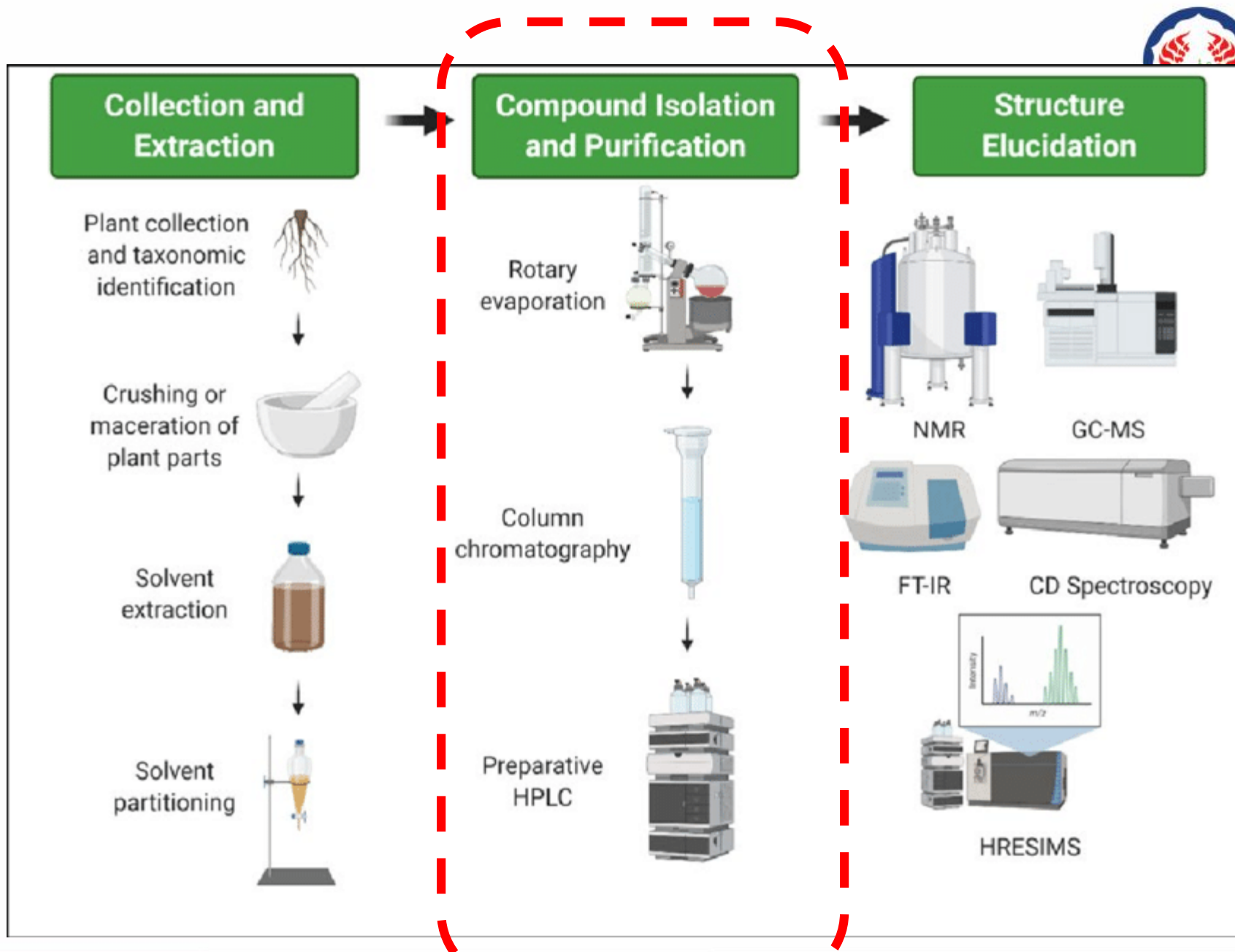
Ekstraksi Senyawa Fenolik

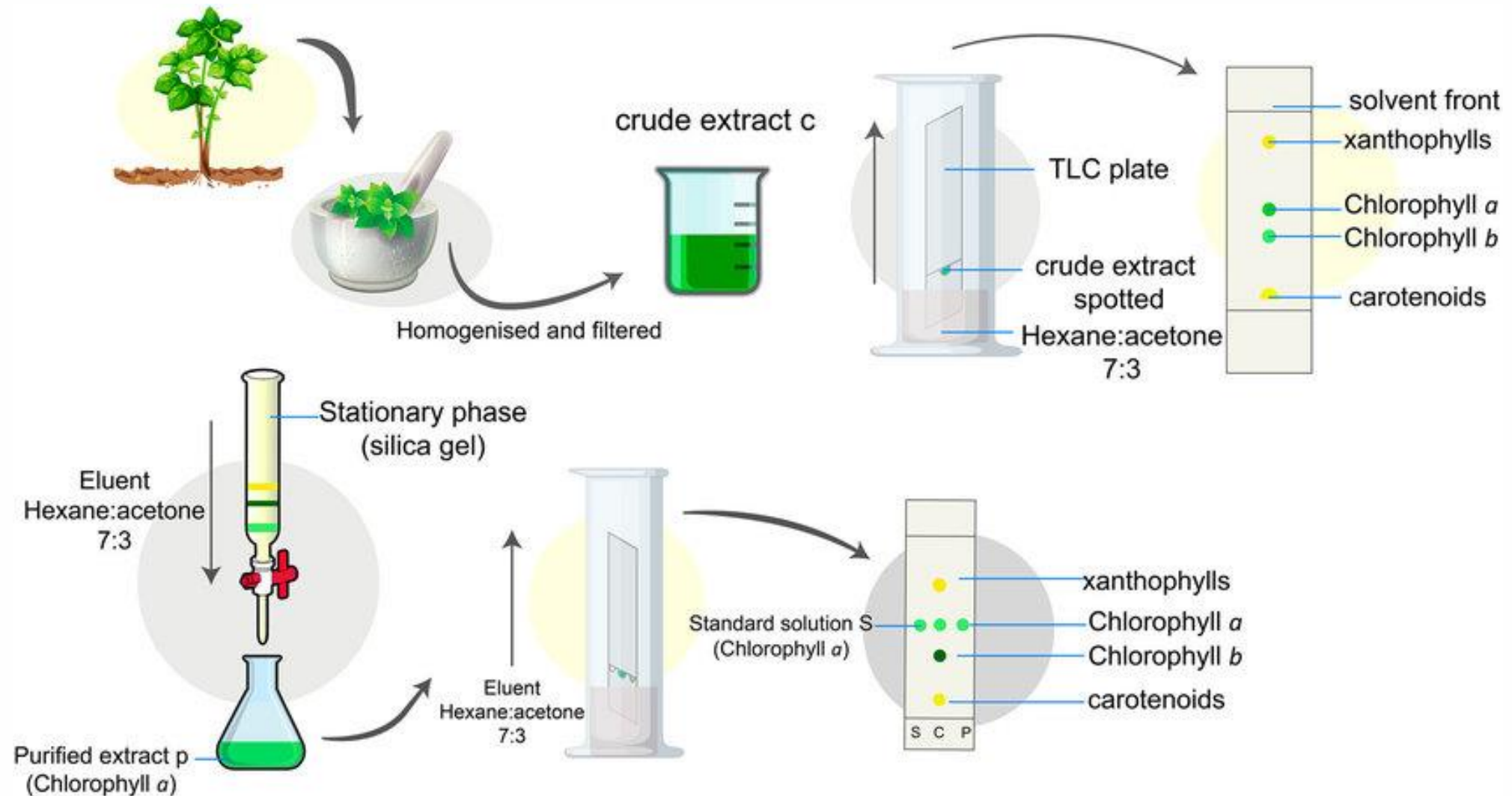
- The yield and rate of polyphenolic extraction are related to the solvent characteristics. It has been observed that **methanol** is more efficient in the extraction of lower molecular weight polyphenols while aqueous acetone is a suitable solvent for the extraction of the higher molecular weight flavanols
- <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC6273793/#:~:text=It%20has%20been%20observed%20that,39%2C40%2C41%5D>.
- organic solvent at a given feed/liquid ratio. Among the generally utilized solvents for extracting polyphenols are methanol, water, chloroform, n-hexane, ethanol, propanol, ethyl acetate, and acetone
- **acetone** has been proven efficient in **polyphenols** extraction from lychee flowers compared to methanol, water and ethanol
- **aqueous** and **organic** solvent to achieve better extraction efficiencies compared to absolute organic solvents (Metrouh-Amir et al., 2015).
- <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S2665927121000241>



Metode Purifikasi

- Kristalisasi,
- Kromatografi Kolom
- Kromatografi Cairan Kinerja Tinggi Preparatif.
- Ion-exchange,
- Affinity
- Gel Permeation
- Size Exclusion

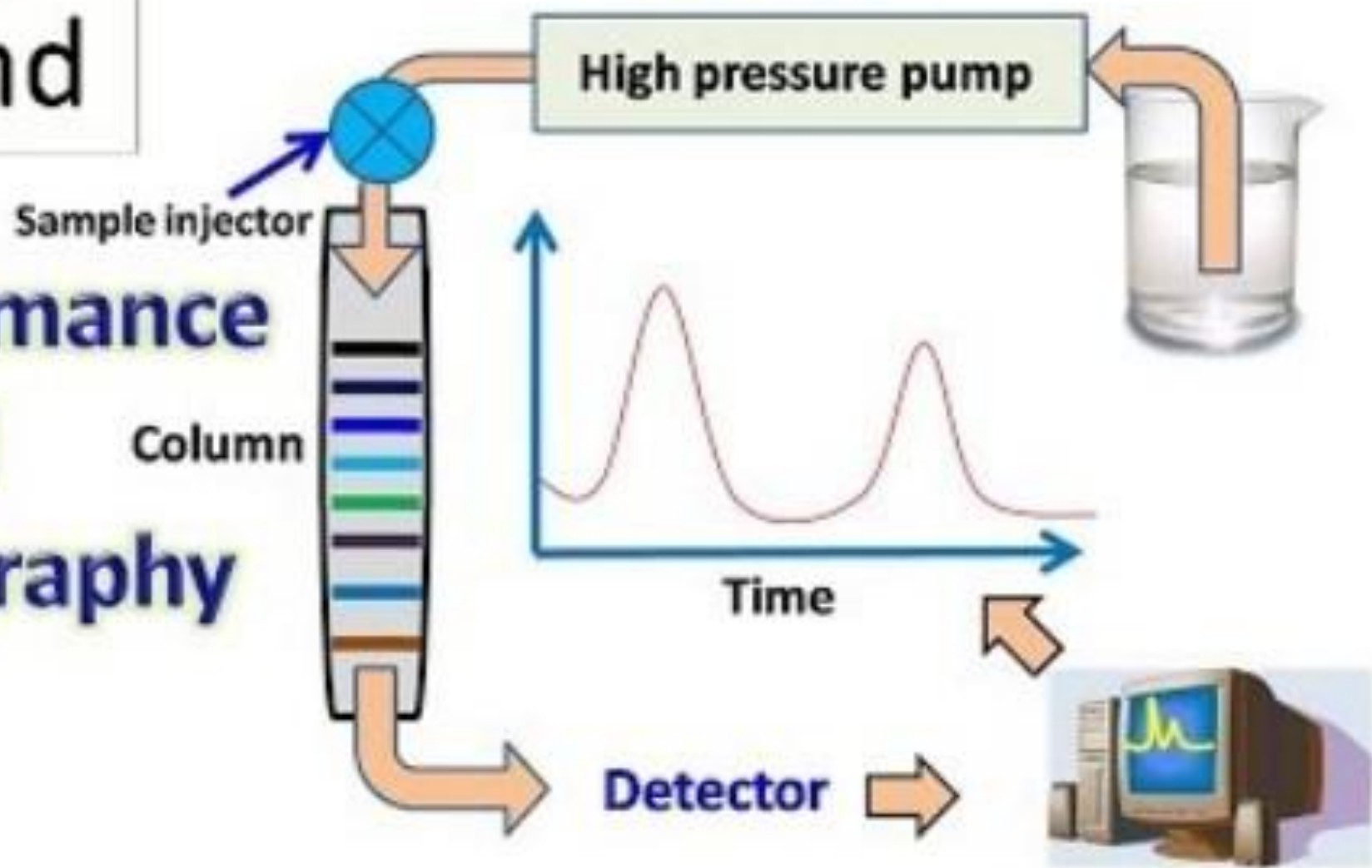




Quickly
understand

HPLC

**High performance
liquid
chromatography**



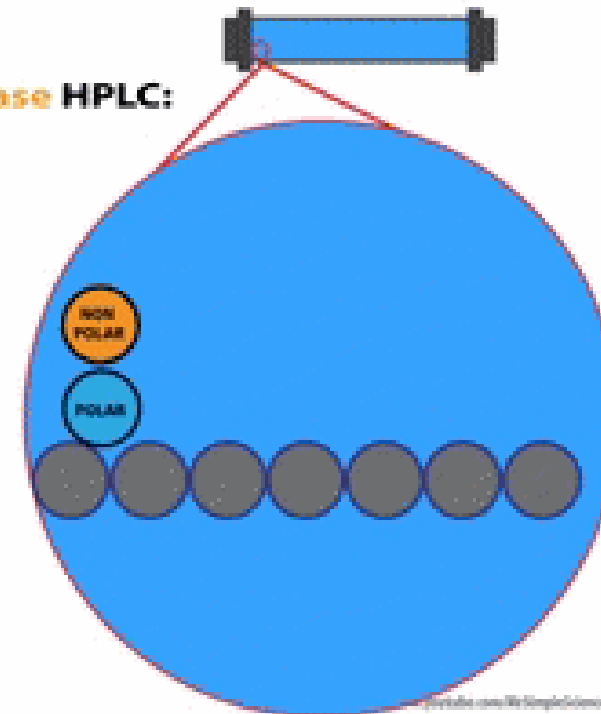
In Normal Phase HPLC:

The silica is polar

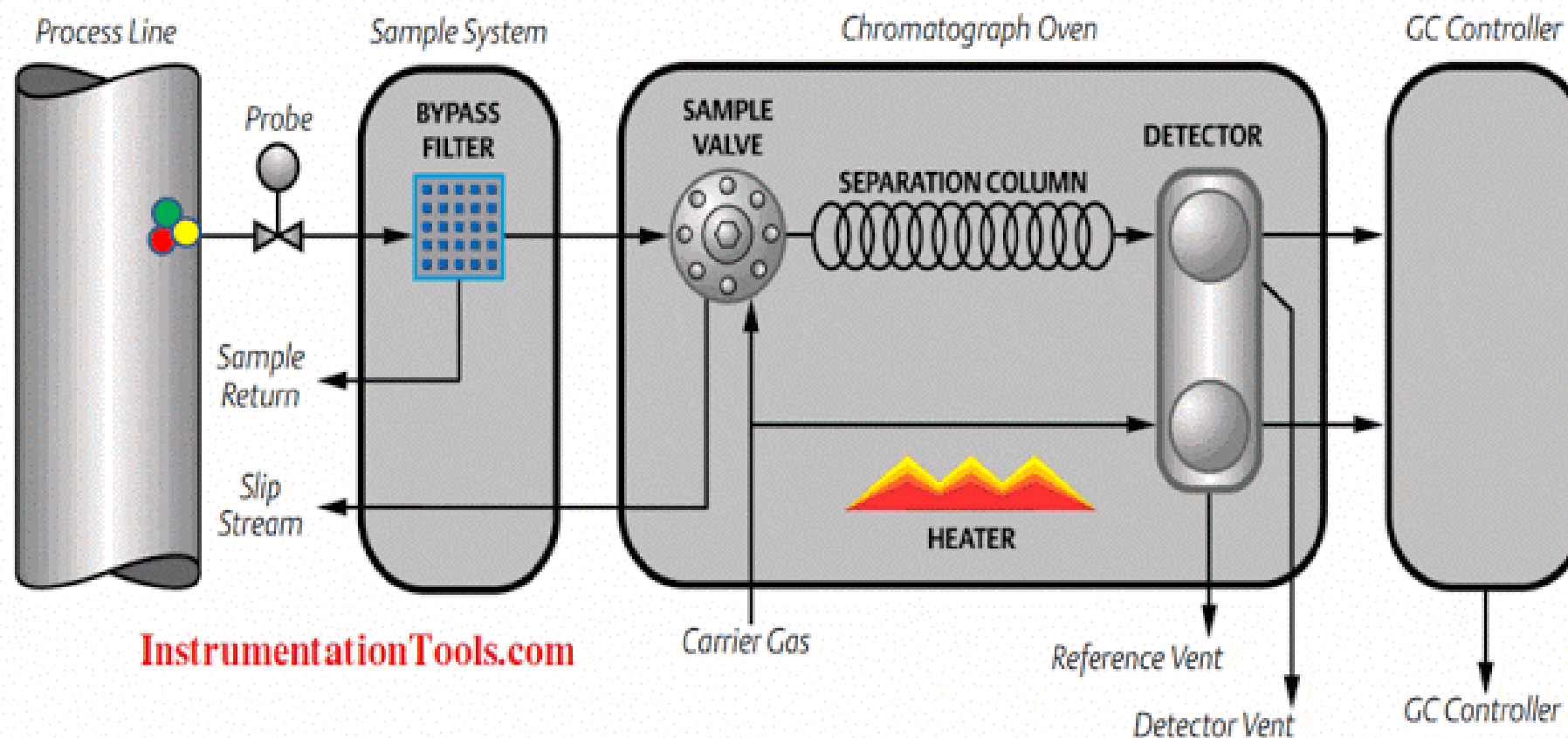
The polar molecules binds/adsorbs to it
and the non polar molecules will pass more
quickly through the stationary phase



Silica molecule
imgflip.com



Gas Chromatograph Working Principle



InstrumentationTools.com

www.InstrumentationTools.com

PROFESIONAL, TERAMPIL, CERDAS, BERETIKA



Maceration extraction conditions for determining the phenolic compounds and the antioxidant activity of *Catharanthus roseus* (L.) G. Don

Condições de extração por maceração para determinação de compostos fenólicos e atividade antioxidante de *Catharanthus roseus* (L.) G. Don

Ane Patrícia Cacique¹ , Érica Soares Barbosa¹ , Gevany Paulino de Pinho¹ , Flaviano Oliveira Silvério^{1*} 

¹Universidade Federal de Minas Gerais/UFMG, Instituto de Ciências Agrárias, Montes Claros, MG, Brasil

*Corresponding author: flavianosilverio@ufmg.br

Received in June 16, 2020 and approved in October 8, 2020

<https://www.scielo.br/j/cagro/a/KPzSvgrLFHTN5hJL4hXVKMw/?format=pdf>



Table 1: Parameters with their evaluated levels for the extraction of phenolic compounds from *C. roseus*.

Parameters	Levels
Plant mass	30, 60, 120, 250, 500 and 1000 mg
Extraction phase composition	Acetone Ethanol Methanol Water Ethanol:acetone (70:30. v/v) Ethanol:water (50:50. v/v) Methanol:water (50:50. v/v)
Homogenization	Vortex for 5 min Maceration for 24 h (without stirring) Maceration for 3 h (with stirring)
Extraction time	1, 3, 12, 24 and 48 h
Temperature	30, 40, 50 and 60 °C



Diskusi Jurnal





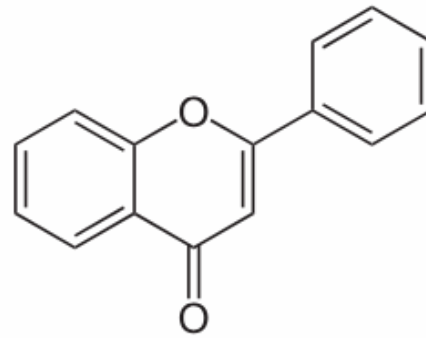
**STIKES
NOTOKUSUMO
YOGYAKARTA**

PURIFIKASI DAN STANDARISASI BAHAN ALAM

PERTEMUAN 5 PURIFIKASI DAN STANDARISASI SENYAWA FLAVONOID PADA BAHAN ALAM

apt. Bayu Bakti Angga Santoso, M.Pharm.Sci.

Flavonoid



- Flavonoid merupakan senyawa metabolit sekunder yang terdapat pada tumbuhan, tidak terdapat pada alga, mikroorganisme, bakteri, lumut, jamur. Senyawa flavanoid termasuk kelompok senyawa fenol terbesar yang di-temukan di alam.
- Sekitar 5-10% metabolit sekunder tumbuhan adalah flavonoid, dengan struktur kimia dan peran biologis yang sangat beragam Senyawa ini dibentuk dari jalur shikimat dan fenilpropanoid, dengan beberapa alternatif biosintesis.
- Flavonoid sebenarnya terdapat pada semua bagian tumbuhan termasuk daun, akar, kayu, kulit, tepung sari, nectar, bunga, buah buni dan biji. Kira-kira 2% dari seluruh karbon yang difotosintesis oleh tumbuhan-tumbuhan diubah menjadi flavonoid.



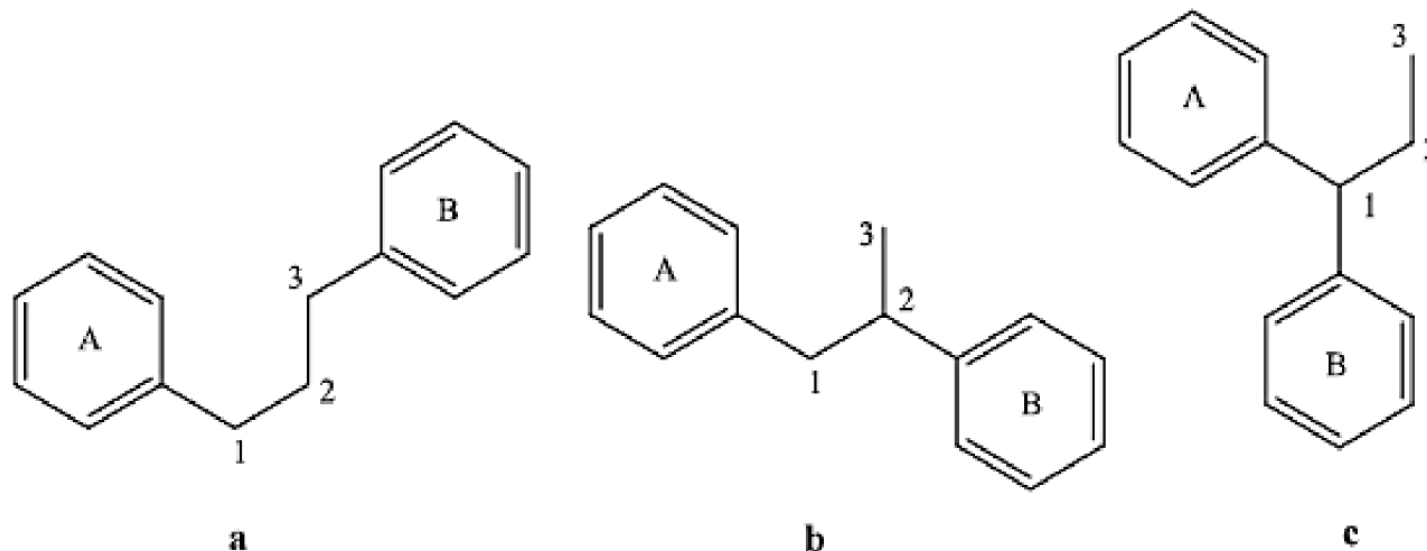
- Senyawa flavonoid terdiri dari 15 atom karbon atau lebih yang sebagian besar bisa ditemukan dalam kandungan tumbuhan.
- Flavonoid juga dikenal sebagai vitamin P dan citrin dan merupakan pigmen yang diproduksi oleh sejumlah tanaman sebagai pewarna yang dihasilkan pada bunga.
- Senyawa flavonoid merupakan zat warna alam (merah, ungu, dan biru, serta sebagai zat warna kuning yang ditemukan dalam tumbuh-tumbuhan).
- Sebagian besar senyawa flavonoid ditemukan dalam bentuk glikosida dan juga sebagai aglikon flavonoid yang lazim ditemukan pada tumbuhan tingkat tinggi (Angiospermae) adalah flavon dan flavonol dengan C- dan O-glikosida, isoflavon C- dan O-glikosida, flavanon C- dan O-glikosida, khalkon dengan C- dan O-glikosida dan dihidro-khalkon, proantosianidin dan antosianin, auron O-glikosida dan dihidroflavonol O-glikosida.
- Golongan flavon, flavonol, flavanon, isoflavon, dan khalkon juga sering ditemukan dalam bentuk aglikonnya (bukan gula).



Kerangka Dasar Flavonoid

- Flavonoid merupakan turunan fenol yang memiliki struktur dasar fenilbenzopiron (tokoferol), dicirikan oleh kerangka 15 karbon dimana dua cincin benzena (C6) terikat pada suatu rantai propan (C3) sehingga membentuk suatu susunan C6-C3-C6 yang terdiri dari satu cincin teroksigenasi dan dua cincin aromatis.
- Susunan ini dapat menghasilkan tiga jenis struktur, yakni 1,3-diarilpropan atau flavonoid, 1,2-diarilpropan atau isoflavonoid, dan 1,1-diarilpropan atau neoflavonoid. Ketiga struktur tersebut dapat dilihat pada gambar slide selanjutnya berikut ini:

- Kerangka dasar karbon flavonoid (a) Flavonoid, (b) Isoflavonoid, (c) Neoflavonoid (Miller 1996)



Contoh Flavonoid



Bagian tanaman	Famili	Nama tanaman	Nama senyawa
Bunga	Asteraceae	<i>Matricaria chamomila</i> L. (kamomile)	Apigenin 7-glukosida, Luteolin-7-O-glukosida, Patuletin-7-O-glukosida, kuersimetrin.
	Myrtaceae	<i>Caryophyllus aromaticus</i> L. (cengkeh)	Kuersetin, kaemferol, mirisetin, isokuersetin
	Malvaceae	<i>Hibiscus sabdariffa</i> L. (rosela)	Gosipetin, hibisetin, sabdaretin
Buah	Rubiaceae	<i>Morinda citrifolia</i> L. (mengkudu/pace)	Rutin, kuersetin
	Papilionaceae	<i>Phaseolus vulgaris</i> L. (buncis)	Kuersetin, kaemferol, mirisetin
Kulit buah	Rutaceae	<i>Citrus</i> sp. (jeruk)	Rutin, naringenin, naringin, hesperidin
	Lythraceae	<i>Punica granatum</i> L. (delima)	Kuersetin, rutin
Biji	Fabaceae	<i>Parkia roxburghii</i>	Luteolin
Daun	Anacardiaceae	<i>Anacardium occidentale</i> (daun jambu mete)	Kaemferol, kuersetin
	Asteraceae	<i>Blumeae balsamifera</i> (daun sembung)	Kuersetin
	Myrtaceae	<i>Syzigium polyanthum</i> (daun salam)	Flouretin, kuersitrin
Rhizoma	Zingiberaceae	<i>Languas galanga</i>	Galangin, kaemferol, kuersetin
Umbi lapis	Amaryllidaceae	<i>Allium sschoenoprasum</i> (KUCAI)	Kaemferol, kuersetin, isoramnetin
Akar	Fabaceae	<i>Glycyrrhiza glabra</i> L. (akar manis)	Likuiritin, isolikuiritin,

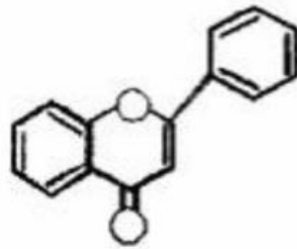


Contoh Flavonoid

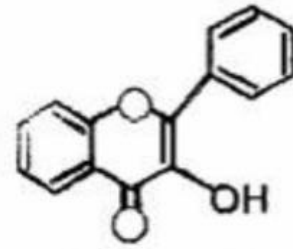
1. **Katekin** atau disebut juga flavanol merupakan senyawa yang mempunyai banyak kesamaan dengan proantosianidin. Katekin mempunyai aktivitas antioksidan yang tinggi.
2. **Proantosianidin**, menurut definisi adalah senyawa yang membentuk antosianidin (jika dipanaskan dengan asam). Jika proantosianidin diperlakukan dengan asam dingin akan menghasilkan polimer yang menyerupai tanin.
3. **Antosianidin** merupakan flavonoid utama karena termasuk jenis flavonoid yang banyak dijumpai di alam, terutama dalam bentuk glikosidanya, yang dinamakan antisianin. Antosianin adalah pigmen daun dan bunga dari yang berwarna merah hingga biru (pH asam merah, pH netral ungu, pH basa hijau/biru. Pada $\text{pH} < 2$, antosianin berada dalam bentuk kation (ion flavilium), tetapi pada pH yang sedikit asam, bentuk kuinonoid yang terbentuk. Bentuk ini dioksidasi dengan cepat oleh udara dan rusak, oleh karena itu pengerjaan terhadap antosianin aman dilakukan dalam larutan yang asam.



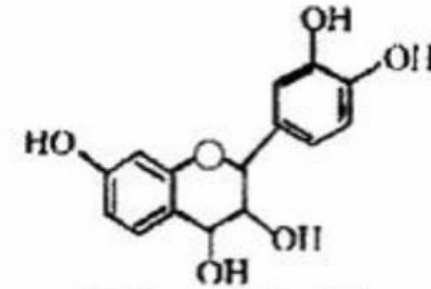
4. **Flavanon** (dihydroflavon) dan flavanol (dihydroflavonol) tersebar di alam dalam jumlah yang terbatas. Keduanya merupakan senyawa yang berwarna atau sedikit kuning.
5. **Flavon** dan **flavonol** merupakan flavonoid utama karena termasuk jenis flavonoid yang banyak dijumpai di alam.
6. **Kalkon** dan **dihidroalkon** tersebar di alam dalam jumlah yang terbatas.
7. **Auron**, tersebar di alam dalam jumlah yang terbatas. Auron memiliki kerangka benzalkumaranon. Auron mempunyai pigmen kuning emas yang terdapat dalam bunga tertentu dan bryophita. Banyak dijumpai dalam bentuk glikosida atau eter metil.
8. Senyawa-senyawa **isoflavonoid** dan **neoflavonoid** hanya ditemukan dalam beberapa jenis tumbuhan. Isoflavonoid penting sebagai fitoaleksin. Yang termasuk isoflavonoid adalah isoflavon, rotenoid, pterokarpan dan kumestan sedangkan neoflavonoid meliputi 4-arilkumarin dan dalbergion.



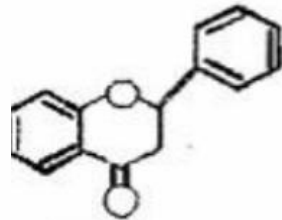
1. Flavone



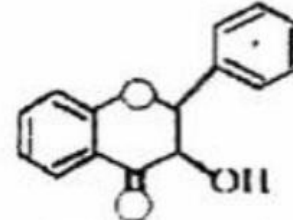
2. Flavonol



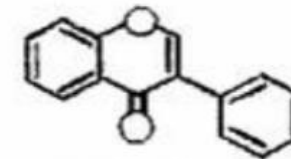
3. Flavan-3,4-diol



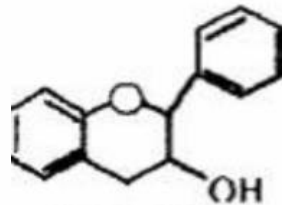
4. Flavanon



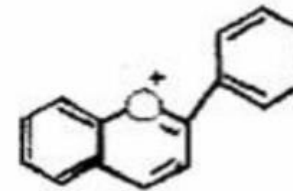
5. Flavanonol



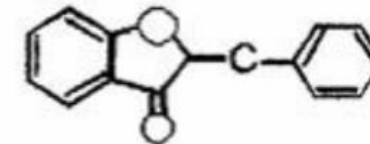
6. Isoflavon



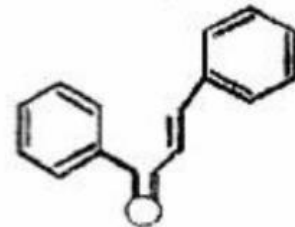
7. Katekin



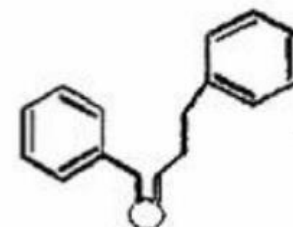
8. Antosianin



9. Auron



10. Khalkon



11. Dihidrokhalkon



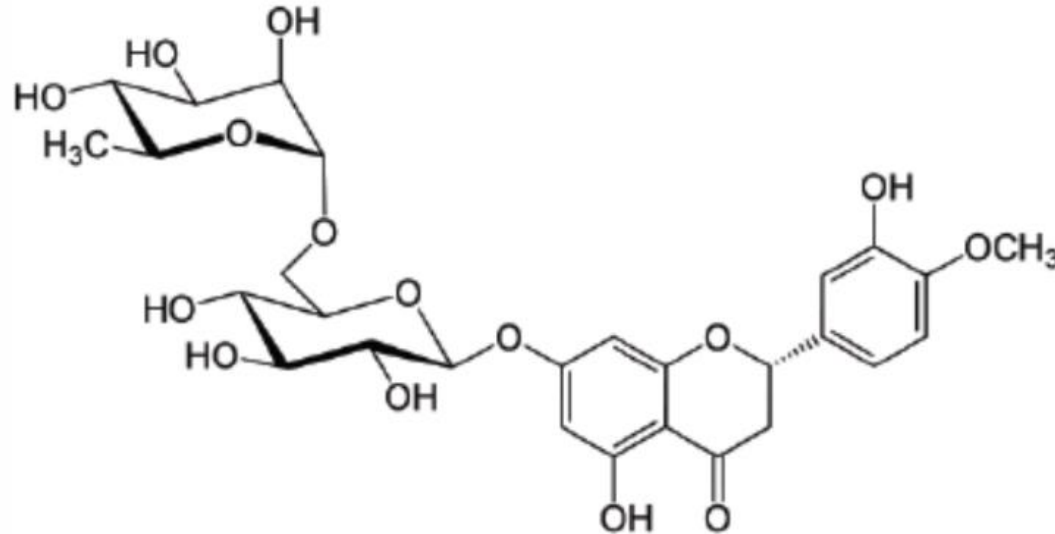
Glikosida Flavonoid

- Glikosida flavonol dan aglikon biasanya dinamakan flavonoid. Glikosida ini merupakan senyawa yang sangat luas penyebarannya. Di alam dikenal adanya sejumlah besar flavonoid yang berbeda-beda dan merupakan pigmen kuning yang tersebar luas di seluruh tanaman tingkat tinggi.
- Rutin, kuersetin ataupun sitrus bioflavonoid (termasuk hesperidin, hesperetin, diosmin dan maringenin) merupakan kandungan flavonoid yang paling dikenal. Rutin dan hesperidin dinamakan vitamin P atau factor permeabilitas. Rutin dan hesperidin pernah digunakan dalam pengobatan berbagai kondisi yang ditandai oleh pendarahan kapiler dan peningkatan kerapuhan kapiler. Bukti kemanjuran terapeutik dari rutin, sitrus, bioflavonoid dan senyawa sekerabata terutama diarahkan kepada beberapa sediaan penunjang diet (food supplement).

Glikosida flavonoid (Flavonoid glycosides)



- Aglikon jenis glikosida ini adalah flavonoid. Contoh glikosida flavonoid diantaranya adalah: Hesperidin (aglikon: Hesperetin, glikon: Rutinose)
- Kebanyakan efek paling penting dari flavonoid adalah sebagai antioksidan. Senyawaan ini juga diketahui dapat mengurangi kerapuhan pembuluh kapiler.



Hesperidin



Ekstraksi dan Pemisahan Flavonoid

- Flavonoid dapat diekstraksi dengan etanol 70%, air.
- Fraksinasi menggunakan corong pisah, ditambahkan dua pelarut yang memiliki BJ berbeda.
- Pemisahan banyak dilakukan menggunakan kromatografi kolom. Jumlah adsorben yang dipakai tergantung pada tingkat kerumitan campuran senyawa yang akan dipisahkan yang berarti panjang dan diameter kolom yang dipakai juga bergantung pada hal tersebut.
- Untuk campuran yang rumit dipisahkan diperlukan 500 gram adsorben tiap gram sampel. Besar partikel adsorben untuk kolom biasanya memiliki rentang 100-300 mesh. Beberapa adsorben yang dapat dipakai untuk pemisahan flavonoid adalah selulosa, silika, poliamida, gel sephadex (G), gel Sephadex (LH-20).
- Pada umumnya, kolom harus dielusi dengan pelarut atau campuran pelarut yang berurutan, dimulai dengan pelarut yang paling kurang polar dan sedikit demi sedikit meningkat sampai ke yang paling polar.



Ekstraksi dan Pemisahan Flavonoid

- Jika diperlukan pemisahan flavonoid yang baik, proses elusinya harus dilakukan perlahan-lahan. Pita yang memisah dalam kolom mungkin tampak kuning atau dapat dideteksi dengan sinar UV (366 nm).
- Dalam hal ini, cara yang sederhana adalah dengan mengumpulkan setiap pita dalam tempat yang terpisah. Tetapi jika pita tidak nampak, fraksifikasi harus ditampung pada selang waktu atau jumlah volume yang teratur. Kemudian setiap fraksi dianalisis dengan KLT untuk menentukan fraksi-fraksi mana saja yang dapat digabung.
- Kromatografi lain yang berperan dalam analisis flavonoid adalah KLT umumnya sama dengan adsorben dan eluen yang digunakan pada kromatografi kolom sedangkan pereaksi penampak noda yang banyak dipakai dalam analisis flavonoid adalah $AlCl_3$, kompleks difenil asam borat etanolamin, asam sulfanilat terdiazotasi, vanilin-HCl



Uji Fitokimia

- Fitokimia merupakan ilmu pengetahuan yang menguraikan aspek kimia suatu tanaman → struktur kimia, biosintesis, perubahan serta metabolisme, penyebaran secara alamiah dan fungsi biologis, isolasi dan perbandingan komposisi senyawa kimia dari bermacam-macam jenis tanaman
- Analisis fitokimia dilakukan untuk menentukan ciri komponen bioaktif suatu ekstrak kasar yang mempunyai efek racun atau efek farmakologis lain yang bermanfaat bila diujikan dengan sistem biologi atau bioassay



Uji Fitokimia

- Kriteria metode skrining fitokimia
- Sederhana
- Cepat
- Hanya membutuhkan peralatan sederhana,
- Khas untuk satu golongan senyawa
- Memiliki batas limit deteksi yang cukup lebar



Skrining Fitokimia Golongan Senyawa Kimia Flavonoid (MMI jilid VI, 1995)

- Pembuatan larutan percobaan:
 - Ditimbang 0,5 gram bahan tumbuhan yang telah dihaluskan, ditambahkan 10 ml metanol, direfluks dengan menggunakan pendingin balik selama 10 menit. Disaring panas melalui kertas saring berlipat, diencerkan filtrat dengan 10 ml aquades.
 - Setelah dingin ditambahkan 5 ml eter minyak tanah, dikocok hati-hati kemudian didiamkan. Diambil lapisan metanol. Diuapkan pada suhu 40 C dibawah tekanan. Kemudian sisa dilarutkan dalam 5 ml etil asetat.



Skrining Fitokimia Golongan Senyawa Kimia Flavonoid (MMI jilid VI, 1995) Lanjutan...

- Diuapkan hingga kering 1 ml larutan percobaan, sisa dilarutkan dalam 2 ml etanol 96%, ditambahkan 0,5 gram serbuk seng dan 2 ml asam klorida 2 N, didiamkan selama 1 menit. Ditambahkan 10 tetes asam klorida pekat, jika dalam waktu 2 sampai 5 menit terjadi warna merah intensif menunjukkan adanya flavonoid (glikosida-3-flavonol).
- Diuapkan hingga kering 1 ml larutan percobaan, sisa dilarutkan dalam 1 ml etanol 96%, ditambahkan 0,1 gram serbuk magnesium dan 10 ml HCl pekat, jika terjadi warna merah jingga sampai merah ungu menunjukkan adanya flavonoid. Jika terjadi warna kuning jingga, menunjukkan adanya flavon dan kalkon.

ANALISIS KUALITATIF FLAVONOID

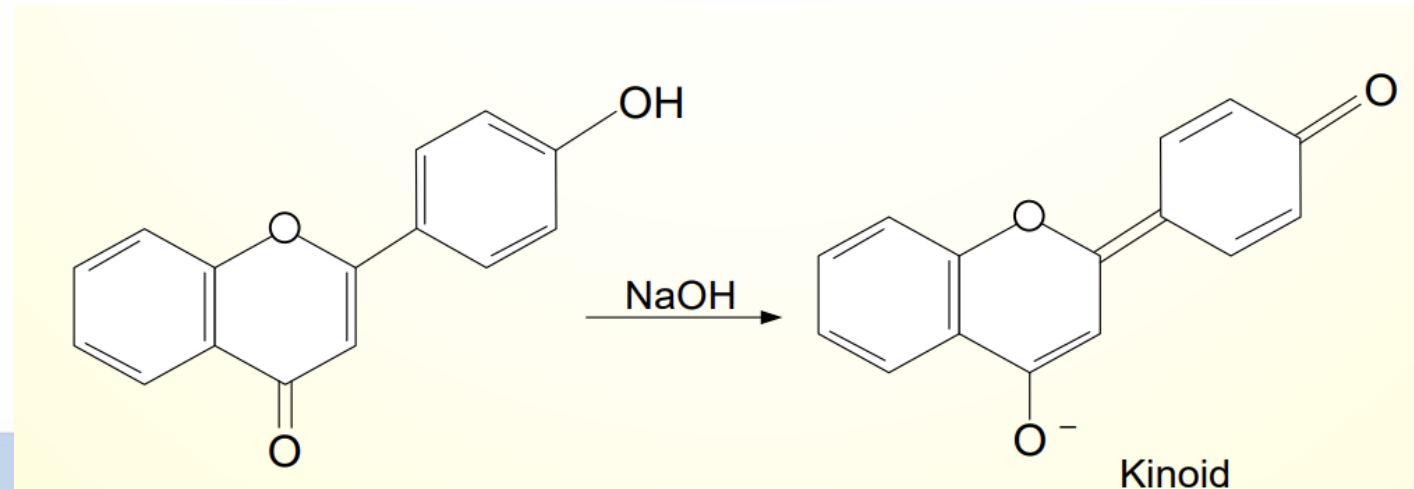


- Reaksi Pembentukan Warna
 - Reaksi karena adanya basa (NaOH)
 - Uji Shinoda seperti skrining yang tertera pada MMI jilid VI, 1995
 - Reaksi pembentukan kompleks antara flavonoid dengan FeCl_3
 - Reaksi pembentukan kompleks antara flavonoid dengan AlCl_3
 - Reaksi pembentukan kompleks antara flavonoid dengan Asam Borat
- Warna bercak KLT pada sinar UV dengan uap ammonia Spektrum: Vis, IR, NMR

Reaksi karena adanya basa



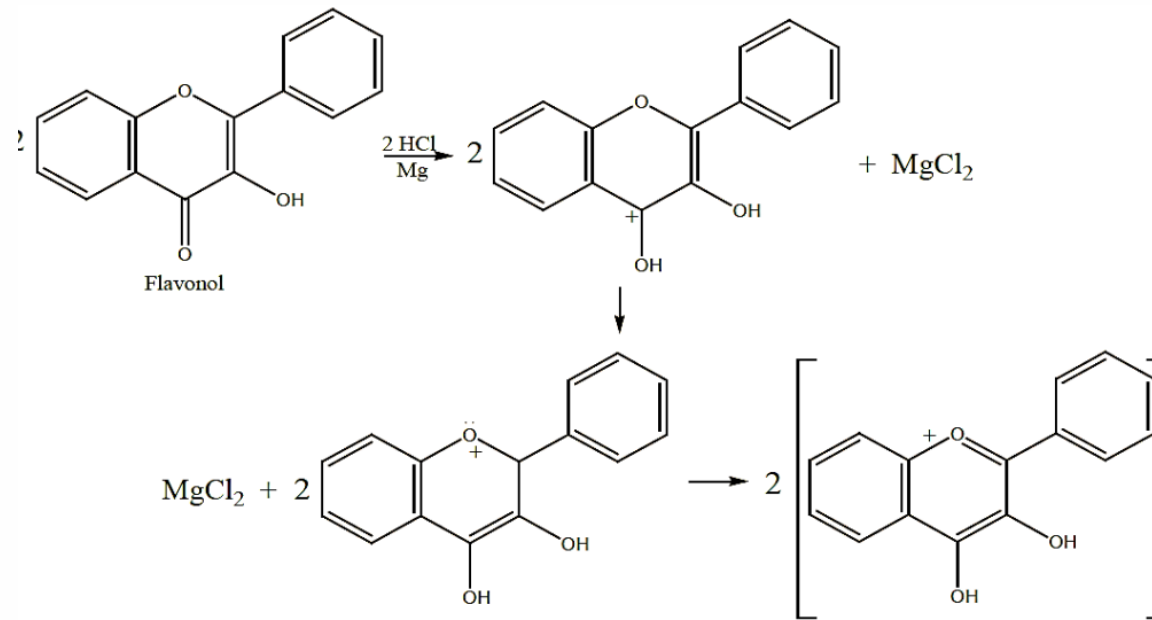
- Flavonoid merupakan senyawa fenolik, flavonoid bila direaksikan dengan basa akan berubah warnanya. Jika tidak ada pigmen lain yang mengganggu, flavonoid dalam tumbuhan dapat diuji dengan NaOH, warna kuning menunjukkan adanya senyawa flavonoid membentuk struktur kuinoid. Penambahan larutan NaOH jika terdapat flavonoid akan menyebabkan timbulnya warna kuning dalam larutan sampel yang akan hilang jika ditambahkan dengan HCl.
- Untuk masing-masing golongan, antosian memberikan warna lembayungbiru, flavon, flavanon, dan xanton berwarna kuning, flavanon menjadi merah jingga. Warna merah lembayung berubah menjadi merah mendadak dalam suasana asam, disebabkan adanya khalkon atau auron.



Uji Shinoda



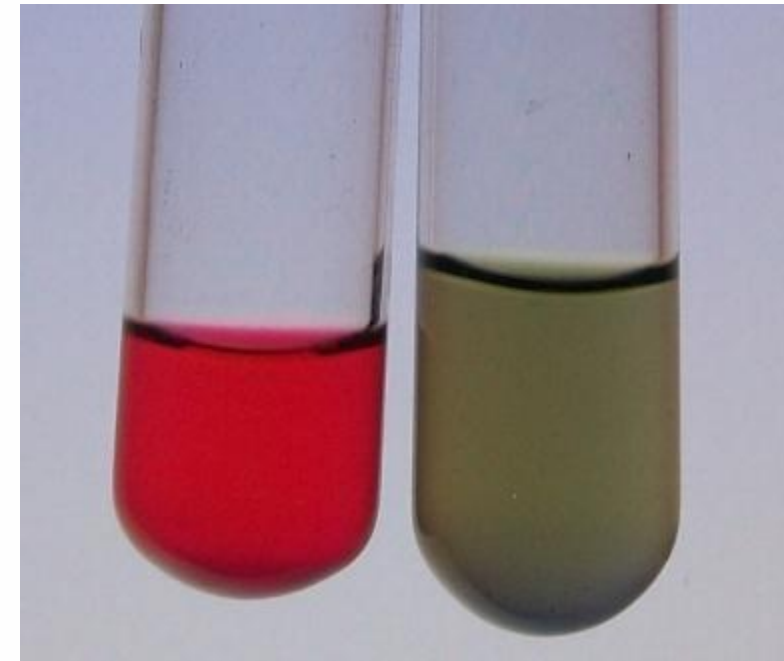
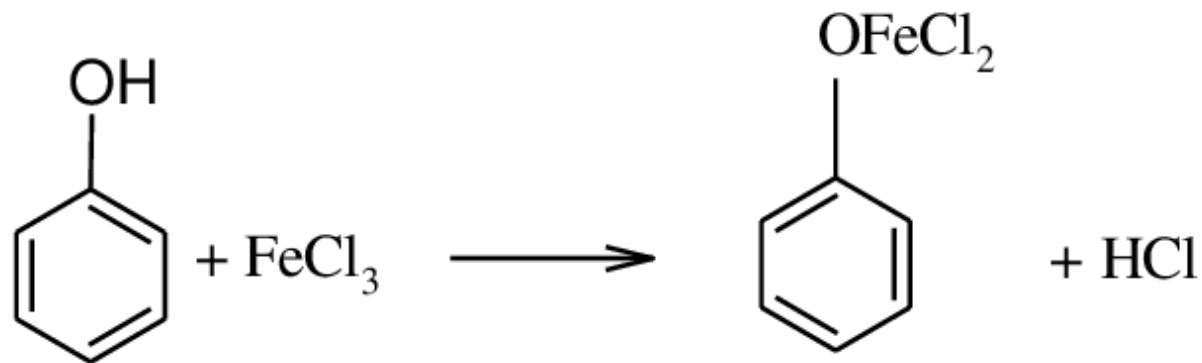
- Beberapa tetes HCl pekat dan logam/serbuk Mg diberikan ke dalam sampel, terbentuknya warna merah (dapat pula hijau, jingga, merah muda) menandakan adanya flavonoid. Magnesium dalam HCl akan mereduksi flavonoid menghasilkan warna merah untuk flavonol dan flavon, sedangkan antosian tidak memberikan perubahan warna. Dalam suasana asam, khalkon memberikan warna merah demikian pula dengan flavon, tetapi terganggu dengan adanya flavonol



Reaksi antara FeCl₃ dengan flavonoid



- Flavonoid memberikan reaksi positif membentuk warna merah sampai ungu dengan pereaksi FeCl₃ dengan membentuk senyawa kompleks biru gelap.



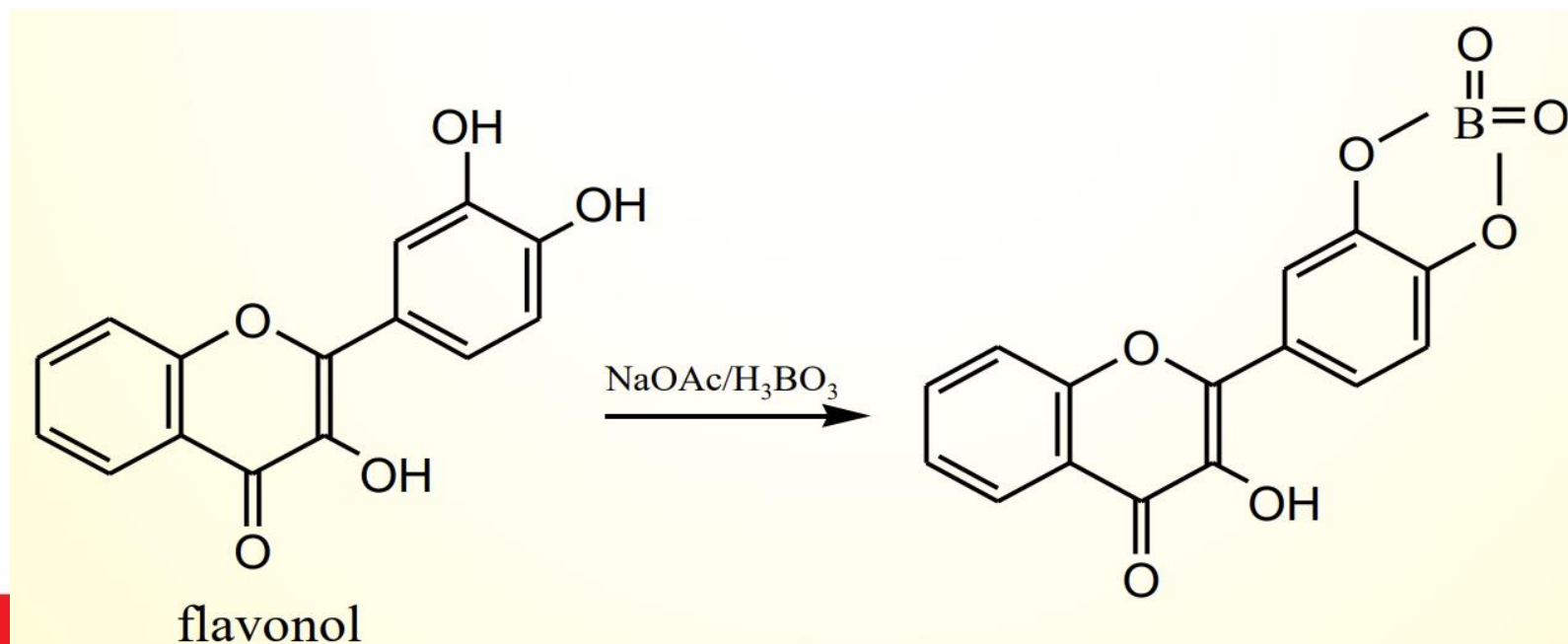
Reaksi pembentukan kompleks antara flavonoid dengan $AlCl_3$

- Aluminium klorida membentuk kompleks warna dengan flavonoid menyebabkan timbulnya **warna kuning**. Reaksi yang terjadi antara $AlCl_3$ dengan gugus hidroksi membentuk kompleks yang tidak stabil dalam suasana asam, sedangkan jika reaksi antara $AlCl_3$ dengan gugus hidroksi karbonil, maka kompleks yang terjadi stabil walaupun ditambah asam.





+ $AlCl_3$	Flavones	Flavonols	Flavanones	Chalcones	Aurones
Fluorescence in UV	Green	Yellow to Yellowish-green	Pale-brown	Brownish-pink	Pale-brown

Reaksi pembentukan kompleks berwarna antara flavonoid dengan Asam Borat

- Larutan asam borat dan natrium asetat akan membentuk senyawa kompleks dengan gugus o-dihidroksi pada senyawa flavonoid baik pada cincin A atau B dari inti flavonoid. Fluoresensi yang terbentuk adalah fluoresensi kuning kehijauan di bawah sinar UV366 nm



Warna bercak pada sinar UV dengan uap ammonia

The samples	The samples solution	The samples with ammonia	Flavonoids content
Ethanolic Extract	 Dimly yellow	 Intense yellow	Positive
Ethyl acetate fraction	 Dimly yellow	 Intense yellow	Positive

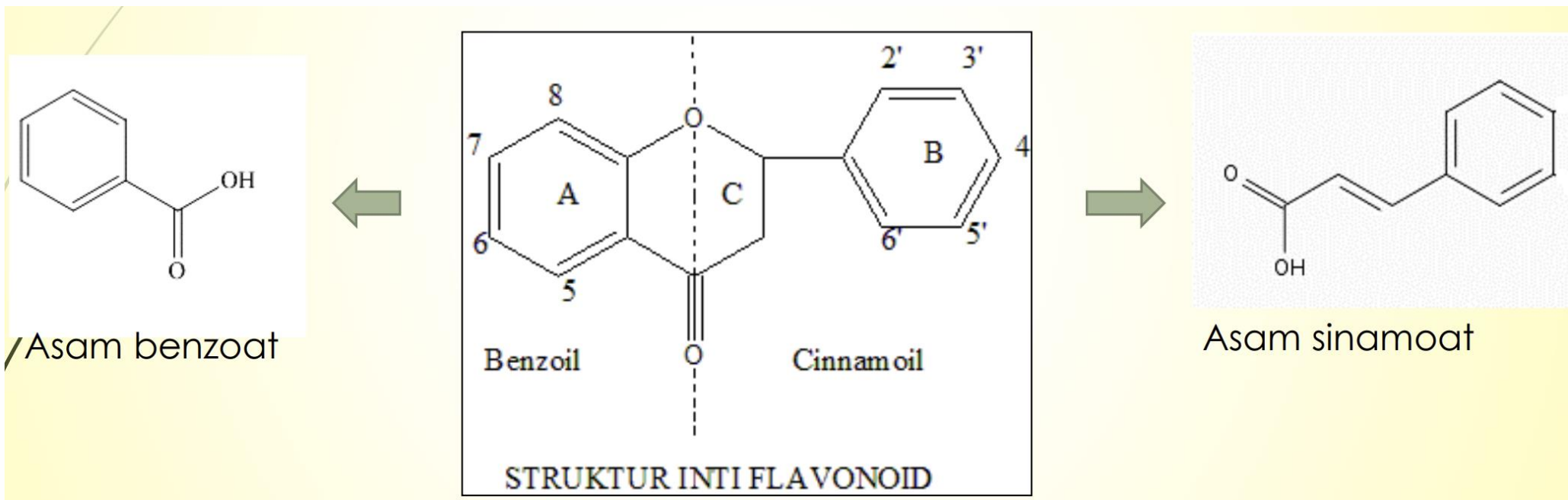


Flavonoid

a. Spektroskopi UV-VIS

- a. Spektrum flavonoid biasanya diukur dalam larutan dengan pelarut metanol atau etanol, meski perlu diingat bahwa spektrum yang dihasilkan dalam etanol kurang memuaskan.
- b. Spektrum khas flavonoid terdiri atas dua panjang gelombang maksimum yang berada pada rentang antara 240-285 nm (pita II) dan 300-550 nm (pita I)
- c. Kedudukan yang tepat dan intensitas panjang gelombang maksimum memberikan informasi yang berharga mengenai sifat flavonoid dan pola oksigasinya.

Benzoil dan Sinamoil dari Asam Benzoat dan Asam Sinamoat





**STIKES
NOTOKUSUMO
YOGYAKARTA**



**STIKES
NOTOKUSUMO
YOGYAKARTA**



PURIFIKASI DAN STANDARISASI BAHAN ALAM

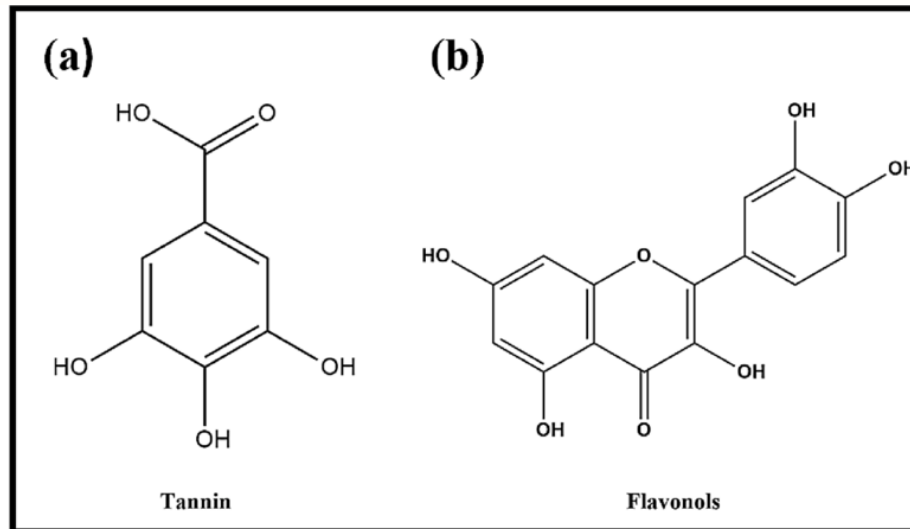
PERTEMUAN 6
PURIFIKASI DAN STANDARISASI
SENYAWA
TANIN PADA BAHAN ALAM

apt. Bayu Bakti Angga Santoso, M.Pharm.Sci.

Tanin



- Tanin (tannin, bahasa Jerman tanna, “pohon ek” atau “pohon berangan”
- pada mulanya merujuk pada penggunaan bahan tannin nabati dari pohon ek untuk menyamak belulang (kulit mentah) hewan agar menjadi masak yang awet dan lentur (penyamakan).





Tanin

- Tanin merupakan metabolit sekunder yang terdapat pada beberapa tanaman yang tergolong dalam senyawa **polifenol (fenolik)**.
- Tanin dapat bereaksi dengan senyawa organik yang mengandung asam amino & alkaloid
- Tanin yang mampu mengikat protein pada tanaman sehingga protein pada tanaman dapat resisten terhadap degradasi oleh enzim
- Tanin memiliki sifat rasa pahit & kelat
- Tanin memiliki berat molekul berkisar antara 500 sampai 3000 (ester asam galat) dan lebih besar dari 20.000 (proantosianidin.)



Karakteristik Tanin

- Berbentuk serbuk atau berlapis-lapis seperti kulit kerang
- Berwarna putih sampai coklat terang
- Berbau khas
- Mempunyai rasa sepat (astringent)
- Mudah dioksidasi dan tidak mempunyai titik leleh dan amorf
- Tanin dapat larut dalam air dalam kondisi suhu tinggi dan pelarut organik seperti etanol, keton dll



DISTRIBUSI TANIN

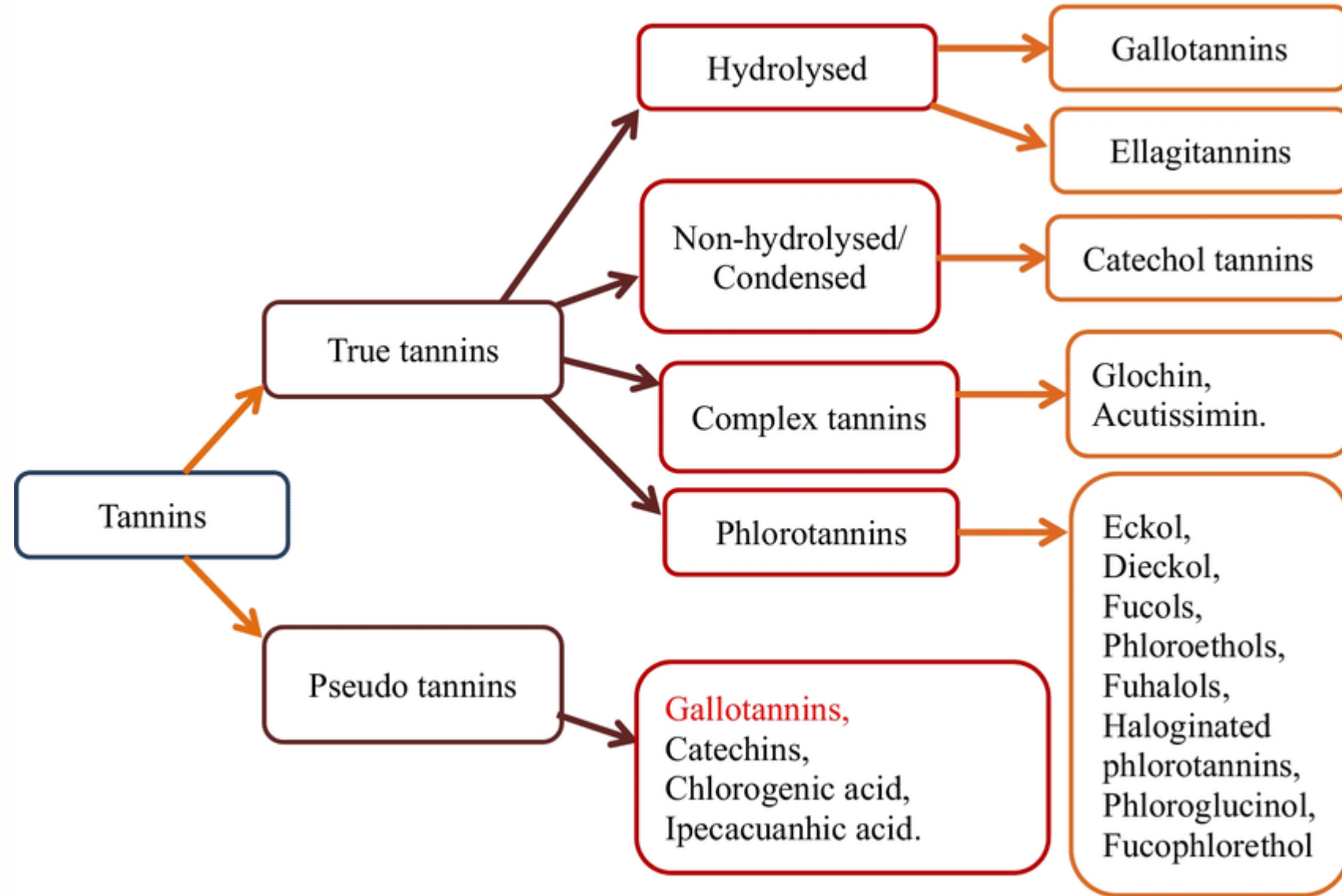
- Terdistribusi luas pada seluruh tumbuhan
- Tumbuhan tingkat rendah seperti alga, fungi dan lumut tidak banyak mengandung tanin
- Terdistribusi pada jaringan daun, tunas, akar, kulit kayu, batang dan lapisan luar dari jaringan tanaman.
- Tannin terkondensasi terdapat pada hampir seluruh perdu dan gymnospermae , dan tersebar luas pada angiospermae, terutama pada pohon dan semak.
- Sebaliknya, pada tanaman dikotil, tannin terhidrolisis jumlahnya hanya terbatas. Kedua tipe tannin ini dapat terdapat pada tanaman yang sama, seperti yang ditemukan pada kulit kayu dan daun oak.
- Tanin adalah salah satu senyawa polifenol yang dapat mengganggu absorpsi besi dan kalsium sehingga dapat mengurangi bioavailabilitas besi dan kalsium tubuh



Kegunaan Tanin- Fungsi Pada Tanaman

- Sebagai proteksi dari cekaman lingkungan
- Sebagai antihama (toksik) terhadap serangga dan fungi
- Sebagai senyawa antiseptik pada jaringan tanaman yang terluka



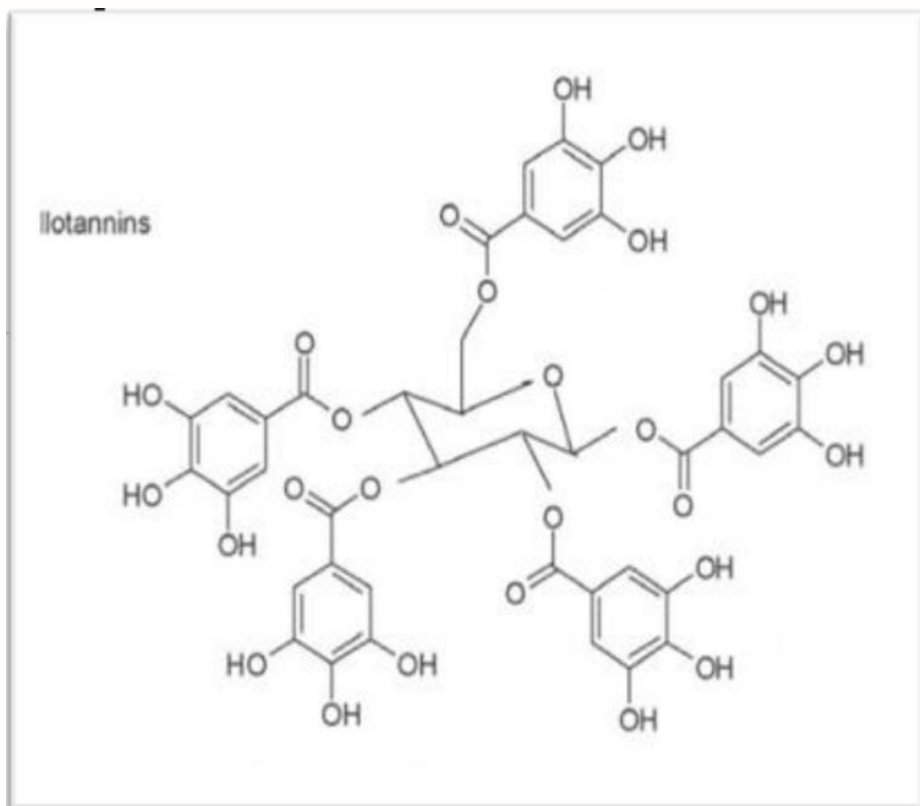




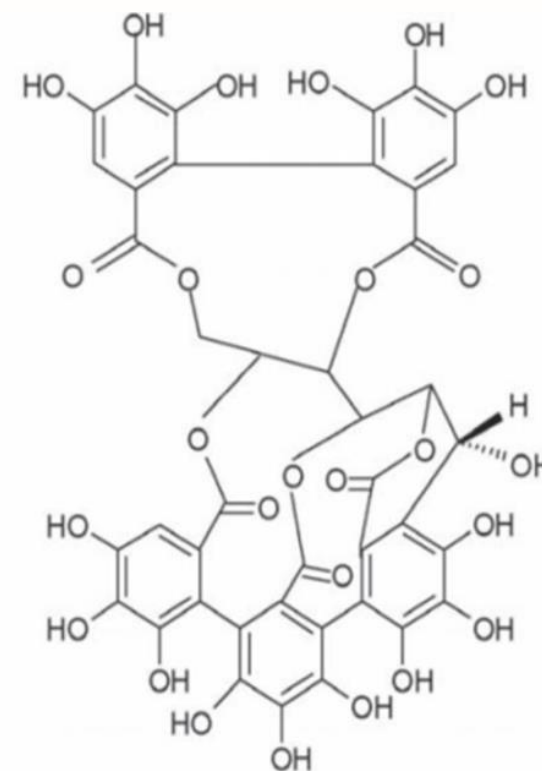
Struktur Tanin

- Tanin terhidrolisis
 - Mengandung inti pusat berupa karbohidrat yang berikatan dengan asam fenol karboksil melalui ikatan ester.
- Mengandung inti pusat berupa karbohidrat yang berikatan dengan asam fenol karboksil melalui ikatan ester.
 - Mengandung dua atau lebih oligomer flavan-3ols seperti katekin, epikatekin, dan gallokatekin

Tanin terhidrolisis



Gallotanin



Ellagitanin



Biosintesis Tanin

- Terjadi di sitoplasma sel tanaman
- Disintesis melalui jalur shikimate
- Asam 3-dehidrosikimat merupakan produk antara jalur shikimate dari substrat karbohidrat yang penting dalam biosintesis senyawa fenolik.



CARA IDENTIFIKASI SENYAWA TANIN

- Untuk analisis secara kualitatif dapat dilakukan dengan menggunakan metode :
- Diberikan larutan FeCl_3 berwarna biru tua / hitam kehijauan.
- Ditambahkan Kalium Ferrisianida + amoniak berwarna coklat.
- Diendapkan dengan garam Cu, Pb, Sn, dan larutan Kalium Bikromat berwarna coklat (Najib, 2009)



STUDI KASUS

- Pilihlah 1 Senyawa Flavonoid/tannin
- Mahasiswa sebagai peneliti Suatu TIM. Ingin mendapatkan senyawa Tunggal. Buatlah Rancangan Tahapan proses Purifikasi tanaman. (Rancangan Mini Penelitian)

ISOLASI FUNGI ENDOFIT DAUN Srikaya (*Annona muricata* L.) SEBAGAI ANTIOKSIDAN SECARA KLT-AUTOGRAFI

Muhammad Ikhwan Asri¹, Sabaruddin*² & Fitriana¹

¹Department of Microbiology, Faculty of Pharmacy, Universitas Muslim Indonesia, Makassar, South Sulawesi, 90231, Indonesia

²Faculty of Pharmacy, Universitas Halu Oleo, Kendari, Southeast Sulawesi, 90232, Indonesia

*Corresponding Author, email: sabarudinombe@gmail.com

ABSTRACT

Antioxidants are compounds that can neutralize free radicals that produced by endophyte microbes. This study aims to isolate endophyte fungi and antioxidant activity of isolate endophyte fungi of Annona muricata L. leave used TLC-Autograph Method. The result of isolation endophyte fungi Annona muricata L. leaves obtained 7 isolates namely FES₁, FES₂, FES₃, FES₄, FES₅, FES₆, dan FES₇ colonies. Isolates of endophytic fungi were purified by quadran steak method to obtain pure isolates. The pure isolates obtained were fermented in Maltosa Yeast Broth (MYB) medium using shaker at 200 rpm for 7 x 24 hours to obtain secondary metabolites namely mycelia and supernatant. The results of testing the antioxidant activity of the supernatant extract of endophytic fungi isolates by TLC-Autograph using 0.04% DPPH spray reagent showed that the endophytic fungi isolate FES₂ had free radical activity at Rf values of 0.94 and 0.87.

Keywords : Endophyte Fungi, *Annona muricata* L. leave, Antioxidants, TLC-Autograph

PENDAHULUAN

Fungi Endofit merupakan mikroorganisme yang berasosiasi dengan jaringan tanaman sehat yang bersifat netral atau menguntungkan yang mampu menghasilkan senyawa biologi atau metabolit sekunder seperti senyawa flavonoid, alkaloid, tanin. Kemampuan suatu endofit memproduksi senyawa metabolit sekunder sesuai dengan tanaman inang sebagai akibat transfer genetik dari tanaman inangnya ke dalam fungi endofit (1). Mikroba endofit menghasilkan senyawa bioaktif yang berpotensi di bidang farmasi meliputi senyawa antibiotika, antivirus, antikanker,

antioksidan, biosektisida, immunosupresif, serta antidiuretik (2).

Fungi endofit dapat menghasilkan senyawa metabolit sekunder sesuai dengan tanaman inangnya. Kemampuan suatu endofit memproduksi senyawa metabolit sekunder sesuai dengan tanaman inang sebagai akibat transfer genetik dari tanaman inangnya ke dalam fungi endofit (Radji, 2008). Mikroba endofit menghasilkan bioaktif yang berpotensi di bidang farmasi. Potensi meliputi antibiotika, antivirus, antikanker, antioksidan, biosektisida, immunosupresif, serta antidiuretik (3). Fungi endofit yang memproduksi antioksidan

contohnya seperti, Pestacin dan isopestacin merupakan metabolit sekunder yang dihasilkan oleh endofit *p. microspora*. Baik pestacin ataupun isopestacin berkhasiat sebagai antioksidan, dimana aktivitas ini diduga karena struktur molekulnya mirip dengan flavonoid (4).

Antioksidan merupakan senyawa yang dapat menetralsir radikal bebas dan mencegah kerusakan yang ditimbulkan oleh radikal bebas terhadap sel normal, protein, dan lemak dengan cara melengkapi kekurangan elektron yang dimiliki radikal bebas sehingga senyawa radikal bebas tersebut stabil dan menghambat terjadinya reaksi berantai dari pembentukan radikal bebas. Tanaman obat semakin banyak digunakan sebagai obat, salah satu tanaman obat tersebut adalah daun srikaya (*Annona squamosa* L.). Hasil penelitian sebelumnya tentang daun Srikaya (*Annona squamosa* L.) memiliki kemampuan sebagai antioksidan (5), maka pada daun srikaya (*Annona squamosa* L.) dapat dimanfaatkan untuk menghambat aktivitas radikal bebas.

Penggunaan daun Sirsak (*Annona squamosa* L.) sebagai tanaman obat, secara empiris tanaman ini dimanfaatkan sebagai obat batuk, disentri, rematik, menurunkan kadar asam urat dan diare oleh masyarakat. Disamping itu, tanaman ini juga diketahui memiliki aktivitas sebagai antioksidan, antikanker, dan antibakteri. Tanaman srikaya (*Annona squamosa* L.) mengandung

senyawa aktif antara lain flavanoid, alkaloid, terpen, saponin, tannin, polifenol dan senyawa poliketida (6).

Salah satu tanaman yang berkhasiat sebagai antidiabetes dan antioksidan adalah daun sirsak. Berdasarkan penelitian sebelumnya, membuktikan bahwa fraksi air ekstrak etanol daun sirsak dosis 400mg/Kg BB memiliki efek penurunan kadar glukosa tertinggi diantara fraksi n-heksan dan etil asetat dengan % penurunan kadar glukosa sebesar 66,45% tikus putih diabetes yang diinduksi aloksan (7). Hasil pengujian aktivitas antioksidan dengan metode penangkapan radikal bebas DPPH menunjukkan bahwa ekstrak etanol daun sirsak memiliki IC₅₀ sebesar 60,74 (8).

Berdasarkan hal sehingga dilakukan penelitian isolasi fungi endofit daun Sirsak (*Annona muricata* L.) sebagai antioksidan secara KLT-Autografi.

METODE

Alat yang digunakan pada penelitian ini adalah autoklaf, enkas, gelas erlenmayer 250 ml, inkubator, lampu spiritus, ose bulat, oven, shaker, tabung reaksi, timbangan analitik dan vial. Dan bahan yang digunakan adalah daun Srikaya (*Annona muricata* L.) yang diperoleh dari kota Maros Sulawesi Selatan, aquadest, alkohol 70%, medium maltosa yeast broth (MYB), lempeng Kromatografi Lapis Tipis (KLT) Silika Gel F₂₅₄, 1,1-Diphenyl-2-picrylhydrazil (DPPH) 0,004%.

Isolasi Fungi Endofit Daun Srikaya

(*Annona muricata* L.)

Daun srikaya (*Annona muricata* L.) yang telah disortasi basah disterilisasi permukaan menggunakan etanol 70% selama 2-5 menit, selanjutnya dibilas dengan aquadest steril + 1 menit diulang 2-3 kali lalu dikeringkan. Pengerjaan dilakukan secara aseptis di dalam Laminar Air Flow (LAF). Potongan kecil Daun sirsak diletakkan diatas medium PDAC (PDA+Cloramphenicol) di dalam cawan petri steril yang kemudian diinkubasi di dalam inkubator pada suhu kamar (25⁰C-30⁰C) selama 3 hari. Diisolasi dan dimurnikan pada media PDAC baru untuk mendapatkan biakan murni (9).

Fermentasi Dan Pemurnian Isolat Fungi Endofit Daun Srikaya (*Annona muricata* L.)

Biakan murni fungi endofit difermentasi menggunakan shaker pada kecepatan 200 rpm selama 7x24 jam. Isolat bakteri yang diperoleh dari proses sebelumnya ditumbuhkan pada media padat yaitu Nutrien Agar (NA) yang baru dengan menggunakan metode gores kuadran. Bakteri diambil dengan menggunakan ose, kemudian digoreskan pada kuadran pertama. Jarum ose disterilkan, ujung dari penggoresan pertama kemudian diteruskan dengan menariknya pada kuadran kedua dan digores kembali hingga kuadran ke empat. Bakteri yang tumbuh terpisah pada empat kuadran tersebut diremajakan pada media NA sebagai isolat murni untuk digunakan pada penelitian

selanjutnya (10).

Pengujian Aktivitas Isolat Fungi Endofit Daun Srikaya Secara KLT-Autografi

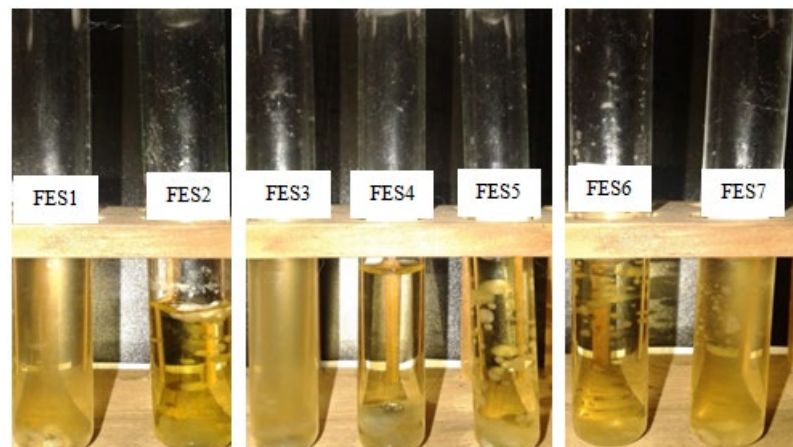
Isolat fungi endofit daun srikaya dilakukan penotolan pada lempeng kromatografi dan kromatogram hasil elusi disemprotkan pereaksi *1,1-Diphenyl-2-picrylhydrazil* (DPPH) 0,004%. Hasil penyemprotan dengan DPPH diamati bercak aktif yang positif sebagai antioksidan berdasarkan bercak berwarna kuning pada sinar tampak kemudian dihitung nilai Rf-nya (11).

Penelitian ini merupakan penelitian berdasarkan pengujian aktivitas antibiotika dari fungi endofit, untuk menentukan aktivitas antiradikal bebas secara KLT-Autografi.. Isolasi fungi endofit dilakukan menggunakan metode tanam pada medium Potato Dekstrosa Agar + Clora, fenikol (PDAC) diperoleh koloni fungi endofit. Hasil isolasi fungi endofit daun srikaya (*Annona muricata* L.) diperoleh 7 isolat dan isolat fungi endofit daun sirsak difermentasi pada medium maltosa yeast broth (MYB) menggunakan shaker pada kecepatan 200 RPM selama 7x24 jam untuk memperoleh metabolit sekunder berupa supernatan dan miselia dan dimurnikan dengan metode kuadran hingga diperoleh isolat fungi endofit daun srikaya yaitu isolat FES₁, FES₂, FES₃, FES₄, FES₅, FES₆, dan FES₇. Hasil fermentasi

fungi endofit terlihat pada gambar 1.

HASIL DAN PEMBAHASAN

Isolat murni yang diperoleh difermentasi dalam medium maltosa yeast broth (MYB) selama 1 x 24 jam, sambil



Gambar 1. Hasil fermentasi isolat fungi endofit (FES) daun srikaya : Isolat FES₁, FES₂, FES₃, FES₄, FES₅, FES₆, dan FES₇

disheaker dengan kecepatan 200 rpm selama 7 x 24 jam agar selama fermentasi fungi endofit akan mencapai fase stasioner dan menghasilkan metabolit sekunder, hal ini untuk mempertahankan hidup mikroorganisme lain sehingga mikroorganisme itu tidak dapat tumbuh dan berkembang biak. Untuk melihat potensi dari hasil metabolisme sekunder maka dilakukan pengujian aktivitas antiradikal bebas.

Media fermentasi yang digunakan adalah maltosa yeast broth (MYB), karena media ini merupakan media cair yang mengandung ekstrak yeast sebagai sumber protein, maltosa dan dekstrosa sebagai sumber karbon dan pepton sebagai sumber asam amino, yang dibutuhkan dalam

pertumbuhan, sintesis sel, keperluan energi dalam metabolisme mikroorganisme. Hasil fermentasi kemudian dilakukan pengujian skrining antiradikal bebas. Pengujian ini bertujuan untuk memorelah isolat yang paling memiliki potensi sebagai antiradikal

bebas.

Hasil pengujian skrining aktivitas antiradikal bebas isolat fungi endofit yaitu isolat FES₁, FES₂, FES₃, FES₄, FES₅, FES₆, dan FES₇ secara kualitatif menggunakan pereaksi DPPH 0,004% sebanyak 200 μ L diperoleh isolat FES₂ merupakan isolat aktif ditandai dengan adanya perubahan warna dari kuning dan pengujian aktivitas antiradikal bebas secara KLT-Autografi menggunakan eluen etil asetat : etanol : air (12:6:1) pada penyemprotan DPPH 0,004% diperoleh nilai Rf 0.94 dan 0.87 bercak kuning berlatar ungu hingga disimpan selama 30 menit menunjukkan isolat FES₂ aktif sebagai antioksidan sebagaimana terlihat pada tabel 1.

Tabel 1. Hasil pengujian aktivitas antiradikal bebas isolat fungi endofit daun srikaya (*Annona muricata* L.) secara KLT-Autografi dengan pereaksi DPPH 0,004%

No.	Isolat	Warna Bercak	Uji KLT-Autografi	
			Nilai Rf	Warna Bercak
1.	FES ₁	Ungu	-	-
2.	FES ₂	Kuning (+)	0.94 0.87	Kuning (+) Kuning (+)
3.	FES ₃	Ungu	-	-
4.	FES ₄	Ungu	-	-
5.	FES ₅	Ungu	-	-
6.	FES ₆	Ungu	-	-
7.	FES ₇	Ungu	-	-

Ket : FES = Isolat Fungi Endofit Srikaya, + = Aktif sebagai antioksidan, - = Tidak terdapat nilai Rf dan Warna bercak

Pengujian aktivitas Antiradikal bebas dengan metode KLT-Autografi menggunakan pereaksi semprot DPPH 0.004% yang ditandai dengan adanya bercak noda berwarna kuning pada kromatogram [11]. Metode ini digunakan karena merupakan salah satu metode yang sederhana dengan jumlah sampel yang relatif sedikit sudah mampu memperlihatkan aktivitasnya, serta dapat langsung melokalisir senyawa yang memberikan aktivitas antiradikal bebas sehingga memudahkan dalam proses isolasi atau pemisahan senyawa aktif dari senyawa-senyawa lainnya .

Menurut Rininta (2008), bahwa setelah lempeng disemprotkan dengan DPPH 0,04% akan diperoleh bercak pita berwarna kekuningan dengan dasar plat berwarna ungu, hal ini dibuktikan oleh hasil penelitian dilakukan dimana isolat JES I₂ menunjukkan 2 bercak berwarna kuning sedangkan

latarnya berwarna ungu, masing-masing dengan nilai Rf 0,94 dan 0,87 yang menandakan bahwa isolat tersebut mammallike aktivitas antiradikal bebas (12).

KESIMPULAN

Hasil isolasi fungi endofit daun srikaya (*Annona squamosa* Linn.) diperoleh 7 isolat dengan isolat fungi endofit JES I₂ secara KLT-Autografi memiliki aktivitas antiradikal bebas pada nilai Rf 0,94 dan 0,87.

DAFTAR PUSTAKA

1. Radji M. Peranan Bioteknologi Dan Mikroba Endofit Dalam Pengembangan Obat Herbal. Maj Ilmu Kefarmasian. 2005;2(3):113–26.
2. Strobel G, Daisy B, Castillo U, Harper J. Natural Products from Endophytic Microorganisms. Vol. 67, Journal of Natural Products. 2004. p. 257–68.
3. Strobel, G.A., and Daisy, B., 2003. *Natural Products from Endophytic Microorganism. J.Nat.Prod.* 67: 257-268.

4. Strobel, G.A., 2002. *Microbial Gifts From Rainforests*. Can. J. Plant Pathology. 24:14-20.
5. Mulyani, M., Arifin, B., dan Nurdin, H., 2013. *Uji Antioksidan dan Isolasi Senyawa Metabolit Sekunder dari Daun Serikaya (Annona squamosa Linn)*. (Diakses 27 Nofember 2013)
6. Djajanegara, I., dan Wahyudi, P., 2009. *Pemakaian Sel Hela Dalam Uji Sitotoksi Fraksi Kloroform dan Etanol Daun Annona squamosa*. Jurnal Ilmu Kefarmasian Indoneisa. Vol 7: 7-11.
7. Adiyati A. *Aktivitas Antidiabetes Fraksi N-Heksana, Etil Asetat Dan Air Ekstrak Etanol Daun Sirsak (Annona muricata L.) Pada Tikus Putih Jantan Diabetes Aloksan* [Skripsi]. Bandung: Universitas Padjajaran; 2011.
8. Rianes R. *Karakteristik Simplisia dan Skrining Fitokimia serta Uji Aktivitas Antioksidan Jus Buah Sirsak dan Ekstrak Etanol Daun Sirsak (Annona muricata L)* [Skripsi]. Medan: Universitas Sumatera Utara; 2012.
9. Herwin. *Isolasi Fungi Endofit Penghasil Antibiotika Pada Alga Merah Jenis Gracilaria verrucosa Secara KLT-Bioautografi*. As-Syifaa. 2010;10(1):83–91.
10. Maulidiyah Z, Dali S, Rusli R, Naid T. *Isolasi Bakteri Rhizosfer Tanaman Nilam (Pogostemon cablin Benth.) yang Berpotensi sebagai Penghasil Senyawa Antibakteri terhadap Bakteri Penyebab Infeksi Saluran Pencernaan*. Wind Heal J Kesehat. 2020;
11. Herwin, Baits M, Ririn. *Aktivitas Antibakteri Dan Antioksidan Fraksi Daun Colocacia esculenta L. dengan Metode KLT-Bioautografi Dan Difenilpikril Hidrazil*. As-Syifaa. 2015;7(2):174–81.3. Wiyono P. *Peranan hiperglikemia terhadap terjadinya komplikasi kronik diabetes melitus*. Medicine (Baltimore). 2003;35(1):55–60.
12. Rininta, N. 2008. *KLT Autografi CUPRAC sebagai Teknik Cepat Pendeteksian Senyawa Antioksidan*. [Skripsi]. FMIPA IPB, Bogor.

Research Article: Isolasi dan Identifikasi Senyawa Terpenoid**Research Article: Isolation and Identification of Terpenoid Compounds****Vriezka Mierza** ^{1*}**Antolin S** ²**Audi Ichsan** ³**Nurma Dwi** ⁴**Sridevi A** ⁵**Syfa Dwi** ⁶

Fakultas Ilmu Kesehatan, Universitas
Singaperbangsa Karawang, Jawa Barat,
Indonesia

*email:

vriezka.mierza@fikes.unsika.ac.id**Abstrak**

Terpenoid merupakan suatu golongan hidrokarbon yang banyak diproduksi oleh tumbuhan dan terutama terkandung pada getah dan vakuola selnya. Pada tumbuhan, senyawa-senyawa golongan terpena dan modifikasinya, terpenoid, merupakan metabolit sekunder. Terpenoid menyusun banyak minyak atsiri yang di produksi oleh tumbuhan. Kandungan minyak atsiri memengaruhi penggunaan produk rempah-rempah, baik sebagai bumbu, sebagai wewangian, serta sebagai bahan pengobatan, kesehatan, dll. Uji terpenoid-steroid dilakukan dengan menggunakan pereaksi lieberman-buchard menghasilkan positif terhadap terpenoid untuk semua fraksi. Hasil yang didapatkan untuk fraksi n-heksan dan fraksi etil asetat pada penambahan lieberman-buchard menghasilkan positif terhadap terpenoid yang ditandai dengan terbentuknya warna merah keunguan pada fraksi. Tujuan dari Research artikel ini dapat memberikan informasi untuk mengetahui metode apa saja yang digunakan pada isolasi dalam identifikasi senyawa terpenoid dan mengetahui jenis senyawa terpenoid yang di dapat dari hasil jurnal penelitian sebelumnya.

Kata Kunci:

Terpenoid
Tumbuhan
Senyawa

Keywords:

Terpenoids
Plant
Compound

Abstract

Terpenoids are a group of hydrocarbons that are produced in large quantities by plants and are mainly contained in the sap and cell vacuoles. In plants, terpene compounds and their modifications, terpenoids, are secondary metabolites. Terpenoids make up many of the essential oils produced by plants. The content of essential oils influences the use of spice products, both as seasonings, as fragrances, as well as ingredients for medicine, health, etc. The terpenoid-steroid test was carried out using the Lieberman-Buchard reagent which yielded positive results for terpenoids for all fractions. The results obtained for the n-hexane and ethyl acetate fractions on the addition of lieberman-buchard yielded positive results for steroids as indicated by the formation of a green color in the fractions. The purpose of this research article is to provide information to find out what methods are used in isolation in identifying terpenoid compounds and knowing the types of terpenoid compounds obtained from the results of previous research journals.



© 2023 The Authors. Published by Institute for Research and Community Services Universitas Muhammadiyah Palangkaraya. This is Open Access article under the CC-BY-SA License (<http://creativecommons.org/licenses/by-sa/4.0/>). DOI: <https://doi.org/10.33084/jsm.v9i2.5681>

PENDAHULUAN

Indonesia merupakan negara kaya akan beraneka ragam tumbuhan dengan negara beriklim tropis yang dapat tumbuh dengan mudah. Keanekaragaman hayati diantaranya merupakan tanaman obat yang memiliki khasiat pengobatan dalam menangani masalah kesehatan. Tanaman yang berkhasiat pengobatan dari pengetahuan pengalaman dan keterampilan secara turun temurun yang diwariskan dari leluhur keturunan dari generasi ke generasi selanjutnya (Miftahul Jannah, et al. 2021). Obat tradisional merupakan dari ramuan bahan

yang berasal dari bahan tumbuhan, bahan hewan, bahan mineral dan sediaan sarian (galenik) yang dilakukan secara turun temurun yang telah digunakan untuk pengobatan menangani masalah kesehatan yang diterapkan berlaku di masyarakat. Penggunaan obat tradisional khususnya dari tumbuh-tumbuhan sudah cukup meluas digunakan dalam kalangan masyarakat menangani masalah kesehatan.

Terpenoid merupakan salah satu senyawa metabolit sekunder atau disebut juga senyawa kimia aktif yang memberikan efek fisiologis dan efek farmakologis. Pada

tumbuhan berkhasiat pengobatan salah satunya mengandung terpenoid, komponen dari terpenoid yaitu dari minyak atsiri, resin dan aktivitas biologi sebagai antibakteri, penghambat sel kanker, inhibisi terhadap sintesis kolesterol, antiinflamasi, gangguan menstruasi, patukan ular, gangguan kulit, kerusakan hati dan malaria (Roumondang, 2013).

Senyawa golongan terpenoid merupakan komponen dari ekstrak kayu dan dari ekstrak yang diperoleh dari pelarut non polar, sebagai zat pengatur tumbuh dan anti rayap. Terpenoid komponen penyusun nya yaitu minyak atsiri mempengaruhi penggunaan produk rempah-rempah sebagai bumbu masak, wewangian, ritual upacara dan sebagai pengobatan kesehatan. Senyawa golongan ini diambil dari nama-nama umum minyak atsiri yang mengandungnya.

Suatu simplisia yang memenuhi persyaratan mutu setelah melakukan uji susut pengeringan, kadar abu total, kadar abu tidak larut asam, kadar sari larut air, kadar sari larut etanol dan kandungan kimia yang terdapat di simplisia yaitu minyak atsiri dan kadar kurkuminoid (Nina Salamah, dkk. 2013).

Identifikasi senyawa-senyawa yang terdapat dalam simplisia dilakukan dengan isolasi untuk mendapatkan isolat-isolat suatu senyawa.

Dari identifikasi isolat-isolat suatu senyawa untuk mengetahui terkandung jenis senyawa terpenoid. Tujuan dari Research artikel ini dapat memberikan informasi untuk mengetahui metode apa saja yang digunakan pada isolasi dalam identifikasi senyawa terpenoid dan mengetahui jenis senyawa terpenoid yang di dapat dari hasil jurnal peneletian sebelumnya.

METODOLOGI

Penelitian ini merupakan studi literatur yang diperoleh dari artikel-artikel ilmiah yang ditelusuri melalui Google Scholar, PubMed, dan Research Gate dengan menggunakan kata kunci Terpenoid, Isolasi, dan Identifikasi. Kriteria artikel yang digunakan telah diterbitkan 10 tahun, yaitu 2012-2022, judul dan isi jurnal sesuai dengan tujuan penelitian.

HASIL DAN PEMBAHASAN

Tabel 1. Hasil Sitasi Jurnal

Sitasi Jurnal	Sampel	Metode	Keterangan
(Dwisari et al., 2016)	Ekstrak metanol akar pohon kayu buta-but	1. Maserasi 2. Fraksinasi 3. Kromatografi Vakum Cair Kolom 4. Kromatografi Gravitasi 5. Kromatografi Lapis Tipis 6. Spektrofotometer FT-IR	Hasil akhir yang didapat pada jurnal ini yaitu, senyawa murni memperlihatkan adanya gugus fungsi -OH, C-H alifatik, C=O, C-O, dan C=C.
(Furi et al., 2015)	Ekstrak etil asetat kulit batang meranti kunyit	1. Maserasi 2. Kromatografi Cair Vakum 3. Kromatografi Kolom 4. Kromatografi Lapis Tipis 5. spektrofotometer UV-VIS 6. Spektrofotometer FT-IR	Senyawa murni dalam jurnal ini menunjukkan gugus, C=O,C-O, C-H, dan C- H Alifatis. hal ini dapat dikatakan senyawa murni tersebut tergolong terpenoid dengan substituen keton.

(Astuti et al., 2017)	Ekstrak n-heksana Daun Kelopak Tambahan Tumbuhan Permot	<ol style="list-style-type: none"> 1. Maserasi 2. Fraksinasi 3. Kromatografi Vakum Cair 4. Kromatografi Lapis Tipis 5. Spektroskopi UV-Vis, IR, IH-NMR dan ¹³C-NMR 	Hasil yang didapat dalam jurnal, Isolat murni pada sampel daun kelopak tambahan (<i>Passiflora foetida</i> L.) merupakan golongan senyawa terpenoid pentasiklik dimana dalam stukturanya terdapat ikatan rangkap terkonjugasi dan gugus karbonil ester.
(Rutdianti et al., 2017)	Isolat Etil Asetat Daun Ekaliptus	<ol style="list-style-type: none"> 1. Maserasi 2. Fraksinasi 3. Kromatografi Lapis Tipis 4. Kromatografi kolom 5. Spektrofotometri UV/Vis 6. Kromatografi Gas-Spektrometri massa (KG-SM) 	Isolat murni etil asetat menunjukkan turunan senyawa terpenoid yaitu senyawa 6, 10, 14-trimetil. 2-pentadekanon.
(Sumarni et al., 2020)	Ekstrak etanol pada sabut kelapa muda	<ol style="list-style-type: none"> 1. Ekstraksi 2. Fraksinasi 3. Kromatografi Vakum Cair 4. Kromatografi Kolom Gravitasi 5. Spektrofotometri FT-IR 	Isolat menunjukkan serapan gugus -OH, CO- alkohol, alkana CH alifatik, C=C, dan C=O keton. isolat tersebut adalah senyawa terpenoid.
(Fauzia et al., 2021)	Fraksi Heksana Dari Umbi Rumpun Teki	<ol style="list-style-type: none"> 1. Maserasi 2. Kromatografi vakum cair Kromatografi Lapis Tipis 3. Spektrofotometer UV-Vis, Infra Red, dan GCMS 	Hasil yang didapat pada jurnal terdapat 3 senyawa terpenoid dengan jenis seskuiterpen. senyawa tersebut diantaranya α -cyperon (C ₁₅ H ₂₂ O), Caryophyllen oxide (C ₁₅ H ₂₄ O), dan β -selinene (C ₁₅ H ₂₄).
(Sathishkumar & Anandakumar, 2021)	Ekstrak methanol Akasia caesia (L.)	<ol style="list-style-type: none"> 1. Kromatografi kolom 2. Kromatografi Lapis Tipis (KLT) 3. Spektroskopi Resonansi Magnetik Nuklir Proton (IH NMR). 4. Analisis GC-MS 5. LC-MS (Kromatografi Cair - Spektrometri massa) 	Berdasarkan data spektral massa <i>Akasia caesia</i> (L.) memberikan senyawa dengan rumus molekul C ₁₈ H ₃₈ sebagai N-oktadekana (diterpen) dengan berat molekul 254 dan C ₂₀ H ₄₂ sebagai N-eikosan (isomer struktural rantai lurus dari hidrokarbon alifatik jenuh) dengan berat molekul 282.

Terpenoid adalah kelas metabolit sekunder yang terdiri dari unit isoprena yang mempunyai 5 karbon (-C₅) yang disintesis dari asetat melalui jalur mevalonat. (Hartati et al., 2016). Terpenoid dapat terekstrak dengan pelarut non-polar atau polar. Dalam bentuk glikosida, senyawa terpenoid dapat tertarik dengan pelarut semi polar atau polar (Wulansari et al., 2020). Dalam isolasi dan identifikasi senyawa terpenoid dilakukan dengan beberapa metode diantaranya ekstraksi, kromatografi cair vakum, kromatografi kolom, Kromatografi Lapis Tipis, Spektrofotometri UV-Vis, Spektrofotometri FT-IR, Spektroskopi Resonansi Magnetik Nuklir Proton (1H NMR), Kromatografi Cair - Spektrometri massa (GC-MS), dan Kromatografi Cair - Spektrometri massa (LC-MS).

Ekstraksi

Berdasarkan tinjauan literatur metode ekstraksi yang paling banyak digunakan untuk mendapatkan ekstrak dari senyawa terpenoid yaitu maserasi. Menurut (Furi et al., 2015) dilakukan ekstraksi dengan metode maserasi yaitu karena maserasi memberikan ekstraksi yang cukup baik, selain itu bertujuan untuk menghindari terjadinya dekomposisi zat aktif akibat pemanasan. Sebagaimana dari peneliti oleh (Astuti et al., 2017) dan (Fauzia et al., 2021) pada proses ekstraksi menggunakan metode maserasi dengan pelarut yang digunakan yaitu N-Heksan dimana pelarut ini merupakan senyawa nonpolar. Sedangkan pada peneliti oleh (Rutdianti et al., 2017) dan (Sumarni et al., 2020) proses ekstraksi menggunakan maserasi tetapi untuk pelarut yang digunakan yaitu pelarut semi polar diantaranya etil asetat dan etanol.

Partisi dan Fraksinasi

Pada Proses Fraksinasi ini dilakukan untuk pemisahan senyawa dari suatu ekstrak dengan berbagai pelarut dengan tingkat kepolaran yang berbeda, baik itu semi polar, polar dan pelarut non polar. pada prinsipnya pelarut non polar seperti pelarut n-heksan akan menarik senyawa-senyawa bersifat non polar (sopomo et al., 2021). Fraksinasi menurut (sopomo et al., 2021) dibedakan dalam beberapa cara metodenya, seperti

fraksinasi cair-cair dilakukannya menggunakan alat labu pemisah yang berisikan 2 pelarut tidak tercampur dengan tingkat kepolaran berbeda. Metode fraksinasi lain yaitu menggunakan kolom kromatografi, metode ini menggunakan sebuah alat berupa kolom seperti kromatografi vakum cair, kromatografi gas dan lainnya. Berdasarkan peneliti yang dilakukan oleh (Dwisari et al., 2016) dan (Sumarni et al., 2020) Sampel yang diekstraksi kemudian secara bertahap dipartisi dengan pelarut n-heksana dan etil asetat.

Kromatografi Lapis Tipis (KLT)

Pada umumnya teknik kromatografi adalah suatu metode untuk dilakukannya pemisahan senyawa dengan menggunakan fase diam dan fase gerak. Berdasarkan tinjauan literatur beberapa peneliti KLT digunakan berbagai macam fungsinya sesuai kebutuhan. Berdasarkan peneliti oleh (Dwisari et al., 2016) metode KLT digunakan untuk menentukan eluen atau fase gerak memberikan pola pemisahannya yang paling baik. Dimana silika gel G60 F254 sebagai fase diam dan fase gerak yaitu n-heksana: etil asetat, etil asetat : metanol dengan nilai perbandingan yang berbeda dan juga menggunakan pelarut etil asetat 100%; metanol 100%. Eluen hasil KLT ini kemudian akan dilanjutkan pada Kromatografi cair vakum (KCV).

Selain itu KLT juga dapat digunakan sebagai skrining fitokimia untuk mengetahui senyawa terpenoid pada sampel yang telah diekstrak, sebagaimana yang dilakukan oleh peneliti (Dwisari et al., 2016) melakukan skrining fitokimia senyawa terpenoid menggunakan pereaksi semprot yaitu Lieberman-buchard. Plat KLT dipanaskan hasil positif menunjukkan warna merah keunguan, hal ini dikarenakan adanya reaksi reduksi oleh kedua senyawa yaitu asam sulfat dalam asam asetat (Sumarni et al., 2020). Perbedaan warna yang dihasilkan terpenoid disebabkan oleh perbedaan gugus atom karbon 4 (C-4) (Kumari et al., 2017). Sedangkan dalam penelitian oleh (Sathishkumar & Anandakumar, 2021) melakukan skrining senyawa terpenoid menggunakan reagen vanillin-asam fosfat dan plat KLT dipanaskan selama 5 menit.

Hasil positif terpenoid menunjukkan bercak berwarna biru.

Tak hanya itu pada proses pemurnian KLT juga digunakan untuk melihat pola pemisahan yang mempunyai kemiripan pada fraksi-fraksi sehingga fraksi dapat digabungkan. Seperti yang dilakukan oleh peneliti (Sumarni et al., 2020) mendapatkan 18 fraksi lalu dilakukan pemantauan dengan KLT, setelah diketahui pola pemisahan yang sama 18 digabungkan sehingga dapat dibagi menjadi 2 fraksi. Hal ini serupa dengan penelitian oleh (Astuti et al., 2017) dan (Dwisari et al., 2016) Fraksi-fraksi hasil pemisahan dimonitoring dengan KLT lalu digabungkan yang terdapat kemiripan pola pemisahan sehingga diperoleh beberapa fraksi gabungan. Untuk menggabungkan fraksi-fraksi dilihat pada nilai R_f (*rate of flow*) sama dan spot noda menunjukkan satu noda yang sama. Kemudian dimurnikan dengan rekristalisasi berulang-ulang dengan pelarut yang sesuai sampai mendapatkan isolat murni (Fauzia et al., 2021).

Kromatografi kolom

Kromatografi mencakup berbagai tahapam berdasarkan perbedaan distribusi komponen penyusun sampel antara dua fase. Dua fase tersebut yaitu fasa diam sebagai adsorben yang mana fasanya hanya tinggal pada system dan fasa gerak yaitu memperkolasi melalui celah fasa diam. Gerakan fase ini menyebabkan perbedaan migrasi dari komponen sampel, menyebabkan fraksi membentuk beberapa lapisan zona berwarna yang dinamakan dengan kromatogram. (Maslebu et al., 2012). Seperti peneliti yang dilakukan oleh (Sumarni et al., 2020) Kromatografi Kolom Gravitasi (KKG) dengan fase gerak yaitu etil asetat: n-heksana sebagai mobile fase dan fase diam yaitu silika gel. Peneliti lain oleh (Rutdianti et al., 2017) dan (Sathishkumar & Anandakumar, 2021) yang juga menggunakan metode kromatografi kolom.

Kromatografi Cair Vakum (KCV)

Kromatografi Cair Vakum merupakan suatu metode pemisahan yang memodifikasi dari kromatografi kolom gravitasi dengan menambahkan vakum (penarik udara)

pada bagian bawah kolom. KCV ini digunakan untuk fraksinasi dan dapat juga memurnikan fraksi dengan menggunakan fase diam dan fase gerak. Cara kerja dari KCV yaitu sampel dilarutkan dengan pelarut yang sesuai lalu ditambahkan langsung pada bagian atas kolom kemudian dihisap perlahan-lahan ke dalam wadah dengan memvakumnya (Fauzia et al., 2021). Berdasarkan penelitian oleh (Fauzia et al., 2021) pada metode KCV, silika gel 60 F-254 digunakan sebagai fase diam dan perbandingan pelarut Heksan: Kloroform:Metanol (6:3:1) sebagai fase gerak. Kemudian fraksi-fraksi diperoleh dimasukkan dalam botol vial. Seperti pada peneliti oleh (Astuti et al., 2017) dan (Sumarni et al., 2020) melakukan Fraksinasi dengan metode KCV.

Spektrofotometri UV-Vis

Spektroskopi merupakan sebuah alat yang mempelajari antara interaksi cahaya dengan atom dan molekul. Ketika suatu senyawa (sampel) terkena cahaya, maka struktur elektronik dari molekul zat akan mempengaruhi penyerapan cahaya oleh molekul di daerah spektrum ultraviolet (UV) dan cahaya tampak (Visible) (Maslebu et al., 2012). Spektrofotometri UV-VIS merupakan salah satu metode instrumentasi yang paling banyak digunakan untuk mendeteksi senyawa berdasarkan serapan foton dalam analisis kimia. Agar sampel dapat menyerap foton pada daerah UV-VIS, biasanya sampel perlu diolah atau diderivatisasi. Misalnya, menambahkan reagen dalam pembentukan garam kompleks (Irawan, 2019). Pada sinar UV memiliki panjang gelombang foton berkisar 200-400 nm sementara sinar tampak (visible) memiliki panjang gelombang foton berkisar 400-750 nm (Gandjar et al., 2019).

Berdasarkan peneliti oleh (Fauzia et al., 2021) hasil spektrum UV-VIS dari sampel ekstrak heksan memberikan serapan cahaya pada panjang gelombang 201 nm disebabkan karena transisi $\pi \rightarrow \pi^*$ dari gugus kromofor C=C dan lalu pada panjang gelombang 306 nm dikarenakan adanya transisi $n \rightarrow \pi^*$ dari gugus

kromofor C=O. Penelitian lain oleh (Astuti et al., 2017) Spektro UV isolat BI dalam pelarut heksana menunjukkan isolat tersebut memiliki serapan pada panjang gelombang maksimum 232 nm karena adanya transisi $\pi \rightarrow \pi^*$ yang disebabkan oleh ikatan rangkap terkonjugasi (-C=C-C=C-).

Spektrofotometri FT-IR

Spektroskopi inframerah transformasi Fourier (FTIR) spektroskopi bergantung pada konsep interferensi radiasi antara dua berkas untuk membentuk interferogram. Sinyal akhir yang dihasilkan adalah fungsi mengubah panjang jalur antara dua balok. Dua jarak dan frekuensi diubah menggunakan metode matematika transformasi Fourier (Stuart 2005). Komponen dasar spektrometer FTIR ditunjukkan sesuai dengan skema. Radiasi yang dipancarkan dari sumber melewati interferometer ke sampel sebelum mencapai sensor. Setelah amplifikasi, sinyal dengan kontribusi frekuensi tinggi yang diekstraksi oleh filter data diubah menjadi format digital oleh konverter analog-ke-digital dan ditransfer ke komputer untuk konversi Fourier (Stuart 2005).

Dalam identifikasi terpenoid, FT-IR digunakan untuk karakterisasi isolat. Pada penelitian (Sumarni et al. 2020), senyawa yang diperoleh dianalisis dengan FT-IR untuk mengetahui gugus fungsi yang terkandung dalam senyawa tersebut. Berdasarkan spektrum terlihat adanya serapan ikatan rangkap C=C pada bilangan gelombang 1635,64 cm⁻¹. Spektrum IR juga menunjukkan adanya vibrasi gugus hidroksi (OH) pada bilangan gelombang 3448,72 cm⁻¹ dan vibrasi karbonil. Adanya karbonil ester pada isolat A1.1 juga diperkuat dengan munculnya vibrasi C-O pada bilangan gelombang 1101,35 cm⁻¹. Vibrasi C-H sp³ pada bilangan gelombang 2991,59 cm⁻¹ menunjukkan adanya vibrasi ulur gugus C-H alifatik yang mengindikasikan adanya gugus metil (-CH₃) dan metilen (-CH₂). Didukung dengan penelitian (Dwisari et al. 2016), spektrum FT-IR isolat F2.1 menunjukkan adanya pita pada daerah serapan pada

bilangan gelombang 3456,44 cm⁻¹ yang menunjukkan adanya gugus hidroksil -OH. Pita serapan pada bilangan gelombang 2924,09 cm⁻¹ menunjukkan keberadaan ini. Batang C-H dari CH₃, 2862,36 cm⁻¹ diasumsikan sebagai batang C-H. Adanya fungsi karbonil (C=O) ditunjukkan dengan munculnya serapan pada daerah bilangan gelombang 1712,79 cm⁻¹. Serapan yang lemah pada bilangan gelombang 1643,35 dan 1512,19 cm⁻¹ menunjukkan adanya gugus C=C aromatik. Bilangan gelombang 1273,02 dan 1226,73 cm⁻¹ menunjukkan adanya serapan C-O.

Spektroskopi Resonansi Magnetik Nuklir Proton (1H-NMR)

Spektrometri resonansi magnetik nuklir (NMR) adalah alat yang sangat penting untuk mendapatkan informasi tentang senyawa kimia. Deskripsi hasil spektroskopi NMR sangat penting untuk mengamati baik senyawa kimia, struktur senyawa dari bahan alam yang tidak diketahui, pembentukan ikatan peptida dan dinamika internal polimer. NMR juga dapat memecahkan masalah atau informasi yang sebelumnya sulit diperoleh dan dipecahkan (Jenie et al. 2014).

Pada penelitian (Sathishkumar et al. 2021), 1H-NMR (CDCl₃, 300.1318534 MHz) spektra fraksi murni kolom II menunjukkan sinyal pada δ H= 0,8 -1,8 ppm ditampilkan untuk daerah alifatik. Sedangkan pada penelitian (Astuti et al. 2017) spektra 1H-NMR isolat BI menunjukkan pergeseran kimia δ H(ppm) sebesar 0,7-5,5. Pergeseran data menunjukkan bahwa senyawa tersebut memiliki proton (H) pada karbon alifatik atau siklik. Berdasarkan spektra 1H-NMR, terdapat pergeseran kimia δ H(ppm) khas proton olefin (proton yang terikat C=C), yaitu pergeseran kimia 5,369 (1H, d, J= 5,5 Hz) dan 5,347 (1H, d, J = 5,5 Hz).

Kromatografi Gas - Spektrometri massa (GC-MS)

GC-MS (Gas Chromatography-Mass Spectrometry) merupakan instrumen gabungan dari alat GC dan MS. Hal ini berarti sampel yang hendak diperiksa diidentifikasi dahulu dengan alat GC (Gas

Chromatography), kemudian diidentifikasi dengan alat MS (Mass Spectrometry). GC dan MS digunakan untuk memisahkan dan mengidentifikasi semua komponen campuran yang mudah menguap (LPPT UGM 2017).

Berdasarkan penelitian (Sathishkumar et al. 2021), data yang diperoleh melalui GC-MS senyawa tersebut memberikan rumus molekul $C_{18}H_{38}$ dengan berat molekul 254 dan $C_{20}H_{42}$ dengan berat molekul 282. Mereka menunjukkan bahwa senyawa tersebut untuk sementara diidentifikasi sebagai N-oktadekana (diterpen) dan N-eikosan masing-masing.

Kromatografi Cair - Spektrometri massa (LC-MS)

LC-MS merupakan gabungan teknik analisis kromatografi cair dengan kemampuan analisis deteksi spektrometri massa. Prinsip kerja LC-MS/MS adalah pemisahan komponen sampel berdasarkan tingkat kepolaran yang selanjutnya ion bermuatan akan dideteksi oleh detektor spektrometer massa (LPPT UGM 2017). Spektra massa LC-MS pada penelitian (Sathishkumar 2021), mendukung data GC dengan memiliki kemiripan berat molekul yang kuat. Hasil penelitian menunjukkan terbentuknya puncak yang dominan untuk senyawa terpenoid pada m/z 255 dan 282 yang menegaskan berat molekul senyawa I dan II berturut-turut adalah 254 dan 282.

KESIMPULAN

Proses isolasi senyawa terpenoid melalui beberapa tahap yaitu ekstraksi sebagian besar peneliti menggunakan metode maserasi. Pemisahannya dilakukan dengan menggunakan kromatografi. Diantaranya yaitu Kromatografi Lapis Tipis (KLT), dimana KLT ini dapat digunakan untuk pemilihan fase gerak yang menunjukkan pola pemisahannya paling baik, selain itu KLT juga dapat digunakan sebagai skrining fitokimia seperti pada senyawa terpenoid yang menggunakan penampak bercak Lieberman-buchard atau dapat dengan reagen vanillin-asam fosfat. kemudian kegunaan KLT terutama yaitu sebagai pemisahan pola

pada plat KLT dilakukan hingga terdapat noda tunggal, hal itu dapat dikatakan bahwa senyawa terpenoid relatif murni dan dapat dilanjutkan pada metode yang menentukan gugus fungsi senyawa. Metode lain dari pemisahan senyawa yaitu Kromatografi Cair Vakum (KCV) dan Kromatografi Kolom Gravitasi (KKG). Untuk fase gerak yang digunakan pada kromatografi yaitu menggunakan beberapa pelarut dengan tingkat kepolaran yang berbeda baik itu pelarut non polar-semi polar-polar. Senyawa hasil isolasi selanjutnya diidentifikasi dapat digunakan metode spektroskopi UV-Vis, FTIR, (1H -NMR), GC-MS, dan LC-MS. Pada proses ini dilakukan untuk mengetahui jenis senyawa terpenoid yang ada isolat murni. dengan melihat struktur kimia atau rumus molekulnya, dengan itu senyawa terpenoid dapat terdeteksi. seperti pada spektroskopi UV-Vis, yang mendeteksi senyawa berdasarkan serapan foton dengan rentang antara 200-750 nm. Pada metode spektroskopi FTIR bergantung pada konsep interferensi radiasi antara dua berkas untuk membentuk interferogram.

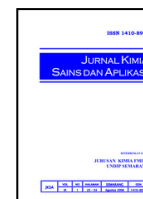
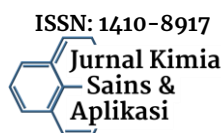
UCAPAN TERIMA KASIH

Terimakasih kepada dosen pengampu, serta seluruh pihak yang terlibat.

REFERENSI

- Astuti, Maria Dewi, Tuti Sriwinarti, and Kamilia Mustikasari. (2017). Isolasi Dan Identifikasi Senyawa Terpenoid Dari Ekstrak N-Heksana Daun Kelopak Tambahan Tumbuhan Permot (*Passiflora Foetida* L). *Jurnal Sains Dan Terapan Kimia* 11(2):80.
- Barokati Azizah, Nina Salamah. (2013). Standarisasi Parameter Non Spesifik dan Perbandingan Kadar Kurkumon Ekstrak Etanol dan Ekstrak Terpurifikasi Rimpang Kunyit. *Jurnal Ilmiah Kefarmasian*, Vol. 3, No. 1, 2013: 21-30.
- Dwisari, Fath, Harlia, and Andi Hairil Alimuddin. (2016). "Isolasi Dan Karakterisasi Senyawa Terpenoid Ekstrak Metanol Akar Pohon

- Kayu Buta-Buta (*Excoecaria Agallocha* L.).
Jurnal Kajian Komunikasi (JKK) 5(3):25–30.
- Fauzia, Dini Nur, Mukasi W. Kurniawati, Arina I. Fuady, and Khairani S. Pratiwi. (2021). Isolasi Dan Identifikasi Senyawa Terpenoid Fraksi Heksana Dari Umbi Rumpuk Teki (*Cyperus Rotundus*, L). *Jurnal Sintesis* 2(1):10–15.
- Furi, Mustika, Enda Mora, and Zuhriyah. (2015). Isolasi Dan Karakteristik Terpenoid Dari Ekstrak Etil Asetat Kulit Batang Meranti Kunyit (*Shorea Conica*). *Jurnal Penelitian Farmasi Indoneisa* 3(2):38–42.
- Gandjar, Ibnu Gholib, and Rohman, Abdul. (2019). *Kimia farmasi analisis*. Yogyakarta: Pustaka pelajar.
- Jenie, Umar Anggara, Leonardus B. S. Kardono, Muhammad Hanafi, Rymond J. Rumampuk, and Akhmad Darmawan. (2014). Teknik Modern Spektroskopi NMR: Teori Dan Aplikasi Dalam Elusidasi Struktur Molekul Organik.
- LPPT UGM. (2017). Kalibrasi – Laboratorium Penelitian Dan Pengujian Terpadu.
- Masadi, Yuniar Indo, Titik Lestari, and Indri Kusuma Dewi. (2018). Identifikasi Kualitatif Senyawa Terpenoid Ekstrak N- Heksana Sediaan Losion Daun Jeruk Purut (*Citrus Hystrix* Dc). *Jurnal Kebidanan Dan Kesehatan Tradisional* 3(1):32–40.
- Miftahul Jannah, Sumi Wijaya, Henry Kurnia Setiawan. (2021). Standarisasi Simplisia Daun Kenikir (*Cosmos caudatus* Kunth) Dari Tiga Daerah Berbeda. *Journal Of Pharmacy Sciene and Practice*, Vol 8 no 1, 2021.
- Rutdianti, Sayu, Rudi Kartika, and Partomun Simanjuntak. (2017). Isolasi Dan Identifikasi Senyawa Kimia Terpenoid Dari Isolat Etil Asetat Daun Ekaliptus (*Eucalyptus Deglupta* Blume.). *Prosiding Seminar Nasional Kimia 2017* 148–52.
- Rumondang, M., D. Kusrini, dan E. Fachriyah. (2013). Isolasi, Identifikasi, Dan Uji Antibakteri Senyawa Triterpenoid Dari Ekstrak n-Heksana Daun Tempuyung (*Sonchus arvensis* L.). *Chem Info*. 1:156-164.
- Supomo. (2021). *Khasiat Tumbuhan Akar Kuning Berbasis Bukti*. Ypgyakarta: Nas Media Pustaka.
- Stuart, Barbara H. (2005). *Infrared Spectroscopy: Fundamentals and Applications*.
- Sumarni, Ni Ketut, Asriani Hasanuddi, Siti Nuryanti, and Gatot Siswo Hutumo. (2020). Isolation and Characterization of Terpenoid Compounds Ethanol Extract on Young Coconut Coir (*Cocos Nucifera* L). *International Journal of Scientific and Technology Research* 9(2):5622–25.
- Osward, T. T., (1995). *Tumbuhan Obat*, Baratha, Jakarta.



Isolasi, Identifikasi Senyawa Steroid dari Daun Getih-Getihan (*Rivina humilis L.*) dan Uji Aktivitas sebagai Antibakteri

Wihda Wihdatul Hidayah^a, Dewi Kusriani^{a*}, Enny Fachriyah^a

^a Organic Chemistry Laboratory, Chemistry Department, Faculty of Sciences and Mathematics, Diponegoro University, Jalan Prof. Soedarto, Tembalang, Semarang

* Corresponding author: dewi.kusriani@live.undip.ac.id

Article Info

Keywords:
getih-getihan, n-hexane extract, steroid, antibacterial

Kata Kunci:
getih-getihan, ekstrak n-heksana, steroid, antibakteri

Abstract

Isolation and identification of steroid compounds from the leaves of getih-getihan (*Rivina humilis L.*) and its antibacterial activity test have been performed. The isolation was carried out by maceration of 2,708 kg of dried powder from Getih-getihan leaves using ethanol solvent, then partitioned with n-hexane solvent which yielded 2.4 gram of n-hexane extract. Phytochemical tests using Liebermann-Burchard reagents showed that n-hexane extracts were positive containing steroids. Separation of n-hexane extracts by column chromatography yielded 5 large fractions (A, B, C, D, E) and a steroid-positive B fraction resulting in isolates of 0.3 mg. The steroid isolates were tested for purity by TLC method with various solvents. From two-dimensional TLC, one stain was obtained and the isolates were suspected to have been pure. The steroid isolates were analyzed using GC-MS, however the structure could not be determined yet. The antibacterial activity test of n-hexane extract on *Escherichia coli* and *Staphylococcus aureus* bacteria showed inhibition of bacterial growth at 1000 ppm concentration.

Abstrak

Isolasi dan identifikasi senyawa steroid dari daun getih-getihan (*Rivina humilis L.*) dan uji aktivitasnya sebagai antibakteri telah dilakukan. Isolasi dilakukan dengan maserasi dari 2,708 kg serbuk kering dari daun getih-getihan menggunakan pelarut etanol, kemudian dipartisi dengan pelarut n-heksana yang menghasilkan ekstrak n-heksana sebanyak 2,4 gram. Uji fitokimia menggunakan pereaksi Liebermann-Burchard menunjukkan bahwa ekstrak n-heksana positif mengandung steroid. Pemisahan ekstrak n-heksana dengan kromatografi kolom menghasilkan 5 fraksi besar (A, B, C, D, E) dan fraksi B yang positif steroid menghasilkan isolat sebanyak 0,3 mg. Isolat steroid diuji kemurnian dengan metode KLT dengan berbagai pelarut. Dari KLT dua dimensi, didapatkan satu noda dan diduga isolat telah murni. Isolat steroid dianalisis menggunakan spektroskopi GC-MS, namun belum dapat ditentukan strukturnya. Uji aktivitas antibakteri dari ekstrak n-heksana terhadap bakteri *Escherichia coli* dan *Staphylococcus aureus* menunjukkan penghambatan pertumbuhan bakteri pada konsentrasi 1000 ppm.

1. Pendahuluan

Seiring perkembangan jaman dan adanya slogan *back to nature* membuat masyarakat Indonesia cenderung meman-faatkan tumbuhan obat sebagai obat tradisional. Salah satu tumbuhan yang berpotensi menjadi obat tradisional adalah getih-getihan (*Rivina humilis L.*) yang

merupakan tumbuhan berfamili *phytolaccaceae* yang biasa dikenal dengan sebutan *pigeon berry* [1]. Tumbuhan ini biasanya tumbuh liar dan belum banyak dimanfaatkan di Indonesia. Menurut Fathima dan Tilton [2] daun getih-getihan yang berasal dari India mengandung flavonoid, alkaloid, quinon, terpenoid,

steroid, saponin, dan tanin serta pada ekstrak metanolnya mempunyai aktivitas antioksidan dan aktivitas antibakteri [3]. Buahnya yang berwarna merah dapat digunakan sebagai sumber pigmen betalain yang memiliki aktivitas antiinflamasi, anti-karsinogenik, anti-malaria, pelindung saraf [1].

Berdasarkan kemotaksonominya, tumbuhan yang satu famili (*Phytolaccaceae*) dengan getih-getihan yaitu Singawalang (*Petiveria alliacea*) dan *Hillieria latifolia*. Singawalang (*Petiveria alliacea*) memiliki kandungan metabolit sekunder yaitu saponin glikosida, isoarborinol-triterpen, isoarborinol-asetat, steroid, alkaloid, isoarborinolsinamat, flavonoid, dan tanin serta mempunyai aktivitas antibakteri, bioinsektisida, antikanker, dan antiinflamasi [4]. Sedangkan *Hillieria latifolia* mengandung tanin, glikosida, saponin, alkaloid, flavonoid, steroid dan terpenoid dan mempunyai aktivitas antinoseptif dan antiinflamasi.

Steroid merupakan salah satu golongan senyawa metabolit sekunder. Golongan senyawa tersebut diketahui mempunyai aktivitas bioinsektisida [5], antibakteri [6, 7], antifungi [8], dan antidiabetes. Belum adanya penelitian terkait jenis senyawa steroid yang terdapat pada daun getih-getihan, maka perlu dilakukan isolasi, identifikasi senyawa steroid dari daun getih-getihan (*Rivina humilis L.*) dan uji aktivitas sebagai antibakteri.

2. Metode Penelitian

Alat dan Bahan

Blender, neraca analitik, gelas ukur, gelas beker, pipet tetes, erlenmeyer, botol vial, pengaduk, rotary evaporator, kertas saring, corong gelas, corong pisah, cawan penguapan, chamber KLT, pipa kapiler, kromatografi kolom, cawan petri, inkubator, jarum ose, autoklaf, lampu UV 254 nm dan 365 nm, spektroskopi GC-MS TQ 8030. Daun getih-getihan, etanol 96%, aquades, n-heksana, kloroform, etil asetat, pereaksi Liebermann-Burchard, kloroform p.a., n-heksana p.a., etanol p.a., benzena p.a., metanol p.a., plat silika gel 60 GF₂₅₄, silika gel 60 G, bakteri *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli*, tetrasiklin, DMSO, nutrient broth, nutrient agar.

Preparasi Sampel

Sampel daun getih-getihan basah sebanyak 22 kg dicuci, dikeringkan dengan cara diangin-anginkan, kemudian dihaluskan menggunakan blender sehingga diperoleh serbuk simplisia.

Isolasi Senyawa Steroid

Sebanyak 2,708 kg serbuk daun getih-getihan dimaserasi selama 24 jam menggunakan pelarut etanol 10 L dengan pergantian pelarut setiap 24 jam sekali. Ekstrak yang diperoleh kemudian dipekatkan dengan rotary evaporator, sehingga diperoleh ekstrak pekat etanol. Kemudian ekstrak pekat etanol dihilangkan klorofil dengan penambahan aquades (1:1) ke dalam ekstrak pekat etanol didiamkan selama 24 jam dan dilakukan penyaringan. Ekstrak etanol-aquades hasil

penyaringan dipartisi menggunakan pelarut n-heksana, kemudian ekstrak n-heksana dipekatkan dengan rotary evaporator hingga diperoleh ekstrak n-heksana sebanyak 2,4 gram. Selanjutnya dilakukan uji steroid menggunakan pereaksi Liebermann-Burchard.

Penapisan Fitokimia Berdasarkan Harborne [9]

Uji Saponin

Sebanyak 2 mL ekstrak etanol ditambahkan 2 mL aquades, kemudian dikocok kuat secara vertikal dan ditambahkan HCl. Adanya saponin ditunjukkan dengan timbulnya busa yang tetap stabil dalam larutan setelah penambahan HCl.

Uji Flavonoid

Sebanyak 2 mL ekstrak etanol ditambahkan serbuk Mg, 1 mL HCl 2M dan 2 mL amilalkohol, dilakukan pengocokkan. Adanya perubahan warna larutan menjadi kuning menunjukkan adanya flavonoid.

Uji Alkaloid

Sebanyak 2 mL ekstrak etanol ditambahkan ammonia 25% dan ditambahkan kloroform. Kemudian diekstraksi dengan HCl 10%. Selanjutnya ditambahkan pereaksi dragendroff. Adanya endapan merah menunjukkan adanya alkaloid.

Uji Triterpenoid

Sebanyak 2 mL ekstrak etanol ditambahkan 2 mL n-heksana, dikocok. Lapisan n-heksana ditambahkan pereaksi Liebermann-Burchard. Adanya perubahan warna menjadi merah menunjukkan adanya triterpenoid.

Uji Steroid

Sebanyak 2 mL ekstrak etanol ditambahkan 2 mL n-heksana, dikocok. Lapisan n-heksana ditambahkan pereaksi Liebermann-Burchard. Adanya perubahan warna menjadi biru kehijauan menunjukkan adanya steroid.

Uji Tanin

Sebanyak 2 mL ekstrak etanol ditambahkan 2 mL FeCl₃ 1%, kemudian dilakukan pengocokkan. Adanya perubahan warna larutan menjadi coklat kehitaman menunjukkan adanya tanin.

Pemisahan Senyawa Steroid

Kromatografi Lapis Tipis (KLT)

Ekstrak n-heksana dilakukan kromatografi lapis tipis untuk mengetahui jumlah komponen senyawa dalam ekstrak dan menentukan eluen yang cocok untuk kromatografi kolom. Eluen yang digunakan yaitu n-heksana, kloroform, dan campuran eluen n-heksana: kloroform (2:7), n-heksana: kloroform (3:7), n-heksana: kloroform (2:8).

Kromatografi Kolom

Ekstrak kental n-heksana dipisahkan menggunakan kromatografi kolom. Silika gel 60G digunakan sebagai fasa diam dan eluen n-heksana, kloroform, etil asetat yang dialirkan secara gradien berdasarkan peningkatan

kepolaran dan ditampung dalam vial tiap 15 mL. Fraksi-fraksi hasil kolom selanjutnya di KLT untuk mengelompokkan senyawa menjadi fraksi-fraksi besar (A, B, C, D, E). Fraksi (A, B, C, D, E) selanjutnya dilakukan pengujian steroid menggunakan KLT dengan penampak bercak Liebermann-Burchard untuk menunjukkan fraksi positif steroid.

KLT Preparatif

Fraksi positif steroid dipisahkan menggunakan metode KLT preparatif dengan fasa diam silika gel dan eluen n-heksana: kloroform (8: 2) dengan ketebalan silika gel 2 mm dan panjang lapisan 20 cm serta lebar 20 cm, sehingga diperoleh isolat steroid.

Uji Kemurnian

Isolat steroid hasil KLT preparatif dilakukan uji kemurnian untuk mengetahui kemurnian senyawa pada KLT yang ditunjukkan dengan adanya satu noda tunggal. Eluen yang digunakan yaitu n-heksana, benzena, metanol, n-heksana: metanol (1:1), n-heksana: kloroform (8:2), n-heksana:benzena (1:1) dan KLT dua dimensi dengan eluen n-heksana: kloroform (8:2) dan n-heksana.

Identifikasi Steroid

Isolat steroid selanjutnya diidentifikasi menggunakan spektroskopi GC-MS.

Uji Aktivitas Antibakteri

Pengujian aktivitas antibakteri dilakukan dengan metode difusi cakram terhadap bakteri gram positif (*Staphylococcus aureus*) dan bakteri gram negatif (*Escherichia coli*). Ekstrak n-heksana diuji berbagai konsentrasi (b/v) 62,5 ppm, 125 ppm, 250 ppm, 500 ppm, dan 1000 ppm. Untuk mengetahui efektivitas bakteri uji digunakan pembanding antibiotik yaitu tetrasiklin [10]. Isolat bakteri uji yang telah dikultur dalam *nutrient broth* diinokulasikan pada permukaan *nutrient agar* sebanyak 20 µL menggunakan *spreader*. Ekstrak n-heksana berbagai variasi ditetaskan pada kertas cakram, selanjutnya kertas cakram yang telah mengandung ekstrak diletakkan pada permukaan media inokulasi menggunakan pinset. Kemudian diinkubasi selama 24 jam pada suhu 37°C. Selanjutnya dilakukan pengukuran diameter zona hambat yang terbentuk diukur dengan jangka sorong.

3. Hasil Dan Pembahasan

Penelitian yang berjudul isolasi, identifikasi senyawa steroid dari daun getih-getihan (*Rivina humilis* L.) dan uji aktivitas sebagai antibakteri dilakukan di Laboratorium Kimia Organik dan Laboratorium Terpadu Universitas Diponegoro Semarang.

Preparasi Sampel

Daun getih-getihan yang sudah bersih dilakukan pengeringan untuk dijadikan simplisia dengan cara diangin-anginkan bertujuan untuk menghilangkan kadar air dan mencegah terjadinya kerusakan senyawa yang terkandung dalam sampel. Kemudian dijadikan

serbuk menggunakan blender bertujuan untuk memperluas permukaan sampel, sehingga pelarut lebih mudah masuk ke dalam jaringan daun dalam mengekstrak senyawa yang terdapat di dalamnya dan menghasilkan simplisia sebanyak 2,708 kg (rendemen 12,31%).

Isolasi Senyawa Steroid

Isolasi steroid dilakukan dengan metode maserasi menggunakan pelarut etanol menghasilkan ekstrak etanol berwarna hijau tua. Etanol merupakan pelarut universal yang berfungsi untuk mengambil semua senyawa organik yang terkandung dalam sampel daun getih-getihan karena pelarut etanol dapat masuk ke dalam jaringan tumbuhan, sehingga banyak senyawa yang terekstrak di dalamnya. Filtrat yang diperoleh dipekatkan dengan *rotary evaporator*, sehingga menghasilkan ekstrak pekat etanol sebanyak 40,25 g.

Ekstrak pekat etanol daun getih-getihan dilakukan penapisan fitokimia untuk mengetahui kandungan kimianya. Hasil pengujian menunjukkan daun getih-getihan mengandung senyawa fenolik, flavonoid, saponin, alkaloid, triterpenoid, steroid, dan tanin dapat dilihat pada tabel 1.

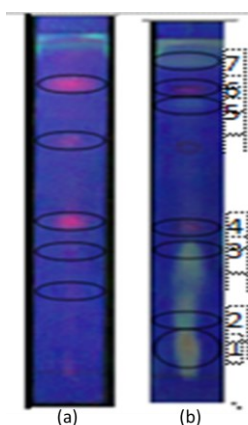
Tabel 1: Hasil penapisan fitokimia daun getih-getihan

Golongan	Ekstrak etanol
Fenolik	+
Flavonoid	+
Saponin	+
Alkaloid	+
Triterpenoid	+
Steroid	+
Tanin	+

Selanjutnya ekstrak pekat etanol dihilangkan klorofilnya dengan penambahan aquades (1:1). Hal ini bertujuan untuk memudahkan isolasi senyawa steroid yang terkandung di dalamnya karena klorofil merupakan senyawa pengotor. Filtrat etanol-aquades selanjutnya dipartisi dengan pelarut n-heksana untuk mengambil senyawa non polar, seperti steroid dan triterpenoid.

Ekstrak pekat n-heksana yang diperoleh dilakukan identifikasi dengan pereaksi Liebermann-Burchard (LB) yang menghasilkan warna biru kehijauan yang menunjukkan adanya senyawa steroid.

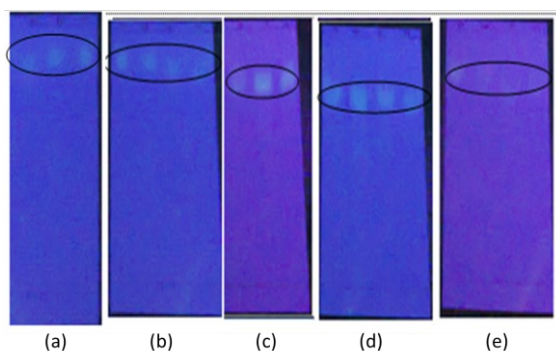
Untuk mengetahui jumlah komponen senyawa yang terdapat dalam fraksi n-heksana dilakukan metode kromatografi lapis tipis (KLT). Fasa diam yang digunakan adalah silika gel 60F₂₅₄ dan eluen n-heksana: kloroform (2:8) diperoleh 7 noda pada gambar 1.



Gambar 1. Hasil KLT fraksi n-heksana:kloroform (2:8) dengan pereaksi Liebermann-Burchard dilihat di bawah lampu UV 365 nm

Pemisahan Senyawa Steroid

Pemisahan senyawa dengan kromatografi kolom menghasilkan 189 vial. Selanjutnya dilakukan KLT fraksi-fraksi hasil kolom untuk mengelompokkan pola noda yang sama. Dari vial-vial hasil kolom diperoleh 5 fraksi besar (A, B, C, D, E). Hasil KLT penggabungan fraksi-fraksi hasil kolom dapat dilihat pada gambar 2.



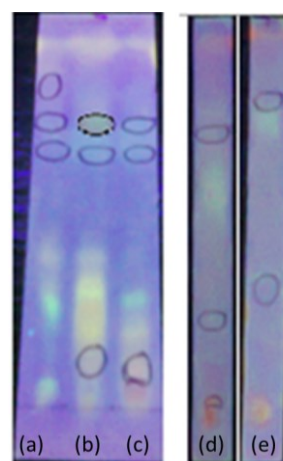
Gambar 2. Hasil penggabungan fraksi-fraksi hasil kolom dengan eluen etanol:aseton (2:1) dilihat di bawah lampu UV 365 nm

Nilai Rf hasil penggabungan fraksi-fraksi hasil kolom dapat dilihat pada tabel 2.

Tabel 2: Data penggabungan fraksi-fraksi hasil kromatografi kolom

Fraksi	Vial	Rf
A	21-60	0,87
B	61-115	0,83
C	116-135	0,77
D	136-164	0,67
E	165-189	0,81

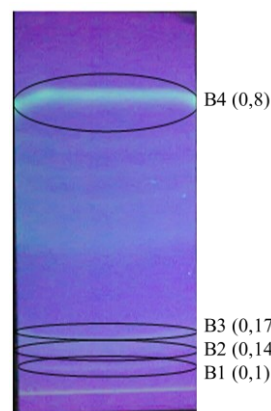
Dari masing-masing fraksi A, B, C, D, E yang diperoleh selanjutnya dianalisis kembali menggunakan KLT untuk mengetahui adanya senyawa steroid. Fraksi yang mengandung steroid ditunjukkan dengan noda berwarna biru kehijauan setelah disemprot pereaksi Liebermann-Burchard (LB). Hasil KLT fraksi A, B, C, D, E, dengan LB ditunjukkan pada gambar 3.



Gambar 3. Hasil KLT fraksi A, B, C, D, E pada uji steroid dengan pereaksi Liebermann-Burchard dilihat di bawah lampu UV 365 nm

Dari hasil KLT gambar 3, fraksi B terlihat ada noda yang berwarna biru kehijauan setelah disemprot dengan pereaksi Liebermann-Burchard yang menunjukkan fraksi B positif steroid.

Selanjutnya fraksi B dilakukan kromatografi preparatif untuk memisahkan isolat steroid menggunakan eluen terbaik campuran n-heksana:kloroform (8:2) menggunakan fasa diam silika gel dengan ketebalan silika gel 2 mm dan panjang lapisan 20 cm serta lebar 20 cm. Hasil KLT preparatif fraksi B dapat dilihat pada gambar 4.

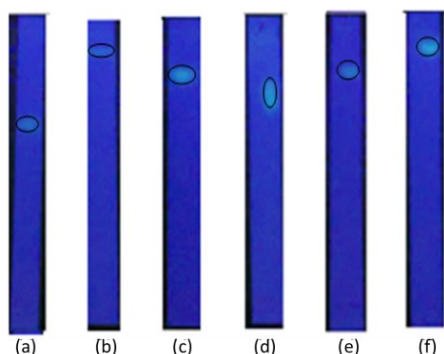


Gambar 4. Hasil KLT preparatif fraksi B dilihat di bawah lampu UV 365 nm

Hasil KLT preparatif menunjukkan adanya 4 pita (B1, B2, B3, B4). Pita B4 dengan Rf 0,8 berwarna biru terang mengindikasikan adanya senyawa steroid. Kemudian pita B4 dikerok dan dilarutkan dalam n-heksana pro analis untuk mendapatkan isolat steroid setelah dipisahkan dengan silika gel dan diuapkan, diperoleh isolat steroid sebanyak 0,3 mg. Selanjutnya untuk mengetahui kemurnian isolat yang diperoleh dilakukan uji kemurnian dengan metode KLT berbagai eluen dan KLT dua dimensi.

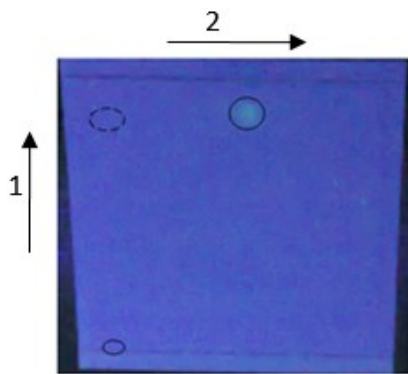
Isolat steroid dilakukan uji kemurnian dengan metode KLT berbagai eluen dan KLT dua dimensi. Eluen yang digunakan yaitu n-heksana, benzena, metanol, n-heksana: metanol (1:1), n-heksana: kloroform (8:2), n-

heksana: benzena (1:1). KLT dua dimensi dielusi dengan eluen pertama n-heksana: kloroform (8:2) dan kedua n-heksana untuk mengetahui apakah steroid dari hasil kromatografi preparatif sudah murni. Uji kemurnian didapatkan satu noda yang diduga isolat telah murni, ditunjukkan pada gambar 5.



Gambar 5. Hasil KLT pada uji kemurnian pita B4 hasil kromatografi preparatif dengan eluen: (a) n-heksana, (b) benzena, (c) metanol, (d) n-heksana:metanol (1:1), (e) n-heksana:kloroform (8:2), (f) n-heksana:benzena (1:1) pada lampu UV 365 nm

Uji kemurnian dilakukan kembali dengan KLT dua dimensi menggunakan eluen yang berbeda pada elusi pertama dan kedua. Elusi pertama dilakukan menggunakan eluen n-heksana: kloroform (8:2) dan setelah diputar 90o elusi kedua menggunakan eluen n-heksana. Hasil KLT dua dimensi ditunjukkan pada gambar 6.



Gambar 6. Hasil uji kemurnian KLT dua dimensi dengan eluen (1) n-heksana:kloroform (8:2) dan (2) n-heksana pada lampu UV 365 nm

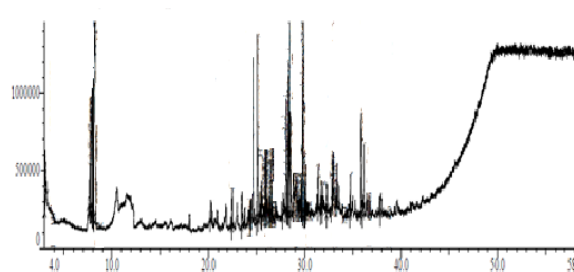
Hasil uji kemurnian KLT dua dimensi menghasilkan satu noda pada setiap elusinya. Hal ini menunjukkan bahwa isolat diduga telah murni. Isolat yang dihasilkan berbentuk kristal kecil-kecil berwarna putih sebesar 0,3 mg.

Selanjutnya isolat diidentifikasi menggunakan spektroskopi GC-MS untuk mengetahui tingkat kemurnian senyawa dan waktu retensi serta mengetahui berat molekul dan pola fragmentasi dari isolat.

Identifikasi Steroid dengan GC-MS

Isolat steroid diidentifikasi dengan GC-MS TQ8030 Shimadzu. Alat GC-MS menggunakan kolom jenis Rtx-

5MS dengan panjang 30 meter dan diameter internal 0,25mm. Gas pembawa yang digunakan adalah helium. Kondisi alat GC-MS yang digunakan yaitu temperatur injektor 200°C, tekanan 86,2 kPa, aliran total 929,3 mL/menit, temperatur kolom terprogram 100oC selama 5 menit kemudian dinaikkan temperaturnya sebesar 50C/menit. Hasil analisis GC isolat steroid dapat dilihat pada gambar 7.



Gambar 7. Kromatogram isolat steroid daun getih-getihan

Berdasarkan hasil kromatogram pada gambar 7 diperoleh 50 puncak senyawa yang menunjukkan bahwa isolat steroid belum murni dan tidak menunjukkan adanya senyawa steroid, sehingga belum mewakili isolat senyawa hasil isolasi. Kemungkinan hal tersebut terjadi karena kondisi operasional alat yang belum optimal sehingga senyawa steroid belum keluar dan belum bisa diketahui jenis steroidnya.

Uji Aktivitas Antibakteri

Uji antibakteri dari ekstrak n-heksana dilakukan terhadap bakteri *Escherichia coli* mewakili gram negatif dan *Staphylococcus aureus* mewakili gram positif. Pengujian dilakukan menggunakan metode difusi cakram dengan berbagai variasi konsentrasi (b/v) yaitu 62,5 ppm, 125 ppm, 250 ppm, 500 ppm, dan 1000 ppm.

Jumlah koloni bakteri *Escherichia coli* dan *Staphylococcus aureus* diatur menggunakan standar Mc Farland 0,5. Selanjutnya dilakukan pengujian ekstrak n-heksana terhadap kedua bakteri uji yang telah divariasikan konsentrasinya dan diinkubasi selama 24 jam. Selanjutnya dilakukan pengukuran diameter zona bening yang menghambat pertumbuhan bakteri. Hasil pengujian aktivitas antibakteri dapat dilihat pada tabel 3.

Tabel 3. Hasil pengujian aktivitas antibakteri ekstrak terhadap bakteri uji

Konsentrasi ekstrak uji	Diameter hambatan (mm)	
	<i>E.coli</i>	<i>S. aureus</i>
62,5 ppm	-	1,05
125 ppm	-	1,9
250 ppm	-	6,15
500 ppm	1,5	6,3
1000 ppm	9,85	6,5
Tetrasiklin 100 ppm (kontrol positif)	26	26
DMSO (kontrol negatif)	-	-

Hasil pengujian antibakteri pada tabel 3 dapat diketahui bahwa ekstrak n-heksana memiliki aktivitas antibakteri pada bakteri *Escherichia coli* dan *Staphylococcus aureus*. Aktivitas antibakteri ekstrak n-heksana terhadap bakteri *Escherichia coli* dan *Staphylococcus aureus* menghambat pertumbuhan bakteri pada konsentrasi 1000 ppm.

Terminalia muelleri Benth. Against *Staphylococcus aureus*, *International Journal of Pharmacology*, 6, 4, (2010) 407-412

4. Kesimpulan

Isolat steroid telah diisolasi dari daun getih-getihan berbentuk kristal kecil-kecil berwarna putih. Struktur isolat steroid dengan spektroskopi GC-MS belum dapat ditentukan. Ekstrak n-heksana daun getih-getihan dapat menghambat pertumbuhan bakteri *Escherichia coli* dan *Staphylococcus aureus* pada konsentrasi 1000 ppm.

5. Daftar Pustaka

- [1] Mohammad Imtiyaj Khan, K. M. Denny Joseph, Muralidhara, H. P. Ramesh, P. Giridhar, G. A. Ravishankar, Acute, subacute and subchronic safety assessment of betalains rich *Rivina humilis* L. berry juice in rats, *Food and Chemical Toxicology*, 49, 12, (2011) 3154-3157
<http://dx.doi.org/10.1016/j.fct.2011.08.022>
- [2] Mujeera Fathima, F Tilton, Phytochemical analysis and antioxidant activity of leaf extracts of *Rivina humilis* L, *International Journal of Current Research*, 4, (2012) 326-330
- [3] Antonnacci Salvat, L Antonnacci, Renee Hersilia Fortunato, Enrique Ysidro Suárez, HM Godoy, Screening of some plants from Northern Argentina for their antimicrobial activity, *Letters in applied microbiology*, 32, 5, (2001) 293-297
<http://dx.doi.org/10.1046/j.1472-765X.2001.00923.x>
- [4] Roman Kubec, Seokwon Kim, Rabi A. Musah, The lachrymatory principle of *Petiveria alliacea*, *Phytochemistry*, 63, 1, (2003) 37-40
[http://dx.doi.org/10.1016/S0031-9422\(02\)00759-8](http://dx.doi.org/10.1016/S0031-9422(02)00759-8)
- [5] P Sugita, Latifah K Darusman, Tuti Setiawati, Steroid dari Ekstrak *Hopea* mengawan sebagai Bahan Baku Insektisida Bologis, *J. Buletin Kimia (2000)*, (2000) 37-41
- [6] S Lalitha, K Rajeshwaran, P Senthil Kumar, K Deepa, K Gowthami, In vivo screening of antibacterial activity of *Acacia mellifera* (BENTH)(Leguminosae) on human pathogenic bacteria, *Global Journal of Pharmacology*, 4, 3, (2010) 148-150
- [7] Fajar Budi Laksono, Enny Fachriyah, Dewi Kusriani, Isolasi dan Uji Antibakteri Senyawa Terpenoid Ekstrak N-Heksana Rimpang Lengkuas Merah (*Alpinia purpurata*), *Jurnal Kimia Sains dan Aplikasi*, 17, 2, (2014) 37-42
- [8] R Saraswathi, Upadhyay Lokesh, R Venkatakrishnan, R Meera, P Devi, Isolation and biological evaluation of steroid from stem of *Costus igneus*, *Journal of Chemical and Pharmaceutical Research*, 2, 5, (2010) 444-448
- [9] Jeffrey Barry Harborne, Metode fitokimia, Padmawinata K, S. I, Institut Teknologi Bandung, Bandung, 1987.
- [10] K Anam, AG Suganda, EY Sukandar, L Broto S Kardono, Antibacterial effect of component of

IDENTIFIKASI DAN PENETAPAN KADAR SENYAWA KUMARIN DALAM EKSTRAK METANOL *Artemisia Annu L.* SECARA KROMATOGRAFI LAPIS TIPIS – DENSITOMETRI

Sukmayati Alegantina dan Ani Isnawati

Pusat Penelitian dan Pengembangan Biomedis dan Farmasi, Jakarta

IDENTIFICATION AND SETTING LEVEL COUMPOUNDS FOR KUMARIN IN THE METANOL EXTRACT *Artemisia Annu L.* BY THIN LAYER CHROMATOGRAPHY - DENSITOMETRY

Abstract. *Artemisia annua L.* contain the active compounds include: terpenoids, flavonoids, kumarin, artemisinin acid, artemisinin B, phenols, saponins, and fat. Kumarin and its derivatives have biological activity that can stimulate skin pigment, blood anticoagulation and can inhibit the effects of carcinogens. With this biological activity of kumarin, the research is done to ensure there is kumarin by identification and measure kumarin level which is contained in the *Artemisia annua L.* herb. The analysis methods include the extraction and fractionation. Identification and determination of level with Thin-Layer Chromatography (TLC) using a Densitometer CS-9301 PC. From the result of TLC identification of kumarin standard known that *Artemisia annua L.* extract contain kumarin compound which marked by a blue spot fluorescence on standards and methanol extract of *Artemisia annua L.* seeing under UV light at a wavelength of 366 nm with Rf value of standard and sample is 0.31, the measurement of kumarin spot with Densitometer known that kumarin concentration in the extract of *Artemisia annua L.* is 10.5 ul / ml with 105% Recovery

Keywords: *Artemisia annua L.*, kumarin, TLC-Densitometry

PENDAHULUAN

Tanaman herbal mempunyai berbagai manfaat untuk penyembuhan dalam pengobatan secara tradisional karena kandungan senyawa aktif dan khasiat yang terkandung di dalamnya. Dimana setiap satu tanaman herbal memiliki banyak senyawa aktif dan berkhasiat di dalamnya seperti pada tanaman herbal *Artemisia annua L.* yang memiliki kandungan senyawa terpenoid, flavonoid, kumarin, artemisinin acid, artemisinin B, fenol, saponin dan lemak. ^(1,2,3) Kumarin adalah senyawa fenol yang pada umumnya ber-

asal dari tumbuhan tinggi dan jarang sekali ditemukan pada mikroorganisme. Kumarin ditemukan hampir di setiap bagian tumbuh-tumbuhan mulai dari akar, batang, daun sampai bunga dan juga buah. ⁽⁴⁾ Kumarin banyak terdapat dalam bentuk glikosida dimana bau yang didapat dari pengeringan seperti bau jerami mencirikan terjadinya hidrolisis glikosida senyawa tersebut. Kumarin dapat dianggap suatu laktone dari suatu senyawa fenolik yaitu ortokumarin (asam orto hidroksi sinamat), apabila gugus fenoliknya terikat dengan molekul glukosa maka terbentuk glikosida yang merupakan kumarin terikat 6.

Kumarin sederhana merupakan fenilpropanoid yang mengandung cincin benzen C6 dengan rantai samping rantai alifatik C3.^(5,6) Senyawa kumarin dan turunannya banyak memiliki aktifitas biologis diantaranya sebagai antikoagulan darah, antibiotik dan ada juga yang menunjukkan aktifitas menghambat efek karsinogenik, selain itu kumarin juga digunakan sebagai bahan dasar pembuatan parfum dan sebagai bahan fluoresensi pada industri tekstil dan kertas.^(7, 8, 9)

Biosintesis kumarin (bentuk lakton) terutama konfigurasi sisinya (asam kumarinat) karena bentuk trans (asam kumarat) lebih stabil. Bentuk glikosida dapat terjadi dari trans ke cis karena adanya penyinaran matahari^(6, 5). Kumarin dan turunannya banyak memiliki aktifitas biologis diantaranya dapat menstimulasi pembentukan pigmen kulit, mempengaruhi kerja enzim, antikoagulasi darah, antimikroba dan menunjukkan aktifitas menghambat efek karsinogen.⁽⁷⁾ polisiklik sebagai senyawa turunan kumarin aktif sebagai antikarsinogen yang disebabkan hidrokarbon aromatik polisiklik karsinogen seperti 6-metil(α) piran.⁽¹⁰⁾ Kumarin dan turunannya seperti metilcoumarin dan etilcoumarin dapat digunakan dalam pengobatan dan parfum.

Kumarin terdapat dalam beberapa tanaman dengan nama yang berbeda tetapi mempunyai dasar sama (berbeda dalam gugus pengganti pada inti kumarin)^(8, 11). Kumarin berbentuk kristal keping (plat) runcing, berbau harum, dapat mencair pada suhu 68 – 70° C dan mendidih pada 297° C sampai 299° C. Kelarutan kumarin dalam 1 gram larut dalam 50 cc air mendidih, dapat juga larut dalam alkohol, kloroform, eter, larutan alkali hidroksida.^(6, 7, 12)

Dengan banyaknya manfaat dan kegunaan yang dimiliki kumarin beserta turunannya, maka dilakukan ekstraksi

untuk mengidentifikasi dan mengukur kadar dari kumarin tersebut di dalam herba *artemisia annua* L. yang mana nantinya dapat digunakan sebagai anti koagulasi darah, menghambat efek karsinogen dll.

BAHAN DAN CARA

Bahan

Bahan yang digunakan dalam penelitian ini adalah simplisia herba *Artemisia annua* L. yang sudah siap untuk dipanen dan baku kumarin sebagai pembandingan. Pelarut yang digunakan untuk ekstraksi adalah metanol teknis, diklormethan teknis dan diklormetan p.a. Untuk identifikasi dan penetapan kadar kumarin digunakan plat silica gel 60 GF254 E Merck dengan eluen n-hexana p.a, etil asetat p.a

Alat

Peralatan yang digunakan adalah soklet dengan pendingin balik, peralatan gelas yang biasa digunakan seperti corong pisah, erlenmeyer, labu takar, chamber sebagai wadah untuk elusidasi, penimbangan menggunakan timbangan merek Precisa XT 220 A. Untuk menarik pelarut digunakan Rotary evaporator Bu"CHI R-114 dan untuk mengeringkan ekstrak sehingga di dapat ekstrak kental digunakan Waterbath SBS, oven merk Heraeus digunakan untuk mengaktifkan plat KLT sebelum digunakan, sedangkan untuk mendeteksi hasil KLT digunakan pendeksi lampu UV dengan panjang gelombang 254 nm dan 366 nm dan selanjutnya diukur kadar kumarin dengan menggunakan alat Densitometer Shimadzu CS-9301 PC.

CARA KERJA^(13, 14, 15, 16, 17)

1. Pengambilan sampel

Simplisia *Artemisia annua* L. berasal dari Balai Besar Penelitian dan

pengembangan Tanaman Obat (B2P2TO2T) Tawangmangu diambil pada waktu tanaman berbunga berumur 6 bulan, sampel dibersihkan dari kotoran, dirajang dan dikeringkan dengan cara menjemur tetapi tidak terkena sinar matahari langsung, setelah kering simplisia di-blender dan diayak dengan ayakan ukuran 40 mesh sehingga diperoleh serbuk.

2. Determinasi tumbuhan

Simplisia *Artemisia annua* L. Di-determinasi di B2P2TO2T Tawangmangu Solo Jawa Tengah.

3. Preparasi sampel

a. Ekstraksi

- Sampel diekstraksi dengan menggunakan alat soklet pendingin balik menggunakan pelarut metanol dengan penggantian sehari sebanyak 2 kali sampai semua sari terekstrak, ini ditunjukkan dengan larutan yang sudah tidak berwarna lagi (bening).
- Ekstrak yang didapat kemudian dipekatkan dengan menggunakan rotary evaporator sampai ekstrak mengental.
- Ekstrak lalu dikeringkan dengan menggunakan waterbath pada suhu 40-45° C sampai didapat ekstrak dengan masa kental
- Ekstrak kental tersebut ditimbang dan dihitung rendemennya

b. Fraksinasi

- Ekstrak kental ditimbang lalu dilarutkan dengan menggunakan akuades hangat sampai semua ekstrak larut.
- Ekstrak yang telah larut di masukkan ke dalam corong pisah 500 ml kemudian ditambahkan

pelarut diklormetan sampai terbentuk 2 lapisan lalu dipisahkan antara fraksi diklormetan yang berwarna hijau pekat dengan fraksi metanol-air yang berwarna coklat muda. dilakukan KLT pada masing-masing fraksi.

4. Identifikasi kumarin

- Timbang dengan teliti ekstrak kental sebanyak 26.5 gram
- Ekstrak kental ditambahkan akuades hangat sampai larut, ekstrak dimasukkan kedalam corong pisah 500 ml
- Ekstrak difraksinasi dengan pelarut diklormetan kemudian dikocok sampai membentuk 2 fraksi yaitu fraksi atas metanol-air dan fraksi bawah diklormetan, endapan ekstrak.
- Larutan yang mengandung fraksi diklormetan dipekatkan menggunakan rotavapor dari fraksi sebanyak 500 ml menjadi 100 ml.
- Siapkan peralatan untuk kromatografi lapis tipis (KLT) yaitu chamber, fase diam plat silica gel GF254 dan fase gerak menggunakan campuran n-hexana dengan etil asetat secara gradien, sebelum digunakan fase diam plat silica gel GF254 di oven dahulu selama 30 menit dan fase gerak dijenuhkan kira-kira selama 1 jam sebelum dilakukan proses KLT
- Masing-masing fraksi dilakukan KLT dengan cara menginjeksikan sampel menggunakan syringe 5-50 µL pada fase diam plat silica gel GF254, lalu plat dimasukkan kedalam chamber yang telah diisi fase gerak n Hexana : etil asetat, kemudian ditutup rapat ditunggu sampai elusi selesai, proses elusidasi fase gerak dilakukan berkali-kali (1:1), (1:2), (2:1), (2:2), (3:1), (4:1), (7:2), (7:3), (8:2), (8:2)

sampai didapat hasil dimana kumarin terpisah baik, berfluorisensi dan nilai Rf sama dengan standar. Nilai Rf dapat didefinisikan sebagai jarak yang ditempuh oleh senyawa dari titik asal dibagi dengan jarak yang ditempuh oleh pelarut dari titik asal. Oleh karena itu bilangan Rf selalu lebih kecil dari 1,0.

- Identifikasi dilakukan dengan jalan membandingkan nilai Rf sampel dan bercak hasil KLT dengan Rf dan bercak dari standart.
- Fase diam hasil KLT dideteksi menggunakan detektor UV pada panjang gelombang 366 nm.

5. Recovery

- Sebanyak 10 ml larutan yang mengandung fraksi metanol-air dimasukkan kedalam corong pisah 500 ml
- Fraksi methanol-air ditambahkan 1 ml standar kumarin baku dengan konsentrasi 200 ppm difraksinasi dengan menggunakan 10 ml pelarut diklormethan p.a. kemudian dikocok sampai membentuk 2 fraksi yaitu fraksi methanol-air dan fraksi diklormethan-standar.
- Pada fraksi diklormethan dilakukan uji KLT dengan eluen hexan p.a dan etil asetat p.a. pada perbandingan 2:2
- Pada fase diam hasil KLT dideteksi menggunakan detektor UV pada panjang gelombang 366 nm.
- Lakukan pengukuran pada bercak hasil KLT dengan densitometer, hasil pengukuran dihitung dengan menggunakan rumus

C yang didapat

% perolehan kembali = ----- x 100%

C yang ditambahkan x 100%

Keterangan : C= Konsentrasi

6. Penetapan Kadar Kumarin

- Buat larutan standar dari baku kristal kumarin, ditimbang sebanyak 5 mg baku kumarin dilarutkan dengan 5 ml diklormethan p.a
- Pada fraksi diklormethan dan standar baku kumarin dilakukan uji KLT menggunakan fase diam silica gel GF 254 dan fase gerak campuran n-hexana : etil asetat dengan perbandingan 2:2.
- Sampel diinjeksikan pada plat silika gel GF254 sebanyak 50 μ L dan standar sebanyak 4 μ L, 8 μ L, 12 μ L, 16 μ L, 20 μ L, plat dimasukan kedalam chamber yang telah terisi larutan jenuh dengan posisi berdiri, ditunggu sampai proses elusi selesai, plat diangkat dan dikeringkan
- Hasil KLT dideteksi menggunakan detektor UV pada panjang gelombang 366 nm, Selanjutnya dilakukan penetapan kadar kumarin dalam sampel dengan alat densitometer.

HASIL

Determinasi

Determinasi tanaman pada penelitian ini dilakukan di B2P2T02T Tawangmangu Solo, diketahui bahwa tanaman ini termasuk ke dalam suku *Asteraceae* genus / marga *Artemisia* dan spesies *Artemisia annua*,

Ekstraksi

Ekstraksi menggunakan alat soklet dengan pendingin balik karena pada proses ini terjadi ekstraksi kontinyu dengan

jumlah pelarut yang relatif konstan dan selalu baru, ekstraksi menggunakan pelarut metanol karena metanol merupakan pelarut general sehingga senyawa aktif yang terkandung didalam tanaman herbal *artemisia annua* L. akan terekstrak semua. Hasil ekstraksi didapat sebanyak 13,7 liter ekstrak yang berasal dari 485 gram serbuk tanaman *artemisia annua* L.

Pemekatan / Penguapan

Dari proses pemekatan/penguapan di dapat ekstrak kental seberat 106,3206 gram dengan rendemen sebesar 21.92 % dari 485 gram serbuk simplisia *artemisia annua* L. (Tabel 1) .

Fraksinasi

Penarikan zat aktif kumarin dilakukan melalui proses fraksinasi dengan menggunakan diklormethan, dipilih pelarut diklormethan karena merupakan pelarut yang dapat melarutkan senyawa kumarin dengan sempurna. Dari hasil fraksinasi di dapat 2 lapisan, lapisan atas terdapat fraksi metanol-air yang berwarna coklat dan pada lapisan bawah terdapat fraksi diklormetan yang berwarna hijau pekat. Pada fraksi diklormetan yang mengandung kumarin dilakukan analisis untuk penetapan kadar

kumarin. Sedangkan fraksi yang tidak mengandung kumarin disimpan untuk uji recovery

Identifikasi kumarin

Identifikasi kumarin dalam ekstrak *artemisia annua* L. dilakukan dengan menginjeksikan larutan standar kumarin, larutan yang mengandung fraksi diklormetan, larutan yang mengandung fraksi metanol-air pada plat kromatografi lapis tipis (KLT) dengan elusidasi menggunakan fase gerak campuran n-hexana : etil asetat dengan perbandingan 2:2, sehingga didapat nilai Rf, bercak dan warna yang sama dari dari masing-masing larutan kemudian dibandingkan dengan nilai Rf bercak serta warna dari standar kumarin. Hasil deteksi dengan menggunakan lampu UV, pada KLT diketahui kumarin positif terdapat pada fraksi diklormethan karena memiliki nilai Rf, bentuk dan warna yang sama dengan larutan standar yaitu 0,31. Kumarin terdeteksi dengan flourisensi biru pada panjang gelombang 366 nm.

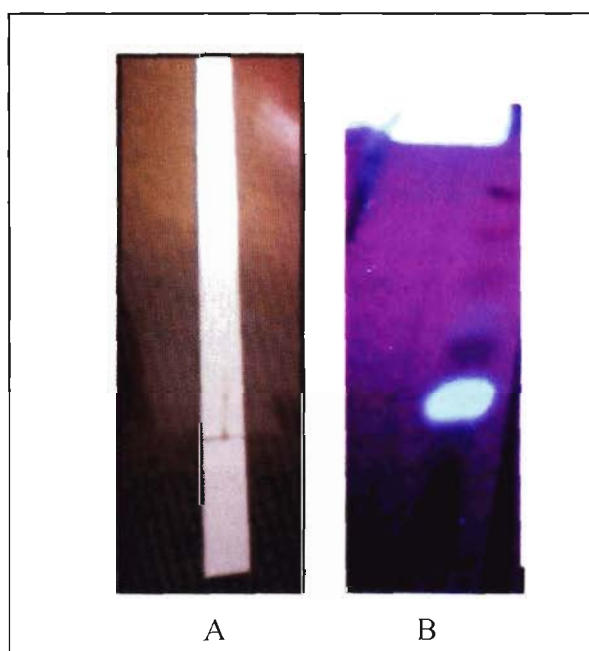
Data yang diperoleh dari hasil KLT adalah nilai Rf yang berguna untuk identifikasi senyawa (Tabel 2).

Tabel 1. Hasil Proses Pemekatan / penguapan ekstrak metanol *Artemisia annua* L.

No	Proses	Alat yang Digunakan	Warna	Bentuk	Keterangan
1	Pemekatan	Rorary Evaporator	Hijau	Cair	sebelum dirotav ekstrak sebanyak 13,7 L
2	Pemekatan	Rotary evaporator	Hijau pekat	sedikit kental	setelah dirotav Ekstrak menjadi 1,500 L
3	Penguapan	Waterbath	Hijau pekat	Cair	sebelum di waterbath
4	Penguapan	Waterbath	Hijau kehitaman	kental	Setelah diwaterbath

Tabel 2. Identifikasi kumarin secara Kromatografi lapis tipis dengan Pengembang n-heksan: etil asetat (2:2)

No	Larutan	Hasil KLT pada panjang gelombang 366 nm		Keterangan
		Rf	Warna	
1	Standar baku kumarin	0.31	Biru flourisensi	Berbentuk bulat
2	Fraksi diklormethan	0.31	Biru flourisensi	Berbentuk bulat
3	Fraksi methanol-air	-	-	berbentuk bercak hitam



Keterangan :

A = Plat kromatogram KLT tanpa disinari lampu

B = Plat kromatogram KLT dengan disinari lampu UV pada panjang gelombang 366 nm

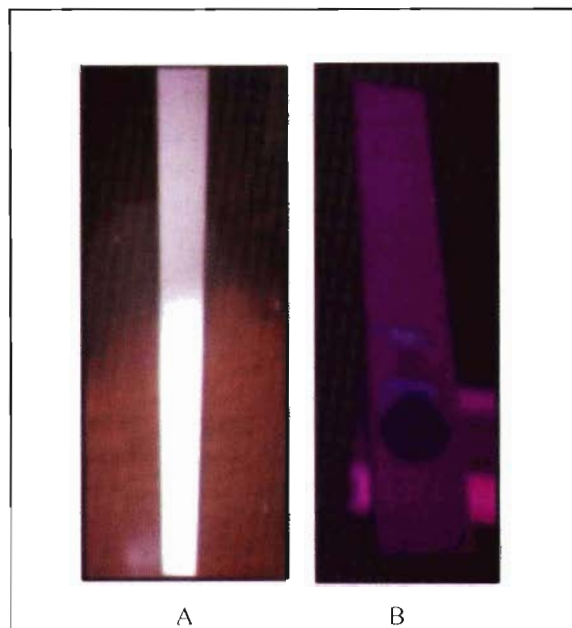
Gambar 1. Kromatogram KLT Hasil Pemisahan pada Fraksi Diklormetan

Hasil kromatogram pada fraksi diklormetan pada plat Kromatografi lapis tipis (KLT) dengan pengembang n-heksan : etil asetat pada perbandingan 2:2 tanpa penyinaran dan dengan penyinaran lampu UV pada panjang gelombang 366 nm (Gambar 1)

Hasil kromatogram pada fraksi metanol-air pada plat KLT dengan pe-

ngembang n-heksan : etil asetat pada perbandingan 2:2 tanpa penyinaran dan dengan penyinaran lampu uv pada panjang gelombang 366 nm (Gambar 2)

Hasil kromatogram standar kumarin pada plat hasil KLT dengan pengembang n-heksan : etil asetat pada perbandingan 2:2 tanpa penyinaran dan dengan penyinaran lampu uv pada panjang gelombang 366 nm (Gambar 3)

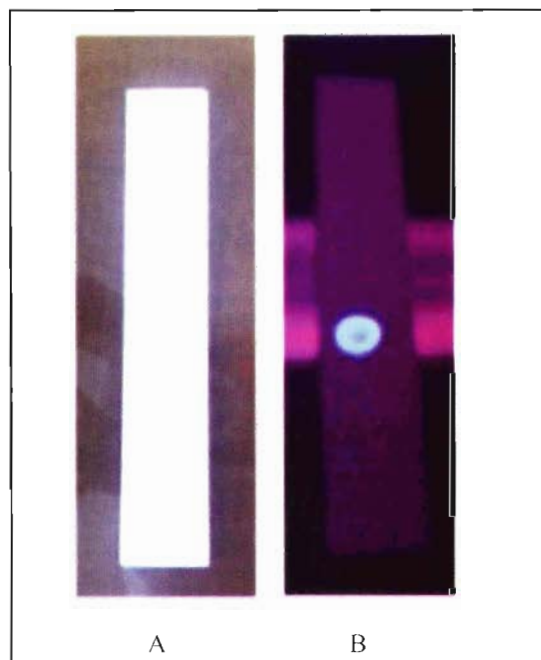


Keterangan :

A= Plat kromatogram KLT tanpa disinari lampu

B = Plat kromatogram KLT dengan disinari lampu UV pada panjang gelombang 366 nm

Gambar 2. Kromatogram KLT Hasil Pe misahan pada Fraksi metanol-air



Keterangan :

A = Plat kromatogram KLT tanpa disinari lampu

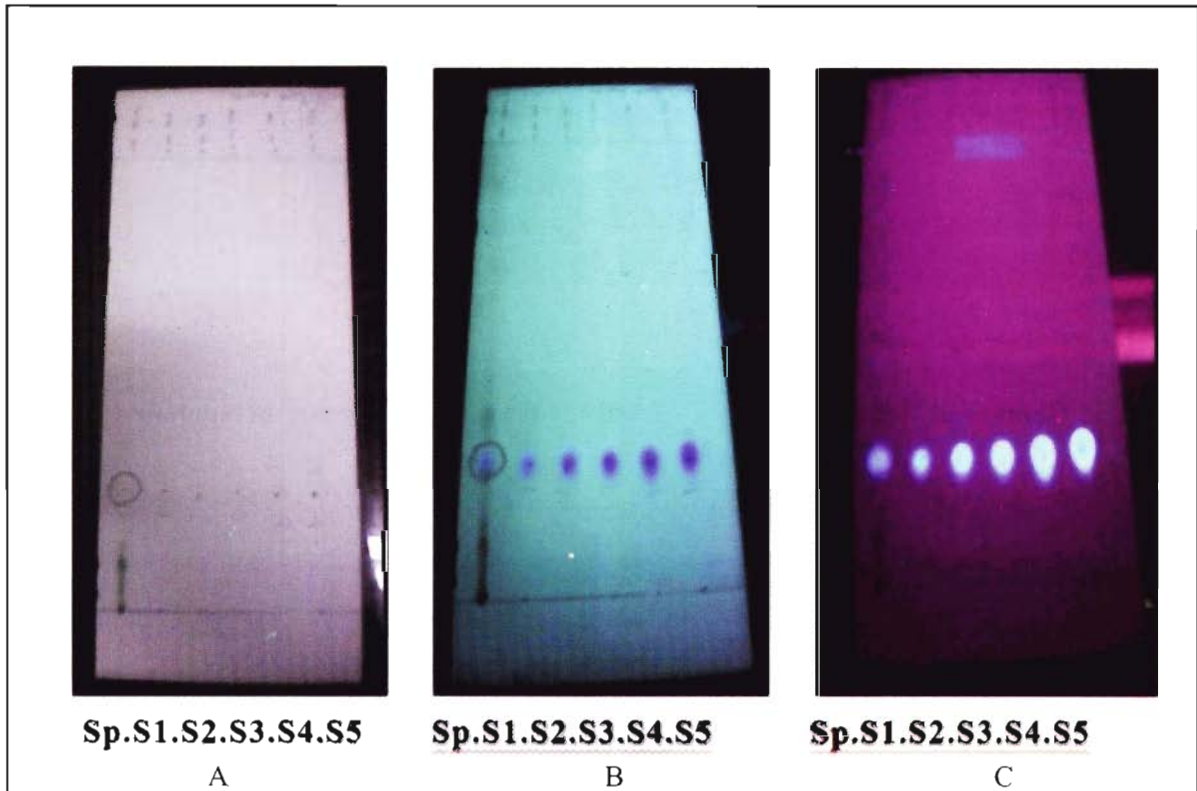
B = Plat kromatogram KLT dengan disinari lampu UV pada panjang gelombang 366 nm

Gambar 3 Kromatogram KLT pada standar baku kumarin

Jika dilihat pada Gambar 1, 2 dan 3 maka dapat diketahui bahwa senyawa kumarin terdapat pada fraksi diklormethan dengan hasil uji KLT yang dideteksi lampu UV pada panjang gelombang 366 nm dimana pada fraksi diklormethan terdapat Rf dan bercak bulat flourisensi biru yang sangat terang yang terlihat sama pada hasil uji KLT standar kumarin.

Kurva Kalibrasi

Untuk mengukur kadar kumarin dari sampel dilakukan dengan membuat kurva kalibrasi dengan cara melakukan pe-notolan sampel dan standar kumarin pada berbagai konsentrasi, hasil pada plat KLT dapat dilihat pada Gambar 4:



Gambar 4. Kromatogram KLT hasil pengukuran antara sampel (fraksi diklormethan) dengan standar baku kumarin

Keterangan :

A: Gambar pada plat kromatogram KLT tanpa disinari lampu

B: Gambar pada plat kromatogram KLT dengan disinari lampu pada panjang gelombang 245 nm

C: Gambar pada plat kromatogram KLT dengan disinari lampu

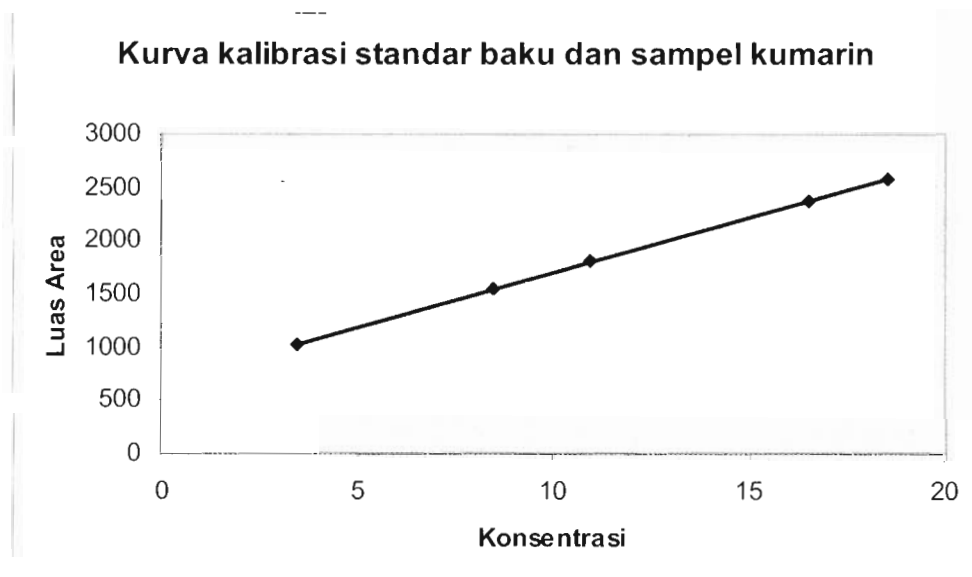
UV pada panjang gelombang 366 nm

Sp: Sampel kumarin dari ekstrak

S1,2,3,4,5: Standar 1,2,3,4,5

Tabel 3. Hasil pengukuran kadar kumarin pada plat KLT dengan pengembang n-heksan:etil asetat (2:2)

No	Larutan	konsentrasi (ug/ml)	Luas Area	Bercak
1	Standar 1	4	1032.171	Baik
2	Standar 2	8	1550.028	Baik
3	Standar 3	12	1809.580	Baik
4	Standar 4	16	2388.982	Baik
5	Standar 5	20	2588.810	Baik
6	Sampel	10.5	1727.460	Baik

**Gambar 5. Kurva Kalibrasi Hasil Pengukuran Kadar Kumarin pada Ekstrak Metanol *Artemisia annual*L**

Dari pola kromatogram yang didapat kemudian dilakukan pengukuran dengan alat Densitometer Shimadzu CS-9301 PC di dapat luas area dari sampel dan standar kumarin yang ditunjukkan pada Tabel 3:

Dari luas area tersebut dapat dihitung konsentrasi dari sampel ekstrak artemisia annua L. melalui ekstrapolasi kurva kalibrasi. Kurva kalibrasi dapat dilihat pada Gambar 5

Dari Persamaan kurva kalibrasi didapat nilai persamaannya $A=668.2445$, $B=98.8058$, dan nilai R nya adalah 0.98

dari persamaan $y=668.2445 + 98.8058 X$ dapat diketahui kadar kumarin dari ekstrak metanol sebesar 10.5 $\mu\text{g/ml}$.

Recovery

Dari percobaan recovery yang dilakukan didapat luas Area bercak sebesar 2758.173 dari 50 μl sampel recovery yang diinjek pada plat KLT, dengan perhitungan $10.5 \times 100\%$ sehingga dapat diketahui perolehan nilai covery sebesar 105%, dapat dikatakan bahwa metode yang dipakai baik, sesuai teori metode analitik yang baik tingkat perolehan kembali 95 % - 105 %.

PEMBAHASAN

Langkah awal sebelum melakukan penelitian adalah melakukan determinasi pada setiap tanaman yang akan di teliti agar kita yakin bahwa benar tanaman tersebut sesuai dengan yang kita harapkan sehingga kesalahan pengambilan sample dapat dihindarkan, Dari hasil determinasi yang dilakukan di B2P2TOT Tawangmangu Solo, diketahui bahwa tanaman ini termasuk ke dalam suku *Asteraceae* genus / marga *Artemisia* dan spesies *Artemisia annua* L., Tanaman ini juga berasal dari BPTO Tawangmangu,

Sample herba *Artemisia annua* L. yang diambil untuk penelitian ini dipilih berdasarkan keseragaman umur, asal usul dan garis keturunan yang sama (galur tanaman terpantau) agar diperoleh hasil yang maksimal, Pengujian yang dilakukan pada tanaman herbal *Artemisia annua* L diketahui memiliki senyawa aktif kumarin yang terkandung di dalamnya. Pada *Artemisia annua* L kumarin paling banyak terdapat pada bagian bunga dan daun muda.

Sebelum digunakan simplisia dikeringkan dengan cara menganginkan tanpa terkena sinar matahari langsung karena dengan pemanasan yang tinggi zat aktif di dalam simplisia akan rusak. Pengerinan dari herba *Artemisia annua* L. ini bertujuan agar kadar air dalam simplisia berkurang sehingga tidak mudah terkena jamur dan dapat bertahan lama. Setelah dilakukan pengerinan kemudian dilanjutkan dengan penyerbukan dan penghalusan dengan blender kemudian diayak dengan pengayak ukuran 40 mesh ini semua bertujuan agar ukurannya sama sehingga ketika diekstraksi semua pelarut dapat menembus/menyerap ke dalam simplisia sehingga diperoleh hasil ekstraksi yang sempurna karena pelarut dapat

menarik semua zat aktif yang ada di dalamnya.

Metode ekstraksi dilakukan dengan cara panas menggunakan alat soklet, ekstraksi dilakukan secara kontinyu dengan jumlah pelarut yang relatif konstan dengan pendingin balik, menggunakan pelarut metanol dimana pelarut tersebut merupakan pelarut general sehingga senyawa-senyawa yang terkandung di-dalamnya akan terekstraksi semua. Pada ekstraksi ini digunakan pendingin balik agar pelarut dan sample tetap terjaga temperaturnya sehingga pelarut dan senyawa yang terkandung di dalam sample tidak hilang/menguap.

Hasil ekstrak yang diperoleh kemudian dipekatkan dengan rotary evaporator dengan cara menarik pelarut. Dari hasil pemekatan dan penguapan dengan rotary evaporator dan water bath didapatkan rendemen ekstrak sebesar 21,92% ini artinya dalam dari 485 gram simplisia yang digunakan didapat 21,92% ekstrak metanol *artemisia annua* L.

Untuk mendapatkan larutan yang mengandung senyawa kumarin dilakukan pemisahan dengan cara fraksinasi, diperoleh 2 lapisan yaitu fraksi methanol-air yang berada pada lapisan atas dan berwarna coklat serta fraksi diklormetan yang berada pada lapisan bawah berwarna hijau pekat, penambahan diklormetan dilakukan berulang kali sampai larutan yang diperoleh dari fraksinasi terakhir bening ini menandakan semua senyawa kumarin sudah tertarik semua ke dalam fraksi diklormetan, Larutan yang mengandung fraksi diklormetan dikumpulkan dan dipekatkan dengan rotary evaporator dan ekstrak diuapkan dengan water bath pada suhu 40-50⁰C agar senyawa kumarin yang ada tidak rusak dimana kumarin akan mencair bila dipanaskan pada suhu 68 – 70 ⁰C sampai didapat ekstrak kental dan

selanjutnya dilakukan identifikasi kumarin secara KLT dengan menggunakan pembanding baku kumarin.

Dari hasil identifikasi kumarin secara KLT dengan eluen n-heksan:etil asetat (2:2) didapat bercak dengan Rf dan warna baku kumarin yang sama dengan sample pada fraksi diklormetan (yang mengandung kumarin) dengan Rf sebesar 0,31 berwarna biru flourisensi yang dilihat pada lampu UV dengan panjang gelombang 366 nm. Sedangkan sample pada fraksi metanol air (tidak ada kumarin) tidak terjadi pemisahan dan tidak terdapat bercak biru flourisensi hanya ada bercak hitam, ini meyakinkan kita bahwa pada fraksi methanol-air tersebut tidak mengandung senyawa kumarin dan semua senyawa kumarin telah tertarik ke dalam fraksi diklormetan

Sebelum melakukan penetapan kadar kumarin, dilakukan recovery yaitu untuk memastikan metoda yang kita gunakan baik atau tidaknya di dalam penelitian ini, Menurut literatur tingkat perolehan kembali harus berkisar 95%-105%, dari hasil recovery pada penetapan kadar kumarin didapat tingkat perolehan kembali 105% ini menandakan bahwa metoda yang digunakan sudah memenuhi standart yang ditetapkan.

Penetapan kadar kumarin menggunakan KLT menggunakan eluen n-heksan : etil asetat = 2:2 yang sebelumnya telah dilakukan pencarian eluen yang cocok sebagai pengembang agar didapat pemisahan yang baik. Dari hasil KLT kemudian dilakukan pengukuran dengan alat densitometer. Kegunaan dari pembuatan konsentrasi pembanding yang bervariasi adalah untuk mendapatkan kurva kalibrasi dari larutan pembanding tersebut kemudian dari perhitungan didapat garis regresi . Hasil pengukuran densitometer dikorelasikan

dengan garis regresi dari pembanding yang diperoleh sehingga di dapat konsentrasi kumarin dalam sample tersebut.

KESIMPULAN

1. Hasil determinasi tumbuhan diketahui bahwa tanaman tersebut termasuk dalam suku *Asteraccae*, genus/marga *Artemisia annua* L.
2. Dari hasil pemekatan dan penguapan didapatkan nilai rendemen ekstrak metanol sebesar : 21.92 %
3. Hasil pengujian identifikasi dengan KLT dengan lampu uv 366 nm didapatkan nilai Rf yang sama sebesar 0.31 dan bercak berwarna biru flourisensi yang sama antara sampel dan standar kumarin.
4. Pengukuran bercak KLT dengan densitometer didapat luas area kumarin dari sampel sebesar 1727.460 sehingga dari ekstrapolasi berdasarkan kurva kalibrasi dapat diketahui konsentrasi kumarin dari ekstrak methanol pada tanaman *Artemisia annua* L sebesar 10.5 $\mu\text{g/ml}$.
5. Nilai perolehan kembalinya (Recovery) yang didapat 105 %.

DAFTAR RUJUKAN

1. Simon, James E, et al, *Artemisia annua* L. : A Promising Aromatic and Medicinal Advances in New Corps. Timber Press, 1990, 522-526
2. University Medical Centre, Departement of Pharmacology, Laboratory of Drug Metabolism, Artemisinin and Derivatives: Recent Progress in Malaria Treatment, journal of Parasitic Diseases, 1996, June, 20 (1):65
3. WHO, The use of Artemisinin & its Derivates as Anti Malaria Drugs, Report of a joint CTD/DMP/TDR informal Consultation, Division of Control of Tropical diseases Geneva, 1998, june 10-12

4. Murray, R.D.H., J. Mendez, and S.A. Brow.. The Natural Cumarins. Jhon Willey and Sons Ltd. New York 1982.
5. Surjadi, Harry. Artemisia Obat Malaria Terkini (on line) <http://www.pustakatani.org/berita-global/Articlevie>
6. Makfoeld,D. Polifenol. PAU Pangan dan Gizi, UGM, Yogyakarta 1992.
7. Harborne J.B., Metode Fitokimia Penuntun Cara Modern Menganalisis Tumbuhan, penerbit : ITB, Bandung , 1987 ; Hal. 1 – 42. 184 – 196
8. Sutikno,A.I., dan Supriyati. Kumarin dalam daun Glicirida 1995.
9. Martindale. The Pharmacope 27. The Pharmaceutical Press 1972.
10. A nonim. Analisis Obat Tradisional, Jilid I, Departemen Kesehatan Republik Indonesia, Jakarta , 1987.
11. A nonim, Parameter Standar Umum Ekstrak Tumbuhan Obat, Departemen Kesehatan Republik Indonesia, Jakarta 2000.
12. A nonim Farmakope Indonesia. Edisi IV, Departemen Kesehatan Republik Indonesia, Jakarta 1995.
13. G ritter R.J., Bobbitt J.M., dan Schwarting A. E. Pengantar Kromatografi, penerbit : ITB, Bandung 1991.
14. R obinson T., Kandungan Organik Tumbuhan Tinggi, penerbit : ITB, Bandung 1995,.
15. The universitas of Queensland. Air analyst traning manual Australia . The universitas of Queensland 1996.
16. Jo seph C.touchstone & Joseph sherma. Densitometry In thin layer chromatography practice & applications 1978.
17. Ru sman Syanti. Identifikasi pendahuluan fitokimia dan uji efek antidiare infuse herbal patikan cina (*Euphobia prostrate* ait) terhadap tikus putih jantan. Skripsi universitas pancasila 1999.

ISOLASI DAN IDENTIFIKASI SENYAWA KUMARIN DARI TANAMAN *ARTEMISIA ANNUA* (L).

Ani Isnawati,* Harfia Mudahar,* Kamilatunisah**

Abstract

The invention of new entity from plant was the basic step for chemistry and another sciences development, such as: pharmacy, biology, and medical. Besides that, it is needed to fulfill people needs on food, medicine, cosmetics, etc. Coumarine is fenilpropanoid that has biological activity to stimulate skin pigmentation, influence enzyme activity, anti coagulant, anti microbial and inhibition of carcinogenic effect. One of the plants that contain coumarine is *Artemisia annua* L, because of that we interested in isolating coumarine and it's derivate in *Artemisia annua* L with expectation that study resulted in discovering anti cancer agent. The method that we use is extraction and soxhletation using methanol and fractionation using dichloromethane. The separation was done by column Chromatography with silica gel and eluent *n*-hexane:etil acetate. Purification was done by recrystalization. Isolate is identified using KLT, GC-MS, Spectrophotometer UV, IR and NMR. This study shows that isolate was coumarine named 2H-1-Benzopyran-2-one, 7-hydroxy-6-methoxy or Scopoletin with molecular weight 192

Keywords: Coumarine, *Artemisia annua* L, TLC, FTIR, GC-MS, NMR

Pendahuluan

Tumbuhan merupakan penghasil puluhan jenis senyawa organik yang digunakan sebagai sumber penghasil senyawa-senyawa berkhasiat. Penemuan senyawa-senyawa aktif baru dari tumbuhan di samping merupakan dasar untuk perkembangan ilmu kimia, juga telah memacu berkembangnya disiplin ilmu yang terkait, seperti: farmasi, biologi, kedokteran, dan ilmu yang lainnya. Kecuali itu juga dapat menghasilkan senyawa-senyawa kimia yang dapat dimanfaatkan oleh masyarakat untuk memenuhi kebutuhannya seperti bahan makanan, obat-obatan, zat pewangi, dsb.¹

Pemanfaatan tumbuhan sebagai penghasil senyawa-senyawa kimia aktif baru yang unik dan potensial secara ekonomi selalu menarik perhatian ahli kimia organik dan alam, mengingat jumlah dan varietasnya yang demikian banyak. Dari

semua itu sebagian belum diketahui kandungan senyawa aktifnya. Oleh karena itu penelitian senyawa aktif yang sistematis terhadap tumbuhan perlu dilakukan dalam rangka memanfaatkan dan mengembangkan lebih lanjut senyawa tersebut.¹

Kumarin merupakan golongan senyawa fenilpropanoid yang memiliki cincin lakton lingkaran enam dan memiliki inti 2H-1-benzopiran-2-on dengan rumus molekul C₉H₅O₂.² Kumarin dan turunannya banyak memiliki aktifitas biologis diantaranya dapat menstimulasi pembentukan pigmen kulit, mempengaruhi kerja enzim, anti-koagulan darah, antimikroba dan menunjukkan aktifitas menghambat efek karsinogen.³ Di sisi lain senyawa turunan kumarin polisiklik aktif sebagai antikarsinogen yang disebabkan hidrokarbon aromatik polisiklik karsinogen seperti 6-metil (α) piran.⁴

* Puslitbang Biomedis dan Farmasi

** Universitas Tujuh Belas Agustus

Salah satu tanaman yang mengandung kumarin adalah *Artemisia annua* L. *Artemisia annua* L yang dikenal sebagai *sweet annie* atau *annual wormwood*. Tanaman herba asli Cina yang dikenal sebagai qinghao⁵ ini sudah dibudidayakan di banyak negara seperti Argentina, Bulgaria, Prancis, Hongaria, Rumania, Italia, bekas Yugoslavia, Spanyol dan USA.⁶ Tanaman ini kini herba *Artemisia annua* L telah dibudidayakan di Balai Penelitian Tanaman Obat (BPTO) Tawangmangu.

Dari data literatur herba *Artemisia annua* L berkhasiat sebagai antimalaria, antibakteri, anti-inflamasi, antitumor dan antipiretik, dan dinyatakan mengandung senyawa terpenoid, flavonoid, kumarin, artemisinic acid, artemisinin B, fenol, saponin dan lemak.⁵

Tertarik akan kandungan kimia dan aktivitas farmakologi senyawa kumarin dan turunannya, maka dilaksanakan isolasi senyawa kumarin yang terdapat pada herba *Artemisia annua* L. yang berasal dari BPTO Tawangmangu dengan harapan kedepan, kumarin hasil isolasi ini dapat diteliti untuk mengetahui efek farmakologisebagai anti-kanker.

Bahan dan Cara

Bahan

Bahan yang digunakan dalam penelitian ini adalah simplisia herba *Artemisia annua* L. yang sudah siap panen. Pelarut untuk ekstraksi digunakan metanol, *n*-heksan dan diklormetan. Selain itu, digunakan pula aqua destilata, asam sulfat pekat, asam asetat anhidrat, ammonium hidroksida, asam asetat 10%, asam klorida 2 N, alkohol, besi (III) klorida, asam klorida pekat, kalium hidroksida, logam magnesium, kalium bromida, etil asetat (didestilasi ulang), kloroform (p.a), metanol (p.a), pereaksi *mayer*, *dragendorf*, plat silica gel 60 GF₂₅₄ E Merck, silica gel 60.

Alat

Peralatan yang digunakan adalah alat soxhlet beserta pendingin balik, alat destilasi, dan *rotary evaporator*, serta peralatan gelas yang lazim digunakan dalam laboratorium. Untuk keperluan identifikasi digunakan : GC-MS, Spektrofotometer UV, FT-IR, ¹³C NMR dan ¹H NMR.

Cara Kerja

1. Pengambilan sampel

Sampel diambil dari perkebunan BPTO Tawangmangu Solo, dikumpulkan sewaktu

tanaman berbunga umur sekitar 6 bulan. Bahan simplisia yang telah dibersihkan dari kotoran, diiris, kemudian dikeringkan dengan cara menjemur terlindung dari sinar matahari langsung dan setelah kering simplisia di serbuk dengan menggunakan blender dan diayak melalui ukuran 40 mesh.

2. Determinasi tumbuhan

Determinasi tumbuhan dilakukan di BPTO Tawangmangu Solo Jawa tengah.

3. Pemeriksaan skrining fitokimia

Pemeriksaan pendahuluan ini meliputi pemeriksaan golongan alkaloid, fenol, flavonoid, minyak atsiri, lemak/lipid, saponin, dan steroid/triterpenoid dan kumarin. Berikut ini cara kerjanya.^{7,8,9}

a. Pemeriksaan Alkaloid

Alkaloid terdiri dari 2 bentuk, yaitu dalam bentuk basa larut dalam pelarut semi polar, sedangkan dalam bentuk garam larut dalam pelarut air. Ekstrak kental yang telah diencerkan dengan metanol ditambahkan HCl 2N. Jika tidak bening maka ditambahkan NH₄OH + CHCl₃ lalu dikocok, diambil lapisan kloroform. Kedua larutan baik yang jernih maupun yang tidak jernih ditambahkan HCl 2N lalu dikocok dan diambil lapisan air kemudian dibagi dalam 3 tabung dan diuji, dengan pereaksi *mayer* terbentuk endapan putih, dengan *dragendorf* terbentuk endapan coklat/jingga, dan dengan pereaksi *bouchardad* terbentuk endapan coklat.

b. Pemeriksaan Fenol

Ekstrak kental yang telah diencerkan dengan metanol ditambahkan larutan Besi (III) klorida lalu amati perubahan warna. Jika terbentuk warna ungu tua menunjukkan adanya fenol.

c. Pemeriksaan Flavonoid

Ekstrak kental yang telah diencerkan dengan metanol ditambahkan HCl pekat dan logam Mg. Jika terbentuk busa berwarna merah atau jingga berarti positif tanin. Kemudian dinginkan dan ditambah amil alkohol, lalu dikocok. Jika warna merah dan naik keatas berarti positif flavonoid dan jika warnanya tetap di bawah positif tanin dan flavonoid.

d. Pemeriksaan Minyak Atsiri

Ekstrak kental yang telah diencerkan dengan metanol ditambah alkohol, sebagian larutan alkohol diuapkan dan sebagian lagi untuk identifikasi lemak. Jika larutan alkohol yang diuapkan berbau aromatis maka positif mengandung minyak atsiri.

e. Pemeriksaan Lemak/asam lemak

Larutan alkohol sisa pada identifikasi minyak atsiri diuapkan hingga kering dan dilanjutkan penyabunan dengan 10 ml kalium hidroksida 0,5 N kemudian diuapkan, jika terdapat tetesan-tetesan minyak berarti positif mengandung minyak/lemak/asam lemak.

f. Pemeriksaan Saponin

Ekstrak kental yang diencerkan dengan metanol dimasukkan ke dalam tabung reaksi kemudian ditambahkan air panas, lalu dikocok kuat-kuat selama 10 detik. Terbentuk buih yang mantap selama tidak kurang dari 10 menit setinggi 1 – 10 cm. Pada penambahan 1 tetes HCl 2N buih tidak hilang.

g. Pemeriksaan Steroid dan Triterpenoid

Ekstrak kental yang telah diencerkan dengan metanol dimasukkan ke dalam tabung reaksi lalu ditambahkan asam asetat anhidrat, ditambah kloroform dan asam sulfat pekat melalui dinding tabung reaksi. Jika terbentuk cincin yang berwarna hijau atau merah berarti positif terpenoid dan jika terbentuk cincin yang berwarna hijau atau biru positif steroid. Ekstrak dalam plat tetes ditambahkan asam sulfat pekat ditambah asam asetat anhidrat. Jika warna ungu merah atau coklat berarti positif terpenoid dan jika warna hijau atau biru positif steroid.

h. Pemeriksaan kumarin

Ekstrak diuapkan sampai kering tambahkan air panas dan dinginkan. Setelah dingin bagi menjadi dua tabung. Tabung I diberi ammonia 10% dan tabung II sebagai pembanding. Dilihat di bawah lampu UV, jika terdapat fluoresensi kuning kehijauan atau kebiruan berarti positif mengandung kumarin.

4. Ekstraksi

Simplisia *Artemisia annua* L. yang sudah dihaluskan diekstraksi secara soxhletasi dengan metanol, tiap satu jam pelarut metanol diganti agar senyawa yang didapat tidak rusak. Semua sari terekstraksi keluar dapat dilihat pada warna ekstrak terakhir metanol tidak lagi berwarna. Ekstrak metanol yang didapatkan selanjutnya dipekatkan dengan menggunakan *rotary evaporator* sampai diperoleh ekstrak kental. Kemudian ekstrak metanol yang didapat dihitung rendemennya.

5. Pemisahan

a. Fraksinasi

Ekstrak kental metanol ditambahkan air panas kemudian difraksinasi dengan *n*-heksan menggunakan corong pisah, kocok lalu dipisahkan

antara lapisan *n*-heksan dari lapisan air. Lapisan air kemudian difraksinasi dengan diklor metan menggunakan corong pisah, dikocok lalu dipisahkan antara lapisan air dengan diklor metan. Fraksinasi dilakukan berulang kali sampai tiap-tiap fraksi terakhir yang didapat jernih. Masing-masing fraksi dipekatkan dengan menggunakan *rotary evaporator*. Kemudian masing-masing fraksi dilakukan KLT dengan menggunakan eluen *n*-Heksan: etil asetat dengan perbandingan (4:1), (2:1) dan (1:1).

b. Kromatografi kolom

Pemisahan kromatografi kolom dilakukan dengan fase diam silika gel dan fase geraknya yaitu *n*-heksan: etil asetat secara gradien pada ekstrak kental diklor metan.

Mula-mula masukkan kapas pada dasar kolom untuk menyangga fase diamnya. Lalu fase diam (silika) disuspensikan dengan menggunakan eluen (fase gerak) sampai terbentuk bubuk silika kemudian dimasukkan ke dalam kolom. Selama proses pengendapan, kolom kromatografi tersebut dapat diketuk-ketuk pada semua sisi secara perlahan-lahan agar diperoleh lapisan yang seragam. Keran dapat dibuka atau ditutup selama penambahan, asal permukaan pelarut tetap diatas permukaan penjerap (fase diam/silika).^{10,11,12,13,14,15}

Ekstrak kental kemudian ditimbang sebanyak 22,69 g digerus bersama fase diam, dimasukkan ke dalam kolom. Setelah itu dielusi dengan fase gerak *n*-heksan : etil asetat dengan perbandingan (4 : 1), (2 : 1), dan (1 : 1). Tiap-tiap fraksi yang keluar ditampung dengan erlenmeyer 20 ml dan 50 ml. Lalu fraksi dalam erlenmeyer tersebut dipekatkan menggunakan *rotary evaporator* sampai didapat fraksi yang lebih pekat dari sebelumnya. Kemudian fraksi tersebut diujikan pada plat KLT silika gel 60 GF₂₅₄ E Merck dengan eluen yang sama dengan sebelumnya. Fraksi yang sama R_f-nya kemudian digabung menjadi satu fraksi.

6. Pemurnian

Kristal yang terbentuk direkristalisasi dengan menggunakan pelarut metanol - kloroform. Hal ini dilakukan berulang-ulang dengan pelarut yang dapat melarutkan senyawa tersebut sehingga diperoleh senyawa murni.

7. Identifikasi Senyawa Hasil Isolasi

a. Secara organoleptis

Pemeriksaan ini meliputi pemeriksaan bentuk kristal, warna kekuningan, rasa pahit, dan bau agak harum.

b. Metode kimia

Tambahkan air panas suhu $\pm 80^{\circ}\text{C}$, kemudian didinginkan. Setelah dingin dibagi menjadi dua tabung. Tabung I diberi ammonia 10% dan tabung II sebagai pembanding. Dilihat dibawah lampu UV, jika terdapat fluoresensi kuning kehijauan atau kebiruan berarti positif kumarin

c. Metode kromatografi

Pemeriksaan ini menggunakan fase diam plat silica gel GF₂₅₄ dan fase gerak *n*-heksan : etil asetat (1:1). Sebagai pendeteksi digunakan lampu UV akan terbentuk 1 noda fluoresensi biru dibawah lampu UV 366 nm

8. Elusidasi struktur

a. GC-MS

Setelah pengkondisian alat kromatografi gas dan spektrometri massa, cuplikan diinjeksikan melalui lubang masuk cuplikan. Pada suhu tinggi cuplikan tersebut akan berubah menjadi gas; bersama gas pembawa pada kenaikan suhu komponen yang mempunyai titik lebur yang sama, secara otomatis data terekam di dalam komputer. Bandingkan dengan data spektrum yang terdapat pada bank data NIST (National Institute of Standard and Technology).

b. Spektrofotometri Ultra Violet (UV)

Pemeriksaan spektrofotometri UV menggunakan ± 1 mg sampel yang dilarutkan dengan metanol (p.a) sampai larut, dan dideteksi menggunakan spektrofotometri UV sehingga terlihat puncak panjang gelombang yang merupakan karakteristik suatu senyawa, kemudian grafik yang terbentuk direkam. Grafik yang terbentuk

menampilkan serapan dan panjang gelombang dari sampel tersebut.

c. Spektrofotometri infra merah (IM)

Senyawa yang didapat kemudian dilanjutkan identifikasi dengan spektrofotometri infra merah (FT-IR) dengan tujuan untuk mengetahui gugus fungsi apa saja yang terdapat dalam senyawa. Caranya, cuplikan/sampel dilarutkan dengan pelarut kloroform atau karbon tetraklorida atau karbon disulfida, dan dicatat spektrum dari larutan ini. Larutan biasanya (1 - 5%) ditempatkan dalam sel larutan yang terdiri dari bahan transparan. Sel yang kedua berisi pelarut murni ditempatkan pada berkas sinar.

d. Spektroskopi ¹H NMR dan ¹³C NMR

Senyawa dilarutkan dalam deuteriochloroform (CDCl₃), kemudian dimasukkan ke dalam tabung dengan sejumlah pelarut dicukupkan sampai setinggi ± 5 cm. Setelah itu, dideteksi dengan alat spektrofotometri NMR (Varian Unity INOVA 500 MHz NMR).¹⁶

Hasil Penelitian Determinasi

Hasil determinasi yang dilakukan di BPTO Tawangmangu Solo Jawa Tengah, menunjukkan bahwa tumbuhan ini termasuk ke dalam suku/famili Asteraceae, genus/marga *Artemisia* dan spesies *Artemisia annua*.

Skrining Fitokimia

Hasil pemeriksaan fitokimia herba *Artemisia annua* L., dalam tumbuhan terdapat golongan fenol, flavonoid, minyak atsiri, lemak, saponin, dan triterpenoid dan kumarin.

Tabel 1. Hasil Pemeriksaan Skrining Fitokimia Pada Ekstrak Metanol Herba *Artemisia annua* L.

No	Pemeriksaan golongan	Pereaksi	Hasil	Keterangan
1	Alkaloid	Mayer	-	≠ endapan
		Dragendorf	-	≠ endapan
		Bouchardad	-	≠ endapan
2	Fenol	FeCl ₃	+	Ungu tua
3	Flavonoid	HClp + logam Mg, dinginkan + amil alkohol, dikocok.	+	Merah tetap di bawah
4	Minyak atsiri	Alkohol, diuapkan	+	Bau minyak atsiri-
5	Lemak/asam lemak	Alkohol	+	Terdapat tetesan-tetesan minyak
6	Saponin	Air panas 10 ml, dikocok vertikal	+	Busa stabil
7	Steroid/triterpenoid	Asam asetat anhidrat + H ₂ SO ₄ + CHCl ₃	+	Cincin merah
8	Kumarin	+NH ₄ OH 10% pada lampu UV	+	Fluoresensi biru

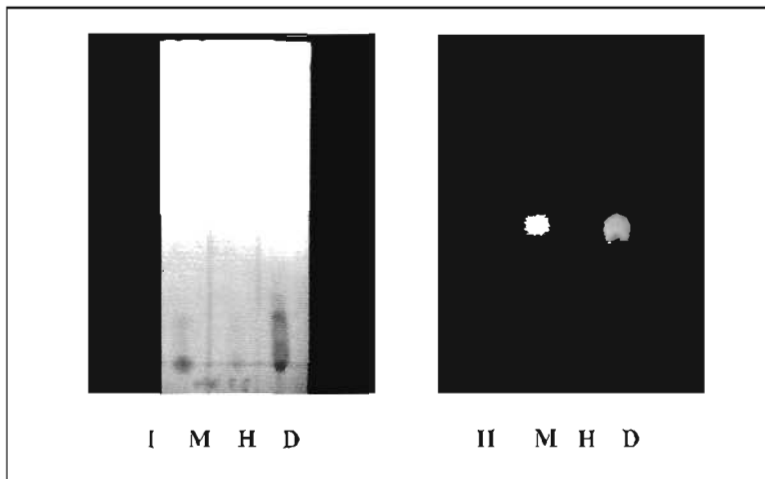
Ekstraksi dan Fraksinasi

Nilai rendemen ekstrak metanol adalah 19,62%. Dari 1100 gram simplisia *Artemisia annua* L. yang sudah dihaluskan diperoleh 215,52 gram ekstrak kental metanol, sedangkan nilai rendemen pada fraksi diklormetan adalah 2,06%.

Ekstrak kental metanol, fraksi *n*-heksan dan fraksi diklormetan yang diperoleh kemudian dilakukan uji KLT dengan fase gerak *n*-heksan : etil asetat (1 : 1). Gambar dapat dilihat pada gambar 1.

Hasil Pemisahan

Pada pemisahan fraksi diklor metan dengan kromatografi kolom diperoleh beberapa fraksi yaitu fraksi 1(1 – 14), 2(16 – 42), 3(43 – 50), 4(51 – 57), 5(58-61), 6(62-70), 7(71-84), 8(885-91), 9(92-114), 10(115-170), 11 (171-190), 12(191-220), 13(221-245), 14(246-274), 15(275 – 310), 16 (311-339), 17(340-366), 18(367-378), 19(379-390). Dari fraksi-fraksi tersebut diketahui pada perbandingan fase gerak *n*-heksan : etil asetat (1 : 1), yaitu fraksi yang ke-19 diperoleh kristal yang belum murni. (Gambar 2)



Gambar 1. Kromatogram KLT ekstrak metanol, fraksi *n*-heksan dan fraksi diklor metan

Keterangan :

Fase diam = plat silika gel GF₂₅₄

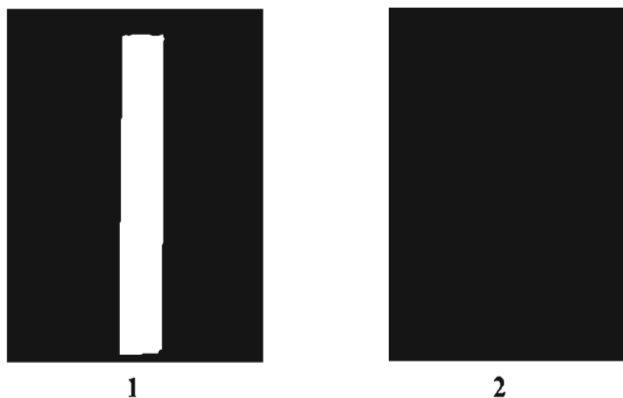
Fase gerak = *n*-heksan : etil asetat (1 : 1)

M = ekstrak metanol, H = fraksi *n*-heksan, D = fraksi diklor metan

I. Dengan mata langsung : warna kuning kecoklatan

II. Dengan sinar UV 366 nm : Berfluoresensi biru

Dari basil KLT diketahui fraksi yang mengandung kumarin terdapat pada fraksi diklor metan.



Gambar 2. Kromatogram KLT Hasil Pemisahan dengan Kromatografi Kolom pada Fraksi 19 Sebelum direkristalisasi.

Keterangan

1 Secara visual : Warna kuning kecoklatan

2. Dengan UV 366 nm : Berfluoresensi biru

Hasil Pemurnian

Pemurnian dilakukan dengan cara rekristalisasi pada fraksi ke-19 menggunakan pelarut campuran metanol dan kloroform. Didapat kristal yang berwarna putih kekuningan yang mengkilat. Hasil KLT dua arah dengan eluen yang berbeda *n*-hexan : etil asetat (1 : 1) dan kloroform : metanol (1 : 1) memberikan satu noda yang berwarna kuning kecoklatan dan jika dilihat di bawah lampu UV 366 nm berfluoresensi warna biru.

Identifikasi Senyawa Hasil Isolasi^{16,17,18,19,20}

a. Organoleptis

Hasil pemeriksaan secara organoleptis menunjukkan bentuk kristal berwarna putih kekuningan yang mengkilat berbau aromatis, rasa pahit.

b. Metode Kimia

Senyawa kumarin ditambah air panas dengan suhu $\pm 80^{\circ}\text{C}$ dan didinginkan. Setelah dingin dibagi menjadi dua tabung. Tabung I diberi amonia 10% dan tabung II sebagai pembanding.

Setelah dilihat di bawah lampu UV terdapat fluoresensi biru.

c. Metode Kromatografi Lapis Tipis (KLT)

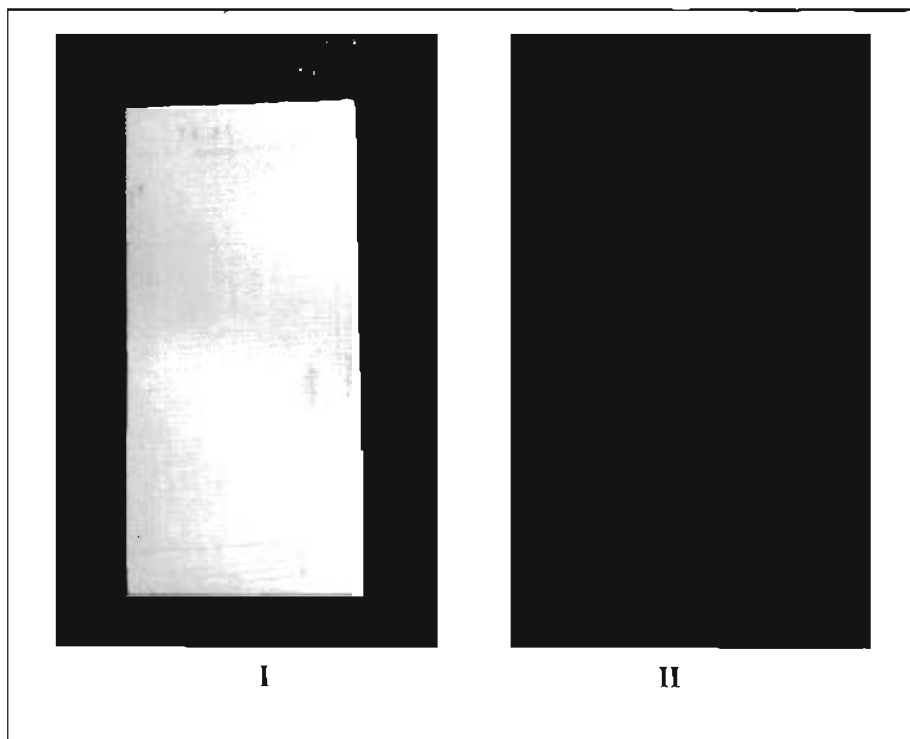
KLT menggunakan eluen *n*-heksan : etil asetat (1 : 1) timbul satu bercak berwarna kuning kecoklatan, dengan bantuan sinar UV 366 nm akan berfluoresensi warna biru dan mempunyai harga $R_f = 0,523$.

d. Elusidasi Struktur

1. GC- MS

Hasil analisis kromatografi gas spektrometri massa pada RT 29,23 menit Gambar memberikan puncak-puncak molekul $m/e = 192$, yang menandakan berat molekul dari senyawa tersebut adalah 192. Puncak-puncak fragmentasinya adalah $m/e = 192, 177, 164, 149, 121, 79, 69, \text{ dan } 51$.

Setelah dibandingkan dengan data *Library Searched* menunjukkan bahwa senyawa hasil isolasi adalah 2H-1-Benzopyran-2-one,7-hydroxy-6-methoxy (skopoletin) memiliki formula molekul $\text{C}_{10}\text{H}_8\text{O}_3$ dan berat molekul 192 dengan kesamaan 96%.



Gambar 3. Kromatogram KLT Dua Arah Hasil Rekristalisasi

Keterangan:

1. Secara visual
2. Secara UV 366 nm

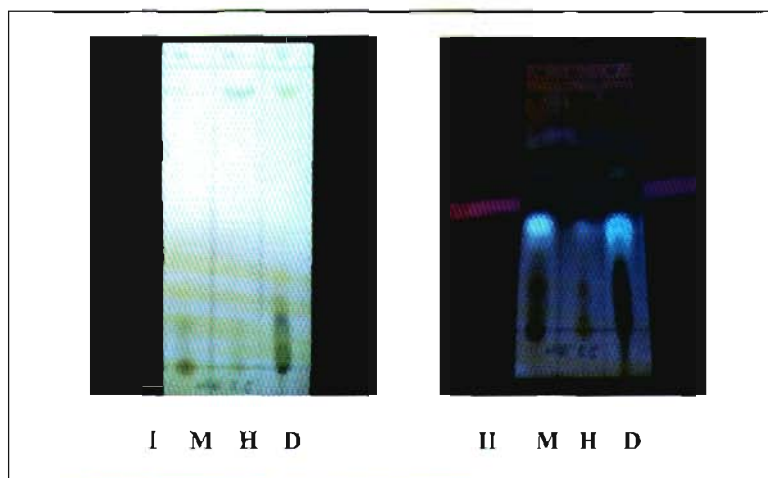
Ekstraksi dan Fraksinasi

Nilai rendemen ekstrak metanol adalah 19,62%. Dari 1100 gram simplisia *Artemisia annua* L. yang sudah dihaluskan diperoleh 215,52 gram ekstrak kental metanol, sedangkan nilai rendemen pada fraksi diklormetan adalah 2,06%.

Ekstrak kental metanol, fraksi *n*-heksan dan fraksi diklormetan yang diperoleh kemudian dilakukan uji KLT dengan fase gerak *n*-heksan : etil asetat (1 : 1). Gambar dapat dilihat pada gambar 1.

Hasil Pemisahan

Pada pemisahan fraksi diklor metan dengan kromatografi kolom diperoleh beberapa fraksi yaitu fraksi 1(1 – 14), 2(16 – 42), 3(43 – 50), 4(51 – 57), 5(58-61), 6(62-70), 7(71-84), 8(885-91), 9(92-114), 10(115-170), 11 (171-190), 12(191-220), 13(221-245), 14(246-274), 15(275 – 310), 16 (311-339), 17(340-366), 18(367-378), 19(379-390). Dari fraksi-fraksi tersebut diketahui pada perbandingan fase gerak *n*-heksan : etil asetat (1 : 1), yaitu fraksi yang ke-19 diperoleh kristal yang belum murni. (Gambar 2)



Gambar 1. Kromatogram KLT ekstrak metanol, fraksi *n*-heksan dan fraksi diklor metan

Keterangan :

Fase diam = plat silika gel GF₂₅₄

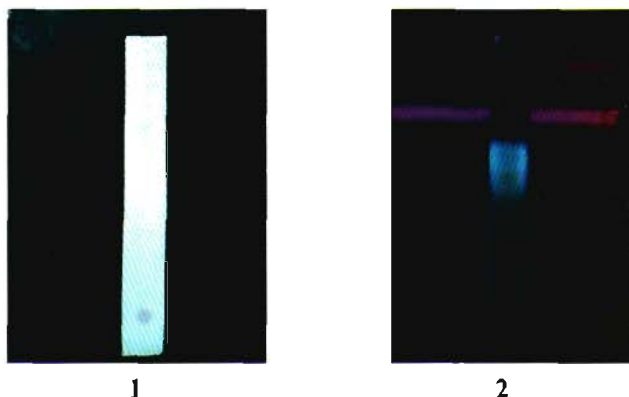
Fase gerak = *n*-heksan : etil asetat (1 : 1)

M = ekstrak metanol, H = fraksi *n*-heksan, D = fraksi diklor metan

I. Dengan mata langsung : warna kuning kecoklatan

II. Dengan sinar UV 366 nm : Berfluoresensi biru

Dari hasil KLT diketahui fraksi yang mengandung kumarin terdapat pada fraksi diklor metan.



Gambar 2. Kromatogram KLT Hasil Pemisahan dengan Kromatografi Kolom pada Fraksi 19 Sebelum direkristalisasi.

Keterangan:

1. Secara visual : Warna kuning kecoklatan

2. Dengan UV 366 nm : Berfluoresensi biru

Hasil Pemurnian

Pemurnian dilakukan dengan cara rekristalisasi pada fraksi ke-19 menggunakan pelarut campuran metanol dan kloroform. Didapat kristal yang berwarna putih kekuningan yang mengkilat. Hasil KLT dua arah dengan eluen yang berbeda *n*-hexan : etil asetat (1 : 1) dan kloroform : metanol (1 : 1) memberikan satu noda yang berwarna kuning kecoklatan dan jika dilihat di bawah lampu UV 366 nm berfluoresensi warna biru.

Identifikasi Senyawa Hasil Isolasi^{16,17,18,19,20}

a. Organoleptis

Hasil pemeriksaan secara organoleptis menunjukkan bentuk kristal berwarna putih kekuningan yang mengkilat berbau aromatis, rasa pahit.

b. Metode Kimia

Senyawa kumarin ditambah air panas dengan suhu $\pm 80^{\circ}\text{C}$ dan didinginkan. Setelah dingin dibagi menjadi dua tabung. Tabung I diberi amonia 10% dan tabung II sebagai pembanding.

Setelah dilihat di bawah lampu UV terdapat fluoresensi biru.

c. Metode Kromatografi Lapis Tipis (KLT)

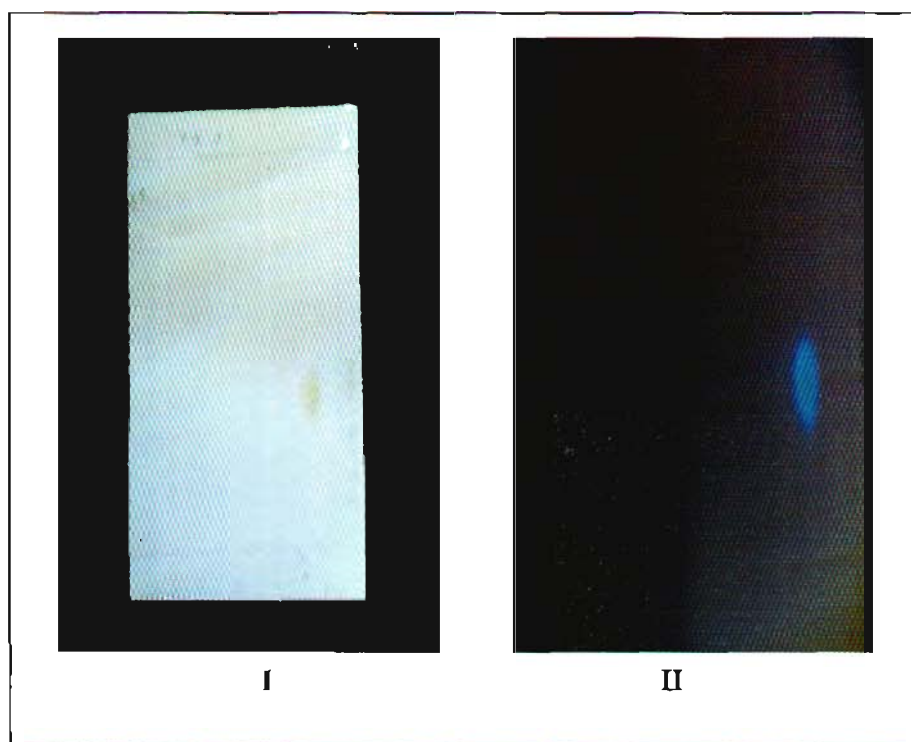
KLT menggunakan eluen *n*-heksan : etil asetat (1 : 1) timbul satu bercak berwarna kuning kecoklatan, dengan bantuan sinar UV 366 nm akan berfluoresensi warna biru dan mempunyai harga $R_f = 0,523$.

d. Elusidasi Struktur

1. GC- MS

Hasil analisis kromatografi gas spektrometri massa pada RT 29,23 menit Gambar memberikan puncak-puncak molekul $m/e = 192$, yang menandakan berat molekul dari senyawa tersebut adalah 192. Puncak-puncak fragmentasinya adalah $m/e = 192, 177, 164, 149, 121, 79, 69$, dan 51.

Setelah dibandingkan dengan data *Library Searched* menunjukkan bahwa senyawa hasil isolasi adalah 2H-1-Benzopyran-2-one,7-hydroxy-6-methoxy (skopoletin) memiliki formula molekul $\text{C}_{10}\text{H}_8\text{O}_3$ dan berat molekul 192 dengan kesamaan 96%.

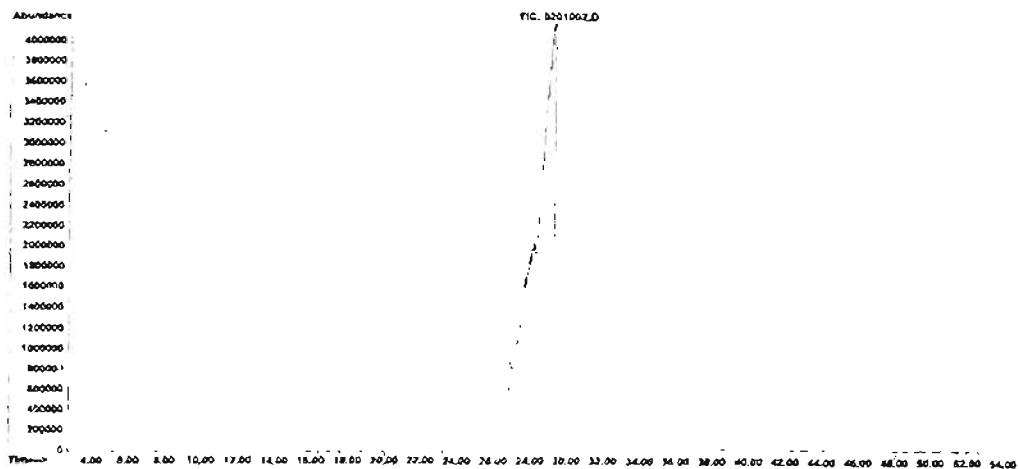


Gambar 3. Kromatogram KLT Dua Arah Hasil Rekristalisasi

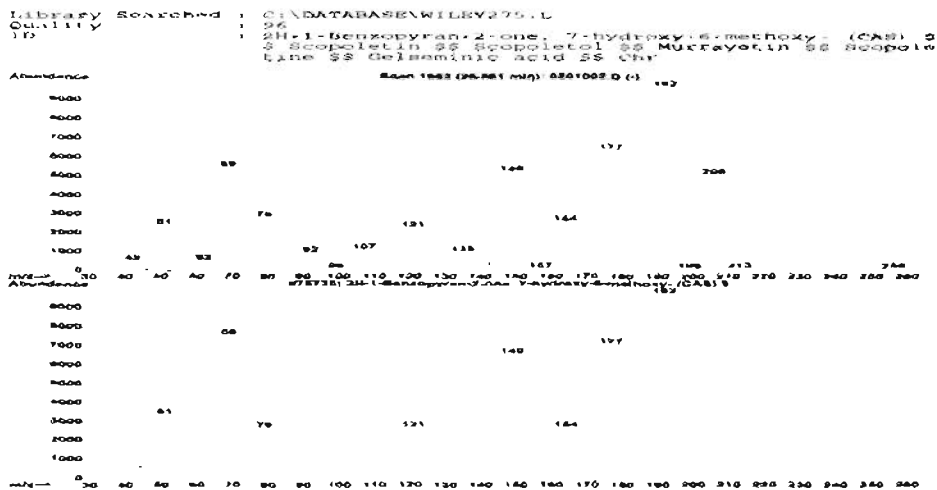
Keterangan:

1. Secara visual
2. Secara UV 366 nm

File : C:\NCPHEM\1\DATA\070424-A\0201002.D
 Operator : TAZ
 Acquired : 24 Apr 07 10:53 using AcqMethod BAHALAM
 Instrument : GC/MS_B
 Sample Name : Sampel Ramilatan
 Misc Info :
 Vial Number : 2



Gambar 4. Spektrum GC-MS



Gambar 5. Spektrum MS

Tabel 2. Hasil Spektrofotometri UV Senyawa Isolat

Panjang gelombang (nm)	Serapan
346,0	1,5560
298,0	0,6567
230,0	1,7278
210,0	2,4362

Spektrofotometri UV

Hasil pengukuran spektrum senyawa isolat dengan pelarut metanol (p.a) dapat dilihat pada Tabel 2.

Spektrofotometri FT IR

Berdasarkan hasil FT IR dapat diketahui adanya regang -OH, regang C - O oksiaril, regang C = O terkonjugasi, dan regang C = C benzena. Lebih jelasnya dapat dilihat pada tabel 3 dan Gambar 6:

Spektrofotometri ¹H dan ¹³C NMR

Dari hasil spektrofotometri ¹H NMR diketahui bahwa pada pergeseran kimia 6,20 ppm muncul satu sinyal doublet dengan konstanta kopling $J = 1,047$ menunjukkan adanya atom H pada posisi 3, pada pergeseran kimia 7,85 ppm muncul satu sinyal doublet dengan konstanta kopling $J = 1,076$ menunjukkan atom H pada posisi 4, pada pergeseran 7,09 ppm muncul satu sinyal singlet dengan konstanta kopling $J = 1,088$ menunjukkan atom H pada posisi 5, pada pergeseran kimia 4,90 ppm muncul satu sinyal singlet dengan konstanta kopling $J=1,74$ menunjukkan atom H pada posisi 7, pada pergeseran kimia 6,76 ppm muncul satu sinyal

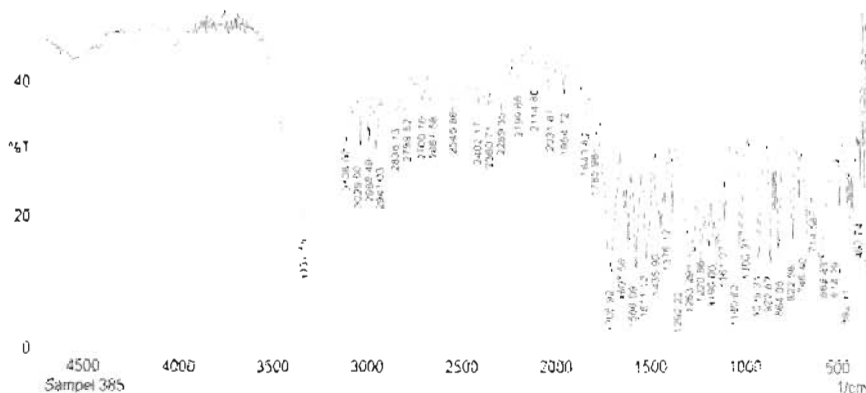
singlet dengan konstanta kopling $J=1$ menunjukkan atom H pada posisi 8, pada pergeseran kimia 3,90 ppm muncul satu sinyal multiplet dengan konstanta kopling $J=3,293$ menunjukkan adanya atom H pada posisi 11.

Sedangkan pada ¹³C NMR diketahui pada pergeseran kimia 164,14 ppm muncul satu sinyal karbon pada posisi 2, pada pergeseran kimia 112,62 ppm muncul satu sinyal karbon pada posisi 3, pada pergeseran kimia 151,49 ppm muncul satu sinyal karbon pada posisi 4, pada pergeseran kimia 109,96 ppm muncul satu sinyal karbon pada posisi 5, pada pergeseran kimia 153,06 ppm muncul satu sinyal karbon pada posisi 6, pada pergeseran kimia 146,21 ppm muncul satu sinyal karbon pada posisi 7, pada pergeseran kimia 104,03 ppm muncul satu sinyal karbon pada posisi 8, pada pergeseran kimia 147,15 ppm muncul satu sinyal karbon pada posisi 9, pada pergeseran kimia 112,68 ppm muncul satu sinyal karbon pada posisi 10, pada pergeseran kimia 56,87 ppm muncul satu sinyal karbon pada posisi 11.

Jika dibandingkan dengan data literatur maka hasil spektrum ¹³C NMR dan ¹H NMR senyawa isolat memiliki kemiripan (tabel 4) dan Gambar 7 dan 8.

Tabel 3. Hasil Spektrofotometri FT -IR Senyawa Isolat

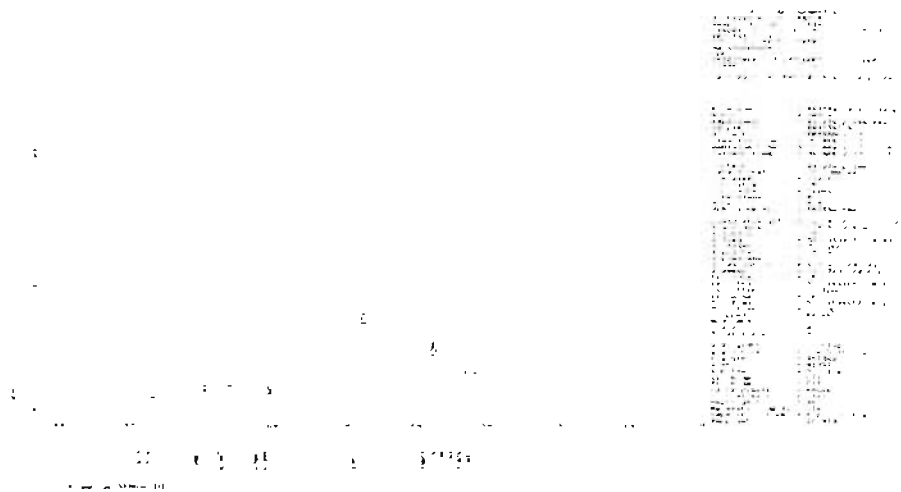
Bilangan gelombang senyawa isolat (cm ⁻¹)	Ikatan yang menyebabkan absorpsi
3337	Regang - OH
1292, 1140	Regang C - O
1705	Regang C = O
1607, 1566, 1435	Regang C = C



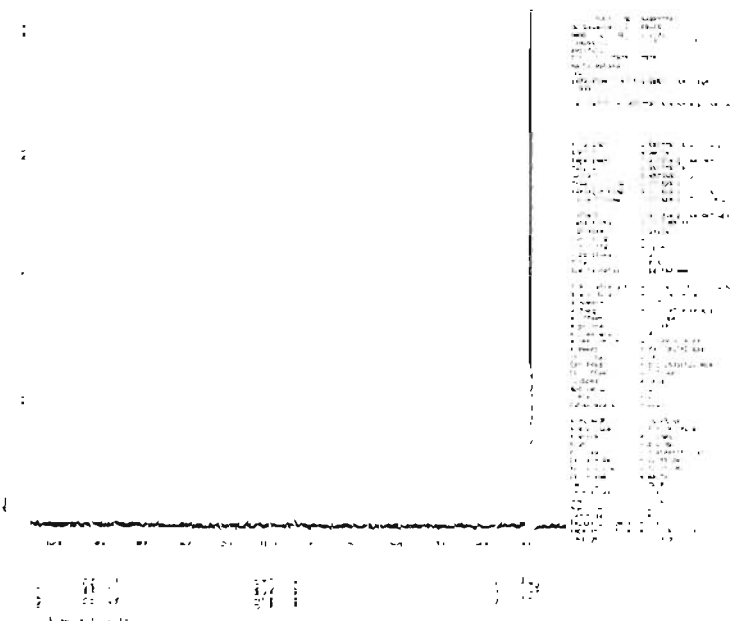
Gambar 6. Spektrum FT-IR

Tabel 4. Perbandingan ^{13}C NMR dan ^1H NMR senyawa isolat dengan literatur

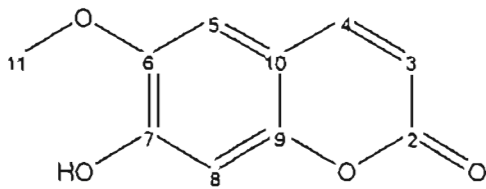
No. atom C	δC senyawa isolat (ppm)	δC literatur (ppm)	δH senyawa isolat (ppm)	δH literatur (ppm)
2	164,14	162	-	-
3	112,62	116,9	6,20 (<i>d</i> , $J = 1,047$)	6,45
4	151,49	145,6	7,85 (<i>d</i> , $J = 1,076$)	7,80
5	109,96	113,6	7,09 (<i>s</i> , $j = 1,088$)	6,97
6	153,06	145,9	-	-
7	146,21	142,5	4,90 (<i>s</i> , $j = 4,74$)	5,0
8	104,03	109,5	6,76 (<i>s</i> , $J = 1$)	6,56
9	147,15	144,5	-	-
10	112,68	121,4	-	-
11	56,87	56,3	3,90 (<i>m</i> , $J = 3,293$)	3,73



Gambar 7. Spektrum ^1H NMR



Gambar 8. Spektrum ^{13}C NMR



2H-1-Benzopyran-2-one, 7-hydroxy-6-methoxy

Gambar 9. Struktur Senyawa Isolat

Pembahasan

Pada penelitian ini digunakan herba *Artemisia annua* L. yang termasuk *Asteraceae*. Bahan baku simplisia diperoleh dari tanaman budidaya BPTO Tawangmangu Solo Jawa Tengah. Keceragaman umur, masa panen, dan galur (asal-usul, garis keturunan) tanaman dapat dipantau. Hasil determinasi yang dilakukan di BPTO Tawangmangu Solo Jawa Tengah menunjukkan bahwa tumbuhan ini termasuk ke dalam suku/famili *Asteraceae*, genus/marga *Artemisia annua* L. Determinasi dilakukan untuk menghindari kesalahan dalam pengambilan sampel.

Sebelum digunakan untuk penelitian, terlebih dahulu herba *Artemisia annua* L. dilakukan pengeringan dengan cara diangin-anginkan dan tidak terkena cahaya matahari langsung, karena dikhawatirkan zat-zat berkhasiat yang terkandung didalamnya akan rusak. Pengeringan bertujuan untuk mengurangi kadar air guna mencegah perubahan kimia pada bahan. Setelah pengeringan dilakukan penyerbukan untuk memudahkan pelarut pengeksrak menembus ke dalam sel, sehingga ekstraksi lebih sempurna. Penghalusan atau penyerbukan herba *Artemisia annua* L. menggunakan blender dan diayak dengan ukuran 40 mesh agar diperoleh hasil yang baik.

Metode ekstraksi yang dilakukan adalah cara panas yaitu sokhlet, karena pada ekstraksi ini terjadi ekstraksi yang kontinyu dengan jumlah pelarut yang relatif konstan dengan adanya pendingin balik, menggunakan pelarut yang selalu baru. Ekstraksi yang digunakan adalah ekstraksi langsung menggunakan pelarut metanol karena metanol merupakan pelarut yang general sehingga senyawa-senyawa yang terkandung di dalamnya akan terekstraksi semua.

Ekstrak yang diperoleh dipekatkan dengan *rotary evaporator* sampai didapat ekstrak kental, setelah itu ekstrak kental dilakukan skrining fitokimia. Pemeriksaan ini merupakan pemeriksaan pendahuluan dimaksudkan untuk memberikan gambaran atau mengetahui kelompok senyawa yang terkandung dalam herba *Artemisia annua* L., kemudian dilakukan uji KLT dan dihitung rendemennya.

Pemisahan ekstrak metanol dilakukan dengan dua cara yaitu fraksinasi dan kromatografi kolom. Ekstrak kental metanol difraksinasi menggunakan pelarut *n*-heksan dan selanjutnya menggunakan diklormetan. Fraksinasi dengan berbagai pelarut dengan kepolaran berbeda bertujuan untuk memisahkan senyawa berdasarkan kelarutannya, sehingga senyawa yang terdapat pada ekstrak dapat larut pada pelarut yang sesuai dengan kelarutannya.

Masing-masing fraksi dilakukan uji KLT menggunakan eluen *n*-heksan : etil asetat (1:1), dari hasil uji KLT diketahui bahwa fraksi diklormetan positif mengandung kumarin dengan adanya noda yang dilihat di bawah lampu UV akan berfluoresensi warna biru. Berdasarkan literatur diketahui bahwa kebanyakan senyawa kumarin ternyata aktif terhadap sinar UV, hal ini disebabkan karena kumarin memiliki ikatan rangkap terkonjugasi, dan diketahui sinar serapan UV mampu menyerap suatu ikatan yang terkonjugasi atau memiliki gugus khromofor. Fraksi yang mengandung kumarin dilakukan pemisahan dengan kromatografi kolom, dengan menggunakan fase diam silika gel 60 dan fase gerak *n*-heksan : etil asetat dengan perbandingan gradien (4:1, 2:1, 1:1) berdasarkan hasil orientasi KLT.

Hasil pemisahan pada fraksi diklormetan didapat 19 fraksi pada eluen *n*-heksan: etil asetat dengan perbandingan (1 : 1), di mana fraksi 19

membentuk kristal yang belum murni, untuk itu dilakukan pemurnian dengan cara rekristalisasi menggunakan pelarut campuran metanol – kloroform. Hasil rekristalisasi tersebut diperoleh kristal yang berwarna putih kekuningan yang mengkilat dan memiliki satu noda pada uji KLT. Kemudian senyawa tersebut dilakukan identifikasi.

Hasil identifikasi terhadap senyawa isolat menggunakan kromatografi gas spektrometri massa pada RT 29,23 menit memberikan puncak-puncak molekul $m/e = 192$, yang menandakan berat molekul dari senyawa tersebut adalah 192. Puncak-puncak fragmentasinya adalah $m/e = 192$, 177, 164, 149, 121, 79, 69, dan 51. Setelah dibandingkan dengan data *Library Searched* menunjukkan bahwa senyawa isolat yang terdapat pada herba *Artemisia annua* L. adalah 2H-1-Benzopyran-2-one,7-hydroxy-6-methoxy (skopoletin) memiliki formula molekul $C_{10}H_8O_3$ dan berat molekul 192, merupakan golongan senyawa kumarin, yang memiliki kesamaan 96 %, untuk itu perlu dilakukan identifikasi lagi secara UV, IR dan NMR.

Karakterisasi senyawa hasil isolasi dengan spektrum UV memberikan serapan pada panjang gelombang 346 nm dan 298 nm yang karesteritik untuk senyawa golongan kumarin.

Elusidasi struktur spektrofotometer infra merah (FT IR) sangat berguna untuk mengetahui gugus fungsi suatu senyawa. Gugus fungsi yang diperoleh pada FT - IR ini meliputi gugus -OH pada bilangan gelombang 3337 cm^{-1} , C - O oksil pada bilangan gelombang 1292 cm^{-1} , C=O terkonjugasi pada bilangan gelombang 1705 cm^{-1} , dan C=C benzene pada bilangan gelombang 1607 cm^{-1} , 1566 cm^{-1} dan 1435 cm^{-1} . Dimana gugus-gugus fungsi tersebut merupakan gugus-gugus fungsi pada senyawa kumarin.

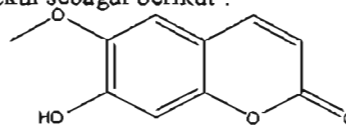
Untuk dapat memastikan struktur senyawa tersebut diperlukan elusidasi struktur dengan spektrofotometri ^1H dan ^{13}C NMR. Dari hasil spektrofotometri ^1H NMR diketahui bahwa pada pergeseran kimia 6,20 ppm muncul satu sinyal doublet dengan konstanta kopling $J = 14,07$ menunjukkan adanya atom H pada posisi 3, pada pergeseran kimia 7,85 ppm muncul satu sinyal doublet dengan konstanta kopling $J = 1,076$ menunjukkan atom H pada posisi 4, pada pergeseran 7,09 ppm muncul satu sinyal singlet dengan konstanta kopling $J = 1,088$ menunjukkan atom H pada posisi 5, pada pergeseran kimia 4,90 ppm muncul satu sinyal singlet dengan konstanta

kopling $J = 1,74$ menunjukkan atom H pada posisi 7, pada pergeseran kimia 6,76 ppm muncul satu sinyal singlet dengan konstanta kopling $J = 1$ menunjukkan atom H pada posisi 8, pada pergeseran kimia 3,90 ppm muncul satu sinyal multiplet dengan konstanta kopling $J = 3,293$ menunjukkan adanya atom H pada posisi 11.

Sedangkan pada ^{13}C NMR diketahui pada pergeseran kimia 164,14 ppm muncul satu sinyal karbon yang spesifik untuk (C = O), pada pergeseran kimia 153,06 ppm dan 56,87 ppm adanya gugus (C - O - C), pada pergeseran kimia 112,62 ppm, 151,49 ppm, 109,96 ppm dan 104,03 ppm muncul sinyal karbon (- C =), pada pergeseran kimia 146,21 ppm muncul sinyal karbon untuk gugus (C - OH), pada pergeseran kimia 112,68 ppm dan 147 ppm adanya gugus C. Dari data spektrum ^1H NMR dan ^{13}C NMR senyawa isolat dengan literatur skopoletin maka senyawa tersebut memiliki inti cincin yang sama .

Kesimpulan

Berdasarkan data yang diperoleh melalui hasil identifikasi secara organoleptis, uji KLT, GC-MS, spektrofotometri UV, FT IR dan spektrofotometri ^1H dan ^{13}C NMR serta dibandingkan dengan literatur 2H-1-Benzopyran-2-one,7-hydroxy-6-methoxy maka senyawa hasil isolasi yang terkandung di dalam herba *Artemisia annua* L merupakan senyawa golongan kumarin dengan nama 2H-1-Benzopyran-2-one,7-hydroxy-6-methoxy atau dengan nama lain skopoletin dengan bobot molekul 192 dengan struktur molekul sebagai berikut :



2H-1-Benzopyran-2-one, 7-hydroxy-6-methoxy

Saran

Perlu dilakukan uji farmakologi senyawa tunggal kumarin sebagai antikanker dari herba *Artemisia annua* L

Daftar Pustaka

1. Ahmad, S.A., E.H. Hakim dan I. Makmur, 1991, Beberapa Upaya Pencarian Bahan Kimia untuk Senyawa-senyawa Bioaktif dari Tumbuhan Lauraceae Indonesia. Makalah Ilmiah, UNESCO Workshop on

-
- Isolation and Bioactivity Studies in Natural Product Research, Padang: 3-5
2. Murray, R.D.H., J. Mendes, and S.A. Brow, 1982, *The Natural Coumarin*, John Willey and Son Ltd, New York
 3. Syarif, Amir, *Farmakologi dan Terapi*, edisi IV, Penerbit: Bagian Farmakologi FKUI, Jakarta.
 4. Kusuma, T.S., 1997, Mempelajari Sifat Antikarsinogen Alamiah Turunan Fenol, Kumin, Kromon, Flavon dan Isokumin, *Jurnal Andalas* No.15, Januari Tahun VI
 5. Juliarni Muji dan Ermayanti Muji, 2004, Studi Karakter Anatomi Daun dari Kultur Tunas *Artemisia Annu L* Penghasil Obat Antimalaria *Artemisin*, Tesis, Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam, IPB.
 6. Bhakuni R.S, P.C.Jain, R.P.Sharma and S.Kumar, *Secondary Metabolites of Artemisia annua and Their Biological Activity*. *Current science*, vol.80 No.1
 7. Banarti, S, 1993, Skrining Aktivitas Antibakteri dari Beberapa Tanaman Suku *Guttiferae* dan Isolasi Senyawa Aktifnya, Tesis, Program Pascasarjana Universitas Airlangga, Surabaya
 8. Anonim, 1987, *Analisis Obat Tradisional*, Jilid I, Departemen Kesehatan Republik Indonesia, Jakarta. Hal. 43 – 53
 9. Anonim, 2000, *Parameter Standar Umum Ekstrak Tumbuhan Obat*, Departemen Kesehatan Republik Indonesia, Jakarta. Hal. 9 – 12
 10. Gritter R.J., Bobbitt J.M., dan Schwarting A.E., 1991, *Pengantar Kromatografi*, penerbit : ITB, Bandung.
 11. Harborne J.B., 1987, *Metode Fitokimia Penuntun Cara Modern Menganalisis Tumbuhan*, penerbit : ITB, Bandung. Hal. 1 – 42, 184 – 196
 12. Kartasubrata, 1991, *Dasar-dasar Kromatografi Lapisan Tipis*, Seminar Aplikasi TLC Dalam Bidang Obat dan Makanan, Puslitbang Kimia Terapan dan Lembaga Ilmu Pengetahuan Indonesia : 1-4
 13. Johnson, E.L dan R.Stevenson, 1991, *Dasar-dasar Kromatografi Cair*, Terjemahan Kosasih Padmawinata, ITB, Bandung:365.
 14. Sidik dan Mudahar, 2000, *Ekstraksi Tumbuhan Obat, Metode dan Faktor-faktor yang mempengaruhi Mutu Produksinya*, Prosiding Seminar PERHIBA Komisariat Jakarta dan Fakultas Farmasi UNTAG 1945 Jakarta, Jakarta: 12-15.
 15. Banarti, S, 1993, *Skrining Aktivitas Antibakteri dari Beberapa Tanaman Suku Guttiferae dan Isolasi Senyawa Aktifnya*, Tesis, Program Pascasarjana Universitas Airlangga, Surabaya.
 16. Cresswel C.J., Rungquist O.A., dan Campbell M.M., 1982, *alibahasa Padmawinata, Sudiro,I, Analisis Spektrum Senyawa Organik*, penerbit : ITB, Bandung. Hal.60 – 181
 17. Silverstein, Basseler and Morrill, 1984, *alibahasa Hartomo, A.J, Purba, A.V, Penyidikan Spektrometri Senyawa Organik*, Edisi 4, Penerbit Erlangga, Surabaya.
 18. Ewing, G.W., 1985, *Instrumental Methods of Chemical Analysis*, Fifth edition, Mc Graw-Hill Book Company, Singapore: 171-172
 19. Tuschone, J.C., 1983, *Practice of Thin Layer Chromatography*, 2nd Edition, John Wiley and Sons Inc, Canada : 122-123
 20. Pine.S.H.J.B.Hendrikson, dan D.J. Cram. 1988, *Spektroskopi, Kimia Organik*, Edisi I, ITB, Bandung, 147-194
-



UNIVERSITAS
ISLAM
INDONESIA



FITOKIMIA

**Tinjauan Metabolit Sekunder dan
Skrining Fitokimia**

TATANG SHABUR JULIANTO

Buku Ajar

Fitokimia
Tinjauan Metabolit Sekunder dan Skrining Fitokimia

Penulis:

Tatang Shabur Julianto

Penerbit:



**UNIVERSITAS
ISLAM
INDONESIA**

2019

KATALOG DALAM TERBITAN (KDT)

Julianto, Tatang Shabur

Fitokimia Tinjauan Metabolit Sekunder dan Skrining Fitokimia/ Tatang Shabur Julianto. --Yogyakarta: Universitas Islam Indonesia, 2019.

x + 106 hlm. ; 16 x 23 cm

ISBN 978-602-450-332-1

e-ISBN 978-602-450-333-8

©2019 Penulis

Hak cipta dilindungi Undang-Undang.

Dilarang memperbanyak atau memindahkan seluruh atau sebagian isi buku ini dalam bentuk apapun, baik secara elektronik ataupun mekanik termasuk memfotokopi, tanpa izin dari Penulis.

FITOKIMIA TINJAUAN METABOLIT SEKUNDER DAN SKRINING FITOKIMIA

Penulis

Tatang Shabur Julianto

Cetakan I

Januari 2019 M / Jumadil Ula 1440 H

Penerbit:



**UNIVERSITAS
ISLAM
INDONESIA**

Kampus Terpadu UII

Jl. Kaliurang Km 14,5 Yogyakarta 55584

Tel. (0274) 898 444 Ext. 2301; Fax. (0274) 898 444 psw 2091

<http://library.uii.ac.id>; e-mail: perpustakaan@uui.ac.id

Kata Pengantar

Assalamu alaikum wr. wb.

Alhamdulillahirobbil'alamin. Segala puji syukur ke hadirat Allah SWT yang dengan limpahan rahmat dan karunia-Nya, akhirnya buku ini dapat tersusun.

Fitokimia merupakan kajian ilmu yang mempelajari sifat dan interaksi senyawaan kimia metabolit sekunder dalam tumbuhan. Keberadaan metabolit sekunder ini sangat penting bagi tumbuhan untuk dapat mempertahankan dirinya dari makhluk hidup lainnya, mengundang kehadiran serangga untuk membantu penyerbukan dan lain-lain. Metabolit sekunder juga memiliki manfaat bagi makhluk hidup lainnya.

Buku ini diharapkan dapat membantu proses pembelajaran matakuliah fitokimia atau pun matakuliah lainnya yang terkait dengan senyawa kimia tumbuhan.

Saran dan kritik sangat kami harapkan kepada seluruh pembaca untuk kesempurnaan buku ini di masa mendatang.

Ucapan terima kasih kami sampaikan kepada Badan Pengembangan Akademik yang telah memberikan dukungan insentif terhadap penulisan dan penerbitan buku ini melalui Program UJI Menulis 2018.

Wa'alaikum salam Wr. Wb.

Yogyakarta, 26 Oktober 2018
Penulis

Tatang Shabur Julianto

Daftar Isi

Kata Pengantar	v
Daftar Isi	vi
Daftar Gambar	viii
1. Pengantar Fitokimia	1
2. Metabolit Primer dan Metabolit Sekunder	7
2.1 Pengertian metabolit primer dan metabolit sekunder	7
2.2 Jalur Biosintesis	12
3. Metode Ekstraksi, Isolasi dan Identifikasi Senyawa Metabolit Sekunder Tumbuhan	17
3.1 Perlakuan sampel tumbuhan	17
3.2 Metode Ekstraksi Tumbuhan	20
3.3 Metode Pemisahan dan Pemurnian Metabolit Sekunder Tumbuhan	30
3.4 Metode Identifikasi Metabolit Sekunder Tumbuhan	32
4. Senyawa Fenolik	35
4.1 Pengertian Senyawa Fenolik	35
4.2 Metode Ekstraksi Senyawa Fenolik	42
4.3 Metode Identifikasi Senyawa Fenolik	43
5. Alkaloid	44
5.1 Pengertian Alkaloid	44
5.2 Metode Ekstraksi Alkaloid	49
5.3 Metode Identifikasi Alkaloid	51
6. Terpenoid	52
6.1 Pengertian Terpenoid	52
6.2 Metode Ekstraksi Terpenoid	56
6.3 Metode Identifikasi Terpenoid	57



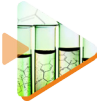
7. Poliketida	60
7.1 Pengertian Poliketida	60
7.2 Metode Ekstraksi Poliketida	67
Glikosida	69
7.3 Pengertian Glikosida	69
7.4 Metode Ekstraksi Glikosida	82
7.5 Metode Identifikasi Glikosida	82
8. Suplemen: Pembuatan Reagen untuk Skrining Fitokimia	84
Referensi	97
Glosari	99
Index	101

Daftar Gambar

Gambar 1.1 Beberapa senyawa metabolit sekunder yang bermanfaat bagi kesehatan	3
Gambar 2.1 Beberapa fungsi metabolit sekunder dalam tumbuhan	9
Gambar 2.2 Jenis metabolisme tumbuhan	11
Gambar 2.3 Jalur biosintesis metabolisme sekunder dalam tumbuhan	13
Gambar 2.4 Metabolit sekunder dari beberapa jalur biosintesis	15
Gambar 3.1 Proses maserasi	21
Gambar 3.2 Perkolator	21
Gambar 3.3 Alat ekstraksi soxhlet	22
Gambar 3.4 Supercritical Fluid Extraction (SFE)	23
Gambar 3.5 Reaktor Microwave-assisted extraction (MAE)	24
Gambar 3.6 Alat Ultrasound-Assisted Extraction	24
Gambar 3.7 Alat Acelarated-Assisted Extraction	25
Gambar 3.8 Proses enflourasi	26
Gambar 3.9 Destilasi rebus	28
Gambar 3.10 Destilasi uap-air	29
Gambar 3.11 Destilasi uap	30
Gambar 4.1 Beberapa jenis senyawa antosianin dalam buah-buahan	36
Gambar 4.2 Beberapa senyawa turunan asam hidroksisinamat suatu fenil propanoid	38
Gambar 5.1 Senyawa-senyawa alkaloid yang terkandung dalam getah Opium	45
Gambar 6.1 Metil jasmonat, suatu monoterpenoid dalam kelopak bunga melati	52
Gambar 7.1 Biosintesis poliketida	61
Gambar 7.2 Senyawa mycothiazole, suatu poliketida yang terdapat dalam sponge	62
Gambar 7.3 Beberapa senyawa poliketida	63
Gambar 7.4 Pengelompokan poliketida berdasarkan strukturnya	64



Gambar 7.5 Klasifikasi genom dan produk dalam biosintesis poliketida	65
Gambar 7.6 Proses kondensasi dalam biosintesis poliketida	66
Gambar 7.7 Reaksi Claisen dalam biosintesis poliketida	67



1. Pengantar Fitokimia

Capaian Pembelajaran

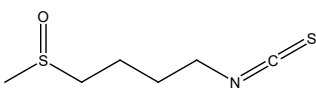
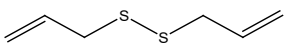
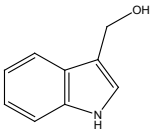
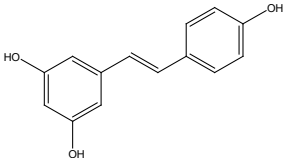
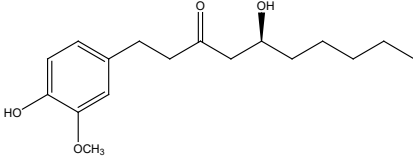
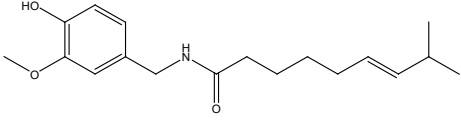
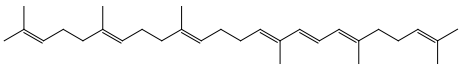
Setelah mempelajari bab 1 ini mahasiswa dapat :

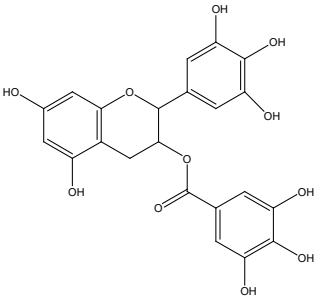
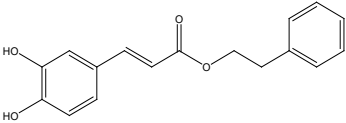
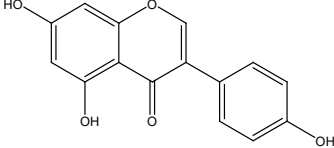
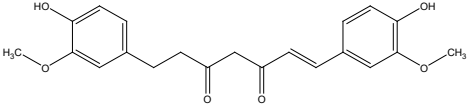
- Memahami dan menjelaskan pengertian fitokimia
- Memahami dan menjelaskan penerapan senyawa kimia dalam metabolisme tumbuhan

Fitokimia merupakan kajian ilmu yang mempelajari sifat dan interaksi senyawa kimia metabolit sekunder dalam tumbuhan. Keberadaan metabolit sekunder ini sangat penting bagi tumbuhan untuk dapat mempertahankan dirinya dari makhluk hidup lainnya, mengundang kehadiran serangga untuk membantu penyerbukan dan lain-lain. Metabolit sekunder juga memiliki manfaat bagi makhluk hidup lainnya.

Hewan termasuk juga manusia dan kebanyakan mikroorganisme bergantung secara langsung maupun tidak langsung terhadap tumbuhan sebagai sumber makanan. Itulah mengapa tumbuhan melalui evolusi membangun strategi sistem pertahanannya dalam melawan gangguan hewan herbivora dan mikroorganisme patogen. Tumbuhan juga harus bersaing dengan tumbuhan lain seringkali dengan tumbuhan dengan spesies yang sama untuk memperoleh kebutuhan sinar matahari, air dan zat makanan nutrisi. Hal yang sama dilakukan oleh hewan yang membangun strategi pertahanan terhadap mikroba dan predator, misalnya dengan sistem imun kompleks untuk melindungi dirinya dari mikroba, senjata, kematian, sistem peringatan, pembentukan racun sebagai pertahanan kimiawi. Namun demikian, tumbuhan tidak dapat bergerak ketika ingin menghindari dari bahaya sehingga mereka perlu membangun bentuk mekanisme pertahanan lainnya, membangun kemampuan pertumbuhan kembali ketika terjadi kerusakan bagian tumbuhan yang termakan oleh hewan atau patogen (daun), perlindungan mekanis (yaitu dengan duri, paku, rambut penyengat, dan lain-lain); kulit kayu yang tebal pada akar dan batang, atau dengan adanya lapisan-lapisan kutikula hidrofobik; getah atau resin yang menghalangi gigitan serangga; membangun dinding sel yang tidak dapat dicerna; dan



menghasilkan metabolit tumbuhan sekunder. Mekanisme yang disebutkan terakhir mungkin merupakan strategi paling penting untuk pertahanan tumbuhan. Contoh mekanisme yang sama ditemukan pada banyak serangga dan invertebrata lainnya, terutama spesies laut. Beberapa vertebrata juga menghasilkan dan menyimpan metabolit protektif yang mirip dalam struktur untuk metabolisme tumbuhan.

Sumber	Struktur	Nama senyawa
Brokoli		Sulforapen
Bawang putih		Dialil sulfida
Kubis		Sindol-3karbinol
Anggur		Resveratrol
Jahe		Gingerol
Cabe		Capsaicin
Tomat		Likopen

Daun teh		Epigallocatechin-3galat
Madu		Asam kafeicfenetil eter
Kedelai		Genistein
Kunyit		curcumin

Gambar 1.1 Beberapa senyawa metabolit sekunder yang bermanfaat bagi kesehatan

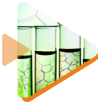
Tindakan Hewan, Manusia Dan Tumbuhan Menghadapi Gangguan

Jenis Gangguan	Hewan dan manusia	Tumbuhan
		
Serangan dari hewan dan serangga	Menyerang baik/melarikan diri/ mengeluarkan repellent (bau yang tidak enak)	Menghasilkan senyawa racun, senyawa yang memiliki rasa pahit, inhibitor enzim, menghasilkan protein
Infeksi oleh mikroorganisme	Memproduksi sistem imun/ antibiotic	Menghasilkan senyawa metabolit antimikroba
Cahaya matahari yang terik	Berteduh, menggunakan sunscreen, mengenakan pakaian	Menghasilkan senyawa anti sinar ultraviolet

Tumbuhan menghasilkan banyak senyawa kimia untuk keperluan pertahanan dan komunikasi, tetapi tumbuhan juga dapat menimbulkan bentuk perang kimia ofensif mereka sendiri yang menargetkan proliferasi sel patogen. Bahan kimia ini mungkin memiliki aktivitas umum atau spesifik terhadap situs target utama pada bakteri, jamur, virus, atau penyakit neoplastik.

Latihan Soal

1. Jelaskan definisi fitokimia!
2. Seberapa pentingnya fitokimia dipelajari untuk kehidupan sehari?
3. Jelaskan perbedaan cara hewan dan tumbuhan dalam mempertahankan kelangsungan hidupnya!



2. Metabolit Primer dan Metabolit Sekunder

Capaian Pembelajaran

Setelah mempelajari bab 2 ini mahasiswa dapat :

- Memahami dan menjelaskan perbedaan antara metabolit primer dan sekunder
- Memahami dan menjelaskan tiga jalur biosintesis dalam tumbuhan serta contohnya

2.1 Pengertian metabolit primer dan metabolit sekunder

Semua makhluk hidup mengubah dan menginterkoneksi sejumlah besar senyawa organik untuk melangsungkan kehidupan, tumbuh dan bereproduksi. Makhluk hidup memiliki kemampuan menyediakan energi dalam bentuk ATP dan pasokan gugus pembangun untuk merancang jaringan tubuhnya.

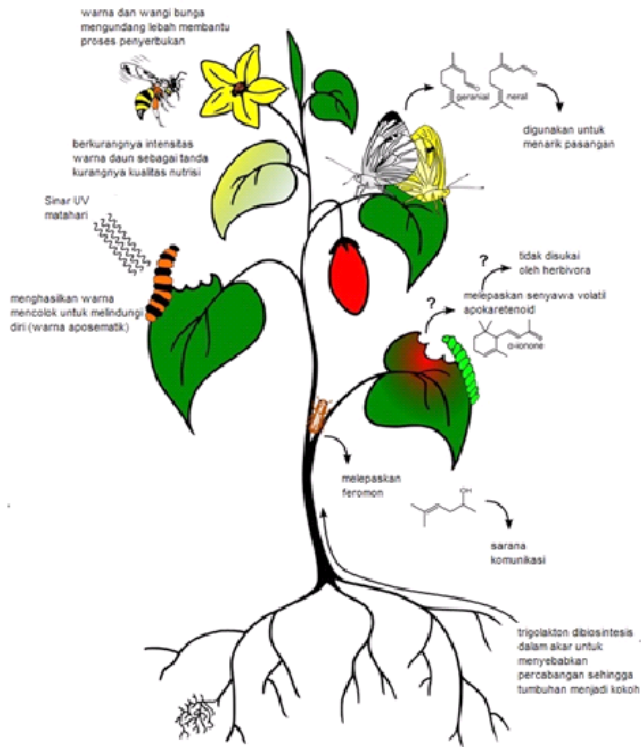
Sebuah hubungan kolektif yang terintegrasi dari reaksi kimia yang dimediasi secara enzimatik dan ditata secara rapi dalam rangka mencapai tujuan tersebut di atas disebut sebagai **metabolisme antara**, sedangkan jalur yang terlibat diistilahkan sebagai **jalur metabolisme**. Beberapa biomolekul yang sangat penting diantaranya adalah karbohidrat, protein, lemak, dan asam nukleat. Karbohidrat tersusun atas unit gula, protein dibuat dari asam amino, asam nukleat tersusun berdasarkan nukleotida dan lemak terbentuk oleh 3 rantai asam lemak yang berikatan dengan gliserol.

Makhluk hidup secara umum bervariasi jika ditinjau dari kapasitasnya dalam melakukan sintesis dan proses pengubahan senyawa kimia. Misalnya, tumbuhan sangat efisien dalam mensintesis senyawa organik melalui fotosintesis dari bahan anorganik yang ditemukan di lingkungan, sementara organisme lain seperti hewan dan mikroorganisme bergantung pada memperoleh bahan mentah mereka dalam makanan mereka, misalnya dengan mengkonsumsi tumbuhan. Dengan demikian, beberapa jalur metabolik berkaitan dengan senyawa dasar yang diperoleh dari penguraian makanan, sementara yang lainnya diminta untuk mensintesis molekul khusus

dari senyawa dasar yang diperoleh. Meskipun karakteristik organisme hidup yang sangat bervariasi, jalur untuk memodifikasi dan mensintesis karbohidrat, protein, lemak, dan asam nukleat pada dasarnya sama pada semua organisme. Proses-proses ini menunjukkan kesatuan mendasar dari semua materi hidup, dan secara kolektif digambarkan sebagai metabolisme utama. Senyawa yang terlibat dalam jalur yang disebut **metabolit primer**. Karenanya, degradasi karbohidrat dan gula umumnya terjadi melalui jalur yang ditandai dengan baik yang dikenal sebagai glikolisis dan siklus Krebs /sitrat/siklus asam trikarboksilat, yang melepaskan energi dari senyawa organik melalui reaksi oksidasi. Oksidasi asam lemak dari lemak dengan urutan yang disebut β -oksidasi juga menghasilkan energi. Organisme aerobik mampu mengoptimalkan proses-proses ini dengan menambahkan pada proses selanjutnya yaitu fosforilasi oksidatif. Proses ini meningkatkan efisiensi oksidasi dengan menggabungkan proses yang lebih umum berlaku untuk oksidasi berbagai substrat daripada harus menyediakan proses spesifik untuk masing-masing substrat.

Metabolisme merupakan seluruh perubahan kimia yang terjadi dalam sel hidup yang meliputi pembentukan dan penguraian senyawa kimia. Metabolisme primer dalam suatu tumbuhan meliputi seluruh jalur metabolisme yang sangat penting kemampuan tumbuhan untuk mempertahankan kelangsungan hidupnya.

Metabolit primer merupakan senyawa yang secara langsung terlibat dalam pertumbuhan suatu tumbuhan sedangkan metabolit sekunder adalah senyawa yang dihasilkan dalam jalur metabolisme lain yang walaupun dibutuhkan tapi dianggap tidak penting perannya dalam pertumbuhan suatu tumbuhan.



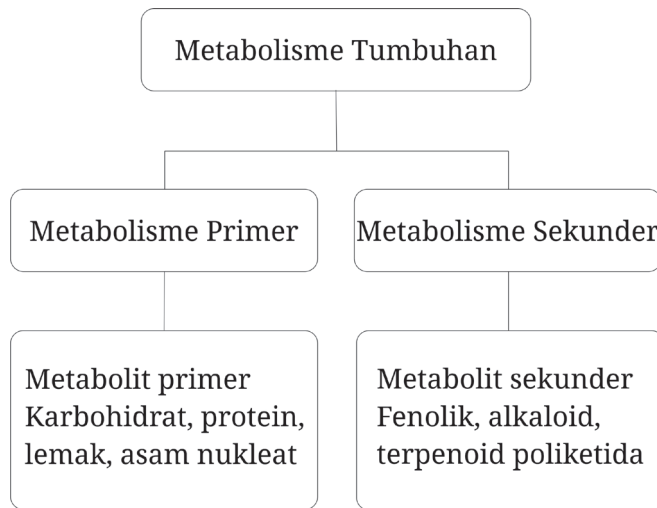
Gambar 2.1 Beberapa fungsi metabolit sekunder dalam tumbuhan

Bagaimanapun itu, metabolit sekunder berperan bagi tumbuhan dalam jangka waktu yang panjang, seringkali sebagai tujuan pertahanan, serta memberikan karakteristik yang khas dalam bentuk senyawa warna. Metabolit sekunder juga digunakan sebagai penanda dan pengatur jalur metabolisme primer. Hormon tumbuhan yang merupakan metabolit sekunder seringkali digunakan untuk mengatur aktivitas metabolisme sel dan pertumbuhan suatu tumbuhan. Metabolit sekunder membantu tumbuhan mengelola sebuah sistem keseimbangan yang rumit dengan lingkungan, beradaptasi mengikuti kebutuhan lingkungan. Warna yang diberikan oleh metabolit sekunder dalam tumbuhan merupakan contoh yang bagus untuk menjelaskan bagaimana sistem keseimbangan diterapkan. Melalui warna, tumbuhan dapat menarik serangga untuk membantu proses penyerbukan dan juga dapat berguna untuk bertahan dari serangan hewan.

Metabolisme sekunder menghasilkan sejumlah besar senyawa-senyawa khusus (kurang lebih 200.000 senyawa) yang secara fungsi tidak memiliki peranan dalam membantu pertumbuhan dan perkembangan tumbuhan namun diperlukan oleh tumbuhan untuk bertahan dari keadaan lingkungannya. Metabolisme sekunder terhubung dengan metabolisme primer dalam hal senyawa pembangun dan enzim dalam biosintesis. Metabolisme primer membentuk seluruh proses fisiologis yang memungkinkan tumbuhan mengalami pertumbuhan melalui menerjemahkan kode genetik menghasilkan protein, karbohidrat dan asam amino.

Senyawa khusus dari metabolisme sekunder sangat penting untuk berkomunikasi dengan organisme lain secara mutualistik (misalnya penarik organisme menguntungkan seperti penyerbuk) atau interaksi antagonis (misalnya pencegah terhadap herbivora dan mikroba patogen). Lebih jauh lagi metabolit sekunder membantu dalam mengatasi stres abiotik seperti peningkatan radiasi UV walaupun mekanisme fungsinya masih belum sepenuhnya dipahami.

Bagaimanapun, keseimbangan yang baik antara produk metabolisme primer dan sekunder adalah yang terbaik untuk pertumbuhan dan perkembangan optimal tumbuhan serta untuk mengatasi secara efektif kondisi lingkungan yang sering berubah. Senyawa khusus yang terkenal diantaranya alkaloid, polifenol termasuk flavonoid, dan terpenoid. Manusia menggunakan cukup banyak senyawa ini, atau tumbuhan dari mana mereka berasal, untuk tujuan pengobatan dan nutrisi.



Gambar 2.2 Jenis metabolisme tumbuhan

Beberapa fungsi penting metabolit sekunder:

- Hormon
- Sebagai agen pewarna untuk menarik atau memberi peringatan pada spesies lainnya
- Fitoaleksan (sebagai bahan racun) yang memberikan pertahanan melawan predator.
- Merangsang sekresi senyawa-senyawa lainnya seperti alkaloid, terpenoid, senyawa fenolik, glikosida, gula dan asam amino.

Hubungan antara metabolisme sekunder dan metabolisme primer:

- Proses dan produk metabolisme primer sama pada hampir semua organisme sedangkan metabolisme sekunder lebih spesifik
- Dalam tumbuhan, metabolisme primer dibuat melalui fotosintesis, respirasi dan lain-lain menggunakan CO_2 , H_2O , dan NH_3 sebagai bahan baku dan membentuk produk seperti glukosa, asam amino, asam nukleat. Sedangkan di dalam metabolisme sekunder, tahap biosintesis, substrat dan produknya khas untuk tiap famili dan spesies. Spesies-spesies yang dekat secara taksonomi memiliki kesamaan jenis metabolit sedangkan spesies yang jauh secara taksonomi memiliki metabolit sekunder yang sangat berbeda.

2.2 Jalur Biosintesis

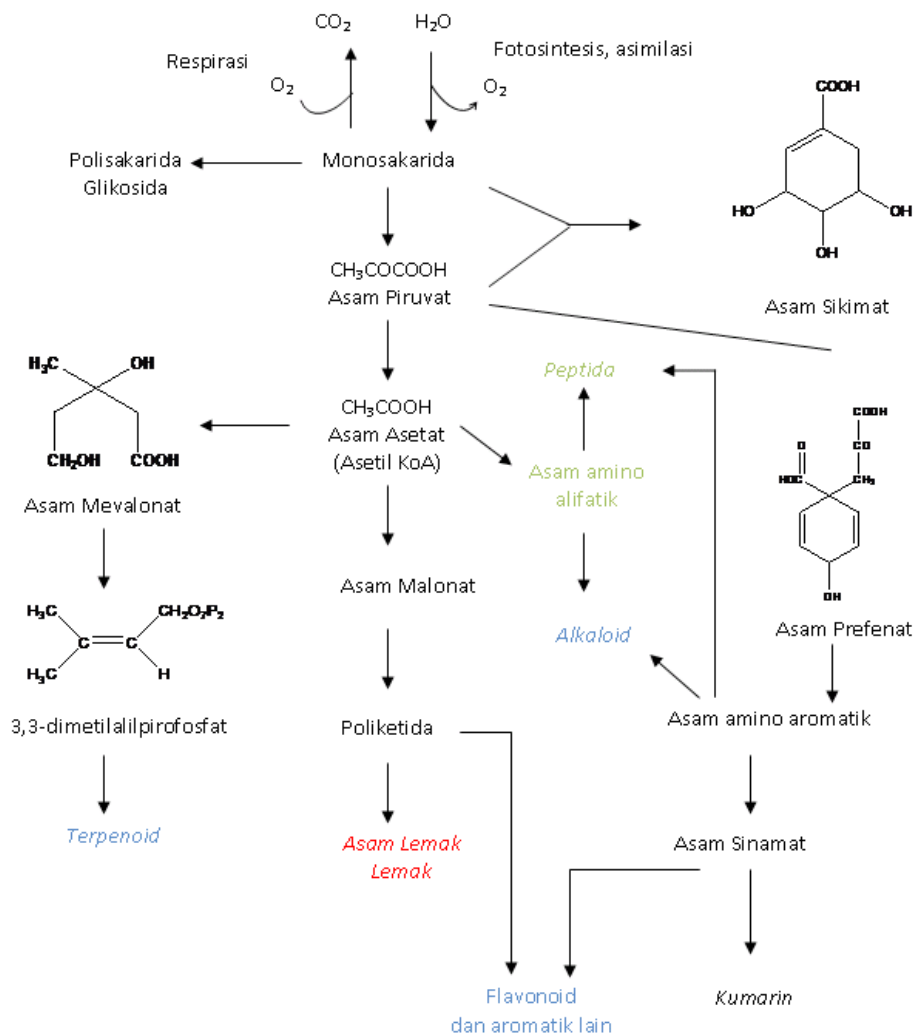
Penentuan jalur biosintetik memungkinkan kita untuk memahami hubungan dan aliran dinamis dari senyawa yang ada dalam sel hidup.

Pemahaman tentang urutan biosintesis dapat membantu kita mengidentifikasi enzim dan gen, memahami hubungan antara organisme yang berbeda (seperti simbiosis, interaksi tumbuhan-serangga, dan lain-lain). Pemahaman tentang biosintesis adalah bagian dari pemahaman lengkap tentang biologi tumbuhan, ekologi dan keanekaragaman hayati.

Jalur biosintesis, atau jalur biosintesis adalah gambaran langkah-langkah reaksi kimia yang terjadi ketika organisme hidup menciptakan molekul kompleks baru dari prekursor yang lebih sederhana dan lebih kecil.

Kata "biosintesis" berasal dari dua kata dasar yaitu "Bio" yang menunjukkan bahwa reaksi berlangsung dalam organisme hidup yang berbeda dengan reaksi di dalam laboratorium; "sintesis" yang menunjukkan bahwa bahan awal yang sederhana direaksikan untuk membentuk produk yang lebih besar.

Jalur biosintesis adalah ringkasan dari reaksi kimia ini, dipecah oleh setiap langkah. Untuk mendeskripsikan suatu jalur, informasi ekstra relevan sering dimasukkan, seperti enzim, koenzim, dan kofaktor yang digunakan dalam setiap reaksi.



Gambar 2.3 Jalur biosintesis metabolisme sekunder dalam tumbuhan

Berdasarkan senyawa pembangunnya (*building block*) maka jalur biosintesis metabolit sekunder dalam tumbuhan dapat dibagi menjadi 3 jalur yaitu:

1. Jalur asam asetat (*Acetate Pathway*)
2. Jalur asam sikimat (*shikimic acid pathway*)
3. Jalur asam mevalonat dan deoksisilulosa (*mevalonate acid and deoxyxylulose pathway*)

Jalur Asam Asetat

Asetil KoA dibentuk oleh reaksi dekarboksilasi oksidatif dari jalur glikolitik produk asam piruvat. Asetil Ko-A juga dihasilkan oleh proses β -oksidasi asam lemak, secara efektif membalikkan proses dimana asam lemak itu sendiri disintesis dari asetil-KoA.

Metabolit sekunder penting yang terbentuk dari jalur asetat meliputi senyawa fenolik, prostaglandin, dan antibiotik makrolida, serta berbagai asam lemak dan turunan pada antarmuka metabolisme primer / sekunder.

Jalur Asam Sikimat

Asam shikimat diproduksi dari kombinasi fosfoenolpiruvat, jalur glikolitik antara, dan erythrose 4-fosfat dari jalur pentosa fosfat. Reaksi siklus pentosa fosfat dapat digunakan untuk degradasi glukosa, tetapi mereka juga fitur dalam sintesis gula oleh fotosintesis.

Jalur sikimat mengarah ke berbagai senyawa fenolik, turunan asam sinamat, lignan, dan alkaloid

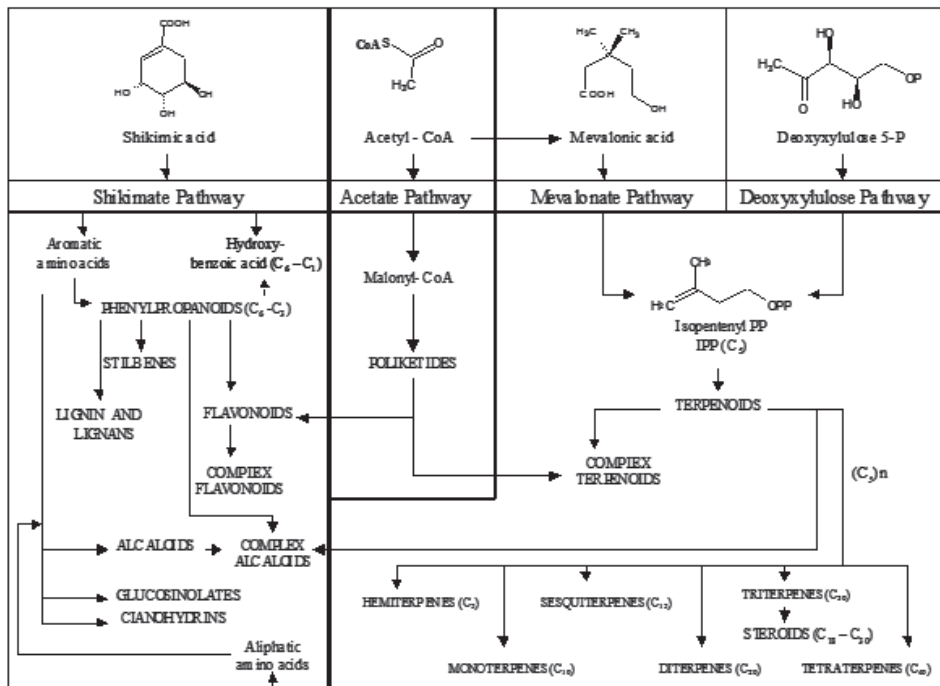
Jalur Asam mevalonat dan deoksisilulosa

Asam mevalonik sendiri terbentuk dari tiga molekul asetil Ko-A, tetapi saluran jalur mevalonatasetat menjadi serangkaian senyawa yang berbeda daripada jalur asetat.

Deoksisilulosa pospat muncul dari kombinasi dua intermediet jalur glikolitik, yaitu asam piruvat dan gliseraldehida-3-fosfat.

Jalur fosfat mevalonat dan deoksisilulosa bersama-sama bertanggung jawab untuk biosintesis dari arah besar metabolit terpenoid dan steroid.

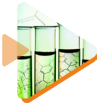




Gambar 2.4 Metabolit sekunder dari beberapa jalur biosintesis

Latihan Soal

1. Jelaskan perbedaan antara metabolit primer dengan metabolit sekunder?
2. Berikan contoh senyawa metabolit sekunder dari jalur biosintesis asam asetat dan asam sikimat?
3. Jelaskan contoh-contoh fungsi senyawa metabolit sekunder bagi tumbuhan dan manusia?



3. Metode Ekstraksi, Isolasi dan Identifikasi Senyawa Metabolit Sekunder Tumbuhan

Capaian Pembelajaran

Setelah mempelajari bab 3 ini mahasiswa dapat :

- Memahami dan menjelaskan perbedaan metode ekstraksi senyawa metabolit sekunder
- Memahami dan menjelaskan beberapa metode identifikasi secara kualitatif dan kuantitatif

Selain digunakan untuk mempertahankan kelangsungan hidupnya, senyawa metabolit sekunder dalam tumbuhan memiliki banyak manfaat bagi manusia diantaranya sebagai obat, pestisida alamiah, pewarna makanan, aroma, kosmetika, dan pewangi. Biosintesis senyawa metabolit sekunder juga dipelajari untuk memperoleh informasi kimiawi terkait dengan proses pertumbuhan dan peningkatan kualitas suatu tumbuhan dalam bidang pertanian, perkebunan dan kehutanan.

Proses ekstraksi dan isolasi diperlukan untuk memisahkan dan mengambil senyawaan metabolit sekunder tersebut sehingga dapat diperoleh manfaatnya. Beberapa tahapan yang dapat dilakukan untuk memperoleh senyawa kimia metabolit sekunder tersebut meliputi metode pengumpulan sampel tumbuhan, pencucian sampel tumbuhan, pengeringan, dan metode ekstraksi dan isolasi tumbuhan.

3.1 Perlakukan sampel tumbuhan

3.1.1 Pengumpulan sampel tumbuhan

Sampel tumbuhan dapat diperoleh baik dari alam liar maupun dari herbarium. Ketika tumbuhan dikumpulkan dari alam liar, ada risiko bahwa sampel tumbuhan telah diidentifikasi secara tidak benar. Keuntungan utama dari tumbuhan yang diperoleh dari hutan liar adalah mereka tidak akan mengandung pestisida. Setelah tumbuhan dikumpulkan dari alam liar atau dari herbarium, sampel tumbuhan harus dibersihkan untuk mencegah atau meminimalisir terjadinya kerusakan senyawa kimia yang ada pada tumbuhan.

3.1.2 Pencucian sampel tumbuhan

Setelah tahapan pengumpulan dilakukan, sampel tumbuhan harus dibersihkan dengan benar. Proses pembersihan mungkin melibatkan langkah-langkah berikut. Membersihkan, mencuci, mengupas atau mengupas daun dari batang. Pembersihan harus dilakukan dengan tangan untuk mendapatkan hasil yang lebih baik.

3.1.3 Preparasi sampel tumbuhan

Idealnya jaringan tumbuhan segar digunakan untuk analisis fitokimia, dilarutkan dalam alkohol mendidih untuk selanjutnya disimpan. Namun kadang-kadang sampel tumbuhan yang akan dipelajari tidak selalu dapat langsung diperoleh di daerah tempat analisis, bahkan berbeda pulau atau benua. Maka untuk mencegah terjadinya kerusakan senyawa metabolit sekunder dalam tumbuhan, dilakukan pengeringan sampel.

Sampel tumbuhan seperti daun, kayu, akar, buah, dan bunga dapat diekstrak dari sampel tumbuhan segar atau sampel yang dikeringkan. Metode preparasinya seperti penggilingan/penghalusan juga berpengaruh terhadap pengawetan senyawa kimia tumbuhan dalam ekstrak.

Sampel segar vs. sampel kering

Kedua jenis sampel baik sampel segar maupun sampel yang dikeringkan, keduanya digunakan dalam kajian fitokimia dalam tumbuhan. Dalam kebanyakan kasus, sampel yang dikering lebih disarankan dengan memperhatikan pertimbangan waktu yang dibutuhkan dalam eksperimen. Interval waktu antara pemanenan dengan pekerjaan eksperimental maksimum pada jangka waktu 3 jam pada sampel segar dimana sampel segar mudah rusak dan mengalami penurunan kualitas yang lebih cepat dibandingkan dengan sampel kering.

Sampel tumbuk vs. sampel serbuk halus

Pengurangan ukuran partikel dapat meningkatkan kontak permukaan antara sampel dan pelarut ekstraksi. Metode tumbuk menghasilkan sampel yang lebih kecil dan kasar; Sementara itu, sampel serbuk memiliki partikel yang lebih homogen dan lebih kecil, yang mengarah ke kontak permukaan yang lebih baik dengan pelarut ekstraksi.



Metode Pengeringan

Ada beberapa metode pengeringan yang dapat dilakukan terhadap sampel tumbuhan yaitu:

a. *Pengeringan udara (Air-Drying)*

Pengeringan udara biasanya memakan waktu selama 3-7 hari hingga beberapa bulan bahkan satu tahun tergantung pada jenis sampel yang dikeringkan (misalnya daun atau biji). Sampel tumbuhan, biasanya daun tumbuhan dengan batang yang diikat bersama dan digantung untuk mengekspos tumbuhan ke udara pada suhu ambien. Metode pengeringan ini tidak memaksakan bahan tumbuhan kering menggunakan suhu tinggi; Oleh karena itu, senyawa yang tidak tahan panas dapat terjaga kualitasnya. Namun, pengeringan udara membutuhkan waktu lebih lama dibandingkan dengan pengeringan *microwave* dan pengeringan beku serta dapat mengalami kontaminasi pada kondisi suhu yang tidak stabil.

b. *Pengeringan microwave*

Pengeringan *microwave* menggunakan radiasi elektromagnetik yang memiliki medan listrik dan magnet. Medan listrik menyebabkan pemanasan simultan melalui rotasi dipolar; pelurusan pada medan listrik dari molekul yang memiliki momen dipol permanen atau induksi (misalnya pelarut atau sampel), dan induksi ionik, yang menghasilkan osilasi molekul. Osilasi menyebabkan tumbukan antar molekul dan menghasilkan pemanasan cepat dari sampel secara bersamaan. Metode ini dapat mempersingkat waktu pengeringan tetapi terkadang menyebabkan degradasi senyawa kimia dalam jaringan tumbuhan.

c. *Pengeringan Oven*

Oven-pengeringan adalah metode pra-ekstraksi lain yang menggunakan energi panas untuk menghilangkan uap air dari sampel. Persiapan sampel ini dianggap sebagai salah satu proses termal termudah dan cepat yang dapat mempertahankan senyawa kimia tumbuhan. Waktu ekstraksi yang lebih pendek diperoleh dengan menggunakan metode ini.

d. *Pengeringan Beku (Freeze Drying)*

Pengeringan beku adalah metode berdasarkan prinsip sublimasi. Sublimasi adalah proses ketika padatan diubah menjadi fase gas tanpa

memasuki fase cair. Sampel dibekukan pada $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ hingga $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ sebelum liopilisasi untuk memantapkan cairan apapun (misalnya pelarut, kelembaban) disampel. Setelah pembekuan dalam semalam (12 jam), sampel segera diserbukkan untuk menghindari cairan beku dalam sampel dari meleleh. Mulut tabung uji atau wadah sampel dibungkus dengan jarum-poked-parafilm untuk menghindari hilangnya sampel selama proses. Beberapa waktu selanjutnya, sampel akan hilang dengan memercik ke dalam labu beku. Pengeringan beku menghasilkan kadar fenolik yang lebih tinggi dibandingkan dengan pengeringan udara karena sebagian besar senyawa kimia tumbuhan dijaga kondisinya dalam metode ini. Namun, pengeringan beku adalah metode pengeringan yang rumit dan mahal dibandingkan pengeringan udara biasa dan pengeringan *microwave*. Dengan demikian, penggunaan dibatasi untuk bahan yang halus, labil terhadap panas dan bahan bernilai tinggi.

3.2 Metode Ekstraksi Tumbuhan

a. Maserasi

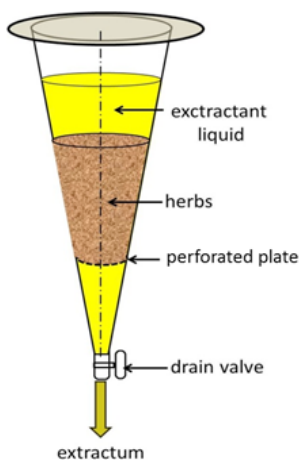
Dalam maserasi, bubuk kasar sampel tumbuhan disimpan dan dibiarkan mengalami kontak dengan pelarut dalam wadah tertutup untuk jangka waktu tertentu yang disertai dengan pengadukan hingga komponen sampel tumbuhan ada yang larut. Metode ini paling cocok untuk digunakan dalam kasus senyawa kimia tumbuhan yang tidak tahan panas (termolabil).



Gambar 3.1 Proses maserasi

b. Perkolasi

Perkolasi adalah prosedur yang paling sering digunakan untuk mengekstrak bahan aktif dalam tumbuhan. Sebuah perkolator adalah wadah sempit berbentuk kerucut terbuka di kedua ujungnya. Sampel tumbuhan padat dibasahi dengan sejumlah pelarut yang sesuai dan dibiarkan selama kira-kira 4 jam dalam wadah tertutup. Selanjutnya bagian atas perkolator ditutup. Pelarut ditambahkan hingga merendam sampel. Campuran sampel dan pelarut dapat dimaserasi lebih lanjut dalam wadah perkolator tertutup selama 24 jam. Saluran keluar perkolator kemudian dibuka dan cairan yang terkandung di dalamnya dibiarkan menetes perlahan. Pelarut dapat ditambahkan sesuai kebutuhan, sampai ukuran perkolasi sekitar tiga perempat dari volume yang diperlukan dari produk jadi.

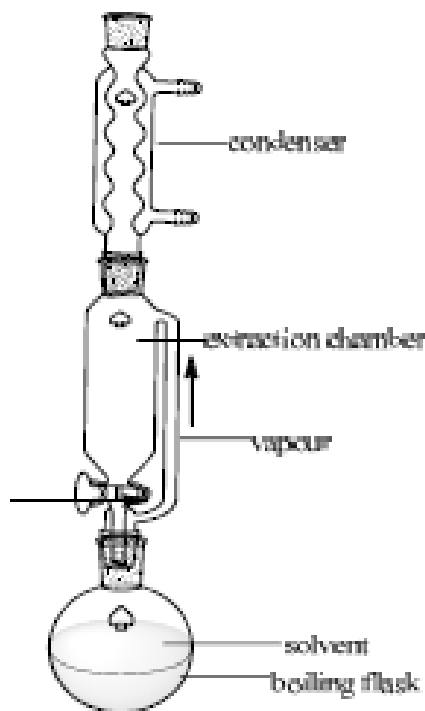


Gambar 3.2 Perkolator

c. Ekstraksi soxhlet

Ekstraksi soxhlet hanya diperlukan apabila senyawa yang diinginkan memiliki kelarutan terbatas dalam pelarut, dan pengotor tidak larut dalam pelarut itu. Jika senyawa yang diinginkan memiliki kelarutan yang tinggi dalam suatu pelarut maka suatu penyaringan sederhana dapat digunakan untuk memisahkan senyawa dari zat yang tidak larut. Keuntungan dari sistem ini adalah proses ekstraksi cukup dilakukan dalam satu wadah dimana secara kontinyu pelarut yang terkondensasi akan menetes dan merendam sampel

tumbuhan dan membawa senyawa terlarut ke labu penampung. Metode ini tidak dapat digunakan untuk senyawa termolabile karena pemanasan yang berkepanjangan dapat menyebabkan degradasi senyawa.



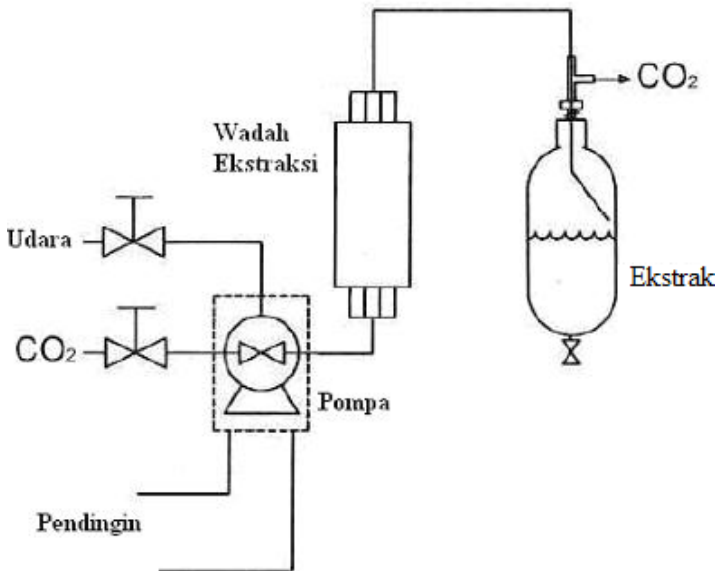
Gambar 3.3Alat ekstraksi soxhlet

d. Supercritical Fluid Extraction

Gas superkritis seperti karbon dioksida, nitrogen, metana, etana, etilen, nitrogen oksida, sulfur dioksida, propana, propilena, amonia dan sulfur heksafluorida digunakan untuk mengekstrak senyawa aktif dalam tumbuhan. Sampel tumbuhan disimpan dalam bejana yang diisi dengan gas dalam kondisi yang terkendali seperti suhu dan tekanan. Senyawa aktif yang larut dalam gas terpisah ketika suhu dan tekanan lebih rendah. Faktor penting dari teknik ini adalah transfer massa zat terlarut dalam pelarut superkritis.

Secara umum, suhu dan tekanan memiliki pengaruh terbesar. Namun efek tekanannya lebih langsung. Ketika tekanan meningkat, kepadatan yang

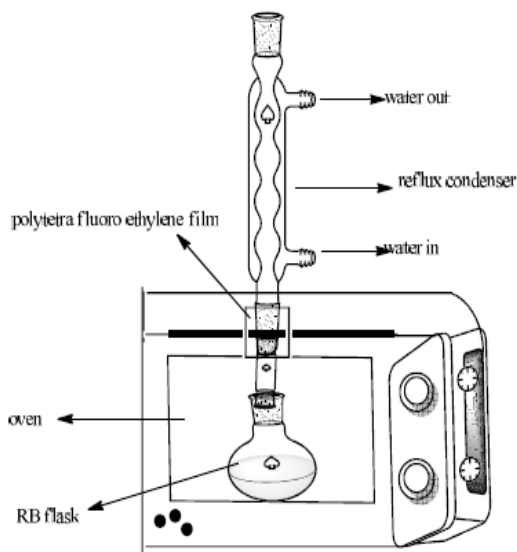
lebih tinggi dicapai oleh cairan superkritis. Dengan demikian densitas medium meningkat dan kelarutan zat terlarut akan meningkat. Untuk mendapatkan hasil yang lebih tinggi, proses harus dioptimalkan. Dengan menggunakan metodologi permukaan respons, parameter optimum dapat diperoleh.



Gambar 3.4 Supercritical Fluid Extraction (SFE)

e. Microwave-assisted extraction

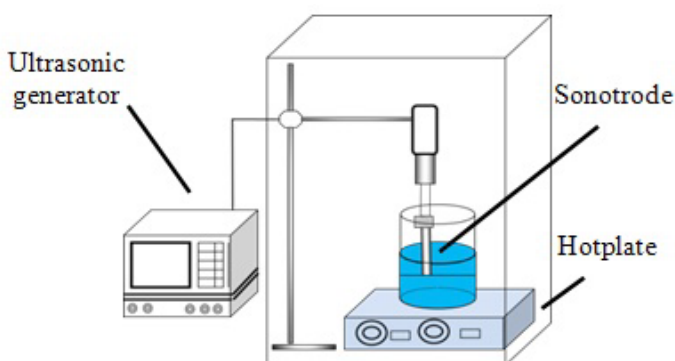
Dalam metode ini energi gelombang mikro (*microwave*) membantu pemisahan senyawa aktif dari sampel tumbuhan ke dalam pelarut. Gelombang mikro memiliki medan listrik dan magnet yang tegak lurus satu sama lain. Listrik yang dialirkan menghasilkan panas melalui rotasi dipolar dan konduksi ionik. Meningkatnya konstanta dielektrik pelarut, pemanasan yang dihasilkan semakin cepat. Berbeda dengan metode klasik, ekstraksi dengan bantuan *microwave* memanaskan seluruh sampel secara bersamaan. Selama ekstraksi, panas mengganggu ikatan hidrogen yang lemah karena rotasi dipol molekul dan migrasi ion terlarut meningkatkan penetrasi pelarut ke dalam sampel atau matriks.



Gambar 3.5 Reaktor Microwave-assisted extraction (MAE)

f. **Ultrasound-Assisted Extraction**

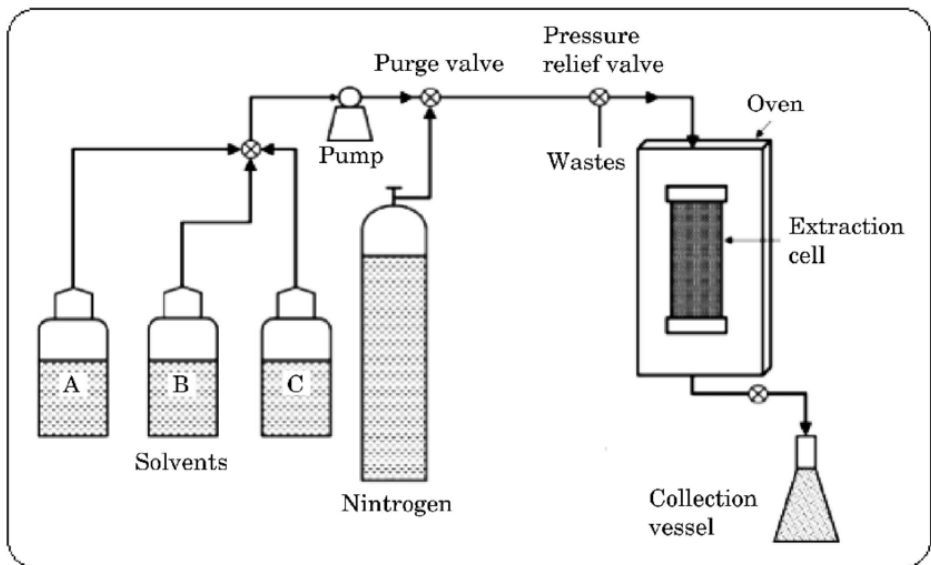
Ultrasound-Assisted Extraction adalah teknik canggih yang memiliki kemampuan mengekstraksi sejumlah besar senyawa bioaktif dalam waktu ekstraksi yang lebih pendek. Keuntungan utama dari teknik ini adalah meningkatkan penetrasi pelarut ke dalam matriks karena gangguan dinding sel yang dihasilkan oleh kavitas akustik. Dan juga ini mencapai pada suhu rendah dan karenanya ini lebih cocok untuk ekstraksi senyawa termal tidak stabil.



Gambar 3.6 Alat Ultrasound-Assisted Extraction

g. Acelarated-assisted extraction

Dalam teknik ekstraksi pelarut dipercepat, pelarut digunakan pada suhu tinggi dan tekanan untuk menjaga pelarut dalam bentuk cair selama proses ekstraksi. Karena suhu tinggi kapasitas pelarut untuk melarutkan analit meningkat dan dengan demikian tingkat difusi meningkat. Selanjutnya, suhu yang lebih tinggi mengurangi viskositas dan pelarut dapat dengan mudah menembus pori-pori matriks. Pelarut bertekanan memungkinkan kontak lebih dekat dengan analit dan pelarut. Namun, metode ini menggunakan lebih sedikit waktu dan lebih sedikit jumlah pelarut untuk ekstraksi bahan aktif. Keuntungan dari metode ini adalah ekstraksi untuk ukuran sampel 1-100g dalam menit, pengurangan pelarut dramatis dan berbagai aplikasi dan penanganan matriks asam dan basa.



Gambar 3.7 Alat Acelarated-Assisted Extraction

h. Enfleurasi

Enfleurasi adalah proses yang menggunakan lemak tak berbau yang padat pada suhu kamar untuk menangkap senyawa yang harum yang dikeluarkan oleh tumbuhan. Prosesnya bisa berupa enfleurasi dingin atau enfleurasi panas.

Ada dua jenis proses:

1. Dalam enfleurasi dingin, sebuah piring kaca berbingkai besar, yang disebut sasis, dilumuri dengan lapisan lemak hewani, biasanya lemak babi atau lemak (dari babi atau daging sapi, masing-masing), dan dibiarkan mengendap. Bahan tumbuhan, biasanya kelopak atau bunga utuh, kemudian ditempatkan pada lemak dan aromanya dibiarkan berdifusi ke dalam lemak selama 1-3 hari. Proses ini kemudian diulang dengan mengganti botani yang dihabiskan dengan yang segar sampai lemak telah mencapai tingkat saturasi aroma yang diinginkan. Prosedur ini dikembangkan di Prancis selatan pada abad ke-18 untuk produksi konsentrat bermutu tinggi.
2. Dalam enfleurasi panas, lemak padat dipanaskan dan materi botani diaduk menjadi lemak. Botani yang digunakan berulang kali tegang dari lemak dan diganti dengan bahan segar sampai lemak jenuh dengan aroma. Metode ini dianggap prosedur tertua yang diketahui untuk melestarikan zat aroma tumbuhan.

Dalam kedua kasus, setelah lemak jenuh dengan aroma, kemudian disebut "pomade enfleurage". Pomade enfleurage dapat langsung diperdagangkan, atau bisa dicuci lebih lanjut atau direndam dalam etanol untuk menarik molekul harum ke dalam alkohol. Alkohol kemudian dipisahkan dari lemak dan dibiarkan menguap, meninggalkan bagian mutlak dari sampel tumbuhan. Lemak yang terbuang biasanya digunakan untuk membuat sabun karena masih relatif harum.



Gambar 3.8 Proses enfleurasi

i. Hidrodestilasi

Penyulingan (distilasi) merupakan proses pemisahan komponen dapat berupa cairan atau padatan yang dibedakan berdasarkan titik didih dari masing-masing zat tersebut. Dalam industri minyak atsiri dikenal tiga macam metode penyulingan, yaitu:

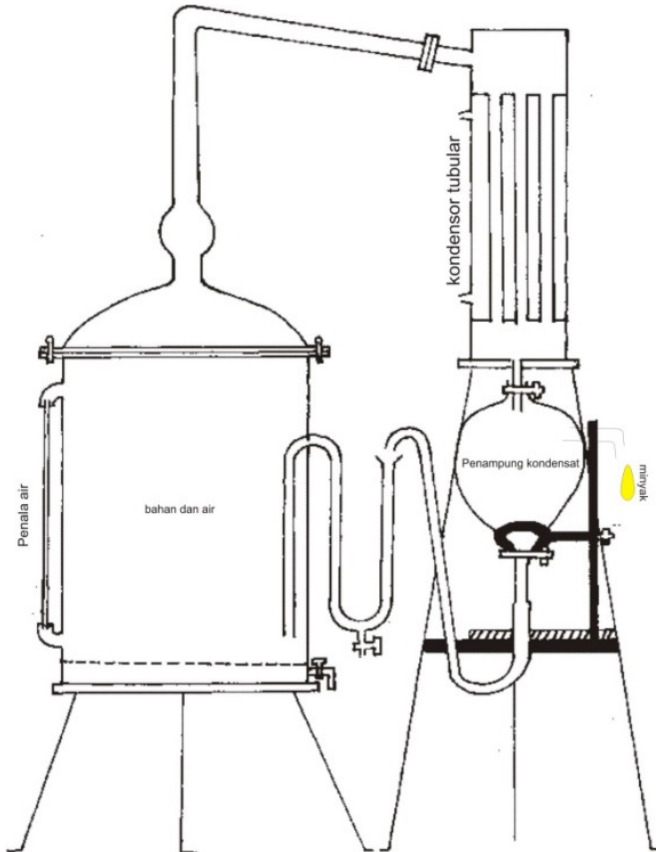
1. Distilasi air (*water distillation*).
2. Distilasi kukus (*steam and water distillation*).
3. Distilasi uap (*steam distillation*).

Ketiganya memiliki kekurangan dan kelebihan masing – masing pada proses penyulingan minyak atsiri.

Distilasi air (rebus)

Pada metode ini, bahan yang akan disuling kontak langsung dengan air atau terendam secara sempurna tergantung pada bobot jenis dan jumlah bahan yang akan disuling. Ciri khas dari metode ini adalah kontak langsung antara bahan yang akan disuling dengan air mendidih.

Pada penyulingan dengan air yang menjadi fokus adalah jumlah air yang ada dalam ketel. Prakiraan waktu penyulingan dengan jumlah air perlu diperhitungkan dengan matang karena bila tidak diperhatikan maka akan terjadi gosong dan berdampak pada kualitas minyak.

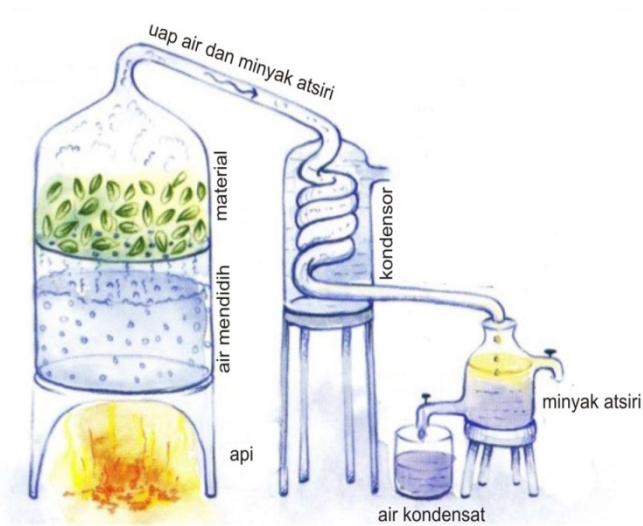


Gambar 3.9 Destilasi rebus

Biasanya penyulingan yang menggunakan distilasi air adalah bahan yang mudah menggumpal dan biasanya disuling dalam bentuk serbuk, lebih cocok untuk beberapa material dari kayu seperti massoi atau gaharu.

Distilasi uap air (kukus)

Pada metode penyulingan ini, material diletakkan di atas rak – rak atau saringan berlubang. Ketel suling diisi sampai dengan batas dibawah sarangan.



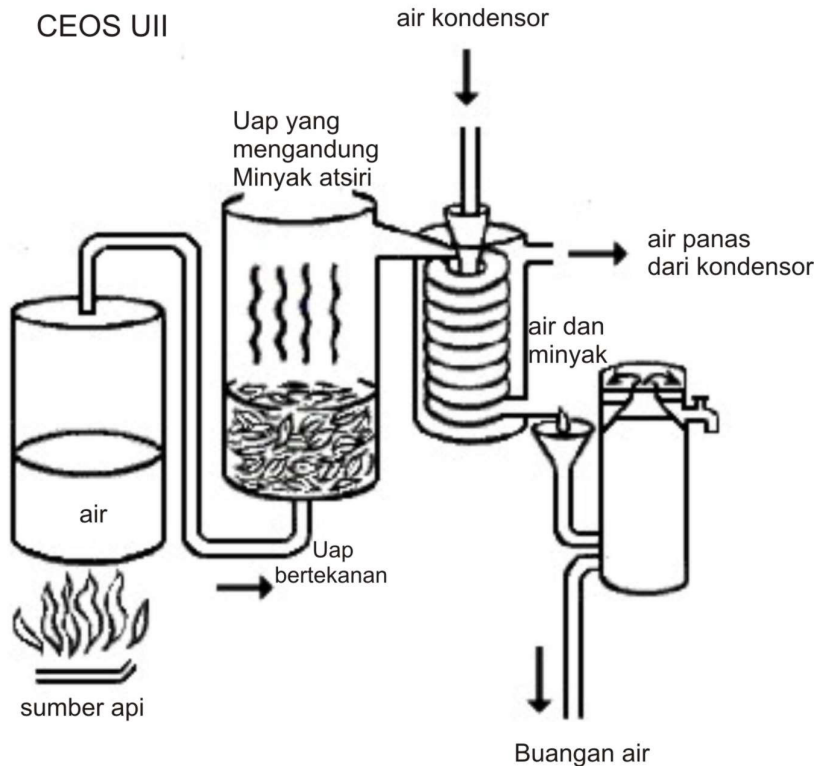
Gambar 3.10 Destilasi uap-air

Prinsip dasarnya seperti mengukus nasi. Material kontak dengan uap yang tidak terlalu panas namun jenuh yang dihasilkan dari air yang mendidih di bawah sarangan.

Distilasi uap

Pada metode penyulingan ini, unit penyulingan terbagi atas 3 unit, ketel bahan baku, boiler, dan kondensor. Jenis penyulingan ini lebih modern daripada 2 jenis penyulingan air atau kukus.

Dapur uap dibentuk di dalam boiler dengan cara memanaskan air hingga tekanan tertentu yang ditunjukkan oleh manometer yang telah dipasang dalam boiler. Setelah tekanan uap yang diinginkan tercapai maka uap jenuh siap dialirkan ke dalam ketel bahan baku. Lebih cocok untuk menyuling bahan-bahan seperti dedaunan dan serpihan kayu.



Gambar 3.11 Destilasi uap

3.3 Metode Pemisahan dan Pemurnian Metabolit Sekunder Tumbuhan

Metode pemisahan dan pemurnian senyawa metabolit sekunder dari tumbuhan adalah teknik yang telah mengalami perkembangan dalam beberapa tahun terakhir. Teknik modern ini menawarkan kemampuan untuk menyejajarkan pengembangan dan ketersediaan banyak metode *bioassay* canggih di satu sisi, dan menyediakan teknik isolasi, pemisahan, dan pemurnian yang tepat di sisi lain. Tujuannya ketika mencari senyawa bioaktif adalah menemukan metode yang tepat yang dapat menyaring bahan sumber untuk bioaktivitas seperti antioksidan, antibakteri, atau sitotoksitas, dikombinasikan dengan kesederhanaan, spesifisitas, dan kecepatan. Metode *in vitro* biasanya lebih diinginkan daripada *in vivo* karena eksperimen hewan

mahal, membutuhkan lebih banyak waktu, dan rentan terhadap kontroversi etis. Ada beberapa faktor yang membuat tidak mungkin untuk menemukan prosedur atau protokol akhir untuk mengisolasi dan mengkarakterisasi molekul bioaktif tertentu.

Ini bisa disebabkan oleh berbagai bagian (jaringan) di sebuah pabrik, banyak yang akan menghasilkan senyawa yang sangat berbeda, di samping struktur kimia yang beragam dan sifat fisikokimia dari *phytochemicals* bioaktif. Baik pemilihan dan pengumpulan bahan tumbuhan dianggap sebagai langkah utama untuk mengisolasi dan mencirikan phytochemical bioaktif. Langkah selanjutnya melibatkan pengambilan informasi ethno-botani untuk membedakan molekul bioaktif yang mungkin. Ekstrak kemudian dapat dibuat dengan berbagai pelarut untuk mengisolasi dan memurnikan senyawa aktif yang bertanggungjawab untuk bioaktivitas.

Teknik kromatografi kolom dapat digunakan untuk isolasi dan pemurnian senyawa bioaktif. Instrumen yang dikembangkan seperti *High Pressure Liquid Chromatography* (HPLC) mempercepat proses pemurnian molekul bioaktif. Berbagai jenis teknik spektroskopi seperti UV-visible, Infrared (IR), Nuclear Magnetic Resonance (NMR), dan spektroskopi massa dapat mengidentifikasi senyawa yang telah dimurnikan.

Banyak molekul bioaktif telah diisolasi dan dimurnikan dengan menggunakan metode Kromatografi lapis tipis (KLT) dan kromatografi kolom. Metode ini masih banyak digunakan karena kenyamanan, ekonomi, dan ketersediaannya dalam berbagai fase stasioner. Silika, alumina, selulosa, dan poliamida paling banyak digunakan untuk memisahkan senyawa kimia tumbuhan.

Bahan-bahan tumbuhan mengandung sejumlah besar fitokimia kompleks, yang membuat pemisahan yang baik menjadi sulit. Oleh karena itu, meningkatkan polaritas menggunakan beberapa fase seluler berguna untuk pemisahan bernilai tinggi. Kromatografi lapis tipis selalu digunakan untuk menganalisis fraksi senyawa dengan kromatografi kolom. Kromatografi kolom gel silika dan kromatografi lapis tipis (KLT) telah digunakan untuk pemisahan molekul bioaktif dengan beberapa alat analisis.

3.4 Metode Identifikasi Metabolit Sekunder Tumbuhan

Penentuan struktur molekul tertentu menggunakan data dari berbagai teknik spektroskopi seperti UV-visible, Infrared (IR), Nuclear Magnetic Resonance (NMR), dan spektroskopi massa. Prinsip dasar spektroskopi adalah melewatkan radiasi elektromagnetik melalui molekul organik yang menyerap sebagian radiasi, tetapi tidak semuanya. Dengan mengukur jumlah penyerapan radiasi elektromagnetik, spektrum dapat diproduksi. Spektrum spesifik untuk ikatan tertentu dalam suatu molekul. Tergantung pada spektrum ini, struktur molekul organik dapat diidentifikasi.

Para ilmuwan terutama menggunakan spektrum yang dihasilkan dari tiga atau empat wilayah — Ultraviolet (UV), Tampak (Visible), Inframerah (IR), gelombang radio, dan berkas elektron—untuk klarifikasi struktural.

Spektroskopi UV-Tampak

Spektroskopi UV-tampak dapat dilakukan untuk analisis kualitatif dan untuk identifikasi kelas tertentu dari senyawa dalam campuran murni dan biologis. Lebih disukai, spektroskopi UV-tampak dapat digunakan untuk analisis kuantitatif karena molekul-molekul aromatik adalah kromofor kuat dalam rentang UV. Senyawa alami dapat ditentukan dengan menggunakan spektroskopi UV-tampak. Senyawa fenolik termasuk anthocyanin, tanin, pewarna polimer, dan fenol membentuk kompleks dengan besi yang telah terdeteksi oleh spektroskopi ultraviolet-tampak (UV-Vis). Selain itu, teknik spektroskopi UV-Vis diketahui menjadi kurang selektif dalam memberikan informasi tentang komposisi kandungan polifenol total. Spektroskopi UV-Vis dapat digunakan untuk menentukan total fenolik ekstrak (280 nm), flavones (320 nm), asam fenolik (360 nm), dan total anthosianid (520 nm). Teknik ini tidak memakan waktu, dan biaya yang lebih murah dibandingkan dengan teknik lain.

Spektroskopi inframerah

Beberapa frekuensi akan diserap ketika cahaya inframerah melewati sampel senyawa organik; Namun, beberapa frekuensi akan ditularkan melalui sampel tanpa terjadi penyerapan. Penyerapan inframerah terkait dengan perubahan vibrasi yang terjadi di dalam molekul ketika terkena radiasi inframerah. Oleh karena itu, spektroskopi inframerah pada dasarnya dapat

digambarkan sebagai spektroskopi vibrasi. Obligasi yang berbeda (C-C, C = C, C₂C, C-O, C = O, O-H, dan N-H) memiliki frekuensi vibrasi yang beragam. Jika jenis-jenis ikatan ini ada dalam suatu molekul organik, mereka dapat diidentifikasi dengan mendeteksi pita penyerapan frekuensi karakteristik dalam spektrum inframerah.

Fourier Transform Infrared Spectroscopy (FTIR) adalah alat analisis resolusi tinggi untuk mengidentifikasi kandungan kimia dan menguraikan senyawa struktural. FTIR menawarkan investigasi yang cepat dan tidak rusak untuk ekstrak atau bubuk herbal sidik jari.

Spektroskopi Resonansi Magnetik Inti – *Nuclear Magnetic Resonance* (NMR)

Spektroskopi Resonansi Magnetik Inti (NMR) terkait dengan sifat-sifat magnetik dari inti atom tertentu; terutama inti atom hidrogen, proton, karbon, dan isotop karbon. Spektroskopi NMR telah memungkinkan banyak peneliti untuk mempelajari molekul dengan merekam perbedaan antara berbagai inti magnetik, dan dengan demikian memberikan gambaran yang jelas tentang apa posisi inti-inti ini dalam molekul. Selain itu, ia akan menunjukkan atom-atom mana yang ada di kelompok tetangga. Pada akhirnya, itu dapat menyimpulkan berapa banyak atom yang hadir di masing-masing lingkungan. Beberapa upaya telah dilakukan di masa lalu dengan menggunakan kromatografi lapis tipis preparatif atau semi preparatif, kromatografi cair, dan kromatografi kolom untuk mengisolasi masing-masing fenol, struktur yang ditentukan selanjutnya oleh NMR secara *off-line*.

Spektrometri Massa untuk Identifikasi Senyawa Kimia

Molekul organik dibombardir dengan elektron atau laser dalam spektrometri massa dan dengan demikian diubah menjadi ion bermuatan, yang sangat energik. Spektrum massa adalah plot dari kelimpahan relatif ion terfragmentasi terhadap rasio massa / muatan ion-ion ini. Menggunakan spektrometri massa, massa molekul relatif (berat molekul) dapat ditentukan dengan akurasi tinggi dan rumus molekul yang tepat dapat ditentukan dengan pengetahuan tentang tempat-tempat di mana molekul telah terfragmentasi. Dalam karya sebelumnya, molekul bioaktif dari empulur diisolasi dan dimurnikan dengan ekstraksi pelarut bioaktivitas yang dipandu, kromatografi kolom, dan HPLC. Teknik UV-visible, IR, NMR, dan spektroskopi massa digunakan

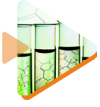
untuk mengkarakterisasi struktur molekul bioaktif. Selanjutnya, molekul dapat dihidrolisis dan turunannya dicirikan.

Spektrometri massa memberikan informasi yang melimpah untuk elusidasi struktural senyawa ketika tandem mass spectrometry (MS) diterapkan. Oleh karena itu, kombinasi HPLC dan MS memfasilitasi identifikasi senyawa kimia yang cepat dan akurat dalam ramuan obat, terutama ketika standar murni tidak tersedia. Baru-baru ini, LC/MS telah banyak digunakan untuk analisis senyawa fenolik. Ionisasi elektropray (ESI) adalah sumber yang disukai karena efisiensi ionisasi yang tinggi untuk senyawa fenolik.

Latihan Soal

1. Jelaskan prinsip kerja teknik-teknik ekstraksi konvensional (maserasi, perkolasi, ekstraksi soxhlet) serta kelebihan dan kelemahannya!
2. Jelaskan prinsip kerja teknik-teknik ekstraksi modern (MAE, AAE, SFE) serta kelebihan dan kelemahannya!
3. Jelaskan kegunaan spektroskopi massa dan NMR dalam identifikasi struktur senyawa metabolit sekunder!





4. Senyawa Fenolik

Capaian Pembelajaran

Setelah mempelajari bab 4 ini mahasiswa dapat :

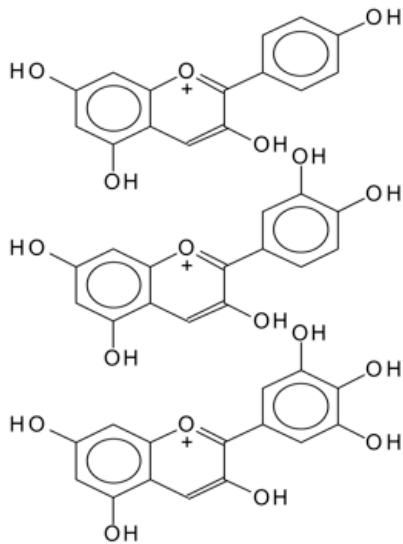
- Memahami dan menjelaskan pengertian senyawa fenolik dan klasifikasinya
- Memahami dan menjelaskan metode ekstraksi dan identifikasi senyawa fenolik

4.1 Pengertian Senyawa Fenolik

Senyawa fenolik merupakan senyawa metabolit sekunder yang terdapat dalam tumbuhan dengan karakteristik memiliki cincin aromatic yang mengandung satu atau dua gugus hidroksi (OH).

Dalam tumbuhan, kelompok senyawa ini memiliki beberapa fungsi yaitu:

- Pembangun dinding sel (lignin)
- Pigmen bunga (antosianin)
- Pengendali tumbuh (flavonol)
- Pertahanan (flavonoid)
- Menghambat dan memacu perkecambahan (fenol sederhana)
- Bau-bauan (vanilin, metil salisilat)



Pelargonidin



Cyanidin



Delphinidin



Gambar 4.1 Beberapa jenis senyawa antosianin dalam buah-buahan

Bila ditinjau dari jalur biosintesisnya, senyawa fenolik dapat dibedakan atas dua jenis senyawa utama yaitu senyawa fenolik yang berasal dari jalur asam asetat mevalonat dan jalur asam sikimat. Kelompok senyawa fenolik yang berasal dari jalur asam asetat mevalonat adalah senyawa poliketida dan senyawa fenolik yang berasal dari jalur asam asetat adalah fenil propanoid. Ditemukan juga senyawa fenolik yang berasal dari kombinasi dua jalur biosintesis ini yaitu senyawa flavonoid.

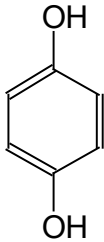
Sifat dan ciri dari senyawa fenolik diantaranya:

- Cenderung mudah larut dalam pelarut polar
- Bila murni, tak berwarna
- Jika kena udara akan teroksidasi menimbulkan warna gelap
- Membentuk kompleks dengan protein
- Sangat peka terhadap oksidasi enzim
- Mudah teroksidasi oleh basa kuat
- Menyerap sinar UV-Vis

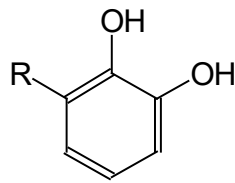
Senyawa fenolik dibagi menjadi beberapa kelompok yaitu fenol sederhana dan asam fenolat, fenilpropanoid, flavonoid, dan tannin.

A. Fenol sederhana dan asam fenolat

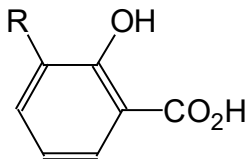
Senyawa fenolik dapat dalam bentuk paling sederhana namun jarang terdapat terdapat dalam tumbuhan. Hidrolisis jaringan membebaskan asam fenolat larut dalam eter. Fenol bebas jarang terdapat dalam tumbuhan, kecuali hidrokuinon



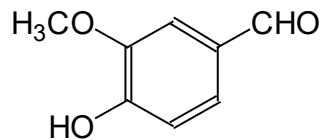
hidrokuinon



R = H, katekol
R = OH, pirogallol



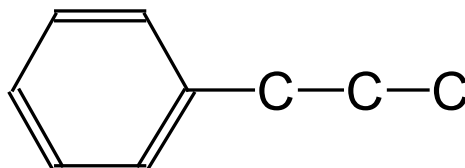
R = H, asam salisilat
R = OH, asam protokatekuat



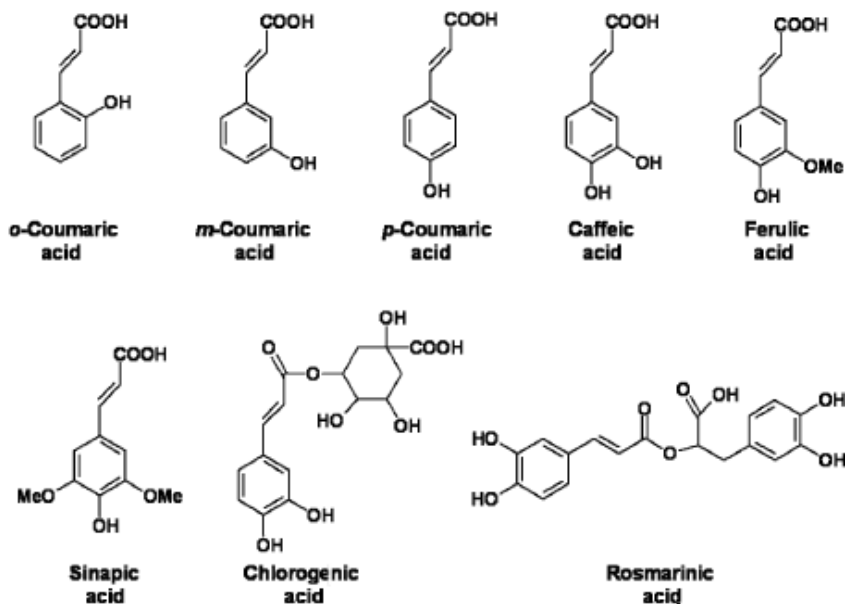
vanillin

B. Fenilpropanoid

Fenilpropanoid merupakan senyawa fenolik yang memiliki kerangka dasar karbon yang terdiri dari cincin benzene (C6) yang terikat pada ujung rantai karbon propana (C3).



Kelompok senyawa ini banyak ditemukan di tumbuhan tingkat tinggi. Senyawa ini merupakan turunan asam amino protein aromatis yaitu fenil alanin. Senyawa asam hidroksisinamat merupakan senyawa golongan fenil propanoid yang paling banyak tersebar di alam. Contoh senyawa fenil propanoid lainnya adalah hidroksikumarin, fenil propana, dan kumarin.

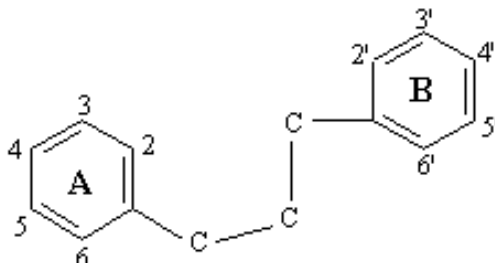


Gambar 4.2 Beberapa senyawa turunan asam hidroksisinamat suatu fenil propanoid

C. Flavonoid

Flavonoid merupakan kelompok senyawa fenolik terbesar di alam. Banyaknya senyawa flavonoid ini karena banyaknya jenis tingkat hidroksilasi, alkoksilasi dan glikosilasi pada strukturnya.

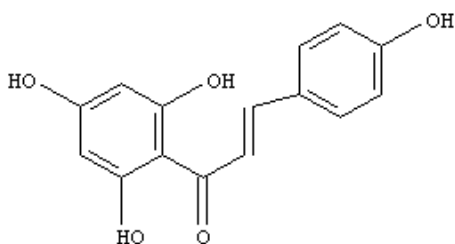
Flavonoid mempunyai kerangka dasar karbon yang terdiri dari 15 atom karbon yang membentuk susunan C₆-C₃-C₆.



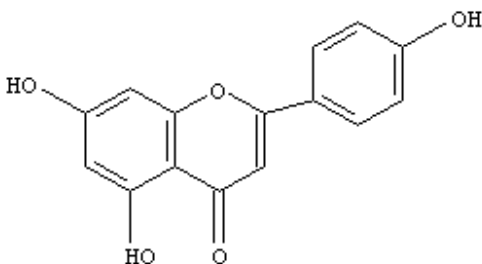
Lebih dari 2000 flavonoid yang berasal dari tumbuhan tumbuhan telah diidentifikasi, diantaranya senyawa antosianin, flavonol, dan flavon. Antosianin (dari bahasa Yunani anthos=bunga, kyanos, biru tua) adalah pigmen berwarna yang umumnya terdapat di bunga berwarna merah, ungu, dan biru. Pigmen ini juga terdapat di berbagai bagian tumbuhan lain, misalnya buah tertentu, batang, daun dan bahkan akar. Flavonoid sebagian besar terhimpun dalam vakuola sel tumbuhan walaupun tempat sintesisnya ada di luar vakuola.

Berdasarkan strukturnya, flavonoid dapat dikelompokkan sebagai berikut:

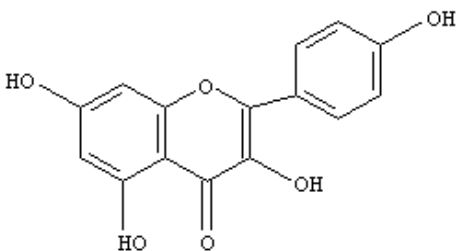
a. Kalkon



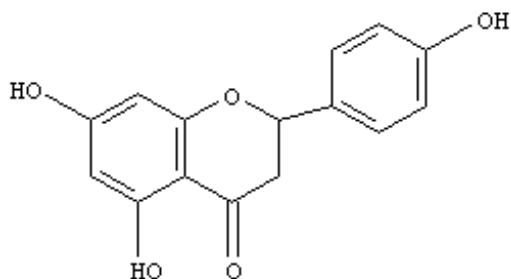
b. Flavon



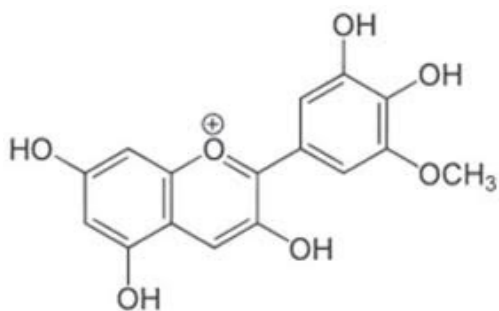
c. Flavonol



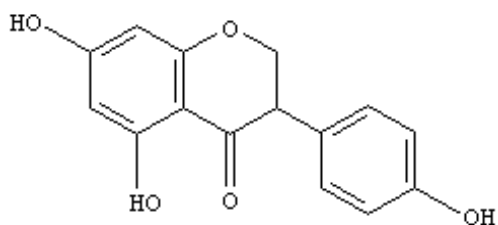
d. Flavanon



e. Antosianin



f. Isoflavon



D. Tanin

Tanin adalah suatu senyawa fenolik yang memberikan rasa pahit dan sepat/kelat, dapat bereaksi dan menggumpalkan protein atau senyawa organik lainnya yang mengandung asam amino dan alkaloid.

Tanin (dari bahasa Inggris tannin, dari bahasa Jerman Hulu Kuno tanna, yang berarti "pohon ek" atau "pohon berangan" pada mulanya merujuk pada penggunaan bahan tannin nabati dari pohon ek untuk menyamak belulang

(kulit mentah) hewan agar menjadi masak yang awet dan lentur (penyamakan). Namun kini pengertiannya meluas, mencakup berbagai senyawa polifenol berukuran besar yang mengandung cukup banyak gugus hidroksil dan gugus lainnya yang sesuai (misalnya gugus karboksil) membentuk ikatan kompleks yang kuat dengan protein dan makromolekul yang lain.

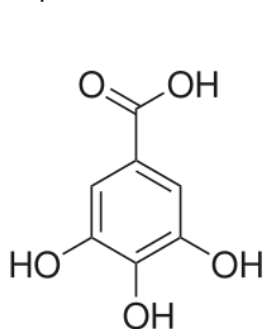
Senyawa-senyawa Tanin ditemukan pada banyak jenis tumbuhan. Senyawa ini berperan penting untuk melindungi tumbuhan dari pemangsa oleh herbivora dan hama, serta sebagai agen pengatur dalam metabolisme tumbuhan.

Tanin memiliki berat molekul berkisar antara 500 sampai 3000 (ester asam galat) dan lebih besar dari 20.000 (proantosianidin.)

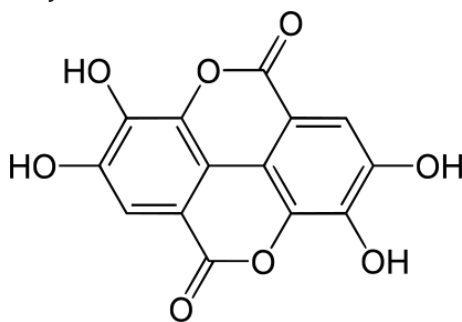
Tanin dikelompokkan menjadi dua bentuk senyawa yaitu:

1. Tanin Terhidrolisis

Tanin dalam bentuk ini adalah tannin yang terhidrolisis oleh asam atau enzim menghasilkan asam galat dan asam elagat. Secara kimia, tannin terhidrolisis dapat merupakan ester atau asam fenolat. Asam galat dapat ditemukan dalam cengkeh sedangkan asam elagat ditemukan dalam daun *Eucalyptus*. Senyawa tannin bila direaksikan dengan feri klorida akan menghasilkan perubahan warna menjadi biru atau hitam.



Asam galat

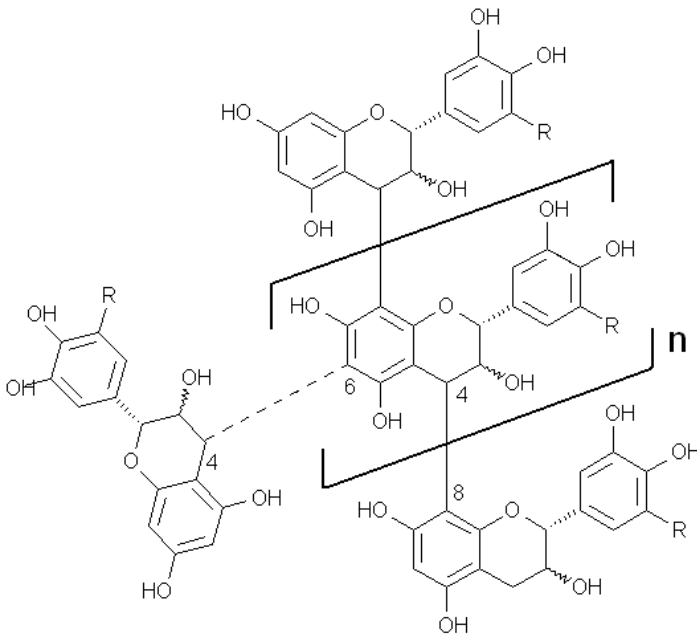


asam elagat

2. Tannin terkondensasi

Tanin jenis ini resisten terhadap reaksi hidrolisis dan biasanya diturunkan dari senyawa flavonol, katekin, dan flavan-3,4-diol. Pada penambahan asam atau enzim, senyawaan ini akan terdekomposisi menjadi plobapen. Pada proses destilasi, tannin terkondensasi berubah menjadi katekol, oleh karenanya sering disebut sebagai tannin katekol. Tanin jenis ini dapat ditemukan dalam kayu

pohon kina dan daun teh. Tanin terkondensasi akan menghasilkan senyawa berwarna hijau ketika ditambahkan dengan ferri klorida.



4.2 Metode Ekstraksi Senyawa Fenolik

A. Fenol sederhana dan asam fenolat

- Hidrolisis dalam suasana asam dengan HCl 2M selama 30 menit (mendidih)
- Hidrolisis dalam suasana basa dengan NaOH 2M selama 4 jam dan selanjutnya diasamkan sebelum ekstraksi (suhu kamar)
- Ekstraksi dengan eter

B. FENILPROPANOID

- Diekstrak dalam suasana asam atau basa
- Isolasi dengan eter dan EtAc

C. FLAVONOID

- Dapat diekstraksi dengan etanol 70%

4.3 Metode Identifikasi Senyawa Fenolik

A. Fenol sederhana dan asam fenolat

- KLT silika gel (asam asetat- CHCl_3 dan Etil asetat-benzena); selulosa MN 300 (benzena-MeOH-asam asetat dan asam asetat-air)
- Deteksi dengan UV dengan pereaksi Folin-Ciocalteu, pereaksi Gibs, uap NH_3 , Vanilin-HCl
- GC-MS
- HPLC

B. FENILPROPANOID

Identifikasi

- Kromatografi Lapis Tipis (sesulosa)
- Kromatografi kertas
- Spektrofotometer UV-Vis

C. FLAVONOID

- Warna berubah dengan penambahan basa atau amonia
- Diidentifikasi dengan KLT (BAA-HAc 5%) spektrofotometer UV-Vis (pereaksi geser)

Latihan Soal

1. Jelaskan dan gambar kerangka dasar struktur senyawa fenolik (asam fenolat, fenil propanoid, flavonoid dan tanin)!
2. Jelaskan metode ekstraksi umum untuk memisahkan senyawa fenolik dari tumbuhan!
3. Jelaskan metode skrining fitokimia yang khas untuk senyawa fenolik!



5. Alkaloid

Capaian Pembelajaran

Setelah mempelajari bab 5 ini mahasiswa dapat :

- Memahami dan menjelaskan pengertian senyawa alkaloid dan klasifikasinya
- Memahami dan menjelaskan metode ekstraksi dan identifikasi senyawa alkaloid

5.1 Pengertian Alkaloid

Alkaloid adalah kelompok metabolit sekunder terpenting yang ditemukan pada tumbuhan. Keberadaan alkaloid di alam tidak pernah berdiri sendiri. Golongan senyawa ini berupa campuran dari beberapa alkaloid utama dan beberapa kecil.

Definisi yang tepat dari istilah 'alkaloid' (mirip alkali) agak sulit karena tidak ada batas yang jelas antara alkaloid dan amina kompleks yang terjadi secara alami. Alkaloid khas yang berasal dari sumber tumbuhan, senyawa ini bersifat basa, mengandung satu atau lebih atom nitrogen (biasanya dalam cincin heterosiklik) dan mereka biasanya memiliki aktivitas fisiologis yang pada manusia atau hewan lainnya.

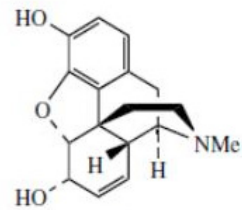
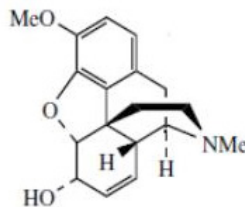
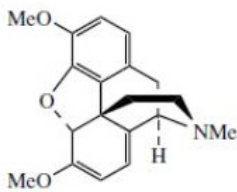
Pada tahun 1803, alkaloid semi-murni telah diisolasi oleh Derosne dan pada tahun 1805 Serturmer mengisolasi alkaloid opium (*Papaver somniferum*).



Thebaine

Codeine

Morphine



Gambar 5.1 Senyawa-senyawa alkaloid yang terkandung dalam getah Opium

Alkaloid pertama yang disintesis adalah coniine dari *Conium maculatum* pada tahun 1886. Strychnine, Emetine, Brucine, Piperine, Caffeine, Quinine, Cinchonine dan Colchicine alkaloid adalah landasan dari semua yang telah terjadi dalam kimia alkaloid hingga hari ini. Sebagian besar alkaloid berasal dari amina oleh dekarboksilasi asam amino.

Isolasi alkaloid pertama kali tercatat dimulai pada abad kesembilan belas bersamaan dengan dikenalnya proses perkolasi untuk ekstraksi obat dari tumbuhan. pada tahun 1803, seorang Apoteker Prancis bernama Derosne melakukan isolasi senyawa alkaloid yang kemudian dikenal sebagai narkotika dan diikuti oleh Sertürner yang menyelidiki lebih lanjut senyawa morfin dari tumbuhan opium (1806, 1816). Setelah itu beberapa jenis alkaloid lainnya juga telah berhasil diisolasi diantaranya strychnine (1817), emetine (1817), brucine (1819), piperine (1819), caffeine (1819), quinine (1820), colchicine (1820) dan coniine (1826). Coniine adalah alkaloid pertama yang diketahui struktur kimianya (Schiff, 1870) dan berhasil disintesis oleh Ladenburg pada tahun 1889. Alkaloid lainnya, seperti colchicine, baru ditemukan dan dijelaskan struktur

kimianya setelah satu abad berikutnya. Perkembangan metode ekstraksi, isolasi dan instrumentasi yang modern sangat memudahkan penyelidikan. Pada paruh kedua abad ke-20, alkaloid sangat menonjol dalam pencarian obat dari bahan tumbuhan untuk aktivitas antikanker. Aktivitas fisiologis alkaloid lain diantaranya untuk anestesi, obat penenang, stimulan.

Sifat umum alkaloid

Kebanyakan alkaloid memiliki rasa pahit, bersifat basa lemah, dan sedikit larut dalam air dan dapat larut dalam pelarut organik non polar seperti dietil eter, kloroform dan lain-lain. Beberapa alkaloid memiliki warna seperti berberin yang berwarna kuning dan garam sanguinarine dengan tembaga berwarna merah. Alkaloid akan terdekomposisi oleh panas kecuali strychnine dan caffeine. Secara wujud kebanyakan alkaloid berbentuk padatan kristal dan sedikit diantaranya merupakan padatan amorf.

Alkaloid pada dasarnya merupakan senyawa yang bersifat basa dengan keberadaan atom nitrogen dalam strukturnya, Asam amino berperan sebagai senyawa pembangun dalam biosintesis alkaloid. Kebanyakan alkaloid mengandung satu inti kerangka piridin, quinolin, dan isoquinolin atau tropan dan bertanggungjawab terhadap efek fisiologis pada manusia dan hewan. Rantai samping alkaloid dibentuk atau merupakan turunan dari terpena atau asetat. Alkaloid memiliki sifat basa dan bertindak sebagai senyawa basa dalam suatu reaksi. Campuran alkaloid dengan suatu asam akan membentuk garam kristalin tanpa membentuk air. Pada umumnya alkaloid berbentuk padatan kristal seperti pada senyawa atropine. Beberapa alkaloid seperti lobeline atau nikotin berbentuk cairan.

Alkaloid memiliki kelarutan yang khas dalam pelarut organik. Golongan senyawa ini mudah larut dalam alkohol dan sedikit larut dalam air. Garam alkaloid biasanya larut dalam air. Di alam, alkaloid ada di banyak tumbuhan dengan proporsi yang lebih besar dalam biji dan akar dan seringkali dalam kombinasi dengan asam nabati. Senyawa alkaloid memiliki rasa yang pahit.

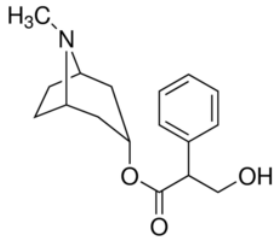
Klasifikasi alkaloid

Jika dibandingkan dengan kelas lain yang terjadi secara alami, tidak ada klasifikasi struktur yang seragam untuk alkaloid. Klasifikasi alkaloid berdasarkan pada kerangka karbonnya meliputi:

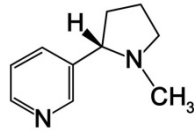
1. *Alkaloid sebenarnya (True alkaloid)*

Alkaloid jenis ini memiliki kerangka cincin heterosiklik yang mengandung atom nitrogen. Biosintesis alkaloid jenis ini berasal dari asam amino-asam amino.

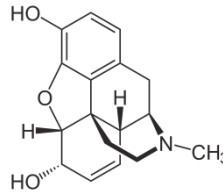
Contoh: Atrophine, Nicotine, Morphine



Atrophine



Nicotine

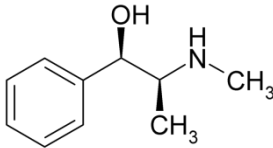


Morphine

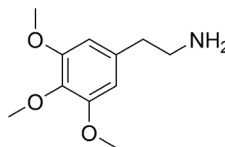
2. *Protoalkaloid*

Alkaloid jenis ini tidak memiliki cincin heterosiklik yang mengandung atom nitrogen dan merupakan turunan dari asam amino

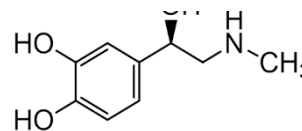
Contoh: Ephedrine, mescaline, adrenaline



Ephedrine



mescaline

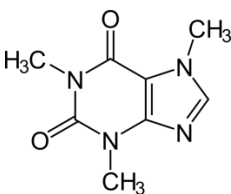


adrenaline

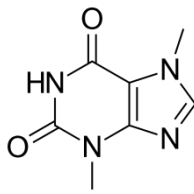
3. *Pseudoalkaloid*

Alkaloid jenis ini mengandung cincin heterosiklik yang mengandung atom nitrogen, namun bukan merupakan turunan dari asam amino

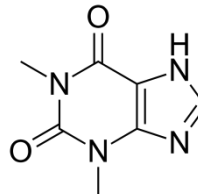
Contoh: Caffeine, theobromine, theophylline



Caffeine



theobromine



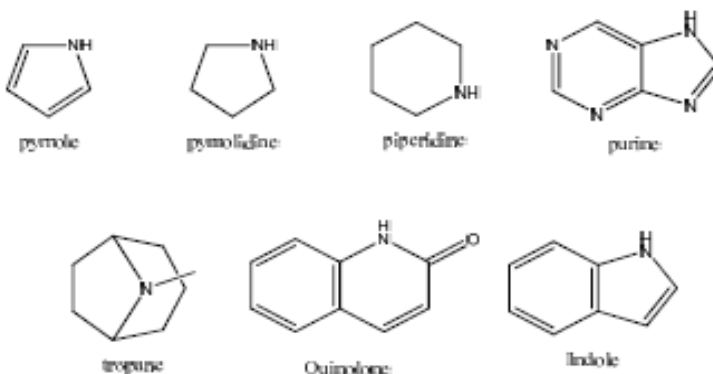
theophylline

Selain klasifikasi di atas, alkaloid dapat diklasifikasikan dengan beberapa faktor yaitu berdasarkan biosintesisnya, berdasarkan kerangka struktur kimia, berdasarkan farmakologi, dan berdasarkan taksonomi.

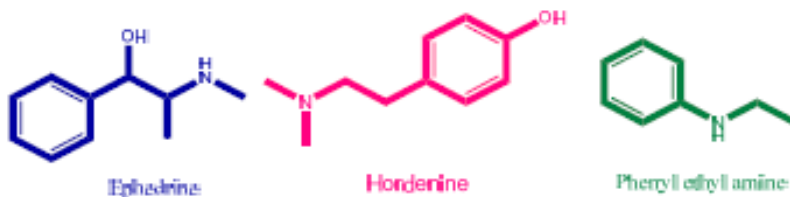
Biosynthetic classification	Chemical classification	Pharmacological classification	Taxonomic classification
<ul style="list-style-type: none"> • Indole • Piperidine • Pyrrolidine • Phenylethylamine • Imidazole 	<ul style="list-style-type: none"> • Tropane • Quinoline • Purine • Diterpene • Steroidal 	<ul style="list-style-type: none"> • Morphine • Quinine • Lobeline • Aconitine • Ergonovine 	<ul style="list-style-type: none"> • Cannabinaceous • Rubiaceous • Solanaceous

Secara umum alkaloid dikelompokkan dalam 2 bagian yaitu (i) heterosiklik (ii) non heterosiklik.

Alkaloid heterosiklik



Alkaloid non heterosiklik



5.2 Metode Ekstraksi Alkaloid

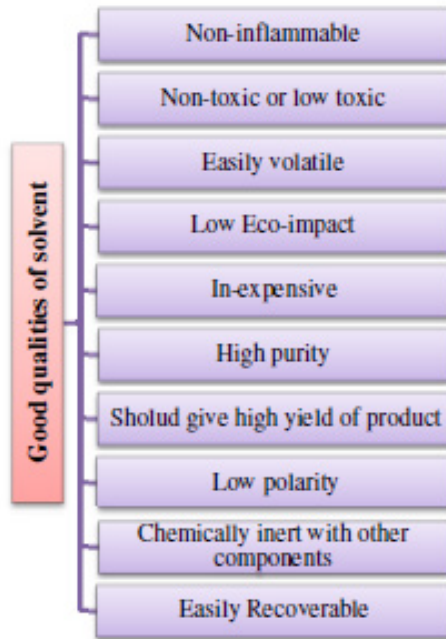
Persiapan sampel

Bahan tumbuhan segar yang digunakan dalam proses ekstraksi. Namun pada umumnya bahan yang digunakan merupakan bahan tumbuhan yang telah dikeringkan. Metode pengeringan harus dalam keadaan yang terkontrol dengan pengeringan udara tanpa penggunaan temperatur tinggi. Bahan tumbuhan yang kering ini dapat disimpan dalam jangka waktu yang lama. Sampel tumbuhan dapat digiling menjadi bentuk serbuk kering untuk dapat memperoleh kontak efektif yang maksimum antara pelarut dengan alkaloid dalam jaringan tumbuhan. Untuk tumbuhan yang memiliki kandungan minyak dan lemak seperti biji dan kernel, maka komponen kimia non-alkaloid ini harus dihilangkan dengan ekstraksi soxhlet dengan pelarut non-polar yang sesuai seperti n-heksana dan petroleum eter.

Pemilihan pelarut

Pelarut memiliki peran yang penting dalam langkah ekstraksi dan pemilihannya tergantung pada jenis bahan tumbuhan. Secara umum alcohol, etil asetat, kloroform dan air digunakan sebagai pelarut. Alkohol digunakan dalam tahap *pretreatment* untuk menghilangkan kandungan klorofil dan impuritis. Pelarut harus memiliki sifat tertentu seperti toksisitas yang rendah, mudah penggunaan dan penyimpanannya, dan inert. Pelarut yang baik harus memiliki sifat-sifat berikut:





Ekstraksi alkaloid

Alkaloid dalam suatu tumbuhan memiliki struktur kimia yang beragam dan dalam jumlah yang banyak. Oleh karenanya tidak mudah mengidentifikasi alkaloid dalam tumbuhan hanya dengan metode kromatografi tunggal. Selain itu luasnya kelarutan alkaloid dalam beberapa pelarut juga menjadi kerumitan tersendiri. Beberapa langkah yang dapat dilakukan untuk melakukan ekstraksi alkaloid diantaranya adalah:

1. Deteksi adanya alkaloid dalam ekstrak tumbuhan
Deteksi awal adanya senyawa alkaloid dapat dilakukan dengan menambahkan pereaksi warna alkaloid ke dalam ekstrak tumbuhan.
2. Proses ekstraksi
Berdasarkan sifat kebiasaannya, pada umumnya alkaloid diekstrak dari tumbuhan dengan menambahkan pelarut alcohol yang diasamkan dengan suatu asam lemah (HCl 1 M atau asam asetat 10%). Penambahan asam akan menyebabkan alkaloid berubah dalam bentuk garamnya yang dalam pelarut alcohol berair. Selanjutnya larutan alcohol dipisahkan dari komponen ekstrak yang tidak larut. penambahan basa lemah tetes

per tetes seperti ammonia atau ammonium hidroksida ke dalam larutan alcohol menyebabkan garam alkaloid kembali menjadi alkaloid semula yang tidak larut dalam larutan berair. Ekstraksi menggunakan pelarut non polar seperti kloroform menyebabkan alkaloid berpindah dari fase air ke fase pelarut organic. Selanjutnya pelarut organic diuapkan sehingga diperoleh alkaloid kasar.

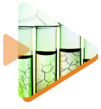
5.3 Metode Identifikasi Alkaloid

Alkaloid kasar yang diperoleh selanjutnya diidentifikasi menggunakan metode kromatografi lapis tipis dan disemprot dengan beberapa pereaksi alkaloid yaitu:

- a. Pereaksi Dragendorff, hasil positif memberikan warna kuning kecoklatan dengan latar belakang warna kuning dari pereaksi
- b. Pereaksi Iodoplatinat, hasil positif memberikan warna yang beragam
- c. Pereaksi Marquis, hasil positif memberikan warna kuning hingga ungu

Latihan Soal

1. Jelaskan dan gambar kerangka dasar struktur senyawa alkaloid!
2. Jelaskan metode ekstraksi umum untuk memisahkan senyawa alkaloid dari tumbuhan!
3. Jelaskan metode skrining fitokimia yang khas untuk senyawa alkaloid!



6. Terpenoid

Capaian Pembelajaran

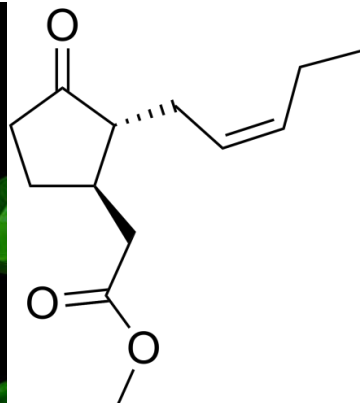
Setelah mempelajari bab 6 ini mahasiswa dapat :

- Memahami dan menjelaskan pengertian senyawa terpenoid dan klasifikasinya
- Memahami dan menjelaskan metode ekstraksi dan identifikasi senyawa terpenoid

6.1 Pengertian Terpenoid

Senyawa terpena merupakan kelompok senyawa organik hidrokarbon yang melimpah yang dihasilkan oleh berbagai jenis tumbuhan. Terpenoid juga dihasilkan oleh serangga. Senyawaan ini pada umumnya memberikan bau yang kuat dan dapat melindungi tumbuhan dari herbivora dan predator.

Terpenoid juga merupakan komponen utama dalam minyak atsiri dari beberapa jenis tumbuhan dan bunga. Minyak atsiri digunakan secara luas untuk wangi-wangian parfum, dan digunakan dalam pengobatan seperti aromaterapi.



Gambar 6.1 Metil jasmonat, suatu monoterpene dalam kelopak bunga melati

Terpena merupakan komponen utama dalam minyak turpentine. Nama "terpena" berasal dari kata turpentine (terpentine). Senyawaan terpena juga

merupakan salah satu senyawa pembangun utama dalam biosintesis. Sebagai contoh, steroid merupakan turunan dari triterpene squalene.

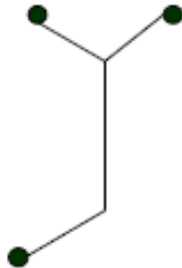
Aturan isoprena

Terdapat sekitar 30 ribu jenis senyawa terpena yang telah diemukan. Struktur dasar senyawa terpena merupakan residu 2 metilbutana atau lebih tepatnya atau sering disebut sebagai unit isoprene, $(C_5)_n$. Aturan ini dicetuskan oleh Ruzicka dan Wallach. Dekomposisi termal terpenoid memberikan isoprena sebagai salah satu produk sehingga oleh Otto Wallach disimpulkan bahwa terpenoid dapat dibangun dari unit isoprena. Aturan isoprena menyatakan bahwa molekul terpenoid dibangun dari dua atau lebih unit isoprene.

Senyawa terpena disebut juga sebagai isoprenoid. Di alam, senyawa terpena didominasi sebagai gugus hidrokarbon, alkohol, glikosida, eter, aldehida, keton, asam karboksilat dan esternya

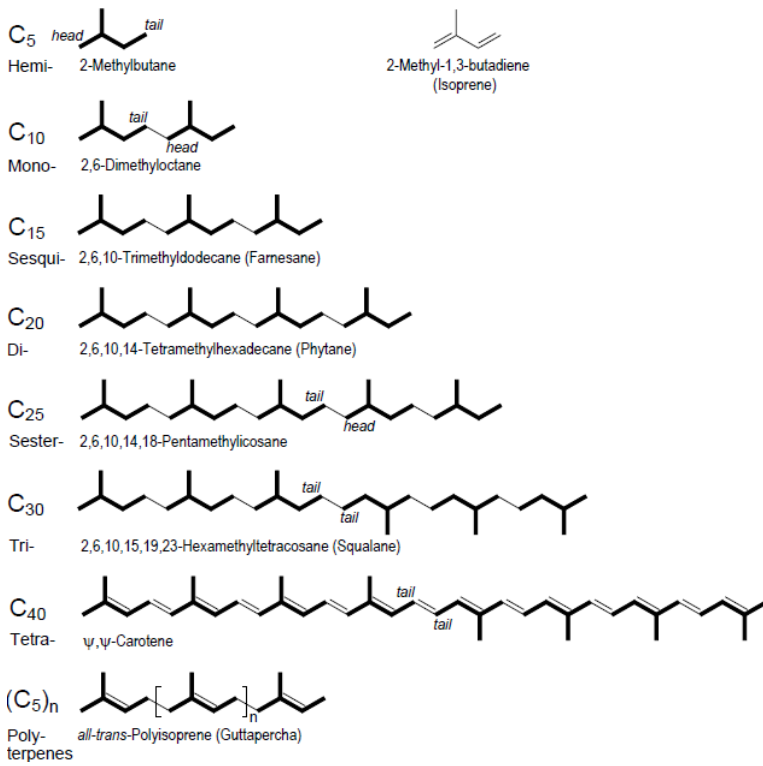
Lebih lanjut, Ingold (1921) mengusulkan bahwa unit isoprena bergabung dalam terpenoid melalui model 'kepala ke ekor'.

Aturan isoprena khusus menyatakan bahwa molekul terpenoid dibangun dari dua atau lebih unit isoprena yang bergabung dengan gaya 'kepala ke ekor'.

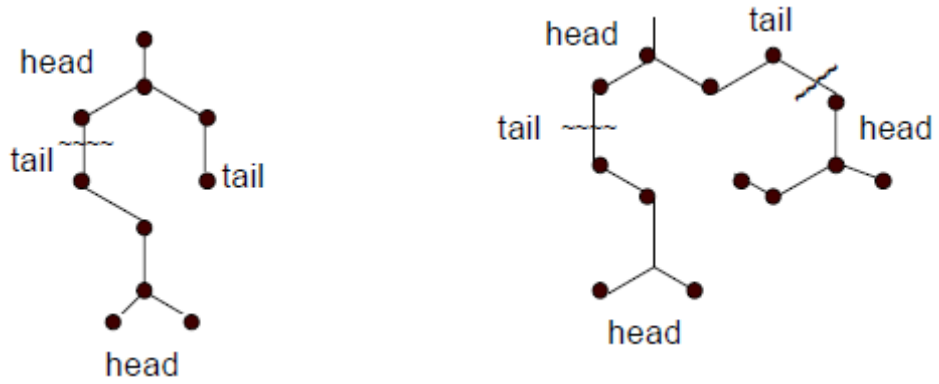


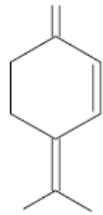
Tetapi aturan ini hanya dapat digunakan sebagai prinsip pemandu dan bukan sebagai aturan baku. Misalnya karotenoid bergabung dengan ekor ke ekor di pusatnya dan ada juga beberapa terpenoid yang kandungan karbonnya bukan kelipatan lima.

Yang membedakan antara hemi- (C_5), mono- (C_{10}), sesqui- (C_{15}), di- (C_{20}), sester- (C_{25}), tri- (C_{30}), tetraterpenes (C_{40}) dan polyterpenes (C_5)ⁿ dengan $n > 8$ adalah jumlah subunit 2-methylbutane (isoprene).

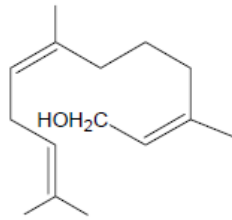


Bagian isopropil dari 2-methylbutane didefinisikan sebagai kepala, dan residu etil sebagai ekor. Dalam mono-, sesqui-, di- dan sesterterpena, unit isoprena dihubungkan satu sama lain dari kepala-ke-ekor.





Myrcene
(monoterpene)



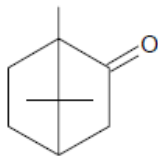
Farnesol (Sesquiterpene)

Aturan ini membatasi jumlah struktur yang mungkin dalam menutup rantai terbuka ke struktur cincin. Dengan demikian rantai terbuka monoterpenoid memunculkan hanya satu kemungkinan monoterpenoid monosiklik yaitu struktur p-cymene.

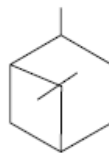


P-cymene structure

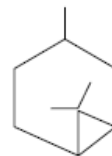
Monoterpenod bisiklik mengandung enam anggota dan tiga anggota cincin. Dengan demikian penutupan sepuluh rantai monoterpenoid terbuka karbon memberikan tiga struktur bisiklik yang mungkin.



Camphor
(6+5) system



Pinane
(6+4) system



Carane
(6+3) System

Karakteristik Terpenoid

Sebagian besar terpenoid tidak berwarna, merupakan cairan yang memiliki bau, memiliki berat jenis yang lebih ringan daripada air, mudah menguap dengan adanya uap air panas. Sedikit diantaranya berwujud padat

seperti camphor. Seluruh senyawa terpenoid dapat larut dalam pelarut organik dan biasanya tidak larut dalam air. Kebanyakan terpenoid bersifat optik aktif.

Struktur senyawa terpenoid merupakan alil siklik, beberapa diantaranya merupakan senyawa tak jenuh dengan satu atau lebih ikatan rangkap. Konsekuensinya senyawa mudah mengalami reaksi adisi dengan hydrogen, halogen, asam dan lain-lain. Sejumlah produk adisinya memiliki sifat antiseptic.

Terpenoid mudah mengalami reaksi polimerisasi dan dehidrogenasi serta mudah teroksidasi oleh agen pengoksidasi. Pada pemanasan, kebanyakan terpenoid menghasilkan isoprene sebagai salah satu produknya.

<i>Number of isoprene units</i>	<i>Carbon number</i>	<i>Name or class</i>	<i>Main types and occurrence</i>
1	C ₅	isoprene	detected in <i>Hamamelis japonica</i> leaf
2	C ₁₀	monoterpenoids	monoterpenes in plant essential oils (e.g. menthol from mint) monoterpene lactones (e.g. nepetalactone)
3	C ₁₅	sesquiterpenoids	tropolones (in gymnosperm woods) sesquiterpenes in essential oils sesquiterpene lactones (especially common in Compositae)
4	C ₂₀	diterpenoids	abscisins (e.g. abscisic acid) diterpene acids in plant resins gibberellins (e.g. gibberellic acid)
6	C ₃₀	triterpenoids	sterols (e.g. sitosterol) triterpenes (e.g. β -amyrin) saponins (e.g. yamogenin) cardiac glycosides
8	C ₄₀	tetraterpenoids	carotenoids* (e.g. β -carotene)
n	C _n	polyisoprene	rubber, e.g. in <i>Hevea brasiliensis</i>

6.2 Metode Ekstraksi Terpenoid

Metode ekstraksi yang umum dilakukan untuk terpenoid adalah semua metode ekstraksi menggunakan pelarut eter, petroleum eter, atau aseton.

Terpenoid dalam bentuk minyak atsiri baik mono- dan sesquiterpena dipisahkan menggunakan metode klasik seperti hidrodestilasi.

6.3 Metode Identifikasi Terpenoid

Reagen Liebermann-Buchard

Pembentukan cincin coklat mengindikasikan adanya pitosterol

Uji Salkowski

Penampakan warna kuning emas mengindikasikan adanya triterpen

Uji Tembaga asetat

Pembentukan warna hijau emerald mengindikasikan adanya diterpen

Metode Kedde

Hasil akan menunjukkan warna ungu.

Metode Keller-Killiani

Hasil positif jika terlihat cincin merah bata menjadi biru atau ungu

Antimon(III)klorida

Berpendar pada panjang gelombang 360 nm.

p-anisaldehida / asam sulfat

Hasil yang terlihat spot berwarna ungu, biru, merah abu-abu atau hijau

Timah(IV)klorida

Periksa dengan sinar UV pada panjang gelombang tampak dan besar.

Vanilin / asam sulfat

Pembentukan warna merah-ungu mengindikasikan terpenoid

Asam Fosfat

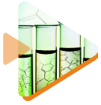
Untuk deteksi sterol, steroid

Asam trifluoroasetat

Untuk deteksi steroid.

Latihan Soal

1. Jelaskan dan gambar kerangka dasar struktur senyawa terpenoid!
2. Jelaskan metode ekstraksi umum untuk memisahkan senyawa terpenoid dari tumbuhan!
3. Jelaskan metode skrining fitokimia yang khas untuk senyawa terpenoid!



7. Poliketida

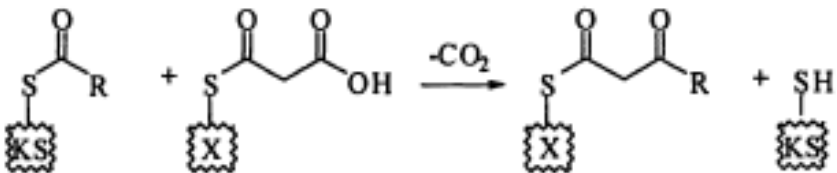
Capaian Pembelajaran

Setelah mempelajari bab 7 ini mahasiswa dapat :

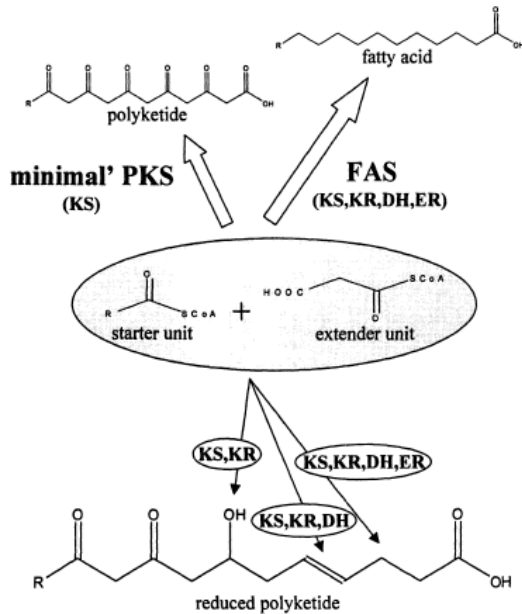
- Memahami dan menjelaskan pengertian senyawa poliketida dan klasifikasinya
- Memahami dan menjelaskan metode ekstraksi dan identifikasi senyawa poliketida

7.1 Pengertian Poliketida

Poliketida merupakan senyawa metabolit sekunder yang mengandung gugus karbonil dan gugus metilen yang tersusun secara selang-seling (beta-poliketone). Biosintesis poliketida dimulai dengan terjadinya reaksi kondensasi sebuah unit starter (asetil CoA atau propionil CoA) dengan sebuah unit penyambung (pada umumnya malonil CoA atau metil malonil CoA, dilanjutkan dengan reaksi dekarboksilasi unit penyambung. Kondensasi dekarboksilatif berulang menghasilkan pemanjangan rantai karbon poliketida, dan modifikasi tambahan seperti ketoreduksi, dehidratasi, dan enoilreduksi juga dapat terjadi.



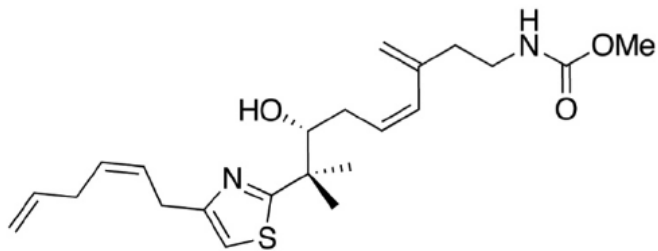
Unit starter unit penyambung



Gambar 7.1 Biosintesis poliketida

Poliketida berasal dari kata “poli” yang berarti banyak dan ketida yang menunjukkan adanya ketida ($-\text{CH}_2\text{COCO}-$). Hal ini dikarenakan suatu poliketida ditandai dengan dimilikinya pola berulang suatu ketida $-\text{[CH}_2\text{CO]}_n-$ dalam rangkaian strukturnya.

Walaupun sebagian besar poliketida diproduksi oleh mikroba (bakteri dan fungi), poliketida dan turunannya juga ditemukan di makhluk hidup lainnya seperti dalam tumbuhan (misalnya, flavonoid), serangga (misalnya, hydroxy-acetophenones), moluska (misalnya, haminol), spons (misalnya, mycothiazole), alga (misalnya, bromoallene acetogenins), lumut kerak (misalnya, asam usnat), dan crinoid (misalnya, polyhydroxyanthraquinone).

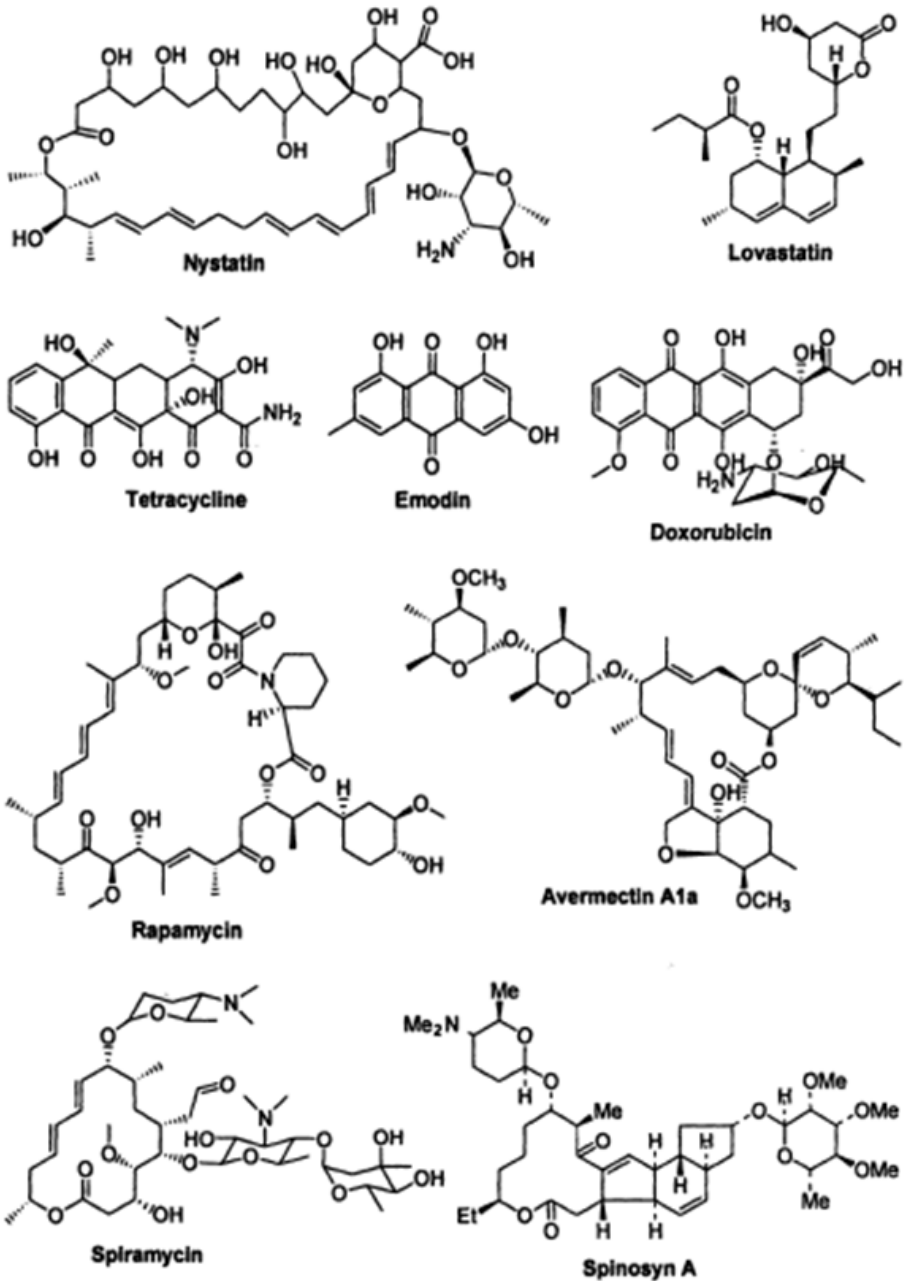


Gambar 7.2 Senyawa mycothiazole, suatu poliketida yang terdapat dalam sponge

Secara keseluruhan, poliketida mewakili kelas bahan alam terbesar dan paling beragam dalam struktur dan fungsi. Kelas-kelas senyawa yang berbeda telah dikelompokkan berdasarkan fitur struktural umum, namun karena keragamannya yang sangat besar, skema klasifikasi terpadu belum muncul. Salah satu perbedaan utama yang telah diketahui adalah kelompok senyawa-senyawa yang berasal dari rantai poliketon yang tidak tereduksi yang sebagian besar aromatik, dan kelompok di mana gugus karbonil sebagian besar berkurang.

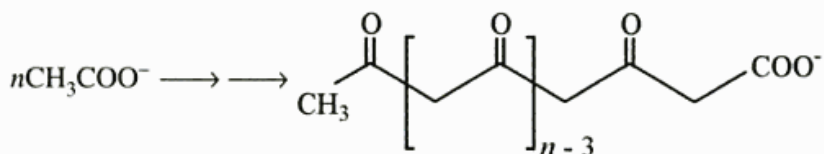
Poliketida dan turunannya telah menjadi pusat perhatian karena kemampuannya sebagai antibiotik dan agen terapi baru. Sekitar 1% dari 5000 hingga 10.000 poliketida telah diketahui aktivitas biologisnya dan 205 diantaranya telah diproduksi secara masal oleh industry farmasi. Beberapa contoh antibiotik turunan poliketida diantaranya tetracycline, erythromycin,

nystatin, avermectin, and spiramycin, agen antikanker doxorubicin, agen hypocholesterol lovastatin, and immunosuppressant rapamycin.



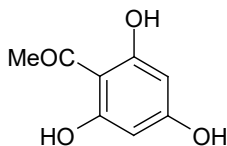
Gambar 7.3 Beberapa senyawa poliketida

Secara umum senyawa poliketida memiliki struktur $\text{CH}_3[\text{CH}_2\text{CO}]_n\text{COOH}$ yang disebut ketida atau poli-beta-keto. Berdasarkan struktur poliketida tersebut, secara trivial poliketida memiliki nama poliketida atau alkan poli-on. Sedangkan secara IUPAC diberi nama polialkanon.



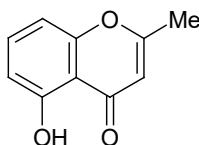
Pengelompokan poliketida:

Turunan asilfloroglusinol



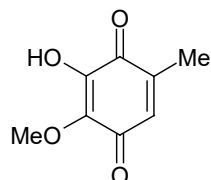
floroasetofenon

Turunan kromon



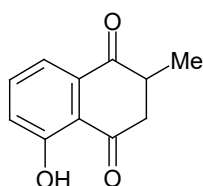
5-hidroksi-2-metilkromon

Turunan benzokuinon



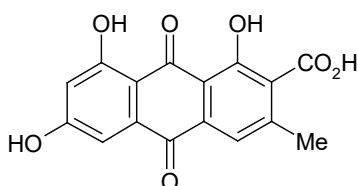
fumigatin

Turunan naftakuinon



plumbagin

Turunan antrakuinon



endokrosin

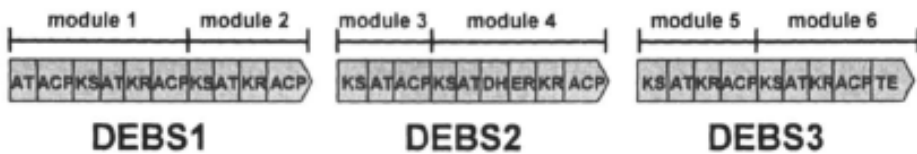
Gambar 7.4 Pengelompokan poliketida berdasarkan strukturnya

Sumber-sumber Poliketida

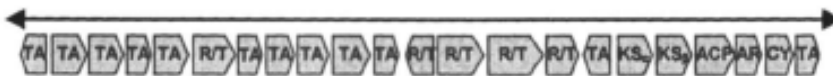
Poliketida banyak dimanfaatkan sebagai obat-obatan karena dapat diisolasi dari tumbuhan-tumbuhan yang ada di sekitar kita. Poliketida dapat diisolasi dari mikroba, jamur *Aspergillus terreus*, tomat, jagung dan invertebrate yang jumlahnya cukup besar. Poliketida adalah keluarga besar metabolit

sekunder dengan struktur yang beragam dan aktivitas biologis. Banyak dari mereka yang secara klinis senyawa penting seperti anti-biotik, anti-jamur, dan obat anti-kanker. Biosintesis poliketida dikatalisis oleh enzim yang disebut polyketide Sintase (PKSS). Rantai karbon dari poliketida dibentuk melalui kondensasi *decarboxylative* bertahap unit asil-thioester menggunakan kelompok terkoordinasi PKS domain. Gen yang mengkode PKS biasanya bergerombol dengan unsur-unsur tambahan dan peraturannya pada genom dan produknya diklasifikasikan ke dalam tipe I, II, dan III tergantung pada organisasi domainnya.

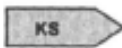
Type I (erythromycin A):



Type II (actinorhodin):



Type III (tetrahydroxychalcone)



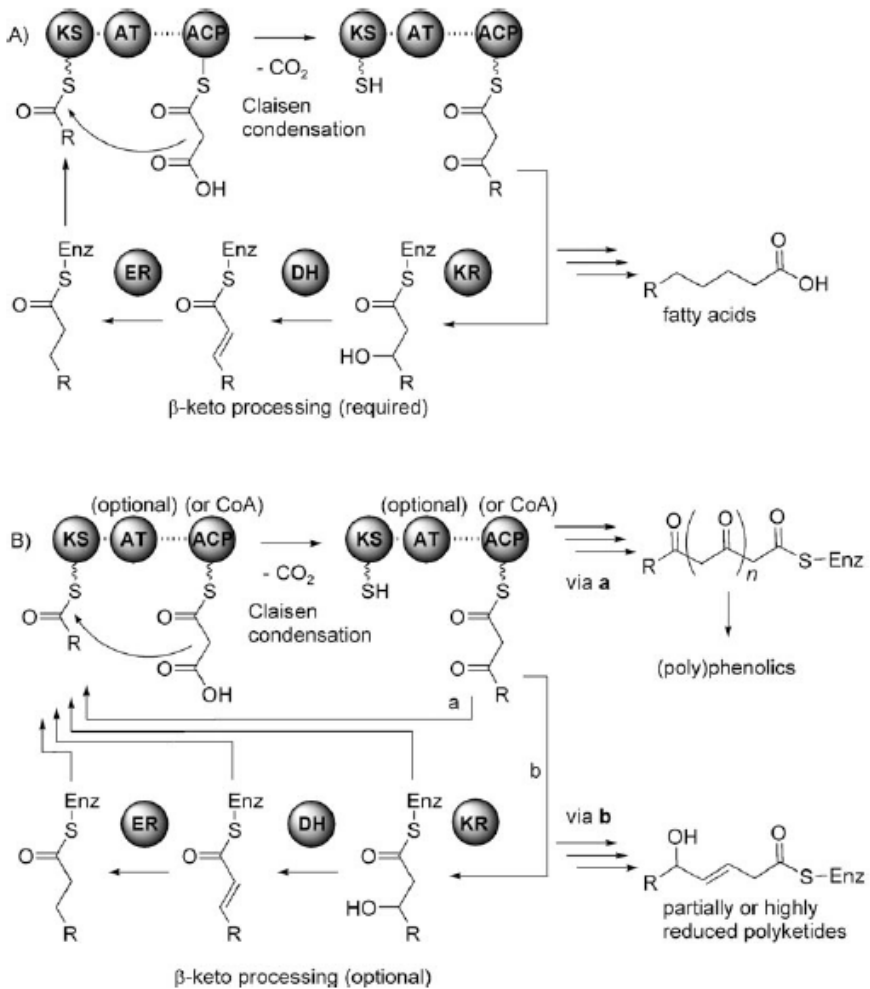
Gambar 7.5 Klasifikasi genom dan produk dalam biosintesis poliketida

Biosintesis poliketida

Penelitian bidang biosintesis dimulai pada tahun 1953 oleh Birch dan Donovan. Peneliti tersebut mengusulkan jalur biosintesis baru untuk poliketida yang menggunakan mekanisme serupa dengan mekanisme biosintesis asam

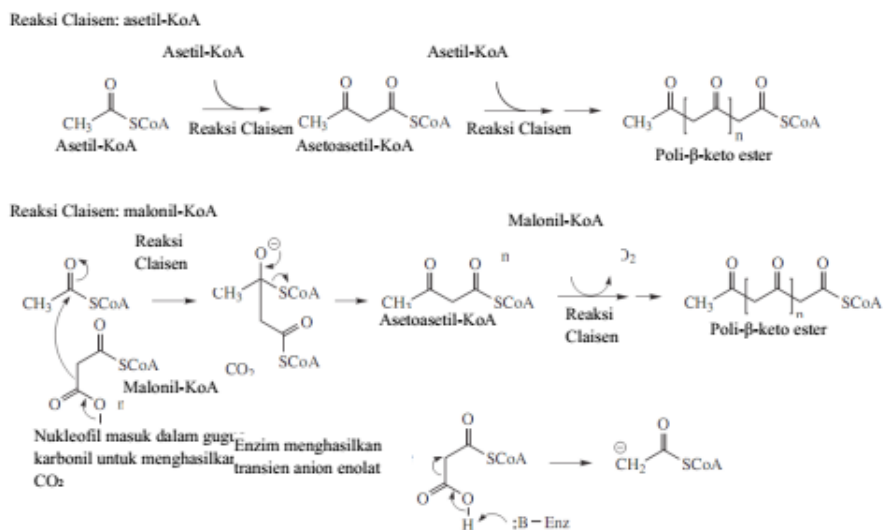
lemak. Hipotesisnya dikenal sebagai hipotesis poliasetat yang menyatakan bahwa "poliketida dibentuk oleh hubungan kepala-ke-ekor unit asetat, diikuti oleh siklisasi dengan reaksi aldol atau dengan asilasi fenol". Pembentukan rantai poli-beta-keto dapat digambarkan sebagai sederet reaksi Claisen.

Poliketida tersebut diproduksi melalui kondensasi bertahap yang sederhana dari prekursor asam karboksilat yang menyerupai biosintesis asam lemak. Biosintesis tersebut dilakukan oleh enzim Polyketide synthetase (PKSs). Selain senyawa di atas, contoh poliketida lainnya antara lain aflatoxin, diskodermolida, antibiotik poliena, makrolida dan tetrasiklin.



Gambar 7.6 Proses kondensasi dalam biosintesis poliketida

Proses perpanjangan biosintesis poliketida terjadi pada C_2 poliketida dan berlangsung secara kondensasi Claisen. Bentuk aktif dari unit C_2 ini adalah Asetil KoA dan Malonil KoA (dari karboksilasi asetil KoA). Jadi, 2 molekul asetil-KoA dapat ikut serta dalam reaksi Claisen membentuk asetoasetil-KoA, kemudian reaksi dapat berlanjut sampai dihasilkan rantai poli-beta-keto.



Gambar 7.7 Reaksi Claisen dalam biosintesis poliketida

Kegunaan senyawa-senyawa poliketida yaitu:

1. Sebagai antibiotik. Golongan yang sering dimanfaatkan diantaranya golongan makrolida (eritromisin, azitromisin, klaritromisin, roksitromisin), golongan ketolida (telitromisin), golongan tetrasiklin (doksisisiklin, oksitetrasiklin, klortetrasiklin).
2. Sebagai obat kolesterol (anti kolesterol), misalnya senyawa lovastatin.
3. Sebagai anti jamur, misalnya senyawa amfoterisin.
4. Sebagai anti kanker, misalnya senyawa epotilon.

7.2 Metode Ekstraksi Poliketida

Pada umumnya senyawa poliketida bersifat nonpolar sehingga dapat dipisahkan menggunakan pelarut yang nonpolar seperti n-heksana, kloroform, metilenklorida, dan etil asetat. Pemisahan dapat dilakukan dengan beberapa tahapan ekstraksi dan metode pemisahan. Misalnya dimulai dengan

melakukan maserasi atau perkolasi menggunakan pelarut alcohol (methanol atau ethanol). Ekstrak kasar yang diperoleh selanjutnya dapat dipisahkan menggunakan metode *vacuum liquid chromatography* dan kromatografi kolom atau kromatografi lapis tipis preparatif. Metode yang lebih modern juga dapat digunakan misalnya menggunakan HPLC preparatif.

Latihan Soal

1. Jelaskan dan gambar kerangka dasar struktur senyawa poliketida!
2. Jelaskan metode ekstraksi umum untuk memisahkan senyawa poliketida dari tumbuhan!

Glikosida

Capaian Pembelajaran

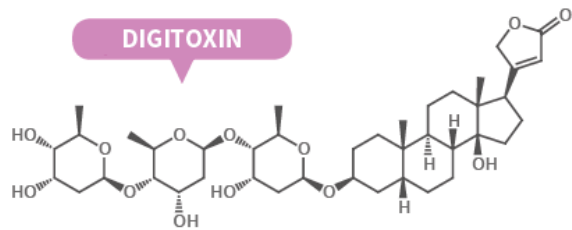
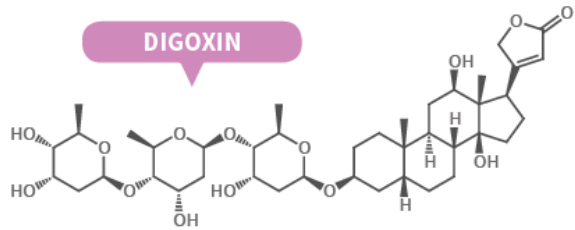
Setelah mempelajari bab 8 ini mahasiswa dapat :

- Memahami dan menjelaskan pengertian senyawa glikosida dan klasifikasinya
- Memahami dan menjelaskan metode ekstraksi dan identifikasi senyawa glikosida

7.3 Pengertian Glikosida

Glikosida adalah suatu senyawa metabolit sekunder yang berikatan dengan senyawa gula melalui ikatan glikosida. Glikosida memainkan peranan penting dalam sistem hidup suatu organisme. Beberapa tumbuhan menyimpan senyawa-senyawa kimia dalam bentuk glikosida yang tidak aktif. Senyawa-senyawa kimia ini akan dapat kembali aktif dengan bantuan enzim hidrolase yang menyebabkan bagian gula putus, menghasilkan senyawa kimia yang siap untuk digunakan. Beberapa glikosida dalam tumbuhan digunakan dalam pengobatan.





Gambar 7.8 Senyawa digoxin dan digitoxin, dua senyawa glikosida jantung yang terdapat dalam tumbuhan *Digitalis purpurea*

Bagian gula suatu glikosida terikat pada atom C anomerik membentuk ikatan glikosida. Glikosida dapat terikat oleh atom O- (O-glikosida), N- (glikosida amin), S- (thioglikosida), C- (C-glikosida). Bagian gula suatu glikosida disebut sebagai glikon, dan bagian bukan gula disebut sebagai aglikon atau genin. Glikon dapat terdiri dari gula tunggal (monosakarida) atau beberapa unit gula (oligosakarida).

Amygdalin merupakan glikosida yang pertama kali diidentifikasi oleh kimiawan berkebangsaan Perancis, Pierre Robiquet dan Antoine Boutron-Charlard pada tahun 1830.

Tumbuhan memiliki banyak jenis enzim yang dapat membentuk dan memutus ikatan glikosida. Enzim paling dalam reaksi pemutusan adalah glikosida hidrosilasi, dan enzim paling penting dalam sintesis glikosida adalah glikosiltransferase.

Klasifikasi Glikosida

Glikosida diklasifikasikan berdasarkan jenis glikon, jenis aglikon dan jenis ikatan glikosidanya

Klasifikasi berdasarkan glikon

Apabila gugus glikon suatu glikosida adalah glukosa maka molekulnya dinamakan sebagai glukosida,

Apabila gugus glikon suatu glikosida adalah fruktosa maka molekulnya dinamakan sebagai fruktosida,

Apabila gugus glikon suatu glikosida adalah asam glukuronat maka molekulnya dinamakan sebagai glukuronida dan sebagainya.

Dalam tubuh, senyawa racun seringkali terikat oleh asam glukuronat untuk meningkatkan kelarutannya dalam air menghasilkan glukuronida yang dapat tereksresikan dari dalam tubuh.

Klasifikasi berdasarkan ikatan glikosida.

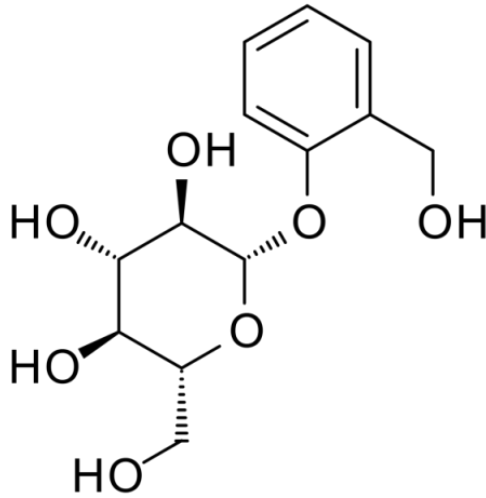
Berdasarkan letak ikatan glikosida, di bawah atau di atas dari struktur datar molekul gula, maka glikosida dapat diklasifikasikan sebagai alfa-glikosida (bawah) atau beta-glikosida (atas). Beberapa enzim seperti alfa-amilase hanya dapat menghidrolisis ikatan-alfa.

Klasifikasi berdasarkan aglikon

Glikosida juga diklasifikasikan berdasarkan senyawa aglikon alamiahnya. Klasifikasi ini banyak digunakan untuk tujuan keimunan biokimia dan farmakologi.

A. Glikosida alkohol (Alcoholic glycosides)

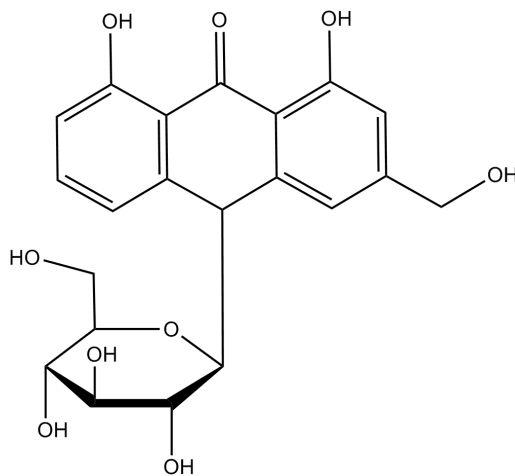
Contoh glikosida alkohol adalah salicin yang dapat ditemukan dalam genus *Salix*. Salicin dalam tubuh diubah menjadi asam salisilat yang berkaitan erat dengan senyawa aspirin yang memiliki efek analgesic, antipiretik, dan antiinflamasi.



Salicin

B. Glikosida antraquinon (Anthraquinone glycosides)

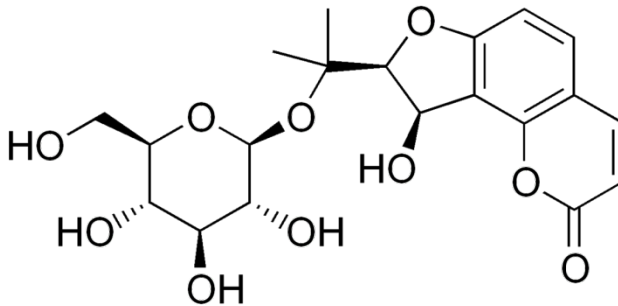
Glikosida jenis ini mengandung gugus aglikon yang merupakan turunan antraquinon. Glikosida jenis ini memiliki aktivitas laksatif (pencahar). Senyawa ini banyak ditemukan dalam semua tumbuhan dikotil. Glikosida ini juga ditemukan dalam tumbuhan monokotil yaitu pada family Liliaceae. Aloin merupakan contoh glikosida turunan antraquinon.



Aloin

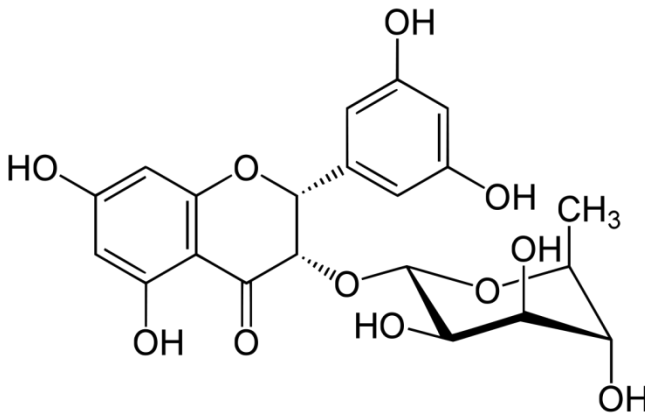
C. Glikosida Kumarin (Coumarin glycosides)

Contoh dari glikosida kumarin adalah apterin yang dilaporkan memiliki aktivitas melebarkan arteri koroner serta memblokir saluran kalsium. Glikosida coumarin lainnya diperoleh dari daun kering tumbuhan *Psoralea corylifolia*.



D. Glikosida Kromon (Chromone glycosides)

Contohnya adalah smitilbin



Smitilbin

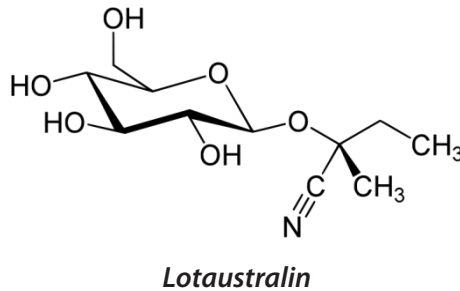
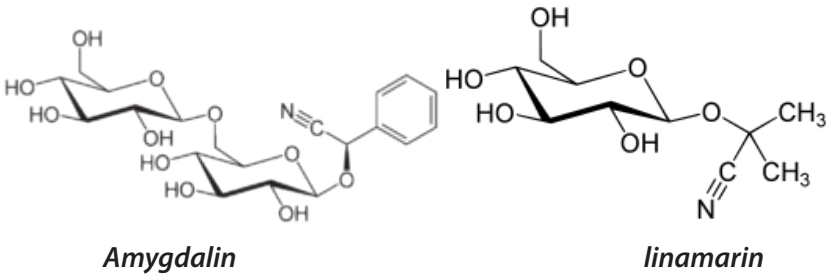
E. Glikosida Sianogenik (Cyanogenic glycosides)

Dalam klasifikasi ini aglikon mengandung gugus cyanohydrin. Tumbuhan menyimpan glikosida sianogenik dalam vakuola, namun pada saat tumbuhan mendapat serangan dari luar lingkungan, maka tumbuhan akan melepaskan glikosida sianogenik dan mengaktifkan dengan bantuan enzim dalam sitoplasma. Enzim akan memutus gula pada molekul glikosida diikuti dengan terbentuknya struktur cyanohydrin dan melepaskan racun hydrogen sianida. Peristiwa ini disebut sebagai sianogenesis. Sianogenesis



adalah salah satu mekanisme yang dapat berfungsi pada tumbuhan sebagai alat pelindung terhadap pemangsa seperti herbivora. Kadar glikosida sianogenik yang dihasilkan tergantung pada usia dan variasi tumbuhan, serta faktor lingkungan.

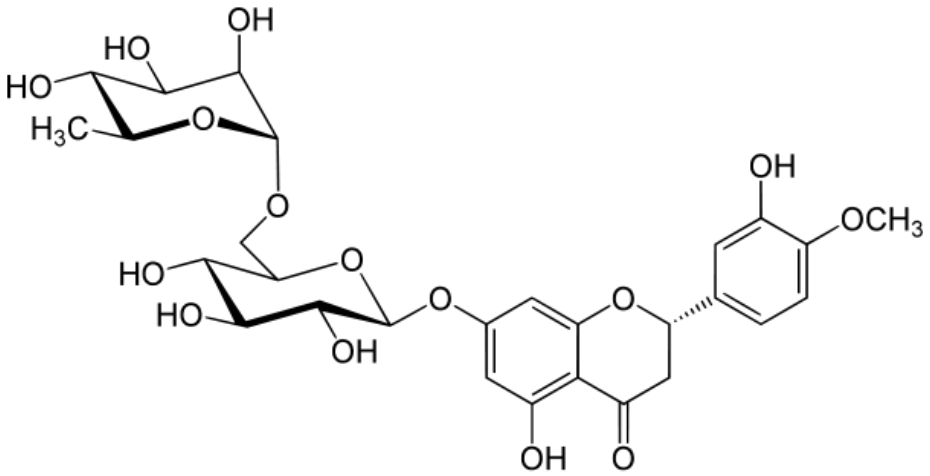
Contoh senyawa glikosida sianogenik adalah amygdalin dan prunasin yang menyebabkan rasa pahit pada pohon almond. Spesies lainnya yang menghasilkan glikosida sianogenik adalah sorgum (dhurrin), singkong (linamarin dan lotaustralin), talas, gadung, kacang koro (*Mucuna pruriens*).



Amygdalin dan senyawa sintetis turunan laetrile diketahui memiliki potensi sebagai obat untuk penyakit kanker.

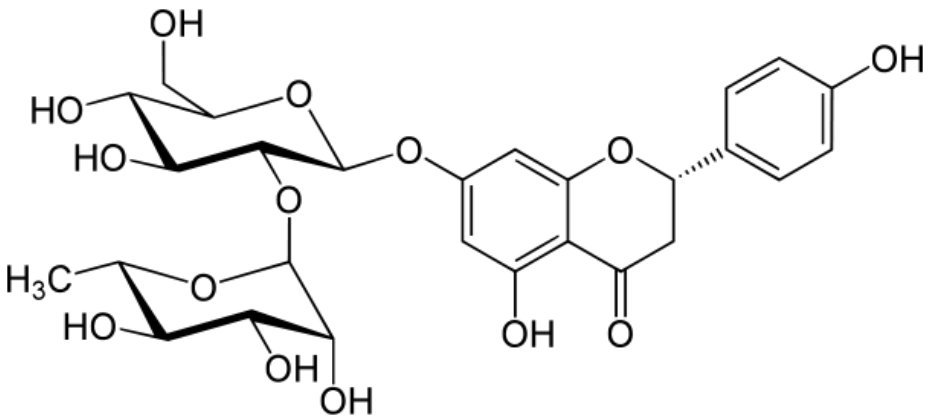
F. Glikosida flavonoid (Flavonoid glycosides)

Aglikon jenis glikosida ini adalah flavonoid. Contoh glikosida flavonoid diantaranya adalah: Hesperidin (aglikon: Hesperetin, glikon: Rutinose)



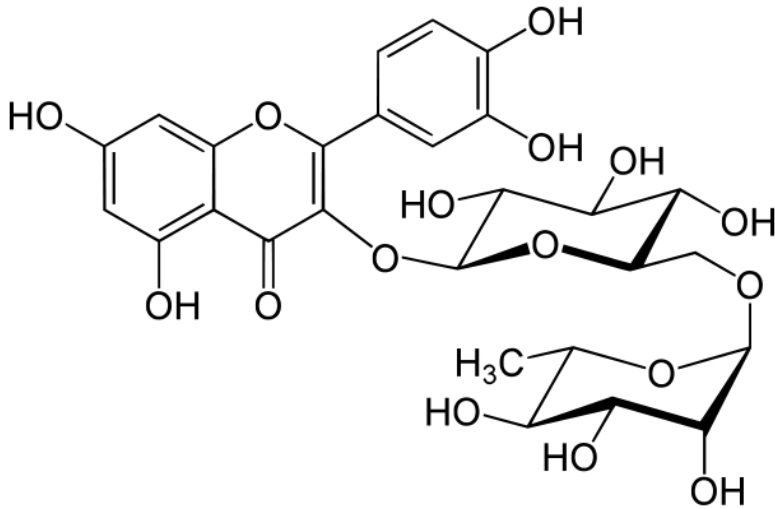
Hesperidin

Naringin (aglikon: Naringenin, glikon: Rutinose)



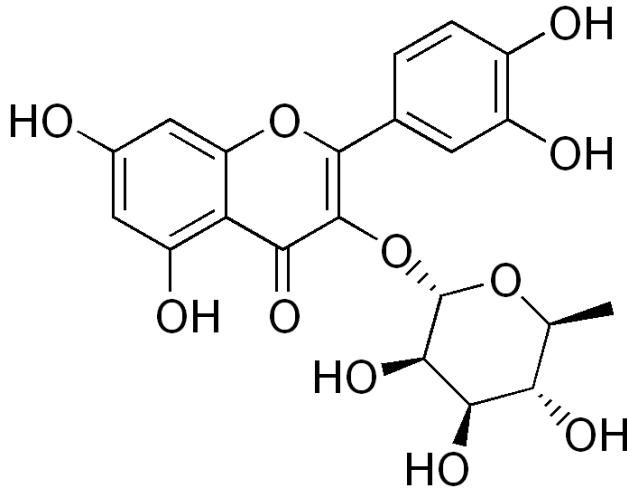
Naringin

Rutin (aglikon: Quercetin, glikon: Rutinose)



Rutin

Quercitrin (aglikon: Quercetin, glikon: Rhamnosa)

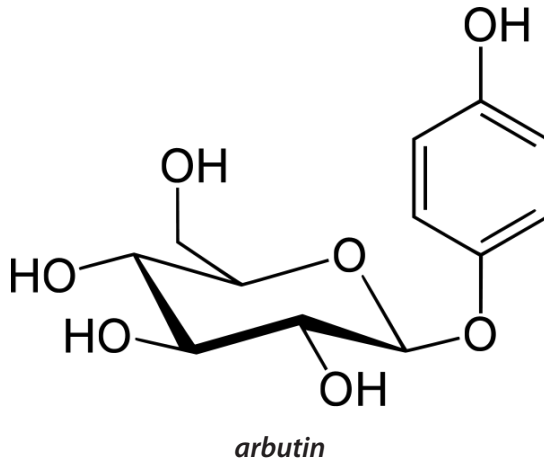


Quercitrin

Kebanyakan efek paling penting dari flavonoid adalah sebagai antioksidan. Senyawaan ini juga diketahui dapat mengurangi kerapuhan pembuluh kapiler.

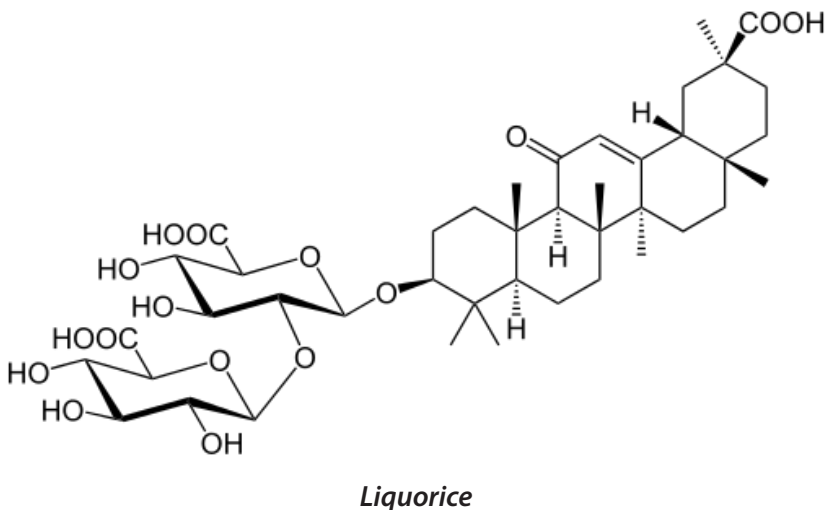
G. Glikosida fenolik (Phenolic glycosides)

Dalam hal ini aglikonnya merupakan suatu struktur fenolik sederhana. Contohnya adalah arbutin yang ditemukan dalam Bearberry (*Arctostaphylos uvaursi*). Senyawa ini memiliki efek antiseptic pada kandung kemih.

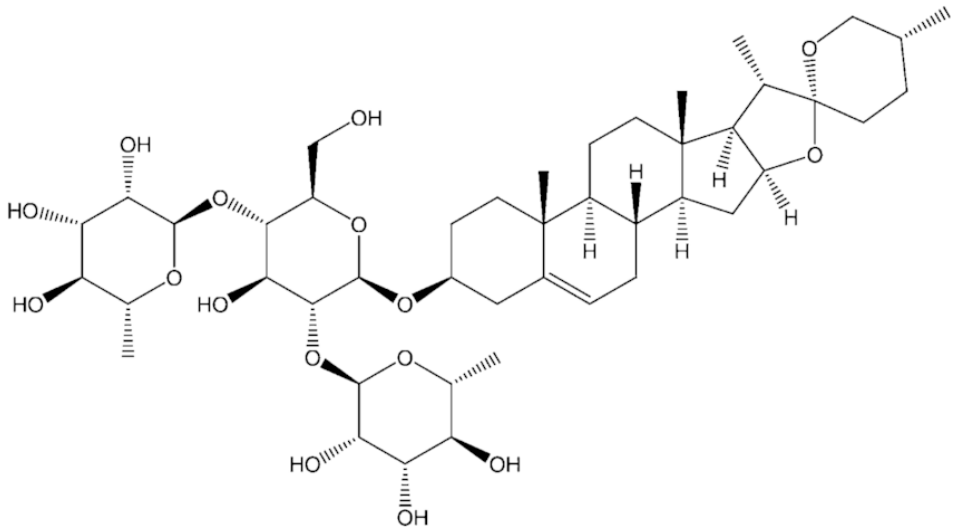


H. Saponin

Senyawaan ini memberikan efek pembentukan gelembung yang permanen pada saat digojok bersama air. Senyawaan ini juga menyebabkan terjadinya hemolysis pada sel darah merah. Contoh senyawa glikosida saponin adalah liquorice. Senyawa ini memiliki aktivitas ekspektoran, dan anti-inflamasi.

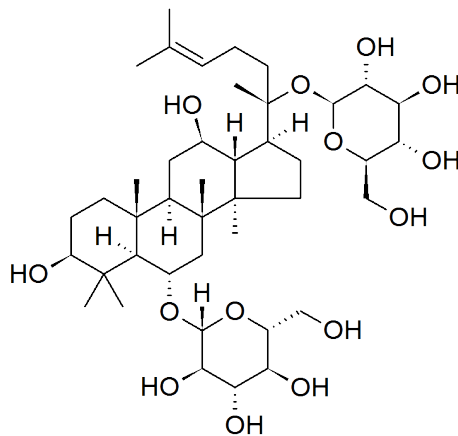


Senyawa diosgin yang merupakan glikosida dari saponin steroid diosgenin adalah suatu *starting material* penting dalam menghasilkan suatu senyawa semi-sintetik glucocorticoid dan steroid hormone sebagai progesterone.



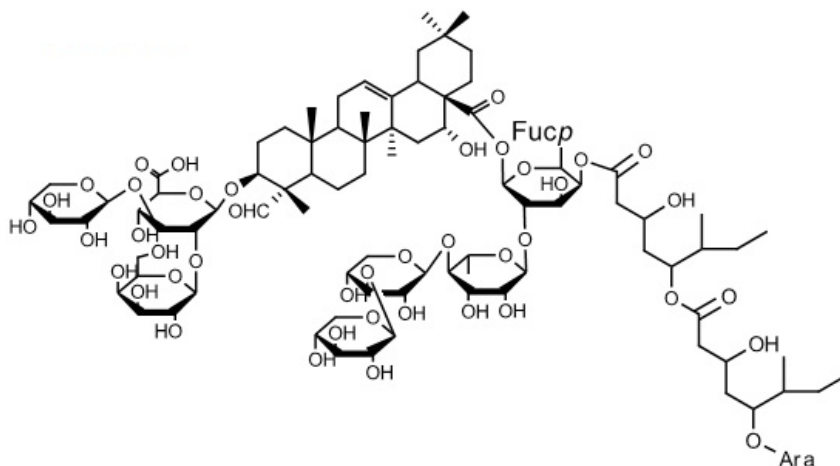
Dioscin

Senyawa ginsenosida adalah glikosida triterpenoid dari saponin (*Panax Ginseng* C. A. Meyer-Chinese ginseng) and *Panax quinquefolius* (American Ginseng).



Ginsenosida

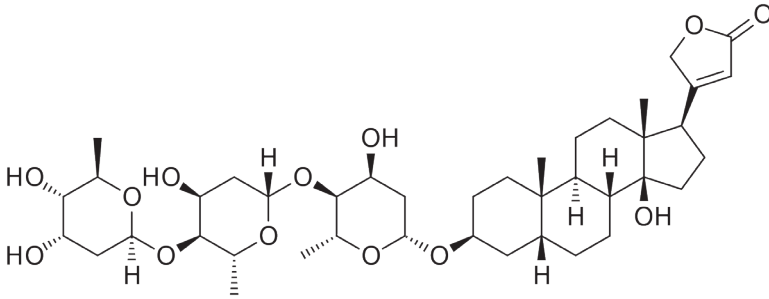
Secara umum, penggunaan istilah saponin dalam kimia organik tidak disarankan, karena banyak konstituen tumbuhan dapat menghasilkan busa, dan banyak triterpene-glikosida bersifat amphipolar dalam kondisi tertentu, bertindak sebagai surfaktan. Penggunaan saponin yang lebih modern dalam bioteknologi adalah sebagai adjuvant dalam vaksin: Quil A dan turunannya QS-21, diisolasi dari kulit *Quillaja saponaria* Molina, untuk menstimulasi baik respon imun Th1 dan produksi sitotoksik T-limfosit (CTLs) terhadap antigen eksogen membuat mereka ideal untuk digunakan dalam subunit vaksin dan vaksin yang diarahkan melawan patogen intraseluler serta untuk vaksin kanker terapeutik tetapi dengan efek samping hemolisis yang telah disebutkan sebelumnya.



QS-21

I. Glikosida steroid (Steroidal glycosides) atau glikosida jantung

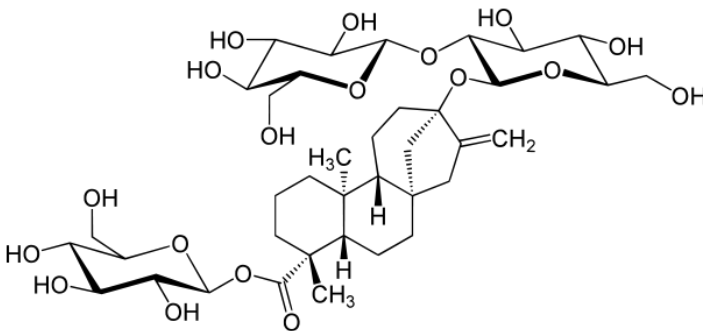
Aglikon pada glikosida ini adalah steroid. Glikosida jenis ini dapat ditemukan dalam tumbuhan *Digitalis*, *Scilla*, and *Strophanthus*. Senyawa ini digunakan dalam pengobatan penyakit jantung seperti gagal jantung kongestif dan arrhythmia. Contoh dari glikosida steroid adalah digitoxin.



Digitoxin

J. Glikosida steviol (Steviol glycosides)

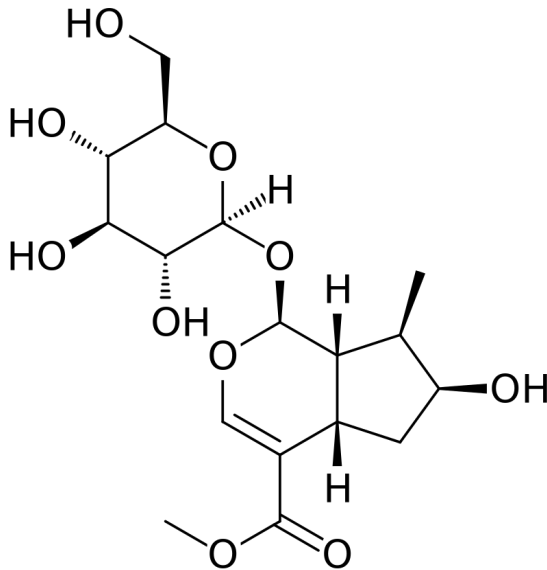
Glikosida yang manis ini ditemukan dalam tumbuhan stevia (*Stevia rebaudiana* Bertoni) memiliki tingkat kemanisan 40-300 kali dibandingkan pemanis sukrosa. Glikosida utama dalam stevia yaitu steviosida and rebaudiosida A, digunakan sebagai pemanis alamiah di beberapa negara. Glikosida ini memiliki aglikon yang dinamakan steviol. glukosa atau kombinasi rhamnosa-glukosa berikatan pada bagian akhir aglikon membentuk senyawaan yang berbeda.



Steviol

K. Glikosida Iridoid (Iridoid glycosides)

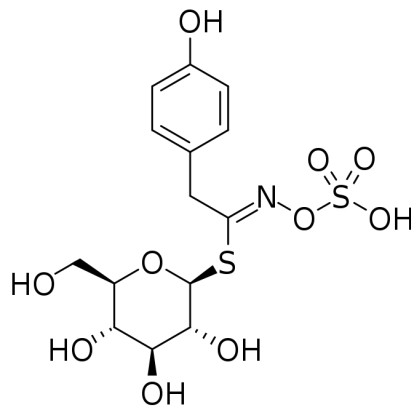
Glikosida ini mengandung gugus iridoil, contohnya adalah aucubin, geniposidic acid, theviridosida, Loganin, Catalpol.



Loganin

L. Thioglikosida

Seperti namanya, glikosida ini mengandung atom sulfur.. Contohnya meliputi sinigrin, yang ditemukan dalam black mustard, and sinalbin, dalam white mustard.



Sinalbin

7.4 Metode Ekstraksi Glikosida

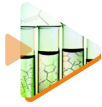
Metode ekstraksi untuk senyawa glikosida mengikuti metode ekstraksi yang berlaku untuk masing-masing jenis aglikonnya.

7.5 Metode Identifikasi Glikosida

Glikosida dapat diidentifikasi secara kualitatif menggunakan pereaksi warna diantaranya:

Latihan Soal

1. Jelaskan dan gambar kerangka dasar struktur senyawa glikosida!
2. Jelaskan metode ekstraksi umum untuk memisahkan senyawa glikosida dari tumbuhan!
3. Jelaskan metode skrining fitokimia yang khas untuk senyawa glikosida!



8. Suplemen: Pembuatan Reagen untuk Skrining Fitokimia

Untuk skrining secara kualitatif, ada beberapa metode standar yang biasa digunakan untuk mengenali adanya gugus fungsi tertentu

Alkaloid

Untuk mengetahui adanya senyawa alkaloid, ekstrak terlebih dahulu dilarutkan dalam HCl dan disaring. Selanjutnya filtrat yang dihasilkan diuji dengan beberapa reagen berikut.

Uji Mayer

Tambahkan setetes atau dua tetes reagen Mayer pada sejumlah kecil filtrat. Pemberian reagen dilakukan pada sisi tabung reaksi. Warna putih atau kuning keruh menunjukkan adanya alkaloid pada ekstrak yang diuji tersebut.

Cara membuat Reagen Mayer:

Larutkan 1,36 gram Merkuri klorida dalam 60 ml aquades dan 5 gram potasium iodida dengan 10 ml aquades.

Campurkan kedua larutan tersebut, tambahkan air distilasi sampai volume campuran mencapai 100 mL.

Uji Wagner

Beberapa tetes reagen Wagner ditampahkan melalui dinding tabung reaksi berisi sejumlah kecil filtrat ekstrak. Warna coklat kemerahan menunjukkan hasil positif adanya alkaloid

Cara membuat Reagen tes Wagner (Iodo-potassium Iodida)

Larutkan 2 gram iodium dan 6 gram potasium iodida dalam 100 ml air destilasi

Uji Hager

Uji Hager dilakukan dengan menambahkan reagen Hager pada filtrat. Adanya alkaloid ditandai dengan pembentukan warna kuning pada campuran tersebut.

Cara membuat Reagen Hager

Reagen Hager dibuat dengan cara melarutkan 1 gram asam pikrat dalam 100 ml aquades

Iodoplatinat

Reagen iodoplatinat dibuat dengan melarutkan 0,15 gram Kalium kloroplatina dan 3 gram Kalium iodida ke dalam 100 ml larutan asam hidroklorida

Reagen semprot untuk alkaloid

Asam iodoplatinat

Asam Iodoplatinat dibuat dengan melarutkan 3 mL asam kloroplatinat (hidrogen hexakloroplatinat) ke dalam 100 ml air. Di tempat lain, larutkan 6 gram Kalium Iodida dalam 100 mL air. Kemudian campur kedua larutan tersebut.

Dragendorff spray

Larutan 1: larutkan 7 gram bismut nitrat dan 20 gram asam tartarat dalam 80 ml aquades

Larutan 2: larutkan 16 gram Kalium Iodida dalam 40 ml aquades.

Larutan stok: campur larutan 1 dan 2 dengan perbandingan volume 1 : 1. Larutan ini stabil beberapa minggu di dalam lemari pendingin.

Prosedur kerja: campurkan 10 gram asam tartarat, 50 ml aquades dan 5 ml larutan stok membentuk larutan. Gunakan untuk menyemprot

Formaldehida / asam sulfat

Campurkan 37% formaldehid dengan asam sulfat pekat dengan perbandingan 1:10. Gunakan untuk menyemprot segera setelah meletakkan plat dalam chamber. Tidak diperlukan pemanasan. Hasilnya akan nampak spot dengan berbagai warna

Formaldehid /asam Fosfat

Larutkan 0,03 gram formaldehid ke dalam 100 mL asam fosfat 85%, aduk menggunakan stirer dalam temperatur ruang. Larutan ini stabil selama beberapa minggu. Gunakan untuk menyemprot plat.

Asam nitrat / etanol

Campurkan 50 tetes asam nitrat 65% ke dalam 100 mL etanol (bisa juga menggunakan konsentrasi yang lebih pekat). Jika diperlukan panaskan sampai 120 derajat celcius untuk beberapa waktu. Gunakan larutan ini untuk *spray*.

Senyawa fenolik dan Flavonoid

Uji Reagen Alkali

Pengujian dilakukan dengan menambahkan beberapa tetes larutan NaOH. Perubahan warna menjadi kuning pekat menandakan adanya flavonoid. Cara lain dalam uji ini adalah menambahkan larutan amonium hidroksida 10% ke dalam ekstrak yang terlarut dalam sejumlah aquades. Adanya flavonoid ditunjukkan dengan terbentuknya warna kuning fluorescence

Uji Pb Asetat

Sebanyak 50 mg ekstrak dilarutkan dalam aquades. Kemudian ditambahkan 3 ml Pb asetat 10%. Perubahan larutan menjadi putih keruh menandakan adanya fenol.

Uji Gelatin

Sebanyak 50 mg ekstrak dilarutkan dalam 50 ml aquades. Kemudian tambahkan 2 ml larutan gelatin yang mengandung 10% NaCl. Campuran berwarna putih menandakan adanya senyawa fenolik.

Uji Ferri klorida

Sebanyak 50 mg ekstrak dilarutkan dalam 5 ml aquades. Tambahkan beberapa tetes ferri klorida 5% netral. Warna hijau pekat menandakan adanya senyawa fenolik

Uji Magnesium dan reduksi asam hidroklorida

Sebanyak 50 mg ekstrak dilarutkan dalam 5 ml alkohol. Masukkan potongan kecil pita magnesium dan HCl pekat beberapa tetes. Jika ada perubahan warna dari pink menjadi merah tua, menandakan adanya flavanol glikosida antimon (III) klorida

Semprot plat dengan larutan jenuh dari 25 gram antimon (III) klorida dalam kloroform. Panaskan pada suhu 100 derajat celsius selama 10 menit. Dengan cahaya UV, lihat spot fluoresen di panjang gelombang 360 nm

Reagen semprot untuk flavonoid dan senyawa fenolik

Aluminium klorida

Larutkan 1 gram aluminium klorida dalam 100 ml etanol 95%. Gunakan untuk menyemprot. Hasil terlihat dari warna kuning fluoresen dengan cahaya UV (360 nm)

Emerson (4-aminoantipirin/kalium heksasianoferat)

Untuk mendeteksi fenol

Larutan 1 : larutkan 1 gram aminiantipirin (4-aminophenazon) ke dalam 100 ml etanol 80%

Larutan 2 : larutkan 4 gram kalium heksasianoferat(III) ke dalam 50 ml aquades. Tambahkan etanol sampai volume mencapai 100 ml

Prosedur kerja: semprot plat dengan larutan 1, keringkan 5 menit dengan udara hangat. semprot dengan larutan 2, keringkan kembali selama 5 menit. Tempatkan plat dalam chamber berisi uap amonia (larutan amonia 25%). pastikan lapisan tidak kontak dengan lartan amonia. Akan terlihat warna merah-orange naik menjadi spot pink salmon

P-Anisaldehyd / asam sulfat

Campurkan 5 ml p-anisaldehyd ke dalam 50 ml asam asetat glasial dan 1 ml asam sulfat 97%. Gunakan selalu larutan baru untuk menyemprot plat. Panaskan pada suhu 105 derajat celcius sampai spot terlihat. Latar belakang plat bisa dibuat lebih terang dengan semprotan uap air. Spot yang terlihat bisa berwarna ungu, biru, merah, abu-abu atau hijau

Reaksi Boute

Untuk mendeteksi fenol. Keringkan dan panaskan plat kromatogram. Letakan plat panas dalam chamber yang berisi uap NO_2 (dari asam nitrat pekat) selama 3 – 10 menit. Kemudian diuapi dengan uap NH_3 (dari amonia pekat)

Reagen Chloranil

Untuk mendeteksi fenol, semprot plat dengan larutan yang terbuat dari 1 gram tetrakloro-p-bonzoquinon dalam 100 ml toluen

Chloramine-T

Larutkan 5 gram reagen dan 0,5 gram NaOH ke dalam 100 ml aquades. Digunakan untuk mendeteksi senyawa fenolik

DDQ

Reagen DDQ (Diklorodisianobenzoquinon) dibuat dengan melarutkan 2 gram 2,3-dikloro-5,6-disiano-1,4-benzoquinon ke dalam 100 ml aquades. Digunakan untuk menyemprot plat mendeteksi fenol

2,6 dikloroquinon

Larutkan 1,0 gram 2,6-dikloroquinon-4-kloroimida ke dalam 100 ml metanol. Untuk mendeteksi fenol, semprot plat dengan larutan baru. Kemudian panaskan pada suhu 110 derajat celcius selama 10 menit dan uapi dengan uap NH_3

Etanolamina difenilborat

Larutan 1 : larutkan 1 gram etanolamin difenilborat dalam 100 ml metanol

Larutan 2 : larutkan 5 gram polietilen glikol dalam 100 ml etanol

Prosedur kerja: untuk mendeteksi flavonoid, semprot plat dengan larutan 1 kemudian semprot dengan larutan 2. Amati dengan UV di panjang gelombang 365 nm

Reagen Fast Blue B

Larutkan 0,5 gram Fast Blue B (tetraazotized di-o-anisidin) dalam aseton/ aquades (9:1, v/v). Selalu gunakan larutan baru.

Semprot plat dua kali dengan larutan tersebut. Lalu semprot berkali kali dengan larutan 0,1M NaOH. Hasil: Senyawa Cannabinoid ditunjukkan dengan berubahnya warna menjadi merah tua/ungu.

Feri klorida / asam sulfat

Larutkan 2 gram FeCl_3 dalam 83 ml n-butanol dan 15 ml asam sulfat pekat.

Gunakan larutan tersebut untuk menyemprot KLT. Panaskan pada suhu 110°C selama 5 – 30 menit.

Cek hasilnya setiap 5-10 menit untuk melihat adanya warna atau spot fluoresens di panjang gelombang 254 nm dan 360 nm. Pengamatan bisa diteruskan sampai spot menjadi berwarna coklat, abu-abu atau hitam.

Feri klorida – Kalium ferisianida

Larutkan 3 gram Feri klorida dan 3 gram Kalium ferisianida ke dalam 100 ml 2M asam hidroklorida. Digunakan untuk mendeteksi senyawa fenolik dan amina aromatik

Reagen Gibb

Untuk mendeteksi fenol. Larutkan 3 gram 2,6-dibromo-N-kloro-p-benzoquinon imina dalam 100 ml metanol atau toluen

Pb tetraasetat (Lead tetraacetate)

Larutan 1: larutkan 2 gram Pb tetraasetat ke dalam 100 ml asam asetat glasial
Larutan 2: larutkan 1 gram 2,7-dikloroflouresen dalam 100 ml etanol
Campurkan larutan 1 dan 2 masing-masing 5 ml, dan tambahkan toluene kering sampai 200 ml. Larutan reagen ini hanya stabil selama 2 jam

Tetrasianoetilen (reagen TCNE)

Untuk mendeteksi fenol. Larutkan 0,5 – 1 gram tetrasianoetilen ke dalam diklorometan atau toluen. Gunakan untuk menyemprot plat. Panaskan pada suhu 100 derajat celcius dalam waktu singkat.

Reagen TNF (trinitrofluorenon)

Larutkan 2 gram 2,4,7-trinitrofluorenon dalam 100 ml toluen. Gunakan untuk menyemprot plat.

O-Tolidin, diazotized

Larutan Tolidin : campurkan 5 gram o-tolidin dan 14 ml asam hidroklorida ke dalam 100 ml aquades

Larutan nitrat : larutkan 10 gram natrium nitrat dalam 100 ml aquades. Selalu siapkan larutan baru.

Campur 20 ml larutan tolidin dan 20 ml larutan nitrat pada suhu 0 derajat celcius sambil diaduk konstan. Larutan penyemprot ini stabil hanya 2-3 jam. Setelah penyemprotan, diperlukan beberapa waktu sampai spot berwarna terbentuk.

Asam p-toluensulfonik

Untuk mendeteksi steroid dan flavonoid

Larutkan 20 mg asam p-toluensulfonik dalam kloroform. Gunakan untuk menyemprot plat. Lalu panaskan beberapa saat pada suhu 100 derajat celcius. Amati spot dengan UV pada panjang gelombang besar.



Deteksi Terpenoid

Reagen Liebermann-Buchard

Tambahkan 1 ml kloroform pada ekstrak kemudian disaring. Pisahkan filtratnya. Tambahkan 1 ml asam asetat anhidrat pada filtrat. Didihkan dan dinginkan pada suhu 0 derajat celcius. Kemudian tambahkan 1 tetes asam sulfat pekat. Pembentukan cincin coklat mengindikasikan adanya pitosterol

Uji Salkowski

Ekstrak ditambah kloroform kemudian disaring. Pisahkan filtrat dan tambahkan beberapa tetes asam sulfat pekat pada filtrat tersebut. Kocok dan biarkan pada posisi berdiri. Penampakan warna kuning emas mengindikasikan adanya triterpen

Uji Tembaga asetat

Ekstrak dilarutkan dalam air. Tambahkan 3-4 tetes larutan tembaga asetat. Pembentukan warna hijau emerald mengindikasikan adanya diterpen

Metode Kedde

yaitu dengan cara menguapkan sampel sampai kering kemudian menambahkan 2 mL kloroform, lalu dikocok dan disaring. Filtrat dibagi menjadi 2 bagian, A dan B. Filtrat A sebagai blangko, dan filtrat B ditambah 4 tetes reagen Kedde. Hasil akan menunjukkan warna ungu.

Metode Keller-Killiani

yaitu dengan menguapkan 2 mL sampel, dan mencucinya dengan heksana sampai heksana jernih. Residu yang tertinggal dipanaskan diatas penangas air kemudian ditambahkan 3 mL pereaksi $FeCl_3$ dan 1 mL H_2SO_4 pekat. Hasil positif jika terlihat cincin merah bata menjadi biru atau ungu

Antimon(III)klorida

Untuk mendeteksi terpen, steroid, steroid glukosida
Semprot plat dengan larutan jenuh dari 25 gram antimon(III)klorida dalam

kloroform. panaskan pada suhu 100 derajat celcius selama 10 menit, lakukan pengamatan pada panjang gelombang 360 nm.

p-anisaldehyda / asam sulfat

untuk deteksi fenol, steroid dan terpen.

Larutkan 0,5 ml p-anisaldehyd dalam campuran 50 ml asam asetat glasial dan 1 ml asam sulfat pekat.

Gunakan larutan baru untuk menyemprot plat. Panaskan pada suhu 105 derajat celcius sampai terlihat spot. Semprotan uap air bisa membuat latar belakang plat lebih terang sehingga spot lebih terlihat.

Hasil yang terlihat spot berwarna ungu, biru, merah abu-abu atau hijau

Timah(IV)klorida

Untuk deteksi triterpen, sterol, steroid, fenol dan polifenol.

Larutkan 10 ml timah(IV)klorida ke dalam campuran 80 ml kloroform dan 80 ml asam asetat glasial. Gunakan larutan ini untuk menyemprot plat. Panaskan pada suhu 100 derajat celcius selama 5-10 menit. Dan periksa dengan sinar UV pada panjang gelombang tampak dan besar.

Vanilin / asam sulfat

Untuk deteksi steroid

Larutkan 1 gram vanilin dalam 100 ml asam sulfat pekat. Gunakan untuk menyemprot plat. Keringkan pada suhu 120 derajat celcius sampai terbentuk warna secara maksimal.

Formulasi yang lain adalah 0,5 gram vanilin dalam campuran 80 ml asam sulfat dan 20 ml etanol.

Reagen ini hanya dapat digunakan untuk KLT berbahan gipsum dengan alas kaca.

Asam Fosfat

Untuk deteksi sterol, steroid

Campurkan 50 ml asam fosfat pekat dengan 50 ml aquades. Semprot plat dengan larutan tersebut sampai lapisan terlihat transparan. Kemudian panaskan pada suhu 10 derajat celcius selama 10-15 menit.

Asam trifluoroasetat

Untuk deteksi steroid.

Larutkan 1 gram asam trifluoroasetat dalam 100 ml kloroform. semprot plat dengan larutan tersebut, kemudian panaskan pada suhu 120 derajat celcius selama 5 menit.

Glikosida

Difenilamina

Untuk deteksi glikosida, glikolipid

Larutkan 5 gram difenilamina dalam 50 ml etanol. Tambahkan 40 ml asam klorida pekat dan 10 ml asam asetat glasial. Semprotkan pada plat dan tutup dengan plat kaca yang lain. Panaskan pada suhu 110 derajat celcius selama 30-40 menit sampai terbentuk spot yang terlihat. spot biru menunjukkan adanya glikolipid

Timbal tetraasetat / 2,7-diklorofluoresen

Larutan 1: larutkan 2 gram Pb tetraasetat ke dalam 100 ml asam asetat glasial

Larutan 2: larutkan 1 gram 2,7-diklorofluoresen dalam 100 ml etanol

Campurkan larutan 1 dan 2 masing-masing 5 ml, dan tambahkan toluene kering sampai 200 ml. Larutan reagen ini hanya stabil selama 2 jam

Orcinol (reagen Bial)

Untuk deteksi glikosida dan glikolipid

Larutkan 0,1 gram orcinol dalam 40,7 ml HCl pekat. Tambahkan 1 ml 1% feri(III) klorida dan larutkan dengan aquades sampai volume menjadi 100 ml.

Semprot plat dan panaskan pada suhu 80 derajat celcius selama 90 menit. Adanya glikolipid akan menghasilkan spot berwarna ungu.

Asam fosfat – bromida

Untuk mendeteksi digitalis glikosida

Larutan 1: 10% asam fosfat encer

Larutan 2 : campurkan 2 ml larutan jenuh kalium bromida, 2 ml larutan jenuh kalium bromat dan 2 ml 25% asam hidroklorida

Prosedur kerja: semprot plat dengan larutan 1. Panaskan pada suhu 120 derajat celcius selama 12 menit. Digitalis glikosida seri B, D, dan E akan menunjukkan fluoresens pada panjang gelombang UV.

Lanjutkan dengan memanaskan lagi pada suhu 120 derajat celcius dan semprotkan sedikit larutan 2. Glikosida seri A menunjukkan warna oranye, seri C ditunjukkan dengan pendar fluoresens berwarna abu-abu hijau sampai abu-abu biru pada cahaya UV

Tetranitro difenil

Untuk deteksi cardiac glikosida

Larutan 1: larutan jenuh 2,3',4,4'-tetranitrodifenil dalam toluen

Larutan 2: larutkan 10 gram kalium hidroksida dalam campuran 50 ml aquades dan 50 ml metanol

Prosedur kerja: semprot plat dengan larutan 1, keringkan pada suhu ruang, kemudian semprot dengan larutan 2. Hasil positif akan terlihat bila terbentuk spot berwarna biru.

Difenilamina

Untuk deteksi glikosida, glikolipid

Larutkan 5 gram difenilamina dalam 50 ml etanol. Tambahkan 40 ml asam klorida pekat dan 10 ml asam asetat glasial. Semprotkan pada plat dan tutup dengan plat kaca yang lain. Panaskan pada suhu 110 derajat celcius selama 30-40 menit sampai terbentuk spot yang terlihat. spot biru menunjukkan adanya glikolipid

Referensi

- Banu, K.S. and Catrine, L. (2015). General Techniques Involved in Phytochemical Analysis, *International Journal of Advanced Research in Chemical Science (IJARCS) Volume 2, Issue 4*
- De Silva, G. O., Theekshana, A., Abeyesundara and Aponso, M. M. W. (2017). Extraction methods, qualitative and quantitative techniques for screening of phytochemicals from plants, *American Journal of Essential Oils and Natural Products*; 5(2): 29-32
- Dewick, P.M., (2009). *Medicinal Natural Product, A Biosynthetic Approach*, 3rd Edition, John Wiley and Son
- Harborne, J.B., (1987). *Phytochemical Methods*, Diterjemahkan oleh Kosasih Padmawinata dan Iwang Sudiro, Penerbit ITB, Bandung
- Hostettmann, K., Marston, A. and Hostettmann, M. (1998). *Preparative Chromatography Techniques: Applications in Natural Product Isolation*, Springer Verlag Berlin Heidelberg New York
- Julianto, T.S. (2016). *Minyak Atsiri Bunga Indonesia*, Deepublish, Yogyakarta
- Marby, J.T., Markham, K.R., Thomas, M.B., 1970. *The Systematic Identification of Flavonoids*, Springer Verlag, Berlin
- Markham, K.R., (1988). *Techniques of Flavonoids Identification*, diterjemahkan oleh Kosasih Padmawinata, Penerbit ITB, Bandung
- Ribera, A.E. and Zuñiga, G. (2012). Induced plant secondary metabolites for phytopatogenic fungi control: a review, *Journal of Soil Science and Plant Nutrition*, 12 (4), 893-911
- Robinson, T., (1991). *The Organic Constituents of Higher Plants*, 6thEd., Diterjemahkan oleh Kosasih Padmawinata, Penerbit ITB, Bandung
- Tiwari, P., Kumar, B., Kaur, M., Kaur, G., Kaur, H. (2011). Phytochemical Screening And Extraction: A Review, *Internationale Pharmaceutica Scientia*, Vol.1, Issue 1, 98-106



Pande, A. and Tripathi, S. (2014). Concept of standardization, extraction and pre phytochemical screening strategies for herbal drug, *Journal of Pharmacognosy and Phytochemistry* 2014; 2 (5)

Glosari

Metabolit;
senyawa hasil metabolisme

Maserasi;
metode pemisahan senyawa aktif tidak tahan panas dari sampel tumbuhan yang dilakukan dengan cara direndam dalam pelarut yang sesuai dalam jangka waktu tertentu

Ekstraksi Soxhlet; metode pemisahan senyawa aktif dari sampel tumbuhan menggunakan pelarut yang mengalami kontak secara kontinyu menggunakan set ekstraktor soxhlet

Kromatografi;
metode pemisahan campuran senyawa berdasarkan distribusinya terhadap fase gerak dan fase diam

Fenolik;
suatu senyawa metabolit sekunder yang mengandung 1 atau lebih gugus hidroksil yang terikat pada cincin aromatik

Terpenoid;
suatu senyawa metabolit sekunder yang terbentuk dari unit-unit kerangka isoprena

Alkaloid;
senyawa metabolit sekunder bersifat basa, mengandung satu atau lebih atom nitrogen (biasanya dalam cincin heterosiklik)

Poliketida;
senyawa metabolit sekunder yang mengandung gugus karbonil dan gugus metilen yang tersusun secara selang-seling (beta-poliketona)

Glikosida

senyawa metabolit sekunder yang terbentuk dari ikatan antara suatu glikon dan aglikon

Index

A

alkaloid 11, 14, 40, 44, 45, 46, 47, 48, 49, 50, 51, 84, 85

Alkaloid 44, 45, 46, 47, 48, 49, 50, 51, 84

alumina 31

antibiotik 14, 62, 67

asam amino 11, 38, 40, 45, 47

asam fenolat 37, 41, 42, 43

Asetil KoA 14, 66

B

biosintesis 11, 12, 13, 14, 15, 36, 46, 53, 65, 66, 67

E

Ekstraksi 17, 20, 22, 42, 49, 50, 51, 56, 67, 82

Enfleurasi 25

enzim 4, 12, 36, 41, 64, 65, 69, 70, 71, 73

F

Fenilpropanoid 37

fenolik 11, 14, 20, 32, 34, 35, 36, 37, 38, 40, 77, 87, 88, 89, 90

fitokimia v, 1, 18, 31

flavonoid 35, 36, 37, 38, 39, 61, 74, 76, 87, 88, 89, 91

Flavonoid 38, 39, 74, 87

fotosintesis 11, 14

H

Hidrodestilasi 27

HPLC 31, 34, 43, 67

I

Identifikasi 17, 32, 33, 43, 51, 57, 82

Isolasi 17, 42, 45

J

Jalur asam asetat 13

Jalur asam mevalonat 14

Jalur asam sikimat 13

K

kromatografi kolom 31, 33, 34, 67

L

lemak 14, 25, 26, 49, 65

M

metabolit sekunder v, 1, 11, 13, 15, 17, 18, 30, 35, 44, 60, 64, 69

microwave 19, 23

N

NMR 31, 32, 33, 34

P

Pemurnian 30

Pencucian 18

pengeringan 17, 18, 19, 20, 49

Pengumpulan 17

penyaringan 22

penyerbukan v, 1

perkolasi 21, 45, 67

Perkolasi 21

protein 4, 36, 38, 40, 41

S

senyawa organik 32, 52

serangan 73

serangga v, 1, 4, 12, 52, 61

silika 31, 43

spektroskopi massa 31, 32, 34

Supercritical 22, 23

T

Tanin 40, 41

termolabile 22

terpenoid 11, 14, 52, 53, 55, 56, 57

U

Ultrasound 24

ultraviolet 4, 32

UV-visible 31, 32, 34

W

Warna 43, 84, 87





UNIVERSITAS ISLAM INDONESIA



ISOLASI SENYAWA AKTIF LIGNAN DARI BEBERAPA TANAMAN

Sekar Ayu Maharani, Adella Aisyah, Diva rizqi salsabilla, Regita Nailuvar

Universitas Singaperbangsa Karawang Jawa Barat, Indonesia

Email: 1910631210014@student.unsika.ac.id, adella54@gmail.com,

salsabiladivarizqi@gmail.com, nailuvar34@gmail.com

Abstrak

Penemuan berbagai senyawa obat baru dari bahan alam semakin memperjelas peran penting metabolit sekunder tanaman sebagai sumber bahan baku obat. Umumnya dihasilkan oleh tumbuhan tingkat tinggi, yang bukan merupakan senyawa penentu kelangsungan hidup secara langsung, tetapi lebih sebagai hasil mekanisme pertahanan diri organisme. Makanan yang mengandung senyawa lignan seperti biji rami, wijen, bunga matahari, kacang-kacangan, dan buah-buahan. Biji rami merupakan bahan makanan sumber yang mempunyai kandungan lignan paling tinggi. Tujuan penelitian ini adalah untuk mengisolasi dan menentukan struktur molekul lignan yang terdapat dalam beberapa jenis tanaman atau buah-buahan seperti Biji Rami, Durian, Meniran, Tanaman Mahkota Dewa dan juga Daun Sirih. Metode yang digunakan adalah dengan melakukan review terhadap artikel terkait pada jurnal internasional dan nasional. Berdasarkan studi referensi menunjukkan Biji rami, Durian, Meniran, Tanaman Mahkota Dewa dan Daun sirih sangat berpotensi dan prospektif sebagai jenis tanaman yang mengandung senyawa lignan. Tantangan yang sangat penting dalam pengembangan tanaman obat adalah kualitas yang konstan, pasokan bahan baku yang kontinu dan khasiatnya terjamin.

Kata kunci: lignanta; naman obat; tanaman

Abstract

The discovery of various new medicinal compounds from natural ingredients further clarifies the important role of plant secondary metabolites as a source of medicinal raw materials. Generally produced by higher plants, which are not compounds that determine survival directly, but rather as a result of the organism's self-defense mechanism. Foods that contain lignan compounds such as flaxseed, sesame, sunflower, nuts, and fruits. Flaxseed is a food source that has the highest lignan content. The purpose of this study was to isolate and determine the molecular structure of lignans contained in several types of plants or fruits such as Flaxseed, Durian, Meniran, Mahkota Dewa Plant and also Betel Leaf. The method used is to review related articles in international and national journals. Based on reference studies, it is shown that Flaxseed, Durian, Meniran, Mahkota Dewa and Betel Leaf have potential and prospective as plant species containing lignan compounds. A very important challenge in the development of medicinal plants is constant quality, continuous supply of raw materials and guaranteed efficacy.

Keywords: *lignans; medicinal plants; plants*

Pendahuluan

Penemuan berbagai senyawa obat baru dari bahan alam semakin memperjelas peran penting metabolit sekunder tanaman sebagai sumber bahan baku obat. Metabolit sekunder merupakan senyawa hasil biogenesis dari metabolit primer (Putri, 2018). Umumnya dihasilkan oleh tumbuhan tingkat tinggi, yang bukan merupakan senyawa penentu kelangsungan hidup secara langsung, tetapi lebih sebagai hasil mekanisme pertahanan diri organisme. Aktivitas biologi tanaman dipengaruhi oleh jenis metabolit sekunder yang terkandung didalamnya. Aktivitas biologi ditentukan pula oleh struktur kimia dari senyawa. Unit struktur atau gugus molekul mempengaruhi aktivitas biologi karena berkaitan dengan mekanisme kerja senyawa terhadap reseptor di dalam tubuh. struktur molekul senyawa kimia bahan alam juga memegang peranan penting untuk pengembangannya menjadi bahan baku senyawa obat baru. Kandungan senyawa metabolit sekunder yang termasuk ke dalam golongan metabolit yang telah terbukti bekerja sebagai derivat polifenol lain dengan aktivitas sitostatika adalah senyawa lignan. Senyawa lignan paling baru yang telah terbukti sebagai sitostatika secara invitro. Senyawa lignan sendiri merupakan senyawa golongan polifenol alam yang secara biosintesis termasuk kedalam senyawa turunan asam amino protein aromatik, yaitu fenilalanin dan fenilpropanoid (Suteja, 2018).

Golongan senyawa ini merupakan bangun dasar pembentuk lignan dan juga berkaitan dengan pengaturan tumbuh dan pertahanan diri tanaman terhadap penyakit. Umumnya struktur lignan berkaitan dengan aktivitas supresi fungsi gen bila berkerja sebagai sitostatika, dimana mekanisme kerja menghambat lagkah biosintesis protein sel kanker. Ligan dibedakan menjadi 8 subkelas yaitu: dibenzylbutyrolactol, dibenzocyclooctadiene, dibenzylbutyrolactone, dibenzylbutane, aryl naphthalene, aryl tetralin, furan, dan furofuran lignan. Makanan, yang mengandung senyawa lignan seperti biji rami, wijen, bunga matahari, kacang-kacangan, dan buah-buahan.

Pada review artikel ini kelompok kami melakukan review pada 5 jurnal dengan 6 sampel tanaman yaitu durian, rami (*Boehmeria nivea* [L.] Gaud.), Lada hitam (*Piper nigrum* L.), Tanaman sirih (*Piper betle* L.), Meniran (*Phyllanthus niruri* L.), dan mahkota dewa *Phaleria macrocarpa* (Scheff) Boerl.

Durian adalah salah satu genus tumbuhan yang banyak ditemukan di daerah Asia Tenggara khususnya Indonesia. Durio dapat digunakan sebagai obat tradisional. Menurut (Nurliani & Santoso, 2010) juga telah melaporkan bahwa ekstrak kulit batang tumbuhan *D. zibethinus* dapat digunakan sebagai antifertilitas. Penelitian sebelumnya terhadap ekstrak kulit batang tumbuhan *D. oxleyanus* telah dihasilkan senyawa-senyawa lignan, boehmenan X, eritro-carolignan X, treo- carolignan X, eritro-carolignan Y dan treo- carolignan Y (Rudiyansyah, Lambert, & Garson, 2010). Sehingga batang pada buah durian dapat digunakan peneliti untuk mengskrining agar mendapatkan senyawa lignan yang terkandung dalam batang buah durian tersebut. Dengan metode penelitian sebagai berikut.

Tanaman rami dalam bahasa latin dikenal dengan nama (*Boehmeria nivea* [L.] Gaud.) yang merupakan tanaman penghasil serat. CNI tahun 2002 melaporkan bahwa minyak mentah biji rami berkhasiat dalam mencegah dan mengobati kanker, stroke, serangan jantung, dan luka lambung karena biji rami mengandung minyak yang kaya protein sulfur yang dapat mengaktifkan asam lemak. Komposisi unsur kimianya terdiri dari selulosa, hemiselulosa, dan lignan. Sehingga biji rami dapat digunakan peneliti untuk mengskringing agar mendapatkan senyawa lignan yang terkandung dalam biji rami.

Tanaman Lada hitam atau *Piper nigrum* L. merupakan salah satu tanaman yang menjadi sampel dalam penelitian ini. Tanaman ini dikenal dalam masyarakat sebagai bumbu dapur, penyedap rasa dan aroma makanan. Namun tidak hanya sebagai penyedap rasa pada makanan, lada hitam juga dapat berperan sebagai obat untuk mengatasi perut kembung, hipertensi, sesak nafas dan peluruh keringat (Novitasari, Amir, & Sumpono, 2014).

Selain lada hitam, Tanaman sirih atau *Piper betle* L. juga merupakan sampel dalam penelitian. Tanaman ini merupakan salah satu jenis tumbuhan yang dimanfaatkan untuk pengobatan. Bagian dari tanaman sirih yang paling sering digunakan sebagai pengobatan adalah bagian daun. Daun sirih dimanfaatkan untuk mengobati sariawan, hidung berdarah, batuk, sakit mata, dan bisul. Selain itu, daun sirih telah terbukti memiliki aktivitas antibakteri sehingga dapat dimanfaatkan sebagai antiseptic (Sukra, Indriyanto, & Asmarahman, 2021).

Informasi senyawa metabolit sekunder lignan dalam sampel-sampel tanaman ini masih terbatas. Maka dilakukan penelitian untuk mengetahui lebih lanjut mengenai kandungan lignan. Senyawa metabolit sekunder lignan diisolasi dari sampel sehingga diperoleh senyawa baru yang memiliki efek farmakologi tertentu.

Meniran (*Phyllanthus niruri* L.) adalah salah satu tanaman obat yang sering digunakan secara turun temurun untuk menyembuhkan penyakit. Tanaman ini berasal dari asia tropik dan tersebar luas di seluruh asia termasuk indonesia, pada saat ini sudah tersebar ke benua Australia, Amerika, dan Afrika. Secara empiris herba meniran bisa menyembuhkan berbagai penyakit seperti sariawan, gangguan ginjal, malaria, tekanan darah tinggi serta mempunyai sifat antipiretik dan antidiare. Meniran mengandung berbagai unsur kimia seperti alkaloid, lignan (hipofilantin, filantin, lintretalin , nirurin), flavonoid, tanin, kumarin, fenol (Fatmawat, 2019).

Tanaman mahkota dewa *Phaleria macrocarpa* (Scheff) Boerl., fam. Thymelaeaceae yang menjadi sampel pada penelitian ini merupakan tanaman yang telah digunakan sebagai obat alternatif kanker (sitostatika) dengan mekanisme kerja menghambat biosintesis protein sel kanker. Beberapa penelitian terhadap sejumlah tanaman dari famili Thymelaeaceae dengan berhasil memperoleh senyawa dengan aktivitas antikanker. Hampir semua bagian tanaman mahkota dewa meliputi buah, biji, batang dan daun dapat digunakan sebagai obat. Kadnungan daun mahkota dewa memiliki efek antibakteri, senyawa yang terkandung dalam daun ini terdiri dari saponin, alkaloid, flavonoid, tannin, lignan, resin, dan benzopenones.

Metode Penelitian

Dalam menyusun review jurnal ini metode yang digunakan adalah metode studi pustaka dengan mencari sumber atau literature dalam bentuk data primer berupa jurnal nasional maupun jurnal internasional dalam kurun waktu 10 tahun terakhir (2011-2021). Selain itu, dalam pembuatan review juga dilakukan pencarian data dengan menggunakan media online seperti Google dan situs jurnal.

Steroid dan Lignan Dari Kayu Batang *Durio Oxleyanus* (Malvaceae). Metode yang pertama diawali dengan mengukur spektrum HRESIMS menggunakan spektrometer Finnigan MAT 900 XL. Sampel untuk MS disiapkan pada konsentrasi 10 $\mu\text{M}/\text{mL}$ kemudian putaran optik direkam pada spektropolarimeter Jasco-P2000. Spektrum ^1H dan ^{13}C NMR dianalisis menggunakan Bruker Avance 400 dan Bruker Avance 500. Mengukur analisis data ^1H dan ^{13}C NMR menggunakan sinyal residu pelarut pada metanol- d_4 (= 3,30 ppm) dan CDCl_3 (= 7,24 ppm). Dilakukannya Kromatografi Cair Vakum (KCV) menggunakan silika gel 60 H dan Kromatografi Kolom menggunakan silika gel Merck (230-400 Mesh). Kromatografi preparatif menggunakan plat KLT preparatif silika gel 60 F254 dengan ukuran (20x20 cm, 2 mm) yang kemudian diamati. Bercak pada KLT diamati dibawah sinar UV pada λ 254 dan λ 366 nm serta penampak bercak serumulfat 15%.

Hasil dan Pembahasan

A. Steroid dan Lignan dari Kayu Batang *Durio oxleyanus* (Malvaceae)

Pada penelitian yang dilakukan oleh Rudiansyah, 2013. Dilakukan penelitian terkait empat senyawa yang diperoleh dari kayu batang tumbuhan *D. oxylum* Griff. Senyawa 1 dimurnikan sebagai padatan putih dengan berat molekul m/z 284,1674 dengan rumus molekul $\text{C}_{19}\text{H}_{24}\text{O}_2$ serta memiliki derajat ketidakjenuhan sebesar 8. Pada pengamatan spectrum C-NMR menunjukkan 19 sinyal karbon yang diantaranya terdiri dari 2 karbonil, 3 karbon kuartener, 6 karbon metin, 6 karbon metilen dan 2 karbon metil. Berdasarkan hasil C-NMR dan derajat ketidakjenuhan dapat diperoleh senyawa I memiliki kerangka struktur steroid. Untuk memperkuat adanya kerangka senyawa steroid dilakukan spectrum H-NMR dan didapatkan hasil munculnya 2 gugus metil. Tiga sinyal proton sebagai karakteristik ikatan rangkap dua dan sinyal proton menunjukkan adanya system tidak tekongjugasi terletak pada satu cincin. Berdasarkan data yang diperoleh dapat memperkuat struktur senyawa kimia steroid I terdiri dari 2 karbonil, 2 ikatan rangkap dua dan 4 cincin.

Senyawa 2 telah diisolasi dari ekstrak kulit batang tumbuhan *D. zibethinus*, *D. carinatus* dan *D. oxleyanus*, diperoleh dalam bentuk padatan kuning dengan berat molekul m/z 712,2422 dengan rumus molekul $\text{C}_{40}\text{H}_{40}\text{O}_{12}$ sehingga memiliki derajat ketidakjenuhan sebesar 21. Data H-NMR tersebut sebanding dengan derajat ketidakjenuhan sebesar 10, karena terdiri dari 2 cincin aromatik dan 2 sistem alkena yang berorientasi secara trans. Dua sinyal proton metin aromatik yang berorientasi

meta. Hal ini memperlihatkan bahwa cincin aromatik tersebut tersubstitusi. Terdapat pula tiga sinyal proton metilen, dua sinyal proton, dan dua sinyal proton geminal.

B. Tiga sinyal proton untuk cincin aromatik tersubstitusi.

Data-data tersebut menunjukkan system aril benzofuran yang merupakan kerangka dasar struktur senyawa lignan yang besar derajat ketidakhajuhannya adalah 9. Terdapat empat sinyal proton metoksi. Berdasarkan data C-NMR menunjukkan 40 karbon termasuk dua gugus karbonil dengan derajat kejenuhan sebesar 2 dengan empat gugus metoksi. Sehingga dapat diperoleh dari data H-NMR dan C- NMR senyawa 2 merupakan golongan lignan dengan nama boehmenan.

C. Senyawa 3 telah dimurnikan sebagai padatan kuning dengan rumus molekul C₃₉H₃₈O₁₁.

Berdasarkan sinyal-sinyal H-NMR senyawa 3 memiliki banyak kemiripan dengan senyawa 2, dan terdapat tiga gugus metoksi. Pada spectrum C-NMR senyawa 3 menunjukkan dua sinyal karbonil. Sehingga dapat diperoleh struktur senyawa 3 merupakan golongan lignan dengan nama boehmenan X.

Senyawa 4 diisolasi sebagai padatan putih dengan berat molekul m/z 222,1 dengan rumus molekul C₁₁H₁₀O₅ dan derajat ketidakhajuhan sebesar 7. Spectrum H-NMR menunjukkan dua sinyal doublet dengan nilai kopling konstan (J = 9,5 Hz) untuk satu proton yang merupakan sinyal proton cis- alkena dengan derajat ketidakhajuhan sebesar 1. Terdapat satu sinyal singlet untuk proton aromatik yang mengindikasikan cincin aromatik tersubstitusi 1,2,3,4 dan 5 dengan derajat ketidakhajuhan sebesar 4. Terdapat dua sinyal proton singlet untuk gugus metoksi. Dapat disimpulkan senyawa 4 memiliki kerangka dasar struktur kumarin. Struktur kimia senyawa 4 dibandingkan dengan data H-NMR dari literature (Rumzhum, Rahman, & Kazal, 2012) sehingga dapat diketahui bahwa senyawa 4 adalah fraksidin.

D. Isolasi Dan Pemurnian Secoisolariciresinoldiglucoside Oligomer (LIGNAN) Dari Biji Rame Dan Evaluasi Aktivitas

Berdasarkan penelitian yang dilakukan mengenai Isolasi dan Pemurnian Secoisolariciresinoldiglucoside oligomer (Lignan) dari Biji Rami dan evaluasi terhadap aktivitas antioksidan. Preparasi Sampel adalah proses dari Biji rami yang telah dilakukan penggilingan dan akan diperoleh bubuk homogenisasi. Lalu Ekstraksi

Cara pertama yang membutuhkan waktu sekitar 48 jam sementara cara kedua memerlukan waktu lebih singkat sekitar 7 jam dan ditemukan bahwa ekstraksi langsung oleh NaOH menghasilkan hasil yang lebih tinggi daripada dengan hidrolisis ekstraksi alkohol karena ekstraksi oligomer yang tidak efisien dari matriks biji rami dengan alkohol. Pemisahan oleh partisi lignan larut dalam air sementara senyawa lain larut dalam etil asetat saat menggunakan (etil asetat: air). Pencucian berulang meningkatkan kemurnian lignan, karena pada pertama kali kedua solusi tercapai jenuh dengan zat. Fraksinasi Ketika pemurnian lignan dilakukan oleh kromatografi kolom, pemeriksaan kimia dilakukan dengan menggunakan reagen kimia. Ini ditentukan untuk kelompok gula yang terikat oleh SDG. Diperoleh lignan murni

yang diidentifikasi dengan (HPLC) menggunakan fase terbalik ODS kolom dan sistem dielusi. Pada saat Penentuan kandungan fenolik total Jumlah total fenol ditentukan dengan reagen Folin- Ciocalteu. Kandungan SDG bervariasi antara 6-29 g/kg dalam bubuk biji rami yang dicairkan. Sehingga disimpulkan tanaman lignan adalah kelas biologis penting senyawa fenolik. Mereka termasuk dalam sekelompok fenol yang ditandai dengan konektor dua unit fenilpropanoid.

E. Isolasi Senyawa Aktif Lignan dari Buah Lada Hitam (*Piper nigrum* L.) dan Daun Sirih (*Piper betle* L.)

Bedasarkan penelitian yang dilakukan oleh (Elfahmi, 2020) mengenai isolasi senyawa lignan dari sampel buah lada hitam dan daun sirih menggunakan metode penapisan fitokimia untuk menunjukkan metabolit sekunder pada sampel. Diberikan hasil pada daun sirih mengandung senyawa alkaloid, flavonoid, kuinon dan steroid-triterpenoid. Sedangkan pada buah lada hitam mengandung senyawa alkaloid dan flavonoid. Selanjutnya ekstraksi dan pemantauan ekstrak dengan penampak bercak 10% dalam methanol bertujuan untuk mengetahui berapa senyawa terdapat dalam ekstrak. Bercak yang merupakan senyawa lignan memberikan warna gelap pada λ 254 nm dan warna ungu pada 366 nm setelah diberi asam sulfat dan vanillin sulfat. Ekstrak diklorometana dilanjutkan dengan Kromatografi Cair Vakum (KCV) pada proses fraksinasi. Berdasarkan hasil pemantauan fraksinasi kedua didapat bercak ungu pada fraksi ke-11 sampai ke-13 pada daun sirih dan pada fraksi ke-8, 10, 13 pada buah lada. Subfraksi dimurnikan dengan KLT preparatif hingga diperoleh beberapa isolat untuk dikarakterisasi. Karakterisasi isolate menggunakan metode kromatografi gas-spektroskopi massa (KG-SM) varian 3900 Saturn 2000 dengan kolom kapiler VF- 5ms 30m x 0,25mm ID. KGSM dipilih karna senyawa lignan memiliki spectrum massa yang khas yaitu fragmen (m/z) 135, 151, 165, 181. Dari hasil karakterisasi yang didapat subfraksi no.10 buah lada hitam mengandung dua senyawa lignan yaitu hinokinin yang memiliki spectrum massa khas dengan fragmen (m/z) 135 dan 354, serta senyawa lignan dengan fragmen khas 135 dan 286. Hinokinin adalah lignan yang diisolasi dari beberapa spesies tanaman yang baru-baru ini diselidiki untuk menentukan aktivitas biologisnya.

F. Pengujian Mutu Dan Penetapan Katar Filantin Pada Ekstrak Etanol Herba Meniran (*Phyllanthus Niruri* Linn)

Bedasarkan penelitian yang dilakukan oleh Alegantinaa dan kawan-kawannya mengenai isolasi senyawa lignan dari ekstrak herba meniran pada penapisan fitokimia menunjukkan adanya senyawa metabolit sekunder yaitu tanin, alkaloid, steroid dan flavonoid. Ekstrak herba meniran mengandung senyawa flavonoid sehingga dapat disimpulkan bahwa menira mengandung senyawa polifenol dimana senyawa lignan terkandung didalamnya, dari hasil penetapan kadar dapat diketahui keberadaan filantin yang merupakan senyawa golongan lignan. Pada proses pemisahan atau fraksinasi menggunakan Kromatografi kolom didapatkan hasil 196 fraksi. Fraksi 9-17 diperoleh isolat A dipantau dengan KLT dengan spektrometer UV-Vis dan panjang gelombang 376 nm, diperoleh bercak berwarna coklat dengan

nilai Rf 0,06. Pada fraksi 18-17 dimurnikan ulang menggunakan eluen n-heksan:toluena didapatkan isolat B dengan nilai Rf 0,52 pada isolat B tidak memberikan serapan ketika menganalisis menggunakan spektrometer Uv karena isolat B tidak mempunyai gugus kromofor. Gabungan fraksi 139-137 dimurnikan menggunakan Kromatografi kolom dengan fase diam Sephadex L-20 dan diperoleh Isolat C yang dipantau dengan Spektrometer Uv dan panjang gelombang 203 nm, 228 m, dan 278,60 nm.

G. Isolasi dan Elusidasi Struktur Senyawa Lignan Dan Asam Lemak Dari Ekstrak Daging Buah Phalaria Macrocarpa.

Berdasarkan penelitian yang dilakukan oleh Vivi Lisdawati dan kawan-kawan mengenai isolasi senyawa lignan dari ekstrak daging buah mahkota dewa (*Phalaria macrocarpa*) pada penafisan fitokimia didapatkan hasil yang menunjukkan adanya senyawa metabolit sekunder seperti alkaloid, flavonoid, fenol/polifenol, tanin, serta senyawa sterol/terpenoid. Selanjutnya pada proses fraksinasi menghasilkan 78 fraksi hasil, yang kemudian digabungkan berdasarkan kesamaan bentuk kromatogramnya menjadi 19 fraksi. Pada proses fraksi G Hasil spektrometri 1H-RMI menunjukkan senyawa merupakan senyawa alifatik serupa asam lemak. Berbagai penelitian membuktikan bahwa senyawa asam lemak termasuk golongan senyawa yang memiliki aktivitas stitostatika. Pada isolat fraksi K, fraksinasi kembali menggunakan kolom kromatografi silika gelas dilakukan berdasarkan sifat semi polar fraksi yang berasal dari hasil elusi pelarut semi polar n-heksan: etil asetat. Keseluruhan data 1H-RMI menunjukkan senyawa isolat memiliki struktur golongan lignan, yaitu senyawa C6-C3 dimer (polifenol), yang merupakan senyawa khas famili Thymeleaceae dan memiliki aktivitas antikanker.

Kesimpulan

Dari hasil review artikel yang telah kami lakukan dapat dilihat bahwa senyawa metabolit lignan dapat ditemukan pada beberapa jenis tumbuhan dan dengan jenis lignan yang berbeda.

Pada jurnal Steroid Dan Lignan Dari Kayu Batang *Durio Oxleyanus* (Malvaceae) menghasilkan data H-NMR, C-NMR MS dan dibandingkan dengan literature. Empat enyawa yang dihasilkan dari *D. oxleyanus* berupa satu senyawa steroid, dua senyawa lignan dan satu senyawa turunan kumarin.

Pada jurnal Isolasi dan Pemurnian *Secoisolariciresinoldiglucoside* oligomer (Lignan) dari Biji Rami dan evaluasi terhadap aktivitas antioksidan Ekstraksi dengan menggunakan alat socxhlet. Pemisahan partisi menggunakan corong pisah. Pemurnian dengan kromatografi kolom sphadex lh 20.

Pada jurnal Isolasi Senyawa Aktif Lignan dari Buah Lada Hitam (*Piper nigrum* L.) dan Daun Sirih (*Piper betle* L.) didapatkan hasil akhir dari karterisasi isoate merupakan senyawa hinokinin dengan fragmen khas 135 dan 354, serta senyawa lignan dengan fragmen 135 dan 286. Sedangkan sampel daun sirih belum dapat dikonfirmasi dengan KGSM.

Pada jurnal Pengujian Mutu Dan Penetapan Katar Filantin Pada Ekstrak Etanol Herba Meniran (*Phyllanthus Niruri* Linn) menghasilkan filantin yang merupakan senyawa golongan lignan.

Pada jurnal Isolasi dan Elusidasi Struktur Senyawa Lignan Dan Asam Lemak Dari Ekstrak Daging Buah *Phalaria Macrocarpa*. Menghasilkan data ¹H-RMI yang menunjukkan senyawa isolat memiliki struktur golongan lignan, yaitu senyawa C6- C3 dimer (polifenol), yang merupakan senyawa khas famili Thymeleaceae dan memiliki aktivitas antikanker.

BIBLIOGRAFI

- Elfahmi, Roni. (2020). Upaya Peningkatan Kompetensi Guru Dalam Menerapkan Pembelajaran Daring Masa Pandemi Covid 19 di SMA Negeri 3 Seunagan. *Bionatural: Jurnal Ilmiah Pendidikan Biologi*, 7(2). [Google Scholar](#)
- Fatmawat, Sri. (2019). *Bioaktivitas dan Konstituen Kimia Tanaman Obat Indonesia*. Deepublish. [Google Scholar](#)
- Novitasari, Vetty, Amir, Hermansyah, & Sumpono, Sumpono. (2014). Uji Ekstrak Minyak atsiri Lada Putih (*Piper Nigrum* Linn) Sebagai Antibakteri *Bacillus Cereus*. Universitas Bengkulu. [Google Scholar](#)
- Nurliani, Anni, & Santoso, Heri Budi. (2010). Efek Spermatisida Ekstrak Kulit Kayu Durian (*Durio Zibethinus* Murr) Terhadap Motilitas Dan Kecepatan Gerak Spermatozoa Manusia Secara In Vitro. *Jurnal Sains Dan Terapan Kimia*, 4(1), 72–79. [Google Scholar](#)
- Putri, Rizka Meirisa. (2018). *Isolasi Senyawa Metabolit Sekunder dari Fraksi n-Heksan Rimpang Temu Giring (*Curcuma heyneana* Val. & V. Zijp)*. UIN Syarif Hidayatullah Jakarta-FIKES. [Google Scholar](#)
- Rudiyansyah, Rudiyansyah, Lambert, Lynette K., & Garson, Mary J. (2010). Conformational Studies Of Lignans From *Durio oxleyanus* Griff.(Bombacaceae). *Indonesian Journal of Chemistry*, 10(1), 116–121. [Google Scholar](#)
- Rumzhum, Nowshin Nowaz, Rahman, Md Mostafizur, & Kazal, Md Khalequzzaman. (2012). Antioxidant and cytotoxic potential of methanol extract of *Tabernaemontana divaricata* leaves. *International Current Pharmaceutical Journal*, 1(2), 27–31. [Google Scholar](#)
- Sukra, Paul, Indriyanto, Indriyanto, & Asmarahman, Ceng. (2021). Asosiasi Liana Dengan Tumbuhan Penopangnya Di Blok Koleksi Taman Hutan Raya Wan Abdul Rachman, Provinsi Lampung. *Jurnal Rimba Lestari*, 1(1), 1–11. [Google Scholar](#)
- Suteja, Aji. (2018). *Identifikasi Senyawa Metabolit Sekunder Pada Daun Durian (*Durio zibethinus* Murr)*. [Google Scholar](#)

Copyright holder :

Sekar Ayu Maharani, Adella Aisiyah, Diva rizqi salsabilla, Regita Nailuvar (2022)

First publication right :

[Jurnal Equivalent](#)

This article is licensed under:



ISOLASI SENYAWA ALKALOID BAHAN ALAM

Bismar Al Bara, Faizal Auladi Rivianto, Nurlaela, Sulastri

Universitas Singaperbangsa Karawang (UNSIKA) Jawa Barat, Indonesia

Email: bismar.br7@gmail.com, auladirivianto241199@gmail.com,

nurlaelanurlaela2002@gmail.com, lastrisulastri936@gmail.com

INFO ARTIKEL	ABSTRAK
Diterima 5 Juli 2021 Direvisi 15 Juli 2021 Disetujui 25 Juli 2021	Penelitian ini bertujuan untuk mengisolasi dan mengidentifikasi senyawa golongan alkaloid dari beberapa sampel tumbuhan yang dipakai. Metode studi literatur review ini berasal dari tinjauan pustaka dan studi lainnya dengan mengumpulkan berbagai literatur yang relevan. Senyawa alkaloid merupakan senyawa organik terbanyak ditemukan di alam. Hampir seluruh alkaloid berasal dari tumbuhan dan tersebar luas dalam berbagai jenis tumbuhan. Pemeriksaan pada tanaman yang mengandung alkaloid terdapat beberapa tahapan, yaitu pengeringan, ekstraksi, fraksinasi, dan isolasi. Isolasi senyawa alkaloid dapat dilakukan dengan menggunakan beberapa metode. Dalam proses ekstraksi digunakan metode maserasi 3x24 jam, selanjutnya proses fraksinasi menggunakan Kromatografi Cair Vakum (KCV) dengan fase diam silika gel dan fase gerak n-heksan: etil asetat dan fraksi tersebut diisolasi lagi menggunakan Kromatografi Kolom Gravitasi (KKG) dengan fase diam silika gel dan fase gerak nheksan: etil asetat. Fraksi tersebut dianalisis kemurniannya menggunakan Kromatografi Lapis Tipis (KLT) dengan fase diam silika gel254.
Kata Kunci: alkaloid; ekstraksi; fraksinasi; isolasi	ABSTRACT <i>This study aims to isolate and identify alkaloid group compounds from some plant samples used. Alkaloid compounds are the most common organic compounds found in nature. This method of review literature study comes from library reviews and other studies by collecting a variety of relevant literature. Almost all alkaloids are native to plants and are widespread in various types of plants. Examination of plants containing alkaloids there are several stages, namely drying, extraction, fractionation, and isolation. Isolation of alkaloid compounds can be done using several methods. In the extraction process used 3x24 hours maceration method, then the fractionation process using Vacuum Liquid Chromatography (KCV) with the silent phase of silica gel and n-hexan motion phase: ethyl acetate and fractions are isolated again using Gravitational Column Chromatography (KKG) with a silent phase of silica gel and nheksan motion phase: ethyl acetate. The fraction is analyzed for purity using Thin Layer Chromatography (KLT) with a still phase of silica gel254.</i>
Keywords: alkaloids; extraction; fractionation; isolation	

Pendahuluan

Tumbuhan merupakan organisme eukariota multiseluler yang termasuk dalam organisme Regnum Plantae (Bakhtiar, 2018).

Indonesia merupakan salah satu negara yang memiliki kekayaan keanekaragaman hayati. Beragam jenis tumbuhan dapat tumbuh di Indonesia. Berbagai jenis tumbuhan juga

dapat dimanfaatkan sebagai obat-obatan. Bahan-bahan alam hayati yang berasal dari tumbuh tumbuhan, hewan dan mikroorganisme telah digunakan oleh umat manusia untuk memenuhi berbagai keperluan hidup, seperti pangan, sandang, papan, energi, wangi-wangian, zat warna, insektisida, herbisida dan obat-obatan (Achmad & Hussein, 2004). Umumnya tumbuhan-tumbuhan digunakan oleh masyarakat sebagai bahan obat-obatan tradisional yang lazim disebut sebagai jamu-jamuan. Perkembangannya dapat dikatakan sangat lambat apabila dibandingkan dengan obat modern yang dihasilkan oleh industri farmasi yang berkembang sangat pesat sejalan dengan kemajuan di bidang kesehatan (Lenny & Barus, 2016). Untuk membuat sebuah obat, diperlukan penelitian terhadap kandungan suatu tumbuhan. Pada penelitian ini dilakukan pemeriksaan kandungan alkaloid dari beragam macam tumbuhan. Alkaloid merupakan senyawa metabolit sekunder yang mengandung satu atau lebih atom nitrogen. Keberadaan alkaloid di alam tidak pernah berdiri sendiri (Saragih, 2018).

Alkaloid memiliki manfaat seperti anti diabetes, anti diare, anti malaria dan anti mikroba. Namun, tidak seluruh alkaloid aman untuk digunakan. Beberapa golongan alkaloid bersifat racun seperti alkaloid dioscorin yang terdapat pada umbi gadung. Oleh karena itu, perlu dilakukan identifikasi senyawa alkaloid dalam tumbuhan guna mengetahui jenis

alkaloid dan manfaatnya. Pada penelitian ini proses identifikasi senyawa alkaloid menggunakan beragam metode. Metode yang digunakan berasal dari berbagai literatur yang relevan. Sumber tinjauan meliputi studi pencarian sistematis database jurnal. Adapun beragam bagian tumbuhan yang digunakan sebagai bahan penelitian, meliputi daun alpukat, kulit buah mangrove pidada, kulit batang mangga, biji sirsak, batang pelir kambing, kulit batang klika falook, daun tempuyung, daun bulian, daun kayu jawa dan rimpang lengkuas merah.

Tujuannya penelitian ini adalah untuk mengetahui kandungan senyawa alkaloid dari sampel bahan alam yang digunakan dan mengetahui tata cara isolasi senyawa bahan alam dari berbagai sumber jurnal yang dibuat dalam sebuah review jurnal.

Manfaat penelitian ini adalah kita dapat mengetahui kandungan alkaloid dari beberapa sampel bahan alam yang digunakan sehingga tahu manfaat dari bahan alam tersebut, dan bisa mengetahui tata cara isolasi senyawa bahan alam.

Metode Penelitian

Metode studi literatur review ini berasal dari tinjauan pustaka dan studi lainnya dengan mengumpulkan berbagai literatur yang relevan. Sumber tinjauan meliputi studi pencarian sistematis database jurnal (*google cendikia, researchgate*).

Hasil dan Pembahasan

Tabel 1
Hasil Isolasi dan Identifikasi Senyawa Golongan Alkaloid

No	Nama Tumbuhan	Ekstraksi	Uji Fitokimia	Penarikan Alkaloid	Fraksinasi	Uji Kemurnian	Hasil
1.	Daun Alpukat	Maserasi : pelarut metanol	<ul style="list-style-type: none"> • Lempengan mg dan larutan HCl • H₂SO₄ • NaOH • Pereaksi meyer • Pereaksi dragendorff • Pereaksi wagner • Pereaksi lieberman bauchard 	-	Ekstraksi Cair-cair (ECC), KLT dan KKG	KLT dan KLT 2 dimensi	Menunjukkan noda tunggal = isolat telah murni
2	Kulit Buah mangrove pidada	Maserasi : metanol	<ul style="list-style-type: none"> • Pereaksi liebermann Burchad (LB), • Pereaksi FeCl₃ 1% • Pereaksi mayer • Pereaksi wagner 	-	KLT, KCV dan KKF	KLT 3 dimensi	Menunjukkan noda tunggal = isolat telah murni
3	Kulit Batang Mangga	Maserasi : Metanol	<ul style="list-style-type: none"> • NaOH • H₂SO₄ • Mg-HCL • Pereaksi hager • Pereaksi Mayer • Pereaksi wagner • Pereaksi liebermann Burchad (LB) 	-	KLT dan KKG	KLT 1 dan 2 dimensi	Menunjukkan noda tunggal = isolat telah murni
4	Biji Sirsak	Maserasi : Metanol	H ₂ SO ₄ Pereaksi Mayer Pereaksi wagner Serbuk Mg-HCL NaOH	-	Ekstraksi cair-cair (ECC), KKG dan KLT	KLT dimensi 2	Menunjukkan noda tunggal = isolat telah murni
5	Batang Pelir Kambing	Maserasi : Metanol	Pereaksi dragendroff pereaksi meyer pereaksi wagner Serbuk Mg-HCl HCl 1 % Pereaksi FeCl ₃ Pereaksi liebermann Burchad (LB)	-	Ekstraksi cair-cair (ECC), KCV, KKT	KLT KLT dimensi dan 2	Menunjukkan noda tunggal = isolat telah murni
6	Kulit Batang Klika Faloak	Maserasi : Metanol	HCl Pereaksi wagner Pereaksi mayer Pereaksi liebermann Burchard (LB)	-	Ekstraksi Cair-Cair (ECC), KCV, KLT, KLT preparatif	KLT dimensi 2	Menunjukkan noda tunggal = isolat telah murni
7	Daun Tempuyung	Maserasi : Metanol	Pereaksi mayer Pereaksi dragendorf	Penambahan HCl dan penambahan NH ₄ OH	Ekstraksi Cair-Cair (ECC), KLT dan	KLT KLT dimensi	Menunjukkan noda tunggal = isolat telah

					KLT preparatif	dan 2	murni
8	Daun Bulian	Maserasi : Metanol	Pereaksi dragendorff FeCl ₃	-	Ekstraksi Cair-Cair (ECC), KCV dan KKG	KLT dimensi 3	Menunjukkan nodan tunggal = isolat telah murni
9	Daun Kayu Jawa	Maserasi : metanol	Pereaksi FeCl ₃ Pereaksi liebermann Burchard Pereaksi Mayer Pereaksi wagner	-	Ekstraksi Cair-Cair (ECC), KL T, KCV, KKT dan rekristalisasi	Titik lebur	Menunjukkan titik leleh yang sama dengan pustaka
10	Rimpang Lengkuas Merah	Maserasi : Etanol 96 %	Pereaksi meyer Pereaksi dragendorff Serbuk Mg H ₂ SO ₄ pekat	Penambahan HCl dan penambahan NH ₄ OH	Ekstraksi Cair-Cair (ECC), KL T dan KLT preparatif	KLT berbagai eluen	Menunjukkan nodan tunggal = isolat telah murni

1. Daun Alpukat

Pada penelitian ini menggunakan sampel daun alpukat (*Persea americana Mill*), sebelum melakukan ekstraksi daun alpukat sudah dikeringkan, dibentuk serbuk dan ditimbang sebanyak 400 gram. Serbuk daun alpukat diekstraksi menggunakan pelarut metanol sebanyak 4 liter, metode maserasi dilakukan selama 4 X 24 jam, setiap 24 jam dilakukan penyaringan dan dimaserasi kembali dengan memakai metanol yang baru. Kemudian filtrat yang diperoleh dievaporasi dengan menggunakan alat penguap vakum pada suhu 30-40°C hingga diperoleh ekstrak kental metanol sebanyak 53,41 gram. Kemudian ekstrak metanol pekat dilakukan fraksinasi dengan mensuspensi ekstrak metanol - air (Tengo et al., 2013) dan dipartisi dengan menggunakan pelarut n-heksan dan fraksi air. Lalu fraksi n-heksan dievaporasi menghasilkan ekstrak n-heksan, sedangkan fraksi air dipartisi dengan pelarut etil asetat diperoleh fraksi air dan etil asetat. Hasil fraksi dievaporasi menghasilkan ekstrak air dan etil asetat. Kemudian hasil fraksi yang telah diperoleh dilakukan uji fitokimia. Berdasarkan pengujian ekstrak kental metanol, ekstrak

etil asetat dan ekstrak n-heksan memberikan hasil positif uji alkaloid dan uji flavonoid. Pada uji alkaloid memberikan hasil positif karena setelah diberikan pereaksi mayer yang ditandai dengan terbentuknya endapan hijau, dimana endapan hijau tersebut diperkirakan merupakan kompleks kalium-alkaloid. Sedangkan pada uji flavonoid memberikan hasil positif yang ditandai dengan adanya perubahan warna.

Hasil dari Ekstrak kental metanol dipisahkan terlebih dahulu menggunakan kromatografi lapis tipis dan kromatografi kolom gravitasi. Penggunaan kromatografi Lapis Tipis (KLT) untuk mencari perbandingan eluen (fase gerak) yang akan digunakan pada metode pemisahan selanjutnya yaitu kromatografi kolom gravitasi. Setelah menemukan fase gerak yang cocok ekstrak kental metanol sebanyak 4gram dipisahkan dengan menggunakan kromatografi kolom gravitasi dengan fase diam berupa silika gel GF60 dan dielusi berturut-turut menggunakan fase gerak n-heksan: etil asetat dan etil asetat: metanol dengan perbandingan tertentu. Pemisahan kromatografi kolom gravitasi menghasilkan 220 fraksi, lalu fraksi yang

diperoleh dari kromatografi kolom gravitasi selanjutnya dilakukan proses kromatografi lapis tipis kembali untuk menggabungkan fraksi-fraksi yang mempunyai nilai Rf yang sama. Setelah dilakukan kromatografi lapis tipis menghasilkan fraksi yang terdiri dari N1 – N17. Dari hasil penggabungan fraksi, fraksi N12 dipilih karena beberapa hal yaitu berat fraksi, pola noda hasil kromatografi lapis tipis dan fraksi ini menghasilkan kristal jarum berwarna hijau. Pada Kromatografi kolom kedua ini fraksi N12 dielusi secara bergradien 10 % dengan eluen n-heksan: etil asetat dan etil asetat: metanol menghasilkan berat sebesar 0,07gram dan 83 fraksi. Dari 83 fraksi ini dilakukan kromatografi lapis tipis dan dihitung nilai Rfnya dari setiap fraksinya. Berdasarkan hasil kromatografi kolom kedua ini, fraksi N7 menghasilkan kristal jarum. Hasil Kromatografi lapis tipis terhadap fraksi ini menunjukkan pola noda tunggal pada eluen n-heksan: etil asetat. Fraksi 7 yang berbentuk kristal jarum berwarna hijau dipisahkan kembali untuk memperoleh isolat murni dengan menggunakan kromatografi lapis tipis berbagai eluen yang berfungsi sebagai fasa gerak. Eluen yang digunakan yaitu n-heksan: etil asetat (Aksara et al., 2013), etil asetat: metanol (Wijaya, 2009) dan kloroform: metanol (Mutiarra et al., 2016). Hasil KLT berbagai eluen dari fraksi 7, menunjukkan pola noda tunggal sehingga dapat disimpulkan bahwa fraksi N7 telah murni dan didukung oleh data KLT dua dimensi yang tetap menunjukkan pola noda tunggal, setelah dilakukan uji fitokimia fraksi N7 positif alkaloid karena membentuk endapan.

2. Kulit Buah Mangrove Pidada

Pada penelitian ini menggunakan sampel kulit buah mangrove pidada. Kulit buah mangrove pidada yang sudah kering, dipotong kecil-kecil dan dihaluskan

menggunakan blender akan menjadi serbuk halus. Kemudian serbuk halus kulit buah mangrove pidada sebanyak 1,217 kg dimaserasi menggunakan pelarut metanol selama 3 x 24 jam pada suhu kamar. Tujuannya untuk mengekstrak kandungan senyawa kimia yang terdapat dalam kulit buah mangrove pidada. Ekstrak metanol (maserat) yang didapatkan berwarna hijau pekat sebanyak 6 L. Ekstrak yang diperoleh kemudian disaring menggunakan corong buchner dan pelarut diuapkan menggunakan *rotary evaporator* dengan suhu 300C. Hasil penguapan diperoleh setelah itu dikeringkan pada suhu kamar sehingga diperoleh ekstrak kering yang berbentuk seperti pasta. Untuk uji pendahuluan menggunakan beberapa pereaksi, ekstrak kental yang telah didapatkan diuji dengan pereaksi Lieberman-Burchard (LB) dan terbentuk warna hijau hasil tersebut menunjukkan hasil yang positif adanya senyawa golongan steroid. Dari hasil uji pendahuluan menggunakan pelarut FeCl₃ 1% menunjukkan hasil positif adanya golongan senyawa flavonoid yang memberikan perubahan warna menjadi hijau pekat, uji pendahuluan menggunakan pereaksi Mayer menunjukkan hasil positif terdapat adanya golongan alkaloid dengan terbentuknya endapan putih, uji pendahuluan menggunakan pelarut Wagner menunjukkan hasil positif adanya golongan alkaloid yang ditandai dengan terbentuknya endapan cokelat. Kemudian dilakukan fraksinasi menggunakan metode kromatografi kolom yang terdiri dari kromatografi kolom cair vakum (KKCV) dan kromatografi kolom flash (KKF). Kemudian dilakukan analisis kromatografi lapis tipis terlebih dahulu sebelum dilakukan KKCV, tujuannya untuk mengetahui jenis eluen yang cocok untuk digunakan pada saat KKCV, hasil KLT didapatkan bahwa eluen nheksan:etil

asetat (Muhammad, 2019) menunjukkan kromatogram yang baik. Untuk proses fraksinasi menggunakan fase diam silika gel G60 dan fase geraknya berupa eluen yang ditingkatkan kepolarannya secara bergradien dimulai dari n-heksan 100%, n-heksan: etil asetat. Tujuannya agar semua senyawa nonpolar atau polar dapat terfraksinasi dengan baik. Fraksi tersebut ditampung hingga diperoleh 24 fraksi. Fraksi-fraksi yang diperoleh dari hasil KKCVC kemudian dianalisis menggunakan metode KLT dengan eluen n-heksan: etil asetat, fraksi dengan kromatogram digabungkan sehingga diperoleh fraksi gabungan sebanyak 12 fraksi. Fraksi gabungan H1, H2, dan H3 membentuk isolat yang berbentuk serbuk berwarna putih kekuningan, setelah itu ketiga fraksi H direkristalisasi menggunakan pelarut yang dapat melarutkan zat pengotor dari isolat yang diperoleh. Isolat yang diperoleh direkristalisasi menggunakan pelarut n-heksan, isolat yang diperoleh kemudian di KLT dengan eluen n-heksan: etil asetat. Dari hasil KLT maka fraksi H1, H2 dan H3 digabungkan karena memiliki pola noda yang sama. Setelah dilakukan rekristalisasi diperoleh isolat murni yang berbentuk serbuk berwarna putih sebanyak 2,861 mg dan ditunjukkan dengan kromatogram berupa noda tunggal.

Isolat yang diperoleh kemudian diuji kemurniannya menggunakan metode tiga sistem eluen. Kemurnian isolat dapat ditandai dengan adanya noda tunggal pada setiap plat KLT. Tiga jenis eluen yang digunakan yaitu n-heksan: kloroform (Rahasasti, 2017), n-heksan:etil asetat (Muhammad, 2019), dan kloroform:etil asetat (Afrida, 2014), hasil yang didapatkan yaitu berupa noda tunggal.

3. Kulit Batang Mangga

Pada penelitian ini sampel berupa kulit batang mangga (*M. indica* L) yang berwarna kecoklatan, dibersihkan dan

dikeringkan dengan cara diangin-anginkan di udara terbuka yang terlindungi dari sinar matahari kemudian dihaluskan dengan menggunakan penghalus yaitu palung batu, dengan menggunakan sedikit metanol hingga terbentuk serbuk. Sampel serbuk kulit batang mangga (*M. indica* L) diambil sebanyak 700gram kemudian diekstraksi menggunakan cara maserasi dengan methanol selama 3×24 jam, setiap 24 jam pelarut diganti dengan yang baru. Diperoleh maserat sebanyak 3,1 liter yang berwarna merah kecoklatan. Maserat yang diperoleh diuapkan dengan menggunakan penguap putar vakum (*rotary vacuum evaporator*) pada suhu 40°C diperoleh ekstrak kental metanol berwarna merah kecoklatan sebanyak 26,89 gram. Kemudian dilakukan skrining fitokimia untuk mengetahui kandungan kimia utamanya. Hasil uji fitokimia positif terhadap flavonoid, alkaloid dan steroid serta negatif terhadap saponin dan terpenoid.

Ekstrak metanol yang telah di uji fitokimianya dianalisis dengan menggunakan kromatografi lapis tipis sampai diperoleh pola pemisahan untuk melihat pola noda (kandungan senyawa). Lalu ekstrak metanol sebanyak 3 gr dipisahkan dengan kromatografi kolom dengan fasa diam silika gel GF60 dan di elusi berturut-turut, lalu diperoleh 124 fraksi. Hasilnya dikromatografi kolom yang sebelumnya telah dimasukan silika gel yang dipanaskan dalam oven. Pelarut kloroform dan metanol secara bergradien dimasukkan. Pergantian pelarut dan perbandingan pelarut diganti berdasarkan perubahan warna terdapat pada botol vial. Fraksi pada botol vial tersebut dengan menghitung nilai Rf-nya. Fraksi yang mempunyai nilai Rf dan noda yang sama digabung, maka diperoleh 22 kelompok fraksi (R1-R22). Mengadakan KLT dengan menggunakan perbandingan eluen

kloroform: metanol (Muhammad, 2019) pada 22 fraksi (R1-R22) ini memiliki 1 noda yang sama, akan tetapi pada Fraksi R1, R2, R3, R4, R17, R18, R19, R20, R21, dan R22 tidak terdapat kristal, hanya terdapat pada fraksi R5-R16. Pada fraksi ini hanya fraksi R14 yang di uji kemurniannya karena memiliki banyak kristal.

Uji kemurnian dilakukan dengan kromatografi lapis tipis menggunakan beberapa macam eluen. Jika isolat tetap menunjukkan pola noda tunggal, maka dilakukan uji kemurnian dengan menggunakan KLT 1 dan 2 dimensi. Hasil uji kemurnian menunjukkan bahwa fraksi R14 hanya mengandung satu senyawa, yang ditunjukkan dengan timbulnya satu noda dengan berbagai campuran eluen yang digunakan (kloroform: metanol). Uji fitokimia menunjukkan bahwa fraksi R14 mengandung metabolisme sekunder yaitu merupakan golongan senyawa alkaloid.

4. Biji Tumbuhan Sirsak

Penelitian ini dilakukan isolasi dan karakterisasi senyawa alkaloid dari biji tumbuhan sirsak (*Annona muricata* Linn). Penelitian ini berfungsi untuk menguji kandungan alkaloid yang terdapat pada biji tumbuhan sirsak (*Annona muricata* Linn). (Pulukadang, 2015) telah melakukan pemeriksaan kandungan kimia biji sirsak dan hasilnya mengandung senyawa golongan alkaloid, iriterpenoid, dan acetogenin. Pada penelitian ini digunakan teknik ekstraksi secara maserasi untuk menguji kandungan alkaloid dari biji tumbuhan sirsak (*Annona muricata* Linn). Ekstraksi senyawa alkaloid dari Biji Tumbuhan Sirsak (*Annona muricata* linn) dilakukan menggunakan teknik ekstraksi secara maserasi menggunakan pelarut metanol. Langkah awal proses ekstraksi terlebih dahulu menghaluskan biji tumbuhan sirsak (*Annona muricata* Linn)

sehingga didapatkan 800gram serbuk halus. Kemudian sampel tersebut diekstraksi menggunakan metode maserasi dengan pelarut methanol. Proses maserasi dilakukan dalam kurun waktu 3x24 jam. Setiap 24 jam kemudian ekstrak disaring dan dimaserasi lagi dengan metanol yang baru. Setelah dilakukan proses maserasi, ekstrak yang didapatkan dikumpulkan sehingga didapatkan filtrat dan residue methanol. Filtrat methanol dievaporasi dengan suhu 30-40°C sehingga didapatkan ekstrak kental methanol. Selanjutnya, ekstrak kental methanol disuspensi dengan perbandingan methanol: air (Tengo et al., 2013) dan dipartisis berturut-turut menggunakan n-heksan, etil asetat sehingga didapatkan masing-masing partisi dari fraksi tersebut. Hasil partisi yang didapatkan dievaporasi pada suhu 30-40°C sampai diperoleh ekstrak dari n-heksan, etil asetat dan ekstrak air. Selanjutnya ekstrak methanol, ekstrak n-heksan, ekstrak etil asetat dan ekstrak air yang diperoleh dilakukan uji penapisan fitokimia. Untuk mengetahui kandungan alkaloid pada ekstrak, dilakukan pengujian alkaloid. Sebelumnya ekstrak methanol diambil sebanyak 0,1gram kemudian diekstraksi menggunakan kloroform amoniak sebanyak 10 mL dan dikocok selama 1 menit. Hasil yang didapatkan dibagi rata menjadi dua bagian kemudian dimasukkan kedalam dua tabung reaksi. Tabung reaksi pertama ditambahkan dengan asam sulfat pekat (H₂SO₄) 2N sebanyak 0,5 mL. Dengan perbandingan volume yang sama, lapisan asam dibagi menjadi 2 tabung reaksi dan masing-masing tabung dilakukan pengujian menggunakan pereaksi Mayer dan Wagner. Sedangkan pada tabung reaksi kedua dilakukan pengujian menggunakan pereaksi Hager.

Ekstrak metanol dipisahkan dengan kromatografi kolom dengan eluen yang

berbeda. Hasil kromatografi kolom, kemudian dilanjutkan dengan pemurnian menggunakan kromatografi lapis tipis. Analisa kemurnian terhadap isolat dilakukan dengan cara KLT dua dimensi dengan menggunakan silika gel GF254 dengan perbandingan fasa gerak kloroform:metanol (Untoro et al., 2016) dan nheksan:etil asetat (Afrida, 2014), dengan nilai Rf yang diperoleh dari masing-masing perbandingan adalah 0,652 dan 0,434.

Pemisahan dengan kromatografi kolom gravitasi secara bergradien menghasilkan 15 fraksi yang di gabung berdasarkan warna yang di dapat (B1, B2, B3, B4, B5, B6, B7, B8, B9, B10, B11, B12, B13, B14, B15) masing-masing 0,02; 0,01; 0,1; 0,04; 0,14; 0,1; 0,02; 0,09; 0,03; 0,02; 0,05; 0,28; 0,06; 0,68; dan 0,17 gram. Kelima belas fraksi hasil kromatografi kolom gravitasi dilakukan uji KLT. Pola pemisahan komponen-komponen fraksi hasil kromatografi kolom gravitasi ekstrak kental metanol dianalisis dengan kromatografi lapis tipis (KLT) dengan fasa gerak n-heksan: etil asetat (Aksara et al., 2013). Fraksi B12, B13, dan B15 hasil kromatografi kolom gravitasi dengan berat masing-masing sebanyak 0,28; 0,06; dan 0,17 gram di uji KLT dengan fase gerak kloroform:metanol (Tengo et al., 2013). Fraksi B13 hasil kromatografi kolom grafitasi sebanyak 0,06 gram, menghasilkan bercak noda tunggal. Isolat berupa senyawa yang berbentuk padatan kristal berwarna kuning yang diduga sebagai senyawa alkaloid. Uji Fitokimia menunjukkan bahwa fraksi B13 mengandung senyawa metabolit sekunder yaitu merupakan golongan senyawa alkaloid.

5. Kulit Batang Pelir Kambing

Pada Penelitian ini menggunakan sampel kulit batang pelir kambing (*T. macrocarpa* Jack). Sebelum melakukan

ekstraksi kulit batang pelir kambing sudah dikeringkan dan dibentuk serbuk. Serbuk batang kulit pelir kambing sebanyak 3,6 Kg diekstraksi dengan metode maserasi menggunakan pelarut metanol. Maserat yang diperoleh kemudian dikentalkan dengan bantuan alat penguap putar vakum (*rotary vacuum evaporator*) menghasilkan ekstrak kental metanol dengan berat 75,16gram berwarna hitam kecoklatan. Selanjutnya ekstrak kental metanol dipartisi menggunakan pelarut n-heksan, etil asetat dan metanol. Ekstrak kental metanol dipartisi dengan pelarut n-heksan lalu dikentalkan menggunakan rotary vacuum evaporator menghasilkan fraksi n-heksan berwarna kuning kehijauan sebanyak 7,92 gram (15,85%). Selanjutnya filtrat metanol dipartisi menggunakan etil asetat menghasilkan fraksi etil asetat sebanyak 15,82gram (31,64 %) menggunakan pelarut metanol dan n-heksan, lalu fraksi n-heksan dikentalkan di rotary vacuum evaporator menghasilkan fraksi n-heksan berwarna kuning kehijauan sebanyak 7,92gram (15,85 %) dan ekstrak metanol dipartisi menggunakan pelarut metanol menghasilkan fraksi metanol berwarna kecoklatan sebanyak 25,74 gram (51,48 %).

Selanjutnya ekstrak metanol, fraksi n-heksan, fraksi etil asetat dan fraksi metanol dilakukan uji fitokimia. Pada uji alkaloid menggunakan pereaksi dragendorff, meyer dan wagner sedangkan pada uji flavonoid menggunakan pereaksi mg-HCl, pada uji tanin menggunakan pereaksi HCl 1%, pada uji saponin menggunakan pereaksi FeCl₃, pada uji terpenoid menggunakan pereaksi liebermann buchard. Setelah direaksikan pada ekstrak metanol memberikan hasil positif pada uji alkaloid, flavonoid, terpenoid dan steroid. Sedangkan fraksi n-heksan dan fraksi etil asetat memberikan

hasil positif pada uji terpenoid dan steroid dan fraksi metanol memberikan hasil positif pada uji alkaloid, saponin dan terpenoid.

Fraksi metanol dipisahkan menggunakan kromatografi Cair Vakum (KVC) dengan menggunakan fase diam silika gel 60 dan fase gerak yang telah ditentukan dengan analisis kromatografi lapis tipis (KLT) menghasilkan 12 fraksi. pada fraksi FM1 (0,17 gram), FM2 (0,85 gram), FM3 (1,09 gram), FM4 (2,01 gram) dan FM5 (5,91 gram) memiliki kemiripan pola noda yang relatif sama. Selanjutnya fraksi FM4 dipisahkan kembali menggunakan KCV sehingga diperoleh 4 subfraksi (FM4.2), lalu gabungan FM4.2 diperoleh berat fraksi seberat 0,5726 gram. Fraksi FM4.2 dilakukan uji alkaloid menghasilkan positif alkaloid dengan ditandai adanya endapan. Setelah dilakukan uji alkalod fraksi FM4.2 dimurnikan dengan kromatografi kolom tekan (KKT) dengan menggunakan fase diam silika gel dan fase gerak kloroform: metanol menghasilkan 15 subfraksi, lalu subfraksi dianalisis menggunakan kromatografi lapis tipis (KLT). Pada subfraksi FM4.2.6 terlihat cukup murni sebanyak 26,3. Selanjutnya fraksi FM4.2.6 dilakukan uji alkaloid memberikan hasil positif alkaloid lalu fraksi FM4.2.6 dimurnikan menggunakan KLTP dengan fase gerak kloroform: metanol, setelah dielus noda FM4.2.6 dikeruk dan dilarutkan pada metanol dan disaring hingga diperoleh filtratnya. Filtrat yang diperoleh dianalisis kembali menggunakan KLT pada eluen kloroform: metanol (Muhammad, 2019), etil asetat: metanol (Aksara et al., 2013) dan aseton 100 % menghasilkan noda tunggal. Isolat yang diperoleh Kemudian dilakukan uji kemurnian menggunakan KLT 2 dimensi menunjukkan noda tunggal sehingga dapat

disimpulkan bahwa fraksi FM 4.2.6 telah murni.

6. Kulit Batang Klika Faloak

Kulit batang faloak diekstraksi dengan metode maserasi menggunakan pelarut metanol. Ekstrak metanol kulit batang faloak dipekatkan menggunakan rotary evaporator. Dilakukan uji golongan alkaloid dengan hasil positif mengandung alkaloid ditandai dengan terbentuknya endapan coklat setelah penambahan pereaksi Wagner, endapan putih setelah penambahan pereaksi Mayer, dan endapan merah orange setelah penambahan pereaksi Dragendorff. Dilakukan uji kelarutan dalam beberapa pelarut, yaitu air, metanol, etil asetat, kloroform, n-butanol, dan n-heksan yang didapatkan hasil ekstrak larut dalam air, metanol, dan etil asetat serta agak larut dalam kloroform, n-butanol, dan n-heksan. Ekstrak kemudian dipartisi dengan pelarut nheksan, etil asetat, dan n-butanol. Hasil dari partisi dilakukan visualisasi dengan metode KLT. Digunakan fase diam silika gel GF254 dan fase gerak n-heksan: etil asetat (Idrus et al., 2013). Diperoleh noda dengan nilai Rf 0,89;0,94;0,78, dan pada fraksi etil asetat diperoleh noda dengan nilai Rf 0,72. Dilakukan pemantauan dengan penampak bercak Dragendorff dan fraksi yang dipilih adalah fraksi n-heksan yang ditandai dengan terbentuknya noda orange atau jingga. Fraksi n-heksan difraksinasi dengan menggunakan metode kromatografi cair vakum (KCV). Digunakan fase diam silika gel 60 dan fase gerak sistem landaian yang kepolarannya ditingkatkan dengan variasi konsentrasi n-heksan, etil asetat, dan metanol, yaitu n-heksan: etil asetat dan etil asetat: metanol. Hasilnya diperoleh sebanyak 10 fraksi, setiap fraksinya ditampung, dipekatkan dan dipantau menggunakan KLT. Hasil visualisasi KLT diperoleh fraksi no. 4 terpilih untuk isolasi. Hal ini ditandai

dengan adanya bercak warna orange atau jingga pada fraksi setelah disemprot dengan pereaksi penampak bercak Dragendorff.

Tahapan isolasi menggunakan KLT preparatif dilakukan terhadap fraksi no. 4 menggunakan fase diam silika gel GF254 dan fase gerak n-heksan: etil asetat (Idrus et al., 2013) dengan nilai Rf 0,67. Hasil dari KLT preparatif diperoleh lima pita dan dari hasil penampak bercak pada lempeng KLT sebelumnya hanya pita empat yang positif menandakan adanya alkaloid. Pemisahan dilakukan dengan mengerok pita empat dan dilarutkan dalam metanol. Hasil pengerokan kemudian dipisahkan menggunakan magnetic stirrer dan disaring menggunakan kolom cair vakum. Kemudian isolat diuapkan dan dilakukan visualisasi profil KLT. Hasilnya diperoleh bercak tunggal (diberi nama isolat F4a). Dilakukan elusi isolat F4a pada lempeng RP-18 menggunakan eluen aseton: air (Idrus et al., 2013) untuk memastikan kemurnian dari isolat dan didapatkan hasil adanya beberapa bercak lain pada lempeng, namun senyawa target terlihat memiliki profil noda yang lebih dominan. Uji kemurnian dilakukan dengan metode KLT 2 dimensi menggunakan fase gerak n-heksan: etil asetat. Diperoleh noda tunggal yang merupakan senyawa murni golongan alkaloid.

7. Daun Tempuyung

Pada penelitian ini menggunakan sampel daun tempuyung (*Sonchus arvensis L.*), sebelum melakukan ekstraksi daun tempuyung sudah dikeringkan dan ditimbang sebanyak 650 gram. Ekstraksi daun tempuyung dengan pelarut etanol 96% menggunakan metode maserasi selama 24 jam. Kemudian hasil ekstraksi etanol dipisahkan dengan cara diuapkan pelarutnya menggunakan *rotary evaporator* untuk memperoleh ekstrak kental sebanyak 8 gram. Hasil ekstraksi

pekat ditambahkan dengan asam asetat 10% hingga suasana ekstrak etanol menjadi asam, pemberian asam asetat 10% bertujuan untuk membentuk garam alkaloid. Ekstrak larutan asam diekstraksi kembali dengan etil asetat sehingga terbentuk dua lapisan, yaitu lapisan etil asetat dan lapisan asam. Pada lapisan asam terletak pada bagian bawah dimana alkaloid akan berikatan pada lapisan asam. Untuk membebaskan alkaloid dari garamnya maka ditambahkan ammonium hidroksida (NH₄OH) pekat sampai suasana basa sehingga alkaloid akan terbentuk menjadi basa alkaloid kembali. Pada lapisan asam dilakukan ekstraksi kembali dengan etil asetat maka akan diperoleh lapisan basa dan lapisan etil asetat. Lapisan etil asetat inilah yang mengandung alkaloid, sedangkan lapisan basa mengandung air. Pemeriksaan senyawa alkaloid dapat menggunakan pereaksi Dragendorff, pada lapisan etil asetat ditambahkan pereaksi Dragendorff menghasilkan endapan merah bata yang menandakan pada lapisan etil asetat positif adanya alkaloid. Alkaloid murni diisolasi dengan menggunakan KLT preparatif dengan fase gerak menggunakan eluen etil asetat: etanol: n-heksan, dan fase diam menggunakan silika gel 60GF254, menghasilkan 6 noda. Masing-masing noda menghasilkan nilai dengan menggunakan sistem eluen yang berbeda maka diperoleh:

- a. Noda 1 menghasilkan Rf 0,2 merah kecoklatan
- b. Noda 2 menghasilkan Rf 0,34 merah kecoklatan
- c. Noda 3 menghasilkan Rf 0,46 biru kehijauan
- d. Noda 4 menghasilkan Rf 0,56 merah kecoklatan
- e. Noda 5 menghasilkan Rf 0,68 merah kekuningan

f. Noda 6 menghasilkan Rf 0,77 biru terang

Pada noda nomor 6 dilakukan ekstraksi maserasi dengan etil asetat untuk memisahkan isolat dengan silika gel. Hasil ekstraksi dilakukan uji kemurnian kembali menggunakan KLT dengan campuran eluen dan KLT dua dimensi dengan eluen berbeda pada lampu UV $\lambda 365$ nm menghasilkan noda tunggal berwarna biru yang merupakan hasil isolat murni.

8. Daun Bulian

Pada penelitian ini menggunakan sampel daun bulian (*Eusideroxylon zwageri* T.et B), sebelum melakukan ekstraksi daun belian sudah dikeringkan dan ditimbang sebanyak 2 kg. Ekstraksi daun bulian menggunakan metode maserasi selama 2 hari yang dilakukan sebanyak 3 kali dengan menggunakan pelarut metanol menghasilkan ekstrak metanol sebanyak 25 gram, kemudian hasil ekstraksi dipisahkan menggunakan rotary evaporator. Fraksinasi pertama dipartisi dengan pelarut n-heksan diperoleh ekstrak n-heksan sebanyak 5 gram. Pada fraksinasi kedua ekstrak n-heksan dipartisi kembali dengan etil asetat didapatkan ekstrak etil asetat sebanyak 4,3 gram. Isolasi senyawa dari ekstrak etil asetat sebanyak 4 gram menggunakan kromatografi vakum cair (KVC). Fase gerak yang digunakan dalam proses pemisahan metode kromatografi vakum cair pada ekstrak etil asetat, yaitu kombinasi dari pelarut n-heksan dan etil asetat dengan teknik peningkatan kepolaran fase geraknya (step gradien polarity), maka akan diperoleh 15 fraksi sebanyak 10 mL. Fraksi 1-5 diduga mengandung alkaloid digabung dengan berat total 6 mg, kemudian dipisahkan kembali ekstrak etil asetat dengan menggunakan metode pemisahan kromatografi kolom gravitasi (KKG). Fase gerak yang digunakan dalam proses

pemisahan kromatografi kolom gravitasi, yaitu pelarut n-heksan dengan teknik peningkatan kepolaran pada fase geraknya (*step gradien polarity*) dan fase diam yang digunakan yaitu silika gel, maka akan diperoleh 25 fraksi. Fraksi no. 57 dipilih karena diduga mengandung alkaloid kemudian digabung hingga membentuk kristal berwarna putih bening seberat 1,6 mg.

Masing-masing fraksi No. 5-7 dilakukan perhitungan nilai Rf dengan menggunakan sistem eluen yang berbeda maka diperoleh:

- a) n-heksan etil asetat didapatkan Rf = 0,175
- b) n-heksan dan etil asetat didapatkan Rf = 0,450
- c) n-heksan dan etil asetat didapatkan Rf = 0,750

Pada n-heksan dan etil asetat didapatkan Rf 0,750 menghasilkan noda tunggal berwarna biru yang merupakan hasil isolat murni.

9. Daun Kayu Jawa

Pada penelitian ini menggunakan sampel kayu jawa. Daun kayu jawa dibersihkan dan dicuci setelah dicuci, lalu dikeringkan. Daun yang sudah kering kemudian dihaluskan menggunakan blender dan ditimbang sebanyak 4,7 kg serbuk halus. Serbuk daun kayu jawa yang sudah halus dimaserasi dengan metanol sebanyak 28 L dilakukan 3 x 24 jam. Ekstrak metanol yang diperoleh dipisahkan menggunakan evaporator dan diperoleh ekstrak kental metanol. Ekstrak kental metanol dipartisi dengan pelarut n-heksan. Ekstrak n-heksan yang diperoleh dilakukan uji golongan dengan beberapa pereaksi dan dianalisis dengan KLT untuk mengidentifikasi golongan senyawa metabolit sekunder yang terdapat dalam ekstrak n-heksan. Dari hasil uji golongan ekstrak n-heksan dengan penambahan pereaksi $FeCl_3$ reaksi positif flavonoid

dengan ditandai warna kuning kehijauan, penambahan pereaksi Lieberman-burchard reaksi positif steroid dengan ditandai warna hijau, penambahan pereaksi Mayer negatif alkaloid dengan ditandai terbentuknya endapan coklat, dan penambahan wagner reaksi positif alkaloid dengan ditandai warna hijau kekuningan. Kemudian ekstrak nheksan. Sebanyak 8.0247 gr di analisis menggunakan KLT untuk menentukan eluen yang akan digunakan pada proses fraksinasi. Hasil KLT n-heksan: etil asetat memberikan pola pemisahan yang baik dan jelas. Fraksinasi awal dilakukan dengan metode kromatografi kolom cair vakum (KKCV) menggunakan fase diam silika gel G60 dan fase gerak menggunakan pelarut n-heksan, etil asetat, aseton dan metanol yang ditingkatkan kepolarannya secara bergradien. Hasil KKCV diperoleh sebanyak 41 fraksi, fraksi 1-41 yang diperoleh di KLT dengan eluen n-heksan: etil asetat (Aksara et al., 2013). Fraksi – fraksi yang menunjukkan pola kromatogram yang sama digabungkan, sehingga diperoleh 7 fraksi gabungan. Fraksi gabungan D dilanjutkan untuk mendapatkan senyawa murni. Fraksi D sebelum di fraksinasi menggunakan Kromatografi Kolom Tekan (KKT) di KLT terlebih dahulu untuk menentukan eluen yang akan digunakan pada KKT.

Hasil KLT diperoleh eluen n-heksan: etil asetat memberikan pola pemisahan noda yang baik, kemudian fraksi D di fraksinasi menggunakan fase diam silika gel G60 (230 – 400 mesh), dan fase gerak menggunakan eluen n-heksan, etil asetat, metanol, dan aseton yang ditingkatkan kepolarannya. Kemudian, eluet ditampung dalam vial-vial diperoleh sebanyak 12 fraksi. Fraksi-fraksi hasil dari KKT dan KLT diuapkan pada suhu ruang untuk mengetahui komponen senyawa kimia yang terdapat

pada fraksi, fraksi D7 membentuk kristal jarum berwarna hijau. Fraksi yang membentuk kristal direkristalisasi untuk memisahkan isolat dari pengotornya. Fraksi D7 direkristalisasi dengan n-heksan dan aseton yang menghasilkan isolat berupa kristal berbentuk jarum berwarna putih dengan berat 0,0142gram hanya isolat tersebut yang berbentuk kristal setelah proses KKT dari 12 fraksi isolat D. Isolat D7 diduga senyawa metabolit sekunder golongan alkaloid. Kemudian di uji kemurniannya menggunakan KLT sistem tiga eluen dengan perbandingan yang berbeda. Hal ini dilakukan untuk memastikan kemurnian dari suatu isolat yang ditunjukkan dengan munculnya satu noda pada tiap KLT dan uji titik leleh. Hasil dari analisis KLT menunjukkan satu noda pada tiga macam eluen yaitu eluen n-heksan: kloroform (Afrida, 2014), n-heksan: etil asetat, dan etil asetat: kloroform (Rahasasti, 2017). Deteksi dengan lampu UV 254 dan UV 366 menunjukkan adanya noda yang berpendar, hal ini menunjukkan bahwa struktur kimia isolat memiliki ikatan rangkap terkonjugasi. Noda hasil elusi yang tidak tampak dibawah lampu UV disemprot dengan reagen penampak noda CeSO₄ 2% dan dipanaskan diatas hotplate sehingga diperoleh noda yang berwarna ungu kemerahan. Isolat fraksi D7 dinyatakan relatif murni secara KLT, dan uji titik leleh menunjukkan bahwa isolat D7 meleleh pada suhu 140, 20 C.

10. Rimpang Lengkuas Merah

Pada penelitian ini menggunakan sampel Rimpang Lengkuas Merah. Rimpang lengkuas merah dibersihkan dan dicuci, setelah pencucian lalu dikeringkan. Sampel yang sudah kering dihaluskan menjadi serbuk. Rimpang lengkuas merah yang sudah menjadi serbuk dilakukan uji fitokimia. Berdasarkan uji fitokimia diketahui bahwa rimpang lengkuas merah

mengandung senyawa golongan alkaloid, flavonoid, steroid dan saponin. Serbuk rimpang lengkuas merah sebanyak 0,616 kg di ekstraksi menggunakan pelarut n-heksan menggunakan alat soxlet yang bertujuan untuk mengikat senyawa-senyawa metabolit sekunder pada rimpang lengkuas merah yang bersifat non-polar seperti steroid dan triterpenoid. Residu hasil ekstraksi dengan pelarut nheksan, selanjutnya di ekstraksi dengan pelarut etanol 96% menggunakan metode maserasi hingga filtratnya tidak berwarna menunjukkan sudah tidak ada senyawa yang terekstrak lagi. Filtrat hasil maserasi dipekatkan menggunakan *rotary evaporator* sehingga diperoleh ekstrak kental etanol. Ekstrak kental etanol yang didapatkan didapatkan, ditambahkan larutan HCl 2M hingga PH larutan 3-4 agar terbentuk garam alkaloid, setelah terbentuk garam alkaloid, setelah itu dilakukan ekstraksi cair-cair menggunakan pelarut etil asetat. Garam alkaloid yang telah terbentuk akan larut dalam air sedangkan senyawa lain akan larut dalam dalam fase etil asetat. Hasil ekstraksi akan terbentuk 2 lapisan yaitu lapisan bawah merupakan lapisan asam, sedangkan lapisan atas merupakan lapisan etil asetat. Kemudian kedua lapisan tersebut dipisahkan, lapisan asam yang mengandung garam alkaloid ditambahkan NH₄OH hingga PH larutan mencapai 8-9 tujuannya agar garam alkaloid membentuk alkaloid kembali. Hasil dari ekstraksi membentuk 2 lapisan yaitu lapisan etil asetat dan lapisan asam. Selanjutnya kedua lapisan dipisahkan, untuk lapisan etil asetat dipekatkan menggunakan *rotary evaporator* hingga diperoleh ekstrak kental alkaloid total sebanyak 2,61 gr. Ekstrak alkaloid total yang diperoleh dilakukan pemisahan komponen menggunakan teknik kromatografi. Analisis kandungan kimia awal dilakukan menggunakan

Kromatografi Lapis Tipis (KLT) dengan fase diam silika gel60 GF254 dan fase geraknya campuran eluen kloroform: etil asetat. Hasil dari KLT alkaloid total pada noda KLT 1 dengan nilai Rf 0,46 berwarna kuning, pada noda KLT 2 dengan Rf 0,56 berwarna ungu, pada noda KLT 3 dengan nilai Rf 0,73 berwarna orange, pada noda KLT 4 dengan nilai Rf 0,79 berwarna hijau kebiruan, dan pada noda KLT 5 dengan nilai Rf 0,96 berwarna biru. Selanjutnya ekstrak alkaloid total dilakukan pemisahan dengan metode kromatografi kolom menggunakan eluen kloroform: etil asetat dan diperoleh 7 fraksi. Pada fraksi III merupakan fraksi terbanyak sehingga dilakukan pemisahan kembali dengan metode KLT preparatif menggunakan eluen campuran kloroform: etil asetat dan hasil elusi KLT preparatif diperoleh 3 pita yaitu Fa (kuning), Fb (kuning kemerahan), dan Fc (hijau kebiruan) selanjutnya dilakukan KLT preparatif dengan eluen kloroform: etil asetat (9:1). Hasil dari KLT preparatif diperoleh 3 pita Fc1 (hijau pudar), Fc2 (hijau kebiruan) dan Fc3 (biru). Selanjutnya isolat Fa, Fb, Fc1, Fc2, dan Fc3 yang diperoleh diuji alkaloid dengan penyemprotan menggunakan pereaksi Dragendorf. Hasil penyemprotan dengan pereaksi Dragendorf diperoleh hasil bahwa noda Fc2 menunjukkan hasil positif terhadap alkaloid ditandai dengan timbulnya bercak coklat kemerahan pada spot yang terbentuk.

Untuk Fc2 (hijau kebiruan) kemudian dilakukan uji kemurnian menggunakan KLT dengan eluen aseton, diklorometana, n-butanol, metanol, kloroform, kloroform: n-heksan (Tengo et al., 2013). Dari hasil uji kemurnian pada isolat Fc2 menunjukkan bahwa isolat tersebut telah murni yang ditanda dengan noda tunggal yang berwarna hijau kebiruan. Filtrat tersebut kemudian

diuapkan untuk menghilangkan pelarut yang terkandung didalamnya sehingga dihasilkan padatan alkaloid berwarna kuning kemerahan.

Kesimpulan

Berdasarkan hasil penelitian isolasi senyawa alkaloid dilakukan dengan metode maserasi. Namun terdapat sedikit perbedaan pada penggunaan pelarut untuk proses maserasi. Terdapat jurnal yang menggunakan etanol atau metanol pada proses maserasi. Penggunaan pelarut mempengaruhi jumlah ekstrak yang dihasilkan dan rendamen ekstraknya. Digunakan pelarut metanol dikarenakan pelarut ini bersifat universal sehingga mampu mengikat semua komponen kimia yang terdapat di dalam tumbuhan. Metanol mampu mengikat senyawa yang bersifat polar, non polar dan semi polar. Sedangkan pelarut etanol memiliki keunggulan berupa polaritas yang tinggi sehingga dapat mengekstrak bahan lebih banyak dibandingkan jenis pelarut yang lain. Selain itu etanol memiliki titik didih yang rendah dan cenderung aman. Pemilihan pelarut ini disesuaikan dengan situasi, kondisi dan karakteristik tumbuhan. Disamping itu, pada uji fitokimia setiap jurnal menggunakan pereaksi yang berbeda-beda. Masing-masing pereaksi memiliki keunggulan serta digunakan untuk tujuan yang berbeda-beda. Dari keseluruhan hasil penelitian, didapatkan noda tunggal pada plat KLT. Hal ini menandakan seluruh penelitian berhasil untuk mengekstraksi isolat murni/senyawa murni yaitu alkaloid.

BIBLIOGRAFI

- Achmad, B., & Hussein, E. M. A. (2004). An X-Ray Compton Scatter Method For Density Measurement At A Point Within An Object. *Applied Radiation*
- And Isotopes, 60(6), 805–814. [Google Scholar](#)
- Afrida, A. (2014). Isolasi Senyawa Alkaloid Dari Daun Bulian (Eusideroxylon Zwagery T. Et B). *Journal Of The Indonesian Society Of Integrated Chemistry*, 6(2), 20–24. [Google Scholar](#)
- Aksara, R., Musa, W. J. A., & Alio, L. (2013). Identifikasi Senyawa Alkaloid Dari Ekstrak Metanol Kulit Batang. *Jurnal Entropi*, 8(01). [Google Scholar](#)
- Bakhtiar, N. (2018). *Biologi Dasar Terintegrasi*. Kreasi Edukasi. [Google Scholar](#)
- Idrus, R. B., Bialangi, N., & Alio, L. (2013). Isolasi Dan Karakterisasi Senyawa Alkaloid Dari Biji Tumbuhan Sirsak (Annona Muricata Linn). *Jurnal Sainstek*, 7(01). [Google Scholar](#)
- Lenny, S., & Barus, T. (2016). Isolasi Senyawa Alkaloid Dari Daun Sidaguri (Sida Rhombifolia L.). *Jurnal Kimia Mulawarman*, 8(1). [Google Scholar](#)
- Muhammad, A. H. A. (2019). Isolasi Senyawa Alkaloid Dari Ekstrak Metanol Kulit Batang Tumbuhan Pelir Kambing (T. Macrocarpa Jack). *Jurnal Kimia Khatulistiwa*, 6(3). [Google Scholar](#)
- Mutiara, R., Djangi, M. J., & Herawati, N. (2016). Isolasi Dan Uji Aktivitas Antioksidan Senyawa Metabolit Sekunder Ekstrak Metanol Kulit Buah Mangrove Pidada (Sonneratia Caseolaris). *Chemica: Jurnal Ilmiah Kimia Dan Pendidikan Kimia*, 17(2), 52–62. [Google Scholar](#)
- Pulukadang, M. A. (2015). Teknik Permainan Polopalo Berbasis Notasi (Studi Pola Permainan Bernada Diatonis Di Kabupaten Gorontalo. *Penelitian Kolaboratif Dana Blu Fsb*, 1(1992). [Google Scholar](#)
- Rahasasti, I. D. (2017). Isolasi, Identifikasi Senyawa Alkaloid Total Daun

Tempuyung (*Sonchus Arvensis* Linn) Dan Uji Sitotoksik Dengan Metode Bslt (Brine Shrimp Lethality Test). *Jurnal Farmasi An Nasher*, 1(1), 8–14. [Google Scholar](#)

Saragih, B. (2018). *Bawang Dayak (Tiwai) Sebagai Pangan Fungsional*. Deepublish. [Google Scholar](#)

Tengo, N. A., Bialangi, N., & Suleman, N. (2013). Isolasi Dan Karakterisasi Senyawa Alkaloid Dari Daun Alpukat (*Persea Americana* Mill). *Jurnal Sainstek*, 7(01). [Google Scholar](#)

Untoro, M., Fachriyah, E., & Kusriani, D. (2016). Isolasi Dan Identifikasi Senyawa

Golongan Alkaloid Dari Rimpang Lengkuas Merah (*Alpinia Purpurata*). *Jurnal Kimia Sains Dan Aplikasi*, 19(2), 58–62. [Google Scholar](#)

Wijaya, M. (2009). Analisis Praktik Perataan Laba Pada Industri Real Estate Dan Properti Yang Bereputasi Balk Di Bursa Efek Indonesia. *Jurnal Akuntansi Kontemporer*, 1(2). [Google Scholar](#)

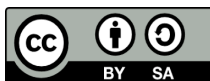
Copyright holder:

Bismar Al Bara, Faizal Auladi Rivianto, Nurlaela, Sulastri (2021)

First publication right:

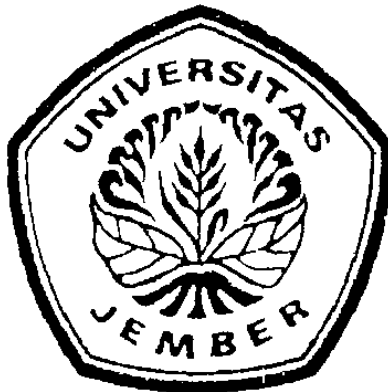
Jurnal Health Sains

This article is licensed under:



**MODUL
FARMAKOLOGI**

FENILPROPANOID



Disusun Oleh :
Indah Yulia Ningsih, S.Farm., M.Farm., Apt.

**BAGIAN BIOLOGI FARMASI
FAKULTAS FARMASI UNIVERSITAS JEMBER
2014**

KATA PENGANTAR

Puji syukur kehadiran Allah SWT yang telah melimpahkan segala nikmat kepada kami sehingga penyusunan modul kuliah ini dapat diselesaikan sebagai mana mestinya.

Modul kuliah ini dimaksudkan sebagai bahan ajar yang akan mendukung kelancaran proses pembelajaran pada Mata Kuliah FARMAKOGNOSI pada Fakultas Farmasi Universitas Jember. Materi-materi yang disajikan dalam modul ini diharapkan dapat memberikan pemahaman mendalam mengenai Fenilpropanoid yang penting sebagai dasar bagi mata kuliah semester-semester berikutnya.

Sebagai sebuah karya keilmiahan, kami berharap semoga modul ini menjadi sesuatu yang bermanfaat bagi siapa saja yang membaca dan mempelajarinya. Dan sebagai sebuah karya pula maka kami menyadari bahwa sudah pasti terdapat kekurangan ataupun kejanggalan di berbagai tempat dalam buku ini. Oleh sebab itu, demi kesempurnaannya di masa mendatang, kritik dan saran yang bersifat membangun sangat kami harapkan.

Jember, November 2014

PENYUSUN

DAFTAR ISI

	Hal.
Halaman Judul	i
Kata Pengantar	ii
Daftar Isi	iii
1.1.Pendahuluan	2
1.2.Penggolongan Fenilpropanoid	6
1.2.1. Asam Hidroksisinamat.....	6
1.2.2. Fenilpropena	10
1.2.3. Kumarin	12
1.2.4. Fenilpropanoid Rantai Pendek.....	20
1.2.5. Turunan Bifenilpropanoid	27
1.2.6. Fenilpropanoid dengan Berat Molekul Tinggi	31
1.3.Tugas/Diskusi	34
1.4.Rangkuman.....	34
1.5.Rujukan Pengayaan	35
1.6.Latihan Soal.....	36

FENILPROPANOID

A. Capaian Pembelajaran (LO) Prodi

Mampu menerapkan ilmu dan teknologi kefarmasian dalam perancangan, pembuatan dan penjaminan mutu sediaan farmasi bahan alam.

B. Capaian Pembelajaran (LO) MK

Memahami aspek biokimia golongan senyawa fenilpropanoid dalam sumber bahan alami (tumbuhan, hewan, mineral) yang digunakan sebagai obat dan bahan alami dalam pengobatan, termasuk simplisia-simplisia yang menghasilkan senyawa golongan tersebut dalam rangka mendukung pembuatan sediaan farmasi bahan alam yang berkualitas.

C. Kompetensi yang Diharapkan

1. Mahasiswa mampu mendeskripsikan sumber bahan alami (tumbuhan, hewan, mineral) dari golongan senyawa fenilpropanoid yang digunakan sebagai obat dan bahan alami dalam pengobatan, termasuk simplisia-simplisia yang menghasilkan senyawa golongan tersebut.
2. Mahasiswa mampu memahami aspek biokimia golongan senyawa fenilpropanoid yang terkandung dalam simplisia.

1.1. Pendahuluan

Berdasarkan jalur biosintesis, metabolit sekunder digolongkan menjadi:

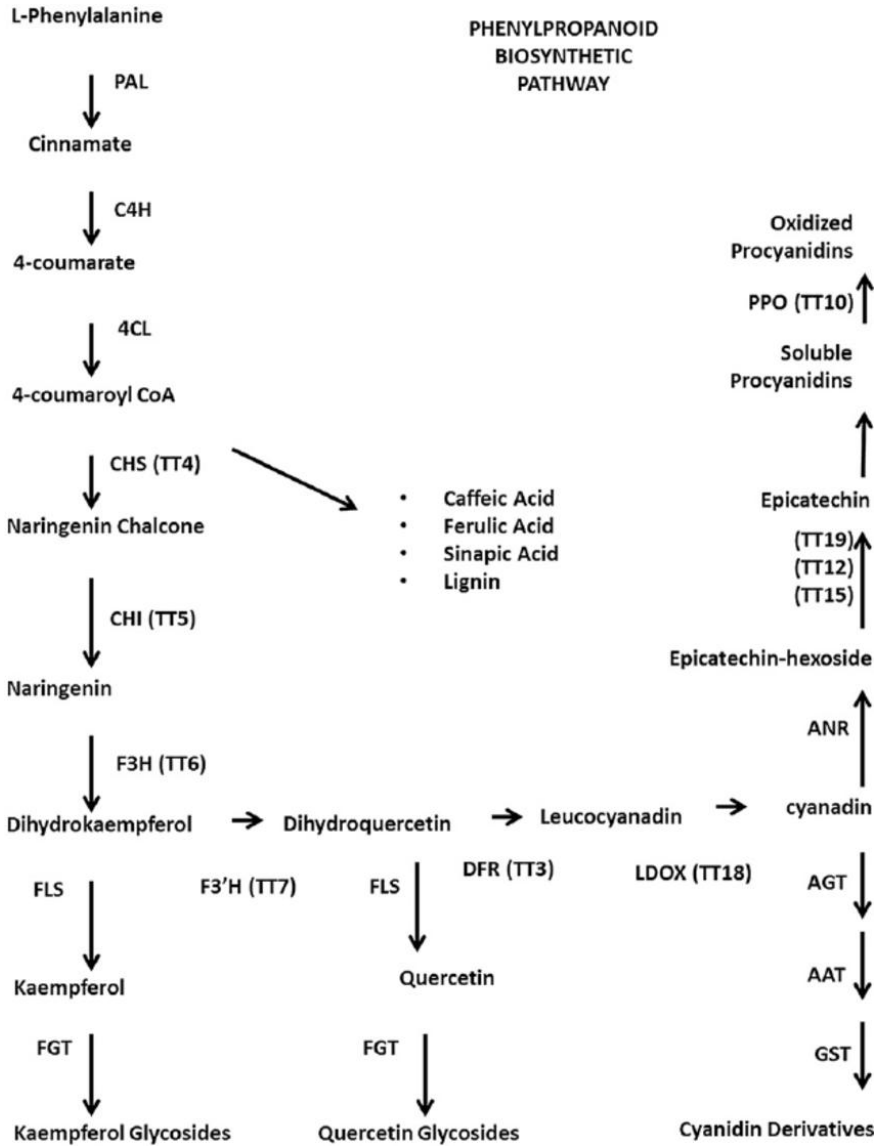
1. Golongan asetat (C2): poliketida dan asam lemak.
2. Golongan mevalonat dan deoksisilulosa (C5): terpenoid
3. Golongan sikimat: fenil matanoid (C7) dan fenilpropanoid (C9)
4. Golongan alkaloid
5. Golongan campuran: kombinasi antar metabolit sekunder atau metabolit sekunder dengan metabolit primer.

Fenilpropanoid merupakan suatu kelompok senyawa fenolik alam yg berasal dari asam amino aromatik fenilalanin dan tirosin. Golongan senyawa ini adalah zat antara dari jalur biosintesis asam sikimat. Berdasarkan strukturnya, fenilpropanoid memiliki cincin fenil yang menjadi tempat melekatnya rantai samping 3C. Senyawa fenilpropanoid adalah senyawa memiliki kerangka aromatik fenil (C6) dengan rantai samping propanoid (C3), sehingga jumlah total karbonnya adalah 9 dan disebut C9 atau fenil propanoid dan kelipatannya. Fenilpropanoid juga dapat mengandung satu atau lebih residu C6-C3. Karakteristik lainnya adalah tidak mengandung atom nitrogen dan terdapat satu atau beberapa gugus hidroksil yang melekat pada rantai aromatik, sehingga memiliki sifat fenolik. Karenanya, golongan

fenilpropanoid disebut pula sebagai fenolik tumbuhan. Keberadaannya berlimpah pada tumbuhan namun terbatas pada jamur dan belum ditemukan pada manusia atau vertebrata.

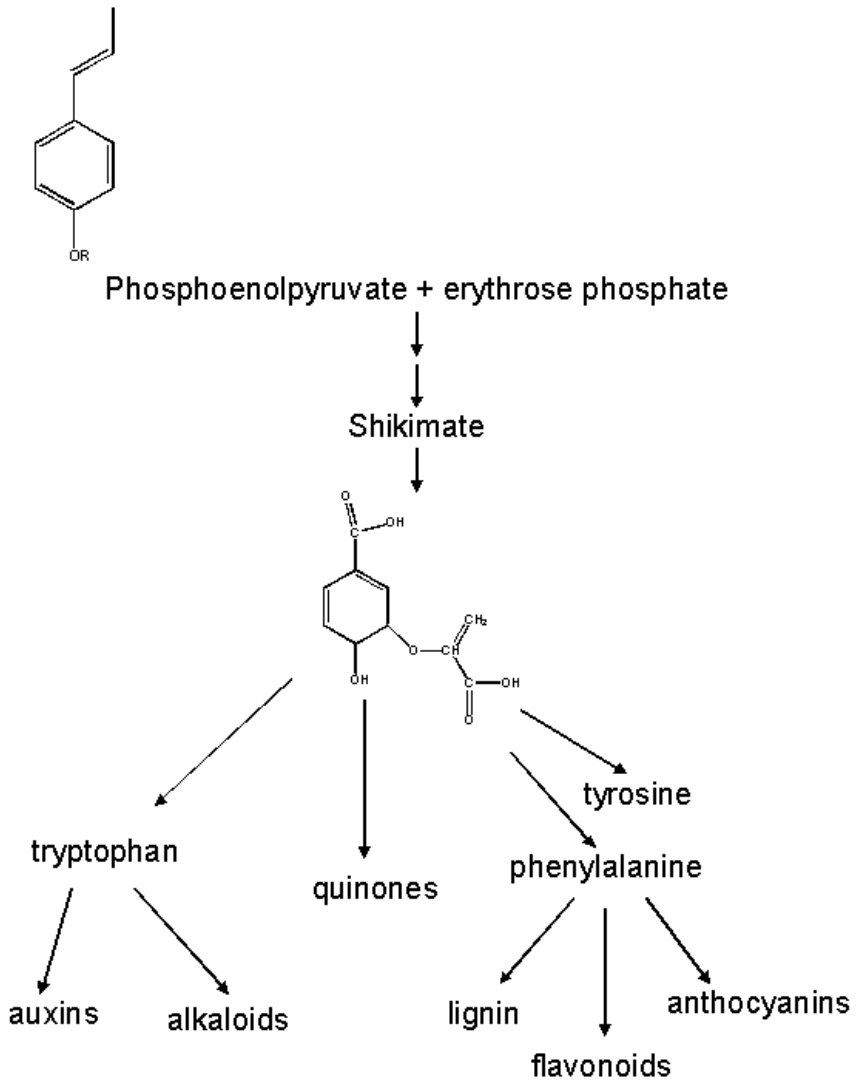
Senyawa fenilpropanoid terbentuk dari asam sikimat. Selain fenil propanoid, jalur asam sikimat dihipotesiskan membentuk *building block* C7. Berbagai senyawa golongan lignin, stilben, kumarin memiliki kerangka C9. Sedangkan asam galat, struktur benzoik, berbagai polifenol (bukan jalur tunggal) terbentuk dari struktur C7. Golongan ini melewati *starting material* asam amino L-tirosin dan L- fenilalalin yang merupakan asam amino esensial (manusia tidak memiliki jalur biosintesis ini), sehingga potensi toksisitasnya kecil pada manusia.

Golongan fenil propanoid adalah senyawa yang memiliki aktifitas farmakologi luas seperti antikanker (podofilotoksin), filantin berefek sebagai hepatoprotektor dan stimulan kekebalan dalam tanaman meniran (*Phyllanthus niruri*), antiaterosklerosis (stilebenoid, dan resveratrol), antidiabetes (sinamaldehyde, yang terkandung dalam kulit kayu manis (*Cinnamomum burmani*)), dan eugenol yang merupakan bahan antiseptik gigi yang diperoleh dari kuncup bunga cengkeh (*Syzygium aromaticum*). Berbagai bahan parfum atau aroma aromaterapi juga merupakan senyawa fenilpropanoid. Hal ini dikarenakan minyak atsiri disusun oleh golongan monoterpen, seskuiterpen, dan fenilpropanoid.



Gambar 1. Jalur Biosintesis fenilpropanoid

Phenylpropanoids



Gambar 2. Struktur fenilpropanoid

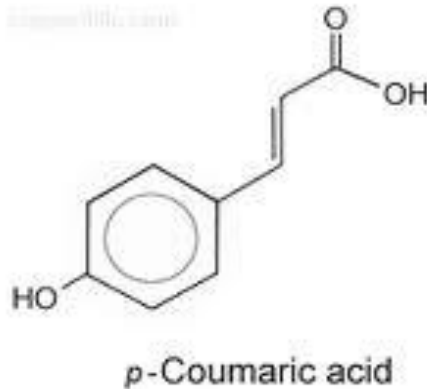
Fenilpropanoid dapat diklasifikasikan berdasarkan gugus kimia dasarnya, yaitu:

1. Asam hidroksisinamat
2. Fenil propena
3. Kumarin
4. Fenilpropanoid pendek
5. Turunan bifenilpropenoid
6. Fenilpropanoid dengan berat molekul tinggi

1.2 Penggolongan Fenilpropanoid

1.2.1. Asam Hidroksisinamat

1. Asam para-kumarat



Karakteristik asam p-kumarat adalah sebagai berikut:

- Sinonim : asam p-hidroksisinamat
- Sumber :

Aloe barbadensis (Aloe barbados)

Euphorbia lathyris (Mole plant)

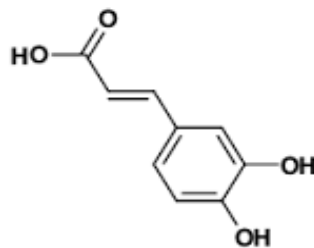
Hura crepitans (Sandhox tree)

Melilotus officinalis (Yellow Sweetlover)

Trifolium pratense (Red clover)

- Pemerian : Berbentuk jarum
- Dapat dikristalkan dalam bentuk anhidrat dari larutan air panas pekat
- Praktis tidak larut dalam benzena, sukar larut dalam air dingin, mudah larut dalam etanol, eter dan air panas

2. Asam kafeat



Caffeic Acid

Karakteristik asam kafeat adalah sebagai berikut:

- Sinonim : asam 3,4-dihidroksisinamat
- Sumber :

Aconitum napellus (Aconite)

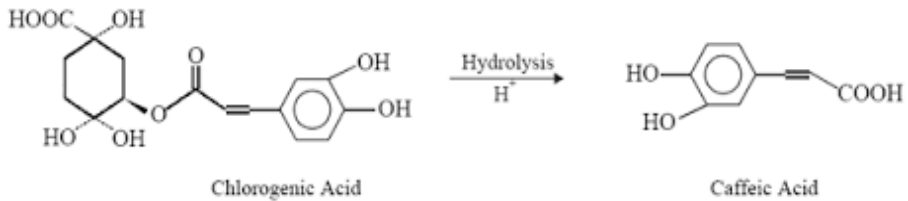
Arctium lappa (Lappa)

Cinnamomum camphora (Kamfor)

Citrullus colocynthis (Colocynth)

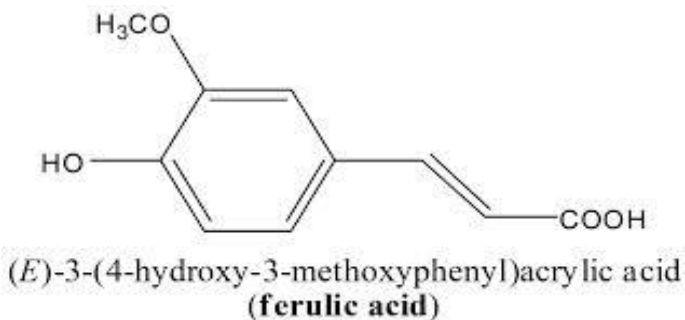
Digitalis purpurea (Digitalis)

- Terdapat pada tumbuhan hanya dalam bentuk terkonjugasi, misalnya Asam klorogenat
- Pembuatan : isolasi dari kopi hijau dan kopi panggang, hidrolisis asam klorogenat dalam media asam



- Pemerian :
Berupa kristal kuning dari larutan air pekat dan monohidrat dari larutan encer

3. Asam ferulat



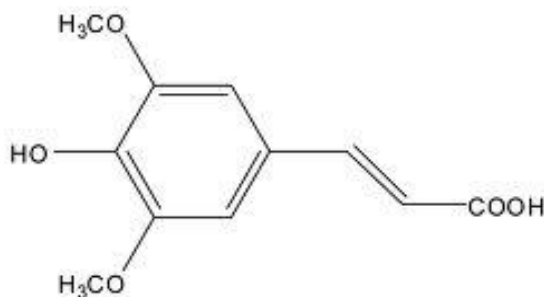
Karakteristik asam ferulat adalah sebagai berikut:

- Sinonim : asam kafeat 3-metil eter, asam 4-hidroksi-3-metoksisinamat
- Sumber :

Biji *Citrullus colocynthis* (Colocynth), daun *Digitalis purpurea*, pucuk muda *Equisetum hyemale*, daun *Euphorbia lathyris*, herba kering *Euphrasia officinalis*, gom-resin *Ferula assafoetida*, MA *Gaultheria procumbens*

- Pembuatan : Isolasi dari *Ferula foetida* dan *Pinus laricio*; reaksi antara vanillin, asam malonat, dan piperidin dalam piridin selama 3 minggu dan endapkan asam ferulat dengan HCl encer
- Pemerian :
Bentuk cis : minyak kuning
Bentuk trans : jarum ortorombik
- Uji identifikasi : asam ferulat dg lart NaOH membentuk garam Na shg kelarutan meningkat
- Kegunaan : pengawet produk makanan

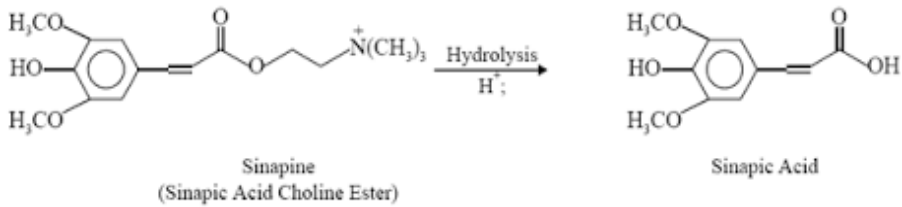
4. Asam sinapat



(*E*)-3-(4-hydroxy-3,5-dimethoxyphenyl)acrylic acid
(sinapic acid)

Karakteristik asam sinapat adalah sebagai berikut:

- Sumber : daun dan ranting *Viscum album*
- Pembuatan : hidrolisis ester kolin asam sinapat dari biji mustard hitam *Brassica nigra*, baik dlm media asam ataupun dg hidrolisis enzimatik



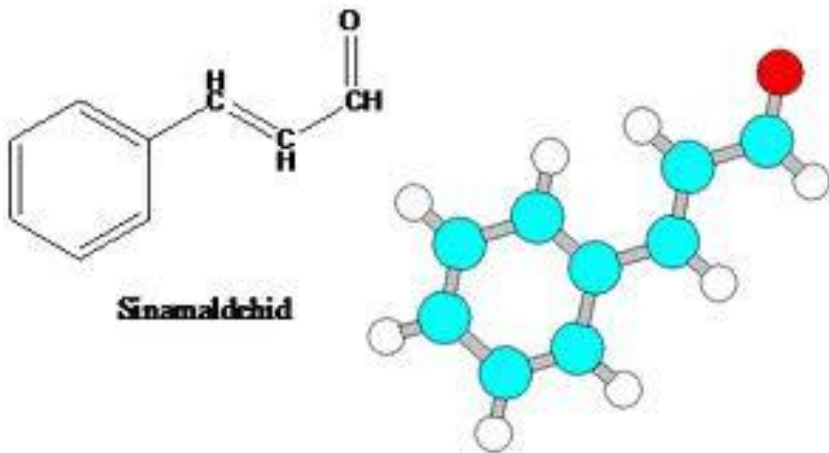
- Kegunaan :
 1. Antiseptik, antispasmodik, dan emetik
 2. Arteriosklerosis, stimulan jantung, kanker, hepatitis, dan hipertensi
 3. Epilepsi, histeria, debilitas saraf

1.2.2. Fenilpropena

Karakteristik fenilpropena adalah sebagai berikut:

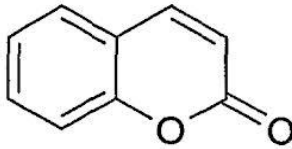
- Umumnya diisolasi dalam komponen minyak atsiri bersama dengan terpena atsiri
- Larut dalam lemak
- Contoh : eugenol, anetol, miristisin
- Eugenol dan isoeugenol selalu berada bersama-sama dalam tumbuhan, misalnya *Cananga odorata* (Ylang ylang), dan *Myristica fragrans* (nutmeg)
- Sinonim : sinamal, fenilakrolein, sinamat aldehid

- Sumber : minyak Ceylon Cinnamon-*Cinnamomum verum*, *Myroxylon balsamum* (Balsam Peru), *Syzygium aromaticum* (Clover)
- Pembuatan : Minyak kasia (*Cinnamomum cassia*) mengandung minyak atsiri (1-2%). Minyak atsiri mengandung sinamaldehyd (80-85%) yang diisolasi melalui distilasi fraksional dalam vakum
- Pemerian : sinamaldehyd berupa cairan berminyak kekuningan yang memiliki bau kayu manis tajam larut dalam sekitar 700 bagian air dan dalam 7 bagian etanol 60%, tetapi tidak larut dalam etanol, eter, kloroform dan minyak
- Uji kimia : 1 tetes larutan FeCl₃ 1% + beberapa tetes sinamaldehyd → coklat khas
- Kegunaan : industri parfum, aroma makmin



1.2.3. Kumarin

1. Kumarin



coumarin

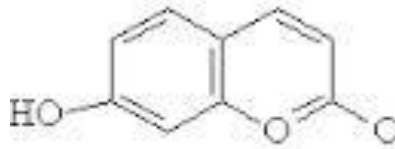
Karakteristik kumarin adalah sebagai berikut:

- Sinonim : asam cis-o-lakton kumarinat, kumarinat anhidrat
- Sumber : *Acacia farnesiana* (Cassie), *Apium graveolens* (celery), *Cinnamomum verum* (Ceylon Cinnamomum), *Myroxylon balsamum* (Balsam Peru), *Pimpinella anisum* (Anisi)
- Pemerian : kristal rektangular, bau mirip biji vanili, rasa terbakar
- Kegunaan : Pemberi aroma pada sediaan obat

2. Hidroksikumarin

Contoh : Umbelliferon (7-hidroksi kumarin), aeskuletin (6,7-dihidroksi kumarin), skopoletin (6-metoksi-7-hidroksi kumarin)

A. Umbelliferon



Umbelliferon

Karakteristik umbelliferon adalah sebagai berikut:

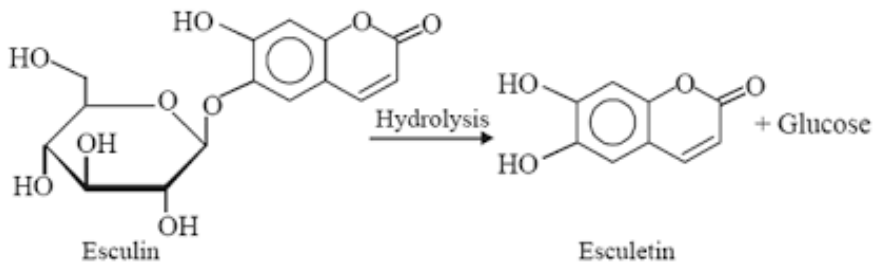
- Sinonim : Hidrangan, Skimmetin
- Sumber : *Apium graviolens*, *Artemisia abronatum*, *Lavandule angustifolia*, *Matricaria chamomilla*, *Pimpinella anisum*
- Pembuatan : Asam ferulat + HCl \rightarrow asam umbelat $\xrightarrow{-H_2O}$ umbelliferon
- Distilasi resin dari Umbeliferae
- Pemerian : Bentuk jarum; dengan pemanasan, baunya meningkat; menyublim; larutannya berfluoresensi biru
- Kegunaan : komponen lotion dan krim tabir surya

B. Eskuletin

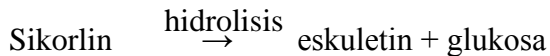
Karakteristik eskuletin adalah sebagai berikut:

- Sinonim : Aeskuletin, Chicorigenin, 6,7-dihidroksi kumarin
- Sumber : kulit kayu *Cratageus oxycantha* dan bunga *Centarea cyanus*

- Merupakan glikosida yang jika dihidrolisis akan menghasilkan aglukon eskuletin
- Juga diperoleh dari sikorlin pada bunga *Cichorium intybus*
- Pembuatannya mll hidrolisis 2 glikosida berikut :
 - a. Dari eskulin



- b. Dari sikorlin



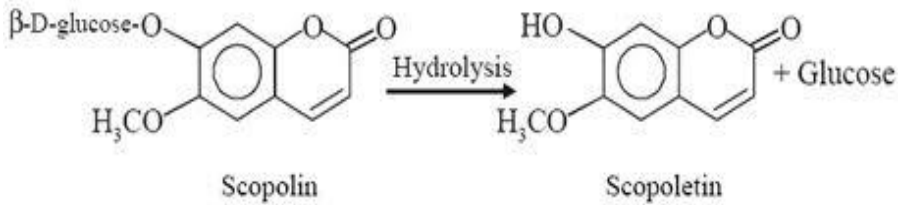
- Pemerian : eskuletin berbentuk prisma dari asasetat glasial dan berbentuk helaian mll sublimasi vakum
- Kegunaan : penyaring sinar UV

C. Skopoletin

Karakteristik skopoletin adalah sebagai berikut:

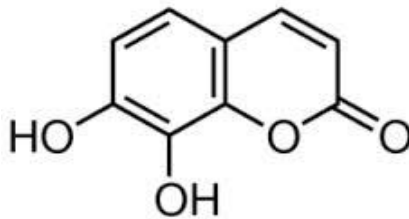
- Sinonim : asam krisatropat, asam gelseminat, 6-metoksiumbelliferon, β -metil-eskuletin, 7-hidroksi-6-metoksikumarin
- Sumber : akar *Arnica montana*, daun *Artemisia abrotanum*, akar dan daun *Atropa belladonna*, buah *Capsicum annum*

- Pembuatan :



- Pemerian : berbentuk prisma atau jarum
- Uji identifikasi :
 1. Larutkan dan hangatkan 0,1 g zat dlm etanol dg WB
→ fluoresensi biru
 2. Larutkan 0,1 g zat dlm 3 ml etanol panas utk mereduksi lart Fehling → endapan merah bata CuO

D. Dafentin



Karakteristik dafentin adalah sebagai berikut:

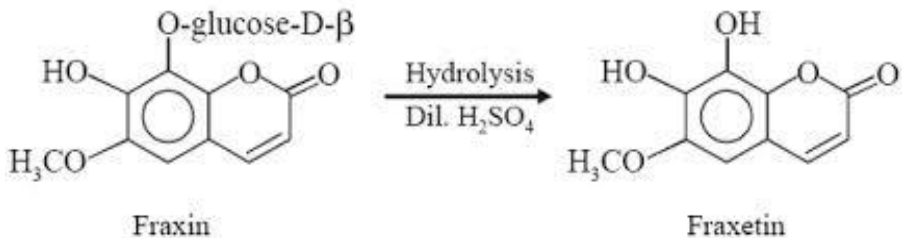
- Sinonim : 7,8-dihidroksi kumarin
- Sumber : biji dan buah *Daphne mezereum*, biji *Euphorbia lathyris*

- Pembuatan : diperoleh dari glukosida dafnin melalui pemanasan dengan asam mineral encer, hidrolisis enzimatik, dan sublimasi
- Pemerian : kristal yang menyublim dengan pemanasan
- Uji identifikasi :
 1. Larutan air dafentin + larutan $\text{FeCl}_3 \rightarrow$ hijau
Larutan air dafentin + $\text{Na}_2\text{CO}_3 \rightarrow$ merah
 2. Larutan alkali dafentin + alkali karbonat/alkali \rightarrow kuning

E. Fraksetin

Karakteristik fraksetin adalah sebagai berikut:

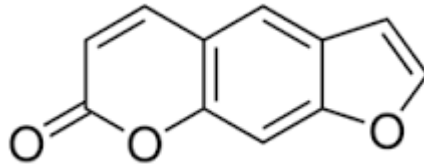
- Sinonim : 7,8-dihidroksi-6-metoksikumarin
- Sumber : biji *Aeschulus hippocastanum*
- Pembuatan :



- Pemerian : berbentuk plat. Pada $150\text{ }^\circ\text{C}$ berubah menjadi kuning dan pada $228\text{ }^\circ\text{C}$ (TL) menjadi coklat

3. Furanokumarin

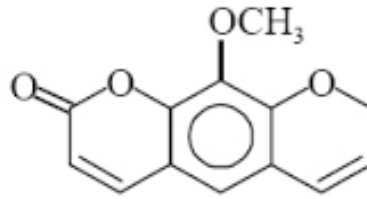
A. Psoralen



Karakteristik psoralen adalah sebagai berikut:

- Sinonim : Fikusin, asam 6-hidroksi-5-benzofuranakrilat δ , furo (3,2- δ)-kumarin
- Sumber : Rutaceae (Bergamot, limau, cengkeh), Umbelliferae (seledri), Leguminosae (*Psoralen coryfolia*), Moraceae (daun ara), minyak *Ruta graveolens*, daun *Ficus carica*
- Pemerian : kristal
- Uji identifikasi :
 1. 1 mg psoralen + 5 ml EtOH + 15 ml campuran dari 3 bagian propilen glikol, 5 bagian asam asetat, dan 43 bagian air \rightarrow + UV \rightarrow fluoresensi biru terang
 2. 1 mg psoralen + 2 ml EtOH + 2 tetes NaOH \rightarrow + UV \rightarrow fluoresensi kuning
- Kegunaan :
 1. Pengobatan leukoderma
 2. Fotokemoterapi pada vitiligo, psoriasis, dan mikosis fungoides

B. Metoksalen



Methoxsalen

Karakteristik metoksalen adalah sebagai berikut:

- Sinonim : Xantotoksin, meloksin, ammoidin, meladinin, 8-metoksipsoralen, oksoralen
- Sumber : buah *Fragara xanthoxysiloides* dan *Ammi majus*, herba *Ruta graveolens*
- Pemerian : jarum, kristal, tdk berbau, rasa pahit
- Uji identifikasi :
 1. + sedikit $\text{H}_2\text{SO}_4 \rightarrow$ jingga-kuning \rightarrow hijau terang
 2. Uji pelarut Wagner \rightarrow endapan
 3. Uji $\text{HNO}_3 \rightarrow$ kuning terang
- Kegunaan :
Pengobatan leukoderma, zat pigmentasi, perawatan psoriasis dan mikosis fungoides

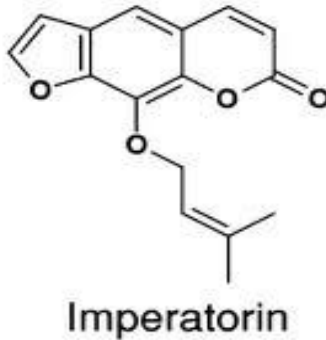
C. Bergapten



Karakteristik bergapten adalah sebagai berikut:

- Sinonim : Heraklin, Majudin, Psoraderm, 5-metoksipsoralen
- Sumber :
Akar dan buah *Angelica archangelica*, biji *Apium graveolens*, daun, batang dan buah *Petroselinum crispum*, minyak *Ruta graveolens*
- Pemerian : kristal jarum, menyublim pd pemanasan
- Uji identifikasi : + H₂SO₄ pekat → kuing-emas terang
- Kegunaan : fotokemoterapi psoriasis, formulasi krim/lotion tabir surya

D. Imperatorin



Karakteristik imperatorin adalah sebagai berikut:

- Sinonim : amidin, pentosalen, marmelosin
- Sumber : akar dan buah *Angelica archangelica*, akar *Imperatoria osthuthium*, buah *Pastinaea sativa*, buah *Ammi majus*
- Pemerian : prisma dan jarum panjang halus
- Uji identifikasi :
 1. Uji H_2SO_4 → jingga tua → coklat
 2. Reagen Marqui → jingga → coklat
 3. Reagen Tollen → cermin perak
 4. Uji Fehling → endapan merah bata CuO
 5. Uji HNO_3 → kuning terang pada pendidihan dengan HNO_3 encer → ungu bila + basa kuat

1.2.4. Fenilpropanoid Rantai Pendek

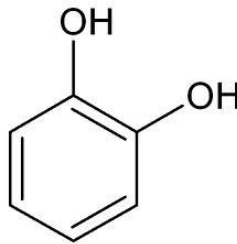
Ciri dari fenilpropanoid rantai pendek, antara lain:

- Selalu berupa asam dan fenol, jarang alkohol dan aldehid
- Klasifikasi :

1. Tidak memiliki rantai samping
2. Memiliki rantai samping dengan 1 atom C
3. Memiliki rantai samping dengan 2 atom C

1. Tidak memiliki rantai samping

Katekol

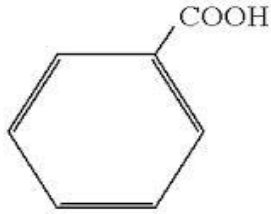


Karakteristik katekol adalah sebagai berikut:

- Sinonim : pirokatekol, pirokatekin, 1,2-dihidrobenzen, 1,2-benzendiol
- Sumber : *Anandenathera peregrina*, korteks *Melia azedaraeh*, *Rumex crispus*
- Pembuatan : ekstrak air + basa encer → garam Na dinetralkan
- Pemerian : tablet atau prisma, berubah warna bila terpapar udara
- Uji identifikasi : 0,2 g katekol dlm ait + lart air FeCl_3 → hijau
- Kegunaan : antiseptik, bahan fotografi, pewarnaan bulu binatang

2. Memiliki Rantai Samping dengan 1 Atom Karbon

A. Asam Benzoat



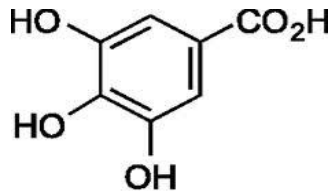
C_6H_5COOH
Benzoic Acid

Karakteristik asam benzoat adalah sebagai berikut:

- Sinonim : asam drasiklik, asam fenilformat, asam benzena karboksilat
- Sumber :
Aecia farnesia, minyak *Cananga odorata*, getah *Daemonorops draco*, *Illicium verum*, MA *Narcissus tazetta*, *Piper methysticum*, *Plantago major*, gom *Styrax benzoin*, kelopak *Vanilla planifolia*
- Pembuatan : ekstrak alkohol dipekatkan, didinginkan, ditambahkan asam mineral encer. Residu padat yang dihasilkan direkristalisasi dari alkohol panas
- Pemerian : plat, tablet, helaian
- Uji identifikasi : garam kalsium benzoat trihidrat menghasilkan kristal dan serbuk dengan densitas 1,44. Sangat larut dalam air mendidih, namun agak sukar larut dalam air dingin (1 g/25 ml)
- Kegunaan :

1. Antijamur topikal bersama asam salisilat
2. Pengawet makanan, lemak, jus buah, larutan alkaloid, tembakau

B. Asam galat



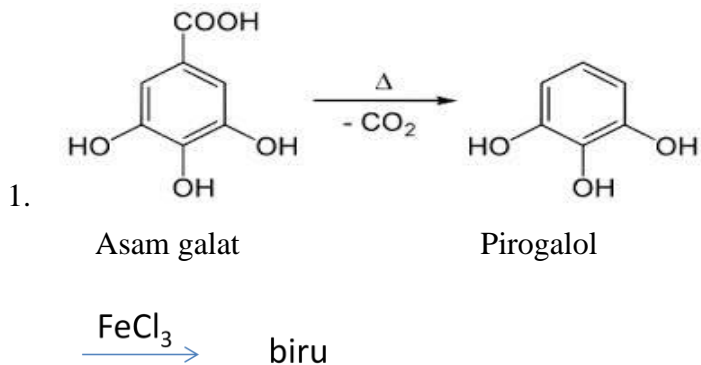
gallic acid (GA)

Karakteristik asam galat adalah sebagai berikut:

- Sinonim : asam 3,4,5-trihidroksi benzoat
- Sumber : biji *Abrus precatorius*, buah buni *Aretostaphylos uva-ursi*, biji *Cimicifuga racemosa*, buah *Coriaria thymifolia*, rimpang *Cypripedium* sp., ranting hijau *Ephedra geradiana*
- Pembuatan :
 1. Hidrolisis asam atau basa tanin dari *Nutgall*
 2. Hidrolisis enzimatik dari kaldu bekas *Penicillium glaucum* dan *A. niger* yg mgd enzim tanase



- Pemerian : jarum, menyublim pada 210 °C
- Uji identifikasi :



2. Asam galat + metanol \rightarrow metil ester dengan titik leleh tajam 202 °C

- Kegunaan : astringen

C. Metil salisilat (terpenoid)

D. Salisin



Karakteristik salisin adalah sebagai berikut:

- Sinonim : Salikosida, salisil alkohol glikosida, saligenin- β -D-glukopiranosida
- Sumber : minyak atsiri *Filipendula ulmaria*
- Pembuatan : ekstrak air panas dari kulit kayu willow atau kulit kayu akar *Viburnum prunifolium*
- Pemerian : kristal
- Kegunaan : analgesik, substrat standar utk evaluasi sediaan enzim yg mgd β -glukosida

E. Vanilin

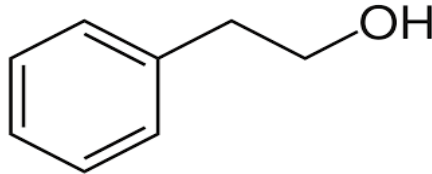


Karakteristik vanilin adalah sebagai berikut:

- Sinonim : aldehida vanilat, 3-metoksi-4-hidroksibenzaldehida, 4-hidroksi-3-metoksibenzaldehida
- Sumber : minyak atsiri *Croton eleutheria*, oleo-gum-resin *Ferula asafoetida*, pucuk bunga *Filipendula ulmaria*, daun *Ilex paragua-riensis*, biji *Myroxylon balsamum*, minyak atsiri *Serenoa repens*, daun *Tilia europaea*
- Pembuatan : hidrolisis valinosida dari buah vanila mentah
- Pemerian : jarum putih/kuning terang
- Uji kimia : + reagen Tollen menghasilkan cermin perak bila dihangatkan (aldehid)
- Kegunaan : pemberi aroma pada minuman, makanan-susu beragi, gula-gula, minyak wangi, dan sediaan obat

3. Memiliki Rantai Samping dengan 2 Atom Karbon

Fenil etanol



Karakteristik fenil etanol adalah sebagai berikut:

- Sinonim : 2-feniletanol, β -feniletil alkohol, benzil karbinol, β -hidroksietil benzen, benzenetanol
- Sumber : minyak atsiri *Tilia europaea* dan minyak atsiri lainnya seperti mawar, anyelir, sitrus, geranium, cempaka, neroli
- Pembuatan : distilasi fraksi minyak atsiri, reduksi feniletil aasetat dengan adanya Na dan EtOH
- Pemerian : cairan tidak berwarna
- Kegunaan : pemberi aroma pada makmin, parfum, bahan aditif untuk infeksi mikroba

1.2.5. Turunan Bifenilpropanoid

1. Lignan

Lignan merupakan penggabungan oksidatif unit-unit parahidroksifenilpropena yang dihubungkan jembatan oksigen

Karakteristik lignan adalah sebagai berikut:

- Unit prekursor : asam sinamat, sinamil alkohol, propenil benzena, alilbenzena
- Lignan/Haworth Lignan : senyawa yg dihasilkan ml penggabungan asam/alkohol scr khusus
- Neolignan : senyawa hasil penggabungan turunan propenil dan/atau alil
- Sumber : akar, *heart wood*, daun, buah, eksudat, resin tumbuhan, manusia dan hewan. α -lignan tdp pd akar dan rimpang *Podophyllum hexandrum*
- Pemerian : enantiomer tunggal (d- atau l- isomer), rasemik dl-

A. Etoposida

Karakteristik etoposida adalah sebagai berikut:

- Sinonim : lastet, vapesid
- Pemerian : kristal
- Kegunaan : dengan zat kemoterapetik lain untuk pengobatan tumor testikular refraktori, pengobatan pertama karsinoma sel kecil paru, leukemia nonlimfositik akut, limfoma non Hodgkin, dan-lain.

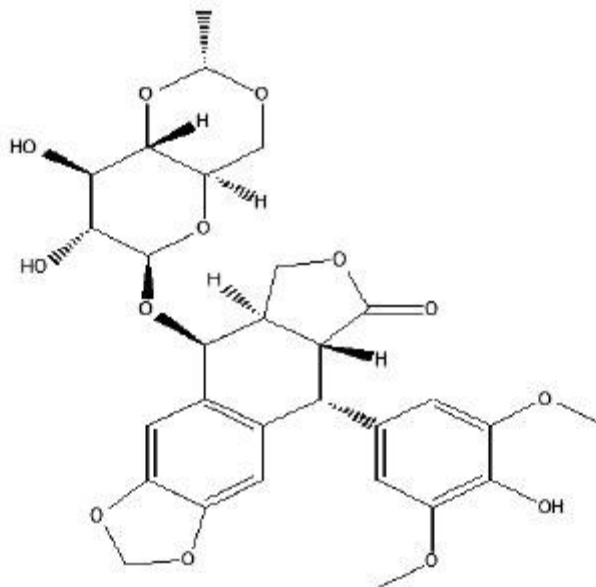
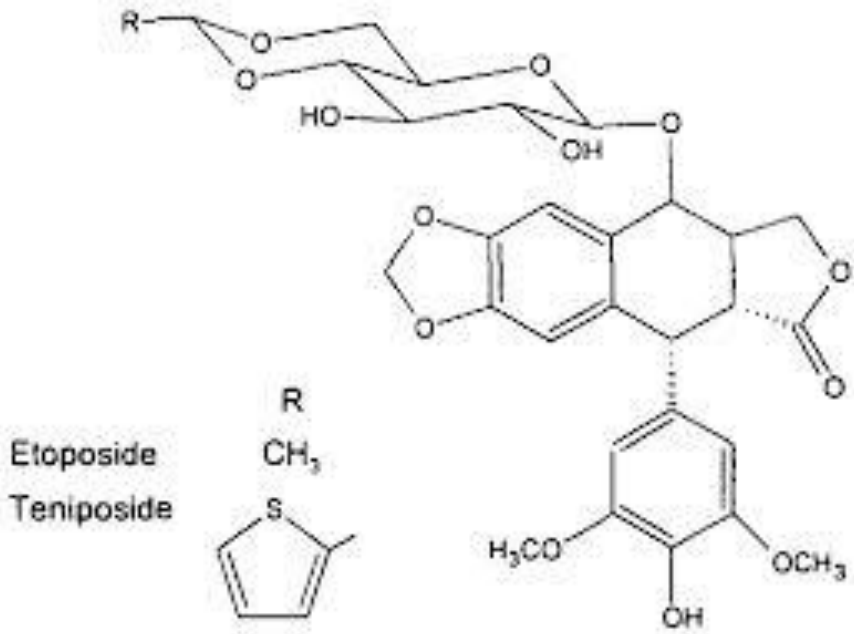


Figure 1: Structure of etoposide (4'-demethyl-epipodophylotoxin 9-[4,6-O-(R)-ethylidene- β -D-glucopyranoside]).

B. Teniposida

Karakteristik teniposida adalah sebagai berikut:

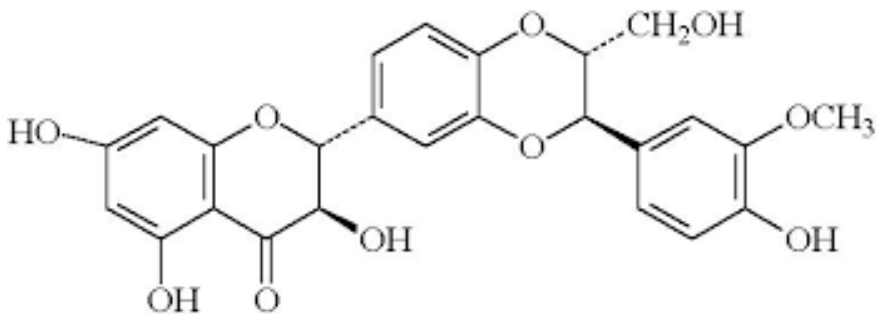
- Sinonim : Vumon, ETP, VM-26, 4'-dimetil-lepipodofilotoksin- β -D-tenilidena glukosida
- Pemerian : kristal, memiliki cincin tenilidena tambahan pada cincin glukopiranosida, pKa lbh tinggi dp etoposida
- Penggunaan : antineoplastik pada leukimia limfoblastik akut anak



C. Flavonoid

Silibin

Karakteristik silibin adalah sebagai berikut:



Silybin

- Sinonim : silimarin, apihepar, laragon, silarin, pluropon, silepan, silirex, silliver, silmar

- Sumber : biji *Silybum marianum*
- Pemerian : kristal monohidrat, larut dlm aseton, etil asetat, metanol, etanol, agak sukar larut dlm kloroform
- Kegunaan :
 1. Perlindungan sel hati atau sel yang belum rusak dengan bekerja langsung pada membran sel, sehingga mencegah masuknya senyawa toksik
 2. Meningkatkan dan menstimulasi sintesis protein sehingga mempercepat proses regenerasi dan produksi hepatosit
 3. Pengobatan penunjang pada radang kronik hati dan sirosis

1.2.6. Fenilpropanoid dengan Berat Molekul Tinggi

1. Lignin

Karakteristik lignin adalah sebagai berikut:

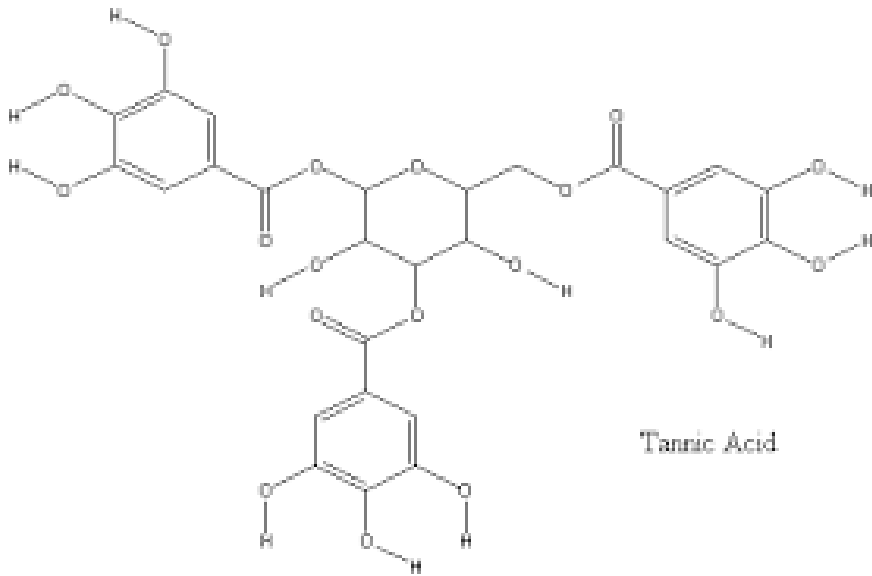
- Merupakan faktor tunggal dalam memperkuat dinding sel sehingga penting dalam sintesis dinding sel
- Penentu dalam adaptasi lingkungan karena dinding sel yang mengandung lignin membantu dalam membangun batang yang kuat dan kaku pada tumbuhan berkayu dan pohon pada umumnya
- Komposisi : koniferil, p-kumaril, sinapil alkohol
- Kegunaan :

1. Sumber vanilin, aldehid siringat, dan dimetil sulfoksida
2. Pengembang plastik fenolik
3. Memperkuat karet sol sepatu
4. Penstabil emulsi aspal
5. Mengendapkan protein

2. Tanin

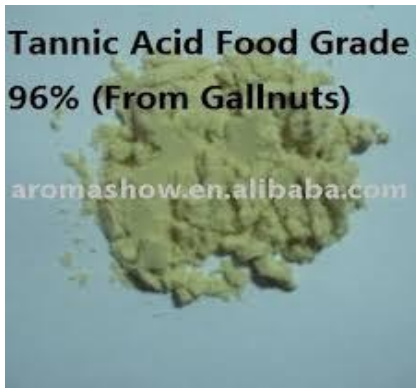
Karakteristik tanin adalah sebagai berikut:

- Sinonim : asam tanat, galotanin, asam galotamat, Acidum tannicum
- Sumber :
Akar *Cimicifuga racemosa*, buah kering *Coffea arabica*, kulit kayu *Cornus florida*, *Equisetum arvense*, akar *Glycyrrhiza glabra*, daun *Eupatorium perfoliatum*, biji *Frangula alnus*, akar *Paeonia officinalis*, daun *Pilocarpus* spp.
- Pemerian : massa serbuk ruahan atau serpihan atau spons berwarna putih kekuningan hingga coklat terang, aroma tidak enak dengan rasa kelat yang khas.
- Jika terpapar udara dan cahaya, cenderung menggelap perlahan



- Uji identifikasi :
 1. Jika dipanaskan 210-215 °C, asam tanat terurai menjadi pirogallol dan CO₂
 2. Asam tanat dengan albumin, pati, gelatin, alkaloid, dan garam logam menghasilkan endapan tidak larut
 3. Asam tanat dengan garam ferri, misalnya FeCl₃ membentuk warna hitam kebiruan atau endapan
- Penyimpanan : wadah tertutup, terlindung dari cahaya
- Kegunaan :
 1. Asam tanat + garam ferri : pembuatan tinta
 2. Penyamakan : kulit sapi, kambing, domba, kerbau
 3. Astringent, antiseptik
 4. Mordan dalam pewarnaan

5. Lem kertas, sutera, pencetakan kain
6. Penjernihan bir dan anggur
7. Koagulan pd produksi karet
8. Produksi asam galat dan pirogalol skala besar



1.3. Tugas/Diskusi

Buatlah makalah tentang salah satu senyawa yang termasuk golongan fenil propanoid dari suatu tanaman. Gunakan setidaknya 2 artikel dari buku teks, jurnal ilmiah terakreditasi atau jurnal ilmiah internasional untuk menyusun makalah anda.

1.4. Rangkuman

Fenil propanoid merupakan salah satu golongan besar senyawa dari tanaman yang banyak dimanfaatkan dalam pengobatan. Fenilpropanoid merupakan suatu kelompok senyawa fenolik alam yg berasal dari asam amino aromatik fenilalanin dan

tirosin. Golongan senyawa ini adalah zat antara dari jalur biosintesis asam sikimat. Berdasarkan strukturnya, fenilpropanoid memiliki cincin fenil yang menjadi tempat melekatnya rantai samping 3C. Fenilpropanoid juga dapat mengandung satu atau lebih residu C6-C3. Karakteristik lainnya adalah tidak mengandung atom nitrogen dan terdapat satu atau beberapa gugus hidroksil yang melekat pada rantai aromatik, sehingga memiliki sifat fenolik. Fenilpropanoid dapat diklasifikasikan berdasarkan gugus kimia dasarnya, yaitu Asam hidroksisinamat, Fenilpropena, Kumarin, Fenilpropanoid rantai pendek, Turunan bifenilpropenoid, dan Fenilpropanoid dengan berat molekul tinggi.

1.5. Rujukan Pengayaan

- Bruneton, J, 1995, *Pharmacognosy, Phytochemistry, Medicinal Plants*, Paris: Lavoiser Publ.
- Claus, EP, Varro, ET, 1973, *Pharmacognosy*, 6th Ed., Philadelphia: Lea & Febiger.
- Depkes RI, 1978, *Materia Medika*, Jakarta: Departemen Kesehatan RI.
- Depkes RI, 1993, *Standard of Asean Herbal Medicine*, Vol. 1, Jakarta: Aksara Buana.
- DirJen POM, 1999, *Peraturan Perundang – Undangan di Bidang Obat Tradisional*, Jakarta: Departemen Kesehatan RI.

Kar, A, 2013, *Farmakognosi & Farmakobioteknologi*, Edisi 2, Vol. 1, Jakarta: EGC Kedokteran.

Saifudin, A, 2014, *Senyawa Alam Metabolit Sekunder: Teori, Konsep, dan Teknik Pemurnian*, Edisi 1, Cetakan 1, Yogyakarta: Deepublish.

1.6. Latihan Soal

Jawablah soal-soal di bawah ini dengan jelas!

1. Jelaskan karakteristik fenilpropanoid!
2. Sebutkan klasifikasi fenilpropanoid!
3. Jelaskan karakteristik dari kumarin beserta kegunaannya!
4. Jelaskan cara pembuatan fraksetin!
5. Jelaskan fungsi lignin bagi tanaman!



Standardisasi Simplisia dan Ekstrak Buah Kemukus (*Piper cubeba* Lf.) Sebagai Bahan Baku Sediaan Kapsul Jamu Sesak Nafas

Indrawati Kurnia Setyani^{1,2}, Wahyono³ dan Teuku Nanda Saifullah Sulaiman^{4*}

¹Program Studi Magister Ilmu Farmasi Fakultas Farmasi, Universitas Gadjah Mada, Jl. Sekip Utara, Sleman, Yogyakarta, Indonesia, 55281.

²PT Swayasa Prakarsa, Jl. Cik Di Tiro No 34, Yogyakarta, Indonesia, 55223.

³Departemen Biologi Farmasi Fakultas Farmasi Universitas Gadjah Mada, Jl. Sekip Utara, Sleman, Yogyakarta, Indonesia, 55281.

⁴Departemen Farmasetika Fakultas Farmasi Universitas Gadjah Mada, Jl. Sekip Utara, Sleman, Yogyakarta, Indonesia, 55281.

*email korespondensi: tn_saifullah@ugm.ac.id

Received 13 April 2021, Accepted 28 June 2021, Published 15 November 2021

Abstrak: Standardisasi merupakan suatu upaya untuk menjaga kualitas bahan baku yang berasal dari tanaman. Standardisasi meliputi parameter spesifik dan non spesifik. Kubebin merupakan senyawa utama yang terkandung di dalam buah kemukus (*Piper cubeba* Lf.). Senyawa ini bisa digunakan sebagai marker untuk mengendalikan kualitas kemukus. Perbedaan tempat tumbuh memberi pengaruh terhadap variasi kadar kubebin. Penelitian ini bertujuan untuk melakukan standardisasi dan membandingkan kadar kubebin dari tiga daerah yang berbeda yaitu Kulonprogo, Magelang, dan Wonosobo sebagai bahan baku untuk pembuatan sediaan kapsul jamu sesak nafas. Kemukus diekstrak dengan metode maserasi. Kadar kubebin merupakan parameter utama dalam pemilihan sumber bahan baku. Penetapan kadar kubebin dengan metode kromatografi lapis tipis-densitometri. Simplisia dengan kadar kubebin yang tertinggi selanjutnya dilakukan standardisasi. Standardisasi simplisia meliputi penetapan kadar air, kadar minyak atsiri, susut pengeringan, kadar abu, kadar abu tak larut asam, cemaran logam berat, residu pestisida dan aflatoxin total. Standardisasi mikrobiologi ekstrak meliputi angka kapang/ khamir, angka lempeng total, mikroba patogen (*Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Salmonella sp* dan *Shigella sp*). Perbedaan tempat tumbuh tidak berpengaruh terhadap kadar kubebin di dalam ekstrak tetapi berpengaruh terhadap randemen. Proses granulasi tidak memberikan pengaruh yang bermakna terhadap senyawa kubebin. Hasil standardisasi kemukus dari Wonosobo menunjukkan bahwa parameter non-spesifik untuk simplisia dan ekstrak memenuhi persyaratan bahan baku obat tradisional sesuai acuan standar *WHO Guidelines* dan Farmakope Herbal Indonesia.

Kata kunci: granul; kemukus; kubebin; standardisasi

Abstract. Standardization of Simplicia and Extract of Kemukus Fruit (*Piper cubeba* Lf.) as Raw Materials for Shortness of Breath for Herbal Medicine Capsules. Standardization is an effort to maintain the quality of raw materials derived from plants. Standardization includes specific and non-specific parameters. Cubebin is the main compound found in cubeb fruit (*Piper cubeba* Lf.) that has been used as a marker to control the quality of cubeb simplisia. The difference in the place of growth affects the variation in the levels of cubebin. This study aimed to standardize and compare the levels of cubebin from three different regions, namely Kulonprogo, Magelang, and Wonosobo as raw materials for making shortness of breath herbal capsules. The cubes were extracted by the maceration method. Cubebin content is the main parameter in selecting the source of raw materials. Determination of the levels of cubebin by the thin layer chromatography-densitometry method. Herbs with the highest levels of cubebin were then standardized. Herbs standardization includes

determination of water content, essential oil content, drying loss, ash content, acid insoluble ash content, heavy metal contamination, total pesticide residues, and aflatoxins. The microbiological standardization of the extract included mold/yeast numbers, total plate count, pathogenic microbes (*Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Salmonella sp*, and *Shigella sp*). The difference in the place of growth had no effect on the content of cubebin in the extract, but it had an effect on yield and the granulation process had no effect on the cubebin compound. The results of standardization of cubeb from Wonosobo show that non-specific parameters for herbs and extract meet the raw material requirements for traditional medicines according to the standard reference of the WHO Guidelines and Indonesian Herbal Pharmacopoeia.

Keywords: granules; cubeb; cubebin; standardization

1. Pendahuluan

Indonesia merupakan negara yang kaya akan sumber daya hayati baik tanaman asli maupun bukan tanaman asli (Cahyaningsih *et al.*, 2021). Salah satu tanaman asli Indonesia adalah Kemukus (*Piper cubeba* L.f) dari famili Piperaceae (Lim, 2012). Tanaman ini banyak terdapat di pulau Jawa, Sumatra dan sebagian Kalimantan selatan (Alqadeeri *et al.*, 2019) yang kemudian menyebar ke Malaysia dan Srilanka (Lim, 2012). Kemukus sudah lama dimanfaatkan untuk pengobatan terutama oleh masyarakat jawa seperti yang tertulis pada naskah pengobatan kuno yaitu buku Serat Primbon Jampi Jawi yang diterbitkan tahun 1928 oleh keraton Surakarta Hadiningrat (Makmun *et al.*, 2014).

Penelitian terkait aktivitas farmakologis yang pernah dilaporkan antara lain sebagai agen profilaksis, antioksidan, hepatoprotektif, insektisida dan acarisida, anti mikroba, anti amoba, anti diabetes, hipokolesterol, analgetik, imunomodulator, anti inflamasi, anti kanker, anti depresan, anti ulkus, efek pada sistem kardiovaskular, efek pada sistem pernafasan (Ahmad *et al.*, 2020). Senyawa utama yang terkandung di dalam kemukus adalah golongan lignan, lignan yang berhasil diisolasi dari ekstrak etanolik antara lain kubebin, yatein, dihidroclusin, clusin, haplomirfolin, veratraldehid (Arruda *et al.*, 2019). Kemukus memiliki aroma yang kuat, aroma tersebut berasal dari minyak atsiri yang terkandung di dalam biji antara lain hidrokarbon sesquiterpen, β -kariofilen, δ -sadinen, α dan β -cubeben serta sejumlah kecil monoterpen (Salehi *et al.*, 2019).

Kemukus banyak digunakan oleh industri obat tradisional sebagai komponen jamu untuk sesak nafas (Wahyono, 2005). Bahan baku herbal diperoleh dari tanaman budidaya dan tanaman liar, namun sebagian besar pengadaannya diambil dari tanaman liar dari berbagai tempat yang berbeda, sedangkan tanaman herbal yang digunakan dari hasil budidaya masih terbatas. Perbedaan lokasi tumbuh tanaman menyebabkan variasi kandungan zat aktif. Terjadinya variasi pada kandungan zat aktif menjadi salah satu faktor penting untuk proses standarisasi (Lubbe & Verpoorte, 2011). Kebutuhan industri akan bahan baku herbal

semakin meningkat (Balekundri & Mannur, 2020), menyebabkan standardisasi menjadi tahapan yang penting dalam pengembangan obat bahan alam untuk memperoleh konsistensi profil kimia, aktivitas biologis, serta *quality assurance* pada tahapan produksinya (Bajpai, 2012). Pada penelitian ini, kadar kubebin digunakan sebagai merupakan parameter utama dalam pemilihan sumber bahan baku, sebab standardisasi yang mengacu pada senyawa marker menjadi hal yang sangat penting untuk menilai kualitas produk obat bahan alam dalam memberikan gambaran fitokonstituen serta untuk memantau keajegan betas ke betas produk akhir (Gaonkar *et al.*, 2020), kadar kubebin ditetapkan dengan kromatografi lapis tipis (KLT) densitometri karena teknik ini bisa digunakan untuk mengidentifikasi senyawa marker (Masoodi *et al.*, 2021). Buah kemukus dengan kadar kubebin yang tertinggi selanjutnya dilakukan standardisasi non spesifik mengacu pada Farmakope Herbal Indonesia dan *WHO Guidelines*. Sediaan kapsul merupakan bentuk sediaan yang paling feasibel dalam memformulasikan suatu bahan aktif dari ekstrak. Tingkat kemudahan dan kepraktisan dalam formulasi sediaan kapsul menjadi pilihan utama dalam merancang sediaan kapsul herbal kemukus. Penelitian terkait standarisasi ekstrak buah kemukus yang diformulasikan ke dalam sediaan kapsul belum pernah dilaporkan sampai saat ini. Penelitian ini bertujuan untuk mengetahui pengaruh perbedaan tempat tumbuh terhadap randemen ekstrak dan kadar senyawa kubebin. Selain itu juga untuk menetapkan standardisasi parameter spesifik dan non-spesifik dari ekstrak dengan kadar kubebin tertinggi sebagai bahan baku untuk pembuatan sediaan kapsul jamu sesak nafas.

2. Bahan dan Metode

2.1. Bahan

Bahan yang digunakan dalam penelitian ini adalah buah kemukus yang diambil dari tiga daerah yaitu Kulonprogo, Magelang, dan Wonosobo. Etanol teknis 70% diperoleh dari pemasok lokal (General Labora, Yogyakarta Indonesia) digunakan untuk proses ekstraksi. Plat KLT silica gel 60 GF₂₅₄, diklorometana, toluene, etil asetat, dan asam sulfat diperoleh dari Merck (Darmstadt, Jerman). Standar kubebin diperoleh dari Extrasynthese (Genay, Perancis). Fumed silica (Aerosil SH200), amilum sagu, dan cangkang kapsul berderajat farmasetis dibeli dari supplier local (General Labora, Yogyakarta Indonesia).

2.2. Metode

2.2.1. Identifikasi tanaman secara makroskopis

Identifikasi tanaman dilakukan secara makroskopis meliputi ukuran, warna, karakteristik permukaan, tekstur, bau, dan rasa pada simplisia buah kemukus (World Health Organization, 2011).

2.2.2. Pembuatan ekstrak

Metode pembuatan ekstrak mengacu pada Farmakope Herbal Indonesia (Kementerian Kesehatan RI, 2017). Ekstrak dari masing-masing tempat tumbuh yang berbeda dibuat secara terpisah dengan metode maserasi. Cairan penyari yang digunakan adalah etanol 70% dengan perbandingan 10:1 terhadap bahan. Proses maserasi dilakukan selama 1x24 jam kemudian diikuti dengan proses remaserasi dengan perbandingan pelarut dan waktu/lama perendaman yang sama. Ekstrak kemudian dipekatkan menggunakan *rotary evaporator* sehingga diperoleh ekstrak kental. Ekstrak yang diperoleh kemudian ditentukan kadar kubebin dan distandarisasi sebelum diformulasikan ke dalam sediaan granul.

2.2.3. Penetapan kadar kubebin ekstrak kemukus dari Kulonprogo, Magelang, dan Wonosobo

Penetapan kadar kubebin dilakukan dengan menggunakan kromatografi lapis tipis-densitometri. Fase diam yang digunakan adalah silika gel GF₂₅₄ sedangkan fase gerak adalah diklorometana:etil asetat (8:2). Deteksi yang digunakan UV₂₅₄, UV₃₆₆ dan pereaksi penampak bercak H₂SO₄ etanolik (Wagner & Bladt, 1996; Wahyono, 2005). Penotolan dilakukan dengan alat Linomat Camag 5 Auto Applier sebanyak 5 µL untuk ekstrak dan beberapa seri konsentrasi kubebin (10 µg/µL) dengan volume 1, 2, 4, 6, 8, dan 10 µL. Setelah proses elusi, plat KLT dipindai menggunakan Camag 3 densitometer (Tokyo, Jepang) pada panjang gelombang 289 nm. Kurva kalibrasi antara jumlah kubebin dan luas puncak dianalisis menggunakan analisa regresi linear sederhana digunakan untuk penetapan kadar kubebin dalam sampel buah kemukus. Penetapan spesifitas, batas deteksi minimal, presisi dan penetapan kadar kubebin mengacu pada penelitian sebelumnya (Pillai & Pandita, 2016). Hasil penetapan kadar kubebin dari tiga tempat tumbuh dengan kadar tertinggi selanjutnya dilakukan standarisasi non spesifik pada simplisia dan ekstrak buah kemukus.

2.2.4. Standarisasi simplisia kemukus

Standarisasi simplisia kemukus dilakukan dengan beberapa parameter yaitu susut pengeringan, kadar air, kadar abu, kadar abu tak larut asam, cemaran logam berat, residu pestisida, dan aflatoksin total.

- Susut pengeringan

Sampel sejumlah 1gram diletakkan pada wadah sampel yang terdapat di dalam alat OHAUS MB-01 *moisture analyzer balance* (Sanghai, Tiongkok). Alat dinyalakan suhu diatur 105°C, lalu ditunggu sampai bobot tetap. Angka yang muncul dinyatakan sebagai persentase bobot yang hilang merupakan hasil susut pengeringan (World Health Organization, 2011)

- Kadar air

Sampel yang digunakan sebanyak 5 gram dimasukkan ke dalam alat destilasi toluen. Volume air yang terukur dibaca setelah toluen dan air memisah secara sempurna. Kadar air dihitung sebagai volume dalam bobot dengan nilai tidak lebih dari 10 % (Kementerian Kesehatan RI, 2017).

- Kadar abu

Sampel ditimbang sebanyak 2 gram, kemudian dimasukkan ke dalam krus silikat yang telah dipijarkan dan ditara. Krus dipijarkan sampai arang habis kemudian didinginkan dan ditimbang. Kadar abu dihitung terhadap bahan yang telah dikeringkan di udara (World Health Organization, 2011)

- Kadar abu tak larut asam

Abu yang diperoleh dari penetapan kadar abu dididihkan dengan 25 mL asam sulfat encer P selama 5 menit. Bagian yang tidak larut asam dikumpulkan dan disaring melalui kertas saring bebas abu, kemudian dicuci dengan air panas. Hasil cucian kemudian dipijarkan sampai bobot konstan lalu ditimbang. Kadar abu yang tidak larut asam dihitung terhadap bahan yang telah dikeringkan di udara (World Health Organization, 2011).

- Cemar logam berat

Penetapan kadar logam berat meliputi Merkuri (Hg), Timbal (Pb), Cadmium (Cd) dan Arsen (As) menggunakan instrumen spektroskopi serapan atom (The United States Pharmacopeial Convention, 2017).

- Residu pestisida

Penetapan residu pestisida dilakukan terhadap golongan organoklor dan organofosfat menggunakan instrumen kromatografi gas-spektroskopi massa. Sebanyak 10 jenis kontaminan yang dianalisis antara lain Oxychlorane, DDT, Gamma-BHC, Endosulfan II, Heptachlor, Aldrin, Hexachlorbenzen, Chlorothalonil, 4,4-DDE dan 4,4 DDT (Reynolds, 2019).

- Aflatoksin total

Penetapan aflatoksin total (B1, B2, G1 dan G2) menggunakan instrumen LC-MS/MS (Bessaire *et al.*, 2019).

2.2.5. Standardisasi ekstrak kemukus

Standardisasi terhadap ekstrak dilakukan setelah hasil standardisasi pada simplisia kemukus memenuhi persyaratan. Adapun pengujian yang dilakukan antara lain :

- Kadar air

Sampel yang digunakan sebanyak 5 gram dimasukkan ke dalam alat destilasi toluen. Volume air yang terukur dibaca setelah toluen dan air memisah secara sempurna. Kadar air

dihitung sebagai volume dalam bobot dengan nilai tidak lebih dari 10% (Kementerian Kesehatan RI, 2017)

- Kadar Minyak Atsiri

Penetapan kadar minyak atsiri menggunakan alat destilasi. Metode uji mengacu pada Farmakope Herbal Indonesia (Kementerian Kesehatan RI, 2017).

- Cemaran mikroba

Penetapan cemaran mikroba mengacu pada *WHO Guidelines* (World Health Organization, 2011) meliputi uji angka kapang khamir (AKK), angka lempeng total (ALT) dan Uji Mikroba patogen (*Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Salmonella sp* dan *Shigella sp*) (Ratajczak *et al.*, 2015).

2.2.6. Pembuatan granul ekstrak buah kemukus

Ekstrak kental yang dihasilkan diuji viskositasnya dengan alat viskosimeter. Pembuatan granul menggunakan bahan tambahan amilum sagu dan aerosil dengan perbandingan sebagai berikut seperti pada Tabel 1. Pembuatan granul dilakukan dengan mencampur ekstrak kental dengan Aerosil kemudian ditambahkan amilum sagu sedikit demi sedikit sampai diperoleh masa elastis. Massa elastis diayak menggunakan ayakan 16 mesh kemudian dikeringkan menggunakan oven pada suhu 40°C selama 3 jam. Granul kering kemudian dispherinisasi menggunakan ayakan 18 mesh. Granul yang diperoleh kemudian dilakukan evaluasi.

Tabel 1. Rancangan formula kapsul ekstrak kemukus dengan variasi amilum sagu dan Aerosil menggunakan *factorial design*.

Rancangan Formula	Berat ekstrak kering (g)	Amilum sagu (g)	Aerosil (g)
I (A1, A2 dan A3)	112	100	15
II (B1, B2 dan B3)	112	150	15
III (C1, C2 dan C3)	112	100	20
IV (D1, D2 dan D3)	112	150	20

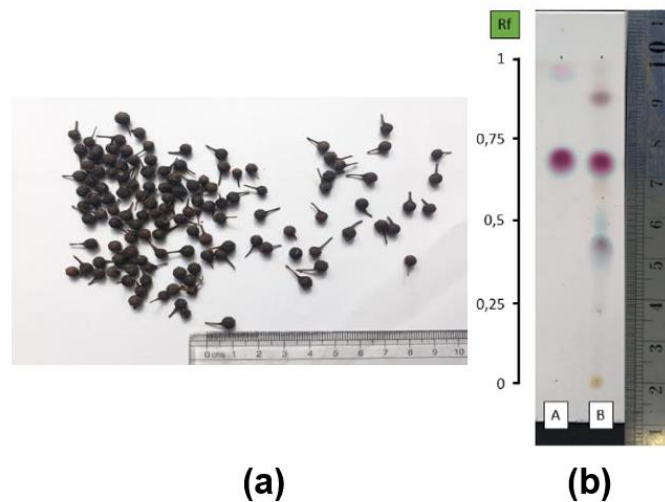
2.2.7. Uji sifat fisik granul

Uji sifat fisik granul meliputi susut pengeringan, indeks pengetapan, sifat alir, densitas, sudut diam, daya serap dan diameter granul. Susut pengeringan dilakukan dengan alat moisture analyzer balance. Sudut diam dan kemampuan mengalir diukur menggunakan digital flowmeter (Erweka). Densitas dan indeks pengetapan diukur menggunakan *tapping device* Erweka. Daya serap air diukur menggunakan alat modifikasi daya serap berbasis timbangan analitik. Hasil karakterisasi granul dianalisis menggunakan pendekatan analisis regresi linear berganda menggunakan pendekatan *factorial design*. Analisis statistik yang diimplementasikan pada *factorial design* berbasis analisis regresi linear berganda menggunakan taraf kepercayaan 95% ($p\text{-value} = 0,05$).

3. Hasil dan Pembahasan

3.1. Identifikasi buah kemukus secara makroskopi

Identifikasi buah kemukus secara makroskopi diketahui bahwa buah berwarna hitam bertangkai dengan permukaan luar berkerut seperti anyaman jala seperti yang terlihat pada Gambar 1 (a). Buah kemukus berdiameter sekitar 0,5 cm serta memiliki bau yang khas, rasa agak pedas, dan pahit.



Gambar 1. Buah kemukus (*Piper cubeba* Lf) (a) dan profil kromatografi lapis tipis standar kubebin (A) dan ekstrak kemukus (B) menggunakan fase gerak diklorometan:etil asetat (8:2) dan fase diam silica gel GF_{245nm} menggunakan deteksi asam sulfat (5%) dalam etanol (b).

Analisis secara mikroskopi tidak dilakukan karena bahan baku diperoleh dalam bentuk simplisia utuh yang sudah dipastikan bahwa simplisia yang digunakan adalah buah kemukus (*Piper cubeba* Lf.). Analisis mikroskopi perlu dilakukan terhadap bahan baku herbal yang sukar diidentifikasi secara makroskopi. Buah kemukus dari Wonosobo memiliki ukuran yang relatif lebih besar dibandingkan buah kemukus dari Magelang dan Kulonprogo. Hal tersebut dipengaruhi oleh perbedaan iklim, komposisi dan komponen tanah dimana tanaman tersebut tumbuh (Balekundri & Mannur, 2020).

3.2. Rendemen ekstrak

Rendemen yang dihasilkan dari pembuatan ekstrak buah kemukus secara maserasi (Tabel 2) sesuai dengan baku mutu yang dipersyaratkan oleh Farmakope Herbal Indonesia (Kementerian Kesehatan RI, 2017). Rendemen ekstrak dari ketiga tempat tumbuh memenuhi baku mutu Farmakope Herbal Indonesia, dengan hasil tertinggi adalah ekstrak buah kemukus dari Wonosobo. Jumlah rendemen tersebut menggambarkan komponen yang dapat terekstrak dari simplisia buah kemukus. Semakin tinggi rendemen komponen terekstrak semakin tinggi. Akan tetapi belum menggambarkan kandungan kubebin secara langsung

Tabel 2. Randemen hasil ekstraksi buah kemukus dari Kulonprogo, Magelang, dan Wonosobo.

Daerah asal	Randemen (%)	Baku mutu (%)
Kulonprogo	14,11	
Magelang	9,32	> 8,2
Wonosobo	19,26	

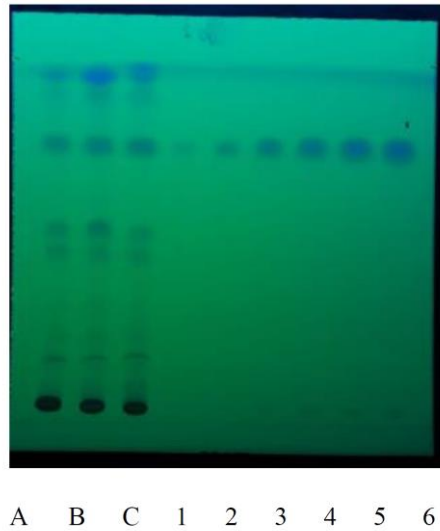
3.3. Hasil penetapan kadar kubebin ekstrak kemukus dari Kulonprogo, Magelang, dan Wonosobo

Penetapan senyawa marker menjadi pekerjaan rutin di industri obat bahan alam oleh karena itu metode yang dipilih yaitu kromatografi lapis tipis karena relatif sederhana, simpel serta mampu memisahkan sampel secara selektif, sensitif, dan handal (Kalász & Báthori, 2020). Identifikasi serta penetapan kadar metabolit dalam suatu ekstrak/simplisia perlu dilakukan untuk menjamin standarisasi mutu ekstrak (Marliyana *et al.*, 2021). Skrining awal keberadaan kubebin di dalam ekstrak kemukus bisa dilihat pada Gambar 2. Bercak yang diduga sebagai kubebin berwarna merah jambu dengan hrf 67. Warna ungu muncul karena reaksi antara kubebin dengan pereaksi penampak bercak H_2SO_4 (Wagner & Bladt, 1996). Keberadaan kubebin secara kualitatif pada ekstrak kemukus sesuai dengan baku mutu (Kementerian Kesehatan RI, 2017). Gambar 1 (b) menunjukkan bahwa bercak pada ekstrak memiliki nilai hrf yang relatif sama dengan baku mutu kubebin.

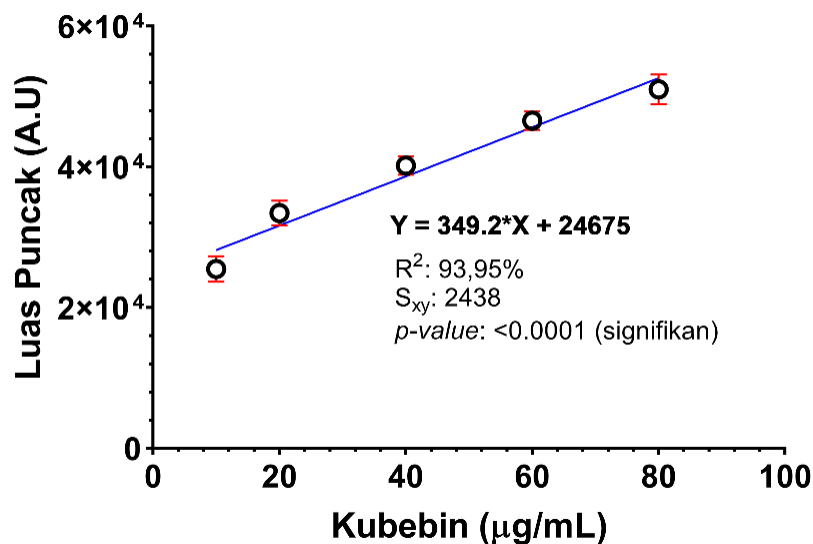
Analisis kuantitatif untuk mengukur kadar kubebin dilakukan pada ekstrak kemukus dari daerah Kulonprogo, Magelang, dan Wonosobo. Ekstrak yang telah dipreparasi dielusi dengan berbagai seri konsentrasi mutu baku kubebin pada kondisi yang sama. Hasil visualisasi plat KLT di bawah sinar UV 254 disajikan pada Gambar 2. Hasil menunjukkan bahwa kubebin dalam ketiga sampel memiliki pola hrf yang relatif sama dengan baku mutu kubebin. Selain itu, perbedaan intensitas pada sampel secara kualitatif menunjukkan perbedaan kandungan kubebin dalam sampel. Intensitas pada sampel ekstrak kemukus dari daerah Kulonprogo secara visual memiliki intensitas yang paling lemah dibandingkan sampel lainnya. Hasil KLT penunjukkan pola pemisahan bercak yang sempurna sehingga metode yang diaplikasikan memiliki spesifitas yang baik.

Plat KLT kemudian dianalisis secara densitometri sehingga diperoleh luas puncak pada nilai hrf yang sejajar dengan baku kubebin sehingga diperoleh kurva kalibrasi dan persamaan garis regresi yang disajikan pada Gambar 3. Hasil menunjukkan bahwa kadar kubebin menunjukkan pengaruh yang bermakna terhadap peningkatan luas puncak kubebin ($p < 0,05$). Parameter goodness of fit (R^2 dan residual (S_{xy})) menunjukkan bahwa model Persamaan regresi memiliki pengaruh sebesar 93,95% dengan nilai residual 9,88% dengan Persamaan regresi $y = 934,2x + 24675$ dengan y adalah luas puncak dan x adalah kadar kubebin. Validasi metode analisis KLT densitometri menunjukkan bahwa linearitas yang tinggi dengan nilai

koefisien korelasi sebesar 0,9693. Hasil analisis spesifitas berdasarkan pola pemisahan bercak ditunjukkan bahwa bercak yang identik dengan baku mutu kubebin terpisah dengan komponen lainnya. Hasil analisa presisi dilihat dari variabilitas luas puncak diperoleh nilai sebesar 7,5% (Tabel 3). Beberapa parameter validasi tersebut menunjukkan bahwa model regresi ini valid dan reliabel untuk mengkuantifikasi kadar kubebin dalam ekstrak kemukus.



Gambar 2. Visualisasi plat KLT ekstrak kemukus berasal dari Kulonprogo (A), Magelang (B), dan Wonosobo (c) dan variasi standar kubebin (1, 2, 3, 4, 5, dan 6 μL) (1-6) di bawah sinar UV 254 nm menggunakan fase diam silica gel GF254 dan fase gerak diklorometan:etil asetat (8:2).



Gambar 3. Kurva kalibrasi kubebin menggunakan teknik densitometri.

Hasil pengukuran kadar kubebin pada buah kemukus dari tiga daerah bisa disajikan pada Gambar 4. Hasil kadar kubebin dalam ekstrak kemukus menunjukkan bahwa tidak ada perbedaan bermakna dari ketiga daerah ($p > 0,05$), sehingga secara kualitatif perbedaan daerah tidak mempengaruhi kadar kubebin pada ekstrak kemukus. Akan tetapi, rendemen yang lebih

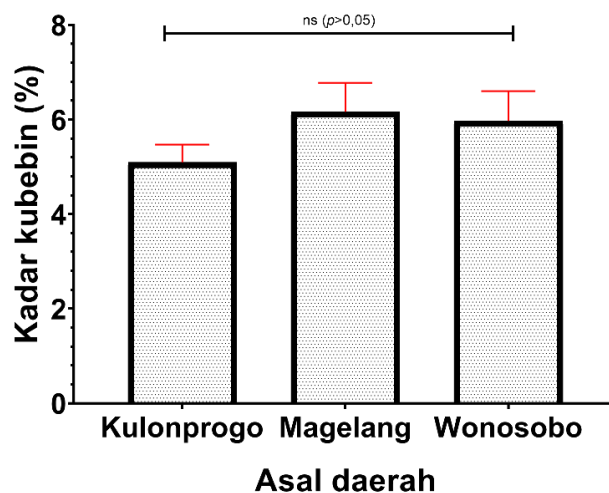
tinggi pada ekstrak kemukus yang diperoleh dari daerah Wonosobo (19,26%) dapat diperoleh jumlah kubebin yang lebih banyak dibandingkan dengan daerah Kulonprogo (14,11%) dan Magelang (9,32%).

Tabel 3. Hasil analisis presisi kubebin pada penetapan kadar kubebin dalam ekstrak kemukus.

No	Faktor retensi (rf)	Luas puncak
1.	0,74	31505,29
2.	0,84	31414,07
3.	0,79	37471,45
4.	0,69	33849,06
5.	0,64	34978,47
	Nilai Rerata	33843,67
	SD	2540,65
	CV (%)	7,51

3.4. Standardisasi simplisia buah kemukus dari daerah Wonosobo

Buah kemukus dari Wonosobo dipilih sebagai sumber bahan baku karena memiliki beberapa keunggulan dibandingkan buah kemukus dari Kulonprogo dan Magelang yaitu ketersediaan bahan baku, randemen ekstrak serta kadar kubebin paling tinggi. Hasil standardisasi simplisia kemukus seperti yang tertera pada Tabel 4.



Gambar 4. Hasil penetapan kadar kubebin pada buah kemukus dari daerah Kulonprogo, Magelang dan Wonosobo. Keterangan: ns = tidak berbeda bermakna ($p > 0,05$).

Penetapan parameter non spesifik dimulai dari bahan baku simplisia sebab bahan awal yang digunakan adalah masih dalam bentuk simplisia. Berdasarkan pengujian hampir semua parameter memenuhi persyaratan kecuali susut pengeringan. Susut pengeringan menggambarkan banyaknya senyawa yang hilang selama proses pemanasan pada suhu 105 °C. Kemukus kaya akan minyak atsiri, sehingga pada susut pengeringan, jumlah yang hilang bukan hanya air saja tetapi juga keberadaan minyak atsiri. Kemudian dilakukan uji kadar air untuk mengoreksi, hasil uji kadar air menunjukkan hasil yang memenuhi persyaratan. Hasil uji menunjukkan bahwa simplisia dan ekstrak buah kemukus memenuhi baku mutu

standardisasi yang telah ditetapkan (Andayani & Nugrahani, 2018; Departemen Kesehatan, 2000; Kementerian Kesehatan RI, 2017)

Tabel 4. Hasil penetapan parameter non spesifik simplisia buah kemukus dari Wonosobo. Keterangan: *NLT-Not Less Than* (tidak kurang dari) dan *NMT-Not More Than* (tidak lebih dari).

No	Parameter	Hasil	Syarat
1.	kadar minyak atsiri	10,93 %	NLT 0,75 %
2.	Susut pengeringan	11,33 %	NMT 10 %
3.	Kadar air	4,43 %	NMT 10%
4.	Kadar abu	5,98 %	NMT 8,1%
5.	Kadar abu tak larut asam	0,34 %	NMT 0,7%
6.	Cemaran logam berat		
	Hg	Tidak terdeteksi	NMT 5 ppm
	Pb	0,42 ppm	NMT 10 ppm
	Cd	Tidak terdeteksi	NMT 0,3 ppm
	As	Tidak terdeteksi	NMT 0,5 ppm
7.	Residu pestisida		
	Oxychlordane	Tidak terdeteksi	NMT 0,00500
	DDT	Tidak terdeteksi	NMT 0,00024
	Gamma-BHC	Tidak terdeteksi	NMT 0,00300
	Endosulfan II	Tidak terdeteksi	NMT 0,00200
	Heptachlor	Tidak terdeteksi	NMT 0,00100
	Aldrin	Tidak terdeteksi	NMT 0,00170
	Hexachrolbenzen	Tidak terdeteksi	NMT 0,00200
	Chlorothalonil	Tidak terdeteksi	NMT 0,00100
	4,4-DDE	Tidak terdeteksi	NMT 0,00100
	4,4 DDT	Tidak terdeteksi	NMT 0,00024
8.	Aflatoksin total	Negatif	NMT 0,03000

Kadar air simplisia kemukus bisa dikatakan rendah yaitu sebesar 4,43%. Hal ini bisa diamati, bahwa simplisia kemukus relatif lebih awet dan tidak mudah berjamur meskipun sudah disimpan dalam kurun waktu yang lama. Kadar air menggambarkan keberadaan air yang masih ada di dalam bahan, kadar air yang terlalu tinggi menyebabkan tanaman rentan ditumbuhi mikroba. Keberadaan air juga memicu terjadinya reaksi enzimatik yang bisa berpengaruh terhadap perubahan struktur kimia dari senyawa aktif. Kadar air pada ekstrak kemukus relatif rendah yaitu sebesar 4,33%. Kadar air yang cukup rendah pada ekstrak membantu kondisi ekstrak tetap awet.

Kadar minyak atsiri pada simplisia sebesar 10,93% jauh lebih tinggi dari pada baku standarnya. Keberadaan minyak atsiri di dalam ekstrak kemukus ikut berperan dalam aktivitas farmakologi. Bersama dengan kubebin memiliki efek yang sinergis untuk gangguan asma (Departemen Kesehatan, 2000). Kandungan minyak atsiri yang terdapat pada buah kemukus terdiri dari golongan alkohol trisiklik sesquiterpen; 1,4-sineol, terpineol-4, kadinol dan kadinen (Wagner & Bladt, 1996) tidak seperti minyak atsiri golongan monoterpen, alkohol

trisiklik sesquiterpen cenderung sukar menguap dan terdapat dalam wujud seperti minyak lemak yang mudah diamati pada saat proses penguapan ekstrak. Hal ini bisa dilihat dari nilai kadar minyak atsiri yang terkandung di dalam ekstrak kemukus masih cukup tinggi yaitu 22,25%. Minyak-minyak yang ada dalam ekstrak kemukus menyebabkan proses pengentalan ekstrak relatif lama dibandingkan dengan ekstrak lain.

3.5. Standardisasi ekstrak kemukus

Hasil standardisasi ekstrak kemukus bisa dilihat pada Tabel 5. Data yang diperoleh dibandingkan dengan monografi Farmakope Herbal Indonesia (Kementerian Kesehatan RI, 2017). Pengujian aflatoxin, residu pestisida dan logam berat, hanya dilakukan pada simplisia, karena hasil pengujian ini tidak terpengaruh oleh proses pengolahan sehingga hasil pengujian pada simplisia bisa menggambarkan hasil pada ekstrak. Sedangkan cemaran mikroba seperti angka lempeng total (ALT) dan angka kapang/khamir (AKK) serta mikroba patogen sangat dipengaruhi oleh kondisi penyimpanan dan proses pengolahan, sehingga pengujian pada simplisia tidak dilakukan. Pengujian cemaran mikroba dilakukan pada ekstrak kental dan produk jadi.

Tabel 5. Kontrol kualitas parameter standar mutu ekstrak buah kemukus dari yang dikoleksi dari Wonosobo.

No	Parameter	Hasil	Syarat
1.	Randemen	22,17 %	NLT 8,2 %
2.	Kadar kubebin	0,56±0,06 %	NLT 0,93 %
3.	Kadar minyak atsiri	22,25 %	NLT 1,40%
4.	Angka kapang/khamir	< 10 CFU/gram	NMT 10 ³ CFU/gram
5.	Angka Lempeng total	< 10 CFU/gram	NMT 10 ⁴ CFU/gram
6.	Kadar air	4,33%	NMT 10% CFU/gram
7.	Mikroba patogen	Negatif	Negatif
	a. <i>Escherichia coli</i>	Negatif	Negatif
	b. <i>Staphylococcus aureus</i>	Negatif	Negatif
	c. <i>Pseudomonas aeruginosa</i>	Negatif	Negatif
	d. <i>Salmonella sp</i>	Negatif	Negatif
	e. <i>Shigella sp</i>	Negatif	Negatif
8.	Angka kapang/khamir	< 10 CFU/gram	NMT 10 ³ CFU/gram

Ekstrak kental kemukus memenuhi semua parameter standar mutu yang ditetapkan Farmakope Herbal Indonesia kecuali kadar kubebin (Tabel 5). Hasil uji viskositas ekstrak kental memiliki nilai sebesar 4,41 ± 0,14 dPas. Selain dilakukan uji yang mengikuti pedoman Farmakope Herbal, juga dilakukan uji cemaran mikroba karena cemaran mikroba bisa terjadi selama proses pembuatan. Hal ini mengikuti monografi parameter standar umum ekstrak tumbuhan obat (Departemen Kesehatan, 2000) dari hasil pengujian, ekstrak kental memenuhi persyaratan batas cemaran mikroba. Cemaran mikroba menjadi acuan selanjutnya ketika ekstrak akan diformulasikan menjadi bentuk sediaan, karena ada batasan minimal yang harus

diikuti ketika produk akan diedarkan. Apabila ekstrak sudah tidak memenuhi persyaratan, maka tidak bisa dilanjutkan menjadi sediaan farmasi. Formulasi sediaan farmasi dilakukan dalam bentuk sediaan granul yang dapat diubah menjadi bentuk sediaan kapsul.

3.6. Uji sifat fisik granul

Granul ekstrak kemukus dievaluasi beberapa parameter yaitu susut pengeringan, indeks pengetapan, waktu alir, densitas ruah, sudut diam, dan daya serap. Hasil evaluasi berdasarkan pendekatan desain factorial dengan Teknik analisis regresi linear berganda menunjukkan bahwa variable yang dikaji yaitu komponen bahan pengisi (amilum sagu) dan bahan pengering (Aerosil; fumed silica) tidak menunjukkan pengaruh yang bermakna terhadap semua parameter sifat fisik granul ($p > 0,05$) kecuali indeks pengetapan ($p < 0,05$). Hasil ini disebabkan karena kontribusi dari bahan pengisi dan pengering memberikan efek minor dan tidak dominan jika dibandingkan dengan karakteristik dari ekstrak, sehingga granul yang dibentuk tidak menunjukkan perbedaan yang bermakna.

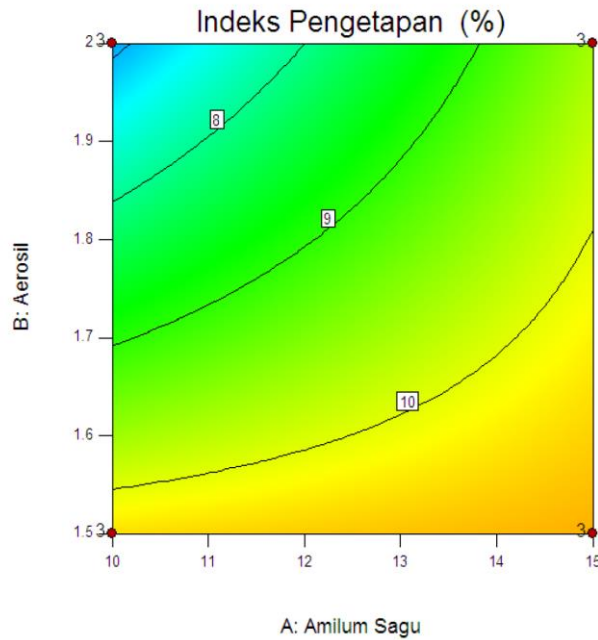
Hasil analisis terhadap parameter indeks pengetapan menggambarkan kemampuan mengalir dari granul. Hasil ini selain dipengaruhi oleh gaya tarik antarpartikel yang dipengaruhi oleh distribusi ukuran partikel dan densitas ruah dari granul ekstrak kemukus. Indeks pengetapan granul ekstrak kemukus yang diperoleh pada rentang 6,01 - 11,52%. Hasil tersebut kemudian dianalisis dengan pendekatan regresi linear berganda dan diperoleh contour plot indeks pengetapan dengan Persamaan regresi linear berganda dan ilustrasi yang disajikan pada Persamaan 1 dan Gambar 5.

$$\text{Indeks pengetapan (\%)} = 9,36 + 0,75 * A - 1,08 * B + 0,62 * A * B$$

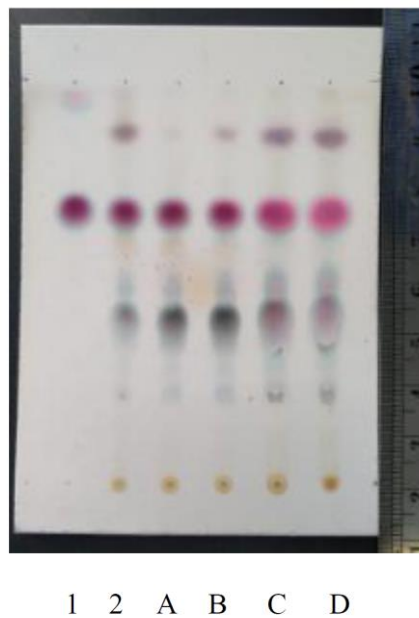
Persamaan 1. Persamaan indeks pengetapan granul ekstrak kemukus menggunakan metode *factorial design*.

Hasil menunjukkan bahwa indeks pengetapan paling rendah (kemampuan mengalir paling bagus) diperoleh pada jumlah amilum sagu paling sedikit dengan Aerosil pada level atas. Hasil ini menunjukkan bahwa semakin tinggi konsentrasi ekstrak kemampuan mengalir akan semakin meningkat karena terbentuk granul yang lebih mampat. Peningkatan indeks pengetapan sebanding dengan peningkatan jumlah amilum sagu dan penurunan jumlah Aerosil. Beberapa contour plot dari parameter sudut diam, densitas, dan daya serap air granul ekstrak buah kemukus yang menunjukkan pengaruh tidak bermakna.

Analisa secara kualitatif granul dan ekstrak dilakukan secara KLT berbasis pada pola bercak dan identifikasi secara kualitatif senyawa kubebin. Hasil disajikan pada Gambar 6 yang menunjukkan bahwa tidak terdapat perubahan pola bercak dan intensitas bercak pada hasil KLT, sehingga menunjukkan bahwa proses granulasi tidak mempengaruhi komponen kandungan metabolit pada ekstrak buah kemukus.



Gambar 5. *Contour plot* indeks pengetapan granul kemukus dengan pendekatan *factorial design*.



Gambar 6. Profil kromatografi lapis tipis dari standar kubenin (1), ekstrak kemukus (2), dan 4 formula granul (A-D) dengan fase diam silica gel GF254 dan fase gerak diklorometan:etil asetat (8:2) menggunakan deteksi semprot 5% asam sulfat dalam etanol.

4. Kesimpulan

Perbedaan tempat tumbuh tidak berpengaruh terhadap kadar kubenin di dalam ekstrak, tetapi berpengaruh terhadap randemen. Serta proses granulasi tidak berpengaruh pada senyawa kubenin. Hasil standardisasi kemukus dari Wonosobo menunjukkan bahwa parameter non-spesifik untuk simplisia dan ekstrak memenuhi persyaratan bahan baku obat tradisional sesuai acuan standar *WHO Guidelines* dan Farmakope Herbal Indonesia. Hasil uji

sifat fisik granul meliputi susut pengeringan, indeks pengetapan, sifat alir, densitas, sudut diam, daya serap granul dan diameter granul menunjukkan bahwa granul ekstrak buah kemukus memenuhi baku mutu yang ditetapkan.

Ucapan Terimakasih

Penulis mengucapkan terima kasih kepada Direktorat Jenderal Pendidikan Tinggi atas hibah PTUPT (Penelitian Terapan Unggulan Perguruan Tinggi) serta kepada pihak-pihak yang memberikan dukungan sehingga penelitian ini dapat terselesaikan.

Deklarasi Konflik Kepentingan

Teuku Nanda Saifullah Sulaiman merupakan salah satu editorial board di JPSCR: Journal of Pharmaceutical Science and Clinical Research, akan tetapi proses evaluasi naskah ini dilakukan sesuai dengan etika publikasi dan diproses sesuai prosedur di JPSCR. Semua penulis tidak memiliki konflik kepentingan apapun terhadap hasil pada hasil penelitian ini.

Daftar Pustaka

- Ahmad, H., Khera, R.A., Hanif, M.A., dan Ayub, M.A., (2020). Cubeb, dalam: *Medicinal Plants of South Asia*. Elsevier, hal. 149–164.
- Alqadeeri, Rukayadi, Abbas, dan Shaari, (2019). Antibacterial and Antispore Activities of Isolated Compounds from Piper cubeba L. *Molecules*, 24: 3095.
- Andayani, D. dan Nugrahani, R., (2018). Skrining Fitokimia dan Aktivitas Antioksidan Ekstrak Etanol Daun Katang-Katang (*Ipomoea pescaprae*. L) dari Pulau Lombok Nusa Tenggara Barat. *JPSCR: Journal of Pharmaceutical Science and Clinical Research*, 02 (3):76–83.
- Arruda, C., Mejía, J.A.A., Pena Ribeiro, V., Costa Oliveira, L., e Silva, M.L.A., dan Bastos, J.K., (2019). Development of a Validated High-Performance Liquid Chromatography Method and Optimization of the Extraction of Lignans from *Piper cubeba*. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 67: 753–759.
- Bajpai, (2012). Standardization of Ethanolic Extract of *Cucurbita Maxima* Seed. *Journal of Applied Pharmaceutical Science*, 02: 92–95.
- Balekundri, A. dan Mannur, V., (2020). Quality control of the traditional herbs and herbal products: a review. *Future Journal of Pharmaceutical Sciences*, 6: 67.
- Bessaire, T., Mujahid, C., Mottier, P., dan Desmarchelier, A., (2019). Multiple Mycotoxins Determination in Food by LC-MS/MS: An International Collaborative Study 18. *Toxins*, 11(11), 658.
- Cahyaningsih, R., Magos Brehm, J., dan Maxted, N., (2021). Gap analysis of Indonesian priority medicinal plant species as part of their conservation planning. *Global Ecology and Conservation*, 26: e01459.
- Departemen Kesehatan, (2000). *Parameter Standar Umum Ekstrak Tumbuhan Obat*. Jakarta : Departemen Kesehatan RI.
- Gaonkar, V.P., Hullatti, K., dan Mannur, V., (2020). Standardization of *Trigonella foenum-graecum* L. Seeds: A Quality by Design Approach. *Indian Journal of Pharmaceutical Education and Research*, 54: 1072–1079.
- Kalász, H. dan Báthori, M., (2020). Chapter 10 Basis and pharmaceutical applications of thin-layer chromatography, dalam: *Handbook of Analytical Separations*. Elsevier, hal. 439–501.

- Kementerian Kesehatan RI, (2017). *Farmakope Herbal Indonesia*, edisi kedua. Jakarta: Kementerian Kesehatan RI
- Lim, T.K., (2012). Piper cubeba, dalam: Lim, T.K. (Editor), *Edible Medicinal And Non-Medicinal Plants: Volume 4, Fruits*. Springer Netherlands, Dordrecht, hal. 311–321.
- Lubbe, A. dan Verpoorte, R., (2011). Cultivation of medicinal and aromatic plants for specialty industrial materials. *Industrial Crops and Products*, 34: 785–801.
- Makmun, M.T. al, Widodo, S.E., dan Sunarto, (2014). Construing Traditional Javanese Herbal Medicine of Headache: Transliterating, Translating, and Interpreting Serat Primbon Jampi Jawi. *Procedia - Social and Behavioral Sciences*, 134: 238–245.
- Marliyana, S.D., Wartono, M.W., dan Dahlia, I. (2021). Steroid B-Sitosterol Dari Kayu Batang Slati (*Calophyllum soulattri* BURM. F), *JPSCR: Journal of Pharmaceutical Science and Clinical Research*, 01:33-40
- Masoodi, K.Z., Lone, S.M., dan Rasool, R.S., (2021). Thin layer chromatography (TLC), dalam: *Advanced Methods in Molecular Biology and Biotechnology*. Elsevier, hal. 143–146.
- Pillai, D. dan Pandita, N., (2016). Validated high performance thin layer chromatography method for the quantification of bioactive marker compounds in Draksharishta, an ayurvedic polyherbal formulation. *Revista Brasileira de Farmacognosia*, 26: 558–563.
- Ratajczak, M., Kubicka, M.M., Kamińska, D., Sawicka, P., dan Długaszewska, J., (2015). Microbiological quality of non-sterile pharmaceutical products. *Saudi Pharmaceutical Journal*, 23: 303–307.
- Reynolds, S. (2019). Analytical Quality Control and Method Validation Procedures for Pesticide Residues Analysis in Food and Feed. *European Commision Directorate General for Health and Food Safety*, SANTE/12682/2019: 52.
- Salehi, B., Zakaria, Z.A., Gyawali, R., Ibrahim, S.A., Rajkovic, J., Shinwari, Z.K., Khan, T., Sharifi-Rad, J., Ozleyen, A., Turkdomez, E., Valussi, M., Tumer, T. B., Fidalgo, L.M., Martorell, M., dan Setzer, W.N. (2019). Piper Species: A Comprehensive Review on Their Phytochemistry, Biological Activities dan Applications. *Molecules*, 24: 1364.
- The United States Pharmacopeial Convention, (2017). *Elemental Impurities-Limits*. Rockville : First Supplement to USP 40–NF 35. <https://www.usp.org/sites/default/files/usp/document/our-work/chemical-medicines/key-issues/232-40-35-1s.pdf>.
- Wagner, H., dan Bladt, S., (1996). *Plant Drug Analysis: A Thin Layer Chromatography Atlas* Second Edition, 248-250. Sydney : Springer Science & Business Media.
- Wahyono, (2005). Isolation dan Structure Elucidation of Tracheospasmodic Compounds from Piper cubeba L.f Friuts and Their Possibility as Anti Inflammatory Activity, *Disertasi*, Yogyakarta : Universitas Gadjah Mada.
- World Health Organization (Editor), (2011). *Quality Control Methods for Herbal Materials*, Updated edition of Quality control methods for medicinal plant materials, 1998. ed. Geneva : World Health Organization.

