

**ISOLASI SENYAWA FLAVONOID DARI FRAKSI ETIL ASETAT DAUN
GAHARU (*Aquilaria malaccensis* Lam.)**

Laporan Tugas Akhir

**INTAN LISTIYOWATI
11171139**



**Universitas Bhakti Kencana
Fakultas Farmasi
Program Strata I Farmasi
Bandung
2020**

LEMBAR PENGESAHAN

**ISOLASI SENYAWA FLAVONOID DARI FRAKSI ETIL ASETAT DAUN GAHARU
(*Aquilaria malaccensis* Lam.)**

Laporan Tugas Akhir

Diajukan untuk memenuhi persyaratan kelulusan Sarjana Farmasi

**INTAN LISTIYOWATI
11171139**

Bandung, 22 Juni 2021

Menyetujui,

Pembimbing Utama,

Pembimbing Serta,



(Apt. Aris Suhardiman, M.Si)
NIDN. 0401018308



(Dr. Apt. Raden Herni Kusriani, M.Si)
NIDN. 0001037701

ABSTRAK**ISOLASI SENYAWA FLAVONOID DARI FRAKSI ETIL ASETAT DAUN
GAHARU (*Aquilaria malaccensis* Lam.)**

Oleh :
Intan Listiyowati
1117119

Gaharu jenis *Aquilaria malaccensis* Lam. memiliki kandungan senyawa bioaktif yang melimpah. Senyawa tersebut adalah alkaloid, saponin, flavonoid, tannin, terpenoid. Karena kandungan senyawa bioaktifnya yang melimpah gaharu banyak dimanfaatkan sebagai obat. Dimana penelitian ini berujuan untuk mengisolasi senyawa flavonoid dari fraksi etil asetat daun gaharu (*Aquilaria malaccensis* Lam.). **Metode Penelitian :** Isolasi dimulai dengan ekstraksi menggunakan metode sokletasi dengan pelarut etanol 96%, fraksinasi menggunakan metode ECC dengan pelarut n-heksan, etil asetat dan metanol-air. Pemantauan fraksi menggunakan metode KLT, pemisahan senyawa menggunakan kromatografi kolom kemudian hasil pemisahan diidentifikasi menggunakan metode HPLC dan LCMS. **Hasil penelitian :** Diperoleh randemen ekstrak sebesar 10,95%, randemen fraksi n-heksan 10,97%, randemen fraksi etil asetat 15,54% dan randemen fraksi metanol:air 17,21%. Fraksi yang dipisahkan menggunakan kromatografi kolom adalah fraksi etil asetat dengan hasil pemisahan yang belum murni namun diduga didalam sub fraksi hasil pemisahan yang belum murni terdapat senyawa flavonoid. Yang kemudian fraksi tersebut diidentifikasi menggunakan HPLC dengan hasil puncak utama dengan waktu retensi 9,3 min dan menggunakan LCMS pada puncak ke 6 dengan waktu retensi 6,63 min. **Kesimpulan :** Berdasarkan hasil isolasi belum didapatkan senyawa murni dari fraksi etil asetat daun gaharu (*Aquilaria malaccensis* Lam.). Namun berdasarkan hasil identifikasi sub fraksi yang diperoleh dari hasil kolom menggunakan HPLC dan LCMS diduga terdapat senyawa mangiferin dengan waktu retensi 9,393 min dan berat molekul sebesar 367.

Kata Kunci : Isolasi, Fraksi Etil Asetat, Daun Gaharu.

ABSTRACT**ISOLATION OF FLAVONOIDS FROM THE ETHYL ACETATE FRACTION OF GAHARU LEAVES (*Aquilaria malaccensis* Lam.)**

By:
Intan Listiyowati
11171139

Agarwood species *Aquilaria malaccensis* Lam. contains abundant bioactive compounds. These compounds are alkaloids, saponins, flavonoids, tannins, terpenoids. Due to the abundant content of bioactive compounds, agarwood is widely used as medicine. Where this study aims to isolate flavonoid compounds from the ethyl acetate fraction of gaharu leaves (*Aquilaria malaccensis* Lam.). **Research Method** : Isolation started with extraction using soxhletation method with 96% ethanol solvent, fractionation using ECC method with n-hexane, ethyl acetate and methanol-water as solvents. Monitoring the fraction using the TLC method, separating the compounds using column chromatography and then identifying the results of the separation using the HPLC and LCMS methods. **The results of the study** : The yield of the extract was 10.95%, the yield of the n-hexane fraction was 10.97%, the yield of the ethyl acetate fraction was 15.54% and the yield of the methanol:water fraction was 17.21%. The fraction that was separated using column chromatography was the ethyl acetate fraction with impure separation results, but it was suspected that in the impure sub-fraction there were flavonoid compounds. The fraction was then identified using HPLC with the main peak yielding a retention time of 9.3 min and using LCMS at the 6th peak with a retention time of 6.63 min. **Conclusion** : Based on the results of the isolation, pure compounds have not been obtained from the ethyl acetate fraction of gaharu leaves (*Aquilaria malaccensis* Lam.). However, based on the identification of the sub-fraction obtained from the column results using HPLC and LCMS, it is suspected that there is a mangiferin compound with a retention time of 9.393 min and a molecular weight of 367.

Keywords: Isolation, Ethyl Acetate Fraction, Agarwood Leaf.

KATA PENGANTAR

Alhamdulillahirobbil'alamin, Puji syukur kehadiran Allah SWT penulis panjatkan atas segala limpahan rahmat dan karunia yang diberikan. Shalawat serta salam juga penulis panjatkan kepada Nabi Besar Muhammad SAW, Keluarga dan Sahabatnya. Saya sebagai penulis sangat bersyukur dapat menyelesaikan laporan tugas akhir yang berjudul **“ISOLASI SENYAWA FLAVONOID DARI FRAKSI ETIL ASETAT DAUN GAHARU (*Aquilaria malaccensis* Lam.)”**. Dimana penulisan tugas akhir ini ditujukan sebagai syarat untuk mendapatkan gelar Sarjana Farmasi di Universitas Bhakti Kencana.

Saya sebagai penulis menyadari bahwa laporan tugas akhir saya ini jauh dari kata sempurna. Maka dari itu penulis mengharapkan kritik dan saran dari semua pihak agar menghasilkan karya ilmiah yang lebih baik. Tidak lupa saya sebagai penulis mengucapkan terimakasih yang tak terhingga kepada :

1. Kedua orang tua saya yang selalu mendukung, memberi semangat, dan mendoakan saya sehingga saya dapat menyelesaikan Laporan Tugas Akhir ini.
2. Apt. Aris Suhardiman, M.Si. selaku pembimbing utama yang sudah banyak membantu, memberi arahan, saran, bimbingan, nasihat yang tulus dan penuh kesabaran kepada saya selama penelitian berlangsung dan selama penulisan Laporan Tugas Akhir ini.
3. Dr. Apt. Raden Herni K, M.Si. selaku pembimbing serta atas segala arahan, saran, bimbingan, dan nasihatnya selama penelitian berlangsung dan selama penulisan Laporan Tugas Akhir ini.
4. Para dosen pengajar, staf kampus dan laboran atas bantuan yang diterima selama mengikuti perkuliahan di Universitas Bhakti Kencana Bandung.
5. Rekan satu bimbingan penelitian yang telah melaksanakan bimbingan serta berjuang bersama dalam penelitian dan penyusunan Tugas akhir sehingga penulis dapat menyelesaikan laporan tugas akhir ini.
6. Sahabat, teman hidup, dan teman sejawat angkatan 2017 serta semua pihak yang telah membantu dan mendukung yang tidak dapat disebutkan satu persatu.

Semoga Allah SWT selalu memberikan rahmat dan karunianya untuk membalas kebaikan semua pihak. Penulis sangat berharap semoga setitik dan seberkas tulisan ini dapat bermanfaat bagi seluruh pihak terutama dilingkungan Fakultas Farmasi Universitas Bhakti Kencana.

Bandung, 25 Juni 2021

Penulis

DAFTAR ISI

ABSTRAK.....	iii
ABSTRACT	iv
KATA PENGANTAR	v
DAFTAR ISI	vii
DAFTAR GAMBAR DAN ILUSTRASI.....	x
DAFTAR LAMPIRAN	xi
DAFTAR SINGKATAN DAN LAMBANG.....	xii
BAB I. PENDAHULUAN	1
1.1. Latar Belakang.....	1
1.2. Rumusan masalah.....	1
1.3. Tujuan dan Manfaat Penelitian.....	1
1.4. Hipotesis Penelitian.....	2
1.5. Tempat dan waktu Penelitian	2
BAB II. TINJAUAN PUSTAKA	3
2.1. Klasifikasi Tanaman Gaharu (<i>Aquilaria malaccensis</i> Lam.).....	3
2.2. Nama Lain Tanaman Gaharu (<i>Aquilaria malaccensis</i> Lam.).....	3
2.3. Morfologi Tanaman Gaharu (<i>Aquilaria malaccensis</i> Lam.)	3
2.3.1. Batang.....	3
2.3.2. Daun.....	3
2.3.3. Bunga.....	3
2.3.4. Buah dan Biji	4
2.4. Ekologi	4
2.5. Kandungan Kimia dan Aktivitas Daun Gaharu (<i>Aquilaria malaccensis</i> Lam.)	4
2.6. Flavonoid	4
2.6.1. Flavonoid Aglikon	5
2.6.2. Flavonoid Glikosida	5

2.6.3. Sifat Kelarutan Flavonoid	6
2.7. Metode Pemisahan dan Pemurnian	6
2.7.1. Ekstraksi	6
2.7.2. Fraksinasi.....	8
2.7.3. Kromatorafi Lapis Tipis (KLT).....	9
2.7.4. Kromatografi Kolom.....	9
2.7.5. Identifikasi Isolat.....	10
BAB III. METODOLOGI PENELITIAN.....	11
BAB IV. PROSEDUR PENELITIAN.....	13
4.1. Alat dan Bahan :	13
4.2. Prosedur :	13
4.2.1. Penyiapan Bahan.....	13
4.2.2. Karakterisasi Simplisia.....	13
4.2.3. Penapisan Fitokimia pada Simplisia	15
4.2.4. Ekstraksi	16
4.2.5. Fraksinasi.....	16
4.2.6. Pemantauan Ekstrak dan Fraksi	17
4.2.7. Isolasi Menggunakan Metode Kromatografi Kolom	17
4.2.8. Identifikasi Menggunakan HPLC.....	17
4.2.9. Identifikasi Menggunakan LCMS	17
BAB V. PEMBAHASAN.....	18
5.1. Penyiapan Bahan	18
5.2. Karakterisasi Simplisia	18
5.3. Penapisan Fitokimia pada Simplisia	19
5.4 Ekstraksi	21
5.5. Fraksinasi	22
5.6. Pemantauan Ekstrak dan Fraksi.....	22
5.7. Isolasi Menggunakan Kromatografi Kolom.....	24

5.8. Identifikasi Fraksi Menggunakan HPLC dan LCMS	28
BAB VI. KESIMPULAN DAN SARAN	30
DAFTAR PUSTAKA	31
LAMPIRAN	33

DAFTAR GAMBAR DAN ILUSTRASI

Gambar 2. 1 Struktur Flavonoid	5
Gambar 2. 2 Contoh Flavonoid C-glikosida	6
Gambar 5. 1 Pemantauan ekstrak dan fraksi dengan fase diam silika gel F254 dan fase gerak non polar n-heksan:etil asetat (8:2).....	23
Gambar 5. 2 Pemantauan ekstrak dan fraksi dengan fase diam silika gel F254 dan fase gerak semi polar klorofom:metanol (9:1).....	233
Gambar 5. 3 Pemantauan ekstrak dan fraksi dengan fase diam silika gel F254 dan fase gerak polar etil asetat:metanol:air (8:1:1)	244
Gambar 5. 4 Pemantauan sub fraksi 1-6 hasil kromatografi kolom ke-1, menggunakan fase gerak klorofom:metanol (9:1).....	255
Gambar 5. 5 Pemantauan 26 fraksi hasil kromatografi kolom ke-2 menggunakan fase gerak nheksan:etil asetat (1:9).....	26
Gambar 5. 6 Pemantauan 6 fraksi hasil kromatografi kolom ke-3 menggunakan fase gerak nheksan:etil asetat (1:9).....	26
Gambar 5. 7 Pemantauan fraksi 3 dan 4 yang digabung dari hasil kromatografi kolom ke-3 menggunakan fase gerak nheksan:etil asetat (1:9)	277
Gambar 5. 8 Kromatogram Profiling pada HPLC dengan Kolom (LiChroCART Purospher). Fase Gerak Gradien A : Air:Asetronitril (95:5), Fase Gerak B : Air:Asetronitril (95:5), Fase Gerak C : Asetronitril:Air (5:95), Fase Gerak D : Asetronitril:Air (5:95).....	288

DAFTAR LAMPIRAN

lampiran 1. Surat Pernyataan Bebas Plagiarisme.....	33
lampiran 2. Surat Persetujuan Untuk Dipublikasikan pada Media Online	34
lampiran 3. Bukti Chat dengan Dosen Pembimbing untuk Meminta Tanda Tangan Virtual.....	35
lampiran 4. Bukti Tidak Plagiasi dari LPPM.....	36
lampiran 5. Hasil Determinasi.....	37
lampiran 6. Proses dan Hasil Karakterisasi Simplisia.....	38
Lampiran 7. Ekstraksi dan Fraksinasi	50
lampiran 8. Hasil Skrining Fitokimia pada Simplisia dan Ekstrak	56
lampiran 9. Proses Identifikasi Menggunakan HPLC dan Hasilnya	61
lampiran 10. Hasil Identifikasi Menggunakan LCMS.....	62

DAFTAR SINGKATAN DAN LAMBANG

SINGKATAN	NAMA
AlCl ₃	Alumunium klorida
BuOH	Butanol
DMF	Dimetilformamida
DMSO	Dimetilsulfoksida
EtOH	Etanol
ECC	Ekstraksi Cair-cair
FeCl ₃	Besi (III) klorida
FMIPA	Fakultas Matematika & Ilmu Pengetahuan Alam
H ₂ SO ₄	Asam sulfat
HCl	Asam klorida
HPLC	High Performance Liquid Chromatography
KLT	Kromatografi Lapis Tipis
LCMS	Liquid Chromatography-Massa Spectroskopy
MeOH	Metanol
Mg	Magnesium
mL	Mililiter
nm	Nanometer
NaOH	Natrium hidroksida
Pa	Proanalisis
Uv	Ultraviolet
Uv-vis	Ultraviolet-visibel

BAB I. PENDAHULUAN

1.1. Latar Belakang

Tanaman yang tumbuh dan berkembang di Indonesia sangat banyak. Indonesia merupakan Negara yang beriklim tropis, sehingga dapat mendukung tumbuh dan berkembangnya suatu tanaman. Adapun beberapa jenis tanaman yang diketahui memiliki khasiat obat tradisional (Dewi *et al.*, 2017). Salah satunya adalah tanaman gaharu.

Ada beberapa jenis tanaman gaharu salah satunya yaitu jenis *Aquilaria malaccensis* Lam. (family Thymeleaceae) (Yusuf *et al.*, 2016). Tanaman ini sangat berpotensi untuk dijadikan obat karena kandungan senyawa bioaktif yang sangat melimpah. Tanaman yang dijadikan sebagai bahan baku obat berkaitan erat dengan kandungan senyawa bioaktif yang ada didalamnya. Dimana senyawa bioaktif yang terdapat pada tanaman umumnya merupakan senyawa metabolit skunder (Suryelita *et al.*, 2017).

Banyak juga masyarakat yang menggunakan daun gaharu (*Aquilaria malaccensis* Lam.) sebagai obat antihipertensi, antidabetes, antioksidan dan juga untuk memperbaiki sistem pencernaan (Nugraha *et al.*, 2013). Selain itu gaharu juga memiliki potensi sebagai antidiabetes dan memiliki aktivitas antikanker dan antidepresi yang baik (Suhardiman *et al.*, 2021).

Senyawa bioaktif yang ada pada tumbuhan Daun gaharu (*Aquilaria malaccensis* Lam.) berpotensi sebagai obat herbal. Senyawa tersebut adalah alkaloid, saponin, dan senyawa fenol seperti flavonoid, tannin, terpenoid (Suhardiman *et al.*, 2021). Flavonoid pada daun gaharu (*Aquilaria malaccensis* Lam.) memiliki aktivitas sebagai antidiabetes (Fitriani & Erlын, 2019), antiinflamasi (Aris Suhardiman, 2019). Tujuan dari penelitian ini adalah untuk mengisolasi senyawa flavonoid dari fraksi daun gaharu (*Aquilaria malaccensis* Lam.).

1.2. Rumusan masalah

Apakah ada senyawa flavonoid dari fraksi etil asetat daun gaharu (*Aquilaria malaccensis* Lam.)
?

1.3. Tujuan dan Manfaat Penelitian

Penelitian ini bertujuan untuk mengisolasi senyawa flavonoid dari fraksi etil asetat daun gaharu (*Aquilaria malaccensis* Lam.).

1.4. Hipotesis Penelitian

Terdapat senyawa flavonoid dari fraksi etil asetat daun gaharu (*Aquilaria malaccensis* Lam.).

1.5. Tempat dan waktu Penelitian

Penelitian ini dilakukan di Laboratorium Biologi Farmasi Universitas Bhakti Kencana. Dimulai dari bulan Febuari 2021 – Juni 2021.

BAB II. TINJAUAN PUSTAKA

2.1. Klasifikasi Tanaman Gaharu (*Aquilaria malaccensis* Lam.)

Kingdom	: Plantae
Divisi	: Magnoliophyta
Kelas	: Magnoliopsida
Ordo	: Malvales
Famili	: Thymelaeaceae
Genus	: <i>Aquilaria</i>
Spesies	: <i>Aquilaria malaccensis</i> Lam.(Cronquist & Arthur, 1981).

2.2. Nama Lain Tanaman Gaharu (*Aquilaria malaccensis* Lam.)

Tanaman Gaharu (*Aquilaria malaccensis* Lam.) memiliki beberapa nama diantaranya yaitu Alim (Batak), Gaharu/Halim (Lampung), Galoop (Melayu), Kareh (Minang), Karas (Dayak).

2.3. Morfologi Tanaman Gaharu (*Aquilaria malaccensis* Lam.)

2.3.1. Batang

Batang dari gaharu bertekstur keras, berwarna abu-abu kecoklatan atau keputih-putihan dengan kulit batang yang licin dan bercabang banyak. Dengan tinggi 30-40 meter, diameter batang pohon dapat mencapai 50-60 cm (Setyaningrum & Saparinto, 2014).

2.3.2. Daun

Tanaman gaharu umumnya memiliki daun berbentuk lonjong memanjang dengan ujung daun meruncing. Daun gaharu berwarna hijau muda atau hijau mengkilap. Panjang daun sekitar 5-8 cm dan lebar daun sekitar 3-5 cm. daun berseling dengan bentuk seragam, simetris, tidak ada kelenjar minyak, dan halus. Tulang daun melunjur dari tulang tengah. Tulang daun yang paling kecil jelas hingga dapat dilihat. Tidak ada tepi daun, tangkai daun pendek, tidak bersayap dan menempel dibawah daun (Setyaningrum & Saparinto, 2014).

2.3.3. Bunga

Bunga dari pohon gaharu terletak diujung ranting atau ketiak atas dan ketiak bawah daun. Bunga berkelompok dari sumbu utama perbungaan bercabang dengan bentuk khusus. Bunga berkelamin dua, bertangkai kecil hingga sedang beraturan (Setyaningrum & Saparinto, 2014). Terdapat perhiasan bunga yaitu berupa daun kelopak dan daun mahkota. Kepala sari terdiri dari dua rongga, melekat pada bagian dorsal atau tidak bertangkai dibagian atas, dan berbekas

oleh celah yang pendek. Kelamin betinanya diatas. Umumnya tidak memiliki tangkai putik, tetapi memiliki putik satu cuping dengan ukuran khas (Setyaningrum & Saparinto, 2014).

2.3.4. Buah dan Biji

Buah tanaman gaharu berbentuk seperti kapsul tidak berdaging, tidak terpecah, majemuk dan bersayap. Buahnya berada pada polong yang berbentuk lonjong atau bulat seperti telur dengan panjang 5 cm dan lebar 3 cm. Terdapat 1-2 biji perbuah dengan ukuran kecil atau sedang. Biji tidak bergaris, bersayap dan tidak berendoplasma (Setyaningrum & Saparinto, 2014).

2.4. Ekologi

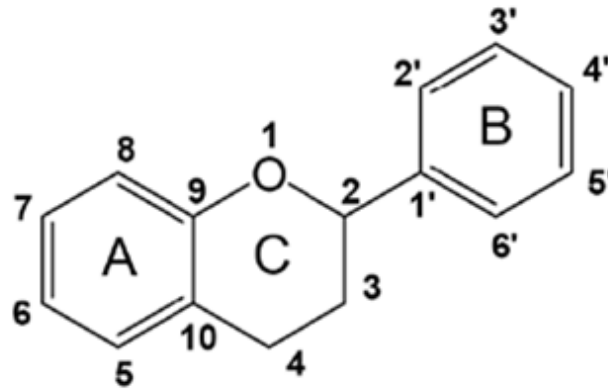
Tanaman gaharu dapat dijumpai diberbagai kondisi wilayah dan tipe hutan baik di Jawa, Kalimantan, Sumatera, Sulawesi, Maluku, Nusa Tenggara, maupun Papua. Pertumbuhan gaharu dipengaruhi oleh kelembapan, suhu dan intensitas sinar cahaya yang masuk. Tanaman gaharu dapat tumbuh di ketinggian 400 mdpl (Sumarna, 2008). Tanaman gaharu juga dapat dijumpai di habitat yang berbatu, berpasir atau berkapur, pada lereng, punggung bukit dan tanah dekat rawa. Biasanya gaharu tumbuh di antara ketinggian 0-850 meter dilokasi dengan suhu rata-rata 20-22 °C.

2.5. Kandungan Kimia dan Aktivitas Daun Gaharu (*Aquilaria malaccensis* Lam.)

Berdasarkan penelitian sebelumnya daun gaharu mengandung alkaloid, saponin, tannin, terpenoid dan flavonoid (Aris Suhardiman, 2019) . Kandungan senyawa flavonoid yang memiliki aktivitas sebagai antidiabetes (Fitriani & Erlyn, 2019), antioksidan dan antiinflamasi (Aris Suhardiman, 2019). Juga memiliki aktivitas sitotoksik dimana cukup aktif dalam melawan kanker payudara (Suhardiman et al., 2021).

2.6. Flavonoid

Flavonoid adalah senyawa golongan fenol yang tersebar di alam. Sehingga dapat dikatakan bahwa senyawa flavonoid ada pada semua tumbuhan hijau (Markham, 1988). Flavonoid tersusun atas 15 atom karbon sebagai inti dasarnya. Struktur umum dari flavonoid dapat dilihat pada gambar berikut ini :



Gambar 2. 1 Struktur Flavonoid

Adapun beberapa jenis flavonoid yaitu :

2.6.1. Flavonoid Aglikon

Aglikon flavonoid merupakan golongan flavonoid golongan fenol. Yang termasuk golongan flavonoid aglikon adalah flavon, flavonol, isoflavon, flavanon, katekin, dihidroflavonol, kalkon, auron, dan leukoantosianin.

2.6.2. Flavonoid Glikosida

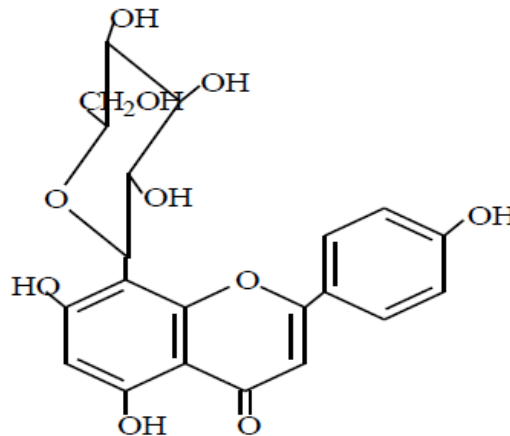
Flavonoid glikosida merupakan flavonoid yang mengikat satu atau lebih gugus gula. Flavonoid glikosida terbagi menjadi dua, yaitu :

a. Flavonoid O-glikosida

Satu atau lebih gugus hidroksi terikat pada satu atau lebih gugus gula dengan ikatan hemiasetal yang tidak tahan asam. Karna adanya glikosida maka flavonoid menjadi kurang aktif dan lebih mudah larut dalam air. Contoh dari flavonoid O-glikosid, yaitu soforosa (2-O- β -D-glukosil-D-Gluosa), gentibiosa (6-O- β -D-glukosil-D-Gluosa) (Markham, 1988).

b. Flavonoid C-glikosida

Flavonoid C-glikosida adalah flavonoid yang terikat pada inti benzen dengan suatu ikatan karbon-karbon yang tahan asam, ikatan terjadi pada C-6 dan C-8 dalam inti flavonoid. Pada C-glikosida gula yang terikat relatif sedikit (Markham, 1988). Adapun contoh dari flavonoid C-glikosida, yaitu:



Apigenin 8-C- β -D-glukopiranosida (veteksin)

Gambar 2. 2 Contoh Flavonoid C-glikosida

c. Flavonoid Sulfat

Flavonoid sulfat merupakan flavonoid yang memiliki satu ion sulfat atau lebih. Sifat dari flavonoid sulfat yaitu lebih mudah larut dalam air (Markham, 1988).

d. Biflavonoid

Biflavonoid merupakan flavonoid dimer. Yang ikatan antar flavonoidnya berupa ikatan karbon-karbon atau berupa ikatan eter (Markham, 1988).

2.6.3. Sifat Kelarutan Flavonoid

Flavonoid merupakan senyawa polar karena flavonoid memiliki beberapa gugus hidroksil yang tak tersulih. Dimana flavonoid larut dalam pelarut polar seperti etanol (EtOH), metanol (MeOH), butanol (BuOH), asetat, dimetil sulfoksida (DMSO), dimetilformamida (DMF), air, dan lain-lain. Karena adanya gugus gula yang terikat pada flavonoid menyebabkan flavonoid lebih mudah larut dalam air (Markham, 1988).

2.7. Metode Pemisahan dan Pemurnian

2.7.1. Ekstraksi

Ekstraksi adalah teknik untuk menarik satu atau lebih komponen atau senyawa –senyawa dari suatu sampel menggunakan pelarut yang sesuai. Ekstraksi yang akan dilakukan adalah ekstraksi padat-cair, dimana sampel berbentuk padatan. Sampel yang diekstraksi berupa padatan yang dapat larut kedalam pelarutnya. Pelarut yang digunakan harus dapat menarik senyawa yang diinginkan secara optimal. Metode ekstraksi padat-cair dibagi menjadi beberapa, yaitu :

a. Maserasi (cara dingin)

Maserasi merupakan metode ekstraksi padat-cair yang paling sederhana. Maserasi merupakan perendaman sampel pada suhu kamar dengan pelarut yang sesuai atau yang dapat melarutkan sampel. Perendaman biasanya dilakukan selama 3-5 hari ditambah dengan pengadukan yang bertujuan untuk mempercepat proses ekstraksi atau melarutnya sampel. Ekstraksi dilakukan berulang kali sehingga analit terekstraksi secara optimal dengan ditandai warna pelarut sudah lebih jernih.

Metode ini memiliki beberapa kelebihan yaitu menggunakan alat dan cara yang sederhana, analit dapat berupa sampel yang tahan panas maupun yang tidak tahan panas. Adapun kelemahan dari metode ini adalah pelarut yang digunakan banyak dan memerlukan waktu yang lama (Leba, 2017).

b. Perkolasi (cara dingin)

Metode perkolasi dilakukan dengan cara pelarut dialirkan secara perlahan pada sampel dalam perkolator. Penambahan pelarut dilakukan secara berkala dan terus menerus sehingga terjadi ekstraksi dengan pelarut yang selalu baru. Penambahan pelarut dilakukan menggunakan pola penetsan. Ekstraksi dilakukan hingga analit terekstraksi optimal, dengan tanda pelarut yang digunakan tidak lagi berwarna (Leba, 2017).

c. Sokletasi (cara panas)

Sokletasi adalah ekstraksi dengan cara panas menggunakan alat soklet. Pelarut yang digunakan diletakkan pada tempat yang terpisah. Ekstraksi secara terus menerus menggunakan pelarut yang relative sedikit sehingga terjadi ekstraksi yang kontinyu dengan adanya kondensor atau pendingin balik merupakan prinsip dari metode ini. Setelah analit terekstraksi secara optimal pelarut diuapkan hingga diperoleh ekstrak kental. Ekstraksi dilakukan menggunakan pelarut dengan titik didih rendah.

Ketika pelarut dipanaskan maka akan dihasilkan uap dari pelarut, yang kemudian akan mengalami pendinginan dalam kondensor yang akan menghasilkan molekul air. Molekul air akan membasahi sampel dan mengalir membawa analit kedalam labu. Proses berlangsung kontinyu dan pelarut yang digunakan bisa diuapkan kembali dan dipisahkan dari analit. Pemberhentian proses ekstraksi dapat dilakukan dengan cara menghentikan pemanasan.

Metode ini dapat digunakan untuk senyawa-senyawa yang termostabil. Yang juga memiliki keuntungan yaitu dapat untuk sampel yang memiliki tekstur lunak, sampel tidak tahan panas secara langsung, suhu dapat diatur. Adapun kerugian dari metode ini adalah senyawa dapat terurai karena panas, tidak cocok menggunakan pelarut yang titik didihnya tinggi, sampel dapat mengendap karena melebihi kelarutannya dalam pelarut (Leba, 2017).

d. Refluk (cara panas)

Ekstraksi dengan menggunakan pelarut pada tempertur titik didihnya, selama waktu tertentu dengan jumlah pelarut yang relatif stabil dengan adanya prinsip pendingin balik. Metode ini dapat digunakan untuk senyawa-senyawa yang tahan panas dan bertekstur kasar.

2.7.2. Fraksinasi

Ada beberapa metode fraksinasi salah satunya yaitu metode ekstraksi cair-cair (ECC). ECC merupakan metode pemisahan senyawa dari campuran senyawa berupa larutan dengan suatu pelarut. Adapun prinsip dari ekstraksi cair-cair yaitu didasarkan dengan adanya suhu dan tekanan yang konstan, dimana senyawa yang akan terdistribusi dalam keseimbangan yang sama dalam dua fase yang tidak saling bercampur. Terbentuknya dua fase tersebut krena adanya perbedaan konsentrasi pada keadaan setimbang.

Ekstraksi cair-cair dilakukan dengan mencampur bahan yang akan diekstraksi (dieluen) dengan pelarut (solven). Campuran dieluen dan solven bersifat heterogen atau tidak larut, sehingga menghasilkan dua fase yaitu fase rafinat dan fase ekstrak (Nasyanka, Na'imah, & Aulia, 2020).

Alat yang digunakan yaitu corong pisah. Adapun kriteria pelarut yang akan digunakan yaitu :

- a. Mampu melarutkan komponen senyawa terlarut dalam campurn senyawa yang diekstraksi
- b. Tidak bereaksi dengan senyawa atau komponen yang diekstraksi
- c. Tidak mudah bercampur dengan bahan atau larutan yang diekstraksi
- d. Tidak mudah terbakar dan tidak beracun
- e. Harga relative murah (Nasyanka, Na'imah, & Aulia, 2020).

Faktor-faktor yang mempengaruhi proses ekstraksi cair-cair, yaitu:

- a. Pengocokkan

Selama proses ekstraksi berlangsung harus dilakukan proses pengocokkan yang searah dengan kecepatan yang konstan. Pengocokkan yang terlalu cepat dan lambat akan mempengaruhi hasil ekstraksi.

b. Perbandingan pelarut-umpan

Banyaknya jumlah pelarut yang digunakan akan meningkatkan hasil ekstraksi (Nasyanka, Na'imah, & Aulia, 2020).

2.7.3. Kromatorafi Lapis Tipis (KLT)

Metode pemantauan paling sederhana yaitu kromatografi lapis tipis. Alat dan bahan yang digunakan untuk memisahkan senyawa dan menganalisis sampel menggunakan KLT yaitu chamber dan plat KLT. Prinsip dari metode ini adalah pemisahan suatu senyawa berdasarkan kepolarannya.

Pemisahan campuran suatu senyawa pada KLT melibatkan partisi suatu senyawa diantara padatan penyerap (adsorben, fase diam) dengan suatu pelarut (fase gerak) yang mengalir melewati fase diam. Pengaliran pelarut dikenal sebagai proses pengembangan oleh pelarut (elusi) (Leba, 2017).

2.7.4. Kromatografi Kolom

Kromatografi merupakan metode konvensional untuk pemisahan maupun pemurnian suatu senyawa. Prinsip kromatografi kolom berdasarkan mekanisme adsorpsi dan partisi. Dimana senyawa yang terkumpul sebagai fraksi adalah senyawa yang tidak dapat berinteraksi dengan fase diam (Leba, 2017).

Kolom yang digunakan adalah tabung kaca, logam atau plastik yang dimodifikasi menggunakan kran pada bagian bawah kolom. Dengan menggunakan fase diam berupa silika gel, selulosa, aluminium, kieseldur, dll yang dikemas didalam kolom. Dimana pengemasan fase diam didalam kolom dapat dilakukan dengan dua cara, yaitu cara kering dan cara basah (Leba, 2017).

Cara kering yaitu menyumbat ujung bawah kolom dengan kapas bebas lemak lalu serbuk silika gel dimasukkan secara perlahan hingga mampat. Kemudian dibasahi dengan eluen (Leba, 2017).

Cara basah dapat dilakukan dengan menyumbat ujung bawah kolom dengan kapas atau kertas saring lalu fase diam yang akan digunakan disuspensi dengan fase gerak atau eluen yang akan digunakan. Kemudian suspensi fase diam dimasukkan ke dalam kolom secara perlahan melalui

dinding kolom. Eluen dialirkan hingga kolom mampat dan fase diam siap digunakan (Leba, 2017).

2.7.5. Identifikasi Isolat

a. High Performance Liquid Chromatography (HPLC) merupakan metode pemisahan. Pemisahan pada HPLC terjadi pada kolom yang berisi fase diam yang dialiri fase gerak. Temperatur berpengaruh pada viskositas fase gerak, difusi analit dan transfer masa analit antara fase diam dan fase gerak. Dengan peningkatan temperatur maka pemisahan akan berlangsung cepat (Fajar et al., 2018).

Selain itu fase gerak juga merupakan parameter dalam pemisahan menggunakan HPLC. Dimana kepolaran fase sangat berperan. Fase gerak yang bersifat polar akan meningkatkan retensi analit dalam fase diam dan fase gerak yang bersifat kurang polar akan mengurangi retensi analit polar dalam fase diam. Keuntungan dari metode ini adalah waktu analisis singkat, hasil pemisahan tinggi, sampel dapat dalam jumlah mikro. (Fajar et al., 2018).

Fase gerak yang biasa digunakan adalah campuran air dengan pelarut organik seperti asetronitril, metanol, dioksan, propranolol (Fajar et al., 2018). Dimana fase gerak yang digunakan pada penelitian ini adalah campuran air dengan asetronitril. Dengan kolom (Merck, tipe LiChroCART Purospher) dengan ukuran partikel 250 µm.

b. Liquid Chromatography-Mass Spectrometry (LCMS) Identifikasi isolat menggunakan LCMS bertujuan untuk melihat alur puncak dan akan melihat besaran berat molekul senyawa sehingga dapat diketahui jumlah senyawa yang terkandung, selain itu LCMS dapat digunakan untuk melihat struktur dari suatu senyawa. (Mangurana *et al.*, 2019). Komponen-komponen sampel dipisahkan oleh kromatografi cair dan kemudian ion bermuatan dideteksi oleh spektrometri masa. Pemisahan berdasarkan interaksi antara fase diam dan elusi pelarut melalui kolom/fase gerak (Mangurana *et al.*, 2019). Komponen elusi dari kolom kromatografi diteruskan ke spektrometer masa. Prinsip dari metode ini adalah pemisahan analit berdasarkan kepolarannya, dimana menggunakan fase diam (kolom) dengan menggunakan fase gerak ditambahkan tekanan tinggi untuk mendorong fase gerak. Campuran analit akan terpisah berdasarkan kepolaran dan waktu retensi (Mangurana *et al.*, 2019).

Adapun keuntungan dari analisis menggunakan LCMS, yaitu dapat menganalisis lebih luas komponen, dapat menganalisis senyawa termolabil, senyawa yang memiliki polaritas tinggi, berat molekul tinggi bahkan dapat digunakan untuk menganalisis protein (Mangurana *et al.*, 2019).

BAB III. METODOLOGI PENELITIAN

Penelitian ini dilakukan di Laboratorium Biologi Farmasi Universitas Bhakti Kencana. dimulai pada bulan Februari 2021 – Juni 2021. Penelitian ini dilakukan dengan beberapa tahap yaitu penyiapan bahan yang meliputi deternnasi, karakterisasi simplisia, skrining fitokimia pada simplisia, ekstraksi, penapisan fitokimia pada ekstrak, fraksinasi, pemantauan fraksi, isolasi, pemurnian, uji kemurnian dan analisis isolat.

Bahan yang digunakan yaitu simplisia daun gaharu (*Aquilaria malaccensis* Lam.) yang diperoleh dari PT. Mitra Dulur Sejahtera Pabrik Obat Tradisional Palembang.

Dilakukan karakterisasi simplisia untuk memastikan bahwa simplisia daun gaharu yang digunakan terjamin mutu dan kualitasnya. Karakterisasi simplisia meliputi uji susut pengeringan, penetapan kadar air, penetapan kadar abu total, penetapan kadar abu tidak larut asam, penetapan kadar sari larut air dan penetapan kadar sari larut etanol.

Penapisan fitokimia pada simplisia meliputi pemeriksaan alkaloid, flavonoid, steroid dan triterpenoid, saponin, kuinon, tannin. Penapisan fitokimia dilakukan untuk mengetahui kandungan senyawa yang terdapat pada simplisia daun gaharu (*Aquilaria malaccensis* Lam.).

Kemudian simplisia diekstraksi menggunakan metode sokletasi, yaitu ekstraksi dengan alat khusus (alat sokletasi) sehingga terjadi ekstraksi yang kontinyu dengan menggunakan pendingin balik atau kondensor. Pelarut yang digunakan yaitu etanol 96%. Ekstrak yang diperoleh dipekatkan menggunakan rotari evaporator sampai diperoleh ekstrak kental. Kemudian dilakukan penapisan fitokimia pada ekstrak.

Dilakukan fraksinasi menggunakan metode ekstraksi cair-cair (ECC). Fraksinasi menggunakan metode ECC yaitu merupakan pemisahan suatu senyawa berdasarkan kepolarannya. Ekstrak difraksinasi menggunakan pelarut n-heksan, etil asetat dan metanol-air. Hingga diperoleh fraksi kental.

Pemantauan ekstrak dan fraksi dilakukan menggunakan metode kromatografi lapis tipis. Dengan fase diam silika gel dan fase gerak non polar, semi polar, polar menggunakan

penampak bercak H_2SO_4 10%, FeCl_3 10% dan AlCl_3 5%. Pengamatan dilakukan dibawah lampu UV 366 nm dan secara visual.

Setelah dipantau fraksi diisolasi menggunakan metode kromatografi kolom. Metode ini memiliki prinsip pemisahan berdasarkan mekanisme adsorpsi dan partisi. Dimana menggunakan fase diam berupa silika gel, kemudian sampel diletakkan diatas kolom bersama dengan fase gerak yang terus mengalir. Hingga fraksi-fraksi terkumpul kemudian dipantau menggunakan kromatografi lapis tipis. Kemudian hasil dari isolasi menggunakan metode kromatografi kolom diidentifikasi menggunakan HPLC dan LCMS.