

SKRIPSI

**OPTIMASI PROSES EKSTRAKSI SENYAWA
METABOLIT SEKUNDER DARI TANAMAN DAUN
AFRIKA (*Vernonia amygdalina*) SECARA
*ULTRASONIC ASSISTED EXTRACTION***

**OPTIMIZATION OF THE EXTRACTION PROCESS OF
PLANT SECONDARY METABOLITE COMPOUNDS
FROM AFRICAN LEAVES (*Vernonia amygdalina*)
WITH *ULTRASONIC ASSISTED EXTRACTION***

Disusun dan diajukan oleh

**MEGAWATI AKRAM
N011 17 1016**



**PROGRAM STUDI FARMASI
FAKULTAS FARMASI
UNIVERSITAS HASANUDDIN
MAKASSAR
2021**

**OPTIMASI PROSES EKSTRAKSI SENYAWA METABOLIT SEKUNDER
DARI TANAMAN DAUN AFRIKA (*Vernonia amygdalina*) SECARA
*ULTRASONIC ASSISTED EXCTRACTION***

**OPTIMIZATION OF THE EXTRACTION PROCESS OF PLANT
SECONDARY METABOLITE COMPOUNDS FROM AFRICAN LEAVES
(*Vernonia amygdalina*) WITH *ULTRASONIC ASSISTED EXTRACTION***

SKRIPSI

untuk melengkapi tugas-tugas dan memenuhi
syarat-syarat untuk mencapai gelar sarjana

**MEGAWATI AKRAM
N011 17 1016**

**PROGRAM STUDI FARMASI
FAKULTAS FARMASI
UNIVERSITAS HASANUDDIN
MAKASSAR
2021**

OPTIMASI PROSES EKTRAKSI SENYAWA METABOLIT SEKUNDER DARI
TANAMAN DAUN AFRIKA (*Vernonia amygdalina*) SECARA ULTRASONIC
ASSISTED EXTRATION

MEGAWATI AKRAM

N011 17 1016

Pembimbing Utama,

Pembimbing Pendamping

Prof. Dr. Gemini Alam, M.Si., Apt.
NIP. 19641231 199002 1 005

Muhammad Raihan, S.Si., M.Sc.Stud., Apt.
NIP. 19900528 201504 1 001

Pada tanggal 20 April 2021

LEMBAR PENGESAHAN SKRIPSI

OPTIMASI PROSES EKTRAKSI SENYAWA METABOLIT SEKUNDER DARI
TANAMAN DAUN AFRIKA (*Vernonia amygdalina*) SECARA ULTRASONIC
ASSISTED EXTRATION

Disusun dan diajukan oleh

MEGAWATI AKRAM


N011 17 1016


Telah dipertahankan di hadapan Panitia Ujian yang dibentuk dalam rangka
Penyelesaian Studi Program Sarjana Program Studi Farmasi
Fakultas Farmasi Universitas Hasanuddin
pada tanggal 20 April 2021 dan dinyatakan telah memenuhi syarat kelulusan

Menyetujui,


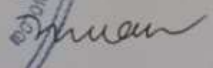
Pembimbing Utama,

Pembimbing Pendamping


Prof. Dr. Gemini Alam, M.Si., Apt.
NIP. 19641231 199002 1 005


Muhammad Raihan, S.Si., M.Sc.Stud., Apt.
NIP. 19900528 201504 1 001

Plt. Ketua Program Studi S1 Farmasi,
Fakultas Farmasi Universitas Hasanuddin



Prof. Dr. rer. nat. Marianti A. Manggau, Apt.
NIP. 19670319 199203 2 002

PERNYATAAN KEASLIAN

Yang bertanda tangan di bawah ini :

Nama : Megawati Akram
NIM : N011171016
Program Studi : Farmasi
Jenjang : S1

Menyatakan dengan ini bahwa skripsi dengan judul Optimasi Proses Ekstraksi Senyawa Metabolit Sekunder dari Tanaman Daun Afrika (*Vernonia Amygdalina*) Secara *Ultrasonic Assisted Extraction* adalah karya saya sendiri dan tidak melanggar hak cipta pihak lain. Apabila dikemudian hari skripsi karya saya ini terbukti bahwa sebagian atau keseluruhannya adalah hasil karya orang lain yang saya pergunakan dengan cara melanggar hak cipta pihak lain, maka saya bersedia menerima sanksi.

Makassar, 20 April 2021

Yang Menyatakan



10000
REPUBLIK INDONESIA
METERAL TEMPEL
2B36AJX239224127

Megawati Akram

UCAPAN TERIMA KASIH

Alhamdulillah Rabiil 'alamiin, segala puji bagi Allah SWT, Tuhan yang Maha Pengasih dan pemilik segala ilmu, atas limpahan rahmat dan karunia-Nya, baik berupa kesehatan, ilmu yang sempurna, waktu yang berharga dan nikmat lainnya yang tidak dapat penulis sebutkan satu persatu sehingga penulis dapat menyelesaikan skripsi ini sebagai persyaratan untuk menyelesaikan studi dan memperoleh gelar sarjana di Program Studi Farmasi, Fakultas Farmasi, Universitas Hasanuddin.

Penulis menyadari bahwa dalam penyusunan skripsi ini terdapat cukup banyak kesulitan yang dihadapi, namun dukungan dan bantuan dari berbagai pihak tidak terlepas pula dalam membantu penulis untuk melewati kesulitan – kesulitan tersebut. Penulis mendapatkan banyak bimbingan dan saran serta dorongan dari berbagai pihak, baik yang bersifat moral maupun material. Oleh karena itu, dengan sangat tulus penulis memberikan ucapan terima kasih yang sebesar – besarnya dan penghargaan yang setinggi – tingginya kepada :

1. Bapak Prof. Dr. Gemini Alam, M.Si., Apt selaku pembimbing utama dan Bapak Muhammad Raihan, S.Si., M.Sc.Stud., Apt. selaku pembimbing pendamping yang telah meluangkan waktu dan tenaganya untuk memberikan bimbingan, arahan, saran, serta semua bantuan yang telah diberikan dengan sepenuh hati.

2. Ibu Yusnita Rifai, S.Si., M.Pharm., Ph.D., Apt. dan Bapak Anshar Saud, S.Si., M.Farm., Apt. selaku penguji yang telah berbaik hati memberikan saran dan masukan dalam penyelesaian skripsi ini.
3. Seluruh Bapak/Ibu dosen Fakultas Farmasi Universitas Hasanuddin yang telah memberikan ilmunya serta membimbing penulis dalam menyelesaikan masa studi S1 ini, serta kepada seluruh staf atas segala fasilitas dan pelayanan yang diberikan sehingga memperlancar penyelesaian studi hingga penelitian ini.
4. Sahabat – sahabat penulis, Novira Mustika, Shabrina Zahra Annisa, Hapsa, Nurul Auliya Syahrul, Prilia Afisrah, dan Ratnasari.
5. Teman seperjuangan penelitian Optimasi Proses Ekstraksi, Zilfrida Aura Bening Azizy, Zulfadly, Delli Cipta Lestari, dan Andharini Rusmana Putri.
6. Korps Asisten Farmakognosi – Fitokimia yang telah berbaik hati memberikan ilmunya dan membantu penulis dalam berbagai hal, khususnya Kak Satria Astazaury Awal, Asma Aris, Meliani, dan Hasriani.

Ucapan terima kasih terkhusus penulis sampaikan secara tulus kepada kedua orang tua penulis yaitu Bapak Akram dan Ibu Nurjannah Saeni yang tak henti – hentinya memberikan kasih sayang, motivasi, dukungan, bantuan, serta doa yang tulus dalam setiap perjalanan yang penulis tempuh. Kepada kakak perempuan penulis, saudari Ayu Lestari Akram, serta kedua

orang adik penulis Adnan Akram dan Adrian Akram yang selalu mendukung dan memotivasi penulis.

Makassar, 2021

Megawati Akram

ABSTRAK

MEGAWATI AKRAM. *Optimasi Proses Ekstraksi Senyawa Metabolit Sekunder Dari Tanaman Daun Afrika (Vernonia Amygdalina) Secara Ultrasonic Assisted Extraction* (dibimbing oleh Prof. Gemini Alam dan Muhammad Raihan).

Vernonia amygdalina Del. merupakan salah satu tanaman yang telah banyak digunakan untuk pengobatan. Penelitian ini dilakukan untuk mengetahui parameter optimum dari rasio perbandingan rasio simplisia dan pelarut serta waktu ekstraksi daun *V. amygdalina* menggunakan metode *ultrasound assisted extraction*. Parameter rasio simplisia dan pelarut yang di uji adalah 1:10, 1:20, dan 1:30, sementara pada waktu ekstraksi dimulai dari 15 menit, 30 menit, dan 45 menit. Analisis data dilakukan menggunakan metode *surface respon methodology* untuk mengetahui nilai optimum ekstraksi dari kedua parameter uji. Rendemen dihitung berdasarkan bobot simplisia yang diekstraksi sementara konsentrasi metabolit sekunder dihitung sebagai stigmasterol secara KLT densitometri. Dari penelitian ini di peroleh persen rendemen yang paling optimum untuk parameter perbandingan rasio simplisia dan pelarut adalah 1:20, sedangkan waktu ekstraksi 51 menit. Selain itu, nilai konsentrasi stigmasterol dari ekstrak yang diuji untuk parameter rasio perbandingan simplisia dan pelarut optimum pada 1:30, dan waktu ekstraksi 9 menit yang di analisis dengan TLC scanner.

Kata kunci : *Vernonia amygdalina*, optimasi, senyawa metabolit sekunder, *ultrasound assisted extraction*, *surface respon methodology*,

ABSTRACT

MEGAWATI AKRAM. *Optimization Of The Extraction Process Of The Secondary Metabolite Compounds From African Leaves (Vernonia Amygdalina) With Ultrasonic Assisted Extraction* (Supervised by Prof. Gemini Alam and Muhammad Raihan).

Vernonia amygdalina Del. is a plant that has been widely used for treatment. This research was conducted to determine the optimum parameters from the ratio of simplicia and solvent ratios as well as the extraction time of *V. amygdalina* leaves using the ultrasound assisted extraction method. The parameters for the simplicia and solvent ratios tested were 1:10, 1:20, and 1:30, while the extraction time started from 15 minutes, 30 minutes, and 45 minutes. Data analysis was performed using the surface response methodology to determine the optimum value of the extraction of the two test parameters. The yield was calculated based on the extracted simplicia weight while the secondary metabolite concentration was calculated as stigmasterol by densitometric TLC. From this research, the optimum yield percent for the ratio parameter of simplicia and solvent ratio is 1:20, while the extraction time is 51 minutes. In addition, the stigmasterol concentration of the extract tested for the optimum ratio of simplicia and solvent ratio parameters is 1:30, and extraction time is 9 minutes were analyzed by TLC scanner.

Keywords : *Vernonia amygdalina*, optimization, secondary metabolite compounds,, ultrasound assisted extraction, surface respon methodology

DAFTAR ISI

	Halaman
UCAPAN TERIMA KASIH	vi
ABSTRAK	ix
ABSTRACT	x
DAFTAR ISI	xi
DAFTAR TABEL	xiii
DAFTAR GAMBAR	xiv
DAFTAR LAMPIRAN	xvi
DAFTAR ARTI LAMBANG DAN SINGKATAN	xvii
BAB I PENDAHULUAN	1
I.1 Latar Belakang	1
I.2 Rumusan Masalah	3
I.3 Tujuan Penelitian	4
BAB II TINJAUAN PUSTAKA	5
II.1 Tanaman Daun Afrika (<i>Vernonia amygdalina</i> Del.)	5
II.1.1 Taksonomi Tanaman	5
II.1.2 Morfologi Tanaman	6
II.1.3 Kandungan Senyawa	6
II.2 Simplisia	7
II.3 Ekstraksi Bahan Alam	7
II.3.1 Pengertian Ekstraksi	7

	Halaman
II.3.2 Metode Ekstraksi	8
II.3.2.1 <i>Ultrasonic Assisted Extraction</i> (UAE)	9
II.3.2.2 <i>Microwave Assisted Extraction</i> (MAE)	10
II.3.2.3 Infusa	11
II.3.2.4 Dekokta	12
II.4 Metabolit Sekunder Tanaman	13
II.5 Kromatografi Lapis Tipis	13
II.5.1 Pengertian Kromatografi Lapis Tipis	13
II.5.2 Penjerap atau Fase Diam KLT	14
II.5.3 Fase Gerak Pada KLT	15
II.5.4 Penotolan Sampel	16
II.5.5 Pengembangan KLT	17
II.5.6 Deteksi Bercak	18
II.5.7 Pemisahan Pada KLT	19
II.6 Densitometri	20
II.6 <i>Response Surface Methodology</i> (RSM)	21
BAB III METODE PENELITIAN	22
III.1 Alat dan Bahan	23
III.2 Determinasi Tanaman	23
III.3 Penyiapan Simplisia	23
III.4 Penetapan Susut Pengeringan	24
III.5 Optimasi Proses Ekstraksi	24

	Halaman
III.5.1 Penentuan Parameter Uji	24
III.4.2 Ekstraksi	25
III.4.3 Penentuan Bobot Ekstrak Hasil UAE dan Persen Rendemen	26
III.4.4 Analisis KLT-Densitometri	26
III.4.5 <i>Respon Surface Methodology</i>	27
BAB IV HASIL DAN PEMBAHASAN .	28
IV.1 Susut Pengeringan	28
IV.2 Ekstraksi	28
IV.3 Kromatografi Lapis Tipis – Densitometri	29
IV.4 Respon Surface Analysis	31
BAB V KESIMPULAN DAN SARAN	37
V.1 Kesimpulan	37
V.2 Saran	37
DAFTAR PUSTAKA	38
LAMPIRAN	40

DAFTAR TABEL

Tabel	halaman
1. Komponen fitokimia ekstrak etanol daun <i>V. amygdalina</i>	7
2. Beberapa penjerap yang digunakan pada KLT	15
3. Parameter – parameter aplikasi atau penotolan yang direkomendasikan	17
4. Parameter uji untuk optimasi ekstraksi menggunakan UAE hasil kalkulasi software minitab 18 dengan rasio minimal 1:10 dan maksimal 1:30, serta waktu ekstraksi minimal 15 menit dan maksimal 45 menit	25
5. Bobot ekstrak dan rendemen hasil ekstraksi menggunakan UAE	29
6. Luas area dan konsentrasi stigmasterol pada ekstrak	31
7. Data nilai Rf dan luas area ekstrak daun <i>V. Amygdalina</i>	54
8. Data nilai Rf dan luas area baku stigmasterol	55

DAFTAR GAMBAR

Tabel	halaman
1. Tanaman daun Afrika	5
2. Pengukuran dan perhitungan nilai Rf	20
3. Profil hasil KLT baku dan ekstrak	29
4. Kurva regresi pembandingan stigmasterol pada konsentrasi 200 – 1000 bpj	30
5. <i>Pareto chart</i> rendemen hasil ekstraksi terhadap parameter uji	32
6. Plot data rendemen hasil ekstraksi	32
7. <i>Optimization plot</i> rendemen ekstrak terhadap parameter uji	34
8. <i>Pareto chart</i> konsentrasi stigmasterol hasil ekstraksi terhadap parameter uji	35
9. Plot data konsentrasi stigmasterol terhadap parameter uji	35
10. <i>Optimization plot</i> konsentrasi stigmasterol terhadap parameter Uji	36
11. Hasil determinasi tanaman	41
12. Pencucian sampel daun Afrika	42
13. Pengeringan sampel daun Afrika	42
14. Penimbangan simplisia daun Afrika	42
15. Pengayakan simplisia daun Afrika	42
16. Penimbangan simplisia dengan botol timbang untuk susut pengeringan	42
17. Penimbangan 10 gram simplisia untuk ekstraksi dengan UAE	42
18. Ekstraksi simplisia dengan UAE	43
19. Penyaringan hasil ekstraksi	43
20. Penguapan ekstrak cair menggunakan <i>rotary evaporator</i>	43
21. Penimbangan bobot ekstrak kental	43

Tabel	halaman
22. Proses elusi lempeng KLT	43
23. Analisis lempeng KLT dengan alat TLC <i>scanner</i>	43

DAFTAR LAMPIRAN

Lampiran	halaman
1. Skema kerja umum	40
2. Hasil determinasi tanaman	41
3. Dokumentasi kegiatan	42
3. Perhitungan	44
4. Data TLC <i>scanner</i>	49

DAFTAR ARTI LAMBANG DAN SINGKATAN

UAE	= <i>Ultrasound Assisted Extraction</i>
MAE	= <i>Microwave Assisted Extraction</i>
KLT	= Kromatografi Lapis Tipis
Rf	= <i>Retardation factor</i>
UV	= <i>Ultra Violet</i>
GF254	= <i>Gypsum Fluoresence 254 nm</i>
LB	= <i>Lieberman Burchard</i>
RSM	= <i>Respon Surface Methodology</i>
TLC	= <i>Thin Layer Chromatography</i>

BAB I

PENDAHULUAN

I.1 Latar Belakang

Metabolit sekunder adalah senyawa non-esensial yang disintesis dari tumbuhan, mikrobial atau hewan yang digunakan untuk menunjang kehidupannya. Senyawa ini disebut sebagai mikro molekul karena memiliki berat molekul 50-1500 kDa. Penggolongan utama senyawa metabolit sekunder terdiri atas terpenoid, fenil propaoid, poliketida dan alkaloid. Di bidang farmasi, senyawa ini digunakan sebagai kandidat obat atau senyawa penuntun (*lead compound*) agar diperoleh senyawa yang lebih poten dengan toksisitas minimal (Saifuddin, 2014).

Tanaman daun Afrika (*Vernonia amygdalina* Del.) merupakan salah satu tanaman yang digunakan di seluruh Afrika tropis untuk tujuan nutrisi dan pengobatan (Erasto, Grierson and Afolayan, 2007). Beberapa penelitian telah mengkaji analisis nutrisi, kima, dan proksimat dari tanaman *V. amygdalina*. Skrining fitokimia dari ekstrak etanol daun *V. amygdalina* menunjukkan adanya beberapa komponen senyawa bioaktif seperti flavonoid, glikosida jantung, gula pereduksi, terpenoid, saponin, antrakuinon, alkaloid dan steroid. (Evbuomwan et al., 2018). Penelitian lainnya juga menunjukkan bahwa ekstrak etanol daun *V. amygdalina* dan dua lakton seskuiterpen (*verolide* dan *vernodalol*) hasil isolasi dari ekstrak tanaman ini telah dilaporkan memiliki aktivitas antioksidan yang cukup besar, ditunjukkan

melalui kemampuan mengurangi dan menangkap radikal bebas (DPPH) dengan nilai IC₅₀ masing – masing sebesar <0.025 mg/mL, 0.04 mg/ mL, dan 0.03 mg/mL (Erasto, Grierson and Afolayan, 2007).

Selain itu, ekstrak etanol daun *V. amygdalina* pada konsentrasi 200 mg/mL memiliki zona hambat sebesar 14,5 ± 2,5 mm terhadap bakteri *E. coli*, 9,0 ± 2,0 mm terhadap bakteri *S. aureus*, dan 11,5 ± 0,5 mm terhadap bakteri *P. aeruginosa* (Evbuomwan et al., 2018). Ekstrak daun *V. amygdalina* juga dapat menjadi pengobatan potensial untuk penyakit diabetes. Penelitian yang dilakukan oleh (Nwanjo, 2005) melaporkan ekstrak air daun *V. amygdalina* pada konsentrasi 200 mg/mL secara signifikan mengurangi kadar trigliserida dan kolestrol LDL pada tikus diabetes yang diinduksi streptozotocin. Hal ini menunjukkan bahwa ekstrak air daun *V. amygdalina* memiliki sifat hipolipidemia (Nwanjo, 2005).

Metode ekstraksi yang dapat digunakan adalah *Ultrasonic-assisted Extraction* (UAE). Metode ini menggunakan bantuan gelombang ultrasonik. Gelombang ultrasonik adalah gelombang suara yang memiliki frekuensi (≥ 20 kHz) (Luque-García and Luque De Castro, 2003). Pada metode ini penggunaan gelombang ultrasonik dilakukan untuk memastikan kontak yang lebih efisien antara sampel dan pelarut yang digunakan, sehingga memungkinkan terjadinya proses ekstraksi yang lebih cepat (Jose-Luis & Capelo-Martinez, 2009). Kelebihan utama ekstraksi yang menggunakan gelombang ultrasonik adalah waktu ekstraksi yang lebih singkat dari waktu yang dibutuhkan oleh metode konvensional seperti *soxhlet* (Luque-García

and Luque De Castro, 2004). Ekstraksi menggunakan gelombang ultrasonik juga dapat menurunkan suhu operasi pada ekstrak sehingga dapat digunakan pada ekstrak yang tidak tahan panas (Zou, T., E. Xia, and T. He, 2014).

Response Surface Analysis merupakan metode analisis yang paling banyak digunakan karena keuntungan utama metode ini yang dapat memberikan informasi lebih banyak hanya dengan menggunakan beberapa percobaan saja. Pada analisis 2 variabel paling banyak menggunakan *Central Composite Design* yang merupakan desain eksperimental orde dua simetris. Hal ini dikarenakan desain ini dapat memberikan hasil yang optimal melalui efisiensi analisisnya yang tinggi untuk 2 variabel (Bezerra M., R. Santelli, and E. Oliveira, 2008).

Oleh karena itu, perlu dilakukan suatu penelitian menggunakan metode UAE pada simplisia daun *V. amygdalina* untuk mengetahui kombinasi parameter yang dapat mempengaruhi hasil ekstraksi secara optimal untuk menghasilkan senyawa metabolit sekunder dari ekstrak daun *V. amygdalina*.

I.2 Rumusan Masalah

Berdasarkan uraian di atas, maka permasalahan yang timbul adalah bagaimana kombinasi dari parameter rasio pelarut dan sampel serta waktu ekstraksi yang dapat menghasilkan ekstrak yang paling optimum dalam proses ekstraksi daun afrika (*Vernonia amygdalina*) khususnya dengan menggunakan metode ekstraksi *Ultrasonic-assisted Extraction*.

I.3 Tujuan Penelitian

Adapun tujuan penelitian ini adalah untuk mengetahui parameter optimum rasio pelarut dan sampel, serta waktu ekstraksi dalam proses ekstraksi daun afrika (*Vernonia amygdalina*) menggunakan metode ekstraksi *Ultrasonic-assisted Extraction*.

BAB II

TINJAUAN PUSTAKA

II.1 Tanaman Daun Afrika (*Vernonia amygdalina* Del.)

II.1.1 Taksonomi Tanaman

Kerajaan	: Plantae
Divisi	: Spermatophyta
Anak divisi	: Angiospermae
Bangsa	: Asterales
Suku	: Asteraceae
Marga	: <i>Vernonia</i>
Jenis	: <i>Vernonia amygdalina</i> Delile



Gambar 1. Tanaman Daun Afrika (Udochukwu *et al.*, 2015)

II.1.2 Morfologi Tanaman

Secara morfologi tanaman *V. amygdalina* memiliki pohon yang dapat mencapai ketinggian hingga 10 meter dengan kulit kayu yang berwarna abu abu muda atau coklat. Tanaman ini dapat tumbuh pada tempat dengan ketinggian hingga 2.800 m dengan curah hujan tahunan rata – rata 750 – 2000 mm. Daun *V. amygdalina* berbentuk lanset lonjong yang biasanya berukuran 10-15 x 4-5 cm, berwarna hijau sedang sampai tua. Ukuran tangkai daunnya biasanya sangat pendek dengan panjang 1-2 cm, memiliki kepala bunga yang kecil dengan panjang 10 mm, berwarna putih krem, dan berbau harum. Tanaman ini dapat tumbuh di semua jenis tanah, terutama pada tanah yang kaya akan humus (Ofori *et al.*, 2013).

II.1.3 Kandungan Senyawa

Tanaman *V. amygdalina* merupakan salah satu tanaman yang dapat digunakan untuk nutrisi dan pengobatan (Erasto *et al.*, 2007). Kandungan senyawa dalam ekstrak etanol daun *V. Amygdalina* antara lain flavonoid, glikosida jantung, gula pereduksi, terpenoid, saponin, antakuinon, alkaloid, dan steroid (Evbuomwan *et al.*, 2018). Penelitian lainnya juga menunjukkan bahwa ekstrak etanol daun *V. amygdalina* menunjukkan terdapatnya dua lakton *seisquiterpen* yaitu *verolide* dan *vernodalol* yang memiliki aktivitas antioksidan yang cukup besar yang ditunjukkan melalui kemampuan menangkap radikal bebas (DPPH) (Erasto *et al.*, 2007).

Menurut Udochukwu (2015), komponen fitokimia ekstrak etanol daun *V. amygdalina* ditunjukkan melalui tabel 1 berikut ini :

Tabel 1. Komponen fitokimia ekstrak etanol daun *V. Amygdalina* (Udochukwu, 2005)

Komponen Fitokimia	Daun <i>V. amygdalina</i> (mg/100g)
Oxalate	3.48
Phytate	3.95
Tannins	9.62
Saponins	5.97
Flavonoid	4.89
Cyanogenic glycoside	1.11
Alkaloids	2.16
Anthraquinone	0.14
Steroid	0.38
Phenol	3.24

II.2 Simplisia

Simplisia adalah bahan alam yang telah dikeringkan yang digunakan untuk pengobatan dan belum mengalami pengolahan. Pengeringan dapat dilakukan dengan penjemuran di bawah sinar matahari, diangin – anginkan, atau menggunakan oven, kecuali dinyaakan lain suhu pengeringan dengan oven tidak lebih dari 60 °C (Kemenkes RI, 2017). Jenis – jenis simplisia terdiri atas simplisia nabati, simplisia hewani, dan simplisia mineral (Depkes, 1983).

II.3 Ekstraksi Bahan Alam

II.3.1 Pengertian Ekstraksi

Ekstraksi merupakan salah satu teknik untuk memisahkan atau menarik satu atau lebih komponen atau senyawa - senyawa (analit) dari suatu

sampel dengan menggunakan pelarut tertentu yang sesuai. Prinsip pemisahannya didasarkan pada kemampuan atau daya larut analit dalam pelarut tertentu (Leba, 2017). Proses ekstraksi terjadi dengan cara masuknya cairan penyari ke dalam sel (osmosis) yang akan semakin mudah apa bila dinding sel sudah tidak menjadi utuh lagi akibat adanya proses penyerbukan. Cairan penyari yang masuk akan membuat zat aktif yang berada di dalam sel terlarut sehingga terjadi perbedaan konsentrasi antara larutan zat aktif di dalam sel dan cairan penyari yang berada di luar sel, maka pada tahap ini terjadi proses difusi. Proses difusi akan terus terjadi sampai konsentrasi zat aktif yang berada di luar sel dan di dalam sel seimbang (Najib, 2018).

Pemilihan cairan penyari yang baik harus memperhatikan hal – hal berikut ini (Najib, 2018):

- a. Mempunyai harga yang murah dan mudah diperoleh,
- b. Stabil secara fisika dan kimia,
- c. Mempunyai reaksi netral dan tidak mudah terbakar
- d. Mempunyai sifat selektif yaitu hanya menarik zat yang berkhasiat yang dikehendaki tidak mempengaruhi zat berkhasiat, serta
- e. Diperbolehkan oleh peraturan.

II.3.2 Metode Ekstraksi

Seperti yang telah diuraikan sebelumnya bahwa ekstraksi adalah upaya untuk menarik komponen atau senyawa yang ada pada sampel. Upaya ini sebenarnya sudah sejak lama dilakukan baik secara tradisional maupun

yang dilakukan secara lebih maju dengan menggunakan teknik yang lebih modern (Najib, 2018).

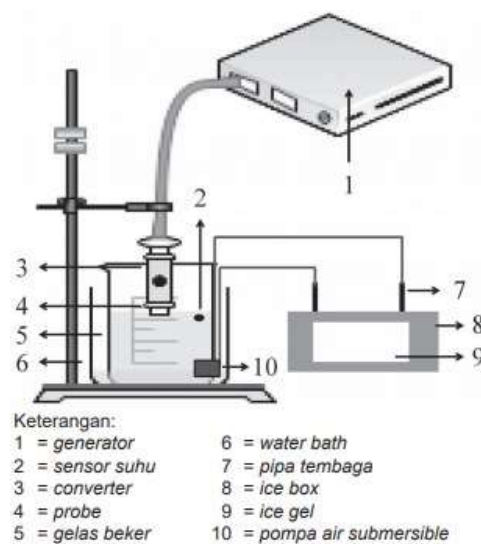
II.3.2.1 *Ultrasonic Assisted Extraction (UAE)*

Salah satu metode ekstraksi yang menggunakan bantuan gelombang ultrasonik disebut *Ultrasonic Assisted Extraction* atau sonikasi. Gelombang ultrasonik adalah gelombang suara yang memiliki frekuensi (≥ 20 kHz) (Luque-García and Luque De Castro, 2003). Penggunaan gelombang ultrasonik dilakukan untuk memastikan kontak yang lebih efisien antara sampel dan pelarut yang digunakan, sehingga memungkinkan terjadinya proses ekstraksi yang lebih cepat (Jose-Luis & Capelo-Martinez, 2009). Dengan gelombang ultrasonik, partikel padat dan cair digetarkan dan dipercepat kemudian zat terlarut dari sampel dengan cepat keluar dari fase padat ke pelarut (Uddin *et al.*, 2018). UAE tidak membutuhkan instrumentasi yang rumit atau mahal, sehingga dapat digunakan baik dalam skala analitis maupun komersial (Picó, 2013).

Mekanisme ekstraksi dengan menggunakan metode UAE dimulai dengan adanya energi mekanik yang diciptakan oleh getaran gelombang *ultrasound* pada frekuensi yang tinggi sehingga menyebabkan terbentuknya rongga dalam cairan. Selanjutnya terjadi ekspansi gelembung dengan penyerapan energi. Kemudian membran sel mengalami gangguan akibat pecahnya gelembung sehingga memudahkan terjadinya penetrasi pelarut ke dalam sampel. Terakhir, terjadilah pelepasan senyawa ke dalam pelarut

yang digunakan. Faktor penting untuk mencapai ekstraksi yang efisien dan efektif menggunakan UAE adalah kadar air dan ukuran partikel sampel, pelarut, derajat kehalusan, frekuensi, dan waktu sonikasi (Uddin *et al.*, 2018).

Kelebihan utama ekstraksi yang menggunakan gelombang ultrasonik adalah waktu ekstraksi yang lebih singkat dari waktu yang dibutuhkan oleh metode konvensional lainnya (Luque-García and Luque De Castro, 2004). Penelitian yang dilakukan oleh (Jovanović *et al.*, 2017) menghasilkan senyawa polifenol yang lebih tinggi dari *Tymus serpyllum* L. dengan metode UAE pada kondisi optimal (50% etanol sebagai pelarut, perbandingan rasio simplisia dan pelarut 1:30, ukuran partikel 0,3 mm dan waktu ekstraksi 15 menit) daripada metode maserasi dan ekstraksi dengan bantuan panas lainnya (Jovanović *et al.*, 2017). Ekstraksi menggunakan gelombang ultrasonik juga dapat menurunkan suhu operasi pada ekstrak sehingga dapat digunakan pada ekstrak yang tidak tahan panas (Zou *et al.*, 2014).



Gambar 1. Metode ekstraksi berbantu ultrasonik.

II.3.2.2 *Microwave Assisted Extraction (MAE)*

Proses ekstraksi menggunakan *microwave* berbeda dengan metode konvensional lainnya karena ekstraksi ini terjadi karena perubahan struktur sel yang disebabkan oleh gelombang elektromagnetik. Radiasi spektrum elektromagnetik yang digunakan berada pada rentang frekuensi 300 MHz (radiasi radio) hingga 300 GHz (Vinatoru, Mason and Calinescu, 2017). Pada ekstraksi menggunakan metode konvensional, perpindahan massa terjadi dari dalam ke luar dan panas ditransfer dari media pemanas ke bagian dalam sampel, sementara pada MAE panas dihamburkan secara volumetrik di dalam media yang di radiasi (Farid Chemat, 2013).

Proses ekstraksi berlangsung pada 3 tahap yang berbeda. Pertama terjadi fase kesetimbangan yaitu terjadinya fenomena pelarutan dan partisi, dimana substrat dikeluarkan dari permukaan luar partikel pada kecepatan yang konstan. Selanjutnya fase transisi yang merupakan perantara menuju fase difusi. Resistensi terhadap perpindahan massa mulai tampak pada padatan — cair, pada tahap ini terjadi perpindahan massa melalui konveksi dan difusi. Fase terakhir, zat terlarut harus mengatasi interaksi yang mengikatnya pada matriks dan berdifusi ke dalam pelarut ekstraksi. Laju ekstraksi pada periode ini rendah, ditandai dengan dikeluarkannya ekstrak melalui mekanisme difusi (Farid Chemat, 2013).

Beberapa keuntungan menggunakan gelombang mikro untuk ekstraksi senyawa bioaktif dari tumbuhan antara lain dapat membuat pemanasan yang

lebih efektif dan selektif terhadap sampel, meningkatkan hasil ekstraksi, dan dapat mengurangi waktu ekstraksi (Vinatoru, Mason and Calinescu, 2017).

II.3.2.3 Infusa

Infusa adalah proses penyarian pada bahan alam yang menggunakan air sebagai pelarut pada suhu 90 °C selama 15 menit. Metode ini biasanya digunakan untuk ekstraksi simplisia yang bersifat lunak seperti daun dan bunga. Pembuatan sediaan herbal yang mengandung minyak atsiri dengan metode infusa hendaknya menggunakan penutup, agar kandungan minyak atsiri tidak hilang selama proses pembuatan (Warsiati., Wijasih., Febriani and Ayu, 2010).

Infus dibuat dengan cara mencampur simplisia dengan derajat halus yang sesuai dalam panci dengan air secukupnya. Selanjutnya, panaskan campuran di atas tangas air selama 15 menit terhitung mulai suhu mencapai 90 °C sambil sekali - kali diaduk. Serkai selagi panas melalui kain flanel, tambahkan air panas secukupnya melalui ampas hingga diperoleh volume infus yang dikehendaki (Paulina V. Y. Yamlean, 2020).

II.3.2.3 Dekokta

Dekokta adalah proses penyarian pada bahan alam yang menggunakan air sebagai pelarut pada suhu 90 °C selama 30 menit. Metode ini biasanya digunakan untuk ekstraksi simplisia yang bersifat keras skayu, batang, biji dan sebagainya. Pembuatan dekok dilakukan dengan cara mencampur simplisia dengan derajat halus yang sesuai dalam panci dengan air

secukupnya. Selanjutnya, panaskan campuran di atas tangas air selama 30 menit terhitung mulai suhu mencapai 90 °C sambil sekali - kali diaduk. Serkai selagi panas melalui kain flanel, tambahkan air panas secukupnya melalui ampas hingga diperoleh volume dekok yang dikehendaki. Kecuali dekok dari simplisia Condurango Cortex yang harus diserkai setelah didinginkan terlebih dahulu. Jika tidak ditentukan perbandingan yang lain dan tidak mengandung bahan berkhasiat keras, maka untuk 100 bagian dekok harus dipergunakan 10 bagian dari bahan dasar atau simplisia (Warsiati., Wijasih., Febriani and Ayu, 2010).

II.4 Metabolit Sekunder Tanaman

Metabolit sekunder adalah senyawa non-esensial yang disintesis dari tumbuhan, mikrobia atau hewan melewati proses biosintesis yang digunakan untuk menunjang kehidupannya. Ketiadaan senyawa tersebut dalam jangka pendek tidak berakibat kematian, akan tetapi dalam jangka panjang dalam mengakibatkan kelemahan dalam pertahanan diri. Senyawa ini disebut sebagai mikro molekul karena memiliki berat molekul 50-1500 kDa. Penggolongan utama senyawa metabolit sekunder terdiri atas terpenoid, fenil propaoid, poliketida dan alkaloid. Di bidang farmasi, senyawa ini digunakan sebagai kandidat obat atau senyawa penuntun (*lead compound*) agar diperoleh senyawa yang lebih poten dengan toksisitas minimal. Dari aspek farmakologi, keanekaragaman struktur kimia metabolit sekunder yang tinggi mengindikasikan potensi keragaman efek farmakologinya sehingga

merupakan sumber kandidat senyawa obat yang tidak terbatas (Saifuddin, 2014).

II.5 Kromatografi Lapis Tipis

II.5.1 Pengertian Kromatografi Lapis Tipis

Kromatografi Lapis Tipis (KLT) merupakan salah satu kromatografi planar yang menggunakan metode pemisahan campuran analit dengan mengelusi analit melalui suatu lempeng kromatografi. Komponen atau analit yang terpisah dilihat dengan penyemprotan atau pengecatan. Gambaran utama yang mengatur kemampuan daya pisah lempeng KLT adalah ukuran bercak (*spot*) dan dimensi fisik lempeng, dengan diameter sebesar 0,5 cm dan panjang lempeng pada umumnya 10 cm. Dengan ukuran seperti ini, lempeng hanya mampu memisahkan 20 analit secara optimal supaya terpisah secara sempurna. Kecepatan fase gerak bervariasi di sepanjang lempeng KLT. Semakin jauh fase gerak melewati lempeng KLT maka kecepatannya akan menurun (Rohman, 2020).

II.5.2 Penjerap atau Fase Diam KLT

Penjerap yang digunakan pada KLT merupakan penjerap yang berukuran kecil dengan diameter partikel antara 10 – 30 μm . Semakin kecil ukuran rata – rata partikel fase diam dan semakin sempit kisaran ukuran fase diam maka akan semakin baik kinerja KLT dalam hal efisiensi dan resolusinya. Penjerap yang paling sering digunakan adalah silika dan serbuk selulosa, sedangkan mekanisme sorpsi-desorpsi (perpindahan analit dari

fase diam ke fase gerak dan sebaliknya) yang utama pada KLT adalah partisi dan adsorpsi. Beberapa jenis penjerap yang sering digunakan pada KLT beserta mekanisme pemisahan dan penggunaan untuk analisisnya dapat dilihat pada tabel berikut ini (Rohman, 2020) :

Tabel 2. Beberapa penjerap yang digunakan pada KLT (Rohman, 2020)

Penjerap	Mekanisme Sorpsi	Penggunaan
Silika gel	Adsorpsi	Asam amino, hidrokarbon, vitamin, alkaloid
Silika yang dimodifikasi dengan hidrokarbon	Partisi termodifikasi	Senyawa senyawa nonpolar
Serbuk selulosa	Partisi	Asam amino, nukleotida, karbohidrat
Alumina	Adsorpsi	Hidrokarbon, ion logam, pewarna makanan, alkaloid
Kieselguhr (tanah Diatomae)	Partisi	Gula, asam – asam lemak
Selulosa penukar ion	Pertukaran ion	Asam nukleat, nukleotida, halida, dan ion - ion logam
Gel sephadex	Eksklusi	Polimer, protein, kompleks logam
B-siklodekstrin	Interaksi adsorpsi stereospesifik	Campuran enansiomer

Lempeng KLT disiapkan dengan melapiskan penjerap ke permukaan lapisan kaca, gelas, atau alumunium dengan ketebalan 250 μm . Lempeng KLT telah tersedia di pasaran dengan berbagai ukuran dan telah di tambah dengan reagen *fluorosen* untuk memfasilitasi deteksi bercak solut. Di samping itu, lempeng KLT yang tersedia di pasaran sudah di tambah dengan agen pengikat seperti kalsium sulfat (Rohman, 2020).

II.5.3 Fase Gerak Pada KLT

Fase gerak pada KLT dapat dipilih dari pustaka, tetapi lebih sering dengan mencoba – coba karena waktu yang diperlukan hanya sebentar. Sistem yang paling sederhana ialah campuran 2 pelarut organik karena daya elusi campuran kedua pelarut ni mudah diatur sehingga pemisahan dapat

terjadi secara optimal. Beberapa petunjuk dalam memilih dan mengoptimasi fase gerak antara lain (Rohman, 2020) :

- a. Fase gerak harus mempunyai kemurnian yang sangat tinggi karena KLT merupakan teknik yang sangat sensitif
- b. Daya elusi fase gerak harus diatur sedemikian rupa sehingga nilai R_f terletak antara 0,2 – 0,8 untuk memaksimalkan pemisahan
- c. Pada pemisahan dengan menggunakan fase diam polar seperti silika gel, polaritas fase gerak akan menentukan kecepatan migrasi solut yang berarti juga menentukan nilai R_f . Penambahan pelarut yang bersifat sedikit polar seperti dietil eter ke dalam pelaut nonpolar seperti metil benzen akan meningkatkan nilai R_f secara signifikan
- d. Solut – solut ionik dan solut – solut polar lebih baik digunakan campuran pelarut sebagai fase geraknya, seperti campuran air dan metanol dengan perbandingan tertentu
- e. Fase gerak yang digunakan harus cukup murah karena biasanya sejumlah besar fase gerak digunakan untuk elusi

II.5.4 Penotolan Sampel

Sampel yang akan ditotolkan pada lempeng KLT harus dilakukan dengan sangat hati – hati dan dengan pertimbangan bahwa gangguan yang mungkin timbul pada lempeng KLT dikendalikan sekecil mungkin. Pada umumnya sampel secara manual ditotolkan melalui pipa kapiler, mikropipet, atau melalui penyuntik mikro kaca yang telah terkalibrasi sedemikian rupa

sehingga tetesan yang datang tepat menyentuh permukaan lempeng, sedangkan ujung alat penotol masih tetap di atas penjerap lempeng KLT. Pemisahan pada KLT yang optimal akan diperoleh hanya jika menotolkan sampel dengan ukuran bercak sekecil dan sesempit mungkin. Penotolan sampel yang tidak tepat akan menyebabkan bercak yang menyebar dan puncak ganda. Berikut berbagai macam jumlah sampel yang disarankan untuk digunakan berdasarkan tujuan analisisnya (Rohman, 2020) :

Tabel 3. Parameter – parameter aplikasi atau penotolan yang direkomendasikan (Rohman, 2020)

Tujuan Analisis	Diameter Bercak (mm)	Konsentrasi sampel	Banyaknya Sampel (μg)
Densitometri (kuantitatif)	2 mm untuk volume sampel 0,5 μL	0,02 – 0,2	0,1 – 1 (Untuk HPTLC) 1-10 (konvensional)
Identifikasi	3 mm untuk volume sampel 1 μL	0,1 – 1	1 – 20
Uji kemurnian	4 mm untuk volume sampel 2 μL	5	100

II.5.5 Pengembangan KLT

Bila sampel telah ditotolkan maka tahap selanjutnya adalah mengembangkan sampel tersebut dalam suatu bejana kromatografi yang sebelumnya telah dijenuhi dengan uap fase gerak. Tujuan penjenuhan (pencapaian kesetimbangan) tersebut adalah untuk memperoleh homogenitas atmosferik dalam bejana, sehingga meminimalkan penguapan pelarut dari lempeng KLT selama pengembangan. Tepi bagian bawah lempeng lapis tipis yang telah ditotoli sampel dicelupkan ke dalam fase gerak kurang lebih 0,5 – 1 cm. Bejana kromatografi harus tertutup rapat dan

sedapat mungkin volume fase gerak sesedikit mungkin (tetapi harus mampu mengelusi lempeng sampai ketinggian yang telah ditentukan). Tinggi fase gerak dalam bejana harus di bawah lempeng yang telah berisi totalan sampel (Rohman, 2020).

II.5.6 Deteksi Bercak

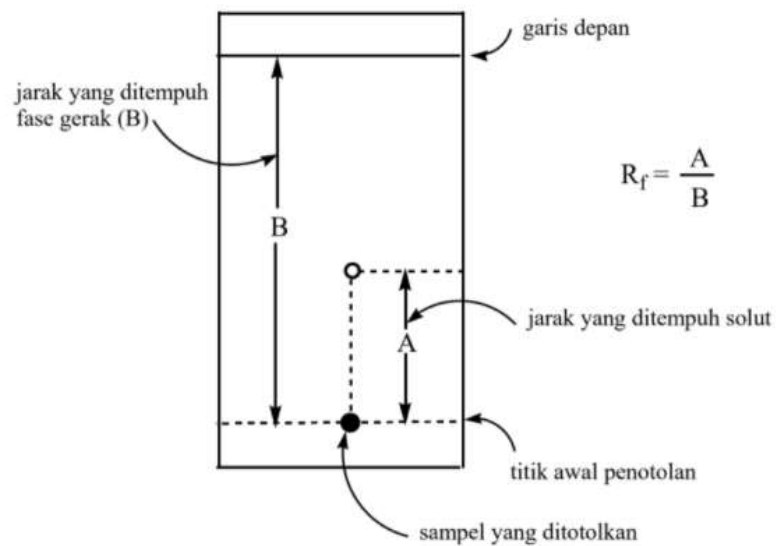
Bercak pemisahan pada KLT umumnya merupakan bercak yang tidak berwarna. Berikut beberapa cara yang dapat dilakukan untuk mendeteksi bercak (Rohman, 2020) :

- a. Menyemprot lempeng KLT dengan reagen kromogenik yang akan bereaksi secara kimia dengan seluruh solut yang mengandung gugus fungsional tertentu sehingga bercak menjadi berwarna. Kadang - kadang lempeng dipanaskan terlebih dahulu untuk mempercepat reaksi pembentukan warna dan intensitas warna bercak
- b. Mengamati lempeng di bawah lampu ultraviolet yang dipasang panjang gelombang emisi 254 nm atau 366 nm untuk menampakkan solut sebagai bercak yang gelap atau bercak yang berfluoresensi terang pada dasar yang berfluoresensi seragam. Lempeng yang diperdagangkan dapat dibeli dalam bentuk lempeng yang sudah diberi dengan senyawa fluoresen yang tidak larut yang dimasukkan ke dalam fase diam untuk memberikan dasar fluoresensi atau dapat pula dengan menyemprot lempeng dengan reagen fluoresensi setelah dilakukan pengembangan

- c. Menyemprot lempeng dengan asam sulfat pekat atau asam nitrat pekat, lalu dipanaskan untuk mengoksidasi solut-solut organik yang akan tampak sebagai bercak hitam sampai kecokelat-cokelatan
- d. Memaparkan lempeng dengan uap iodium dalam chamber tertutup
- e. Melakukan *scanning* pada permukaan lempeng dengan densitometer, Suatu instrumen yang dapat mengukur intensitas radiasi yang direfleksikan dari permukaan lempeng ketika disinari dengan lampu UV atau lampu sinar tampak. Solut-solut yang mampu menyerap sinar akan dicatat sebagai puncak (*peak*) dalam pencatat (*recorder*)

II.5.7 Pemisahan Pada KLT

Pemisahan pada KLT umumnya dihentikan sebelum semua fase gerak melewati seluruh permukaan fase diam. Solut pada kromatografi ini dikarakterisasi dengan jarak migrasi solut terhadap jarak ujung fase geraknya. Gambaran untuk menghitung nilai R_f dapat dilihat pada gambar berikut ini (Rohman, 2020) :



Gambar 2. Pengukuran dan perhitungan Rf (Rohman, 2020)

Nilai R_f dihitung dengan menggunakan persamaan :

$$R_f = \frac{\text{Jarak yang ditempuh solut}}{\text{Jarak yang ditempuh fase gerak}} \quad (1)$$

II.6 Densitometri

Densitometri merupakan salah satu analisis kuantitatif yang digunakan pada metode pada KLT yang dilakukan dengan melakukan pengukuran luas area. Densitometri dapat bekerja secara serapan atau *fluoresensi*. Kebanyakan densitometer mempunyai sumber cahaya, monokromator untuk memilih panjang gelombang yang sesuai, sistem untuk memfokuskan sinar pada lempeng, penganda foton, dan *recorder*. Pada sistem serapan dapat dilakukan dengan model pantulan atau transmisi. Pada cara pantulan yang diukur adalah sinar yang dipantulkan, yang dapat menggunakan sinar tampak maupun *ultraviolet*, sementara itu, cara transmisi dilakukan dengan menyinari bercak dari satu sisi dan mengukur sinar yang diteruskan pada sisi

lain. Semua pengerjaan KLT jika ditujukan untuk analisa kuantitatif harus dilakukan dengan seksama. Alat yang digunakan untuk mengambil sampel harus terkalibrasi dengan baik. Saat ini tersedia alat penotol sampel kapiler yang berukuran antara 1 sampai 100 μL . pada saat menotolkan sampel, kapiler harus tegak lurus dengan lempeng dan semua sampel harus dikeluarkan dari kapiler (Rohman, 2020).

II.7 Response Surface Methodology (RSM)

Response Surface Analysis merupakan metode analisis yang paling banyak digunakan karena keuntungan utama metode ini yang dapat memberikan informasi lebih banyak hanya dengan menggunakan beberapa percobaan saja. Sebelum menerapkan metodologi RSM, pertama-tama perlu dipilih desain eksperimen yang akan menentukan eksperimen mana yang harus dilakukan. Desain eksperimental yang dipilih harus memastikan bahwa semua variabel yang diteliti dilakukan setidaknya di tiga tingkat faktor. Pada analisis 2 variabel paling banyak menggunakan *Central Composite Design* yang merupakan desain eksperimental orde dua simetris. Hal ini dikarenakan desain ini dapat memberikan hasil yang optimal melalui efisiensi analisisnya yang tinggi untuk 2 variabel (Bezerra *et al.*, 2008).