

SKRIPSI
ISOLASI DAN KARAKTERISASI SENYAWA
PENANDA PADA EKSTRAK DAUN
Vernonia amygdalina Delile
ISOLATION AND CHARACTERIZATION
BIOMARKER ON *Vernonia amygdalina* Delile
LEAVES EXTRACT

Disusun dan diajukan oleh

ZULFADLY

N011 17 1027



PROGRAM STUDI FARMASI
FAKULTAS FARMASI
UNIVERSITAS HASANUDDIN
MAKASSAR
2021

**ISOLASI DAN KARAKTERISASI SENYAWA PENANDA PADA
EKSTRAK DAUN *Vernonia amygdalina* Delile**

**ISOLATION AND CHARACTERIZATION BIOMARKER ON *Vernonia
amygdalina* Delile LEAVES EXTRACT**

SKRIPSI

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

**ZULFADLY
N011 17 1027**

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

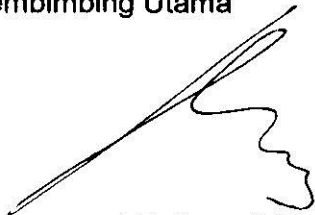
**ISOLASI DAN KARAKTERISASI SENYAWA PENANDA PADA
EKSTRAK DAUN *Veronia amygdalya* Delile**

ZULFADLY

N011 17 1027

Disetujui oleh :

Pembimbing Utama



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

Pembimbing Pendamping



Dra. Rosany Tayeb, M.Si., Apt.
NIP. 19561011198603 2 002

Pada tanggal Juni 2021

LEMBAR PENGESAHAN SKRIPSI

**ISOLASI DAN KARAKTERISASI SENYAWA PENANDA PADA
EKSTRAK DAUN *Veronia amygdalya* Delile**

**ISOLATION AND CHARACTERIZATION BIOMARKER ON
Vernonia amygdalina Delile LEAVES EXTRACT**

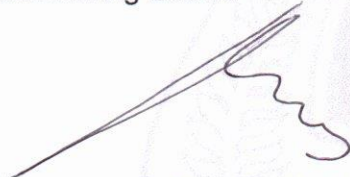
Disusun dan diajukan oleh :

**ZULFADLY
N011 17 1027**

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

Menyetujui,

Pembimbing Utama



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

Pembimbing Pendamping



Dra. Rosany Tayeb, M.Si., Apt.
NIP. 19561011198603 2 002

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




Firzan Nainu, S.Si., M.Biomed.Sc., Ph.D., Apt.
NIP. 19820610 200801 1 012

PERNYATAAN KEASLIAN SKRIPSI

Yang bertanda tangan dibawah ini ;

Nama : Zulfadly
NIM : N011171027
Program Studi : Farmasi
Jenjang : S1

Menyatakan dengan ini bahwa Skripsi dengan judul Isolasi dan Karakterisasi Senyawa Penanda Pada Ekstrak Daun *Veronia amygdalya* Deliile 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, 8 Juni 2021

Yang Menyatakan


Zulfadly

UCAPAN TERIMA KASIH

Al-hamdulillahi rabbil 'alamin, segala puji bagi Allah SWT. yang telah memberikan rahmat dan hidayah berupa kesehatan, waktu, ilmu pengetahuan serta petunjuk sehingga Penulis dapat menyelesaikan skripsi sebagai syarat untuk menyelesaikan program studi S1 farmasi di Fakultas Farmasi Universitas Hasanuddin. Penyusunan skripsi ini tidak terlepas dari berbagai hambatan karena keterbatasan pengetahuan yang dimiliki oleh Penulis, namun berkat semangat dan bantuan yang terus diberikan dari berbagai pihak sehingga Penulis mampu melewati berbagai ujian dan hambatan yang dihadapi.

Ucapan terima kasih yang tulus kepada kedua orang tua Penulis yaitu Bapak Suryadi dan Ibu Nurdiana yang memberikan kesempatan untuk melanjutkan studi, membiayai segala keperluan Penulis dalam menjalankan studi tanpa kenal rasa lelah, motivasi, kasih sayang, dan doa yang tulus selalu mengiringi langkah Penulis. Adik Penulis, Nurnasyhifa yang selalu menghibur dan menyemangati Penulis. Keluarga Penulis, Kakek, Nenek dan khususnya tante Nurjannah dan Nurhasana yang turut memberikan dukungan moral dan materil selama Penulis menempuh masa studi.

Ucapan terima kasih Penulis yang sebesar-besarnya dan penghargaan yang setinggi-tingginya kepada :

1. Bapak Muhammad Raihan, S.Si., M.Sc.Stud., Apt. selaku pembimbing utama dan Ibu Dra. Rosany Tayeb, M.Si., Apt. selaku pembimbing

pendamping yang telah menyisihkan waktunya untuk memberikan bimbingan, arahan, saran dalam penelitian dan penyusunan skripsi, serta bantuan yang penulis tidak bisa uraikan dengan kata-kata


2. Bapak Muh. Aswad, S.Si., M.Si., Ph.D., Apt. dan Ibu Dra. Ermina Pakki, M.Si., Apt. selaku tim penguji yang telah meluangkan waktunya untuk memberikan koreksi dalam penyusunan skripsi Penulis.
3. Bapak Dr. Andi Ilham Makhmud, Dip.Sc., MM., Apt. selaku penasehat akademik yang memberikan arahan selama penulis menempuh studi di Fakultas Farmasi.
4. Seluruh Dosen Fakultas Farmasi Universitas Hasanuddin yang telah membagikan ilmu, pengalaman dan bimbingan kepada Penulis selama menempuh program studi S1, juga kepada seluruh staf akademik dan laboran yang telah memberikan pelayanan dan fasilitas kepada Penulis.
5. Teman-teman korps Asisten 2017 botani-farmakognosi, yang telah berbagi ilmu dan pengalaman, terlebih kepada Asma, Munawara, Ani, meli, Delli yang membantu Penulis dalam penelitian dan penyusunan skripsi.
6. Teman seperjuangan penelitian *Vernonia amygdalina*, Zizi dan Mega yang telah banyak membantu dalam menyelesaikan penelitian.
7. Teman-teman Penulis, Dandy, Achmad Lutfi , Mega Tri Satria, Abd.Hamid, Awan, Munawara, Asma Aris, Hardiana Lestari, yang selalu memberikan masukan, bantuan, hiburan dan motivasi kepada

Penulis.

8. Teman-teman angkatan 2017 Farmasi Unhas (CLOSTRI17IUM), terlebih kepada seluruh laki-laki angkatan 2017 (17CLOS) yang telah berproses bersama memberikan pengalaman berharga dan memori yang indah untuk Penulis.

Serta ucapan terima kasih kepada semua pihak yang telah membantu dalam menempuh hingga menyelesaikan studi yang Penulis tidak bisa uraikan satu persatu. Penulis menyadari bahwa skripsi ini jauh dari kata sempurna sehingga sangat diharapkan masukan yang membangun. Semoga skripsi ini bermanfaat untuk pengembangan ilmu pengetahuan dimasa yang akan datang.

Makassar, 8 Juni 2021



Zulfadly

ABSTRAK

ZULFADLY. Isolasi dan Karakterisasi Senyawa Penanda Pada Ekstrak Daun *Veronia amygdalya* Delile. (Dibimbing oleh Muhammad Raihan dan Rosany Tayeb)

Veronia amygdalya Delile merupakan tanaman yang sudah sering digunakan sebagai pengobatan tradisional maupun modern seperti ramuan pencahar, antihiperlikemik dan masih banyak lainnya. Menyadari potensi digunakannya *V.amygdalina* sebagai bahan baku obat sehingga perlu dilakukan pencarian senyawa penanda sebagai pembanding dalam standarisasi. Penelitian ini bertujuan untuk mengisolasi dan mengkarakterisasi komponen kimia pada *Veronia amygdalya* Delile yang dapat digunakan senyawa penanda. Proses isolasi dilakukan dengan metode ekstraksi, partisi, kromatografi kolom, kromatografi lapis tipis preparatif, karakterisasi menggunakan instrument spektrofotometer IR, spektrofotometer UV/Vis dan identifikasi komponen kimia. Hasil yang diperoleh berupa ekstrak kental etanol 96% seberat 7,1483 gram (rendemen 15,31%). Karakterisasi isolat menggunakan instrumen spektrofotometer UV/Vis diperoleh panjang gelombang 408 nm dan hasil karakterisasi menggunakan spektrofotometer IR diperoleh karakteristik isolat mengandung gugus -OH (3414 cm^{-1}), C-H (2924 cm^{-1} , 2852 cm^{-1}), -CH₂- (1465 cm^{-1}), C=O (1728 cm^{-1}), C=C (1666 cm^{-1}), C-O (1109 cm^{-1} , 1072 cm^{-1}) yang mengindikasikan senyawa yang berhasil diisolasi merupakan golongan senyawa terpenoid yang didukung dengan hasil uji identifikasi komponen kimia menunjukkan hasil positif untuk uji terpenoid sedangkan pada pengujian flavonoid dan alkaloid diperoleh hasil negatif. Hasil dari penelitian ini perlu dilakukan penelitian lebih lanjut mengenai elucidasi struktur menggunakan instrumen *Nuclear Magnetic Resonance* dan penentuan karakteristik lainnya seperti titik leleh.

Kata kunci: *Veronia amygdalya* Delile, Isolasi, Karakterisasi, Senyawa penanda.

ABSTRACT

ZULFADLY. Isolation and Characterization Biomarker On *Veronia Amygdalina* Delile Leaves Extract. (Supervised by Muhammad Raihan dan Rosany Tayeb)

Veronia amygdalina Delile is a plant that has often been used as traditional and modern medicine such as laxatives, antihyperglycemic and many others. Realizing the potential for using *V.amygdalina* as a medicinal raw material, it is necessary to search for marker compounds as comparisons in standardization. This study aims to isolate and characterize the chemical components of *Veronia amygdalina* Delile that can be used as marker compounds. The isolation process was carried out by extraction, partitioning, column chromatography, preparative thin layer chromatography, characterization using IR spectrophotometer, UV/Vis spectrophotometer and identification of chemical components. obtained in the form of a thick extract of 96% ethanol weighing 7.1483 grams (15.31% yield). Characterization of isolates using a UV/Vis spectrofortometer instrument obtained a wavelength of 408 nm and the results of characterization using an IR spectrometer obtained characteristics of isolates containing -OH groups (3414 cm^{-1}), CH (2924 cm^{-1} , 2852 cm^{-1}), CH_2 (1465 cm^{-1}). C=O (1728 cm^{-1}), C=C (1666 cm^{-1}). C-O (1109 cm^{-1} , 1072 cm^{-1}) which indicates that the compound that has been isolated is a class of terpenoid compounds which is supported by the results of the identification of chemical components which showed positive results for the terpenoid test while the flavonoid and alkaloid tests obtained negative results. The results of this study need further research on the elucidation of the structure using the *Nuclear Magnetic Resonance* instrument and the determination of other characteristics such as melting point.

Key word: *Veronia amygdalina* Delile, Isolation, Characterization, Biomarker.

DAFTAR ISI

	halaman
UCAPAN TERIMA KASIH	v
ABSTRAK	viii
ABSTRACT	ix
DAFTAR ISI	x
DAFTAR TABEL	xiii
DAFTAR GAMBAR	xiv
DAFTAR LAMPIRAN	xv
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 Daun Afrika (<i>Vernonia amygdalina</i> Delile)	5
II.1.1 Klasifikasi Tanaman	5
II.1.2 Morfologi Tanaman	5
II.1.3 Kegunaan	6
II.1.4 Kandungan Senyawa	6
II.2 Ekstraksi	6
II.2.1 Maserasi	7
II.2.2 Perkolasi	7
II.2.3 Infusa	8
II.2.4 Sokhlet	8
II.3 Metabolit Sekunder	8
II.3.1 Metabolit Sekunder dalam <i>Vernonia amygdalina</i> Delile	9

II.3.2 Senyawa Penanda	9
II.3.3 Terpenoid	10
II.3.4 Alkaloid	10
II.3.5 Flavonoid	11
II.4 Kromatografi Lapis Tipis (KLT)	12
II.5 Kromatografi Lapis Tipis Preparatif (KLTP)	13
II.6 Spektroskopi UV-Visible	13
II.7 Spektroskopi FT-IR	14
II.8 Nuclear Magnetic Resonance Spectroscopy (NMR)	17
II.9 Titik Leleh	18
BAB III METODE PENELITIAN	20
III.1 Alat dan Bahan	20
III.2 Metode Penelitian	20
III.2.1 Penyiapan Sampel	20
III.2.2 Pembuatan ekstrak	20
III.2.3 Penentuan Senyawa Penanda	22
III.2.4 Partisi Ekstrak	22
III.2.5 Kromatografi Lapis Tipis (KLT)	22
III.2.6 Kromatografi Kolom	22
III.2.7 Kromatografi Lapis Tipis Preparatif	23
III.2.8 Rekristalisasi	24
III.2.9 Karakterisasi	24
III.3 Pengumpulan, Analisis, Pembahasan, dan Kesimpulan	24
BAB IV HASIL DAN PEMBAHASAN	26
IV.1 Ekstraksi	26
IV.2 Penentuan Senyawa Target	Error! Bookmark not defined.
IV.3 Partisi Ekstrak	Error! Bookmark not defined.
IV.4 Fraksinasi	Error! Bookmark not defined.

IV.5 Kromatografi Lapis Tipis Preparatif (KLTP)	Error! Bookmark not defined.
IV.6 Spektrofotometer UV-Vis	Error! Bookmark not defined.
IV.7 Spektrofotometer FT-IR	Error! Bookmark not defined.
IV.8 Uji Identifikasi Komponen Kimia	Error! Bookmark not defined.
BAB V KESIMPULAN DAN SARAN	35
V.1 Kesimpulan	35
V.2 Saran	35
DAFTAR PUSTAKA	36
LAMPIRAN	39

DAFTAR TABEL

Tabel	Halaman
1. Beberapa kandungan kimia dari <i>V.amygdalina</i> yang telah Dilaporkan	9
2. Bobot hasil fraksi ekstrak etanol 96% <i>V.amygdalina</i>	28
3. Spektrum serapan FT-IR yang diperoleh	32

DAFTAR GAMBAR

Gambar	Halaman
1. Tanaman afrika	5
2. Struktur kimia Sesquiterpen lakton	10
3. Struktur kimia Alkaloid	11
4. Struktur kimia Flavonoid	11
5. Cara kerja alat spektroskopi IR	16
6. Tabel kolerasi data spectrum Spektroskopi FT-IR	17
7. Profil KLT ekstrak daun afrika berbagai pelarut	26
8. Profil KLT hasil partisi	27
9. Profil KLT hasil fraksinasi KCV	28
10. Profil KLT hasil fraksinasi KK	29
11. Profil hasil KLTP	30
12. Profil KLT hasil isolasi	31
13. Hasil Identifikasi Komponen Kimia	33
14. Daun afrika	43
15. Proses maserasi	43
16. Proses evaporasi	43
17. Ekstrak kental etanol 96%	43
18. Proses Fraksinasi dengan KCV	43
19. Hasil fraksinasi KCV	43
20. Proses KLTP	44

DAFTAR LAMPIRAN

Lampiran	Halaman
1. Skema Kerja	39
2. Gambar Penelitian	43
3. Data Hasil Spekrtofotometer UV/Vis	45
4. Data Hasil Spekrtofotometer UV/Vis	46
5. Surat Hasil Determinasi	47

BAB I

PENDAHULUAN

I.1 Latar Belakang

Daun afrika (*Vernonia amygdalina* Delile) secara tradisional digunakan oleh masyarakat di Nigeria dalam pengobatan antelmintik, ramuan pencahar, dan antimalaria (Farombi, 2003). Ijeh dan Ejike (2011) merangkum hasil-hasil penelitian sebelumnya terkait potensi *V. amygdalina* dalam pengobatan diantaranya yaitu sebagai antibakteri, antimalaria, antijamur, antikanker, antioksidan, antidiabetes, analgetik, insektisida, dan lain-lain.

Erasto, dkk (2007) melaporkan bahwa *V. amygdalina* memiliki aktivitas sebagai antioksidan. Hasil penelitiannya menunjukkan bahwa ekstrak etanol dan senyawa *seskuiterpen lakton* (*vernolide* dan *vernodalol*) yang diisolasi dari tanaman *V. amygdalina* menunjukkan aktivitas penghambatan radikal bebas atau IC_{50} terhadap DPPH sebesar 0,04 mg/mL (*vernolide*), 0,03 mg/mL (*Vernodalol*) dan <0.025 mg/mL (ekstrak etanol). Selain memiliki aktivitas antioksidan, dilaporkan pula bahwa ekstrak etanol dari *V. amygdalina* memiliki aktivitas antibakteri terhadap *S. aureus*, *P. aeruginosa*, dan *E. coli* (Adetunji C. O, 2013).

Daun *V. amygdalina* juga diketahui memiliki aktivitas antidiabetes. Pada dosis ekstrak sebesar 400 mg/kg *V. amygdalina* dilaporkan memiliki efek antihiperlipidemik yang paling efektif menurunkan gula darah pada

model tikus untuk diabetes kronik dalam waktu 28 hari pengamatan. Dalam penelitiannya dilaporkan 4 polifenol utama dalam ekstark etanol *V.amygdalina* yaitu asam dikaffeoyl-quinic, asam 1,5-dikaffeoyl-quinic, asam chlorogenic dan luteolin-7-O-glukosida (Ong et al., 2011).

Beberapa penelitian menunjukkan kandungan kimia dari *V.amygdalina* seperti *Vernonioside* A₁-A₃ dan B₁ (Jisaka et al., 1992). Selain itu penelitian lain juga melaporkan kandungan kimia dari *V.amygdalina* seperti *vernodalol*, *vernolide*, *hydroxyvernolide*, *vernodalol*, *vernoniosides* A1-A3, B1-B3, (Koshimizu et al., 1994). Jisaka, dkk (1993) pertamakali melaporkan bahwa dalam penelitiannya berhasil mengisolasi 4 senyawa *sequiterpen laktone* yaitu *vernodalol*, *vernolide*, *hydroxyvernolide*, dan *vernodalol*, dengan masing-masing 2,3 g, 52,5 mg dan 70,1 mg dari 800 g ekstrak daun yang larut dalam etil asetat. Erasto et al (2006) mengekstraksi 500 gram *V.amygdalina* dengan 99% etanol selama 24 jam menghasilkan 42,6 g setelah difraksinasi kemudian diidentifikasi menghasilkan 78 mg senyawa *vernolide* dan 243 mg *Vernodalol*. Pada penelitian lain *V.amygdalina* sebanyak 400 g diekstraksi menggunakan kloroform selama 16 jam menghasilkan 42 g ekstrak kental dan setelah diidentifikasi menghasilkan 866 mg *vernodalol* dan 359 mg *vernolide*. (Kupchan, 1969).

Senyawa penanda dapat diartikan sebagai senyawa acuan yang digunakan sebagai standar dengan tujuan perbandingan dalam menentukan keaslian bahan alam dan membantu dalam penjaminan mutu

obat herbal yang beredar di pasaran (Rasheed A.M.N, Nagaiah K., Goud R.P., 2012). Senyawa penanda atau senyawa marker memiliki beberapa kriteria seperti : merupakan senyawa aktif, senyawa utama atau senyawa yang secara kuantitatif dominan pada suatu tanaman, senyawa khas yang hanya terdapat pada satu tanaman dan senyawa aktual yang merupakan senyawa apapun yang terdapat dalam tanaman yang dianalisis (Saifudin dkk,2011).

Dari uraian diatas diketahui bahwa daun afrika (*Vernonia amygdalina* Delile) memiliki potensi untuk untuk pengembangan obat-obatan kedepannya dengan berbagai kandungan kimia yang telah dilaporkan. Selain itu, perlu dilakukan pencarian senyawa yang lebih spesifik sebagai senyawa penanda. Sehingga perlu dilakukan isolasi dan karakterisasi senyawa penanda daun afrika (*Vernonia amygdalina* Delile) dimana senyawa yang ditargetkan merupakan senyawa yang dominan, sehingga hasil yang diperoleh dapat digunakan dalam standarisasi dari ekstrak daun afrika (*Vernonia amygdalina* Delile) sebagai bahan baku obat.

I.2 Rumusan Masalah

Apa jenis senyawa penanda yang dapat diisolasi dari ekstrak daun afrika (*Vernonia amygdalina* Delile) dan bagaimana karakteristik dari senyawa tersebut ?

I.3 Tujuan Penelitian

Penelitian ini bertujuan untuk mengetahui senyawa penanda yang dapat diisolasi dari ekstrak daun afrika (*Vernonia amygdalina* Delile) dan mengetahui karakteristik senyawa tersebut.

BAB II

TINJAUAN PUSTAKA

II.1 Daun Afrika (*Vernonia amygdalina* Delile)

II.1.1 Klasifikasi Tanaman

Kingdom	: Plantae
Divisio	: Spermatophyta
Sub divisio	: Angiospermae
Class	: Dicotyledonae
Order	: Asterales
Family	: Asteraceae
Genus	: <i>Vernonia</i>
Species	: <i>Vernonia amygdalina</i> Del. (Danladi et al., 2018)



Gambar 1. Tanaman Afrika (*Vernonia amygdalina* Delie. (Danladi et al., 2018)

II.1.2 Morfologi Tanaman

Vernonia amygdalina Delile merupakan tanaman semak yang tumbuh dengan tinggi mencapai 10 m. *V. amygdalina* memiliki batang dengan kulit berwarna abu-abu hingga kecoklat-coklatan. Daun *V. amygdalina* berbentuk bulat lonjong, memiliki ukuran 15 x 5 cm, berwarna hijau hingga hijau gelap, pangkal daun memiliki bentuk yang simetris, tepi daun yang sedikit bergerigi, tangkai daun memiliki ukuran yang pendek sekitar 1-2 cm. Bunga *V. amygdalina* berwarna putih krem, memiliki ukuran yang kecil dengan panjang sekitar 10 mm, kepala bunga berbentuk seperti thistle tumbuh pada terminal maupun ketiak daun

dengan membentuk gugusan datar dengan diameter 15 cm (Ofori et al., 2013).

II.1.3 Kegunaan

Vernonia amygdalina Delile daunnya telah digunakan dalam pengobatan tradisional sebagai pengobatan antelmintik, ramuan pencahar, dan antimalaria (Farombi, 2003). Secara modern *V. amygdalina* juga memiliki potensi sebagai antioksidan yang dilaporkan oleh Erasto, dkk (2007) bahwa kedua senyawa *vernolide* dan *vernodalol* dari ekstrak *V. amygdalina* memiliki aktivitas penghambatan terhadap radikal bebas. Selain itu Ong, dkk (2011) melaporkan bahwa ekstrak *V. amygdalina* pada dosis 400 mg/kg memiliki efek antihiperqlikemik pada hewan coba yang diujikan.

II.1.4 Kandungan Senyawa

Berdasarkan skrining fitokimia yang dilakukan oleh (Adetunji C. O, 2013) *V. amygdalina* memiliki kandungan senyawa golongan flavonoid, saponin, tannin glikosida jantung, dan steroid. Selain itu dilaporkan kandungan kimia dari *V. amygdalina* yaitu *vernodalol*, *vernolide*, *hydroxyvernolide*, *vernodalol*, *vernoniosides A1-A3, B1-B3* (Koshimizu et al., 1994).

II.2 Ekstraksi

Ekstraksi merupakan proses pemindahan komponen satu atau lebih dari suatu fase ke fase yang lainnya (Rostagno and Prado, 2013). Proses ekstraksi merupakan langkah awal dalam mengisolasi senyawa alam

dimana senyawa yang akan diisolasi dipisahkan dari bahan bakunya. Proses ekstraksi terjadi dengan tahapan : (1) pelarut akan menembus kedalam matriks padatan, (2) Zat yang berada dalam matriks akan terlarut oleh pelarut, (3) Zat yang telah terlarut akan berdifusi keluar dari matriks, dan (4) hasil dari ekstraksi yang disebut ekstrak kemudian dikumpulkan untuk tahap selanjutnya. Proses ekstraksi ini dapat dipengaruhi oleh beberapa hal seperti jenis pelarut, ukuran partikel simplisia, suhu, dan waktu mengekstraksi (Zhang et al., 2018).

II.2.1 Maserasi

Maserasi merupakan metode ekstraksi secara dingin dilakukan dengan merendam simplisia kedalam cairan penyari. Metode ini biasanya digunakan pada simplisia yang mengandung zat yang mudah larut dalam cairan penyari dan biasanya digunakan untuk simplisia yang kandungan zatnya belum diketahui sifat fisika-kimianya. Keuntungan metode ini adalah pengerjaan dan alat yang digunakan lebih sederhana (Najib, 2018).

II.2.2 Perkolasi

Perkolasi juga merupakan metode ekstraksi secara dingin namun berbeda dengan maserasi, pengerjaan metode perkolasi yaitu dengan mengalir sampel pada ada alat perkolator dengan cairan penyari secara terus menerus menggunakan pelarut yang baru. Sehingga membuat penggunaan cairan penyari yang lebih banyak yang merupakan kekurangan dari metode ini (Najib, 2018).

II.2.3 Infusa

Infusa merupakan metode ekstraksi secara panas dimana menggunakan cairan penyari air pada temperatur 90°C dalam waktu 15-20 menit (Najib, 2018).

II.2.4 Sokhlet

Sokhletasi merupakan metode ekstraksi yang umumnya digunakan untuk sampel yang tahan akan pemanasan, sampel dimasukkan ke kertas sari kemudian dimasukkan ke slongsong, cairan penyari dipasang pada labu alas yang kemudian dipanaskan hingga pelarut menguap dan terkondensasi kemudian turun lagi ke slongsong untuk membasahi sampel dan kembali lagi ke labu alas bulat setelah melewati pipa sifon, hal ini terjadi berulang kali (Najib, 2018).

II.3 Metabolit Sekunder

Metabolit merupakan produk dari hasil metabolisme yang terjadi secara alami dengan ukuran yang umumnya kecil. Metabolit terbagi dua metabolit primer dan sekunder, dimana Metabolit primer bertanggung jawab langsung atas pertumbuhan dan perkembangan suatu organisme misalnya vitamin, lipid, polisakarida dan lain-lain, sedangkan metabolit sekunder tidak bertanggung jawab langsung atas proses tersebut namun tetap memiliki fungsi tersendiri namun tidak begitu penting bagi organisme tersebut, metabolit ini dibagi atas beberapa kelas berdasarkan dari fungsinya seperti alkaloid, fenolik, terpenoid, dan lain-lain (Copper and Nicola, 2014).

II.3.1 Metabolit Sekunder dalam *Vernonia amygdalina* Delile

Berdasarkan skrining fitokimia yang dilakukan oleh (Adetunji C. O, 2013) *V. amygdalina* memiliki kandungan senyawa golongan flavonoid, saponin, tannin glikosida jantung, dan steroid. Selain itu dilaporkan kandungan kimia dari *V. amygdalina* yaitu *vernodalol*, *vernolide*, *hydroxyvernolide*, *vernodalol*, *vernoniosides A1-A3, B1-B3* (Koshimizu et al., 1994).

Tabel 1. Beberapa kandungan kimia dari *V. amygdalina* yang telah dilaporkan

No	Referensi	Senyawa yang diidentifikasi
1	Jisaka, dkk (1992)	<i>Vernonioside A₁-A₃ dan B₁</i>
2	Koshimizu, dkk (1994)	<i>Vernodalol, Vernolide, Hydroxyvernolide, Vernodalol, Vernoniosides A1-A3, B1-B3,</i>
3	Erasto, dkk (2007)	<i>Vernolide Dan Vernodalol</i>
4	Jisaka, dkk (1993)	<i>Vernodalol, Vernolide, Hydroxyvernolide, dan Vernodalol</i>
5	Kupchan (1969)	<i>Vernodalol dan Vernodalol</i>

II.3.2 Senyawa Penanda

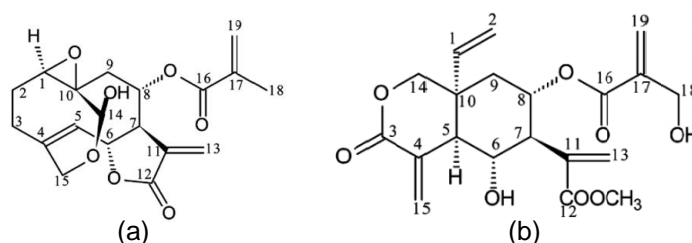
senyawa penanda merupakan komponen kimia yang ditentukan dari bahan obat herbal atau obat herbal yang digunakan dalam standarisasi bertujuan untuk mengontrol pengawasan mutu sehingga keamanan dan khasiat dari penggunaan obat tradisional lebih terjamin (Rasheed A.M.N, Nagaiah K., Goud R.P., 2012).

Senyawa penanda memiliki kriteria seperti berikut : (Saifudin dkk, 2011).

1. Senyawa aktif, yakni senyawa yang bertanggung jawab atas aktivitas dari bahan obat ataupun obat.
2. Senyawa utama, yakni senyawa yang memiliki konsentrasi yang lebih dominan ditandai dengan mudahnya diperoleh meskipun menggunakan instrument yang murah dan sederhana.
3. Senyawa identitas, yakni senyawa yang khas, unik, dan terdapat hanya pada tanaman itu saja.
4. Senyawa aktual, yakni senyawa apapun yang asalkan terdapat pada tanaman yang dianalisis.

II.3.3 Terpenoid

Terpenoid merupakan senyawa minyak esensial yang memiliki struktur dasar isoprene (2-metilbutadiena). Struktur dari terpenoid akan selalu memiliki kelipatan lima atom karbon dari struktur awalnya, hemiterpenoid (C₅), kelompok monoterpenoid (C₁₀), dan sesquiterpenoid (C₁₅) (Rostagno and Prado, 2013).

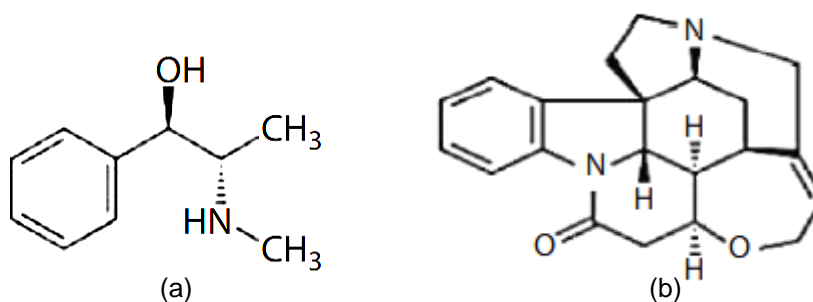


Gambar 2. Struktur kimia sesquiterpen lakton (Erasto, dkk 2007), (a) Vernolide, (b) Vernodalol

II.3.4 Alkaloid

Alkaloid merupakan kelompok senyawa basa organik yang mengandung amina sekunder, tersier, hingga siklik. Sekitaran 550 jenis

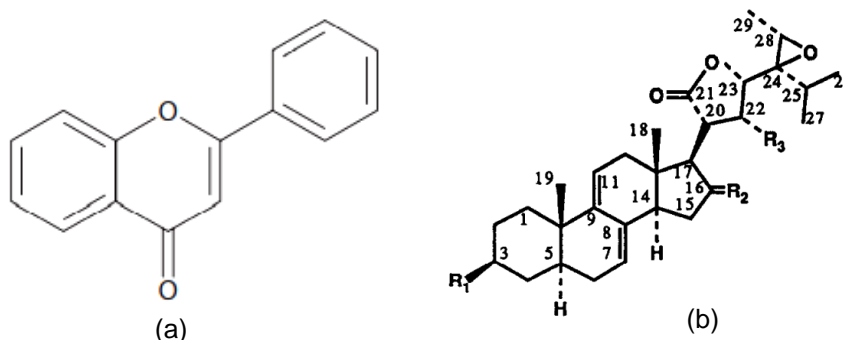
alkaloid yang diketahui yang merupakan metabolit sekunder suatu tanaman. Sebenarnya tidak ada definisi pasti dari alkaloid namun yang kita pahami bersama ialah suatu zat yang memiliki struktur dasar mengandung satu atom nitrogen ataupun lebih, biasanya menjadi penyusun dalam siklik (Makkar et al., 2005).



Gambar 3. Struktur Kimia Alkaloid (Copper and Nicola, 2014) (a) efedrin, (b) striknin

II.3.5 Flavonoid

Flavonoid merupakan senyawa turunan fenolik dimana memiliki ciri khas struktur $C_6 - C_3 - C_6$ dua cincin aromatic yang dihubungkan dengan 3 atom C yang biasanya berikatan dengan ato O membentuk ikatan heterosiklik (Hanani,2015). kelompok flavonoid didasarkan pada derajat oksidasi jembata 3-C dan menghasilkan beberapa struktur seperti flavon, flavonol, isoflavon, dan antosianin (Copper and Nicola, 2014).



Gambar 4. Struktur Kimia Flavonoid (a) flavonoid, (Copper and Nicola, 2014) (b) Vernoside (Jisaka, dkk 1992)

II.4 Kromatografi Lapis Tipis (KLT)

Kromatografi lapis tipis (KLT) merupakan metode pemisahan yang menggunakan lapisan tipis sorben (fase diam) dengan ketebalan yang merata biasanya sekitar 0,1 hingga 0,25 mm diaplikasikan pada plat dari aluminium, kaca, dan plastik. Ada banyak jenis sorben yang sering digunakan seperti silika gel, selulosa, aluminium oksida, dan lain-lain. Sampel dilarutkan dengan pelarut yang sesuai kemudian ditotolkan membentuk sebuah titik atau pita pada lapisan sorben. Eluen (fase gerak) merupakan pelarut tunggal atau campuran pelarut yang dibiarkan mengalir melalui sorben yang dimulai dari bawah sampel yang telah ditotolkan, eluen ini akan dituangkan pada ruang kromatografi atau tangki kaca berbentuk persegi (chamber) kemudian plat KLT disimpan di dalam chamber berisi eluen kemudian ditutup. Eluen akan bergerak berdasarkan gaya kapiler melalui sorben diikuti dengan komponen sampel yang juga ikut bergerak, tetapi dengan kecepatan yang berbeda sehingga menghasilkan sebuah pemisahan. Ketika eluen mencapai batas yang mendekati tepi atas plat, plat kemudian diangkat dan dikeringkan lalu divisualisasikan, jika perlu menggunakan UV dan semprotan bahan kimia (Wall, 2005).

Nilai R_f (retardation factor) merupakan karakteristik dari KLT dimana menggambarkan pemisahan senyawa berdasarkan kecepatan migrasinya. R_f didefinisikan perbandingan jarak tempuh noda (b) dengan jarak tempuh eluen (a), $R_f = b / a$ (Marzuki, 2018).

II.5 Kromatografi Lapis Tipis Preparatif (KLTP)

Hal yang membedakan KLTP dengan KLT yaitu pada KLTP sampel diaplikasikan dalam bentuk pita pada selebar plat dan pemisahan senyawa lebih eksklusif. Pengaplikasian sampel biasanya diberikan jarak 2 cm dari tepi untuk menghindari efek tepi, biasanya pengembangan memakan waktu yang lebih lama tergantung dari ketebalan dari plat. Eluen atau fase gerak dipilih dari uji KLT sebelumnya dan seringkali digunakan pelarut yang sedikit kurang polar dari eluen yang diuji pada KLT sebelumnya. Pada saat elusi setelah eluen bermigrasi sekitar 2 cm kepolaran biasanya ditingkatkan untuk meningkatkan kualitas pemisahan. Setelah di elusi zona yang terbentuk diamati di UV kemudian ditandai dan dipisahkan zona yang diinginkan menggunakan spatula, penting diperhatikan menandai lebih sedikit di bawah zona, sorben dengan senyawa dapat dipisahkan dengan penyaringan kemudian diuapkan untuk mendapatkan senyawa dalam bentuk kristal (Wall, 2005).

II.6 Spektroskopi UV-Visible

Informasi yang diperoleh dari spektroskopi uv-visible ketika digabungkan dengan hasil dari instrument NMR dapat menjadi hal penting untuk menentukan suatu struktur yang dimiliki suatu senyawa . Panjang gelombang maximum dan minimum serapan spektrum akan tercatat dalam satuan nm. Pengukuran untuk sampel yang tidak tampak atau tidak berwarna dilakukan dalam rentang 200-400 nm, sedangkan untuk sampel yang tampak atau berwarna dilakukan dalam rentang 200-700 nm. pelarut

yang biasa digunakan adalah etanol 95% karena bisa melarutkan sebagian besar dari kelas senyawa, pelarut yang komersial sangat dihindari (Harborne, 1984).

Spektroskopi UV-Visible bekerja dengan melewati radiasi secara berkelanjutan kemudian sampel akan menyerap beberapa radiasi, kemudian radiasi yang lewat akan terekam disebut spektrum absorpsi. Absorpsi radiasi ini terjadi ketika perpindahan energi dari rendah ke keadaan yang lebih tinggi atau disebut eksitasi (Pavia et al., 2013)

Panjang gelombang yang terserap dipengaruhi oleh inti atom yang terikat oleh elektron, kekuatan ikatan antara elektron dengan inti atom akan mempengaruhi jarak energi dasar dengan energi yang tereksitasi, ikatan antara inti dengan elektron menimbulkan energi karakteristik dari transisi dan panjang gelombang, sekelompok atom yang mengabsorpsi radiasi disebut kromofor. Setiap senyawa akan memiliki transisi energi yang berbeda (Pavia et al., 2013).

II.7 Spektroskopi FT-IR

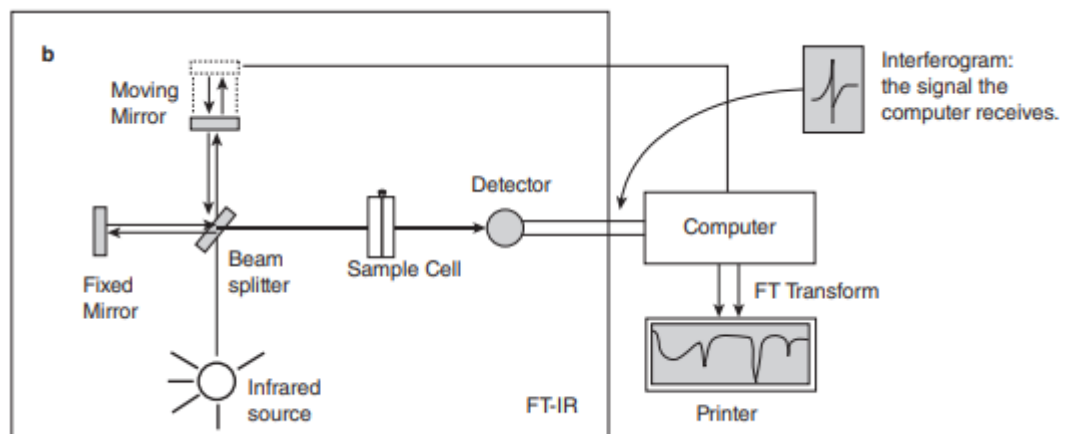
Spektrofotometer merupakan instrument yang menentukan spectrum absorpsi sebuah senyawa, salah satunya IR, terdapat dua jenis IR yaitu dispersive dan transformasi fourier (FT) dimana keduanya memberikan informasi spectrum dalam kisaran 4000 hingga 400 cm^{-1} (Pavia et al., 2013).

Setiap molekul memiliki serapan infra merah yang berbeda, dikarekan setiap ikatan memiliki getaran frekuensinya masing-masing dan

meskipun jenis ikatan yang sama namun berada pada dua senyawa yang berbeda akan memiliki perbedaan lingkungan sehingga menyebabkan absorpsi infra merah akan berbeda. Penggunaan IR ini yaitu untuk menyelidiki suatu senyawa yang identik dan juga penting digunakan dalam menentukan informasi struktur dari suatu senyawa (Pavia et al., 2013).

Spektrofotometer IR bekerja dengan berbagai prinsip bergantung pada pola jalur optic yang digunakan disebut interferogram. Interferogram merupakan sebuah signal kompleks dan menjadi dasar penentuan spectrum infra merah berdasarkan pola gelombang yang terbentuk dari cahaya. Salah satu jenis spektrofotometer IR adalah Fourier transform Infra red (FTIR) yang dapat memisah masing-masing frekuensi absorpsi dari interferogram kemudian membentuk spectrum tampak kemudian terukur pada spectrometer. Keuntungan dari spektrofotometer jenis FTIR yaitu dapat menentukan interferogram kurang dari satu detik. Dengan demikian, hal ini memungkinkan untuk mendapatkan lusinan interferogram dalam suatu sampel kemudian mengumpulkannya dalam computer. Ketika *fourier transform* bekerja pada interferogram yang telah dikumpulkan, spectrum dengan rasio signal yang baik akan *diplot*. Sehingga FTIR merupakan instrument sensitive dan dapat mengukur dengan cepat (Pavia et al., 2013).

Struktur senyawa dapat diketahui dengan membandingkan hasil spectrum dengan tabel kolerasi infra merah yang meberikan informasi dimana suatu gugus fungsi mengalami absorpsi.



Gambar 5. Cara kerja Spektroskopi FT-IR (Pavia et al., 2013)

Type of Vibration			Frequency (cm ⁻¹)	Intensity
C-H	Alkanes	(stretch)	3000-2850	s
	-CH ₃	(bend)	1450 and 1375	m
	-CH ₂ -	(bend)	1465	m
	Alkenes	(stretch)	3100-3000	m
		(out-of-plane bend)	1000-650	s
	Aromatics	(stretch)	3150-3050	s
		(out-of-plane bend)	900-690	s
	Alkyne	(stretch)	ca. 3300	s
	Aldehyde		2900-2800	w
			2800-2700	w
C-C	Alkane	Not interpretatively useful		
C=C	Alkene	1680-1600	m-w	
	Aromatic	1600 and 1475	m-w	
C≡C	Alkyne	2250-2100	m-w	
C=O	Aldehyde	1740-1720	s	
	Ketone	1725-1705	s	
	Carboxylic acid	1725-1700	s	
	Ester	1750-1730	s	
	Amide	1700-1640	s	
	Anhydride	1810 and 1760	s	
	Acid chloride	1800	s	
C-O	Alcohols, ethers, esters, carboxylic acids, anhydrides	1300-1000	s	
O-H	Alcohols, phenols			
	Free	3650-3600	m	
	H-bonded	3400-3200	m	
	Carboxylic acids	3400-2400	m	
N-H	Primary and secondary amines and amides			
	(stretch)	3500-3100	m	
	(bend)	1640-1550	m-s	
C-N	Amines	1350-1000	m-s	
C=N	Imines and oximes	1690-1640	w-s	
C≡N	Nitriles	2260-2240	m	
X=C=Y	Allenes, ketenes, isocyanates, isothiocyanates	2270-1940	m-s	
N=O	Nitro (R-NO ₂)	1550 and 1350	s	
S-H	Mercaptans	2550	w	
S=O	Sulfoxides	1050	s	
	Sulfones, sulfonyl chlorides, sulfates, sulfonamides	1375-1300 and 1350-1140	s	
C-X	Fluoride	1400-1000	s	
	Chloride	785-540	s	
	Bromide, iodide	< 667	s	

Gambar 6. Tabel kolerasi data spektrum Spektroskopi FT-IR (Pavia et al., 2013)

II.8 Nuclear Magnetic Resonance Spectroscopy (NMR)

Spektroskopi NMR (Nuclear Magnetic Resonance) merupakan metode yang sangat penting digunakan untuk mengidentifikasi suatu struktur senyawa organik. NMR terbagi dua yaitu ¹H NMR dan ¹³C NMR bekerja dengan menganalisa suatu struktur senyawa organik dengan mengukur tumbukan medan magnet yang dimiliki oleh atom hydrogen dan carbon. Kelebihan NMR yaitu sampel yang telah diukur atau melewati

proses tidak mengalami perubahan sehingga dapat digunakan untuk analisis yang lainnya (Harborne, 1984).

Ada empat informasi yang dapat diperoleh dari spectrum ^1H NMR yaitu (Mohrig et al., 2014) :

1. Jumlah jenis proton yang berbeda dalam suatu molekul sampel, akan terbaca dalam bentuk kelompok sinyal,
2. Jumlah proton pada setiap kelompok sinyal, yang disebut integrasi,
3. Posisi kelompok sinyal pada sumbu horizontal, yang disebut chemical shift atau pergeseran kimia, dan
4. Split atau pola yang terbentuk (singlet, doublet, triplet, dan lain-lain).

^{13}C NMR memiliki kemiripan dengan ^1H NMR, tetapi ^{13}C NMR memberikan informasi langsung terkait kerangka karbon suatu molekul sehingga digunakan dalam penentuan struktur molekul (Mohrig et al., 2014).

II.9 Titik Leleh

Titik leleh atau rentang leleh merupakan titik dimana terjadi proses perubahan dari padatan menjadi cairan, pencairan terjadi ketika susunan molekul dalam padatan kristal mengalami pergerakan bebas secara acak dalam perubahan ini tentunya memerlukan energy panas. Pengukuran titik lebur bertujuan untuk menentukan identitas suatu senyawa dan juga kemurniannya. Senyawa yang murni biasanya meleleh pada suhu $0,5^\circ - 1,5^\circ\text{C}$, sedangkan senyawa yang kurang murni biasanya memiliki rentang

yang lebih besar. Untuk menentukan titik leleh metode yang sering digunakan ialah memanaskan zat padat dalam jumlah yang kecil pada pipa kapiler secara elektrik, saat ini alat yang digunakan paling banyak yang berbasis digital karena memiliki banyak keuntungan seperti kecepatan memanskan dapat diatur hingga suhu diukur menggunakan sensor dan terekam pada ICD digital, sehingga memudahkan dalam proses pengukuran (Mohrig et al., 2014).