OPTIMASI PROSES EKSTRAKSI DAUN *Morus nigra* L. SECARA MASERASI DENGAN PENDEKATAN RESPONSE SURFACE ANALYSIS

OPTIMIZATION OF *Morus nigra* L. LEAF EXTRACTION PROCESS BY MACERATION USING RESPONSE SURFACE ANALYSIS APPROACH

ASRIYANI

N011 18 1306

PROGRAM STUDI FARMASI
FAKULTAS FARMASI
UNIVERSITAS HASANUDDIN
MAKASSAR
2022

OPTIMASI PROSES EKSTRAKSI DAUN *Morus nigra* L. SECARA MASERASI DENGAN PENDEKATAN RESPONSE SURFACE ANALYSIS

OPTIMIZATION OF *Morus nigra* L. LEAF EXTRACTION PROCESS BY MACERATION USING RESPONSE SURFACE ANALYSIS APPROACH

SKRIPSI

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

ASRIYANI

N011 18 1306

PROGRAM STUDI FARMASI
FAKULTAS FARMASI
UNIVERSITAS HASANUDDIN
MAKASSAR
2021

OPTIMASI PROSES EKSTRAKSI DAUN *Morus nigra* L. SECARA MASERASI DENGAN PENDEKATAN RESPONSE SURFACE ANALYSIS

ASRIYANI

N011 18 1306

Disetujui oleh:

Pembimbing Utama,

Prof. Dr Gemini Alam, M.Si., Apt.

NIP. 19641231 199002 1 005

Pembimbing Pendamping,

Dra. Rosany Tayeb, M.Si., Apt.

NIP. 19561011 198603 2 002

Pada Tanggal, 17 Mei 2022

LEMBAR PENGESAHAN SKRIPSI

OPTIMASI PROSES EKSTRAKSI DAUN *Morus nigra* L. SECARA MASERASI DENGAN PENDEKATAN RESPONSE SURFACE ANALYSIS

OPTIMIZATION OF *Morus nigra* L. LEAF EXTRACTION PROCESS BY MACERATION USING RESPONSE SURFACE ANALYSIS APPROACH

Disusun dan diajukan oleh:

ASRIYANI
N011 18 1306

Telah dipertahankan di hadapan Panitia Ujian yang dibentuk dalam rangka Penyelesaian Studi Program Sarjana Program Studi Farmasi Fakultas Farmasi Universitas Hasanuddin
pada tanggal 17 Mei 2022
dan dinyatakan telah memenuhi syarat kelulusan

Menyetujui,

Pembimbing Utama,	Pembimbing Pendamping,
Prof. Dr Gemini Alam, M.Si., Apt.	Dra. Rosany Tayeb, M.Si., Apt.
NIP. 19641231 199002 1 005	NIP. 19561011 198603 2 002

Ketua Program Studi S1 Farmasi,
Fakultas Farmasi Universitas Hasanuddin

Nurhasni Hasan, S.Si., M.Si., M.Pharm.Sc., Ph.D., Apt.
NIP. 19860116 201012 2 009

PERNYATAAN KEASLIAN SKRIPSI

Yang bertanda tangan dibawah ini ;

Nama	: Asriyani
Nim	: N011 18 1306
Program Studi	: Farmasi
Jenjang	: S1

Menyatakan dengan ini bahwa karya tulisan saya berjudul "Optimasi Proses Ekstraksi Daun *Morus nigra* L. Secara Maserasi Dengan Pendekatan Response Surface Analysis" adalah karya tulisan saya sendiri dan bukan merupakan pengambilan alihan tulisan orang lain bahwa skripsi yang saya tulis benar benar merupakan hasil karya saya sendiri.

Apabila dikemudian hari terbukti atau dapat dibuktikan bahwa sebagian atau keseluruhan skripsi ini hasil karya orang lain, maka saya bersedia menerima sanksi atas perbuatan tersebut.

Makassar, 17 Mei 2022

Yang menyatakan,

Asriyani

UCAPAN TERIMA KASIH

Alhamdulilahi Rabiil ‘alamiin segala puji bagi Allah *subhanahu wa ta’ala* yang telah memberikan rahmat dan karunia-Nya, berupa nikmat kesempatan dan kesempatan 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 banyak kesulitan yang dihadapi dan tidak terlepas dari dukungan berbagai pihak. Penulis banyak menerima bimbingan, petunjuk dan bantuan serta dorongan dari berbagai pihak baik bersifat moral maupun material. Untuk itu menulis ingin mengucapkan terima kasih yang sebesar–besarnya dan penghargaan setinggi-tingginya kepada:

1. Prof. Dr. Gemini Alam, M.Si., Apt. selaku pembimbing utama dan Bapak Dra. Rosany Tayeb, M.Si., Apt. selaku pembimbing pendamping yang telah meluangkan banyak waktu dan tenaganya untuk memberikan bimbingan, arahan, saran, serta bantuan bagi penulis dalam melaksanakan penelitian dan banyak melatih penulis untuk berpikir kritis dan logis dalam menyelesaikan suatu permasalahan.
2. Bapak Muhammad Aswad dan Ibu Yayu Mulsiani Evary selaku penguji yang telah meluangkan waktunya dan memberikan masukan

dan saran terkait penelitian ini dan dalam proses menyelesaikan skripsi ini

3. Prof. Dr. Elly Wahyudin, DEA., Apt. selaku pembimbing akademik yang telah membimbing selama proses menyelesaikan studi di fakultas Farmasi Universitas Hasanuddin.
4. Dosen pembimbing akademik dan seluruh Bapak/ Ibu dosen Fakultas Farmasi Universitas Hasanuddin yang telah memberikan ilmunya dan membimbing penulis selama masa studi S1 juga seluruh staf akademik dan segala fasilitas dan pelayanan yang telah diberikan kepada penulis selama menempuh studi sehingga menyelesaikan penelitian ini.
5. Ucapan terima kasih yang setulus-tulusnya khususnya kepada orang tua penulis yaitu Bapak Laere dan Ibu Hatima, kakak penulis Asriyanto serta beberapa keluarga penulis yang tanpa henti memberikan dukungan, motivasi, kasih sayang, serta doa yang tulus yang selalu mengiringi langkah penulis.
6. Sahabat-sahabat penulis, Nirma, Delly, Acce, Fiqri, Safe, Juju, Ama, Hilda, Aqilah, Utti, Nunu, dan Ila untuk setiap dukungan, doa, semangat dan motivasi yang diberikan kepada penulis.
7. Rekan-rekan Asisten Farmasetika, Dosen dan Laboran yang senantiasa membantu dan memberikan dukungan kepada penulis.

8. Teman-teman tim murbei Ime, Ulfa, Hilda, Ayu, Iyang, Ciki, Isna, Ikka atas kerjasamanya serta Awal, Sarman, Safe, Irfan, dan Usri, Elga atas bantuannya kepada penulis.
9. Teman KKN dan teman kos pernulis yaitu Ummi, Aini, Puteri, Yanti, Nunung, Mute dan Ayu yang selalu memberikan dukungan kepada penulis.
10. Teman LKTI BIOEXPO, Asfa dan Daya yang selalu memberikan dukungan, semangat dan rasa percaya diri yang tinggi kepada penulis
11. Teman-teman angkatan "GEMF18ROZIL" atas kebersamaan yang diberikan selama penulis berada di bangku perkuliahan, melewati suka dan duka dalam perkuliahan dan selama penyelesaian skripsi. .
12. Semua pihak yang telah membantu yang tidak sempat disebutkan satu persatu.

Penulis berharap agar skripsi ini dapat memberikan manfaat dalam sumbangsih ilmu pengetahuan khususnya dalam bidang Farmasi dan dapat dijadikan acuan untuk mengembangkan penelitian penelitian selanjutnya

Makassar, 17 Mei 2022

Asriyani

ABSTRAK

ASRIYANI. Optimasi Proses Ekstraksi Daun *Morus nigra* L. Secara Maserasi Dengan Pendekatan Response Surface Analysis (dibimbing oleh Gemini Alam dan Rosany Tayeb)

Murbei hitam (*Morus nigra* L.) merupakan salah satu jenis tanaman genus *Morus* dan termasuk kedalam famili Moraceae. *M. nigra* L. memiliki beberapa kandungan senyawa metabolit seperti senyawa fenolik dengan aktivitas antioksidan tinggi. Untuk mendapatkan senyawa dari suatu tanaman maka diperlukan suatu metode ekstraksi, sehingga pada penelitian ini bertujuan untuk mengetahui optimasi proses ekstraksi daun *M. nigra* L. secara maserasi dengan pendekatan *Response Surface Analysis*. Ekstraksi dilakukan secara maserasi dengan menggunakan 3 parameter uji yaitu konsentrasi pelarut (etanol 30%, etanol 70%, dan etanol 96%), rasio sampel-pelarut (1:10, 2:10, dan 3:10), dan waktu ekstraksi (1 hari, 2 hari, dan 3 hari). Berdasarkan hasil penelitian menunjukkan bahwa proses optimasi daun M. nigra L secara maserasi diperoleh hasil persen rendemen esktrak yang optimum yaitu sebesar 18,06% pada waktu maserasi 72 jam, perbandingan rasio sampel pelarut 1:10 dan konsentrasi pelarut etanol 30%. Sedangkan kadar fenolik total diperoleh hasil yang optimum yaitu 628,07 mgGAE/g pada waktu maserasi 24 jam, perbandingan rasio sampel pelarut 2:10 dan konsentrasi pelarut etanol 94%.

Kata Kunci : *Morus nigra* L., maserasi, fenolik total, *Response Surface Methodology*

ABSTRACT

ASRIYANI. Optimization of *Morus nigra* L. Leaf Extraction Process by Maceration Using Response Surface Analysis Approach (supervised by Gemini Alam dan Rosany Tayeb)

Black mulberry (Morus nigra L.) is a type of plant belonging to the Morus genus and belongs to the Moraceae family. *M. nigra* L. contains several metabolites such as phenolic compounds with high antioxidant activity. To obtain compounds from a plant, an extraction method is needed, so this study aims to determine the optimization of the extraction process of *M. nigra* L. leaves by maceration with the Response Surface Analysis approach. Extraction was carried out by maceration using 3 test parameters, namely solvent concentration (30% ethanol, 70% ethanol, and 96 % ethanol), sample-solvent ratio (1:10, 2:10, and 3:10), and extraction time (1 day, 2 days, and 3 days). Based on the results of the study showed that the optimization process of M. nigra L leaves by maceration obtained the optimum extract % yield of 18,06%% at 72 hours of maceration, the ratio of the sample solvent ratio was 1:10 and the solvent concentration was ethanol 30%. While the total phenolic content obtained the optimum result is 628,07 mgGAE/g at 24 hours of maceration, the ratio of the sample solvent ratio is 2:10 and the solvent concentration is ethanol 94%.

Keywords: Morus nigra L., maceration, total phenolic, Response Surface Methodology

DAFTAR ISI

	Halaman
UCAPAN TERIMA KASIH	vii
ABSTRAK	x
ABSTRACT	xi
DAFTAR ISI	xii
DAFTAR TABEL	xv
DAFTAR GAMBAR	xvi
DAFTAR SINGKATAN	xix
DAFTAR LAMPIRAN	xx
BAB I PENDAHULUAN	1
I.1 Latar Belakang	1
I.2 Rumusan Masalah	3
I.3 Tujuan Penelitian	3
BAB II TINJAUAN PUSTAKA	4
II.1 Tanaman *Morus nigra* L.	4
II.1.1 Taksonomo tanaman	4
II.1.2 Morfologi tanaman	5
II.1.3 Kandungan kimia	5
II.1.4 Kegunaan tanaman murbei	5
II.2 Ekstraksi	5
II.2.1 Pengertian ekstraksi	5

II.2.2 Metode ekstraksi 6
II.3 KLT-Densitometri 12
II.4 Metabolit sekunder 14
II.5 Spektrofotometri UV-Vis 17
II.6 *Response surface methodology* (RSM) 18
BAB III METODE PENELITIAN 20
III.1 Alat dan Bahan 20
III.2 Metode Kerja 20
III.2.1 Pengambilan dan penyiapan sampel 20
III.3 Optimasi proses ekstraksi 21
III.3.1 Penentuan parameter uji 21
III.3.2 Ekstraksi 22
III.3.3 Penentuan bobot ekstrak hasil ekstraksi maserasi dan persen rendemen 22
III.3.4 Penentuan metabolit sekunder dengan metode KLT-Densitometri 22
III.3.5 Penentuan kadar fenolik total dengan metode spektrofotometri UV-VIs 22
III.3.6 Analisis response surface methodology (software minitab version 18) 24
BAB IV Hasil Dan Pembahasan 26
IV.1 Hasil analisis persen rendemen optimum 26
IV.2 Hasil analisis kadar fenolik total optimum 29

IV.3 KLT-Densitometri 33

BAB V PENUTUP 36

V.1 Kesimpulan 36

V.2 Saran 36

DAFTAR PUSTAKA 37

LAMPIRAN 40

DAFTAR TABEL

Tabel Halaman

1. Penentuan parameter uji untuk metode ekstraksi 21
2. Optimalisasi ekstrak etanol daun *M. nigra* L. metode ekstraksi maserasi daun 28

DAFTAR GAMBAR

Gambar		halaman
1.	Buah *Morus nigra* L.	4
2.	Proses maserasi (Julianto, 2019)	6
3.	Perkolator (Julianto, 2019)	7
4.	Rangkaian alat refluks (Tian et al., 2016)	7
5.	Rangkaian alat sokhlet (Julianto, 2019)	8
6.	Rangkaian alat *supercritical fluid extraction* (Julianto, 2019)	10
7.	Rangkaian alat *microwave assisted extraction* (Julianto, 2019)	11
8.	Rangkaian alat *ultrasound assisted extraction* (Julianto, 2019)	11
9.	Rangkaian alat *acelarated assisted extraction* (Julianto, 2019)	12
10.	Diagram skematis spektrofotometri UV-Vis (Marzuki, 2019)	18
11.	PCA score plot KLT-Densitometri ekstrak daun *M. nigra* L pada UV 254 nm	29
12.	PCA score plot KLT-Densitometri ekstrak daun *M. nigra* L pada UV 366 nm	30
13. .	Dendogram CA KLT-Densitometri ekstrak daun *M. nigra* L pada UV 254 nm	32
14.	Dendogram CA KLT-Densitometri ekstrak daun *M. nigra* L pada UV 366 nm	32
15.	*Preto chart* dari persen rendemen ekstrak ekstrak daun *M. nigra* L. vs waktu;rasio pelarut; konsentrasi pelarut	34
16.	*Countour plot* dari persen rendemen ekstrak daun M. nigra L.	35

17. *Surface plot* dari persen rendemen ekstrak persen rendemen ekstrak daun *M. nigra* L. 37
18. *Optimization plot* dari persen rendemen ekstrak daun *M. nigra* L.vs waktu;rasio sampel pelarut;konsentrasi pelarut 38
19. *Preto chart* dari kadar fenolik ekstrak daun *M. nigra* L. vs waktu;rasio pelarut; konsentrasi pelarut 38
20. *Countour plot* dari kadar fenolik ekstrak daun *M. nigra* L. 40
21. *Surface plot* dari kadar fenolik ekstrak daun *M. nigra* L. 42
22. *Optimization plot* dari kadar fenolik ekstrak daun *M. nigra* L.vs waktu;rasio sampel pelarut;konsentrasi pelarut 42

DAFTAR SINGKATAN

KLT = Kromatografi Lapis Tipis

TLC = Thin Layer Chromatography

RSM = Response Surface Methodology

CCD = Central Composite Design

BBD = Box-Bhenken Design

nm = Nanometer

UV = Ultra Violet

Vis = Visibel

PCA = Principle Component Analysis

CA = Cluster Analysis

DAFTAR LAMPIRAN

Lampiran		Halaman
1.	Skema kerja	40
2.	Hasil determinasi tanaman	45
3.	Data hasil *TLC Scanner*	46
4.	KLT-Densitometri	52
5.	Penentuan panjang gelombang maksimum dan kurva baku asam galat	53
6.	Perhitungan	54
7.	Dokumentasi kegiatan	57

BAB I

PENDAHULUAN

I.1 Latar Belakang

Murbei hitam (*Morus nigra* L.) merupakan salah satu jenis tanaman dari genus *Morus* dan termasuk kedalam famili Moraceae (Hussain *et al.*, 2017). *M. nigra* L. merupakan salah satu jenis tanaman yang dapat tumbuh di daerah beriklim seperti di wilayah Asia, Eropa, Afrika Utara dan Selatan, serta Amerika (Abbas and Rehmat, 2020).

M. nigra L. memiliki banyak manfaat dalam pengobatan tradisional, dimana pada beberapa penelitian telah membuktikan bahwa tanaman ini memiliki manfaat perlindungan terhadap organ tubuh manusia, sebagian besar manfaat tanaman ini didasarkan pada kemampuan antioksidannya, selain itu *M. nigra* L. juga merupakan sumber nutrasetikal progresif yang dapat menghambat berbagai penyakit kronis (Abbas and Rehmat, 2020). Hal ini disebabkan karena kandungan senyawa fitokimianya yang tinggi seperti polifenol dan flavonoid (Lim and Choi, 2019). Daun *M. nigra* L. kaya akan senyawa polifenol terutama senyawa rutin, klorogenat, dan asam *caffeic* dengan aktivitas antioksidan yang tinggi (Radojkovic *et al*., 2017) dan pada senyawa flavonoid yaitu *kaempferol* 3-O-glikosida dan *quercetin* 3-O-glikosida (Moura *et al*., 2019). Jika senyawa fenolik pada bagian buah dibandingkan dengan bagian daun, maka pada bagian daun lebih tinggi kadar fenoliknya yaitu kisaran 6,43 sampai 10,0 mg/g sampel

kering dibanding pada bagian buah yaitu 0,16 sampai 3,62 mg/g sampel kering (Sánchez-Salcedo *et al.*, 2015).

Untuk mendapatkan senyawa dari suatu tanaman, maka diperlukan suatu metode ekstraksi. Maserasi merupakan salah satu metode ekstraksi yang paling umum digunakan dan sederhana. Metode ini masih secara luas digunakan karena beberapa kelebihan seperti biaya murah, peralatan yang sederhana, serta pada tahapannya tidak dilakukan proses pemanasan sehingga dapat menghindari kerusakan zat aktif yang terkandung dalam simplisia. Metode ini merupakan metode yang tepat untuk ekstraksi senyawa-senyawa yang bersifat tidak tahan panas (*termolabile*) (Mauricio, 2013).

Response Surface Methodology (RSM) merupakan suatu metode kumpulan statistik dan matematika teknik yang berguna untuk mengembangkan, meningkatkan, dan mengoptimalkan proses, di mana respon dipengaruhi oleh beberapa faktor (variabel independen) (Sarabia and Ortiz, 2009). RSM merupakan kombinasi desain dan analisis beksperimen, teknik pemodelan, dan metode optimasi dalam pendekatan yang lebih kuat yang memanfaatkan data eksperimen untuk mendapatkan perbaikan proses (de Oliveira *et al.*, 2019).

RSM menghubungkan sebuah respon atau variabel luaran (*output*) dengan data masukan *(input*) yang mempengaruhinya (Hidayat, Zuhrotun and Sopyan, 2021). Keunggulan metode RSM ini di antaranya tidak

memerlukan data-data percobaan dalam jumlah yang besar dan tidak membutuhkan waktu lama (Iriawan dan Astuti, 2006).

Oleh karena itu pada penelitian ini, telah dilakukan optimasi proses ekstraksi daun *M. nigra* L. dengan pendekatan *Response Surface Analysis* dengan menggunakan tiga parameter yaitu konsentrasi pelarut, rasio pelarut-sampel dan waktu ekstraksi terhadap kandungan senyawa fenolik dari ekstrak yang diperoleh.

I.2 Rumusan Masalah

Berdasarkan latar belakang di atas, rumusan masalah yang diperoleh adalah bagaimanakah konsentrasi pelarut, rasio pelarut-sampel dan waktu ekstraksi yang optimal dalam menghasilkan persen rendemen dan kadar fenolik daun *M. nigra* L. secara maserasi, serta bagaimana profil metabolit sekundernya menggunakan KLT-Densitometri dengan pendekatan *Response Surface Analysis*.

I.3 Tujuan Penelitian

Berdasarkan rumusan masalah di atas, tujuan penelitian yaitu untuk mengetahui optimasi proses ekstraksi daun *M. nigra* L. secara maserasi serta profil metabolit sekundernya menggunakan KLT-Densitometri dengan pendekatan *Response Surface Analysis*.

BAB II

TINJAUAN PUSTAKA

II.1 Tanaman *Morus nigra* L.

II.1.1 Taksonomi Tanaman

Kingdom : Plantae

Divisi : Magnoliophyta

Class : Dicotyledoneae/Magnoliopsida

Ordo : Urticales

Famili : Moraceae

Genus : Morus

Spesies : *Morus nigra* L.

Kunci determinasi : 1a-2b-11b-12b-13b-Group XIII-1b-3b-4a-5a-6b 7b-8b-9b-Fam. Moraceae-Morus-*Morus nigra* L. (Laboratorium Biologi UNM, 2022).

Gambar 1. Tanaman *Morus nigra* L. (Dokumentasi pribadi)

II.1.2 Morfologi tanaman

Tumbuhan berupa pohon atau semak dengan tinggi 5-9 m. Batang bulat, berwarna ungu saat muda dan berubah menjadi coklat saat tua. Daunnya berbentuk bulat telur dengan panjang 20-25 cm dan lebar 10-12 cm, tepi bergerigi, berujung runcing. Bunga majemuk berbentuk tandan, mahkota berbentuk tajuk kecil putih. Buah buni, berwarna hijau ketika muda dan akan berubah menjadi hitam saat masak. Biji kecill berwarna hitam (Hidayat *et al*., 2016).

II.1.3 Kandungan Kimia

Ada banyak senyawa fenolik yang terkandung dan diidentifikasi dalam daun *mulberry*. Flavonoid (*quercetin dan kaempferol*) dan turunannya, *quercetin 3-(6-malonyglucoside*), *quercetin-3-rutinoside*, *quercetin 3-glucoside* dan *kaempferol-3-(6-acetylglucoside*) adalah fenol yang terkandung dalam daun *mulberry* yang memiliki manfaat bagi kesehatan seperti dapat digunakan sebagai antioksidan (Taufik *et al*., 2016). Selain itu, juga terkandung senyawa flavonoid *kaempferol* 3-O-glikosida dan *quercetin* 3-O-glikosida (Moura *et al*., 2019).

II.1.4 Kegunaan Tanaman Murbei

Daun Murbei umumnya digunakan sebagai pakan ulat sutra. Tanaman genus *Morus* ini juga mengandung senyawa fenolik yang berperan sebagai antioksidan. Daun pada tanaman murbei dapat digunakan sebagai sumber nutrasetikal progresif yang dapat menghambat berbagai penyakit kronis (Abbas and Rehmat, 2020).

II.2 Ekstraksi

II.2.1 Pengertian Ekstraksi

Ekstraksi atau penyaringan merupakan proses pemisahan suatu zat atau senyawa aktif dalam tanaman dengan menggunakan pelarut yang sesuai dan prosedut standar dengan tujuan untuk memisahkan metabolit terlarut dalam tanaman dengan residunya (Hanani, 2014).

II.2.2 Metode Ekstraksi

II.2.2.1 Metode Dingin

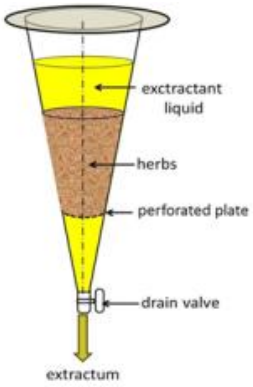
1. Maserasi

Maserasi merupakan salah satu metode ekstraksi dimana dalam maserasi, bubuk kasar sampel tumbuhan disimpan dan dibiarkan mengalami kontak denganpelarut dalam wadah tertutup untuk jangka waktu tertentu yang disertai dengan pengadukan hingga komponen sampel tumbuhan ada yang larut. Metode ini paling cocok untuk digunakan dalam kasus senyawa kimia tumbuhan yang tidak tahan panas (termolabil) (Julianto, 2019).

Gambar 2. Proses Maserasi (Julianto, 2019)

2. Perkolasi

Perkolasi merupakan salah satu metode ekstraksi yang juga paling sering digunakan untuk mengekstrak bahan aktif dalam tumbuhan. Sebuah perkolator adalah wadah sempit berbentuk kerucut terbuka di kedua ujungnya. Sampel tumbuhan padat dibasahi dengan sejumlah pelarut yang sesuai dan dibiarkan selama kira-kira 4 jam dalam wadah tertutup. Selanjutnya bagian atas perkolator ditutup. Pelarut ditambahkan hingga merendam sampel. Campuran sampel dan pelarut dapat dimaserasi lebih lanjut dalam wadah percolator tertutup selama 24 jam. Saluran keluar perkolator kemudian dibuka dan cairan yang terkandung di dalamnya dibiarkan menetes perlahan. Pelarut dapat ditambahkan sesuai kebutuhan, sampai ukuran perkolasi sekitar tiga perempat dari volume yang diperlukan dari produk jadi (Julianto, 2019).



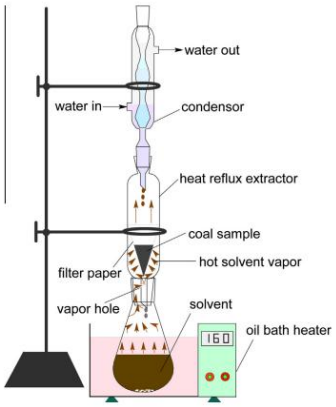
Gambar 3. Perkolator (Julianto, 2019)

II.2.2.2 Metode Panas

1. Rekfluks

Pada metode ekstraksi reflux, serbuk simplisia di masukkan bersama pelarut ke dalam labu yang dihubungkan dengan kondensor.

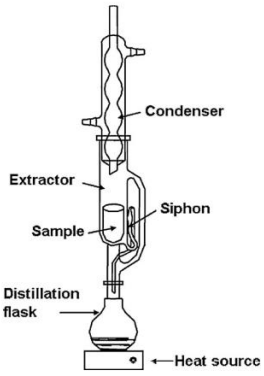
Pelarut dipanaskan hingga mencapai titik didih. Uap terkondensasi dan kembali ke dalam labu (Mukhriani, 2014).



Gambar 4. Rangkaian Alat Refluks (Tian *et al*., 2016)

2. Sokhletasi

Sokhletasi merupakan salah satu metode ekstraksi yang hanya diperlukan apabila senyawa yang diinginkan memiliki kelarutan terbatas dalam pelarut, dan pengotor tidak larut dalam pelarut itu. Jika senyawa yang diinginkan memiliki kelarutan yang tinggi dalam suatu pelarut maka suatu penyaringan sederhana dapat digunakan untuk memisahkan senyawa dari zat yang tidak larut. Keuntungan dari sistem ini adalah proses ekstraksi cukup dilakukan dalam satu wadah dimana secara kontinyu pelarut yang terkondensasi akan menetes dan merendam sampel tumbuhan dan membawa senyawa terlarut ke labu penampung. Metode ini tidak dapat digunakan untuk senyawa termolabile karena pemanasan yang berkepanjangan dapat menyebabkan degradasi senyawa (Julianto, 2019).



Gambar 5. Rangkaian Alat Sokhlet (Julianto, 2019)

3. Infusa

Infusa dilakukan dengan maserasi bagian tanaman menggunakan air dingin atau air mendidih dalam jangka waktu yang pendek. Pemilihan suhu infus tergantung pada ketahanan senyawa (Endarini, 2016). Metode ini cocok untuk simplisia yang bersifat lunak, seperti bunga dan daun (Hanani, 2015).

4. Dekokta

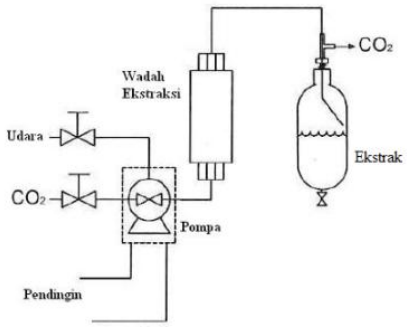
Dekokta dapat digunakan untuk esktraksi pada bagian tanaman yang berupa batang, kulit kayu, cabang, ranting, rimpang atau akar direbus dalam air mendidih dengan volume dan selama waktu tertentu kemudian didinginkan dan ditekan atau disaring untuk memisahkan cairan ekstrak dari ampasnya. Proses ini sesuai untuk mengekstrak bahan bioaktif yang dapat larut dalam air dan tahan terhadap panas (Endarini, 2016).

II.2.2.3 Metode Modern

1. Supercritical Fluid Extraction

Supercritical Fluid Extraction (SFE) merupakan ekstraksi yang menggunakan Gas superkritis seperti karbon dioksida, nitrogen, metana, etana, etilen, nitrogen oksida, sulfur dioksida, propana, propilena, amonia dan sulfur heksafluorida digunakan untuk mengekstrak senyawa aktif dalam tumbuhan. Sampel tumbuhan disimpan dalam bejana yang diisi dengan gas dalam kondisi yang terkendali seperti suhu dan tekanan. Senyawa aktif yang larut dalam gas terpisah ketika suhu dan tekanan lebih rendah. Faktor penting dari teknik ini adalah transfer massa zat terlarut dalam pelarut superkritis (Julianto, 2019).

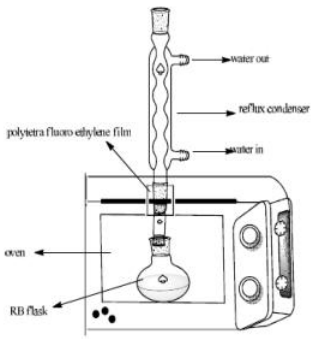
Secara umum, suhu dan tekanan memiliki pengaruh terbesar. Namun efek tekanannya lebih langsung. Ketika tekanan meningkat, kepadatan yang lebih tinggi dicapai oleh cairan superkritis. Dengan demikian densitas medium meningkat dan kelarutan zat terlarut akan meningkat. Untuk mendapatkan hasil yang lebih tinggi, proses harus dioptimalkan. Dengan menggunakan metodologi permukaan respons, parameter optimum dapat diperoleh (Julianto, 2019).



Gambar 6. Rangkaian Alat *Supercritical Fluid Extraction* (Julianto, 2019).

2. Microwave-Assisted Extraction

Microwave-assisted extraction (MAE) merupakan metode ekstraksi yang menggunakan energi gelombang mikro (*microwave*) membantu pemisahan senyawa aktif dari sampel tumbuhan ke dalam pelarut. Gelombang mikro memiliki medan listrik dan magnet yang tegak lurus satu sama lain. Listrik yang dialirkan menghasilkan panas melalui rotasi dipolar dan konduksi ionik. Meningkatnya konstanta dielektrik pelarut, pemanasan yang dihasilkan semakin cepat. Berbeda dengan metode klasik, ekstraksi dengan bantuan *microwave* memanaskan seluruh sampel secara bersamaan. Selama ekstraksi, panas mengganggu ikatan hidrogen yang lemah karena rotasi dipol molekul dan migrasi ion terlarut meningkatkan penetrasi pelarut ke dalam sampel atau matriks (Julianto, 2019).

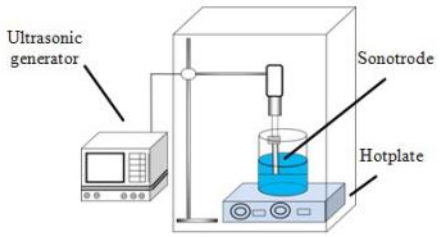


Gambar 7. Rangkaian Alat *Microwave Assisted Extraction* (Julianto, 2019)

II.2.2.5 Ultrasound-Assisted Extraction

Ultrasound-Assisted Extraction (UAE) merupakan teknik canggih yang memiliki kemampuan mengekstraksi sejumlah besar senyawa bioaktif dalam waktu ekstraksi yang lebih pendek. Keuntungan utama dari teknik ini adalah meningkatkan penetrasi pelarut ke dalam matriks karena

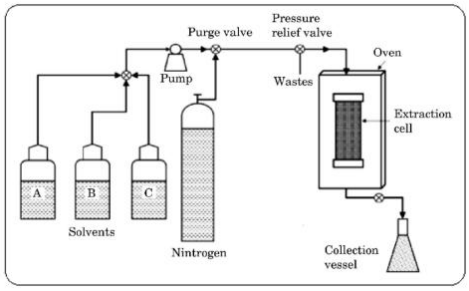
gangguan dinding sel yang dihasilkan oleh kavitasi akustik. Dan juga ini mencapai pada suhu rendah dan karenanya ini lebih cocok untuk ekstraksi senyawa termal tidak stabil.



Gambar 8. Rangkaian Alat *Ultrasound Assisted Extraction* (Julianto, 2019)

II.2.2.6 Acelarated-assisted extraction

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



Gambar 9. Rangkaian Alat *Acelarated-assisted extraction* (Julianto, 2019)

II.3 KLT-Densitometri

Densitometri merupakan metode analisis instrumental penentuan analit secara kualitatif maupun kuantitatif berdasarkan interaksi radiasi elektromagnetik (REM) dengan noda analit pada fase diam KLT. Metode ini biasa disebut metode KLTDensitometri. Penentuan kualitatif analit KLT-Densitometri dilakukan dengan cara membandingkan nilai Rf analit dan standart. Dari noda analit yang memiliki Rf sama denga standar diidentifikasi kemurnian analit dengan cara membandingkan spektrum densitometri analit dan standart. Sedangkan penentuan kuantitatif analit dilakukan dengan cara membandingkan luas area noda analit dengan luas area noda standart pada fase diam yang diketahui konsentrasinya atau menghitung densitas noda analit dan membandingkannya dengan densitas noda standart (Wulandari, 2011)..

Interaksi radiasi elektromagnetik (REM) merupakan intensitas cahaya yang mengenai molekul senyawa dalam noda. Interaksi radiasi elektromagnetik dengan noda pada fase diam KLT menentukan intensitas cahaya yang diabsorpsi, ditransmisi, dipantulkan (refleksi) oleh noda analit dari intensitas REM semula Apabila pada fase diam tidak ada noda, maka

cahaya yang jatuh akan dipantulkan kembali. Tetapi jika cahaya tersebut dijatuhkan pada pelat yang terdapat noda dari suatu senyawa, maka sebagian cahaya akan diserap dan intensitas yang dipantulkan akan berbeda dengan intensitas cahaya yang datang (Wulandari, 2011)..

Skema sistem optik densitometer yaitu sumber radiasi yang digunakan dapat dipilih yaitu sinar UV (lampu deuterium), sinar VIS (lampu tungsten) dan sinar fluoresensi (lampu merkuri). Sinar yang dipancarkan berupa sinar polikromatik masuk melewati celah monokromator. Didalam monokromator sinar didispersikan menjadi sinar monokromatik dengan teknik grating. Sinar monokromatik dengan panjang gelombang terpilih keluar melalui celah keluar monokromator. Sinar monokromatik dengan panjang gelombang terpilih dipantulkan melalui cermin sehingga mengenai objek (lempeng KLT). Sinar yang datang dapat direfleksikan maupun diteruskan. Sinar yang direfleksikan atau diteruskan ditangkap oleh pengganda foton (photomultiplier) berfungsi menggandakan sinar yang datang sehingga dihasilkan elektron yang terbaca oleh sistem komputer sebagai data *output* (Wulandari, 2011).

II.4 Metabolit Sekunder

Metabolit sekunder adalah senyawa yang dihasilkan dalam jalur metabolism lain yang walaupun dibutuhkan tapi dianggap tidak penting peranannya dalam pertumbuhan suatu tumbuhan (Julianto, 2019). Metabolit sekunder merupakan senyawa yang disintesis oleh makhluk tumbuhan, mikroba atau hewan yang melewati proses biosintesis yang

digunakan dalam menunjuang kehidupan namun vital atau jika tidak ada makan tidak akan membuat tumbuhan tersebut mati, sebagaimana gula, asam amino, dan asam lemak. Metabolit sekunder biasanya memiliki aktivitas farmakologi dan biologi. Dalam bidang farmasi, metanolit sekunder dipelajari dan digunakan sebagai kandidat obat atau senyawa penuntun (*lead compound*) untuk melakukan optimasi agar diperoleh senyawa yang lebih poten dengan toksisitas minimal (hit) (Saifudin, 2014).

II.4.1 Senyawa Fenolik

Senyawa fenolik merupakan senyawa metabolit sekunder yang terdapat dalam tumbuhan dengan karakteristik memiliki cincin aromatik yang mengandung satu atau dua gugus hidroksi (OH). Senyawa fenolik dapat dibedakan atas dua jenis senyawa utama yaitu senyawa fenolik yang berasal dari jalur asam asetat mevalonat dan jalur asam sikimat. Kelompok senyawa fenolik yang berasal dari jalur asam asetat mevalonat adalah senyawa poliketida dan senyawa fenolik yang berasal dari jalur asam asetat adalah fenil propanoid. Ditemukan juga senyawa fenolik yang berasal dari kombinasi dua jalur biosintesis ini yaitu senyawa flavonoid. Senyawa fenolik dibagi menjadi menjadi beberapa kelompok yaitu fenol sederhana dan asam fenolat, fenilpropanoid, flavonoid, dan tannin (Julianto, 2019).

II.4.2 Senyawa Alkaloid

Alkaloid adalah kelompok metabolit sekunder terpenting yang ditemukan pada tumbuhan. Keberadaan alkaloid di alam tidak pernah

berdiri sendiri. Golongan senyawa ini berupa campuran dari beberapa alkaloid utama dan beberapa kecil. Tidak ada klasifikasi struktur yang seragam untuk alkaloid. Klasifikasi alkaloid berdasarkan pada kerangka karbonnya yaitu alkaloid sebenarnya (true alkaloid), protoalkaloid, dan pseudoalkaloid (Julianto, 2019).

II.4.2 Senyawa Terpenoid

Senyawa terpena merupakan kelompok senyawa organik hidrokarbon yang melimpah yang dihasilkan oleh berbagai jenis tumbuhan. Terpenoid juga dihasilkan oleh serangga. Senyawaan ini pada umumnya memberikan bau yang kuat dan dapat melindungi tumbuhan dari herbivora dan predator. Terpenoid juga merupakan komponen utama dalam minyak atsiri dari beberapa jenis tumbuhan dan bunga. Minyak atsiri digunakan secara luas untuk wangi-wangian parfum, dan digunakan dalam pengobatan seperti aromaterapi. Terpena merupakan komponen utama dalam minyak turpentine. Nama "terpena" berasal dari kata *turpentine (terpentine).* Senyawaan terpena juga merupakan salah satu senyawa pembangun utama dalam biosintesis (Julianto, 2019).

II.4.3 Senyawa Poliketida

Poliketida merupakan senyawa metabolit sekunder yang mengandung gugus karbonil dan gugus metilen yang tersusun secara selang-seling (beta-poliketon). Biosintesis poliketida dimulai dengan terjadinya reaksi kondensasi sebuah unit starter (asetil CoA atau propionil CoA) dengan sebuah unit penyambung (pada umumnya malonil CoA atau

metil malonil CoA, dilanjutkan dengan reaksi dekarboksilasi unit penyambung. Kondensasi dekarboksilatif berulang menghasilkan pemanjangan rantai karbon poliketida, dan modifikasi tambahan seperti ketoreduksi, dehidratasi, dan enoilreduksi juga dapat terjadi. Poliketida berasal dari kata “poli” yang berarti banyak dan ketida yang menunjukkan adanya ketida (-CH2COCOOH). Hal ini dikarenakan suatu poliketida ditandai dengan dimilikinya pola berulang suatu ketida –[CH2CO]n-dalam rangkaian strukturnya (Julianto, 2019).

II.4.3 Senyawa Glikosida

Glikosida adalah suatu senyawa metabolit sekunder yang berikatan dengan senyawa gula melalui ikatan glikosida. Glikosida memainkan peranan penting dalam sistem hidup suatu organisme. Beberapa tumbuhan menyimpan senyawa-senyawa kimia dalam bentuk glikosida yang tidak aktif. Senyawa-senyawa kimia ini akan dapat kembali aktif dengan bantuan enzim *hydrolase* yang menyebabkan bagian gula putus, menghasilkan senyawa kimia yang siap untuk digunakan. Beberapa glikosida dalam tumbuhan digunakan dalam pengobatan (Julianto, 2019).

II.5 Spektrofotometri UV-Vis

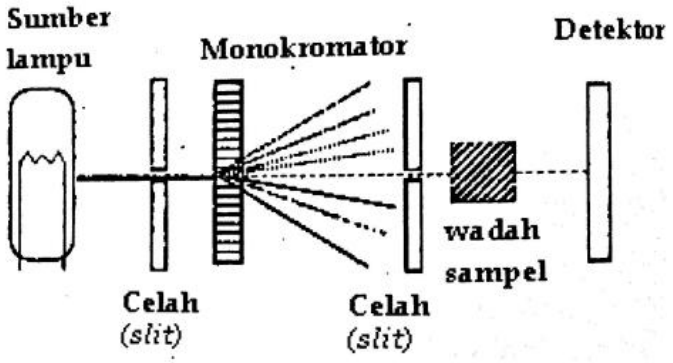
Spektroskopi UV-Vis dapat dilakukan untuk analisis kualitatif dan untuk identifikasi kelas tertentu dari senyawa dalam campuran murni dan biologis. Lebih disukai, spektroskopi UV-Vis dapat digunakan untuk analisis kuantitatif karena molekul-molekul aromatik adalah kromofor kuat dalam rentang UV. Senyawa alami dapat ditentukan dengan

menggunakan spektroskopi UV-Vis. Senyawa fenolik termasuk anthocyanin, tanin, pewarna polimer, dan fenol membentuk kompleks dengan besi yang telah terdeteksi oleh spektroskopi ultraviolet-tampak (UV-Vis).

Spektrofotometri yang sesuai untuk pengukuran di daerah spektrum ultraviolet dan sinar tampak terdiri atas suatu sistem optik dengan kemampuan menghasilkan sinar monokromatis dalam jangkauan panjang golombang 200-800 nm. Berikut komponen-komponen spektrofotometri UV-Vis meliputi sumber-sumber sinar, monokromator, dan sistem optik (Marzuki, 2019).

I. Sumber-sumber lampu; lampu deuterium digunakan untuk daerah UV pada Panjang gelombang dari 190-350 nm, sementara lampu halogen kuarsa atau lampu tungsten digunakan untuk daerah visible (pada Panjang gelombang antara 350- 900 nm).
II. Monokromator; digunakan untuk mendispersikan sinar kedalam komponen-komponen panjang gelombangnya yang selanjutnya akan dipilih oleh celah (slit). Monokromator berputar sedemikian rupa sehingga kisaran panjang gelombang dilewatkan pada sampel sebagai scan instrument melewato spektrum.
III. Optik-optik dapat didesain untuk memecah sumber sinar sehingga sumber sinar melewati dua kompartemen, dan sebagaimana dalam spektrofotometer berkas ganda, suatu larutan blanko dapat digunakan dalam satu kompartemen untuk mengkoreksi pembacaan atau

spektrum sampel. Yang paling sering digunakan sebagai blanko dalam spektrofotometri yaitu semua pelarut yang digunakan untuk melarutkan sampel dan perekasi.



Gambar 10. Diagram skematis spektrofotometer UV-Vis (Marzuki, 2019)

II.6 *Response Surface Methodology* (RSM)

Response Surface Methodology (RSM) merupakan suatu metode kumpulan statistik dan matematika teknik yang berguna untuk mengembangkan, meningkatkan, dan mengoptimalkan proses, di mana respon dipengaruhi oleh beberapa faktor (variabel independen) (Sarabia and Ortiz, 2009). RSM menghubungkan sebuah respon atau variable luaran (*output*) dengan data masukan (*input*) yang mempengaruhinya. Dalam RSM terdapat dua desain yaitu (Hidayat, 2021):

II.6.1 *Central Composite Design* (CCD)

Central Composite Design merupakan proses optimasi yang dilakukan untuk mengetahui perkiraan arah optimal karena dalam RSM optimasi dan lokasi optimal tidak diketahui. CCD ini dapat digunakan untuk optimasi dengan 2 variable atau parameter uji.

II.6.2 *Box-Bhenken Design* (BBD)

Box-Bhenken Design digunakan untuk optimasi dengan tiga variabel. Perbedaan *Box-Bhenken Design* (BBD) dengan *Central Composite Design* (CCD) adalah pada rancangan *Box-Bhenken Design* percobaanya lebih efisien karena sedikit *run*/unit percobaan dibandingkan dengan *Central Composite Design.* Walaupun jumlah run yang lebih sedikit tetapi *Box-Bhenken* mampu memprediksi nilai optimum yang baik.