



**IDENTIFIKASI SENYAWA DALAM EKSTRAK ETANOL BIJI
BUAH MERAH (*Pandanus conoideus* Lamk.)**



Disusun Oleh :

IDA SUNDARI

M0305036

SKRIPSI

Ditulis dan diajukan untuk memenuhi sebagian
persyaratan mendapatkan gelar Sarjana Sains Kimia

**FAKULTAS MATEMATIKA DAN ILMU PENGETAHUAN ALAM
UNIVERSITAS SEBELAS MARET
SURAKARTA**

2010

HALAMAN PENGESAHAN

Jurusan Kimia Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam Universitas
Sebelas Maret telah mengesahkan skripsi mahasiswa:

Ida Sundari NIM M0305036, dengan judul "Identifikasi Senyawa dalam Ekstrak
Etanol Biji Buah Merah (*Pandanus conoideus* Lamk.)"

Skripsi ini dibimbing oleh:

Pembimbing

Dr. rer. nat. Fajar Rakhman W., M.Si.

NIP. 19730605 200003 1001

Dipertahankan di depan Tim Penguji Skripsi pada:

Hari : Kamis

Tanggal : 29 Juli 2010

Anggota tim Penguji :

1. Dra. Tri Martini, M.Si.
NIP. 19581029 198503 2002

1.

2. Soerya Dewi Marliyana, M.Si
NIP. 19690313 199702 2001

2.

Ketua Jurusan Kimia

Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam
Universitas Sebelas Maret Surakarta

Prof. Drs. Sentot Budi Rahardjo, Ph.D.

NIP. 19560507 198601 1001



PERNYATAAN

Dengan ini saya menyatakan bahwa skripsi saya yang berjudul “**IDENTIFIKASI SENYAWA DALAM EKSTRAK ETANOL BIJI BUAH MERAH (*Pandanus conoideus Lamk.*)**” adalah benar-benar hasil penelitian sendiri dan tidak terdapat karya lain yang pernah diajukan untuk memperoleh gelar kesarjanaan di suatu perguruan tinggi dan sepanjang pengetahuan saya juga tidak terdapat kerja atau pendapat yang pernah ditulis atau diterbitkan oleh orang lain, kecuali yang secara tertulis diacu dalam naskah ini dan disebutkan dalam daftar pustaka.

Surakarta, Juli 2010

IDA SUNDARI

IDENTIFIKASI SENYAWA DALAM EKSTRAK ETANOL BIJI BUAH MERAH (*Pandanus conoideus Lamk.*)

IDA SUNDARI

Jurusan kimia, Fakultas MIPA, Universitas Sebelas Maret
Surakarta

ABSTRAK

Identifikasi dari komponen polar dalam biji buah merah (*Pandanus conoideus* Lamk.) telah dilakukan. Komponen non-polar diisolasi dengan metode sokhlet menggunakan pelarut petroleum eter. Selanjutnya, komponen polarnya diisolasi dari residu biji buah merah dengan metode maserasi menggunakan pelarut etanol 96%. 10,953 gr ekstrak pekat etanol dihasilkan dari 150 gr serbuk kering biji buah merah.

Senyawa dalam ekstrak etanol biji buah merah diidentifikasi dengan skrinning fitokimia. Hasilnya, menunjukkan bahwa ekstrak etanol mengandung tanin, glikosida antrakuinon, glikosida senyawa fenolik, dan glikosida asam lemak. Ekstrak etanol dipisahkan dengan kromatografi kolom *flash*, kromatografi kolom sephadex LH-20, dan HPLC. Kromatografi kolom *flash* tidak dapat memisahkan semua komponen polar biji buah merah. Hasil pemisahan HPLC menunjukkan bahwa ekstrak etanol biji buah merah setidaknya mempunyai 5 komponen senyawa. Pemisahan kromatografi sephadex dianggap paling efektif karena dapat memisahkan semua komponen yang terdeteksi dalam ekstrak etanol biji buah merah dengan skrinning fitokimia. Hasil pemisahan kromatografi sephadex menunjukkan bahwa glikosida senyawa fenolik mendominasi komponen polar dalam biji buah merah dengan 55,375%, diikuti dengan tanin (22,345%) dan glikosida antrakuinon (18,732%). Secara umum, hasil studi ini mengindikasikan bahwa senyawa dalam ekstrak etanol biji buah merah berpotensi sebagai obat karena tanin dan glikosida (baik senyawa fenolik maupun antrakuinon) merupakan senyawa antioksidan.

Kata kunci : biji buah merah (*Pandanus conoideus* L.), Kromatografi kolom sephadex, tanin, glikosida.



IDENTIFICATION OF COMPOUNDS IN RED FRUIT SEED ETHANOL EXTRACT

IDA SUNDARI

Department of Chemistry. Faculty of Mathematics and Science.
Sebelas Maret University

ABSTRACT

Identification of polar compound in red fruit seed has been done. Non-polar compound was isolated by soxhlet method using petroleum ether. Then polar compound was isolated from residues of red fruit seed soxhletation by maseration method using ethanol 96%. As much as 10.953 gr of concentrate ethanol extract was yielded from 150 gr dry powder red fruit seed.

Compound of red fruit seed ethanol extract was identified by phytochemical screening. The result showed that ethanol extract contains tannin, anthraquinone glycoside, fenolic compound glycoside, and fatty acid glycoside. Then ethanol extract was separated by various separation method, included flash column chromatography, Sephadex LH-20 column chromatography, and HPLC. Flash column chromatography was not able to separate all the polar compound of red fruit seed. Chromatogram profile of HPLC showed that ethanol extract have minimal 5 compounds. Sephadex chromatography separation was considered the most effective than another separation method because it is able to separate all compounds on ethanol extract of red fruit seeds. The result of sephadex chromatography separation showed that phenolic glycosides dominates polar component of red fruit seeds (57.375%), followed by tannin (22.345%) and anthraquinone glycoside (18.732%). In general, the results of this study indicated that compounds of ethanol extract are able to has potential as a drug because tannins and glycosides (anthraquinone and phenolic compounds) are generally antioxidant compound.

Keyword: Red fruit (*Pandanus conoideus* Lamk.) seed, sephadex column chromatography, tannin, glycosides.



MOTTO

*“Sesungguhnya sesudah kesulitan itu ada kemudahan.
Maka apabila kamu telah selesai dari suatu urusan, kerjakanlah dengan sungguh –
sungguh urusan yang lain”*

(Q.S. Al-Insyirah : 6-7)

*“ Sesungguhnya Allah tidak merubah keadaan suatu kaum sehingga
mereka merubah keadaan yang ada pada diri mereka sendiri”*

(Q.S Ar-Ra'd:11)

“Dan beristirahatlah ketika kau yakin langkahmu terhenti di surga”

*“Sahabat, ketika usahamu dinilai tak jua membuahikan hasil maka kau sedang belajar
arti keikhlasan. Ketika kau letih dan tak tau harus kemana melangkah, maka kau
sedang belajar arti pengorbanan. Ketika cobaan datang menyapamu, maka kau sedang
belajar untuk lebih bersyukur dan mendekati kepada-Nya”*

Berusaha, Berdoa dan Tetap Semangaaat!!!

(Sahabat)



PERSEMBAHAN



Karya Kecil ini ku persembahkan untuk:

Ibu...

untuk, berjuta kasih sayang yang selalu mengiringiku dalam doamu

Bapak... untuk harapan yang tak pernah redup

Mas dan mbakku tersayang... yang selalu memotivasiku

Sahabat-sahabat.. yang selalu setia disampingku dalam keadaan apapun aku

Seseorang disana... ini bukti keseriusanku belajar selama ini



KATA PENGANTAR

Puji Syukur kehadiran Tuhan Yang Maha Esa yang telah melimpahkan rahmat, karunia, dan ijin-Nya sehingga penulis dapat menyelesaikan penulisan skripsi ini untuk memenuhi sebagian persyaratan guna mencapai gelar Sarjana Sains dari Jurusan Kimia FMIPA, UNS.

Dalam penyusunan laporan ini, penulis tidak lepas dari bimbingan, pengarahan dan bantuan dari berbagai pihak, maka pada kesempatan ini penulis menyampaikan ucapan terima kasih kepada :

1. Bapak Drs. Sentot Budi Rahardjo, Ph.D, selaku Ketua Jurusan Kimia F.MIPA Universitas Sebelas Maret Surakarta.
2. Bapak Dr. rer. nat. Fajar R. Wibowo, M.Si, selaku pembimbing yang dengan kesabarannya telah meluangkan waktu dalam mengarahkan dan membimbing penulis hingga selesainya skripsi ini.
3. Staf Lab. Dasar Kimia FMIPA UNS dan Sub. Lab. Kimia Laboratorium Pusat UNS.
4. Bapak/Ibu Dosen pengajar dan semua staf jurusan kimia.
5. Sahabat-sahabatku di Kimia'05 dan Asy-Syamsa yang tak pernah lelah untuk selalu menyemangati aku.
6. Murid-muridku: Iman, Katarina, Vina, Stefani, Robert, Ivan, Yosia yang selalu ngasih *deadline* lulus kepadaku, Lanjutkan!!!
7. Semua pihak yang telah membantu penulisan skripsi ini, yang tidak dapat penulis sebutkan namanya satu persatu, terima kasih

Penulis menyadari bahwa skripsi ini masih jauh dari kesempurnaan. Untuk itu penulis mengharapkan kritik dan saran yang bersifat membangun demi hasil yang lebih baik lagi. Penulis juga berharap semoga skripsi ini dapat bermanfaat dan memberi tambahan ilmu bagi pembaca. Amin.

Surakarta, Juli 2010

Ida Sundari



DAFTAR ISI

	Halaman
HALAMAN JUDUL	i
HALAMAN PENGESAHAN	ii
HALAMAN PERNYATAAN	iii
HALAMAN ABSTRAK	iv
HALAMAN ABSTRACT	v
HALAMAN MOTTO	vi
HALAMAN PERSEMBAHAN	vii
KATA PENGANTAR	viii
DAFTAR ISI	ix
DAFTAR TABEL	xii
DAFTAR GAMBAR	xiii
DAFTAR LAMPIRAN	xiv
BAB I. PENDAHULUAN	1
A. Latar Belakang Masalah	1
B. Perumusan Masalah	3
1. Identifikasi Masalah	3
2. Batasan Masalah	4
3. Rumusan Masalah	4
C. Tujuan Penelitian	5
D. Manfaat Penelitian	5
BAB II. LANDASAN TEORI	6
A. Tinjauan Pustaka	6
1. Buah Merah	6
2. Ekstraksi	7
3. Skrining Fitokimia	8
4. Kromatografi Lapis Tipis	9
5. Kromatografi Kolom <i>Flash</i>	10
6. Kromatografi Kolom Sephadex	10



7. <i>High Performance Liquid Chromatography (HPLC)</i>	11
8. Tanin.....	12
9. Glikosida	13
B. Kerangka Pemikiran	15
C. Hipotesis	16
BAB III. METODOLOGI PENELITIAN	17
A. Metode Penelitian	17
B. Waktu dan Tempat Penelitian	17
C. Alat dan Bahan Penelitian	17
1. Alat	17
2. Bahan	18
D. Prosedur Penelitian	18
1. Pembuatan Serbuk Biji Buah Merah	18
2. Ekstraksi	19
3. Skrining Fitokimia	19
4. Kromatografi Lapis Tipis	20
5. Kromatografi Kolom <i>Flash</i>	21
6. Kromatografi Kolom Sephadex	21
7. <i>High Performance Liquid Chromatography (HPLC)</i>	21
E. Teknik Pengumpulan dan Analisis Data	22
BAB IV. HASIL DAN PEMBAHASAN	23
A. Ekstraksi	23
B. Skrinning Fitokimia	23
C. Pemisahan Komponen Senyawa dalam Ekstrak Etanol	24
1. Kromatografi Kolom <i>Flash</i>	25
2. Kromatografi Kolom Sephadex	29
3. <i>High Performance Liquid Performance Chromatography (HPLC)</i>	34
D. Analisis Golongan Senyawa Ekstrak Etanol Biji Buah Merah	36
BAB V. KESIMPULAN DAN SARAN	44
A. Kesimpulan	44
B. Saran	44



C. DAFTAR PUSTAKA	45
D. LAMPIRAN	50





DAFTAR TABEL

	Halaman
Tabel 1. Hasil Skrinning Fitokimia Ekstrak Etanol Biji Buah Merah	24
Tabel 2. Hasil Skrinning Fitokimia Partisi Ekstrak Etanol Biji Buah Merah...	30





DAFTAR GAMBAR

	Halaman
Gambar 1. Buah Merah	6
Gambar 2. Struktur Tanin (a) <i>condensed tannin</i> (b) <i>Hydrolyzable tannin</i>	13
Gambar 3. Struktur Glikosida Antrakuinon.....	14
Gambar 4. Profil KLT Ekstrak Etanol Biji Buah Merah dengan Sistem Eluen <i>n</i> -heksan-Etil Asetat (1:3)	26
Gambar 5. Diagram No. Vial vs Berat Hasil Pemisahan Ekstrak Etanol Biji Buah Merah dengan Kromatografi Kolom <i>Flash</i>	28
Gambar 6. Diagram No.Vial vs Berat Hasil Pemisahan Ekstrak Etanol Biji Buah Merah dengan Kromatografi Kolom Sephadex	31
Gambar 7. Diagram Hasil Skrinning Fitokimia Fraksi-Fraksi Hasil Pemisahan Kromatografi Kolom Sephadex	32
Gambar 8. Struktur Glikosida Tanin Katekin.....	34
Gambar 9. Kromatogram HPLC Ekstrak Etanol Biji Buah Merah.....	36
Gambar 10. Profil KLT vial no. 8 dan 10 Hasil Pemisahan Komponen dalam Ekstrak Etanol Biji Buah Merah dengan Kromatografi Kolom <i>Flash</i>	37
Gambar 11. Uji Antrakuinon Ekstrak Etanol Biji Buah Merah Hasil Pemisahan Kromatografi Kolom Sephadex	39
Gambar 12. Struktur (a) Antrakuinon (b) Alizarin	41
Gambar 13. Oksidasi Antrakuinon.....	42

DAFTAR LAMPIRAN

	Halaman
Lampiran 1. Profil KLT dalam berbagai perbandingan <i>n</i> -heksan : etil asetat ...	50
Lampiran 2. Profil Kromatogram HPLC Etanol 96%	51
Lampiran 3. Profil KLT Ekstrak Etanol Awal Biji Buah Merah (a), Profil KLT vial no. 8 dan 10 Hasil Pemisahan Kromatografi Kolom <i>Flash</i> (b), Profil Uji Penegasan KLT Antrakuinon Hasil Pemisahan Kolom Sephadex (c)	52
Lampiran 4. Perhitungan Prosentase Berat Masing-Masing Senyawa dalam Ekstrak Etanol Biji Buah Merah	53

BAB I PENDAHULUAN

A. Latar Belakang Masalah

Buah merah (*Pandanus conoideus* Lamk.) merupakan tumbuhan endemik Papua yang memiliki potensi untuk dikembangkan sebagai salah satu sumber fitofarmaka Indonesia. Buah yang termasuk dalam famili *Pandanaceae* ini oleh masyarakat lokal Papua secara empiris telah dimanfaatkan sebagai obat tradisional. Sari buah merah yang diambil dari daging buah telah digunakan oleh masyarakat untuk pengobatan berbagai penyakit degeneratif, seperti misalnya diabetes mellitus, asam urat, hipertensi, stroke, dan kanker (Budi dan Paimin, 2005).

Sari buah merah mengandung senyawa antioksidan dengan kandungan yang cukup tinggi yaitu karotenoid (12.000 ppm), beta-karoten (700 ppm), dan tokoferol (11.000 ppm) (Budi, 2001). Sari buah merah dapat menghambat proliferasi sel limfosit dan pertumbuhan sel penyebab kanker sehingga angka kematian karena kanker di Indonesia dapat ditekan (Wahyuniari *et al.*, 2009; Mu'nim *et al.*, 2006). Konsumsi beta-karoten rutin membuat tubuh dapat memperbanyak sel-sel alami pembasmi penyakit. Bertambahnya sel-sel tersebut akan menekan kehadiran sel kanker dengan menetralkan radikal bebas senyawa karsinogen penyebab kanker (Dermawan, 2005; Sofia, 2005). Bahkan, uji *in vivo* menggunakan hewan percobaan tikus *Sparague Dawley* menunjukkan bahwa buah merah mampu berperan untuk pertumbuhan dan pemeliharaan jaringan pada tikus secara optimal (Sari, 2008).

Sampai saat ini, pemanfaatan buah merah hanya terfokus pada daging buahnya. Padahal, selain daging merah, bagian lain dari buah merah adalah biji buahnya. Jumlah biji buah merah cukup melimpah karena buah merah tersusun atas ribuan biji yang membentuk kulit buah. Selama ini, bijinya dibuang begitu saja setelah daging buahnya diambil. Padahal, buah dan biji saling berkaitan erat karena keduanya mempunyai susunan struktur hampir sama dan sama-sama berfungsi sebagai tempat penyimpanan cadangan makanan dalam tumbuhan

(Suharto, 2004). Selain itu, biji juga mengandung bahan makanan utama misalnya karbohidrat, protein, lipid, dan beberapa senyawa metabolit sekunder. (Tjitrosoepomo, 2005). Oleh karena itu, kandungan senyawa yang terdapat dalam daging buah merah diduga juga terdapat dalam biji buah merah.

Kemampuan antimikroba biji buah atung (*Parinariium glaberrimum* Hassk) lebih baik dibandingkan pada daging buah atung (Murhadi, *et al.*, 2004). Bahkan, uji toksisitas tanaman nyamplung (*Calophyllum inophyllum* L.) menunjukkan bahwa biji buah nyamplung lebih toksik dibandingkan daging buahnya (Santi, 2009). Fakta ini menunjukkan bahwa pemanfaatan biji dapat setara bahkan dapat juga lebih baik dibanding pada daging buahnya. Sehingga tidak menutup kemungkinan bahwa biji buah merah dapat juga dimanfaatkan seperti pada daging buah merah yang telah dilakukan pemanfaatan lebih dahulu. Hal inilah yang mendorong dilakukan identifikasi kandungan senyawa dalam biji buah merah sebagai tahapan awal pemanfaatan biji buah merah.

Komponen non polar dari biji buah merah telah berhasil diisolasi dan diidentifikasi oleh Septiyaningsih (2010). Hasil penelitiannya menunjukkan bahwa komponen non polar biji buah merah didominasi oleh asam lemak. Asam lemak ini merupakan kandungan utama dari daging buah merah (Budi, 2001). Etanol merupakan pelarut polar yang banyak digunakan untuk mengekstrak komponen polar suatu bahan alam dan dikenal sebagai pelarut universal. Ekstrak etanol buah merah mengandung golongan senyawa asam lemak, steroid/terpenoid, karotenoid, minyak atsiri, glikosida jantung, antrakuinon, flavonoid dan kumarin (Marliyana *et al.*, 2009). Kasus ini membuktikan bahwa etanol tidak hanya melarutkan komponen polar, tetapi komponen non polar juga ikut terekstrak di dalamnya. Komponen polar dari suatu bahan alam dalam ekstrak etanol dapat diambil dengan teknik ekstraksi lebih lanjut dan atau melalui proses pemisahan lanjut (Santana, *et al.*, 2009). Pemilihan teknik pemisahan ini merupakan salah satu faktor yang menentukan berhasil atau tidaknya proses identifikasi yang dilakukan. Pemilihan metode pemisahan sendiri bergantung pada senyawa yang terkandung dalam bahan alam (Padmawinata, 1996), dalam hal ini biji buah merah.

Oleh karena itulah, dalam penelitian ini akan dilakukan isolasi, pemisahan, dan identifikasi komponen polar biji buah merah sebagai tahap awal pendahuluan pemanfaatan biji buah merah, khususnya dalam ilmu kesehatan.

B. Perumusan Masalah

1. Identifikasi masalah

Berdasarkan biosintesis metabolit sekunder dalam biji dan buah, senyawa yang terkandung dalam daging buah mungkin dapat ditemukan dalam biji buah. Sehingga, senyawa kimia dalam daging buah merah diduga juga terdapat dalam biji buah merah. Untuk membuktikan apakah senyawa kimia dalam biji buah merah hampir sama dengan dagingnya sehingga perlu dilakukan isolasi senyawa kimianya.

Isolasi senyawa metabolit sekunder dari suatu bahan alam dapat dilakukan dengan berbagai metode ekstraksi yaitu sokhlet, maserasi, dan perkolasi. Komponen non polar biji buah merah telah berhasil diisolasi dengan metode sokhletasi (Septyaningsih, 2010). Metode ini sangat efektif untuk mengisolasi komponen non polar suatu bahan alam. Secara umum, metode maserasi banyak digunakan untuk mengisolasi komponen polar maupun non polar dalam suatu bahan alam karena metode ini pengerjaannya mudah, menghasilkan rendemen yang cukup tinggi, serta kemungkinan rusaknya senyawa kimia yang terkandung di dalam suatu bahan alam dapat dihindari karena tidak disertai pemberian panas.

Komponen polar biji buah merah telah dilakukan skrining fitokimia oleh Septyaningsih (2010). Skrining fitokimianya menunjukkan bahwa komponen polar biji buah merah mengandung tanin, glikosida asam lemak, antrakuinon, dan senyawa fenolik. Golongan-golongan senyawa ini belum dilakukan pemisahan dan identifikasi lebih lanjut sehingga belum dapat diketahui seberapa besar kadar dari masing-masing golongan senyawanya, seperti halnya dalam komponen non polarnya.

Senyawa hasil skrining fitokimia yang terkandung dalam komponen polar biji buah merah tersebut dapat dipisahkan preparatif dengan kromatografi fase normal seperti Kromatografi Vakum Cair (KVC) dan kromatografi kolom

flash. Namun apabila senyawa yang terkandung di dalam biji buah merah terlalu polar, kromatografi fase terbalik lebih sesuai digunakan sebagai metode pemisahannya. Akan tetapi, kromatografi fase terbalik preparatif sulit diterapkan karena membutuhkan biaya yang cukup besar. *High Performance Liquid Chromatography* (HPLC) sering dijadikan pilihan utama untuk pemisahan dengan fase terbalik. HPLC dapat digunakan untuk analisis kualitatif maupun kuantitatif. Kromatografi filtrasi gel dapat juga dijadikan alternatif apabila komponen polarnya sulit dipisahkan dengan kromatografi fase normal.

Hasil pemisahan komponen polar biji buah merah perlu diidentifikasi untuk mengetahui kandungan senyawa kimianya. Identifikasi senyawa kimia biji buah merah dapat dilakukan dengan skrining fitokimia, KLT, HPLC, *Nuclear Magnetic Resonance* (NMR), dan GC-MS. Apabila komponen biji buah merah diduga memiliki titik didih yang cukup tinggi ($>300^{\circ}\text{C}$), komponen biji buah merah tidak dapat diidentifikasi dengan GC-MS.

2. Batasan masalah

Berdasarkan identifikasi masalah tersebut, maka dibuat batasan masalah sebagai berikut:

- a. Isolasi dilakukan pada komponen polar biji buah merah dengan cara ekstraksi maserasi sisa sokhletasi komponen non polarnya dengan pelarut etanol.
- b. Identifikasi awal komponen polar biji buah merah dilakukan dengan skrining fitokimia
- c. Pemisahan komponen polar ekstrak biji buah merah difokuskan pada senyawa yang bersifat polar, seperti tanin, antrakuinon, dan glikosida.
- d. Pemisahan komponen polar biji buah merah dilakukan dengan metode kromatografi kolom *flash*, kromatografi filtrasi gel (Sephadex), dan HPLC.
- e. Hasil pemisahan komponen polar biji buah merah diidentifikasi lebih lanjut menjadi golongan senyawa yang lebih spesifik dengan skrining fitokimia.

3. Rumusan masalah

Berdasarkan batasan masalah di atas, maka dibuat rumusan masalah dalam penelitian ini sebagai berikut :

- a. Berapa kadar masing-masing golongan senyawa yang teridentifikasi dalam ekstrak etanol biji buah merah dengan skrining fitokimia?
- b. Metode pemisahan manakah yang tepat untuk memisahkan komponen polar biji buah merah?
- c. Senyawa apa yang teridentifikasi dalam ekstrak polar biji buah merah setelah dilakukan pemisahan?

C. Tujuan Penelitian

Tujuan dari penelitian ini adalah sebagai berikut :

- a. Mengetahui kadar masing-masing golongan senyawa yang teridentifikasi dalam ekstrak etanol biji buah merah dengan skrining fitokimia.
- b. Mengetahui metode pemisahan yang tepat untuk memisahkan komponen polar biji buah merah.
- c. Mengetahui senyawa polar yang teridentifikasi dalam ekstrak etanol biji buah merah setelah dilakukan pemisahan.

D. Manfaat Penelitian

Penelitian ini diharapkan dapat memberikan informasi mengenai metode isolasi dan metode pemisahan yang tepat untuk komponen polar biji buah merah serta mengetahui senyawa metabolit sekunder yang terdapat dalam ekstrak etanol biji buah merah. Dengan demikian penelitian ini dapat memberikan sumbangan terhadap eksplorasi manfaat dan khasiat tanaman buah merah yang telah dilakukan selama ini.



BAB II

LANDASAN TEORI

A. Tinjauan Pustaka

1. Buah Merah

Tanaman Buah Merah (Gambar 1) adalah tanaman yang masih satu famili dengan tanaman pandan. *Pandanus conoideus* ini di habitat aslinya (Pulau Papua) tumbuh dari dataran rendah dekat pantai sampai dataran tinggi. Bahkan, di lereng pegunungan Jayawijaya diketinggian 2.500 m dpl. tanaman ini bisa ditemukan. Tanaman berkayu ini tumbuh bercabang sampai mempunyai 5 cabang. Daunnya berbentuk pita yang pinggirnya berduri-duri kecil. Tinggi tanaman bisa mencapai 15 meter. Akarnya berbentuk akar udara yang menggantung sampai ketinggian satu meter dari pangkal batang. Tanaman ini berbuah saat berumur tiga tahun sejak ditanam. Buah merah umumnya berbentuk panjang lonjong atau agak persegi. Panjang buah 30-120 cm. Diameter buah 10-25 cm. Buah ini umumnya berwarna merah, merah kecokelatan, dan ada pula yang berwarna kuning. Kulit buah bagian luar menyerupai buah nangka. Di Papua, beberapa daerah yang menjadi sentra buah merah adalah daerah-daerah yang berada di sepanjang lereng pegunungan Jayawijaya. Di antaranya Kelila, Bokondini, Karubaga, Kobakma, Kenyam, dan Pasema (Budi dan Paimin, 2005).



Klasifikasi ilmiah :

Divisio : Spermatophyta

Kelas : Angiospermae

Subkelas : Monocotyledonae

Ordo : Pandanales

Famili : Pandanaceae

Genus : Pandanus

Species : *Pandanus conoideus* L.

Gambar 1. Buah merah

Berdasarkan penelitian yang dilakukan oleh I Made Budi (2001), buah merah mengandung zat-zat antioksidan, di antaranya karotenoid (12.000 ppm), tokoferol 11.000 ppm, betakaroten (700 ppm), α -tokoferol (500 ppm), asam oleat (58%), asam linoleat (8,8%), asam linolenat (7,8%), dan asam dekanoat (2,0%). Zat-zat tersebut merupakan zat antioksidan yang baik, misalnya betakaroten. Betakaroten berfungsi memperlambat berlangsungnya penumpukan flek pada arteri. Interaksinya dengan protein hewani meningkatkan produksi antibodi. Betakaroten meningkatkan jumlah sel-sel pembunuh alami dan memperbanyak aktivitas sel-sel T helpers dan limposit. Konsumsi betakaroten 30-60 mg/hari selama 2 bulan membuat tubuh memiliki sel-sel pembunuh alami lebih banyak (Subroto, 2007).

2. Ekstraksi

Ekstraksi adalah suatu proses pemisahan substansi dari campurannya dengan menggunakan pelarut yang sesuai. Metode ekstraksi yang dipilih untuk digunakan dalam suatu penelitian fitokimia sangat bergantung pada tekstur dan kandungan air bahan tumbuhan yang diekstraksi dan pada jenis senyawa yang akan diisolasi. Pada umumnya yang perlu dilakukan dalam mengekstraksi adalah “membunuh” jaringan tumbuhan untuk mencegah terjadinya oksidasi atau hidrolisis oleh enzim. Di samping itu, metode ekstraksi berguna untuk melarutkan senyawa-senyawa yang terdapat dalam jaringan tanaman ke dalam pelarut yang dipakai untuk ekstraksi tersebut.

Alkohol merupakan pelarut universal yang baik untuk mengekstraksi semua golongan senyawa metabolit sekunder. Untuk mengisolasi suatu senyawa dari bahan tanaman segar, keberhasilan ekstraksi dengan alkohol berkaitan langsung dengan seberapa jauh klorofil tertarik oleh pelarut tersebut sedangkan prosedur klasik untuk mengekstraksi berkesinambungan menggunakan alat sokhlet. (Kristanti *et al.*, 2008)

Ekstraksi biasanya menggunakan pelarut organik secara berurutan dengan kepolaran yang semakin meningkat. Pelarut heksana, eter, petroleum eter, dan kloroform digunakan untuk mengambil senyawa dengan kepolaran rendah

sedangkan pelarut yang lebih polar misalnya alkohol dan etil asetat digunakan untuk mengambil senyawa yang lebih polar. (Rusdi, 1990)

Maserasi merupakan cara ekstraksi paling sederhana yang dilakukan dengan merendam serbuk kasar simplisia dengan cairan pengekstraksi selama 4-10 hari dan disimpan terlindung dari cahaya langsung (mencegah reaksi yang dikatalisis cahaya atau perubahan warna). Keuntungan dari maserasi adalah hasil ekstraksi banyak serta dapat menghindarkan perubahan kimia terhadap senyawa-senyawa tertentu oleh karena pemanasan namun demikian proses maserasi membutuhkan waktu yang relatif lama. Kerugian cara maserasi adalah penyarian kurang sempurna karena terjadi kejenuhan cairan penyari dan membutuhkan waktu yang lama. (Hargono *et al.*, 1986). Dengan pengocokan dijamin keseimbangan konsentrasi bahan ekstraksi lebih cepat dalam cairan. Keadaan diam selama maserasi menyebabkan turunnya perpindahan bahan aktif. Walaupun demikian, maserasi merupakan proses ekstraksi yang masih umum digunakan karena cara pengerjaan dan peralatannya sederhana dan mudah. (Noerono, 1994).

3. Skrinning Fitokimia

Skrinning fitokimia merupakan tahap pendahuluan dalam penelitian fitokimia. Secara umum dapat dikatakan bahwa sebagian besar metodenya merupakan reaksi pengujian warna dengan suatu pereaksi warna.

Metode yang digunakan atau dipilih untuk melakukan skrinning fitokimia harus memenuhi beberapa persyaratan antara lain sederhana, cepat, dapat dilakukan dengan peralatan minimal, bersifat semikuantitatif yaitu memiliki batas kepekaan untuk senyawa yang bersangkutan, selektif terhadap golongan senyawa yang dipelajari, dan dapat memberikan keterangan tambahan ada atau tidaknya senyawa tertentu dalam dari golongan senyawa yang dipelajari. (Noerono, 1994).

Pendekatan skrinning fitokimia meliputi analisis kualitatif kandungan kimia dalam tumbuhan atau bagian tumbuhan (akar, batang, daun, buah, bunga, biji), terutama kandungan metabolit sekunder yang bioaktif seperti alkaloid, antrakinon, flavonoid, glikosida jantung, kumarin, saponin (steroid dan triterpenoid), tanin (polifenolat), minyak atsiri (terpenoid), dan sebagainya.

Adapun tujuan pendekatan skrining fitokimia adalah untuk mensurvei tumbuhan mendapatkan kandungan yang berguna untuk pengobatan. (Farnsworth, 1966).

4. Kromatografi Lapis Tipis (KLT)

Kromatografi Lapis Tipis merupakan metode pemisahan yang memerlukan pembiayaan yang cukup murah. Kromatografi jenis ini sering dilakukan secara preparatif dengan berbagai tujuan, seperti untuk mencari system eluen saat dilakukan kromatografi kolom atau untuk mengecek apakah senyawa tersebut telah murni atau tidak (Hostettmann *et al.*,1986).

Fase diam dalam KLT berupa padatan penyerap yang dihasilkan pada sebuah plat datar dari gelas, plastik atau alumina sehingga membentuk lapisan tipis dengan ketebalan tertentu. Fase diam atau penyerap yang bisa digunakan sebagai pelapis plat adalah silika gel (SiO_2), selulosa, alumina (Al_2O_3) dan kieselgur (tanah diatome). Kebanyakan penyerap yang digunakan adalah silika gel, dimana telah tersedia plat yang siap pakai (Padmawinata, 1991).

Pelarut sebagai fasa gerak atau eluen merupakan faktor yang menentukan gerakan komponen-komponen dalam campuran. Pemilihan pelarut tergantung pada sifat kelarutan komponen tersebut terhadap pelarut yang digunakan. Kekuatan elusi dari deret-deret pelarut untuk senyawa-senyawa dalam KLT dengan menggunakan silika gel akan turun dengan urutan sebagai berikut: air murni > metanol > etanol > propanol > aseton > etil asetat > kloroform > metil klorida > benzena > toluen > trikloroetilena > tetraklorida > sikloheksana > heksana. Fasa gerak yang bersifat lebih polar digunakan untuk mengelusi senyawa-senyawa yang adsorbsinya kuat, sedangkan fasa gerak yang kurang polar digunakan untuk mengelusi senyawa yang adsorbsinya lemah (Sastrohamidjojo, 2005).

Identifikasi dari senyawa terpisah pada lapis tipis diperoleh dari faktor retensi (R_f), yaitu dengan membandingkan jarak tempuh senyawa terlarut dengan jarak tempuh pelarut.

$R_f = \frac{\text{jarak yang digerakkan oleh senyawa dari titik asal}}{\text{jarak tempuh pelarut dari titik asal}}$

(Padmawinata, 1985)

5. Kromatografi Kolom *Flash*

Kromatografi *flash* merupakan kromatografi dengan tekanan rendah (pada umumnya <20 psi) yang digunakan sebagai kekuatan bagi elusi bahan pelarut melalui suatu ruangan atau kolom yang lebih cepat. Kualitas pemisahan sedang, tetapi dapat berlangsung cepat (10-15 menit). Pemisahan ini tidak sesuai untuk pemisahan campuran yang terdiri dari bermacam-macam zat, tetapi sangat baik untuk memisahkan sedikit reaktan dari komponen utama dalam sintesa organik.

Pemisahan merupakan fungsi waktu (t_r) dibagi dengan luas puncak (w). Sampel dimasukkan ke dalam kolom dengan menggunakan corong dengan diameter tangkai corong 4 mm. Pemisahan yang terbaik pada R_f 0.35. Pelarut yang digunakan merupakan campuran 10-50% etil asetat dengan 30-60% petroleum eter atau dengan heksana. Fraksi-fraksi yang didapatkan dari pemisahan kromatografi tersebut kemudian dilakukan uji KLT. Sampel ditotolkan pada plat KLT sebanyak 5 μ L untuk setiap fraksi. Dari hasil uji KLT ini fraksi-fraksi yang mengandung senyawa yang diinginkan akan teridentifikasi dan derajat pemisahan (R_f) yang dicapai pun diketahui (Clark Still, 1978).

6. Kromatografi Kolom Sephadex

Sephadex LH-20 merupakan media kromatografi cair yang didesain berdasarkan ukuran molekul dari produk bahan alam seperti flavonoid, glikosida, steroid, dan peptida berberat molekul rendah (Anonim, 1994). Sephadex merupakan dekstran yang berpautan silang. Dekstran adalah polimer glukosa yang diproduksi dari mikroorganisme tertentu, yang cabang-cabangnya dihubungkan dengan rantai utama oleh hubungan 1-3. Prinsip pemisahan kromatografi sephadex LH-20 adalah molekul yang berat molekul kecil akan melewati dan terjebak dalam gel sephadex terlebih dahulu sebelum turun keluar kolom, sedangkan molekul yang berat molekul besar akan langsung terelusi keluar kolom karena tidak dapat menembus gel. Oleh karena itu, molekul yang akan keluar dari kolom terlebih dahulu adalah molekul yang ukurannya lebih besar setelah itu disusul oleh molekul yang ukurannya lebih kecil (Day dan Underwood, 2002).

Gel sephadex (LH-20) dirancang untuk digunakan memakai pelarut organik. LH-20 sangat cocok untuk pemurnian akhir aglikon flavonoid dan

glikosida yang telah diisolasi dari pemisahan sebelumnya menggunakan kolom dengan berbagai adsorben yang lain. Umumnya eluen yang cocok digunakan dengan adsorben ini adalah metanol, meski sebelumnya kadang-kadang diperlukan sedikit air untuk melarutkan flavonoid. Gel ini pun perlu perendaman dengan metanol sebelum digunakan (Kristanti *et al.*, 2008).

7. High Performance Liquid Chromatography (HPLC)

HPLC (*High Performance Liquid Chromatography*) atau biasa juga disebut Kromatografi Cair Kinerja Tinggi (KCKT) mulai dikembangkan pada akhir tahun 1960-an dan awal tahun 1970-an. HPLC termasuk metode analisis terbaru yaitu suatu teknik kromatografi dengan fase gerak cairan dan fase diamnya cairan atau padat. HPLC memiliki banyak kelebihan dibanding teknik kromatografi yang lain, diantaranya mampu memisahkan molekul dalam campuran, mudah melaksanakannya, kecepatan analisis dan kepekaan tinggi, dapat dihindari terjadinya dekomposisi bahan yang dianalisis, resolusi yang baik, dapat digunakan bermacam-macam detektor (menurut kebutuhan), kolom dapat digunakan kembali, serta dapat dilakukan *sample recovery*. HPLC merupakan metode yang tidak destruktif dan dapat digunakan baik untuk analisis kualitatif maupun kuantitatif (Putra, 2004).

Kromatografi fase terbalik sejauh ini adalah teknik paling banyak digunakan dalam HPLC. Teknik ini sangat populer karena dapat diterapkan untuk analit yang kebanyakan non polar dan senyawa-senyawa ionik dan terionkan (zwitter ion). Fase diam yang paling sering digunakan dalam kromatografi fase terbalik adalah fase diam yang bersifat hidrofobik di alam (Majors, 2003).

Oktadesil silika (ODS atau C₁₈) merupakan fase diam yang paling banyak digunakan karena mampu memisahkan senyawa-senyawa dengan kepolaran rendah, sedang, maupun tinggi. Fase gerak yang paling sering digunakan untuk pemisahan dengan fase terbalik adalah campuran larutan buffer dengan metanol atau campuran air dengan asetonitril. (Rohman, 2007).

Detektor UV-Vis merupakan detektor yang paling banyak digunakan. Detektor spektrofotometri UV-Vis merupakan detektor dengan sensitivitas tinggi karena dapat menganalisis analit meskipun beratnya hanya dalam skala nano

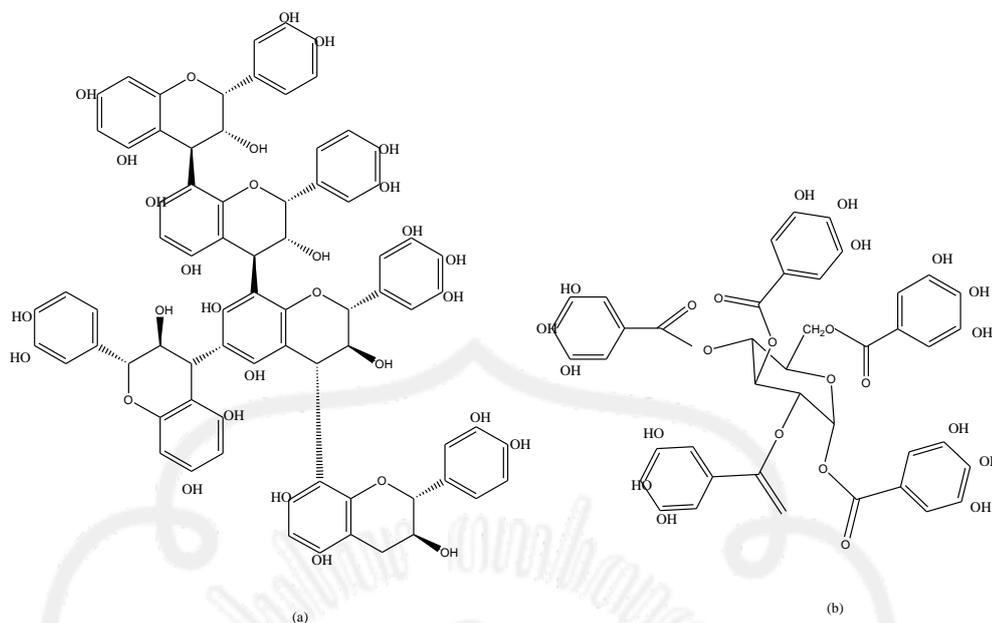
gram. Selain itu, detektor ini juga tidak dipengaruhi suhu. Pendeteksian detektor ini didasarkan pada transisi elektronik elektron dari keadaan dasar menuju ke keadaan tereksitasi. (Day dan Underwood, 2002)

8. Tanin

Tanin merupakan salah satu senyawa metabolit sekunder pada tanaman. Tanin adalah senyawa polimer fenolat yang dapat ditemukan pada semua tanaman vaskular yang diturunkan dari jalur *shikimic acid* dimana unit monomernya adalah fenol (Koensoemardiyah, 1992). Fungsi tanin pada tanaman adalah sebagai mekanisme pertahanan bagi tanaman, yaitu untuk menghindari terjadinya *overgrazing* oleh hewan ruminansia dan menghindarkan diri dari serangan serangga. Tanin mempunyai minimum berat molekul 500 gr/mol dan bersifat larut di dalam air, mempunyai kemampuan untuk mengikat protein dan juga menimbulkan *astringent sensation* (rasa tidak enak) bagi hewan ternak atau manusia yang mengkonsumsinya. *Astringent sensation* ini ditimbulkan karena adanya ikatan kompleks antara mukoprotein dengan tanin. (Farida *et al.*, 2000).

Tanin merupakan komponen utama dalam jaringan kayu pada tanaman, meskipun demikian pada jaringan lembut, seperti dalam daun dan kulit kayu, tanin sering ditemukan lebih melimpah keberadaanya dibanding dengan lignin (Hernes dan Hedges, 2004). Berdasarkan bentuk dan kimiawinya, tanin dapat dibagi menjadi 2 golongan, tanin yang dapat dihidrolisis (*Hydrolyzable tannin*) dan tanin yang tidak dapat dihidrolisis (*Condensed tannin*).

Condensed tannin (Gambar 2a), apabila dihidrolisis tidak menghasilkan senyawa-senyawa dengan bobot molekul yang kecil, tetapi suatu zat amorf. Katekin merupakan salah satu jenis tanin tak terhidrolisis. Sedangkan, *hydrolysable tannin* (Gambar 2b), karena pemberian asam-basa dan enzim dapat berubah/terhidrolisis menjadi bagian monomernya seperti asam-asam aromatik (asam galat, bentuk monomer dari galotanin dan asam elagat, bentuk monomer elagitanin) dan satuan karbohidrat. (Koensoemardiyah, 1992).



Gambar 2. Struktur tanin (a). *condensed tannin* (b). *hydrolyzable tannin*

Selain memiliki berat molekul yang besar, tanin merupakan golongan senyawa berwarna sehingga dapat menyerap sinar UV pada panjang gelombang 280 nm. Oleh karena itu tanin dapat dipisahkan dengan kromatografi filtrasi gel dan HPLC. Kromatografi filtrasi gel didasarkan pada ukuran atau berat molekul sedangkan HPLC didasarkan pada keberadaan tanin sebagai senyawa berwarna non-volatil (Kennedy *et al.*, 2006). Analisis kuantitatif tanin dapat dilakukan dengan metode titrimetri dan *colorimetri* (Atanasanova and Badgassarian, 2009. Zivkovic *et al.*, 2009).

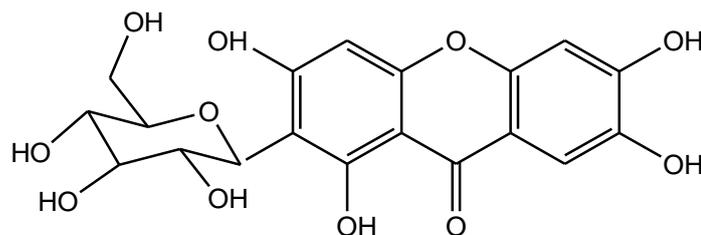
9. Glikosida

Glikosida merupakan salah satu kandungan aktif tanaman yang termasuk dalam kelompok sekunder. Di dalam tanaman glikosida tidak lagi diubah menjadi senyawa lain, kecuali bila mengalami peruraian akibat pengaruh lingkungan luar (misalnya terkena panas dan teroksidasi udara). Glikosida adalah senyawa yang terdiri atas gabungan dua bagian senyawa, yaitu gula dan bukan gula. Keduanya dihubungkan oleh suatu bentuk ikatan berupa jembatan oksigen (O-glikosida, dioscin), jembatan nitrogen (N-glikosida, adenosine), jembatan sulfur (S-glikosida, sinigrin), maupun jembatan karbon (C-glikosida, barbaloin). Bagian gula biasa disebut glikon sedangkan bagian bukan gula disebut sebagai aglikon

atau genin. Apabila glikon dan aglikon saling terikat maka senyawa ini disebut sebagai glikosida. (Rohman, 2009).

Glikosida senyawa fenolik adalah glikosida yang aglikonnya merupakan senyawa fenol (bebas). Glikosida jenis ini merupakan jenis glikosida paling sederhana. Glikosida senyawa fenolik dalam buah rambutan berhasil dipisahkan dengan kromatografi Sephadex LH-20 dan analisis senyawanya menggunakan HPLC pada 280 nm (Thitilertdecha *et al.*, 2010). Glikosida fenol dapat dianalisis pada 280 dan 314 nm. Panjang gelombang tersebut merupakan karakteristik panjang gelombang untuk jenis senyawa polifenol dalam bentuk aglikon maupun glikosilat (Neacsu *et al.*, 2007). Glikosida fenolik tanaman *Clematis rehderiana* dapat juga dipisahkan dengan kromatografi kolom fase normal dengan silika gel (200-300 mesh) (Du *et al.*, 2010). Fase diam yang biasa dipakai untuk HPLC adalah C₁₈. Interaksi yang terjadi antara senyawa fenolik dengan fase diamnya adalah interaksi apolar Van der Waals. Oleh karena itu PH sampel yang mengandung senyawa fenolik harus disesuaikan untuk menghindari ionisasi dari beberapa fenol (Santana *et al.*, 2009).

Glikosida antrakuinon (Gambar 3) adalah glikosida yang aglikonnya merupakan golongan antrakuinon. Glikosida jenis ini merupakan zat aktif dalam obat pencahar (Robinson, 1993). Glikosida antrakuinon pada *Morinda officinalis* dapat dipisahkan dengan kromatografi kolom silika gel (200-300 mesh) kemudian difraksinasi dengan kromatografi sephadex LH-20 dengan metanol 100% (Wu *et al.*, 2009). Kromatografi kolom Silika gel 70-230 mesh digunakan untuk mengisolasi dan memurnikan aglikon antrakuinon dan asam fenolik. Kromatografi sephadex LH-20 digunakan untuk pemurnian asam fenolik dalam *Isatis microcarpa* (Emmam and El-Moaty, 2009)



Gambar 3. Struktur glikosida antrakuinon

B. Kerangka Pemikiran

Ekstrak buah merah yang diambil dari daging buahnya utamanya telah diteliti dan telah diketahui banyak mengandung senyawa antioksidan yang dapat meminimalisir resiko kanker dan juga ditemukan senyawa-senyawa yang dapat meningkatkan daya tahan tubuh sedangkan biji buahnya belum pernah diteliti sebelumnya dan belum pernah ditemukan literatur mengenai komponen utama biji buah merah. Biji dan buah memiliki hubungan biologik yang kuat jika dilihat dari proses pembentukannya sehingga diduga biji memiliki senyawa metabolit sekunder yang hampir mirip dengan bagian daging buah merah. Untuk lebih mengoptimalkan potensi buah merah secara keseluruhan maka dilakukan isolasi dan metode pemisahan yang tepat, khususnya untuk komponen polar biji buah merah.

I Made budi (2001) menyatakan bahwa komponen non polar dari buah merah sebagian besar terdiri dari asam lemak. Komponen non polarnya, khususnya asam lemak harus dihilangkan terlebih dahulu agar tidak ikut terekstrak ke dalam pelarut polar yang akan digunakan untuk mengisolasi komponen polarnya. Proses sokhlet dilakukan untuk menghilangkan komponen non polar. Residu hasil ekstraksi sokhlet yang diduga telah bebas dari senyawa non polarnya, dimaserasi dengan menggunakan etanol untuk mengekstrak komponen polarnya.

Selanjutnya, ekstrak etanol biji buah merah dilakukan skринning fitokimia sebagai uji pendahuluan senyawa metabolit sekunder yang terkandung dalam biji buah merah. Hasil skринning fitokimia ini nantinya akan memberikan gambaran senyawa metabolit sekunder apa saja yang terkandung dalam biji buah merah dan dapat dijadikan dasar metode pemisahan selanjutnya. Septiyaningsih (2010) telah melakukan skринning fitokimia ekstrak etanol biji buah merah . Hasil skринning fitokimianya menunjukkan bahwa ekstrak etanol uji positif terhadap tanin, glikosida antrakuinon dan fenolik, serta asam lemak. Hasil skринning fitokimia awal ini belum menjelaskan jenis tanin, atau aglikon glikosida jenis apa yang berada dalam ekstrak etanol biji buah merah. Selain itu, ekstrak etanol ini juga belum dilakukan pemisahan dan identifikasi lebih lanjut. Sehingga, kadar masing-

masing golongan senyawa tersebut di dalam ekstrak etanol biji buah merah belum dapat diketahui.

Senyawa fenolik merupakan senyawa yang jangkauannya cukup luas karena hampir semua senyawa bahan alam memiliki gugus fenolik. Bahkan, antrakuinon dan tanin sendiri juga merupakan suatu fenolik (Treutter, 2010). Antrakuinon merupakan senyawa bahan alam yang jarang ditemukan karena senyawa ini mudah teroksidasi atau terurai oleh enzim (Robinson, 1993). Sedangkan, Tanin merupakan senyawa metabolit sekunder yang memiliki berat molekul cukup tinggi dan sering kali membentuk kompleks dengan protein dan karbohidrat (Risnasari, 2002). Tanin dalam akar *Tsuga heterophylla* mencapai 90% dari kandungan senyawa totalnya (Hernes and Hedges, 2004).

Keberadaan tanin dalam jumlah besar pada tanaman diduga dapat mengganggu proses pemisahannya. Untuk mengetahui pengaruh keberadaan tanin terhadap pemisahan komponen polar dalam biji buah merah dilakukan beberapa metode pemisahan. Metode pemisahan yang akan dilakukan terhadap komponen polar biji buah merah meliputi kromatografi kolom *Flash*, kromatografi kolom Sephadex, dan *High Performance Liquid Chromatography* (HPLC). Kromatografi Sephadex-HPLC memberikan hasil pemisahan tanin yang bagus pada ekstrak daun bearberry (Pegg *et al.*, 2008).

C. Hipotesis

Berdasarkan kerangka pemikiran di atas, dapat dirumuskan hipotesis sebagai berikut :

1. Prosentase kandungan senyawa fenolik dalam ekstrak etanol biji buah merah paling tinggi dibandingkan tanin dan antrakuinon. Antrakuinon memiliki prosentase kandungan paling kecil dalam ekstrak etanol biji buah merah.
2. Kromatografi Sephadex-HPLC memberikan hasil pemisahan optimal terhadap komponen dalam ekstrak etanol biji buah merah.
3. Semua golongan senyawa kimia yang teridentifikasi saat skrining fitokimia ekstrak etanol awal biji buah merah dapat diidentifikasi lebih lanjut setelah dilakukan pemisahan komponen senyawa ekstrak etanol biji buah merah.

BAB III

METODOLOGI PENELITIAN

A. Metode Penelitian

Metode yang digunakan dalam penelitian ini adalah metode eksperimen di laboratorium kimia. Untuk mengisolasi komponen polar biji buah merah dilakukan dengan metode ekstraksi dengan cara mengisolasi komponen non polarnya terlebih dahulu untuk mempermudah metode pemisahan. Isolasi komponen non polarnya dilakukan dengan cara ekstraksi sokhlet dengan pelarut petroleum eter. Residu sokhlet tersebut di maserasi dengan pelarut etanol untuk diambil komponen polarnya. Untuk mengetahui teknik pemisahan yang tepat, ekstrak etanol dilakukan uji skrining fitokimia. Pemisahan komponen polar ekstrak etanol dilakukan dengan metode kromatografi. Metode kromatografi yang dimaksud meliputi Kromatografi Lapis Tipis (KLT), Kromatografi Kolom *Flash*, Kromatografi Filtrasi Gel (Sephadex LH-20), *High Performance Liquid Chromatography* (HPLC). Untuk mengidentifikasi senyawa metabolit sekunder yang dipisahkan dengan kromatografi, fraksi hasil pemisahan dilakukan skrining fitokimia lebih lanjut untuk memperoleh golongan senyawa yang lebih spesifik.

B. Waktu dan Tempat Penelitian

Penelitian dilaksanakan pada bulan Agustus 2009 – Mei 2010 di Laboratorium Kimia Dasar FMIPA dan SubLab Kimia Laboratorium Pusat Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam Universitas Sebelas Maret Surakarta.

C. Alat dan Bahan

1. Alat

Alat yang digunakan adalah sebagai berikut :

- a. Satu set alat Sokhlet
- b. Satu set alat *vacuum rotary evaporator*
- c. Penyaring *Buchner*
- d. Plat KLT

- e. TLC Chamber
- f. Lampu UV 254 nm dan 365 nm
- g. Mikropipet
- h. Hot plate
- i. Satu set alat Kromatografi kolom *flash*
- j. Satu set alat HPLC
- k. Alat-alat gelas
- l. Corong pisah

2. Bahan

Bahan-bahan yang digunakan dalam penelitian ini adalah :

- | | |
|--|--|
| a. Biji buah merah dari Papua | n. H ₂ SO ₄ p.a (Merck) |
| b. Silika gel <i>for column</i> (Merck) | o. CH ₃ COOH anhidrat (Merck) |
| c. Petroleum eter p.a (Merck) | p. FeCl ₃ p.a (Merck) |
| d. n-heksan (Merck) | q. K ₃ [Fe(CN) ₆] p.a (Merck) |
| e. etil asetat p.a (Merck) | r. NaOH p.a (Merck) |
| f. etanol 96% (Merck) | s. KOH p.a (Merck) |
| g. metanol p.a (Merck) | t. Kertas saring (bratachem) |
| h. kloroform p.a (Merck) | u. mikrofilter 0.45µm |
| i. plat KLT silika gel GF ₂₅₄ (Merck) | v. HCl p.a (Merck) |
| j. aseton teknis (saba kimia) | w. Na ₂ SO ₄ anhidrat (Merck) |
| k. aquabides (Apotek Kimia Farma) | x. H ₃ PO ₄ p.a (Merck) |
| l. asetonitril <i>for HPLC grade</i> (Merck) | y. aquades (Lab Pusat UNS) |
| m. dietil eter p.a (Merck) | z. logam Mg |

D. Prosedur Penelitian

1. Persiapan Sampel Biji Buah Merah

Biji buah merah dibersihkan dari kotoran/sisa daging yang menempel pada biji buah merah dengan air kemudian dicuci kembali dengan aseton. Biji buah merah dikeringkan dengan cara diangin-anginkan dalam suhu kamar selama 2

hari/sampai benar-benar kering. Setelah kering, biji digiling menjadi serbuk dengan ukuran 50-60 mesh.

2. Ekstraksi

Sebanyak 150 gr serbuk biji buah merah diekstraksi sokhlet dengan pelarut petroleum eter dengan perbandingan 1:10 (w/v) pada T :40-60°C. proses sokhlet dapat diakhiri apabila filtrat/pelarut berwarna jernih (setelah terjadi 16-20 sirkulasi).

Residu hasil sokhlet dikeringkan, kemudian di maserasi dengan pelarut etanol 1500 ml selama 7 hari dan disertai pengadukan setiap hari. Filtrat hasil maserasi dipisahkan dari residunya dengan cara disaring dengan penyaring *buchner*. Filtrat etanol dipekatkan dengan *rotary evaporator* pada 60-75°C sampai diperoleh ekstrak pekat etanol.

3. Skrining Fitokimia

Skrining fitokimia (uji tabung) terhadap ekstrak etanol, sebagai berikut;

a. Glikosida

Lebih kurang 20 mL ekstrak etanol ditambahkan 15 ml HCl 10%, kemudian direfluks selama 30 menit. Larutan didinginkan kemudian diekstrak 3 x 8 mL eter dengan corong pisah. Lapisan eter dipisahkan dan ditambah dengan Na₂SO₄ anhidrat. Lapisan eter ini merupakan bagian aglikon (bebas gula).

1) Senyawa fenolik

Lebih kurang 1 mL ekstrak eter diuapkan kemudian ditetesi dengan kalium heksasianoferrat (III) dan larutan FeCl₃. Larutan hitam kehitaman yang terbentuk menunjukkan adanya senyawa fenolik

2) Flavonoid

Lebih kurang 3 mL ekstrak eter diuapkan. Sisa dilarutkan dalam 1-2 mL metanol 50%. Ke dalam larutan tersebut ditambahkan logam Mg dan 4 tetes HCl pekat. Larutan berwarna merah atau jingga yang terbentuk menunjukkan adanya flavonoid.

3) Antrakuinon

Lebih kurang 3 mL ekstrak eter ditambahkan NaOH 10% kemudian dikocok. Bila terbentuk warna merah sampai jingga menunjukkan adanya antrakuinon.

4) Asam Lemak

Lebih kurang 5 mL ekstrak eter diuapkan. Jika sisa berminyak maka dalam sari eter tersebut mengandung asam lemak.

b. Saponin

Lebih kurang 2 mL ekstrak etanol diuapkan kemudian diencerkan dengan aquades dengan perbandingan (1:1). Dikocok selama 15 menit. Apabila buih/busa bertahan selama 30 menit, berarti ekstrak mengandung saponin.

c. Tanin

Lebih kurang 1 mL ekstrak etanol diencerkan dengan 2 mL aquades. Ditambahkan 3 tetes larutan FeCl_3 . timbulnya warna biru kehitaman menunjukkan adanya senyawa tanin galat dan jika warnanya hijau kehitaman menunjukkan adanya senyawa tanin katekin.

d. Antosianin

Lebih kurang 1 mL ekstrak etanol ditambahkan/dibuat dalam suasana asam, netral dan basa. Jika dalam suasana asam berwarna merah, dalam suasana netral berwarna ungu dan dalam suasana basa berwarna hijau atau ungu maka dalam ekstrak etanol mengandung antosianin

4. Kromatografi Lapis Tipis (KLT)

Sistem eluen yang akan digunakan dalam kromatografi kolom flash ditentukan terlebih dahulu dengan KLT. Pelarut yang digunakan adalah *n*-heksana-etil asetat. Ekstrak etanol ditotolkan pada plat KLT dan dielusikan dalam larutan pengembang *n*-heksana : etil asetat (1:1; 1:2; 2:1; 1:3; 1:4; 2:3; 3:7; 10:0; 0:10). Deteksi bercak diamati dalam lampu UV 254 nm dan 365 nm. Sistem eluen terpilih yaitu sistem yang memberikan profil pemisahan paling baik dan memberikan *spot* paling banyak. Sistem eluen tersebut kemudian digunakan sebagai fase gerak dalam kromatografi cair *flash*.

5. Kromatografi Kolom Flash

Kromatografi kolom *flash* dilakukan dengan eluen yang memberikan profil KLT paling baik. Fase diamnya berupa silika gel *for column chromatography* sebanyak 30 gr yang diaktivasi 24 jam pada suhu 110⁰C. Kolom kromatografi *flash* yang dipakai berdiameter 2 cm. silika gel teraktivasi dibuat kolom dengan cara basah/dibuat bubuk dengan pelarut *n*-heksan. Kolom tersebut dikondisikan selama 24 jam sebelum digunakan untuk elusi.

Proses elusi dimulai dari pelarut yang diperoleh dari KLT kemudian ditingkatkan kepolaranya untuk menyempurnakan proses elusi sampel. Setiap pengelusan, kolom ditekan dengan *flash*. Eluat ditampung dalam 50 vial, dengan 4 ml eluat per vial. Masing-masing eluat diuapkan pelarutnya dengan cara diangin-anginkan. Masing-masing vial ditimbang untuk mengetahui beratnya. Kemudian masing-masing vial tersebut dilakukan uji KLT dan dicocokkan Rf-nya dengan hasil KLT sebelumnya untuk memastikan bahwa sampel dapat memisah dengan baik. vial yang mempunyai Rf identik dengan hasil KLT sebelumnya dilakukan pemisahan lebih lanjut.

6. Kromatografi Kolom Sephadex

Kromatografi ini menggunakan sephadex LH-20. Sebanyak 1,356 gr sampel dielusi dalam kolom sephadex siap pakai. Sampel dielusi gravitasi dengan pelarut metanol 100% sampai seluruh sampel dapat terelusi keluar dari kolom.

Eluat ditampung dalam 50 vial, dengan 4 ml eluat per vial. Masing-masing eluat diuapkan pelarutnya dengan *rotary evaporator*. Masing-masing vial ditimbang untuk mengetahui beratnya. Setelah itu sampel dilakukan skrining fitokimia untuk memastikan semua golongan senyawa dapat memisah dengan cara ini.

7. High Performance Liquid Chromatography (HPLC)

Kondisi operasi alat HPLC :

- a. Fase diam : kolom C18
- b. Fase gerak : asetonitril : 0.4 % H₃PO₄ dalam aquabides (10:90)
- c. Kecepatan alir : 1mL/menit

- d. Detektor UV pada λ 280 nm
- e. Jumlah sampel :20 μ L/injeksi. Sampel yang diinjeksi meliputi pelarut etanol 95% (standar) dan ekstrak etanol biji buah merah

E. Teknik Pengumpulan dan Analisis Data

Data yang diperoleh dari hasil penelitian yaitu golongan senyawa metabolit sekunder yang terkandung dalam ekstrak etanol dari hasil skrining fitokimia. Penentuan fasa diam dan eluen dengan menggunakan KLT akan diperoleh data berupa spot-spot hasil pemisahan dan nilai Rf untuk tiap perbandingan eluen *n*-heksan dan etil asetat, yang selanjutnya hasil pemisahan yang baik akan digunakan dalam pemisahan kromatografi kolom *flash*.

Pemisahan komponen polar ekstrak etanol menggunakan kromatografi *flash* maupun kolom sephadex akan dihasilkan eluat. Tiap eluat diuji dengan KLT dan menghasilkan nilai Rf yang kemudian dibandingkan dengan nilai Rf awal. Selain itu masing-masing eluat juga dilakukan skrining fitokimia terhadap golongan metabolit sekunder yang positif pada ekstrak etanol awal (sebelum dipisahkan dengan kolom) untuk mengetahui senyawa metabolit sekunder tersebut dapat terpisah dengan baik atau tidak serta untuk mengetahui bagaimana pola pemisahan dan analisis kuantitatif masing-masing senyawanya.

Pemisahan komponen polar biji buah merah menggunakan HPLC menghasilkan data berupa profil kromatogram, waktu retensi, dan luas puncak. Jumlah puncak menunjukkan jumlah komponen senyawa dalam ekstrak etanol (kualitatif). Luas puncak digunakan untuk menghitung % kandungan masing-masing komponen polar senyawa dalam biji buah merah (kuantitatif).

Masing-masing metode pemisahan (kromatografi kolom *flash*, kromatografi kolom sephadex, dan HPLC) dibandingkan satu sama lain untuk mendapatkan metode pemisahan yang paling tepat. Metode pemisahan yang paling tepat untuk memisahkan komponen polar biji buah merah adalah metode yang menghasilkan data terbaik baik dari sisi kualitatif maupun kuantitatifnya. Komponen polar yang teridentifikasi baik dengan menggunakan metode pemisahan tersebut kemudian dianalisis golongan senyawa lebih lanjut.

BAB IV HASIL DAN PEMBAHASAN

A. Ekstraksi

I Made Budi (2001) menyatakan bahwa komponen non polar dari buah merah sebagian besar terdiri dari asam lemak. Komponen non polarnya, terutama asam lemak harus dihilangkan terlebih dahulu. Proses sokhlet dilakukan untuk menghilangkan komponen non polar. Ekstraksi sokhlet 150 gr biji buah merah dilakukan dalam 1500 mL petroleum eter. Biji buah merah yang telah disokhlet dimaserasi dan diperoleh ekstrak etanol yang berwarna coklat kekuningan. Ekstrak etanol tersebut dipekatkan dan diperoleh ekstrak pekat etanol berwarna coklat kehitaman sebanyak 10,953 gr.

Ekstrak pekat etanol diduga hanya mengandung senyawa yang bersifat polar karena senyawa non polarnya telah diambil terlebih dahulu dengan ekstraksi sokhlet. Ekstrak etanol diduga mengandung senyawa kimia antara lain garam alkaloid, alkaloid basa kuarterner, antosianin, glikosida, saponin, dan tanin. Menurut Moeljopawiro *et al.*, (2005), Ekstrak buah merah tidak mengandung alkaloid. Sehingga dalam penelitian ini tidak dilakukan skrinning fitokimia alkaloid terhadap ekstrak etanol biji buah merah. Glikosida adalah senyawa yang terdiri atas gabungan dua bagian senyawa, yaitu gula dan bukan gula (aglikon). Aglikon dari glikosida ini dapat berupa flavonoid, antrakuinon, senyawa fenolik bebas, dan asam lemak (Rohman, 2009).

B. Skrinning Fitokimia

Skrinning fitokimia merupakan tahap pendahuluan dalam penelitian fitokimia. Skrinning fitokimia dilakukan dengan uji tabung. Skrinning fotokimia ini dilakukan untuk identifikasi awal golongan metabolit sekunder yang terkandung dalam ekstrak etanol biji buah merah.

Adapun hasil skrinning fitokimia ekstrak etanol biji buah merah dapat dilihat pada Tabel 1.

Tabel 1. Hasil skrinning fitokimia (uji tabung) ekstrak etanol biji buah merah

No	Uji fitokimia	Pereaksi uji	Perubahan yang terjadi	kesimpulan
1.	Saponin	Ditambah air lalu dikocok	Tidak terbentuk buih/busa	-
2.	Tanin	H ₂ O, FeCl ₃	Hijau kehitaman	+
3	Antosianin	Suasana asam	Merah bata	-
3.	Glikosida			
	a. fenol	FeCl ₃	Hijau	+
	b. flavonoid	Mg _(s) dan HCl	Tidak ada	-
	c. antrakuinon	NaOH 10%	merah bata	+
	d. asam lemak	-	sisa berminyak	+

Ket : (+) uji positif

(-) uji negatif

Hasil uji di atas sama dengan hasil skrinning fitokimia ekstrak etanol biji buah merah yang telah dilakukan oleh Septiyaningsih (2010). Ekstrak etanol biji buah merah setidaknya 4 senyawa yaitu tanin katekin, glikosida antrakuinon, glikosida senyawa fenolik, dan asam lemak. Tanin katekin merupakan *condensed tanin* yang tidak dapat dihidrolisis menjadi bagian molekul yang lebih kecil. Tanin katekin sering kali dijumpai dalam bentuk polimer, yang tersusun atas senyawa polifenol (Koensoemardiyah, 1992). Kandungan senyawa kimia dalam biji buah merah memiliki beberapa persamaan dengan kandungan kimia dalam buah merah, yaitu sama-sama mengandung asam lemak dan antrakuinon meskipun dalam biji buah merah keduanya dalam bentuk glikosida. Ekstrak etanol buah merah mengandung golongan senyawa asam lemak, steroid/terpenoid, karotenoid, minyak atsiri, glikosida jantung, antrakuinon, flavonoid dan kumarin (Marliyana *et al.*, 2009)

C. Pemisahan Komponen Senyawa dalam Ekstrak Etanol

Hasil skrinning fitokimia menunjukkan bahwa ekstrak etanol biji buah merah mengandung golongan tanin katekin, glikosida antrakuinon, glikosida asam lemak dan glikosida senyawa fenolik. Keempat golongan senyawa tersebut adalah

golongan metabolit sekunder yang umumnya memiliki titik didih tinggi dan memiliki rantai yang panjang. Selain itu, masing-masing golongan tersebut memiliki karakteristik pemisahan yang berbeda-beda sehingga dalam penelitian ini akan digunakan beberapa metode kromatografi untuk memisahkan komponen senyawa dalam ekstrak etanol. Metode yang digunakan dalam pemisahan komponen senyawa dalam ekstrak etanol biji buah merah adalah Kromatografi Kolom *Flash*, Kromatografi Filtrasi Gel (Sephadex), dan *High Performance Liquid Chromatography* (HPLC). Masing-masing metode kromatografi tersebut akan dilakukan untuk mengetahui metode kromatografi mana yang efektif untuk memisahkan komponen senyawa dalam ekstrak etanol biji buah merah.

1. Kromatografi Kolom *Flash*

a. Penentuan Sistem Eluen dengan Kromatografi Lapis Tipis (KLT)

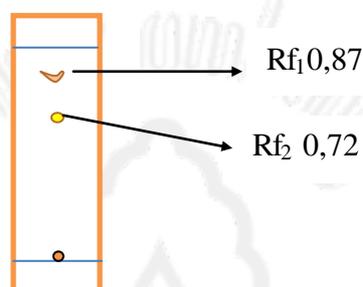
Penentuan sistem eluen dengan KLT bertujuan untuk mencari sistem eluen yang mampu memberikan pemisahan yang paling baik dan sekaligus untuk mengetahui profil pemisahannya. Sistem eluen yang menghasilkan pemisahan paling baik akan digunakan sebagai sistem eluen dalam proses pemisahan dengan kromatografi kolom *flash* dan untuk analisis fraksi yang diperoleh dari kromatografi kolom *flash*.

Fase gerak yang digunakan adalah *n*-heksana dan etil asetat yang divariasikan tingkat kepolarannya dengan memvariasikan perbandingan volume hingga diperoleh perbandingan volume yang memberikan pemisahan paling baik. Campuran pelarut *n*-heksana dan etil asetat merupakan sistem eluen universal yang sering direkomendasikan sebagai fase gerak dalam kromatografi karena mudah diuapkan dan mudah mengatur tingkat kepolaran eluen.

Sistem eluen yang dipakai adalah sistem eluen yang dapat memberikan pemisahan yang paling baik, ditandai dengan spot-spot yang terpisah nyata. Penentuan sistem eluen dengan KLT dilakukan dengan metode *trial and error*. Ekstrak etanol awal ditotolkan pada plat KLT kemudian dielusikan dengan berbagai variasi perbandingan *n*-heksana : etil asetat (*v/v*). Variasi terdiri dari perbandingan *n*-heksana 100%, etil asetat 100%, *n*-heksana-etil asetat (1:1; 1:2; 2:1; 1:3; 1:4;

2:3; 3:7). Spot hasil elusi dilihat dalam lampu UV pada panjang gelombang 254 nm dan 365 nm untuk dilihat pola pemisahannya. Profil KLT masing-masing sistem eluen dapat dilihat pada Lampiran 1.

Hasil pemisahan terbaik pada perbandingan *n*-heksan : etil asetat (1:3) yang dapat dilihat pada Gambar 4. Sistem eluen ini menghasilkan 3 spot yang seolah-olah hanya menghasilkan 2 spot. Hal ini disebabkan karena hanya 2 spot dapat naik/terelusi oleh pelarut, sedangkan 1 spot ada pada titik awal penotolan (spot tidak dapat naik). Spot 1 berwarna orange memiliki R_f 0,87 dan spot 2 berwarna kuning memiliki R_f 0,72.



Gambar 4. Profil KLT Ekstrak Etanol Biji Buah Merah dengan Sistem Eluen *n*-heksan : Etil Asetat (1 : 3). (gambar asli dapat dilihat pada lampiran 3)

Menurut Clark Still (1978), pemilihan sistem eluen dengan KLT sebaiknya harus memiliki ΔR_f 0,15-0,20. Sistem eluen ini memiliki ΔR_f 0,15 sehingga sistem eluen ini dapat digunakan untuk pemisahan kromatografi kolom *flash*. Jika eluen 1:3 diaplikasikan dalam kromatografi kolom *flash*, spot 1 akan terelusi bersama dengan sistem eluen ini, sedangkan spot 2 yang bersifat lebih polar akan tertinggal terlebih dahulu dalam fase diam. Spot 2 dielusi dengan sistem eluen yang cenderung lebih polar. Sedangkan, spot 3 dielusi oleh pelarut yang paling polar (etil asetat 100%). Campuran senyawa dalam ekstrak etanol biji buah merah cukup sederhana karena profil KLTnya hanya menghasilkan 3 spot. Jumlah spot KLT mengindikasikan setidaknya ada 3 senyawa dalam ekstrak etanol biji buah merah sehingga dapat digunakan elusi isokratik dalam kromatografi kolom *flash*.

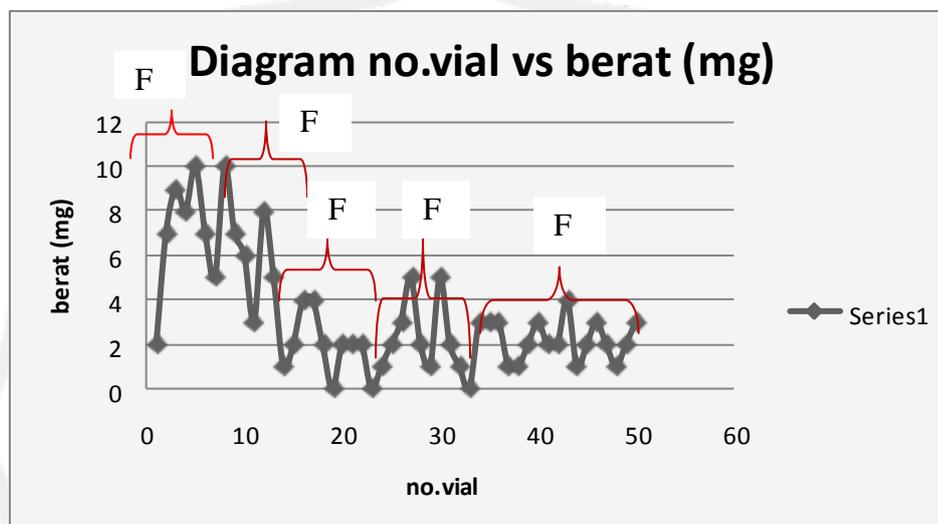
b. Pemisahan Komponen Senyawa dalam Ekstrak Etanol dengan Kromatografi Kolom *Flash*

Kromatografi kolom *flash* merupakan kromatografi dengan tekanan rendah (pada umumnya <20 psi) yang digunakan sebagai kekuatan bagi elusi bahan pelarut melalui suatu ruangan atau kolom yang lebih cepat. Kualitas pemisahan sedang, tetapi dapat berlangsung cepat (10-15 menit). Jenis kromatografi ini merupakan modifikasi dari kromatografi kolom gravitasi dan Kromatografi Vakum Cair (KVC). Selain lebih cepat, kromatografi *flash* ini membutuhkan sampel yang relatif lebih kecil. Karena kolomnya lebih ramping dibandingkan kolom yang digunakan dalam KVC sehingga jumlah fase diam (silika gel) dan fase geraknya lebih kecil sehingga biaya yang dikeluarkan lebih sedikit pula.

Kromatografi kolom *flash* ini menggunakan fase normal karena fase diamnya (silika gel) jauh lebih polar dibanding pelarutnya (*n*-heksan:etil asetat 1:3). Sistem elusi dilakukan secara isokratik karena profil KLT menunjukkan hanya terdapat 2-3 spot, sehingga pemisahan secara gradien dinilai belum perlu. Sebanyak 0,8gr (800 mg) ekstrak etanol dimasukkan di atas permukaan kolom. Kemudian secara perlahan, *n*-heksan-etil asetat (1:3) dimasukkan ke dalam kolom untuk mengelusi sampel sambil diberi *flash* untuk mempercepat proses elusi. Untuk dapat mengelusi sampel secara sempurna, proses elusi ditingkatkan kepolarannya dengan diakhiri elusi etil asetat 100 %. Eluat yang dihasilkan ditampung tiap 3-4 mL dalam 50 vial. Eluat diangin-anginkan untuk menghilangkan pelarutnya, kemudian ditimbang untuk mengetahui berat masing-masing hasil pemisahan tiap vialnya. Berat masing-masing hasil pemisahan kromatografi kolom *flash* dapat dilihat pada Gambar 5.

Gambar 5 menunjukkan profil kromatogram hasil pemisahan. Senyawa yang dihasilkan saat dilakukan pemisahan *flash* cukup kompleks. Setidaknya 5 golongan senyawa hasil pemisahan terdapat dalam ekstrak etanol biji buah merah. Vial 1-7 digolongkan sebagai fraksi 1 (F1), vial 8-14 digolongkan sebagai fraksi 2 (F2), vial 15-23 digolongkan sebagai fraksi 3 (F3), vial 24-33 digolongkan sebagai fraksi 4 (F4), dan vial 34-50 digolongkan sebagai fraksi 5 (F5). Jumlah

fraksi yang diduga ini (5 fraksi) berbeda dengan jumlah fraksi yang terdapat dalam profil KLT pra kolom (3 fraksi). Hal ini diduga karena pemisahan kromatografi kolom *flash* memiliki resolusi yang lebih baik meskipun awalnya menggunakan sistem eluen yang sama saat dilakukan KLT. Sistem eluen dalam kromatografi kolom *flash* tidak bersifat statis seperti dalam KLT karena kepolaran pelarutnya ditingkatkan agar komponen senyawa dalam kolom dapat terelusi keluar kolom.



Gambar 5. Diagram no.vial vs berat hasil pemisahan kromatografi kolom *flash*, menunjukkan setidaknya ada 5 fraksi dalam ekstrak etanol biji buah merah

Berat ekstrak etanol biji buah merah hasil pemisahan dengan kromatografi kolom *flash* adalah 165 mg atau 20,625% dari berat awal ekstrak etanol biji buah merah yang dielusikan. Sisanya, sampel masih terjebak dalam kolom atau masih tetap berada di atas permukaan adsorben, tidak dapat dielusi secara sempurna oleh sistem eluennya meskipun telah di elusi dengan etil asetat 100 %. Hal ini dapat terjadi karena beberapa faktor, antara lain karena pemilihan sistem eluen *n*-heksan-etil asetat (1:3) belum sepenuhnya tepat. Sistem eluen tersebut tidak dapat melulusi seluruh senyawa yang terkandung dalam ekstrak etanol. Hal ini diperkuat dengan masih ada spot pekat yang tidak ikut terelusi pada lokasi penotolan pertama kali pada plat KLT (Gambar 4). Faktor lain adalah keberadaan tanin katekin (*condensed tannin*) dalam ekstrak etanol mempengaruhi pemisahannya. Tanin katekin merupakan suatu polimer. Karena golongan ini

sangat ruah dan memiliki gugus hidroksi (lihat Gambar 2), sehingga golongan ini tidak dapat terelusi karena bentuknya dan dapat menjerat golongan/senyawa lain dengan ikatan hidrogen. Ikatan hidrogen dapat terjadi karena golongan senyawa metabolit sekunder hasil skrinning seperti glikosida asam lemak, antrakuinon dan senyawa fenolik sama-sama memiliki gugus hidroksil, sehingga dapat membentuk ikatan hidrogen dengan gugus hidroksi tanin katekin. Oleh karena itulah sebagian sampel tidak dapat terelusi dan tetap berada di atas permukaan kolom. Untuk membuktikan apakah tanin katekin dapat terelusi atau tidak, uji tanin katekin dilakukan dengan uji tabung dengan FeCl_3 sebagai pereaksi penampak warnanya. Hasilnya, semua hasil pemisahan kromatograf kolom *flash* uji negatif terhadap tanin. Itu artinya tanin benar-benar tidak dapat dipisahkan dengan kromatografi kolom *flash*. Hasil uji tanin menunjukkan bahwa pemisahan komponen senyawa dalam ekstrak etanol biji buah menggunakan kromatografi kolom *flash* dengan fase diam silika gel dan fase gerak *n*-heksan: etil asetat (1:3) menggunakan fase normal dinilai masih belum tepat.

2. Kromatografi Kolom Sephadex

Kromatografi kolom Sephadex merupakan metode pemisahan senyawa kimia yang didasarkan pada ukuran molekul. Metode ini dilakukan untuk membandingkan hasilnya dengan metode pemisahan yang pertama. Skrinning fitokimia ekstrak etanol masih menunjukkan adanya asam lemak sehingga dilakukan pemisahan terhadap komponen polarnya lagi dengan ekstraksi partisi cair-cair untuk mempermudah proses pemisahannya. Sebelum dilakukan pemisahan dengan kromatografi Sephadex, ekstrak etanol di partisi dengan *n*-heksan untuk mengambil asam lemaknya terlebih dahulu. *n*-heksan dipilih sebagai pelarut karena terdapat perbedaan sifat kepolaran dengan etanol. *n*-heksan merupakan pelarut paling non polar dan asam lemak bersifat non polar. Oleh karena itu, nantinya asam lemak yang berada dalam ekstrak etanol diharapkan dapat terekstrak ke dalam *n*-heksan.

Ekstraksi cair-cair ini menghasilkan 2 ekstrak yaitu ekstrak etanol dan ekstrak *n*-heksan. Untuk memastikan bahwa asam lemak telah benar-benar terekstrak ke dalam *n*-heksan, dilakukan skrinning fitokimia. Hasil skrinning

fitokimia menunjukkan bahwa asam lemak telah terekstrak ke dalam *n*-heksan dan ekstrak etanol hanya mengandung komponen polar saja. Skrinning fitokimia ekstrak etanol hasil partisi dapat dilihat pada Tabel 2.

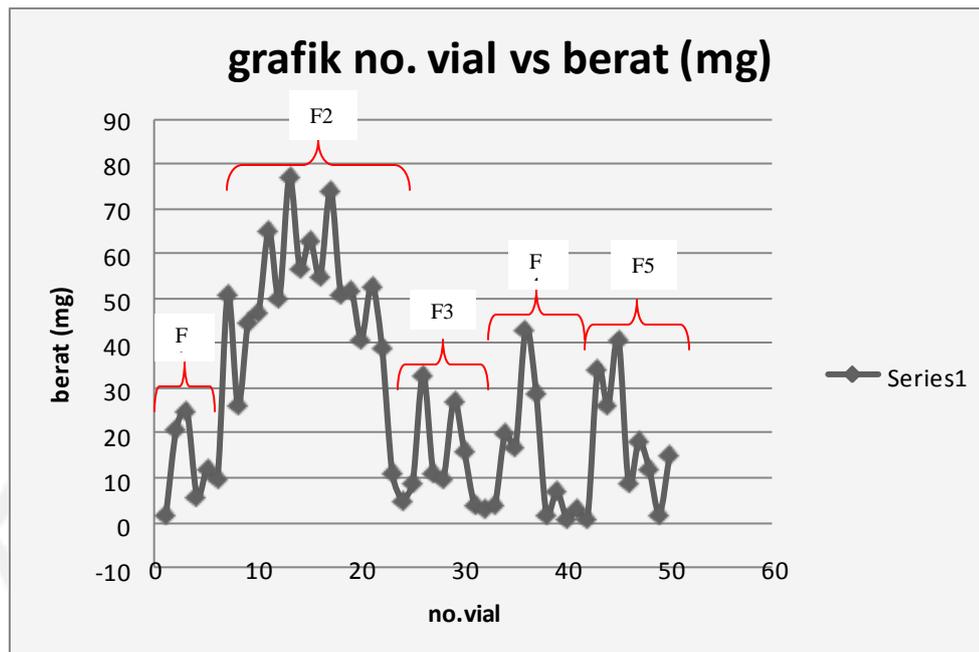
Tabel 2. Hasil Skrinning Fitokimia Partisi Ekstrak Etanol Biji Buah Merah

No	Kandungan kimia	Ekstrak etanol	Ekstrak <i>n</i> -heksan
1	Tanin katekin	+	-
2	a. Senyawa fenolik bebas	+	-
	b. antrakuinon	+	-
3	Asam lemak	-	+

Kromatografi filtrasi gel ini menggunakan Sephadex LH-20. Prinsip dari jenis kromatografi ini adalah ukuran molekul-molekul yang kecil akan memasuki pori-pori dari gel sedangkan molekul besar akan melewati sela-sela gel lebih cepat bila dibandingkan dengan molekul yang melewati pori-porinya. Jadi, urutan elusi mula-mula adalah molekul yang lebih besar, molekul sedang, dan terakhir molekul yang paling kecil. Metode pemisahan ini dipilih karena hasil skrinning fitokimia ekstrak etanol positif mengandung tanin, glikosida antrakuinon dan glikosida senyawa fenolik. Ketiga golongan senyawa tersebut memiliki keruahan geometrik dan berat molekul yang besar. Kromatografi kolom Sephadex ini sangat efektif untuk memisahkan golongan glikosida dan senyawa dengan berat molekul yang besar hasil isolasi (Kristanti *et al.*, 2008). Pegg *et al.*, (2008) mengisolasi fraksi tanin dan komponen fenolik dalam daun bearberry (*Arctostaphylos uva-ursi* L. Sprengel) dengan kromatografi kolom sephadex LH-20. *Condensed tannin* standar yang telah murni dalam *Castanea sativa* diperoleh dengan pemisahan kromatografi Sephadex LH-20 (Zirkovic, *et al.*, 2009).

Sebanyak 1,356 gr ekstrak etanol biji merah dipisahkan dengan kromatografi kolom Sephadex LH-20 dengan metanol 100%. Eluat ditampung dalam 50 vial setiap 4 mL. Eluat yang dihasilkan mula-mula berwarna orange, kemudian semakin memudar dan akhirnya bening pada vial ke-50. Hal ini

menandakan bahwa sampel dalam kolom Sephadex LH-20 telah habis terelusi oleh metanol. Eluat yang dihasilkan diuapkan dengan *rotary evaporator* untuk menghilangkan pelarutnya. Setelah pelarutnya hilang, sisa evaporasi pada vial 1-50 ditimbang untuk mengetahui berat hasil pemisahan tiap vialnya. Diagram no.vial vs berat dapat dilihat pada Gambar 6.

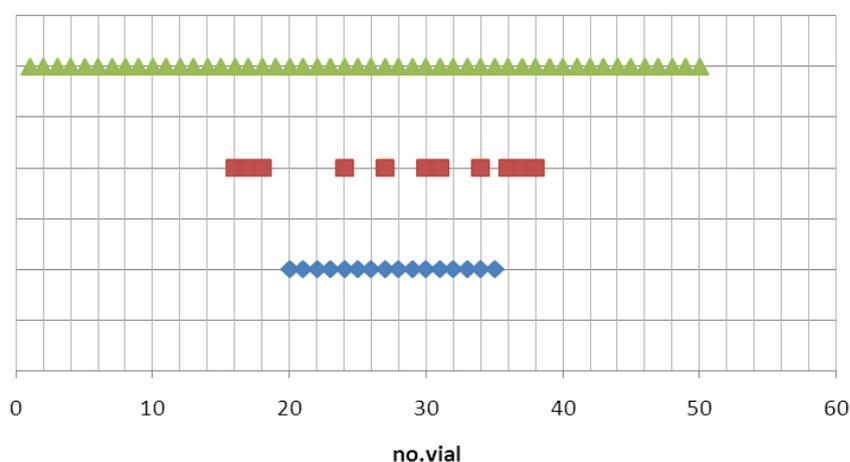


Gambar 6. Diagram no.vial vs berat hasil pemisahan kromatografi kolom Sephadex, menunjukkan setidaknya terdapat 5 fraksi dalam ekstrak etanol biji buah merah

Secara umum, hasil pemisahan kromatografi kolom sephadex LH-20 cukup baik karena jumlah ekstrak etanol yang dielusikan relatif sama dengan jumlah ekstrak etanol hasil elusi. Gambar 6 menunjukkan bahwa senyawa yang berberat molekul tinggi merupakan komponen senyawa yang mendominasi dalam ekstrak etanol biji buah merah. Hal ini disebabkan karena fraksi yang keluar lebih dahulu hasil pemisahan sephadex adalah senyawa-senyawa dengan berat molekul besar yang kemudian diikuti oleh senyawa berberat molekul lebih kecil (dalam hal ini senyawa pada no.vial awal (no. vial <20) memiliki berat yang jauh lebih besar bila dibandingkan senyawa pada no.vial akhir). Apabila Gambar 6 diibaratkan sebagai profil kromatogram, setidaknya ada 5 golongan senyawa yang diduga terdapat dalam ekstrak etanol biji buah merah. Vial 1-6 diduga sebagai fraksi 1

(F1), vial 7-23 diduga sebagai fraksi 2 (F2), vial 24-32 diduga sebagai fraksi 3 (F3), vial 33-40 diduga sebagai fraksi 5 (F4), dan vial 41-50 diduga sebagai fraksi 5 (F5).

Untuk membuktikan pendugaan sebelumnya, hasil pemisahan kromatografi kolom sephadex dilakukan skrinning fitokimia untuk senyawa-senyawa yang uji positif pada ekstrak etanol bebas lemak. Uji ini dilakukan untuk mengetahui apakah komponen senyawa dalam ekstrak etanol tersebut dapat terpisah baik atau tidak dengan kromatografi kolom sephadex. Hasil skrinning fitokimia ini dapat dilihat pada Gambar 7.



Keterangan : ◆ tanin katekin ■ antrakuinon ▲ Senyawa fenolik

Gambar 7. Diagram hasil skrinning fitokimia hasil pemisahan kromatografi kolom Sephadex

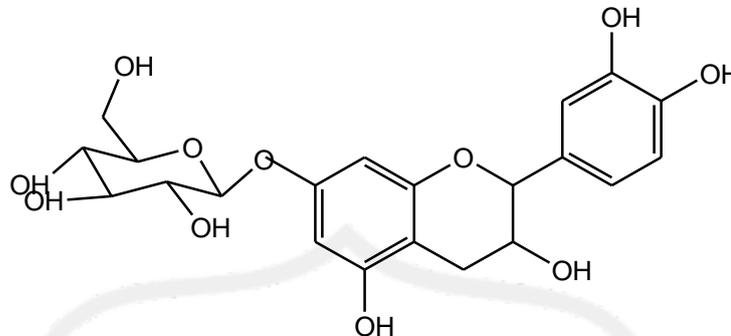
Hasil diatas menunjukkan bahwa tanin katekin, glikosida antrakuinon, dan glikosida senyawa fenolik telah berhasil dielusi dan dipisahkan dengan cara kromatografi filtrasi gel sephadex LH-20. Secara umum, glikosida senyawa fenolik merupakan senyawa yang mendominasi dalam ekstrak etanol biji buah merah. Hasil pemisahan sephadex ekstrak etanol biji buah merah dapat digolongkan berdasarkan senyawa yang keluar dari kolom menjadi beberapa fraksi utama. Komponen senyawa pada vial 1-15 merupakan glikosida senyawa fenolik (Fraksi 1). Senyawa pada vial 16-18 terdiri dari senyawa fenolik dan glikosida antrakuinon (Fraksi 2), vial 19-35 terdiri dari senyawa tanin dan

glikosida senyawa fenolik yang kadang pada vial tertentu juga mengandung glikosida antrakuinon (Fraksi 3). Setelah tanin keluar, glikosida antrakuinon keluar lagi bersama glikosida senyawa fenolik pada vial 36-38 (Fraksi 4). Setelah itu glikosida fenolik kembali keluar kolom dari vial 39 sampai pada vial ke-50 (Fraksi 5). Meskipun penggolongan fraksi berada pada vial yang berbeda, namun diperoleh kesimpulan yang sama, yakni hasil pemisahan sephadex menunjukkan bahwa setidaknya ada 5 fraksi/senyawa dalam ekstrak etanol biji buah merah.

Hasil pemisahan kromatografi kolom sephadex menunjukkan bahwa tanin keluar bukan di fraksi awal melainkan di fraksi tengah. Padahal prinsip pemisahan pada kromatografi kolom sephadex adalah senyawa dengan berat molekul besar akan keluar lebih dulu sedangkan senyawa dengan berat molekul yang lebih kecil akan terjebak ke dalam pori sephadex dahulu. Kasus ini seperti pemisahan senyawa dalam bahan alam yang dilakukan oleh Amarowicz *et al.*, (2009) dengan kromatografi Sephadex LH-20. Hasil penelitiannya menunjukkan bahwa fraksi 1 merupakan molekul gula yang mengikat senyawa fenolik dengan berat molekul kecil dan fraksi 2 merupakan tanin. Senyawa dalam vial 1 sampai vial 18 ekstrak etanol bijibuah merah diduga merupakan glikosida fenolik yang terdiri dari gula dan senyawa fenolik berberat molekul kecil pula. Penelitian tersebut tidak dapat memberi penjelasan fenomena penyebab mengapa fraksi tanin keluar di tengah.

Pendugaan lain yang menyebabkan tanin muncul pada fraksi tengah adalah tanin yang dielus berupa monomer bukan polimer seperti yang diduga sebelumnya. Tanin yang terdapat dalam ekstrak etanol ini berupa katekin sederhana yang hanya berupa monomer, akan tetapi monomer katekin ini sulit ditemukan di alam (Robinson, 1993). Tanin katekin merupakan *condensed tannin* yang apabila terhidrolisis tidak menghasilkan senyawa dengan bobot molekul rendah, tetapi hanya menghasilkan suatu zat amorf dan tak larut (Koensoemardiyah, 1992). Identifikasi yang dilakukan oleh Plazonic *et al.*, 2009 menunjukkan bahwa tanin yang teridentifikasi terikat dengan suatu molekul gula membentuk suatu glikosida yang strukturnya dapat dilihat pada gambar 8. Hasil ini berdasarkan fragmentasi yang diperoleh dari data HPLC-ESI-MS. Sehingga tanin dalam ekstrak etanol biji buah merah diduga kuat bergabung dengan

glikosida senyawa fenolik membentuk molekul glikosida dengan berat molekul yang lebih besar.



Gambar 8. Struktur glikosida tanin katekin

3. High Performance Liquid Chromatography (HPLC)

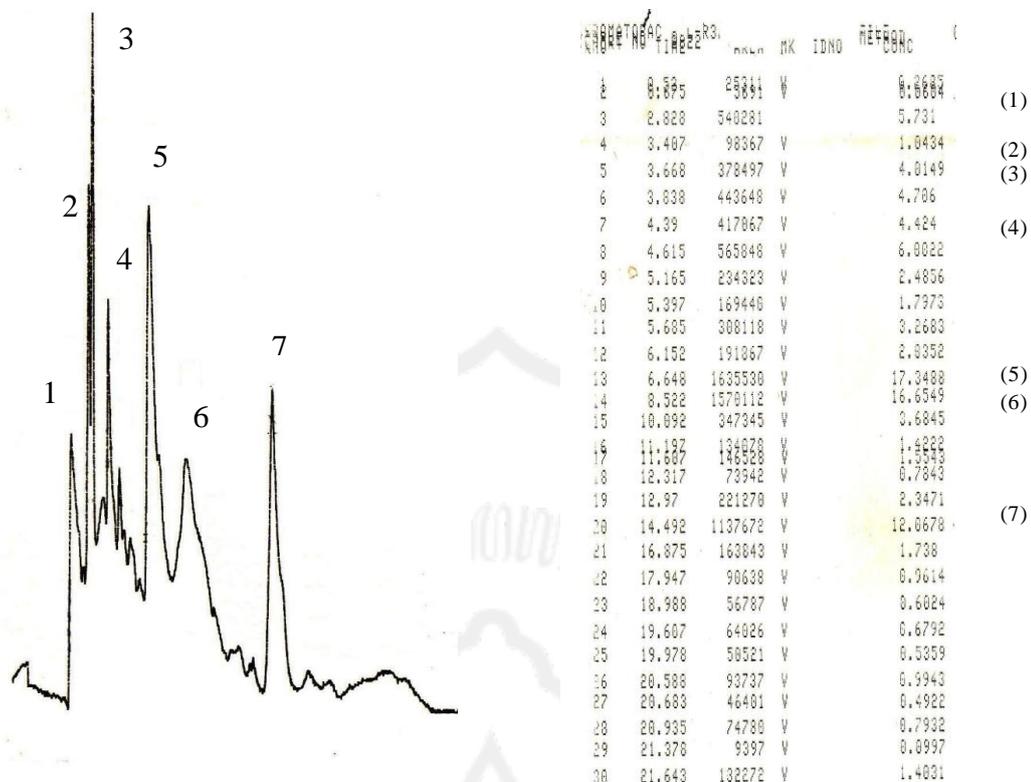
Metode ini dipilih karena hasil skrining fitokimia menunjukkan bahwa kandungan senyawa ekstrak etanol biji buah merah sebagian besar merupakan senyawa non volatil. Tanin katekin tidak memiliki titik didih karena biasanya tanin jenis ini berupa suatu polimer dan berbobot molekul yang cukup tinggi. Selain itu, kebanyakan glikosida, baik glikosida antrakuinon maupun glikosida senyawa fenolik memiliki titik didih yang cukup tinggi pula. Aglikon antrakuinon dikenal sebagai suatu golongan senyawa yang bertitik didih tinggi. *SIDS Initial Assessment Report* (1996) melaporkan bahwa 1-Aminoanthraquinone memiliki titik didih di atas 300 °C. Senyawa fenolik merupakan senyawa yang cakupannya cukup luas, sehingga sulit diprediksi titik didihnya. Oleh karena itu dipilih HPLC sebagai salah satu alternatif metode pemisahan komponen senyawa dalam ekstrak etanol biji buah merah.

HPLC adalah suatu metode deteksi dan kuantifikasi yang sensitifitasnya sangat tinggi untuk berbagai senyawa kimia dalam suatu sampel partikular menggunakan absorbansi UV-Vis (Hanachi, 2009). HPLC dengan fase normal kurang umum dibanding dengan fase terbalik (Rohman, 2007). Yang dimaksud Fase terbalik adalah fase diamnya lebih non polar dibanding fase gerak. Li *et al.*, (2009) berhasil mengisolasi dan mengidentifikasi Rubiacordone A, suatu jenis glikosida antrakuinon baru dari akar *Rubia cordifolia* menggunakan HPLC fase terbalik dengan sistem elusi isokratik pada panjang gelombang 280 nm. Zhang

and Lin (2008) menganalisis *condensed tannin* dari *L. glaber* menggunakan HPLC pada panjang gelombang yang sama.

Sebanyak 25 μ L sampel cair ekstrak etanol yang telah bebas asam lemak diinjeksikan ke dalam HPLC untuk dianalisis. Fase diam yang digunakan adalah C₁₈. Fase gerak yang sering digunakan untuk pemisahan dengan fase terbalik adalah campuran larutan buffer-metanol atau campuran air-asetonitril (Rohman, 2007). Dalam penelitian ini digunakan sistem pelarut asetonitril dan 0,4% H₃PO₄ dalam aquabides (10:90) (v/v). Sampel dielusi pada panjang gelombang 280 nm. Tanin dan antrakuinon dapat dideteksi pada panjang gelombang tersebut. Senyawa fenolik dapat dideteksi pada range panjang gelombang 270-290 nm (Tsimogiannis *et al.*, 2007) sehingga senyawa fenolik bebas juga dapat terdeteksi pada panjang gelombang 280 nm. Semua golongan metabolit sekunder kecuali antosianin dapat terdeteksi pada panjang gelombang 280 nm (Harris *et al.*, 2007). Oleh karena itulah, ekstrak etanol dielusikan pada panjang gelombang 280 nm. Pada panjang gelombang tersebut, senyawa-senyawa yang diduga dalam ekstrak etanol dapat terdeteksi.

Kromatogram HPLC ekstrak etanol biji buah merah pada Gambar 9, menunjukkan adanya 7 puncak utama yang terpisah dengan baik. Akan tetapi puncak I yang terdeteksi diduga merupakan serapan senyawa dari pelarutnya (etanol 96%) karena waktu retensinya (Tr) sama dengan waktu retensi hasil penginjeksian etanol 96% (waktu retensi puncak mayor 2 dan 3 ekstrak etanol = 3.668 dan 3.838 dan waktu retensi puncak 1 dan 2 etanol 96% = 3.51 dan 3.817). Kromatogram HPLC etanol 96% dapat dilihat pada Lampiran 2. Pelarut etanol dapat memberikan serapan karena pelarut yang digunakan bukan pelarut murni, dalam hal ini etanol 96%. Sehingga, serapan tersebut diduga merupakan serapan dari senyawa pengotor atau komponen senyawa (4%) yang terkandung dalam etanol. Sehingga, setidaknya ada 5 senyawa dalam ekstrak etanol biji buah merah dengan tingkat kemurnian 17, 35 % pada puncak 5 yang terdeteksi setelah dilakukan pemisahan komponen polar ekstrak etanol biji buah merah menggunakan HPLC.



Gambar 9. Kromatogram HPLC ekstrak etanol biji buah merah, menunjukkan adanya 7 puncak utama yang terdiri dari 2 puncak serapan dari pelarut dan 5 puncak serapan dari senyawa dalam ekstrak etanol.

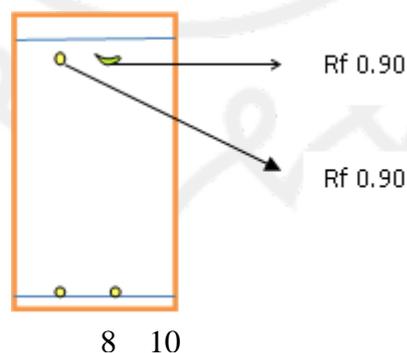
D. Analisis Golongan Senyawa Ekstrak Etanol Biji buah Merah

Profil KLT hanya dapat mendeteksi atau membuktikan bahwa komponen senyawa ekstrak etanol biji buah merah dapat memisah atau tidak. Data ini menjadi acuan untuk metode pemisahan menggunakan kromatografi kolom *flash*.

Pola pemisahan dengan eluen *n*-heksana-etil asetat 1:3 (Gambar 4) menunjukkan bahwa setidaknya terdapat 3 senyawa yang teridentifikasi dalam ekstrak etanol biji buah merah dengan KLT sistem eluen ini. Jumlah senyawa yang terdeteksi dengan KLT berbeda dan jauh lebih sedikit dengan jumlah senyawa yang teridentifikasi dengan skrining fitokimia. Apabila mengacu dengan skrining fitokimia, jumlah minimal spot yang ada saat dilakukan KLT adalah 4 spot. 3 Spot yang dihasilkan dalam Gambar 4 (terdiri dari 2 spot yang dapat naik atau terelusi oleh sistem eluen dan 1 spot yang tidak dapat naik) diduga disebabkan karena sebagian besar senyawa yang terkandung dalam ekstrak etanol

biji buah merah merupakan senyawa yang sangat polar yang dapat saling melakukan interaksi (ikatan hidrogen misalnya, karena kebanyakan senyawa polar memiliki gugus hidroksil) dan atau terikat dengan fase diamnya (silika gel) sehingga pemisahan sulit terjadi. Hal ini ditunjukkan oleh masih adanya 1 spot tebal pada titik awal penotolan (tidak dapat naik/tidak terelusi) yang mengindikasikan masih adanya senyawa yang belum terpisah pada titik tersebut dengan pelarut etil asetat: *n*-heksan (3:1). Oleh karena itu senyawa yang berhasil dipisahkan dengan KLT jauh lebih sedikit dibandingkan saat dilakukan skrining fitokimia awal.

Analisis hasil pemisahan kromatografi kolom *flash* dilakukan dengan uji KLT setelah kolom yang diperoleh dan datanya diperkuat dengan skrining fitokimia, baik dengan uji tabung maupun uji penegasan KLT. Hasil pemisahan pada 8 dan 10 memiliki R_f 0,90 berwarna orange pada sinar biasa dan kuning kehijauan di bawah lampu UV 365 nm (Gambar 10). Setelah dicocokkan dengan profil KLT ekstrak etanol pra kolom (Gambar 4), warna spotnya sama sedangkan harga R_f yang dihasilkan hampir sama dengan spot 1 pada profil KLT pra kolom. Harga R_f pada spot 1 pra kolom adalah 0,87 dan warna *spot*nya adalah orange. Sehingga senyawa pada vial 8 dan 10 dapat terjadi pemisahan karena spot 1 KLT pra kolom dapat muncul pada profil KLT vial 8 dan 10 dengan sistem eluen yang sama.



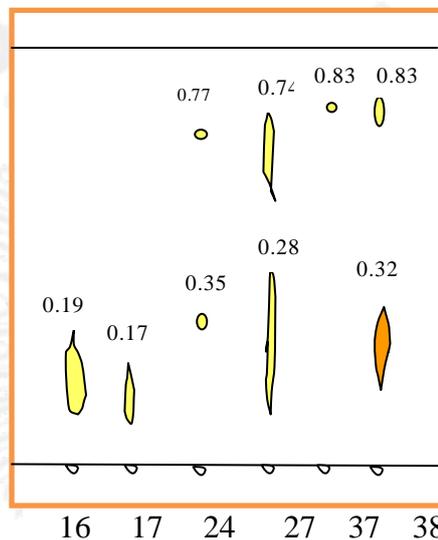
Gambar 10. Profil KLT senyawa pada vial no. 8 dan 10 hasil pemisahan kromatografi kolom *flash* (gambar asli pada Lampiran 3), R_f spot KLT yang dihasilkan serupa dengan spot 1 KLT pra kolom.

Sedangkan, hasil pemisahan pada vial diluar no 8 dan 10 menghasilkan Rf yang mendekati 1. Hal ini diduga dapat terjadi karena senyawa satu dan senyawa lain saling berinteraksi di dalam kolom, sehingga memperlambat proses elusi. Hasil ini menunjukkan bahwa kromatografi kolom *flash* belum mampu memisahkan komponen senyawa yang terkandung dalam ekstrak etanol dengan baik meskipun ada sebagian senyawa yang terpisah pada vial 8 dan 10.

Hasil pemisahan pada vial 8 dan 10 dilakukan skrining fitokimia menggunakan uji penegasan KLT menggunakan sistem pelarut etil asetat:metanol:air (100:13,5:10). Sistem eluen ini spesifik untuk golongan senyawa fenolik, antrakuinon, dan tanin. Spot yang dihasilkan berwarna kuning kehijauan di bawah sinar lampu UV 365 nm. Warna spot kuning kehijauan menunjukkan bahwa senyawa pada vial 8 dan 10 ekstrak etanol biji buah merah mengandung aglikon antrakuinon yang telah tereduksi menjadi antron. Antron merupakan bentuk antrakuinon tereduksi (Gambar 13). Oleh karena itu dapat disimpulkan bahwa senyawa yang dapat terelusi dan terdeteksi pada spot 1 KLT pra kolom adalah glikosida dengan aglikon antron sedangkan spot 2 KLT pra kolom adalah senyawa yang lebih polar, dalam hal ini adalah glikosida dengan aglikon senyawa fenolik atau tanin.

Analisis hasil kromatografi kolom Sephadex menunjukkan bahwa semua golongan yang terdeteksi dalam skrining fitokimia dapat dipisahkan dengan metode ini dan setidaknya ada 5 senyawa dalam ekstrak etanol biji buah merah. Senyawa fenolik mendominasi ekstrak etanol biji buah merah. Senyawa pada vial 1 sampai 50 positif mengandung senyawa fenolik. Tanin berada di fraksi tengah sedangkan antrakuinon berada disekitar dan atau pada daerah tanin. Robinson (1993) menyatakan bahwa kebanyakan antrakuinon terdapat pada ekstrak tanin tumbuhan telah terbukti pada ekstrak etanol biji buah merah. Glikosida antrakuinon yang terkandung dalam ekstrak etanol digolongkan pada 3 fraksi yang berbeda. Ini menunjukkan bahwa glikosida antrakuinon ini memiliki jenis yang berbeda-beda. Meskipun demikian ketiga fraksi glikosida antrakuinon ini sama-sama mengikat gugus fenolik.

Untuk menunjukkan bahwa aglikon antrakuinon dalam ekstrak etanol berjenis sama atau tidak, fraksi yang mengandung glikosida antrakuinon dilakukan skrining lagi dengan uji penegasan KLT menggunakan sistem eluen etil asetat : metanol : air (100:13,5:10) menggunakan pereaksi tampak KOH 10% pada fraksi no 16, 17, 24, 27, 37, 38. Fraksi-fraksi ini dipilih secara acak untuk membuktikan apakah antrakuinon yang keluar di awal, tengah, maupun di paling akhir keluarnya merupakan jenis antrakuinon yang sama atau tidak seperti yang diduga sebelumnya. Hasil uji penegasan KLT golongan antrakuinon dapat dilihat pada Gambar 11.



Gambar 11. Uji Antrakuinon vial 16, 17, 24, 27, 37, 38 Hasil Pemisahan Kromatografi Kolom Sephadex (gambar asli pada Lampiran 3), memiliki spot-spot dengan Rf yang berbeda. Rf yang berbeda mengindikasikan jenis antrakuinon yang berbeda-beda pula.

Gambar 11 menunjukkan bahwa vial 16 dan 17 memiliki antrakuinon identik karena nilai Rfnya hampir sama (masing-masing 0.19 dan 0.17). Vial 24 dan 27 memiliki 1 jenis antrakuinon yang berbeda karena nilai Rf₁nya 0.74-0.77 meskipun nilai Rf₂nya relatif sama dengan spot 16 dan 17. Vial 38 memiliki 2 spot sehingga diduga pada vial 38 mengandung 2 jenis antrakuinon. Spot 2 vial 38 memiliki Rf yang berbeda dengan yang lain sedangkan spot 2 identik dengan dengan spot yang dimiliki oleh vial 37 karena memiliki Rf yang sama. Antrakuinon pada vial 37 dan 38 ini juga berbeda dengan jenis antrakuinon

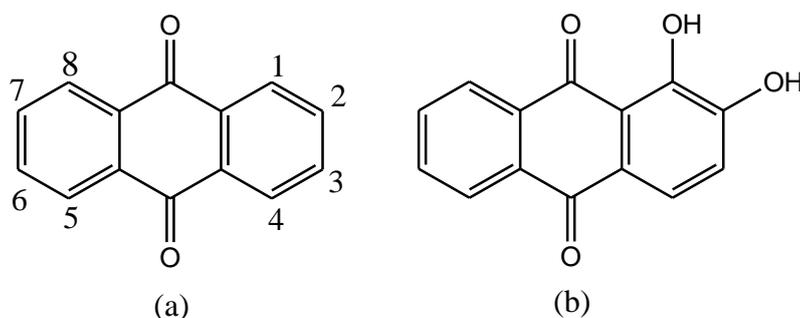
sebelumnya karena Rf yang dihasilkan berbeda sehingga ekstrak etanol biji buah merah setidaknya memiliki 3 jenis antrakuinon yang berbeda. Meskipun demikian, warna spot uji penegasan KLT untuk antrakuinon ini adalah relatif sama, yaitu kuning kehijauan. Warna ini adalah menunjukkan bahwa aglikon antrakuinon dalam ekstrak etanol biji buah merah adalah jenis antron. Apabila hasil ini dibandingkan dengan hasil identifikasi senyawa hasil pemisahan kromatografi kolom *flash*, hasil identifikasinya adalah sama karena senyawa yang teridentifikasi adalah antron (Gambar 13). Apabila hasil uji penegasan KLT dan uji tabung skrinning fitokimia digabung, antron dalam ekstrak etanol biji buah merah ini mempunyai gugus hidroksil fenolik, itu artinya antron mengikat gugus hidroksil tenolik.

HPLC adalah salah satu metode yang dapat digunakan untuk analisis senyawa dengan cara membandingkan dengan data standar golongan senyawa yang diduga terkandung di dalam sampel dengan syarat kondisi pemisahan yang dilakukan sama dengan kondisi pemisahan data standar. HPLC yang dilakukan untuk ekstrak etanol biji buah merah menggunakan sistem elusi isokratik. Sedangkan, data standar menggunakan sistem elusi gradien. Selain itu waktu analisis yang dilakukan untuk data standar minimal 1 jam sedangkan waktu analisis yang dilakukan untuk ekstrak etanol biji buah merah ini hanya 25 menit. Karena syarat yang harus dipenuhi untuk analisis senyawa dengan membandingkan data standar tidak terpenuhi sehingga senyawa apa saja yang terdeteksi dalam HPLC tidak dapat dilakukan.

Kromatogram HPLC menunjukkan setidaknya ada 5 senyawa dalam ekstrak etanol biji buah merah. Hasil analisis senyawa yang terdeteksi setelah dilakukan pemisahan HPLC sama dengan analisis data pemisahan kromatografi sephadex, yaitu setidaknya ada 5 senyawa yang berhasil dipisahkan dengan kedua metode tersebut. Prinsip HPLC bertolak belakang dengan kromatografi kolom *flash* (Kromatografi kolom *flash* menggunakan fase normal sedangkan HPLC menggunakan fase terbalik) sehingga senyawa keluar terakhir kali saat *flash* akan menjadi senyawa yang keluar pertama kali saat HPLC. Panjang gelombang 280 nm merupakan panjang gelombang untuk tanin, antrakuinon, dan senyawa fenolik

sehingga ketiga senyawa ini dapat dipisahkan dengan HPLC. Tanin merupakan senyawa yang tidak dapat terelusi keluar dari kolom *flash* sehingga diduga senyawa ini keluar terlebih dahulu dibandingkan glikosida antrakuinon, karena glikosida antrakuinon dapat terdeteksi lagi setelah dilakukan pemisahan kromatografi kolom *flash*. Apabila profil kromatogram HPLC (Gambar 9) dan diagram no. vial vs berat hasil pemisahan sephadex (Gambar 6) dibandingkan, profil/kurva keduanya memiliki pola yang hampir sama. Oleh karena itu, senyawa yang teridentifikasi setelah dilakukan kromatografi kolom sephadex dapat dianalogikan dengan senyawa yang dapat dipisahkan dengan HPLC. Puncak 1 merupakan puncak dari glikosida senyawa fenolik, puncak 4 merupakan puncak glikosida antrakuinon fenolik, puncak 5 merupakan puncak dari tanin, puncak 6 merupakan puncak dari glikosida antrakuinon fenolik yang lebih non polar, dan puncak 7 adalah puncak glikosida senyawa fenolik yang lebih non polar (puncak 2 dan 3 adalah terdeteksi puncak dari senyawa yang terkandung dalam etanol 96%).

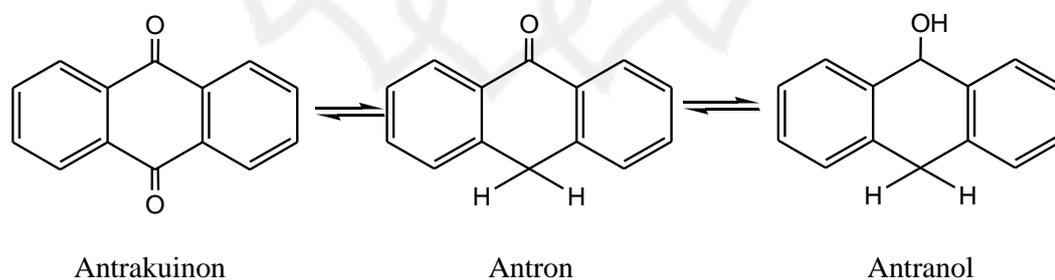
Bila hasil pemisahan dari metode pemisahan yang dilakukan (Kromatografi kolom *flash*, kromatografi kolom Sephadex, dan HPLC) saling dihubungkan diperoleh kesimpulan yang sama, yaitu setidaknya ada 5 senyawa yang terdapat dalam ekstrak etanol biji buah merah. Selain itu, antrakuinon dalam ekstrak etanol tersebut dapat dipisahkan dengan ketiga metode tersebut dan jenis antrakuinon dalam ekstrak etanol tersebut beraneka macam. Kesimpulan ini diperkuat dengan hasil uji penegasan KLT golongan antrakuinon fraksi yang dihasilkan dari kromatografi kolom *flash* dan Sephadex. Data HPLC juga dapat digunakan sebagai data pendukung keanekaragaman antrakuinon dalam ekstrak etanol biji buah merah.



Gambar 12. Struktur (a) Antrakuinon (b) Alizarin (Robinson, 1993)

Kebanyakan antrakuinon dari tumbuhan tinggi dihidroksilasi pada C-1 (Gambar 12a), meskipun antrakuinon sendiri dilaporkan terdapat dalam berbagai ekstrak tanin tumbuhan. Hasil pemisahan Sephadex ekstrak etanol biji buah merah juga menunjukkan bahwa antrakuinon kebanyakan ditemukan bergabung dengan golongan tanin. Antrakuinon terhidroksilasi jarang terdapat dalam tumbuhan secara bebas, tetapi sebagai glikosida. Semua antrakuinon berupa senyawa kristal bertitik leleh tinggi, larut dalam pelarut organik biasa, senyawa ini biasanya berwarna merah, sisanya berwarna kuning sampai coklat.

Banyak antrakuinon yang terdapat sebagai glikosida dengan bagian gula terikat dengan salah satu gugus hidroksil fenolik, contohnya alizarin dari *Rubia tinctorium* (Robinson, 1993). Alizarin mempunyai kerangka dasar antrakuinon yang mengikat 2 gugus hidroksil (Gambar 12b). Data ini sesuai dengan hasil skrining fitokimia pada ekstrak etanol biji buah merah dimana antrakuinon yang terdapat dalam biji buah merah berupa glikosida, kebanyakan berada pada daerah/fraksi yang positif mengandung tanin, dan semua mengandung gugus fenol bebas (hidroksil fenol). Fakta lain adalah dalam banyak kasus, tampaknya aglikon glikosida asli berbentuk antrakuinon tereduksi yang dikenal sebagai antron (Robinson, 1993). Hal ini juga sesuai dengan skrining fitokimia terhadap antrakuinon dengan uji penegasan KLT (Gambar 11), spotnya berwarna kuning kehijauan yang menunjukkan bahwa antrakuinon yang terdeteksi telah tereduksi menjadi antron. Apabila proses reduksi ini berlanjut antron tereduksi menjadi antranol. Oksidasi antrakuinon ini ditunjukkan pada Gambar 13.



Gambar 13. Oksidasi antrakuinon (Robinson, 1993)

Berdasarkan uji skrining fitokimia fraksi-fraksi yang diperoleh dari kromatografi kolom Sephadex, dilakukan analisis kuantitatif senyawa yang

berhasil dipisahkan. Jumlah tanin dalam 1,356 gr ekstrak etanol biji buah merah adalah $\pm 303\text{mg}$ (22,345%), antrakuinon adalah $\pm 254\text{mg}$ (18,732%), sedangkan jumlah glikosida fenol bebas adalah $\pm 778\text{mg}$ (57,375%). Perhitungan kadar masing-masing senyawa dalam ekstrak etanol biji buah merah dapat dilihat pada Lampiran 3. Apabila dalam satu vial terdiri dari 2 senyawa atau lebih, fraksi tersebut dihitung sebagai satu senyawa saja yang memiliki berat/ukuran molekul yang lebih besar. Ukuran molekul tanin lebih besar dibanding glikosida antrakuinon, namun ukuran molekul glikosida antrakuinon lebih besar dibanding glikosida senyawa fenolik. Sebagai contoh, satu vial mengandung tanin, glikosida antrakuinon, dan glikosida senyawa fenolik sehingga dalam perhitungannya hanya dihitung sebagai tanin karena ukuran molekulnya lebih besar dibandingkan senyawa yang lain. Perhitungan ini tidak bersifat spesifik karena dalam satu fraksi ada yang mengandung lebih dari 1 senyawa sehingga perhitungan secara pasti sulit dilakukan dan hanya berupa nilai pendekatan saja.

Ekstrak etanol biji buah merah mengandung tanin, glikosida antrakuinon, dan glikosida senyawa fenolik bebas. Antrakuinon, tanin, dan senyawa fenolik bebas baik yang berupa glikosida maupun sebagai senyawa bebas sudah banyak digunakan dalam ilmu kesehatan. Antrakuinon dikenal sebagai senyawa aktif dalam obat pencahar. Beberapa jenis tanin terbukti mempunyai aktivitas antioksidan dan menghambat pertumbuhan tumor, (Robinson, 1993). Bahkan, uji aktivitas antioksidan tanin lebih besar dari antioksidan standar, BHT (Thitilertdech *et al.*, 2010). Senyawa fenolik bebas kebanyakan bergabung dalam antrakuinon dan tanin, sehingga diduga bahwa senyawa fenolik bebas juga memiliki aktivitas antioksidan. Menurut Mitic *et al.*, 2010), semua jenis senyawa fenolik memiliki aktivitas antioksidan namun dengan tingkatan yang berbeda-beda. Oleh karena itu, biji buah merah juga memiliki potensi yang besar untuk dikembangkan sebagai obat.

BAB V

KESIMPULAN DAN SARAN

A. Kesimpulan

Dari hasil penelitian dengan pembahasan sebelumnya dapat diambil kesimpulan bahwa :

1. Hasil skrining fitokimia ekstrak etanol menunjukkan bahwa biji buah merah mengandung glikosida senyawa fenolik ($\pm 57,375\%$), tanin katekin ($\pm 22,345\%$), glikosida antrakuinon ($\pm 18,732\%$) dan glikosida asam lemak.
2. Kromatografi kolom Sephadex merupakan metode pemisahan yang tepat untuk memisahkan komponen polar ekstrak etanol biji buah merah.
3. Setidaknya ada 5 senyawa dalam ekstrak etanol biji buah merah yang berhasil dipisahkan dengan metode pemisahan yang digunakan (kromatografi kolom *flash*, kromatografi kolom sephadex, dan HPLC). Aglikon antrakuinon yang teridentifikasi dalam bentuk antron (bentuk antrakuinon tereduksi) yang mengikat gugus hidroksil fenolik.

B. Saran

Berdasarkan kesimpulan di atas maka perlu dilakukan penelitian lebih lanjut mengenai :

1. Pemisahan lebih lanjut komponen polar biji buah merah sampai identifikasi senyawa murninya.
2. Uji toksisitas dan uji aktivitas antioksidan ekstrak etanol biji buah merah untuk mengetahui potensi biji buah merah dalam bidang farmasi dan kesehatan.

DAFTAR PUSTAKA

- Amarowicz, R., I. Estella, T. Hernandez, Duenas, A. Troszynska, A. Kosinska, and R.B. Pegg. 2009. *Antioxidant Activity of a Red Lentil Extract and Its Fractions*. International Journal of Molecular Science. Vol. 10. Hal. 5513-5527
- Atanassova, M., and C.V. Bagdassarian. 2009. *Determination of Tannins Content by Titrimetric Method for Comparison of Different Plant Species*. Journal of The University of Chemical Technology and Metallurgy. Vol. 44. Hal. 413-415
- Barry, K.M., N.W. Davies, and C.L. Mohammed. 2001. *Identification of Hidrolysable Tannins in the Reaction Zone of Eucalyptus nitens Wood by High Performance Liquid Chromatography-Electrospray Ionisation Mass Spectrometry*. Phytochemical Analysis Journal. Vol. 12. Hal. 120-127.
- Budi, I Made. 2001. *Kajian Kandungan Zat Gizi dan Sifat Fisiko Kimia Berbagai Jenis Minyak Buah Merah (Pandanus conoideus Lamk) Hasil Ekstraksi secara Tradisional di Kab. Jayawijaya Irian Jaya*. Tesis. Institut Pertanian Bogor.
- Budi, I.M., dan F.R. Paimin. 2005. *BuahMerah*. PenebarSwadaya, Jakarta.
- Day, R.A. and A.L. Underwood. 2002. *Quantitative Analysis*. Sixth Edition. Prentice-Hall. New York.
- Du, Z.Z., X.W. Yang, H. Han, X.H. Cai, and X.D. Luo. 2010. *A New Flavon C Glycoside from Clematis rehderiana*. Molecules. Vol. 15. Hal. 672-679.
- Emmam, S.S and H.I.A. El-Moaty. 2009. *Glucosinolates, Phenolic Acids and Anthraquinones of Liatis microcarpu Boiss and Pseuderucaria Clavate (Boiss and Reut). Family : Crucyferae*. Journal of Applied Sciences Research. Vol. 5. Hal. 2315-2322.
- Farnsworth, N.R., 1966, *Biological and Phytochemical Screening of Plants*, J. Pharm. Sci., Vol 55, 3, Hal. 225-276.
- Farida, W.R., Praptiwi, dan W.Semiadi. 2000. *Tanin dan Pengaruhnya pada Ternak. Jurnal Peternakan dan Lingkungan*. Vol. 6. Hal. 66-71
- Hanachi, P. 2009. *Using HPLC to Determination the Composition and Antioxidant Activity of Berberis vulgaris*. European Journal of Scientific Research. Vol. 29. Hal. 47-54

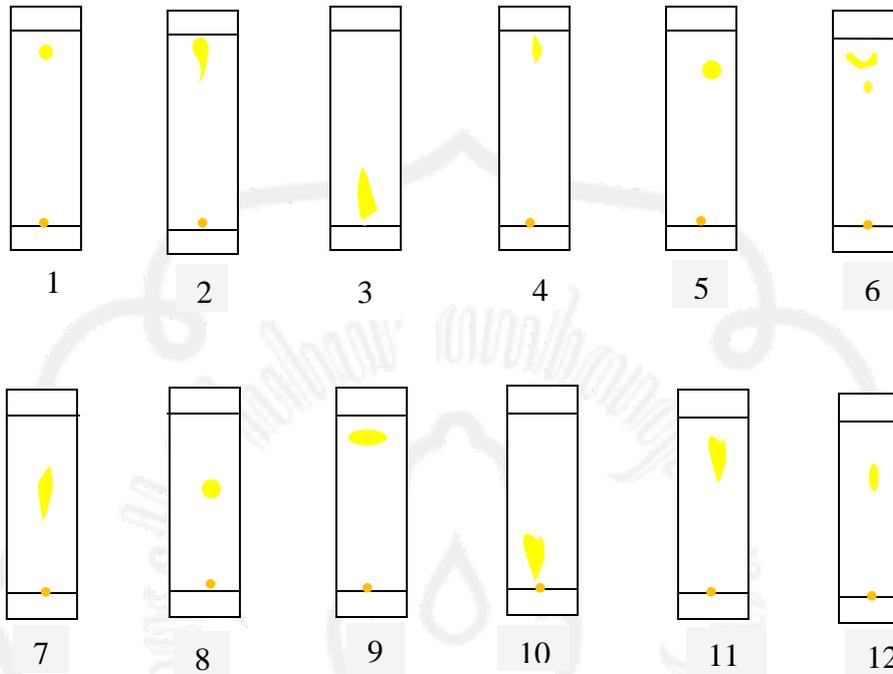
- Hargono, D., 1997, *Obat tradisional dalam Zaman Teknologi*, Majalah Kesehatan Masyarakat No. 56, Hal: 3-5.
- Harris C.S ., A.J. Burt, A. Saleem, P.M. Lee, L.C.Martineau, P.S.Haddad, S.A.L. Bennett, and J.T.Arnason. 2007. *A Single HPLC-PAD-APCI/MS Method for the Quantitative Comparison of Phenolic Compounds Found in Leaf, Stem, Root, and Fruit Extract of Vaccinium angusti-folium*. Phytochemical Analysis Journal. Vol. 18. Hal. 161-169.
- Hernes, P.J and Hedges, J.I. 2004. *Tannin Signatures of Bark, Needles, Leaves, Cones, and Wood at the Molecular Level*.Geochimica Acta. Vol. 68. Hal. 1293-1307.
- Hostettman, K., M. Hostettman, A. Marston. 1986. *Preparative Chromatography Techniques*. Springer-Verlag Berlin Heidelberg. Inggris.
- Kennedy, J., J. Ferrier, J. Harbertson, and C.P. Gachons. 2006. *Analysis of Tannins in Red Wine Using Multiple Methods: Correlation with Perceived Astringency*. American Journal of Enology. Vol. 4. Hal. 481-485.
- Koensomardiyah. 1992. *Biosintesis Produk Alami*. IKIP Semarang Press. Terjemahan ; *Biosynthesis of Natural Products* , Manito, P., 1985. John wiley and sons. Inggris.
- Kristanti, A.N., N.S. Aminah, M. Tanjung, dan B. Kurniadi. 2008. *Fitokimia*. Airlangga University Press. Surabaya.
- Li, X., Z. Liu., Y. Chen, L.J. Wang, Z.N. Zheng, G.Z. Sun, and C.C. Ruan. 2009. *Rubiaccordone A : A New Anthraquinone Glycoside from The Rubia cordifolia*. Molecules. Vol. 14. Hal. 2986-2997.
- Majors, E. Ronald. 2003. *The Cleaning and regenerations of Reversed Phase HPLC Columns*. Column Watch. Journal of LC-GC Europe. Hal 1-6
- Marliyana, S.D., F.R. Wibowo, N. Handayani, dan R. Rahmawati. 2010. *Penentuan Kandungan Kimia dan Uji Toksisitas Ekstrak Etanol Buah Merah (Pandanus conoideus Lamk.)*. Penelitian DP2M Hibah bersaing 2009 LPPM UNS.
- Moeljopawiro, S., M.R. Anggelia, D. Ayuningtyas, B. Widaryanti, Y. Sari, dan I.M. Budi. 2007. *Pengaruh Sari Buah Merah (Pandanus conoideus Lamk.) terhadap Pertumbuhan Sel Kanker Payudara dan Sel Kanker Usus Besar*. Jurnal Berkala Ilmiah Biologi Vol 2. Hal. 121-130.

- Mitic, M.N., M.V. Obradović, Z.B. Grahovac and A.N. Pavlović. 2010. *Antioxidant Capacities and Phenolic Levels of Different Varieties of Serbian White Wines*. *Molecules*. Vol. 15. Hal. 2016-2027.
- Mu'nim, A., R. Andrajati, dan H. Susilowati. 2006. *Uji Hambatan Tumorigenesis Sari Buah Merah (Pandanus Conoideus Lamk.) Terhadap Tikus Putih Betina yang diinduksi 7, 12 dimetilbenz (a) dan antrasen (DMBA)*. *Majalah Ilmu Kefarmasian*. Vol. 3. Hal. 153-161.
- Murhadi, T.S. Soewarno, B.S.L. Jennie, A. Apriyantono, S. Yasni. 2004. *Karakteristik Spektroskopi Isolat Antibakteri Biji Atung (Parinarium glaberrimum Hassk)*. *Jurnal Teknologi dan Industri Pangan*. Vol. 15. Hal. 1-10
- Neacsu, M., V. Micol, L.P. Fons, S. Willfor, B. Holmbom, and Mallavia. 2007. *A Novel Antioxidant Phenyl Disaccharide from Populus Tremula Knotwood*. *Molecules*. Vol.12. hal. 205-217.
- Noerono, Soendani. 1994. *Buku Pelajaran Teknologi Farmasi*. UGM Press. Jogjakarta.
- Padmawinata, K. dan I. Soediro. 1985. *Analisis Obat secara Kromatografi dan Mikroskopi*. Penerbit ITB. Bandung. Terjemahan : *Drugs Analisis by Chromatography and Microscopy*, Stahl, E., Michigan.
- Padmawinata, K. 1991. *Pengantar Kromatografi*. Edisi Ke dua, ITB Press, Bandung. Terjemahan: *Introduction to Chromatography*, Gritter, R.J.: J. M. Bobbit; A. E Schwarting, 1985, Holden Day Inc., USA.
- Padmawinata, K. dan I. Soediro., 1996. *Metode Fitokimia: Penuntun Cara Modern Menganalisis Tumbuhan*, Cetakan kedua, Penerbit ITB, Bandung. Terjemahan: *Phytochemical Methods*, Harborne, J.B., 1984, Chapman and Hall Ltd., London.
- Pegg, R.B., A Rybarczyk, R Amarowicz. 2008. *Chromatographic Separation of Tannin Fraction from A. Bearberry Leaf (Arctostaphylos uva-ursi. L. sprengel) Extract by SE-HPLC. A short Report*. *Polish Journal of Food and Nutrition Sciences*. Vol.58. Hal. 485-490.
- Plazonic, A., F.Bucar, Ž.Maleš, A. Mornar, B. Nigović, and N.Kujundžić. 2009. *Identification and Quantification of Flavonoids and Phenolic Acids in Burr Parsley (Caucalis platycarpos L.), Using High-Performance Liquid Chromatography with Diode Array Detection and Electrospray Ionization Mass Spectrometry*. *Molecules*. Vol. 14. Hal. 2466-2490.
- Putra, D.L. Effendy. 2004. *Kromatografi Cair Kinerja Tinggi dalam Bidang Farmasi*. USU Digital Library. diakses pada 26 Januari 2010.

- Risnasari, I. 2002. *Tanin*. USU Digital Library. diakses 18 Mei 2010
- Robinson, Trevor. 1993. *Kandungan Organik Tumbuhan Tinggi*. ITB Press. Bandung.
- Rusdi, 1990, *Tetumbuhan Sebagai Sumber Bahan Obat*. Pusat Penelitian Universitas Andalas, Padang.
- Rohman, Abdul. 2007. *Kimia Farmasi Analisis*. PustakaPelajar. Jogjakarta
- _____. 2009. *Kimia untuk Mahasiswa Farmasi : Bahan Kimia Organik, Alam, dan Umum*. Pustaka Pelajar. Jogjakarta. Terjemahan : *Chemistry for Pharmasi Students : General, Organic, and Natural Product Chemistry*. Sarker, S.D., dan L Nahar. 2007. John Wiley and Son Ltd.
- Santana, C.M., Z.S. Ferrera, M.E.T. Padron, and J.J.S. Rodriquez. 2009. *Methodologies for The Extraction of Phenolic Compounds from Enviromental Samples : New Approaches*. *Molecules*. Vol. 14. Hal. 298-320.
- Santi, S.R. 2009. *Penelusuran Senyawa Sitotoksik pada Kulit Biji Nyamplung (Calophyllum inophyllum L.) dan Kemungkinan Korelasinya sebagai Anti Kanker*. *Jurnal Kimia*. Vol. 2. Hal.101-108
- Sari, E.K. 2008. *Mempelajari Khasiat Buah Merah (Pandanus conoideus Lamk.) Terhadap Kualitas Pertumbuhan dan Fungsi Hati Secara in Vivo*. Skripsi. Departemen Ilmu dan Teknologi Pangan. Fakultas Pertanian. Institut Pertanian Bogor.
- Sastrohamidjojo, H. 2005. *Kromatografi*, Liberty, Yogyakarta.
- Septianingsih, Dyah. 2010. *Isolasi dan Identifikasi Komponen Utama Ekstrak Biji Buah Merah (Pandanus conoideus Lamk.)*. Skripsi. Jurusan Kimia. Fakultas MIPA. Universitas Sebelas Maret.
- Stahl, E., 1985. *Analisis Obat secara Kromatografi dan Mikroskopi*. ITB. Bandung. Hal 3-19.
- Still, Clark., M. Kahn, and A. Mitra. 1978. *Rapid Chromatographic Technique for Preparatives Separations with Moderate Resolution*. *Journal of Organic Chemistry* : Vol. 43. No. 14.
- Subroto, A., 2007. *Buah Merah Sehatkan Mata ?*, Majalah Trubus No.451. Jakarta, Hal: 116-117.

- Suharto, Edi. 2004. *Struktur Biji, Sifat Fisik Biji, dan Karakteristik Benih Kayu Afrika (Maesopris eminii Engl) Provenan Padang Jaya*. Jurnal akta Aagrosia. Vol 7. No. 1. Hal. 24-32.
- Thitilertdecha, N., A. Teerawutgulrag, J.D. Killburn, and N. Rekariyatham. 2010. *Identification of Major Phenolic Compounds from Nephelium lappaceum L. and Their Antioxidant Activities*. Molecules. Vol. 15. Hal 1453-1465.
- Tjitrosoepomo, G. 2005. *Morfologi Tumbuhan*. Edisi ke-15. Gadjah Mada University Press. Yogyakarta. Hal 242.
- Treutter, Dieter. 2010. *Managing Phenol Contents in Crop Plants by Phytochemical Farming and Breeding – Visions and Constrains*. International Journal of Molecules. Vol. 11. Hal. 807-857.
- Tsimogiannis, D., M. Samiotaki, G. Panayotou, and V. Oreopoulou. 2007. *Characterization of Flavonoid Subgroups and Hydroxy Substitution by HPLC-MS/MS*. Molecules. Vol.12. Hal. 593-606.
- Wahyuniari, I., M.H.N.E. Soesatyo, M. Ghufron, Yustina, A.A.Sumawi, dan S.Wiryawan. 2009. *Minyak Buah Merah Meningkatkan Aktivitas Proliferasi Limfosit Limpa Mencit Setelah Infeksi Listeria Monocytogenes*. Jurnal Veteriner. Vol.10. Hal. 143-149.
- Wu, YB., C.Z. Zheng, L.P. Qin, L.N.Sun, T. Han, L. Jiao, Q.Y. Zhang, and J.Z. Wu. 2009. *Antiosteoporotic Activity of Anthraquinones from Morinda officinalis on Osteoblast and Osteoclasts*. Molecules. Vol. 14. Hal. 1453-1465.
- Zhang, L.L., and Y.M. Lin. 2008. *HPLC, NMR, and MALDI-TOF MS Analysis of Condensed Tannins from Lithocarpus glaber Leaves with Potent Free Radical Scavenging Activity*. Molecules. Vol. 13. Hal. 2986-2997.
- Zivkovic, J., I.Mujic, Z.Zekovic, G.Nikolic, S.Vidovic, and A.Mujic. 2009. *Extraction and Analysis of Condensed Tannins in Castanea sativa Mill*. Journal of Central European Agriculture. Vol. 10. Hal.283-288.

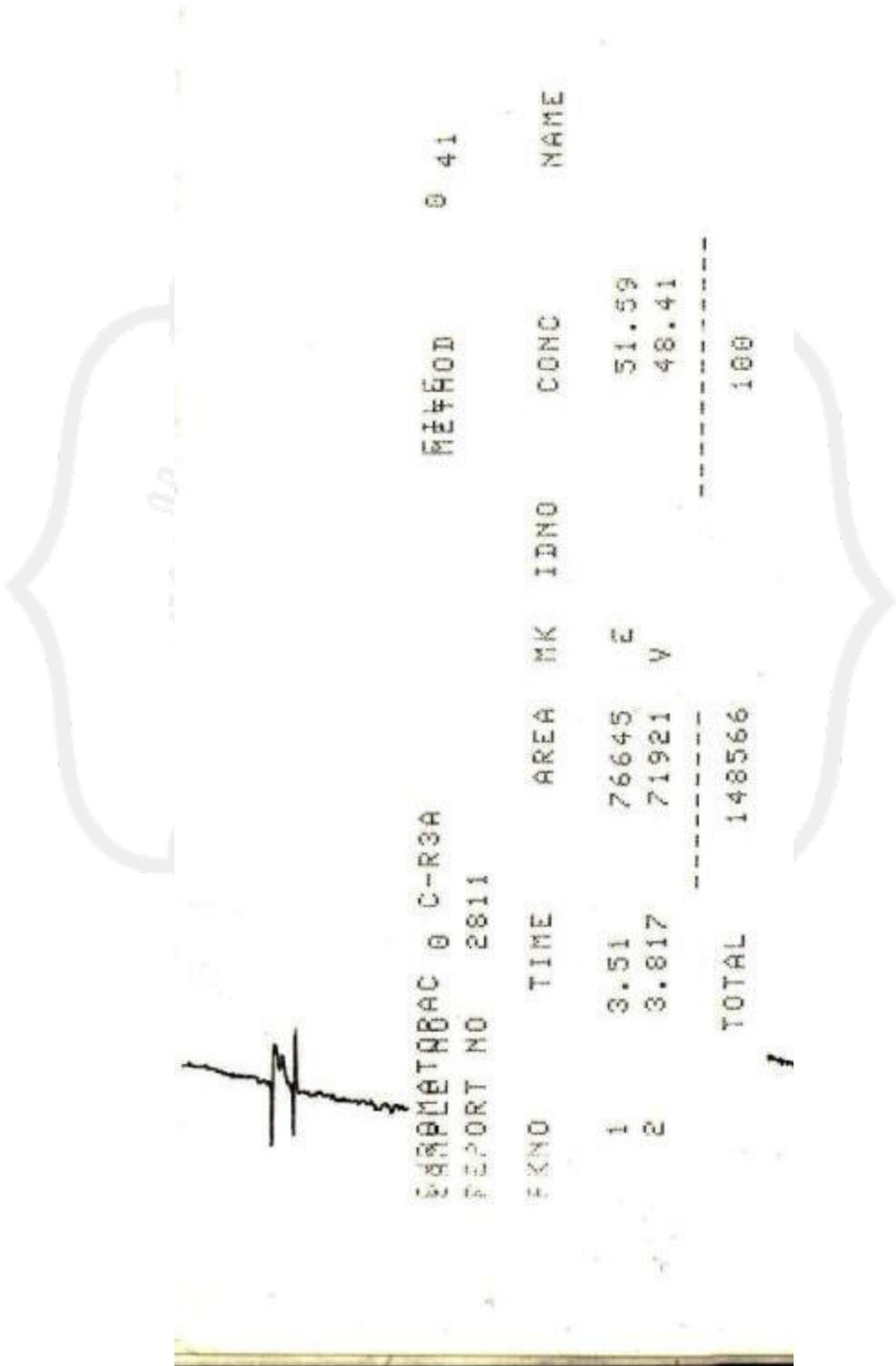
LAMPIRAN I
PROFIL KLT DENGAN VARIASI SISTEM ELUEN



Keterangan :

- | | |
|--|---|
| 1. Metanol 100% | 7. etil asetat: <i>n</i> -heksan (1:1) |
| 2. etil asetat 100% | 8. etil asetat: <i>n</i> -heksan (2:1) |
| 3. <i>n</i> -heksan 100% | 9. etil asetat: <i>n</i> -heksan (3:2) |
| 4. metanol: etil asetat (3:1) | 10. etil asetat: <i>n</i> -heksan (1:2) |
| 5. metanol: etil asetat (1:3) | 11. etil asetat: <i>n</i> -heksan (4:1) |
| 6. etil asetat: <i>n</i> -heksan (3:1) | 12. etil asetat: <i>n</i> -heksan (7:3) |

LAMPIRAN 2
PROFIL KROMATOGRAM HPLC ETANOL 96%

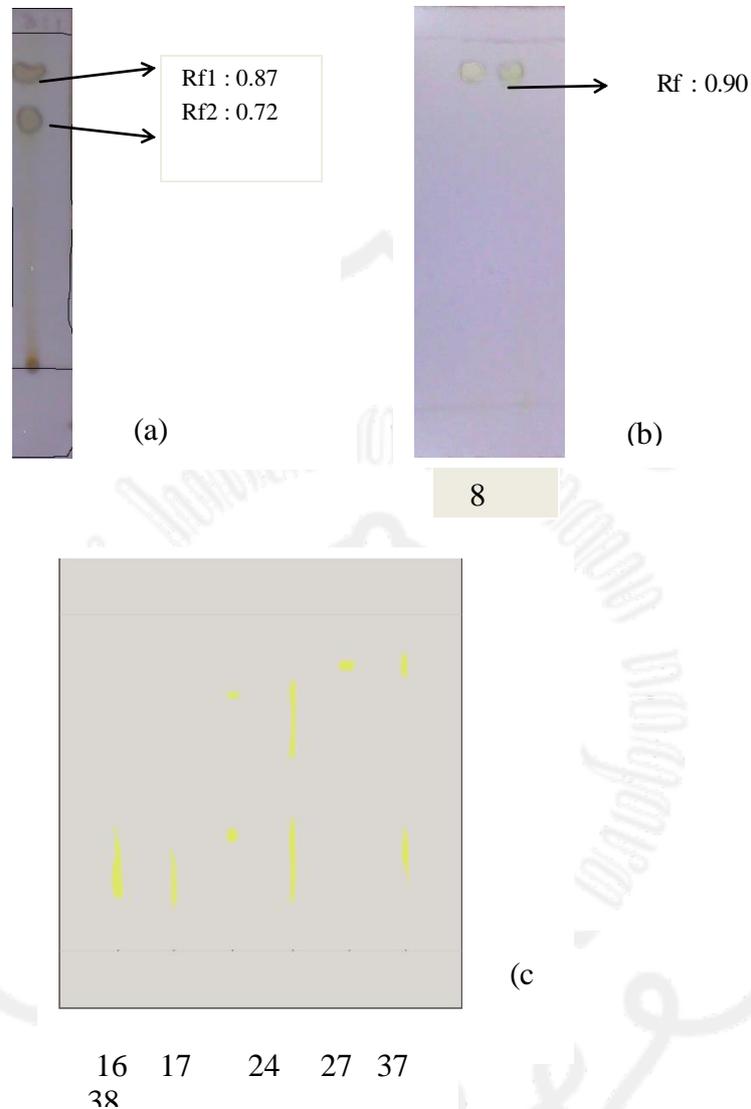


EXAMPLARAC 0 C-R3A
REPORT NO 2811

METHOD 0 41

PKNO	TIME	AREA	MK	IDNO	CONC	NAME
1	3.51	76645	E		51.59	
2	3.817	71921	V		48.41	
TOTAL		148566			100	

LAMPIRAN 3



Keterangan :

- profil KLT ekstrak etanol awal biji buah merah dengan sistem eluen *n*-heksan : etil asetat (1:3)
- profil KLT vial no 8 dan 10 hasil pemisahan kromatografi kolom *flash*
- uji antrakuinon ekstrak etanol biji buah merah hasil pemisahan kromatografi kolom sephadex

LAMPIRAN 4

Analisis kuantitatif didasarkan pada hasil kromatografi sephadex

$$\text{Fraksi Tanin} = \frac{a}{d} \times 100\% = \frac{303}{1356} \times 100\% = 22,345\%$$

$$\text{Fraksi Antrakuinon} = \frac{b}{d} \times 100\% = \frac{256}{1356} \times 100\% = 18,732\%$$

$$\text{Fraksi Fenolik} = \frac{c}{d} \times 100\% = \frac{778}{1356} \times 100\% = 57,375\%$$

Berat total vial yang positif uji tanin (a) = 303 mg

Berat total vial yang uji positif antrakuinon + senyawa fenolik (b) = 254 mg

Berat total vial yang uji positif senyawa fenolik (bebas antrakuinon dan tanin) (c) = 778 mg

Berat total ekstrak etanol biji buah merah yang dielusikan (d) = 1356 mg