

Isolasi Dan Karakterisasi Senyawa Metabolit Sekunder Ekstrak Etil Asetat Daun Malapari (*Pongamia pinnata* L)

I Gusti Made Ngurah¹, Hestine Tade Here²

^{1,2,3}Program Studi Pendidikan Kimia, FKIP- Universitas Nusa Cendana
Jl. Adisucipto Penfui, Kupang-NTT 85001 Indonesia
* email korespondensi: gusti_budiana @staf.undana.ac.id

Abstrak

Telah dilakukan penelitian tentang Isolasi Dan Karakterisasi Senyawa Metabolit Sekunder Ekstrak Etil Asetat Daun Malapari (*Pongamia pinnata* L). yang berasal dari kabupaten Lembata, nusa tenggara timur. Penelitian ini dilaksanakan dalam beberapa tahapan yaitu; (1). Preparasi sampel daun malapari, (2). Ekstraksi daun malapari, (3). Skrining ujifitokimia, (4). Pemisahan komponen dengan KLT dan KLT Preparatif, dan (5) karakterisasi senyawa dengan spektrofotometri UV-Vis. Penelitian ini bertujuan untuk mengetahui kandungan beberapa senyawa metabolit sekunder dan mengetahui eluen terbaik dengan nilai Rf yang terbentuk. Ekstraksi dilakukan dengan teknik maserasi bertingkat menggunakan pelarut petroleum eter dan etil asetat terhadap hasil ekstraksi kemudian dilakukan uji fitokimia untuk mengetahui golongan senyawa metabolit sekunder yang terkandung didalamnya. Isolasi dilakukan dengan metode Kromatografi Lapis Tipis (KLT) dan Kromatografi Lapis Tipis Preperatif (KLTP) lalu diidentifikasi dengan spektro UV-VIS. Hasil uji fitokimia menunjukan bahwa ekstrak daun malapari positif mengandung senyawa metabolit sekunder alkaloid, steroid dan tanin dan Hasil Spektro UV-Vis isolat menunjukkan bahwa Ekstrak etil asetat daun malapari mengandung senyawa Flavonoid..

Kata Kunci : Daun Malapari, Isolasi, Ekstraksi, Bertingkat

Abstract

Research has been conducted on the Isolation and Characterization of Secondary Metabolite Compounds of Malapari Leaf Ethyl Acetate Extract (*Pongamia pinnata* L). who came from Lembata regency, East Nusa Tenggara. This research was carried out in several stages, namely; (1). Preparation of malapari leaf samples, (2). Malapari leaf extraction, (3). Phytochemical screening, (4). Component separation by KLT and Preparatory KLT, and (5) compound characterization by UV-Vis spectrophotometry. This study aims to determine the content of several secondary metabolite compounds and determine the best eluene with the Rf value formed. Extraction was carried out by a cascade maceration technique using petroleum ether and ethyl acetate solvents on the extraction results and then phytochemical tests were carried out to determine the class of secondary metabolite compounds contained in it. Isolation was carried out by Thin Layer Chromatography (KLT) and Preperative Thin Layer Chromatography (KLTP) methods and then identified by UV-VIS spectroscopy. The results of phytochemical tests showed that the positive malapari leaf extract contained secondary metabolite compounds of alkaloids, steroids and tannins and the results of the UV-Vis isolate spectrum showed that the ethyl acetate extract of the malapari leaf contained flavonoid compounds..

Keywords : Malapari Leaves, Isolation, Extraction, Terraced.

PENDAHULUAN

Malapari (*Pongamia pinnata* L.) adalah sejenis pohon penghasil biji-bijian yang berasal dari India dan Asia Tenggara. Tumbuhan ini juga sering disebut sebagai "kacang cina" atau "kacang hilir". Tumbuhan Malapari dapat tumbuh

hingga mencapai ketinggian 15-25 meter dengan diameter batang mencapai 80 cm. (Heyne,1987).

Malapari (*Pongamia pinnata* L.) merupakan salah satu jenis tumbuhan obat yang salah satu daerah penyebarannya

adalah Nusa Tenggara Timur (NTT). Tanaman ini cepat tumbuh yang bunganya digunakan untuk mengobati wasir berdarah sedangkan buah membantu pengobatan sakit maag, tumor, dan wasir. Bubuk bijinya mengurangi demam dan membantu mengobati bronkitis, batuk rejan dan juga diresepkan sebagai obat penurun panas dan tonik. Di sisi lain, jus daunnya membantu pengobatan kusta, diare, batuk, gonore, perut kembung, dan pilek. Kulit batangnya yang selama ini digunakan sebagai obat untuk mengurangi pembengkakan limpa. Kulit batangnya meredakan batuk dan pilek serta gangguan jiwa. Akar digunakan sebagai sikat gigi untuk kebersihan mulut sedangkan sari akar digunakan untuk membersihkan bisul (Usharani, 2019). Tanaman ini biasa tumbuh di pesisir pantai sebagai pemecah angin dan mencegah erosi dan tanaman perindang jalan yang sudah dapat berbuah pada umur 4-5 tahun. Selain digunakan obat-obatan tumbuhan ini juga dapat dimanfaatkan untuk bahan baku lemari, kertas dan kayu bakar dengan nilai kalor 4600 kkal/kg, daunnya untuk pakan ternak dan pupuk hijau (Orwa et al, 2009; Alimah, 2011). Banyak diteliti mengenai pemanfaatan bagian tanaman ini sebagai bahan untuk keperluan medis antara lain anti inflamasi, anti bakteri, anti virus, anti diare, anti oksidan dan lain-lain (Yadav et al, 2011; Ghumare et al, 2014).

Dalam tumbuhan terdapat kandungan senyawa yang disebut senyawa metabolit sekunder. Metabolit sekunder merupakan senyawa kimia yang dihasilkan oleh tumbuhan dan biasanya tidak terlibat dalam proses metabolisme primer. Senyawa ini sering digunakan dalam industri, farmasi, kosmetik, makanan dan bahan kimia lainnya. Oleh karena itu, penelitian tentang metabolit sekunder pada tumbuhan memiliki potensi untuk membuka peluang baru dalam pengembangan industri dan kesehatan. Senyawa ini disintesis oleh tumbuhan untuk mempertahankan eksistensinya dalam berinteraksi dengan lingkungan dan bersifat tidak esensial bagi pertumbuhan. Beberapa contoh senyawa metabolit sekunder yang sering ditemukan dalam tumbuhan yaitu flavonoid, alkaloid, steroid, saponin dan terpenoid. Kandungan senyawa metabolit sekunder tidak terdapat secara merata dan ditemukan dalam jumlah sedikit. Umumnya terdapat pada semua organ tumbuhan yakni pada akar, kulit batang, daun, bunga, dan biji (Reskika, 2011 dan Ratnasari, 2015).

Kandungan setiap jenis tumbuhan dalam senyawa metabolit sekunder yang dihasilkan itu berbeda-beda. Senyawa metabolit sekunder yang pada tumbuhan dalam setiap spesies pun dapat membentuk senyawa yang berbeda pula. Hal tersebut tergantung pada lingkungan hidup dari tumbuhan itu sendiri. Pembentukan metabolit sekunder dipengaruhi oleh banyaknya faktor antara lain suhu, pH, aktivitas air, dan intensitas cahaya. Kelembapan tanah atau lahan dan pH tanah merupakan parameter yang relevan untuk terbentuknya metabolit sekunder (Vinolina, 2014).

Secara umum tumbuhan malapari ini memiliki akar, batang, daun, bunga, dan buah. Bagian-bagian tersebut memiliki kandungan senyawa bahan alam tertentu yang dapat bermanfaat bagi kesehatan. Hal ini berdasarkan penelitian yang dilakukan oleh Aminah, dkk (2017). Malapari sebagai bahan baku produksi biodiesel. Penelitian ini melibatkan analisis kandungan minyak dan komposisi asam lemak biji malapari yang dikumpulkan dari berbagai lokasi di Pulau Jawa, Indonesia. Penelitian sebelum-sebelumnya yang dilakukan untuk mengeksplorasi kandungan senyawa kimia pada daun malapari. Mengingat belum adanya penelitian tentang kandungan senyawa metabolit sekunder yang berasal dari daun malapari asal NTT, maka penelitian ini penting untuk dilakukan.

METODE PENELITIAN

Alat

Alat yang digunakan dalam penelitian ini adalah toples, pisau, blender, ayakan, autoclave, pipet tetes, timbangan/neraca analitik, bejana kromatografi, tabung reaksi, gelas ukur, erlenmeyer, kain flanel, gelas kimia, kertas saring, corong pisah, kaca arloji, pengaduk, penjepit, maserator, rotary vacuum evaporator, lampu UV, aluminium foil, mikropipet, kapas steril, jarum ose, pecandang, pembakar bunsen, oven, cawan petri, incubator, pinset, dan botol sampel.

Bahan

Bahan yang digunakan dalam penelitian ini adalah tumbuhan daun malapari (*Pongamia Pinnata L*), Etil asetat ($C_4H_8O_2$), petroleum eter, n-butanol, kloroform ($CHCl_3$), HCL 2%, aquades, asam asetat, plat silika gel, pereaksi Liebermann-Burchard (asam sulfat + asam asetat anhidrat), pereaksi Mayer ($HgCl$), pereaksi shibata, pereaksi Wagner (KI).

Preparasi sampel daun malapari

Sampel tumbuhan malapari diambil dari kabupaten Lembata bagian sampel yang diambil adalah bagian daun. Proses pengambilan sampel tidak berpatokan pada umur sampel.

Tahap pertama sampel daun malapari di petik selanjutnya dicuci hingga bersih. Kemudian dikeringkan untuk mengurangi kadar air, agar terhindar dari adanya reaksi enzimatik, pertumbuhan jamur sehingga sampel dapat disimpan lebih lama, tidak mudah rusak, komposisi kimianya tidak mengalami perubahan dan mempermudah penggilingan. Sampel tersebut dikeringkan pada suhu kamar atau dikeringkan tanpa sinar matahari agar senyawa yang terkandung di dalamnya tidak terdegradasi oleh sinar UV dikeringkan selama 4-6 hari. Kemudian dihaluskan menjadi

serbuk menggunakan blender. Pembuatan serbuk dapat mempermudah proses ekstraksi.

Ekstraksi daun malapari

Sebanyak 500 gram serbuk kering daun malapari mula-mula diekstraksi secara maserasi dengan petroleum eter 1000 mL selama 5 hari. Kemudian disaring sehingga diperoleh ekstrak petroleum eter dan ampas. Ampas yang diperoleh dikeringkan kemudian dimasukkan ke dalam toples dan direndam menggunakan pelarut etil asetat 2 L selama 3 hari pada suhu ruangan (kira-kira tinggi pelarut 1-2 cm di atas serbuk sampel). Sampel kemudian diangkat, diperas dan ekstraknya disaring menggunakan kertas saring. Hasil dari ekstraksi ini adalah ekstrak etil asetat dan ampas. Ekstrak etil asetat yang diperoleh dievaporasi dengan alat vakum evaporator sehingga diperoleh ekstrak daun Malapari bebas pelarut (ekstrak kental). Kemudian ekstrak etil asetat tersebut yang akan digunakan untuk analisis selanjutnya.

$$\%rendaman = \frac{\text{bobot ekstrak}(g)}{\text{bobot simplisia yang diekstrak}} \times 100\%$$

Skrining ujifitokimia

a. Uji Flavonoid

Diambil ekstrak etil asetat sebanyak 1 mL untuk dilakukan uji dengan menggunakan pereaksi shibata. Apabila terbentuk warna merah atau jingga menunjukkan adanya flavonoid. Pembuatan pereaksi shibata dapat dilakukan dengan menambahkan 2 mL amilalkohol pada 5 mL air panas, kemudian ditambahkan 0.1 g logam Mg dan ditambahkan 1 mL HCL Pekat, kemudian larutan dihomogenkan sebelum digunakan.

b. Uji Terpenoid

Ekstrak etil asetat sebanyak 1 ml untuk dilakukan uji dengan menggunakan pereaksi Liebermann-Burchard. Apabila terbentuk cincin berwarna merah kecoklatan atau ungu menunjukkan adanya terpenoid. Pembuatan pereaksi Liebermann-Burchard dapat dilakukan dengan menambahkan 1 mL asam sulfat pekat ke dalam 19 mL asam asetat anhidrat dingin, kemudian larutan dihomogenkan dan dibiarkan selama 4 menit sebelum digunakan.

c. Uji Alkaloid

Ekstrak etil asetat sebanyak 1 mL kemudian ditambahkan HCl 2% dan diuji dengan menggunakan pereaksi Mayer, apabila terbentuk endapan putih kekuningan menunjukkan adanya alkaloid. Pembuatan pereaksi Mayer dapat dilakukan dengan sebanyak 1,3 gr HgCl₂ dilarutkan dalam 60 mL air (larutan I). KI sebanyak 5 gram dilarutkan

dalam 10 mL air (larutan II). Kedua larutan tersebut dicampur dan diencerkan sampai 100 mL.

Selanjutnya ekstrak etil asetat diambil 1 mL kemudian ditambahkan HCl 2% diuji dengan menggunakan pereaksi Wagner, apabila terbentuk endapan coklat pada pereaksi Wagner menunjukkan adanya alkaloid. Pembuatan pereaksi Wagner dapat dilakukan dengan sebanyak 2 gr KI ditambah I sebanyak 1,27 gr dan dilarutkan dalam 5 mL air, kemudian diencerkan sampai 100 mL.

d. Uji Saponin

Ekstrak etil asetat 1 mL ditambahkan dengan beberapa tetes aguada kemudian dikocok. Adanya busa yang stabil menunjukkan adanya saponin.

e. Uji Tanin

Uji Tanin dilakukan dengan cara ekstrak etil asetat 1 mL untuk dilakukan uji dengan menggunakan pereaksi FeCl₃ 1%. Adanya warna biru tua atau hijau kehitaman menunjukkan adanya tanin.

Pemisahan Komponen Senyawa Dengan Kromatografi Lapis Tipis

1. Disiapkan *chamber* kromatografi ukuran kecil, ke dalamnya dimasukkan pelarut (eluen kloroform : etil asetat) dengan perbandingan (3:2). Kemudian *chamber* ditutup dan dibiarkan sampai jenuh dengan eluen.
2. Dipotong plat KLT dengan ukuran 8x2 cm
3. Plat diberi tanda dengan garis sepanjang plat pada batas bawah (1,5 cm dari tepi bawah plat) dan batas atas (0,5 cm dari tepi atas plat) dengan menggunakan pensil dan mistar.
4. Dengan menggunakan mikropipet, ditotolkan sampel pada garis batas bawah yang telah dibuat. Diusahakan diameter pentotolan sekecil mungkin kemudian dikeringkan di udara terbuka.
5. Plat dimasukkan ke dalam *chamber* kromatografi yang telah terisi pelarut dalam posisi berdiri dan diusahakan agar totolan sampel tidak terendam dalam pelarut.
6. Dibiarkan hingga pelarut bergerak mencapai garis batas atas plat, kemudian plat dikeluarkan dari *chamber* dan dikeringkan pada suhu kamar.
7. Plat diamati di bawah lampu UV dengan panjang gelombang 254 nm.
8. Warna noda(spot) yang terbentuk dicatat, kemudian diukur jarak yang ditempuh masing-masing spot. Semua hasil KLT dihitung nilai R_fnya, dilihat kolom kromatogram dan warna yang tampak pada spot.

Pemisahan Senyawa Metabolit Sekunder Dengan KLT Preparatif

Disiapkan plat KLT berukuran 20 x 20 cm untuk *chamber* kromatografi berukuran besar. Kemudian diberi tanda berupa garis sepanjang plat pada batas bawah (2 cm dari

tepi bawah plat) dan batas atas (1,5 cm dari tepi atas plat), lalu plat KLT diaktivasi dalam oven pada suhu 105° C selama 30 menit dan setelah itu didiamkan didesikator selama 15 menit. Selanjutnya, larutan ditotolkan pada silika gel. Plat dielusi dengan eluen terbaik hasil KLT (eluen yang memberikan pemisahan terbaik) dan dibiarkan hingga pelarut bergerak mencapai garis batas atas plat. Plat dikeluarkan dan dikeringkan pada suhu kamar. Selanjutnya plat diamati di bawah lampu UV dengan panjang gelombang 366 nm. Warna noda (spot) yang terbentuk dicatat, kemudian diukur jarak yang ditempuh masing-masing spot. Kemudian noda yang diperoleh dikerok untuk masing-masing komponen. Hasil kerokan dilarutkan dalam pelarut etil asetat sebanyak 10 mL, kemudian disaring sehingga diperoleh hasil saringan (isolat).

Uji Fitokimia Hasil Pemisahan dengan KLTP

Uji ini dilakukan terhadap isolat hasil KLTP yang menunjukkan hasil positif pada uji pendahuluan. Isolat yang diperoleh dari hasil KLTP, masing-masing diuji menggunakan pereaksi warna yang khas untuk setiap golongan.

Karakterisasi Senyawa Metabolit Sekunder dengan Spektrofotometer UV-Vis

Isolat hasil pemisahan komponen senyawa dengan kromatografi lapis tipis preparatif (KLTP) kemudian dikarakterisasi menggunakan spektrofotometer UV-Vis.

HASIL DAN PEMBAHASAN

Sampel daun malapari yang akan digunakan dalam penelitian berasal dari daun tumbuhan malapari yang diambil dari Kabupaten Lembata, Nusa Tenggara Timur. Daun malapari dipetik, dicuci bersih dengan air mengalir dan dikeringkan.

Pencucian bertujuan agar daun malapari bersih dari kotoran seperti debu tanah ataupun gulma yang menempel. Proses pengeringan dilakukan agar daun yang dihasilkan benar-benar kering untuk menghilangkan kandungan air serta mencegah tumbuhnya jamur dan bakteri yang dapat merusak senyawa bioaktif yang terkandung dalam daun. Namun proses pengeringan yang terlalu lama dapat merusak mutu dan komponen daun sehingga pengeringan dilakukan selama 5-7 hari. Proses pengeringan yang dilakukan memberikan perubahan pada warna, tekstur dan berat daun. Daun malapari yang segar berwarna hijau, setelah dikeringkan menjadi berwarna putih kecoklatan, garing, berkerut dan ringan. Perubahan warna yang terjadi disebabkan karena daun kehilangan klorofil, sedangkan perubahan tekstur dan berat terjadi karena berkurangnya kadar air pada daun.

Daun malapari yang telah dikeringkan kemudian dihaluskan menggunakan *blender* dan diayak untuk memperoleh ukuran serbuk simplisia yang homogen. Penghalusan daun bertujuan untuk memperbesar luas

permukaan sampel karena semakin kecil ukuran suatu partikel maka semakin besar luas permukaannya, sehingga dapat mempercepat proses pelarutan pelarut dalam proses ekstraksi pada sampel. Daun Malapari setelah dikeringkan dapat dilihat pada Gambar 1.



Gambar 1. Serbuk Simplisia daun malapari

Ekstraksi daun malapari Dengan Metode Maserasi

Ekstrak etil asetat daun malapari di peroleh dengan menggunakan metode ekstraksi cara dingin yakni metode maserasi. Ekstraksi maserasi merupakan salah satu metode pemisahan senyawa dengan cara perendaman menggunakan pelarut organik pada temperatur ruangan sehingga mengurangi resiko terdegradasinya senyawa metabolit sekunder dalam sampel akibat suhu yang tinggi. Suhu yang tinggi kemungkinan akan menyebabkan terdegradasinya senyawa-senyawa metabolit sekunder (Widodo, 2007). Sedangkan kekurangan dari metode ini adalah memakan banyak waktu yang lama untuk mencari pelarut organik yang dapat melarutkan dengan baik senyawa yang akan diisolasi dan harus mempunyai titik didih yang tinggi pula sehingga tidak mudah menguap (Voight, 1995). Selain itu, beberapa senyawa mungkin saja sulit diekstraksi pada suhu kamar. Namun, disisi lain metode maserasi dapat menghindari rusaknya senyawa-senyawa yang bersifat termolabil (Agoes, 2007).

Proses ekstraksi dilakukan secara bertahap dengan menggunakan dua pelarut yang berbeda yaitu pelarut petroleum eter yang bersifat non polar dan etil asetat yang bersifat semi polar. Menurut Mukhopadhyay (2002), pelarut organik yang umum digunakan untuk memproduksi konsentrat, ekstrak, absolut, atau minyak atsiri dari bunga, biji, akar, dan bagian lain dari tanaman adalah etil asetat, petroleum eter, benzena, etanol isopropanol, aseton dan air. Terdapat dua pertimbangan dalam memilih dua jenis pelarut yaitu pelarut yang mempunyai daya larut yang tinggi dan pelarut tidak berbahaya dan beracun.

Data hasil penelitian ekstrak etil asetat daun malapari disajikan pada tabel 1.

Tabel 1. Data hasil ekstraksi pembuatan ekstrak etil asetat dan petroleum eter daun malapari dengan metode maserasi.

Berat sampel (gram)	Larutan pengestrak (mL)	Volume pengestrak (mL)	Waktu ekstrak (hari)	Warna ekstrak
500	Petroleum eter	1000	5	Hijau pekat
500	Etil asetat	2000	3	Hijau

Proses ekstraksi dilakukan dengan cara sampel serbuk daun malapari ditimbang sebanyak 500 gram dan diisi dalam toples kaca besar. Kemudian dimaserasi dengan petroleum eter 1000 mL selama 5 hari. Kemudian disaring sehingga diperoleh ekstrak petroleum eter dan ampas. Ampas yang diperoleh dikeringkan kemudian dimasukkan ke dalam toples dan direndam menggunakan pelarut etil asetat 2 L selama 3 hari pada suhu ruangan (kira-kira tinggi pelarut 1-2 cm di atas serbuk sampel). Toples kemudian ditutup rapat, dilindungi dengan aluminium foil agar tidak terjadinya pertukaran udara dan disimpan ditempat sejuk terhindar dari paparan sinar matahari langsung. Hal ini merupakan salah faktor yang sangat mempengaruhi proses ekstraksi, karena semakin lama waktu yang dibutuhkan dalam proses ekstraksi maka waktu kontak antara pelarut dan sampel semakin tinggi, sehingga proses ekstraksi atau penarikan senyawa metabolit sekunder dalam sampel lebih optimal dan mencegah reaksi dikatalisis cahaya atau terjadinya perubahan warna. Tujuan toples di lindungi dengan aluminium foil juga karena sifat kepolaran etil asetat adalah semi polar menyebabkan etil asetat dapat mudah menguap.

Pada proses maserasi dilakukan pengadukan sekali dalam 24 jam yang bertujuan untuk menyempurnakan kontak antara sampel dan pelarut karena jika maserasi dalam keadaan diam akan menyebabkan turunnya perpindahan bahan aktif. Setelah maserasi sampel kemudian disaring menggunakan kertas saring dan kain flannel untuk memisahkan antara filtrat dan ampas. Filtrat yang diperoleh dari hasil penyaringan maserasi petroleum eter adalah 100mL dan hasil penyaringan maserasi dengan pelarut etil asetat adalah 900mL.



Gambar 2. (a) Hasil maserasi dengan petroleum eter; (b) Hasil maserasi dengan etil asetat

Selanjutnya dievaporasi untuk diperoleh ekstrak etil asetat kental. Pada proses evaporasi, alat yang digunakan yaitu *rotary vacum evaporator*. *rotary vacum evaporator* merupakan instrumen yang menggunakan prinsip utama dalam instrumen ini terletak pada penurunan tekanan pada labu alas bulat dan pemutaran labu alas. Waterbath pada alat ini kemudian dipanaskan sesuai suhu pelarut etil asetat yaitu 40°C. Setelah itu, labu alas bulat yang berisi sampel dihubungkan pada ujung rotary yang terhubung dengan kondensor. Terdapat juga air pendingin (es) yang dijalankan sehingga proses ini berjalan secara kontinyu jadi ketika uap dari pelarut mengenai dinding-dinding kondensor, maka pelarut ini akan mengalami proses kondensasi yaitu perubahan fasa dari fasa gas ke fasa cair.

Proses penguapan ini dilakukan hingga diperoleh pelarut yang sudah tidak menetes lagi pada labu alas bulat penampung dan juga bisa dilihat dengan semakin kentalnya zat yang ada pada labu alas bulat sampel dan terbentuk gelembung-gelembung pecah pada permukaan zatnya (Khoirulazam,2012). Tujuan proses evaporasi sampel yaitu untuk menguapkan pelarut yang terdapat dalam sampel (menghilangkan pelarut), sehingga hasil yang diperoleh yaitu sampel ekstrak etil asetat daun malapari yang kental berwarna hijau kehitaman dan bebas dari pelarut. Hasil evaporasi inilah yang kemudian digunakan untuk uji selanjutnya.



Gambar 3. Hasil Evaporasi

Uji Fitokimia Senyawa Metabolit Sekunder Ekstrak Etil Asetat Daun Malapari

Uji fitokimia merupakan uji awal untuk mengetahui kandungan senyawa metabolit sekunder dalam ekstrak tanaman. Secara kuantitatif, uji fitokimia digunakan untuk menunjukkan ada atau tidak adanya senyawa tertentu dalam sampel. Identifikasi dilakukan dengan menggunakan pereaksi warna dalam proses analisis. Dalam penelitian ini, uji fitokimia dilakukan untuk ekstrak etil asetat daun malapari. Data hasil uji fitokimia disajikan dalam table 2.

Tabel 2. data hasil uji fitokimia ekstrak etil asetat daun malapari.

No	Senyawa metabolit sekunder yang diuji	Pereaksi yang digunakan	Warna berdasarkan teori	Hasil penelitian	Keterangan (+) (-)
1	Flavonoid	Shibata	Merah atau jingga	Hijau	-
2	Terpenoid	Lieberman- burchan	Cincin berwarna merah kecoklatan atau ungu	Hijau kehitaman	-
3	Alkaloid	Mayer	Endapan putih kekuningan	Hijau muda	-
		Wagner	Endapan coklat	Endapan coklat	+
4	Saponin	Aquades	Ada busa yang stabil	Tidak terbentuk busa	-
5	Tanin	FeCl ₃ 1%	Biru tua atau hijau kehitaman	Hijau kehitaman	+
6	Steroid	Lieberman- burchan	Hijau-biru	Hijau	+

Komponen Senyawa Dengan Metode Kromatografi Lapis Tipis (KLT)

Proses KLT dilakukan untuk mencari eluen terbaik dari beberapa eluen yang digunakan dalam pemisahan senyawa metabolit sekunder. Eluen yang baik adalah eluen yang bisa memisahkan senyawa dalam jumlah banyak yang ditandai dengan munculnya spot. Prosedur kerja dengan KLT dilakukan untuk lebih memperkuat dan mempertegas hasil yang didapat dari uji fitokimia senyawa dengan pereaksi warna serta bermanfaat dalam tahap isolasi senyawa yang terkandung dalam daun malapari.

KLT yaitu perpindahan analit pada fase diam karena pengaruh fase gerak (elusi). Fase diam yang digunakan berupa plat silika gel G₆₀ F₂₅₄ dengan ukuran 8x2 cm. pengguna bahan silika karena pada umumnya silika digunakan untuk memisahkan asam-asam amino, fenol, flavonoid, asam lemak, sterol dan terpenoid. Plat silika G₆₀ F₂₅₄ memiliki sifat yang polar dimana sebelum digunakan diaktivasi terlebih dahulu dalam oven pada suhu 105 °C selama 30 menit. Tujuan dilakukan aktivasi adalah untuk menghilangkan kadar air serta pengotor yang terdapat pada plat (Sastrohamidjojo,1996). Dengan menghilangnya kadar air, daya serap adsorben plat akan meningkat sehingga pemisahan komponen dapat berlangsung dengan baik.

Eluen yang digunakan, sebelumnya harus dijenuhkan didalam chamber berukuran kecil dengan meletakkan kertas saring ke dalam chamber dan di tutup rapat. Eluen dapat dikatakan sudah jenuh apabila sudah naik membasahi seluruh permukaan kertas saring yang ada. Penjenuhan eluen bertujuan

agar proses elusi atau perambatan berjalan dengan cepat dan optimal serta untuk mencegah penguapan eluen.

Kemudian plat KLT diukur 8cm x 2cm dan diberi tanda berupa garis sepanjang plat. Pada batas bawah 1,5 cm dari tepi bawa plat dan batas atas plat 0,5cm dengan menggunakan pensil dan mistar. Tujuan dibuat penandaan batas bawah pada plat KLT agar dapat menghindari ekstrak yang terendam dalam eluen dan sebagai tempat penotolan sampel. Sedangkan penandaan batas atas berfungsi sebagai penanda agar proses elusi atau pemisahan dapat dihentikan apabila eluen telah mencapai batas tempuh.

Dengan menggunakan mikropipet ekstrak etil asetat ditotolkan pada garis batas bawah yang telah dibuat. Diusahakan diameter penotolan sekecil mungkin kemudian dikeringkan diudara terbuka. Sampel yang ditotolkan tidak boleh terlalu banyak karena jika terlalu banyak maka noda yang muncul akan tidak beraturan. Selanjutnya plat dimasukan ke dalam chamber kromatografi yang telah terisi pelarut dalam posisi berdiri miring dan di usahakan totolan sampel tidak terendam dalam pelarut. Dibiarkan hingga pelarut bergerak mencapai garis batas atas plat. Kecepatan komponen-komponen naik pada plat KLT berbeda-beda, tergantung dari kekuatan komponen dalam pelarut, kelarutan komponen dalam pelarut dan derajat kekuatan komponen terabsorbsi pada fase diam. Perbedaan kecepatan migrasi dari masing-masing komponen di tandai dengan adanya bercak atau noda dengan nilai R_f yang berbeda. Proses elusi diakhiri pada saat eluen mencapai batas atas plat. Plat dikeluarkan dari chamber dan dikeringkan pada suhu kamar. Selanjutnya plat di amati dibawah lampu UV dengan panjang gelombang 254nm untuk

mengetahui secara jelas ada spot yang terbentuk pengamatan plat dibawah lampu UV yang dipasang pada panjang gelombang emisi 254nm untuk menampakan komponen senyawa sebagai bercak yang gelap atau bercak yang berfluoresensi terang pada dasar yang berfluoresensi seragam (Gritter, 1991). Noda yang terlihat di bawah lampu UV ditandai dengan pensil untuk dihitung nilai Rf. Nilai Rf berfungsi untuk menyatakan posisi noda pada fase diam setelah dielusi.

Table 3. Data hasil pemisahan komponen senyawa dengan KLT

No	Nama Eluen	Lampu UV 254 nm			
		Jumlah spot	Warna spot	Bentuk spot	Rf
1	BAA 6:1:3	1	Hijau	Berekor	0,4
2	Etil asetat : N-heksana. 7:3	1	hijau	Berekor	0,8
3	Metanol:kloroform.3:2	1	Ungu	Berekor	0,6
4	Kloroform: etil asetat 3:2	4	Ungu	Bulat	0,4
			Kuning	Bulat	0,6
			Kuning	Bulat	0,8
			Hijau tua	Bulat	0,86

Berdasarkan table 3. eluen yang memberikan pemisahan terbaik hasil kromatogram pada plat KLT adalah kloroform : etil asetat dengan perbandingan 3:2 yang memiliki 4 spot noda, dengan harga Rf noda satu hingga noda empat dengan nilai Rf berturut-turut yaitu 0.4, 0.6, 0.8, 0.86. perbedaan nilai Rf dari masing-masing ekstrak karena perbedaan struktur dan distribusi senyawa terhadap fase gerak dan fase diam. Jika nilai Rf dihasilkan memiliki nilai yang tinggi maka hal tersebut menunjukkan bahwa senyawa memiliki kepolaran yang lebih rendah begitu pula sebaliknya. Hal ini dikarenakan fase diam bersifat polar dan senyawa yang bersifat polar akan tertahan pada fase diam sehingga menghasilkan nilai Rf yang rendah.

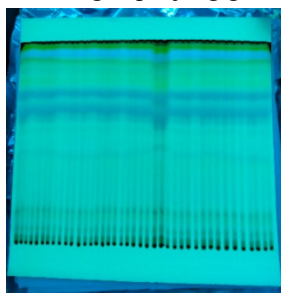
Pemisahan Senyawa Dengan Metode Kromatografi Lapis Tipis Preparatif (KLTP)

Eluen terbaik hasil pemisahan dengan kromatografi lapis tipis (KLT) diaplikasikan pada kromatografi lapis tipis preparatif (KLTP). Tujuan

dilakukannya aplikasi KLTP adalah untuk mendapatkan isolate yang lebih banyak. Untuk pelaksanaan teknik KLTP yaitu jenuhkan eluen terlebih dahulu pada chamber berukuran besar dengan menggunakan eluen terbaik hasil pemisahan KLT. Eluen terbaik hasil pemisahan KLT yaitu campuran kloroform : etil asetat (3:2). Sehingga untuk pemisahan senyawa dengan metode KLTP digunakan eluen dengan perbandingan 30:20.

Selanjutnya, sampel ditotolkan pada plat silica gel berukuran 20 x 20 cm. untuk batas bawah plat diberi tanda garis 2cm dan batas atas plat diberi tanda garis 1,5 cm. sampel ditotolkan sepanjang plat dari batas bawah plat. Plat KLTP yang telah ditotol dikeringkan sebelum plat dimasukkan ke dalam chamber yang telah jenuh dengan eluen. Kemudian dibiarkan hingga pelarut bergerak mencapai garis batas atas plat. Salah satu kelemahan plat silica gel adalah proses elusi membutuhkan waktu yang lama. Setelah proses elusi mencapai garis batas atas, Plat dikeluarkan dan

dikeringkan pada suhu kamar. Selanjutnya plat diamati dibawah lampu UV dengan panjang gelombang 254nm.



Gambar 4. hasil pemisahan senyawa pada KLTP

Table 4. data hasil pemisahan senyawa menggunakan KLT Preparatif

Nama Eluen	Hasil			
	Jumlah Spot	Warna Spot	Bentuk Spot	Harga Rf
Kloroform: Etil Asetat	4	Hijau tua	Pita	0,2
		Ungu	Pita	0,64
		Ungu	Pita	0,72
		Kuning	Pita	0,84

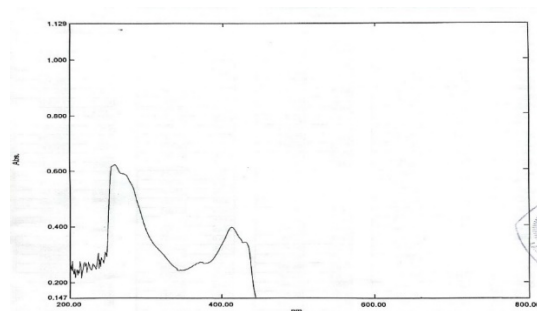
Berdasarkan table diatas, hasil pengamatan terhadap ekstrak etil asetat daun malapari adalah campuran kloroform : etil asetat dengan perbandingan 30:20. Pada perbandingan ini, diperoleh empat noda yang berbentuk pita yang terpisah dengan jelas, yaitu noda pertama dengan nilai Rf 0.2, noda kedua dengan nilai Rf 0.64, noda ketiga dengan nilai Rf 0.72, dan noda keempat dengan nilai Rf 0.84. Pita-pita yang terbentuk pada plat kemudian dikerok dan dilarutkan dalam etil asetat sebanyak 10mL, kemudian disaring untuk memisahkan larutan dengan silika gel sehingga diperoleh hasil saringan berupa isolat. Isolat tersebut kemudian dilakukan uji fitokimia dan diidentifikasi menggunakan spektrofotometer UV-Vis.

Hasil Identifikasi Senyawa Dengan Spektrofotometri UV-Vis

Hasil aplikasi KLTP yang berupa isolat selanjutnya dilakukan identifikasi senyawa dengan menggunakan spektrofotometer UV-Vis. Spektrofotometer UV-Vis merupakan teknik analisis spektroskopi yang menggunakan sumber radiasi

elektromagnetik dan sinar tampak dengan menggunakan instrumen yang digunakan untuk memperkuat dugaan hasil uji fitokimia serta menentukan secara deskriptif senyawa yang diperoleh dari pemisahan menggunakan KLT Preparatif. Tujuan utama analisis ini yaitu untuk menentukan secara pasti senyawa yang terkandung pada isolat hasil isolasi KLTP. Analisis UV-Vis ini diukur pada panjang gelombang 200-800nm.

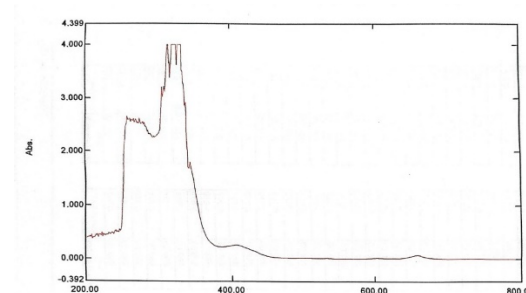
1. Identifikasi senyawa dengan spektro UV-Vis isolat 1



Gambar 5. Spektrum UV isolat ekstrak etil asetat isolat I

Dari hasil UV Vis isolat I terlihat dua puncak absorbansi yang signifikan yaitu pada panjang gelombang 258nm dengan nilai absorbansi 0.624, dan pada panjang gelombang 411 dengan nilai absorbansi 0.397. pada kedua puncak ini kemungkinan merupakan transisi $\pi - \pi^*$ pada cincin aromatik dalam struktur flavonoid. Transisi ini terjadi saat elektron dari orbital pi bebas (π) di cincin aromatik dipromosikan ke orbital antibonding pi (π^*) yang kosong. Pada puncak 411nm mungkin merupakan transisi $\pi - \pi^*$ yang terjadi ketika elektron dari orbital non bonding (π) pada gugus seperti gugus hidroksil atau karbonil dipromosikan ke orbital antibonding pi (π^*). Transisi ini lebih intensif daripada transisi $\pi - \pi^*$ dan seringkali merupakan puncak utama dalam spektrum UV-Vis Favonoid.

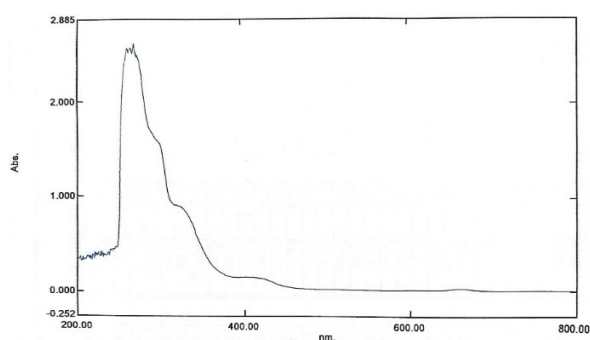
2. Identifikasi senyawa dengan spektro UV-Vis isolat 2



Gambar 6. Spektrum UV Vis Isolat II

Dari hasil UV Vis isolat II terlihat dua puncak absorbansi yang signifikan yaitu pada panjang gelombang 258nm dengan nilai absorbansi 2.656, dan pada panjang gelombang 321nm dengan nilai absorbansi 4.000. puncak UV yang sangat tinggi menunjukkan sistem (π) yang sangat terkonjugasi seperti dalam senyawa poliaromatik atau rantai karbon terkonjugasi yang panjang. Kemungkinan senyawa yang terkandung adalah alkaloid, flavonoid, antrakuinon, atau turunan polifenol lainnya yang umumnya memiliki absorbansi UV yang kuat.

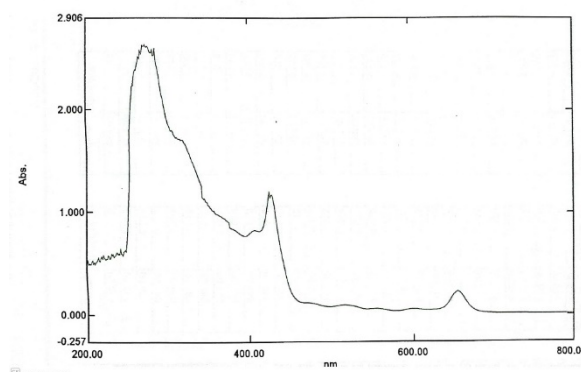
3. Identifikasi senyawa dengan spektro UV-Vis isolat 3



Gambar 7. Spektrum UV Isolat III

Dari hasil UV Vis isolat III terlihat puncak absorbansi yang signifikan tinggi yaitu pada panjang gelombang 269nm dengan nilai absorbansi 2.623, ini menunjukkan bahwa sampel sangat kuat menyerap cahaya pada panjang gelombang UV. Setelah puncak ini absorbansi menurun dengan cepat seiring dengan meningkatnya panjang gelombang yang menunjukkan penurunan penyerapan di daerah UV yang lebih tinggi dan daerah cahaya tampak. Ini menunjukkan bahwa sampel mungkin mengandung senyawa organik yang memiliki ikatan (π) terkonjugasi atau kromofor yang menyerap kuat di daerah UV seperti yang biasa ditemukan dalam berbagai senyawa aromatik atau terkonjugasi.

4. Identifikasi senyawa dengan spektro UV-Vis isolat 4



Gambar 8. Spektrum UV Isolat IV

Dari hasil UV Vis isolat IV terlihat puncak absorbansi yang signifikan tinggi yaitu pada panjang gelombang 272nm dengan nilai absorbansi 2.642. absorbansi menurun secara signifikan setelah puncak menunjukkan penurunan penyerapan cahaya oleh sampel pada panjang gelombang yang lebih tinggi. Terdapat puncak kedua yang lebih rendah pada panjang gelombang 424nm dengan nilai absorbansi 1.188.

KESIMPULAN

Berdasarkan atas hasil pengujian laboratorium dan analisa hasil penelitian serta rujukan dari beberapa pustaka maka dapat disimpulkan bahwa Komponen golongan senyawa metabolit sekunder yang terdapat pada ekstrak etil asetat daun malapari (*Pongamia pinnata*) adalah senyawa alkaloid, steroid dan tanin.

DAFTAR RUJUKAN

- Agoes.G.2007. Teknologi Bahan Alam, ITB Press Bandung
- Alimah, D. (2011). *Budidaya dan potensi malapari (Pongamia pinnata [L.] Pierre.) sebagai tanaman penghasil bahan bakar nabati. Galam*, 5(1), 35–49.
- Aminah, A., Supriyanto, Zulkarnaen, I., & Suryani, A. (2017). *Kandungan minyak malapari (Pongamia pinnata (L.) Pierre) dari Pulau Jawa sebagai bahan baku biodiesel. Jurnal Penelitian Hasil Hutan*, 35(4), 255–262.
- Ghumare, P., Jirekar, D. B., Farooqui, M., & Naikwade, S. D. (2014). A Review of *Pongamia pinnata* – An Important Medicinal

- Plant. *Current Research in Pharmaceutical Sciences*, 4(2), 44–47.
- Gritter, Roy., James, M., Dan Arthur E.S., 1991. Pengantar Kromatografi. Penerbit ITB, Bandung
- Harbone, J.B., 1987, Metode Fitokimia Penuntun Cara Modern Menganalisa Tumbuhan, ITB, Bandung
- Heyne, K. 1987. Tumbuhan berguna indonesia jilid II. Badan penelitian dan pengembangan kehutanan, departemen kehutanan. Jakarta.
- [Lenny S. 2006. *Senyawa flavonoida, fenilpropanoida, dan alkaloida*. Karya ilmiah. Medan: universitas sumatera utara](#)
- Orwa, C., Mutua, A., Kindt, R., Jamnadass, R., & Anthony, S. (2009). Agroforestry Database: a tree reference and selection guide version 4.0.
- Reskika, A. 2011. Evaluasi potensi rumput laut coklat (phaeophyceae) dan rumput laut hijau (chlorophyceae) asal perairan takalar sebagai antibakteri vibrio spp. Skripsi. Makassar: universitas hasanuddin.
- Saputrasari, A. 2015. Isolasi senyawa metabolit sekunder dan uji aktivitas antifungal ekstrak metanol batang tumbuhan patah tulang (*Euphorbia tirucalli* Linn) terhadap jamur *candida albicans*. Skripsi. Kupang: Universitas Nusa Cendana
- Sastrohamidjojo, H. 1996. Sintesis Bahan Alam. Yogyakarta: Gadjah Mada University Press
- Usharani, K. V., Naik, D., & Manjunatha, R. L. (2019). *Pongamia pinnata* (L.): Composition and advantages in agriculture: A review. *Journal of Pharmacognosy and Phytochemistry*, 8(3), 2181-2187.
- Vinolina N.S. 2014. Peningkatan produksi centellosida pada pegagan (*Centella asiatica*) melalui pemberian fosfor dan metil jasmonat dengan umur panen yang berbeda. [Disertasi]. Sumatera Utara (ID): Universitas Sumatera Utara.
- Voight, R. (1995). Buku Pelajaran Teknologi Farmasi, diterjemahkan oleh. Soendari Noerono. Yogyakarta: Gajah Mada University Press.
- Widodo, N., 2007. Isolasi Dan Karakterisasi Senyawa Alkaloid Yang Terkandung Dalam Jamur Tiram Putih (*Pleurotus Astreatus*), Skripsi, Jurusan Kimia, Fakultas Matematika Dan Ilmu Pengetahuan Alam, Universitas Negeri Semarang, Semarang
- Yadav, R. D., Jain, S. K., Alok, S., Prajapati, S. K., & Verma, A. (2011). *Pongamia pinnata*: an overview. *International Journal of Pharmaceutical Science and Research*, 2(3), 494–500.