

Identifikasi senyawa dalam ekstrak etanol biji buah merah (*Pandanus conoideus*)

Identification of compounds in red fruit (*Pandanus conoideus*) seed ethanol extract

IDA SUNDARI, FAJAR RAKHMAN WIBOWO

Jurusan Kimia, Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam, Universitas Sebelas Maret. Jl. Ir. Sutami 36a, Surakarta 57126, Jawa Tengah

Manuskrip diterima: 3 Maret 2015. Revisi disetujui: 29 Juli 2015.

Abstract. Sundari, Wibowo FR. 2015. *Identification of compounds in red fruit (Pandanus conoideus) seed ethanol extract.* Biofarmasi 13: 78-89. 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 maceration method using ethanol 96%. As much as 10.953 g of concentrate ethanol extract was yielded from 150 g 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, phenolic compound glycoside, and fatty acid glycoside. Then ethanol extract was separated by various separation methods, 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 has 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 dominate 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 have potential as a drug because tannins and glycosides (anthraquinone and phenolic compounds) are generally antioxidant compounds.

Keywords: Glycosides, *Pandanus conoideus*, red fruit, seed, sephadex column chromatography, tannin

PENDAHULUAN

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 (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 (*Parinarium 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 (Harborne 1984), 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.

Tujuan penelitian ini adalah (i) Mengetahui kadar masing-masing golongan senyawa yang teridentifikasi dalam ekstrak etanol biji buah merah dengan skrinning fitokimia. (ii) Mengetahui metode pemisahan yang tepat untuk memisahkan komponen polar biji buah merah. (iii) Mengetahui senyawa polar yang teridentifikasi dalam ekstrak etanol biji buah merah setelah dilakukan pemisahan.

BAHAN DAN METODE

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 skrinning 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 skrinning fitokimia lebih lanjut untuk memperoleh golongan senyawa yang lebih spesifik.

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.

Alat dan Bahan

Alat utama yang digunakan adalah Sokhlet, *vacuum rotary evaporator*, *Buchner*, Plat KLT, TLC Chamber, Lampu UV 254 nm dan 365 nm, alat kromatografi kolom *flash* dan HPLC. Bahan tumbuhan yang digunakan adalah biji buah merah dari Papua. Bahan lain yang digunakan antara lain

Bahan-bahan yang digunakan dalam penelitian ini adalah: asetonitril for HPLC grade (Merck), CH_3COOH anhidrat (Merck), dietil eter p.a (Merck), etanol 96% (Merck), etil asetat p.a (Merck), FeCl_3 p.a (Merck), H_2SO_4 p.a (Merck), H_3PO_4 p.a (Merck), HCl p.a (Merck), $\text{K}_3[\text{Fe}(\text{CN})_6]$ p.a (Merck), Kertas saring (bratachem), kloroform p.a (Merck), KOH p.a (Merck), logam Mg, metanol p.a (Merck), mikrofilter 0.45 μm , Na_2SO_4 anhidrat (Merck), NaOH p.a (Merck), n-heksan (Merck), Petroleum eter p.a (Merck), plat KLT silika gel GF254 (Merck), Silika gel for column (Merck).

Prosedur penelitian

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.

Ekstraksi

Sebanyak 150 g 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.

Skrinning fitokimia

Skrinning fitokimia (uji tabung) terhadap ekstrak etanol, sebagai berikut:

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 Na_2SO_4 anhidrat. Lapisan eter ini merupakan bagian aglikon (bebas gula).

Senyawa fenolik: Lebih kurang 1 mL ekstrak eter diuapkan kemudian ditetesi dengan kalium heksasianoferrat (III) dan larutan FeCl_3 . Larutan hitam kehitaman yang terbentuk menunjukkan adanya senyawa fenolik

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.

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

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

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.

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.

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

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*.

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 g yang diaktivasi 24 jam pada suhu 110°C. Kolom kromatografi *flash* yang dipakai berdiameter 2 cm. silika gel teraktivasi dibuat kolom dengan cara basah/dibuat bubur dengan pelarut *n*-heksana. Kolom tersebut dikondisikan selama 24 jam sebelum digunakan untuk elusi.

Proses elusi dimulai dari pelarut yang diperoleh dari KLT kemudian ditingkatkan kepolarannya 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 R_f -nya dengan hasil KLT sebelumnya untuk memastikan bahwa sampel dapat memisah dengan baik. vial yang mempunyai R_f identik dengan hasil KLT sebelumnya dilakukan pemisahan lebih lanjut.

Kromatografi kolom Sephadex

Kromatografi ini menggunakan sephadex LH-20. Sebanyak 1,356 g sampel dielusikan dalam kolom sephadex siap pakai. Sampel dielusikan gravitasi dengan pelarut metanol 100% sampai seluruh sampel dapat terelusikan 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.

High Performance Liquid Chromatography (HPLC)

Kondisi operasi alat HPLC : Fase diam: kolom C18, Fase gerak: asetonitril : 0.4 % H_3PO_4 dalam aquabides (10:90), Kecepatan alir: 1 mL/menit, Detektor UV pada λ 280 nm, Jumlah sampel : 20 μL /injeksi. Sampel yang diinjeksi meliputi pelarut etanol 95% (standar) dan ekstrak etanol biji buah merah.

Analisis data

Data yang diperoleh dari hasil penelitian yaitu golongan senyawa metabolit sekunder yang terkandung dalam ekstrak etanol dari hasil skrining fitokimia. Penentuan fase diam dan eluen dengan menggunakan KLT akan diperoleh data berupa spot-spot hasil pemisahan dan nilai R_f untuk tiap perbandingan eluen *n*-heksana 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 R_f yang kemudian dibandingkan dengan nilai R_f 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.

HASIL DAN PEMBAHASAN

Ekstraksi

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 g 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 g.

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 kuartern, antosianin, glikosida, saponin, dan tanin. Menurut Moeljopawiro et al. (2007), 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).

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.

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 (Manito 1985). 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)

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.

Kromatografi kolom flash

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 divariasi tingkat kepolarannya dengan memvariasi 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 dielus 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.

Hasil pemisahan terbaik pada perbandingan *n*-heksana : etil asetat (1:3) yang dapat dilihat pada Gambar 1. 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.

Menurut Still et al. (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*.

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 0,8g (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 2.

Gambar 2 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.

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 mengelusi 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 1). 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, 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 kromatografi 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.

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.

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 keruan 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 g 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 3.

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 3 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 3 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 4.

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.

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

Uji fitokimia	Pereaksi uji	Perubahan	Kesimpulan
Saponin	Ditambah air lalu dikocok	Tidak terbentuk buih/busa	-
Tanin	H ₂ O, FeCl ₃	Hijau kehitaman	+
Antosianin	Suasana asam	Merah bata	-
Glikosid:			
- fenol,	FeCl ₃	Hijau	+
- flavonoid,	Mg(s) dan HCl	Tidak ada	-
- antrakuinon,	NaOH 10%	Merah bata	+
- asam lemak	-	Sisa berminyak	+

Keterangan: (+) uji positif; (-) uji negatif

Tabel 2. Hasil skrinning fitokimia partisi ekstrak etanol biji buah merah

Kandungan kimia	Ekstrak etanol	Ekstrak <i>n</i> -heksan
Tanin katekin	+	-
Senyawa fenolik bebas	+	-
Antrakuinon	+	-
Asam lemak	-	+

Pendugaan lain yang menyebabkan tanin muncul pada fraksi tengah adalah tanin yang dielusi 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 (Manito 1985). Identifikasi yang dilakukan oleh Plazonic et al. 2009 menunjukkan bahwa tanin yang teridentifikasi terikat dengan suatu molekul gula membentuk suatu glikosida. 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.

High Performance Liquid Chromatography (HPLC)

Metode ini dipilih karena hasil skrinning 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.

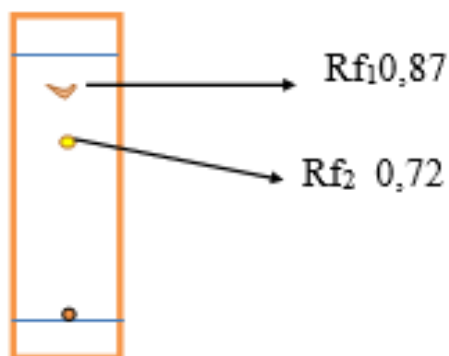
HPLC adalah suatu metode deteksi dan kuantifikasi yang sensitifitasnya sangat tinggi untuk berbagai senyawa kimia dalam suatu sampel partikular menggunakan absorbansi UV-Vis (Hanachi 2009). HPLC dengan fase normal kurang umum dibanding dengan fase terbalik (Rohman 2007). Yang dimaksud Fase terbalik adalah 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 µL 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 dielusi pada panjang gelombang 280 nm. Pada panjang gelombang tersebut, senyawa-senyawa yang diduga dalam ekstrak etanol dapat terdeteksi.

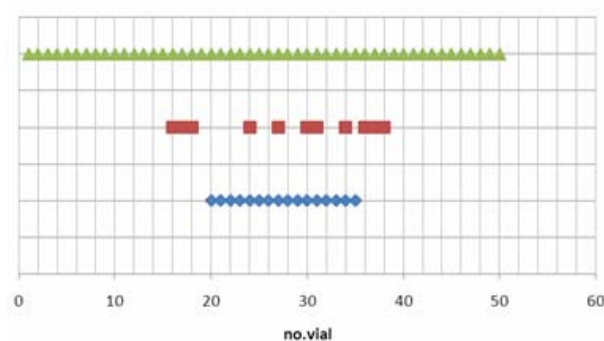
Kromatogram HPLC ekstrak etanol biji buah merah pada Gambar 5, menunjukkan adanya 7 puncak utama yang terpisah dengan baik. Akan tetapi puncak I yang terdeteksi diduga merupakan serapan senyawa dari pelarutnya (etanol 96%) karena waktu retensinya (Tr) sama dengan waktu retensi hasil penginjeksian etanol 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). 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.

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*.

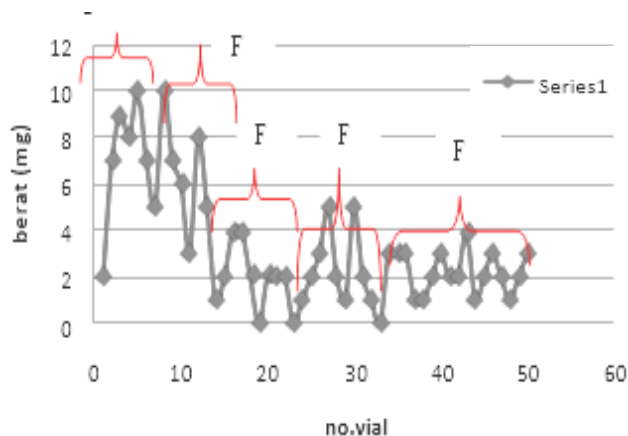


Gambar 1. Profil KLT Ekstrak Etanol Biji Buah Merah dengan Sistem Eluen *n*-heksan : Etil Asetat (1 : 3)

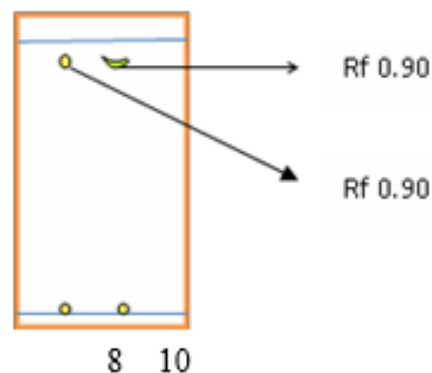


an : ◆ tanin katekin ■ antrakuinon ▲ Senyawa fenolik

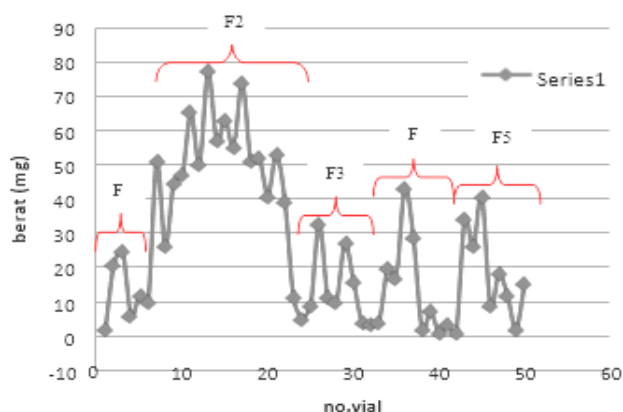
Gambar 4. Diagram hasil skrining fitokimia hasil pemisahan kromatografi kolom Sephadex



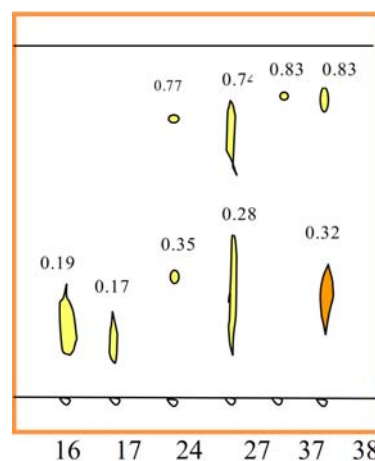
Gambar 2. Diagram no.vial vs berat hasil pemisahan kromatografi kolom *flash*, menunjukkan setidaknya ada 5 fraksi dalam ekstrak etanol biji buah merah



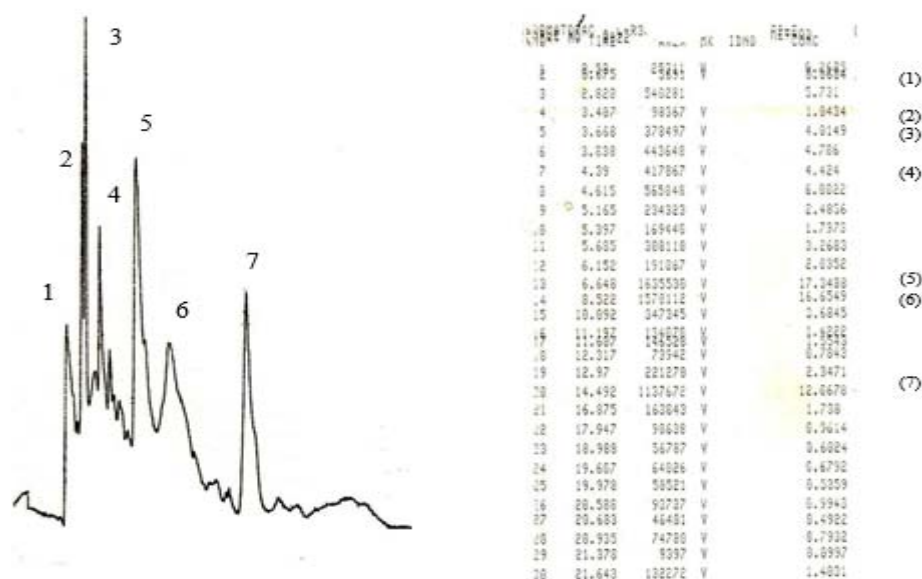
Gambar 6. Profil KLT senyawa pada vial no. 8 dan 10 hasil pemisahan kromatografi kolom *flash*, Rf spot KLT yang dihasilkan serupa dengan spot 1 KLT pra kolom



Gambar 3. Diagram no.vial vs berat hasil pemisahan kromatografi kolom Sephadex, menunjukkan setidaknya terdapat 5 fraksi dalam ekstrak etanol biji buah merah



Gambar 7. 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 5. 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

Pola pemisahan dengan eluen *n*-heksana-etil asetat 1:3 (Gambar 1) 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 1 (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 *Rf* 0,90 berwarna orange pada sinar biasa dan kuning kehijauan di bawah lampu UV 365 nm (Gambar 6). Setelah dicocokkan dengan profil KLT ekstrak etanol pra kolom (Gambar 1), warna spotnya sama sedangkan harga *Rf* yang dihasilkan hampir sama dengan spot 1 pada profil KLT pra kolom. Harga *Rf*

pada spot 1 pra kolom adalah 0,87 dan warna spotnya 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.

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. 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 7.

Gambar 7 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 Rfnya 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. Apabila hasil uji penegasan KLT dan uji tabung skrining fitokimia digabung, antron dalam ekstrak etanol biji buah merah ini mempunyai gugus hidroksil fenolik, itu artinya antron mengikat gugus hidroksil fenolik.

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 5) dan diagram no. vial vs berat hasil pemisahan sephadex (Gambar 3) 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.

Kebanyakan antrakuinon dari tumbuhan tinggi dihidroksilasi pada C-1, 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. Data ini sesuai dengan hasil skrinning 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 skrinning fitokimia terhadap antrakuinon dengan uji penegasan KLT (Gambar 7), spotnya berwarna kuning kehijauan yang menunjukkan bahwa antrakuinon yang terdeteksi telah tereduksi menjadi antron. Apabila proses reduksi ini berlanjut antron tereduksi menjadi antranol.

Berdasarkan uji skrinning fitokimia fraksi-fraksi yang diperoleh dari kromatografi kolom Sephadex, dilakukan analisis kuantitatif senyawa yang berhasil dipisahkan. Jumlah tanin dalam 1,356 g 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 tidak ditunjukkan). 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.

KESIMPULAN

Dari hasil penelitian dengan pembahasan sebelumnya dapat diambil kesimpulan bahwa: Hasil skrinning 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. Kromatografi kolom Sephadex merupakan metode pemisahan yang tepat untuk memisahkan komponen polar ekstrak etanol biji buah merah. 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.

DAFTAR PUSTAKA

- Amarowicz R, Estella I, Hernandez T, Duenas M, Troszynska A, Kosinska A, Pegg RB. 2009. Antioxidant activity of a red lentil extract and its fractions. *Intl J Mol Sci* 10: 5513- 5527
- Budi IM. 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 IM, Paimin FR. 2005. Buah Merah. Penebar Swadaya, Jakarta.
- Hanachi P. 2009. Using HPLC to determination the composition and antioxidant activity of *Berberis vulgaris*. *Eur J Sci Res* 29: 47-54.
- Harris CS, Burt AJ, Saleem A, Lee PM, Martineau LC, Haddad PS, Bennett SAL, Arnason JT. 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 angustifolium*. *Phytochemical Analysis Journal* Vol. 18. Hal. 161-169.
- Manito P. 1985. Biosynthesis of Natural Products. John Wiley and Sons, London.
- Kristanti AN, Aminah NS, Tanjung M, Kurniadi B. 2008. Fitokimia. Airlangga University Press. Surabaya.
- Li X, Liu Z, Chen Y, Wang LJ, Zheng ZN, Sun GZ, Ruan CC. 2009. Rubiacordone A : A New Anthraquinone Glycoside from The *Rubia cordifolia*. *Molecules* 14: 2986-2997.
- Marliyana SD, Wibowo FR, Handayani N, Rahmawati R. 2010. Penentuan Kandungan Kimia dan Uji Toksisitas Ekstrak Etanol Buah Merah (*Pandanus conoideus* Lamk.). Penelitian DP2M Hibah bersaing 2009 LPPM UNS.
- Moeljopawiro S, Anggelia MR, Ayuningtyas D, Widaryanti B, Sari Y, Budi IM. 2007. Pengaruh sari buah merah (*Pandanus conoideus* Lamk.) terhadap pertumbuhan sel kanker payudara dan sel kanker usus besar. *Jurnal Berkala Ilmiah Biologi* 2: 121-130.
- Mitic MN, Obradović MV, Grahovac ZB, Pavlović AN. 2010. Antioxidant capacities and phenolic levels of different varieties of serbian white wines. *Molecules* 15: 2016-2027.
- Mu'nim A, Andrajati R, Susilowati H. 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* 3: 153-161.
- Murhadi, Soewarno TS, Jennie BSL, Apriyantono A, Yasni S. 2004. Karakteristik Spektroskopi Isolat Antibakteri Biji Atung (*Parinari glaberrimum* Hassk). *Jurnal Teknologi dan Industri Pangan* 15: 1-10.
- Harborne JB. 1984. Phytochemical Methods. Chapman and Hall Ltd, London.
- Pegg RB, Rybarczyk A, Amarowicz R. 2008. Chromatographic Separation of Tannin Fraction from A. Bearberry Leaf (*Arctostaphylos uva-ursi*. L. Sprengel) Extract by SE-HPLC. A short Report. *Polish J Food Nutr Sci* 58: 485-490.
- Plazonic A, Bucar F, Males Ž, Mornar A, Nigović B, Kujundžić N. 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* 14: 2466-2490.
- Robinson T. 1993. *Kandungan Organik Tumbuhan Tinggi*. ITB Press. Bandung.
- Rohman A. 2007. *Kimia Farmasi Analisis*. PustakaPelajar. Yogyakarta
- Santana CM, Ferrera ZS, Padron MET, Rodriquez JJS. 2009. Methodologies for the extraction of phenolic compounds from enviromental samples : new approaches. *Molecules* 14: 298- 320.
- Santi SR. 2009. Penelusuran senyawa sitotoksik pada kulit biji nyamplung (*Calophyllum inophyllum* L.) dan kemungkinan korelasinya sebagai anti kanker. *Jurnal Kimia* 2: 101-108.
- Sari EK. 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, Bogor.
- Septiyaningsih D. 2010. Isolasi dan Identifikasi Komponen Utama Ekstrak Biji Buah Merah (*Pandanus conoideus* Lamk.). [Skripsi]. Jurusan Kimia, Fakultas MIPA, Universitas Sebelas Maret.
- Still C, Kahn M, Mitra A. 1978. Rapid chromatographic technique for preparatives separations with moderate resolution. *J Org Chem* 43 (14):-.
- Suharto E. 2004. Struktur biji, sifat fisik biji, dan karakteristik benih kayu afrika (*Maesopris eminii* Engl) Provenan Padang Jaya. *Jurnal Akta Agrosia* 7 (1): 24-32.
- Thitilertdecha N, Teerawutgulrag A, Killburn JD, Rekariyatham N. 2010. Identification of major phenolic compounds from *Nephetium lappaceum* L. and their antioxidant activities. *Molecules* 15: 1453-1465.
- Tjitrosoepomo G. 2005. *Morfologi Tumbuhan*. Edisi ke-15. Gadjah Mada University Press. Yogyakarta.
- Tsimogiannis D, Samiotaki M, Panayotou G, Oreopoulou V. 2007. Characterization of flavonoid subgroups and hydroxy substitution by HPLC-MS/MS. *Molecules* 12: 593-606.
- Wahyuniari I, Soesatyo MHNE, Ghufro M, Yustina, Sumiwi AA, Wiryawan S. 2009. Minyak buah merah meningkatkan aktivitas proliferasi limfosit limpa mencit setelah infeksi listeria monocytogenes. *Jurnal Veteriner* 10: 143-149.
- Zhang LL, Lin YM. 2008. HPLC, NMR, and MALDI-TOF MS analysis of condensed tannins from *Lithocarpus glaber* leaves with potent free radical scavenging activity. *Molecules* 13: 2986-2997.