

EKSTRAKSI, PEMISAHAN SENYAWA, DAN IDENTIFIKASI SENYAWA AKTIF

Mukhriani*

* Program Studi Farmasi Fakultas Ilmu Kesehatan UIN Alauddin Makassar

Abstrak

Ekstraksi merupakan proses pemisahan bahan dari campurannya dengan menggunakan pelarut yang sesuai. Proses ekstraksi dihentikan ketika tercapai kesetimbangan antara konsentrasi senyawa dalam pelarut dengan konsentrasi dalam sel tanaman. Setelah proses ekstraksi, pelarut dipisahkan dari sampel dengan penyaringan. Ekstrak awal sulit dipisahkan melalui teknik pemisahan tunggal untuk mengisolasi senyawa tunggal. Oleh karena itu, ekstrak awal perlu dipisahkan ke dalam fraksi yang memiliki polaritas dan ukuran molekul yang sama.

Identifikasi golongan senyawa dilakukan dengan uji warna, penentuan kelarutan, bilangan Rf dan ciri spectrum UV. Identifikasi yang paling penting dan digunakan secara luas ialah pengukuran spektrum serapan dengan menggunakan spektrofotometer.

Kata Kunci : Ekstraksi, Identifikasi Senyawa

PENDAHULUAN

Indonesia merupakan salah satu negara dengan kekayaan hayati terbesar yang memiliki lebih dari 30.000 spesies tanaman tingkat tinggi. Hingga saat ini tercatat 7000 spesies tanaman telah diketahui khasiatnya namun kurang dari 300 tanaman yang digunakan sebagai bahan baku industri farmasi secara reguler. WHO pada tahun 2008 mencatat bahwa 68% penduduk dunia masih bergantung sistem pengobatan tradisional yang mayoritas melibatkan tumbuhan untuk menyembuhkan penyakit dan lebih dari 80% penduduk dunia menggunakan obat herbal untuk mendukung kesehatan mereka (Saifuddin, dkk., 2011).

Untuk mendukung hal tersebut maka

dilakukan pengembangan obat tradisional melalui penelitian-penelitian ilmiah terbaru dan diproduksi secara modern agar bisa dimanfaatkan sebagai obat untuk kepentingan kesehatan dan kesejahteraan masyarakat. Proses saintifikasi tersebut sangat penting agar penggunaan obat tradisional tidak berdasarkan pengalaman saja tetapi memiliki bukti ilmiah sehingga bisa digunakan dalam sistem pelayanan kesehatan formal yang modern.

Salah satu metode yang digunakan untuk penemuan obat tradisional adalah metode ekstraksi. Pemilihan metode ekstraksi tergantung pada sifat bahan dan senyawa yang akan diisolasi. Sebelum memilih suatu metode, target ekstraksi perlu ditentukan terlebih dahulu. Ada be-

berapa target ekstraksi, diantaranya (Sarker SD, dkk., 2006):

1. Senyawa bioaktif yang tidak diketahui
2. Senyawa yang diketahui ada pada suatu organisme
3. Sekelompok senyawa dalam suatu organisme yang berhubungan secara struktural.

Semua senyawa metabolit sekunder yang dihasilkan oleh suatu sumber tetapi tidak dihasilkan oleh sumber lain dengan kontrol yang berbeda, misalnya dua jenis dalam marga yang sama atau jenis yang sama tetapi berada dalam kondisi yang berbeda. Identifikasi seluruh metabolit sekunder yang ada pada suatu organisme untuk studi sidik jari kimiawi dan studi metabolomik.

Proses ekstraksi khususnya untuk bahan yang berasal dari tumbuhan adalah sebagai berikut :

1. Pengelompokan bagian tumbuhan (daun, bunga, dll), pengeringan dan penggilingan bagian tumbuhan.
2. Pemilihan pelarut
3. Pelarut polar: air, etanol, metanol, dan sebagainya.
4. Pelarut semipolar: etil asetat, diklorometan, dan sebagainya.
5. Pelarut nonpolar: n-heksan, petroleum eter, kloroform, dan sebagainya.

Ekstraksi

Jenis-jenis metode ekstraksi yang

dapat digunakan adalah sebagai berikut :

Maserasi

Maserasi merupakan metode sederhana yang paling banyak digunakan. Cara ini sesuai, baik untuk skala kecil maupun skala industri.(Agoes,2007). Metode ini dilakukan dengan memasukkan serbuk tanaman dan pelarut yang sesuai ke dalam wadah inert yang tertutup rapat pada suhu kamar. Proses ekstraksi dihentikan ketika tercapai kesetimbangan antara konsentrasi senyawa dalam pelarut dengan konsentrasi dalam sel tanaman. Setelah proses ekstraksi, pelarut dipisahkan dari sampel dengan penyaringan. Kerugian utama dari metode maserasi ini adalah memakan banyak waktu, pelarut yang digunakan cukup banyak, dan besar kemungkinan beberapa senyawa hilang. Selain itu, beberapa senyawa mungkin saja sulit diekstraksi pada suhu kamar. Namun di sisi lain, metode maserasi dapat menghindari rusaknya senyawa-senyawa yang bersifat termolabil.

Ultrasound - Assisted Solvent Extraction

Merupakan metode maserasi yang dimodifikasi dengan menggunakan bantuan *ultrasound* (sinyal dengan frekuensi tinggi, 20 kHz). Wadah yang berisi serbuk sampel ditempatkan dalam wadah *ultrasonic* dan *ultrasound*. Hal ini dilakukan untuk memberikan tekanan mekanik pada sel hingga menghasilkan rongga pada sampel. Kerusakan sel dapat menyebabkan peningkatan kelarutan senyawa dalam pel-

arut dan meningkatkan hasil ekstraksi.

Perkolasi

Pada metode perkolasi, serbuk sampel dibasahi secara perlahan dalam sebuah perkolator (wadah silinder yang dilengkapi dengan kran pada bagian bawahnya). Pelarut ditambahkan pada bagian atas serbuk sampel dan dibiarkan menetes perlahan pada bagian bawah. Kelebihan dari metode ini adalah sampel senantiasa dialiri oleh pelarut baru. Sedangkan kerugiannya adalah jika sampel dalam perkolator tidak homogen maka pelarut akan sulit menjangkau seluruh area. Selain itu, metode ini juga membutuhkan banyak pelarut dan memakan banyak waktu.

Soxhlet

Metode ini dilakukan dengan menempatkan serbuk sampel dalam sarung selulosa (dapat digunakan kertas saring) dalam klonsong yang ditempatkan di atas labu dan di bawah kondensor. Pelarut yang sesuai dimasukkan ke dalam labu dan suhu penangas diatur di bawah suhu reflux. Keuntungan dari metode ini adalah proses ekstraksi yang kontinyu, sampel terekstraksi oleh pelarut murni hasil kondensasi sehingga tidak membutuhkan banyak pelarut dan tidak memakan banyak waktu. Kerugiannya adalah senyawa yang bersifat termolabil dapat terdegradasi karena ekstrak yang diperoleh terus-menerus berada pada titik didih.

Reflux dan Destilasi Uap

Pada metode reflux, sampel dimasukkan bersama pelarut ke dalam labu yang dihubungkan dengan kondensor. Pelarut dipanaskan hingga mencapai titik didih. Uap terkondensasi dan kembali ke dalam labu.

Destilasi uap memiliki proses yang sama dan biasanya digunakan untuk mengekstraksi minyak esensial (campuran berbagai senyawa menguap). Selama pemanasan, uap terkondensasi dan destilat (terpisah sebagai 2 bagian yang tidak saling bercampur) ditampung dalam wadah yang terhubung dengan kondensor. Kerugian dari kedua metode ini adalah senyawa yang bersifat termolabil dapat terdegradasi (Seidel V 2006).

Pemisahan Senyawa

Kromatografi Lapis Tipis (Thin Layer Chromatography)

Kromatografi Lapis Tipis (KLT) dan kromatografi kolom pada prinsipnya sama. Apabila suatu cuplikan yang merupakan campuran dari beberapa komponen yang diserap lemah oleh adsorben akan keluar lebih cepat bersama eluen, sedangkan komponen yang diserap kuat akan keluar lebih lama (Hostettman, 1995). KLT merupakan suatu teknik pemisahan dengan menggunakan adsorben (fase stasioner) berupa lapisan tipis seragam yang disalutkan pada permukaan bidang datar berupa

lempeng kaca, pelat aluminium, atau pelat plastik. Pengembangan kromatografi terjadi ketika fase gerak tertapis melewati adsorben (Deinstrop, Elke H, 2007).

KLT dapat digunakan jika :

1. Senyawa tidak menguap atau tingkat penguapannya rendah.
2. Senyawa bersifat polar, semi polar, non polar, atau ionik.
3. Sampel dalam jumlah banyak harus dianalisis secara simultan, hemat biaya, dan dalam jangka waktu tertentu.
4. Sampel yang akan dianalisis akan merusak kolom pada Kromatografi Cair (KC) ataupun Kromatografi Gas (KG).
5. Pelarut yang digunakan akan mengganggu penjerap dalam kolom Kromatografi Cair.
6. Senyawa dalam sampel yang akan dianalisis tidak dapat dideteksi dengan metode KC ataupun KG atau memiliki tingkat kesulitan yang tinggi.
7. Setelah proses kromatografi, semua komponen dalam sampel perlu dideteksi (berkaitan dengan nilai Rf).
8. Komponen dari suatu campuran dari suatu senyawa akan dideteksi terpisah setelah pemisahan atau akan dideteksi dengan berbagai metode secara bergantian (misalnya pada *drug screening*).

9. Tidak ada sumber listrik.

KLT digunakan secara luas untuk analisis *solute-solute organic* terutama dalam bidang biokimia, farmasi, klinis, forensic, baik untuk analisis kualitatif dengan cara membandingkan nilai Rf solut dengan nilai Rf senyawa baku atau untuk analisis kualitatif (Gandjar IG., 2008). Penggunaan umum KLT adalah untuk menentukan banyaknya komponen dalam campuran, identifikasi senyawa, memantau berjalannya suatu reaksi, menentukan efektifitas pemurnian, menentukan kondisi yang sesuai untuk kromatografi kolom, serta untuk memantau kromatografi kolom, melakukan *screening* sampel untuk obat (Gandjar IG, 2008).

Flash Chromatography Column (Sepacore®)

Flash Chromatography Column dipopulerkan oleh Clark W. Still dari Universitas Columbia pada tahun 1978, sebagai alternatif lain dari kromatografi gravitasi yang lambat dan sering tidak efisien. *Flash chromatography* berbeda dari teknik konvensional, yaitu partikel silika gel yang digunakan sedikit lebih kecil yaitu silika gel 60, 70-230 mesh (63-200 μm), aliran pelarut terbatas yang disebabkan oleh partikel silika gel kecil, dan menggunakan tekanan gas nitrogen (ca. 10-15 psi) untuk mendorong pelarut melalui kolom dari fase diam. Hasil akhirnya cepat dengan kromatografi yang beresolusi

tinggi. Sepacore[®] *flash chromatography* menjawab keterbatasan dalam *flash chromatography column* dengan meningkatkan tekanan sampai dengan 10 bar/145 psi atau 50 bar/725 psi. Sistem kromatografi ini sepenuhnya otomatis termasuk deteksi UV, kolektor fraksi dan perangkat lunak di antara banyak fitur dapat diatur sesuai dengan kebutuhan spesifik pemisahan. *Flash chromatography* merupakan sistem pemisahan yang sangat populer sekarang ini, karena sangat mudah untuk dilakukan, fleksibel, dan dapat dikerjakan secara universal (Talamona, 2005).

c. Fraksinasi

Ekstrak awal merupakan campuran dari berbagai senyawa. Ekstrak awal sulit dipisahkan melalui teknik pemisahan tunggal untuk mengisolasi senyawa tunggal. Oleh karena itu, ekstrak awal perlu dipisahkan ke dalam fraksi yang memiliki polaritas dan ukuran molekul yang sama. Fraksinasi dapat dilakukan dengan metode ekstraksi cair-cair atau dengan kromatografi cair vakum (KCV), kromatografi kolom (KK), *size-exclusion chromatography* (SEC), *solid-phase extraction* (SPE) (Sarker SD, dkk., 2006).

Isolasi Senyawa

Faktor yang perlu diperhatikan sebelum melakukan isolasi adalah sifat dari senyawa target yang ada dalam ekstrak awal atau dalam fraksi. Sifat umum molekul yang dapat membantu proses isolasi

yaitu kelarutan (hidrofilisitas atau hidrofobisitas), sifat asam-basa, muatan, stabilitas, dan ukuran molekul. Sifat ekstrak juga dapat membantu dalam pemilihan metode isolasi yang tepat. Misalnya, suatu ekstrak metanol atau fraksi dari suatu ekstrak mengandung senyawa polar lebih baik dilakukan *reversed-phase HPLC* (RP-HPLC). Berbagai sifat fisika dari ekstrak juga dapat ditentukan dengan beberapa percobaan berikut (Sarker SD, dkk., 2006):

Hidrofobisitas atau hidofilisitas. Suatu indikasi polaritas ekstrak sesuai dengan senyawa yang ada dalam ekstrak dapat dideterminasi dengan mengeringkan aliquot dari campuran dan mencoba melarutkannya kembali dalam variasi pelarut pada beberapa tingkatan polaritas.

Sifat asam-basa. Sifat ini membawa partisi dalam pelarut air pada range pH, khususnya 3, 7, dan 11 dapat membantu determinasi sifat asam-basa dari senyawa dalam ekstrak.

Muatan. Informasi nilai muatan dari senyawa dapat diiperoleh dengan pengujian pada sejumlah kondisi, efek dari penambahan beberapa penukar ion ke dalam campuran. Informasi ini dapat digunakan untuk merancang metode isolasi yang melibatkan kromatografi penukar ion.

Stabilitas terhadap panas. Tes stabilitas terhadap panas dilakukan dengan menginkubasi sampel pada suhu 90°C

selama 11 menit dalam penangas air diikuti dengan pengujian terhadap senyawa yang tidak terpengaruh.

Ukuran. Tabung dialisis dapat digunakan untuk pengujian adanya makromolekul seperti protein yang ada dalam ekstrak.

1. *Droplet Countercurrent Chromatography (DCCC)*
2. Kromatografi Cair Kinerja Tinggi (KCKT/HPLC)
3. *Hyphenated techniques* (HPLC-PDA, LC-MS, LC-NMR, LC-MS NMR)

Metode Identifikasi

Identifikasi golongan senyawa dapat dilakukan dengan uji warna, penentuan kelarutan, bilangan Rf dan ciri spectrum UV (Harborne, 1998). Identifikasi yang paling penting dan digunakan secara luas ialah pengukuran spektrum serapan dengan menggunakan spektrofotometer. Pengukuran ini tidak merusak senyawa dan senyawa dapat dipakai lagi untuk uji-uji yang lain. Seringkali gabungan kromatografi dan spektrofotometri memungkinkan fraksinasi menjadi sempurna terhadap campuran alami yang sangat kecil jumlahnya dan identifikasi setiap komponennya secara pasti.

Tiga jenis spektrum serapan telah dikenal yaitu sinar tampak, ultraviolet dan inframerah. Kesamaan spektrum inframerah suatu senyawa murni yang

tidak diketahui dengan senyawa pembanding dapat dianggap sebagai bukti bahwa kedua senyawa itu sama. Spektrum serapan ultraviolet-visibel tidak didasarkan pada getaran atom dalam molekul akan tetapi pada kenyataannya elektron tertentu yang terikat longgar dapat ditingkatkan ke arah energi yang lebih tinggi dengan menyerap radiasi dengan panjang gelombang tertentu.

Spektra UV digunakan untuk mengetahui keberadaan ikatan rangkap terkonjugasi pendek misalnya aromatik dan panjang misalnya karotenoida. Spektra IR digunakan untuk mengetahui gugus fungsi dan perkiraan jenis senyawa (Harborne, 1998).

Spektrofotometer UV

Daerah pengukuran spektrofotometer UV adalah pada panjang gelombang 200-400 nm. Spektrum UV disebut juga spektrum elektronik karena terjadi sebagai hasil interaksi radiasi UV terhadap molekul yang mengakibatkan molekul tersebut mengalami transisi elektronik. Apabila radiasi elektromagnetik dikenakan pada suatu molekul atau atom maka sebagian dari radiasi tersebut diserap oleh molekul atau atom tersebut sesuai dengan strukturnya yang mempunyai gugus kromofor (Mulja, 1990).

Spektrofotometer IR

Radiasi *infrared* (IR) atau infrared merupakan bagian dari spektrum elektro-

magnetik antara daerah gelombang cahaya tampak dan gelombang mikrowafe. Penggunaan terbesar terhadap kimia organik adalah pada panjang gelombang 4000-400 cm^{-1} . Frekuensi radiasi IR kurang dari 100 cm^{-1} diabsorpsi dan diubah oleh molekul organik menjadi energi rotasi molekul. Serapan ini diukur. Radiasi IR dalam daerah panjang gelombang 10000-100 cm^{-1} diabsorpsi dan diubah oleh sebuah molekul organik ke dalam energi vibrasi molekul. Serapan ini juga dihitung. Tapi, spektrum vibrasi muncul sebagai tanda lebih baik karena sebuah perubahan energi vibrasi tunggal diikuti oleh sejumlah perubahan energi rotasi. Absorpsi frekuensi atau panjang gelombang tergantung pada massa relatif atom, gaya konstan ikatan dan geometri atom.

Posisi tanda dalam spektrum IR disajikan dalam jumlah gelombang yang memiliki satuan cm^{-1} . Jenis ikatan yang dapat ditunjukkan pada daerah serapan 1300-800 cm^{-1} (C-C, C-O, C-N), 1900-1500 cm^{-1} (C=O, C=N, N=O), 2300-2000 cm^{-1} (C≡C, C≡N), dan 3000-2200 (C-H, O-H, N-H) (Silverstain, 1998).

DAFTAR PUSTAKA

- Agoes.G.2007. *Teknologi Bahan Alam*, ITB Press Bandung.
- Deinstrop, Elke. 2007. *Applied Thin-Layer Chromatography*. 2nd ed. Weinheim: Wiley-VCA hal. 1-2.
- Gandjar IG & Abdul R. 2008. *Kimia Farmasi Analisis*. Yogyakarta. Pustaka Pelajar.
- Hostettman, 1995. Cara Kromatografi Preparatif”Penggunaan pada Isolasi Senyawa Alam” ITB, Bandung
- Harborne JB. 1998. *Phytochemical Methods: A guide to modern techniques of plant analysis 3rd Edition*. Chapman and Hall, London.
- Saifuddin A, Rahayu, Yuda Hilwan. 2011. *Standarisasi Bahan Obat Alam*. Graha Ilmu. Yogyakarta. hal. 1-22.
- Seidel V. Initial and ulkextraction. In: Sarker SD, Latif Z & Gray AI, editors. *Natural product Isolation*, 2nd ed. Totowa (Ney Jersey). Humana Press Inc. 2006. hal. 31-5
- Sarker SD, Latif Z, & Gray AI. 2006. Natural products isolation. In: Sarker SD, Latif Z, & Gray AI, editors. *Natural Products Isolation*. 2nd ed. Totowa (New Jersey). Humana Press Inc. hal. 6-10, 18.
- Seidel V., 2006. Initial and bulk extraction. In: Sarker SD, Latif Z, & Gray AI, editors. *Natural Products Isolation*. 2nd ed. Totowa (New Jersey). Humana Press Inc. hal. 31-5.
- Silverstain,R.M., Webster,F.X., (1998), *Spectrometric Identification Of Organic Compound*, sixth edition, John Wiley & Sons,Inc,US, hal 71-74.
- Talamona A. 2005. *Laboratory Chromatography Guide*. Büchi Labortechnik AG.. Switzerland. hal 12.
- Mulja M. 1990. *Aplikasi Spektrofotometer UV-VIS*. Mecphiso. Surabaya. Hal 3.