

BAB IV

HASIL DAN PEMBAHASAN

A. Determinasi tanaman

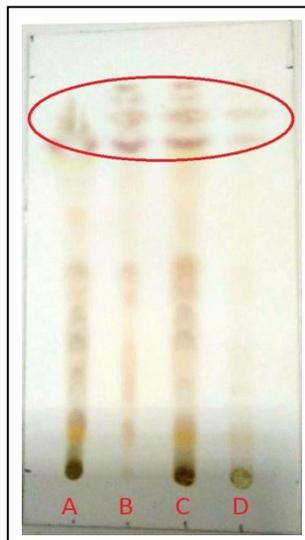
Hasil determinasi sampel tanaman yang dilakukan di Laboratorium Biologi Farmasi, Fakultas Farmasi Universitas Gajah Mada yang menyatakan bahwa sampel yang digunakan pada penelitian ini adalah benar *Aegle marmelos* (L.) Correa dengan bukti sertifikat hasil pada Lampiran 1.

B. Pengumpulan dan penyiapan bahan

Korteks maja dipanen pada bulan April 2016 diambil dari daerah Wates, Kulonprogo, Yogyakarta. Korteks maja dipanen dengan memotong bagian cabang batang maja dan dibersihkan dari kayunya. Korteks maja dikeringkan sehingga mempermudah proses pembuatan menjadi serbuk yang memiliki tujuan untuk meningkatkan luas permukaan bahan baku. Pengeringan korteks dengan dijemur pada sinar matahari dengan ditutup menggunakan kain berwarna hitam yang dimaksudkan untuk menghindari paparan sinar matahari secara langsung yang akan merusak senyawa yang terkandung di dalam korteks maja. Pengeringan dimaksudkan untuk mengurangi kadar air, mencegah tumbuhnya jamur dan mencegah rusaknya komposisi senyawa metabolit yang ada di dalam korteks. Bagian korteks maja yang sudah dikeringkan selanjutnya di serbuk menggunakan mesin penggiling, hasil yang didapatkan berupa serbuk korteks maja.

C. Identifikasi Steroid dengan *Liebermann-Burchard*

Identifikasi steroid merupakan langkah awal untuk mengetahui secara kualitatif kandungan senyawa steroid pada korteks maja. Identifikasi steroid dilakukan menggunakan KLT dengan penyemprotan pereaksi *Liebermann-Burchard* (Kristanti, *et al.*, 2008). Ekstraksi menggunakan metode maserasi dengan empat pelarut berbeda, yaitu kloroform, n-heksan, etanol 96%, dan etil asetat dalam jumlah sedikit menggunakan tabung reaksi, yang bertujuan untuk melihat kandungan senyawa steroid di dalam korteks maja. Ekstraksi menghasilkan ekstrak korteks maja berwarna coklat kekuningan. Hasil uji KLT pada ekstrak kloroform, n-heksan, etanol 96% dan etil asetat terhadap kandungan steroid yang telah dilakukan penyemprotan pereaksi *Liebermann-Burchard* ditunjukkan pada Gambar 12.

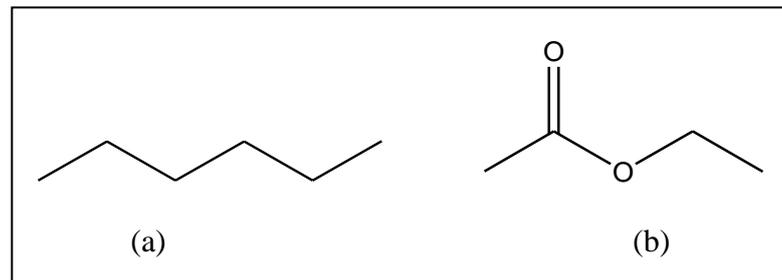


Gambar 12. Profil kromatogram steroid setelah penyemprotan, (A) ekstrak kloroform, (B) ekstrak n-heksan, (C) ekstrak etanol 96%, (D) ekstrak etil asetat

Setelah penyemprotan pereaksi *Liebermann-Burchard* dari keempat pelarut memperlihatkan warna yang sama ungu kemerahan pada bagian atas KLT yang diperkirakan senyawa steroid. Dengan hasil ini menunjukkan bahwa steroid terdeteksi dengan menggunakan berbagai pelarut, hal ini sesuai dengan syarat analitik senyawa penanda dimana syarat senyawa penanda adalah bersifat khas, mempunyai struktur yang jelas, bersifat stabil, tersedia dan dapat diisolasi dengan berbagai pelarut.

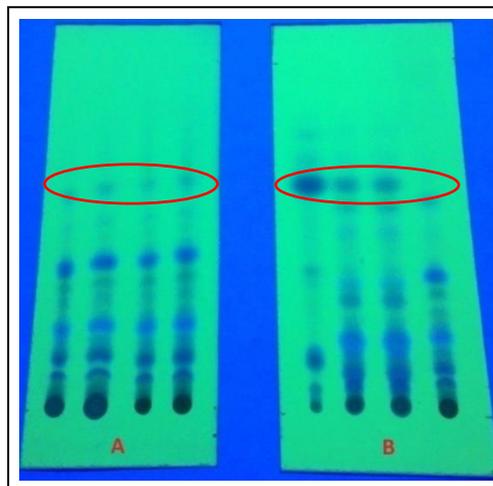
D. Optimasi fase gerak

Isolasi senyawa steroid dapat dipengaruhi oleh eluen yang digunakan, karena kepolaran dari senyawa organik berbeda-beda. Di dalam sebuah fraksi mempunyai banyak kandungan senyawa sehingga untuk mendapatkan senyawa yang diinginkan dibutuhkan eluen yang tepat untuk proses elusi. Optimasi fase gerak dilakukan menggunakan ekstrak hasil ekstraksi dengan cara maserasi. Ekstraksi dilakukan dengan menggunakan pelarut etanol 96% dalam jumlah kecil dengan tabung reaksi, ekstraksi menghasilkan ekstrak korteks maja berwarna coklat kekuningan yang kemudian ditotolkan pada plat KLT dengan silika gel GF₂₅₄ sebagai fase diam dan dielusi menggunakan fase gerak n-heksan: etil asetat dengan dua perbandingan kepolaran 1:1 dan 2:1. Pemilihan fase gerak didasarkan pada kemampuan fase gerak untuk mengelusi senyawa pada ekstrak yang akan diuji. Etil asetat dan n-heksan digunakan karena prekursor dari pembentukan steroid adalah kolesterol yang bersifat nonpolar (Harborne, 1987), sehingga steroid dapat dielusi dengan pelarut nonpolar.



Gambar 13. Struktur molekul (a) n-heksan (b) etil asetat

n-heksan adalah senyawa hidrokarbon alkana dengan rumus kimia C_6H_{14} , n-heksan mempunyai indeks kepolaran 0,1. Etil asetat adalah senyawa organik yang merupakan ester dari etanol dan asam asetat dengan rumus kimia $C_4H_8O_2$, etil asetat mempunyai indeks kepolaran 4,4. Semakin besar nilai indeks kepolaran maka semakin polar pelarut tersebut. Hasil optimasi fase gerak yang digunakan terlihat pada Gambar 14.



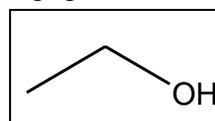
Gambar 14. KLT optimasi fase gerak UV 254 nm (a) n-Heksan: etil asetat (1:1); (b) n-Heksan: etil asetat (2:1).

Berdasarkan hasil KLT (Gambar 14), terlihat adanya pemisahan fraksi menjadi beberapa bercak elusi pada UV 254 nm. Hasil perbandingan kedua fase gerak pada fase gerak perbandingan 2:1 menunjukkan hasil yang lebih

baik dalam memisahkan senyawa, di mana pada bagian paling atas menunjukkan spot berwarna biru yang lebih pekat. Dari hasil perbandingan tersebut maka perbandingan fase gerak yang digunakan untuk identifikasi selanjutnya adalah n-heksan: etil asetat dengan konsentrasi 2:1.

E. Ekstraksi dengan Maserasi

Ekstraksi merupakan langkah awal yang dilakukan untuk melakukan proses isolasi dikarenakan dapat melarutkan komponen senyawa aktif yang terdapat di dalamnya. Ekstraksi korteks maja dilakukan dengan menggunakan metode maserasi menggunakan penyari etanol 96%. Metode maserasi dipilih karena menggunakan teknik perendaman dengan cara dingin tanpa disertai dengan pemanasan. Pada teknik pemanasan menyebabkan senyawa metabolit sekunder terdegradasi sehingga metode maserasi lebih aman untuk dilakukan pada isolasi. Pelarut yang digunakan adalah etanol 96% dikarenakan etanol merupakan pelarut yang bersifat universal, serbaguna, larut dalam air, pelarut organik lain dan dapat melarutkan senyawa polar maupun non polar sehingga diharapkan dengan menggunakan pelarut etanol 96% zat aktif yang diperlukan dapat tertarik sepenuhnya. Etanol mempunyai titik didih yang rendah dan mempunyai sifat semipolar sehingga mudah untuk melarutkan senyawa yang memiliki tingkat kepolaran dari tingkat rendah hingga tinggi (Wulandari, 2011). Etanol termasuk ke dalam rantai tunggal dengan rumus kimia C_2H_5OH dan memiliki indeks kepolaran 5,2. Gugus OH pada etanol memberikan sifat polar sedangkan gugus C memberikan sifat nonpolar.



Gambar 15. Struktur molekul etanol

Proses maserasi korteks maja dilakukan selama 2 hari disertai dengan pengadukan secara periodik. Pengadukan dilakukan untuk mempercepat kontak pelarut dengan sampel sehingga proses ekstraksi berjalan lebih cepat. Setelah 2 hari proses maserasi dipisahkan antara residu dan filtrat dengan cara penyaringan menggunakan kain flanel dan kertas penyaring. Residu yang diperoleh diremaserasi untuk mengoptimalkan proses maserasi, karena kemungkinan komponen aktif masih banyak yang tertinggal di dalam residu. Proses maserasi menghasilkan ekstrak cair yang selanjutnya diuapkan menggunakan *rotary evaporator* sampai menghasilkan bentuk kental sebanyak 37,6 gram berwarna coklat kekuningan.

F. Pemisahan dengan Kromatografi Kolom

Sebanyak 30 gram ekstrak kental korteks *Aegle marmelos* Correa dipisahkan menggunakan kromatografi kolom untuk mengambil komponen senyawa yang terkandung di dalam *Aegle marmelos* Correa. Kromatografi kolom gravitasi dilakukan dengan menggunakan fase diam berupa silika gel serbuk dan fase gerak campuran n-heksan: etil asetat (2:1) secara bergradien. Pemisahan kromatografi kolom dilakukan dengan cara tabung yang digunakan sebagai kolom diberi *glasswool* pada bagian bawah kolom yang berfungsi sebagai penyaring dan penghambat fase diam supaya tidak terbawa fase gerak, kemudian masukkan serbuk silika gel ke dalam kolom sebagai fase diam. Lakukan penjenjuran fase diam dengan cara memasukkan fase

gerak ke dalam kolom kemudian tunggu sampai fase gerak turun dan membasahi seluruh silika gel di dalam kolom.



Gambar 16. Proses elusi kromatografi kolom

Tahap berikutnya adalah memasukkan ekstrak yang sudah dilarutkan dengan etanol 96% ke dalam kolom, fase gerak ditambahkan sedikit demi sedikit melalui dinding kolom. Teknik pemisahan pada kromatografi kolom berdasarkan warna yang dilihat secara visual dan pada sinar UV. Hasil pemisahan ditampung pada tabung reaksi berdasarkan warna yang terpisah, proses elusi dihentikan setelah warna fraksi memudar menjadi bening kembali. Pada pemisahan kromatografi kolom ini didapatkan pemisahan sebanyak 38 tabung reaksi.



Gambar 17. Hasil pemisahan kromatografi kolom

Fraksi yang didapat dari hasil kolom ini dilakukan kromatografi lapis tipis. Dilakukan KLT bertujuan untuk melihat pemisahan senyawa dengan metode kromatografi kolom berdasarkan warna yang terbentuk. Hasil fraksinasi dari 38 tabung reaksi dikelompokkan berdasarkan warna yang terbentuk menjadi 9 fraksi gabungan yang kemudian diberi nama fraksi A, B, C, D, E, F, G, H dan I.

Tabel 2. Hasil pemisahan larutan berdasarkan warna

Fraksi	Tabung Reaksi	Warna larutan
A	1-18	Bening
B	19-22	Kuning
C	23-24	Orange
D	25-26	Merah muda
E	27-28	Merah pekat
F	29-30	Hijau muda
G	31-36	Hijau pekat
H	37	Hijau muda
I	38	Bening

Dari hasil sembilan fraksi yang diperoleh dari hasil pemisahan kromatografi kolom dipilih fraksi pertama yang terbentuk warna, yaitu fraksi B yang terdiri atas 4 tabung reaksi kemudian dianalisis dengan KLT, spektrofotometri UV-Vis dan analisis *GC-MS*.

G. Identifikasi kandungan Steroid Maja dengan KLT

Kromatografi Lapis Tipis (KLT) dapat digunakan untuk memisahkan berbagai senyawa seperti ion-ion anorganik, kompleks senyawa-senyawa organik dengan senyawa-senyawa anorganik, dan senyawa-senyawa organik baik yang terdapat di alam maupun senyawa-senyawa organik sintetik (Adnan, 1997). Kromatografi merupakan suatu teknik pemisahan yang menggunakan fase diam dan fase gerak (Gandjar dan Rohman, 2012). Fase

gerak yang digunakan adalah n-hexan:etil asetat (2:1) dan fase diam yang digunakan adalah plat silika gel GF₂₅₄. Plat KLT dibuat dengan panjang 10 cm dengan jarak elusidasi 8 cm.

Sebelum proses elusi dilakukan terlebih dahulu harus dilakukan penjenjuran eluen di dalam bejana kromatografi. Hal ini perlu dilakukan agar proses elusi dapat berjalan dengan cepat. Proses penjenjuran pada bejana dilakukan dengan menggunakan kertas saring sampai eluen mencapai titik atas kertas saring. Fraksi yang dianalisis adalah fraksi B yang terdiri atas 4 tabung reaksi. Proses penotolan pada plat kromatografi menggunakan pipet kapiler, kemudian dilakukan elusi pada chamber KLT selanjutnya adalah deteksi bercak dengan sinar tampak, sinar UV 254 dan UV 366.

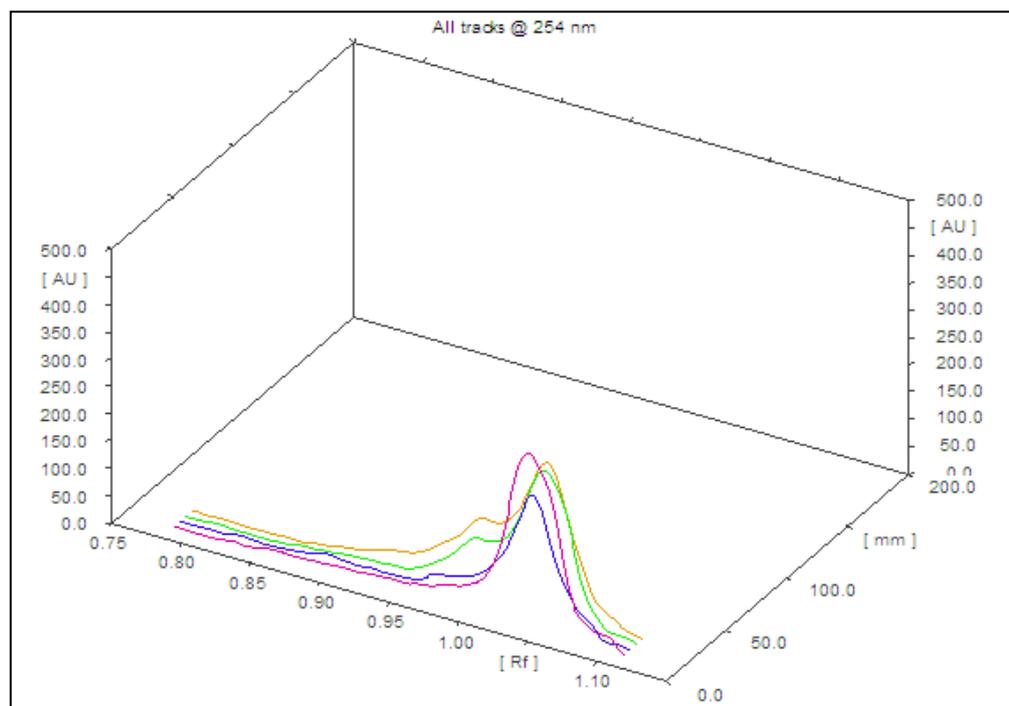
Tabel 3. Hasil perhitungan Rf KLT fraksi B

Sampel (Fraksi)	Spot	Rf
B1	1	1,0
B2	1	1,0
B3	1	1,0
B4	1	0,95
	2	1,0

Dari fraksi B yang dianalisis menggunakan KLT didapatkan noda berwarna kuning secara sinar tampak dan sinar UV 254 pada Rf 1,0 dan Rf 0,95 yang diperkirakan senyawa golongan steroid. Menurut Arifin *et al* (2006) Profil kromatogram menunjukkan adanya noda dari fraksi heksan pada Rf 0,9 dan Rf 0,85 yang diperkirakan suatu terpenoid. Elusi pada ekstrak metanol daun sirih menghasilkan tiga noda pada Rf 0,35; 0,75 dan 0,875 yang diperkirakan terpenoid atau steroid (Fitriyani *et al.*, 2011).

Nilai Rf senyawa pembanding β -sitosterol pada identifikasi senyawa steroid daun buncis ialah 0,437; 0,662 dan 0,962 (Risnafiani *et al.*, 2015).

Pengamatan selanjutnya dilakukan dengan menggunakan *TLC scanner*. Pada kurva pemisahan sampel setelah dianalisis menggunakan alat *TLC scanner* menghasilkan puncak tunggal kromatogram pada sampel B1, B2 dan B3, sedangkan pada sampel B4 terlihat dua puncak kromatogram. Puncak kromatogram dapat dilihat pada Gambar 18 dan nilai Rf dapat dilihat pada Tabel 4. Adanya perbedaan nilai Rf pada *TLC scanner* dikarenakan *TLC scanner* mempunyai sensitifitas yang lebih tinggi dibandingkan dengan analisis secara visual menggunakan sinar UV 254 nm.



Gambar 18. Kurva hasil pengukuran puncak *TLC scanner* fraksi B

Keterangan :

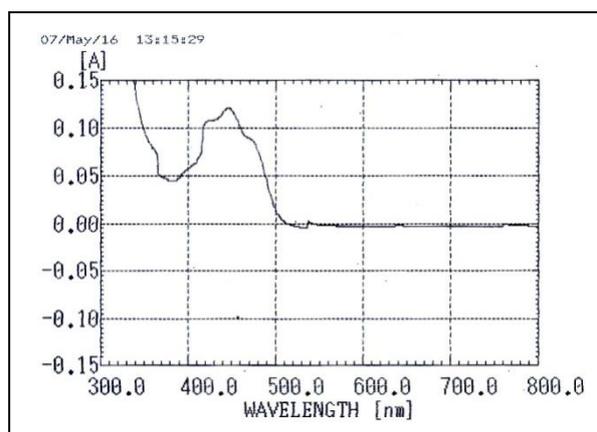
- | | | | |
|----|--|----|---------------------------------------|
| 01 | — | 03 | — |
| 02 | — | 04 | — |

Tabel 4. Nilai Rf TLC scanner Fraksi B

<i>Track</i>	<i>Peak</i>	<i>Start Position</i>	<i>Max Position</i>	<i>End Position</i>
B1	1	0.95 Rf	1.04 Rf	1.09 Rf
B2	1	0.95 Rf	1.04 Rf	1.10 Rf
B3	1	0.94 Rf	1.04 Rf	1.10 Rf
B4	1	0.90 Rf	1.00 Rf	1.00 Rf
	2	1.01 Rf	1.04 Rf	1.11 Rf

H. Identifikasi Senyawa Steroid Maja dengan Spektrofotometer UV-Vis

Uji spektrofotometer UV dilakukan untuk mengidentifikasi spektra panjang gelombang maksimum senyawa yang diperoleh. Analisis menggunakan alat spektrofotometer UV-Vis ditujukan untuk steroid yang mempunyai gugus kromofor sehingga senyawa tersebut dapat menyerap energi cahaya UV. Keuntungan penggunaan metode ini adalah tidak adanya gangguan dari senyawa yang menyerap pada panjang gelombang yang lebih rendah. Identifikasi dilakukan menggunakan sampel fraksi B yang telah didapatkan dari proses pemisahan kromatografi kolom. Hasil identifikasi spektrofotometer UV-Vis menggunakan panjang gelombang 300-800 nm dapat dilihat pada Gambar 19.



Gambar 19. Kurva kromatogram spektrofotometri UV-Vis Senyawa fraksi B.

Hasil identifikasi spektrofotometri UV-Vis fraksi B steroid maja menunjukkan 3 pita absorpsi dengan panjang gelombang maksimum 761,0 nm; 643,0 nm; 447,0 nm. Spektrum UV-Vis senyawa steroid yang diperoleh menunjukkan bahwa jumlah sistem kromofor yang terdapat pada masing-masing senyawa.

Tabel 5. Panjang gelombang dan Absorbansi senyawa fraksi B

Senyawa fraksi B	
Panjang gelombang (nm)	Absorbansi
447	0,121
643	-0,002
761	-0,000

Dari analisis spektrofotometri UV-Vis didapatkan puncak kromatogram paling tinggi pada panjang gelombang 447,0 nm dan nilai absorbansinya 0,121. Menurut Kusmiyati *et al* (2015) identifikasi ekstrak bunga kenikir dengan spektrofotometri cahaya menunjukkan adanya gugus kromofor terkonjugasi dengan λ_{max} pada 447 nm yang mirip dengan senyawa pembanding lutein. Lutein termasuk karotenoid merupakan pigmen organik yang memberikan warna kuning hingga merah.

I. Hasil analisis GC-MS

GC-MS dapat memberikan data kualitatif dan kuantitatif senyawa yang menjadi komponen steroid karena AUC yang ditunjukkan pada kromatogram berbanding lurus dengan konsentrasi masing masing komponen yang terdapat pada sampel. Analisis kromatografi gas akan mendapat kemungkinan jumlah komponen steroid dan kadar masing-masing. Sedangkan untuk menentukan

jenis komponen steroid tersebut dilakukan analisis dengan *Mass Spectra* selanjutnya diidentifikasi dengan spektra yang berasal dari *database NIST62* dan *WILEY229*.

Analisis dengan *GC-MS* dilakukan dengan menginjeksi 1 μL larutan ke dalam tempat injeksi. Uap cuplikan ini kemudian dibawa oleh gas pembawa masuk ke dalam kolom. Kolom akan memisahkan komponen-komponen steroid sehingga dapat dideteksi oleh detektor dan dihasilkan suatu kromatogram. Identifikasi komponen-komponen senyawa dalam steroid korteks maja menggunakan alat *GC-MS* pada kondisi yang ditentukan sebagai berikut:

Kolom : AGILENT HP 1MS

Panjang : 30 meter

ID : 0,25mm

Gas pembawa : Helium

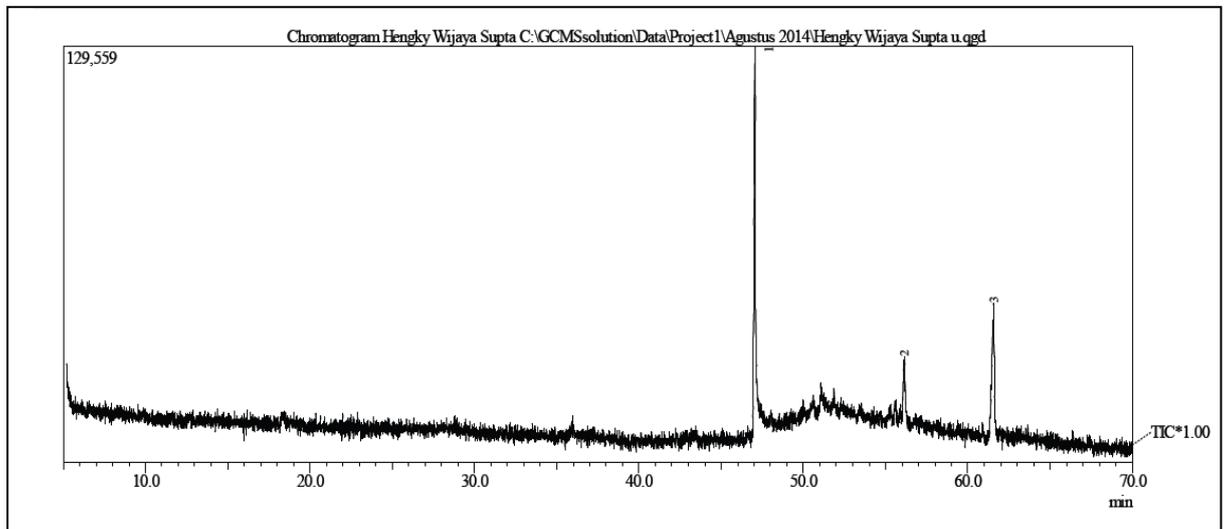
Suhu kolom oven : 70,0°C

Suhu injeksi : 310°C

Mode injeksi : Split

Tekanan : 13,7 kPa

Total gelombang : 20,0 mL/menit

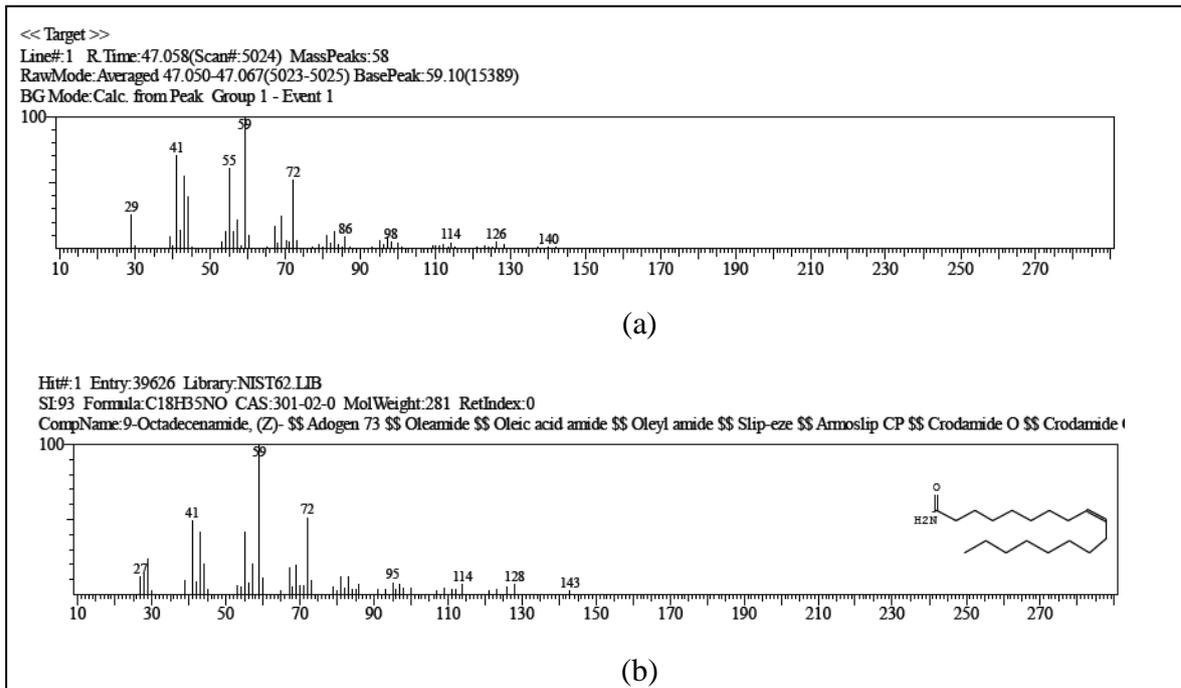


Gambar 20. Kromatogram hasil pemisahan kromatografi gas fraksi B steroid korteks maja

Identifikasi komponen-komponen senyawa dalam steroid korteks maja menggunakan alat *GCMS-QP2010S* (SHIMADZU®) menghasilkan 3 puncak kromatogram yang dapat dilihat pada Gambar 20. Dari 3 puncak yang muncul merupakan puncak utama yaitu nomor 1, 2 dan 3 yang masing masing berada pada waktu retensi yang berbeda, puncak 1 menunjukkan kromatogram pada waktu 47,058, puncak 2 menunjukkan kromatogram pada waktu 56,137 dan puncak 3 menunjukkan kromatogram pada waktu 61,560.

Analisis kandungan steroid korteks maja pada penelitian ini dilakukan menggunakan analisis spektra massa yang didasarkan pada “*base peak*” (puncak dasar) dan nilai *SI* (*Similarity Index*) dengan perbandingan spektra dari *NIST62* dan *WILEY299 LIB*. *Base peak* merupakan puncak yang paling besar limphannya dalam spektrum dan diberi harga 100%. Jika nilai *SI* mendekati 100% maka senyawa yang terdeteksi memiliki tingkat kemiripan dengan data senyawa yang diidentifikasi.

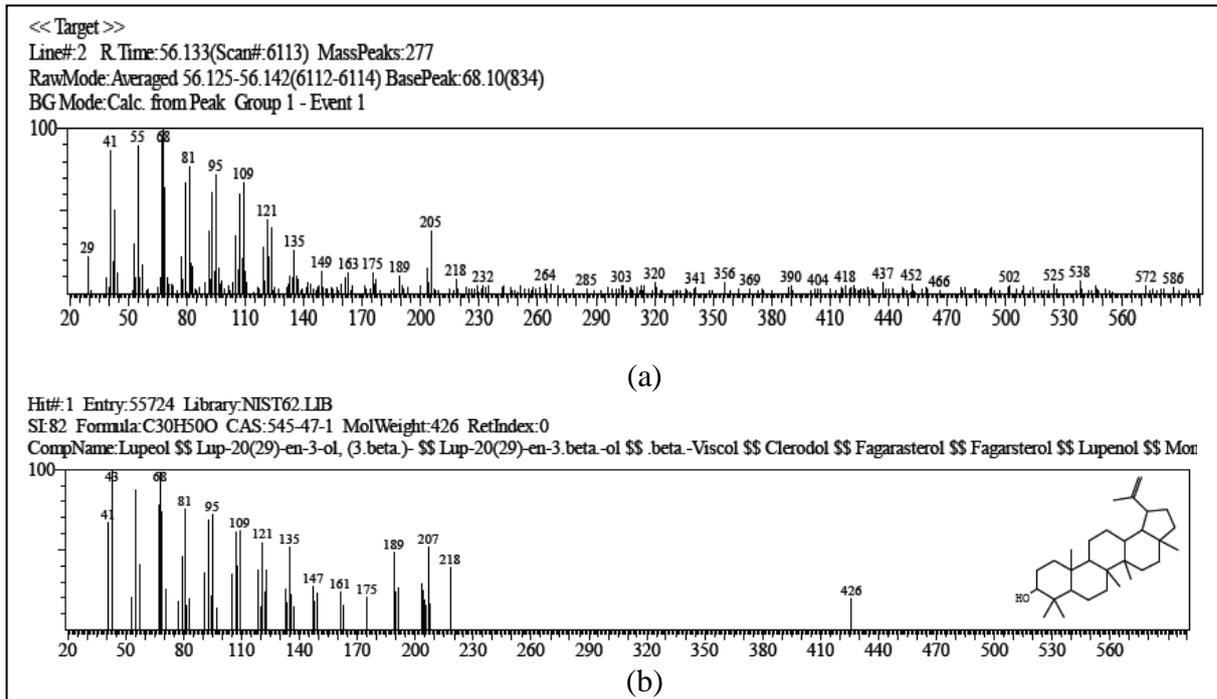
Senyawa pada puncak dasar 1 dengan waktu retensi 47,068 menit dan SI= 93 mirip dengan senyawa *9-octadecenamide* dengan rumus molekul $C_{18}H_{35}NO$. Spektra massa senyawa I dan spektra massa senyawa *9-octadecenamide* dapat dilihat pada Gambar 21.



Gambar 21. (a) Spektra Massa Senyawa I (b) Spektra Massa *9-octadecenamide*

Berdasarkan analisis data *GC-MS*, Senyawa I memiliki indeks kemiripan (SI) = 93 dengan *9-octadecenamide* atau dengan nama lain *oleamide*, yang merupakan senyawa golongan amida dan memiliki berat molekul 281 g/mol.

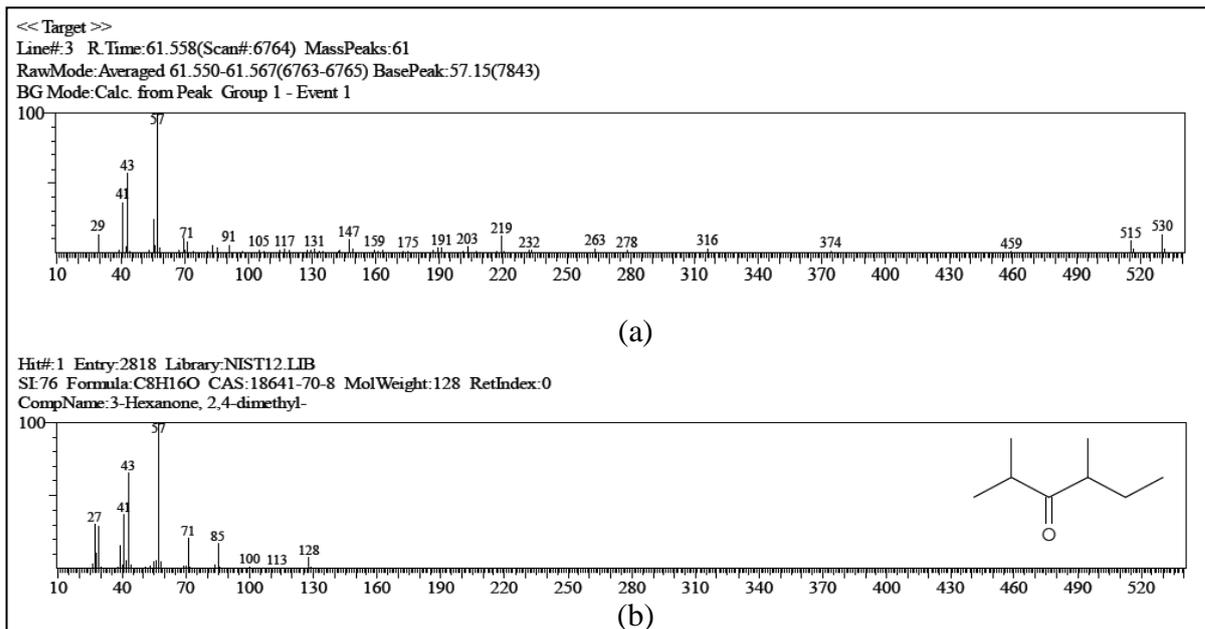
Senyawa pada puncak dasar 2 dengan waktu retensi 56,133 menit dan SI= 82 mirip dengan senyawa lupeol dengan rumus molekul $C_{30}H_{50}O$. Spektra massa senyawa II dan spektra massa senyawa lupeol dapat dilihat pada Gambar 22.



Gambar 22. (a) Spektra Massa Senyawa II (b) Spektra Massa lupeol

Berdasarkan analisis data *GC-MS*, Senyawa II memiliki indeks kemiripan (SI) = 82 dengan lupeol, yang merupakan senyawa golongan steroid dan memiliki berat molekul 426 g/mol.

Senyawa pada puncak dasar 3 dengan waktu retensi 61,558 menit dan SI= 76 mirip dengan senyawa *3-hexanone* dengan rumus molekul $C_8H_{16}O$. Spektra massa senyawa III dan spektra massa senyawa *3-hexanone* dapat dilihat pada Gambar 23.



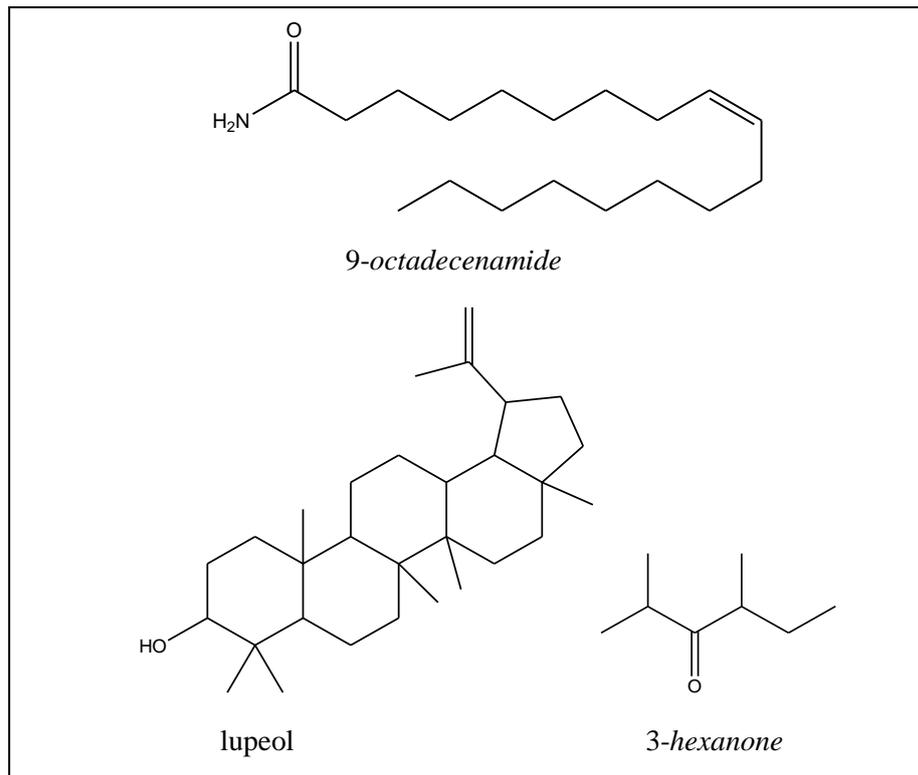
Gambar 23. (a) Spektra Massa Senyawa III (b) Spektra Massa 3-hexanone

Berdasarkan analisis data *GC-MS*, Senyawa III memiliki indeks kemiripan (SI) = 76 dengan 3-hexanone, yang merupakan senyawa golongan keton dan memiliki berat molekul 128 g/mol.

Tabel 6. Hasil analisis *Mass Spectra* fraksi B korteks maja

No	Senyawa	Waktu retensi	Puncak (% AUC)	SI	BM	Perkiraan Senyawa
1	I	47,058	1 (60,51)	93	281	9-octadecenamide
2	II	56,137	2 (10,64)	82	426	lupeol
3	III	61,560	3 (28,86)	76	128	3-hexanone

Dari tabel tersebut dapat diketahui bahwa hasil *mass spectra* fraksi B korteks maja terdiri atas tiga perkiraan senyawa yaitu 9-octadecenamide, lupeol dan 3-hexanone. Struktur molekul penyusun fraksi B korteks maja dapat dilihat pada Gambar 24.



Gambar 24. Struktur molekul senyawa hasil analisis *Mass Spectra*

Secara kimia fraksi B korteks maja terdiri atas senyawa *9-octadecenamide*, lupeol dan *3-hexanone*. Lupeol merupakan senyawa golongan steroid, lupeol merupakan satu dari tiga kerangka karbon utama penyusun triterpenoid pentasiklik, dua kerangka karbon lainnya adalah α -amirin dan β -amirin. *9-octadecenamide* merupakan golongan amida yang berasal dari asam lemak asam oleat. Sedangkan *3-hexanone* merupakan golongan keton, senyawa tersebut bukan senyawa penyusun utama dari korteks maja dikarenakan eluen yang digunakan pada pemisahan kromatografi kolom adalah n-heksan.

Hasil *GC-MS* menunjukkan bahwa senyawa *9-octadecenamide* dan lupeol dari fraksi B korteks maja (*Aegle marmelos* Correa) yang dianalisis merupakan 2 dari banyak komponen utama dari korteks maja. Bagian

tumbuhan maja seperti buah mengandung minyak atsiri, vitamin C, gula, pati, pectin dan tannin sedangkan daunnya mengandung rutasin, aegelin dan minyak atsiri (Hasrah, 1994).

Hasil uji fitokimia yang telah dilakukan menunjukkan bahwa kulit batang *Aegle marmelos* Correa mengandung senyawa golongan steroid dan turunan kumarin dan berdasarkan data difraksi sinar-X senyawa tersebut adalah R-(+)- marmin[32] (Gupta, *et al.*, 2006). Hasil isolasi dengan menggunakan pelarut petroleum eter dapat diisolasi 2 senyawa triterpen dari korteks *Aegle marmelos* Correa dapat diidentifikasi adanya fitosterol yaitu stigmasterol dan sitosterol (Riyanto, *et al.*, 2000).

Hasil uji fitokimia yang telah dilakukan menunjukkan bahwa dalam kulit batang *Aegle marmelos* Correa mengandung senyawa golongan steroid, selain itu telah diidentifikasi kandungan kimia ekstrak daun tumbuhan *Aegle marmelos* Correa seperti tannin, skimmianin, minyak atsiri, *caryophyllena*, *cineole*, *citral*, *citronellal*, *D-limonena*, *eugenol*, stigmasterol dan triterpenoid termasuk β -sitosterol, γ -sitosterol, α -amirin dan β -amirin, flavonoid (Karawya dalam Saleh, 2008).