

Profil Kromatografi Lapis Tipis Metabolit Sekunder Ekstrak Fraksi etil asetat Daun Alpukat (*Persea americana* Mill) Hasil Pemisahan Kromatografi Kolom Gravitasi

Kartika Damasanti Mamonto^{*}, Adam M. Ramadhan, Laode Rijai

*Laboratorium Penelitian dan Pengembangan Kefarmasian "Farmaka Tropis",
Fakultas Farmasi, Universitas Mulawarman, Samarinda*

**Email : kartikadamasantim@gmail.com*

ABSTRACT

Gravity Column chromatography (GCC) still used to separated organic compounds especially compounds that have the semi polar characteristic of the dielectric constant from 2 until 10. The ethyl acetate extract fraction from avocado leaf was done separated using chloroform-ethyl acetate-methanol with a ratio of 6:3:1, the separated profile from Thin Layer Chromatography showed from A fraction four spots on UV 254 nm with Rf 1.82, 1.55, 1.2, 1.1, 3 spots on UV 366 nm with Rf 1.35, 1.2, 1.1 and 2 spot on H₂SO₄ with Rf 1.4, 1.1 and fraction A showed two spots on UV 254 nm with Rf 1.31, 1.2, 3 spots on UV 366 nm with Rf 1.35, 1.2, 1:07 and 1 spot on H₂SO₄ with Rf 1.2. Profile spot on the TLC has not showed good enough separation because Rf value between one and other spots are almost the same.

Keyword : Avocado leaf, Ethyl acetate fraction, TLC's profile

ABSTRAK

Kromatografi Kolom Gravitasi (KKG) masih merupakan alat yang digunakan untuk memisahkan senyawa-senyawa organik terutama terhadap senyawa yang memiliki sifat semi polar pada konstanta dielektrik 2 hingga 10. Ekstrak fraksi etil asetat dari daun alpukat telah dilakukan pemisahan dengan menggunakan eluen kloroform-etil asetat-metanol dengan perbandingan 6:3:1 menghasilkan profil pemisahan pada plat Kromatografi Lapis Tipis (KLT) yaitu fraksi gabungan A menunjukkan 4 spot noda pada UV 254 nm dengan Rf 1.82, 1.55, 1.2, 1.1, 3 spot noda pada UV 366 nm dengan Rf 1.35, 1.2, 1.1 dan 2 spot noda pada H₂SO₄ dengan Rf 1.4, 1.1 dan fraksi gabungan B menunjukkan 2 spot noda pada UV 254 nm dengan Rf 1.31, 1.2, 3 spot noda pada UV 366 nm dengan Rf 1.35, 1.2, 1.07 dan 1 spot noda pada H₂SO₄ dengan Rf 1,2. Profil spot pada KLT tersebut tampak belum ditemukan suatu pemisahan yang cukup baik yaitu nilai Rf antara spot satu dan lainnya hampir sama.

Kata Kunci : Daun alpukat, Fraksi etil asetat, Profil KLT

PENDAHULUAN

Potensi kefarmasian suatu bahan alami tergantung pada jenis senyawa yang terkandung dalam bahan alami tersebut, sedangkan pemanfaatannya sangat tergantung pada kemampuan mengeksplorasi molekul-molekul kandungannya tersebut meliputi jenis molekul dan aktivitas biologi, fisika, dan kimia molekul tersebut. Kemanfaatan informasi jenis molekul dalam bidang kefarmasian terkait dengan penentuan mekanisme perjalanan molekul (farmakologi) sebagai xenobiotik dalam sel atau tubuh manusia/hewan sehingga efek dinamik (energi) molekul dalam mempengaruhi reseptor (molekul penerima) dalam sel juga dapat diketahui. Jika suatu bahan alami digunakan dalam bentuk ekstrak dengan tanpa informasi tentang molekulnya, sukar untuk menentukan farmakologi xenobiotik tersebut (farmakokinetik dan farmakodinamik) sehingga berakibat pada kesulitan penentuan stabilitas serta efek yang tidak diinginkan.

Daun Alpukat (*Persea americana* Mill.) merupakan tumbuhan yang telah banyak diketahui manfaatnya secara empiris maupun berbagai hasil penelitian dalam bentuk ekstrak, namun belum dapat diwujudkan sebagai suatu produk yang terpercaya secara ilmiah karena kesulitan studi farmakologi. Daun alpukat mengandung senyawa kimia saponin, alkaloid, flavonoid, tanin katekat, kuinon, saponin dan steroid berdasarkan hasil skrining fitokimia yang dilakukan oleh Maryati (2007). Selain itu daun alpukat juga diketahui memiliki kandungan glikosida sianogenik, alkaloid dan fenol menurut Aruwe (2009). Penelitian ini berusaha mengisolasi beberapa senyawa dari daun alpukat khususnya fraksi polaritas rendah yaitu mulai dari n-heksana hingga etil asetat. Pelarut organik yang memiliki sifat polaritas rendah hingga menengah tersebut dengan konstanta dielektrik 2 hingga 6 menggambarkan senyawa yang larut di dalamnya dapat dipisahkan dengan silika gel polar seperti F₂₅₄. Pemisahan suatu molekul dengan teknik KKG sangat tergantung pada keahlian penentuan eluen, sedangkan petunjuk keberhasilan pemisahan tergantung pada profil R_f pada KLT sebagai hasil pemisahan dengan eluen tersebut. Jika R_f antara spot senyawa satu dan lainnya menunjukkan pemisahan yang signifikan maka prospek menemukan molekul murni tersebut sangat berpeluang. Oleh karena itu profil Kromatografi Lapis Tipis hasil pemisahan suatu teknik pemisahan sangat penting untuk memprediksi keberhasilan pemisahan dengan metode tersebut atau menentukan teknik baru untuk pemisahannya.

METODE PENELITIAN

Bahan

Daun alpukat (*Persea americana* Mill) yang diperoleh di Tanah Grogot Kabupaten Paser, pelarut etanol 96%, n-heksana, etil asetat, kloroform dan metanol, plat KLT GF₂₅₄ ukuran 0,25 cm×20 cm×20 cm, dan silika gel 60 H[®].

Peralatan

Bejana maserasi, *rotary evaporator* (B'U'CHI®), corong pisah (Pyrex®), *chamber*, mikropipet, lampu *UV portable* (UVGL-55 *Handheld UV Lamp*®), penyemprot bercak dan kolom serta peralatan gelas lainnya.

Pengumpulan Bahan Tumbuhan

Daun alpukat (*Persea americana* Mill) segar diambil secara acak pada pagi atau sore hari. Daun yang telah dipilih dibuat simplisia dengan beberapa tahap yaitu sortir basah untuk memisahkan kotoran-kotoran pada sampel, pencucian dengan menggunakan air bersih yang mengalir, pengecilan ukuran partikel untuk mempermudah proses pengeringan, pengeringan tanpa menggunakan sinar matahari langsung, sortir kering, penimbangan dan pengepakan.

Ekstraksi dan Fraksinasi

Simplisia daun alpukat diekstraksi dengan metode maserasi menggunakan pelarut etanol 96%. Ekstraksi dilakukan selama 3×24 jam, selanjutnya ekstrak dipekatkan dengan *rotary evaporator* dan diuapkan sisa pelarut dalam ekstrak kental diatas *waterbath*.

Ekstrak yang diperoleh disuspensi dengan air untuk proses fraksinasi dan dipartisi dengan pelarut n-heksana dan etil asetat secara bertahap sehingga diperoleh fraksi n-heksana dan etil asetat.

Penentuan Eluen

Kedua fraksi yang diperoleh beserta ekstrak dielusi untuk mencari larutan pengembang (eluen) yang menghasilkan pemisahan terbaik dengan metode kromatografi lapis tipis. Ketiga sampel dielusi dengan larutan pengembang kloroform, etil asetat dan metanol dalam berbagai perbandingan hingga diperoleh noda dengan pemisahan terbaik yang diamati secara visible setelah disemprot H₂SO₄ maupun dibawa UV 254 nm dan 366 nm. Pereaksi H₂SO₄ disemprotkan pada plat yang telah dielusi kemudian dikeringkan dan dipanaskan hingga muncul warna pada plat.

Kromatografi Kolom Gravitasi

Ekstrak fraksi etil asetat dipisahkan dengan kromatografi kolom gravitasi. Silika gel 60 diaktifasi pada suhu 110 °C selama kurang lebih 2 jam, selanjutnya dibuat bubuk silika dengan menggunakan eluen yang telah terpilih pada proses kromatografi lapis tipis. Kolom disiapkan dengan mengisi bagian dasar kolom dengan kapas dan kertas saring selanjutnya bubuk silika yang telah jadi dimasukan secara perlahan kedalam kolom. Ekstrak fraksi etil asetat dibuat impreg dengan cara mencampurkan sampel dengan silika gel dan dimasukan kedalam kolom setelah kolom didiamkan selama 1 malam. Selanjutnya dielusi dengan eluen terpilih secara isokratik dimana setiap 5 mL eluat ditampung dalam botol. Masing-masing botol yang berisi eluat dianalisis profil kromatografinya, eluat yang mempunyai harga R_f dan bercak yang sama digabungkan menjadi satu fraksi.

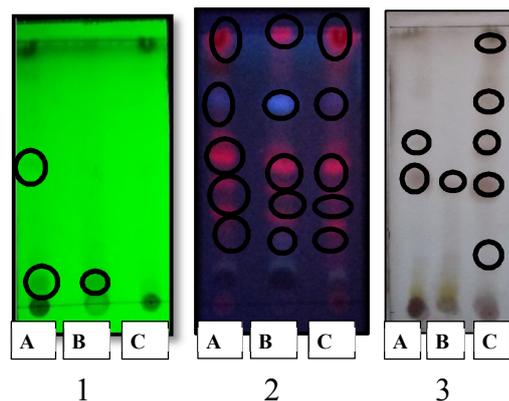
HASIL DAN PEMBAHASAN

Simplisia daun alpukat sebanyak 1500 gram diekstraksi dengan metode maserasi menggunakan pelarut etanol 96%, setelah dipekatkan dengan *rotary evaporator* diperoleh ekstrak sebanyak 268 gram. Ekstrak etanol daun alpukat difraksinasi dengan metode fraksinasi cair-cair bertingkat menggunakan pelarut n-heksana dan etil asetat.

Tabel 1. Perbandingan eluen yang digunakan untuk penentuan eluen

Eluen	Perbandingan
Kloroform : etil asetat : metanol	1:8:1
	2:7:1
	3:6:1
	4:5:1
	5:4:1
	5,5:3,5:1
	6:3:1
	7:2:1

Ekstrak fraksi n-heksana dan etil asetat yang diperoleh bersama dengan ekstrak etanol digunakan penentuan teknik isolasi dengan metode kromatografi lapis tipis. Identifikasi noda pada plat KLT menggunakan sinar 254 nm dan UV 366 nm dan secara visible setelah disemprot dengan H₂SO₄. Kloroform : etil asetat : metanol dengan perbandingan 6:3:1 menghasilkan pemisahan senyawa terbaik.



Gambar 1. Profil kromatografi lapis tipis eluen terpilih dari A) ekstrak etanol. B) fraksi etil asetat, dan C) fraksi n-heksana dideteksi dengan 1) UV 254 nm, 2) UV 366 nm, 3) H₂SO₄

Tabel 2. Profil kromatografi lapis tipis eluen terpilih

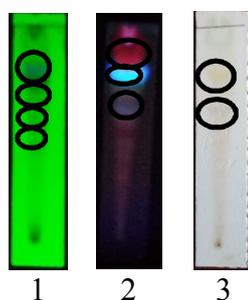
Eluen	Jenis Deteksi	Sampel	Noda	Harga Rf
Kloroform : etil asetat: metanol (6:3:1)	UV 254 nm	A	2	4,2
				1,5
				4,2
		C	-	-
	UV 366 nm	A	5	2,21
				1,75
				1,5
				1,35
				1,16
				2,33
		B	5	1,83
				1,55
				1,16
		C	5	0,91
				2,47
				1,9
	1,55			
	1,13			
	0,93			
H ₂ SO ₄	A	B	4	2
				1,55
				1,16
		C	4	0,89
				2,47
				1,9
	C	4	1,55	
			0,89	
			1,82	
			1,4	
			1,9	
			4,2	
C	5	1,9		
		1,5		
		1,16		
		0,89		

Keterangan: A) Ekstrak etanol, B) Ekstrak Fraksi etil asetat, C) Ekstrak Fraksi n-heksana

Rf atau retensi faktor adalah perbandingan antara jarak yang ditempuh senyawa atau komponen terhadap jarak yang ditempuh fase gerak. Senyawa atau komponen yang mempunyai afinitas lebih besar dari fase gerak atau afinitasnya lebih kecil dari fase diam akan bergerak lebih cepat dari pada senyawa atau komponen yang mempunyai sifat sebaliknya (Gritter dkk, 1991). Sehingga

komponen atau senyawa yang memiliki nilai Rf terbesar merupakan senyawa yang cenderung berikatan dengan fase gerak sedangkan senyawa yang memiliki nilai Rf yang kecil cenderung berikatan dengan fase diam.

Hasil identifikasi noda pada plat KLT dengan menggunakan sinar UV 254 nm menunjukkan 2 spot noda pada ekstrak etanol, 1 spot noda pada ekstrak fraksi etil asetat dan pada ekstrak fraksi n-heksana tidak ada noda yang terdeteksi. Pada sinar UV 366 nm terdapat 6 spot noda yang terdeteksi pada ekstrak etanol, 5 spot noda pada ekstrak fraksi etil asetat dan 5 spot noda pada ekstrak fraksi n-heksana. Identifikasi noda dengan menggunakan pereaksi semprot yakni H₂SO₄ menunjukkan 2 spot noda pada ekstrak, 1 spot noda pada ekstrak fraksi etil asetat dan 5 spot noda pada ekstrak fraksi n-heksana.



Gambar 2. Profil kromatografi lapis tipis gabungan hasil pemisahan kolom A, dideteksi dengan 1) UV 254 nm, 2) UV 366 nm, 3) H₂SO₄

Tabel 3. Profil kromatografi hasil pemisahan kolom (Gabungan A)

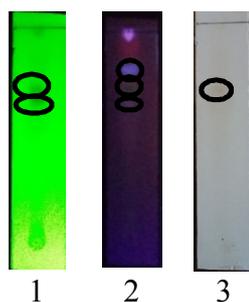
Eluen	Jenis Deteksi	Noda	Rf
Kloroform : etil asetat : metanol (6:3:1)	UV 254	4	1,82
			1,55
			1,2
			1,1
	UV 366	3	1,35
			1,2
			1,1
	H ₂ SO ₄	2	1,4
			1,1

Pemisahan komponen senyawa dalam ekstrak fraksi etil asetat dilakukan dengan metode kromatografi kolom gravitasi. Silika gel 60 H digunakan sebagai fase diam dan eluen yang terpilih yakni kloroform : etil asetat : metanol (6:3:1) digunakan sebagai fase gerak. Ekstrak fraksi etil asetat sebanyak 1 gram dibuat impreg dengan silika gel 60 H dengan perbandingan 1:1. 37 fraksi yang diperoleh dari proses kromatografi kolom gravitasi dimonitor dengan kromatografi lapis tipis menggunakan eluen yang sama, sehingga terdapat 11 fraksi yang dapat

digabungkan menjadi dua fraksi (gabungan A dan gabungan B) berdasarkan harga Rf yang sama.

Gabungan A dan gabungan B dianalisis profil KLT dengan eluen kloroform: etil asetat : metanol (6:3:1) pada UV 254 nm, UV 366 nm, dan pereaksi H₂SO₄.

Hasil identifikasi pada gabungan A menunjukkan terdapat 4 spot noda terlihat pada UV 254 nm dan 3 spot noda terlihat pada UV 366 nm sedangkan dengan menggunakan pereaksi semprot H₂SO₄ hanya terlihat 2 spot noda.



Gambar 3. Profil kromatografi lapis tipis gabungan hasil pemisahan kolom B, dideteksi dengan 1) UV 254 nm, 2) UV 366 nm, 3) H₂SO₄

Tabel 4. Profil kromatografi hasil pemisahan kolom (gabungan B)

Eluen	Jenis Deteksi	Noda	Rf
Kloroform:etil asetat: metanol (6:3:1)	UV 254 nm	2	1,31
			1,2
	UV 366 nm	3	1,35
			1,2
			1,07
	H ₂ SO ₄	1	1,2

Hasil identifikasi pada gabungan B menunjukkan profil KLT pada UV 254 nm terlihat 2 spot noda dan UV 366 nm terlihat 3 spot noda sedangkan dengan menggunakan pereaksi semprot H₂SO₄ hanya menunjukkan 1 spot noda.

Berdasarkan pada jumlah spot noda yang terdeteksi pada UV 254 nm, UV 366 nm dan pereaksi H₂SO₄ dapat dilihat bahwa hasil pemisahan ekstrak fraksi etil asetat dengan kromatografi kolom gravitasi belum menghasilkan pemisahan senyawa yang baik hal ini dapat dilihat dengan nilai Rf antar spot noda hampir sama.

KESIMPULAN

1. Profil kromatografi lapis tipis dengan eluen kloroform : etil asetat : metanol (6:3:1) pada fraksi hasil pemisahan dengan kromatografi kolom gravitasi untuk gabungan A menunjukkan 4 spot noda pada UV 254 nm, 3 spot noda pada UV

- 366 nm dan 2 spot noda pada H₂SO₄ dan gabungan B menunjukkan 2 spot noda pada UV 254 nm, 3 spot noda pada UV 366 nm dan 1 spot noda pada H₂SO₄.
2. Semua spot noda yang terdeteksi belum dapat dipastikan kemurniannya sehingga perlu dilakukan pemisahan kembali baik dengan kromatografi kolom gravitasi maupun metode lain.
 3. Pemisahan dengan kromatografi kolom gravitasi menggunakan cara elusi isokratik yaitu menggunakan fase gerak dengan polaritas tetap sehingga pemisahan yang dihasilkan kurang maksimal.

DAFTAR PUSTAKA

- [1] Maryati S, Fidrianny I, Ruslan K. 2007. *Telaah kandungan kimia daun alpukat (Persea americana mill.)*. Skripsi. Sekolah Farmasi, Institut Teknologi Bandung.
- [2] Arukwe U, Amadi BA, Duru MK. 2011. Chemical composition of persea americana leaf, fruit and seed. *IJRRAS*. 11(2): 346-349.
- [3] Gritter RJ, Bobbit JM, Schwarting AE. 1991. *Pengantar Kromatografi*. Bandung: Penerbit ITB.