

**PERBANDINGAN METODE EKSTRAKSI MASERASI DAN
ULTRASOUND ASISSTED EXTRACTION PADA KAYU
SECANG DAN ANALISIS PENETAPAN KADAR FLAVONOID
MENGUNAKAN PEKTROFOTOMETRI UV**



Oleh :

Faraz Imelda putri

22330755

PROGRAM STUDI FARMASI

FAKULTAS MATEMATIKA DAN ILMU PENGETAHUAN ALAM

INSTITUT SAINS DAN TEKNOLOGI NASIONAL

JAKARTA

2024

LEMBAR PEMBIMBING SKRIPSI

PERBANDINGAN METODE EKSTRAKSI MASERASI DAN ULTRASOUND ASISSTED EXTRACTION PADA KAYU SECANG DAN ANALISIS PENETAPAN KADAR FLAVONOID MENGGUNAKAN SPEKTROFOTOMETRI UV

SKRIPSI

Oleh :

Faraz Imelda Putri

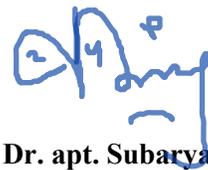
22330755

PEMBIMBING-1



Apt. Erwi Putri Setyaningsih, M.Si

PEMBIMBING-2



Dr. apt. Subaryanti, M.Si

BAB 1

PENDAHULUAN

A. Latar belakang

Penggunaan bahan aktif alami dari spesies tanaman dalam industri farmasi dan kosmetika terus mengalami peningkatan seiring dengan bergesarnya gaya hidup masyarakat modern yang lebih menyukai produk berbasis herbal (Alfiah et al., 2015). Hal ini juga didukung dengan kemajuan penelitian di lapangan yang membuktikan secara ilmiah bahwa banyak spesies tanaman yang dimanfaatkan oleh masyarakat secara tradisional/turun temurun dapat digunakan dalam dunia industri obat (Ode et al., 2019). Jenis bahan aktif yang banyak dibutuhkan dalam industri farmasi dan kosmetika saat ini seperti antibakteri dan antioksidan. Bahan aktif antibakteri adalah zat yang dapat menghambat pertumbuhan/infeksi bakteri pada tubuh, sedangkan antioksidan adalah bahan aktif yang berfungsi untuk melindungi sel dari efek berbahaya radikal bebas dengan menyumbangkan satu atau lebih electron pada radikal bebas, sehingga radikal bebas tersebut dapat diredam. Namun sayangnya bahan aktif alami yang saat ini banyak digunakan oleh industri belum banyak mengeksplor dari kekayaan/potensi lokal yang dimiliki alam Indonesia, padahal secara turun temurun/tradisional banyak tumbuhan yang telah dimanfaatkan oleh masyarakat sebagai tanaman obat. Tumbuhan secang (*Caesalpinia sappan* L.) merupakan salah satu hasil hutan non kayu yang banyak dimanfaatkan batang/kayunya dalam pengobatan tradisional dan pewarna alami. Tanaman ini berproduksi sepanjang tahun dan budidayanya relatif mudah (jangka waktu panen 1-2 tahun). Sebaran tanaman ini bisa di temukan di hampir seluruh wilayah Indonesia mulai dari Pulau Kalimantan, Bali, Lombok, Manado, Sulawesi, Jawa, Sumatra, Halmahera, Timor, hingga Alor (Karlina et al., 2016). Secara tradisional, kayu secang banyak digunakan sebagai minuman herbal yang digunakan untuk pengobatan darah kotor, antiadiabetik, antitumor, antimikroba, antivirus, antikoagulan, antiinflamasi, sebagai imunostimulan, dan bersifat sitotoksik (Sufiana dan Harlia, 2014)..

Kayu secang diketahui memiliki mengandung fenolik, flavonoid, tannin, polifenol, kardenolin, antraknon, sappan kalkon, caesalpin, resin, resorsin, brazilin, d-alfa phallandren, oscimenen dan minyak atsiri (Yenni, Putranti, Dewi, Nurul, dkk, 2016). Selain itu tanaman secang merupakan salah satu tanaman yang digunakan sebagai pigmen alami. Bagian tanaman secang yang sering digunakan adalah kayu. Kayu secang menghasilkan pigmen berwarna merah. Pigmen merah ini disebut antosiasin yang bersifat mudah larut dalam air panas.

Senyawa flavonoid merupakan kelompok senyawa fenolik terbesar yang terdapat di alam. Senyawa tersebut berupa pewarna merah, ungu, biru dan beberapa kuning yang terdapat pada tumbuhan (Andersen dan Markham, 2005). Beberapa tanaman obat yang mengandung flavonoid mempunyai aktivitas antioksidan, antibakteri, antivirus, antiinflamasi, alergi, dan antikanker (Miller dan Begoña Ruiz-Larrea, 2002). Senyawa flavonoid diduga sangat bermanfaat dalam pangan karena dalam bentuk senyawa fenolik, senyawa tersebut merupakan antioksidan yang kuat. Banyak kondisi penyakit diketahui diperburuk oleh adanya radikal bebas seperti superoksida dan hidrosil, dan flavonoid sebenarnya dapat menghilangkan spesies pengoksidasi yang merusak ini (Heinrich, M, Bames, J, Gibbons, S, Williamson, E, 2010).

Proses Ekstraksi adalah proses pemisahan suatu zat berdasarkan perbedaan sifat tertentu, terutama kelarutannya terhadap dua cairan tidak saling larut yang berbeda. Pada umumnya ekstraksi dilakukan dengan menggunakan pelarut yang didasarkan pada kelarutan komponen terhadap komponen lain dalam campuran, biasanya air dan pelarut organik yang lainnya. Bahan yang akan diekstrak biasanya berupa bahan kering yang telah dihancurkan, biasanya berbentuk bubuk atau simplisia (Sembiring, 2007: 136-137).

Metode maserasi adalah proses pengesktrakan simplisia dengan menggunakan pelarut dengan beberapa kali pengocokan atau pengadukan pada temperature ruangan (kamar). Secara teknologi termasuk ekstraksi dengan prinsip metode pencapaian konsentrasi pada keseimbangan. Maserasi kinetik berarti dilakukan pengadukan yang kontinu (secara terus-menerus). (Depkes RI, 2000:10).

Pada saat ini, banyak penelitian yang mencoba mengembangkan penggunaan pelarut yang ramah lingkungan *Natural Deep Solvent* (NADES) sebagai pelarut alternatif dalam ekstraksi. NADES adalah salah satu *Green solvent* (pelarut hijau) yang dipilih sebagai pelarut alternatif dalam ekstraksi senyawa bioaktif. NADES memiliki keuntungan yaitu ramah lingkungan, murah dan termasuk golongan *foodgrade* sehingga aman bila dikonsumsi (Astiti *et al*, 2019). Dari segi lingkungan dan ekonomi, NADES juga memberikan keuntungan besar mengenai degradabilitas.

biaya rendah dan persiapan yang sederhana. Dari semua sifat tersebut menunjukkan bahwa NADES sebagai pelarut ekstraksi untuk produk alami dan potensial dibidang kesehatan seperti kosmetik, makanan, dan kefarmasian (Dai *et al*, 2016).

Pelarut NADES terbuat dari senyawa-senyawa metabolit primer yang alami dan aman seperti asam amino, monosakarida, polisakarida, disakarida, asam laktat, asam amino, kolin klorida gliserol yang dapat digunakan sebagai *Natural Deep Solvent* (NADES) dengan perbandingan mol rasio tertentu. NADES memiliki beberapa gugus fungsi yaitu asam amino, gugus hidroksil yang dapat membentuk ikatan hidrogen antarmolekul sehingga dapat meningkatkan kelarutan senyawa terutama senyawa fenolik dalam pelarut NADES.

Pada penelitian yang telah dilakukan oleh (Dewi puspa sari, 2022) tentang pengaruh *Natural Deep Solvent* (NADES) terhadap aktivitas antibakteri ekstrak daun beluntas. Pembuatan pelarut NADES dibuat dengan cara pemanasan dan pengadukan. Pelarut yang digunakan dalam penelitian tersebut Sebanyak 1 mol kolin klorida ditimbang (139,62 gram) dan sebanyak 1mol gliserol ditimbang (92 gram) dengan masing masing konsentrasi rasio 1;1, kemudian kedua bahan dimasukkan ke dalam Erlenmeyer lalu dipanaskan diatas *hot plate* kurang lebih 1 jam pada temperature suhu 60-70°C dengan stirrer.

Skrining fitokimia merupakan tahap pendahuluan dalam suatu penelitian fitokimia yang bertujuan untuk memberikan gambaran tentang golongan senyawa yang terkandung dalam tanaman yang sedang diteliti. Penemuan obat-obat baru sangat penting untuk tiap-tiap pemerintah daerah di dalam negeri pada waktu ini. Salah satu sumber alam yang berpotensi memiliki kandungan bioaktif yang dapat berfungsi sebagai obat adalah sumberdaya hayati khususnya tanaman kayu secang ini.

Pada penelitian yang telah dilakukan oleh (Dhea nur fadhilah dkk, 2023) tentang karakterisasi simplisia dan skrining fitokimia ekstrak etanol kayu secang (*Caesalpinia sappan L*) hasil skrining fitokimia ekstrak kayu secang menunjukkan hasil positif (+) memiliki kandungan senyawa kimia golongan flavonoid, tannin, saponin, alkaloid, steroid, fenolik.

Penelitian yang dilakukan oleh (I gede dewa, Nandra, Hamlan, 2019) tentang kajian bioaktivitas dan metabolit sekunder dari kayu secang (*Caesalpinia sappan L*). Untuk sediaan bahan aktif. Bahwa ekstrak kayu secang yang diperoleh dengan menggunakan teknik maserasi dengan pelarut 70% selama 2 hari pada suhu kamar, kandungan fitokimia dalam ekstrak ditemukan terpenoid, flavonoid, fenolik.

Penelitian yang telah dilakukan oleh (Dewi puspa sari, 2022) tentang pengaruh Natural Deep Solvent (NADES) terhadap aktivitas antibakteri ekstrak daun beluntas. Hasil uji skrining fitokimia ekstrak NADES daun beluntas menunjukkan hasil positif mengandung, alkaloid, flavonoid, saponin, tannin dan fenol.

Berdasarkan uraian diatas, penulis tertarik untuk melakukan penelitian tentang “perbandingan metode ekstraksi maserasi dan NADES pada kayu secang dan analisis penetapan kadar flavonoid menggunakan spektrofotometri UV”.

B. Rumusan Masalah

1. Bagaimana efektivitas rendemen, waktu ekstraksi, dan volume pelarut ekstraksi maserasi dan NADES ?
2. Senyawa apa saja yang terkandung dalam kayu secang ?

3. Berapa kadar flavonoid dalam kayu secang dengan spektrofotometri UV ?

C. Tujuan Penelitian

1. Untuk mengetahui Bagaimana efektivitas rendemen,waktu ekstraksi, dan volume pelarut ekstraksi maserasi dan NADES
2. Senyawa apa saja yang terkandung dalam kayu secang
3. Berapa kadar flavonoid dalam kayu secang dengan spektrofotometri UV

D. Manfaat Penelitian

1. Bagi Peneliti Menambah pengetahuan, dan wawasan serta dapat menerapkan ilmu yang telah didapat selama menjalani perkuliahan di Jurusan Farmasi ISTN umumnya dalam ilmu fitokimia khususnya pada ekstraksi maserasi dan sokhletasi dan skrining fitokimia untuk melihat kandungan metabolit sekunder pada kayu secang (*Caesalpinnia sappan L*)
2. Bagi Institusi Menambah pustaka informasi bagi mahasiswa di Jurusan Farmasi ISTN terutama dalam mata kuliah fitokimia dan menjadi referensi mengenai cara yang lebih efektif untuk mengambil ekstrak metabolit sekunder pada kayu secang (*Caesalpinnia sappan L*)
3. Bagi Masyarakat Menginformasikan kepada masyarakat tentang tanaman kayu secang (*Caesalpinnia sappan L*) yang dapat dijadikan sebagai tanaman obat yang dapat menyembuhkan berbagai penyakit dan dapat dibuat berbagai bentuk sediaan.

E. Ruang Lingkup Penelitian

Ruang lingkup dalam penelitian ini adalah ekstrak kayu secang (*Caesalpinnia sappan L*) yang diperoleh dengan metode ekstraksi secara maserasi dan Natural deep solvent (NADES) dan dilakukan skrining fitokimia untuk melihat metabolit sekunder (Alkaloid, flavonoid, tanin, saponin, minyak atsiri, polifenol, steroid dan triterpenoid) yang terkandung di dalam kayu secang (*Caesalpinnia sappan L*). Penelitian ini direncanakan akan dilakukan di Laboratorium Jurusan Farmasi Institut sains dan teknologi nasional.

BAB II

TINJAUAN PUSTAKA

A. Tanaman kayu secang (*Caesalpinia sappan* L)



Sumber : Dokumentasi Pribadi

Gambar 2.1 kayu secang (*Cesalpinia sappan* L).

Klasifikasi Kayu secang (BPOM RI, 2008)

Kerajaan :Plantae

Divisi :Spermatophyta

Sub divisi :Angiospermae

Kelas :Dicotyledoneae

Bangsa :Fabales

Suku : Fabaceae

Marga : *Caesalpinia*

Jenis : *Caesalpinia sappan* L.

1. Morfologi

Kayu secang biasa tumbuh di daerah tropis umumnya di tempat terbuka sampai ketinggian 1000 m di atas permukaan laut seperti di pegunungan namun tidak bersuhu terlalu dingin (Astina, 2010). Kayu secang termasuk suku *Caesalpiniaceae*. memiliki nama berbeda di setiap daerah seperti cang (Bali), sepang (Sasak), kayu sena (Manado), naga, sapang (Makassar), soga jawa (Jawa), kayu secang (Madura), secang (Sunda), sepeung, sopang, cacang (Sumatra), sepang (Bugis), sawala, hinianga, sinyhiaga, singiang (Halmahera Utara), sepen (Halmahera Selatan), lacang (Minangkabau), sepel (Timor), hape (Sawu), hong (Alor) (Karlina et al, 2016).

Secang termasuk jenis perdu atau pohon kecil dengan tinggi 5-10 m. Batang dan percabangannya berduri tempel yang bentuknya bengkok dan letaknya tersebar, batang bulat dan berwarna hijau kecoklatan, memiliki daun majemuk menyirip ganda, panjang 25- 40 cm, jumlah anak daun 10-20 pasang yang letaknya berhadapan. Anak daun tidak bertangkai, bentuknya lonjong, pangkal romping, ujung bulat, tepi rata dan hampir sejajar panjang 10-25 cm, lebar 3-11 mm, dan berwarna hijau. Bunga nya bunga majemuk berbentuk malai, keluar dari ujung tangkai dengan panjang 10-40 cm, mahkota bentuk tabung, warna kuning. Buahnya buah polong, memiliki ukuran panjang 8-10 cm dan lebar 3-4 cm ujung seperti paruh berisi 3-4 biji, bila masak warnanya hitam (Yohana dan Yovita, 2012).

2. kandungan kimia kayu secang (*Caesalpinia sappan L*)

Berdasarkan laporan berbagai penelitian kayu menganandung senyawa homoisoflavonoid, pewarna merah saponin, tanin, asam galat dan brazilin. Batang dan daun tumbuhan ini mengandung alkaloid, flavonoid, tanin, brazilin, saponin, dan fitosterol serta buahnya mengandung tanin, beberapa senyawa fenolat telah diisolasi dan diidentifikasi dari secang diantaranya brazilin, sappankalokon, (Saitoh et.al.,1986) dalam (Yemirita, 2010).

1. khasiat kayu secang (*Caesalpinia sappan L*)

Tanaman kayu secang secara tradisional dapat dimanfaatkan untuk pengobatan diare, disentri batuk darah pada TBC, muntah darah, sifilis, malaria tetanus pembengkakan (tumor), dan nyeri karena gangguan sirkulasi darah. (Yenni, putranti, dewi, dkk, 2016).

B. Simplisia

1. Definisi Simplisia Simplisia adalah bahan alamiah yang dipergunakan sebagai obat yang belum mengalami pengolahan apapun juga dan kecuali dikatakan lain, berupa bahan yang telah dikeringkan (Depkes RI, 2000: 3). Menurut “Materia Medika Indonesia” simplisia dibedakan menjadi 3 yaitu:

a. Simplisia Nabati

Simplisia nabati adalah simplisia yang dapat berupa tanaman utuh, bagian tanaman, eksudat tanaman, atau gabungan antara ketiganya, misalnya *Datura Folium* (kecubung) dan *Piperis nigri Fructus* (lada).

b. Simplisia Hewani Simplisia

hewani adalah simplisia yang dapat berupa hewan utuh atau zat-zat berguna yang dihasilkan oleh hewan dan belum berupa bahan kimia murni.

b. Simplisia Pelikan atau Mineral

Simplisia pelikan atau mineral adalah simplisia berupa bahan pelikan atau mineral yang belum diolah atau telah diolah dengan cara sederhana dan belum berupa bahan kimia murni

2. Karakteristik Simplisia

Simplisia sebagai produk hasil pertanian atau pengumpulan dari tumbuhan liar (wild crop) memiliki kandungan kimia yang tidak selalu terjamin karena adanya variabel bibit, tempat tumbuh, iklim, kondisi (umur dan cara), panen, serta proses pasca panen dan preparasi akhir. Variasi kandungan senyawa dalam produk hasil panen tumbuhan obat yang disebabkan oleh beberapa aspek sebagai berikut (Depkes RI, 2000) :

- 1) Genetik (bibit)
- 2) Lingkungan (tempat tumbuh, iklim)
- 3) Rekayasa agronomi (pupuk, perlakuan selama masa tumbuh)
- 4) Panen (waktu dan pasca panen) Besarnya variasi senyawa kandungan meliputi baik jenis maupun kadarnya, sehingga timbul jenis (spesies) lain yang disebut kultivar (Depkes RI, 2000: 4). Proses pemanasan dan preparasi simplisia merupakan proses yang dapat menentukan mutu simplisia dalam artian, yaitu komposisi senyawa kandungan, kontaminasi dan bahan.

Karakterisasi suatu penyederhanaan memiliki pengertian bahwa penyederhanaan yang akan digunakan untuk obat sebagai bahan baku harus memenuhi persyaratan yang tercantum dalam monografi terbitan resmi Departemen Kesehatan (Materia Medika Indonesia). Sedangkan sebagai produk yang langsung dikonsumsi (serbuk jamu dsb) masih harus memenuhi persyaratan produk kefarmasian sesuai dengan peraturan yang berlaku. Karakterisasi simplisia meliputi uji makroskopik, uji mikroskopik, dan uji simplisia (Depkes RI, 2000: 5).

3. Pengolahan Simplisia

Proses awal pembuatan ekstrak adalah tahapan pembuatan serbuk simplisia kering (penyerbukan). Dari simplisia dibuat serbuk simplisia dengan perakatan tertentu sampai derajat kehalusan tertentu. Proses ini dapat mempengaruhi mutu ekstrak dengan beberapa hal dasar yaitu membuat serbuk halus menyederhanakan proses ekstraksi semakin efektif, namun membuat serbuk halus maka semakin rumit secara teknologi peralatan untuk tahap filtrasi. Selama penggunaan peralatan penyerbukan dimana ada gerakan dan interaksi dengan benda keras (logam, dll) maka akan timbul panas (kalori) yang dapat berpengaruh pada kandungan senyawa. Namun hal ini dapat dikompensasi dengan penggunaan nitrogen cair.

Untuk menghasilkan simplisia yang bermutu tinggi dan terhindar dari cemaran industri obat tradisional dalam mengelola simplisia sebagai bahan baku pada umumnya melakukan tahapan berikut:

a) Sortasi basah

Sortasi Basah Sortasi basah dilakukan untuk memisahkan kotoran-kotoran atau bahan-bahan asing lainnya dari bahan simplisia. Misalnya simplisia yang dibuat dari suatu tanaman obat, bahan-bahan asing seperti tanah, kerikil, rumput, batang, daun, akar yang telah rusak, serta pengotoran lainnya harus dibuang. Tanah yang mengandung bermacam-macam mikroba dalam jumlah yang tinggi. Oleh karena itu penyederhanaan dari tanah yang terikut dapat mengurangi jumlah mikroba awal.

b) Pencucian Pencucian dilakukan untuk menghilangkan tanah dan pengotor lainnya yang menempel pada bahan simplisia. Pencucian dilakukan dengan air bersih, misalnya air dari mata air, air sumur dari PAM. Bahan simplisia yang mengandung zat yang mudah larut dalam air yang mengalir, pencucian dilakukan dalam waktu yang sesingkat mungkin.

c) Perajangan Beberapa bahan penyederhanaan yang perlu dialami perajangan bahan penyederhanaan dilakukan untuk memperoleh proses pengeringan, pengepakan, dan penggilingan. Semakin tipis bahan yang akan dikeringkan maka semakin cepat penguapan udara, sehingga mempercepat waktu pengeringan. Akan tetapi potongan yang terlalu tipis juga dapat menyebabkan penurunan/ penurunan zat berkhasiat yang mudah menguap, sehingga mempengaruhi komposisi, bau, dan rasa yang diinginkan.

Pengeringan Tujuannya untuk mendapatkan simplisia yang tidak mudah rusak, sehingga dapat disimpan dalam waktu yang lebih lama. Dengan mengurangi kadar air dan reaksi reaksi enzimatis akan menurunkan mutu atau merusak simplisia. Air yang masih tersisa dalam simplisia pada kadar tertentu dapat merupakan media pertumbuhan kapang dan jasad renik lainnya. Proses sudah dapat tercapai proses enzimatis dalam sel bila kadar airnya dapat mencapai kurang dari 10%. Hal-hal yang perlu diperhatikan selama proses.

d) pengeringan adalah pengeringan, kelembaban, waktu pengeringan, dan luas permukaan bahan.

Suhu yang terbaik pada pengeringan adalah tidak melebihi 60°C, tetapi bahan aktif yang tidak tahan pemanasan atau mudah menguap harus dikeringkan pada

suhu serendah mungkin, misalnya 30°C sampai 45°C. Terdapat dua cara pengeringan yaitu pengeringan alami (dengan sinar matahari langsung atau dengan diangin-anginkan) dan pengeringan buatan (menggunakan instrumen).

e) Sortasi kering

Sortasi setelah pengeringan sebenarnya merupakan tahap akhir pembuatan simplisia. Tujuan sortasi adalah untuk memisahkan benda-benda asing seperti bagian-bagian tanaman yang tidak diinginkan dan pengotoran-pengotoran lainnya yang masih ada dan tertinggal pada simplisia kering. Pada simplisia bentuk rimpang, sering jumlah akar yang menempel pada rimpang terlalu besar dan harus dibuang. Demikian pula adanya partikel-partikel pasir, besi, dan benda-benda tanah lain yang tertinggal harus dibuang sebelum simplisia di bungkus.

f) Penyimpanan

Setelah pengeringan dan sortasi kering selesai, simplisia perlu ditempatkan dalam suatu tempat tersendiri agar tidak saling bercampur antara simplisia satu dengan yang lainnya. Selanjutnya, wadah-wadah yang berisi simplisia disimpan dalam rak pada gudang penyimpanan. Adapun faktor-faktor yang mempengaruhi pengepakan dan penyimpanan simplisia adalah cahaya, oksigen, atau sirkulasi udara, reaksi kimia yang terjadi antara aktif tanaman dengan wadah, penyerapan air, kemungkinan terjadinya proses dehidrasi, pengotoran atau pencemaran, baik yang diakibatkan oleh serangga, kuman atau lainnya. Untuk persyaratan wadah yang akan digunakan sebagai pembungkus simplisia adalah harus inert, artinya tidak mudah bereaksi dengan bahan lain, tidak mampu melindungi bahan penyederhanaan dari cemaran mikroba, kotoran, serangga, penguapan aktif serta dari pengaruh cahaya, oksigen, dan uap air. (Depkes RI, 1985; Depkes RI, 2000).

4. Identitas Simplisia Kayu Secang (*Caesalpinia sappan L*)

(Martindale jilid 1 hal 31)

A. Pemerian

Tidak berbau, rasa agak kelat. Kayu berbentuk potongan-potongan atau kepingan dengan ukuran sangat bervariasi atau berupa serutan-serutan keras dan padat, warna merah, merah jingga, atau kuning.

B. Mikroskopik

Xylem jelas, rider dengan jari jari xylem terdiri dari 1 sampai 3 baris sel yang berisi butir pati kecil. Tunggal dan berkelompok. Pembuluh kayu atau trachea umumnya berkelompok, kadang kadang tunggal. Garis tengah 25 sampai 120, dinding tebal berlignin. Bernoktah yang berupa noktah halaman dengan lubang berbentuk celah, lumen umumnya berisi zat yang berwarna merah keunguan, merah kekuningan sampai merah kecoklatan. serbuk warna merah jingga kecoklatan. fragmen pengenal adalah berkas serabut dengan seludang hablur kalsium oksalat berbentuk prisma.

C. Ekstraksi

1. Ekstrak

Menurut Farmakope Edisi IV (Depkes RI, 1995: 7) Ekstrak adalah sediaan kental yang diperoleh dengan mengekstraksi senyawa aktif dari simplisia nabati atau simplisia hewani menggunakan pelarut yang sesuai, diuapkan dan sedemikian hingga memenuhi baku yang telah ditetapkan. Sebagian besar ekstrak dibuat dengan mengekstraksi bahan baku obat secara perkolasi. Seluruh perkolat biasanya dipekatkan secara destilasi dengan pengurangan tekanan, agar bahan sesedikit mungkin terkena panas. kemudian semua atau hampir yang tersisa semua pelarut diperlakukan massa atau serbuk.

Ekstraksi adalah suatu proses penyarian zat aktif dari bagian tanaman obat yang bertujuan untuk menarik komponen kimia yang terdapat dalam bagian tanaman obat tersebut. Proses ekstraksi pada dasarnya adalah proses perpindahan massa dari komponen zat padat yang terdapat pada simplisia ke dalam pelarut organik yang digunakan. Pelarut organik akan menembus dinding sel dan selanjutnya akan masuk ke dalam rongga sel tumbuhan yang mengandung zat aktif. Zat aktif akan terlarut dalam pelarut organik pada bagian luar sel untuk selanjutnya berdifusi masuk ke dalam pelarut. (Marjoni, 2016: 15-16).

2. Metode ekstraksi

1) Cara dingin

Pada metode ini tidak dilakukan pemanasan selama proses ekstraksi dilakukan dengan tujuan untuk menghindari rusaknya senyawa yang akan diambil pada proses ekstraksi.

a) Maserasi

Maserasi adalah proses pengekstrakan simplisia dengan menggunakan pelarut dengan beberapa kali pengocokan atau pengadukan pada temperatur ruangan (Kamar). Secara teknologi termasuk ekstraksi dengan prinsip metode pencapaian konsentrasi pada keseimbangan. Maserasi kinetik berarti dilakukan pengadukan yang kontinu (terus-menerus). Remaserasi berarti dilakukan pengulangan penambahan pelarut setelah dilakukan penyaringan maserat pertama, dan seterusnya. (Depkes RI, 2000: 10).

Sedangkan menurut (Fernanda, Sudarwati. 2019:21) maserasi merupakan penyarian sederhana dengan cara merendam serbuk simplisia kedalam serbuk penyari. cairan penyari akan menembus dinding sel dan akan masuk kedalam rongga sel yang mengandung zat aktif, zat aktif tersebut akan larut dengan adanya perbedaan konsentrasi antara larutan zat aktif di dalam sel. Proses tersebut dilakukan berulang sehingga terjadi keseimbangan konsentrasi antara larutan diluar sel dan didalam sel.

Kelebihan dari ekstraksi maserasi adalah peralatan dan teknik pengerjaan yang relatif sederhana dan mudah dilakukan. Sedangkan, kekurangan dari ekstraksi maserasi adalah memerlukan banyak waktu, dan proses penyariannya tidak sempurna karena zat aktif hanya mampu terekstraksi sebesar 50% (Marjoni, 2016: 46)

b) Perkolasi

Perkolasi adalah proses penyarian dengan cara melewatkan pelarut yang cocok pada simplisia secara lambat dalam suatu wadah yang disebut percolator. Prinsip perkolasi adalah penyarian zat aktif yang dilakukan dengan cara mengalirkan suatu pelarut melalui serbuk simplisia yang telah terlebih dahulu

dibasahi selama waktu tertentu, kemudian ditempatkan dalam suatu wadah berbentuk silinder yang diberi sekat berpori pada bagian bawahnya (Marjoni, 2016: 49-50)

2) Cara panas

Pada metode ini menggunakan pemanasan selama proses ekstraksi berlangsung, dengan adanya pemanasan tentunya akan mempercepat proses ekstraksi dibandingkan dengan ekstraksi cara dingin.

a) Refluks Refluks adalah ekstraksi dengan pelarut pada temperatur titik didihnya, selama waktu tertentu dan jumlah pelarut terbatas yang relatif konstan dengan adanya pendingin balik. Umumnya dilakukan pengulangan proses pada residu pertama sampai 3-5 kali sehingga dapat termasuk proses ekstraksi sempurna. (Depkes RI, 2000: 10).

b) Soxhletasi

Soxhletasi adalah metoda pemisahan suatu komponen yang terdapat dalam suatu contoh berbentuk padatan dengan cara penyarian berulang, menggunakan pelarut tertentu dengan memakai alat soxhletasi (Marjoni, 2016: 65)

Soxhletasi digunakan pada pelarut organik tertentu. Dengan cara pemanasan, sehingga uap yang timbul setelah dingin secara kontinyu akan membasahi sampel, secara teratur pelarut tersebut akan dimasukkan kembali kedalam labu dengan membawa senyawa kimia yang akan diisolasi tersebut (Fernanda, Sudarwati. 2019:23).

Pada metode soxhletasi terdapat kelebihan dan kekurangan. Kelebihannya yaitu, jumlah sampel yang diperlukan sedikit, proses sokhletasi berlangsung cepat, pelarut organik dapat mengambil senyawa organik berulang kali, sampel diekstraksi dengan sempurna karena dilakukan berulang kali, dapat digunakan untuk bahan (simplisia) yang bertekstur lunak dan tidak tahan terhadap pemanasan secara langsung, hemat pelarut karena hanya menggunakan pelarut dalam jumlah sedikit, senyawa yang tidak terlarut tidak akan ikut menguap saat dipanaskan karena suhu alat sokhlet diatur dibawah titik didih senyawa, dan sistem pemanasan dapat diatur/ disesuaikan. Sedangkan kekurangan sokhletasi

yaitu, ekstrak harus diidentifikasi dengan pereaksi (Mayer, Na, Wagner, atau reagen lainnya), pelarut yang didaur ulang dan ekstrak yang terkumpul di dalam wadah dipanaskan secara terus-menerus mengakibatkan adanya reaksi peruraian oleh panas, jumlah senyawa yang diekstraksi akan melampaui kelarutannya dalam pelarut tertentu kemudian dapat mengendap dalam wadah, sehingga diperlukan pelarut lebih banyak untuk melarutkannya, pada ekstraksi yang berskala besar, metode ini kurang cocok karena menggunakan pelarut dengan titik didih yang tinggi (Emelda, 2019: 204).

Prinsip kerja soxhletasi adalah uap cairan pelarut naik ke atas melalui pipa samping kemudian diembunkan kembali oleh pendingin tegak. Selanjutnya, cairan turun ke labu melalui tabung berisi simplisia. Adanya sifon cukup berperan karena seluruh cairan akan kembali ke labu. Cara ini lebih menguntungkan karena uap panas tidak melalui serbuk simplisia, tetapi melalui pipa samping. Wadah labu yang berisi bahan (simplisia) secara perlahan terisi terus-menerus dengan tetesan pelarut. Akibatnya, senyawa-senyawa tertentu dari bahan (simplisia) akan larut pada pelarut tersebut. Pelarut yang akan memenuhi wadah labu yang berisi bahan (simplisia), seluruh pelarut akan dikeluarkan melewati tabung destilasi kembali. Alat soxhlet akan mengosongkan isinya ke dalam labu dasar bulat setelah pelarut mencapai kadar tertentu (Emelda, 2019: 201)

c) Digesti

Digesti adalah maserasi kinetik (dengan pengadukan kontinu) pada temperatur yang lebih tinggi dari temperatur ruangan (kamar), yaitu secara umum dilakukan pada temperatur 40 - 50°C. (Depkes RI, 2000: 10).

d) Infusa

Infus adalah ekstraksi dengan pelarut air temperature penangas air (bejana infus tercelup dalam penangas air mendidih, suhu pada 96-98°C) selama waktu tertentu (15 - 20 menit). (Depkes RI, 2000: 10). Infusa merupakan sediaan cair yang dibuat dengan cara menyari simplisia nabati dengan air pada suhu 90°C selama 15 menit (Marjoni, Riza 2016: 21).

e) Dekokta

Dekokta adalah infus pada waktu yang lebih lama (-30°C) dan temperatur sampai titik didih air (Depkes RI, 2000: 10). Proses penyarian dekokta hampir sama dengan infusa, perbedaannya hanya terletak pada lamanya waktu pemanasan. Waktu pemanasan pada dekokta lebih lama dibandingkan metode infusa, yaitu 30 menit dihitung setelah suhu mencapai 90°C menit (Marjoni, 2016: 21).

f) Destilasi uap

Destilasi uap adalah ekstraksi kandungan uap (minyak atisiri) dari bahan (segar atau simplisia) dengan uap air berdasarkan peristiwa tekanan parsial senyawa kandungan menguap dengan fase uap air dari ketel secara kontinu sampai sempurna dan diakhiri dengan kondensasi fase uap campuran (senyawa kandungan uap ikutan) terdestilasi) menjadi destilat air bersama senyawa kandungan yang memisah sempurna atau memisah sebagian. Destilasi uap, bahan (simplisia) benar-benar tidak tercelup ke air yang mendidih, namun dilewati uap air sehingga senyawa kandungan uap menguap ikut terdestilasi. Destilasi uap dan air, bahan (simplisia) bercampur sempurna atau sebagian dengan air mendidih, senyawa kandungan menguap tetap ikut terdestilasi. (Depkes RI, 2000: 10-11).

g) Ekstraksi Non-Konvensional

Ultrasound Assisted Extraction (UAE) juga disebut ekstraksi ultrasonik atau sonikasi yang menggunakan energi gelombang ultrasonik dalam ekstraksi. Ultrasonografi dalam pelarut yang menghasilkan kavitasasi mempercepat pelarutan dan difusi zat terlarut serta perpindahan panas, yang meningkatkan efisiensi ekstraksi. Keuntungan lain dari UAE termasuk konsumsi pelarut dan energi yang rendah, serta pengurangan suhu dan waktu ekstraksi. UAE berlaku untuk ekstraksi senyawa termolabil dan tidak stabil. UAE biasanya digunakan dalam ekstraksi berbagai jenis produk alami (Zhang et al, 2018).

D. Natural deep eutectic solvent (NEDES)

Deep Eutectic Solvents (DES) merupakan pelarut baru seperti Ionic liquids (ILs), dengan karakteristik campuran dua senyawa yang membuat campuran eutektik sehingga dapat digunakan ketika dua komponen pembentuknya dicampur bersama dalam rasio

yang tepat, maka titik eutektik akan terjadi. Pelarut DES termasuk ILs dengan mencampurkan garam amonium kuaterner dengan kolin klorida dan gliserol tersubstitusi dan donor ikatan hidrogen, keduanya memiliki titik leleh yang tinggi, untuk membentuk campuran eutektik dengan titik peleburan yang jauh lebih rendah (Leron et al, 2012). DES yang paling umum didasarkan pada kolin klorida (ChCl), asam karboksilat, dan donor ikatan hidrogen lainnya, seperti urea, asam sitrat, asam suksinat, dan gliserol (Craveiro et al, 2016)

Natural Deep Eutectic Solvents (NADES) merupakan pelarut alternatif yang ramah lingkungan. Potensi penggunaan pelarut NADES dapat diaplikasikan dalam proses ekstraksi (misalnya perasa makanan, pewangi, pewarna, obatobatan, kosmetik, dan bahan kimia pertanian), kimia organik sintesis, dan reaksi enzimatik. NADES menyajikan sifat yang baik untuk digunakan sebagai pelarut ekstraksi alternatif, seperti cair pada suhu kamar (dan terkadang bahkan di bawah 0°C), memiliki viskositas yang dapat diatur dengan mudah, dan berkelanjutan serta aman (Choi et al, 2011; Paiva et al, 2014).

NADES dapat dikelompokkan berdasarkan senyawa-senyawa penyusunnya sebagai berikut (Dai et al, 2013):

- 1) Cairan ionik, terdiri dari asam-asam organik (asam sitrat, asam maleat, asam laktat) dan senyawa-senyawa basa (choline chloride, betaine chloride, dan betaine).
- 2) NADES netral, tidak terdapat konstituen ionik, seperti campuran polyalcohols (gliserol, glisin, 1-2-propandiol).
- 3) NADES yang bersifat asam, terdiri dari senyawa-senyawa netral (glukosa, fruktosa, sukrosa, maltosa, trehalose) dan senyawa-senyawa asam.
- 4) NADES yang bersifat basa, yang terdiri dari senyawa-senyawa netral dan senyawa-senyawa basa.
- 5) NADES yang bersifat amfoter, kombinasi dari asam amino (α -Proline, β Alanine) dan gula, polyalcohol, atau senyawa-senyawa asam.

E. Choline Chloride

Salah satu komponen yang paling banyak digunakan untuk pembentukan DES ini adalah choline chloride (ChCl). ChCl sangat murah, biodegradable dan tidak beracun. Suatu garam amonium kuarterner yang dapat diekstrak dari biomassa atau disintesis dari cadangan fosil. Saat ini aman dikombinasikan dengan komponen sebagai donor ikatan hidrogen seperti urea, asam karboksilat terbarukan (misalnya oksalat, sitrat, suksinat atau amino asam) atau poliol terbarukan (misalnya gliserol, karbohidrat), ChCl mampu dengan cepat membentuk DES. Meskipun sebagian besar dari DES adalah terbuat dari ChCl sebagai spesies ionik, DES tidak dapat dianggap sebagai ILS karena DES tidak seluruhnya terdiri dari spesies ion dan juga dapat diperoleh dari spesies non-ionik. Dibandingkan dengan ILS tradisional, DES yang berasal dari ChCl memiliki banyak keuntungan antara lain yaitu :

- 1) Harga rendah
- 2) Inert secara kimia dengan air (memudahkan saat storage).
- 3) Mudah saat preparasi karena DES diperoleh hanya dengan mencampur dua komponen, sehingga tidak memerlukan masalah pemurnian dan pembuangan limbah yang umumnya ditemui dengan ILS.
- 4) Kebanyakan dari DES adalah biodegradabel, biokompatibel dan tidak beracun. (Zhang et al, 2012).

F. Gliserol

Gliserol mempunyai nama lain yaitu sebagai propana-1,2,3-triol dalam industri farmasi biasa digunakan sebagai bahan baku pada pembuatan obatobatan, krim untuk kulit, bahan pada pembuatan sabun dan sampo serta pelarut. Gliserol yang digunakan yaitu gliserol murni dan biasanya diperoleh dari industri farmasi di luar negeri. Kondisi ini tidak akan berakibat baik jika hanya mengandalkan produk impor karena diperkirakan setiap tahun kebutuhan gliserol ini akan terus meningkat. Maka berbagai penelitian telah dilakukan untuk memanfaatkan gliserol ini dengan cara mengubahnya menjadi senyawa lain yang mempunyai nilai ekonomis lebih tinggi (Ritmaleni, 2014).

3. Pembuatan ekstrak

Pembuatan ekstrak melalui tahap-tahap sebagai berikut (Depkes RI, 1986; Depkes RI, 2000: 9-10)

1. Pembasahan

Pembasahan serbuk dilakukan pada penyarian, dimaksudkan memberikan kesempatan sebesar-besarnya kepada cairan penyari memasuki pori-pori dalam simplisia sehingga mempermudah penyarian selanjutnya. Penyari/Pelarut

Cairan penyari yang digunakan dalam proses pembuatan ekstrak adalah penyari yang baik untuk senyawa kandungan yang berkhasiat atau aktif.

Penyari tersebut dapat dipisahkan dari bahan dan dari senyawa kandungan lainnya. Faktor utama yang menjadi pertimbangan dalam pemilihan cairan penyari adalah selektifitas, ekonomis, mudah, ramah lingkungan dan aman.

Dalam hal keamanan untuk manusia atau hewan coba, cairan pelarut harus memenuhi syarat kefarmasian atau dalam perdagangan yang dikenal dengan kelompok spesifikasi "Pharmaceutical grade". Sampai saat ini berlaku aturan bahwa pelarut yang diperolehkan adalah air, alkohol (etanol) atau campuran (air dan alkohol).

2. Pemisahan dan Pemurnian

Tujuannya adalah untuk menghilangkan (memisahkan) senyawa yang tidak dikehendaki mungkin tanpa pengaruh pada senyawa kandungan yang dikehendaki, sehingga diperoleh ekstrak yang lebih murni. Proses-proses pada tahap ini adalah pengendapan, pemisahan dua cairan bercampur, sentrifugasi, dekantasi, filtrasi, serta proses absorpsi dan penukaran ion.

3. Pemekatan / Penguapan

Pemekatan berarti peningkatan jumlah partikel solut (senyawa terlarut) dengan cara penguapan pelarut tanpa sampai menjadi kering tetapi ekstrak hanya menjadi kental/ pekat. Hitung hasil rendemen ekstrak etanol 70% kayu secang (*Caesalpinia sappan L*) dengan rumus :

$$\% \text{ Rendemen} : \frac{\text{Bobot ekstrak yang didapat}}{\text{Bobot serbuk simplisia yang diekstraksi}} \times 100\%$$

4. Factor factor yang memperngaruhi ekstraksi

hal yang perlu diperhatikan dalam melakukan ekstraksi (Marjoni, 2016: 18-19) :

a. Jumlah simplisia yang akan diekstrak

Jumlah simplisia yang akan di ekstrak sangat erat kaitannya dengan jumlah pelarut yang akan digunakan. Semakin banyak simplisia yang akan digunakan, maka jumlah pelarut yang digunakan juga semakin banyak.

b. Derajat kehalusan simplisia

Semakin halus suatu simplisia, maka luas kontak permukaan dengan pelarut juga akan semakin besar sehingga proses ekstraksi akan dapat berjalan lebih optimal.

c. Jenis pelarut yang akan digunakan dalam ekstraksi

Pemilihan pelarut yang digunakan dalam ekstraksi sangat dipengaruhi oleh kepolaran dari pelarut itu sendiri. Senyawa dengan kepolaran yang sama akan lebih mudah larut dalam pelarut yang memiliki tingkat kepolaran yang sama pula (like dissolves like).

d. Waktu ekstraksi

Waktu yang digunakan selama proses ekstraksi akan sangat menentukan banyaknya senyawa-senyawa yang terekstrak.

e. Metode ekstraksi

Berbagai metoda ekstraksi dapat digunakan untuk menarik senyawa kimia dari simplisia

f. Kondisi proses ekstraksi

Beberapa proses ekstraksi memerlukan keadaan dan kondisi tertentu. Bahan alam yang mengandung senyawa kumarin dan kuinon umumnya dilakukan pada kondisi terlindung dari cahaya. Proses ekstraksi skala industri misalnya dilakukan secara kontiniu, sedangkan pada skala laboratorium, ekstraksi dapat dilakukan baik dengan pengadukan atau tan`pa pengadukan.

g. Temperatur / Suhu

Temperatur/suhu juga berpengaruh terhadap senyawa yang diekstrak. Temperatur pada proses ekstraksi terbatas hingga suhu titik didih pelarut yang digunakan. Biasanya waktu ekstraksi akan relatif cepat jika dilakukan pada suhu yang tinggi. Namun, pada beberapa bahan (simplisia) dengan sifat tertentu, dapat merusakkan bahan tersebut. Sebaiknya ekstraksi dilakukan pada kisaran suhu 30-50°C (Emelda, 2019: 174)

D. Skrining Fitokimia

Skrining fitokimia merupakan cara untuk mengidentifikasi bioaktif yang belum tampak melalui suatu tes atau pemeriksaan yang dapat dengan cepat memisahkan antara bahan alam yang memiliki kandungan fitokimia tertentu. Skrining fitokimia merupakan tahap pendahuluan dalam suatu penelitian fitokimia yang bertujuan untuk memberikan gambaran tentang golongan senyawa yang terkandung dalam tanaman yang sedang diteliti. Metode skrining fitokimia dilakukan dengan melihat reaksi pengujian warna dengan menggunakan suatu pereaksi warna. Hal yang berperan penting dalam skrining fitokimia adalah pemilihan pelarut dan metode ekstraksi. (Kristianti dkk, 2008: 47)

Alasan lain melakukan fitokimia adalah untuk menentukan ciri senyawa aktif penyebab efek racun atau efek bermanfaat, yang ditunjukkan oleh ekstrak tumbuhan kasar bila diuji dengan sistem biologis. Pemanfaatan prosedur fitokimia telah mempunyai peranan yang mapan dalam semua cabang ilmu tumbuhan. Meskipun cara ini penting dalam semua telaah kimia dan biokimia juga telah dimanfaatkan dalam kajian biologis. (Robinson, 1991)

Untuk identifikasi metabolit sekunder yang terdapat pada suatu ekstrak digunakan berbagai metode sebagai berikut (Marjoni, 2016: 8-13)

a. Identifikasi senyawa alkaloid

1) Cara 1

Serbuk simpisia ditimbang sebanyak 0,5 g kemudian ditambahkan 1 ml asam klorida 2 N dan 9 ml air suling, dipanaskan diatas tangas air selama 2 menit, didinginkan lalu disaring. Filtrat dipakai untuk percobaan berikut:

- Diambil 3 tetes filtrat, lalu ditambahkan 2 tetes pereaksi Mayer menghasilkan endapan putih/kuning
- Diambil 3 tetes filtrat, lalu ditambahkan 2 tetes pereaksi Bouchardat menghasilkan endapan coklat-hitam
- Diambil 3 tetes filtrat, lalu ditambahkan 2 tetes pereaksi Dragendrof menghasilkan endapan merah bata

Apabila terdapat endapan putih paling sedikit dengan 2 atau 3 dari pengujian diatas, maka simplisia dinyatakan positif mengandung alkaloida.

2) Cara 2

Menggunakan metode Culvenor dan Fitzgerald: Sebanyak 4 g sampel yang dirajang dan gerus halus dalam lumpang dengan pasir bersih dan dibasahi dengan 10 ml kloroform. Tambahkan 10 ml larutan kloroform amoniak 0,05 N, gerus perlahan dan saring ke dalam tabung reaksi, tambahkan 0,5 ml asam sulfat 2 N, kocok selama 2 menit sampai terjadi pemisahan, ambil lapisan asam tambahkan pereaksi Mayer, adanya alkaloid ditandai dengan terbentuknya kabut putih hingga endapan putih.

b. Identifikasi senyawa golongan flavonoid

1) Cara 1

Sebanyak 10 g serbuk simplisia ditambahkan dengan 100 ml air panas. Campuran kemudian dididihkan selama lebih kurang 5 menit, kemudian disaring ketika panas. Sebanyak 5 ml filtrat yang diperoleh, ditambahkan 0,1 g serbuk Mg, 1 ml HCl pekat dan 2 ml Amil alkohol, dikocok, dan dibiarkan memisah. Flavonoida positif jika warna merah, kuning, jingga pada lapisan amil alkohol

2) Cara 2

Dilakukan menurut cara Simes dkk, dimana 4 g sampel yang digiling halus dalam lumpang, dididihkan dalam 25 ml etanol selama 15 menit, disaring dalam keadaan panas, filtrat yang diperoleh ditambahkan dengan air suling dan kloroform masing-masing 5 ml, lalu dikocok kuat dan dibiarkan beberapa saat sampai terbentuk dua lapisan yaitu lapisan air dan lapisan kloroform.

Lapisan air ditambahkan dengan HCl 0,1 ml dan beberapa butir logam Mg, reaksi positif jika terjadi warna merah muda sampai merah.

c. Identifikasi senyawa saponin

1) Cara 1

Sebanyak 0,5 g sampel dimasukkan kedalam tabung reaksi dan ditambahkan 10 ml air suling panas, didinginkan kemudian dikocok kuat-kuat selama 10 detik, terbentuk buih atau busa yang selama tidak kurang dari 10 menit setinggi 1-10 cm. Pada penambahan 1 tetes larutan asam klorida 2 N, apabila buih tidak hilang menunjukkan adanya saponin.

2) Cara 2

Dilakukan menurut cara Simes dkk, dimana 4 g sampel digiling halus dalam lumpang, dididihkan dalam 25 ml etanol selama 15 menit, disaring dalam keadaan panas, filtrat yang diperoleh dikeringkan. Ekstrak kering yang diperoleh ditambahkan dengan air suling dan kloroform masing-masing 5 ml, lalu dikocok kuat dan dibiarkan beberapa saat sampai terbentuk dua lapisan yaitu lapisan air dan lapisan kloroform. Lapisan air dimasukkan kedalam tabung reaksi, kemudian dikocok. Reaksi positif jika terbentuk busa yang menetap selama 15 menit dan tidak hilang dengan penambahan HCl 2 N.

d. Identifikasi senyawa golongan tannin

1) Cara 1

Sebanyak 0,5 g sampel diekstrak menggunakan 10 ml aquadest. Hasil ekstraksi disaring kemudian filtrat yang diperoleh diencerkan dengan aquadest sampai tidak berwarna. Hasil pengenceran ini diambil sebanyak 2 ml, kemudian ditambahkan dengan 1-2 tetes besi (III) klorida. Terjadi warna biru atau hijau kehitaman menunjukkan adanya tanin.

2) Cara 2

Dilakukan menurut cara Simes dkk, dimana 4 g sampel yang digiling halus dalam lumpang, dididihkan dalam 25 ml etanol selama 15 menit, disaring dalam keadaan panas, filtrat yang diperoleh dikeringkan. Ekstrak kering yang diperoleh ditambahkan dengan air suling dan kloroform masing-masing 5 ml,

lalu dikocok kuat dan dibiarkan beberapa saat sampai terbentuk dua lapisan yaitu lapisan air dan lapisan kloroform. Lapisan air ditambahkan beberapa tetes larutan FeCl_3 . Reaksi positif untuk tanin bila terbentuk warna biru.

3) Gelatin test

Ekstrak ditambahkan larutan gelatin 1% yang mengandung NaCl , jika timbul endapan berarti mengandung tanin (Trease dan Evans, 1996).

e. Identifikasi senyawa golongan minyak atsiri

Pemeriksaan senyawa minyak atsiri dapat dilakukan dengan cara ekstrak kental 0,5 g diencerkan dengan pelarut 1 ml. Kemudian dipanaskan dihotplate diatas gelas arloji hingga diperoleh residu. Hasil positif minyak atsiri ditandai dengan bau khas yang dihasilkan oleh residu tersebut.

f. Identifikasi senyawa golongan triterpenoid dan steroid

1) Cara 1

Sebanyak 1 g sampel dimaserasi dengan 20 ml N-heksan selama 2 jam, lalu disaring. Filtrat diuapkan dalam cawan penguap. Pada sisa ditambahkan 2 tetes asam asetat anhidrat dan 1 tetes asam sulfat pekat. Timbul warna ungu atau merah kemudian berubah menjadi hijau biru menunjukkan adanya steroida triterpenoida

2) Cara 2

Dilakukan menurut cara Simes dkk, dimana 4 g sampel yang digiling halus dalam lumpang, didihkan dalam 25 etanol selama 15 menit, disaring dalam keadaan panas, filtrat yang diperoleh dikeringkan. Ekstrak kering yang diperoleh ditambahkan dengan air suling dan kloroform masing-masing 5 ml, lalu dikocok kuat dan dibiarkan beberapa saat sampai terbentuk dua lapisan yaitu lapisan air dan lapisan kloroform. Lapisan kloroform disaring dengan cara melewati larutan dalam pipet kecil berisi norit dan filtrat yang diperoleh ditampung pada tiga lubang plat tetes, biarkan mengering, kemudian tambahkan pada lubang pertama H_2SO_4 pekat, lubang kedua asetat anhidrat dan H_2SO_4 dan asetat anhidrat pada lubang ketiga. Jika terbentuk warna merah pada lubang ketiga berarti positif terpenoid dan warna hijau biru menandakan positif steroid

E. Analisis penetapan kadar

Penetapan kadar flavonoid dilakukan dengan metode kolorimetri dengan menggunakan aluminium klorida dan pembanding kuersetin (Quercetine Equivalent/QE), dimana aluminium klorida akan membentuk kompleks stabil dari senyawa flavon sehingga menyebabkan terjadinya absorpsi radiasi elektromagnetik senyawa kompleks pada daerah UV melalui peristiwa transisi, yaitu eksitasi ion logam, eksitasi molekul ligan, dan transfer muatan. Selain itu, pada penelitian ini menggunakan pembanding kuersetin, dimana diketahui bahwa Kuersetin dikategorikan sebagai flavonol, salah satu dari enam subkelas senyawa flavonoid. The International Union of Pure and Applied Chemistry (IUPAC) menyebutkan kuersetin adalah 3,3',4',5,7-pentahydroxyflavanone.

BAB III METODE PENELITIAN

A. Tempat dan waktu penelitian

Penelitian dilakukan dilaboratorium mikrobiologi dan laboratorium fitokimia program studi farmasi institute sains dan teknologi nasional Jakarta. Waktu penelitian dilaksanakan pada bulan juni sampai agustus 2024.

B. Bahan dan alat penelitian

Pada penelitian ini peneliti memerlukan alat dan bahan serta prosedur kerja penelitian. Alat dan bahan serta prosedur kerja pada penelitian ini yaitu sebagai berikut, alat yang digunakan, belender, ayakan, neraca analitik, Erlenmeyer 50ml, 100ml, 250ml, beaker glass 100ml, dan 250ml, pipet tetes, rak tabung reaksi, spatula, batang pengaduk, sudip, toples maserasi, tabung reaksi, corongan.

Bahan yang digunakan, simplisia kayu secang, etanol 96%, kolin kloride, gliserol, menthanol, quersetin, pereaksi meyer, preaksi dragendrof, serbuk magnesium, HCL2N.

C. Prosedur penelitian

- a. Pembuatan serbuk simplisia kayu secang
 - 1) Diambil serutan kayu secang (*Caesalpinia sappan* L)
 - 2) Dilakukan sortasi basah dengan memisahkan serutan kayu secang (*Caesalpinia sappan* L) dari kotoran dan bahan asing lain
 - 3) Diletakan serutan kayu secang (*Caesalpinia sappan* L) diatas nampan stainlistiel kemudian dikeringkan dengan menggunakan sinar matahari langsung
 - 4) Dilakukan sortasi kering dengan memilih serutan kayu secang (*Caesalpinia sappan* L) dari bahan yang rusak atau benda asing serta kotoran lain nya
 - 5) Diperhalus serutan kayu secang (*Caesalpinia sappan* L) yang sudah kering dengan menggunakan blender agar menjadi serbuk kering

- 6) Kemudian di ayak serbuk kayu secang menggunakan ayakan 40 mesh lalu masukan kedalam wadah yang kering, lalu disimpan pada suhu ruangan
- b. Pembuatan ekstrak kayu secang dengan cara maserasi (Marjoni, 2016:41)
- 1) Disiapkan wadah bejana yang akan digunakan untuk wadah maserasi
 - 2) Disiapkan serbuk simplisia kayu secang (*Caesalpinia sappan L*) lalutimbang sebanyak 100 gram pada neraca analitik kemudian masukan kedalam toples maserasi
 - 3) Ditambahkan 700 ml etanol 96%, lalu aduk menggunakan spatula hingga homogen
 - 4) Didiamkan selama 48 jam (2 hari) dan diaduk setiap 24 jam
 - 5) Disaring menggunakan kertas saring dan dipisahkan antara hasil saringan dan endapan
 - 6) Selanjutnya dilakukan remaserasi dengan 300 ml etanol 96% selama 48 jam (2 hari) dan diaduk setiap 24 jam
 - 7) Disaring kembali hasil remaserasi dan dicampurkan semua maserat yang didapatkan
 - 8) Maserat diuapkan menggunakan *rotary evaporator*, dandilanjutkan dengan penguapan di *waterbath* hingga diperoleh ekstrak kental

c. Pembuatan larutan NADES

Pelarut NADES dibuat dengan cara pemanasan dan pengadukan (Dai et al, 2013). Sebanyak 1 mol kolin klorida ditimbang (139,62 gr) dan sebanyak 1 mol gliserol ditimbang (92 gr) dengan masing-masing konsentrasi rasio 1:1, kemudian kedua bahan dimasukan kedalam erlenmayer lalu di panaskan diatas hot plate kurang lebih selama 1 jam angka pada temperatur suhu 60-70 derajat celcius dengan kecepatan stirrer skala 4 (350 rpm). Kemudian dilakukan pemanasan sampai memperoleh larutan yang stabil (ditandai dengan campuran tetap bening tidak mengendap, mengkristal ataupun berubah warna).

Ekstraksi NADES kayu secang dengan metode UAE Ekstraksi dengan metode Ultrasound Assiste Extraction (UAE) yang dilakukan mengacu pada penelitian Andriani et al (2019). Sebanyak 15 gr serbuk simplisia ditimbang dan ditambah

dengan 150ml NADES kolin klorida:gliserol dalam Erlenmeyer. Campuran selanjutnya diaduk menggunakan UAE selama 15 menit dan frekuensi sebesar kHz untuk memberi waktu pelarut berpenetrasi ke dalam bahan. Setelah proses ekstraksi selesai, sampel didinginkan pada suhu ruang. Kemudian didiamkan selama 15 menit agar serbuk simplisia mengedap. Serbuk simplisia dipisahkan dari larutan dengan penyaringan dan dimasukkan ke dalam wadah yang tertutup rapat (Mulyadi et al, 2015).

d. Uji skrining fitokimia kayu secang

1. Uji flavonoid

Ekstrak sebanyak 0,5 gram dimasukkan kedalam tabung reaksi, kemudian tambahkan dengan serbuk Mg dan larutan HCLpekat. Hasil positif flavonoid akan menunjukkan warna orange atau merah.

2. Uji fenol

ekstrak sebanyak 100 mg dilarutkan kedalam 10 ml aquadest, kemudian ekstrak yang telah dilarutkan tersebut diambil 1-2 dimasukkan kedalam tabung reaksi dan ditambah 2 tetes larutan FeCL 5% Hasil positif senyawa fenol akan menunjukkan warna hijau, biru kehitaman.

3. Uji tannin

Sebanyak 0,5 gram dimasukkan kedalam tabung reaksi kemudian tambahkan 2 ml etanol dan diaduk. Tambahkan 3 tetes FeCl₃. Hasil positif akan menunjukkan warna endapan biru atau hitam.

4. Uji alkaloid

Ekstrak sebanyak 0,5 gram dilarutkan dalam asam sulfat. Kemudian filtrate dimasukkan kedalam 3 tabung reaksi yang berbeda. Tabung reaksi (1) tambahkan beberapa tetes pereaksi mayer. Tabung reaksi (2) tambahkan beberapa tetes pereaksi wagner. Tabung reaksi (3) tambahkan pereaksi dragendrof. Hasil positif alkaloid akan menunjukkan warna endapan putih kekuningan pada tabung (1), warna endapan coklat kemerahan pada tabung (2) dan warna endapan jingga pada tabung (3)

5. Uji saponin

Ekstrak sebanyak 0,5 gram dimasukkan kedalam tabung reaksi kemudian ditambahkan 10 ml aquadest. Campuran tersebut kemudian dikocok kuat kurang lebih selama 30 detik. Setelah itu hasil diamati selama beberapa menit, jika terbentuk busa yang stabil diatas permukaan cairan maka sampel mengandung saponin

6. Uji terpenoid

Ekstrak sebanyak 0,5 gram dimasukkan kedalam tabung reaksi dan ditambahkan 2 ml etanol, diaduk, kemudian ditambahkan 2 ml CHCl_3 dan beberapa tetes H_2SO_4 . Hasil positif akan menunjukkan lapisan warna coklat kemerahan.

e. Analisis Kandungan Flavonoid Dengan Menggunakan Metode SpektrofotometriUV.

a) Pembuatan Larutan Pereaksi

- 1) Pembuatan reagen AlCl_3 10%. Ditimbang sebanyak 10 mg serbuk AlCl_3 kemudian dilarutkan menggunakan aquadest hingga batas tanda 10 mL.
- 2) Pembuatan kalium asetat. Ditimbang sebanyak 1 g kalium asetat kemudian dilarutkan menggunakan aquadest hingga batas tanda 10 mL.

b) Penentuan Kurva Baku Standar Kuersetin

Ditimbang sebanyak 10 mg baku standar kuersetin dan dilarutkan dalam 10 mL etanol p.a. Larutan stok (1000 ppm) dipipet sebanyak 1 mL kemudian dicukupkan volumenya hingga 10 mL dengan etanol p.a sehingga diperoleh konsentrasi 100 ppm. Dari larutan standar kuersetin 100 ppm, kemudian dibuat beberapa seri konsentrasi yaitu 2 ppm, 4 ppm, 6 ppm, 8 ppm, dan 10 ppm. Dari masing-masing seri konsentrasi larutan standar kuersetin dipipet 0,2 mL (2 ppm), 0,4 mL (4 ppm), 0,6 mL (6 ppm), 0,8 mL (8 ppm), dan 1 mL (10 ppm). Kemudian masing-masing seri konsentrasi ditambahkan 3 mL etanol pa, 0,2 mL AlCl_3 10% dan 0,2 mL kalium asetat, lalu dicukupkan volumenya hingga batas tanda dengan aquabidest menggunakan labu ukur 10 mL. Setelah itu, diinkubasi selama 30 menit pada suhu kamar. Absorbansi

ditentukan menggunakan metode spektrofotometri UV pada panjang gelombang maksimum.

c) Penentuan Panjang Gelombang Maksimum Pada Larutan Standar Kuersetin

Penentuan panjang gelombang maksimum kuersetin dilakukan dengan running larutan kuersetin pada range panjang gelombang 400-800 nm. Panjang gelombang maksimum tersebut yang akan digunakan untuk mengukur serapan dari sampel

d) Penetapan Kadar Flavonoid Total kayu secang (*Caesalpinia sappan L*) Dengan Spektrofotometri UV

Sebanyak 0,5 mL (500 µl) ekstrak kayu secang (*Caesalpinia sappan L*) dimasukkan kedalam labu ukur 10 mL kemudian ditambahkan 3 mL etanol p.a; 0,2 mL AlCl₃ 10%; 0,2 mL kalium asetat; dan dicukupkan hingga batas tanda menggunakan aquabidest. Setelah itu, diinkubasi selama 30 menit pada suhu kamar. Absorbansi ditentukan menggunakan metode spektrofotometri UV pada panjang gelombang maksimum. Dimana sampel dibuat dalam tiga replikasi untuk setiap analisis sehingga diperoleh nilai rata-rata absorbansi