

ANALISIS KROMATOGRAFI LAPIS TIPIS (KLT) DAN AKTIVITAS PENANGKAPAN RADIKAL BEBAS (PRB) EKSTRAK ETANOL LEMPUYANG EMPRIT (*Zingiber americans*) HASIL MASERASI SEKALI DAN MASERASI BERULANG

ANALYSIS OF THIN LAYER CHROMATOGRAPHY AND RADICAL SCAVENGING ACTIVITY ETHANOL EXTRACTS OF LEMPUYANG EMPRIT (ZINGIBER AMERICANS) THE RESULT OF A MACERATION AND REMACERATION

Susi Indah Lestari, Broto Santoso

Fakultas Farmasi, Universitas Muhammadiyah Surakarta

Email korespondensi: Broto.Santoso@ums.ac.id

ABSTRAK

Metode ekstraksi menjadi penting dan dapat mempengaruhi ekstrak yang diperoleh. Rendemen hasil metode maserasi berulang didapatkan lebih tinggi dibandingkan maserasi. Penelitian ini ditujukan untuk membandingkan hasil analisis kromatografi lapis tipis (KLT) dan aktivitas penangkapan radikal bebas (PRB) ekstrak etanol rimpang lempuyang emprit (*Zingiber americans*) hasil maserasi sekali dan maserasi berulang. Simplisia diekstraksi dengan pelarut etanol 96% (rasio 10:75) menggunakan metode maserasi dan maserasi berulang masing-masing sebanyak empat kali replikasi. Setiap ekstrak dilakukan analisis kromatografi lapis tipis silika gel GF²⁵⁴ menggunakan eluen heksana:etil asetat (9:1), dan dilanjutkan dengan uji penangkapan radikal bebas DPPH. Rendemen hasil maserasi dan maserasi berulang adalah 4,37% dan 6,83% ($p < 0,05$) berturut-turut, sedangkan persen PRB-nya 21,63% dan 32,68% ($p > 0,05$) secara berturut-turut. Hasil kromatogram menampakkan perbedaan intensitas bercak dan nilai R_f . Bercak yang tidak terelusi menunjukkan kemampuan dalam menangkap radikal bebas, dimana sebagian bercak menunjukkan bahwa ekstrak mengandung golongan senyawa terpenoid, flavonoid, dan alkaloid, namun tidak fenolik. Kesimpulan penelitian ini bahwa maserasi dan maserasi berulang memiliki aktivitas PRB yang tidak berbeda, dengan kandungan terpenoid, flavonoid, dan alkaloid yang lebih tinggi pada maserasi berulang.

Kata Kunci: Lempuyang Emprit, Maserasi, Maserasi Berulang, Aktivitas Penangkapan Radikal Bebas, Kromatografi Lapis Tipis

ABSTRACT

Extraction method is important because has high impact to the final result of extract. The repeated maceration yield (rMAC) is higher than maceration (MAC) method. The aim of the research was to compare the results of chromatogram profile and free radical scavenging activity of ethanol extracts of lempuyang emprit (*Zingiber americans*) between both of methods. Crude material was extracted using 96% ethanol (ratio 10:75) four times for each method. Extracts were analyzed using TLC plate of silica gel GF²⁵⁴ as stationary phase and hexane-ethyl acetate (9:1) as mobile phase. Their radical scavenging activity were done using DPPH method. The yield of maceration repeated maceration results was 4.37% and 21.63% ($p < 0.05$), respectively, while the percentage of PRB was 6.83% and 32.68% ($p > 0.05$), respectively. The chromatogram results showed the difference in spot intensity and the R_f value. The uneluted spots showed the activity of radical scavenging. The spots reveal that terpenoid, flavonoid, and alkaloid groups but not phenolic were found in both of extract. Further purification needed to be done to confirm the PRB value that did not differ from the two extracts

Keywords: Lempuyang Emprit, Maceration, Repeated Maceration, Radical Scavenging Activity, Thin Layer Chromatography

How To Cite: Lestari, S., & Santoso, B. (2021). ANALISIS KROMATOGRAFI LAPIS TIPIS (KLT) DAN AKTIVITAS PENANGKAPAN RADIKAL BEBAS (PRB) EKSTRAK ETANOL LEMPUYANG EMPRIT (*Zingiber americans*) HASIL MASERASI SEKALI DAN MASERASI BERULANG. *Biomedika*, 13(1), 76-82. doi:<https://doi.org/10.23917/biomedika.v13i1.11439>

DOI: <https://doi.org/10.23917/biomedika.v13i1.11439>

PENDAHULUAN

Kandungan senyawa dengan aktivitas penangkap radikal bebas dalam ekstrak berperan aktif dalam pengobatan, dimana konsentrasi senyawa akan dipengaruhi dari teknik ekstraksi yang merupakan kunci dalam memperoleh semua senyawa aktif target (Ghasemzadeh *et al.*, 2010). Pemilihan teknik ekstraksi mempengaruhi hasil jumlah dan jenis kandungan senyawa dalam ekstrak (Yusnawan, 2018). Yeshak *et al.* (2012) membuktikan bahwa terdapat perbedaan sepersepuluh bagian untuk besar rendemen ekstrak pada 1 dari 4 siklotida yang digunakan, dimana sebagian besar perlakuan didapati penambahan 9% rendemen. Famili *Zingiberaceae* diketahui sebagai tanaman sumber antioksidan, salah satu spesiesnya adalah lempuyang emprit (*Zingiber americans*) (Da'i *et al.* 2018).

Salah satu sesquiterpen, yaitu zerumbon, merupakan kandungan terbesar lempuyang emprit dapat larut dalam heksana atau etanol (Sukari *et al.*, 2008). Nilai *half maximal inhibitory concentration* (IC₅₀) penangkapan radikal bebas zerumbon sebesar 105,08 µg/mL, namun nilai *Ferric Reducing Antioxidant Power* (FRAP) lebih rendah 3,6

kalinya dibandingkan dengan vitamin C (Sidahmed *et al.*, 2015; Da'i *et al.*, 2018). Profil kromatogram dari hasil maserasi dan perkolasi terdapat perbedaan dalam jumlah bercak yaitu berturut-turut tiga dan lima bercak, karena kandungan kimia dalam ekstrak hasil maserasi memiliki konsentrasi yang kecil sehingga tidak dapat terdeteksi.

Penelitian ini dilakukan untuk membandingkan hasil kromatografi lapis tipis dan aktivitas penangkapan radikal bebas ekstrak etanol lempuyang emprit (*Zingiber americans*) hasil maserasi sekali dan maserasi berulang.

METODE

Alat dan Bahan

Alat yang digunakan dalam penelitian ini yaitu alat-alat gelas (pyrex), neraca analitik OHAUS Pioneer, labu alas datar, kondensor allihn, *magnetic stirrer*, *hot plate* (Cimarec thermo scientific), *vacuum rotary evaporator* (Heidolph), *waterbath* (Memmert), mikropipet (Socorex), spektrofotometer UV-Vis Shimadzu UV mini-1240, *microtube*, kuvet (Hellma), *sonicator* (Branson), lampu UV portable, pipa kapiler, bejana kromatografi lapis tipis (KLT).

Bahan yang digunakan yaitu rimpang lempuyang emprit yang diperoleh dari Dusun Pijenan, Desa Bakalan, Kecamatan Jumapolo,

Kabupaten Karanganyar, etanol 96%, etanol p.a (Agung Jaya), air suling, larutan pereaksi anisaldehyd-asam sulfat, feri klorida, dragendorff, sitroborat, 2,2 Difenil-1-pikrilhidrazil (DPPH), dan lempeng KLT GF₂₅₄

Preparasi Simplisia

Rimpang yang telah dideterminasi di Laboratorium FKIP UMS disortir berdasarkan ukuran, warna, dan bau. Rimpang terpilih dicuci, dikupas, dirajang, dan dikeringkan di bawah sinar matahari dengan pembatas kain hitam. Rimpang kering diserbuk menggunakan blender lalu disimpan dalam wadah tertutup.

Ekstraksi Rimpang Lempuyang Emprit

Metode maserasi sekali dilakukan dengan cara merendam 100 gram serbuk dalam etanol 96% selama 3 jam dengan pengadukan manual pada jam ke 0, 1, dan 2. Hasil dipisahkan antara filtrat dan residu menggunakan Buchner. Filtrat diuapkan dengan *rotary evaporator* pada suhu 60°C lalu dikentalkan di atas *waterbath* sehingga didapatkan ekstrak kental. Ekstrak disimpan pada kulkas. Maserasi dilakukan dengan orientasi dan replikasi tiga kali.

Maserasi berulang dikerjakan dengan cara melarutkan 100 gram serbuk dalam etanol 96% menggunakan labu alas datar yang

terhubung kondensor Allihn dengan kecepatan pengadukan 350 rpm yang dihentikan setelah 1 jam. Hasil dipisahkan antara filtrat dan residu dengan Buchner. Proses ini diulangi hingga 4 kali. Total filtrat diuapkan dengan *rotary evaporator* pada suhu 60°C lalu dikentalkan di atas *waterbath*. Ekstrak kental yang didapatkan disimpan pada kulkas. Maserasi berulang dilakukan dengan orientasi dan replikasi tiga kali.

Penentuan Aktivitas Penangkapan Radikal Bebas

Penentuan panjang gelombang maksimal dilakukan dengan mengambil 500,0 µL larutan DPPH 0,8 mM dan ditambahkan etanol p.a hingga volume akhirnya adalah 2,5 mL di dalam mikrotube dan diukur absorbansinya pada rentang panjang gelombang 400-800 nm dengan blanko etanol p.a. Panjang gelombang maksimal DPPH secara teoritis yaitu 517 nm. Larutan stok dibuat dalam konsentrasi 1200 µg/mL, diencerkan menjadi 200 µg/mL lalu ditambahkan etanol dan larutan DPPH masing-masing sebanyak 500,0 µL. Campuran diinkubasi dalam kondisi terhindar cahaya selama 45 menit dan dilakukan pengukuran. Apabila dari hasil pengujian skrining 200 µg/mL

menunjukkan nilai % PRB \geq 50% maka pengujian dilanjutkan dengan IC₅₀.

Analisis Kromatografi Lapis Tipis

Kromatogram ekstrak diperoleh dengan cara KLT dengan kadar sampel 0,1 µg/mL pada lempeng silika gel GF₂₅₄ dan menggunakan fase gerak heksana:etil asetat (9:1) dan bercak yang terbentuk diamati pada sinar UV254 nm dan 366 nm. Dalam identifikasi senyawa, plat KLT disemprot dengan pereaksi anisaldehyd-H₂SO₄, FeCl₃, sitroborat, dragendorff, dan DPPH yang kemudian dibandingkan dengan kontrol positif 1,0 mg/mL. Kontrol positif yang digunakan yaitu mentol, kuercetin, asam galat, vitamin E, dan piperin.

Analisis Data

Analisis data secara statistika dilakukan uji distribusi data dengan uji Shapiro Wilk. Data terdistribusi normal dilanjutkan uji T independent. Data terdistribusi tidak normal dilanjutkan uji Mann Whitney.

HASIL DAN PEMBAHASAN

Ekstrak yang didapatkan berupa ekstrak kental berwarna coklat kehitaman untuk kedua metode. Rendemen maserasi berulang lebih tinggi 1,6 kalinya dibandingkan maserasi sekali (tabel 1) yang berbeda signifikan (uji T, $p < 0,05$). Selain faktor pengadukan, adanya

perbedaan rendemen dikarenakan jumlah pelarut yang digunakan berbeda, pengaruh efektivitas dan total lama penyarian.

Tabel 1. Rendemen Dan Persen Penangkapan Radikal Bebas Maserasi Dan Maserasi Berulang Ekstrak Etanol Rimpang Lempuyang Emprit (n=4)

Metode	Rendemen (rerata±SD)	% PRB (rerata±SD)
Maserasi	4,37±0,14	21,63±5,89
Maserasi Berulang	6,83±1,15	32,68±6,99

Hasil skrining awal untuk uji PRB ekstrak pada kadar 200 ppm diperoleh nilai kurang dari 50% (tabel 1) yang tidak terdapat perbedaan secara signifikan (uji T, $p > 0,05$). Kadar 200 ppm dipilih karena batas tertinggi suatu sampel dapat dinyatakan masih aktif sebagai antioksidan (Da'i *et al*, 2018).

Profil Kromatografi Lapis Tipis

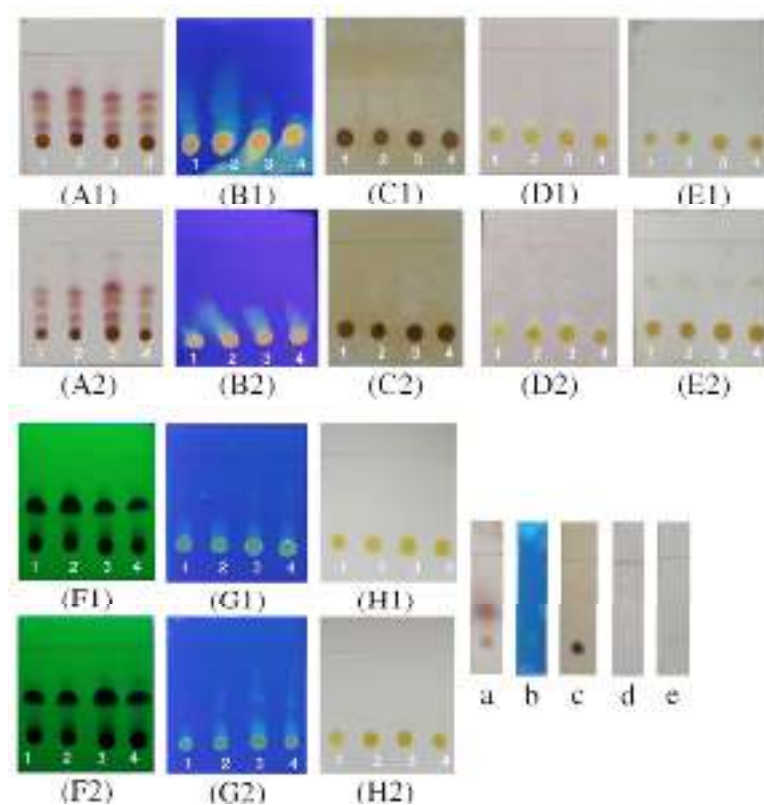
Kromatogram hasil maserasi dan maserasi berulang menunjukkan perbedaan pada intensitas bercak dan nilai R_f (tabel 2 dan gambar 1). Perbedaan tersebut karena kandungan kimia dalam ekstrak hasil maserasi kemungkinan memiliki konsentrasi yang lebih kecil sehingga tidak dapat terdeteksi, sedangkan nilai R_f yang diperoleh digunakan untuk mengidentifikasi senyawa.

Uji KLT dilakukan untuk mengidentifikasi suatu senyawa dalam rimpang. Identifikasi golongan senyawa metabolit

dilakukan menggunakan larutan pereaksi penyemprot. Kromatogram menunjukkan bahwa kelompok senyawa pada bercak yang tidak terelusi memiliki kemampuan penangkapan radikal bebas dikarenakan memiliki polaritas yang mirip dengan fase diam silika yang mempunyai gugus hidroksil sebagai pengikatnya. Sebagian bercak lainnya menampakkan kandungan senyawa golongan

terpenoid, flavonoid, dan alkaloid tetapi tidak ditemukan adanya senyawa fenolik.

Hasil uji KLT pada penyemprotan lempeng menggunakan pereaksi anisaldehid menampakkan bercak yang sama dengan kontrol positif (mentol) yaitu berwarna biru violet dan kuning pada sinar tampak (gambar 1 dan tabel 2), sehingga kemungkinan ekstrak mengandung terpenoid.



Gambar 1. Hasil KLT ekstrak etanol lempuyang emprit menggunakan fase diam silika gel GF₂₅₄ dan fase gerak n-heksan:etil asetat (9:1), (1) maserasi, (2) maserasi berulang, lempeng disemprot dengan pereaksi (A) Anisaldehyd, (B) Sitroborat, (C) FeCl₃, (D) DPPH, (E) Dragendorff, (F) Sinar UV_{254nm}, (G) Sinar UV_{366nm}, (H) Sinar tampak: (1) Orientasi, (2-3) Replikasi 1-3. (a-e) Kontrol positif.

Bercak keempat menampilkan nilai R_f yang tinggi, sehingga dimungkinkan mengandung senyawa yang bersifat non polar.

Identifikasi senyawa flavonoid dilakukan dengan pereaksi semprot sitroborat yang

hasilnya muncul bercak berwarna berfluoresensi kuning kehijauan pada sinar UV₃₆₆ sama seperti kontrol positif (kuersetin), sehingga kemungkinan ekstrak mengandung senyawa flavonoid. Bercak totalan setelah disemprot

tidak mengalami pemisahan, sehingga dimungkinkan golongan senyawa bersifat polar.

Pereaksi FeCl_3 yang disemprotkan pada lempeng KLT menampilkan bercak warna coklat pada sinar tampak, sedangkan pada kontrol positif (asam galat) menampilkan warna abu-abu biru, sehingga ekstrak dimungkinkan tidak mengandung fenolik karena tidak berwarna seperti kontrol positif. Bercak pada lempeng maserasi berulang memiliki intensitas warna yang lebih pekat dibandingkan lempeng maserasi dilihat pada sinar tampak dan tidak mengalami pemisahan, sehingga

dimungkinkan bersifat polar karena tertahan di fase diam. Analisis kualitatif untuk uji penangkapan radikal bebas menggunakan pereaksi semprot DPPH yang menunjukkan bercak berwarna kuning dengan latar belakang berwarna ungu sama seperti kontrol positif (vitamin E), sehingga kemungkinan adanya senyawa yang bertanggung jawab atas aktivitas penangkapan radikal bebas pada ekstrak. Bercak pemisahan yang terbentuk berada di bawah sehingga dimungkinkan bersifat polar. Senyawa alkaloid diidentifikasi dengan pereaksi Dragendorff.

Tabel 2. Hasil Identifikasi Kandungan Senyawa Ekstrak Etanol Lempuyang Emprit, (I-IV) Totalan Ekstrak, (1-4) Nilai Rf Dari Bercak Yang Tampak

Identi- fikasi	Perlakuan (nilai R _f)		Kelom- pok se- nyawa
	Maserasi	Maserasi Berulang	
UV ₂₅₄	I: 0,4 (1); 0,56 (2); II: 0,4 (1); 0,64 (2) III, IV: 0,36 (1); 0,56 (2)	I, II, IV: 0,44 (1); 0,64 (2); III: 0,44 (1); 0,68 (2)	-
UV ₃₆₆	I: - II: 0,64 (1); III: 0,52 (1) IV: 0,52 (1); 0,68 (2)	I: - II: 0,48 (1); 0,6 (2); III: 0,52 (1); 0,68 (2) IV: 0,4 (1); 0,68 (2)	-
Anisal- dehid	I: 0,16 (1); 0,36 (2); 0,48 (3); 0,92 (4); II: 0,16 (1); 0,40 (2); 0,56 (3); 0,92 (4) III, IV: 0,16 (1); 0,32 (2); 0,48 (3); 0,92 (4)	I, II: 0,16 (1); 0,32 (2); 0,44 (3); 0,88 (4); III: 0,16 (1); 0,36 (2); 0,52 (3); 0,88 (4); IV: 0,16 (1); 0,36 (2); 0,44 (3); 0,88 (4)	Terpenoi d
DPPH	I-III: 0,16(1) IV: -	I-III: 0,16(1) IV: -	Aktivi- tas PRB
Dragendor ff	I, II, IV: 0,4 (1) III: 0,44 (1)	I, II: 0,56 (1) III, IV: 0,52 (2)	Alkaloid
Sinar tampak; sitroborat; FeCl_3	- - -	- - -	- Flavo- noid Fenolik

Perubahan warna lempeng KLT setelah disemprot menunjukkan warna kuning oranye sehingga dimungkinkan ekstrak mengandung senyawa alkaloid. Bercak yang muncul pada lempeng maserasi berulang memiliki intensitas lebih tebal dibandingkan lempeng maserasi dan berada di tengah lempeng sehingga dimungkinkan bersifat semi polar.

SIMPULAN DAN SARAN

Ekstrak hasil maserasi dan maserasi berulang pada pengujian aktivitas penangkapan radikal bebas menunjukkan % PRB yaitu 21,63% dan 32,68% yang tidak terdapat perbedaan secara signifikan, sedangkan hasil kromatogram menampakkan perbedaan intensitas bercak dan nilai R_f . Bercak yang tidak terelusi menunjukkan kemampuan dalam menangkap radikal bebas, sedangkan sebagian bercak menunjukkan bahwa ekstrak mengandung golongan senyawa terpenoid, flavonoid, dan alkaloid.

DAFTAR PUSTAKA

Da'i, M., Setiawan, D. and Melannisa, R. 2018. Potency of Radical Scavenging Activity and Determination of Total Phenolic

Content of Five Ethanolic Extract of Rhizome Zingiberaceae Family. *Indones. J. Cancer Chemoprevent.* 4(1). p: 457. doi: 10.14499/indonesianjcanchemoprev4iss1 pp457-462.

Ghasemzadeh, A., Jaafar, H. Z. E. and Rahmat, A. 2010. Antioxidant Activities, Total Phenolics and Flavonoids Content in Two Varieties of Malaysia Young Ginger (*Zingiber officinale* Roscoe). *Molecules.* 15(6). Pp: 4324–4333. doi: 10.3390/molecules15064324.

Sidahmed, H. M. A. Hashim, N.M., Abdulla, M. A., Ali, H.M., Mohan, S., Abdelwahab, S. I., Taha, M.M.E., Fai, L.M., and Vadivelu, J. 2015. Antisecretory, Gastroprotective, Antioxidant and Anti-Helicobacter Pylori Activity of Zerumbone from Zingiber Zerumbet (L.) Smith. *PLoS One.* 10(3). Pp: 1–21. doi: 10.1371/journal.pone.0121060.

Sukari, M. A., Mohd Sharif, N.W., Yap, A.L.C., Tang, S.W., Neoh, B.K., Rahmani, M., Ee, G.C.L., Taufiq-Yap, Y.H., and Yusof, U.K. 2008. Chemical Constituents Variations of Essential Oils From Rhizomes of Four Zingiberaceae Species. *Diversity.* 12(3). Pp: 638–644.

Yeshak, M.Y., Burman, R., Eriksson, C., and Goransson, 2012. Optimization of cyclotide extraction parameters. *Phytochem. Lett.* 5. Pp: 776–81.

Yusnawan, E. 2018. Effects of Different Extraction Methods on Total Phenolic Content and Antioxidant Activity in Soybean Cultivars. *IOP Conf. Ser.: Earth Environ. Sci.* 102. p: 12039. doi: 10.1088/1755-1315/102/1/012039.