Chimica et Natura Acta

p-ISSN: 2355-0864 e-ISSN: 2541-2574

Homepage: http://jurnal.unpad.ac.id/jcena

Optimasi Kondisi Pemisahan Senyawa Flavonoid dari Fraksi Polar Erythrina poeppigiana Menggunakan Alat Kromatografi Cair Kinerja Tinggi (KCKT) Preparatif

Rahmawati^{1,*}, Ida Nur Farida¹, Witriany Rayapratiwi¹, Nayla Haraswati², Tati Herlina², Unang Supratman¹

¹Laboratorium Sentral, Direktorat Sumber Daya Akademik dan Perpustakaan, Universitas Padjadjaran, Jalan Raya Bandung – Sumedang Km.21 Jatinangor, Sumedang, 45363, Indonesia

²Jurusan Kimia, Fakultas Matematuka dan Ilmu Pengetahuan Alam, Universitas Padjadjaran, Jalan Raya Bandung – Sumedang Km.21 Jatinangor, Sumedang, 45363, Indonesia

*Penulis korespondensi: rahmawati@unpad.ac.id

DOI: https://doi.org/10.24198/cna.v7.n1.19600

Abstrak: Teknik pemisahan sangat diperlukan dalam mengisolasi senyawa-senyawa yang mempunyai bioaktivitas untuk memperoleh senyawa murni dalam suatu riset pengembangan di bidang kimia organik bahan alam hayati. Senyawa yang diisolasi dari jaringan tumbuhan secara alamiah berada dalam keadaan tercampur dengan senyawa lainnya, oleh karena itu perlu dipilih teknik pemisahan dan pemurnian yang sesuai. Kromatografi Cair Kinerja Tinggi (KCKT) Preparatif merupakan salah satu instrumen pemisahan modern yang digunakan untuk memisahkan dan memurnikan campuran senyawa dengan daya pisah tinggi, cepat (throughput tinggi). Tujuan dari penelitian ini adalah untuk menetapkan kondisi optimum pemisahan senyawa flavonoid dari fraksi polar Erythrina poeppigiana menggunakan sistem KCKT preparatif. Penelitian ini dilakukan dengan tahapan : Ekstraksi dan Fraksionasi, proses pemisahan dan pemurnian, analisis KCKT analitik fraksi polar E. poeppigiana, penentuan kondisi optimum KCKT preparatif dengan menggunakan kolom C18 meliputi; konsentrasi sampel yang diinjeksikan, pemilihan fasa gerak, dan laju alir pada panjang gelombang deteksi 254 nm dan 365 nm. Dari hasil penelitian diperoleh kondisi pemisahan yang optimum dari fraksi polar E. poeppigiana yaitu pada konsentrasi sampel 3000 ppm dan fase gerak campuran metanol dan air (7:3,v/v) dengan kecepatan laju alir 5,28 mL/menit kromatogram hasil KCKT yang dihasilkan menunjukkan satu puncak. Kondisi optimum yang diperoleh tersebut selanjutnya digunakan oleh peneliti untuk memisahkan senyawasenyawa dalam fraksi polar *E.poeppigiana* yang dikerjakan di laboratorium.

Kata kunci: KCKT Preparatif, Kolom C18, Senyawa Flavonoid, E. poeppigiana

Abstract: Separation techniques are very necessary in isolating compounds that have bioactivity to obtain pure compounds in development research in the field of organic chemistry of biological natural materials. Compounds isolated from plant tissue are naturally mixed with other compounds, therefore the appropriate separation and purification techniques need to be chosen. High Performance Liquid Chromatography (HPLC) Preparative is one of the equipment in the laboratory that is used to separate and purify compound mixtures with high separability, fast (high throughput). The purpose of this study was to determine the optimum conditions for the separation of flavonoids from the polar fraction of Erythrina poeppigiana using the preparative HPLC system. This research was carried out in the following stages analyzing KCKT analytical polar fraction of E. peppigiana, determining the optimum conditions of preparative HPLC using C18 columns including the concentration of the injected sample, mobile phase selection, and flow rate at 254 nm and 365 nm detection wavelengths. The results showed that the optimum separation conditions of the polar E. poeppigiana fraction were at a sample concentration of 3000 ppm and the mobile phase of a mixture of methanol and water (7:3 v/v) with a velocity flow rate of 5.28 mL / min. The analytical HPLC produced shows one peak and one spot. The optimum conditions produced can be used by researchers for separating the compounds in the polar fraction of E. pepigiana in the laboratory.

Keywords: Preparative HPLC, C18 Column, Flavonoids, E. poeppigiana

PENDAHULUAN

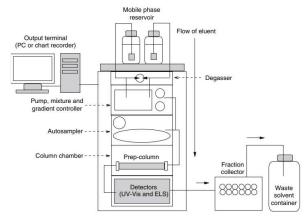
Dewasa ini, penggunaan bahan alam cenderung meningkat, tingginya minat dan penggunaan produk obat yang berasal dari bahan alam ditunjukkan oleh fakta hasil penelitian yang menyatakan bahwa 40% dari 35 jenis obat yang paling banyak diresepkan, merupakan obat yang diperoleh dari senyawa bahan alam dan turunannya. Dalam kurun waktu 1981 hingga 2002, 52% dari senyawa kimia baru yang dilempar ke pasar, merupakan senyawa hasil isolasi bahan alam, turunannya, atau hasil sintesis laboratorium yang merupakan replikasi senyawa bahan alam (Chin 2006).

Erythrina poeppigiana adalah salah satu spesies yang tumbuh di Indonesia dikenal sebagai tumbuhan tradisional. Masyarakat mengenal poeppigiana dengan nama dadap blendung. E. poeppigiana termasuk spesies yang memiliki ketahanan terhadap hama lebih baik dibandingkan dadap lainnya (Heyne 1987). Spesies ini pun dapat tumbuh dengan mudah, bahkan pada tanah yang kurang nutrisi. Masyarakat biasa menggunakan tanaman ini sebagai insektisida (Orwa et al. 2009). Hampir seluruh bagian tumbuhan ini, seperti daun, bunga, kulit batang, dan akar dapat dimanfaatkan sebagai obat. Bagian tumbuhan yang paling sering digunakan dalam pengobatan adalah kulit batang dengan persentase sebesar 40-80% (Araujo-Junior et al. 2012). Flavonoid merupakan kelompok fenolik dari Erythrina yang paling banyak diteliti aktivitas biologisnya yang dikenal sebagai antimikroba, obat infeksi tenggorokan (Simoes et al. 1999), obat sakit gigi (Dominguez & Alcorn 1985), demam, sakit kepala, obat cuci mata, melancarkan haid, reumatik. hepatitis (Heyne 1987).

Dalam riset pengembangan di bidang kimia organik bahan alam hayati seringkali diperlukan produk senyawa murni dalam kuantitas miligram atau lebih, agar dapat melakukan penentuan struktur molekul, biossay dan uji farmakologik, serta sebagai senyawa pembanding atau standar untuk penentuan kuantitatif. Untuk itu perlu dipilih teknik pemisahan dan pemurnian yang cocok mengingat senyawa yang ingin diisolasi dari jaringan tumbuhan secara alamiah berada dalam keadaan tercampur dengan banyak senyawa lainnya. Pilihannya adalah kromatografi cair kinerja tinggi (KCKT) Preparatif (Gambar 1), karena teknik ini mempunyai daya pisah tinggi, cepat (dengan througput tinggi), dan dapat digunakan untuk memperoleh hasil pemisahan senyawa murni dalam skala yang jauh lebih besar dibandingkan dengan KCKT analitik (yang skalanya hanya mikrogram).

Penelitian ini bertujuan untuk memperoleh kondisi optimum pemisahan senyawa flavonoid dari fraksi polar *E. poeppigiana* menggunakan sistem KCKT preparatif dengan menggunakan kolom C18, yaitu meliputi konsentrasi sampel yang diinjeksikan,

pemilihan fasa gerak, dan laju alir pada panjang gelombang 254 nm dan 365 nm.



Gambar 1. Sistem KCKT Preparatif (Latif & Sarker 2012)

BAHAN DAN METODE Bahan

Bahan kimia yang digunakan terdiri dari pelarut metanol, *n*-heksana dan etil asetat yang telah didistilasi ulang, pereaksi penampak noda asam sulfat 10% dalam etanol aluminium klorida 5% dalam etanol, pelarut metanol grade LC, asetonitril grade LC dan milli-Q. Objek penelitian yang digunakan adalah kulit batang *Erythrina poeppigiana* yang diperoleh dari Subang, Jawa Barat.

Instrumentasi

Peralatan yang digunakan dalam penelitian ini meliputi peralatan gelas yang umum digunakan di laboratorium. Selain itu juga, digunakan peralatan pendukung lainnya seperti alat maserasi, kertas saring PS1, plat TLC Silica gel 60 RP-18 F₂₅₄S untuk kromatografi lapis tipis, sonicator FALC, rotary evaporator tipe BUCHI R-300 yang dilengkapi dengan B 169 vacuum system Buchi, KCKT-Analitik Waters 1500-Series, neraca analitik Mettler Toledo, Micropipette Eppendorf, Lampu UV Vilbert Luomart (λ 254 dan 365nm). Untuk keperluan fraksionasi digunakan Medium Pressure Liquid Chromatograph (MPLC) BUCHI Sepacore Control yang dilengkapi dengan detektor UV dengan panjang gelombang 254 dan 365 nm dan untuk keperluan optimasi kondisi pemisahan digunakan KCKT-Preparatif Agilent SD1.

Ekstraksi dan Fraksionasi

Kulit batang *E. poeppigiana* yang diperoleh terlebih dahulu dikeringkan dan dihaluskan dengan alat penggiling kemudian diekstraksi dengan metode maserasi dalam pelarut metanol yang dilakukan secara berulang pada suhu kamar. Hasil maserasi dipekatkan dengan rotary evaporator, diperoleh ekstrak pekat metanol. Ekstrak ini dilarutkan dalam air dan difraksionasi dengan n-heksana, diperoleh fraksi n-heksana dan air. Fraksi air selanjutnya difraksionasi kembali dengan etil asetat, diperoleh

fraksi etil asetat dan air. Fraksi etil asetat selanjutnya dipekatkan dengan rotary evaporator, diperoleh ekstrak pekat etil asetat.

Pemisahan dan Pemurnian

Ekstrak etil asetat yang telah diperoleh dari hasil fraksionasi dipisahkan menggunakan MPLC BUCHI Sepacore Control dengan fase diam silika gel G60 dengan sistem elusi gradien sehingga diperoleh sejumlah fraksi. Pemisahan ini dipandu dengan teknik kromatografi lapis tipis. Deteksi senyawa dengan menggunakan penampak noda asam sulfat 10% dalam etanol dan aluminium klorida 5% dalam etanol.

Penentuan variasi komposisi fase gerak dengan kromatografi lapis tipis

Pemisahan senyawa dari sub fraksi 6 ekstrak etil asetat E. poeppginana hasil pemisahan MPLC menggunakan plat silika G₆₀ F₂₅₄S sebagai fase diamnya dengan ukuran 1 × 5 cm diberi penanda garis pada tepi bawah plat pada jarak 0,5 cm untuk menunjukan posisi awal totolan dan 0,5 cm dari tepi atas plat untuk menunjukkan batas dari proses elusi. Fase gerak yang digunakan yaitu campuran metanol:air dan asetonitril:air dengan perbandingan (80:20, 70:30, 60:40, 50:50, 40:60, 30:70, dan 20:80; v/v). Setiap campuran fase gerak di masukkan kedalam *chamber* lalu ditutup rapat dan dilakukan penjenuhan selama 1 jam. Fraksi polar dilarutkan dengan pelarutnya selanjutnya ditotolkan sebanyak ± 10 totolan (pada tempat yang sama) dengan menggunakan pipa kapiler, kemudian dikeringkan dengan diangin-anginkan. Fraksi polar yang telah di totolkan pada plat selanjutnya dielusi dengan masingmasing fase gerak yang telah jenuh, diletakkan setinggi 0,5cm dari dasar plat, kemudian chamber ditutup rapat hingga fase geraknya mencapai jarak ± 0,5cm dari tepi atas plat. Noda-noda yang terbentuk pada plat kemudian diamati di bawah sinar UV pada panjang gelombang 254 dan 365 nm. Setelah itu noda yang terbentuk dideteksi dengan menggunakan penampak noda asam sulfat 10% dalam etanol. Noda yang teramati ditandai menggunakan pensil, diukur jarak tempuh tiap-tiap spot dan dihitung nilai Rf-nya. Eluen yang menghasilkan pemisahan terbaik selanjutnya digunakan untuk KCKT- Analitik.

Penentuan waktu retensi dan laju alir pada KCKT-Analitik

Instrumen KCKT-Analitik yang digunakan yaitu Waters 1500-Series dengan detektor *Photo Diode Array* (PDA). Kolom yang digunakan adalah C18 (4 mm \times 125 mm, 5 μ L) yang digunakan sebagai fase diam. Komposisi larutan fase gerak yang telah dipilih dari hasil kromatografi lapis tipis selanjutnya disiapkan dan dihilangkan gasnya dengan sonicator. Kemudian dikondisikan KCKT-Analitik pada fase gerak yang telah dipilih dan dialirkan pada laju alir tertentu. Sub fraksi 6 yang telah dilarutkan

diinjeksikan sebanyak 20 μ L ke dalam loop KCKT-Analitik. Senyawa target akan di dorong oleh fase gerak ke dalam kolom pada laju alir tertentu dan selanjutnya akan dideteksi oleh detektor PDA dan akan didapatkan profil kromatogramnya meliputi waktu retensi dan luas area kromatogram.

Pemisahan senyawa aktif dengan KCKT-Preparatif

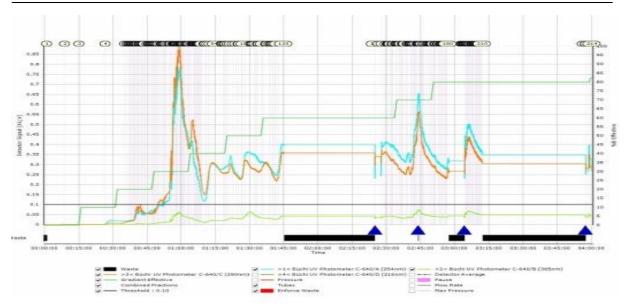
Instrumen KCKT preparatif yang digunakan yaitu Agilent SD1 yang dilengkapi dengan fraction collector untuk menghimpun seluruh sampel berdasarkan waktu, volume atau puncak spektrum pada segala jenis tabung atau bejana yang sesuai. Panjang gelombang yang digunakan 254 dan 365 nm dengan detektor UV. Kolom yang digunakan adalah Agilent Pursuit 5 C18 (250 mm \times 21,2 mm, 5 μ L) sebagai fase diam. Sub Fraksi 6 yang telah dilarutkan diinjeksikan sebanyak 1 mL ke dalam loop KCKT-Preparatif. Senyawa target akan di dorong oleh fase gerak ke dalam kolom pada laju alir tertentu dan selanjutnya akan dideteksi oleh detektor. Selanjutnya puncak atau fraksi-fraksi yang terbentuk dihimpun dengan menggunakan fraction collector dan hasil collect dianalisis kembali dengan menggunakan KCKT-Analitik.

HASIL DAN PEMBAHASAN Ekstaksi dan Fraksionasi

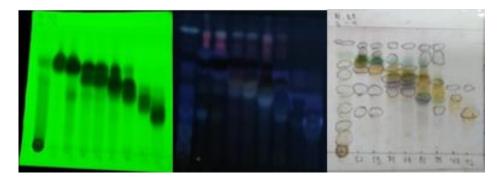
Kulit batang *E. poeppigiana* kering (2,4 kg) yang didapat dari daerah Subang ditumbuk sampai halus. Penumbukan sampel dilakukan agar dapat memperbesar luas permukaan dan memecah dinding sel sampel sehingga senyawa-senyawa kimia yang terkandung di dalamnya dapat terekstraksi secara maksimal.

Sampel yang telah halus kemudian diekstraksi dengan cara maserasi dengan pelarut metanol. Pengekstraksian dilakukan untuk memaksimalkan ekstraksi sampel karena dengan jangka waktu tersebut filtrat metanol sudah berkurang warnanya, artinya pelarut maksimal dalam mengambil senyawasenyawa dalam sampel. Penggunaan metanol dalam proses maserasi dikarenakan metanol melarutkan senyawa-senyawa polar dan nonpolar sehingga sangat baik untuk mengekstrak kandungan metabolit sekunder dalam tanaman (Cordell 1981). Teknik ekstraksi dengan metode maserasi memiliki keunggulan yaitu dapat menghindari rusaknya senyawa-senyawa yang tidak tahan panas, namun memiliki kelemahan yaitu membutuhkan waktu yang

Hasil maserasi disaring dengan menggunakan kertas saring dan dipekatkan menggunakan *rotary* evaporator pada suhu ± 40°C hingga diperoleh ekstrak pekat metanol (155,9 g). Ekstrak pekat metanol dipartisi antara air dan *n*-heksana (1:1), diperoleh ekstrak pekat *n*-heksana (24 g) dan fraksi air. Fraksi air dipartisi kembali dengan etil asetat (1:1), diperoleh ekstrak pekat etil asetat (30 g).



Gambar 2. Kromatogram hasil pemisahan MPLC dengan pelarut n-heksana:etil asetat sistem elusi gradien.



Gambar 3. Kromatogram KLT sub fraksi 52-112 dengan pelarut air-etilasetat (6:4;v/v) dilihat dibawah sinar UV 254 nm dan sinar UV 365 nm dan setelah disemprot dengan larutan penampak noda H₂SO₄.

Hasil analisis kromatografi lapis tipis (KLT) menunjukkan bahwa fraksi etil asetat berpendar di bawah sinar UV λ 254 dan 365 nm dan berwarna jingga dengan penampak noda asam sulfat dalam etanol, menandakan keberadaan senyawa fenolik, maka fraksi etil asetat dilakukan pemisahan lebih lanjut.

Pemisahan dan Pemurnian

Sebanyak 30 g ekstrak pekat etil asetat dipisahkan menggunakan metode kromatografi cair vakum (KCV) dengan fasa diam silika gel 60, pelarut nheksana:etil asetat:metanol digunakan sebagai fasa gerak dengan sistem elusi 5%, stepwise. Pemisahan ini menghasilkan 24 fraksi yang selanjutnya dianalisis menggunakan metode KLT dengan fasa diam plat silika gel GF254. Fraksi yang memiliki pola noda sama digabungkan, diperoleh tujuh fraksi gabungan, yaitu fraksi A (5,1 mg), B (252,7 mg), C (8,0 g), D (5,48 g), E (4 g), F (3,7 g), dan G (6,0 g). Noda fraksi C (8,0 g) berpendar di bawah sinar UV λ 254 dan 365 nm pada kromatogram dan berwarna jingga dengan penampak noda asam sulfat dalam etanol, menunjukkan bahwa fraksi C mengandung senyawa flavonoid.

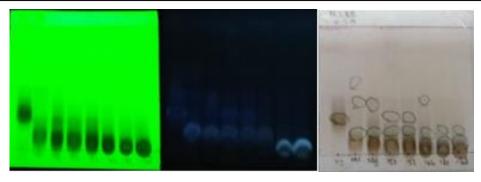
Fraksi C selanjutnya dilakukan pemisahan dengan MPLC dengan fase diam silika gel G60 dengan sistem elusi gradien menggunakan fase gerak n-Hexane dan etil asetat. Hasil pemisahan ditunjukan oleh Gambar 2.

Pemisahan ini menghasilkan 188 sub fraksi selanjutnya di analisis metode KLT dengan fasa diam plat silika gel GF_{254} . Hasil KLT ditunjukan oleh Gambar 3 dan Gambar 4.

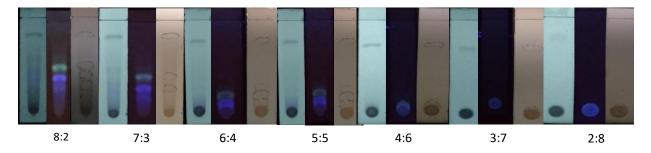
Sub fraksi yang memiliki pola noda sama digabungkan, diperoleh tujuh fraksi gabungan, yaitu fraksi F1 (126 mg), F2 (39,5 mg), F3 (55,6 mg), F4 (47,6 mg), F5 (56,8 mg), F6 (198,5 mg g), dan F7 (51,8 mg). Sub fraksi yang telah digabungkan dianalisis kembali KLT dengan plat silika gel GF₂₅₄.

Sub fraksi yang dipilih untuk dilakukan pemurnian selanjutnya adalah F6 karena pola noda hasil KLT lebih sederhana dan massa yang didapat lebih banyak. Sebelum dilakukan pemisahan dengan menggunakan KCKT-Preparatif terlebih dahulu dilakukan optimasi pemilihan fase gerak dengan metode analisis KLT dengan fasa diam plat ODS C18.

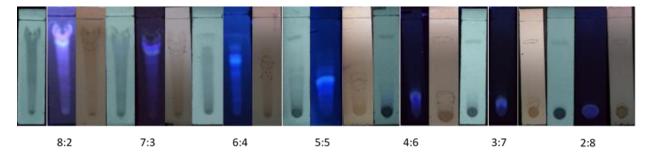
Rahmawati, Farida, I.N., Rayapratiwi, W., Haraswati, N., Herlina, T., Supratman, U.



Gambar 4. Kromatogram KLT sub fraksi 112-188 dengan pelarut air-etilasetat (60:40;v/v) dilihat dibawah sinar UV 254nm dan sinar UV 365 nm dan setelah disemprot dengan larutan penampak noda H₂SO₄.



Gambar 5. Kromatogram KLT dengan pelarut metanol:air pada berbagai perbandingan dilihat dibawah sinar UV 254 nm dan sinar UV 365 nm serta setelah disempot dengan larutan penampak noda H₂SO₄.



 $\label{eq:Gambar 6.} \textbf{Kromatogram KLT dengan pelarut asetonitril:air pada berbagai perbandingan dilihat dibawah sinar UV 254 nm dan sinar UV 365 nm serta setelah disempot dengan larutan penampak noda H_2SO_4}$

Penentuan variasi komposisi fase gerak dengan kromatografi lapis tipis

Untuk memperoleh fase gerak yang optimal dilakukan optimasi fase gerak menggunakan metode analisis kromatografi lapis tipis (KLT) dengan fasa diam plat ODS C18. KLT dilakukan beberapa kali menggunakan bermacam eluen dengan tingkat kepolaran yang berbeda untuk mendapatkan fase gerak yang mampu memberikan pemisahan baik serta noda zat warna yang bagus. Analisis KLT pada fraksi polar *E. poeppigiana* dengan menggunakan fase gerak metanol:air dan asetonitril:air pada berbagai perbandingan diperlihatkan pada Gambar 5 dan Gambar 6.

Berdasarkan pengoptimasian fase gerak pada berbagai variasi komposisi dengan metode KLT menunjukan fase gerak dengan pelarut metanol:air perbandingan 8:2 dan 7:3 memberikan pemisahan baik sedangkan fase gerak dengan pelarut Acetonitril:Air perbandingan 7:3 dan 6:4 diantara memberikan hasil pemisahan baik perbandingan lainnya. Sehingga dipilih perbandingan gerak Metanol:Air 8:2 dan 7:3 serta perbandingan fase gerak Acetonitril:Air 7:3 dan 6:4 untuk selanjutnya menjadi dasar kondisi pemisahan fraksi polar E. poeppigiana.

Penentuan waktu retensi dan laju alir pada KCKT-Analitik

Berdasarkan profil kromatogram hasil KLT yang didapat selanjutnya dilakukan optimasi laju alir dan waktu retensi dengan menggunakan KCKT-Analitik yang berfungsi melihat profil pemisahan yang baik untuk mengetahui kondisi awal pemisahan sehingga ketika dilakukan pemisahan dengan KCKT-Preparatif dapat mentransfer kondisi pemisahan. Konsentrasi sampel dibuat 3000 ppm agar pembacaan intensitas dalam pemisahan terlihat lebih jelas apabila kurang

dari 3000ppm atau lebih maka intensitas puncak kromatogram tidak akan terlihat. Laju alir dipilih sesuai dengan Rf hasil dari KLT. Sistem KCKT-Analitik yang digunakan untuk analisis fraksi polar *E. poeppgiana* ditunjukkan pada Tabel 1.

Tabel 1. Kondisi pemisahan dengan KCKT-Analitik

Fase gerak	Flow rate (mL/menit)	
Metanol:Air	0,400	Fase Diam:
(8:2)	0,500	SunFire TM Prep C8
Metanol:Air	0,275	(10 mm x 150 mm, 5μL)
(7:3)	0,400	• /
Acetonitril:Air (7:3)	0,700	Panjang Gelombang:
	0,630	254nm & 365nm
Acetonitril:Air (6:4)	0,580	
	0,500	

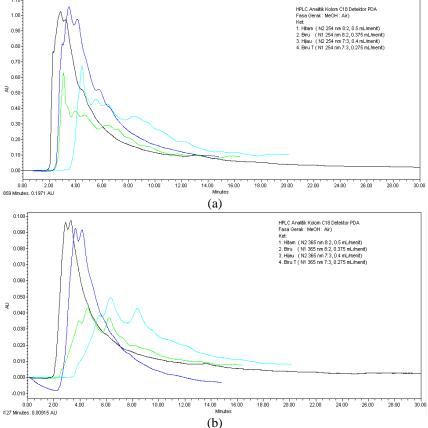
Berdasarkan kromatogram yang terbentuk ditunjukan pada Gambar 7 dan Gambar 8. Pada fase gerak Metanol:Air perbandingan 8:2 dan 7:3 terdapat dua puncak yang masih fraksi polar *E. poeepigiana* masih terbentuk dua puncak yang dominan masih menyatu sedangkan pada fase gerak Asetonitril:Air

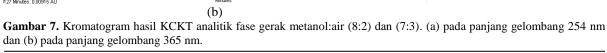
7:3 dan 6:4 puncak-puncak yang terbentuk lebih banyak dan terdapat satu puncak yang dominan.

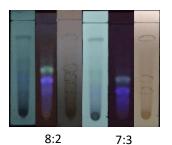
Dari data hasil kromatogram diperoleh waktu retensi yang ditunjukkan pada Tabel 2. Waktu retensi merupakan parameter yang paling luas digunakan dan paling mudah diukur yang berfungsi sebagai pengidentifikasian analit. Waktu retensi analit tergantung pada laju alir fase gerak dan stabilitas laju alir.

Tabel 2. Hasil optimasi laju alir terhadap waktu retensi

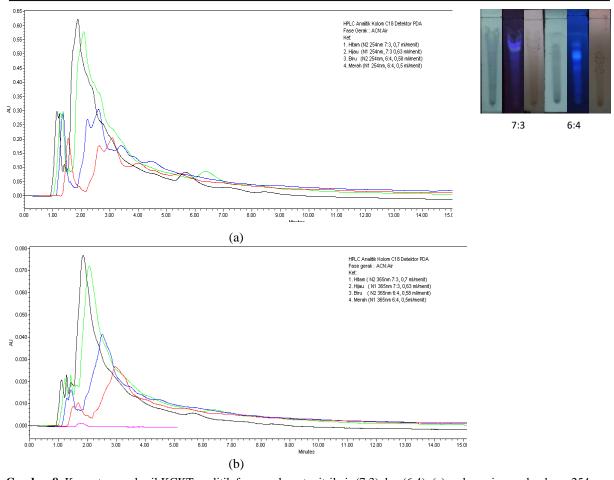
Fase gerak	Flow rate (mL/menit)	Waktu retensi (menit)	
		λ 254 nm	λ 365 nm
metanol:air (8:2)	0,4	3,482	3,642
	0,5	2,847	2,888
metanol:air (7:3)	0,275	4,464	6,317
	0,4	3,070	4,560
acetonitril:air (7:3)	0,7	1,145	1,185
	0,63	1,358	2,063
acetonitril:air (6:4)	0,58	2,216	2,510
	0,5	2,620	2,966







Rahmawati, Farida, I.N., Rayapratiwi, W., Haraswati, N., Herlina, T., Supratman, U.



Gambar 8. Kromatogram hasil KCKT analitik fase gerak asetonitril:air (7:3) dan (6:4). (a) pada panjang gelombang 254 nm dan (b) pada panjang gelombang 365 nm.

Kondisi optimum yang diperoleh yaitu:

- Pada fase gerak Metanol:Air (8:2) dengan laju alir 0,5ml/menit waktu retensi menunjukan relatif lebih singkat dibandingkan dengan laju alir 0,5ml/menit. Sedangkan pada fase gerak Metanol:Air (7:3) dengan laju alir 0,4 mL/menit waktu retensi menunjukan relatif lebih singkat dibandingkan dengan laju alir 0,275ml/menit.
- Pada fase gerak acetonitril:air (7:3) dengan laju alir 0,7 mL/menit waktu retensi menunjukan relatif lebih singkat dibandingkan dengan laju alir 0,63 mL/menit. Sedangkan pada fase gerak asetonitril:air (6:4) dengan laju alir 0,58 mL/menit waktu retensi menunjukan relatif lebih singkat dibandingkan dengan laju alir 0,5 mL/menit.

Hasil tersebut menunjukan bahwa laju alir bernilai linier dengan waktu retensi yaitu semakin besar laju alir maka waktu retensi yang diperlukan semakin cepat dalam pemisahan fraski polar *E. poeppigiana*.

Pemisahan senyawa aktif dengan KCKT-Preparatif

Berdasarkan kondisi yang diperoleh melalui KCKT-Analitik maka kondisi pemisahan senyawa flavanoid dari fraksi polar *E. poeppigiana* dengan KCKT-Preparatif dapat ditentukan melalui *transfer-method* yang telah dilakukan penelitian sebelumnya oleh

Penduff (2013) dengan menentukan flow rate dengan persamaan (1). Dari hasil perhitungan maka sistem KCKT-Preparatif yang digunakan disajikan pada Tabel 3

Flow Prep = Flow ana×
$$\frac{(Dprep)^2}{(Dana)^2}$$
× $\frac{(Dpart.ana)}{(Dpart.prep)}$... (1)

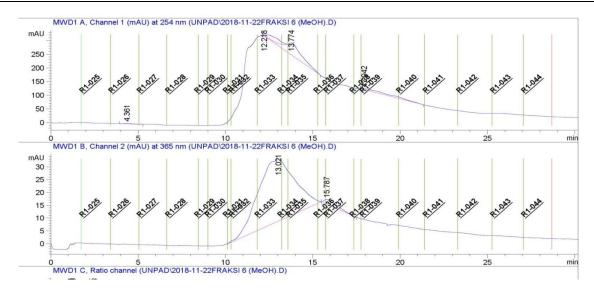
dengan:

Flow Prep = Laju alir KCKT-Preparatif Flow Ana = Laju alir KCKT-Analitik

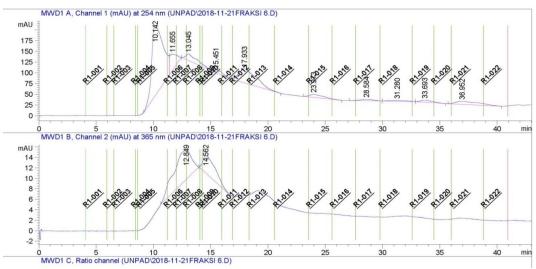
Dprep = Diameter kolom KCKT-Preparatif
Dana = Diameter kolom KCKT-Analitik
Dpart prep = Diameter partikel KCKT- Preparatif
Dpart ana = Diameter partikel KCKT-Analitik

Tabel 3. Kondisi pemisahan dengan KCKT-Preparatif

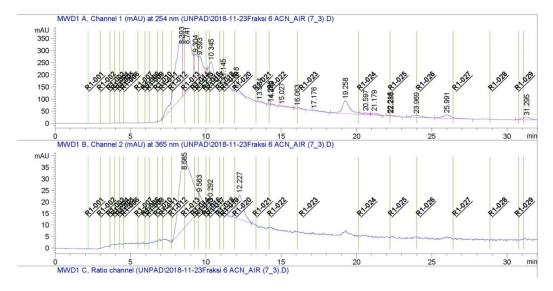
Fase gerak	Flow rate (ml/menit)	
Metanol:air (8:2)	7,2	Fase Diam: Agilent Pursuit 5 C18
Metanol:air (7:3)	5,8	(250 mm × 21,2 mm, 5μL)
Acetonitril:air (7:3)	10,1	Panjang Gelombang: 254nm & 365nm
Acetonitril:air (6:4)	8,3	20 mm & 000mm



Gambar 9. Kromatogram pemisahan KCKT-Preparatif dengan fase gerak Metanol:Air (8:2).

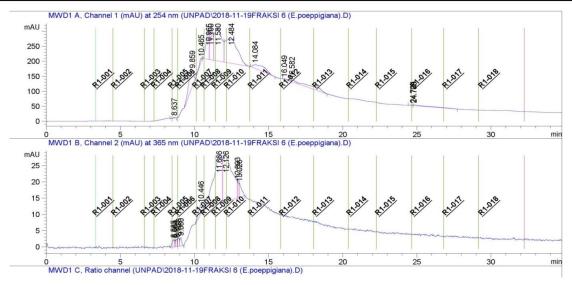


Gambar 10. Kromatogram pemisahan KCKT-Preparatif dengan fase gerak Metanol:Air (7:3).

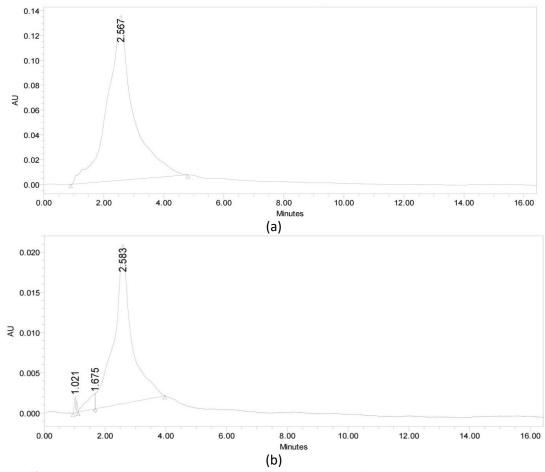


Gambar 11. Kromatogram pemisahan KCKT-Preparatif dengan fase gerak asetonitril:air (7:3).

Rahmawati, Farida, I.N., Rayapratiwi, W., Haraswati, N., Herlina, T., Supratman, U.



Gambar 12. Kromatogram pemisahan KCKT-preparatif dengan fase gerak asetonitril:air (6:4).

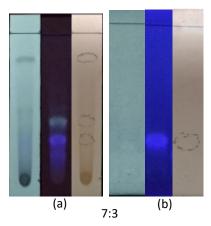


Gambar 13. Kromatogram R9 s.d. R11 hasil KCKT-analitik dengan fase gerak metanol:air (7:3): (a) pada panjang gelombang 254 nm dan (b) pada panjang gelombang 365 nm.

Hasil KCKT-Preparatif ditunjukan pada Gambar 9 sampai dengan Gambar 12.

Proses penghimpunan puncak-puncak hasil pemisahan dari KCKT-Preparatif berdasarkan collect-*manual* hasilnya adalah:

- Fase gerak Metanol:Air (8:2): Puncak yang di collect yaitu pada R31 s/d R34, R35 dan R36 s/d R39
- 2. Fase gerak Metanol:Air (7:3): Puncak yang di *collect* yaitu pada R5, R6 s/d R7, R9 s/d R11, R12 s/d R13



Gambar 14. Kromatogram KLT R9 s.d. R11 hasil KCKT-analitik dengan fase gerak metanol:air (7:3): (1) sebelum pemisahan dan (2) setelah pemisahan.

- 3. Fase gerak Acetonitrill:Air (7:3): Puncak yang di *collect* yaitu pada R12,R13, R16 s/d R17, dan R20.
- 4. Fase gerak Acetonitrill:Air (6:4): Puncak yang di collect yaitu pada R8, R9 dan R10.

Sub fraksi yang telah dikumpulkan kemudian di evaporasi dan dilakukan pengecekan kembali dengan KCKT-Analitik dan KLT untuk menentukan senyawa murni hasil pemisahan dari KCKT-Preparatif. Berdasarkan hasil pengecekan maka senyawa murni diperoleh pada kondisi pemisahan fase gerak Metanol:Air (7:3) dengan flow rate 5,8 mL/menit pada tabung R9 s.d. R11 ditunjukkan pada Gambar 13 dan Gambar 14.

KESIMPULAN

Kondisi optimal pemisahan dengan KCKT-Preparatif optimal diperoleh pada konsentrasi sampel 3000 ppm dengan komposisi fase gerak campuran Metanol:Air (7:3), serta kecepatan laju alir 5,28 mL/menit terlihat dari puncak hasil yang diperoleh satu puncak.

DAFTAR PUSTAKA

- de Araújo-Júnior, J.X., de Oliveira, M.S., Aquino, P.G., Alexandre-Moreira, M.S. & Sant'Ana, A.E. (2012). A phytochemical and ethnopharmacological review of the genus Erythrina. In Rao, V. (ed). *Phytochemicals A Global Perspective of Their Role in Nutrition and Health*. InTech. Croatioa.
- Chin, J. (2006). *Manual Pemberantasan Penyakit Menular edisi 17*. Penterjemah: Kandun, I.N. Infomedika. Jakarta.
- Cordell, G.A. (1981). *Introduction to Alkaloid A Biogenetic Approach*. Jhon Willey and Sons, Inc. New York.
- Domínguez, X.A. & Alcorn, J.B. (1985). Screening of medicinal plants used by Huastec Mayans of northeastern Mexico. *Journal of Ethnopharmacology*. 13(2): 139-156.
- Heyne, K. (1987). *Tumbuhan Berguna Indonesia*. Badan Penelitian dan Pengembangan Kehutanan, Departemen Kehutanan. Jakarta.
- Latif Z. & Sarker S.D. (2012) Isolation of Natural Products by Preparative High Performance Liquid Chromatography (Prep-HPLC). In: Sarker S., Nahar L. (eds) *Natural Products Isolation. Methods in Molecular Biology (Methods and Protocols)*. vol 864. pp. 255-274. Humana Press
- Orwa, C., Mutua, A., Kindt, R., Jamnadass, R., Simons, A. (2009). *Erythrina poeppigiana*. *Agroforestree Database: a tree reference and selection guide version 4.0.* http://www.worldagroforestry.org/sites/treedbs/treedatabases.asp.
- Penduff, P. (2013). Method Transfer an easy way to scale up from UHPLC to preparative. Agilent Technologies, Inc. Waldbroon, Germay.
- Simões, C.M.O., Falkenberg, M., Mentz, L.A., Schenkel, E.P., Amoros, M. & Girre, L. (1999). Antiviral activity of south Brazilian medicinal plant extracts. Phytomedicine. 6(3): 205-214.