

## BAB II TINJAUAN PUSTAKA

### 2.1. Tinjauan tentang Tanaman Bawang Dayak (*Eleutherine palmifolia* L.)

Bawang dayak (*Eleutherine palmifolia* L.) merupakan salah satu jenis tanaman yang berkhasiat bagi kesehatan. Tanaman ini banyak ditemukan di daerah Kalimantan. Penduduk lokal di daerah tersebut sudah menggunakan tanaman ini sebagai obat tradisional. Bagian yang dapat dimanfaatkan pada tanaman ini adalah umbinya. Tanaman ini banyak terdapat di daerah pegunungan antara 600 sampai 1500 m di atas permukaan laut. Mudah dibudidayakan, tidak tergantung musim dan dalam waktu 2 hingga 3 bulan setelah tanaman sudah dapat dipanen. (Saptowalyono, 2007) .

#### 2.1.1. Klasifikasi

Berdasarkan ilmu taksonomi, klasifikasi tanaman Bawang Dayak (*Eleutherine palmifolia* L.) Merr

|              |   |
|--------------|---|
| Kingdom      | : Plantae   |
| Subkingdom   | : Tracheobionta   |
| Super Divisi | : Spermatophyta   |
| Divisi       | : Magnoliophyta   |
| Kelas        | : Liliopsida  |
| Sub Kelas    | : Liliidae  |
| Ordo         | : Liliales  |
| Famili       | : Iridaceae   |
| Genus        | : <i>Eleutherine</i>  |
| Spesies      | : <i>Eleutherine palmifolia</i> (L.) Merr   |
| Nama Umum    | : Bawang dayak, bawang sabrang  |
| Nama Daerah  | : Bawang hantu atau bawang makkah, brambang sabang, bawang siyem, lulupan sapo, teki sabrang, bebawangan bereum, bawang berlian, bawang tiwai |



**Gambar 2.1.** Tanaman Bawang Dayak (*Eleutherine palmifolia* L.)

(Sumber : <https://kaltim.tribunnews.com>)

### 2.1.2. Morfologi

Tumbuhan ini berupa terna menahun yang merumpun sangat kuat, akhirnya merupakan rumpun-rumpun besar. Tingginya hanya mencapai 26 hingga 50 cm. Batangnya tumbuh tegak atau merunduk, berumbi yang berbentuk kerucut dan warnanya merah. Daunnya ada dua macam, yaitu yang sempurna berbentuk pita dengan ujungnya runcing, sedang daun-daun lainnya berbentuk menyerupai batang. Bunganya berupa bunga tunggal, warnanya putih, terdapat pada ketiak-ketiak daun atas, dalam rumpun-rumpun bunga yang terdiri dari 4 sampai 10 bunga. Bunganya mekar menjelang sore, jam 5 sampai jam 7 sore dan kemudian menutup kembali. Buah kotaknya berbentuk jorong dengan bagian ujungnya berlekuk. Bila masak merekah menjadi 3 rongga yang berisi banyak biji. Bentuk bijinya bundar telur atau hampir bujur sangkar. Umbinya mirip bawang merah tetapi sama sekali tidak berbau (Heyne,1987).

### 2.1.3. Manfaat Bawang Dayak *Eleutherine palmifolia* L.

Bawang dayak atau bawang hantu (*Eleutherine palmifolia* L.) (Merr) merupakan tanaman khas Kalimantan Tengah. Tanaman ini sudah secara turun temurun dipergunakan masyarakat Dayak sebagai tanaman obat. Tanaman ini memiliki warna umbi merah dengan daun hijau berbentuk pita dan bunganya berwarna putih. Secara empiris, umbi bawang dayak dikenal memiliki khasiat untuk mengatasi bisul atau penyakit kulit. Cara penggunaannya yaitu dengan menempelkan parutan umbi bawang dayak pada daerah yang luka (Galingging, 2009).

#### 2.1.4. Kandungan Senyawa Kimia Tanaman *Eleutherine palmifolia L.*

Dalam umbi bawang dayak terkandung senyawa fitokimia yakni alkaloid, glikosida, flavonoid, fenolik, steroid dan tannin. Hasil penapisan fitokimia pada bagian umbi menunjukkan adanya kandungan metabolit sekunder yaitu alkaloid, glikosida, flavanoid, fenolik, kuinon, steroid, zat tanin dan minyak atsiri. Bagian daun dan akar mengandung flavonoida dan polifenol (Heyne, 1987).

#### 2.2. Tinjauan Umum tentang Bakteri

Salah satu bakteri yang mengakibatkan timbulnya jerawat pada permukaan kulit yaitu bakteri *P. acnes*. Berikut ini klasifikasi dari bakteri *P. acnes*, menurut (Brannan, 2007) sebagai berikut:

|         |                                  |
|---------|----------------------------------|
| Kingdom | : Bacteria                       |
| Phylum  | : Actinobacteria                 |
| Class   | : Actinobacteria                 |
| Order   | : Actinomycetales                |
| Family  | : Propionobacteriaceae           |
| Genus   | : <i>Propionibacterium</i>       |
| Spesies | : <i>Propionibacterium acnes</i> |

*Propionibacterium acnes* tergolong kedalam kelompok bakteri berbentuk batang, atau benang gram positif yang tidak membentuk spora. Bakteri ini tergolong bakteri anaerob hingga aerotolerant. Pertumbuhan optimum pada suhu 30-37°C. Koloni bakteri pada media agar berwarna kuning muda sampai merah muda dan memiliki bentuk khas (Bojar, 2004 :22)

*Propionibacterium acnes* ikut serta dalam patogenesis jerawat dengan menghasilkan lipase, yang memecahkan asam lemak bebas dari lipid kulit. Asam lemak ini dapat menimbulkan radang jaringan dan ikut menyebabkam jerawat. *Propionibacterium acnes* kadang-kadang menyebabkam infeksi katup jantung prostetik dan pintas cairan serebrospinal (Jawertz et al, 2005)

Patogenesis dari *P.acnes* terutama dipusatkan pada kemampuan organisme menghasilkan produk bioaktif exoseluler dan interaksinya dengan sistem imun. *P.acnes* memproduksi sejumlah enzim exoseluler dan metabolis yang secara langsung merusak jaringan host. Telah dilaporkan bahwa sitokin penginduksi

inflamasi pada *P. acnes* merupakan interleukin (IL)-1 $\alpha$ , IL-1 $\beta$ , IL-8 dan TNF- $\alpha$ . Mekanisme terjadinya jerawat adalah *P.acnes* yang merusak stratum corneum dan stratum germinal dengan cara mensekresikan bahan kimia yang menghancurkan dinding pori. Kondisi ini dapat menyebabkan inflamasi. Asam lemak dan minyak pada kulit tersumbat dan mengeras. Jika jerawat disentuh maka inflamasi meluar sehingga padatan asam lemak dan minyak kulit yang mengeras akan membesar (Athikomkulchai et al, 2008).

### 2.2.1. Klasifikasi Respon Hambatan Pertumbuhan Bakteri

**Tabel 2.1.** Kadar Hambat minimal pertumbuhan bakteri (Elganyar, 2006)

| Diameter zona bening | Respon hambatan pertumbuhan |
|----------------------|-----------------------------|
| >20mm                | Kuat                        |
| 16 – 20 mm           | Sedang                      |
| 10 – 15 mm           | Lemah                       |
| <10 mm               | Kurang efektif              |

### 2.3. Tinjauan Umum tentang Antibiotik

Antibiotik adalah senyawa kimia yang dapat menghambat atau membunuh mikroba, terutama yang dapat mengganggu kesehatan manusia. Definisi ini kemudian berkembang menjadi suatu senyawa yang dihasilkan oleh suatu mikroorganisme dan dalam konsentrasi kecil mampu menghambat bahkan membunuh proses kehidupan suatu mikroorganisme (Jawetz *et al.*, 2012).

Berdasarkan sifatnya (daya hancurnya) antibiotik dapat dibagi menjadi beberapa tipe, yaitu : (Jawetz *et al.*, 2012).

- (1) Antibiotik yang menghambat sintesis dinding sel bakteri. Dinding sel yang terganggu akan menyebabkan dinding sel menjadi rapuh dan mengakibatkan pecah.
- (2) Antibiotik yang menghambat fungsi membran sel.
- (3) Antibiotik yang menghambat sintesis protein (yaitu inhibisi, translasi, dan transkripsi bahan genetik)
- (4) Antibiotik yang menghambat sintesis asam nukleat

### 2.3.1 Klindamisin

Terapi yang efektif dapat sangat memperbaiki kualitas hidup dari penderita acne vulgaris (Healy, 1994) Salah satu jenis terapi yang sering digunakan untuk jerawat derajat ringan dan sedang adalah terapi topikal. Antibiotik topikal sudah secara luas digunakan sebagai salah satu cara efektif dalam pengobatan acne vulgaris selama 30 tahun terakhir (William and Richard, 1976).

Terapi antibiotik tidak hanya menurunkan jumlah *P. Acnes* pada kulit, tetapi juga bekerja dengan menurunkan jumlah mediator inflamasi *P. Acnes*. Terapi topikal biasanya digunakan untuk pengobatan mild acne. Obat topikal ini bisa langsung bekerja pada folikel sebaceous tanpa memberi pasien resiko *adverse drugs effect*, yang kemungkinan dapat ditimbulkan obat sistemik. Klindamicin paling efektif dalam pengobatan acne vulgaris jika dibandingkan dengan erythromycin dan tetracycline (Beck, 1981), tetapi penggunaan obat ini secara luas memunculkan strain *P. Acnes* yang resistan terhadap Klindamicin. Akibatnya penggunaan Klindamicin sebagai anti acne topikal jangka panjang mulai diragukan dan penelitian terhadap alternatif terapi acne vulgaris menjadi berkembang lebih luas.

## 2.4 Tinjauan tentang Aktivitas Antibakteri Senyawa Metabolit Sekunder

Komponen senyawa metabolit sekunder yang berfungsi sebagai antimikroba:

### 2.4.1. Flavonoid

Flavonoid merupakan sub kelompok senyawa polifenol memiliki struktur benzo-y-pyrone yang terdapat pada tanaman yang digunakan untuk infeksi mikroba. Studi epidimiologis telah secara konsisten menunjukkan bahwa asupan tinggi flavonoid memiliki efek protektif terhadap penyakit yang disebabkan bakteri atau virus. Flavonoid merupakan salah satu dari sekian banyak senyawa metabolit sekunder yang dihasilkan oleh suatu tanaman, yang dapat dijumpai pada bagian daun, akar, kulit, tepung sari, bunga, dan biji (Lenny, 2006).

Kerangka flavonoid terdiri atas satu cincin aromatik A, satu cincin aromatik B, dan cincin tengah berupa heterosiklik yang mengandung oksigen dan bentuk teroksidasi cincin mi merupakan dasar dalam pembagian flavonoid ke dalam sub-sub kelompoknya (Redha, 2010). Mekanisme kerja dari alkaloid sebagai antibakteri

melalui cara berinteraksi dengan asam deoksiribosa nukleat (DNA) bakteri atau berinteraksi dengan dinding sel bakteri (Cowan, 1999).

#### **2.4.2. Alkaloid**

Alkaloid adalah senyawa yang secara umum mengandung paling sedikit satu buah atom nitrogen yang bersifat basa dan merupakan bagian dari cincin heterosiklik. Banyak tumbuhan yang digunakan untuk pengobatan yang setelah di isolasi dengan senyawa nitrogen heterosiklik (Lutfiana, 2013).

Alkaloid memiliki efek antimikroba dan efek antidiare. Mekanisme kerja dari alkaloid sebagai antibakteri melalui cara berinteraksi dengan asam deoksiribosa nukleat (DNA) bakteri atau berinteraksi dengan dinding sel bakteri yaitu dengan meletakkan diri di antara untaian DNA atau dinding sel bakteri. Penghambatan sintesis dinding sel yang akan menyebabkan lisis pada sel bakteri sehingga sel akan mati (Cowan, 1999).

#### **2.4.3. Fenol**

Fenol merupakan kelompok besar dari tanaman metabolit sekunder dan ditemukan pada senyawa alami dari tanaman yang memiliki gugus aromatik, serta fenol memiliki struktur sederhana dengan satu cincin aromatik yang dikombinasikan dengan alkohol (Evans, 2002).

Mekanisme yang dianggap bertanggung jawab terhadap toksisitas fenolik pada mikroorganisme adalah melalui inhibitor enzim reaksi dengan grup sulfhidril atau melalui interaksi non-spesifik dengan protein (Cowan, 1999).

#### **2.4.4. Tanin**

Tanin merupakan suatu nama deskriptif umum untuk satu grup substansi fenolik polimer yang mampu menyamak kulit atau mempresipitasi gelatin dari cairan, suatu sifat yang dikenal sebagai astringensi. Tanin di temukan hampir di setiap bagian dari tanaman yaitu kulit kayu, daun, buah dan akar (Hagerman, 2002).

Mekanisme kerja senyawa tanin sebagai antibakteri antara lain dengan cara berikatan dengan protein, merusak membran sel bakteri dan menghambat pengeluaran enzim (Cowan, 1999). Dengan terhambat salah satu enzim yang berperan dalam metabolisme bakteri dapat mengakibatkan penumpukan bahan-bahan metabolit yang bersifat toksik pada bakteri (Dzen, 2003).

#### 2.4.5. Saponin

Saponin adalah zat yang apabila dikocok dengan air akan mengeluarkan buih dan bila dihidrolisis akan menghasilkan gula dan saponenin. Sifat-sifat saponenin ialah dapat menghemolisis darah, mengikat kolesterol dan toksin pada hewan berdarah (Mulyana, 2002). Saponin merupakan metabolit sekunder yang banyak ditemukan di alam, terdiri gugus gula yang berikatan dengan aglikon atau saponenin. Bahan Aktif ini menghambat DNA-polymerase sehingga dapat mengganggu sintesa asam nukleat (Cowan, 1999).

Senyawa golongan saponin mempunyai tingkat kelarutan rendah dalam etanol, akan tetapi mempunyai tingkat kelarutan tinggi dalam air dan metanol. Saponin bersifat spektrum luas sebagai antibakteri dan antijamur. Saponin dapat bekerja menghambat DNA-polymerase sehingga sintesa asam nukleat terganggu (Hertanti, 2012).

#### 2.5 Tinjauan Uji Kepekaan terhadap aktivitas Antibakteri secara Invitro

Aktivitas antibakteri diukur in vitro untuk menentukan:

1. Potensi agen antibakteri dalam larutan
2. Konsentrasinya dalam cairan tubuh atau jaringan
3. Ketentuan mikroorganisme tertentu terhadap obat dengan konsentrasi tertentu (Jawetz *et al.*, 2012).

Uji kepekaan antibakteri terhadap obat-obatan secara in vitro bertujuan untuk mengetahui obat antibakteri yang masih dapat digunakan untuk mengatasi infeksi oleh suatu mikroba (Dzen *et al.*, 2003). Pengujian aktivitas antibakteri secara in vitro dapat dilakukan dengan salah satu dari metode dibawah ini :

##### 2.5.1 Metode Difusi Cakram

Prinsip dari metode difusi cakram yaitu obat dijenuhkan ke dalam kertas saring (cakram kertas). Cakram kertas yang mengandung obat tertentu di tanam pada media pembedihan agar padat yang telah di campur dengan mikroba yang diuji, kemudian di inkubasikan 37°C selama 18-24 jam. Selanjutnya diamati adanya area (zona) jernih disekitar cakram kertas yang menunjukkan tidak adanya pertumbuhan mikroba (Dzen *et al.*, 2003).

Pada metode ini yang diamati adalah diameter daerah hambatan pertumbuhan kuman karena difusinya obat ini titik awal pemberian ke daerah difusi

sebanding dengan kadar obat yang diberikan. Metode ini dilakukan dengan cara menanam kuman pada media agar padat tertentu kemudian diletakkan kertas samir atau disk yang mengandung obat atau dapat juga dibuat sumuran kemudian diisi obat dan dilihat hasilnya (Jawetz *et al.*, 2012).

Cakram kertas filter yang mengandung sejumlah tertentu obat ditempatkan di atas permukaan medium padat yang telah diinokulasi pada permukaan dengan organisme uji. Setelah inkubasi, diameter zona jernih inhibisi di sekitar cakram diukur sebagai ukuran kekuatan inhibisi obat melawan organisme uji tertentu. Metode tersebut dipengaruhi banyak faktor fisik dan kimia selain interaksi sederhana antar obat dan organisme (misal : sifat medium dan kemampuan difusi, ukuran molekular, dan stabilitas obat). Meskipun demikian, standardisasi keadaan memungkinkan penentuan kerentanan organisme (Jawetz *et al.*, 2012).

### **2.5.2 Metode dilusi**

Cara ini digunakan untuk menentukan KHM (Kadar Hambat Minimal) dan KBM (Kadar Bunuh Minimal) dari obat antimikroba. Prinsip dari metode Dilusi Tabung yaitu menggunakan satu seri tabung reaksi yang diisi media cair dan sejumlah tertentu sel mikroba yang diuji. Kemudian masing-masing tabung diisi dengan obat yang telah diencerkan secara serial. Selanjutnya seri tabung diinkubasikan pada suhu 37°C selama 18-24 jam dan diamati terjadinya kekeruhan pada tabung (Dzen *et al.*, 2003).

Prinsip metode ini adalah pengenceran antibiotik sehingga diperoleh beberapa konsentrasi obat yang ditambah suspensi kuman dalam media. Sedangkan pada dilusi padat, tiap konsentrasi obat dicampur dengan media agar lalu ditanami kuman dan diinkubasi. Pada metode ini yang diamati adalah ada atau tidaknya pertumbuhan bakteri atau kuman atau jika mungkin, tingkat kesuburan dari pertumbuhan kuman, dengan cara menghitung jumlah koloni, maka dapat ditentukan Kadar Hambat Minimum (KHM) dan Kadar Bunuh Minimum (KBM) (Jawetz *et al.*, 2012).

### **2.5.3 Metode Biotografi**

Bioautografi adalah suatu metode pendeteksian untuk menemukan suatu senyawa antimikroba yang belum teridentifikasi dengan cara melokalisir aktivitas antimikroba tersebut pada suatu kromatogram. Metode tersebut di dasarkan pada



aktivitas biologi analit, baik sebagai antibakteri, antifungi, antitumor, maupun antiprotozoa (Choma, 2005). Bioautografi sering digunakan untuk mendeteksi antibiotik yang dapat dianalisis dengan KLT atau kromatografi kertas. Pada umumnya, efek biologi senyawa yang dapat dikatakan menghambat pertumbuhan bukan organisme dinyatakan sebagai zona hambat. (Touchstone Dobbins, 1983).

Ciri khas dari prosedur bioautografi adalah didasarkan atas teknik difusi agar, dimana senyawa antimikrobanya dipindahkan dari lapisan KLT ke medium agar yang telah diinokulasikan dengan merata bakteri uji yang peka. Dari hasil inkubasi pada suhu dan waktu tertentu akan terlihat zona hambatan di sekeliling spot dari KLT yang telah ditempelkan pada media agar. Zona hambatan ditampakkan oleh aktivitas senyawa aktif yang terdapat di dalam bahan yang di periksa terhadap pertumbuhan mikroorganisme uji (Betina, 1972).

## **2.6 Tinjauan tentang Metode Ekstraksi**

### **2.6.1 Pengertian Ekstraksi**

Ekstrak adalah sediaan pekat yang diperoleh dengan mengekstraksi zat aktif dari simplisia nabati atau simplisia hewani menggunakan pelarut yang sesuai, kemudian semua atau hampir semua pelarut diuapkan dan massa atau serbuk yang tersisa di perlakukan sedemikian hingga memenuhi baku yang telah ditetapkan (Depkes RI, 2014).

### **2.6.2 Tinjauan tentang Metode Ekstraksi**

Ekstraksi merupakan proses pemisahan bahan dari campurannya dengan menggunakan pelarut. Ekstraksi tanaman obat adalah pemisahan secara kimia atau fisika suatu atau sejumlah bahan padat atau bahan cair dari suatu padatan, yaitu tanaman obat. Biasanya menggunakan pelarut untuk mengekstraksi bahan tanaman. Praktek ini umum dikatakan sebagai ekstraksi padat – cair, yang berlangsung dalam dua proses secara paralel: pelepasan (release) bahan yang diekstraksi melalui proses dari sel (tanaman) yang telah dirusak, dan pelepasan bahan yang diekstraksi melalui proses difusi. Prinsip ekstraksi adalah melarutkan senyawa polar dalam pelarut polar dan senyawa non polar dalam pelarut non polar (Agoes, 2007)

Dalam pembuatan ekstrak untuk keperluan farmasi, hal berikut harus jelas:

1. Jumlah simplisia yang akan diekstraksi. Jumlah ini akan digunakan untuk perhitungan dosis obat.
2. Derajat kehalusan simplisia. Hal ini penting untuk mengupayakan agar penarikan dapat berlangsung semaksimal mungkin. Kehalusan menyangkut luas permukaan yang akan berkontak dengan pelarut untuk ekstraksi.
3. Jenis pelarut yang akan digunakan. Hal ini menyangkut keamanan karena pelarut yang digunakan untuk keperluan farmasi sangat terbatas jumlahnya. Selain itu, pelarut akan menentukan efisiensi proses penarikan zat berkhasiat dari tanaman obat.
4. Temperatur atau suhu penyari akan menentukan jumlah dan kecepatan penyaringan.
5. Lama waktu penyarian. Hal ini penting sekali untuk menentukan jumlah bahan yang tersari.
6. Proses ekstraksi. Ada kalanya proses ekstraksi harus terlindungi dari cahaya karena kemungkinan akan ada komponen ekstrak yang peka terhadap cahaya. Selain itu, untuk skala laboratorium, pada umumnya proses dilakukan dalam skala betas.

### **2.6.3 Prinsip Ekstraksi**

Ekstraksi adalah proses pemisahan bahan dari campurannya dengan menggunakan pelarut. Dari serangkaian proses ekstraksi didapatkan ekstrak sebagai hasil akhir. Prinsip ekstraksi dibagi menjadi tiga cara, cara dingin, cara panas, dan cara ekstraksi lainnya.

Cara dingin:

1. Maserasi

Penyarian zat aktif yang dilakukan dengan cara merendam serbuk simplisia dalam cairan penyari yang sesuai selama tiga hari pada temperatur kamar terlindung dari cahaya, cairan penyari akan masuk ke dalam sel melewati dinding sel. Isi sel akan larut karena adanya perbedaan konsentrasi antara larutan didalam sel dengan diluar sel. Larutan yang konsentrasinya tinggi akan terdesak keluar dan diganti oleh cairan penyari dengan konsentrasi rendah (proses difusi). Peristiwa

tersebut berulang sampai terjadi keseimbangan konsentrasi antara larutan di luar sel dan di dalam sel. Selama proses maserasi dilakukan pengadukan dan penggantian cairan penyari setiap hari. Endapan yang diperoleh dipisahkan dan filtratnya di pekatkan.

## 2. Perkolasi

Metode ekstraksi secara berkesinambungan dimana serbuk sampel dibasahi secara perlahan dalam sebuah perkolator (wadah silinder yang dilengkapi dengan kran pada bagian bawahnya). Pelarut ditambahkan pada bagian atas serbuk sampel dan dibiarkan menetes perlahan pada bagian bawah (Mukhriani, 2014).

Cara panas:

### 1. Reflux

Penarikan komponen kimia yang dilakukan dengan cara sampel dimasukkan kedalam labu alas bulat bersama-sama dengan cairan penyari lalu dipanaskan, uap- uap cairan penyari terkondensasi pada kondensor bola menjadi molekul – molekul cairan penyari yang akan turun kembali menuju labu alas bulat, akan menyari kembali sampel yang berada pada labu alas bulat akan menyari kembali menuju labu alas bulat, akan menyari kembali sampel yang berada pada labu alas bulat, demikian seterusnya berlangsung secara berkesinambungan sampai penyarian sempurna, penggantian pelarut dilakukan sebanyak 3 kali setiap 3-4 jam. Filtrat yang diperoleh dikumpulkan dan dipekatkan.

### 2. Destilasi Uap Air

Penyarian minyak menguap dengan cara simplisia dan air ditempatkan dalam labu berbeda. Air dipanaskan dan akan menguap, uap air akan masuk ke dalam labu sampel sambil mengekstraksi minyak menguap yang terdapat dalam simplisia uap air dan minyak menguap yang telah terekstraksi menuju kondensor dan akan terkondensasi lalu akan melewati pipa alonga, campuran air dan minyak menguap akan masuk ke dalam corong pisah, dan akan memisah antara air dan minyak atsiri.

### 3. Digesti

Merupakan maserasi kinetik (dengan pengadukan kontinu) pada temperature yang lebih tinggi dari temperature ruangan yaitu secara umum dilakukan pada temperature 40-50°C (Depkes RI, 2000).

### 4. Soxhlet

Adalah metode ekstraksi yang dilakukan secara berkesinambungan dengan melarutkan sampel kering dengan menggunakan pelarut bervariasi. Pelarut yang sesuai dimasukkan ke dalam labu dan suhu penangas diatur di bawah suhu reflux (Mukhriani, 2014). Keuntungan dari metode ini adalah tidak membutuhkan banyak pelarut dan tidak memakan banyak waktu. Kerugiannya adalah senyawa yang bersifat termolabil dapat terdegradasi karena ekstrak yang diperoleh terus-menerus berada pada titik didih (Sutar *et al.*, 2010).

Cara Ekstraksi Lainnya (Depkes RI, 2000)

#### 1. Ekstraksi Berkesinambungan

Proses ekstraksi yang dilakukan berulang kali dengan pelarut yang berbeda atau resirkulasi cairan pelarut dan prosesnya tersusun berturutan beberapa kali. Proses ini dilakukan untuk meningkatkan efisiensi dan dirancang untuk bahan dalam jumlah besar yang terbagi dalam beberapa bejana ekstraksi.

#### 2. Superkritikal Karbondioksida

Penggunaan prinsip superkritik untuk ekstraksi serbuk simplisia dan umumnya digunakan gas karbondioksida. Dengan variable tekanan dan temperatur akan diperoleh spesifikasi kondisi polaritas tertentu yang sesuai untuk melarutkan golongan senyawa kandungan tertentu. Penghilangan cairan pelarut dengan mudah dilakukan karena karbondioksida menguap dengan mudah, sehingga hampir langsung diperoleh ekstrak.

#### 3. Ekstraksi Ultrasonik

Getaran ultrasonik (20.000 Hz) memberikan efek pada proses ekstrak dengan prinsip meningkatkan permeabilitas dinding sel, menimbulkan gelembung spontan sebagai stress dinamis menimbulkan fraksi interfase.

Hasil ekstraksi tergantung pada frekuensi getaran, kapasitas alat dan lama proses ultrasonikasi.

#### 4. Ekstraksi Energi Listrik

Energi listrik digunakan dalam bentuk medan listrik, medan magnet serta “*Electric-discharges*” yang dapat mempercepat proses dan meningkatkan hasil dengan prinsip menimbulkan gelembung spontan dan menyebarkan gelombang tekanan berkecepatan ultrasonik.

Berdasarkan penelitian Fauzana (2010), maserasi sederhana didefinisikan sebagai metode ekstraksi dimana sampel direndam menggunakan pelarut dalam kurun waktu tertentu dengan atau tanpa pengadukan pada suhu ruang. Kinetika maserasi dan maserasi dengan tekanan tidak jauh berbeda dengan maserasi sederhana. Titik perbedaan kinetika maserasi terletak pada dilakukannya pengadukan berkecepatan konstan. Metode maserasi yang digunakan dalam penelitian sebelumnya cenderung mengarah pada kinetika maserasi karena menggunakan pengadukan yang konstan, yakni 200 rpm dan waktu selama 4 jam dan bahwa dengan menggunakan metode remaserasi kinetik menghasilkan rendemen terendah dengan hasil yang optimum pada lama ekstraksi selama 4 jam. Sedangkan penelitian yang dilakukan oleh Amalina (2015), menyimpulkan bahwa dengan menggunakan remaserasi kinetik 4 jam dan non kinetik 24 jam memberikan hasil rendemen yang tidak jauh berbeda yaitu 8,75 % dan 9,86 %. (Fauzana, 2010).

### 2.7 Macam-Macam Penyari

Cairan yang dapat digunakan untuk menyari diantaranya air, ester, dan etanol dengan air (Voight, 1995). Pemilihan pelarut ekstraksi dipengaruhi oleh beberapa faktor (Bernasconi, *et al.*, 1995) :

1. Adanya selektivitas, yaitu pelarut hanya melarutkan ekstrak yang diinginkan dan bukan komponen lain dari bahan yang diekstraksi
2. Pelarut sebisa mungkin memiliki kemampuan yang besar untuk melarutkan ekstrak
3. Pelarut memiliki kemampuan untuk tidak saling bercampur dalam bahan ekstraksi

4. Pada umumnya, pelarut tidak boleh menyebabkan perubahan secara kimia pada komponen-komponen bahan ekstraksi. Selain itu, pelarut sebisa mungkin adalah pelarut yang murah, tidak beracun, tidak dapat terbakar, tidak korosif, stabil secara kimia dan ternis

## 2.8 Tinjauan tentang Pelarut

Pelarut adalah benda cair atau gas yang melarutkan benda padat, cair atau gas yang menghasilkan sebuah larutan. Pelarut paling umum digunakan dalam kehidupan sehari – hari adalah air. Pelarut lain yang umum digunakan adalah pelarut organik (mengandung karbon). Pelarut yang biasanya memiliki titik didih rendah dan lebih mudah menguap, meninggalkan substansi terlarut yang didapatkan. Untuk membedakan antara pelarut dengan zat yang dilarutkan, pelarut biasanya terdapat dalam jumlah yang lebih besar (Guenther, 1987).

### 2.8.1 Pemilihan Pelarut

Pelarut yang dapat digunakan dalam pembuatan ekstrak harus merupakan pelarut yang baik (optimal) untuk senyawa kandungan yang berkhasiat atau yang aktif, sehingga senyawa tersebut dapat terpisah dari bahan dan senyawa kandungan lainnya, serta ekstrak hanya mengandung sebagian besar senyawa yang diinginkan. Berbagai pelarut digunakan, akan tetapi pelarut yang toksik harus dihindari. Pelarut yang akan digunakan dapat dilihat pada farmakope. Oleh karena itu diperlukan beberapa pertimbangan dalam pemilihan pelarut yakni sebagai berikut:

1. Selektivitas
2. Kemudahan bekerja dan proses dengan cairan tersebut
3. Ekonomis
4. Ramah lingkungan
5. Keamanan (Depkes RI, 2000).

Pemerintah juga membatasi penggunaan pelarut untuk proses ekstraksi. Pelarut yang boleh digunakan dan yang dilarang. Pelarut ini harus memenuhi standar kefarmasian atau *pharmaceutical grade*. Hingga sekarang pelarut yang dapat digunakan adalah air dan alkohol atau campuran keduanya. Jenis pelarut lain seperti metanol dan lain-lain (alkohol dan turunannya), heksana dan lain-lain (hidrokarbon alifatik), toluen dan lain-lain (hidrokarbon aromatik), kloroform

(dan segolongannya), aseton, umumnya digunakan untuk tahap separasi dan tahap pemurnian (fraksinasi). Untuk metanol penggunaannya dihindari karena sifatnya yang toksik akut dan kronik (Depkes RI, 2000).

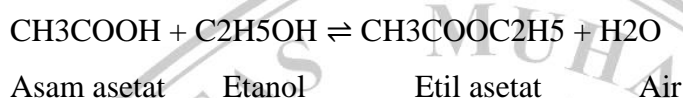
Selain pertimbangan toksik dan tidak toksik pelarut berikut dapat digunakan berdasarkan pertimbangan suhu didih agar mudah diuapkan atau dihilangkan. Untuk menemukan suhu didih/penguapan dapat dilakukan dalam keadaan vakum. Jenis-jenis pelarut yang dapat digunakan sebagai berikut: Pelarut tunggal senyawa hidrokarbon

1. Pelarut yang dapat digunakan misalnya petroleum eter (suhu didih 40-60°C), n-heksan (suhu didih 68,7°C), benzen (suhu didih 80,10°C), toluen (suhu didih 110,62°C), kloroform (suhu didih 61,15°C).
2. Pelarut tunggal senyawa alkohol  
Pelarut yang dapat digunakan misalnya metil alkohol (suhu didih 64,5°C), etanol (suhu didih 78,32°C), n-propanol (suhu didih 91,75°C), isopropanol (suhu didih 82,40°C).
3. Pelarut tunggal keton  
Misalnya aseton (suhu didih 56,24°C).
4. Pelarut tunggal asam karboksilat  
Misalnya asam asetat (suhu didih 117,72°C)
5. Pelarut tunggal ester  
Misalnya etil asetat (suhu didih 77,14°C)
6. Pelarut tunggal eter  
Misalnya di-etil eter (suhu didih 34,48°C) (Agoes, 2007).

### 2.8.2 Etil Asetat

Dalam penelitian kali ini digunakan pelarut etil asetat yang merupakan pelarut semi polar. Etil asetat adalah salah satu jenis pelarut yang memiliki rumus molekul  $\text{CH}_3\text{COOC}_2\text{H}_5$ . Produk turunan dari asam asetat ini memiliki banyak kegunaan seperti pengaroma buah dan pemberi rasa seperti untuk es krim, kue, kopi, teh atau juga untuk parfum, digunakan pada industri tinta cetak, cat dan tiner, lem, PVC film, polimer cair dalam industri kertas, serta banyak industri penyerap lainnya seperti industri farmasi, dan sebagainya (Mc Ketta and Cunningham, 1977).

Etil asetat berwujud cairan tak berwarna, memiliki aroma khas. Etil asetat adalah pelarut semi polar yang volatil(mudah menguap), tidak beracun, dan tidak higroskopis. Etil asetat dibuat melalui reaksi esterifikasi Fischer dari asam asetat dan etanol. Reaksi esterifikasi Fischer adalah reaksi pembentukan ester dengan cara merefluks asam karboksilat bersama etanol dengan katalis asam. Reaksi esterifikasi merupakan reaksi reversible yang sangat lambat, tetapi bila menggunakan katalis, kesetimbangan reaksi akan tercapai lebih cepat. Asam yang dapat digunakan sebagai katalis adalah asam sulfat, asam klorida, dan asam fosfat. Dari reaksi asam asetat dan etanol inilah akan menghasilkan etil asetat dengan persamaan reaksinya:



**Tabel 2.2 Sifat Fisika Etil Asetat(McKetta and Cuningham, 1977).**

| Sifat Fisika | Keterangan    |
|--------------|---------------|
| Berat        | 88,105 gr/mol |
| Wujud        | Cairan Bening |
| Densitas     | 0,897 gr/mol  |
| Titik Leleh  | -83,6         |
| Titik Didih  | 77,1°C        |
| Titik Nyala  | -4°C          |

Beberapa kegunaan etil asetat :

- 1) Sebagai bahan pelarut cat dan bahan baku pembuatan plastik
- 2) Untuk kebutuhan industri farmasi
- 3) Sebagai bahan baku bagi industri tinta cetak
- 4) Sebagai bahan baku bagi pabrik parfum, flavor, kosmetik, dan minyak atsiri (McKetta and Cuningham, 1977).

## 2.9 Tinjauan Kromatografi Lapis Tipis (KLT)

Kromatografi adalah pemisahan zat berkhasiat dan zat lain yang ada dalam sediaan dengan jalan penyarian berfraksi, atau penyerapan, atau penukaran ion pada zat berpori, menggunakan cairan atau gas yang mengalir. Banyak jenis kromatografi, salah satunya kromatografi lapis tipis(KLT). Kromatografi lapis tipis



digunakan pada pemisahan zat secara cepat, dengan menggunakan zat penyerap berupa serbuk halus yang dilapiskan serba rata pada lempeng kaca. Lempeng yang dilapis, dapat dianggap sebagai “kolom kromatografi terbuka” dan pemisahan didasarkan pada penyerapan, pembagian atau gabungannya, tergantung dari jenis penyerap dan cara pembuatan lapisan zat penyerap dan jenis pelarut (Materia Medika Indonesia, 1995).

Kromatografi planar ini fasa diamnya merupakan lapisan *uniform* bidang datar yang didukung oleh plat kaca, aluminium atau plat selulosa, sedangkan fasa gerak yang juga sering disebut sebagai pelarut pengembang akan bergerak sepanjang fasa diam dibawah pengaruh kapiler, pengaruh gravitasi atau pengaruh potensial listrik (Materia Medika Indonesia, 1995).

Untuk mengetahui kesesuaian zat yang diuji dengan pembanding maka bisa dilakukan dengan menghitung nilai Rf (*retention factor*). Rumus Rf sebagai berikut:

$$Rf = \frac{\text{jarak titik pusat bercak dari titik awal}}{\text{jarak garis depan dari titik awal}} \quad (\text{Stahl, 1985})$$

Perhitungan nilai Rf suatu senyawa yang diuji dan senyawa pembanding harus dilakukan pada plat yang sama. Nilai Rf dari suatu senyawa akan tetap konstan dari satu penelitian ke penelitian lainnya hanya jika kondisi kromatografi berikut juga konstan:

1. Sistem pelarut
2. Adsorben
3. Ketebalan adsorben
4. Jumlah zat yang ditotolkan
5. Temperatur (suhu)

### 2.9.1 Fase Diam

Kromatografi lapis tipis memiliki fase diam berupa lapisan tipis yang terdiri atas bahan padat yang dilapiskan pada permukaan penyangga datar yang biasanya terbuat dari kaca, dapat pula terbuat dari plat polimer atau logam. Lapisan ini melekat pada permukaan dengan bantuan bahan pengikat, biasanya kalsium sulfat atau amilum. Penjerap yang umum dipakai untuk kromatografi lapis tipis adalah silika gel, alumina, kieselgur dan selulosa (Gritter, et al., 1991).

Dua sifat yang penting dari fase diam adalah ukuran partikel dan homogenitasnya, karena adesi terhadap penyokong sangat tergantung pada kedua sifat tersebut. Ukuran partikel yang biasa digunakan adalah 1-25 mikron. Partikel yang butirannya sangat kasar tidak akan memberikan hasil yang memuaskan dan salah satu cara untuk memperbaiki hasil pemisahan adalah dengan menggunakan fase diam yang butirannya lebih halus. Butiran yang halus memberikan aliran pelarut yang lebih lambat dan resolusi yang lebih baik (Sastrohamidjojo, 1985).

### **2.9.2 Fase Gerak**

Fase gerak merupakan medium angkut yang terdiri atas satu atau beberapa pelarut, jika diperlukan sistem pelarut multi komponen, harus berupa suatu campuran sesederhana mungkin yang terdiri atas maksimum tiga komponen (Stahl, 1985).

Pemisahan senyawa organik selalu menggunakan pelarut campur. Tujuannya menggunakan pelarut campur adalah untuk memperoleh pemisahan senyawa yang baik. Kombinasi pelarut adalah berdasarkan atas polaritas masing-masing pelarut, sehingga dengan demikian akan diperoleh sistem pengembang yang cocok. Fase gerak yang digunakan dalam kromatografi lapis tipis antara lain: n-heksan, karbondottraklorida, benzen, kloroform, eter, etilasetat, piridinan, aseton, etanol, metanol dan air (Gritter, et al., 1991).

### **2.10 Tinjauan Uji Senyawa Golongan dengan metode KLT**

Hal yang pertama dilakukan uji golongan senyawa dengan metode KLT yaitu melakukan penjenjuran bejana, dengan cara tempatkan kertas saring dalam bejana kromatografi. Tinggi kertas saring 18 cm dan lebarnya sama dengan lebar bejana. Masukkan sejumlah larutan pengembang (fase gerak) ke dalam bejana kromatografi, hingga tingginya 0,5 sampai 1 cm dari dasar bejana. Tutup kedap dan biarkan hingga kertas saring basah seluruhnya. Kertas saring harus selalu terelup ke dalam larutan pengembang pada dasar bejana. Kecuali dinyatakan lain pada masing-masing monografi, prosedur KLT dilakukan dalam bejana jenuh (Farmakope Herbal Indonesia, 2008).

Setelah itu buat larutan uji, dengan cara timbang saksama lebih kurang 1 g serbuk simplisia, rendam sambil dikocok di atas penangas air dengan 10 mL pelarut

yang sesuai selama 10 menit. Masukkan filtrat ke dalam labu terukur 10 mL tambahkan pelarut sampai tanda. Setelah larutan uji selesai dilakukan penotolan larutan uji dan larutan pembanding, dengan jarak antara 1,5 sampai 2 cm dari tepi bawah lempeng, dan biarkan mengering. Tempatkan lempeng pada rak penyangga, hingga tempat penotolan terletak di sebelah bawah, dan masukkan rak ke dalam bejana kromatografi. Larutan pengembang (fase gerak) dalam bejana harus mencapai tepi bawah lapisan penjerap, totolan jangan sampai terendam. Letakkan tutup bejana pada tempatnya dan biarkan sistem hingga fase gerak merambat sampai batas jarak rambat. Keluarkan lempeng dan keringkan di udara, dan amati bercak dengan sinar tampak, ultraviolet gelombang pendek (254 nm) kemudian dengan ultraviolet gelombang panjang (366 nm). Ukur dan catat jarak tiap bercak dari titik penotolan serta catat panjang gelombang untuk tiap bercak yang diamati. Tentukan harga *R<sub>f</sub>* atau *R<sub>x</sub>*. Jika diperlukan, semprot bercak dengan pereaksi penampak bercak, amati dan bandingkan kromatogram bahan uji dengan kromatogram pembanding (Farmakope Herbal Indonesia, 2008).

### **2.10.1 Alkaloida**

Secara kimia senyawa alkaloida bersifat heterogen dan banyak yang tidak dapat diidentifikasi dalam ekstrak tumbuhan dengan menggunakan kromatografi tunggal. Selain itu kelarutan dan sifat lain alkaloid sangat berbeda-beda, cara penjarangan umum untuk alkaloid dalam tumbuhan mungkin tidak akan bias berhasil mendeteksi senyawa khas. Ekstraksi jaringan kering dengan asam asetat 10% dalam etanol, biarkan sekurang-kurangnya empat jam. Pekatkan ekstrak sampai seperempat volume asal dan endapkan alkaloid dengan meneteskan  $\text{NH}_4\text{OH}$  1%. Larutkan sisa dalam beberapa tetes etanol atau kloroform.

Kromatografi sebagian larutan pada kertas dapar sitrat dalam n-butanol-larutan asam sitrat dalam air. Kromatografi sebagian lain pada plat silica gel G dalam methanol- $\text{NH}_4\text{OH}$  pekat (200:3). Deteksi adanya alkaloid pada kertas dan plat, mula-mula dengan fluoresensi dibawah sinar UV, kemudian menggunakan tiga penyemprot: pereaksi dragendorff, iodoplatinat, dan Marquis (Harborne, 1987).

### **2.10.2 Terpenoid**

Secara kimia, terpenoid umumnya larut dalam lemak dan terdapat didalam sitoplasma sel tumbuhan. Biasanya terpenoid diekstraksi dari jaringan tumbuhan

dengan menggunakan eter minyak bumi, eter atau kloroform, dan dapat dipisahkan secara kromatografi pada silica gel atau alumina menggunakan pelarut diatas. Silica gel merupakan penjerap yang paling banyak digunakan dengan pengembang seperti benzena-kloroform(1:1) dan benzena-etil asetat(19:1). Untuk analisis terpena yang mengandung oksigen(misalnya karvon) lapisan silica gel jangan diaktifkan dulu sebelum digunakan karena air yang ada membantu pemisahan.

Cara umum deteksi ialah menyemprot dengan larutan  $\text{KMnO}_4$  0,2% dalam air, antimony klorida dalam kloroform,  $\text{H}_2\text{SO}_4$  pekat, atau vanillin-  $\text{H}_2\text{SO}_4$ . Pereaksi terakhir dibuat segar dengan menambahkan 8 ml etanol sambil didinginkan kedalam 0,5 g vanillin dalam 2 ml  $\text{H}_2\text{SO}_4$  pekat. Setelah disemprot plat KLT dipanaskan dalam suhu  $100-105^\circ\text{C}$  sampai pembentukan warna sempurna (Harborne, 1987).

### 2.10.3 Flavonoid

Flavonoid mengandung system aromatic yang terkonjugasi dan karena itu menunjukkan pita serapan yang kuat pada daerah spectrum UV dan spectrum tampak. Flavonoid yang terdapat dalam tumbuhan jarang sekali dijumpai hanya flavonoid tunggal, sering terdapat flavonoid campuran. Penggolongan jenis flavonoid dalam jaringan tumbuhan mula-mula didasarkan pada sifat kelarutan dan reaksi warna, kemudian dilanjutkan dengan pemeriksaan ekstrak tumbuhan yang telah dihidrolisis secara kromatografi satu arah, dan pemeriksaan ekstrak etanol secara dua arah (Harborne, 1987).

Sebanyak 3 ml sampel diuapkan, dicuci dengan heksana sampai jernih. Residu dilarutkan dalam 20 ml etanol kemudian disaring. Filtrat dibagi 4 bagian A, B, C dan D. Filtrat A sebagai blangko, filtrat B ditambahkan 0,5 mL HCl pekat kemudian dipanaskan pada penangas air, jika terjadi perubahan warna merah tua sampai ungu menunjukkan hasil yang positif (metode Bate Smith-Metchalf). Filtrat C ditambahkan 0,5 mL HCl dan logam Mg kemudian diamati perubahan warna yang terjadi (metode Wilstater). Warna merah sampai jingga diberikan oleh senyawa flavon, warna merah tua diberikan oleh flavonol atau flavonon, warna hijau sampai biru diberikan oleh aglikon atau glikosida. Filtrat D pada skrining fitokimia ditotolkan pada plat silika gel G60. Dielusi dengan butanol : asam asetat : air = 3:1:1, kemudian dikeringkan dan diamati pada cahaya tampak, UV 254 nm

dan 366 nm. Selanjutnya plat disemprot dengan amonia, dikeringkan dan diamati kembali pada cahaya tampak, UV 254 nm dan 366 nm(Marliana,2005).

#### **2.10.4 Polifenol**

Polifenol adalah asam fenolik dan flavonoid yang banyak ditemukan dalam sayuran, buah-buahan, serta biji-bijian (Faisal Anwar,2009). Polifenol adalah kelompok zat kimia yang ditemukan pada tumbuhan. Zat ini memiliki tanda khas yaitu memiliki banyak gugus phenol dalam molekulnya. Polifenol sering terdapat dalam bentuk glikosida polar dan mudah larut dalam pelarut polar (Hosttetman, dkk, 1985). Beberapa golongan bahan polimer penting dalam tumbuhan seperti lignin, melanin dan tanin adalah senyawa polifenol dan kadang-kadang satuan fenolitik dijumpai pada protein, alkaloid dan terpenoid (Harbone, 1987). Senyawa fenol sangat peka terhadap oksidasi enzim dan mungkin hilang pada proses isolasi akibat kerja enzim fenolase yang terdapat dalam tumbuhan. Ekstraksi senyawa fenol tumbuhan dengan etanol mendidih biasanya mencegah terjadinya oksidasi enzim. Semua senyawa fenol berupa senyawa aromatik sehingga semuanya menunjukkan serapan kuat di daerah spektrum UV. Selain itu secara khas senyawa fenol menunjukkan geseran batokrom pada spektrumnya bila ditambahkan basa. Karena itu cara spektrometri penting terutama untuk identifikasi dan analisis kuantitatif senyawa fenol (Harbone, 1987).

Sebanyak 3 mL sampel diekstraksi akuades panas kemudian didinginkan. Setelah itu ditambahkan 5 tetes NaCl 10% dan disaring. Filtrat dibagi 3 bagian A, B, dan C. Filtrat A digunakan sebagai blangko dan untuk uji KLT, filtrat B ditambahkan 3 tetes pereaksi FeCl<sub>3</sub>, dan ke dalam filtrat C ditambah garam gelatin. Kemudian diamati perubahan yang terjadi. Filtrat A ditotolkan pada fase diam Kiesel Gel 254, kemudian di eluasi dengan fase gerak Kloroform : etil asetat:asam formiat(0,5:9:1 tetes), dan disemprotkan dengan penampak noda FeCl<sub>3</sub>, jika timbul warna hitam menunjukan adanya polifenol dalam sampel(Harborne, 1987; Marliana, 2005).

#### **2.10.5 Antrakuinon**

Kuinon adalah senyawa berwarna dan mempunyai kromofor dasar seperti kromofor pada benzokuinon, yang terdiri atas dua gugus karbonil yang terkonjugasi dengan dua ikatan rangkap karbon-karbonil. KLT merupakan cara umum untuk

memisahkan kuinon, pada saat mengidentifikasi pigmen dari sumber tumbuhan baru harus diingat bahwa antakuinon dalam tumbuhan dalam jumlah sedikit (Harborne, 1987).

Uji antrakuinon dilakukan dengan uji Brontrager dan uji Brontrager termodifikasi. Uji Brontrager dilakukan dengan cara melarutkan 2 mL sampel dengan 10 mL akuades kemudian disaring, filtrat diekstrak dengan 5 mL benzena. Hasil ekstrak dibagi menjadi 2 bagian, A dan B. Filtrat A digunakan sebagai blangko dan filtrat B ditambahkan 5 mL ammonia kemudian dikocok, bila terdapat warna merah berarti hasil positif. Uji Brontrager termodifikasi dilakukan dengan melarutkan 2 mL sampel dengan 10 mL 0,5 N KOH dan 1 mL larutan hidrogen peroksida. Kemudian dipanaskan pada waterbath selama 10 menit, dididihkan dan disaring. Pada filtratnya ditambahkan asam asetat bertetes-tetes sampai pada kertas lakmus menunjukkan asam. Selanjutnya diekstrak dengan 5 mL benzena. Hasil ekstrak dibagi menjadi 2 bagian, A dan B. Larutan A digunakan sebagai blangko, sedangkan larutan B dibuat basa dengan 2-5 mL larutan amonia. Perubahan warna pada lapisan basa diamati. Warna merah atau merah muda menunjukkan adanya antrakuinon (Marliana, 2005).