

PENGARUH PERBEDAAN METODE EKSTRAKSI TERHADAP FINGERPRINT FITOKIMIA HIGH PERFORMANCE THIN LAYER CHROMATOGRAPHY (HPTLC) -GANJA

Ni Luh Putu Vidya Paramita¹⁾ dan I Made agus Gelgel Wirasuta¹⁾

¹⁾ Jurusan Farmasi, Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam, Universitas Udayana, Bukit Jimbaran, Badung, 80363, Indonesia (E-mail : putu.vidya.paramita@gmail.com)

The influence of extraction method on the phytochemical chromatographic fingerprint HPTLC *Cannabis* sp. had been conducted. Cannabinoids of leaves, flower, seed, and stem were extracted by maceration and soxhletation method using petroleum eter, methanol, diethyleter, as solvent. Concentrated extracts were spotted HPTLC Si 60 GF₂₅₄. Plate was eluted with hexane-diethyleter (80:20,v/v) in ascending twin chamber. Each peak was scanned on Camag TLC Scanner III and identification of each in-situ spectra were based on Rf and library spectra. The HPTLC chromatograms were analyzed by using principal component analysis (PCA) and hierarchal cluster analysis (HCA). The aim of this research was to obtain the better extraction method in propose herbal medical standardization and drugs profiling in forensic propose.

The extraction method played importance role on the total chromatographic fingerprint of *Cannabis* sp. This influenced the PCA and HCA results. Maceration *Cannabis* sp with diethyleter introduced highest recovery of cannabinoids. The highest THC contains and the lowest degradation of THC was obtained from seed. There were no significant contains of major cannabinoids between leaves, flowers and stems.

Keywords : cannabinoides, fingerprint, HPTLC, spectrophotodensitometry, extraction

PENDAHULUAN

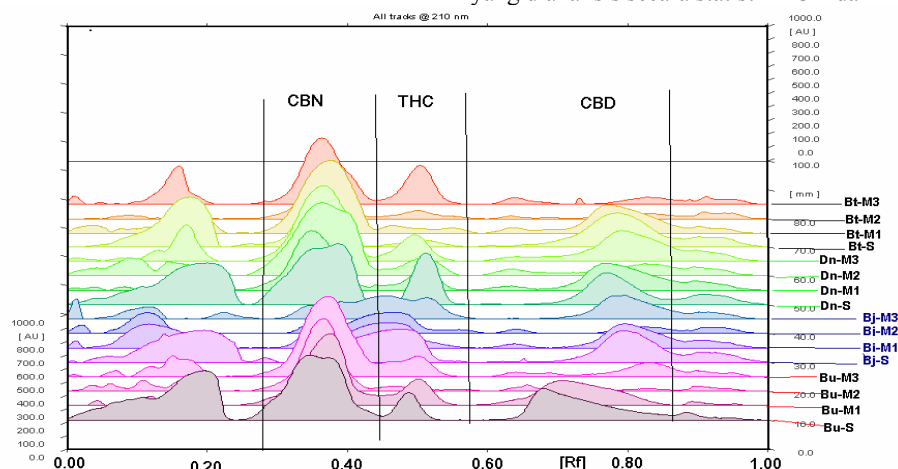
Standarisasi herbal adalah suatu sistem yang menjamin kualitas, kuantitas dan efek terapeutik dari kandungan kimia dari suatu tanaman [1]. Penentuan *fingerprint* kandungan kimia suatu tanaman merupakan salah satu metode untuk menjamin integritas, kesamaan, *fuzziness*, dan perbedaan kandungan kimia dari suatu tanaman [2].

Cannabis sp mengandung cannabinoid utama seperti: cannabiniol (CBN), cannabidiol (CBD), dan Δ^9 -Tetrahydrocannabinol (THC) [3]. Perbedaan sintesis metabolit sekunder pada setiap organ tanaman menyebabkan komposisi kandungan kimianya juga berbeda. Perbedaan metode ekstraksi akan mempengaruhi hasil rendemen kandungan kimia [4]. Sehingga dengan adanya perbedaan metode ekstraksi

dan preparasi sampel akan mempengaruhi hasil *fingerprint* dari suatu tanaman [2].

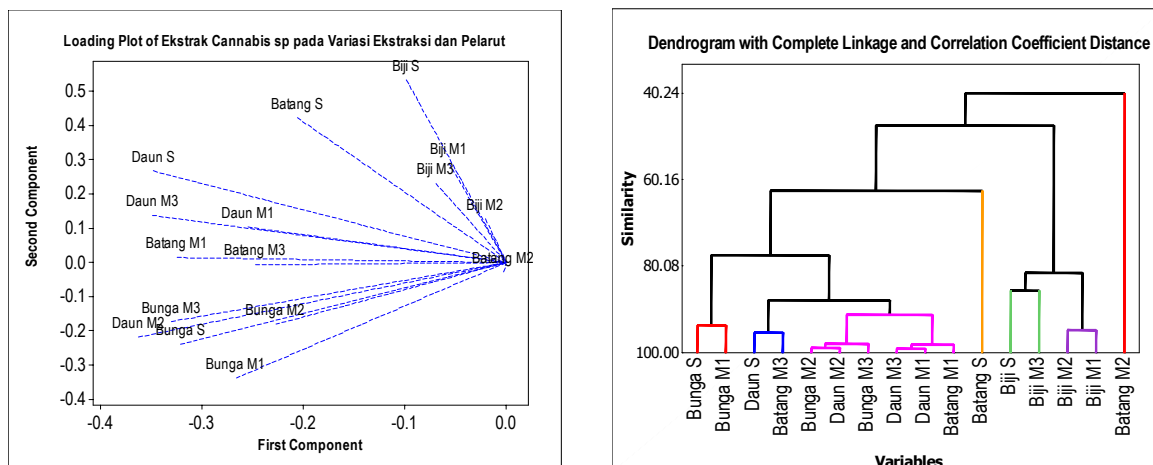
HPTLC dilaporkan digunakan untuk penetapan *fingerprint* metabolit sekunder suatu simplisia untuk tujuan standarisasi dan identifikasi. Deteksi terhadap CBN, CBD dan THC dengan metode HPTLC menggunakan silika gel sebagai fase diam, heksan-dietil eter (80 :20, v/v) sebagai fase gerak dan garam Fast Blue B sebagai pereaksi penampak noda [5].

Analisis multivariat mampu menyederhanakan variasi data peak yang kompleks dan bersifat selektif pada setiap tanaman [2]. Melalui artikel ini akan dibahas mengenai pengaruh metode ekstraksi terhadap *fingerprint* fitokimia HPTLC tanaman *Cannabis* Sp. yang dianalisis secara statistik PCA dan HCA.



Gambar 1. Kromatogram Simplisia Bunga, Biji, Daun, dan Batang *Cannabis* Sp. pada Variasi Metode Ekstraksi dan Cairan Penyari.

Keterangan: Bu=Bunga, Bj=Biji, Dn=Daun, Bt=Batang, S=Sokletasi-Petroleum Eter, M1=Maserasi-Metanol, M2=Maserasi-Petroleum Eter, M3=Maserasi-Eter.



Gambar 2.: Loading plots PCA dan Dendrogram HCA-Complete Linkage berdasarkan seluruh puncak kromatogram *fingerpint* HPTLC dari Simplisia Bunga, Biji, Daun, dan Batang *Cannabis* sp. dengan Variasi Metode Ekstraksi dan Pelarut Penyari.

Keterangan: Bu=Bunga, Bj=Biji, Dn=Daun, Bt=Batang, S=Sokletasi-Petroleum Eter, M1=Maserasi-Metanol, M2=Maserasi-Petroleum Eter, M3=Maserasi-Eter

MATERI DAN METODE

Bahan kimia yang digunakan adalah: Pelarut penyari kualitas teknis: petroleum eter, toluen, eter, dan metanol, pelarut dan bahan kimia analisis perkualitas pro analisis: heksan, dietil ether, penampak noda Fast Blue B, aquadest dan plat HPTLC Si G 60 F₂₅₄ (Merck-Darmstadt-Germany). *Cannabis* sp (bunga, biji, daun, dan batang) didapatkan dari Laboratorium Kimia Forensik Mabes Polri Cabang Denpasar.

Alat yang digunakan adalah alat-alat gelas, timbangan analitik, seperangkat alat sokhlet, rotary vacuum evaporator, tabung eppendorf, Camag- twin chamber), oven (Mettler), nanomat IV, TLC-Scanner 3 (Camag-Muttenz-witzerland), alat sentrifugasi (Mikro centrifuge-Clements), alat soxhletasi dan alat penyemprot (TLC sprayer Camag Muttenz-Switzerland).

METODE PENELITIAN

Maserasi

Diambil 500 mg sampel dimasukkan ke dalam erlenmeyer yang berbeda lalu ditambahkan 15 ml pelarut penyari ditutup dengan Plastik wrap. Maserasi selama 24 jam, kemudian ekstrak disaring dengan menggunakan corong gelas dan kertas saring. Ekstrak diuapkan dengan menggunakan alat evaporator pada suhu 50°C. Ekstrak kental ditambahkan 1 ml toluen, ekstrak dilarutkan dengan pengocok ultrasonic [4].

Proses Soxhletasi Simplisia

Diambil 500 mg sampel dibungkus dengan kertas saring lalu dimasukkan ke dalam tabung soxhlet dan ditambahkan pelarut petroleum eter ke dalam labu (volume pelarut yang ditambahkan adalah sejumlah 2x labu). Alat soxhlet dihidupkan dan diatur suhu pada

40°C. Sampel diekstraksi hingga 5-6 kali putaran aliran pelarut. Ekstrak yang diperoleh ditampung di dalam erlenmeyer kemudian disaring menggunakan corong gelas dan kertas saring. Ekstrak kemudian diuapkan dengan alat evaporator pada suhu 50°C hingga pelarutnya menguap semua. Ekstrak kental yang diperoleh kemudian ditambahkan 1 mL toluen pa. [4].

Proses identifikasi dengan Metode HPTLC – Spektrodensitometri.

Masing-masing ditotolkan sebanyak 3 µl ekstrak dalam toluen menggunakan pipet kapiler dengan nanomat. Plat elusi menggunakan sistem heksan-dietil eter (80 :20, v/v) pada jarak elusi 9 cm, di dalam twin chamber yang telah dijenuhkan selama 30 menit. Plat kemudian dikeringkan di dalam oven pada suhu 60 °C selama 5 menit. Kromatogram masing-masing ekstrak dipindai dengan TLC-Scanner pada 210 nm. Spektrum insitu masing-masing puncak kromatogram dirajah pada rentang panjang gelombang 190 - 400 nm. Plat yang telah dirajah disemprot dengan penampak noda Fast Blue B. Reagen tersebut akan memberikan warna Orange-merah untuk CBD, Violet untuk CBN dan ungu untuk THC. Identifikasi dan konfirmasi cannabinoide menggunakan kombinasi software WinCATS dan reaksi warna [6,7].

Analisis Multivariat

Analisis multivariat didasarkan pada analisis statistik multivariat yang dimana variabel dependen adalah data *fingerpint* dan variabel independen adalah variasi metode ekstraksi dan cairan penyari yang digunakan dalam proses ekstraksi. Salah satu teknik analisis multivariat adalah HCA dan PCA [8].

HASIL DAN PEMBAHASAN

Kromatogram *Cannabis sp.* pada variasi metode ekstraksi dan pelarut penyari ditampilkan pada gambar 1. Hasil analisis statistik multivariat dengan PCA dan HCA dari semua kromatogram ditampilkan pada gambar 2. Secara visual setiap ekstrak memberikan profil kromatogram yang berbeda, terutama pada pola *fingerprint* CBN, THC, dan CBD dari 4 bagian tanamaman *Cannabis sp.* Perbedaan metode ekstraksi dan pelarut penyari mengakibatkan perbedaan jumlah CBN, THC, dan CBD.

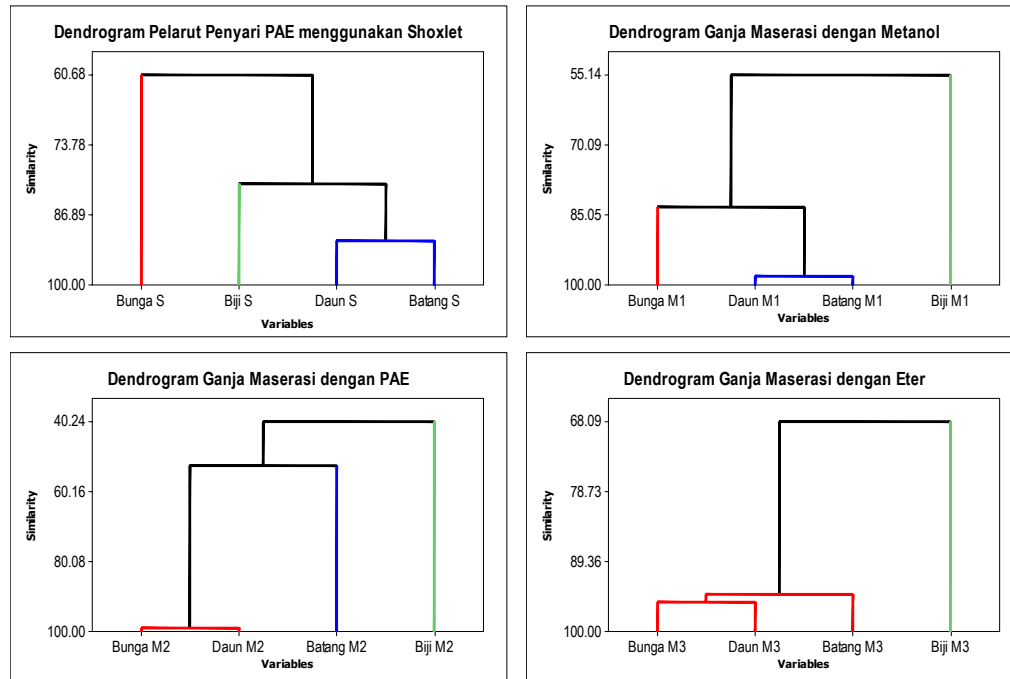
Analisis kluster dengan tingkat kemiripan 80% kromatogram HPTLC sampel dikelompokkan menjadi 7 kelompok (Gambar 2, kelompok ditunjukkan pada dendrogram dengan warna yang berbeda pada). Kemiripan pola kromatogram HPTLC dijadikan dasar pengelompokan dalam analisis statistik multivariat (PCA dan HCA). Dendrogram kromatogram yang memiliki kedekatan pola (sidik jari) kromatogram yang sama (similarity>80%) akan ditempatkan pada kluster yang sama.

Bunga, biji, batang dan daun ganja sebelum diekstraksi telah dihomogenkan, sehingga secara logika keempat jenis sampel ini memiliki kandungan kimia yang sama. Ekstrak Bunga S dan Bunga M1 berada pada satu kluster, namun Bunga M2 dan M3 berada pada kluster

ke 3. Hal yang sama juga diamati pada ekstrak biji, batang dan daun. Hal ini menunjukkan metode ekstraksi dan pelarut penyari yang berbeda mengakibatkan perbedaan profil *fingerprint* kromatografi simplisia.

Gambar 3 menampilkan dendrogram dari *Cannabis sp* pada variasi metode ekstraksi dan pelarut penyari. Produksi cannabinoid pada berbagai bagian tanaman *Cannabis sp* adalah berbeda [10]. Hal ini akan memberikan perbedaan *fingerprint* HPTLC *Cannabis sp*. Pelarut PAE (petroleum eter) dengan metode penyari *shoxlet* dan maserasi memberikan profil *fingerprint* kromatogram yang berbeda. Perbedaan ini dapat diakibatkan oleh sifat fisika cannabinoid yang mudah menguap. THC, CBD dan CBN memiliki titik uap yang berbeda penyarian dengan *shoxlet* pada suhu tinggi dengan waktu yang lama memungkinkan lebih besar terjadi kehilangan cannabinoid jika dibandingkan dengan maserasi.

Penyarian *Cannabis sp* menggunakan teknik maserasi dengan pelarut yang berbeda juga memberikan perbedaan profil *fingerprint* HPTLC (Gambar 3). Perbedaan kelarutan cannabinoid pada pelarut penyari menyebabkan perbedaan perolehan kembali dan jenis metamolit sekunder yang tersari (Gambar 4 dan tabel 1). Hal ini mengakibatkan perbedaan profile kromatogram *fingerprint* HPTLC sampel.



Gambar 3. Dendrogram *Cannabis sp* berdasarkan total fingerprint HPTLC dengan Variasi Metode Ekstraksi dan Pelarut Penyari

Keterangan: Bu=Bunga, Bj=Biji, Dn=Daun, Bt=Batang, S=Sokletasi-Petroleum Eter, M1=Maserasi-Metanol, M2=Maserasi-Petroleum Eter, M3=Maserasi-Eter

Tabel 1. Total Perolehan kembali Cannabinoid pada Variasi Metode Ekstraksi dan Pelarut Penyari.

Total AUC Cannabinoid pada jenis organ <i>Cannabis</i> sp				
Cannabinoid	Bunga	Biji	Daun	Batang
CBN	139.297	20.976	146.765	85.976
THC	19.783	62.180	37.746	16.294
CBD	2.301	2.043	4.673	3.884
Ratio AUC (CBN + THC)/CBD	69,14	40,70	39,49	26,33
Total AUC Cannabinoid pada variasi metode ekstraksi				
Cannabinoid	Shoxlet	Maserasi		
		Metanol	PAE	Eter
CBN	98.114	103.231	78.754	112.916
THC	45.098	35.371	21.220	34.314
CBD	745	3.508	4.575	4.074
Total AUC (CBN + THC+CBD)	143,956	142,110	104,549	151,304

Kandungan CBN tertinggi ditemukan di daun. CBN adalah hasil urai dari THC [4]. Umumnya THC diproduksi di seluruh bagian tanaman ganja namun produksi terbanyak di daun. Penguraian THC menjadi CBN ditentukan oleh faktor waktu panen dan pasca penyimpanan. THC ditemukan paling banyak di biji dan sebaliknya kandungan CBN yang terendah. Hal ini menunjukkan laju urai THC menjadi CBN paling rendah di biji.

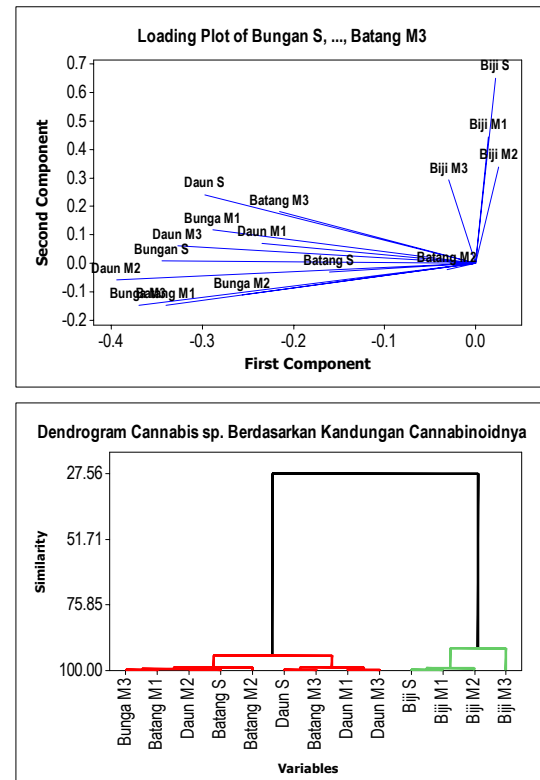
Ekstraksi menggunakan shoxlet dengan pelarut PAE memberikan rendamen perolehan THC dibandingkan dengan metode maserasi. Namun ekstraksi dengan shoxlet juga memungkinkan memberikan kehilangan cannabinoid karena faktor penguapan pada suhu yang tinggi (titik didih PAE) selama proses ekstraksi. Ekstraksi dengan maserasi menggunakan pelarut eter memberikan rendamen total cannabinoid tertinggi. Lipofilitas dietileter yang tinggi mampu melarutkan cannabinoid yang lebih banyak dan titik uap yang paling rendah mampu mencegah kehilangan cannabinoid selama proses ekstraksi.

Pengelompokan ekstrak / bagian ganja berdasarkan kandungan cannabinoid mayornya ditampilkan pada gambar 4. Bunga, daun, dan batang menjadi satu kelompok, namun biji menjadi kelompok tersendiri. Analisa statistik multivarian (PCA dan HCA) memberikan gambaran, bahwa metode ekstraksi tidak berpengaruh secara signifikan terhadap profil kromatogram HPTLC kandungan cannabinoid mayornya.

Standarisasi dan identifikasi fingerprint suatu simplisia umumnya mempertimbangkan semua kandungan kimia metabolit sekundernya [1, 2]. Dalam analisis profiling ganja untuk tujuan perunut sumber dan jalur peredaran ganja sebaiknya menggunakan profile fingerprint total kromatogram. Total kromatogram adalah gambaran total kandungan antara metabolit mayor dan minor dari ganja. Gambaran profile

fingerprint total kromatogram dapat memberikan gambaran yang menyeluruh dari ganja sitaan tersebut.

Perbedaan komposisi kandungan cannabinoid mayor dapat memberikan gambaran sumber asal simplisia [11], sedangkan ratio persentase THC terhadap persentase CBD digunakan untuk menentukan fenotip dari *Cannabis* [12, 13].



Gambar 4. Pengelompokan ekstrak / bagian ganja berdasarkan kandungan cannabinoidnya menggunakan analisa PCA dan HCA

KESIMPULAN

Berdasarkan hasil penelitian, metode ekstraksi sangat mempengaruhi pola *fingerprint* kandungan kimia suatu simplisia. Analisis multivariat mampu digunakan untuk menganalisis secara langsung kesamaan kromatogram atau kemiripan kandungan kimia akibat perbedaan metode ekstraksi.

DAFTAR PUSTAKA

- [1] Choudhary. N. and Sekhon. B.S.. 2011. An overview of advances in the standardization of herbal drugs. *J Pharm Educ Res.* 2(2): 55-70
- [2] Liang. Y.. Xie. P.. and Chan. K.. 2004. Quality control of herbal medicines. *J. Cromatogr B.* 812: 53-70
- [3] Moffat. A.C.. et all. Clarke's Analysis Drugs and Poison. 3rd Edition. London: Pharmeceutical Prees. 2004. p. 740-1.
- [4] Astuti. K.W.. 2012. Pengaruh Metode Ekstraksi Terhadap Perolehan Kembali Cannabinoid Dari

- Daun Ganja. Indonesian Journal of Legal and Forensic Sciences 2012; 2(1): 21-23
- [5] Antonilli. A. Analysis of Cocaethylene, Benzoylecgonine and Cocaine in Human Urine by High-Performance Liquid Chromatography with Ultraviolet detection : A Comparison with high-performance liquid chromatography. J. Chromatogr. B 2001; (751): p. 19-27
- [7] Susanti. N.M.P.. Identifikasi Kandungan Cannabinoid Dalam Ekstrak Batang Ganja Dengan Metode Al-TLC Dan HPTLC Spectrophotodensitometry. Indonesian Journal Of Legal And Forensic Sciences 2012; 2(1): 17-20
- [8] Galland. N. et al.. (2004). Separation and Identification of cannabis Components by Difference Planar Chromatography Technique (TLC. AMD. OPLC). Journal of Chromatographic Science.
- [9] Santoso. S.. 2010. *Analisis Multivariat. Konsep Dan Aplikasi Dengan SPSS*. Jakarta: Elex Media Computindo. P. 117
- [10] Tindall. et. al.. (2005). Cannabis: Methods of Forensic Analysis. in Handbook of Forensic Drug Analysis. Elsevier Academic Press.
- [11] Davis T. W. M., C. G. Farmilo, Miroslaw, Osadchuk, (1963), Identification and Origin Determinations of Cannabis by Gas and Paper Chromatography. Anal. Chem., 1963, 35 (6), pp 751-755
- [12] Small, E., H. D. Beckstead, and A. Chan. (1975). The evolution of cannabinoid phenotypes in *Cannabis*. *Economic Botany* 29: 219-232.
- [13] Small E. and H.D. Beckstead, (1973). Common cannabinoid phenotypes in 350 stocks of *Cannabis*. *Lloydia* 36: 144-165.