

Optimasi Sistem GC-MS dalam Analisis Minyak Atsiri Daun Sirih Hijau (*Piper betle L.*)

* I M.A. G. Wirasuta, I.Y.J. Wage, C.I.T.R. Dewi, N.M.N.P. Dewi, N.K.A. Julianty, I G.L.B. Wirajaya, N.M.W. Astuti

Program Studi Farmasi, FMIPA, Universitas Udayana

*Email: gelgel.wirasuta@unud.ac.id

ABSTRAK

Minyak atsiri daun sirih (*Piper betle L.*) memiliki potensi untuk dikembangkan sebagai bahan obat. Standarisasi mutu minyak atsiri daun sirih dapat dilakukan menggunakan metode kromatografi gas. Metode ini harus dapat menjamin pemisahan komponen yang ada pada sampel. Hasil studi literatur diperoleh 6 metode kromatografi gas dengan laju alir dan laju peningkatan suhu kolom yang berbeda. Hasil pemisahan minyak atsiri daun sirih dari ke-6 metode ini dibandingkan dengan melihat parameter kromatografinya. Faktor lain yang dibandingkan adalah identitas MS dari masing-masing puncak yang muncul pada setiap kromatogram. Hasil perbandingan menunjukkan bahwa metode 4 memberikan hasil pemisahan yang paling baik karena memberikan jumlah parameter kromatografi yang paling banyak memenuhi persyaratan pemisahan. Metode 4 juga mampu memberikan satu identitas senyawa untuk setiap puncaknya. Metode 4 ini dilakukan dengan laju alir 1 mL/menit dan suhu kolom 60°C sistem 60°C ditahan 5 menit lalu dinaikkan 4°C/menit hingga 220°C ditahan 20 menit.

Kata kunci : Minyak atsiri, Sirih (*Piper betle L.*), GC-MS, Optimasi

ABSTRACT

Essential oil of betel leaf (Piper betle L.) has the potential to be developed as a drug substance. Standardization of the quality of essential oil of betel leaf can be done using methods kromatografi gas. This method should be able to guarantee the separation of components in a sample. The results of the study of literature obtained 6 gas chromatography with a flow rate and the rate of temperature increase in a different column. The result of the separation of betel leaf essential oil from all 6 of this method compared to seeing kromatografinya parameter. Another factor is that compared MS identity of each peak that appears on each chromatogram. The comparison shows that the method 4 provides the results of the separation of the most good because it gives the number of chromatographic parameters that most meets the requirements of separation. Method 4 is also able to provide the identity of the compound for each peak. Method 4 is

carried out at a flow rate of 1 mL / min and column temperature of 60 ° C the system 60 ° C arrested 5 minutes then raised 4 ° C / min to 220 ° C on hold 20 minutes.

Keywords: *Essential oils, Betel (Piper betle L.), GC-MS, Optimization*

I. PENDAHULUAN

Minyak atsiri daun sirih (*Piper betle* L.) berpotensi tinggi untuk dikembangkan sebagai bahan obat anti kandidiasis karena memiliki aktivitas antijamur (Saxena *et al.*, 2014). Hal ini mendukung penggunaan ekstrak daun sirih secara tradisional sebagai obat kumur dan pembersih daerah kewanitaan (Ladion, 2009; Moeljanto dan Mulyono, 2003). Senyawa aktif yang diduga sebagai bahan aktif sediaan tersebut adalah senyawa turunan eugenol seperti kavikol dan kavibetol (Saxena *et al.*, 2014). Standarisasi kualitas minyak atsiri dapat dilakukan dengan menggunakan kromatografi sidik jari, salah satunya dengan metode kromatografi gas. Metode kromatografi gas yang digunakan harus dapat menjamin pemisahan berbagai komponen yang ada di dalam minyak atsiri daun sirih sehingga dapat secara jelas menentukan komponen yang berperan sebagai sidik jari (Giri *et al.*, 2010).

Hasil studi literatur menunjukkan terdapat 6 metode GC-MS untuk analisis kandungan kimia minyak atsiri antara lain yang dilakukan oleh Misra *et al.*, 2009, Prakash *et al.*, 2010, Wongsariya *et al.*,

2015, Mohottalage *et al.*, 2007, Utpala *et al.*, 2014 dan Said *et al.*, 2013. 6 metode ini memiliki pengaturan metode kromatografi yang berbeda dalam hal laju alir dan peningkatan suhu kolom. Pemilihan metode kromatografi gas yang tepat untuk digunakan dalam penentuan sidik jari sampel minyak atsiri daun sirih dapat ditentukan dengan menggunakan perbandingan parameter kromatografi yang dihasilkan dari masing-masing metode. Tujuan penelitian ini adalah menentukan metode dengan laju alir dan suhu sistem GC-MS yang paling baik untuk memisahkan komponen-komponen penyusun dalam minyak atsiri daun sirih hijau (*Piper betle* L.) yang dievaluasi menggunakan parameter kromatografi dan perkiraan identitas senyawa berdasarkan spektrum massanya

II. METODE PENELITIAN

A. Alat dan Bahan

Alat-alat yang digunakan dalam penelitian ini antara lain perangkat destilasi (Iwaki Pyrex), corong pisah (Iwaki Pyrex), alat sentrifugasi (K Centrifuge PLC Series) instrumen GC-MS (Agilent Technologies).

Bahan-bahan yang digunakan dalam penelitian ini antara lain daun sirih hijau, akuades (Brataco), NaCl (Brataco), Na₂SO₄ (Brataco) dan metanol (Merck-Germany).

B. Metode

1. Isolasi Minyak Atsiri

Satu kg sampel daun sirih hijau didestilasi dengan air selama 5 jam dengan suhu destilasi 100°C. Destilat diekstraksi cair-cair dengan penambahan NaCl. Fase minyak ditambahkan Na₂SO₄ anhidrat lalu disentrifugasi dengan kecepatan 4000 rpm selama 10 menit.

2. Analisis GC-MS

Minyak atsiri dari daun sirih diambil 10 µL lalu dilarutkan ke dalam 240 µL metanol. Larutan tersebut kemudian diinjeksikan ke dalam sistem GC-MS sebanyak 1 µL.

- a. Laju alir 1 mL/menit dan suhu kolom 70°C ditahan 2 menit lalu dinaikkan 3°C/menit hingga 250°C yang ditahan 2 menit (Misra *et al.*, 2009).
- b. Laju alir 1 mL/menit dan suhu kolom 70°C ditahan 2 menit lalu dinaikkan 37°C/menit hingga 250°C yang ditahan 10 menit (Prakash *et al.*, 2010).
- c. Laju alir 0,68 mL/menit dan suhu kolom 60°C ditahan 5 menit lalu

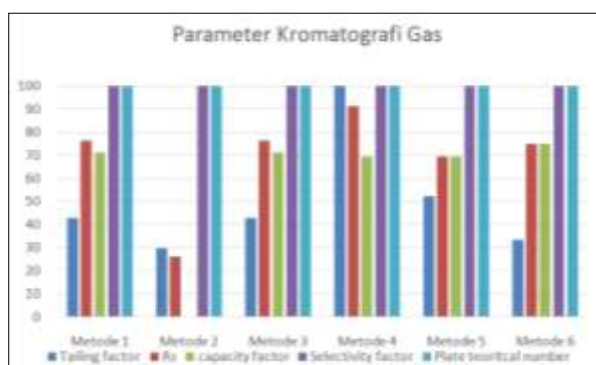
dinaikkan 3°C/menit hingga 200°C (Wongsariya *et al.*, 2015).

- d. Laju alir 1 mL/menit dan suhu kolom 60°C sistem 60°C ditahan 5 menit lalu dinaikkan 4°C/menit hingga 220°C ditahan 20 menit (Mohottalage *et al.*, 2007).
- e. Laju alir 1 mL/menit dan suhu kolom 70°C ditahan 5 menit lalu dinaikkan 5°C/menit hingga 110°C ditahan 5 menit, lalu dinaikkan 3°C/menit hingga 200°C ditahan 5 menit, lalu dinaikkan 5°C/menit hingga 220°C ditahan 5 menit (Utpala *et al.*, 2014).
- f. Laju alir 1,2 mL/menit dan suhu kolom 75°C ditahan 5 menit lalu dinaikkan 5°C/menit hingga 250°C ditahan 10 menit (Said *et al.*, 2013).

III. HASIL DAN PEMBAHASAN

Hasil yang diperoleh dari proses destilasi dan ekstraksi cair-cair adalah terbentuknya dua fase yaitu fase air dan fase minyak yang berwarna kuning transparan. Hasil analisis minyak atsiri masing-masing metode berbeda satu dengan lainnya. Perhitungan parameter kromatografi dilakukan untuk mengevaluasi metode yang memberikan hasil pemisahan yang paling baik. Parameter yang dihitung antara lain tailing factor (τ) yang menyatakan simetrisitas

puncak dengan syarat berada pada rentang 0,9-1,4, resolusi (R_s) yang menyatakan keterpisahan antara dua puncak dengan syarat lebih besar dari 1,5, faktor kapasitas (k) yang menyatakan laju migrasi analit dalam kolom dengan syarat berada pada rentang 1-10, faktor selektivitas (α) yang menyatakan tingkat pemisahan analit dalam kolom dengan syarat α yaitu lebih besar dari 1 dan jumlah lempeng teoritis (N) yang menyatakan efisiensi kolom dengan syarat nilai yang semakin besar menandakan peningkatan efisiensi (Ahuja dan Dong, 2005).



Gambar 1. Perbandingan persentase parameter kromatografi setiap metode

Hasil perhitungan parameter kromatografi ditransformasikan ke dalam bentuk persentase sesuai dengan jumlah puncak yang terdeteksi yaitu 21 puncak untuk metode 1, 27 puncak untuk metode 2, 21 puncak untuk metode 3, 23 untuk metode 4, 23 puncak untuk metode 5 dan 24 puncak untuk metode 6. Hasil

perbandingan antara ke enam metode tersebut ditunjukkan pada Gambar 1. Persentase puncak yang memenuhi syarat parameter τ dan R_s paling tinggi ada pada metode 4. Persentase puncak yang memenuhi syarat parameter k paling tinggi ada pada metode 1, akan tetapi jumlah ini hampir mirip untuk seluruh metode. Dan seluruh puncak dari seluruh metode memenuhi persyaratan untuk parameter α dan N .

Faktor pendukung lainnya yang dapat digunakan untuk evaluasi pemisahan adalah identitas MS dari masing-masing puncak yang muncul pada setiap kromatogram. Identitas MS ditandai sebagai puncak tertinggi pertama, kedua dan ketiga atau yang dikenal sebagai *parent peak*. Metode 1, 3, 4 dan 5 mampu memberikan satu puncak dengan satu identitas senyawa. Puncak 7, 8 dan 9, puncak 11 dan 12, puncak 14 dan 15 serta puncak 24, 25, 26 dan 27 dari metode 2 terdeteksi sebagai senyawa yang sama. Hal yang serupa juga diperoleh metode 6. Pembacaan puncak-puncak tersebut sebagai senyawa yang sama disebabkan karena kemiripan spektrum MS dari puncak-puncak tersebut.

Laju peningkatan suhu kolom pada oven berpengaruh pada waktu analisis (*running time*). Metode 2 dengan laju peningkatan suhu oven adalah 37°C/menit

memberikan *running time* selama 6,86 menit, sedangkan metode 5 dengan laju peningkatan suhu 3°C/menit memberikan *running time* selama 32, 75 menit. *Running time* berpengaruh pada daya pisah dari setiap senyawa (lihat Tabel 1). Metode 4 memberikan daya pisah yang paling baik dari semua metode yang dicoba. Metode 4 juga memberikan jumlah

parameter kromatografi yang paling dan banyak memenuhi persyaratan pemisahan analisis. Berdasarkan data tersebut metode 4 adalah metode yang paling baik untuk digunakan dalam penetapan sidikjari kromatografi gas minyak atsiri daun sirih.

Tabel 1. Waktu Retensi dan Daftar Pendugaan Senyawa Berdasarkan Spektrum Massa

No.	Metode 1		Metode 2		Metode 3	
	Rt (min)		Rt (min)		Rt (min)	
1.	4.33	α Pinene	4.18	β Ocimene	6.24	α Pinene
2.	4.66	Camphene	4.27	Terpinene	6.77	Camphene
3.	5.20	α Phellandrene	4.45	Sabinene hydrate	7.75	α Phellandrene
4.	6.31	Bicyclo 4.1,0 heptane 3,7,7 trimethyl	4.50	1,6-Octadien-3-ol, 3,7-dimethyl-	9.55	Bicyclo 4.1,0 heptane 3,7,7 trimethyl
5.	6.68	β Phellandrene	4.95	Terpineol	10.08	β Phellandrene
6.	7.58	Terpinene	5.05	Anisole, p-allyl-	11.46	Terpinene
7.	11.87	Terpineol	5.31	Chavicol	17.02	Terpineol
8.	15.32	Chavicol	5.38	Chavicol	21.13	Chavicol
9.	18.76	Isoeugenol	5.47	Chavicol	24.78	Isoeugenol
10.	20.02	Eugenol	5.68	Isoeugenol	26.10	Eugenol
11.	20.56	β Elemene	5.75	Eugenol	26.63	β Elemene
12.	21.60	Caryophyllene	5.83	Eugenol	27.69	Caryophyllene
13.	22.94	Humulene	5.89	β Elemene	29.09	Humulene
14.	23.90	α Amorphene	6.03	Caryophyllene	30.10	α Amorphene
15.	24.05	Germacrene	6.06	Caryophyllene	30.24	Germacrene
16.	24.25	γ Selinene	6.16	Humulene	30.44	γ Selinene
17.	24.61	α Selinene	6.21	α Amorphene	30.81	α Selinene
18.	25.45	α Panasinsen	6.25	Germacrene	31.67	α Panasinsen
19.	25.73	δ Amorphene	6.28	γ Selinene	31.97	δ Amorphene
20.	26.19	α Patchoulene	6.30	α Selinene	32.45	α Patchoulene
21.	30.53	Allylpyrocatechol 3,4-diacetate	6.34	α Patchoulene	36.89	Allylpyrocatechol 3,4-diacetate
22.			6.39	α Panasinsen		
23.			6.63	4-hydroxy-6-methoxycoumarin		
24.			6.73	Allylpyrocatechol 3,4-diacetate		
25.			6.79	Allylpyrocatechol 3,4-diacetate		
26.			6.83	Allylpyrocatechol 3,4-diacetate		
27.			6.86	Allylpyrocatechol 3,4-diacetate		

Tabel 1 (Lanjutan). Waktu Retensi dan Daftar Pendugaan Senyawa Berdasarkan Spektrum Massa

	Metode 4		Metode 5		Metode 6	
1.	Rt (min)		Rt (min)		Rt (min)	
2.	6.21	α Pinene	4.58	α Pinene	4.32	Camphene
3.	6.72	Camphene	5.00	Camphene	4.90	α Phellandrene
4.	7.64	α Phellandrene	5.70	α Phellandrene	5.32	β Pinene
5.	8.32	β Pinene	6.20	β Pinene	6.12	Bicyclo 4.1,0 heptane 3,7,7 trimethyl
6.	9.25	Bicyclo 4.1,0 heptane 3,7,7 trimethyl	7.03	Bicyclo 4.1,0 heptane 3,7,7 trimethyl	6.51	β Phellandrene
7.	9.72	β Phellandrene	7.43	β Phellandrene	7.42	Terpinene
8.	9.80	Eucalyptol	8.40	Terpinene	8.75	1,6-Octadien-3-ol, 3,7-dimethyl-
9.	10.90	Terpinene	12.25	Terpineol	11.21	Terpineol
10.	15.46	Terpineol	12.96	Eucalyptol	11.89	Eucalyptol
11.	18.63	Chavicol	15.14	Chavicol	13.78	Chavicol
12.	21.47	Isoeugenol	19.17	Isoeugenol	16.17	Isoeugenol
13.	22.50	Eugenol	20.76	Eugenol	17.03	Eugenol
14.	22.92	β Elemene	21.41	β Elemene	17.40	β Elemene
15.	23.77	Caryophyllene	22.66	Caryophyllene	18.11	Caryophyllene
16.	24.84	Humulene	24.25	Humulene	18.98	Humulene
17.	25.57	α Amorphene	25.38	α Amorphene	19.56	α Amorphene
18.	25.70	Germacrene	25.54	Germacrene	19.68	Germacrene
19.	25.87	γ Selinene	25.77	γ Selinene	19.82	γ Selinene
20.	26.14	α Selinene	26.18	α Selinene	20.04	α Selinene
21.	26.80	α Panasinsen	27.13	α Panasinsen	20.58	α Panasinsen
22.	26.98	δ Amorphene	27.47	δ Amorphene	20.71	δ Amorphene
23.	27.29	α Patchoulene	28.02	α Patchoulene	20.93	α Patchoulene
24.	30.64	Allylpyrocatechol 3,4-diacetate	32.75	Allylpyrocatechol 3,4-diacetate	23.62	Allylpyrocatechol 3,4-diacetate
					23.84	Allylpyrocatechol 3,4-diacetate
25.						
26.						
27.						

IV. KESIMPULAN

Metode GC-MS yang memberikan hasil yang paling optimal adalah metode 4 dengan laju alir 1 mL/menit dan suhu kolom 60°C sistem 60°C ditahan 5 menit lalu dinaikkan 4°C/menit hingga 220°C ditahan 20 menit.

DAFTAR PUSTAKA

- Ahuja, S. dan M. W. Dong. 2005. *Handbook of Pharmaceutical Analysis by HPLC* Vol. 7. New York: Elsevier Inc.
- Giri, L., H. C. Andola, V. K. Purohit, M. S. M. Rawat, R. S. Rawal dan I. D. Bhatt. 2010. Chromatographic and Spectral Fingerprinting Standarization of Traditional Medicines: An Overview as Modern Tools. *Research Journal of Phytochemistry* Vol. 4.
- Ladion, H. de Guzman. 2009. *Tanaman Obat Penyembuh Ajaib*. Bandung: Indonesia Publishing House.
- Misra, P., A. Kumar, P. Khare, S. Gupta, N. Kumar, dan A. Dube. 2009. Pro-

- Apoptotic Effect of The Landrace Bangla Mahoba of *Piper betle* on *Leishmania donovani* May Due to The High Content Of Eugenol. *Journal of Medicinal Microbiology*. Vol. 58.
- Moeljanto, R. D. dan Mulyono. 2003. *Khasiat & Manfaat Daun Sirih: Obat Mujarab dari Masa ke Masa*. Jakarta: Penerbit AgroMedia Pustaka.
- Mohottalage, S., R. Tabacchi, dan P. M. Guerin. 2007. Components from Sri Lankan *Piper betle* L. Leaf Oil and Their Analogues Showing Toxicity Against The Housefly, *Musca domestica*. *Flavour and Fragrance Journal*. Vol. 22.
- Said, S. M., F. A. A. Majid, W. A. W. Mustapha, dan I. Jantan. 2013. Anti-Inflammatory Activity of Selected Edible Herbs and Spices on Cultured Human Gingival Fibroblasts. *The Open Conference Proceedings Journal*. Vol. 4.
- Saxena, M., N. K. Khare, P. Saxena, K. V. Syamsundar dan S. K. Srivastava. 2014. Antimicrobial Activity and Chemical Composition of Leaf Oil in Two Varieties of *Piper betle* from Northern Plains of India. *Journal of Scientific and Industrial Research*. Vol. 73.
- Prakash, B., R. Shukla, P. Singh, A. Kumar, P. K. Mishra dan N. K. Dubey. 2010. Efficacy of Chemically Characterized *Piper betle* L. Essential Oil Against Fungal and Aflatoxin Contamination of Some Edible Commodities and Its Antioxidant Activity. *International Journal of Food Microbiology*. Vol. 142.
- Utpala, P., G. R. Asish, K. V. Saji, J. K. George, N. K. Leela, dan P. A. Mathew. 2014. Diversity Study of Leaf Volatile Oil Constituent of Piper Species Based on GC/MS and Spatial Distribution. *Journal of Spices and Aromatic Crops*. Vol. 23. No. 1.
- Wongsariya, K., P. Lomarat, N. Bunyapraphatsara, V. Srisukh, dan M. T. Chomnawang. 2014. Evaluation of Thai Spice Essential Oil and Their Active Compounds for Anti-Cariogenic Activity and Mechanism of Action. *Journal of Essential Oil Bearing Plants*. Vol. 17.