

**REVIEW: PENGEMBANGAN METODE EKSTRAKSI SENYAWA AZADIRAKTIN
DAN ANALISIS MENGGUNAKAN KROMATOGRAFI CAIR KINERJA TINGGI
(KCKT)**

Handrian Ramoko, Zelika Mega Ramadhania
Fakultas Farmasi Universitas Padjadjaran
Jln. Raya Bandung Sumedang Km 21 Jatinangor 45363
bayernaan@gmail.com

ABSTRAK

Tanaman mimba telah diketahui dengan sifat uniknya dalam mengobati penyakit dan berperan sebagai antiskabies. Diantara senyawa limonoid lain yang ada pada tanaman mimba, azadiraktin merupakan komponen utama yang berperan sebagai antiskabies. Azadiraktin merupakan senyawa triterpenoid limonoid yang didapatkan dari bagian tanaman mimba. Telah dilakukan banyak pengembangan metode ekstraksi senyawa azadiraktin dengan berbagai modifikasi untuk mendapatkan hasil ekstraksi terbaik kemudian dianalisis dengan menggunakan Kromatografi Cair Kinerja Tinggi (KCKT). Metode ekstraksi pelarut panas bertekanan, bantuan *ultrasound*, dan pengendapan oleh pelarut dapat digunakan dengan sampel yang tahan terhadap pemanasan. Metode ekstraksi dengan menggunakan ekstraksi tekanan dingin dapat digunakan untuk sampel yang termolabil. Ekstraksi dengan menggunakan PHSE dapat menghasilkan azadiraktin dengan jumlah yang maksimal dibandingkan tiga metode lainnya.

Kata kunci: Azadiraktin, Ekstraksi, KCKT

ABSTRACT

The neem plant has been known for its unique properties in treating scabies. Among other limonoid compounds present in the neem tree, azadirachtin is a major compound that acts as an antiscabies. Azadirachtin is a triterpenoid limonoid compound obtained from parts of the neem plant. There has been much development of the method of extraction of azadirachtin compounds with various modifications to obtain the best extraction results and then analyzed by using High Performance Liquid Chromatography (HPLC). Pressurised hot solvent extraction (PHSE), ultrasound assisted, and Solvent Precipitation can be used with sample can be used with a sample that is resistant to heating, while the extraction method using Cold Press Extraction can be used for thermolabile samples. Extraction using PHSE can produce azadirachtin with a maximum amount compared to the other three methods.

Keywords: Azadirachtin, Extraction, HPLC

Diserahkan: 4 Juli 2018, Diterima 4 Agustus 2018

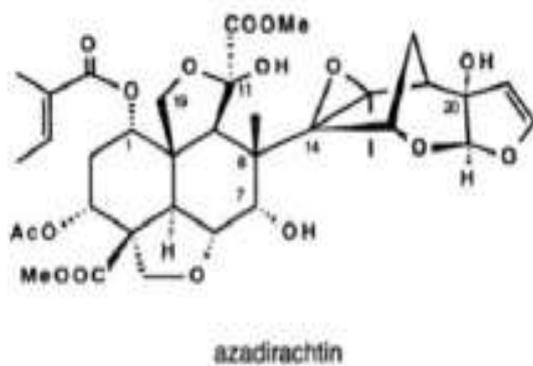
PENDAHULUAN

Tanaman mimba (*Azadirachta indica* L) merupakan salah satu tanaman yang cukup dikenal masyarakat Indonesia, karena hampir seluruh bagian tanamannya dapat digunakan untuk pengobatan.

Tanaman mimba dapat tumbuh di sebagian wilayah tropis dan subtropis untuk produksi bahan baku yang berkhasiat untuk insektisida dan obat alami (Mordue & Nisbet, 2000; Alzohairy, 2016).

Tanaman mimba (*Azadirachta indica*) mengandung senyawa triterpenoid yang sangat luas seperti azadiraktin, nimbin, salanin, azadiraktol, dan lain – lain, serta minyak sebesar 30 – 50%. Azadiraktin merupakan senyawa yang paling banyak ditemukan dalam biji mimba. (Mossini & Kimmelmeier, 2005; Kavatherkar, 2003).

Azadiraktin mempunyai struktur kimia sebagai berikut:



(Warras, 2002)

Minyak mimba dapat diekstraksi dari biji mimba. Ekstrak dari biji mimba ini didapatkan dengan metode ekstraksi untuk mendapatkan beberapa senyawa limonoid (Govindachari, *et al.*, 1990).

Kandungan azadiraktin pada minyak mimba paling banyak ditemukan dari semua senyawa lainnya (0,2 – 0,6% (b/b)) (Govindachari, *et al.*, 1990). Senyawa azadiraktin mengalami dekomposisi pada suhu 300°C (Liu, *et al.*, 2005) dan akan meleleh pada suhu 154 – 158°C (Morgan, 2009).

Pemisahan azadiraktin dan limonoid lainnya dari biji mimba atau minyak dapat dilakukan dengan menggunakan berbagai metode ekstraksi. Modifikasi metode

ekstraksi azadiraktin dilakukan untuk memperoleh azadiraktin dengan jumlah maksimal. Metode ekstraksi konvensional seperti maserasi perkolasi, menggunakan banyak pelarut organik, terkadang masih menyisakan senyawa aktif dari biji mimba (Schroeder & Nakanishi, 1987). Ekstraksi secara mekanik adalah metode yang paling sering digunakan untuk mengekstraksi minyak mimba dari biji mimba (Liau, *et al.*, 2008).

Hasil ekstraksi dari minyak atau biji mimba kemudian dianalisis menggunakan kromatografi cair kinerja tinggi (KCKT), Prosedur KCKT dilakukan setelah pemisahan awal limonoid dari minyak atau biji mimba (Yamasaki, *et al.*, 1986; Yamasaki, *et al.*, 1988; Silva, *et al.*, 2007; Sharma, *et al.*, 2003.; Jarvis, Morgan, dan Edwards, 1999. Schroeder, dan Nakanishi, 1987).

Penelitian Jadeja, *et al.* (2011) telah melakukan ekstraksi azadiraktin dari mimba menggunakan metode *Pressurized Hot Solvent Extraction* (PHSE). Penelitian Esparza-Diaz, *et al.*, (2010) juga telah melakukan ekstraksi azadiraktin dengan menggunakan ekstraksi tekanan dingin. Penelitian Paula, *et al.*, (2015) telah melakukan ekstraksi azadiraktin dengan bantuan *ultrasound*. Modifikasi metode ekstraksi yang akan dibahas ini dilakukan berdasarkan ketahanan sampel terhadap suhu, bantuan secara fisika dan kimia untuk

mendapatkan azadiraktin dengan jumlah tertinggi.

Review artikel ini memaparkan beberapa modifikasi metode untuk ekstraksi senyawa azadiraktin, kemudian dilakukan kuantifikasi menggunakan KCKT untuk mengetahui kadar azadiraktin. Artikel kali ini akan membahas tentang pengembangan beberapa metode ekstraksi analisis azadiraktin dengan menggunakan KCKT.

Ekstraksi Senyawa Azadiraktin dengan menggunakan Pelarut Panas Bertekanan (Jadeja, *et al.*, 2011)

Ekstraksi dengan menggunakan pelarut panas bertekanan, atau disebut sebagai *Pressurized Hot Solvent Extraction* (PHSE), adalah metode ekstraksi dengan menggunakan pelarut tunggal atau campuran pelarut dengan polaritas yang berbeda yang dilakukan dengan tekanan tinggi (35-200 bar)

Tabel 1. Perbandingan hasil ekstraksi azadiraktin dengan variasi metode ekstraksi

No	Metode	Sampel	Azadiraktin yang diperoleh (%)	Sitasi
1	<i>Pressurized Hot Solvent Extraction</i> (PHSE)	Biji mimba	0,95	(Jadeja, <i>et al.</i> , 2011)
2.	Ekstraksi tekanan dingin	Biji mimba`	0,2478	(Esparza-Diaz, <i>et al.</i> , 2010).
3.	Ekstraksi dengan bantuan <i>ultrasound</i>	Buah mimba	0,2691	(Paula, <i>et al.</i> , 2015)
4.	Ekstraksi dengan pengendapan oleh pelarut	Minyak mimba (0,1%)	0,56	(Melwita dan Ju, 2010)

yang menjaga pelarut ekstraksi dalam keadaan cair dan suhu mulai dari suhu kamar sampai 200 °C (Ritcher, *et al.*, 1996).

Modifikasi metode ekstraksi ini menggunakan pelarut organik yang dipanaskan pada tekanan yang ditingkatkan. Kondisi yang optimum untuk melakukan ekstraksi dengan metode ini adalah pada suhu 50°C, tekanan 50 bar, ukuran partikel *mesh* -60 +80, dan laju alir ekstraktan 5 mL/min. Metode ekstraksi ini

dapat menghasilkan 9510 ppm dengan waktu ekstraksi 100 menit.

Kelebihan ekstraksi dengan metode ini adalah pelarut yang digunakan 1,5 kali lebih hemat daripada menggunakan metode maserasi dan waktu ekstraksi dengan metode ini lebih cepat daripada metode maserasi.

Kekurangan dari metode ini adalah jika tekanan ditingkatkan dapat menyebabkan biaya operasi PLE yang mahal, dan

temperatur yang terlalu tinggi dapat menyebabkan terdegradasinya senyawa azadiraktin.

Pemisahan senyawa azadiraktin dari hasil ekstraksi dilakukan dengan kolom Purospher-Star RP_{18-e} (250mm × 4.6mm id, 5mm). Berat ekstrak kasar yang diperoleh, dilarutkan kembali dalam metanol (*HPLC grade*) dan campuran disonatasi sampai selesai proses solubilisasi. Larutannya kemudian disaring melalui 0,45µm *filter syringe* (Millipore, USA) dan 20µL sampel disuntikkan ke dalam kolom. Elusi dilakukan secara isokratik (25 menit) dengan menggunakan fase gerak asetonitil: air campuran (35: 65 % (v/v)) dengan laju alir 1mL / menit. Waktu retensi azadiraktin didapatkan sekitar 18,6 menit.

Ekstraksi Senyawa Azadiraktin dengan Metode Ekstraksi Tekanan Dingin (Esparza-Diaz, *et al.*, 2010).

Kombinasi metode ekstraksi secara langsung dilakukan dengan menggunakan ekstrusi dan disolusi. Ekstraksi tekanan dingin dengan menggunakan pelarut dapat memisahkan senyawa tanpa terkena degradasi suhu pada senyawa yang ada di dalam biji. Metode ekstraksi tekanan dingin, dapat memaksimalkan azadiraktin yang diperoleh dari biji mimba sebanyak 2478 ppm.

Kelebihan dari metode ini adalah senyawa cair yang mudah larut di dalam etanol dapat terekstraksi secara mudah

dengan menggunakan metanol sebagai pelarut. Kekurangan dari metode ini adalah retensi senyawa salanin yang tidak bisa dihindari. karena metode ekstraksi tekanan dingin ini mempertahankan beberapa fraksi minyak. Untuk memaksimalkan metode ini pada skala *scaled up*, diperlukan untuk memaksimalkan konsentrasi azadiraktin yang diekstraksi atau untuk mencegah pengurangan konsentrasi azadiraktin. Metode ini dapat digunakan untuk sampel yang tidak tahan terhadap panas.

Kondisi KCKT yang digunakan menggunakan kolom 125 x 4 mm, laju alir 2 mL/min, detektor UV-Vis (214 nm), volume sampel 20 µL, dan fase gerak campuran asetonitril dan air, dan waktu retensi relatif 2.504 menit.

Ekstraksi Senyawa Azadiraktin dengan Pengendapan oleh Pelarut (Melwita dan Ju, 2010)

Heksan menginduksi pengendapan dari azadiraktin dan limonoid lainnya dari minyak mimba. Limonoid terlarut dalam pelarut polar dan semi polar dan sedikit terlarut di dalam air (Isman, 2006). Pengendapan dari senyawa limonoid terjadi ketika minyak mimba dicampur dengan heksan terbentuk fase baru (heksan-minyak), dan terbentuk keseimbangan yang baru (heksan - minyak - limonoid). Endapan yang terbentuk disaring menggunakan kertas saring kemudian dimasukkan ke dalam oven 50°C selama 30 menit. Endapan

yang dicuci dibilas dengan heksan segar untuk memisahkan minyak yang tersisa. Kondisi optimum yang didapatkan untuk ekstraksi azadiraktin menggunakan metode ini adalah rasio heksan-minyak 9 mL/g, suhu -5°C , dan waktu presipitasi 15 jam.

Kelebihan dari metode ini adalah dapat menghasilkan senyawa dalam bentuk serbuk yang dapat digunakan sebagai metode pre-konsentrasi yang potensial untuk memisahkan azadiraktin dan limonoid yang lain dari minyak mimba.

Kekurangan dari metode ini adalah dengan terbentuknya fase antara heksan dengan minyak, tidak bisa memisahkan seluruh senyawa limonoid, kemungkinan masih ada senyawa yang tertinggal. Metode ini juga perlu memperhatikan kondisi suhu yang digunakan pada saat melakukan optimasi.

Analisis KCKT dilakukan dengan kondisi sebagai berikut: Kolom kromatografi Luna C₁₈ (2) kolom 250mm × 4.6mm (Phenomenex, USA) yang mengandung partikel 5 μm digunakan sebagai fase diam (stasioner). Kromatografi dilakukan dengan elusi isokratik menggunakan Metanol / air (50:50 v/v) pada laju alir 1 mL / menit (Melwita dan Ju, 2010).

Ekstraksi Azadiraktin menggunakan Bantuan *Ultrasound* (Paula, et al., 2015)

Metode ekstraksi azadiraktin dengan menggunakan bantuan *ultrasound* ini telah dilihat dalam penerapan *Ultrasonic-*

Assisted Extraction (UAE) baru - baru ini pada ekstraksi berbagai golongan senyawa pada tumbuhan (Wang, et al., 2013; Irbay, Sahin, dan Kirbaslar, 2013; Martins, et al., 2013; Sahin, Aybastier, dan Isik, 2013; Sousa, et al., 2013; Yolmeh, Najafi, dan Farhoosh, 2014).

Mekanisme ekstraksi metode ini, dilakukan dengan kekuatan mekanis dan kavitasi yang disebabkan oleh gelombang suara sehingga mengakibatkan pengurangan ukuran partikel, rusaknya dinding sel pada tanaman dan peningkatan transfer massa melalui membran (Luque-Garcia dan Castro, 2003). Percobaan ekstraksi dilakukan dengan mengikuti desain Box–Behnken terkait *respons surface methodology* (RSM) dengan tiga faktor dan tiga level. Kondisi RSM yang memberikan konsentrasi azadiraktin tertinggi adalah pada konsentrasi etanol 70% (b/b) pada 30°C dan rasio bahan:pelarut 0,55 g/ml, sehingga menghasilkan konsentrasi azadiraktin sebanyak 2691,829 ppm.

Kelebihan metode ini adalah dengan mekanisme bantuan *ultrasound* membuat metode ini menjadi metode alternatif yang murah, sederhana, cepat dan efisien dibandingkan dengan teknik ekstraksi konvensional, seperti perkolasi (Paula, et al., 2015)..

. Kekurangan metode ekstraksi ini adalah metode ekstraksi ini dapat dipengaruhi suhu, peningkatan suhu dapat

meningkatkan atau menurunkan hasil ekstraksi. Sehingga diperlukan kondisi RSM yang optimal untuk mendapatkan azadiraktin terbanyak.

Analisis dengan menggunakan KCKT-PDA dilakukan dengan kromatografi fase terbalik secara isokratik. Eluen yang digunakan adalah asetonitril : air (40:60), laju alir 1,0 mL/menit, detektor pada panjang gelombang 214 nm, menggunakan kolom C₁₈ (250 x 4,6 mm, 5 µm).

SIMPULAN

Metode ekstraksi senyawa azadiraktin dan analisisnya telah dikaji. Penggunaan metode ekstraksi ini memiliki kelebihan masing - masing, sehingga dapat meningkatkan hasil ekstraksi. Metode ekstraksi dengan menggunakan PHSE, bantuan *ultrasound*, dan Pengendapan oleh pelarut dapat digunakan dengan memperhatikan sampel yang tahan terhadap pemanasan, sedangkan metode ekstraksi dengan menggunakan tekanan dingin dan dapat digunakan untuk sampel yang termolabil. Ekstraksi dengan menggunakan PHSE dapat menghasilkan azadiraktin dengan jumlah yang maksimal dibandingkan metode lainnya

UCAPAN TERIMA KASIH

Dalam pembuatan *review* artikel ini, penulis mengucapkan terimakasih kepada Ibu Zelika Mega Ramadhania, M.Si., Apt. sebagai dosen pembimbing, dan Bapak Rizky Abdullah, Ph.D., Apt. sebagai dosen

metodologi penelitian. Penulis juga mengucapkan terimakasih kepada Nazil, Irfan yang telah membantu diskusi pembuatan *review* artikel ini serta teman – teman ASPIRIN 2015.

KONFLIK KEPENTINGAN

Penulis menyatakan tidak terdapat potensi konflik kepentingan dengan penelitian, kepenulisan, dan atau publikasi artikel ini.

DAFTAR PUSTAKA

- Alzohairy, MA. 2016. Therapeutics Role of Azadirachta indica (Neem) and Their Active Constituents in Diseases Prevention and Treatment. *Evidence-based Complementary and Alternative Medicine*. :1 - 11.
- Dubashi S. *et al.* 2013. Studies on extraction and HPLC Analysis of Azadirachtin from Kernels of Neem Seeds. *Journal of Advanced Pharmacy Education & Research* pp: 27 – 30.
- Esparza-Diaz G. *et al.* 2010. Azadirachtin Extraction Using Cold Press and Soxhlet Methods. *Biopestic. Inc.* 6(1): 45 – 51
- Govindachari, TR. *et al.* 1990. Simple Method for the Isolation of Azadirachtin by Preparative High-Performance Liquid Chromatography, *J. Chromatography* : 389–391.
- Ilbay, Z, S Sahin, dan SI Kirbaslar. 2013. Optimisation of ultrasound-assisted extraction of rosehip (*Rosa canina L.*) with response surface methodology, *J. Sci. Food Agric.* 93: 2804 - 2809
- Isman, MB. 2006. Botanical insecticides, deterrents, and repellents in modern agriculture and an increasingly

- regulated world, *Annu. Rev. Entomol.* : 45–66.
- Jadeja, GC. 2011. Extraction of natural insecticide azadirachtin from neem (*Azadirachta indica* A. Juss) seed kernels using pressurized hot solvent. *The Journal of Supercritical Fluid* : 253 – 258
- Jarvis, AP, ED Morgan, and C Edwards. 1999. Rapid separation of triterpenoids from neem seed extracts, *Phytochem. Anal.* : 39–43.
- Kavathekar, KY. 2003. Neem in India, *NISCAIR*,: 21–23.
- Liauw, MY., *et al.* 2008. Extraction of neem oil (*Azadirachta indica* A. Juss) using n- Hexane and ethanol: Studies of Oil Quality Kinetic and Thermodynamic. *ARNP J Eng Appl Sci*.3(3):49-54.
- Liu Y. *et al.* 2005. Inclusion complexes of azadirachtin with native and methylated cyclodextrins: solubilization and binding ability, *Bioor. Med. Chem.* 13:4037 – 4042
- Luque-García, JL and MDL Castro. 2003. Ultrasound: a powerful tool for leaching?, *TrAC Trends Anal. Chem.* 22:41-47.
- Martins, FS. *et al.* 2013. Impact of different extraction methods on the quality of *Dipteryx alata* extracts, *Braz. J. Pharmacogn.* 23: 521 - 526.
- Melwita E. and Y Ju. 2010. Separation of azadirachtin and other limonoids from crude neem oil via solvent precipitation. *Separation and Purification Technology* :219 – 224
- Mordue, AJ dan A Nisbet. 2000. Azadirachtin from the neem tree *Azadirachta indica*: its action against insects, *An. Soc. Entomol. Brasil.* : 615 - 632
- Morgan, ED. 2009. Azadirachtin, a scientific gold mine, *Bioor. Med. Chem.* 17: 4096 – 4105
- Mossini, SAG. Dan C Kimmelmeier. 2005. A árvore Nim (*Azadirachta indica* A. Juss): múltiplos usos, *Acta Farm. Bonaerense* :139-148.
- Ritcher, BE. *et al.* 1996. Accelerated solvent extraction: A technique for sample preparation, *Analytical Chemistry*. :1033–1039.
- Sahin S, Ö Aybastier, dan E Isik. 2013. Optimisation of ultrasonic-assisted extraction of antioxidant compounds from *Artemisia absinthium* using response surface methodology, *Food Chem.* 141: 1361-1368.
- Sharma V. *et al.* 2003. An efficient method for the purification and characterization of nematicidal azadirachtins A, B, and H, using MPLC and ESIMS, *J. Agric. Food Chem.* :3966–4397.
- Silva, JCT. *et al.* 2007. Purification of the seven tetranortriterpenoids in neem (*Azadirachta Indica*) seed by counter-current chromatography sequentially followed by isocratic preparative reversed phase high-performance liquid chromatography, *J. Chromatogr. A* : 203–210.
- Sousa, JN. *et al.* 2014. Optimization of ultrasound-assisted extraction of polyphenols, tannins and epigallocatechin gallate from barks of *Stryphnodendron adstringens* (Mart.) Coville bark extracts, *Pharmacogn. Mag.* 10: 318 - 323.
- Wang X. *et al.* 2013. Optimisation of ultrasound assisted extraction of phenolic compounds from *Sparganii rhizoma* with response surface methodology, *Ultrason. Sonochem.* 20: 846-854.
- Warras, AA. 2012. Medicinal and Cosmetic Potential of Neem (*Azadirachta Indica*) Seed Oil: A Review. *Journal of Medicinal Chemistry*, 1(1): 5 - 8

Yamasaki, RB. *et al.* 1986. Isolation and purification of azadirachtin from neem (*Azadirachta indica*) seeds using flash chromatography and high-performance liquid chromatography, *J. Chromatogr.* :220–226.

Yamasaki, RB. *et al.* 1988. Isolation and purification of salannin from neem

seeds and its quantification in neem and chinaberry seeds and leaves, *J. Chromatogr.* :277–283.

Yolmeh M, MBH Najafi, , and R Farhoosh. Optimisation of ultrasound-assisted extraction of natural pigment from annatto seeds by response surface methodology (RSM), *Food Chem.* 155: 319-324.