

**ISOLASI SENYAWA ALKALOID FRAKSI ETIL ASETAT TANAMAN
ANTING-ANTING (*Acalypha Indica* L) DENGAN VARIASI KECEPATAN
LAJU ALIR MENGGUNAKAN KROMATOGRAFI KOLOM**

SKRIPSI

Oleh:
NUR LISIYANA
NIM. 12630007



**JURUSAN KIMIA
FAKULTAS SAINS DAN TEKNOLOGI
UNIVERSITAS ISLAM NEGERI
MAULANA MALIK IBRAHIM MALANG
2016**

**ISOLASI SENYAWA ALKALOID FRAKSI ETIL ASETAT TANAMAN
ANTING-ANTING (*Acalypha Indica* L) DENGAN VARIASI KECEPATAN
LAJU ALIR MENGGUNAKAN KROMATOGRAFI KOLOM**

SKRIPSI

Oleh:
NUR LISIYANA
NIM. 12630007

Diajukan Kepada:
Fakultas Sains dan Teknologi
Universitas Islam Negeri (UIN) Maulana Malik Ibrahim Malang
Untuk Memenuhi Salah satu Persyaratan dalam
Memperoleh Gelar Sarjana Sains (S.Si)

JURUSAN KIMIA
FAKULTAS SAINS DAN TEKNOLOGI
UNIVERSITAS ISLAM NEGERI
MAULANA MALIK IBRAHIM MALANG
2016

ISOLASI SENYAWA ALKALOID FRAKSI ETIL ASETAT TANAMAN
ANTING-ANTING (*Acalypha Indica* L) DENGAN VARIASI KECEPATAN
LAJU ALIR MENGGUNAKAN KROMATOGRAFI KOLOM

SKRIPSI

Oleh:
NUR LISIYANA
NIM. 12630007

Telah Diperiksa dan Disetujui untuk Diuji :
Tanggal, 16 September 2016

Pembimbing I



Elok Kamilah Hayati, M.Si
NIP.19790620 200604 2 002

Pembimbing II



Nur Aini, M.Si
NIDT. 19840608 20160801 2 070

Mengetahui,
Ketua Jurusan Kimia



Elok Kamilah Hayati, M.Si
NIP.19790620 200604 2 002

ISOLASI SENYAWA ALKALOID FRAKSI ETIL ASETAT TANAMAN
ANTING-ANTING (*Acalypha Indica* L) DENGAN VARIASI KECEPATAN
LAJU ALIR MENGGUNAKAN KROMATOGRAFI KOLOM

SKRIPSI

Oleh:
NUR LISIYANA
NIM. 12630007

Telah Dipertahankan di Depan Dewan Penguji Skripsi
Dan Dinyatakan Diterima Sebagai Salah Satu Persyaratan
Untuk Memperoleh Gelar Sarjana Sains (S.Si)
Tanggal: 16 September 2016

Penguji Utama	: Suci Amalia, M.Sc NIP. 19821104 200901 2 007	(.....)
Ketua Penguji	: Diana Candra Dewi, M.Si NIP. 19770720 200312 2 001	(.....)
Sekretaris Penguji	: Elok Kamilah Hayati, M.Si NIP. 19790620 200604 2 002	(.....)
Anggota Penguji	: Nur Aini, M.Si NIDT. 19840608 20160801 2 070	(.....)

Mengesahkan,
Ketua Jurusan Kimia



Elok Kamilah Hayati, M.Si
NIP.19790620 200604 2 002

PERNYATAAN KEASLIAN TULISAN

Saya yang bertanda tangan dibawah ini:

Nama : Nur Lisiyana
NIM : 12630007
Jurusan : Kimia
Fakultas : Sains dan Teknologi
Judul Penelitian : Isolasi Senyawa Alkaloid Fraksi Etil Asetat Tanaman Anting-anting (*Acalypha Indica* L) dengan Variasi Kecepatan Laju Alir Menggunakan Kromatografi Kolom

Menyatakan dengan sebenarnya bahwa skripsi yang saya tulis ini benar-benar merupakan hasil karya saya sendiri, bukan merupakan pengambilan data, tulisan atau pikiran orang lain yang saya akui sebagai hasil tulisan atau pikiran saya sendiri, kecuali dengan mencantumkan sumber cuplikan pada daftar pustaka. Apabila dikemudian hari terbukti atau dapat dibuktikan skripsi ini hasil jiplakan, maka saya bersedia menerima sanksi atas perbuatan tersebut.

Malang, 16 September 2016
Yang membuat pernyataan,



Nur Lisiyana
NIM. 12630007

MOTTO

“THERE IS NO MORE BEAUTIFUL PRAYER THAN PRAYER SO THAT
THE COMPLETION OF THIS THESIS”

“ karena sesungguhnya sesudah kesulitan ada kemudahan, sesungguhnya sesudah
kesulitan ada kemudahan” (QS. Al-Insyirah: 5-6)

“Lakukanlah sekarang, jangan menunggu besok selagi kita bisa. Karena kita tidak
tahu apa yang akan terjadi untuk hari esok” Nur lis

“In my nervousness for the speech and my moments of doubt, I’ve told my self
firmly, ‘if not me, who? If not now, when?’ ” Nur lis



HALAMAN PERSEMBAHAN

Yang Utama dari Segalanya...

Puji syukur kehadirat Allah SWT yang telah memberikanku kekuatan dan membekaliku ilmu serta memperkenalkanku dengan cinta. Atas karunian-Nya dan kemudahan yang Engkau berikan akhirnya skripsi yang sederhana ini dapat terselesaikan. Sholawat serta salam semoga tetap terucapkan keharibaan Rasululah Muhammad SAW.

Kupersembahkan karya sederhana ini kepada kedua orang tua q (Mustafa dan Munawiyah) dan adekku Fahmi yang telah memberikan motivasi dan dukungan serta kasih sayang yang tiada tara. Semoga ini menjadi langkah awal untuk membahagiakan dan membanggakan keluarga. Karena selama ini aku sadar belum bisa berbuat yang lebih untuk ibu, ayah dan adek yang selalu mendoakanku, selalu menasehatiku menjadi lebih baik.

Terimakasih kepada seluruh dosen kimia UIN MALIKI MALANG khususnya bu Elok Kamilah Hayati M.Si, bu Diana Candra Dewi M.Si, bu Nur Aini M.Si dan bu Suci Amalia M.Sc yang selalu meberikan bimbingan dan didikan serta pengalaman yang sangat berharga yang telah kalian berikan kepada kami...

Buat Teman-teman kimia angkatan 2012 khususnya kimia kelas A (C3H8) terimakasih sudah 4 tahun ini mengisi hari-hari q dengan canda tawa dan suka duka saat dikelas maupun saat penelitian. Teruntuk teman-teman kontrakan ku Nanda, Laili, Yeyen, Fitri, Sisca, Rosi, mbk Devi dan mbk Astri terimakasih telah mau menjadi keluarga q selama 2 tahun ngontrak bareng dan terimakasih selalu memberikan semangat serta dukungan dalam penulisan karya tulis ini....

Untuk teman-teman Rudi Tabuti Q yaitu Dinda, Ria, Eli, Devi, Ira, dan Diana. Senang sekali aku bisa kenal dan dekat dengan kalian. Aku bakalan kangen sama wajah judes nya Dinda yang tidak pernah senyum, kekocakan dan kekonyolannya Ria, wajah polosannya Eli, Suara nyaringnya Incees Devi, sama tubuh mungilnya Ira dan Omongannya Diana yang ngak ada jeda nya.. berkat bulian kalian kepada q, kita bisa ketawa bareng-bareng(hahahha). Pkoknya aq bakalan rindu dengan bulian-nya kalian semua.. I WIIL TO MISS THE MOMENT WITH YOU....

KATA PENGANTAR



Segala puja dan puji syukur kami panjatkan kehadirat Allah SWT yang maha pengasih lagi maha penyayang kepada seluruh hamba-Nya, yang mana hanya dengan rahmat, taufik, hidayah, dan inayah-Nya penulis dapat menyelesaikan skripsi yang berjudul **Isolasi Senyawa Alkaloid Fraksi Etil Asetat Tanaman Anting-anting (*Acalypha Indica* L) dengan Variasi Kecepatan Laju Alir menggunakan Kromatografi Kolom** dengan semaksimal mungkin, meskipun masih jauh dari kesempurnaan karena banyaknya kekurangan. Shalawat serta salam semoga tetap tercurahkan kepada Nabi junjungan, Nabi Muhammad SAW yang karena ajaran beliau kita dapat menuju jalan yang lurus, jalan yang diridhoi dan bukan jalan orang sesat yang dimurkai.

Penulis menyadari keterbatasan pengetahuan yang penulis miliki, karena itu tanpa keterlibatan dan saran dari berbagai pihak, sulit bagi penulis untuk menyelesaikan proposal skripsi ini. Maka dari itu dengan segenap kerendahan hati patutlah penulis ucapkan terima kasih seiring doa dan harapan *jazakumullan ahsanal jaza'* kepada semua pihak yang telah membantu terselesaikannya penelitian ini. Ucapan terimakasih ini penulis sampaikan kepada:

1. Bapak Prof. Dr. H. Mudjia Rahardjo, M.Si selaku Rektor Universitas Islam Negeri (UIN) Maulana Malik Ibrahim Malang.
2. Ibu Dr. drh. Hj. Bayyinatul M. M.Si selaku Dekan Fakultas Sains dan Teknologi Universitas Islam Negeri (UIN) Maulana Malik Ibrahim Malang.
3. Ibu Elok Kamilah Hayati, M.Si selaku Ketua Jurusan Kimia Fakultas Sains dan Teknologi Universitas Islam Negeri (UIN) Maulana Malik Ibrahim Malang dan selaku dosen pembimbing proposal skripsi yang telah banyak memberikan pengarahan dan pengalaman yang berharga
4. Ibu Diana Candra Dewi, M.Si selaku dosen konsultan yang telah meluangkan waktu untuk membimbing, memotivasi, mengarahkan dan memberi masukan dalam penulisan proposal skripsi ini.

5. Seluruh Dosen Jurusan Kimia Fakultas Sains Dan Teknologi Universitas Islam Negeri Maulana Malik Ibrahim Malang yang telah mengalirkan ilmu, pengetahuan, pengalaman, wacana dan wawasannya, sebagai pedoman dan bekal bagi penulis.
6. Kedua orang tuaku dan seluruh keluarga besar yang dengan penuh kasih sayang dan keikhlasan telah memberikan segala kebutuhan kepada penulis, memberi dorongan dan motivasi baik secara materiil maupun spiritual.
7. Teman-teman angkatan 2012 Jurusan Kimia Fakultas Sains dan Teknologi Universitas Islam Negeri Maulana Malik Ibrahim Malang yang telah memberi motivasi, informasi, dan masukannya pada penulis

Teriring do'a dan harapan semoga apa yang telah mereka berikan kepada penulis, mendapatkan balasan yang lebih baik dari Allah SWT. Akhirnya atas segala kekurangan dari skripsi ini, sangat diharapkan saran dan kritik yang bersifat konstruktif dari semua pembaca demi sempurnanya skripsi ini. Semoga skripsi ini dapat memberikan kontribusi positif serta bermanfaat bagi kita semua, Amin.

Malang, 16 September 2016

Penulis

DAFTAR ISI

HALAMAN JUDUL	i
HALAMAN PERSETUJUAN	ii
HALAMAN PENGESAHAN	iii
HALAMAN PERNYATAAN	iv
MOTTO	v
HALAMAN PERSEMBAHAN	vi
KATA PENGANTAR	vii
DAFTAR ISI	ix
DAFTAR GAMBAR	xi
DAFTAR TABEL	xii
DAFTAR LAMPIRAN	xiii
ABSTRAK	xiv
BAB I PENDAHULUAN	1
1.1 Latar Belakang	6
1.2 Rumusan Masalah	7
1.3 Tujuan Penelitian	7
1.4 Batasan Masalah	7
1.5 Manfaat Penelitian	7
BAB II TINJAUAN PUSTAKA	9
2.1 Tanaman Anting-anting (<i>Acalypha indica L.</i>).....	9
2.1.1 Morfologi.....	9
2.1.2 Klasifikasi.....	10
2.1.3 Kandungan Kimia.....	11
2.1.4 Manfaat Tumbuhan.....	12
2.2 Alkaloid	13
2.2.1 Pengertian Alkaloid	13
2.2.2 Sifat Fisika	13
2.2.3 Sifat Kimia	13
2.2.4 Penggolongan Alkaloid	14
2.3 Ekstraksi Senyawa Alkaloid	17
2.4 Fraksinasi Ekstrak Kasar Metanol.....	19
2.5 Uji Fitokimia Senyawa Alkaloid dengan Reagen.....	22
2.6 Pemisahan Senyawa Alkaloid dengan Kromatografi Kolom	24
2.7 Uji Kuantitatif Senyawa Alkaloid	28
2.8 Kromatografi Lapis Tipis	29
2.9 Identifikasi Senyawa Alkaloid dengan UPLC-MS.....	31
BAB III METODELOGI PENELITIAN	36
3.1 Lokasi dan Waktu Penelitian	36
3.2 Alat dan Bahan	36
3.2.1 Alat	36
3.2.2 Bahan	36
3.3 Rancangan Percobaan	36
3.4 Tahapan Penelitian	37

3.5 Cara Kerja.....	38
3.5.1 Preparasi Sampel	38
3.5.2 Ekstraksi Sampel dengan Metanol	38
3.5.3 Fraksinasi (Partisi) Ekstrak Metanol	39
3.5.4 Uji fitokimia senyawa alkaloid dengan reagen.....	40
3.5.5 Pemisahan dengan metode Kromatografi Kolom.....	40
3.5.6 Pengelompokan Fraksi secara Uji Kualitatif dengan Reagen	41
3.5.7 Penentuan Laju Alir terbaik dengan Kadar Alkaloid Total	42
3.5.8 Uji Kemurnian Isolat dengan KLT Analitik.....	42
3.5.9 Identifikasi senyawa Alkaloid menggunakan UPLC-MS	43
3.6 Analisis Data	44
BAB IV HASIL DAN PEMBAHASAN	46
4.1 Preparasi Sampel	46
4.2 Ekstraksi Tanaman Anting-anting	47
4.3 Fraksinasi (Partisi) Senyawa Alkaloid.....	48
4.4 Uji fitokimia senyawa alkaloid dengan reagen.....	50
4.5 Pemisahan Senyawa Alkaloid dengan Kromatografi Kolom	52
5.1 Kecepatan Laju Alir 1 mL/menit	53
5.2 Kecepatan Laju Alir 2 mL/menit	55
4.6 Pengelompokan Fraksi secara Uji Kualitatif dengan Reagen	56
4.7 Penentuan Laju Alir terbaik dengan Kadar Alkaloid Total	57
4.8 Uji Kemurnian Isolat dengan KLT Analitik.....	60
4.9 Identifikasi senyawa Alkaloid menggunakan UPLC-MS	61
4.10 Pemanfaatan Tanaman Anting-anting dalam Perspektif Islam	75
BAB V PENUTUP	79
5.1 Kesimpulan	79
5.2 Saran	79
DAFTAR PUSTAKA	80
LAMPIRAN.....	86

DAFTAR GAMBAR

Gambar 2.1 Tanaman Anting-anting (<i>Acalypha indica</i> L)	11
Gambar 2.2 Struktur Sederhana Senyawa Alkaloid (Piridina)	15
Gambar 2.3 Senyawa Berberine dan (b) senyawa menisperine	16
Gambar 2.4 Senyawa Piperidina	16
Gambar 2.5 Senyawa Indol	16
Gambar 2.6 Reaksi Amina dengan asam kuat	20
Gambar 2.7 Reaksi pembebasan amina dengan cara pembasaan	21
Gambar 2.8 Reaksi dugaan antara Alkaloid dengan Dragendorff	22
Gambar 2.9 Reaksi dugaan antara Alkaloid dengan Mayer.....	23
Gambar 2.10 Struktur Silika Gel	26
Gambar 2.11 Spektra MS yang mengandung senyawa Menisperin	34
Gambar 2.12 Spektra MS yang mengandung senyawa Berberin.....	35
Gambar 2.13 Spektogram MS yang mengandung senyawa Isokuinolin	35
Gambar 4.1 Reaksi Alkaloid dengan Asam Kuat	48
Gambar 4.2 Reaksi Pembebasan Amina dengan cara Pembasaan.....	49
Gambar 4.3 Hasil Uji mayer dan Hasil Uji Dragendorff	51
Gambar 4.4 Ilustrasi KLTA	60
Gambar 4.5 Kromatogram UPLC-MS isolat Alkaloid	61
Gambar 4.6 Spektra Massa Senyawa Puncak 1	62
Gambar 4.7 Struktur Senyawa Produk dari BM 1.120,8804	63
Gambar 4.8 Spektra Massa Senyawa Puncak 2	63
Gambar 4.9 Struktur Senyawa Produk dari BM 1.385,9199	64
Gambar 4.10 Spektra Massa senyawa Puncak 3	65
Gambar 4.11 Struktur Senyawa Produk dari BM 696,4435	65
Gambar 4.12 Spektra massa senyawa puncak 4.....	66
Gambar 4.13 Struktur Senyawa Produk dari BM 852,3294	66
Gambar 4.14 Spektra Massa Senyawa Puncak 5	67
Gambar 4.15 Struktur Senyawa Produk dari BM 852,5286	67
Gambar 4.16 Spektra Massa senyawa Puncak 6.....	68
Gambar 4.17 Pola fragmentasi Senyawa Palmatin	68
Gambar 4.18 Spektra massa senyawa puncak 7.....	69
Gambar 4.19 Struktur Senyawa Produk dari BM 1.108,8027	70
Gambar 4.20 Spektra Massa Senyawa Puncak 8	70
Gambar 4.21 Pola Fragmentasi Senyawa Berberin.....	71
Gambar 4.22 Spektra Massa senyawa Puncak 9	71
Gambar 4.23 Struktur Senyawa Produk dari BM 1.066,7390	72
Gambar 4.24 Spektra massa senyawa puncak 10.....	72
Gambar 4.25 Struktur Senyawa Produk BM 1.185,7997	73
Gambar 4.26 Spektra massa senyawa puncak 11.....	73
Gambar 4.27 Struktur Senyawa Produk dari BM 1.249,7888	74

DAFTAR TABEL

Tabel 2.1 Konstanta Dielektrikum dan Tingkat Kelarutan beberapa pelarut.....	18
Tabel 2.2 Hasil Uji Fitokimia Tanaman Anting-anting	23
Tabel 2.3 Hasil penggabungan fraksi dari kromatografi kolom	27
Tabel 4.1 Hasil Maserasi ekstrak Metanol Tanaman Anting-anting.....	48
Tabel 4.2 Penggabungan Fraksi berdasarkan Warna	54
Tabel 4.3 Penggabungan Fraksi berdasarkan Warna pada Vial.....	55
Tabel 4.4 Data Pengelompokan Fraksi hasil Isolasi Laju Alir 1 mL/ menit.....	56
Tabel 4.5 Data Pengelompokan Fraksi hasil Isolasi Laju Alir 2 mL/ menit.....	57
Tabel 4.6 Hasil Penetapan Kadar Alkaloid total Fraksi	59
Tabel 4.7 Senyawa alkaloid yang dominan pada isolat Anting-anting	75



DAFTAR LAMPIRAN

Lampiran 1 Rancangan Penelitian	85
Lampiran 2 Diagram Alir	86
Lampiran 3 Pembuatan Larutan dan Reagen	92
Lampiran 4 Rendemen Ekstrak Metanol tanaman anting-anting	95
Lampiran 5 Rendemen Ekstrak Alkaloid Kasar	95
Lampiran 6 Rendemen Kadar Alkaloid dengan laju alir 1 mL/menit	95
Lampiran 7 Rendemen Kadar Alkaloid dengan Laju alir 1 mL/menit	96
Lampiran 8 Perhitungan Nilai Rf	96
Lampiran 9 Perhitungan Persen Luas Area	96
Lampiran 10 Dokumentasi	98
Lampiran 11 Hasil MS Keseluruhan	105



ABSTRAK

Lisiyana, Nur. 2016. Isolasi Senyawa Alkaloid Fraksi Etil Asetat Tanaman Anting-anting (*Acalypha indica* linn) dengan Variasi Kecepatan Laju Alir Menggunakan Kromatografi Kolom. Skripsi. Jurusan Kimia, Fakultas Sains dan Teknologi, Universitas Islam Negeri Maulana Malik Ibrahim Malang. Pembimbing 1: Elok Kamilah Hayati, M.Si. Pembimbing 2: Nur Aini, M.Si. Konsultan: Diana Candra Dewi, M.Si.

Kata Kunci: Alkaloid, Anting-anting (*Acalypha indica* L), Isolasi, Kromatografi kolom, UPLC-MS

Tanaman anting-anting (*Acalypha indica* L) merupakan salah satu tanaman semak yang tumbuh liar di pekarangan rumah, pinggir jalan dan lapangan berumput di seluruh daerah tropis. Tanaman ini dapat digunakan sebagai obat karena didalamnya banyak terdapat kandungan metabolit sekunder, salah satunya adalah senyawa alkaloid. Tujuan penelitian ini adalah untuk mengisolasi senyawa alkaloid menggunakan metode kromatografi kolom dengan variasi kecepatan laju alir, yaitu menggunakan 1 mL/menit dan 2 mL/menit.

Ekstraksi bahan aktif menggunakan metode maserasi dengan pelarut metanol. Ekstrak metanol difraksinasi dengan HCl 2 N dan dipartisi menggunakan ekstraksi cair-cair dengan pelarut etil asetat. Fraksi etil asetat dilakukan uji fitokimia kemudian dilakukan pemisahan dengan metode kromatografi kolom menggunakan eluen kloroform:metanol (9,5:0,5). Fraksi yang diperoleh dilakukan pengelompokan fraksi secara uji kualitatif dengan reagen. Hasil penggabungan fraksi kemudian dilakukan penentuan laju alir yang terbaik dengan kadar alkaloid total fraksi. Fraksi yang memiliki kadar alkaloid total tinggi diuji kemurniannya dengan KLTA. Fraksi dengan spot tunggal diidentifikasi dengan UPLC-MS.

Hasil penelitian menunjukkan bahwa ekstrak metanol yang diperoleh $\pm 10,030\%$ dari 300 gram sampel. Fraksi etil asetat yang dihasilkan sebesar 0,145%. Kecepatan laju alir yang terbaik dalam memisahkan senyawa alkaloid menggunakan kromatografi kolom adalah laju alir 1 mL/menit. Pada kecepatan laju alir 1 mL/menit diperoleh kadar alkaloid total sebanyak 0,988 % dengan berat isolat 0,069 gram. Endapan hasil isolasi dengan laju alir 1 mL/menit dilakukan uji kemurnian isolat dengan KLT dan diperoleh satu spot tunggal dengan warna hijau. Hasil isolat dilakukan identifikasi menggunakan UPLC-MS dan diperoleh sebelas dugaan jenis senyawa alkaloid diantaranya adalah senyawa hidrastin, dopamin, sanguinarin, kafein, karbamazepin, palmatin, bazinaprin, berberin, evosantin, tebain dan senyawa pentilpiridin

ABSTRACT

Lisiyana, Nur. 2016. Isolation of Ethyl Acetate Fraction Compounds Alkaloids Plant Anting-anting (*Acalypha indica* Linn) by speed variation of flow rate using column chromatography. Essay. Department of Chemistry, Faculty of Science and Technology, the State Islamic University of Maulana Malik Ibrahim Malang. Supervisor 1: Elok Kamilah Hayati, M.Si. Supervisor 2: Nur Aini, M.Si. Consultant: Diana Candra Dewi, M.Si.

Keywords: Alkaloids, Anting-anting (*Acalypha indica* L), Isolation, Column Chromatography, UPLC-MS

Anting-anting (*Acalypha indica* L) is a shrub that grows on the yard, roadside and grassy field across the tropics. This plant can be used as a drug because it contains secondary metabolites, one of which is the alkaloid. The purpose of this study is to isolate the alkaloid compounds using column chromatography with speed variation of flow rate, using a 1 mL/min and 2 mL/min.

Extraction of active ingredients using methods maceration with methanol. The methanol extract fractionated with HCl 2 N and partitioned using liquid extraction with ethyl acetate solvent. Ethyl acetate fractions tested phytochemical then separation by column chromatography using the eluent chloroform: methanol (9.5:0.5). Fractions obtained by grouping fraction qualitative test reagent. Results of merging fractions then conducted to determine the best flow rate with a total alkaloid content of the fraction. The fraction that had high levels of total alkaloids tested purity with KLTA. Fraction with a single spot identified by UPLC-MS.

The results showed that the methanol extract obtained $\pm 10.030\%$ from 300 grams sample. The resulting ethyl acetate fraction 0.145%. The best of speed flow rate in separating the alkaloid compounds using column chromatography is a flow rate 1 mL/min. The speed of flow rate 1 mL/min obtained a total alkaloid content 0.988% with weight 0.069 grams isolates. The precipitate is isolated with a flow rate 1 mL/min to test the purity of isolates using TLC and obtained a single spot with the color green. Results of isolates identification using UPLC-MS and obtained eleven allegations the type of alkaloid compounds include compounds hidrastine, dopamine, sanguinarine, caffeine, carbamazepine, palmatine, bazineprine, berberine, evosantine, thebaine and compounds phenylpyridine

مستخلص البحث

لسيانا، نور. ٢٠١٦. عزل المركبات القلويدات يعنى إيثيل خلات النباتات الأقراط (*Acalypha indica* L) من خلال تباين سرعة من معدل تدفق باستخدام اللوني العمود. بحث جامعي. قسم الكيمياء، كلية العلوم والتكنولوجيا، جامعة الإسلامية الحكومية مولانا مالك إبراهيم مالانج. المشرفة الاول إيلوك كاملة حياتي: ، الماجستير، المشرفة الثانى: نور عيني، الماجستير، مستشار: ديانا جاندر ديوي، الماجستير

كلمات الرئيسية: القلويدات، النباتات الأقراط أنتينج-أنتينج (*Acalypha indica* L) عزل، اللوني العمود، UPLC-MS

النباتات الأقراط (*Acalypha indica* L) هو النبات التي تنمو البرية في الشارع، وحقل معشوشب في المناطق المدارية. هذه النبات تمكن استخدامها كدواء لأنه في كثير هناك محتوى المركبات الثانوية، واحدة منها هو قلويد. واما الغرض من هذه الدراسة لعزل المركبات قلويد باستخدام اللوني العمود مع اختلاف سرعة معدل التدفق، يعنى باستخدام ١ مل / دقيقة و ٢ مل / دقيقة.

استخراج المكونات النشطة استخدمت اسلوب النقع باستخدام الميثانول. استخراج الميثانول مجزأة مع HCl 2 N وتقسيم باستخدام استخراج السائل مع مذيب الإيثيل الخلات. كسور الإيثيل خلات اختبار النباتية ثم فصل من قبل اللوني العمود باستخدام الكلوروفورم الميثانول (٩،٥ : ٠،٥). ثم نفذ التجمع باعتباره جزء من الكواشف اختبار النوعية. وعلاوة على ذلك، من الأفضل تحديد معدل التدفق على مجموع محتوى قلويد من الكسر. الكسر الذي لديهم مستويات عالية من إجمالي قلويدات اختبار نقاء مع KLTا و تحدد فصيل مع بقعة واحدة من UPLC-MS

وأظهرت النتائج أن استخراج الميثانول ينتج في ١٠،٣٠٪ وجزء الإيثيل خلات يعنى ١٤٥، ٠٪. أفضل النتائج اللوني العمود لعزل مركب قلويد هو العمود اللوني مع سرعة معدل التدفق يعنى ١ مل / دقيقة بدلا من استخدام معدل التدفق ٢ مل / دقيقة. بسرعة معدل التدفق من ١ مل / دقيقة حصل على المحتوى الكلي قلويد من ٠،٩٨٨٪ وزنا من ٠،٠٦٩ غرام. يعجل عزل مع معدل التدفق من ١ مل / دقيقة لاختبار نقاء العزلات مع KLTا وحصلت بقعة واحدة مع اللون الأخضر. ثم يتم تحديدها باستخدام UPLC-MS وحصل أحد عشر نوع المزعومة من قلويد. ومن بين احد عشر المركبات هناك الثلاثة مركبات غالبا ما تكون موجودة في كل أطيايف الشامل هي مركبات فالمتين، سانغونارينوبارين.

BAB 1

PENDAHULUAN

1.1 Latar Belakang

Indonesia sebagai negara tropis memiliki potensi keragaman hayati yang cukup besar di dunia, termasuk tanaman obat. Keanekaragaman hayati Indonesia ini menempati urutan kedua terkaya di dunia setelah Brazil. Tumbuhan yang berpotensi obat di Indonesia cukup melimpah, tetapi untuk pemanfaatannya hanya sebatas penggunaan secara tradisional, hanya sebagian kecil saja, sekitar 7.000 spesies dari 30.000 spesies yang telah dilakukan penelitian secara ilmiah. Masih banyak spesies yang belum dikenal manfaat, kandungan kimia dan bioaktivitasnya. Berbagai tumbuhan dapat dijadikan sebagai sumber obat seperti kelompok sayur-sayuran, dan bunga-bunga serta tumbuhan liar (Wasito, 2011). Salah satu keanekaragaman tumbuhan yang digunakan sebagai bahan obat tradisional adalah tanaman anting-anting (*Acalypha indica* L).

Keanekaragaman tumbuhan khususnya anting-anting yang dimiliki Indonesia merupakan salah satu nikmat yang diberikan oleh Allah SWT kepada kita, sehingga kita patut bersyukur dan memanfaatkannya dengan baik. Dalam firmanNya, Allah SWT telah menjelaskan dalam Qs. an-Nahl ayat 11:

يُنْبِتُ لَكُمْ بِهِ الزَّرْعَ وَالزَّيْتُونَ وَالنَّخِيلَ وَالْأَعْنَابَ وَمِنْ كُلِّ الثَّمَرَاتِ إِنَّ فِي ذَلِكَ لَآيَةً
لِّقَوْمٍ يَتَفَكَّرُونَ ﴿١١﴾

Artinya:

“Dia menumbuhkan bagi kamu dengan air hujan itu tanam-tanaman; zaitun, korma, anggur dan segala macam buah-buahan. Sesungguhnya pada yang demikian itu benar-benar ada tanda (kekuasaan Allah) bagi kaum yang memikirkan.” (Qs. an-Nahl:11)

Qs. an-Nahl ayat 11 dijelaskan dalam tafsir al-Maraghi (1992), bahwa Allah SWT menumbuhkan berbagai tanaman dan segala jenis buah-buahan dengan air yang diturunkan dari langit sebagai rizki dan makanan pokok bagi ummatnya agar menjadi nikmat bagi umatnya. Kaum yang memikirkan akan tanda-tanda kekuasaan-Nya tentu akan dapat mengambil pelajaran dan manfaat terhadap segala ciptaan-Nya. Semua yang diciptakan oleh Allah baik di langit maupun di bumi tidak ada yang sia-sia. Salah satunya adalah memanfaatkan tanaman Anting-anting sebagai tanaman obat. Seperti halnya sabda Nabi Muhammad SAW dalam HR. Ibnu Majah berikut (Farooqi, 2005: 173):

" Allah tidak menciptakan suatu penyakit tanpa menciptakan pula obat untuknya- Barang siapa mengerti hal ini, ia mengetahuinya dan barang siapa tidak mengerti hal ini, ia tidak mengetahuinya kecuali kematian." (HR. Ibnu Majah)

Hadist di atas menunjukkan bahwa Allah Maha Adil, Allah menciptakan suatu penyakit dan diciptakan pula obatnya, hal ini akan diketahui oleh manusia dengan adanya ilmu. Ilmu pengetahuanlah yang akan menuntun manusia untuk mencari obat-obatan dari suatu penyakit. Jika manusia tidak mengembangkan ilmunya maka tidak akan pernah tahu bahwa sesungguhnya Allah menciptakan berbagai macam tumbuhan untuk dijadikan obat-obatan dari suatu penyakit.

Tanaman anting-anting (*Acalypha indica* L) merupakan tanaman liar yang dikenal sebagai salah satu tanaman obat yang tumbuh di pinggir jalan dan lapangan berumput serta lahan-lahan kosong diseluruh daerah tropis. Keberadaannya yang melimpah dan mudah diperoleh inilah yang memberikan peluang tanaman ini dapat ditingkatkan nilai ekonomi dan nilai gunanya yang belum dikenal manfaatnya secara umum di kalangan masyarakat. Beberapa

penelitian telah banyak dilakukan pada tanaman anting-anting diantaranya Hayati (2009) melakukan uji senyawa potensi antimalaria tanaman anting-anting (*Acalypha indica* L) Ekstraksi Pemisahan dan Bioaktivitasnya Secara in Vivo diperoleh ekstrak n-heksana menunjukkan potensi aktif sebagai antimalaria. Selain itu penelitian Zamrodi (2011) menyebutkan bahwa ekstrak etanol dari anting-anting mempunyai aktivitas antibakteri terhadap bakteri *E-coli*. Tanaman ini selain berpotensi sebagai antibakteri, penelitian Suyoso (2011) menyebutkan bahwa golongan flavonoid, dan triterpenoid pada ekstrak etanol juga mempunyai potensi sebagai antioksidan.

Kandungan senyawa kimia pada tanaman anting-anting adalah alkaloid, flavonoid, steroid, saponin, dan minyak atsiri (Kartika, 2009). Alkaloid merupakan salah satu komponen penting dari suatu tumbuhan. Berdasarkan penelitian terdahulu menyebutkan bahwa dalam tanaman anting-anting memiliki kandungan alkaloid yang cukup tinggi, sehingga memungkinkan untuk melakukan pemisahan alkaloid pada tanaman anting-anting. Alkaloid banyak ditemukan pada akar, biji, ranting, kulit kayu pada banyak tumbuhan (Simbala, 2009). Hasil penelitian Sriwahyuni (2010) menunjukkan adanya 2 golongan senyawa alkaloid pada ekstrak etil asetat dengan uji KLT. Selain itu penelitian Hayati (2012) yang telah menghasilkan senyawa alkaloid pada ekstrak etil asetat dengan dilakukan uji fitokimia dan Kromatografi Lapis Tipis. Diperkuat lagi dengan penelitian Wemay (2013) tentang uji fitokimia dan aktivitas analgesik ekstrak etanol pada anting-anting menghasilkan ekstrak etanol *Achalipa indica* L mengandung alkaloid dan saponin pada ketiga jenis ekstrak akar, daun dan batang.

Secara umum senyawa alkaloid sering digunakan dalam bidang pengobatan, seperti pengobatan penyakit malaria. Malaria merupakan salah satu penyakit infeksi yang sampai saat ini masih menjadi problematika dunia karena menyebabkan kematian yang tinggi dinegara berkembang dan Negara beriklim tropis. Tanaman kina (*Cinchona calisaya* Wedd) sudah dikenal sejak tahun 1820 sebagai salah satu jenis tanaman obat yang berkhasiat untuk mengobati penyakit malaria. Khasiat dari tanaman ini berasal dari senyawa alkaloid kuinin, kinidin yang dikandungnya (Winarno, 2006). Menurut penelitian Umami (2006) senyawa alkaloid dari daun cangkring (*Erythrina fusca*) dapat menghambat pertumbuhan *P. falciparum* secara in vitro dengan nilai IC₅₀ sebesar 2,07 micro g/ml. Hal ini diperkuat lagi dengan penelitian Husna (2011) menunjukkan bahwa kandungan senyawa alkaloid dalam ekstrak etil asetat anting-anting menunjukkan aktif sebagai antimalaria dengan menurunkan jumlah parasite *P. berghei* dengan penghambatan parasite 85-87%.

Pemisahan senyawa alkaloid yang terdapat dalam tanaman anting-anting dapat dilakukan dengan metode KLT dan kromatografi kolom. Metode pemisahan yang digunakan dalam penelitian ini adalah kromatografi kolom karena pemisahan kromatografi kolom dapat memberikan ketajaman pemisahan yang lebih baik, mengisolasi senyawa dalam jumlah besar, hasil yang didapat lebih banyak, dan optimal serta kepekaannya lebih tinggi. Penggunaan metode pemisahan ini didasarkan pada penelitian Alio (2013) yang memisahkan senyawa alkaloid dari ekstrak metanol dilakukan proses pemisahan menggunakan kromatografi kolom diperoleh 15 fraksi yang digabung berdasarkan warna yang didapat. Fraksi B13 dari kulit batang mangga (*Mangifera indica* L) yang terdapat

pada ekstrak kental metanol menghasilkan bercak noda tunggal dan diduga adalah senyawa alkaloid jenis indol.

Penggunaan metode kromatografi kolom untuk proses isolasi harus menggunakan fase gerak (eluen) terbaik. Penentuan eluen terbaik dapat dilakukan dengan melalui KLTA. Pemilihan eluen dengan menggunakan KLT mempunyai peran yang cukup penting untuk memisahkan senyawa aktif. Tetapi dalam penelitian ini tidak dilakukan melalui KLTA melainkan berdasarkan penelitian sebelumnya. Penelitian sebelumnya dilakukan oleh Husna (2011) yang menggunakan KLT dengan fase gerak kloroform:metanol (9,5:0,5) dan dihasilkan senyawa alkaloid dengan Rf 0,37-0,97. Rahmah (2014) menyatakan bahwa eluen terbaik untuk pemisahan alkaloid dengan KLT adalah campuran kloroform:metanol (9,5:0,5) dengan pereaksi dragendrooff menghasilkan 7 noda dengan Rf 0,21-0,92. Selain itu, secara umum fase gerak kloroform:metanol dengan berbagai komposisi kadar bisa digunakan untuk pemisahan berbagai senyawa, ekstrak dan fraksi dengan kemampuan yang luas (Saifudin, 2011).

Salah satu faktor yang paling berperan dalam keberhasilan suatu pemisahan dengan metode kromatografi kolom adalah kecepatan laju alir atau elusi yang dilakukan (Wonorahardjo, 2013). Laju alir harus dapat dikontrol dan diatur dengan tepat dan cukup lambat sehingga senyawa selalu berada dalam keseimbangan antara fase diam dan fase gerak. Untuk laju alir yang terlalu cepat, waktu kontak antara eluen dengan fase diam sangat kecil dan keseimbangan belum tercapai sehingga pemisahan kurang maksimal, sebaliknya jika kecepatan elusi terlalu kecil maka senyawa akan terdifusi kedalam eluen akibatnya

pemisahan kurang maksimal dan waktu yang dibutuhkan semakin lama (Kristanti, 2008).

Berdasarkan latar belakang diatas, maka pada penelitian ini dilakukan variasi kecepatan laju alir 1 mL/menit dan 2 mL/menit dalam mengisolasi senyawa alkaloid fraksi etil asetat ekstrak metanol tanaman anting-anting (*Achalipa indica* L) menggunakan kromatografi kolom. Mengingat penelitian terhadap kandungan senyawa alkaloid pada tanaman anting-anting (*Achalipa indica* L) yang berpotensi sebagai obat antimalaria masih sebatas ditingkat ekstrak kasar dan isolat hasil KLT, sementara penelitian di tingkat isolat hasil kromatografi kolom belum pernah dilaporkan. Maka dari itu, perlu dilakukan penelitian ini untuk mendapatkan kondisi yang paling baik dalam memisahkan dan menganalisis jenis senyawa alkaloid yang terkandung di dalam tanaman anting-anting (*Achalipa indica* L) di tingkat pemisahan isolat hasil kromatografi kolom agar tanaman anting-anting (*Achalipa indica* L) dapat lebih dimanfaatkan.

1.2 Rumusan Masalah

1. Berapa kecepatan laju alir yang terbaik dalam mengisolasi senyawa alkaloid fraksi etil asetat tanaman anting-anting (*Acalypha indica* L) menggunakan Kromatografi kolom?
2. Bagaimana hasil identifikasi senyawa alkaloid hasil isolasi kromatografi kolom fraksi etil asetat tanaman anting-anting (*Acalypha indica* L) menggunakan UPLC-MS?

1.3 Tujuan Penelitian

1. Untuk mengetahui kecepatan laju alir yang terbaik dalam mengisolasi senyawa alkaloid fraksi etil asetat tanaman anting-anting (*Acalypha indica* L) menggunakan Kromatografi kolom
2. Untuk mengetahui hasil identifikasi UPLC-MS pada Senyawa Alkaloid hasil Fraksi etil asetat tanaman anting-anting (*Acalypha indica* L) menggunakan Kromatografi Kolom.

1.4 Batasan Masalah

1. Tanaman anting-anting (*Achalipa indica* L) yang digunakan seluruh tanaman dan berasal dari daerah Landungsari Malang
2. Metode ekstraksi yang digunakan adalah ekstraksi maserasi dengan pelarut metanol dan ekstraksi cair-cair menggunakan pelarut etil asetat
3. Fase gerak yang digunakan adalah campuran kloroform dan metanol dengan perbandingan volume 9,5:0,5
4. Pemisahan yang digunakan yaitu kromatografi kolom dengan fase diam silika gel (0,063-0,200 mm)
5. Variasi kecepatan laju alir yang digunakan adalah 1 mL/menit dan 2 mL/menit

1.5 Manfaat Penelitian

1. Dapat memberikan informasi mengenai teknik pemisahan menggunakan kromatografi kolom senyawa alkaloid dalam tanaman anting-anting (*Acalypha indica* L)

2. Dapat memberikan informasi mengenai kecepatan laju alir yang terbaik terhadap pemisahan senyawa alkaloid fraksi etil asetat ekstrak metanol tanaman anting-anting (*Acalypha indica* L) menggunakan kromatografi kolom
3. Dapat memberikan informasi mengenai hasil analisis UPLC-MS pada isolasi senyawa Alkaloid dalam tanaman anting-anting (*Acalypha indica* L) dengan menggunakan kromatografi kolom.



BAB II

TINJAUAN PUSTAKA

2.1 Tanaman Anting-anting (*Acalypha indica* L)

2.1.1 Morfologi

Tanaman anting-anting (*Acalypha indica* L) merupakan salah satu tanaman semak yang sangat umum ditemukan dan tumbuh liar di pinggir jalan, di lereng gunung maupun lapangan berumput pada daerah tropis (Muslimah, 2008). Tanaman anting-anting merupakan tumbuhan perdu semusim tumbuh tegak dan berambut, tinggi 30-50 cm, letak daun berseling, tersebar, ujung dan pangkal runcing, tepi begigi, dan berwarna hijau. Bunganya berbentuk kecil-kecil keluar dari ketiak daun, bentuknya mengerucut seperti anting-anting sehingga disebut tumbuhan anting-anting. Buahnya kecil, bentuk bulat panjang, dan berwarna coklat, akar dari tanaman ini bentuknya tunggang, berwarna putih, disukai kucing disebut juga tumbuhan kucing-kucingan. (Wijayakusuma, 2006).

Salah satu ciptaan atau karunia Allah SWT adalah aneka ragam tumbuhan dengan segala macam jenis dan bentuknya. Bentuk, warna dan rasa yang dimiliki oleh tanaman anting-anting menunjukkan kekuasaan yang amat menakjubkan dan membuktikan betapa agung penciptaan Allah SWT. Sebagaimana firman Allah SWT dalam Qs al-An'am ayat 141 yang berbunyi:

﴿ وَهُوَ الَّذِي أَنْشَأَ جَنَّاتٍ مَعْرُوشَاتٍ وَغَيْرَ مَعْرُوشَاتٍ وَالنَّخْلَ وَالزَّرْعَ مُخْتَلِفًا أَكْلُهُ وَالزَّيْتُونَ وَالرُّمَّانَ مُتَشَابِهًا وَغَيْرَ مُتَشَابِهٍ ۚ كُلُوا مِنْ ثَمَرِهِ إِذَا أَثْمَرَ وَآتُوا حَقَّهُ يَوْمَ حَصَادِهِ ۗ وَلَا تُسْرِفُوا ۚ إِنَّهُ لَا يُحِبُّ

الْمُسْرِفِينَ ۙ ١٤١

Artinya:

“dan Dialah yang menjadikan kebun-kebon yang berjunjung dan yang tidak berjunjung, pohon korma, tanam-tanaman yang bermacam-macam buahnya, zaitun dan delima yang serupa (bentuk dan warnanya) dan tidak sama (rasanya). makanlah dari buahnya (yang bermacam-macam itu) bila dia berbuah, dan tunaikanlah haknya di hari memetik hasilnya (dengan disedekahkan kepada fakir miskin); dan janganlah kamu berlebih-lebihan. Sesungguhnya Allah tidak menyukai orang yang berlebih-lebihan.”(al-An’am ayat 141)

Qs. al-An’am ayat 141 dijelaskan dalam tafsir Imam Syafi’i (2007) bahwa Allah menumbuhkan berbagai macam tanaman yang memiliki bentuk, warna, dan rasa yang sama/berbeda meskipun tumbuh didaerah yang sama. Melalui tanaman tersebut Allah menunjukkan kekuasaan, kekuatan dan kasih sayang yang tidak terbatas kepada manusia dengan memperbolehkan manusia untuk menikmati hasilnya dengan tidak melupakan saudaranya (kaum kafir miskin). Setiap macam tumbuhan diciptakan Allah SWT untuk kepentingan umat manusia.

2.1.2 Klasifikasi

Klasifikasi (Taksonomi) tanaman anting-anting adalah sebagai berikut (Hutapea, 1993):

Kingdom	: Plantae (tumbuhan)
Subkingdom	: Tracheobiontai (berpembuluh)
Superdeviso	: Spermatophyta (menghasilkan biji)
Devisi	: Magnoliophyta (berbunga)
Kelas	: Magnoliopsida/ Dicotyledonae (dikotil)
Sub-kelas	: Rosidae
Ordo	: Euphorbiales
Familia	: Euphorbiaceae
Genus	: <i>Acalypha</i>
Spesies	: <i>Acalypha indica</i> Linn



Gambar 2.1 Tanaman Anting-anting (*Acalypha Indica* L)

Tanaman anting-anting di beberapa daerah dikenal dengan sebutan ceka mas (Melayu) Lelatang (Jakarta), rumput kokosongan (Sunda), rumput bolong bolong (Jawa) (Muslimah, 2008). Nama asing tanaman ini adalah Tie xian (Cina), *copperleaf herb* (Inggris). Marga *Acalypha* menunjukkan adanya golongan senyawa alkaloid, amida, glukosida dan sterol (Wei-Feng, *et al.*, 1994).

2.2.3 Kandungan Kimia

Kandungan kimia tanaman anting-anting adalah *Acalypine glikosida*, *inositol metileneter*, *triacetomamine* dan minyak atsiri (Azmahani, dkk, 2002). Menurut Wijayakusuma (2006) tanaman anting-anting mengandung senyawa alkaloid, *Acalypha* dan asam galat. Berdasarkan penelitian Felicia (2009) menyebutkan bahwa hasil uji fitokimia ekstrak air akar anting-anting menunjukkan adanya golongan alkaloid, saponin dan tanin. Sedangkan penelitian Halimah (2010) menyebutkan bahwa daun tanaman anting-anting mengandung saponin, tanin, flavonoid. Penelitian tersebut diperkuat oleh Sriwahyuni (2010) yang menunjukkan bahwa golongan senyawa yang terdapat dalam ekstrak etil asetat tanaman anting-anting dari hasil uji fitokimia menunjukkan adanya golongan senyawa tanin, alkaloid dan steroid.

2.2.4 Manfaat Tumbuhan

Allah berfirman dalam Qs. asy Syu'araa ayat 80 yaitu:

وَإِذَا مَرِضْتُ فَهُوَ يَشْفِينِ ٨٠

Artinya:

“dan apabila aku sakit (manusia), Dialah (yaitu Allah) yang menyembuhkan aku (manusia),”

Qs. asy Syu'araa ayat 80 dijelaskan dalam tafsir al-Maraghi (1992) bahwa Allah SWT akan memberikan kesembuhan kepada manusia ketika sakit, sehingga dengan izin-Nya penyakit tersebut akan hilang. Segala penyakit yang diberikan oleh Allah SWT, tentunya sudah tersedia obat yang juga diberikan oleh Allah. Akan tetapi, kesembuhan tersebut dapat diperoleh oleh manusia dengan jalan ikhtiar kepada Allah SWT. Ikhtiar ini dapat diwujudkan dengan doa dan usaha, salah satu usaha tersebut adalah dengan mencari obat dan mengkonsumsinya.

Tanaman anting-anting yang merupakan tanaman liar memiliki kandungan senyawa alkaloid yang dapat digunakan sebagai obat. Bagian-bagian tanaman anting-anting digunakan untuk pengobatan tradisional, buahnya dapat digunakan untuk mengobati asma, batuk, bronkitis, dan sakit telinga. Seluruh bagian tanaman digunakan sebagai ekspektoran, laksatif, dan rematik. Daunnya digunakan untuk mengobati penyakit kulit (Hutapea, 1993). Menurut Hayati (2009) ekstrak kasar pada tanaman anting-anting berpotensi sebagai antimalaria. Ekstrak etanol dari anting-anting mempunyai aktivitas sebagai antibakteri (Zamrodi, 2011). Selain itu ekstrak etanol tanaman anting-anting juga berpotensi sebagai antioksidan (Suyoso, 2011).

2.2 Alkaloid

2.2.1 Pengertian Alkaloid

Alkaloid merupakan suatu golongan senyawa organik yang terbanyak ditemukan di alam. Hampir seluruh senyawa alkaloid berasal dari tumbuh-tumbuhan dan tersebar luas dalam berbagai jenis tumbuhan. Lebih dari 5000 senyawa alkaloid yang ditemukan dalam tumbuhan mempunyai keaktifan fisiologis tertentu. Semua alkaloid mengandung paling sedikit satu atom nitrogen yang biasanya bersifat basa (Lenny, 2006). Fungsi alkaloid bagi tumbuhan yaitu sebagai zat beracun untuk melawan serangga atau hewan pemakan tumbuhan, faktor pengatur tubuh, substansi cadangan untuk memenuhi kebutuhan nitrogen, dan elemen-elemen lain yang penting bagi tumbuhan, dapat mempertahankan keseimbangan basa mineral dalam mempertahankan keseimbangan ion dalam tumbuhan karena alkaloid memiliki sifat basa. Sedangkan dalam pengobatan, alkaloid memberikan efek fisiologis pada susunan syaraf pusat (obat anti rasa sakit dan obat tidur), dalam jumlah besar sangat beracun terhadap manusia (Robinson, 1995).

2.2.2 Sifat Fisika

Kebanyakan alkaloid diisolasi berupa padatan kristal dengan titik didih berkisar 87°C - 238°C . Alkaloid sedikit amorf, beberapa berupa cairan seperti nikotin dan koniin. Kebanyakan alkaloid tidak berwarna namun beberapa senyawa kompleks spesies aromatik berwarna seperti berberin berwarna kuning dan betanin berwarna merah. Pada umumnya alkaloid larut dalam pelarut organik namun ada beberapa yang larut dalam air seperti pseudoalkaloid dan

protoalkaloid, garam alkaloid dan alkaloid quartener sangat larut dalam air (Sastrohamidjojo, 1996).

2.2.3 Sifat Kimia

Alkaloid terdiri atas karbon, hidrogen, dan nitrogen, sebagian besar diantaranya mengandung oksigen. Senyawa ini bersifat basa dan sifat ini bergantung pada adanya pasangan elektron pada nitrogen. Jika gugus fungsional yang berdekatan dengan nitrogen bersifat melepaskan elektron contoh gugus alkil, maka kesediaan elektron pada nitrogen naik dan senyawa ini lebih bersifat basa. Bila gugus fungsional yang berdekatan bersifat menarik elektron maka kesediaan pasangan elektron berkurang dan pengaruh yang ditimbulkan alkaloid dapat bersifat netral atau bahkan sedikit asam (Sastrohamidjojo, 1996).

2.2.4 Penggolongan Alkaloid

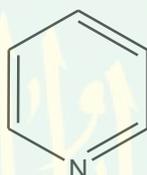
Alkaloida tidak mempunyai tatanan sistematis, oleh karena itu, suatu alkaloida dinyatakan dengan nama trivial, misalnya kuinin, morfin dan strikhnin. Hampir semua nama trivial ini berakhiran -in yang mencirikan alkaloid. Klasifikasi alkaloid dapat dilakukan berdasarkan beberapa cara, yaitu (Robinson, 1995):

1. Berdasarkan jenis cincin heterosiklik nitrogen yang merupakan bagian dari struktur molekul. Berdasarkan hal tersebut, maka alkaloid dapat dibedakan atas beberapa jenis seperti alkaloid pirolidin, alkaloid piperidin, alkaloid isokuinolin, alkaloid kuinolin, dan alkaloid indol.
2. Berdasarkan jenis tumbuhan darimana alkaloid ditemukan. Berdasarkan cara ini, alkaloid dapat dibedakan atas beberapa jenis yaitu alkaloid tembakau, alkaloid amaryllidaceae, alkaloid erythrine dan sebagainya. Cara ini

mempunyai kelemahan, yaitu : beberapa alkaloid yang berasal dari tumbuhan tertentu dapat mempunyai struktur yang berbeda-beda.

3. Berdasarkan asal-usul biogenetik. Cara ini sangat berguna untuk menjelaskan hubungan antara berbagai alkaloid yang diklasifikasikan berdasarkan berbagai jenis cincin heterosiklik. Dari biosintesa alkaloid, menunjukkan bahwa alkaloid berasal hanya dari beberapa asam amino tertentu saja.

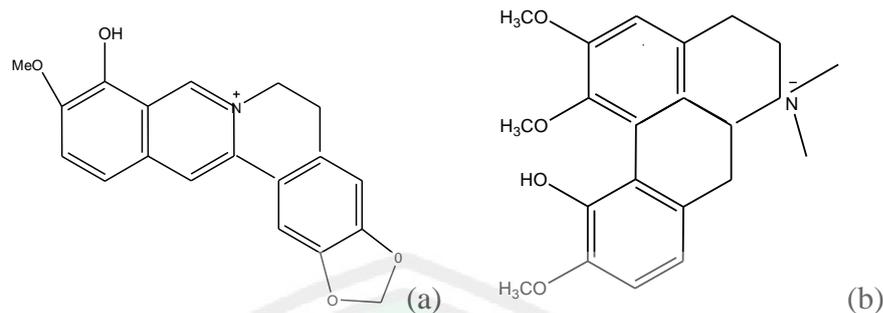
Berikut salah satu struktur senyawa alkaloid dapat dilihat pada Gambar 2.2 berikut:



Gambar 2.2: Struktur Sederhana Senyawa Alkaloid (Piridina)

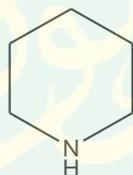
Sebagian besar alkaloid bersifat heterogen dan mempunyai kerangka dasar polisiklik termasuk cincin heterosiklik nitrogen serta mengandung substituen yang tidak terlalu bervariasi. Atom nitrogen alkali hampir selalu berada dalam bentuk gugus amin ($-NR_2$) atau gugus amida ($-CO-NR_2$) dan tidak pernah dalam bentuk gugus nitro (NO_2) atau gugus diazo. Sedangkan substituen oksigen biasanya ditemukan sebagai gugus fenol ($-OH$), metoksi ($-OCH_3$) atau gugus metilendioksi ($-O-CH_2-O$) substituen oksigen ini dan gugus N-metil merupakan ciri sebagian besar alkaloid (Lenny, 2006). Alkaloid umumnya mencakup senyawa-senyawa bersifat basa yang mengandung satu atau lebih atom nitrogen (Robinson, 1995).

Beberapa contoh senyawa golongan alkaloid yang berhasil diisolasi adalah Berberine dan menisperine yang mempunyai struktur seperti pada Gambar 2.3 berikut:



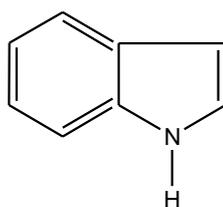
Gambar 2.3 (a) Senyawa Berberin dan (b) Senyawa Menisperin

Senyawa tersebut merupakan senyawa yang berhasil diisolasi Husna (2011) pada ekstrak kasar etil asetat tanaman anting-anting yang mengandung senyawa berberin dan menisperin. Selain itu, Riska (2013) berhasil mengisolasi senyawa alkaloid jenis piperidin. Senyawa tersebut merupakan senyawa golongan alkaloid pada kulit batang mangga. Struktur senyawa tersebut seperti pada Gambar 2.4 berikut:



Gambar 2.4 Senyawa Piperidina

Alio, *et al.*, (2013) telah melakukan isolasi dan karakterisasi senyawa alkaloid dari biji tumbuhan sirsak (*Annona Muricata* Linn) dan diperoleh senyawa golongan alkaloid jenis alkaloid indol, Struktur senyawa alkaloid indol tersebut seperti pada Gambar 2.5:



Gambar 2.5 Senyawa Indol

2.3 Ekstraksi Senyawa Alkaloid

Ekstraksi adalah proses penarikan atau penyarian komponen zat aktif dari bagian tanaman obat, hewan, dan beberapa jenis ikan termasuk biota laut. Tujuan ekstraksi bahan alam adalah untuk menarik komponen kimia yang terdapat pada bahan alam (Harborne, 1987). Ekstraksi alkaloid dilakukan berdasarkan sifat umum yang dimilikinya. Ekstraksi alkaloid dapat dilakukan dengan suasana asam, basa dan netral. Dalam suasana netral dapat dipakai alkohol atau air, dalam suasana asam dengan alkohol atau air yang mengandung 1-2% asam mineral dan dalam suasana basa dengan alkohol atau kloroform yang dibasakan dengan ammonia (Harborne, 1987).

Ekstraksi pada penelitian ini dilakukan dengan metode maserasi. Maserasi adalah proses perendaman sampel menggunakan pelarut organik pada suhu ruang. Maserasi sangat menguntungkan dalam isolasi senyawa bahan alam yang volatil. Metode maserasi dipilih karena relatif murah, sederhana, dan mudah dilakukan karena tidak memerlukan peralatan yang rumit, terjadi kontak antara sampel dan pelarut yang cukup lama dan dapat menghindari kerusakan komponen senyawa yang tidak tahan panas. Kekurangannya adalah membutuhkan waktu yang lama untuk mencari pelarut organik dan harus mempunyai titik didih yang tinggi pula sehingga tidak mudah menguap (Voight, 1995). Proses maserasi dilakukan berulang hingga warna anting-anting dan filtrat hasil maserasi berubah lebih pucat. Ekstrak yang diperoleh disaring kemudian di pekatkan menggunakan *Rotary evaporator vacuum*. Pemekatan ini bertujuan untuk memisahkan pelarut metanol dengan ekstrak kasar metanol anting-anting.

Pemilihan pelarut organik yang digunakan dalam ekstraksi komponen aktif merupakan faktor penting untuk mencapai tujuan dan sasaran ekstraksi komponen selain itu dapat memberikan efektivitas yang tinggi dengan memperhatikan kelarutan senyawa bahan alam dalam pelarut tersebut. Sifat kelarutan zat didasarkan pada teori *like dissolve like* dimana zat yang bersifat polar akan larut dalam pelarut polar, dan zat yang bersifat non polar akan melarutkan senyawa non polar (Khopkar, 2003). Tabel 2.1 menunjukkan sifat fisik beberapa jenis pelarut organik yang dapat digunakan untuk ekstraksi. Semakin tinggi nilai konstanta dielektrik, titik didih dan kelarutan dalam air, maka pelarut akan bersifat makin polar (Sudarmadji, dkk., 2007).

Tabel 2.1 Konstanta dielektrikum dan tingkat kelarutan beberapa pelarut

Jenis pelarut	Konstanta dielektrikum	Tingkat kelarutan dalam air	Titik didih (°C)
Heksana	1,9	TL	68,7
Petroleum eter	2,28	TL	60
Kloroform	4,81	S	61,3
Etil asetat	6,02	S	77,1
Metil klorida	9,08	S	39,75
Etanol	24,30	L	78,5
Metanol	33,60	L	64
Air	78,4	L	100

Keterangan: TL = tidak larut; S = sedikit; L = larut dalam berbagai proporsi
 Sumber: Fesenden dan Fesenden (1997), dan Mulyono (2009)

Lenny (2006) mengatakan bahwa pelarut-pelarut golongan alkohol merupakan pelarut yang paling banyak digunakan dalam proses isolasi senyawa organik bahan alam karena dapat melarutkan senyawa metabolit sekunder secara maksimal. Salah satu pelarut alkohol yang digunakan untuk ekstraksi maserasi adalah metanol. Metanol memiliki beberapa kelebihan sebagai pelarut ekstraksi

karena termasuk pelarut universal karena dapat melarutkan hampir semua senyawa organik yang bersifat polar, semi polar dan non polar, menghambat kerja enzim, memperbaiki stabilitas bahan obat terlarut, mengendapkan protein, lebih selektif, dan titik didih pelarut metanol sangat rendah yaitu 64°C, selain itu dikhawatirkan alkaloid masih terikat dengan gugus gula sehingga menggunakan pelarut polar.

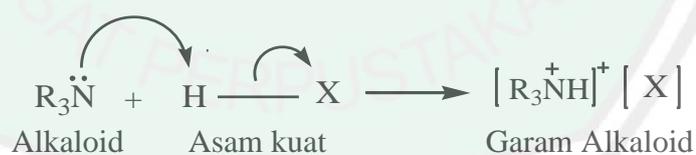
Pyne (2012) melakukan maserasi pada tanaman anting-anting menggunakan variasi pelarut metanol, kloroform dan n-heksan, diperoleh rendemen yang tertinggi adalah pelarut metanol dengan hasil 22,5%, sedangkan kloroform dengan hasil rendemen 10,2% dan hasil rendemen dari n-heksan adalah 9,5%. Muadifah (2013) melakukan maserasi pada tanaman anting-anting (*Acalypha indica* L) menggunakan pelarut metanol diperoleh rendemen sebesar 23%. Selain itu Rahmah (2014) juga mengekstrak alkaloid tanaman anting-anting dengan cara metode maserasi menggunakan pelarut metanol diperoleh rendemen sebesar 12,11%.

2.4 Fraksinasi Ekstrak Kasar Metanol

Fraksinasi adalah proses untuk memisahkan golongan utama kandungan senyawa yang satu dengan golongan utama yang lainnya dari suatu ekstrak sebelum dilakukan kromatografi. Senyawa akan lebih terlarut pada pelarut yang memiliki kemiripan sifat dengan senyawa tersebut. Sifat kimia yang membedakan senyawa nitrogen dari senyawa organik lain adalah dari sifat kebiasaannya; jadi membentuk garam dengan asam mineral. Selain itu, dapat diekstraksi dari jaringan tumbuhan dengan menggunakan pelarut asam lemak dan kemudian

terendapkan secara terpisah dari ekstrak tersebut dengan menambahkan ammonia (Harborne, 1987).

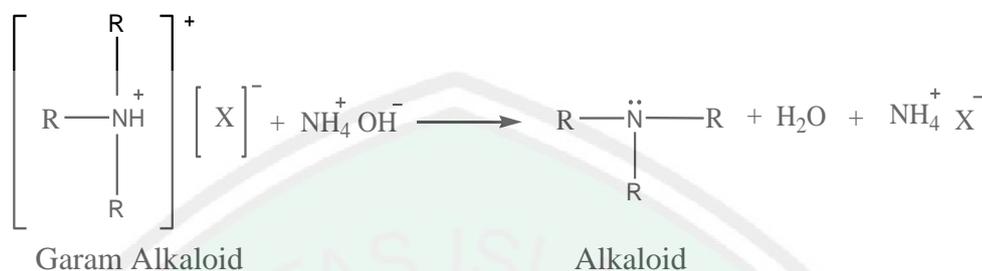
Robinson (1995) menyatakan bahwa untuk memisahkan alkaloida disekat pada pH tertentu dengan pelarut organik (*Asas Keller*). Prinsip pengerjaan dengan *Asas Keller* yaitu alkaloida yang terdapat dalam suatu sampel sebagai bentuk garam dari hasil pengasaman, dibebaskan dari ikatan garam tersebut menjadi alkaloida yang bebas, untuk itu ditambahkan basa lain yang lebih kuat dari pada basa alkaloid. Alkaloid yang bebas tadi diekstraksi dengan pelarut tertentu, misalnya dengan etil asetat, kloroform. Alkaloid biasanya diperoleh dengan cara mengekstraksi bahan memakai air yang diasamkan. Hal ini bertujuan untuk membentuk garam alkaloid amina serta memperbesar kelarutan alkaloid dalam air (Robinson, 1995). Alkaloid amina bereaksi dengan asam kuat akan membentuk garam alkilamonium. Jenis reaksi amina ini digunakan untuk memisahkan amina dari zat netral atau zat yang larut dalam air bersuasana asam. Reaksi Amina dapat dilihat pada Gambar 2.6 berikut ini:



Gambar 2.6: Reaksi Amina dengan asam kuat

Garam alkaloid dari hasil pengasaman dapat dibasakan dengan penambahan NH_4OH yang semula dalam bentuk garamnya yang larut dalam air akan menjadi alkaloid bebas yang tidak larut dalam air tapi larut dalam pelarut organik seperti kloroform atau eter. Dimana proses ini merupakan proses

pembebasan amina dari garamnya dengan penambahan basa lemah yang sesuai reaksi pada Gambar 2.7 (Robinson, 1995):



Gambar 2.7: Reaksi pembebasan amina dengan cara pembasaan

Partisi menggunakan pelarut etil asetat bertujuan agar senyawa-senyawa yang memiliki kepolaran yang sama dengan etil asetat akan berpartisi ke etil asetat. Penggunaan fraksi etil asetat ini adalah berdasarkan pada penelitian sebelumnya yang dilakukan oleh Kusri (2013) melakukan fraksinasi ekstrak kasar metanol dengan penambahan HCl 2 N dan dipartisi dengan etil asetat diperoleh fraksi etil asetat mengandung senyawa alkaloid total dengan adanya endapan putih kekuning-kuningan setelah disemprot Mayer. Selain itu, Nassel (2008) telah melakukan fraksinasi ekstrak metanol dari tumbuhan *Larrea tridentata* dengan penambahan asam dan basa kemudian di partisi dengan etil asetat menghasilkan rendemen fraksi etil asetat asam 0,084%, sedangkan fraksi etil asetat basa 0,077% dan keduanya diuji dengan pereaksi menghasilkan positif alkaloid.

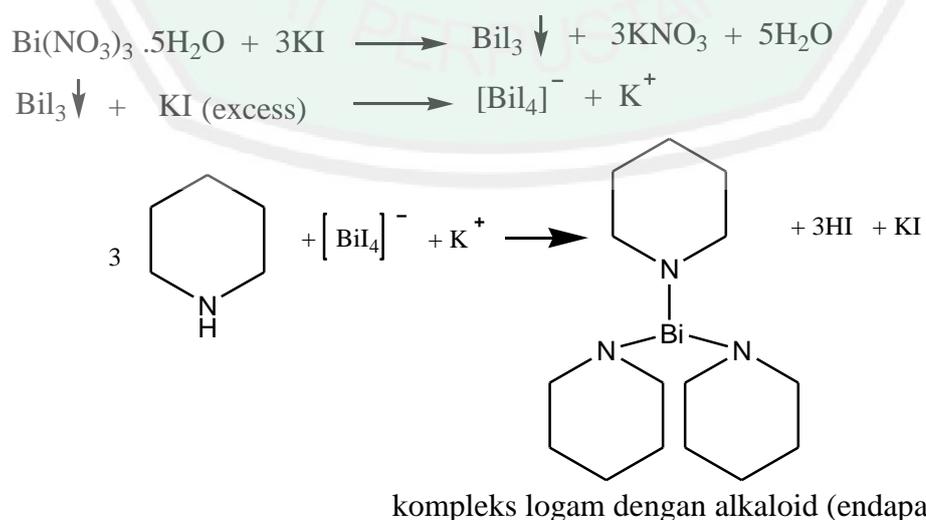
2.5 Uji Fitokimia Senyawa Alkaloid dengan Reagen

Uji kualitatif senyawa alkaloid dilakukan dengan uji fitokimia. Uji fitokimia merupakan pengujian kandungan senyawa-senyawa di dalam tumbuhan. Tumbuhan umumnya mengandung senyawa aktif dalam bentuk metabolit

sekunder seperti flavonoid, tanin, alkaloid, triterpenoid (Lenny, 2006). Bukti kualitatif untuk menunjukkan adanya alkaloid dan pencirian kasar dapat diperoleh dengan menggunakan berbagai pereaksi alkaloid. Pereaksi Dragendorff (kalium tetraiodobismutat) paling banyak digunakan untuk mendeteksi adanya alkaloid karena pereaksi ini mengendapkan hampir semua alkaloid. Pereaksi lain yang sering digunakan seperti pereaksi Wagner (iodium dalam kalium iodida), asam silikotungstat 5 %, asam tanat 5 %, pereaksi Mayer dan Iodoplatinat.

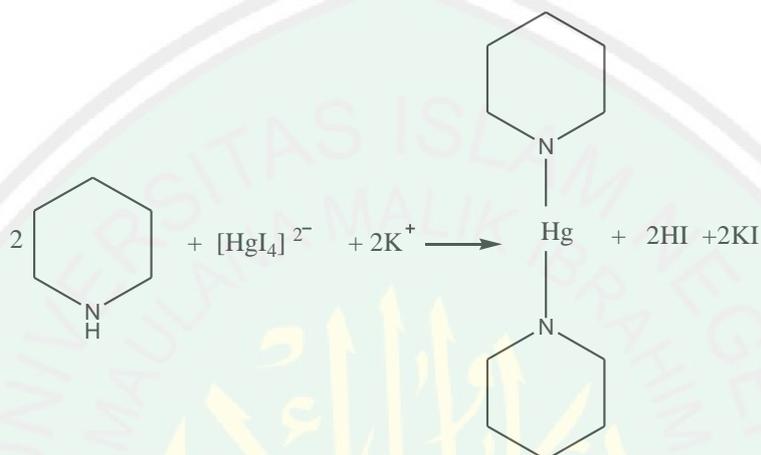
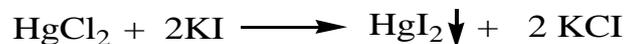
Uji fitokimia senyawa alkaloid dilakukan dengan uji Dragendorff dan Mayer. Prinsip dasar dari uji Dragendorff adalah senyawa alkaloid dapat mengalami kompleks logam dengan ditandai adanya endapan jingga karena bereaksi dengan tetraiodobismut. Sedangkan prinsip dasar dari uji Mayer adalah senyawa alkaloid dapat mengalami kompleks logam dengan ditandai adanya endapan putih kekuningan karena bereaksi dengan tetraiodomerkurat (Robinson, 1995).

Reaksi dugaan antara alkaloid dengan reagen Dragendorff ditunjukkan pada Gambar 2.8 berikut ini:



Gambar 2.8. Reaksi dugaan antara alkaloid dengan Dragendorff (Rahmah, 2014)

Reaksi dugaan yang terjadi antara alkaloid dengan reagen Mayer ditunjukkan pada Gambar 2.9 berikut ini:



Kompleks logam dengan alkaloid (endapan putih kekuningan)

Gambar 2.9 Reaksi dugaan antara alkaloid dengan Mayer (Rahmah, 2014)

Mamidala, *et al.*, (2014) telah melakukan uji fitokimia pada tanaman anting-anting (*Acalypha indica* L) yang diekstrak dengan menggunakan metanol, aseton, etil asetat, kloroform, n-heksana, dan diperoleh data seperti pada Tabel 2.2 berikut ini:

Tabel 2.2 Hasil Uji Fitokimia Tanaman Anting-anting (Mamidala, *et al.*, 2014)

Golongan Senyawa	Pelarut				
	Metanol	Aseton	Etil asetat	Kloroform	n-heksana
Alkaloid	+++	+++	+++	+++	+++
Protein	+++	+	++	+++	+++
Glikosida	+++	+++	+++	+++	+++
Saponin	-	-	-	-	-
Fenol	-	+	-	++	+++
Karbohidrat	+++	+++	+++	++	++

Sriwahyuni, (2010) telah melakukan uji fitokimia pada ekstrak etil asetat tanaman anting-anting menggunakan pereaksi Mayer dan Dragendorf. Diperoleh ekstrak positif senyawa alkaloid yang ditunjukkan dengan terbentuknya endapan putih kekuningan dan endapan jingga. Sementara Hayati, *et al.*, (2012) melakukan uji fitokimia dengan KLT pada ekstrak etil asetat tanaman anting-anting menggunakan pereaksi Dragendorf. Pereaksi Dragendorf disemprotkan pada plat dan diperoleh warna kuning orange pada spot yang positif senyawa alkaloid. Selain itu, Rahmah (2014) melakukan uji fitokimia senyawa alkaloid dengan reagen pada fraksi etil asetat tanaman anting-anting menggunakan pereaksi Mayer dan Dragendorf. Diperoleh ekstrak positif senyawa alkaloid yang ditunjukkan dengan terbentuknya endapan putih kekuningan dan endapan jingga.

2.6 Pemisahan Senyawa Alkaloid menggunakan Kromatografi Kolom

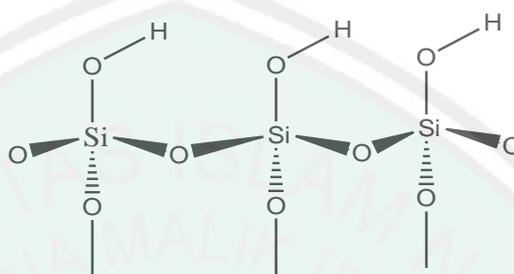
Pada dasarnya isolasi senyawa kimia dari bahan alam adalah sebuah cara untuk memisahkan senyawa yang bercampur sehingga dapat menghasilkan senyawa tunggal yang murni. Isolasi adalah cara pemisahan komponen-komponen kimia yang terdapat dalam suatu bahan alam. Cara isolasi senyawa metabolit sekunder biasanya terdiri dari ekstraksi, fraksinasi, pemisahan menggunakan berbagai teknik kromatografi, pemurnian dengan cara rekristalisasi dan identifikasi serta karakterisasi. Pemisahan kandungan tumbuhan terutama dilakukan dengan menggunakan salah satu dari empat teknik kromatografi. Keempat teknik kromatografi itu adalah Kromatografi Lapis Tipis, Kromatografi Kolom, kromatografi gas cair (KGC), kromatografi cair kinerja tinggi (Harborne, 1987).

Kromatografi kolom adalah salah satu metode pemisahan senyawa yang telah lama ada dan masih banyak digunakan. Pemisahan senyawa menggunakan kromatografi kolom sangat efisien untuk memisahkan senyawa-senyawa dalam jumlah banyak. Pemisahan menggunakan kromatografi kolom berdasarkan pada adsorpsi dan partisi (Gritter, 1991). Fase gerak yang dipilih pada penelitian ini disesuaikan dengan sifat kelarutan senyawa yang akan dianalisis. Pemisahan senyawa alkaloid ini menggunakan fase gerak kloroform:metanol dengan perbandingan volume 9,5:0,5. Pemakaian fase gerak tersebut berdasarkan pada penelitian sebelumnya yaitu Husna (2011) menganalisis ekstrak etil asetat tanaman anting-anting dengan menggunakan KLT dengan fase gerak kloroform:metanol (9,5:0,5) pendeteksi UV 366 nm serta penampak noda dragendroff dan dihasilkan senyawa alkaloid dengan Rf 0,37-0,97.

Penelitian lainnya Rahmah (2014) menyatakan bahwa eluen terbaik untuk memisahkan alkaloid dengan KLT dari hasil fraksinasi kloroform adalah campuran kloroform:metanol (9,5:0,5) dengan pendeteksi UV 254 nm dan 366 nm serta dengan pereaksi dragendroff menghasilkan 7 noda dengan memberikan nilai Rf 0,21-0,92. Secara umum fase gerak kloroform:metanol dengan berbagai komposisi kadar bisa digunakan untuk pemisahan berbagai senyawa, ekstrak dan fraksi dengan kemampuan yang luas. Dengan catatan kadar metanolnya kurang dari 20%, karena jumlah methanol yang melebihi 25% akan merusak lapisan fase diam silica, mudahnya dengan perbandingan kloroform : metanol 9:1 ; 9,5:0,5 (Saifudin, 2011).

Fase diam yang digunakan pada proses pemisahan kromatografi kolom adalah silika gel G-60 (0,063 – 0,200 mm). Silika gel merupakan fase diam yang

paling banyak digunakan dalam pemisahan bahan alam. Silika gel memberikan luas permukaan yang besar dikarenakan ukuran partikel silika gel yang kecil. Adapun struktur dasar silika gel dapat dilihat pada gambar 2.10 (Noviyanti, dkk., 2010):



Gambar 2.10 Struktur Silika Gel

Permukaan silika gel ini mengandung gugus silanol, hidroksil yang terdapat pada gugus silanol ini merupakan pusat aktif dan berpotensi mampu membentuk ikatan hidrogen yang kuat dengan senyawa yang akan dipisahkan. Silika gel membentuk ikatan hidrogen terutama dengan donor H seperti alkohol, fenol, amina, amida dan asam karboksilat. Sehingga semakin kuat kemampuan ikatan hidrogen suatu senyawa maka semakin kuat akan tertahan pada silika gel (Noviyanti, 2010).

Penggunaan metode pemisahan dengan kromatografi kolom ini didasarkan atas penelitian Alio.,dkk (2013) telah memisahkan senyawa alkaloid dari ekstrak metanol biji tumbuhan sirsak (*Annona murcata* Linn) dilakukan proses pemisahan menggunakan kromatografi kolom dengan fasa diam silika gel GF₆₀ dan di elusi berturut-turut dengan fase gerak kloroform:metanol (9:1) sehingga diperoleh 125 vial dan digabung berdasarkan warna yang didapat kemudian diperoleh 15 fraksi. Fraksi B13 hasil kromatografi kolom sebanyak 0,06 gram menghasilkan bercak

noda tunggal. Isolat berupa senyawa yang berbentuk padatan kristal berwarna kuning yang diduga sebagai senyawa alkaloid. Kemudian diidentifikasi menggunakan IR dan UV-Vis dan diduga adalah senyawa alkaloid jenis alkaloid indol. Penggabungan fraksi berdasarkan warna yang didapat dari kromatografi kolom ditampilkan pada Tabel 2.3 berikut:

Tabel 2.3 Hasil penggabungan fraksi dari kromatografi kolom (Alio.,dkk, 2013)

Fraksi	Berat (gr)	Warna Hasil Kolom
B1 (2-7)	0,02	Hijau Bening
B2 (8)	0,01	Bening
B3 (9-17)	0,1	Hijau Bening
B4 (18-21)	0,04	Bening
B5 (22-37)	0,14	Hijau Bening
B6 (38-44)	0,1	Bening
B7 (45-48)	0,02	Bening Kehijauan
B8 (49-55)	0,09	Putih Keruh
B9 (56-63)	0,03	Coklat Keruh
B10 (64-67)	0,02	Kuning Keruh
B11 (68-82)	0,05	Putih Keruh
B12 (83-90)	0,28	Kuning
B13 (91-93)	0,06	Kecoklatan
B14 (94-107)	0,68	Kuning
B15 (108-125)	0,17	Kuning kecoklatan

Hal yang paling berperan pada keberhasilan pemisahan dengan kromatografi kolom adalah pemilihan adsorben dan eluen/pelarut, dimensi kolom yang digunakan serta kecepatan elusi yang dilakukan. Pada kecepatan laju alir/elusi sebaiknya dibuat konstan. Kecepatan tersebut harus cukup lambat agar senyawa berada dalam keseimbangan antara fasa diam dan fasa gerak. Di dalam kolom konsentrasi di fase gerak dan fase diam menyebar akan secara homogen walau masih bergantung pada sifat fisika dan kimia masing-masing komponen. Semakin rendah kecepatan arus cairan, semakin baik akibatnya bagi tercapainya

keseimbangan adsorpsi dan akan semakin baik pula pemisahannya. Tetapi kecepatan arus yang terlalu rendah dapat menimbulkan efek difusi dalam fasa mobil yang harus dihindarkan sejauh mungkin. Sementara itu jika aliran fase gerak tidak memberikan kesempatan kumpulan molekul komponen untuk mencapai keadaan setimbang, maka akan terjadi deviasi yang disebabkan oleh transfer massa yang tidak seimbang dari kumpulan molekul komponen di fase diam ke fase gerak dan sebaliknya (Kristanti, 2008).

Zhou (2005) telah melakukan isolasi dan pemurnian senyawa flavonoid dari *Trollius ledebouri* menggunakan kromatografi cair kinerja tinggi dengan menggunakan variasi laju alir 1,5 mL/menit dan 2,5 mL/menit diperoleh laju alir yang optimal adalah 1,5 mL/menit dengan menghasilkan berat 9,3 mg dan kemurnian senyawa 97%. Sementara Kong (2005) melakukan isolasi dan pemurnian senyawa alkaloid dari obat herbal China *Evodia rutaecarpa (Juss.)* menggunakan kromatografi cair kinerja tinggi dengan laju alir 2 mL/ menit dan diperoleh hasil pemisahan senyawa turunan alkaloid 1-methy-2-6,9-pentadecadienyl-4-quinolone dan 1--methyl-2-dodecyl-4-quinolone.

2.7 Uji Kuantitatif Senyawa Alkaloid

Uji kuantitatif senyawa alkaloid dilakukan dengan Penetapan kadar alkaloid total menggunakan metode gravimetri yang didahului dengan proses pengendapan. Uji pendahuluan sebelum penentuan alkaloid total yaitu dengan penambahan reagen Meyer atau Dragendorff pada ekstrak etanol Anting-anting dalam suatu tabung reaksi. Hasil positif ditunjukkan dengan terbentuknya endapan. Menurut BPOM (2000) tentang Parameter Mutu Ekstrak, alkaloid total ditentukan dengan cara spektrofotometri dan menggunakan senyawa standar, akan

tetapi jenis alkaloid sangat beragam sehingga sulit untuk penentuan standarnya. Hal ini kemudian direvisi BPOM (2006) tentang Monografi Ekstrak bahwa penetapan alkaloid total paling tepat adalah secara gravimetri, yaitu dengan pengendapan semua alkaloid kemudian disaring dan ditimbang. Metode ini juga memiliki kelemahan yaitu senyawa nonalkaloid (senyawa-senyawa nitrogen yang bukan anggota cincin) dapat ikut terendapkan (Saifuddin, dkk., 2011).

Soladoye (2012) melakukan uji profil fitokimia kuantitatif daun *Cissus populnea* Guill menggunakan metode gravimetri dan menghasilkan kadar alkaloid total sebesar 2,49%. Selain itu, penelitian Nopika (2013) telah melakukan penetapan kadar alkaloid total dari ekstrak etanol umbi lapis bakung (*Hymenocallis littoralis* (jacq.) salisb.) menggunakan metode gravimetri dan diperoleh hasil kadar alkaloid total yaitu sebesar 10,93%.

2.8 Kromatografi Lapis Tipis Analitik

Kromatografi lapis tipis analitik atau KLTA adalah salah satu jenis metode kromatografi. Menurut literatur (Gritter, 1991), kromatografi lapis tipis adalah kromatografi serapan, dimana sebagai fasa tetap (diam) berupa zat padat yang disebut adsorben (penyerap) dan fasa gerak adalah zat cair yang disebut larutan pengembang. Penyerap untuk KLT ialah silika gel, alumina, kiselgur, dan selulosa. KLT dapat dipakai dengan dua tujuan. Pertama, dipakai sebagai metode untuk mencapai hasil kualitatif, kuantitatif, ataupun preparatif. Kedua, dipakai untuk menjajaki sistem pelarut dan sistem penyangga yang akan dipakai pada kromatografi kolom.

Kromatografi lapis tipis sangat berhubungan dengan kromatografi kolom, hal ini karena fasa-fasa senyawa yang digunakan dalam teknik keduanya sama.

Kromatografi lapis tipis adalah metode pemisahan fitokimia. Lapisan yang memisahkan terdiri atas bahan berbutir-butir ditempatkan pada penyangga berupa pelat gelas, logam atau lapisan yang cocok. Campuran yang akan dipisah berupa larutan, ditotolkan berupa bercak atau pita awal kemudian plat dimasukkan didalam bejana tertutup rapat yang berisi larutan pengembang yang cocok. Pemisahan terjadi selama perambatan kapiler dan selanjutnya senyawa yang tidak berwarna harus ditampakkan (Sudarmadji, 1996). Untuk identifikasi dari senyawa-senyawa yang terpisah dari lapisan tipis menggunakan Rf. Harga Rf untuk senyawa murni dapat dibandingkan dengan harga Rf standart. Harga Rf dapat dihitung dengan rumus berikut (Sastrohamidjojo, 2005):

$$\text{Harga Rf} = \frac{\text{Jarak yang digerakkan oleh senyawa dari titik asal}}{\text{Jarak yang digerakkan oleh pelarut dari titik asal}} \dots\dots\dots (2.1)$$

Untuk mendeteksi alkaloid pada plat kromatografi lapis tipis digunakan lampu ultraviolet dengan panjang gelombang 254 nm dan 366 nm serta pereaksi penampak noda seperti pereaksi dragendroff yang menghasilkan noda berwarna jingga dan penambahan pereaksi mayer yang ditandai dengan endapan putih (Wagner, 1984).

Karakteristik senyawa hasil uji kadar alkaloid total dilakukan dengan pemeriksaan secara KLT menggunakan plat silika gel GF₂₅₄ untuk mengetahui kemurnian hasil isolasi dari kromatografi kolom. Alio, dkk (2013) telah mengisolasi senyawa alkaloid dari kulit batang mangga menggunakan kromatografi kolom. Isolat yang diperoleh dari monitoring kemudian diuji kemurnian dengan KLTA hingga diperoleh noda tunggal. Hal ini mengindikasikan bahwa isolat telah murni dengan mengandung satu senyawa,

kemudian dilanjutkan uji fitokimia dan isolat menunjukkan adanya senyawa alkaloid Sehingga untuk memperoleh senyawa yang relatif murni dari hasil kromatografi kolom maka perlu dilakukan monitoring menggunakan KLTA pada fraksi hasil kromatografi kolom.

Eluen yang dipilih pada penelitian ini disesuaikan dengan sifat kelarutan senyawa yang akan dianalisis. Berdasarkan penelitian Lutfillah (2008) menyatakan bahwa eluen terbaik untuk pemisahan alkaloid dengan KLT dari hasil isolat kulit batang angret adalah campuran metanol: kloroform (0,5:9,5) dengan pereaksi dragendroff yang menghasilkan 8 noda yang memiliki Rf antara 0,22-0,85 dengan 5 noda berwarna biru dan 2 noda berwarna kuning serta 1 noda berwarna merah setelah disinari dengan lampu UV. Penelitian lainnya Rahmah (2014) menyatakan bahwa eluen terbaik untuk memisahkan alkaloid dengan KLT dari tanaman anting-anting adalah campuran kloroform:metanol (9,5:0,5) dengan pendeteksi UV 254 nm dan 366 nm serta dengan pereaksi dragendroff menghasilkan 7 noda dengan memberikan nilai Rf 0,21-0,92.

2.9 Identifikasi Senyawa Alkaloid dengan UPLC-MS

Spektroskopi Massa merupakan suatu metode analisis instrument yang digunakan untuk proses identifikasi dan penentuan suatu struktur dari molekulorganik dengan tidak melibatkan interaksi antara REM akan tetapi melibatkan electron dengan kecepatan tinggi atau energi tinggi (70 eV) dalam vakum tinggi (Sastrohamidjojo, 2005). Spektrum massa merupakan rangkaian puncak puncak yang berbeda tingginya. Bentuk spektrumnya tergantung dari sifat molekul, potensial ionisasi, mudah tidaknya sampel tersebut menguap, dan

kontruksi alat. Untuk menghasilkan spektrum massa, dalam proses ionisasi berkas elektron dipergunakan minimal 7-15 mv (Khopkar, 2008).

Metode spektroskopi massa berbeda dengan metode spektroskopi yang lain. Dalam spektrometer ini, suatu sampel dalam keadaan cair akan ditabrak atau ditembak oleh elektron yang berenergi tinggi. Penembakan tersebut akan menyebabkan lepasnya sebuah elektron dari suatu sampel membentuk suatu ion organik. Ion yang dihasilkan oleh penembakan elektron tersebut tidak stabil dan pecah menjadi fragmen fragmen kecil, baik berbentuk radikal maupun dalam bentuk ion positif dan negatif. Dalam sebuah spektroskopi massa yang khas, fragmen yang bermuatan positif akan dideteksi oleh rekorder (Supratman, 2010).

Ultra chromatograph-mass spectrometry merupakan satu-satunya teknik kromatografi cair dengan detektor spektrometer massa. Penggunaan UPLC-MS untuk penelitian bio-analisis dimulai pada akhir 1980-an. Kelebihan dari teknologi UPLC-MS meliputi (Michael, 2008):

1. Spesifitas. Hasil analisis yang khas dan spesifik diperoleh dari penggunaan spectrometer massa sebagai detektor.
2. Aplikasi yang luas dengan system yang praktis. Berbeda dengan GC-MS sebagai spectrometer massa klasik
3. Penerapan UPLC-MS tidak terbatas untuk molekul volatile (biasanya dengan berat molekul dibawah 500 Da), selain itu mampu mengukur analit yang sangat polar dan persiapan sampel yang sangat sederhana tanpa adanya teknik derivatisasi.
4. Fleksibilitas. Pengujian yang berbeda dapat dikembangkan tingkat fleksibilitas yang tinggi dan waktu yang singkat.

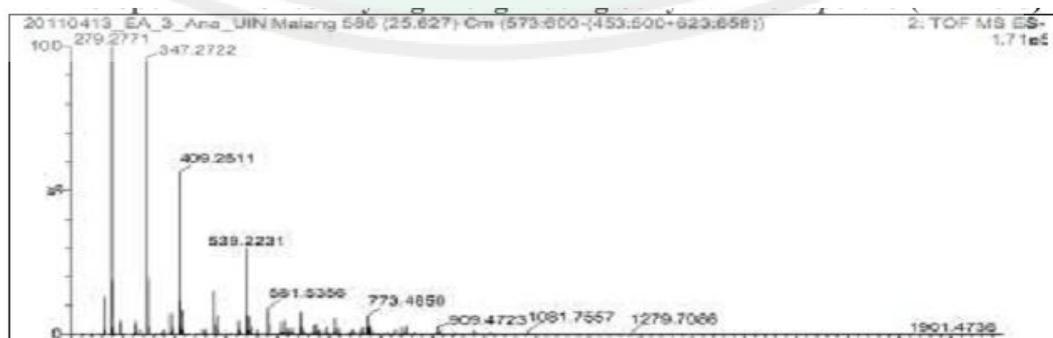
Sistem UPLC-MS umumnya menggunakan beberapa jenis *ion source* dan *mass analyzer* yang dapat disesuaikan dengan kepolaran senyawa yang akan dianalisis. Masing-masing *ion source* dan *mass analyzer* memiliki kelebihan dan kekurangan (Michael, 2008). Untuk menghasilkan spektrum massa, dalam proses ionisasi berkas elektron dipergunakan minimal 7-15 mv (Khopkar, 2008). Muatan ion dari sampel yang dideteksi oleh suatu spektroskopi massa adalah +1, maka nilai m/z sama dengan massa molekulnya (M). Suatu molekul atau ion dari sampel akan pecah menjadi fragmen-fragmen bergantung pada kerangka karbon dan gugus fungsional yang ada. Oleh karena itu, struktur dan massa fragmen memberikan petunjuk mengenai struktur molekul induknya dan dapat pula menentukan bobot molekul suatu senyawa dari spektrum massa (Panji, 2012).

Untuk pengoptimalan Kondisi UPLC-MS yang digunakan adalah kolom Sunfire C18 (fase terbalik) yang cenderung fase diam bersifat non polar dan fase geraknya bersifat polar. Oktadesil silika (C18) ini dapat memisahkan senyawa-senyawa dengan kepolaran yang rendah, sedang, maupun tinggi. Dengan fase terbalik ini kemampuan elusi akan menurun dengan meningkatnya polaritas pelarut. Sehingga senyawa yang kepolarannya kurang akan lebih mudah dibawah oleh fase gerak dibandingkan dengan senyawa yang kepolarannya tinggi. Berbeda dengan fase normal, proses elusi akan meningkat seiring meningkatnya polaritas pelarut. Kolom yang digunakan berukuran 2,1 cm dengan diameter 5,0 mm. Kolom pengaman ini berfungsi untuk menyaring kotoran yang terbawa dalam fase diam serta untuk menjenuhkan fase diam

Fase gerak yang digunakan adalah campuran air dan asam format asetonitril dan asam format. Pemilihan eluen tersebut karena memiliki kemurniaan

yang sangat tinggi dan berderajat UPLC. Selain itu fase gerak tersebut bersifat polar sehingga mampu mengelusi senyawa alkaloid dengan cepat. Sebelum digunakan, eluen terlebih dahulu dilakukan penyaringan dengan saringan nilon berdiameter 1,7 μm . Penyaringan partikel kotoran ini bertujuan agar tidak terjadi gangguan pada sistem kromatografi, dimana partikel yang kecil terkumpul dalam kolom sehingga dapat mengakibatkan kekosongan pada kolom (Gandjar dan Rohman, 2008). Elusi yang digunakan dengan cara isokratik (komposisi fase gerak tetap selama elusi) yaitu 30% H_2O + 0,1% asam format, 70% asetonitril. Laju alir dibuat 0,3 mL/menit. Detektor UPLC yang digunakan adalah DAD (Diode Array Detection) karena dapat mengukur semua senyawa pada panjang gelombang yang digunakan.

Penggunaan identifikasi UPLC-MS ini didasarkan pada penelitian sebelumnya yaitu Husna (2011) melakukan identifikasi dengan HPLC-MS pada ekstrak etil asetat tanaman anting-anting menghasilkan puncak tertinggi yaitu pada golongan alkaloid berberin 321,2 m/z dan menisperin 279,2 m/z dan golongan tannin terhidrolisis. Hasil MS berberin dan menisperin dapat dilihat pada Gambar 2.11 dan Gambar 2.12 berikut ini:

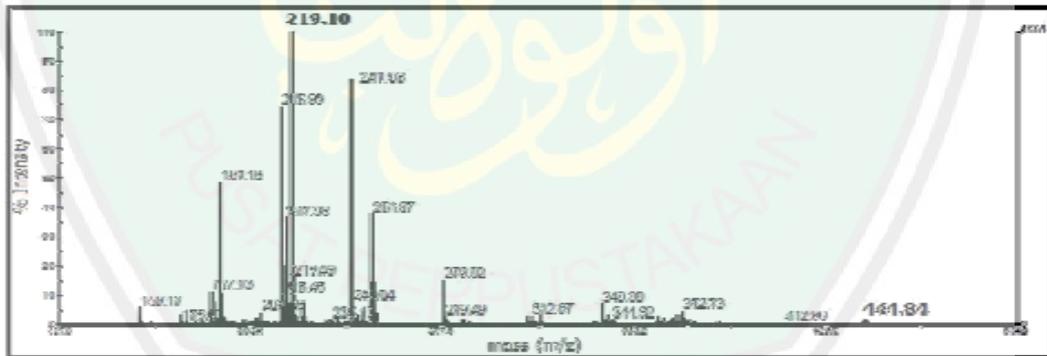


Gambar 2.11: Spektra MS yang mengandung senyawa Menisperin



Gambar 2.12: Spektra MS yang mengandung senyawa Berberin

Selain itu, Murtadlo (2013) mengidentifikasi senyawa alkaloid dari isolat daun tempuyung menggunakan LC-MS menghasilkan spektrogram MS alkaloid dengan berat molekul sebesar 219 g/mol yang menunjukkan alkaloid dengan kerangka dasar isokuinolin. Hasil MS senyawa isokuinolin tersebut dapat dilihat pada Gambar 2.13 :



Gambar 2.13: Spektrogram MS yang mengandung senyawa isokuinolin

BAB III

METODE PENELITIAN

3.1 Pelaksanaan Penelitian

Penelitian dilaksanakan pada bulan April-Juni 2016 Di Laboratorium Organik dan Laboratorium Analisis Jurusan Kimia Fakultas Sains dan Teknologi Universitas Islam Negeri Maulana Malik Ibrahim Malang.

3.2 Alat Dan Bahan Penelitian

3.2.1 Alat

Alat penelitian yang digunakan pada penelitian ini meliputi oven, vacum rotary evaporator, kertas saring, saringan 60-80 mesh, hotplate, desikator, aluminium foil, inkubator shaker, plat KLT, stopwatch, bejana pengembang, indikator pH Universal, seperangkat alat UPLC-MS, lampu UV, kertas saring 42, seperangkat alat KLT dan Kromatografi kolom diameter 1,5 cm tinggi 50 cm, statif, dan seperangkat alat gelas laboratorium.

3.2.1 Bahan

Bahan uji yang digunakan pada penelitian ini yaitu sampel tanaman Anting-anting yang berasal dari daerah Landungsari Malang. Sedangkan bahan kimia yang digunakan meliputi aquades, metanol 99%, etil asetat 96%, HCl 37%, NH₄OH 28%, kloroform 99%, asam asetat 99%, etanol 96%, reagen Dragendorff, reagen Mayer, dan silika gel 60 (0,063-0,200 mm). Semua bahan kimia dan plat KLT yang digunakan dari Merck.

3.3 Rancangan Percobaan

Penelitian ini menggunakan metode deskriptif kualitatif dan kuantitatif. Diawali dengan pengambilan sampel tanaman anting-anting lalu dikeringkan dan

dihaluskan dengan ukuran 60-80 mesh. Serbuk anting-anting kemudian dimaserasi menggunakan pelarut metanol. Selanjutnya ekstrak kasar metanol difraksinasi dengan pelarut Etil asetat. Ekstrak kasar alkaloid yang diperoleh lalu dilakukan uji fitokimia senyawa alkaloid dengan menggunakan reagen. Ekstrak kasar alkaloid yang positif alkaloid dipisahkan menggunakan metode Kromatografi kolom dengan metode pembuatan fase diam secara basah dan proses pemisahannya dilakukan dengan variasi kecepatan laju alir antara 1 mL/menit dan 2 mL/menit. Hasil tampungan fraksi masing-masing laju alir dengan penampakan warna yang sama pada vial digabung menjadi satu dan pengelompokan fraksi selanjutnya dilakukan dengan menggunakan reagen untuk dasar pengelompokan fraksi secara uji kualitatif yang menunjukkan adanya golongan senyawa alkaloid. Hasil penggabungan fraksi yang positif alkaloid dilakukan uji kuantitatif kadar alkaloid total untuk mengetahui kecepatan laju alir yang terbaik dalam memisahkan senyawa alkaloid. Dari kecepatan laju alir yang terbaik, fraksi yang memiliki kadar alkaloid total yang paling tinggi diuji kemurniannya dengan menggunakan KLT analitik. Apabila hanya didapatkan satu noda, maka isolat alkaloid telah murni. Kemudian untuk mengetahui struktur dari senyawa alkaloid murni yang didapatkan, maka isolat murni yang dihasilkan dari kromatografi kolom diidentifikasi dengan menggunakan UPLC-MS, dan yang terakhir dilakukan analisis data.

3.4 Tahapan Penelitian

Tahapan-tahapan yang dilakukan dalam penelitian ini yaitu:

1. Preparasi sampel
2. Ekstraksi sampel dengan metanol

3. Faksinasi (Partisi) ekstrak metanol
4. Uji fitokimia senyawa alkaloid dengan reagen
5. Pemisahan Senyawa Alkaloid dengan metode Kromatografi Kolom
6. Pengelompokan Fraksi secara Uji Kualitatif dengan Reagen
7. Penentuan Laju Alir terbaik dengan Kadar Alkaloid Total Fraksi
8. Uji kemurnian isolat dengan KLT Analitik
9. Identifikasi senyawa alkaloid menggunakan UPLC-MS

3.5 Cara Kerja

3.5.1 Preparasi Sampel (Hayati, 2012)

Sebanyak 3 Kg tanaman anting-anting (*Acalypha indica* L) diperoleh dari daerah Landungsari Malang. Tanaman anting-anting kemudian dioven dengan suhu 30°C-37°C. Setelah kering kemudian tanaman Anting-anting tersebut dihaluskan dengan blender, dan diayak dengan 60-80 mesh sehingga diperoleh sampel berupa serbuk Anting-anting yang siap untuk diekstraksi.

3.5.2 Ekstraksi Sampel dengan Metanol (Rahmah, 2014)

Ekstraksi komponen aktif pada sampel dilakukan dengan cara ekstraksi maserasi atau perendaman dengan pelarut metanol. Ekstraksi dilakukan sebanyak 3 kali pengulangan karena dimungkinkan bahwa kandungan senyawa pada tanaman sudah cukup banyak yang terekstrak pada masing-masing tahapannya. Sampel berupa serbuk halus dari tanaman Anting-anting (*Acalypha indica* L) sebanyak 300 gram dibagi menjadi tiga bagian masing-masing 100 gram diekstraksi dengan cara maserasi menggunakan pelarut metanol 400 mL di dalam erlenmeyer dan diaduk menggunakan *shaker* dengan kecepatan 120 rpm selama 3

jam. Lalu disaring dan ampas yang diperoleh dimaserasi kembali dengan pelarut dan perlakuan yang sama selama 3 kali pengulangan sampai diperoleh filtrat yang cukup bening. Selanjutnya ketiga filtrat yang diperoleh kemudian digabung menjadi satu. Lalu dipekatkan menggunakan *rotary evaporator* pada suhu 30-40°C sehingga diperoleh ekstrak kental metanol. Ekstrak pekat ditimbang lalu dihitung rendemennya dengan persamaan:

$$\% \text{ rendemen} = \frac{\text{Berat ekstrak}}{\text{Berat sampel}} \times 100 \% \dots\dots\dots (3.1)$$

3.5.3 Fraksinasi (Partisi) Ekstrak Metanol (Kusrini, 2013)

Ekstrak pekat yang diperoleh dari hasil maserasi dilakukan fraksinasi dengan menggunakan ekstraksi cair-cair secara asam basa dengan menggunakan pelarut HCl dan NH₄OH kemudian dilakukan partisi dengan etil asetat. Pertama, semua ekstrak pekat metanol ditimbang lalu ditambahkan HCl 2 N sampai pH 2-3, Kemudian dipartisi menggunakan pelarut etil asetat:Air dengan volume masing-masing 50 mL sehingga diperoleh 2 fasa. Fasa etil asetat mengandung alkaloid netral sedangkan fasa asam yang telah dipisahkan dibasakan kembali menggunakan NH₄OH hingga pH larutan mencapai 9-10, lalu diekstraksi kembali menggunakan etil asetat 50 mL. Hasil ekstraksi akan terbentuk 2 lapisan yaitu lapisan basa dan lapisan etil asetat, lalu dipisahkan dan fasa basa dilakukan replikasi dengan penambahan etil asetat sampai 5 kali pengulangan. Kemudian lapisan etil asetat dipekatkan dengan *rotary evaporator* pada temperatur tidak lebih dari 40°C sehingga diperoleh ekstrak kasar alkaloid. Ekstrak kasar alkaloid ditimbang lalu dihitung rendemennya dengan persamaan:

$$\% \text{ rendemen} = \frac{\text{Berat fraksi Etil asetat}}{\text{Berat sampel}} \times 100 \% \dots\dots\dots (3.2)$$

3.5.4 Uji Fitokimia Senyawa Alkaloid dengan Reagen (Rahmah, 2014)

Ekstrak kasar alkaloid yang diperoleh dari hasil partisi dilakukan uji fitokimia senyawa alkaloid dengan menggunakan reagen. Ekstrak pekat fraksi etil asetat ditimbang sebanyak 10 mg dan dimasukkan dalam tabung reaksi, kemudian ditambah 0,5 mL HCl 2% kemudian disaring. Filtrat yang diperoleh dibagi dalam dua tabung dengan volume yang sama. Tabung I ditambahkan 2-3 tetes reagen Dragendorff, tabung 2 ditambahkan 2-3 tetes reagen Mayer. Jika tabung I terbentuk endapan jingga dan pada tabung 2 terbentuk endapan putih kekuningan, maka ekstrak tersebut menunjukkan adanya alkaloid dan dilanjutkan dengan pemisahan dengan kromatografi kolom.

3.5.5 Pemisahan Senyawa alkaloid dengan Metode Kromatografi Kolom (Kusmiyati dkk, 2011; Alio dkk, 2013)

Ekstrak kasar alkaloid yang diperoleh dari hasil fraksinasi dihitung beratnya dan dilakukan pemisahan dengan menggunakan metode kromatografi kolom dengan fase gerak yang digunakan adalah eluen kloroform:metanol (9,5:0,5) sedangkan fase diam yang digunakan adalah silika gel G₆₀ (0,063-0,200 mm). Pembuatan fase diam dilakukan dengan cara basah, pertama silika gel G₆₀ ditimbang sebanyak 15 gram kemudian diaktivasi dengan pemanasan menggunakan oven pada 110°C selama 2 jam dan didinginkan dalam desikator. Kemudian silika gel dimasukkan ke dalam beaker glass lalu ditambahkan eluen, diaduk hingga homogen dan tidak ada gelembung udara. Kolom bagian bawah diisi glasswool lalu dimasukkan bubuk silika gel kedalam kolom, kran sedikit dibuka dan ditampung eluen yang keluar. Setelah itu, dimasukkan ekstrak hasil

partisi 0,2 gram dalam 1 mL fase gerak. Eluen yang keluar dari kolom di atur kecepatan laju alirnya selama 1 mL/menit dan 2 mL/menit, kemudian setiap eluat yang dihasilkan ditampung sebanyak 2 mL dalam setiap botol vial. Proses pengelusan dihentikan ketika pita warna yang terbentuk pada kolom sudah tidak ada dan warna pada kolom seperti semula ketika belum ditambahkan sampel. Artinya senyawa (pita warna) tersebut sudah terelusi secara maksimal. Fraksi-fraksi dengan penampakan warna yang sama pada botol vial digabung menjadi satu untuk dikelompokkan lagi secara uji kualitatif menggunakan reagen.

3.5.6 Pengelompokan Fraksi secara Uji Kualitatif Dengan Reagen (Ningsih dkk, 2006; Rahmah, 2014)

Pengelompokan fraksi selanjutnya dilakukan dengan uji fitokimia menggunakan reagen. Uji fitokimia tersebut digunakan untuk dasar pengelompokan fraksi secara uji kualitatif yang menunjukkan adanya senyawa alkaloid. Hasil masing-masing penggabungan fraksi dengan penampakan warna yang sama pada botol vial dari pemisahan kolom diambil 0,5 mL kemudian dimasukkan dalam setiap tabung reaksi, lalu ditambah 0,5 mL HCl 2% dan larutan dibagi dalam dua tabung. Tabung I ditambahkan 2-3 tetes reagen Dragendorff, tabung 2 ditambahkan 2-3 tetes reagen Mayer. Jika tabung I terbentuk endapan jingga dan tabung 2 terbentuk endapan putih, maka fraksi menunjukkan adanya alkaloid. Fraksi yang menunjukkan positif alkaloid digabung menjadi satu berdasarkan laju alir yang digunakan dan dilanjutkan dengan penentuan kadar alkaloid total untuk mengetahui laju alir yang terbaik

3.5.7 Penentuan Laju Alir terbaik dengan Kadar Alkaloid Total Fraksi (Saifudin, 2011)

Penentuan alkaloid total dilakukan untuk mengetahui kecepatan laju alir yang terbaik terhadap pemisahan senyawa alkaloid yang ditandai dengan tingginya kadar alkaloid pada setiap fraksi. Hasil penggabungan fraksi dari uji kualitatif yang positif alkaloid di ukur volumenya dan dilarutkan dengan 25 mL larutan CH₃COOH 10% (dalam etanol). Larutan dikocok dengan *magnetic stirrer* selama 4 jam, kemudian disaring. Filtrat kemudian dievaporasi hingga seperempat volume awalnya. Kemudian ditetesi dengan NH₄OH pekat tetes demi tetes kedalam ekstrak sampai endapannya sempurna, dimana penambahan NH₄OH dihentikan ketika sudah tidak terjadi endapan. Ditimbang dahulu kertas saring yang akan digunakan untuk menyaring endapan. Kemudian endapan disaring dan dicuci dengan menggunakan larutan NH₄OH 1%. Kertas saring yang mengandung endapan dikeringkan dalam oven pada suhu 60 °C selama 30 menit. Setelah dingin, endapan ditimbang kemudian dihitung rendemennya dengan persamaan:

$$\% \text{ rendemen} = \frac{\text{Berat endapan alkaloid}}{\text{Berat awal sampel}} \times 100 \% \dots\dots\dots(3.3)$$

% Rendemen yang tertinggi pada fraksi dilanjutkan dengan uji fraksi menggunakan KLT analitik.

3.5.8 Uji Kemurnian Isolat dengan KLT Analitik (Jhon, 2012)

Isolat dengan % kadar alkaloid tertinggi yang diperoleh dari penentuan laju alir yang terbaik dengan kadar alkaloid total dilakukan uji kemurnian dengan KLT analitik. Pada uji kemurnian dengan KLT analitik ini digunakan plat silika G₆₀ F₂₅₄ dengan ukuran 1 cm x 10 cm. Isolat hasil kromatografi kolom ditotolkan pada plat sebanyak 20 totolan dengan jarak 1 cm dari garis bawah dan garis tepi.

Selanjutnya dielusi dengan menggunakan eluen kloroform:metanol (9,5:0,5) sebanyak 10 mL. Setelah gerakan larutan pengembang sampai pada garis batas, elusi dihentikan. Noda yang terbentuk masing-masing diukur harga R_f nya dan diperiksa di bawah sinar UV pada panjang gelombang 254 nm dan 366 nm. Warna noda akan berwarna kuning dan hijau kecoklatan tanpa sinar UV dan warna noda akan berwarna kuning orange ketika dideteksi dibawah sinar UV. Hasil pemisahan KLT analitik kemudian diuji dengan pereaksi Dragendroff untuk memperkirakan bercak yang positif alkaloid. Spot yang positif alkaloid ditandai dengan bercak noda berwarna jingga kecoklatan setelah di semprot pereaksi dragendorf. Kemudian isolat yang dihasilkan dilakukan identifikasi lebih lanjut menggunakan UPLC-MS.

3.5.9 Identifikasi Senyawa Alkaloid menggunakan UPLC-MS

Isolat hasil kromatografi kolom dianalisis menggunakan UPLC-MS. Isolat hasil kromatografi kolom diambil sebanyak 10 μ L. Spektra yang dihasilkan lalu dianalisa untuk mengetahui kemungkinan senyawa alkaloid yang ada pada isolat. Tahap awal merupakan tahap preparasi eluen untuk UPLC. Eluen disaring terlebih dahulu dengan menggunakan saringan nilon berdiameter 1,7 μ m dengan bantuan pompa vakum. Kemudian tahap selanjutnya adalah penyuntikan sampel pada UPLC. Isolat hasil uji kemurnian dengan KLTA diambil sebanyak 5 μ L (0,005 ml) dan disuntikkan secara langsung menggunakan *micro syringe* kedalam eluen yang mengalir dibawah tekanan menuju kolom. Tahap terakhir yaitu identifikasi senyawa dengan MS yang dilakukan dengan menghubungkan system UPLC dengan sumber ion ESI.

Parameter analisis yang digunakan dalam analisa adalah sebagai berikut:

Alat : UPLC Alliance 2695 (Waters) with photodiode-array (PDA)
 Detector 2996 (Waters)
 Column : Acquity C18, 1,7 μ m, 2,1x50 mm
 Flow rate : 0,3 ml/min, injection 5 microliter (0,005 ml)
 Eluent : A. H₂O (HPLC grade) + formic acid; B. Acetonitrile + formic acid
 HPLC method : isocratic 30% H₂O + 0,1% formic acid, 70% acetonitrile

Kondisi alat Spektroskopi Massa adalah sebagai berikut,

Alat : XEVO – G2QTOF (Waters)
 Analyser MS : TOF (*Time of Flight*) dengan *electrosprayer* modus positif (ES+) dan negatif (ES-) dari m/z 100 sampai m/z 2000
Desolvation temperature : 300 °C
Source temperature : 110 °C
Desolvation gas flow : 500 L/hour.

3.6 Analisis Data

Analisis data yang digunakan dalam penelitian ini adalah deskriptif kualitatif dan kuantitatif. Data yang diperoleh dijelaskan secara deskriptif yaitu dengan memperhatikan pola pemisahan dari pita warna yang terbentuk pada kolom. Penggabungan fraksi berdasarkan warna yang sama pada vial hasil pemisahan dan memperhatikan hasil warna endapan jingga dan putih kekuningan pada fraksi ketika dilakukan uji fitokimia. Fraksi yang positif alkaloid dilakukan uji kuantitatif untuk mengetahui % kadar alkaloid total yang paling tinggi. Hasil endapan dilakukan perhitungan dengan cara gravimetri. Kecepatan laju alir dikatakan terbaik dalam memisahkan senyawa alkaloid dalam tanaman Anting-anting jika menghasilkan % kadar alkaloid total yang terbanyak.

Endapan yang memiliki kadar alkaloid total yang paling tinggi diuji kemurniannya dengan menggunakan KLT analitik. Apabila hanya didapatkan satu noda, maka isolat alkaloid telah murni. Jika kenampakan noda atau spot yang

diperoleh dari hasil uji fraksi menggunakan KLT berwarna hijau ketika dideteksi sinar UV dan berwarna jingga kecoklatan setelah di semprot pereaksi dragendorf, maka spot yang dihasilkan positif alkaloid. Jika spot yang dihasilkan tunggal, maka senyawa yang dihasilkan dapat dikatakan murni.

Hasil UPLC-MS ditampilkan dalam bentuk kromatogram UPLC dan kromatogram MS isolat hasil KLTA kemudian diinterpretasikan berdasarkan kromatogram tersebut. Berat molekul yang dihasilkan dari kromatogram tersebut dicocokkan dengan referensi dan dilakukan fragmentasi senyawa sehingga dapat mengidentifikasi dan menentukan komponen-komponen suatu senyawa yang ada pada tanaman anting-anting.



BAB IV

HASIL DAN PEMBAHASAN

4.1 Preparasi Sampel

Sampel yang digunakan dalam penelitian ini adalah seluruh tanaman anting-anting (*Acalypha indica* L) dari daerah Landungsari Malang dalam keadaan segar dan hijau. Tahapan preparasi sampel meliputi pencucian, pengeringan dan penyerbukan sampel. Sampel tanaman anting-anting (*Acalypha indica* L) dicuci dengan air sampai bersih. Pencucian dilakukan untuk menghilangkan kotoran berupa tanah yang mungkin terikut pada saat pengambilan sampel. Tanaman yang sudah bersih dipotong kecil-kecil lalu dikeringkan dengan diangin-anginkan terlebih dahulu didalam rumah selama 24 jam untuk menghilangkan air sisa pencucian. Kemudian pemanasan menggunakan oven pada suhu 30-37°C selama 24 jam agar kandungan kimia tidak mengalami kerusakan. Pengeringan dilakukan agar mengurangi kadar air yang ada pada sampel, meminimalkan kerusakan senyawa akibat degradasi oleh mikroorganisme/tumbuhnya jamur (Halimah, 2010).

Sampel yang telah kering berwarna coklat kehijauan dihaluskan dengan menggunakan blender sehingga terbentuk serbuk anting-anting (*Acalypha indica* L). Perlakuan ini bertujuan untuk memperluas permukaan sehingga mudah dalam proses pengekstraksian. Voight (1995) menyatakan semakin kecil ukuran sampel, luas permukaan semakin besar maka interaksi antara zat pelarut dengan komponen kimia dalam sampel semakin besar, sehingga proses ekstraksi akan lebih cepat dan lebih efektif. Serbuk anting-anting (*Acalypha indica* L) yang telah halus kemudian dilakukan pengayakan dengan menggunakan ayakan 60-80 mesh.

Tujuan pengayakan untuk menghilangkan pengotor, mensekarkan ukuran serbuk dan memperluas permukaan. Semakin kecil ukuran serbuk maka semakin besar luas permukaan sampel sehingga mempermudah kelarutan komponen bioaktif. Interaksi antara pelarut dengan sampel akan semakin besar, proses ekstraksi akan semakin efektif dan senyawa aktif yang terekstrak semakin banyak (Baraja, 2008). Diperoleh serbuk halus ukuran yang relatif sama dan seragam dengan berat $\pm 307,5$ gram. Serbuk inilah yang selanjutnya dimaserasi dengan menggunakan pelarut metanol.

4.2 Ekstraksi Tanaman Anting-anting (*Acalypha indica* L)

Metode ekstraksi yang digunakan pada penelitian ini adalah maserasi. Ekstraksi menggunakan metode maserasi bertujuan untuk mengekstrak senyawa aktif yang terdapat dalam tanaman anting-anting (*Acalypha indica* L). Pada saat maserasi serbuk kering (*Acalypha indica* L) direndam menggunakan pelarut metanol dan terjadi proses difusi. Dimana proses difusi terjadi karena adanya perbedaan konsentrasi larutan. Pelarut metanol yang memiliki konsentrasi tinggi akan masuk ke dalam sel anting-anting melalui dinding sel. Seluruh isi sel akan larut ke dalam pelarut metanol yang ada di dalam sel. Sehingga konsentrasi larutan dalam sel lebih tinggi daripada larutan diluar sel dan terjadi proses difusi. Peristiwa difusi ini akan berlangsung terus menerus hingga diperoleh keseimbangan antara larutan didalam dan diluar sel.

Filtrat yang diperoleh kemudian dipisahkan dengan *rotary vacuum evaporator*. Pemekatan dilakukan untuk menghilangkan atau menguapkan pelarut metanol sehingga yang didapatkan merupakan ekstrak pekat dari tanaman anting-anting. Pemekatan dengan menggunakan *rotary vacuum evaporator* menghasilkan

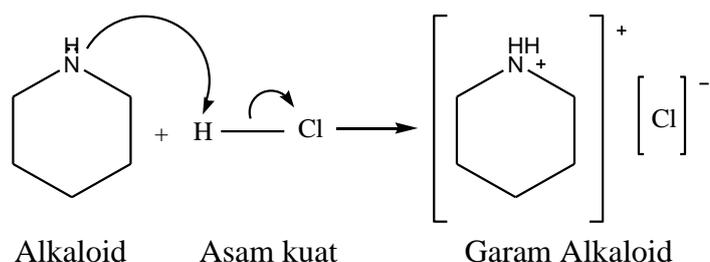
ekstrak pekat yang berupa padatan berwarna hijau tua pekat. Hasil ekstrak pekat dilihat pada Tabel 4.1 berikut dengan perhitungan rendemen di Lampiran 4.

Tabel 4.1 Hasil maserasi ekstrak metanol tanaman anting-anting

Pelarut	Serbuk + pelarut yang digunakan	Perubahan warna filtrat	Warna ekstrak pekat	Berat ekstrak pekat (g)	Rendemen (%) (b/b)
Metanol	300,014 g + 3600 mL	Hijau tua pekat sampai hijau tua	Hijau tua pekat	30,092	10,030

4.3 Fraksinasi (Partisi) Senyawa Alkaloid

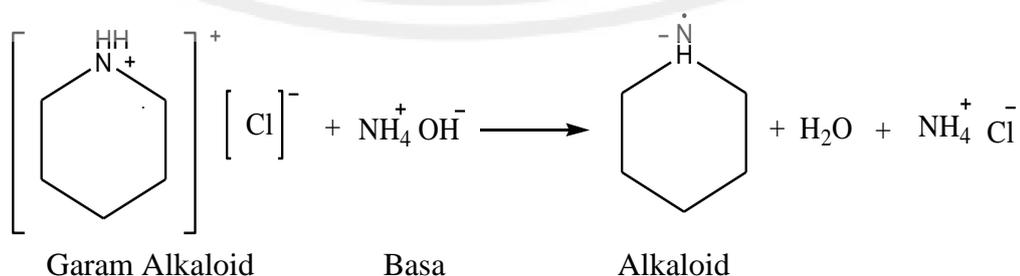
Proses ekstraksi senyawa alkaloid dilakukan dengan menggunakan metode ekstraksi asam basa serta ekstraksi cair-cair yang bertujuan untuk memisahkan senyawa alkaloid dari zat-zat lain yang ada pada ekstrak tanaman anting-anting. Ekstrak metanol yang diperoleh kemudian diekstraksi cair-cair secara asam-basa dengan HCl 2 N, NH₄OH 28% dan dipartisi dengan pelarut etil asetat. Penambahan asam HCl 2 N sampai pH 2-3 dilakukan untuk membentuk garam alkaloid -Cl serta memperbesar kelarutan alkaloid dalam air. Alkaloid bereaksi dengan asam kuat akan membentuk garam alkaloid. Garam alkaloid -Cl mudah larut dalam air, sehingga komponen tersebut dapat dipisahkan dari komponen lainnya. Adapun reaksi yang terjadi ketika penambahan HCl dapat dilihat pada Gambar 4.1 berikut ini (Robinson, 1995):



Gambar 4.1: Reaksi alkaloid dengan asam kuat

Hasil pengasaman dipartisi dengan ditambahkan pelarut etil asetat. Tujuan penambahan etil asetat berfungsi untuk mengambil senyawa-senyawa lemak dan lilin yang ada pada larutan asam. Hasil partisi didapatkan 2 lapisan yang berbeda. Lapisan atas ialah lapisan etil asetat (organik) yang berwarna hijau tua dan lapisan bawah ialah lapisan air yang berwarna coklat orange. Terbentuknya dua lapisan disebabkan karena adanya perbedaan massa jenis etil asetat dengan air. Massa jenis etil asetat yaitu 0,899 g/mL, sedangkan massa jenis air yaitu 1,000 g/ mL. Alkaloid dalam bentuk garamnya akan mudah larut dalam fasa air (Robinson, 1995).

Alkaloid yang terlarut dalam fasa air ditambahkan NH_4OH sampai pH 10. Perlakuan tersebut dilakukan agar garam alkaloid membentuk basa bebas alkaloid kembali dan membebaskan alkaloid dari garamnya akibat penambahan asam. Dengan penambahan NH_4OH , alkaloid yang semula dalam bentuk garamnya yang larut dalam air akan menjadi alkaloid bebas yang tidak larut dalam air akan tetapi larut dalam pelarut organik. Dimana proses ini merupakan proses pembebasan amina dari garamnya dengan penambahan basa lemah sesuai dengan reaksi pada Gambar 4.2 berikut ini:



Gambar 4.2: Reaksi pembebasan amina dengan cara pembasaan

Hasil pembasaan kemudian dipartisi menggunakan etil asetat. Tujuan penambahan etil asetat ini untuk menarik dan mengambil alkaloid yang sudah bebas dari bentuk garamnya, karena alkaloid bebas mudah larut dalam pelarut organik sedangkan garam alkaloid tidak mudah larut. Setelah ditambahkan etil asetat kemudian dilakukan proses pengocokan untuk meningkatkan proses distribusi atau pengikatan alkaloid bebas ke dalam etil asetat, sehingga senyawa alkaloid yang sudah bebas dari bentuk garamnya dapat terambil secara maksimal. Kemudian hasil partisi akan terbentuk dua lapisan yang saling tidak campur dalam corong pisah. Lapisan atas ialah lapisan etil asetat (organik) yang berwarna kuning kehijauan dan lapisan bawah ialah lapisan air yang berwarna coklat orange.

Alkaloid akan larut dalam fasa organik, sehingga didapat senyawa netral dan asam yang akan tertinggal dalam fasa air. Fraksi organik yang dihasilkan dikumpulkan menjadi satu dan selanjutnya dipekatkan menggunakan *rotary vacuum evaporator* untuk memisahkan pelarutnya. Kemudian diperoleh ekstrak kasar alkaloid 0,434 gram dengan rendemen sebesar 0,145%.

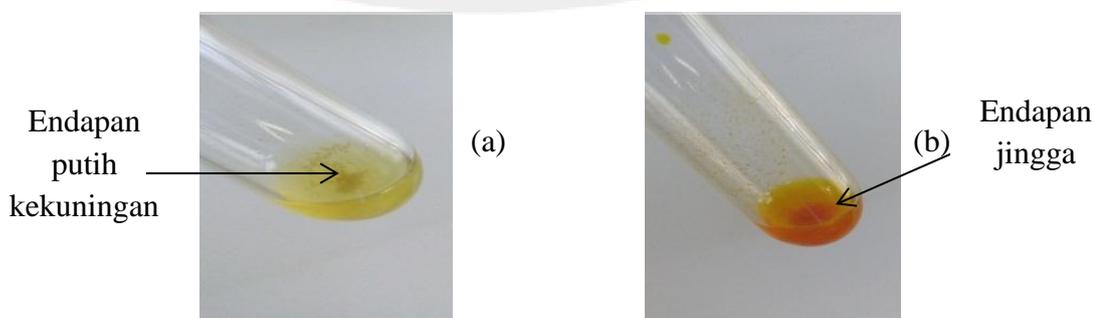
4.4 Uji Fitokimia Senyawa Alkaloid dengan Reagen

Langkah awal untuk mengetahui secara uji kualitatif kandungan senyawa pada fraksi etil asetat yaitu dengan uji fitokimia. Identifikasi adanya senyawa alkaloid dilakukan menggunakan reagen meyer dan dragendroff. Jika fraksi positif senyawa alkaloid akan terbentuk endapan putih kekuningan ketika ditambahkan dengan reagen Meyer dan endapan jingga ketika ditambahkan reagen Dragendroff (Harborne, 1987). Fraksi etil asetat ditambahkan dengan HCl 2% dan ditetesi

dengan reagen Dragendorff atau reagen Meyer. Penambahan HCl 2% untuk mengekstrak alkaloid karena alkaloid bersifat basa.

Senyawa alkaloid dengan pereaksi dragendroff akan membentuk garam tetraiodobismut yang berwarna jingga. Terbentuknya endapan jingga tersebut karena nitrogen membentuk ikatan kovalen koordinat dengan ion logam bismut dari kalium tetraiodobismut (II). Endapan tersebut adalah bismut-alkaloid (Marliana, *et al.*, 2005). Pereaksi Dragendorff dapat bereaksi dengan alkaloid dalam suasana asam. Alkaloid dalam suasana asam gugus basa nitrogennya mengion berupa kation sehingga dapat bereaksi dengan anion iodobismut.

Pereaksi Meyer dengan senyawa alkaloid dapat menghasilkan endapan berwarna putih kekuningan. Terbentuknya endapan tersebut dikarenakan nitrogen alkaloid bereaksi dengan ion logam merkuri dari kalium tetraiodomerkurat (II) membentuk kompleks merkuri-alkaloid (Marliana, *et al.*, 2005). Kebanyakan alkaloid bereaksi dengan pereaksi-pereaksi tersebut tanpa membedakan kelompok alkaloid (Sastrohamidjojo, 1996). Alkaloid adalah senyawa yang tersusun dari atom nitrogen PEB (Pasangan Elektron Bebas) yang dapat digunakan untuk membentuk ikatan kovalen koordinat dengan ion logam (Sirait, 2007). Berikut hasil uji Meyer dan Dragendorff pada Gambar 4.3 dibawah ini



Gambar 4.3 (a) Hasil uji Meyer (b) Hasil uji Dragendorff

Hasil pengujian pada Gambar 4.5 (a) menunjukkan terbentuknya endapan putih kekuningan yang mengendap di bawah tabung reaksi ketika ditambahkan dengan reagen Meyer. Sedangkan pada Gambar (b) menunjukkan terbentuknya endapan jingga yang mengendap di bawah tabung reaksi ketika ditambahkan dengan reagen Dragendorff. Hal tersebut menandakan bahwa fraksi etil asetat mengandung senyawa alkaloid.

4.5 Pemisahan Senyawa Alkaloid dengan Kromatografi Kolom

Kromatografi kolom merupakan suatu metode pemisahan preparatif yang digunakan untuk memisahkan suatu sampel dengan kapasitas yang lebih besar daripada KLT. Prinsip dasar kromatografi kolom adalah suatu pemisahan yang didasarkan pada prinsip adsorpsi (Kristanti, *et al.*, 2008). Pemisahan senyawa alkaloid dilakukan dengan kecepatan laju alir 1 mL/menit dan 2 mL/menit. Variasi tersebut bertujuan untuk mengetahui laju alir terbaik dalam memisahkan senyawa alkaloid menggunakan perbedaan kecepatan elusi. Campuran yang akan dipisahkan diletakkan diatas bagian penyerap yang berada pada tabung kaca. Fasa gerak dibiarkan mengalir melalui kolom yang disebabkan oleh gaya gravitasi. Pita senyawa yang terlarut bergerak melalui kolom dengan laju yang berbeda, memisah dan dikumpulkan berupa fraksi-fraksi pada saat keluar dari kolom.

Pada penelitian ini dilakukan pengisian adsorben cara basah dengan menggunakan 15 gram silika gel G-60 (0,063 – 0,200 mm). Dengan adsorben cara basah ini, maka daya serap silika gel akan lebih tinggi karena terjadi interaksi antara silika gel dan fase gerak. Silika mengandung gugus silanol yang bersifat polar. Gugus hidroksil pada silanol dapat membentuk ikatan hidrogen yang kuat dengan senyawa yang akan dipisahkan. Interaksi antara senyawa yang

mengandung atom donor H dengan silika dapat mempengaruhi pemisahan, dimana senyawa yang bersifat polar akan terjebak lebih lama dengan fase diam. Sedangkan senyawa kepolarannya rendah akan lebih larut terbawa ke fase gerak.

Terlebih dahulu silika gel diaktivasi dengan pemanasan. Proses aktivasi ini bertujuan untuk menghilangkan molekul air yang terdapat dalam silika sehingga interaksi antara fase diam, fase gerak dan senyawa yang akan dipisahkan maksimal dan diperoleh hasil pemisahan yang baik. Selanjutnya dibuat bubur silika yaitu dengan mencampur silika dan eluen kemudian distirer selama 1 jam. Bubur silika yang terbentuk selanjutnya dimasukkan kedalam kolom kromatografi secara perlahan untuk mengurangi terbentuknya gelembung udara didalam kolom. Fase diam kemudian didiamkan selama 24 jam. Sampel dengan konsentrasi 200.000 ppm dimasukkan dalam kolom melalui dinding kolom sampai merata. Eluen dialirkan ke dalam kolom melalui bagian atas kolom dan dilakukan elusi menggunakan eluen terbaik yaitu kloroform:metanol dengan perbandingan (9,5:0,5).

4.5.1 Kecepatan Laju Alir 1 mL/menit

Kecepatan laju alir 1 mL/menit merupakan laju alir yang cukup rendah dibandingkan dengan kecepatan laju alir 2 mL/menit. Pelarut ditambahkan sedikit demi sedikit melalui dinding kolom dan pelarut yang keluar dari kolom mulai ditampung. Laju alir yang digunakan adalah 1 mL/menit. Eluat ditampung tiap 2 mL dalam botol vial karena volume tampungan akan mempengaruhi hasil pemisahan. Semakin sedikit jumlah tampungan tiap fraksi akan lebih memperkecil kemungkinan senyawa akan bercampur kembali saat proses penampungan. (Ningsih, dkk., 2006).

Proses elusi dihentikan setelah warna adsorben memudar. Jumlah vial yang diperoleh dari hasil kromatografi kolom adalah 130 vial, kemudian Isolat hasil kromatografi kolom dilakukan penggabungan berdasarkan penampakan warna yang sama pada botol vial hingga diperoleh 14 fraksi gabungan seperti pada Tabel 4.2:

Tabel 4.2 Penggabungan fraksi berdasarkan warna pada vial

Fraksi	Warna pada vial
F1 (1)	Bening
F2 (2-9)	Hijau tua
F3 (10-19)	Kuning keruh
F4 (20-25)	Kuning bening
F5 (26-30)	Kuning
F6 (31-34)	Kuning kehijauan
F7 (35-49)	Hijau
F8 (50-60)	Bening
F9 (61-65)	Hijau bening
F10 (66-77)	Hijau tua
F11 (78-82)	Kuning keruh
F12 (83)	Kuning bening
F13 (84-103)	Kuning
F14 (103-130)	Bening

Pemisahan dengan kromatografi kolom menggunakan laju alir 1 mL/menit menghasilkan 14 fraksi yang digabung berdasarkan warna yang didapat pada vial. Sifat fraksi yang diperoleh dari atas ke bawah akan semakin polar. Hal tersebut disebabkan karena eluen yang digunakan bersifat semi polar sehingga senyawa yang bersifat kurang polar (semi polar) akan terelusi lebih cepat dibandingkan dengan senyawa yang bersifat polar. Senyawa yang bersifat polar akan tertahan lama di fase diam. 14 fraksi tersebut kemudian dilakukan pengelompokan fraksi lebih lanjut dengan cara uji kualitatif menggunakan reagen untuk mengetahui senyawa alkaloid yang ada pada fraksi hasil pemisahan.

4.5.2 Kecepatan Laju Alir 2 mL/menit

Kecepatan laju alir 2 mL/menit merupakan laju alir yang cepat jika dibandingkan dengan laju alir 1 mL/menit. Eluen dialirkan ke dalam kolom melalui bagian atas kolom dan dilakukan elusi. Laju alir yang digunakan adalah 2 mL/menit. Hasil eluat yang diperoleh kemudian ditampung dalam botol vial setiap 2 mL dalam botol vial. Proses elusi dihentikan ketika warna adsorben memudar. Jumlah vial yang diperoleh adalah 151 vial, kemudian Isolat hasil kromatografi kolom dilakukan penggabungan berdasarkan penampakan warna yang sama pada botol vial hingga diperoleh 7 fraksi gabungan seperti pada Tabel 4.3 berikut:

Tabel 4.3 Penggabungan fraksi berdasarkan warna pada vial

Fraksi	Warna pada vial
F1 (1-5)	Hijau tua
F2 (6-23)	Kuning keruh
F3 (24-42)	Kuning kehijauan
F4 (43-70)	Hijau bening
F5 (71-118)	Bening
F6 (119-130)	Kuning keruh
F7 (131-151)	Bening

Hasil penggabungan fraksi berdasarkan warna yang didapat pada vial dengan laju alir 2 mL/menit diperoleh 7 fraksi. Ketujuh fraksi tersebut kemudian dilakukan pengelompokan lebih lanjut secara uji kualitatif menggunakan reagen. Sifat fraksi yang diperoleh dari atas ke bawah semakin polar. Penggabungan fraksi didasarkan pada penampakan warna yang sama pada vial. Hal tersebut disebabkan karena warna yang sama akan mewakili kandungan senyawa yang terdapat pada fraksi dengan warna yang sama.

4.6 Pengelompokan Fraksi Secara Uji Kualitatif dengan Reagen

Fraksi dari hasil penggabungan berdasarkan warna pada vial kemudian di kelompokkan secara kualitatif menggunakan reagen untuk mengetahui kandungan senyawa alkaloid pada fraksi hasil isolasi. Reagen yang digunakan untuk uji kualitatif adalah reagen Mayer dan Dragendorff. Prinsip metode ini adalah reaksi pengendapan yang terjadi karena adanya penggantian ligan atom nitrogen yang mempunyai pasangan elektron bebas pada alkaloid dapat mengganti ion iod dalam reagen Mayer dan Dragendorff (Sangi, *et al.*, 2012).

Hasil pengelompokan fraksi dengan pemisahan laju alir 1 mL/menit diperoleh 3 kelompok fraksi positif senyawa alkaloid yang terdiri dari fraksi F3, F4 dan F11. Fraksi yang positif alkaloid tersebut memiliki warna yang sama yaitu warna kuning pada botol vial hasil pengelompokan secara visual. Ketiga kelompok fraksi menghasilkan endapan jingga ketika ditambahkan reagen Dragendorff dan endapan putih ketika ditambahkan reagen Mayer. Kelompok fraksi yang diperoleh ditunjukkan pada Tabel 4.4

Tabel 4.4 Data pengelompokan fraksi hasil isolasi pemisahan laju alir 1 mL/menit

Fraksi	Warna pada vial	Alkaloid	
		Mayer	Dragendorff
F3 (10-19)	Kuning keruh	(+)	(+)
F4 (20-25)	Kuning bening	(+)	(+)
F11 (78-82)	Kuning keruh	(+)	(+)

Hasil pengelompokan fraksi dengan pemisahan laju alir 2 mL/menit diperoleh 2 kelompok fraksi senyawa alkaloid yang terdiri dari F2 dan F6. Kedua kelompok fraksi tersebut menghasilkan endapan jingga ketika ditambahkan reagen Dragendorff dan endapan putih ketika ditambahkan reagen Mayer. Data pengelompokan fraksi ditunjukkan pada Table 4.5 berikut:

Tabel 4.5 Data pengelompokan fraksi hasil isolasi pemisahan laju alir 2 mL/menit

Fraksi	Warna pada vial	Alkaloid	
		Mayer	Dragendorff
F2 (6-23)	Kuning keruh	(+)	(+)
F6 (119-130)	Kuning bening	(+)	(+)

Berdasarkan hasil pengelompokan fraksi secara uji kualitatif diperoleh fraksi dengan laju alir 1 mL/menit menghasilkan kelompok fraksi yang positif alkaloid lebih banyak. Banyaknya fraksi menandakan banyaknya senyawa yang terpisah. Hal tersebut disebabkan karena dengan menggunakan laju alir 1 mL/menit waktu interaksi antara senyawa dengan fase diam lebih lama sehingga selektivitasnya dalam proses pemisahan lebih tinggi. Interaksi antara senyawa dengan adsorben yang cukup lama menyebabkan senyawa yang lebih polar akan tertahan lebih kuat di fase diam, sedangkan senyawa yang kepolarannya rendah akan terelusi lebih cepat terbawa oleh fase gerak.

Untuk hasil penggabungan fraksi menggunakan laju alir 2 mL/menit diperoleh fraksi yang lebih sedikit karena interaksi antara fase diam dengan senyawa berjalan lebih cepat. Sehingga proses pemisahannya kurang maksimal dan selektivitas senyawa akan berkurang jika dibandingkan dengan interaksi senyawa dengan fase diam yang cukup lama. Masing-masing kelompok fraksi yang positif alkaloid digabung menjadi satu berdasarkan laju alir 1 mL/menit dan laju alir 2 mL/menit yang digunakan.

4.7 Penentuan Laju Alir Terbaik dengan Kadar Alkaloid Total Fraksi

Hasil penggabungan fraksi dari uji kualitatif yang positif alkaloid dengan laju alir 1 mL/menit dan 2 mL/menit dilakukan penetapan kadar alkaloid total. Penetapan kadar alkaloid total ini dilakukan untuk menentukan laju alir yang

terbaik dalam memisahkan senyawa alkaloid menggunakan kromatografi kolom. Penetapan alkaloid total ini menggunakan metode gravimetri. Menurut Saifuddin (2011) penetapan alkaloid total paling tepat adalah secara gravimetri, yaitu dengan pengendapan semua alkaloid kemudian disaring dan ditimbang.

Senyawa alkaloid dapat terekstrak dengan menggunakan pelarut asam dan dapat terendapkan dengan basa amonium hidroksida. Fraksi hasil penggabungan di uapkan di dalam desikator untuk mempertahankan kelembaban fraksi yang peka terhadap pengaruh udara lembab dan mencegah kontak fraksi dengan udara luar. Kemudian ditambahkan larutan asam CH_3COOH 10% (dalam etanol) untuk melarutkan endapan isolat dan memperbesar kelarutan alkaloid. Dengan penambahan asam ini maka gugus amina pada senyawa alkaloid akan terpisah dengan zat netral sehingga membentuk garam alkaloid.

Fraksi yang telah ditambahkan asam kemudian dikocok dengan *magnetic stirrer* selama 2 jam. Pengocokan dengan *magnetic stirrer* untuk memperbanyak kontak yang terjadi antara pelarut dengan fraksi. Hal ini memungkinkan ikatan antara asam dan alkaloid akan semakin kuat sehingga alkaloid semakin banyak yang terekstraksi. Kemudian disaring untuk memisahkan filtrat dan residu. Filtrat yang didapat dibasakan dengan NH_4OH pekat 28% tetes demi tetes ke dalam ekstrak sampai terbentuk endapan yang maksimal. Karena alkaloida yang terdapat dalam suatu sampel sebagai bentuk garam dari hasil pengasaman, maka alkaloid dibebaskan dari ikatan garam menjadi alkaloida yang bebas dari garamnya dengan ditambahkan basa lain yang lebih kuat dari pada basa alkaloid sehingga terbentuk endapan alkaloid.

Endapan hasil penambahan NH_4OH pekat kemudian disaring dan dicuci dengan menggunakan larutan NH_4OH 1% sampai tidak ada sisa endapan pada beaker glass. Kertas saring yang mengandung endapan dikeringkan dalam oven pada suhu $60\text{ }^\circ\text{C}$ selama 30 menit. Pengovenan dengan suhu $60\text{ }^\circ\text{C}$ diharapkan agar senyawa alkaloid tidak mengalami kerusakan. Setelah dingin, endapan ditimbang hingga diperoleh alkaloid total, Hasil kadar alkaloid total ditunjukkan pada Tabel 4.6 dengan perhitungan rendemen di Lampiran 4.

Tabel 4.6 Hasil penetapan kadar alkaloid total fraksi

Fraksi hasil laju alir	Berat fraksi (gr)	Rendemen (%)
1 mL/menit	0,0697	0,988
2 mL/menit	0,0362	0,6284

Berdasarkan hasil penetapan kadar alkaloid total fraksi laju alir 1 mL/menit dan 2 mL/menit, maka penggunaan laju alir 1 mL/menit merupakan laju alir terbaik yang dapat digunakan untuk isolasi senyawa bahan alam khususnya senyawa alkaloid dalam tanaman anting-anting (*Acalypha indica* L). Hal tersebut disebabkan karena waktu kontak antara senyawa dengan adsorben mencapai titik optimum, sehingga keseimbangan antara adsorben dengan fase gerak umumnya cepat dicapai. Dengan keseimbangan ini, maka jumlah senyawa terpisah yang dibawa oleh laju alir 1 mL/menit lebih banyak dibandingkan dengan laju alir 2 mL/menit. Hal ini didasarkan pada banyaknya kadar alkaloid total yang diperoleh sebanyak 0,988%. Selain itu hasil pengelompokan fraksi dengan laju alir 1 mL/menit diperoleh 3 fraksi sementara pada laju alir 2 mL/menit hanya 2 fraksi. Banyaknya rendemen dan fraksi menandakan banyaknya senyawa alkaloid yang terpisah.

4.8 Uji Kemurnian Isolat dengan KLT Analitik

Pengujian kemurnian isolat alkaloid yaitu dengan KLT analitik. Hasil isolat alkaloid yang diperoleh dari pemisahan kemudian ditotolkan pada jarak 1 cm dari garis bawah dan 1 cm dari garis tepi lalu dikembangkan atau dielusi dengan menggunakan satu sistem fase gerak kloroform:metanol (9,5:0,5). Noda yang dihasilkan pada plat KLT kemudian dilihat dibawah sinar UV pada panjang gelombang 366 nm. Spot yang terbentuk ditandai menggunakan pensil, Spot hasil pemisahan KLT analitik diilustrasikan pada Gambar 4.4

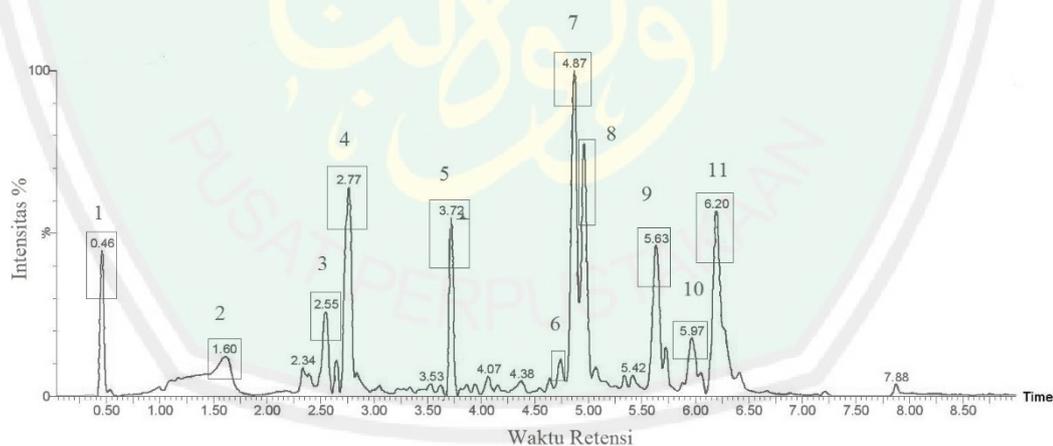


Gambar 4.4: Ilustrasi KLTA

Berdasarkan hasil dari uji kemurniaan isolat alkaloid dengan KLT analitik pada Gambar 4.6 menunjukkan bahwa pada saat proses elusi menghasilkan satu noda. Noda yang dihasilkan tersebut berwarna hijau terang dengan nilai R_f 0,8. Noda yang dihasilkan ketika dilihat dibawah sinar UV akan menghasilkan berbagai warna untuk senyawa alkaloid, hal ini dikarenakan ada berbagai jenis senyawa alkaloid yang terdapat di alam (Harborne, 1987). Warna tersebut antara lain, warna hijau terang (Rahmah, 2014); warna jingga keunguan, hijau terang (Rahmawati, 2015). Dari hasil KLTA tersebut dapat diasumsikan bahwa isolat yang dihasilkan telah murni.

4.9 Identifikasi Senyawa Alkaloid Menggunakan UPLC-MS

Kromatografi cair merupakan teknik yang mana senyawa/komponen terpisah oleh perbedaan kecepatan elusi, dikarenakan senyawa-senyawa ini melewati kolom. Isolat dari hasil isolasi menggunakan kromatografi dengan kecepatan laju alir 1 mL/menit dilakukan analisis senyawa dengan UPLC-MS untuk mengetahui struktur dari senyawa alkaloid murni yang didapatkan. Analisis dengan UPLC memberikan banyaknya jenis senyawa alkaloid yang terkandung dalam isolat hasil pemisahan. Sedangkan spektroskopi massa untuk mengetahui ion molekuler (m/z) yang menunjukkan massa relatif molekul dari senyawa alkaloid yang terdapat pada isolat. Analisis kualitatif ditunjukkan dari jumlah senyawa berdasarkan jumlah puncak pada kromatogram. Hasil kromatogram UPLC-MS isolat alkaloid tanaman anting-anting ditampilkan dalam Gambar 4.5.

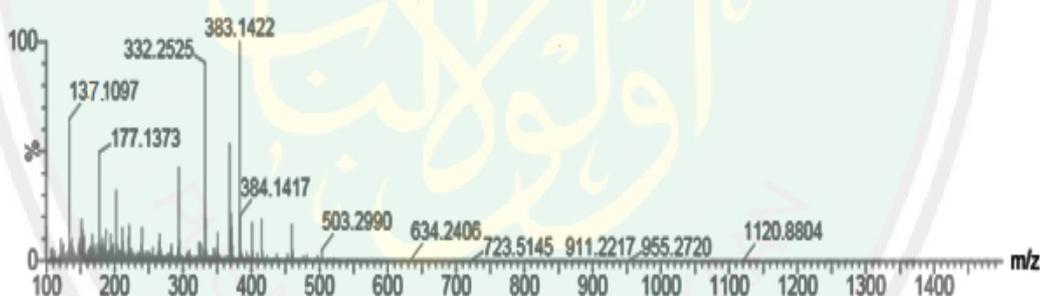


Gambar 4.5: Kromatogram UPLC-MS isolat alkaloid tanaman Anting-anting

Hasil analisis menggunakan UPLC-MS pada Gambar 4.5 menunjukkan adanya 11 puncak, hal ini membuktikan bahwa dalam isolat hasil pemisahan ada 11 serapan senyawa. Isolat anting-anting masih belum murni karena masih

menghasilkan banyak puncak. Sementara pada hasil uji kemurnian isolat menggunakan KLT analitik diduga isolat alkaloid telah murni karena memberikan noda tunggal. Hal tersebut dimungkinkan karena pada uji kemurnian KLT analitik masih ada banyak senyawa yang menumpuk, sehingga hanya ada satu noda hijau yang terdapat pada KLT ketika dilihat di lampu UV.

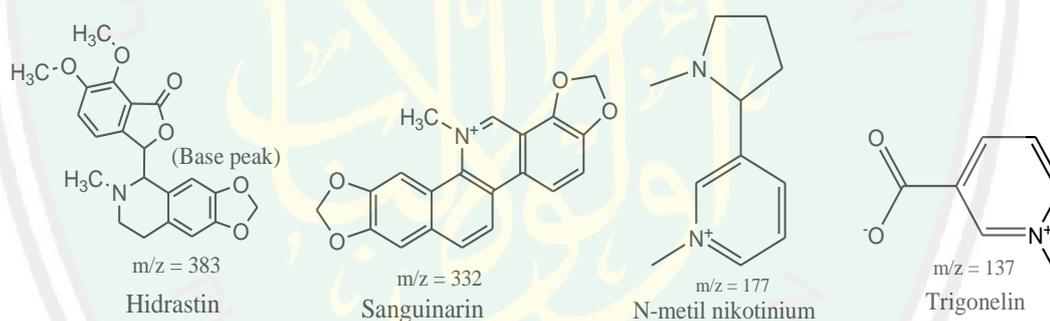
Gambar 4.5 memperlihatkan waktu retensi (tR) yang dibutuhkan senyawa untuk keluar dari kolom dan dideteksi oleh detektor berkisar antara 0,50 menit sampai 9,00 menit. Sebelas puncak tersebut merupakan jenis senyawa alkaloid yang telah dipisahkan berdasarkan prinsip kromatografi dengan waktu retensi yang berbeda-beda. Pada puncak 1 dengan waktu retensi 0,46 menit memiliki spektra massa yang ditunjukkan pada Gambar 4.6.



Gambar 4.6: Spektra massa senyawa puncak 1

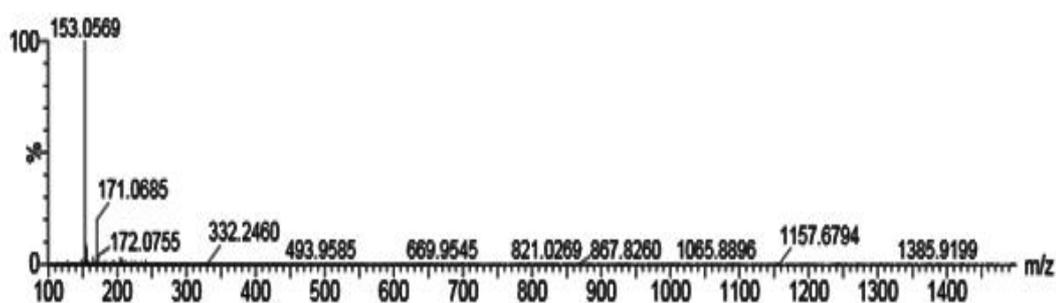
Gambar 4.6 menunjukkan bahwa spektra massa puncak 1 memiliki berat molekul 1.120,8804. Berat molekul tersebut terfragmen menjadi beberapa ion molekuler diantaranya 383, 1422 m/z, 332,2525 m/z, 177,1373 m/z dan 137,1097 m/z. Dari empat ion molekuler tersebut, nilai m/z 383,1422 merupakan puncak dasar (*base peak*) yang sifatnya stabil pada puncak 1 dengan kelimpahan relatif sebesar 100%. Nilai m/z pada puncak dasar (*base peak*) menunjukkan ion

molekuler senyawa mayor yang terdapat pada puncak 1. Ion molekuler pada puncak dasar (*base peak*) tersebut merupakan ion molekuler yang memiliki kemiripan terhadap massa relatif dari molekul senyawa hidrastin. Senyawa hidrastin merupakan senyawa alkaloid golongan isokuinolin dengan rumus molekul $C_{21}H_{21}NO_4$. Sedangkan nilai m/z 332,2525 memiliki kemiripan terhadap massa relatif dari molekul senyawa sanguinarin. Untuk nilai m/z 177,1373 memiliki kemiripan dengan senyawa N-metil nikotinium dan nilai m/z 137,1097 merupakan ion molekuler yang memiliki kemiripan dengan senyawa trigonelin. Adapun struktur senyawa produk dari berat molekul 1.120,8804 ditunjukkan pada Gambar 4.7.



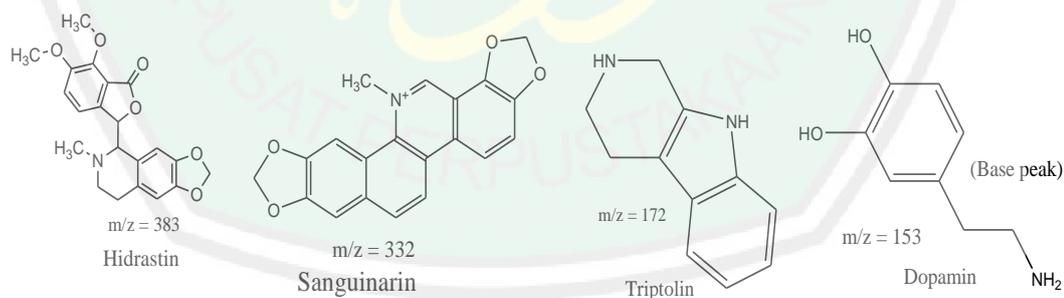
Gambar 4.7 Struktur senyawa produk dari BM 1.120,8804

Senyawa puncak 2 dengan waktu retensi 1,60 menit memiliki spektra massa yang ditampilkan pada Gambar 4.8.



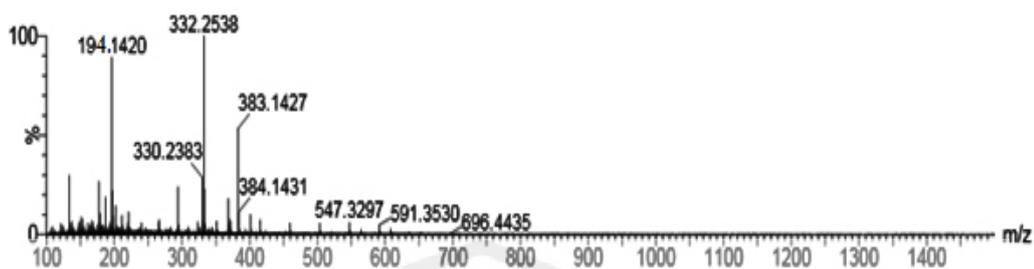
Gambar 4.8 Spektra massa senyawa puncak 2

Berdasarkan Gambar 4.8 diketahui bahwa pada puncak 2 memiliki berat molekul 1.385,9199. Dimana berat molekul tersebut terfragmen menjadi beberapa ion molekuler diantaranya 332,2460 m/z, 171,0685 m/z dan 153,0569 m/z. Dari tiga ion molekuler tersebut, nilai m/z 153,0569 merupakan puncak dasar (*base peak*) yang sifatnya stabil pada puncak 2 dengan kelimpahan relatif sebesar 100%. Nilai m/z pada puncak dasar (*base peak*) menunjukkan ion molekuler senyawa mayor yang terdapat pada puncak 2. Ion molekuler pada puncak dasar (*base peak*) tersebut merupakan ion molekuler yang memiliki kemiripan terhadap massa relatif dari molekul senyawa dopamin. Senyawa dopamin merupakan senyawa alkaloid yang termasuk golongan protoalkaloid dengan rumus molekul $C_8H_{11}NO_2$. Untuk m/z 171,0685 memiliki kemiripan dengan senyawa triptolin. Sedangkan ion molekuler 332,2460 m/z memiliki kemiripan dengan senyawa sanguinarin. Adapun struktur senyawa produk dari berat molekul 1.385,9199 ditunjukkan pada Gambar 4.9.



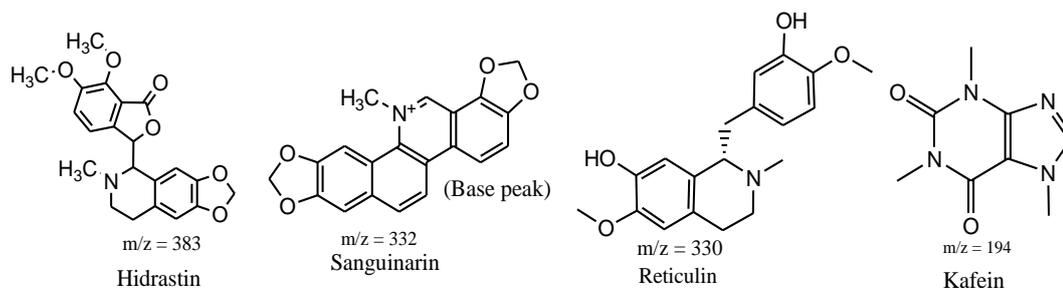
Gambar 4.9 Struktur senyawa produk dari BM 1.385,9199

Selanjutnya pada senyawa puncak 3 dengan waktu retensi 2,55 menit memiliki spektra massa yang ditampilkan pada Gambar 4.10.



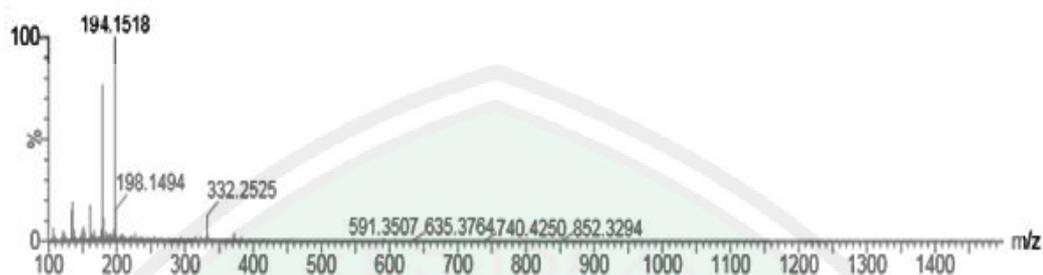
Gambar 4.10 Spektra massa senyawa puncak 3

Gambar 4.10 menunjukkan bahwa spektra massa puncak 3 memiliki berat molekul 696,4435 m/z. Berat molekul tersebut terfragmen menjadi beberapa ion molekuler diantaranya 383, 1427 m/z, 332,2538 m/z, 330,2383 m/z dan 194,1420 m/z. Ion molekuler 332,2538 m/z merupakan puncak dasar (*base peak*) pada puncak 3 dengan kelimpahan relatif sebesar 100%. Nilai m/z pada puncak dasar (*base peak*) merupakan senyawa mayor pada puncak 3. Ion molekuler pada puncak dasar (*base peak*) tersebut merupakan ion molekuler yang memiliki kemiripan terhadap massa relatif dari molekul senyawa sanguinarin. Senyawa sanguinarin merupakan senyawa alkaloid golongan isokuinolin dengan rumus molekul $C_{20}H_{14}NO_4$. Untuk m/z 330,2383 memiliki kemiripan dengan senyawa reticulin. Sedangkan ion molekuler 194,1420 m/z memiliki kemiripan dengan senyawa kafein. Adapun struktur senyawa produk dari berat molekul 696,4435 ditunjukkan pada Gambar 4.11.



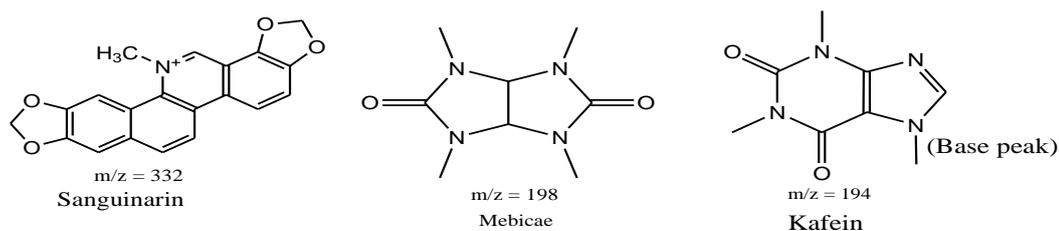
Gambar 4.11 Struktur senyawa produk dari BM 696,4435

Untuk senyawa puncak 4 dengan waktu retensi 2,77 menit memiliki spektra massa yang ditampilkan pada Gambar 4.12.



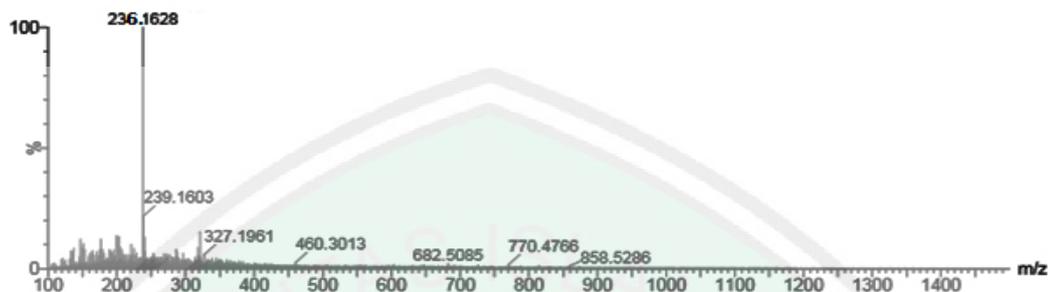
Gambar 4.12 Spektra massa senyawa puncak 4

Gambar 4.12 menunjukkan bahwa puncak dasar (*base peak*) pada spektra massa memiliki berat molekul 852,3294 m/z. Berat molekul tersebut terfragmen menjadi beberapa ion molekuler diantaranya 332,2525 m/z, 198,1494 m/z dan 194,1518 m/z. Ion molekuler 194,1518 m/z merupakan puncak dasar (*base peak*) pada puncak 4 dengan intensitas sebesar 100%. Ion molekuler pada puncak dasar (*base peak*) tersebut merupakan senyawa mayor pada puncak 4. Nilai m/z pada puncak dasar (*base peak*) memiliki kemiripan terhadap massa relatif dari molekul senyawa kafein. Senyawa kafein merupakan senyawa alkaloid yang termasuk golongan purin dengan rumus molekul $C_8H_{10}N_4O_2$. Sedangkan m/z 198,1494 memiliki kemiripan dengan senyawa mebicae. Adapun struktur senyawa produk dari berat molekul 852,3294 m/z ditunjukkan pada Gambar 4.13.



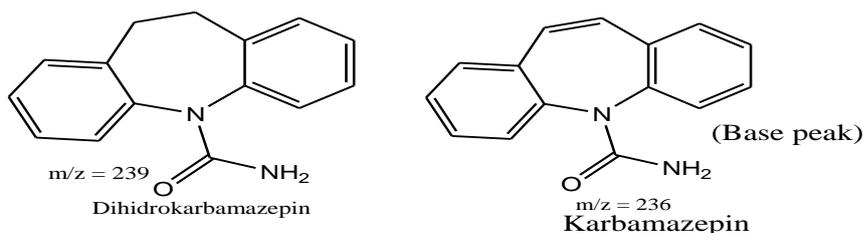
Gambar 4.13 Struktur senyawa produk dari BM 852,3294

Senyawa puncak 5 dengan waktu retensi 3,72 menit memiliki spektra massa yang ditampilkan pada Gambar 4.14.



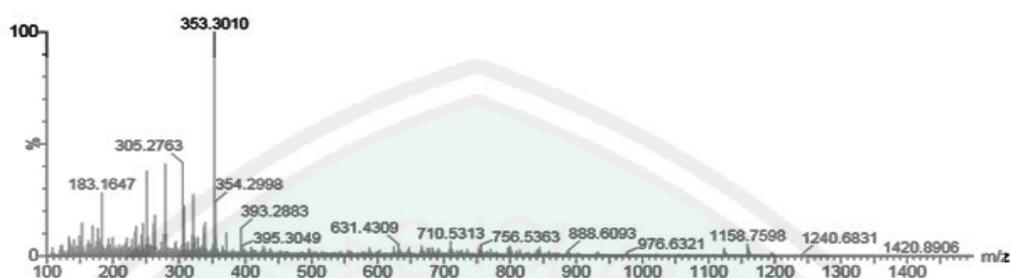
Gambar 4.14 Spektra massa senyawa puncak 5

Berdasarkan Gambar 4.14 diketahui bahwa spektra massa puncak 5 memiliki berat molekul 858,5286 m/z. Berat molekul tersebut terfragmen menjadi beberapa ion molekuler diantaranya 239,1603 m/z dan 236,1628 m/z. Puncak dasar (*base peak*) pada puncak 5 terdapat pada m/z 236,1628 dengan kelimpahan relatif sebesar 100%. Nilai m/z pada puncak dasar (*base peak*) menunjukkan senyawa mayor yang terdapat pada puncak 5. Ion molekuler pada puncak dasar (*base peak*) tersebut memiliki kemiripan terhadap massa relatif dari molekul senyawa karbamazepin. Senyawa karbamazepin merupakan senyawa alkaloid golongan indol dengan rumus molekul $C_{15}H_{14}N_2O$. Sedangkan ion molekuler 239,1603 m/z memiliki kemiripan dengan senyawa dihidrokarbamazepin. Adapun struktur senyawa produk dari berat molekul 852,5286 m/z ditunjukkan pada Gambar 4.15.



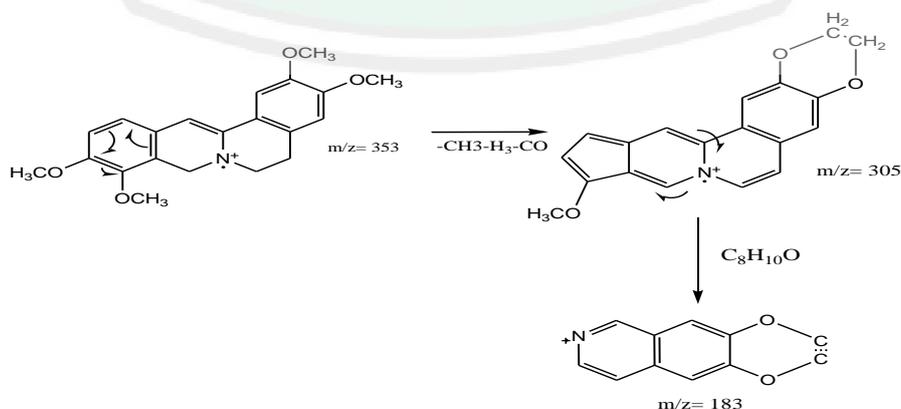
Gambar 4.15 Struktur senyawa produk dari BM 852,5286

Pada puncak 6 dengan waktu retensi 4,74 menit memiliki spektra massa yang ditunjukkan pada Gambar 4.16.



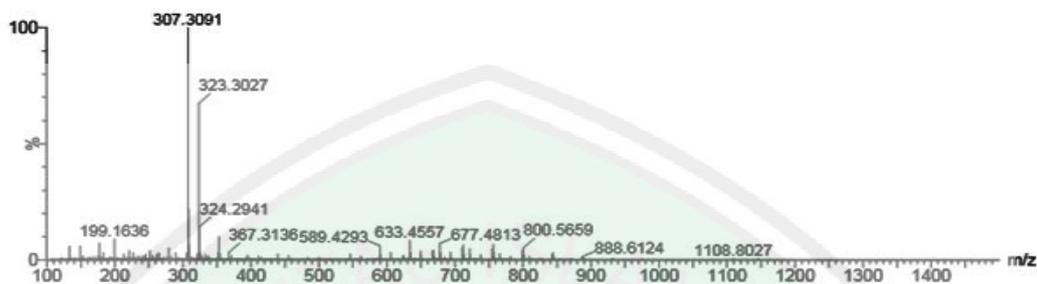
Gambar 4.16 Spektra massa senyawa puncak 6

Gambar 4.16 menunjukkan bahwa spektra massa puncak 6 memiliki *Base peak* yang sifatnya stabil pada m/z 353,3010 dengan kelimpahan relatif sebesar 100%. Nilai m/z pada puncak dasar menunjukkan ion molekuler senyawa yang terdapat pada puncak 6. Ion molekuler pada *base peak* tersebut merupakan ion molekuler yang memiliki kemiripan terhadap massa relatif dari molekul senyawa palmatin. Senyawa palmatin merupakan senyawa alkaloid golongan isokuinolin dengan rumus molekul $C_{21}H_{22}NO_4$. Hal ini didukung dengan pola fragmentasi ion seperti yang ditampilkan pada Gambar 4.17 berikut:



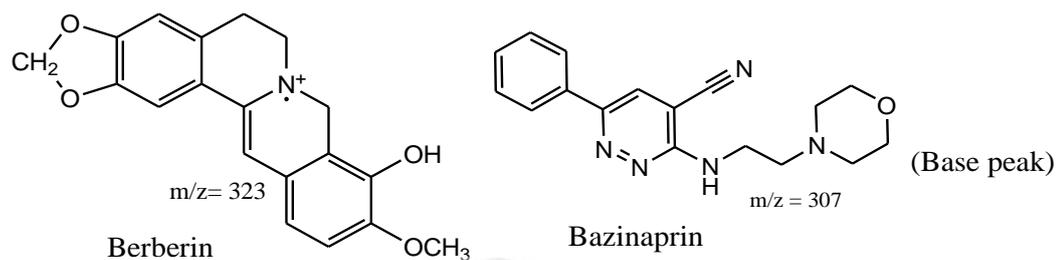
Gambar 4.17 Pola fragmentasi senyawa palmatin

Senyawa puncak 7 dengan waktu retensi 4,86 menit memiliki spektra massa yang ditampilkan pada Gambar 4.18.



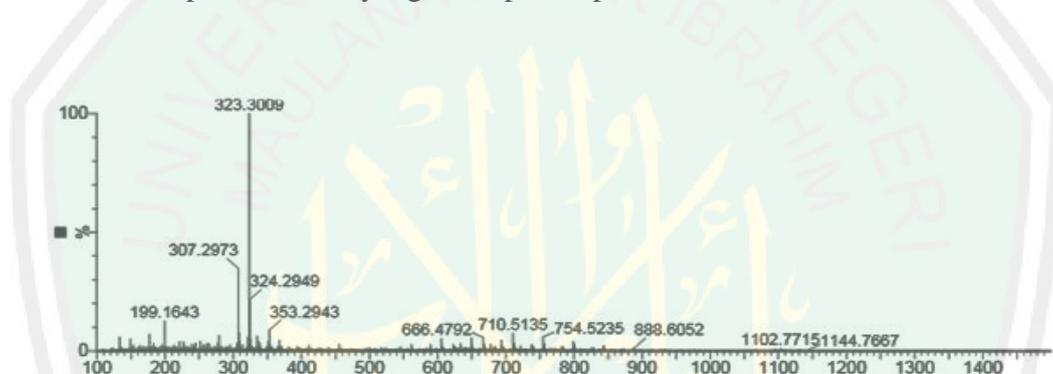
Gambar 4.18 Spektra massa senyawa puncak 7

Gambar 4.18 menunjukkan bahwa spektra massa puncak 7 memiliki berat molekul 1.108,8027. Berat molekul tersebut terfragmen menjadi beberapa ion molekuler diantaranya 323, 3027 m/z dan 307,3091 m/z. Dari empat ion molekuler tersebut, nilai m/z 307,3091 merupakan puncak dasar (*base peak*) yang sifatnya stabil pada puncak 7 dengan kelimpahan relatif sebesar 100%. Nilai m/z pada puncak dasar (*base peak*) menunjukkan ion molekuler senyawa mayor yang terdapat pada puncak 7. Ion molekuler pada puncak dasar (*base peak*) tersebut merupakan ion molekuler yang memiliki kemiripan terhadap massa relatif dari molekul senyawa bazinaprin. Senyawa bazinaprin merupakan senyawa alkaloid golongan purin dengan rumus molekul $C_{17}H_{19}N_5O$. Sedangkan ion ion molekuler dengan m/z 323, 3027 memiliki kemiripan dengan senyawa berberin. Adapun struktur senyawa produk dari berat molekul 1.108,8027 ditunjukkan pada Gambar 4.19.



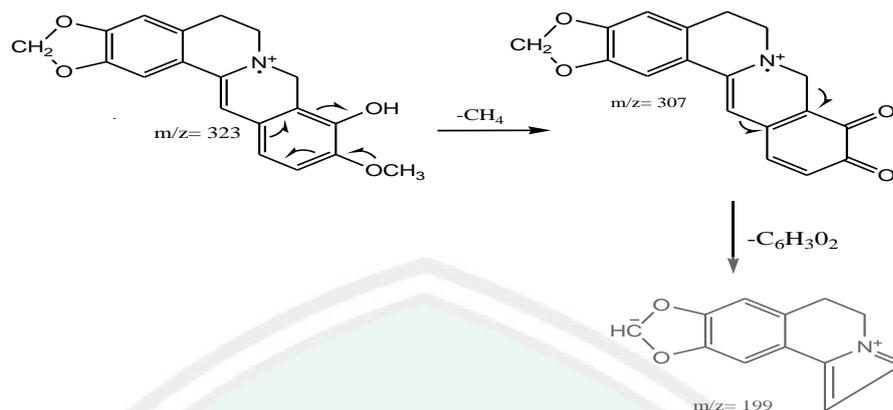
Gambar 4.19 Struktur senyawa produk dari BM 1.108,8027

Selanjutnya pada Senyawa puncak 8 dengan waktu retensi 4,95 menit. Memiliki spektra massa yang ditampilkan pada Gambar 4.20



Gambar 4.20 Spektra massa senyawa puncak 8

Gambar 4.20 menunjukkan bahwa spektra massa puncak 8 memiliki puncak dasar (*base peak*) pada m/z 323,3009 dengan kelimpahan relatif sebesar 100%. Nilai m/z pada puncak dasar (*base peak*) menunjukkan ion molekuler senyawa yang terdapat pada puncak 8. Ion molekuler pada puncak dasar (*base peak*) tersebut merupakan ion molekuler yang memiliki kemiripan terhadap massa relatif dari molekul senyawa berberin. Senyawa berberin merupakan senyawa alkaloid golongan isokuinolin dengan rumus molekul $C_{20}H_{18}NO_4$. Hal ini didukung dengan pola fragmentasi ion molekuler seperti yang ditampilkan Gambar 4.21.



Gambar 4.21 Pola fragmentasi senyawa berberin

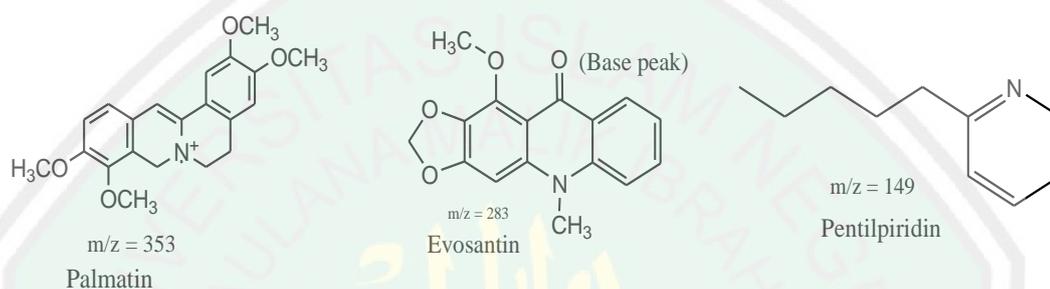
Senyawa puncak 9 dengan waktu retensi 5,63 menit memiliki spektra massa yang ditampilkan pada Gambar 4.22.



Gambar 4.22 Spektra massa senyawa puncak 9

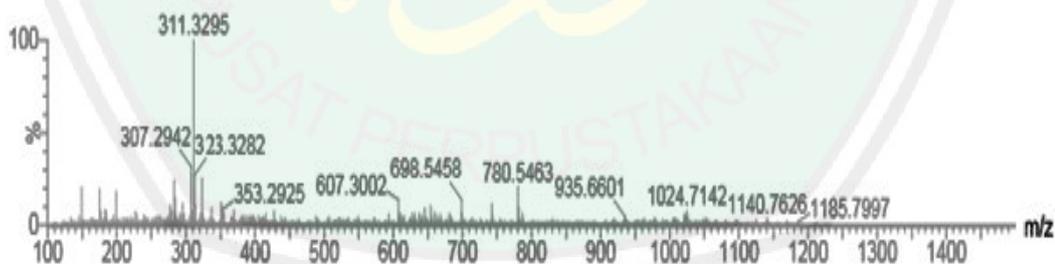
Berdasarkan Gambar 4.22 diketahui bahwa spektra massa puncak 9 memiliki berat molekul 1.066,7390 m/z . Berat molekul tersebut terfragmen menjadi beberapa ion molekuler diantaranya 353,2869 m/z , 283,3002 m/z dan 149,0594 m/z . Puncak dasar (*base peak*) pada puncak 9 terdapat pada m/z 283,3002 dengan kelimpahan relatif sebesar 100%. Nilai m/z pada puncak dasar (*base peak*) menunjukkan senyawa mayor yang terdapat pada puncak 9. Ion molekuler pada puncak dasar (*base peak*) tersebut merupakan ion molekuler yang memiliki

kemiripan terhadap massa relatif dari molekul senyawa evosantin. Senyawa evosantin merupakan senyawa alkaloid golongan indol dengan rumus molekul $C_{16}H_{13}NO_4$. Sedangkan m/z 149,0594 memiliki kemiripan dengan senyawa pentilpiridin. Adapun struktur senyawa produk dari berat molekul 1.066,7390 m/z ditunjukkan pada Gambar 4.23.



Gambar 4.23 Struktur senyawa produk dari BM 1.066,7390

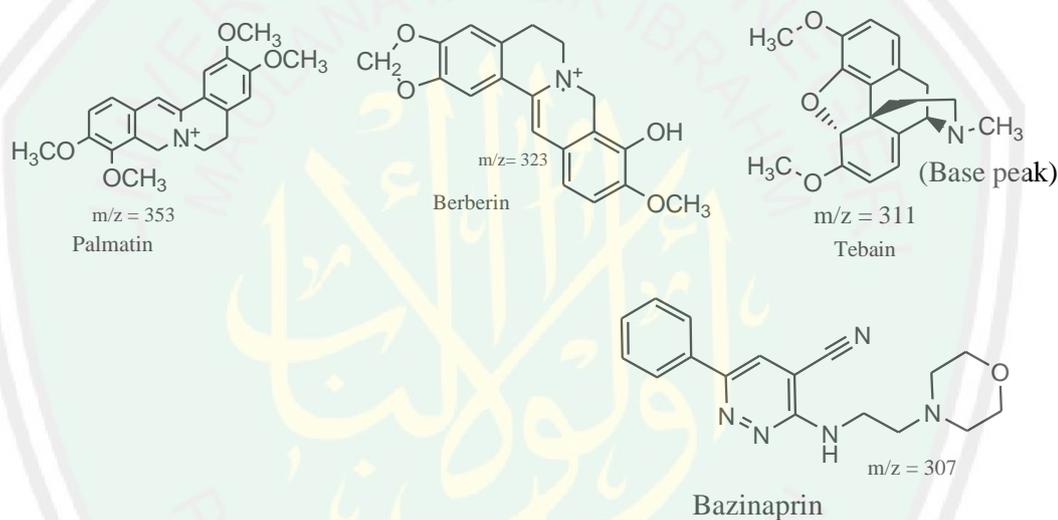
Pada puncak 10 dengan waktu retensi 5,97 menit memiliki spektra massa yang ditunjukkan pada Gambar 4.24.



Gambar 4.24 Spektra massa senyawa puncak 10

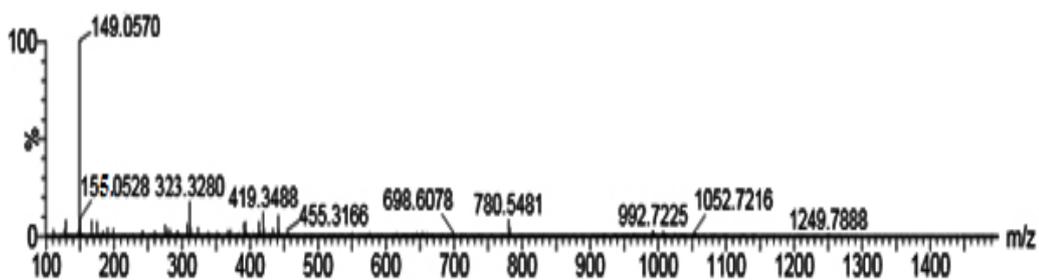
Gambar 4.24 menunjukkan bahwa spektra massa puncak 10 memiliki berat molekul 1185,7997 m/z . Berat molekul tersebut terfragmen menjadi beberapa ion molekuler diantaranya 353,2925 m/z , 323,3282 m/z , 311,3295 dan 307,2942 m/z .

Puncak dasar (*base peak*) pada puncak 10 terdapat pada m/z 311,3295 dengan kelimpahan relatif sebesar 100%. Nilai m/z pada puncak dasar (*base peak*) menunjukkan senyawa mayor yang terdapat pada puncak 10. Ion molekuler pada puncak dasar (*base peak*) tersebut memiliki kemiripan terhadap massa relatif dari molekul senyawa tebain. Senyawa tebain merupakan senyawa alkaloid golongan fenantrena dengan rumus molekul $C_{19}H_{23}NO_3$. Adapun struktur senyawa produk dari berat molekul 1185,7997 m/z ditunjukkan pada Gambar 4.25.



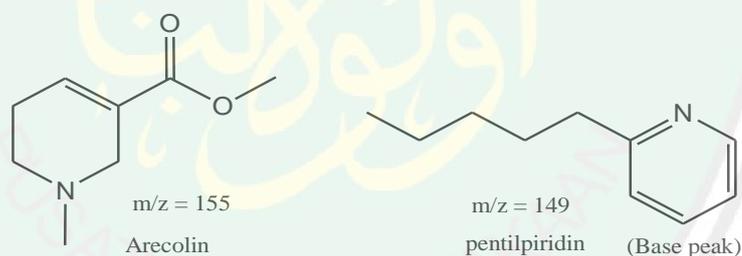
Gambar 4.25 Struktur senyawa produk dari BM 1185,7997

Selanjutnya puncak 11 dengan waktu retensi 6,20 menit memiliki spektra massa yang ditunjukkan pada Gambar 4.26.



Gambar 4.26 Spektra massa senyawa puncak 11

Gambar 4.26 menunjukkan bahwa spektra massa puncak 11 memiliki berat molekul 1.249,7888 m/z. Berat molekul tersebut terfragmen menjadi beberapa ion molekuler diantaranya 155,0528 m/z dan 149,0570 m/z. Puncak dasar (*base peak*) pada puncak 11 terdapat pada m/z 149,0570 dengan kelimpahan relatif sebesar 100%. Nilai m/z pada puncak dasar (*base peak*) menunjukkan senyawa mayor yang terdapat pada puncak 11. Ion molekuler pada puncak dasar (*base peak*) tersebut memiliki kemiripan terhadap massa relatif dari molekul senyawa tebain senyawa pentilpiridin. Senyawa pentilpiridin merupakan senyawa alkaloid yang termasuk golongan piridin dengan rumus molekul $C_{10}H_{15}N$. Sedangkan ion molekuler 155,0528 m/z memiliki kemiripan dengan senyawa arecolin. Adapun struktur senyawa produk dari berat molekul 1.249,7888 m/z ditunjukkan pada Gambar 4.27.



Gambar 4.27 Struktur produk dari BM 1.249,7888

Dari sebelas dugaan senyawa yang ada pada isolat anting-anting (*Acalypha indica* L), ada beberapa senyawa yang paling dominan terdapat pada isolat anting-anting (*Acalypha indica* L). Banyaknya senyawa terdapat pada isolat anting-anting dilihat dari seringnya senyawa tersebut muncul dengan m/z yang sama pada spektra massa tiap puncak kromatogram berdasarkan identifikasi

menggunakan UPLC-MS. Senyawa alkaloid yang paling dominan terdapat pada isolat anting-anting tersebut ditunjukkan pada Tabel 4.7

Tabel 4.7 Senyawa alkaloid yang dominan pada isolat Anting-anting

M/Z	Nama Senyawa	Golongan	Jumlah Kemunculan m/z pada Spektra Massa
353	Palmatin	Isokuinolin	6
332	Sanguinarin	Isokuinolin	6
323	Berberin	Isokuinolin	5
383	Hidrastin	Isokuinolin	2
194	Kafein	Purin	3
307	Bazinaprin	purin	3
153	Dopamin	Protoalkaloid	2
149	pentilpiridin	Piridin	5
283	evosantin	Indol	2

4.10 Pemanfaatan Tanaman Anting-anting (*Acalypha indica* L) dalam Perspektif Islam

Penelitian ini mengkaji mengenai isolasi salah satu senyawa kimia yaitu senyawa alkaloid yang terkandung di dalam tanaman anting-anting. Di dalam ayat-ayat alquran, Allah SWT sering kali menyeru manusia untuk memperhatikan dan merenungkan ciptaan-ciptaan-Nya yang amat menakjubkan. Agar senantiasa manusia selalu berfikir dan menjadi hamba Allah yang tunduk dan patuh dihadapan Allah SWT. Sebagaimana firman Allah dalam Qs. Ali ‘Imran ayat 190 yaitu:

إِنَّ فِي خَلْقِ السَّمَاوَاتِ وَالْأَرْضِ وَاخْتِلَافِ اللَّيْلِ وَالنَّهَارِ لآيَاتٍ لِّأُولِي الْأَبْصَارِ ۝ ١٩٠

Artinya:

“*Sesungguhnya dalam penciptaan langit dan bumi, dan silih bergantinya malam dan siang terdapat tanda-tanda bagi orang-orang yang berakal*” (Qs. Ali ‘Imran 190)

Qs. Al- Imran ayat 190 menunjukkan tentang kekuasaan dan kebesaran Allah SWT yang menciptakan alam beserta isinya seperti hewan dan tumbuhan. Tidak ada segala sesuatu yang diciptakan oleh Allah menjadi sesuatu yang sia-sia, melainkan Allah SWT menciptakan segala sesuatu dengan hikmah-hikmah tertentu. Dalam tafsir Ibnu Katsir (2004) menjelaskan bahwa orang-orang yang berakal akan memikirkan segala ciptaan Allah SWT yang terdapat di langit dan bumi. Mereka memahami dan mempelajarinya kemudian mengambil hikmahnya sehingga mereka mampu menunjukkan betapa besar keagungan Allah SWT atas segala ciptaan-Nya.

Salah satu ciptaan atau karunia Allah SWT kepada umat manusia yang ada dimuka bumi adalah aneka ragam tumbuhan dengan segala macam manfaatnya. Banyaknya tanaman baik yang tumbuh dimuka bumi untuk dimanfaatkan oleh umat manusia merupakan bukti jelas betapa sempurnanya kekuasaan Allah SWT. Sebagaimana Allah SWT berfirman dalam Qs. Asy-Syu'araa' ayat 7:

أَوَلَمْ يَرَوْا إِلَى الْأَرْضِ كَمْ أَنْبَتْنَا فِيهَا مِنْ كُلِّ زَوْجٍ كَرِيمٍ ۝٧

Artinya:

“Dan apakah mereka tidak memperhatikan bumi, berapakah banyaknya Kami tumbuhkan di bumi itu berbagai macam tumbuh-tumbuhan yang baik?” (Qs. Asy-Syu'araa':7)

Tumbuhan yang baik dalam hal ini adalah tumbuhan yang subur dan bermanfaat bagi makhluk hidup (Shihab, 2002). Qs. Asy-Syu'araa' ayat 7 menunjukkan bahwa Allah menciptakan bumi yang didalamnya banyak terdapat tumbuhan yang baik, yang dapat dimanfaatkan oleh makhluk hidup. Tumbuhan yang bermacam-macam jenisnya dapat digunakan sebagai obat berbagai penyakit.

Salah satu tumbuhan yang telah Allah SWT ciptakan ialah tanaman anting-anting (*Acalypha indica* L). Bagian dari tumbuhan anting-anting seperti akar, batang, daun, dan bunga dapat bermanfaat sebagai tumbuhan obat untuk menyembuhkan berbagai macam penyakit.

Menurut Rahmawati (2015) fraksi etil asetat hasil fraksinasi ekstrak metanol tanaman anting-anting (*Acalypha indica* L) mengandung senyawa alkaloid. Pada penelitian ini rendemen fraksi etil asetat diperoleh 0,1446%. Sementara penelitian Kusumarini (2013) menggunakan fraksi lain yaitu kloroform diperoleh rendemen 0,019%. Selain itu, Rahmah (2014) menggunakan fraksi kloroform diperoleh rendemen sebesar 0,0364%. Hal ini mengindikasikan bahwa fraksi etil asetat dapat mengesktrak senyawa alkaloid lebih banyak dibandingkan dengan fraksi kloroform. Kandungan senyawa alkaloid tanaman anting-anting menunjukkan aktif sebagai antimalaria (Husna, 2011) dan sebagai antibakteri (Zamrodi, 2011).

Hasil penelitian ini menunjukkan bahwa senyawa alkaloid dalam tanaman anting-anting lebih baik diisolasi menggunakan kromatografi kolom dengan kecepatan laju alir 1 mL/menit dari pada menggunakan laju alir 2 mL/menit. Pada kecepatan laju alir 1 mL/menit diperoleh kadar alkaloid total sebanyak 0,988 % dengan berat isolat alkaloid 0.0697 gram. Hal ini tersirat dalam Qs. Al-Qamar ayat 49 tentang penciptaan segala makhluk dengan kadar tertentu:

إِنَّا كُلَّ شَيْءٍ خَلَقْنَاهُ بِقَدَرٍ ۙ ٤٩

Artinya:

“*Sesungguhnya Kami menciptakan segala sesuatu menurut ukuran*”. (Qs. Al-Qamar ayat 49)

Qs. Al-Qamar ayat 49 menunjukkan bahwa segala sesuatu yang diciptakan oleh Allah sesuai dengan naluri, sifat-sifat dan fungsinya masing-masing dalam hidup. Dalam tafsir Ibnu Katsir (2004) menjelaskan bahwa Allah SWT telah menentukan atau memberi ukuran/kadar masing-masing makhluk-Nya dan memberi petunjuk kepada makhluk-Nya. Semua makhluk telah ditetapkan kadarnya dalam segala hal.

Endapan alkaloid total kemudian di lakukan uji kemurnian dengan KLT Analitik dan diperoleh satu noda yang berwarna hijau terang. Hal ini mengindikasikan bahwa isolat yang diperoleh telah murni. Setelah itu dilakukan identifikasi menggunakan UPLC-MS dan diperoleh isolat senyawa alkaloid masih belum murni. Karena dalam isolat masih ada sebelas jenis senyawa alkaloid dengan ditunjukkan oleh puncak-puncak kromatogram pada Gambar 4.5. Adapun dugaan senyawa tersebut adalah senyawa hidrastin, dopamin, sanguinarin, kafein, karbamazepin, palmatin, bazinaprin, berberin, evosantin, tebain dan senyawa pentilpiridin.

BAB V PENUTUP

5.1 Kesimpulan

Berdasarkan hasil penelitian dapat disimpulkan bahwa:

1. Hasil isolasi senyawa alkaloid fraksi etil asetat tanaman anting-anting (*Acalypha indica* L) menggunakan kromatografi kolom dengan kecepatan laju alir 1 mL/menit lebih baik dari pada menggunakan kecepatan laju alir 2 mL/menit.
2. Hasil identifikasi senyawa menggunakan UPLC-MS pada isolat alkaloid hasil pemisahan menggunakan kromatografi kolom dengan kecepatan laju alir 1 mL/menit diduga merupakan senyawa hidrastin, dopamin, sanguinarin, kafein, karbamazepin, palmatin, bazinaprin, berberin, evosantin, tebain dan senyawa pentilpiridin

5.2 Saran

1. Tidak perlu dilakukan penyampuran fraksi hasil pengelompokan uji kualitatif pada penelitian selanjutnya agar isolat yang diperoleh lebih murni dan tidak bercampur dengan senyawa lain
2. Perlu dilakukan uji kemurnian pada masing-masing fraksi hasil pengelompokan uji kualitatif
3. Perlu dilakukan uji kemurnian menggunakan KLT 2 Dimensi atau variasi eluen pada KLT agar kemurnian isolat dapat diketahui lebih maksimal
4. Perlu dilakukan identifikasi lebih lanjut dengan menggunakan instrumen H-NMR dan C-NMR untuk mengetahui struktur senyawaan alkaloid pada tanaman anting-anting.

DAFTAR PUSTAKA

- Alio, et al. 2013. Isolasi Dan Karakterisasi Senyawa Alkaloid Dari Biji Tumbuhan Sirsak (*Annona Muricata* Linn). *Jurnal Penelitian*. Jurusan Pendidikan Kimia Fakultas MIPA. Universitas Negeri Gorontalo
- Al- Farran, A,b.M. 2007. *Menyelami kedalaman Kandungan Al-Quran dan Tafsir Imam Syafi'i*. Jakarta: Almahira
- Al-Maraghi, A. M. 1992. *Terjemahan Tafsir Al-Maraghi Jilid 14*. Semarang. CV: Toha Putra Semarang
- Azmahani, dkk. 2002. In Vitro Anti Bakterial and Anti Fungal Properties of *Acalypha Indica* (Kucing Galak). *Proceedings of The Regional Symposium on Environment and Natural Resources*. Department of Biomedical Sciences, Faculty Medicine and Health Sciences, University Putra Malaysia, 43400 UPM Serdang, Selangor Darul Ehsan. Malaysia
- Baraja, M.2008. Uji Toksisitas Ekstrak Daun *Ficus Elastica* Noies ex Blume terhadap *Artemia salina* Leach dan Profil Kromatografi Lapis Tipis. *Skripsi Diterbitkan*. Surakarta: Fakultas Farmasi Universitas Muhammadiyah Surakarta.
- Brian, S.F. et al. 1989. *Vogel's Textbook of Practical Organic Chemistry, 5th ed.* England: Longmans Group UK.
- Dalimartha, S. 1999. *Atlas Tumbuhan Obat Indonesia, jilid 1*. Jakarta: Trubus Agriwidya
- Farooqi, M. I. H. 2005. *Terapi Herbal Cara Islam; Manfaat Tumbuhan Menurut Al-Qur'an dan Sunah Nabi*. Diterjemahkan oleh Ahmad Y. Samantho, Jakarta: Penerbit Hikmah (PT Mizan Publika)
- Fessenden dan Fessenden. 1997. *Kimia Organik Edisi Ketiga*. Jakarta: Erlangga
- Felicia. 2009. Efek neuterapi ekstrak akar *achalypha indica* linn. terhadap katak bufo dosis 20 mg dan 25 mg. *skripsi diterbitkan*. Jakarta: Fakultas Kedokteran Universitas Indonesia
- Gandjar,I.G. dan Rohman A.2007. *Kimia Farmasi Analisis*. Cetakan II. Yogyakarta: Pustaka Pelajar
- Gritter, R.J. 1991. *Pengantar Kromatografi. edisi kedua*. Diterjemahkan oleh Kokasih Padmawinata. Bandung: Penerbit ITB.
- Halimah N. 2010. Uji Fitokimia dan Uji Toksisitas Ekstrak Tanaman Anting-anting (*Acalypha indica* Linn) Terhadap Larva Udang (*Artemia salina*)

- Leach). *Skripsi*. Malang: Jurusan Kimia Universitas Islam Negeri Maulana Malik Ibrahim.
- Harborne J. B. 1996. *Metode Fitokimia Ed ke-2*. Padmawinata K, Soedira L, penerjemah. Bandung: Penerbit ITB. Terjemahan dari: Phytochemical Method.
- Hayati, E.K. 2009. Senyawa Potensi Antimalaria Tanaman Anting-anting (*Acalypha indica* Linn): Ekstraksi Pemisahan dan Bioaktivitasnya Secara in Vivo. *Jurnal Penelitian*. Malang: Universitas Islam Negeri Maulana Malik Ibrahim.
- Hayati, E.K. 2012. Identifikasi Senyawa Dan Aktivitas Antimalaria In Vivo Ekstrak Etil Asetat Tanaman Anting-Anting (*Acalypha Indica* L.). *Jurnal Penelitian*. Malang: Universitas Islam Negeri Maulana Malik Ibrahim
- Husna, ana nihayah. 2011. Identifikasi Senyawa Dan Aktivitas Antimalaria In Vivo Ekstrak Etil Asetat Tanaman Anting-Anting (*Acalypha Indica* L.). *Skripsi* Tidak Diterbitkan Universitas Islam Negeri Maulana Malik Ibrahim Malang
- Hutapea, I.R. 1993. *Inventaris tanaman obat Indonesia*. Jakarta: Departemen Kesehatan Indonesia
- Ibnu Katsir, Al- Imam Abu Fida Isma'il. *Terjemahan Tafsir Ibn Katsir*. Jakarta: Sinar Baru AL- Gensindo, 2004
- Jhon, Nofrizal. 2012. Analisis dan Karakterisasi Senyawa Alkaloid dari Tanaman Kina (*Chinhona ledgeriana*). *Jurnal Penelitian*. Universitas jambi Seri Sains Volume 14.no.2
- Kartika, R,P.T. 2009. Perbandingan pengaruh ekstrak kasar daun ekor kucing (*Acalypha hispida* L) Dan daun anting-anting (*Acalipha indica* L) terhadap pertumbuhan bakteri staphylococcus aureus secara invitro. *Naskah publikasi*. Fakultas Mipa Universitas Sebelas Maret Surakarta
- Kusmiyati, Aznam, N., Handayani, S. 2011. Isolasi Dan Identifikasi Zat Aktif Ekstrak Metanol Rimpang Kunyit Putih (*Curcuma mangga val*) Fraksi Etil Asetat. *Jurnal Ilmiah Kefarmasian*, Vol. 1, No.2
- Kusrini, D dan Muhammad. 2013. Isolasi, identifikasi dan uji aktivitas senyawa alkaloid total daun tempuyung dan uji sitotoksitasnya dengan metode BSLT. *Jurnal chemistry*, jurusan kimia FSM Universitas Diponegoro Semarang
- Khopkar,S. M. 2008. *Konsep dasar kimia analitik*. Jakarta: UI Press

- Kong, Lingyi. 2005. Preparative Isolation and Purification of Alkaloid from the Chinese medicinal herb *Evodia rutaecarpa* (juss.) Benth by high- speed counter-current chromatography. *Journal of Chromatography. A*, 1074.
- Kristanti novi, 2008. *Buku ajar fitokimia*. Surabaya: Airlangga University Press.
- Lenny, S. 2006. Senyawa flavonoida, Fenilpraponoida, dan Alkaloida. *Karya Ilmiah*. Medan: USU
- Lutfilla, M. 2008. Karakterisasi Senyawa Alkaloid Hasil Isolasi dari Kulit Batang Angsret serta Uji Aktivitasnya sebagai Antibakteri Secara In Vitro. *Skripsi tidak diterbitkan*. Malang: Jurusan Kimia FMIPA Universitas Brawijaya
- Mamidala., Paindla. 2014. Phytochemical and Chromatographic Studies in the Leaves Extract of *Achalipha Indica* Linn. *Online International Interdisciplinary Research Journal vol. IV*
- Marliana, S.D., Suryanti, V. Skrinning Fitokimia dan Analisis Kromatografi Lapis Tipis Komponen Kimia Buah Labu Siam dalam Ekstrak Etanol. *Biofarmasi*. Vol 3 No.1, Surakarta: FMIPA Universitas Sebelas Maret
- Michael vogeser, cristhop seger. 2008. *A decade og HPLC-MS in the routine clinical laboratory-goals for futher development*. Clinical biochemistry
- Muadifah, afidatul. 2013. Efektivitas Antimalaria dan Identifikasi golongan Senyawa aktif Ekstrak etanol 80% tanaman anting-anting pada mencit terinfeksi *Plasmodium berghei*. *Skripsi tidak diterbitkan*. Malang: Universitas Islam Negeri Maulana Malik Ibrahim Malang
- Mulyono. 2009. *Kamus kimia*. Jakarta: Bumi Aksara
- Mulyono. 2012. *Membuat Reagen Kimia di Laboratorium*. Jakarta: Bumi Aksara
- Muslimah, S. 2008. Uji Sitotoksik Fraksi Protein daun dan bunga kucing-kucingan (*Acalypha Indica* L.) Terhadap sel Myeloma. *Skripsi Diterbitkan*. Surakarta: Fakultas Farmasi Universitas Muhammadiyah Surakarta
- Murtadlo., Kusri., Fachriyah. 2013. Isolasi, Identifikasi Senyawa Alkaloid Total Daun Tempuyung Dan Uji Sitotoksik dengan Metode BSLT. *Chem info*. Vol.1
- Nassel, febriyani M. 2008. Isolasi Alkaloid Utama dari Tumbuhan *Lerchea interupta Korth*. Percikan: Vol.91

- Ningsih., Warsinah., Suwandari. 2006. Fraksinasi Ekstrak Metanol Kulit Batabg *Rhizophora mucronata* dan Uji hambatnya terhadap bakteri *Escherichia coli*. *Molekul*. Vol.1 No.1
- Noviyanti, L., Wibowo, F. R., Wartono, M. W., Suharty, N. S., Patiha. 2010. Modifikasi Teknik Kromatografi Kolom Untuk Pemisahan Triglicerida dari Ekstrak Buah Merah (*Pandanus conoideus Lamk.*). *Skripsi* diterbitkan. Surakarta: Universitas Sebelas Maret.
- Nopika, Lani. 2013. Penetapan Kadar Alkaloid Total Dari Ekstrak Etanol Umbi Lapis Bakung (*Hymenocallis Littoralis* (Jacq.) Salisb.). *Jurnal Penelitian*. Jurusan Pendidikan Kimia Fakultas MIPA. Universitas Negeri Gorontalo
- Panji, Tri. 2012. *Teknik Spektroskopi untuk Elusidasi Struktur Molekul*. Yogyakarta: Graha Ilmu
- Pyne, Stephen.,dkk. 2012. Antioxidant and Anticancer Activities from Aerial Parts of *Acalypha indica* Linn. Chiang Mai University *Journal of Natural Sciences*, 11 (2), 157-168.
- Riska, et.al. 2013. Identifikasi Senyawa Alkaloid Dari Ekstrak Metanol Kulit Batang Mangga (*Mangifera indica L.*). *Jurnal Entropi*, Volume Viii, Nomor 1 Pendidikan Kimia, FMIPA Universitas Negeri Gorontalo.
- Rahmah, Rochisotur. 2014. Isolasi dan uji efektivitas antimalaria isolate senyawa alkaloid tanaman anting-anting secara invivo pada mencit jantan. *Skripsi tidak diterbitkan* Universitas Islam Negeri Maulana Malik Ibrahim Malang
- Robinson, T. 1995. *Kandungan Senyawa Organik Tumbuhan Tinggi*. Diterjemahkan oleh Prof. Dr. Kosasih Padmawinata. Bandung: ITB
- Saifudin, Azis. 2011. *Standarisasi Bahan Obat Alam*. Yogyakarta: Graha Ilmu
- Saifudin, Azis. 2014. *Senyawa Alam Metabolit Sekunder*. Yogyakarta: Budi utomo
- Sastrohamidjojo, Hardjono.1996. *Dasar-Dasar Spektroskopi*. Yogyakarta: Universitas Gadjah Mada (UGM)
- Sastrohamidjojo, H. 1996. *Sintesis Bahan Alam*. Yogyakarta: Gadjah Mada Press
- Simbala, Herny. 2009. Analisis senyawa alkaloid beberapa jenis tumbuhan obat sebagai bahan aktif fitofarmaka. *Jurnal Penelitian*. Jurusan Pendidikan Kimia Fakultas MIPA. Universitas Negeri Gorontalo

- Sirait, Median. 2007. *Penentuan Fitokimia dalam Farmasi*. Bandung: ITB
- Sudarmadji, S, B. Haryono dan Suhardi. 2007. *Analisa bahan makanan dan pertanian*. Yogyakarta: Liberty
- Supratman, Unang. 2010. *Elusidasi Struktur Senyawa Organik*. Bandung: Jurusan Kimia FMIPA, Universitas Padjajaran
- Suyoso, H. C. 2011. Uji Antioksidan dan Identifikasi Senyawa Aktif dari Ekstrak Tanaman Anting-Anting (*Acalypha indica L.*) *Skripsi Tidak Diterbitkan*. Jurusan Kimia. Fakultas Saintek. Malang: UIN Malang
- Sriwahyuni, 2010, Uji Fitokimia Ekstrak Tanaman Anting-anting (*Acalypha indica L.*) dengan Variasi Pelarut dan Uji Toksisitas dengan Menggunakan Brine Shrimp, *Skripsi*, Jurusan Kimia Fakultas Sains dan Teknologi UIN Maliki, Malang.
- Shihab, Q. 2002. *Tafsir Al-Mishbah Pesan, Kesan, dan Keserasian Al-Qur'an* Vol.7,8 dan 10. Jakarta: Penerbit Lentera Hati
- Soladoye., Chukwuma. 2012. Quantitative phytochemical profile of the leaves of *Cissus populnea* Guill. & Perr. (Vitaceae) – an important medicinal plant in central Nigeria. *Scholars Research Library Archives of Applied Science Research*, 2012, 4 (1):200-206
- Umami, F. 2006. Isolasi Dan Penentuan Struktur Alkaloid Erythrinan Dari Daun Cangkring (*Erythrinofusca*) Serta Uji Aktivitas Antimalaria In Vitro. *Jurnal Skripsi Diterbitkan* . Surabaya: FMIPA UNAIR
- Voight, R.1995. *Buku Pelajaran Teknologi Farmasi*. Diterjemahkan oleh Soedani Noerono Soewandi, Apt. Yogyakarta: Universitas Gajah Mada press.
- Wasito, Hendri. 2011. *Obat Tradisional Kekayaan Indonesia*. Yogyakarta: Graha Ilmu
- Wagner H., 1984. *Plant Drug Analysis A Thin Layer Chromatography*, 1st Ed., Springer Verlag, Berlin.
- Wijayakusuma, H. 2006. *Atasi asam urat dan rematik al hembring*. Jakarta: Niaga Swadaya
- Wei-Feng, D., L. Zhong-Wen and S. Han-Dong. 1994. *A New Compound from Acalypha australis, Laboratory of Phytochemistry. Kunming Institute of Botany. Kunming 650204: Chiese Academy of Sciences*
- Wemay., Fatimawall., Wehantouw. 2013. Uji Fitokimia dan Aktivitas Analgesik ekstrak etanol Tanaman Kucing-kucingan (*Achalipha Indica L*) pada

Tikus Betina Galur Wistar. *Pharmacon jurnal ilmiah farmasi-UNSRAT*
Vol. 2 no.3

Winarno, F.G. 2002. *Kimia Pangan dan Gizi*. Jakarta: Gramedia Pustaka Utama

Wonorahardjo, Surjani. 2013. *Metode-Metode Pemisahan Kimia*. Jakarta:
Akademia Permata

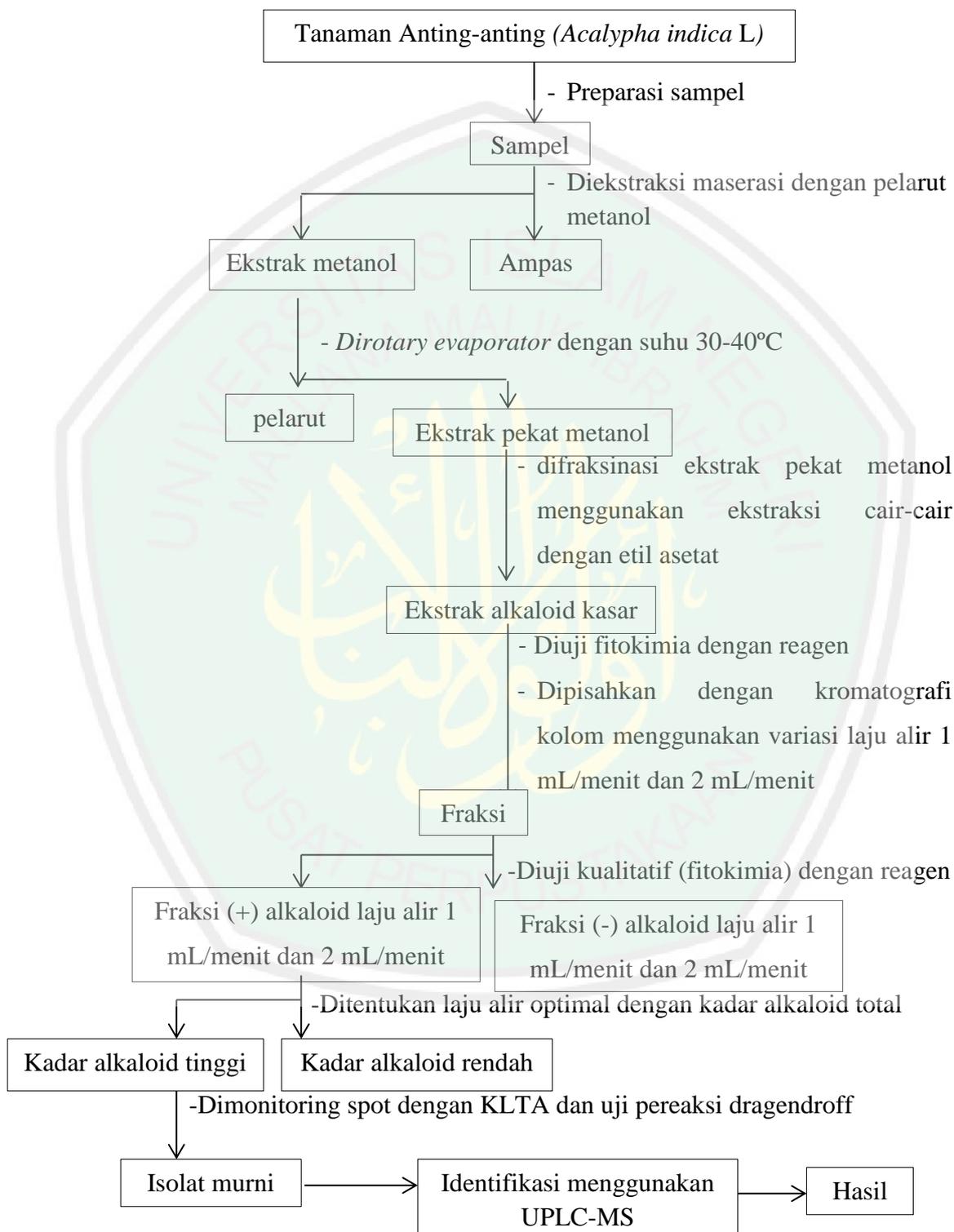
Zamrodi, M. 2011. Uji fitokimia dan uji aktivitas antibakteri senyawa aktif
tanaman anting anting. *Skripsi*. Malang: Jurusan Kimia Universitas
Islam Negeri Maulana Malik Ibrahim

Zhou, Xin. 2005. Isolation and Purification of Flavonoid Glycosides from *trollius*
ledeboury using high-speed-current chromatography by stepwise
increasing the flow-rate of the mobile phase. *Journal of*
Chromatography A, 1092.



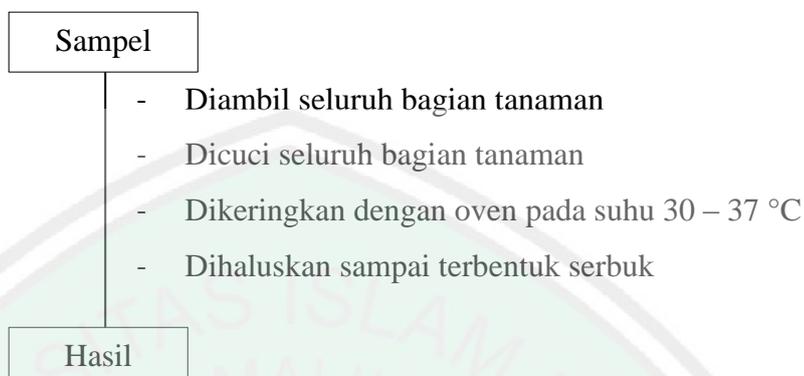
LAMPIRAN

Lampiran 1 Rancangan Penelitian

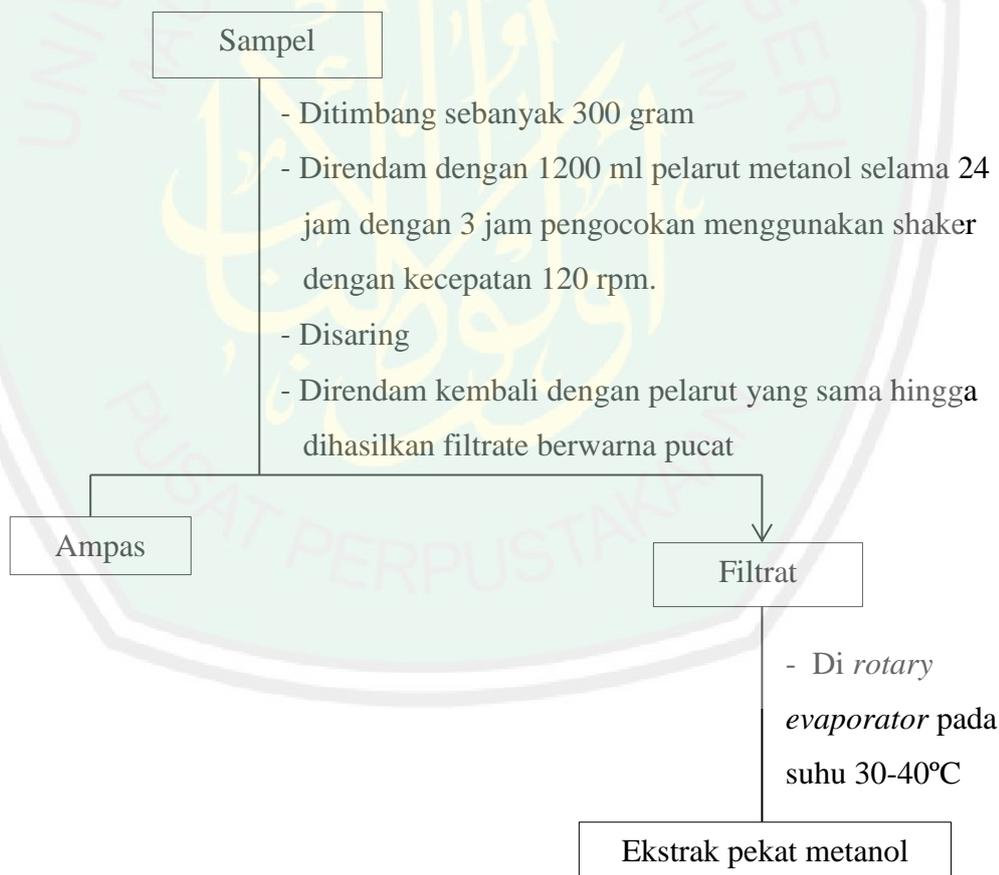


Lampiran 2 Diagram alir

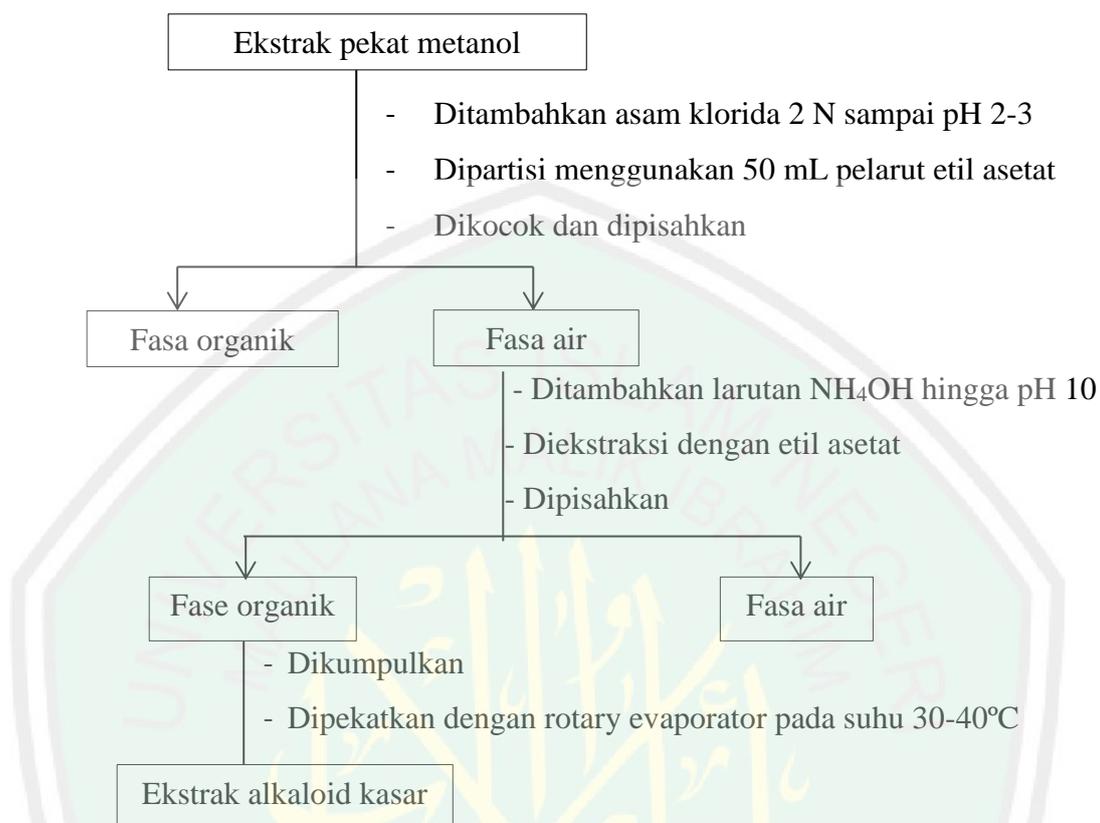
2.1 Preparasi Sampel



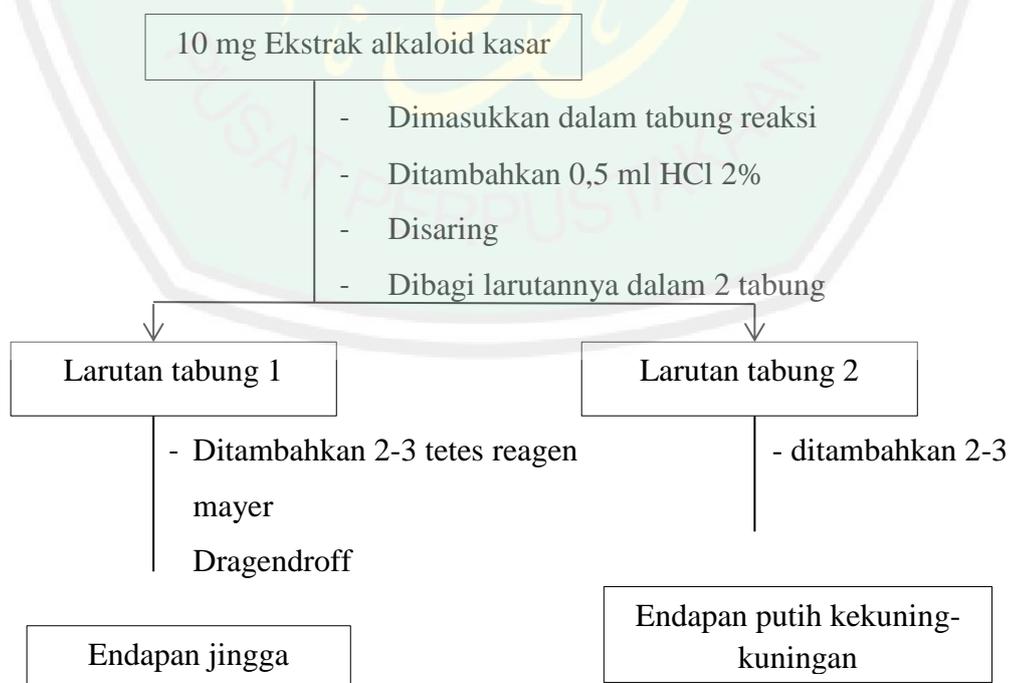
2.2 Ekstraksi Senyawa alkaloid dengan Metode Maserasi



2.3 Ekstraksi Cair-Cair (Partisi) Ekstrak Pekat Methanol



2.4 Uji Fitokimia Senyawa Alkaloid Dengan Reagen



2.5 Pemisahan Dengan Metode Kromatografi Kolom

2.5.1 Pembuatan Fase Diam Dengan Cara Basah

Silika gel G₆₀ (0,063-0,200 mm)

- Ditimbang sebanyak 15 gram
- Diaktivasi dengan suhu 110 °C selama 2 jam
- Didinginkan didesikator selama 15 menit
- Dimasukkan dalam beaker glass
- Ditambahkan eluen sampai silika terendam
- Diaduk menggunakan stirrer sampai homogen

Hasil

2.5.2 Pemisahan Senyawa Alkaloid

Ekstrak alkaloid kasar

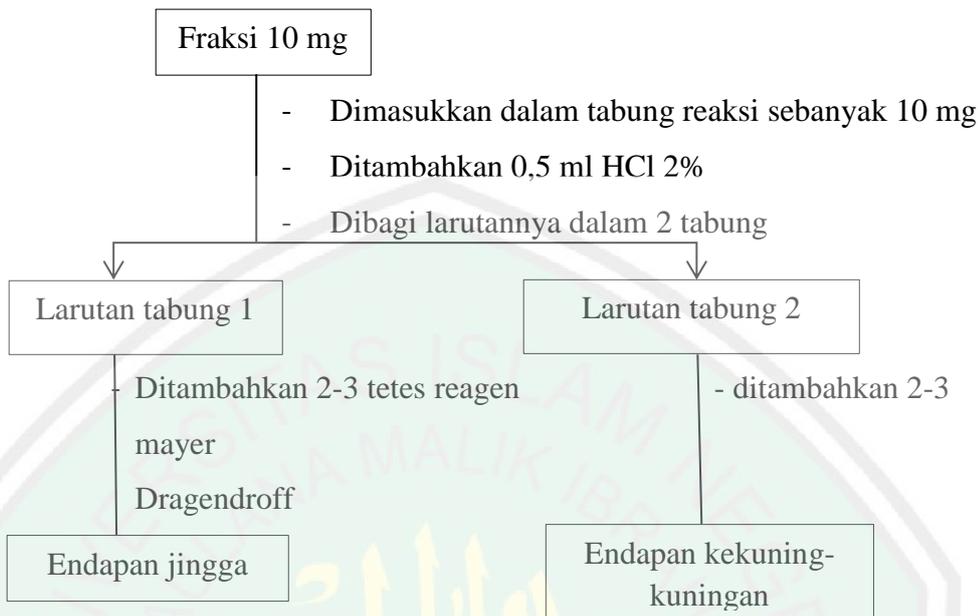
- Dimasukkan benang wol hingga sampai bagian bawah dari kolom
- Dituangkan silika gel yang sudah dalam bentuk bubuk dalam kolom setinggi 2/3 dari panjang kolom
- Diketok-ketok kolom dan didiamkan selama 24 jam
- Ekstrak alkaloid kasar 0,15 gram ditambahkan eluen 1 mL lalu dipipet kedalam kolom
- Dilakukan proses elusi dengan eluen kloroform:metanol (0,95:0,5)
- Diatur proses elusi dengan variasi kecepatan laju alir 1 mL/menit dan 2 mL/menit
- Ditampung setiap 2 mL dalam botol vial yang berbeda.

Eluat

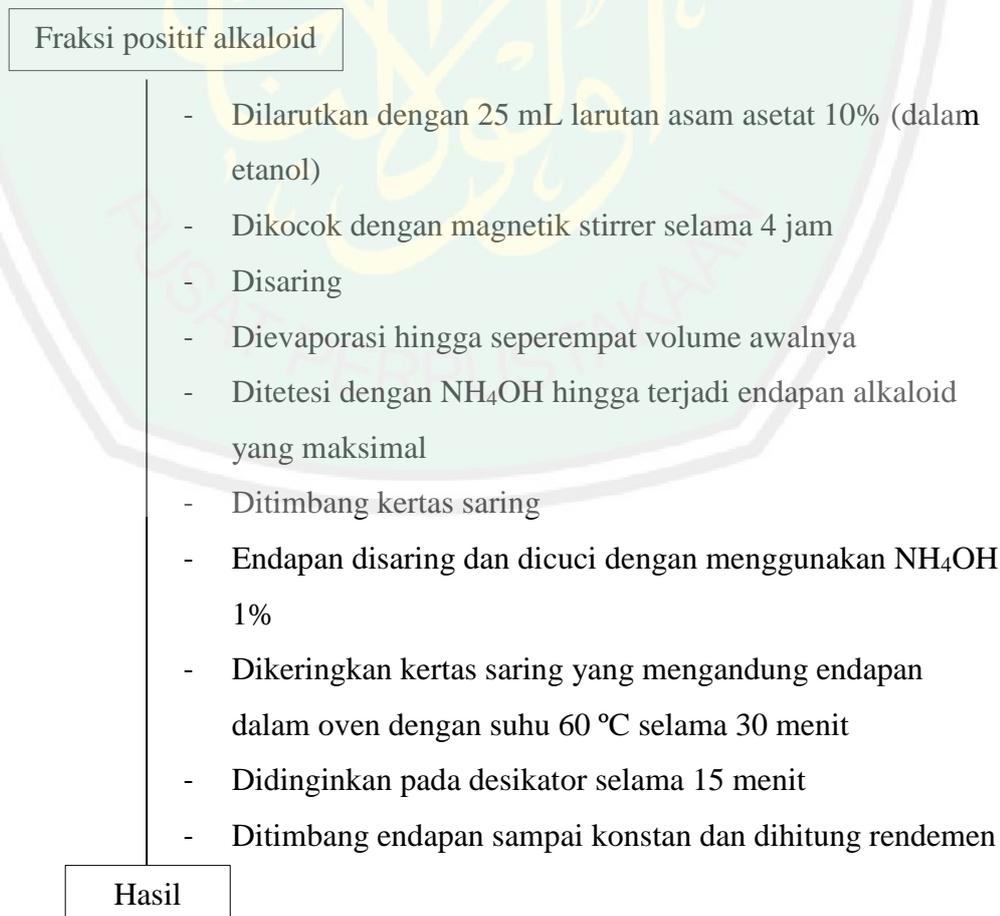
- Digabung menjadi satu berdasarkan penampakan warna yang sama pada botol vial hasil pemisahan

Hasil

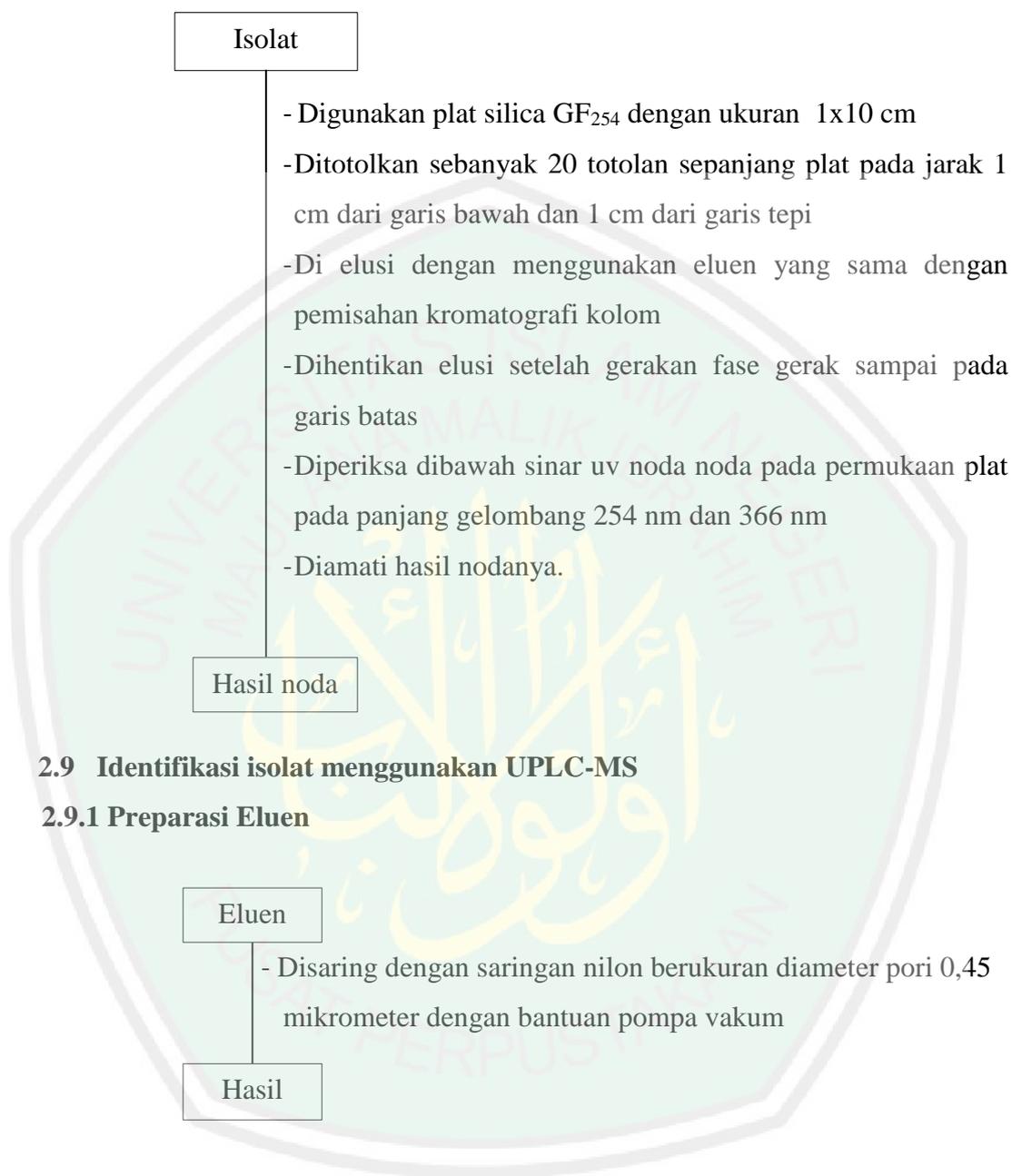
2.6 Pengelompokan Fraksi Secara Uji Kualitatif dengan Reagen



2.7 Penentuan Laju Alir Optimal dengan Kadar Alkaloid Total Fraksi

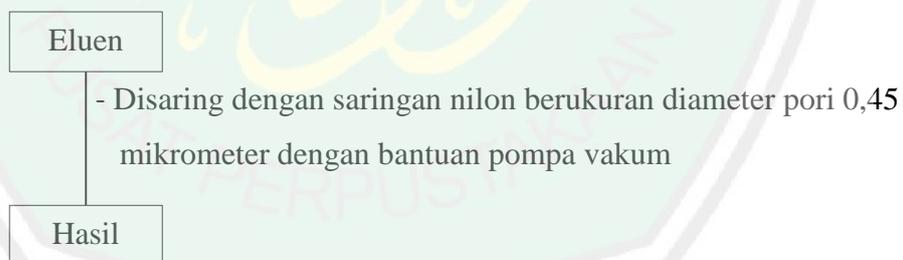


2.8 Uji kemurnian isolat dengan KLT Analitik

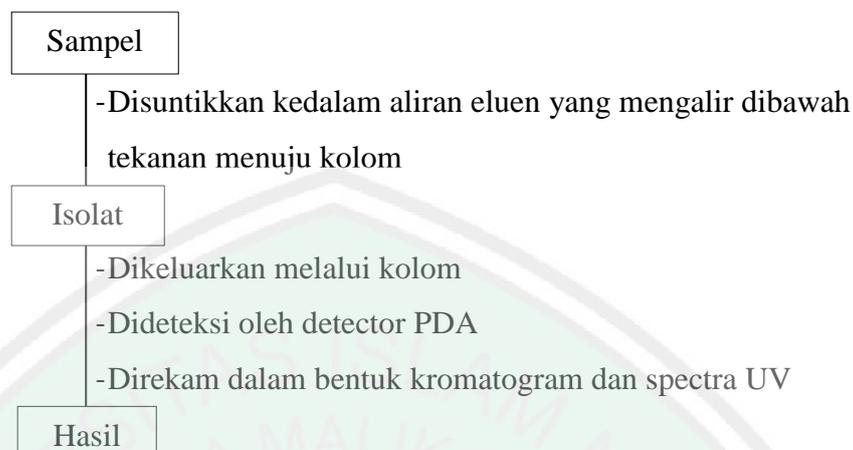


2.9 Identifikasi isolat menggunakan UPLC-MS

2.9.1 Preparasi Eluen



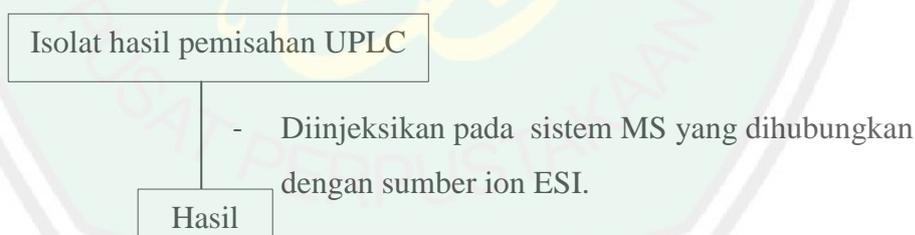
2.9.2 Penyuntikan Sampel Pada UPLC



Parameter analisis yang digunakan dalam analisa adalah sebagai berikut:

Alat : UPLC Alliance 2695 (Waters) with photodiode-array (PDA)
 Detector 2996 (Waters)
 Column : Acquity C18, 1,7 μm , 2,1x50 mm
 Flow rate : 0,3 ml/min, injection 5 microliter (0,005 ml)
 Eluent : A. H₂O (HPLC grade) + formic acid; B. Acetonitrile + formic acid
 HPLC method : isocratic 30% H₂O + 0,1% formic acid, 70% acetonitrile

2.9.3 Identifikasi Senyawa dengan UPLC-MS



Kondisi alat Spektroskopi Massa adalah sebagai berikut,

Alat : XEVO – G2QTOF (Waters)
 Analyser MS : TOF (*Time of Flight*) dengan *electrosprayer* modus positif (ES+) dan negatif (ES-) dari m/z 100 sampai m/z 2000
Desolvation temperature : 300 °C
Source temperature : 110 °C
Desolvation gas flow : 500 L/hour.

Lampiran 3 Pembuatan Larutan Dan Reagen

3.1 Pembuatan HCl 2 %

$$M1 \times V1 = M2 \times V2$$

$$37 \% \times V1 = 2 \% \times 25 \text{ mL}$$

$$V1 = 1,4 \text{ mL}$$

Adapun prosedur pembuatannya adalah diambil larutan HCl 37% sebanyak 1,4 mL. dimasukkan kedalam labu takar 25 mL yang telah terisi akuades 20 mL. kemudian ditambahkan akuades hingga tanda batas dan dihomogenkan (Mulyono, 2012)

3.2 Pembuatan Reagen Dragendorff

I. 0,6 g bismutsubnitrat dalam 2 mL HCl pekat dan 10 mL H₂O.

II. 6 g KI dalam 10 mL H₂O.

Kedua larutan tersebut dicampur dengan 7 mL HCl pekat 37% dan 15 mL aquades (Harborne, 1987).

3.3. Pembuatan Reagen Mayer

A. HgCl₂ 1,358 g

Akuades 60 mL

B. KI 5 g

Akuades 10 mL

Cara membuatnya adalah tuangkan larutan A ke dalam larutan B, encerkan dengan akuades sampai volume larutan menjadi 100 mL.

3.4 Pembuatan Larutan HCl 2 N

$$\text{BJ HCl pekat} = 1,19 \text{ g/mL}$$

$$\text{Konsentrasi} = 37\%$$

$$n = 1 \text{ (jumlah mol ion H}^{\text{+}}\text{)}$$

$$\text{Normalitas HCl} = n \times \text{Molaritas HCl}$$

$$= 1 \times \frac{37\% \times \text{BJ HCl} \times 10}{\text{BM HCl pekat}}$$

$$= \frac{37\% \times 11,9 \text{ g/mL}}{36,5 \text{ g/mol}}$$

$$= 12,06 \text{ N}$$

$$N_1 \times V_1 = N_2 \times V_2$$

$$12,06 \text{ N} \times V_1 = 2 \text{ N} \times 100 \text{ mL}$$

$$V_1 = 16,6 \text{ mL}$$

Adapun prosedur pembuatannya adalah diambil larutan HCl 37% sebanyak 16,87 mL. dimasukkan kedalam labu takar 100 mL yang telah terisi akuades 15 mL. kemudian ditambahkan akuades hingga tanda batas dan dihomogenkan (Mulyono, 2012)

3.5 Pembuatan NH₄OH 1%

$$M_1 \times V_1 = M_2 \times V_2$$

$$28\% \times V_1 = 1\% \times 25 \text{ mL}$$

$$V_1 = 0,9 \text{ mL}$$

Jadi, untuk membuat larutan NH₄OH 1% disiapkan 20 mL H₂O dalam labu takar 25 mL kemudian diambil sebanyak 0,9 mL larutan NH₄OH 28 % dan dilarutkan dengan aquades dalam labu ukur 25 mL sampai tanda batas (dilakukan dilemari asam). Harus dikemas dalam botol plastik dan selalu dalam keadaan

tertutup rapat, larutan ini mudah bereaksi dengan kaca dan mudah mengurai dengan melepaskan NH_3 (Mulyono, 2012)

3.6 Pembuatan asam asetat 10% dalam etanol

$$M1 \times V1 = M2 \times V2$$

$$99 \% \times V1 = 10 \% \times 50 \text{ mL}$$

$$V1 = 5 \text{ mL}$$

Jadi, untuk membuat larutan asam asetat 10% dalam etanol disiapkan didalam labu takar 50 mL bertutup etanol sebanyak 40 mL. Kemudian diambil sebanyak 5 mL larutan asam asetat pekat 99% dan ditandabatkan dengan etanol dalam labu ukur 50 mL kemudian ditutup rapat dan dihomogenkan. (asam asetat dapat menguap sehingga botol harus selalu tertutup) (Mulyono, 2012).

Lampiran 4 Rendemen Ekstrak Metanol tanaman anting-anting

Berat sampel serbuk = 300,0146 gram

Berat ekstrak pekat = 30,092 gram

$$\begin{aligned}\text{Rendemen} &= \frac{\text{Berat ekstrak}}{\text{Berat sampel}} \times 100 \% \\ &= \frac{30,092 \text{ gram}}{300,0146 \text{ gram}} \times 100 \% \\ &= 10,030\%\end{aligned}$$

Lampiran 5 Rendemen Ekstrak Alkaloid Kasar

Berat ekstrak pekat yang diekstraksi = 30 gram

Berat ekstrak alkaloid kasar = 0,434 gram

$$\begin{aligned}\text{Rendemen} &= \frac{\text{Berat ekstrak alkaloid kasar}}{\text{Berat ekstrak pekat}} \times 100 \% \\ &= \frac{0,434 \text{ gram}}{300 \text{ gram}} \times 100 \% \\ &= 0,144\%\end{aligned}$$

Lampiran 6 Rendemen Kadar Alkaloid Total dengan laju alir 1 mL/menit

Berat isolat = 0,0705 gram

Berat alkaloid total = 0,0697 gram

$$\begin{aligned}\text{Rendemen} &= \frac{\text{Berat endapan alkaloid}}{\text{Berat isolat}} \times 100 \% \\ &= \frac{0,0697 \text{ gram}}{0,0705 \text{ gram}} \times 100 \% \\ &= 98,8\%\end{aligned}$$

Lampiran 7 Rendemen Kadar Alkaloid Total dengan laju alir 2 mL/menit

Berat isolat = 0,0576 gram

Berat alkaloid total = 0,0362 gram

$$\begin{aligned} \text{Rendemen} &= \frac{\text{Berat endapan alkaloid}}{\text{Berat isolat}} \times 100 \% \\ &= \frac{0,0576 \text{ gram}}{0,0362 \text{ gram}} \times 100 \% \\ &= 0,628\% \end{aligned}$$

Lampiran 8 Hasil nilai Rf KLT Analitik

$$\text{Harga Rf} = \frac{\text{Jarak yang digerakkan oleh senyawa dari titik asal}}{\text{Jarak yang digerakkan oleh pelarut dari titik asal}}$$

1. Eluen kloroform : methanol (9,5:0,5) (Rahmah, 2014)

$$\text{Rf noda} = \frac{6,4 \text{ cm}}{8 \text{ cm}} = 0,8 \text{ cm}$$

Lampiran 9 Perhitungan Persen Luas Area

$$\% \text{ Luas Area} = \frac{\text{Area Puncak 1}}{\sum \text{Area Puncak}} \times 100 \%$$

1. Puncak 1 = $\frac{691}{10086} \times 100 \% = 6,851 \%$
2. Puncak 2 = $\frac{128}{10086} \times 100 \% = 1,269\%$
3. Puncak 3 = $\frac{539}{10086} \times 100 \% = 5,344\%$
4. Puncak 4 = $\frac{1120}{10086} \times 100 \% = 11,104\%$
5. Puncak 5 = $\frac{816}{10086} \times 100 \% = 8,090\%$
6. Puncak 6 = $\frac{228}{10086} \times 100 \% = 2,260\%$

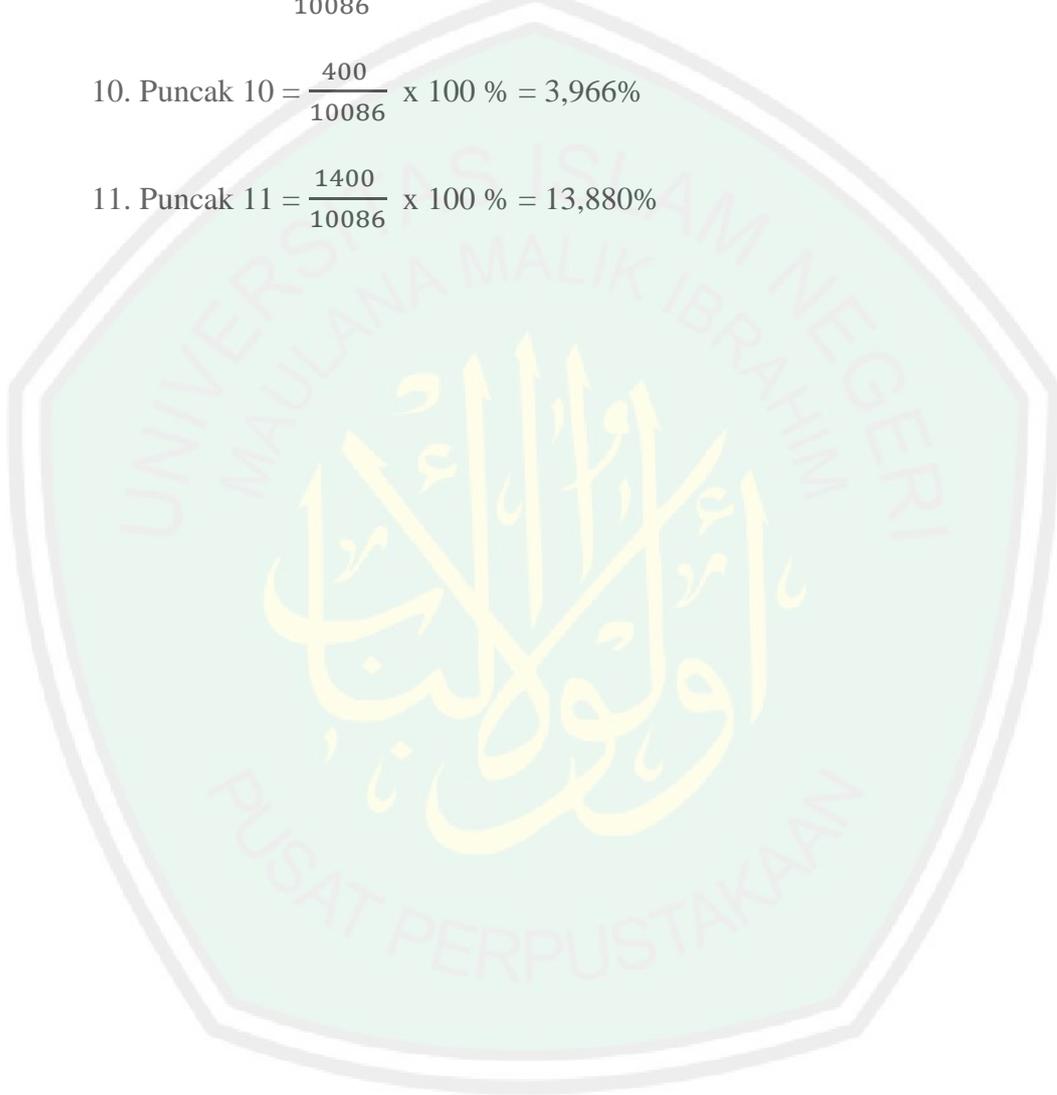
$$7. \text{ Puncak 7} = \frac{1978}{10086} \times 100 \% = 19,611\%$$

$$8. \text{ Puncak 8} = \frac{1501}{10086} \times 100 \% = 14,882\%$$

$$9. \text{ Puncak 9} = \frac{1053}{10086} \times 100 \% = 10,440\%$$

$$10. \text{ Puncak 10} = \frac{400}{10086} \times 100 \% = 3,966\%$$

$$11. \text{ Puncak 11} = \frac{1400}{10086} \times 100 \% = 13,880\%$$



Lampiran 10. Dokumentasi Penelitian

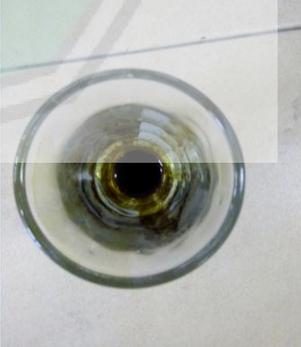
10.1 Preparasi Sampel Tanaman Anting-anting

		
<p>Gambar 1. Anting-anting</p>	<p>Gambar 2. Anting-anting setelah dikeringkan</p>	<p>Gambar 3. Anting-anting setelah dihaluskan</p>

10.2 Ekstraksi Maserasi

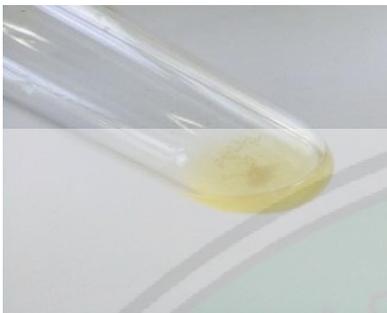
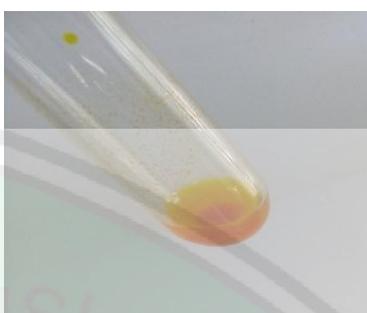
		
<p>Gambar 4. Anting-anting dimaserasi</p>	<p>Gambar 5. Penyaringan ekstrak anting-anting</p>	<p>Gambar 6. Hasil filtrat Anting-anting</p>
		
<p>Gambar 7. Pemekatan ekstrak Anting-anting</p>	<p>Gambar 8. Ekstrak pekat metanol</p>	<p>Gambar 9. Ekstrak pekat methanol</p>

10.3 Fraksinasi senyawa alkaloid

		
<p>Gambar 10. Pengasaman ekstrak dengan HCl 2N</p>	<p>Gambar 11. Larutan asam+etil asetat setelah dikocok</p>	<p>Gambar 12. Fraksi etil asetat 1</p>
		
<p>Gambar 13. Pembasaan larutan asam dengan NH_4OH</p>	<p>Gambar 14. Fraksi basa setelah ditambahkan etil asetat</p>	<p>Gambar 15. Lapisan air+etil asetat sampai bening</p>
		
<p>Gambar 16. Fraksi etil asetat 2</p>	<p>Gambar 17. Ekstrak alkaloid kasar</p>	<p>Gambar 18. Ekstrak alkaloid kasar</p>

10.4 Hasil Uji Fitokimia dengan Reagen

10.4.1 Uji Fitokimia Ekstrak alkaloid kasar

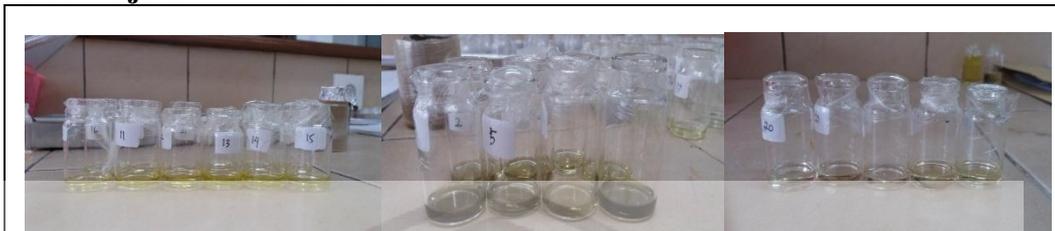
	
<p>Gambar 19. Positif alkaloid dengan reagen meyer</p>	<p>Gambar 20. Positif alkaloid dengan Dragendroof</p>

10.5 Pemisahan senyawa alkaloid dengan kromatografi kolom

		
<p>Gambar 21. Proses pengelusan senyawa</p>	<p>Gambar 22. Fraksi ditampung dalam botol vial</p>	<p>Gambar 23. Elusi dihentikan sampai silica berwarna putih</p>

10.6 Penggabungan fraksi berdasarkan warna pada vial

10.6.1 Laju alir 1 mL/menit



Gambar 24. penggabungan fraksi berdasarkan warna pada vial



Gambar 25. Hasil penggabungan fraksi

10.6.2 Laju alir 2 mL/menit



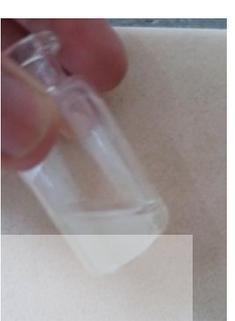
Gambar 26. penggabungan fraksi berdasarkan warna pada vial



Gambar 27. Hasil penggabungan fraksi

10.7 Pengelompokan Fraksi Secara Uji Kualitatif dengan Reagen

10.7.1 Laju alir 1 mL/menit

			
Gambar 28. Fraksi F3 (10-19) Positif alkaloid dengan Dragendroof	Gambar 29. Fraksi F3 (10-19) Positif alkaloid dengan Meyer	Gambar 30. Fraksi F4 (20-25) Positif alkaloid dengan Dragendroof	Gambar 31. Fraksi F4 (20-25) Positif alkaloid dengan Meyer

	
Gambar 32. Fraksi F11 (78-82) Positif alkaloid dengan Dragendroof	Gambar 33. Fraksi F11 (78-82) Positif alkaloid dengan Meyer

10.7.2 Laju alir 2 mL/menit

			
Gambar 34. Fraksi F2 (6-23) Positif alkaloid dengan Dragendroof	Gambar 35. Fraksi F2 (6-23) Positif alkaloid dengan Meyer	Gambar 36. Fraksi F6 (119-130) Positif alkaloid dengan Dragendroof	Gambar 37. Fraksi F6 (119-130) Positif alkaloid dengan Meyer

10.8 Penentuan Laju Alir Terbaik dengan Kadar Alkaloid Total Fraksi

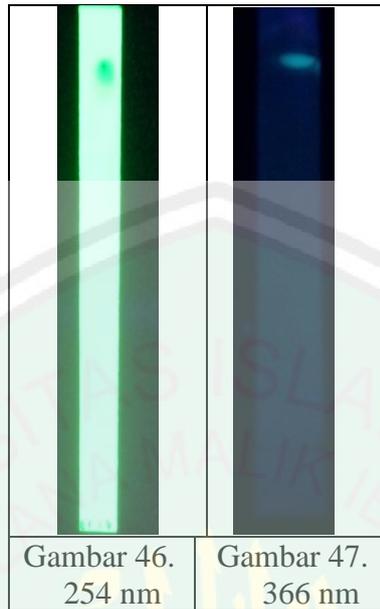
10.8.1 Laju Alir 1 mL/menit

	
<p>Gambar 38. Fraksi di tambahkan asam asetat</p>	<p>Gambar 39. Di stirer</p>
	
<p>Gambar 40. Disaring dan di cuci dengan NH_4OH</p>	<p>Gambar 41. Hasil endapan alkaloid</p>

6.8.2 Laju Alir 2 mL/menit

	
<p>Gambar 42. Fraksi di tambahkan asam asetat</p>	<p>Gambar 43. Di stirer</p>
	
<p>Gambar 44. Disaring</p>	<p>Gambar 45. Hasil endapan</p>

6.9 Hasil penyinaran KLTA dengan lampu UV 254 nm dan 366 nm



Lampiran 11 Hasil MS Keseluruhan

