

BAB IV

HASIL DAN PEMBAHASAN

4.1 Hasil Ekstraksi Serbuk Kulit Batang Tumbuhan Halay (*Alstonia Spectabilis R. Br*)

Kulit batang tumbuhan Halay (*Alstonia Spectabilis R. Br*) yang telah diekstrak dengan pelarut n-heksana dan metanol menghasilkan rendemen yang dapat dilihat pada tabel 4.1.

Tabel 4.1 Rendemen ekstrak n-heksana dan metanol kulit batang tumbuhan Halay (*Alstonia Spectabilis R. Br*)

Pelarut	Massa (gram)		Rendemen
	Serbuk sampel	Ekstrak kering	
n-heksana	200	1	0,5%
Metanol	200	31,40	15,7%

Pada tabel 4.1 rendemen ekstrak metanol lebih tinggi daripada rendemen ekstrak n-heksana. Hal ini menunjukkan bahwa komponen yang terkandung dalam kulit batang tumbuhan Halay (*Alstonia Spectabilis R. Br*) lebih banyak mengandung senyawa yang bersifat polar dibandingkan dengan kelarutan komponen kimia dalam pelarut n-heksana yang bersifat nonpolar. Tingginya rendemen yang diperoleh dari suatu sampel tumbuhan juga tergantung pada jenis pelarut yang digunakan untuk mengekstrak komponen dari tumbuhan tersebut. Menurut Sarastani dkk (2002), ekstraksi menggunakan pelarut dengan polaritas berbeda dapat menghasilkan ekstrak dengan polaritas yang berbeda pula sesuai

dengan sifat kepolaran masing-masing ekstrak. Metanol memiliki gugus polar yang lebih kuat daripada gugus nonpolar, hal ini dapat terlihat dari struktur kimia metanol yang mengandung gugus hidroksil (polar) dan gugus karbon (nonpolar) (Ukhty, 2011). Menurut Supiyanti (2010) metanol dapat mengekstrak senyawa fitokimia dalam jumlah yang lebih banyak. Tingginya rendemen yang terdapat dalam pelarut metanol menunjukkan pelarut tersebut mampu mengekstrak lebih banyak komponen bioaktif yang memiliki sifat kepolaran yang lebih tinggi. Hal ini diduga karena komponen kulit batang tumbuhan Halay (*Alstonia Spectabilis R. Br*) banyak mengandung senyawa polar. Nilai rendemen terkecil terdapat pada fraksi terlarut n-heksana, hal ini menunjukkan bahwa senyawa bioaktif yang bersifat nonpolar pada sampel kulit batang tumbuhan Halay (*Alstonia Spectabilis R. Br*) jumlahnya sedikit.

4.2 Hasil Uji Fitokimia Ekstrak n-heksana dan Metanol Kulit Batang Tumbuhan Halay (*Alstonia Spectabilis R. Br*)

Tabel 4.2 Hasil Uji Fitokimia Ekstrak n-heksana Kulit Batang Tumbuhan Halay(*Alstonia Spectabilis R. Br*)

Kandungan Kimia	Metode Pengujian	Pustaka	Hasil Uji	Keterangan
Alkaloid	Mayer	Endapan Putih	Endapan Putih	+
	Wagner	Warna Coklat	Warna Coklat	+
	Dragendorff	Warna Jingga	Warna Jingga	+
Flavanoid	Mg/HCl	Jingga, merah muda sampai merah	Tidak ada perubahan	-
Fenolik	FeCl ₃	Biru/ungu	Tidak ada perubahan	-
Saponin	Air	Terbentuk busa	Tidak terbentuk busa	-
Terpenoid	Liebermann-Burchard	Merah	Tidak ada perubahan	-
Steroid	Liebermann-Burchard	Hijau/biru	Tidak ada perubahan	-
Tanin	FeCl ₃	Hijau/biru/hitam	Tidak ada perubahan	-

Hasil uji fitokimia ekstrak n-heksana menunjukkan bahwa positif mengandung alkaloid. Menurut Harborne (1987) pelarut nonpolar (n-heksana) dikenal efektif terhadap alkaloid. Alkaloid adalah senyawa organik mengandung nitrogen yang banyak ditemui pada tumbuhan. Nitrogen dalam alkaloid terdapat dalam bentuk amina primer, sekunder dan tersier, bahkan alkaloid dengan amina kuartener masih ditemui di alam. Menurut Bruneton (1999), alkaloid merupakan senyawa organik siklik yang mengandung atom nitrogen, umumnya merupakan bagian dari cincin heterosiklik (sebagai gugus amina atau amida) dan bersifat basa. alkaloid sebagai basa, tidak larut atau hanya larut sebagian dalam air, larut dalam pelarut nonpolar, pelarut organik agak polar dan hidroalkohol. Alkaloid dalam bentuk garam umumnya larut dalam air dan alkohol tetapi tidak larut dalam pelarut organik. Adanya alkaloid dalam uji ini disebabkan karena alkaloid ini dapat larut dalam pelarut polar dan nonpolar. Jenis alkaloid yang terdapat dalam fraksi n-heksana ini diperkirakan mengandung lebih banyak mengandung atom nitrogen yang menyebabkannya lebih basa dan bersifat nonpolar (Bhat, 2009).

Tabel 4.3 Hasil Uji Fitokimia Ekstrak Metanol Kulit Batang Tumbuhan Halay (*Alstonia Spectabilis R. Br*)

Kandungan Kimia	Metode Pengujian	Pustaka	Hasil Uji	Keterangan
Alkaloid	Mayer	Endapan Putih	Endapan Putih	+
	Wagner	Warna Coklat	Warna Coklat	+
	Dragendorff	Warna Jingga	Warna Jingga	+
Flavanoid	Mg/HCl	Jingga, merah muda sampai merah	Tidak ada perubahan	-
Fenolik	FeCl ₃	Biru/ungu	Tidak ada perubahan	-
Saponin	Air	Terbentuk busa	Tidak terbentuk busa	-
Terpenoid	Liebermann-Burchard	Merah	Merah	+
Steroid	Liebermann-Burchard	Hijau/biru	Tidak ada perubahan	-
Tanin	FeCl ₃	Hijau/biru/hitam	Tidak ada perubahan	-

Hasil uji fitokimia ekstrak metanol kulit batang tumbuhan Halay (*Alstonia Spectabilis R. Br*) menunjukkan bahwa positif mengandung alkaloid dan terpenoid. Hasil uji fitokimia yang diperoleh sesuai dengan penelitian yang

dilakukan oleh Haiyul, (2010) yang melaporkan bahwa ekstrak metanol kulit akar *Alstonia Spatulata* BI mengandung senyawa metabolit sekunder alkaloid dan terpenoid.

Alkaloid merupakan golongan senyawa metabolit sekunder yang bersifat basa dengan satu atau lebih atom nitrogen yang umumnya berada dalam gabungan sistem siklik. Pereaksi sering didasarkan pada kesanggupan alkaloid untuk bergabung dengan logam yang memiliki berat atom tinggi seperti merkuri bismuth, tungsten dan iodin. Pereaksi Mayer mengandung kalium iodida dan merkuri klorida. Pereaksi Dragendorf mengandung bismuth nitrat dan merkuri klorida dalam nitrit berair. Pereaksi Wagner mengandung kalium iodida dan iodin (Anonim, 2019). Hasil positif alkaloid pada uji Mayer ditandai dengan terbentuknya endapan putih. Diperkirakan endapan tersebut adalah kompleks kalium-alkaloid (Marliana, dkk, 2005). Alkaloid mengandung atom nitrogen yang mempunyai pasangan elektron bebas sehingga dapat digunakan untuk membentuk ikatan kovalen koordinat dengan ion logam (McMurry, 2004). Pada uji alkaloid dengan pereaksi Mayer diperkirakan nitrogen pada alkaloid akan beraksi dengan ion logam K^+ dari kalium tetraiodomerkurat(II) membentuk kompleks kalium-alkaloid yang mengendap. Hasil positif alkaloid untuk uji Wagner ditandai dengan terbentuknya endapan coklat. Diperkirakan endapan tersebut adalah kalium-alkaloid. Pada uji Wagner, ion logam K^+ akan membentuk ikatan kovalen koordinat dengan nitrogen pada alkaloid membentuk kompleks kalium-alkaloid yang mengendap.

Terpenoid adalah senyawa yang hanya mengandung karbon dan hidrogen atau karbon, hidrogen dan oksigen yang bersifat aromatis. Terpenoid umumnya larut dalam lemak dan terdapat dalam sitoplasma sel tumbuhan. Kebanyakan terpenoid alam mempunyai struktur siklik dan mempunyai satu gugus fungsi atau lebih (Harborne, 1987). Hasil positif terpenoid pada ekstrak metanol saat penambahan Lieberman-Buchard dilihat dari warna merah keunguan yang terbentuk

4.3 Pengujian ekstrak total n-heksana secara KLT

Pemeriksaan komponen yang terkandung dalam ekstrak n-heksanayang diperoleh dilakukan dengan cara Kromatografi Lapis Tipis (KLT). Hal ini dilakukan untuk mengetahui eluen yang bisa memberikan pola pemisahan yang baik dan untuk mengetahui kandungan alkaloid serta untuk mengetahui komponen-komponen yang terdapat dalam kedua ekstrak tersebut.

Tabel 4.4 Nilai Rf hasil KLT ekstrak n-heksana

Eluen n-heksana : etil asetat	Nilai Rf
5:0,5	0,02; 0,14; 0,25; 0,41; 0,6; 0,68; 0,88; 0,94.
4:1	0,17; 0,21; 0,51; 0,7; 0,75.

4.4 Pemisahan Senyawa Alkaloid

Sebanyak 10 gram ekstrak metanol diasamkan dengan asam tartrat 2% sampai pH 3-4 yang bertujuan untuk membentuk garam alkaloid yang larut dalam air. Hal ini sesuai dengan sifat senyawa alkaloid yang bersifat basa sehingga apabila ditambahkan asam akan terbentuk garam alkaloid (Fadly, dkk (2015). Untuk membebaskan alkaloid, ditambahkan amoniak sampai pH 9-10. Larutan yang dihasilkan bersifat basa dan berwarna kuning pekat. Perlakuan dilakukan agar garam alkaloid membentuk basa bebas alkaloid.

Alkaloid kemudian dipisahkan menggunakan kloroform. Partisi menggunakan kloroform dilakukan sebanyak 3 kali. Fraksi kloroform dicuci menggunakan aquadest sebanyak 3 kali. Fraksi kloroform masih mengandung air dan dihilangkan airnya menggunakan sodium sulfat anhidrat kemudian disaring. Fraksi kloroform yang diperoleh sebanyak 2,08 gram. Kemudian fraksi kloroform tersebut dilakukan uji KLT untuk mencari eluen yang akan digunakan untuk kromatografi kolom. Eluen yang didapatkan untuk fraksinasi yaitu kloroform:metanol dengan perbandingan 4,5:0,5. Tujuan dari mendapatkan identitas noda dengan harga Rf pada uji KLT adalah untuk mencari pelarut yang akan digunakan pada kromatografi kolom (Markham, 1988).

Tabel 4.5 Nilai Rf hasil KLT ekstrak kloroform

Eluen kloroform : metanol	Nilai Rf
4,5 : 0,5	0,17; 0,41; 0,54; 0,65; 0,72; 0,77; 0,78
4:1	0,92
3,6 : 1,7	0,9
3,6 :1,6	0,68; 0,88; 0,91
3,6 : 1,5	0, 85
3,6 : 1,4	0, 71; 0,85; 0, 95

4.5 Pemisahan dengan Kromatografi Kolom

Hasil pemisahan fraksi kloroform menggunakan kromatografi kolom diperoleh sebanyak 30 vial. Hasil pemisahan tersebut kemudian diuji menggunakan kromatografi lapis tipis. Berdasarkan hasil pemeriksaan, vial nomor 24 sampai nomor 27 yang memberikan pemisahan baik yaitu terdapat 2 spot dengan nilai Rf yang hampir sama yaitu 0.8 dan 0.88, 0.9 dan 0,92. Keempat vial tersebut kemudian digabungkan dan dipekatkan untuk dilakukan kromatografi kolom. Diperoleh ekstrak pekat sebanyak 0.3 gram. Fraksinasi merupakan metode pemisahan yang digunakan untuk memisahkan komponen-komponen kimia yang ada dalam ekstrak kloroform kulit batang tumbuhan Halay (*Alstonia Spectabilis* R. Br) dalam bentuk fraksi-fraksi. Fraksinasi dilakukan menggunakan

kromatografi kolom dengan fase geraknya adalah kloroform dan metanol yang masing-masing memiliki sifat kepolaran yang berbeda yaitu kloroform bersifat nonpolar dan metanol bersifat polar. Preparasi kolom dilakukan dengan cara memasukkan glass wool kedalam ujung kolom kemudian menuangkan silika gel 60 yang sudah disuspensikan menggunakan pelarut yang dijadikan eluen dalam kromatografi kolom. Pengisian adsorben cara basah menggunakan silika gel 60 bertujuan untuk memudahkan silika berinteraksi dengan 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 donor H dengan silika dapat mempengaruhi pemisahan, dimana senyawa yang bersifat polar akan terjebak lebih lama dalam fase diam. Sedangkan senyawa yang kepolarannya lebih rendah akan lebih dahulu terbawa fase gerak.

Kolom dibuat dalam keadaan padat atau tidak berongga oleh padatan silika gel dengan ketinggian 20 cm. Sampel kemudian dimasukkan kedalam kolom kemudian dielusi dengan eluen yang sudah didapatkan. Senyawa yang terlarut bergerak melalui kolom dengan laju alir berbeda memisah dan dikumpulkan. Proses elusi dihentikan setelah warna adsorben memudar. Fraksi-fraksi ditampung dalam vial dengan masing-masing vial volume 5 mL dan diperoleh 30 fraksi.

Tabel 4.6 Warna larutan pada vial

Fraksi	Warna larutan pada vial
F ₁ -F ₄	Kuning bening
F ₆ -F ₁₅	Coklat pekat
F ₁₆ -F ₂₃	Kuning
F ₂₄ -F ₃₀	Kuning bening

Hasil fraksinasi dilakukan uji dengan KLT menggunakan plat yang dilapisi dengan silika gel sehingga senyawa-senyawa organik yang terpisah pada plat dapat mengadakan fluoresensi supaya mudah dideteksi dengan sinar UV pada panjang gelombang 254 nm dan 366 nm. Sebelum plat digunakan terlebih dahulu diaktivasi dengan cara dipanaskan dalam oven pada suhu 110⁰C selama 30 menit dengan tujuan untuk menghilangkan kadar air yang menempel pada silika gel sehingga tidak mempengaruhi proses pemisahan.

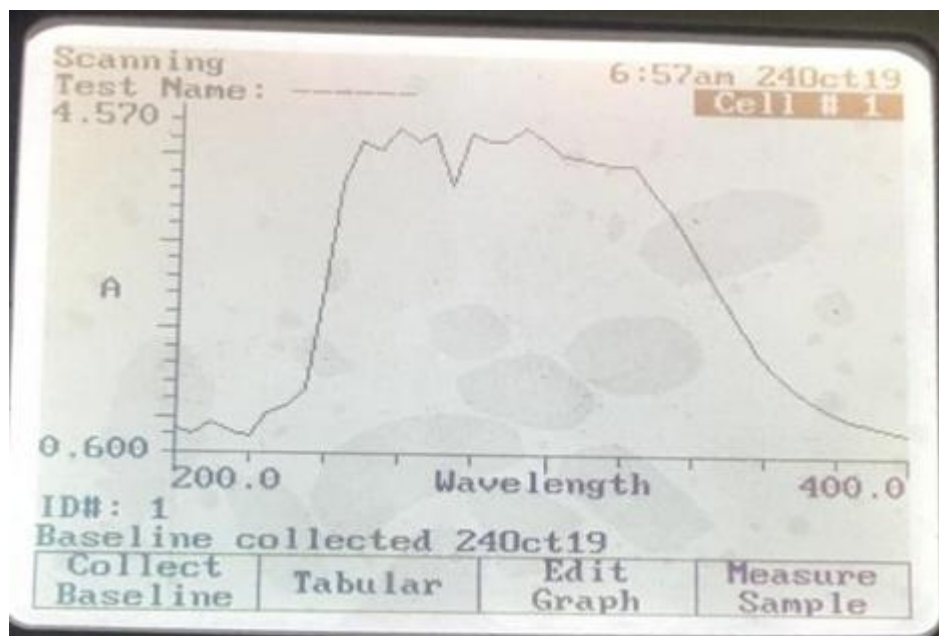
Berdasarkan hasil analisis menggunakan KLT dengan eluen kloroform:metanol dengan perbandingan (4,5:0,5), terjadi pemisahan yang signifikan. Fraksi-fraksi yang memiliki nilai R_f sama digabungkan. Fraksi yang memiliki spot/noda tunggal yaitu nomor vial 24,25,26 dan 27 dengan nilai R_f 0,9 cm. Fraksi-fraksi tersebut digabungkan dan diuji lagi menggunakan KLT dengan eluen kloroform:metanol dengan perbandingan (4:1 dan 3,5:1,5). Hasil uji menunjukkan bahwa tetap memiliki spot/noda tunggal dengan nilai R_f 0,74 cm.

4.6 Karakterisasi

Karakterisasi senyawa alkaloid dilakukan dengan menggunakan spektrofotometri UV-Vis dan Spektrometri Infra Merah(IR).

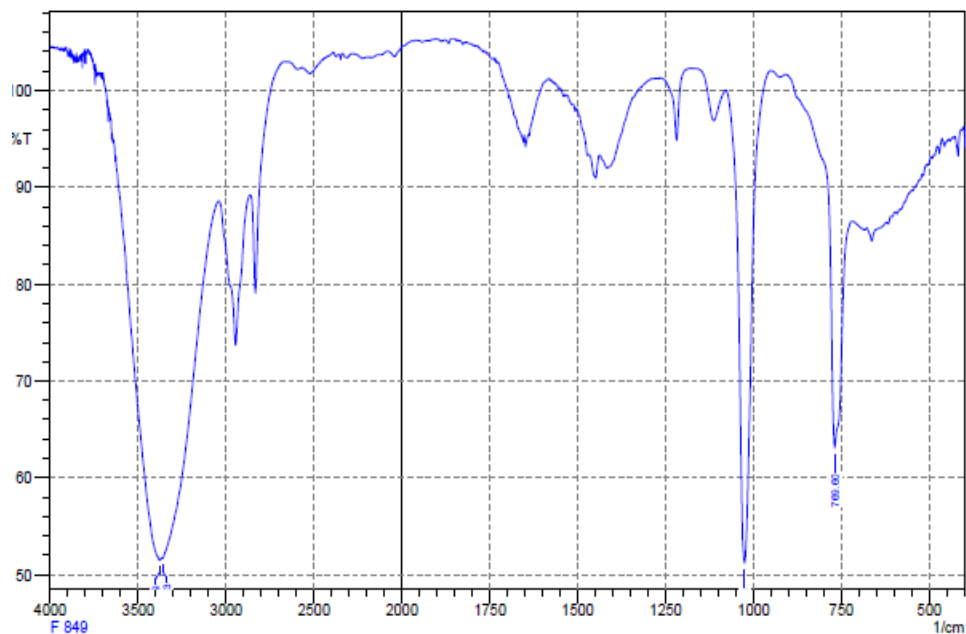
Spektrofotometri UV-Vis

Hasil analisis menggunakan spektrofotometri UV-Vis isolat gabungan dengan panjang gelombang 200 nm sampai 400 nm. Spektrum ultraviolet senyawa isolat dengan pelarut kloroform:metanol memberikan serapan maksimum $\lambda_{\text{maks}}=295,0$ nm dengan nilai absorbansi 4,389.



Gambar 4.1 Spektrum UV-Vis isolat pelarut kloroform:metanol

Karakterisasi senyawa hasil isolasi dilakukan dengan analisis spektrofotometri UV-Vis. Serapan pada panjang gelombang 295 nm menunjukkan adanya serapan karbonil yang terjadi pada 270-300 nm. Puncak serapan pada $\lambda_{\text{maks}}=295,0$ nm menunjukkan adanya kromofor benzena.



Gambar 4.2 Spektrum Inframerah ekstrak kloroform kulit batang tumbuhan

Halay (*Alstonia Spectabilis* R. Br)

Hasil spektrum inframerah pada gambar 4.2 menunjukkan adanya pita serapan pada spektrum IR yaitu pada $3361,93\text{ cm}^{-1}$ dan $3379,29\text{ cm}^{-1}$ yang menunjukkan adanya gugus N-H terletak pada daerah dekat 3500 cm^{-1} (Sastrohamidjojo, 1991). Dugaan ini diperkuat dengan munculnya pita tajam dengan intensitas kuat di daerah bilangan gelombang $1026,13\text{ cm}^{-1}$ yang menjadi ciri khas dari C-O eter dan merupakan serapan untuk gugus fungsi C-N tak terkonjugasi dalam amina sekunder yang mendukung adanya gugus N-H sekunder. Dugaan ini diperkuat lagi dengan adanya pita serapan $769,6\text{ cm}^{-1}$ menunjukkan adanya tekukan C-H aromatik.

Tabel 4.7 Analisis spektrum inframerah ekstrak kloroform kulit batang tumbuhan Halay (*Alstonia Spectabilis R. Br*)

No.	Bilangan gelombang (cm^{-1})		Bentuk pita	Kemungkinan gugus fungsi
	Pada isolat	Pustaka rujukan		
1.	3361,93	3400-3450*	Tajam	Regang N-H
2.	3379,29	3100-3500**	Tajam	
3.	1026,13	1300-1000*	Tajam	Regang C-N
4.	769,9	650-1000**	Tajam	Tekuk C-H aromatik

Sumber: * Sastrohamidjojo, (1991) ** Creswell, (2005)

Berdasarkan hasil analisis dengan spektrofotometer UV-Vis dan FTIR, isolat diduga merupakan senyawa alkaloid yang mengandung gugus N-H pada bilangan gelombang $3361,93 \text{ cm}^{-1}$ dan $3379,29 \text{ cm}^{-1}$, C-N pada bilangan gelombang $1026,13 \text{ cm}^{-1}$ dan C-H aromatik pada bilangan gelombang $769,9 \text{ cm}^{-1}$.

