

ANTI  
MEM  
C'ed

SKRIPSI

ADITYA DWI PERMANA

ISOLASI DAN IDENTIFIKASI SENYAWA ALKALOID  
DARI DAUN JOHAR (*Cassia siamea*)

F= 15/08

Ler  
i



FAKULTAS FARMASI UNIVERSITAS AIRLANGGA  
BAGIAN ILMU BAHAN ALAM  
SURABAYA  
2007

**Lembar Pengesahan**

**ISOLASI DAN IDENTIFIKASI SENYAWA ALKALOID  
DARI DAUN JOHAR (*Cassia siamea*)**

**SKRIPSI**

**Dibuat Untuk Memenuhi Syarat Mencapai Gelar Sarjana Farmasi  
Pada Fakultas Farmasi Universitas Airlangga**

**2007**


**Oleh :**


**ADITYA DWI PERMANA  
050212626**

**Disetujui Oleh :**

**Pembimbing Utama**

**Pembimbing Serta**

  
**Dr. Mulja Hadi Santosa  
NIP. 130 809 084**

  
**Dra. Wiwid Ekasari, Apt. M.Si  
NIP. 132 087 863**

## KATA PENGANTAR

Alhamdulillah, puji syukur kehadiran Allah SWT yang telah melimpahkan karuniaNya sehingga penyusun dapat menyelesaikan tugas skripsi yang berjudul **“ISOLASI DAN IDENTIFIKASI SENYAWA ALKALOID DARI DAUN JOHAR (*Cassia siamea*)”**

Skripsi ini dapat terselesaikan atas bantuan dan dorongan semua pihak. Untuk itu pada kesempatan ini penyusun ingin menyampaikan ucapan terima kasih kepada :

1. Dr. Mulja Hadi Santosa, Apt selaku dosen pembimbing utama yang telah berkenan meluangkan waktu dan tenaganya untuk memberikan petunjuk, bimbingan serta masukan sehingga penyusun dapat menyelesaikan skripsi ini.
2. Dra. Wiwied Ekasari, MSi, Apt selaku dosen pembimbing serta yang juga telah memberikan bimbingan, saran serta dorongan semangat sehingga skripsi ini terselesaikan.
3. Dr. Bambang Prajogo EW, MS, Apt dan Drs. Herra Studiawan, Msi, Apt selaku dosen penguji atas masukan yang diberikan untuk menyempurnakan skripsi ini.
4. Rektor Universitas Airlangga yang telah memberikan fasilitas selama saya mengikuti kuliah dan melakukan penelitian ini.
5. Dekan Fakultas Farmasi Universitas Airlangga yang telah memberikan fasilitas selama saya mengikuti kuliah dan melakukan penelitian ini.
6. Dr Marcellino Rudyanto, Msi PhD, Apt sebagai dosen wali yang telah membimbing dan selalu memberi saran selama menempuh pendidikan sarjana farmasi..
7. Kepala bagian Ilmu Bahan Alam yang telah menyediakan bahan dan fasilitas penelitian
8. Seluruh staf pengajar Fakultas Farmasi Universitas Airlangga yang telah membimbing dan menyalurkan ilmunya.

9. Bapak, Ibu, Mas Agus, Mbak Nanik, Dita, paman-paman, bibi-bibi serta seluruh saudaraku tercinta yang selalu menyayangi, mendoakan, dan memberi bantuan moril maupun materiil.
10. Rekan seperjuangan dari Tim Johar : Nugroho, Nurul, Arum, Afraz, Arlita, dan Arles yang selalu bersama dalam suka maupun duka
11. Rekan seperjuangan di Lab Bahan Alam : Nina, Andi, Vivi, Irma, Marcha, Nia, Farida, Wuri atas bantuannya selama kerja di lab.
12. Sobat-sobatku semua : Mas Elvin "*My Best Teacher*", Rivany, Marcha, Mas Agus, Agung, Hermanto, Topan, Yohanes, Riki, Happy, Dewi, Mas Dodik, Aris, Sugeng, Indrawan, serta sobat - sobatku yang lain, "*You're my best friends*".
13. Adik - adik Tim Johar II : Eko, Aan, Rima, Ima, Esti, Maisya, Eta, Gugus dan Irma, atas dukungan serta bantuannya selama ini.
14. Kepada Pak Jarwo, Mas Iwan, Mas Mahfud, Pak Kadi, Pak Lismo dan Pak Parto yang telah banyak membantu dalam kelancaran penelitian.
15. Seluruh karyawan Fakultas Farmasi Universitas Airlangga yang telah membantu kelancaran studi penyusun.
16. Serta semua pihak yang tidak disebutkan namanya, yang telah memberi bantuan secara langsung maupun tidak langsung hingga terselesaikannya pendidikan sarjana ini.

Semoga Allah SWT berkenan melimpahkan Rahmat dan karunia-Nya sebagai balasan atas kebaikan dan bantuan yang telah diberikan. Dan dengan segala kekurangan dalam penyusunan skripsi ini penyusun mohon maaf dan berharap semoga skripsi ini berguna bagi pengembangan ilmu pengetahuan. Amin

Surabaya, Maret 2007

Penulis

## RINGKASAN

ISOLASI DAN IDENTIFIKASI SENYAWA ALKALOID DARI DAUN  
JOHAR (*Cassia siamea*)

Aditya Dwi Permana

*Cassia siamea* yang dikenal masyarakat dengan nama Johar, merupakan salah satu jenis tumbuhan yang banyak dimanfaatkan sebagai obat tradisional. Di kalangan masyarakat, tanaman ini banyak dimanfaatkan sebagai obat malaria, obat cacung, tonikum serta obat gatal-gatal dan penyakit kulit. Penggunaan daun *Cassia siamea* sebagai obat malaria telah banyak diteliti, mengingat resistensi parasit malaria terhadap obat modern telah banyak terjadi. Kandungan utama dari daun *Cassia siamea* yang diduga memiliki aktivitas antimalaria, salah satunya adalah senyawa alkaloid. Pada penelitian sebelumnya, uji aktivitas antimalaria fraksi alkaloid daun *Cassia siamea* secara *in vitro* dan *in vivo* memberikan hasil yang positif.

Penelitian ini bertujuan untuk mengisolasi dan mengidentifikasi senyawa golongan alkaloid yang terkandung dalam daun *Cassia siamea* sehingga data yang diperoleh dapat digunakan untuk penelitian identifikasi struktur.

Pada penelitian terdahulu yang dilakukan oleh El Sayyad (1984), pada daun *Cassia siamea* ditemukan empat macam alkaloid yang mempunyai inti isoquinolina, yaitu alkaloid siamin, siaminin A, siaminin B dan siaminin C dengan total kandungan alkaloid mencapai 0,17 %. Pada proses isolasi yang dilakukan oleh El Sayyad, digunakan pelarut benzena yang tergolong pelarut yang sangat toksik dan berbahaya. Oleh karena itu pada penelitian kali ini, dilakukan isolasi dan identifikasi senyawa alkaloid dari daun *Cassia siamea* yang mengacu pada metode isolasi yang dilakukan oleh El Sayyad dengan menggunakan berbagai modifikasi yang sesuai untuk isolasi alkaloid.

Serbuk daun seberat 2301 gram dihilangkan lemaknya dengan cara maserasi menggunakan pelarut n-heksana. Kemudian ampasnya diekstraksi lagi dengan etanol 90 % yang mengandung asam tartrat 1 %. Hasil yang diperoleh dipekatkan dengan rotavapor sampai  $\frac{1}{4}$  nya kemudian dibasakan dengan  $\text{NH}_4\text{OH}$  sampai pH 8, kemudian diekstraksi dengan  $\text{CHCl}_3$ . Hasil ekstraksi diperoleh sebanyak 97 gram, kemudian diambil 4 gram dan dilakukan pemurnian dengan pengasaman dan pembasaan, dengan etanol 90 % yang mengandung asam tartrat 1 % dan pembasaan dengan  $\text{NH}_4\text{OH}$  2,5 % lalu diekstraksi dengan  $\text{CHCl}_3$ , sebanyak tiga kali. Dari hasil pengasaman dan pembasaan sebanyak 161,8 mg, kemudian dilakukan kromatografi kolom dengan fase gerak  $\text{CHCl}_3$  : Etanol (8,5 : 1,5) sehingga didapatkan tiga fraksi positif alkaloid, yaitu fraksi 31-44, 45-59 dan 80-140. Dari fraksi-fraksi tersebut kemudian dilakukan isolasi dengan kromatografi preparatif dan didapatkan dua isolat alkaloid, yaitu isolat A sebanyak 11,5 mg dari fraksi 31-44 dan 45-59 (0,012 % dari serbuk daun) serta isolat B sebanyak 1,4 mg dari fraksi 80-140 (0,0015 % dari serbuk daun).

Dari hasil identifikasi alkaloid dengan reaksi pengendapan, didapatkan hasil yang positif dengan pereaksi Dragendorff, Mayer, Wagner dan Boucharat. Pada hasil KLT, isolat A memberikan noda tunggal dengan harga Rf : 0,45 ( $\text{CHCl}_3$  : Etanol = 8 : 2), 0,47 ( $\text{CHCl}_3$  : Metanol : Etil asetat = 2 : 1 : 1) dan 0,37

(Etil asetat : Metanol : Air = 16,2 : 2,2 : 1,6). Sedangkan isolat B memberikan noda tunggal dengan harga  $R_f$  : 0,14 ( $\text{CHCl}_3$  : Etanol = 8 : 2 ), 0,28 ( $\text{CHCl}_3$  : Metanol : Etil asetat = 2 : 1 : 1) dan 0,02 (Etil asetat : Metanol : Air = 16,2 : 2,2 : 1,6). Hasil identifikasi dengan KCKT, isolat A didapatkan puncak dengan waktu tambat (Retention time /  $t_R$ ) = 51,946 menit dan tingkat kemurnian sebesar 97,6752 %. isolat A juga memberikan serapan maksimum pada panjang gelombang 340,4; 269; dan 253,8. Hasil spektrum Infra Merah dari isolat alkaloid A memperlihatkan puncak yang intensif pada  $3435,26 \text{ cm}^{-1}$  yang menunjukkan adanya senyawa O-H. Puncak pada  $1327,79 \text{ cm}^{-1}$  dan  $1393,96 \text{ cm}^{-1}$  menunjukkan adanya gugus C-N aromatik. Adanya gugus C-O ditandai dengan puncak pada bilangan gelombang 1188,98 dan  $1170,24 \text{ cm}^{-1}$ . Sedangkan puncak pada 2919,61 dan  $2851,54 \text{ cm}^{-1}$  menunjukkan adanya gugus C-H. Adanya gugus aromatis ditandai dengan puncak pada  $1619,35 \text{ cm}^{-1}$  yang menunjukkan -C=C- aromatis serta adanya vibrasi tekuk aromatis luar bidang pada 852,98 dan  $816,90 \text{ cm}^{-1}$ . Hasil identifikasi dengan spektrometer  $^1\text{H-RMI}$  didapatkan pergeseran kimia pada 2,3479; 2,2115; 2,1966 ppm yang menunjukkan proton dari gugus metil. Sedangkan proton aromatis ditunjukkan pada pergeseran 6,7149; 6,4811; 6,4788; 6,4610; 6,4582, 6,0382 ppm dan proton dari OH fenolik ditunjukkan pada pergeseran 7,6002 ppm.

Melihat hasil dari penelitian ini, maka perlu dilakukan penelitian lebih lanjut tentang struktur elusidasi dari isolat alkaloid A dan isolat alkaloid B sehingga nanti diharapkan data yang diperoleh dapat digunakan sebagai riset marker analitik dan riset marker bioaktivitas untuk daun *Cassia siamea* dikembangkan sebagai obat herbal antimalaria yang baru.

**ABSTRACT**

*Cassia siamea* is one species of *Cassia* family. The aim of this research is to isolate and identify alkaloid compounds from *Cassia siamea* leaves. The powdered leaves were extracted with 90 % ethanol containing 1 % tartaric acid. The concentrated ethanol extract was alkalized with  $\text{NH}_4\text{OH}$  and extracted with chloroform. The acid base purification was carried out three times using 90 % ethanol containing 1 % tartaric acid and alkalized with  $\text{NH}_4\text{OH}$  and then extracted with chloroform. The separation of the chloroform fraction was achieved by column chromatography. Positive alkaloid fractions were purified using TLC preparative. The result of that purification preparation were two isolates, A isolate and B isolate. Those isolates were identified using these following apparatus namely TLC, HPLC, and spectroscopy (UV, Infrared, NMR), which were performed the alkaloid compounds existence.

**Keyword :** isolation and identification, *Cassia siamea* leaves, alkaloid

DAFTAR ISI

HALAMAN JUDUL..... i

LEMBAR PENGESAHAN..... ii

KATA PENGANTAR..... iii

RINGKASAN..... v

ABSTRACT..... vii

DAFTAR ISI..... viii

DAFTAR TABEL..... xi

DAFTAR GAMBAR..... xii

DAFTAR SINGKATAN..... xiii

BAB I PENDAHULUAN..... 1

1.1 Latar belakang..... 1

1.2 Rumusan masalah..... 3

1.3 Tujuan penelitian..... 4

1.4 Hipotesis penelitian..... 4

1.5 Manfaat penelitian..... 4

BAB II TINJAUAN PUSTAKA..... 5

2.1 Tinjauan tentang tanaman *Cassia siamea*..... 5

2.1.1 Klasifikasi tanaman..... 5

2.1.2 Penyebaran *Cassia siamea*..... 5

2.1.3 Morfologi *Cassia siamea*..... 6

2.1.4 Kandungan *Cassia siamea*..... 7

2.1.5 Khasiat *Cassia siamea*..... 7

2.2 Tinjauan tentang Alkaloid secara umum..... 7

2.2.1 Penggolongan Alkaloid..... 8

2.2.2 Tinjauan Tentang Reaksi Pengendapan..... 11

2.2.3 Penelitian tentang senyawa alkaloid pada daun *Cassia siamea*..... 11

2.3 Tinjauan Tentang Metode Ekstraksi..... 12

2.4 Tinjauan Tentang Metode Pemisahan Dengan Kromatografi..... 15

2.4.1 Definisi Kromatografi..... 15

2.4.2 Kromatografi Lapis Tipis..... 16



2.4.3 KLT Densitometri.....	17
2.4.4 Kromatografi Kolom.....	17
2.4.5 Kromatografi Preparatif.....	18
2.4.6. KCKT ( Kromatografi Cair Kinerja Tinggi ).....	18
2.5 Tinjauan tentang Spektrometri Infra Merah.....	21
2.6 Tinjauan tentang Spektrofotometri UV Vis.....	22
2.7 Tinjauan tentang Spektrometri Resonansi Magnetik Inti (RMI).....	23
<b>BAB III KERANGKA KONSEPTUAL.....</b>	<b>25</b>
3.1 Landasan Teoritik.....	25
3.2 Skema Kerangka Konseptual.....	27
<b>BAB IV METODE PENELITIAN.....</b>	<b>28</b>
4.1 Bahan Penelitian.....	28
4.1.1 Bahan Tanaman.....	28
4.1.2 Bahan Kimia.....	28
4.2 Alat-Alat.....	28
4.3 Tahapan Kerja.....	28
4.3.1 Pembuatan Fraksi Kloroform.....	28
4.3.2 Metode fraksinasi dengan Kromatografi kolom terbuka.....	30
4.3.3 Isolasi dengan Kromatografi Preparatif.....	31
4.3.4 Identifikasi Senyawa Alkaloid.....	33
4.3.4.1 Reaksi Pengendapan.....	33
4.3.4.2 Identifikasi Dengan Kromatografi Lapis Tipis.....	33
4.3.4.3 Identifikasi Kemurnian dengan KCKT.....	33
4.3.4.3 Identifikasi Dengan Spektrofotometri UV- Vis.....	33
4.3.4.3 Identifikasi Dengan Spektrometer Infra Merah.....	33
4.3.4.6 Identifikasi dengan Spektrometri Resonansi Magnetik Inti.....	34
<b>BAB V HASIL PENELITIAN DAN ANALISIS DATA.....</b>	<b>35</b>
5.1. Hasil Ekstraksi dan Fraksi Kloroform dari Daun <i>Cassia siamea</i> .....	35
5.2 Hasil Fraksinasi Alkaloid dengan Kromatografi Kolom Lambat.....	36
5.3 Hasil Isolasi Alkaloid dengan Kromatografi Preparatif.....	37
5.4. Identifikasi Senyawa Alkaloid Hasil Kromatografi Preparatif.....	38
5.4.1. Identifikasi Alkaloid Dengan Reaksi Pengendapan.....	38

	x
5.4.2. Identifikasi Alkaloid Dengan Kromatografi Lapis Tipis.....	38
5.4.3. Identifikasi Kemurnian dengan Kromatografi Cair Kinerja Tinggi (KCKT).....	41
5.4.4. Identifikasi dengan Spektrofotometri UV- Vis.....	43
5.4.5. Identifikasi dengan Spektrometer Infra Merah.....	45
5.4.6. Identifikasi dengan Spektrometer Resonansi Magnetik Inti (RMI).....	47
BAB VI PEMBAHASAN.....	49
BAB VII KESIMPULAN DAN SARAN.....	56
DAFTAR PUSTAKA.....	57
LAMPIRAN.....	59

## DAFTAR TABEL

Tabel 2.1. Pembagian Daerah Infra Merah .....	21
Tabel 5.1. Hasil Pembuatan Fraksi Alkaloid untuk Isolasi Alkaloid.....	35
Tabel 5.2. Hasil Penggabungan Fraksi positif alkaloid dari hasil Kromatografi Kolom Lambat.....	36
Tabel 5.3. Hasil Identifikasi Isolat Alkaloid dengan KLT Fase Diam silika gel 60 F 254.....	41
Tabel 5.4. Hasil pengukuran $\lambda_{max}$ dari isolat A.....	43
Tabel 5.5. Hasil spektrum Infra Merah dari isolat A.....	45
Tabel 5.6. Hasil spektrum $^1H$ -RMI dari isolat A.....	47
Tabel 6.1. Hasil identifikasi isolat A dibandingkan dengan alkaloid siaminin A, siaminin B dan siaminin C.....	53

## DAFTAR GAMBAR

Gambar	Halaman
2.1 Gambar Pohon, Bunga dan Daun <i>Cassia siamea</i> .....	6
2.2 Struktur senyawa alkaloid inti Isokuinolina dari daun <i>Cassia Siamea</i> ..	12
3.1 Skema Kerangka Konseptual.....	27
4.1 Skema isolasi dan identifikasi alkaloid dari daun <i>Cassia siamea</i> .....	32
5.1 Hasil KLT Kromatografi Kolom dengan fase gerak kloroform : Etanol ( 8,5 : 1,5 ) pada panjang gelombang 365 nm.....	36
5.2 Hasil KLT Kromatografi Kolom dengan fase gerak kloroform : Etanol ( 8,5 : 1,5 ) pada panjang gelombang 255 nm.....	37
5.3 Hasil KLT Kromatografi Kolom dengan fase gerak kloroform : Etanol ( 8,5:1,5 ) dengan penampak noda pereaksi Dragendorf.....	37
5.4. KLT senyawa hasil isolasi dengan fase gerak Kloroform : Etanol ( 8 : 2 ) pada panjang gelombang 365 nm, 254 nm dan penampak noda Dragendorf .....	39
5.5. KLT senyawa hasil isolasi dengan fase gerak Kloroform : Etil- Asetat : Metanol ( 2 : 1 : 1 ) pada panjang gelombang 365 nm, 254 nm dan penampak noda Dragendorf .....	39
5.6. KLT senyawa hasil isolasi dengan fase gerak Etil Asetat : Metanol : Air ( 16,2 : 2,2 : 1,6 ) pada gelombang 365 nm, 254 nm dan penampak noda Dragendorf.....	40
5.7. Profil Kromatogram KCKT dari isolat A pada panjang gelombang 254 nm.....	42
5.8. Spektrum UV - Vis dari isolat A pada panjang gelombang 200 - 400 nm.....	44
5.9. Spektrum Infra Merah dari Isolat A.....	46
5.10 Spektrum <sup>1</sup> H-RMI dari isolat A.....	48

**DAFTAR SINGKATAN**

CDC	: Cilnical Disease Centre
Depkes RI	: Departemen Kesehatan Republik Indonesia
IC <sub>50</sub>	: Inhibitory Concentration 50
ED <sub>50</sub>	: Effective Dose 50
TLC	: Thin Layer Chromatography
UV	: Ultra Violet
IR	: Infra Red
KCKT	: Kromatografi Cair kinerja Tinggi
RMI	: Resonansi Magnetik Inti
TMS	: Tetra Metil Silana
KBr	: Kalium Bromida

## BAB I PENDAHULUAN



### 1.1 Latar Belakang Masalah

Indonesia merupakan negara yang kaya akan berbagai macam tumbuhan. Sedikitnya 3500 jenis tumbuhan yang terdapat di Indonesia telah dimanfaatkan penduduk sebagai sumber pangan, papan maupun obat-obatan (Heyne, 1987).

Pemakaian bahan alam untuk mengatasi berbagai penyakit telah lama dilakukan, ditambah pula adanya data bahwa sekitar 75-80 % dari penduduk dunia tidak mempunyai kemampuan untuk mendapatkan pengobatan klinik guna mengatasi penyakit yang dideritanya (Ekasari, 2001). Ada beberapa keuntungan pengobatan dengan bahan alam atau fitoterapi. Keuntungan yang utama adalah ketersediaan bahan alam dalam jumlah yang cukup besar terutama di negara-negara berkembang. Di samping itu, obat dari bahan alam dalam hal ini obat tradisional lebih dipercaya dan digunakan oleh sebagian besar penduduk dunia terutama di negara-negara berkembang. Efek samping dari obat bahan alam juga relatif lebih ringan dan dari segi ekonomis relatif lebih murah (Wijisekera, 1991).

Salah satu jenis tumbuhan yang telah dimanfaatkan sebagai obat tradisional adalah *Cassia siamea* yang dikenal masyarakat dengan nama Johar atau Juwar. Tanaman ini merupakan salah satu jenis pohon yang banyak di budidayakan di pulau Jawa. Tanaman ini mampu tumbuh pada ketinggian kurang lebih 1000 m diatas permukaan laut dan tidak memerlukan kondisi tanah yang terlalu baik (Heyne, 1987).

Di kalangan masyarakat luas, tanaman *Cassia siamea* dimanfaatkan sebagai obat antimalaria, obat cacing, tonikum serta untuk menghilangkan gatal-gatal dan penyakit kulit (Heyne, 1987) maupun untuk obat insomnia (Phuket herbs).

Penggunaan daun *Cassia siamea* sebagai obat antimalaria telah banyak diteliti, mengingat resistensi parasit malaria terhadap beberapa obat modern banyak terjadi. Selama bertahun-tahun klorokuin telah digunakan sebagai pengobatan malaria. Namun kini hampir di seluruh negara endemik malaria telah ditemukan resistensi *Plasmodium* terhadap klorokuin. Lebih daripada itu

resistensi dari *Plasmodium falciparum* telah berkembang untuk obat antimalaria yang lain. Pada beberapa tempat di Asia Tenggara, telah dilaporkan adanya resistensi terhadap klorokuin, sulfadoksin / piremetamin, meflokuin, halofantrin, dan kuinin. Pada beberapa tempat tersebut pengobatan yang efektif hanya kombinasi artemesinin dan turunannya ( CDC, 2004 ).

Kandungan utama yang terdapat pada daun *Cassia siamea* antara lain alkaloid, triterpenoid, dan antrakuinon (Depkes RI,1989). Dari beberapa tumbuhan yang telah berhasil diisolasi senyawa bioaktifnya, beberapa golongan senyawa telah menunjukkan aktivitas antimalaria, misalnya senyawa golongan alkaloid, terpenoid, kumarin dan lignan, antranoid, khalkon dan flavonoid (Broto, 1994). Alkaloid merupakan salah satu metabolit sekunder yang dihasilkan oleh tumbuhan, yang banyak dimanfaatkan untuk mengobati penyakit malaria. Alkaloid kinin yang terdapat pada kulit batang *Cinchona succirubra* telah digunakan selama bertahun-tahun untuk mengobati penyakit malaria (Mursito,2002). Selain itu, adapula jenis alkaloid lain yang juga efektif sebagai antimalaria seperti piknamina yang terdapat dalam *Triclisia patens* suku Menispermaceae, Senyawa 4-metoksi -1- vinil- $\beta$ -karbolina yang terdapat dalam *Picrasma javanica*, serta 5'-O-demethyldioncophylline merupakan alkaloid jenis baru yang berhasil diisolasi dari akar *Triphyophyllum peltatum* (Bringmann *et al*, 1998 ; Sutaryo B.M.,1994)

Untuk dapat mengidentifikasi senyawa alkaloid yang terdapat pada daun *Cassia siamea*, diperlukan metode yang efektif untuk dapat mengekstraksi dan mengisolasinya. Pada tahun 1984, El Syyad berhasil menemukan metode yang efektif untuk mengisolasi senyawa alkaloid yang terdapat dalam daun *Cassia siamea* dengan menggunakan pelarut benzena, yang tergolong pelarut yang sangat toksik dan berbahaya. Dari hasil isolasi tersebut, kemudian dilakukan identifikasi dan didapatkan empat macam alkaloid dengan inti isokuinolin yaitu siamin, siaminin A, siaminin B, dan siaminin C.

Beberapa penelitian terdahulu menunjukkan bahwa daun *Cassia siamea* memiliki aktivitas sebagai antimalaria, tetapi tidak menjelaskan tentang senyawa tertentu yang memiliki aktivitas antimalaria. Ekasari (2001) telah melakukan serangkaian penelitian dengan dugaan senyawa alkaloid yang mempunyai

aktivitas antimalaria. Penelitian dimulai dengan menggunakan ekstrak etanol untuk uji aktivitas antimalaria secara *in vitro* dengan  $IC_{50}$  sebesar  $7,06 \mu\text{g/ml}$ , lalu dilakukan ekstraksi dengan pelarut kloroform yang menghasilkan ekstrak kloroform dengan harga  $IC_{50}$  sebesar  $2,41 \mu\text{g/ml}$ . Kemudian dilakukan fraksinasi dengan kromatografi kolom vakum dengan menggunakan fase gerak n-heksana-kloroform-etanol pada berbagai macam perbandingan sampai akhirnya didapatkan fraksi 16 ekstrak kloroform yang positif alkaloid, dengan harga  $IC_{50}$  sebesar  $1,70 \mu\text{g/ml}$ . Harga  $IC_{50}$  dari fraksi 16 ekstrak kloroform tersebut tidak berbeda jauh dengan  $IC_{50}$  dari klorokuin difosfat sebesar  $1,03 \mu\text{g/ml}$ . Selain itu Puspadina (2005) juga meneliti tentang aktivitas fraksi alkaloid total hasil isolasi dari daun *Cassia siamea* terhadap Plasmodium berghei secara *in-vivo*. Dari hasil penelitian tersebut didapatkan harga  $ED_{50}$  sebesar  $0,2529 \text{ mg/kg BB}$  mendekati harga  $ED_{50}$  dari klorokuin difosfat sebesar  $0,1561 \text{ mg/kg BB}$ . Hal ini makin mengarahkan bahwa senyawa alkaloid pada daun *Cassia siamea* mempunyai aktivitas antimalaria yang poten.

Mengingat dari hasil penelitian tersebut, senyawa alkaloid yang terdapat dalam daun *Cassia siamea* diduga kuat memiliki aktivitas antimalaria yang poten, maka perlu dilakukan penelitian lebih lanjut mengenai isolasi dan identifikasi senyawa alkaloid pada daun *Cassia siamea*, sehingga nantinya daun *Cassia siamea* dapat dikembangkan sebagai obat herbal antimalaria yang baru. El Sayyad (1984) menggunakan pelarut benzena untuk mengisolasi senyawa alkaloid dari daun *Cassia siamea*, padahal pelarut tersebut tergolong sangat toksik dan penggunaannya sebaiknya dihindari. Untuk itu, pada penelitian kali ini dilakukan isolasi dan identifikasi senyawa alkaloid pada daun *Cassia siamea* dengan tetap mengacu pada metode isolasi dari El Sayyad (1984) tetapi sebagian dari proses isolasi menggunakan berbagai modifikasi yang sesuai, sehingga nantinya dapat dilanjutkan dengan uji aktivitas antimalariannya.

## 1.2 Rumusan Masalah

Apakah senyawa alkaloid dari daun *Cassia siamea* bisa diisolasi dan diidentifikasi ?



### **1.3 Tujuan Penelitian**

Untuk mengisolasi dan mengidentifikasi senyawa golongan alkaloid yang terkandung dalam daun *Cassia siamea*

### **1.4 Manfaat Penelitian**

Dengan mengisolasi dan mengidentifikasi senyawa golongan alkaloid dari daun *Cassia siamea*, diharapkan metoda yang diperoleh dapat digunakan sebagai riset marker analitik dan riset marker bioaktivitas untuk daun *Cassia siamea* dikembangkan sebagai obat herbal antimalaria yang baru.

## BAB II TINJAUAN PUSTAKA

### 2.1. Tinjauan tentang tanaman *Cassia siamea*

#### 2.1.1. Klasifikasi tanaman (Becker C.A and Backhuizen, 1963)

Divisi	: Spermatophyta
Anak Divisi	: Angiospermae
Kelas	: Dicotyledonae
Anak kelas	: Dialypetalae
Bangsa	: Leguminosae
Suku	: Caesalpiniaceae
Marga	: <i>Cassia</i>
Jenis	: <i>Cassia siamea</i> Lamk
Nama daerah	: Johar, Juwar (Heyne, 1987)
Sinonim	: <i>Cassia florida</i> Vahl., <i>Senna sumatrana</i> Roxb. ; <i>Cassia arayatensis</i> Naves (Joker,2001)

#### 2.1.2. Penyebaran *Cassia siamea*

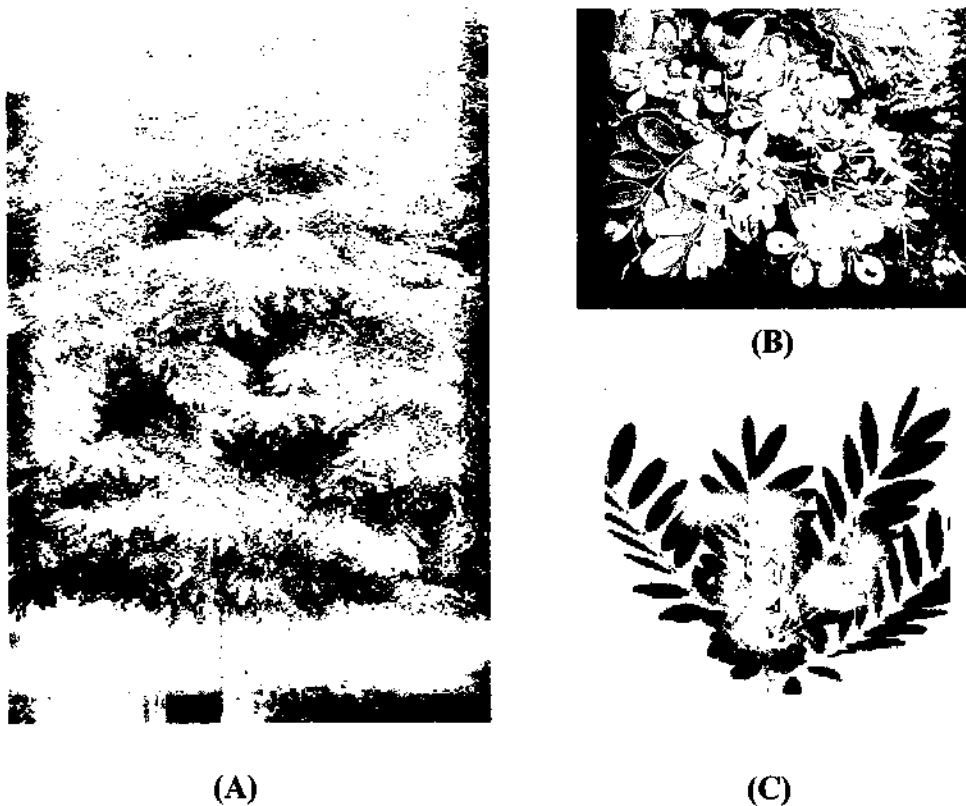
*Cassia siamea* merupakan tanaman asli India dan Sumatera sekitar katulistiwa. Tanaman ini merupakan salah satu jenis pohon yang banyak dibudidayakan di Pulau Jawa. Tanaman ini banyak terdapat di sepanjang jalan sebagai pohon peneduh. Tanaman ini mampu tumbuh pada ketinggian kurang lebih 1000 m di atas permukaan laut dan tidak memerlukan kondisi tanah yang terlalu baik.

Di daerah Batak sering ditemukan *Cassia siamea* dalam hutan sekunder yang berumur puluhan tahun dan tumbuh dengan baik. Di daerah pantai barat Sumatra, bagian kayu dari *Cassia siamea* merupakan jenis kayu yang sangat keras. (Heyne, 1987)

### 2.1.3. Morfologi *Cassia siamea*

Merupakan tanaman pohon (keras) menahun, berbatang tegak dan banyak bercabang. Tanaman ini dapat mencapai tinggi hingga 20 m, batangnya berbentuk bulat, berkayu keras dan daunnya berbentuk menyirip genap. Anak daun berbentuk oval sampai memanjang seringkali melekuk ke dalam, pada bagian bawah berambut halus dan tepi daun rata. Ukuran anak daun panjangnya 3 - 7,5 cm dan lebarnya 1 - 2,5 cm. Bunga berbentuk malai, Kelopak bunga terbagi lima, daun mahkota berwarna kuning cerah panjangnya 2 cm, tangkai sari terpanjang 1 cm.

Buah berbentuk polongan dengan katup yang tebal dan sambungan buah yang dapat dipertebal, diantara sambungan berkelok-kelok panjangnya 15 - 30 cm lebarnya 1,5 cm berkatup dua dan berisi biji antara 20 - 30 butir dan panjangnya 1,5 kali panjang. (Mardisiswo dan Rajakmangunsudiarso, 1985).



Gambar 2.1 Gambar Pohon (A), Bunga (B) dan Daun *Cassia siamea* (C).

#### 2.1.4. Kandungan *Cassia siamea*

Kandungan senyawa kimia yang terdapat pada tanaman *Cassia siamea* antara lain : (Depkes RI, 1989; Ross, S.A, 1986; Rao *et al.*,1978)

- Pada daun : Triterpenoid, alkaloid inti isokuinolin, yaitu siaminin, Senyawa golongan antrakuinon (dioxapenalen, krisofanolantron), sitosterol, flavonoid barakol, apigenin, kaempferol
- Pada Kayu/ batang : Tannin, antrakuinon, lignin, pentosa hidrosianat
- Pada bunga : Senyawa alkaloid inti kromon, yaitu *Cassia* Denindihidroisokumarin asam kumarat, sterol
- Pada buah : Antrakuinon, krisopanol (Abdallah *et al.*, 1987)

#### 2.1.5. Khasiat *Cassia siamea*

*Cassia siamea* mempunyai berbagai macam khasiat dan dapat digolongkan menurut bagian tanaman yang digunakan antara lain (Heyne, 1987) :

1. Daun *Cassia siamea* digunakan secara tradisional oleh masyarakat Jawa sebagai antimalaria. Disamping itu juga dapat digunakan untuk menghilangkan gatal-gatal dan penyakit kulit.
2. Akarnya dapat digunakan sebagai obat cacing
3. Bunga dan buahnya dipakai sebagai tonikum
4. *Cassia siamea* dipakai sebagai obat insomnia

## 2.2. Tinjauan tentang alkaloid secara umum

Alkaloid merupakan golongan zat tumbuhan yang terbesar. Pada umumnya alkaloid mencakup senyawa yang bersifat basa yang mengandung satu atau lebih atom nitrogen, biasanya dalam gabungan, sebagai bagian dari sistem siklik. Alkaloid seringkali beracun bagi manusia tetapi banyak yang mempunyai kegiatan fisiologi yang menonjol sehingga banyak digunakan dalam bidang pengobatan. Alkaloid seringkali bersifat optis aktif, kebanyakan berbentuk kristal tetapi hanya sedikit yang berupa cairan pada suhu kamar.

Prazat alkaloid paling umum adalah asam amino, meskipun sebenarnya biosintesis kebanyakan alkaloid lebih rumit. Secara kimia alkaloid merupakan

suatu golongan heterogen. Ia berkisar dari senyawa sederhana seperti koniina, yaitu alkaloid utama dari *conium maculatum*, sampai ke struktur pentasiklik pentasiklik seperti strikhnina. Banyak sekali alkaloid yang khas pada suku tumbuhan. Penyebaran alkaloid sangat tidak merata dan banyak suku tumbuhan yang tidak mengandungnya sama sekali. Pada umumnya alkaloid tidak ditemukan dalam paku-pakuan, gymnospermae, lumut dan tumbuhan rendah. Fungsi alkaloid dalam tumbuhan masih belum jelas, meskipun masing-masing senyawa telah dinyatakan terlibat sebagai pengatur tumbuh, penghalau atau penarik serangga (Harborne, 1996)

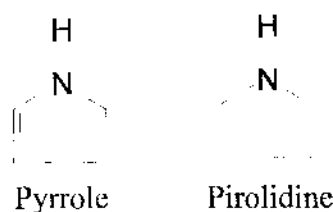
Untuk identifikasi alkaloid biasanya menggunakan uji KLT dan pereaksi kimia. Pereaksi kimia yang sering digunakan adalah pereaksi Mayer, Marquis dan Baughardat. Penampak noda yang digunakan untuk uji KLT adalah pereaksi Dragendorf. Dengan pereaksi Dragendorf alkaloid biasanya menghasilkan noda jingga coklat dengan latar belakang kuning.

### 2.2.1. Penggolongan Alkaloid

Adapun penggolongan Alkaloid antara lain ( Trease and Evans, 1978 ) :

#### 1. Pyrrole dan Pirolidine

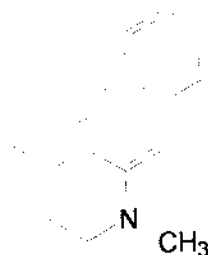
Struktur Kimia :



Contoh : Hygrine (*Coca spp.*), Stachydrine (*Stachys tuberifera*), Trigonelline (Fenugreek, Strophanthus, Kopi).

#### 2. Aporphine

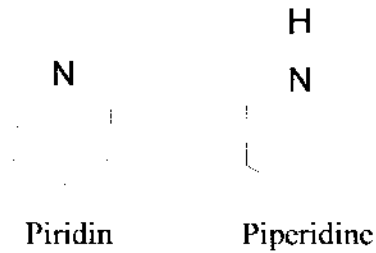
Struktur Kimia :



Contoh : Boldine (*Peumus boldus*)

## 3. Piridin dan Piperidine

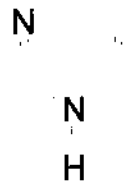
Struktur Kimia :



Contoh : Coniine (*Conium matulatum*), Arecoline (*Areca catechu*), Lobeline (*Lobelia* spp.), Nicotine (*Nicotiana tabacum*), Anabasine (*Nicotiana glauca*), Piperine (*Piper* spp.), Ricinine (*Ricinus communis*)

## 4. Imidazole

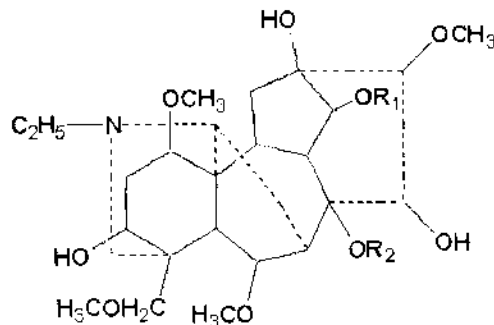
Struktur Kimia :



Contoh : Pilocarpine (*Pilocarpus* spp.)

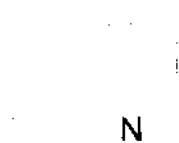
## 5. Terpenoid

Contoh : Aconine ( $R_1=H$ ;  $R_2=H$ ), Benzoylaconine ( $R_1=COC_6H_5$ ;  $R_2=H$ ), Aconiline ( $R_1=COC_6H_5$ ;  $R_2=COCH_3$ )



## 6. Quinolin

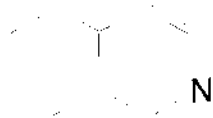
Struktur Kimia :



Contoh : Quinine, Quinidine, Cinchonine, Cinchonidine (*Cinchona* spp.)

## 7. Isoquinoline

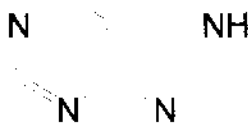
Struktur Kimia :



Contoh : Papaverine, narceine, narcotine (*Papaver somniferum*), Corydaline (*Corydalis* dan *Dicentra*), Hydrastine, Berberine (Beberapa genus dari Berberidaceae, Ranunculaceae, dan Papaveraceae)

## 8. Purine

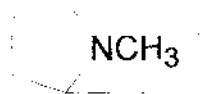
Struktur Kimia :



Contoh : Caffeine (Teh, Kopi, Cola nuts, guarana), Theobromine (Cocoa)

## 9. Tropan

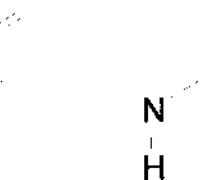
Struktur Kimia :



Contoh : Hyoscyamine, Atropine, Hyoscine, Meteloidine (Spesies dari *Atropa*, *Datura*, *Hyoscyamus*, *Duboisia*, *Mandragora*, dan *Scopolia*), cocaine (*Coca* spp.), Pseudo-pelleterine (*Punica granatum*)

## 10. Indol

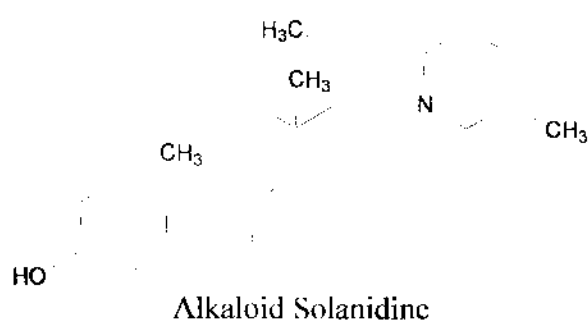
Struktur Kimia :



Contoh : Ergometrine, Ergotamine (*Claviceps* spp.), Physostigmine (*Physostigma venenosum*), Ajmaline, Serpentine, reserpine (*Rauwolfia* spp.), Yohimbine, Aspidospermine (*Aspidosperma* spp.), Vinblastine, vincristine (*Catharantus roseus*), Strychnine, Brucine (*Strychnos max-vomica*).

## 11. Steroid

Contoh : Solanidine (Kentang), Conessine (*Holarrhena antidysenterica*), Funtumine (*Funtumia elastica*)



### 2.2.2. Tinjauan Tentang Reaksi Pengendapan

Identifikasi senyawa alkaloid dapat dilakukan berdasarkan reaksi pengendapan. Adapun pereaksi yang umum digunakan adalah :

1. Mayer ( Kalium merkuri iodida )
2. Dragendorf ( Kalium bismuth iodida )
3. Wagner ( I-KI )
4. Bouchardat
5. Iodoplatinat
6. Marquis
7. Asam silikitungsat

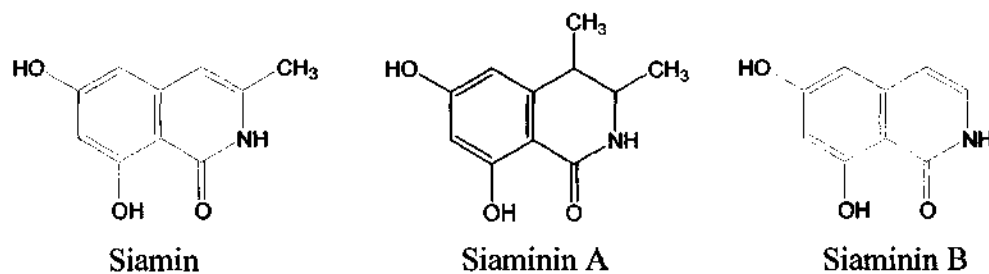
Adanya endapan putih dengan pereaksi Mayer, endapan jingga dengan pereaksi Dragendorf, serta endapan coklat dengan pereaksi Wagner dan Bouchardat menunjukkan adanya alkaloid (Fong, et al., 1990)

### 2.2.3. Penelitian tentang senyawa alkaloid pada daun *Cassia siamea*

Pada tahun 1984, El-Sayyad melakukan isolasi dan identifikasi senyawa alkaloid dari daun *Cassia siamea*. Serbuk daun sebanyak 1 kg diekstraksi dengan Etanol 90% yang mengandung asam tartrat 1 % pada temperatur ruang. Ekstrak pekat kemudian dibasakan dengan  $\text{NH}_4\text{OH}$  (pH 8) dan diekstraksi dengan  $\text{CHCl}_3$ . Residu ekstrak  $\text{CHCl}_3$  kemudian dilakukan digesti dengan  $\text{C}_6\text{H}_6$  sampai didapatkan larutan  $\text{C}_6\text{H}_6$  yang tidak berwarna. Selanjutnya dilakukan pemurnian



dengan pengasaman dan pembasaan menggunakan  $H_2SO_4$  1 N dan  $NH_4OH$  encer dan kemudian diekstraksi dengan  $CHCl_3$ . Residu  $CHCl_3$  (1,7 g) dilarutkan dalam 10 ml etanol 96 % dan digunakan untuk TLC Preparatif ( 40 plate, silika gel GF 254 Merck, 20 x 20 cm,  $CHCl_3$  : Et-OH = 9 : 1). Dari hasil isolasi dan identifikasi tersebut, didapatkan senyawa alkaloid dengan inti isokuinolina yaitu senyawa siamin, siaminin A, Siaminin B dan Siaminin C, dengan kandungan total alkaloid sebesar 0,17 %.



Gambar 2.2. Struktur senyawa alkaloid inti Isokuinolina dari daun *Cassia Siamea* (El- Sayyad SM, 1984)

### 2.3 Tinjauan Tentang Metode Ekstraksi

Ekstraksi adalah kegiatan penarikan kandungan kimia yang dapat larut sehingga terpisah dari bahan yang tidak dapat larut dengan pelarut cair. Simplisia yang diekstrak mengandung senyawa aktif yang dapat larut dan senyawa yang tidak dapat larut, seperti serat, karbohidrat, protein dan lain-lain. Struktur kimia yang berbeda-beda akan mempengaruhi kelarutan serta stabilitas senyawa-senyawa tersebut terhadap pemanasan, udara, cahaya, logam berat dan derajat keasaman. Dengan diketahuinya senyawa aktif yang dikandung simplisia akan mempermudah pemilihan pelarut dan cara ekstraksi yang tepat. Simplisia yang lunak seperti rimpang dan daun mudah diserap oleh pelarut, karena itu pada proses ekstraksi tidak perlu diserbuk sampai halus. Ada beberapa macam metode ekstraksi yang dapat digunakan, antara lain :

#### A. Ekstraksi dengan menggunakan pelarut

##### 1. Cara dingin.

- Maserasi

Maserasi adalah proses pengekstrakan simplisia dengan menggunakan pelarut dengan beberapa kali pengocokan atau pengadukan pada temperatur ruangan (kamar). Secara teknologi

termasuk ekstraksi dengan prinsip metode pencapaian konsentrasi pada keseimbangan. Maserasi kinetik berarti dilakukan pengadukan yang kontinyu. Remaserasi berarti dilakukan pengulangan penambahan pelarut setelah dilakukan penyaringan maserat pertama, dan seterusnya.

- Perkolasi

Perkolasi adalah ekstraksi dengan pelarut yang selalu baru sampai sempurna (*exhaustive extraction*) yang umumnya dilakukan pada temperatur ruangan. Proses terdiri dari tahapan pengembangan bahan, tahap maserasi antara, tahap perkolasi sebenarnya (pencetakan/ penampungan ekstrak), terus menerus sampai diperoleh ekstrak (perkolat) yang jumlahnya 1-5 kali bahan.

## 2. Cara panas

- Refluks

Refluks adalah ekstraksi dengan pelarut pada temperatur pada titik didihnya, selama waktu tertentu dan jumlah pelarut terbatas yang relatif konstant dengan adanya pendingin balik. Umumnya dilakukan pengulangan proses pada residu pertama sampai 3-5 kali sehingga dapat termasuk proses ekstraksi sempurna.

- Soxhlet

Soxhlet adalah ekstraksi menggunakan pelarut yang selalu baru yang umumnya dilakukan dengan alat khusus sehingga terjadi ekstraksi kontinyu dengan jumlah pelarut relatif konstan dengan adanya pendingin balik.

- Digesti

Digesti adalah maserasi kinetik (dengan pengadukan kontinyu) pada temperatur yang lebih tinggi dari temperatur ruangan (kamar), yang secara umum dilakukan pada temperatur 40-50<sup>0</sup>C.

- Infus

Infus adalah ekstraksi dengan pelarut air pada temperatur penangas air (bejana infus tercelup ke dalam penangas air

mendidih, temperatur terukur 96-98<sup>0</sup>C) selama waktu tertentu (15- 20 menit).

- Dekok

Dekok adalah infus pada waktu yang lebih lama ( $\geq 30^0\text{C}$ ) dan temperatur sampai titik didih air.

#### B. Destilasi uap

Destilasi uap adalah ekstraksi senyawa kandungan menguap (minyak atsiri) dari bahan (segar atau simplisia) dengan uap air berdasarkan peristiwa tekanan partial senyawa kandungan menguap dengan fase uap air dan ketel secara kontinyu sampai sempurna dan diakhiri dengan kondensasi fase uap campuran (senyawa kandungan menguap ikut terdestilasi) menjadi destilat air bersama sentawa kandungan yang memisah sempurna atau memisah sebagian.

Pada destilasi uap, bahan (simplisia) benar-benar tidak tercelup ke air yang mendidih, namun dilewati uap air sehingga senyawa kandungan menguap ikut terdestilasi.

Destilasi uap dan air, bahan (simplisia) bercampur sempurna atau sebagian dengan air mendidih, senyawa kandungan menguap tetap kontinyu ikut terdestilasi.

#### C. Cara ekstraksi lainnya.

- Ekstraksi berkesinambungan

Proses ekstraksi yang dilakukan berulang kali dengan pelarut yang berbeda atau resirkulasi cairan pelarut dan prosesnya tersusun berturutan beberapa kali. Proses ini dilakukan untuk meningkatkan efisiensi (jumlah pelarut) dan dirancang untuk bahan dalam jumlah besar yang terbagi dalam beberapa bejana ekstraksi.

- Superkritikal karbondioksida

Penggunaan prinsip superkritik untuk ekstraksi serbuk simplisia, dan umumnya digunakan gas karbondioksida. Dengan variabel temperatur dan tekanan akan diperoleh spesifikasi kondisi polaritas tertentu yang sesuai untuk

melarutkan golongan senyawa kandungan tertentu. Penghilangan cairan pelarut dengan mudah dilakukan karena karbondioksida menguap dengan mudah, sehingga hampir langsung diperoleh ekstrak.

- Ekstraksi ultrasonik

Getaran ultrasonik (>20.000 Hz) memberikan efek pada proses ekstrak dengan prinsip meningkatkan permeabilitas dinding sel, menimbulkan gelembung spontan (cavitation) sebagai stress dinamik serta menimbulkan fraksi interfase. Hasil ekstraksi tergantung pada frekwensi getaran, kapasitas alat dan lama proses ultrasonikasi.

- Ekstraksi energi listrik

Energi listrik digunakan dalam bentuk medan listrik, medan magnet serta "electric-discharges" yang dapat mempercepat proses dan meningkatkan hasil dengan prinsip menimbulkan gelembung spontan dan menyebarkan gelembung tekanan berkecepatan ultrasonik.

## **2.4 Tinjauan Tentang Metode Pemisahan Dengan Kromatografi**

### **2.4.1 Definisi Kromatografi**

Pemakaian Kromatografi pada hakikatnya adalah untuk menjawab tiga pertanyaan : senyawa apa yang ada, berapa banyaknya dan bagaimana memperoleh komponen yang murni. Kromatografi adalah teknik pemisahan fisik suatu campuran zat-zat kimia yang berdasar pada perbedaan migrasi dari masing-masing komponen yang terpisah pada fase diam dibawah pengaruh fase yang bergerak (fase mobil). Kromatografi ini terbagi menjadi Kromatografi kualitatif, kromatografi kuantitatif dan kromatografi preparatif. Kromatografi kualitatif mengungkapkan ada atau tidaknya senyawa tertentu dalam cuplikan. Kromatografi kuantitatif digunakan untuk penetapan kadar cuplikan. Sedangkan kromatografi preparatif dipakai untuk memperoleh senyawa murni dalam jumlah memadai (mg sampai g) sehingga komponen itu dapat dicirikan lebih lengkap atau dipakai pada reaksi berikutnya (Gritter and Bobbit, 1991).

#### 2.4.2 Kromatografi Lapis Tipis

KLT ialah metode kromatografi cair yang paling sederhana dimana teknik pemisahan komponen-komponen atas dasar perbedaan adsorpsi atau partisi oleh fase diam dibawah gerakan pelarut pengembang atau pelarut pengembang campur. KLT ini biasanya dilakukan dengan membandingkan senyawa murni dengan campuran.

Fase diam KLT adalah bahan padat yang dilekatkan pada pelat gelas secara uniform dengan ketebalan lebih kurang 0,255 mm. Keadaan uniform fase diam ini untuk tujuan didapatnya pemisahan, yang laju aliran pelarut pengembang cepat dan merata. Fase diam yang umum dan banyak dipakai adalah silica gel yang dicampur dengan  $\text{CaSO}_4$  untuk menambah daya lengket partikel silica gel pada pelat. Adsorban lain yang banyak dipakai adalah alumina, kieselguhr, celite, serbuk selulosa, serbuk poliamida, kanji dan sephadex. Pemilihan pelarut pengembang atau pelarut pengembang campur sangat dipengaruhi oleh macam dan polaritas zat-zat kimia yang dipisahkan.

Kromatogram pada KLT merupakan noda-noda yang terpisah setelah melihat kromatogram yang mngabsorpsi radiasi ultraviolet atau visualisasi dengan cara fisika dan kimia. Visualisasi cara fisika yaitu dengan cara berfluoresensi dengan radiasi ultraviolet pada  $\lambda = 254 \text{ nm}$  atau  $\lambda = 365 \text{ nm}$ . Sedangkan visualisasi dengan cara kimia adalah dengan mereaksikan kromatogram dengan pereaksi warna yang memberikan warna atau fluoeresensi yang spesifik. Pada kromatogram KLT dipakai istilah faktor retardasi ( $R_f$ ) untuk kromatogram, yang didefinisikan :

$$R_f = \frac{\text{Jarak migrasi komponen}}{\text{Jarak migrasi fase mobil}}$$

Noda kromatogram tiap-tiap komponen yang terpisah setelah visualisasi tampak sebagai noda yang bulat bila terjadi proses pemisahan yang baik. (Mulja, dkk., 1995).

### 2.4.3. KLT Densitometri

Densitometri adalah metode analisis instrumental yang didasarkan pada interaksi radiasi elektromagnetik dengan analit yang merupakan noda analit pada KLT. Interaksi radiasi elektromagnetik dengan noda pada plat KLT yang dapat ditentukan adalah absorpsi, transmisi, pantulan (refleksi) pendar fluor atau pemadaman pendar fluor dari radiasi semula. Scanner pada KLT Densitometri digunakan untuk mengubah pola pada pelat KLT menjadi suatu kromatogram yang terdiri dari puncak-puncak.

Densitometri untuk analisis kualitatif didasarkan pada spectrum panjang gelombang kromatogram. Jika panjang gelombang kromatogram maksimum sama panjang gelombang pembanding, maka kemungkinan zat itu sama. Untuk analisis kuantitatif lebih dititikberatkan pada analit-analit dengan kadar sangat kecil yang perlu dipisahkan dulu dengan KLT. Analisa kuantitatif didasarkan pada adanya perbandingan yang proporsional antara jumlah cahaya yang diabsorpsi atau emisi dengan konsentrasi senyawa pada noda kromatogram (Mulja, dkk., 1995)

### 2.4.4. Kromatografi Kolom

Kromatografi kolom telah lama dikenal sebagai suatu cara untuk memisahkan campuran zat. Pemisahan yang terjadi pada kromatografi kolom berdasarkan perbedaan daya adsorpsi oleh fase diam terhadap masing-masing komponen di dalam campuran. Zat-zat yang teradsorpsi lemah pada fase diam akan terbawa lebih dulu oleh cairan pengeluasi, sedangkan zat-zat yang teradsorpsi kuat pada fase diam akan terbawa kemudian (Heftman, 1995).

Zat penyerap (seperti Aluminium Oksida yang telah diaktifkan, silika gel, kieselguhr terkalsinasi dan kieselguhr kromatografi murni) dalam keadaan kering atau setelah dicampur dengan sejumlah cairan, dimampatkan ke dalam tabung kaca atau tabung kwarsa dengan ukuran tertentu dan mempunyai lubang pengalir keluar dengan ukuran tertentu. Sejumlah sediaan yang diperiksa, dilarutkan dengan sedikit pelarut ditambahkan pada puncak kolom dan dibiarkan mengalir ke dalam zat penyerap. Zat berkhasiat diserap dari larutan oleh bahan penyerap secara sempurna berupa pita sempit pada puncak kolom. Dengan

mengalirkan pelarut lebih lanjut, dengan atau tanpa tekanan udara, masing-masing zat bergerak turun dengan kecepatan khas hingga terjadi pemisahan dalam kolom. Kecepatan bergerak zat dipengaruhi beberapa faktor, seperti daya serap zat penyerap, sifat pelarut dan suhu dari sistem kromatografi.

#### **2.4.5. KLT Preparatif**

Pada KLT preparatif, cuplikan yang akan dipisahkan ditotolkan berupa garis pada salah satu sisi lempeng, dan dikembangkan secara tegak lurus pada garis cuplikan sehingga campuran yang terpisah menjadi beberapa pita.

Penampakan pita yang mengandung cuplikan pada KLT preparatif tidak boleh merusak senyawa dan fase diam yang akan dikerok. Cara penampakan pita terbaik untuk senyawa bersifat aromatik atau mempunyai ikatan rangkap ialah dengan menyinari sinar UV pada lapisan yang mengandung indikator fluoresensi.

Banyaknya campuran yang dapat dipisahkan pada lapisan yang ukuran dan tebalnya tertentu sangat beragam. KLT preparatif dapat memisahkan 50 mg cuplikan pada lapisan 20 x 20 cm tebal 1 mm.

Hampir semua senyawa organik mengurai jika dibiarkan pada lapisan penyerap di udara dan tersinari untuk jangka waktu tertentu. KLT preparatif harus dilakukan secepat mungkin, mulai dari penotolan cuplikan awal sampai ke eluasi akhir (Gritter, 1991).

#### **2.4.6. KCKT ( Kromatografi Cair Kinerja Tinggi )**

HPLC yang merupakan kependekan dari High Performance Liquid Chromatography atau High Pressure Liquid Chromatography adalah istilah umum yang dipakai di dunia internasional. Kadang – kadang HPLC hanya diberi istilah LC ( Liquid Chromatography ). Di Indonesia, HPLC dipopulerkan dengan istilah KCKT yang merupakan kependekan dari Kromatografi Cair Kinerja Tinggi.

Ditinjau dari sistem peralatannya, KCKT termasuk dalam kromatografi kolom karena dipakai fase diam yang diisikan atau terpacking di dalam kolom. Tetapi bila ditinjau dari asas pemisahannya, KCKT dapat digolongkan sebagai kromatografi adsorpsi atau kromatografi partisi atau asas lainnya tergantung jenis kolom yang dipakai dan analit yang ditentukan.

Perkembangan KCKT berawal dari proses pemisahan yang berdasarkan adsorpsi dan partisi ke arah yang lebih luas yaitu proses pemisahan yang berdasarkan afinitas, filtrasi gel dan ion yang berpasangan, akan tetapi proses pemisahannya tetap dilakukan dalam kolom dengan menggunakan pelarut pengembang yang bertekanan tinggi. Maksud dan tujuan analisis dengan KCKT adalah didapatkannya pemisahan yang baik dan proses analisis berlangsung dalam waktu relatif singkat.

Bagian- bagian terpenting dalam instrumen KCKT diantaranya adalah :

a) Gerbang suntik (injektor)

Ada tiga macam sistem injektor dalam KCKT diantaranya Injektor dengan memakai diafragma (*Septum injector*), injektor tanpa diafragma (*Septumless injection system*) dan injektor dengan pipa dosis (*loop valve*) serta ada juga sistem injektor otomatis (*auto injector*)

b) Kolom

Kolom pada KCKT merupakan bagian yang sangat penting, sebab pemisahan komponen-komponen sampel akan terjadi dalam kolom. Berdasarkan ukurannya, kolom KCKT terbagi atas kolom konvensional, kolom microbore dan kolom *high speed*. Sedangkan dilihat dari jenis fase diam dan fase gerak, maka kolom KCKT dibedakan atas kolom fase normal (*Normal phase column*) dan kolom fase terbalik (*Reversed phase column*)

c) Pompa cairan

Beberapa persyaratan yang harus dimiliki sistem pompa KCKT adalah :

- Memberikan tekanan sampai 6000 – 8000 psi
- Sama sekali bebas dari pulsa
- Memberikan kecepatan aliran 0,1-10 ml/ menit
- Aliran terkontrol dengan reproduktibilitas kurang dari 0,5 %
- Tahan karat ( terbuat dari bahan baja / teflon)
- Dapat memberikan aliran isokratik atau gradien

Ada 3 macam jenis pompa yang digunakan dalam KCKT diantaranya adalah *Resiprocating Pumps*, *Displacement Pumps (Syringe Pumps)*, dan *Pneumatic Pumps (Constant Pressure Pumps)*.



## d) Detektor.

Detektor pada KCKT memberikan informasi tentang segala sesuatu yang diperlukan sehubungan dengan tujuan analisis kualitatif dan kuantitatif dengan metode KCKT. Pada umumnya detektor KCKT bersifat diferensial dan buta, kecuali MS dan FT-IR sebagai teknik analisis spesifik. Beberapa persyaratan detektor antara lain :

- Sensitivitas yang sangat tinggi dengan rentang sensitivitas  $10^{-8} - 10^{-15}$  g solut / detik
- Kestabilan dan reproduibilitas yang sangat baik
- Memberikan tanggapan yang linier terhadap konsentrasi solut (analit)
- Dapat bekerja dari suhu kamar sampai  $400^{\circ}$  C
- Tidak dipengaruhi perubahan suhu dan kecepatan pelarut pengembang
- Mudah didapat dan mudah pemakaiannya
- Dapat selektif terhadap macam-macam analit di dalam larutan pengembang
- Tidak merusak sampel
- Memberikan volume mati (dead volume) yang kecil untuk menghindari terjadinya pelebaran pita (band broadening).

Detektor pada KCKT dapat digolongkan menjadi 2 macam (tipe), yaitu :

- Detektor tipe G (General) yaitu detektor yang dapat mendeteksi analit secara umum, tidak bersifat spesifik dan tidak selektif
- Detektor tipe S (Selektif) yaitu detektor yang dapat mendeteksi analit dengan spesifik dan selektif

KCKT dapat digunakan untuk analisis kualitatif dan analisis kuantitatif terhadap sampel yang diamati. Secara kualitatif, KCKT dapat mendeteksi ada atau tidaknya suatu senyawa atau ion dalam sampel. Sedangkan secara kuantitatif, KCKT dapat memberikan informasi tentang jumlah komposisi analit yang terdapat dalam sampel. Namun, KCKT tidak dapat memberikan informasi tentang suatu senyawa yang belum diketahui, karena teknik yang digunakan dalam KCKT adalah dengan membandingkan data yang ada pada pembandingnya (Mulya, dkk.,1995).

### 2.5. Tinjauan tentang Spektrometri Infra Merah

Penggunaan Spektrometri infra merah ditujukan untuk menentukan gugus-gugus fungsi molekul pada analisis kualitatif, disamping juga untuk tujuan analisis kuantitatif. Pada spektrometri infra merah dipelajari karakter getaran gugus-gugus molekul yang berinteraksi dengan radisi infra merah. Adapun pembagian daerah infra merah dapat dilihat pada tabel 2.1.

NO	Daerah Infra Merah	Rentang Panjang Gelombang ( $\lambda$ ) (dalam $\mu\text{m}$ )	Rentang Bilangan Gelombang ( $\text{cm}^{-1}$ )	Rentang Frekuensi ( $\nu$ ) (dalam Hz)
1	Dekat	0,78 - 2,5	13.000 - 4000	3,8 - 1,2 ( $10^{13}$ )
2	Pertengahan	2,5 - 50	4000 - 200	1,2 - 0,06 ( $10^{14}$ )
3	Jauh	50 - 1000	200 - 10	6,0 - 0,3 ( $10^{13}$ )
4	Terpakai untuk analisis instrumental	2,5 - 15	4000 - 670	1,2 - 0,2 ( $10^{14}$ )

Tabel 2.1 Pembagian Daerah Infra Merah (Mulja, dkk., 1995)

Spektrometer inframerah biasanya merupakan spektrometer berkas ganda dan terdiri dari 5 bagian utama yaitu sumber radiasi, daerah cuplikan, kisi difraksi (monokromator) dan detektor.

Radiasi IR yang dipakai untuk analisis instrumental adalah radiasi IR yang rentang bilangan gelombangnya antara 4000 hingga 670  $\text{cm}^{-1}$ . Radiasi IR tersebut terbagi lagi atas dua daerah, yaitu :

1. Daerah gugus fungsi pada rentang bilangan gelombang 4000 hingga 1600  $\text{cm}^{-1}$
2. Daerah sidik jari pada rentang bilangan gelombang antara 1600 hingga 670  $\text{cm}^{-1}$

(Mulja, dkk., 1995)

Untuk memperoleh informasi gugus-gugus molekul dari zat yang dianalisis baik berupa cairan, padatan maupun gas, radiasi IR yang dipakai harus

berada pada rentang frekuensi yang sesuai dengan rentang getaran alamiah dari molekul (Hostettmann, *et al.*, 1995)

## 2.6 Tinjauan Tentang Spektrofotometri UV-Vis

Spektrofotometri UV-Vis adalah anggota spektroskopik yang memakai sumber radiasi elektromagnetik ultra violet (190-380 nm) dan sinar tampak (380-780 nm) dengan memakai instrument spektrofotometer. Spektrofotometri UV-Vis melibatkan energi elektronik yang cukup besar pada molekul yang dianalisis, sehingga spektrofotometri UV-Vis lebih banyak dipakai untuk analisis kuantitatif dibandingkan kualitatif.

Pada senyawa-senyawa yang gugus atomnya dapat mengabsorpsi radiasi UV-Vis disebut kromofor. Dikenal pula gugus aoksokrom yaitu gugus fungsional yang mempunyai elektron bebas seperti  $-OH$ ;  $-ONH_2$  dan  $-OCH_3$  yang memberikan transisi elektron. Terikatnya gugus aoksokrom oleh gugus kromofor akan mengakibatkan pergeseran pita absorpsi menuju ke panjang gelombang yang lebih panjang (pergeseran merah = batokromik) disertai peningkatan intensitas (hiperkromik)

Spektrofotometri UV-Vis dapat melakukan penentuan terhadap sampel yang berupa larutan, gas dan uap. Untuk sampel yang berupa larutan perlu diperhatikan beberapa persyaratan pelarut yang dipakai, antara lain :

1. Pelarut yang dipakai tidak mengandung sistem ikatan rangkap terkonjugasi pada struktur molekulnya dan tidak berwarna
2. Tidak terjadi interaksi dengan molekul senyawa yang dianalisis
3. Kemurniannya harus tinggi atau derajat untuk analisis

Pada umumnya pelarut yang sering dipakai adalah air, etanol, sikloheksan, dan isopropanol. Bougner, Lambert dan Beer membuat formula secara matematik hubungan antara transmittan atau absorban terhadap intensitas radiasi atau konsentrasi zat yang dianalisis dan tebal larutan yang mengabsorpsi sebagai :

$$A = \log \frac{1}{T} = \epsilon.b.c$$

Dimana : T = Persen transmittan  
 $\epsilon$  = Absorbansi Molar ( $L \cdot mol^{-1} \cdot cm^{-1}$ )  
c = Konsentrasi ( $mol \cdot L^{-1}$ )  
b = Tebal larutan (cm)  
A = Absorban  
(Mulja, dkk, 1995)

## 2.7. Tinjauan tentang Spektrometri Resonansi Magnetik Inti (RMI)

Spektrometri Resonansi Magnetik Inti (RMI) dapat digunakan untuk analisis kualitatif, khususnya dalam penentuan struktur molekul zat organik. Dengan hasil pengamatan spektrometri RMI dapat diketahui jenis, lokasi dan jumlah atom  $^1H$ ,  $^{13}C$ , dan  $^{15}N$  serta hubungan atom tersebut dengan atom lainnya.

Inti atom H dan C dikelilingi oleh medan magnet yang lemah. Jika senyawa yang mengandung atom-atom ini ditempatkan diantara medan magnet yang kuat, medan magnet inti akan terorientasi terhadap medan magnet luar, baik secara paralel maupun anti paralel. Perbedaan energi orientasi tampak sebagai frekuensi radio pada pita spektrum elektromagnetik.

Analisis dengan metode spektrometri RMI dilakukan dengan pengamatan pergeseran kimia ( $\delta$ ). Pergeseran kimia adalah posisi frekuensi resonansi sebuah proton tertentu yang posisinya berbeda terhadap posisi standar internal. Jika proton berada pada lingkungan kerapatan elektron yang tinggi,  $\delta$  akan bergeser pada harga yang tinggi. Sebaliknya  $\delta$  akan rendah pada keadaan proton dengan kerapatan elektron yang rendah (Akitt, 1992).

Spektrometri  $^1H$ -RMI merupakan metode yang penting dalam identifikasi struktur karena dapat memberikan informasi tentang lingkungan kimia dari atom hidrogen, jumlah atom hidrogen dalam setiap lingkungan dan struktur gugus yang berdekatan dengan setiap atom hidrogen (Fessenden, 1999). Spektrum  $^1H$ -RMI terlihat terutama di daerah 0-10 ppm medan bawah dari sinyal acuan Tetrametil silana (yang berdasarkan perjanjian ditetapkan pada 0 ppm). Proton tunggal sering terlihat pada spektrum sebagai kelompok sinyal yang keseluruhannya menunjukkan integrasi yang sesuai dengan satu proton. Hal ini terjadi bila proton

itu mempunyai satu atau lebih proton tetangga pada atom yang berdekatan. Gejala ini disebut penggandengan (coupling).

Spektrum  $^{13}\text{C}$  RMI memberikan informasi keadaan atom-atom karbon dalam sebuah molekul organik. Pada  $^{13}\text{C}$  RMI pergeseran kimia terjadi lebih besar ke arah bawah medan dari puncak Tetrametilsilana (TMS) sehingga rentang harga  $\delta$  menjadi lebih luas. Pelebaran rentang akan menyederhanakan spektrum karena kecilnya kemungkinan terjadi puncak yang tumpang tindih (Mulya, dkk.,1995).

## BAB III KERANGKA KONSEPTUAL

### 3.1 Landasan Teoritik

*Cassia siamea* yang dikenal dengan nama Johar, merupakan salah satu jenis tanaman yang dapat dimanfaatkan sebagai obat tradisional. Salah satu khasiat dari tanaman ini yaitu sebagai obat antimalaria. Penggunaan daun *Cassia siamea* sebagai obat antimalaria telah banyak diteliti, mengingat resistensi parasit malaria terhadap beberapa obat modern banyak terjadi, misalnya resistensi terhadap klorokuin, primakuin dan pirimetamin (CDC, 2004)

Daun *Cassia siamea* diketahui mengandung senyawa alkaloid (Depkes RI, 1989). Senyawa alkaloid seringkali beracun bagi manusia, tetapi banyak yang mempunyai aktivitas fisiologi yang menonjol, sehingga digunakan secara luas dalam pengobatan. Alkaloid secara farmakologi dikenal dapat mengobati malaria, seperti Alkaloid kinin yang digunakan selama bertahun-tahun untuk mengobati penyakit malaria (Mursito, 2002).

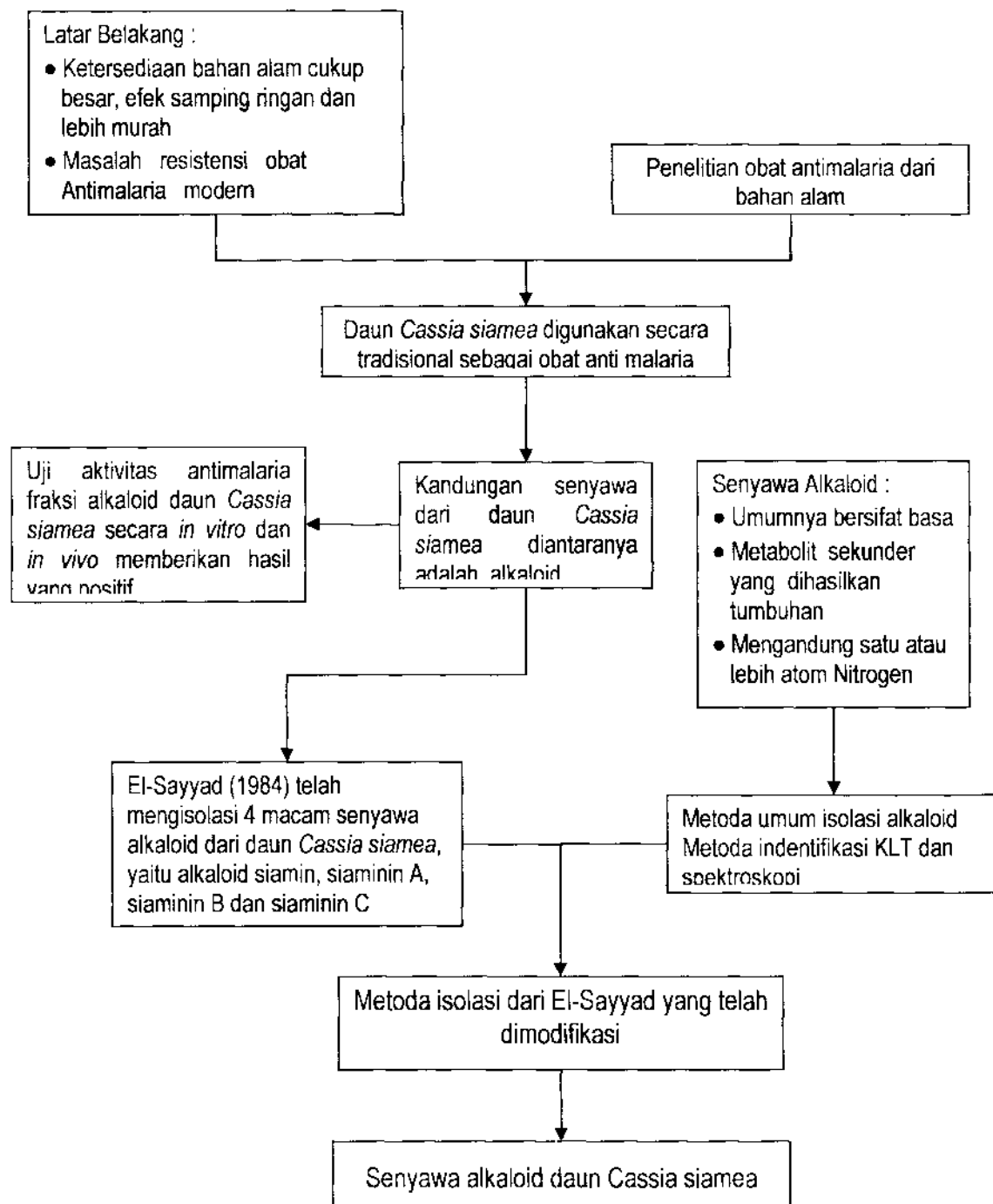
Penelitian tentang uji aktivitas antimalaria dari fraksi alkaloid daun *Cassia siamea*, baik secara *in vitro* maupun *in vivo* menunjukkan hasil yang positif. Ekasari (2001) melakukan uji aktivitas antimalaria dari fraksi 16 dari ekstrak kloroform, yang positif alkaloid, secara *in vitro* terhadap *Plasmodium falciparum* dan didapatkan  $IC_{50}$  sebesar 1,70  $\mu\text{g/ml}$ . Harga  $IC_{50}$  tersebut tidak berbeda jauh dengan  $IC_{50}$  dari klorokuin difosfat sebesar 1,03  $\mu\text{g/ml}$ . Puspadina lalu melanjutkan dengan melakukan uji aktivitas antimalaria fraksi total alkaloid daun *Cassia siamea* terhadap *Plasmodium berghei* secara *in vivo*. Pada penelitian tersebut didapatkan harga  $ED_{50}$  sebesar 0,2529 mg/kg BB mendekati harga  $ED_{50}$  dari klorokuin difosfat sebesar 0,1561 mg/kg BB.

Pada penelitian yang dilakukan oleh El-Sayyad (1984), telah diisolasi 4 macam senyawa alkaloid dari daun *Cassia siamea*, yaitu alkaloid siamin, siaminin A, siaminin B dan siaminin C, dimana pada proses isolasinya menggunakan pelarut benzena yang tergolong pelarut yang toksik.

Pada penelitian ini dilakukan isolasi senyawa alkaloid dari daun *Cassia siamea* dengan menggunakan metode dari El-Sayyad yang sebagian dari proses

isolasinya menggunakan berbagai modifikasi yang sesuai. Isolat alkaloid yang didapatkan lalu diidentifikasi dengan KLT, KCKT, Spektrometri Infra Merah, Spektrofotometri UV dan Spektrometri RMI.

### 3.2 Skema Kerangka Konseptual



Gambar 3.1. Skema Kerangka Konseptual





BAB IV

METODE PENELITIAN

## BAB IV METODE PENELITIAN

### 4.1. Bahan Penelitian

#### 4.1.1. Bahan Tanaman

Daun johar (*Cassia siamea*) yang digunakan dalam penelitian ini diperoleh di Kebun Raya Purwodadi

#### 4.1.2. Bahan Kimia

Metanol, Etil asetat, n-heksana, Etanol 90 % dan etanol p.a., NH<sub>4</sub>OH 25%, kloroform p.a., Aquadest, Asam tartrat, Pereaksi Dragendorf, Pereaksi Mayer, Pereaksi Wagner, Pereaksi Bouchardat,

### 4.2. Alat-Alat

Dalam penelitian ini digunakan beberapa alat antara lain : timbangan, toples, penyaring buchner, pompa vakum, corong pisah, gelas ukur, gelas beker, Erlenmeyer, rotavapor, cawan porselen, dan batang pengaduk, Silika gel 60 Merck, kolom kromatografi, plat KLT Silika gel 60 F 254 Merck, plat preparatif Silika gel 60 F 254 Merck, pipet preparatif, chamber preparatif, pipet tetes, vial, batang pengaduk, timbangan analitik, kertas saring, hair dryer, wadah tampungan, alat-alat yang digunakan untuk mengidentifikasi isolat alkaloid murni diantaranya lampu UV ( $\lambda = 254 \text{ nm}$  dan  $365 \text{ nm}$ ), penyemprot noda, KCKT, spektrometer Infra Merah, Spektrofotometer UV, dan spektrometer RMI

### 4.3. Tahapan Kerja

#### 4.3.1. Pembuatan Fraksi Kloroform

Daun yang masih segar kemudian dicuci sampai bersih, lalu dikeringkan dengan cara dimasukkan ke dalam oven pada suhu 50<sup>0</sup> C, sambil sesekali dibolak-balik. Setelah simplisia kering, kemudian digiling sehingga diperoleh serbuk yang halus. Serbuk halus tersebut kemudian dimaserasi dengan menggunakan pelarut n-Heksana. Selanjutnya didiamkan selama 24 jam sambil sesekali diaduk-aduk. Setelah didiamkan rendaman tersebut disaring dengan corong buchner yang

dihubungkan dengan pompa vakum untuk mendapatkan filtratnya. Proses maserasi ini dilakukan berulang-ulang, sampai diperoleh filtrat yang jernih. Setelah proses maserasi, selanjutnya serbuk diangin-anginkan sampai bebas n-heksana.

Proses maserasi dilanjutkan dengan menggunakan pelarut etanol 90 % yang mengandung 1 % asam tartrat. Sama seperti proses maserasi dengan n-heksan, pada maserasi ini juga didiamkan selama 24 jam sambil sesekali dilakukan pengadukan. Setelah 24 jam, rendaman tersebut disaring dengan corong Buchner untuk mendapatkan filtratnya. Setelah itu filtrat diuapkan dengan rotavapor sampai didapatkan volume  $\frac{1}{4}$  dari volume total. Ekstrak yang sudah kental tadi dibasakan dengan  $\text{NH}_4\text{OH}$  2,5 % sampai diperoleh suasana basa pada pH 8. Setelah itu untuk dapat memperoleh alkaloid dalam bentuk basa, perlu dilakukan penarikan dengan pelarut kloroform. Jumlah kloroform yang digunakan sebanyak 3 kali volume ekstrak. Campuran tersebut dikocok selama 15 menit dengan menggunakan corong pisah.

Setelah dikocok campuran didiamkan sampai terlihat adanya pemisahan. Setelah terlihat pemisahannya, fase kloroform yang ada pada bagian bawah ditampung. Hal ini dilakukan karena alkaloid base akan tertarik pada pelarut kloroform. Hasil tampungan fase kloroform, kemudian dipekatkan dengan menggunakan rotavapor. Ekstrak kental yang dihasilkan dari rotavapor tersebut lalu diuapkan sampai diperoleh ekstrak yang kering.

Ekstrak  $\text{CHCl}_3$  yang kering sebanyak a gram dilarutkan dengan kloroform sebanyak 20 kali berat ekstrak, lalu dikocok dengan etanol 90 % (mengandung asam tartrat 1 %) sebanyak  $\frac{1}{2}$  kali volume kloroform, selama 15 menit dengan corong pisah. Kemudian ditambahkan air dengan volume yang sama dengan kloroform, dikocok lagi selama 5 menit. Setelah itu didiamkan sampai fase kloroform dan fase etanol memisah. Fase etanol diambil, dan langkah diatas diulangi sebanyak dua kali sampai alkaloid tertarik sempurna dalam fase etanol. Fase etanol yang didapatkan, kemudian dilakukan isolasi dengan pembasaan.

Fase etanol dibasakan dengan  $\text{NH}_4\text{OH}$  2,5 % sampai didapatkan pH 8. Kemudian diekstraksi dengan kloroform, dengan volume yang sama, dikocok selama 15 menit, didiamkan sampai fase etanol dan kloroform memisah. Fase

kloroform diambil dan langkah diatas diulangi sebanyak dua kali sampai alkaloid tertarik sempurna dalam fase kloroform. Fase kloroform yang didapatkan kemudian dilakukan isolasi kembali dengan pengasaman seperti langkah diatas (dimulai dengan penambahan etanol 90% yang mengandung asam tartrat 1 %).

Proses pengasaman dan pembasaan tersebut diulangi lagi sebanyak dua kali sampai didapatkan fraksi kloroform yang mengandung alkaloid dengan jumlah pengotor yang lebih sedikit, kemudian dilakukan fraksinasi dengan kromatografi kolom terbuka

#### **4.3.2 Metode Fraksinasi dengan Kromatografi Kolom Terbuka**

Cara kerja:

1. Ditimbang silika gel 60 Merck (63 - 200 $\mu$ m) sebanyak 10 g. Diambil eluen Kloroform - etanol (8,5 : 1,5) sebanyak 3 kali dari jumlah silika.
2. Silika gel masukkan labu erlenmeyer, tambahkan eluen, dikocok selama 15 menit
3. Silika gel dan eluen tersebut dituangkan ke dalam kolom.
4. Eluen dituangkan ke dalam kolom sampai penuh, ditutup dengan aluminium foil, dibiarkan semalam. Jumlah eluen yang digunakan harus tetap terukur.
5. Ditimbang fraksi alkaloid hasil pengasaman dan pembasaan sebanyak 1-2 % dari jumlah silika gel yang digunakan. Lalu ekstrak dilarutkan dengan pelarut organik secukupnya kemudian dicampur dengan silika, dicampur sampai homogen dan kering.
6. Eluen dialirkan sampai permukaannya 0,5 cm di atas permukaan silika gel. Diukur jumlah volume kolom = volume eluen mula-mula - volume eluen yang sudah dialirkan.
7. Fraksi alkaloid yang sudah dikeringkan dengan silika gel dimasukkan ke dalam kolom (di atas permukaan silika gel) lalu ditambahkan eluen kira-kira setinggi 3 cm. Kemudian di atasnya diberi silika kering setinggi 2 cm dan kertas saring
8. Ditambahkan eluen yang pertama. Dilakukan penetesan dengan kecepatan 1 tetes per detik. Ditampung dalam vial-vial tiap volume tertentu.

9. Dilakukan identifikasi alkaloid terhadap fraksi-fraksi yang dihasilkan dengan menggunakan uji KI.T. Fraksi-fraksi yang mengandung alkaloid dikelompokkan dan dimurnikan dengan kromatografi preparatif.

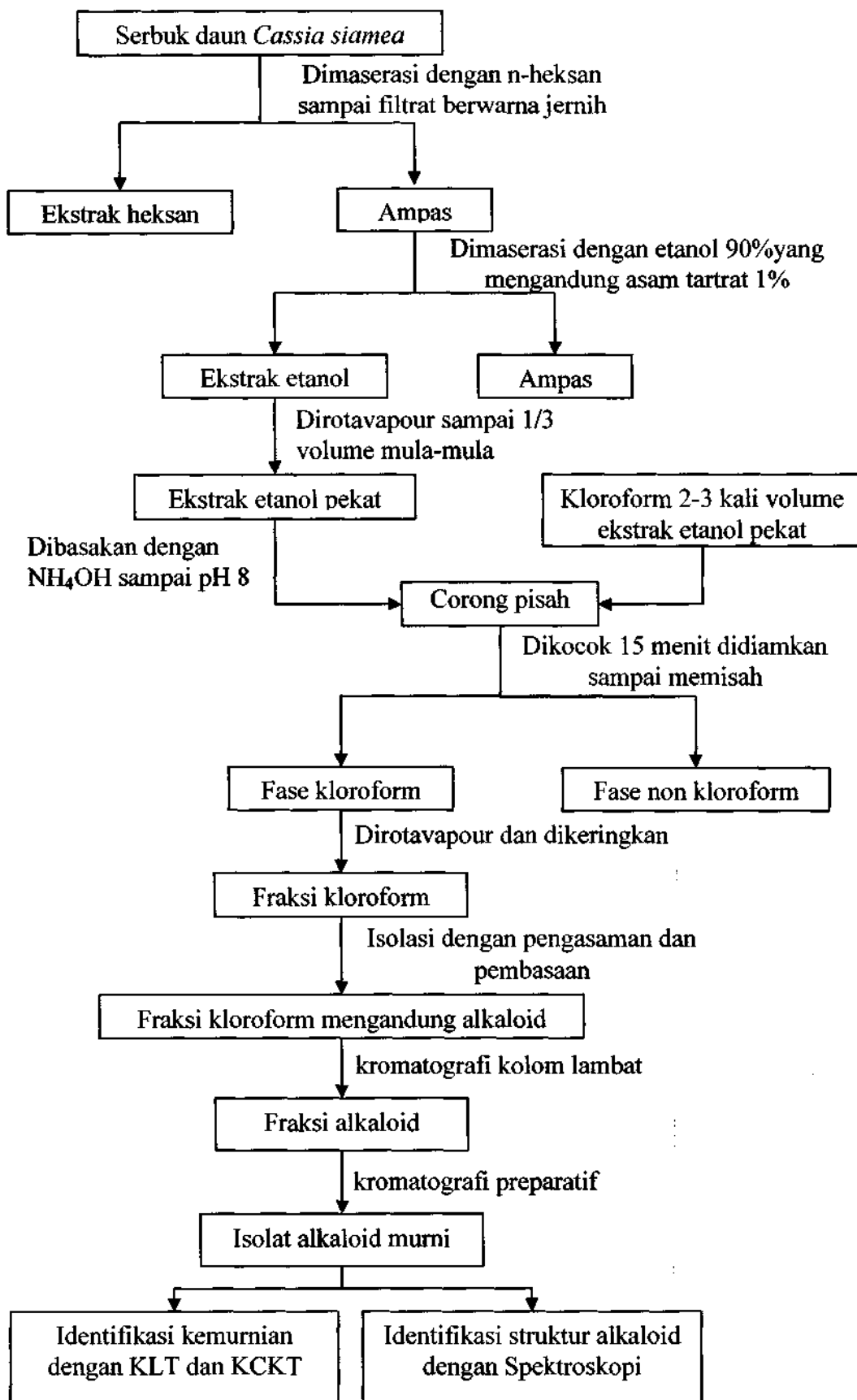
#### **4.3.3 Isolasi dengan kromatografi preparatif**

Fase diam : Silika gel 60 F 254 Merck

Fase gerak : Kloroform : etanol = 8,5 : 1,5

Cara Kerja :

1. Kurang lebih 50 mg cuplikan dilarutkan dengan etanol-kloroform (1:1) sampai larut, kemudian ditotolkan berupa garis pada salah satu sisi plate preparatif setinggi 2 cm dari bawah.
2. Membuat fase gerak kloroform : etanol (8,5: 1,5), kemudian dimasukkan ke dalam bejana pengembang (chamber), ditunggu sampai jenuh.
3. Setelah jenuh, plate preparatif dimasukkan ke dalam chamber, dan dluasi sampai mencapai garis batas atas
4. Lalu plate preparatif dilihat dibawah lampu uv, noda alkaloid yang berbentuk pita ditandai dan dikerok. Hasil kerokan tersebut lalu dialiri dengan eluen kloroform-etanol (8,5 : 1,5) sebanyak 30 ml dalam tabung penyaring. Setelah itu dikeringkan sampai didapatkan isolat alkaloid kering.



Gambar 4.1 Skema isolasi dan identifikasi alkaloid dari daun *Cassia siamea*

#### 4.3.4 Identifikasi senyawa alkaloid

##### 4.3.4.1 Reaksi Pengendapan

Senyawa yang telah dilarutkan dengan pelarut yang sesuai, kemudian ditambahkan dengan pereaksi untuk alkaloid, yaitu pereaksi Dragendorf, Mayer, Wagner, Bauchardat.

##### 4.3.4.2 Identifikasi dengan Kromatografi Lapis Tipis

Fase diam : Silika gel 60 F 254 Merck

Fase gerak :  $\text{CHCl}_3$  : Etil asetat : Metanol (2 : 1 : 1)

$\text{CHCl}_3$  : Etanol (8 : 2)

Etil asetat : Metanol : Air (16,2 : 2,2 : 1,6)

Penampak Noda : Pereaksi Dragendorf, apabila timbul noda berwarna merah jingga, menunjukkan adanya senyawa alkaloid

##### 4.3.3.3 Identifikasi Kemurnian dengan Kromatografi Cair Kinerja Tinggi (KCKT)

Ditimbang 1 mg bahan, kemudian dilarutkan dalam metanol pro KCKT sampai 0,5 ml, kemudian diultrasonik selama 15 menit. Disuntikkan ke dalam kolom sebanyak 0,20  $\mu\text{l}$ .

##### 4.3.4.4 Identifikasi dengan Spektrofotometer UV-Vis

Sebanyak 1 mg isolat alkaloid dilarutkan dengan metanol p.a dalam labu ukur 10 ml sampai tanda batas. Setelah dilakukan koreksi terhadap pelarut, isolat alkaloid yang telah dilarutkan dengan metanol p.a dimasukkan ke dalam kuvet sampel, Kemudian diamati panjang gelombang maksimumnya pada 200-400 nm

##### 4.3.4.5 Identifikasi dengan Spektrometer Infra Merah

Sebanyak 1 mg isolat alkaloida dicampur dengan KBr bebas air, kemudian digerus dalam lumpang agate sampai homogen. Campuran ditekan dengan alat penekan hidrolik khusus (tekanan 6-7 ton) hingga terbentuk lempeng bulat transparan. Kemudian dilihat serapan IR pada daerah 400-4000  $\text{cm}^{-1}$  dengan Spektrometer Infra Merah

#### **4.3.3.6 Identifikasi dengan Spektrometer Resonansi Magnetik Inti (RMI)**

Sebanyak 5 mg isolat alkaloid dilarutkan dalam 0,5 ml methanol-D<sub>4</sub>, dimasukkan dalam tabung RMI dengan diameter 5 mm. Pada penentuan spektrum <sup>1</sup>H RMI ditambahkan Tetrametilsilana (TMS) sebagai standar internal. Tabung diletakkan diantara magnet utara dan selatan, kemudian direkam.





## BAB V

# HASIL PENELITIAN DAN ANALISIS DATA

**BAB V**  
**HASIL PENELITIAN DAN ANALISIS DATA**

**5.1. Hasil Ekstraksi dan Fraksi Kloroform dari Daun *Cassia siamea***

Daun *Cassia siamea* yang masih segar, dibersihkan terlebih dahulu kemudian dikeringkan dan diserbuk. Sebanyak 2,3 kg serbuk daun yang didapatkan, kemudian dilakukan maserasi dengan pelarut n-Heksan dengan volume perendaman  $\pm$  4,5 liter sebanyak 35 kali sampai filtrat berwarna jernih. Dari hasil maserasi dengan pelarut n- Heksan tersebut, didapatkan ekstrak n-Heksan sebanyak 388 gram.

Ampas daun yang sudah kering sebanyak 1.876 kg, kemudian diekstraksi lagi dengan menggunakan pelarut etanol 90 % yang mengandung asam tartrat 1 % sebanyak 10 kali. Hasil yang diperoleh kemudian dipekatkan dengan menggunakan rotavapor sampai kira-kira 1/3 – 1/4 dari volume semula. Ekstrak etanol pekat, kemudian dibasakan dengan menggunakan NH<sub>4</sub>OH 2,5 % sampai diperoleh pH 8. Selanjutnya dilakukan ekstraksi cair-cair dengan menggunakan pelarut CHCl<sub>3</sub>, dan didapatkan dua fase yaitu fase etanol di bagian atas dan fase kloroform di bagian bawah. Fase kloroform yang ada di bagian bawah, kemudian ditampung dan dikeringkan, sehingga didapatkan fraksi kloroform pekat sebanyak 97 gram. Diambil Fraksi kloroform sebanyak 4 gram, kemudian dilakukan pengasaman dan pembasaan secara berulang-ulang, masing-masing sebanyak tiga kali, sehingga didapatkan fraksi kloroform yang mengandung pengotor lebih sedikit sebanyak 161,8 mg

No.	Bahan	Warna	Berat	%
1	Serbuk Daun Johar	Coklat	2.3 kg	-
2	Ekstrak n-heksana	Hitam	388 gram	16,87
3	Ekstrak Kloroform	Hitam	97 gram	4,2
4	Fraksi kloroform hasil pengasaman dan pembasaan (Dari 4 g Ekstrak Kloroform)	Coklat tua	161,8 mg	0,17

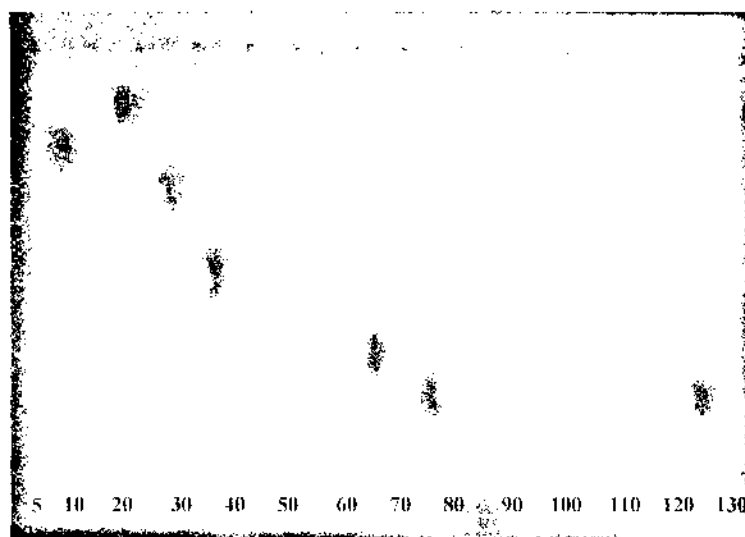
Tabel 5.1. Hasil Pembuatan Fraksi kloroform untuk Isolasi Alkaloid

### 5.2. Hasil Fraksinasi Alkaloid dengan Kromatografi Kolom Lambat

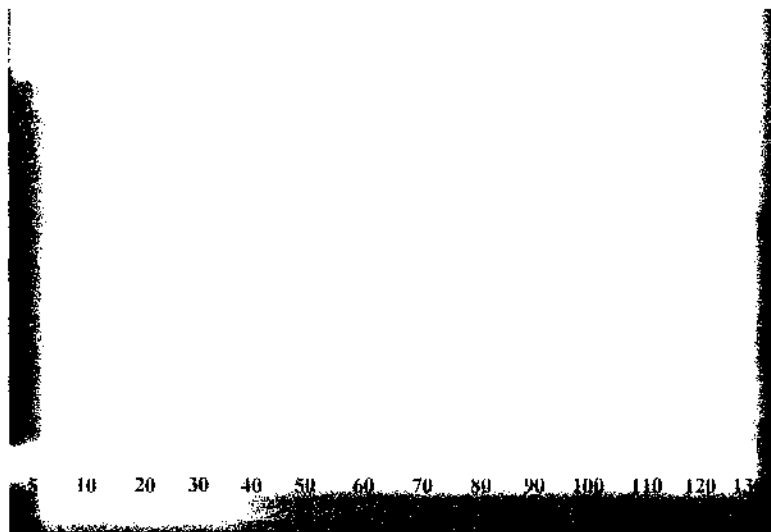
Fraksi Kloroform yang didapatkan dari hasil pengasaman dan pembasaan sebanyak 161,8 mg, kemudian difraksinasi dengan menggunakan Kromatografi kolom lambat dengan menggunakan fase gerak terpilih, yaitu Kloroform : etanol = 8,5 : 1,5. Fraksi-fraksi yang dihasilkan dari kromatografi kolom lambat, selanjutnya dikelompokkan berdasar profil KLTnya sehingga diperoleh tiga macam fraksi yang positif alkaloid.

No	FRAKSI	JUMLAH (mg)
1	31 - 44	35,5
2	45 - 59	41,6
3	80 - 130	20,4

Tabel 5.2. Hasil Penggabungan Fraksi positif alkaloid dari hasil Kromatografi Kolom Lambat



Gambar 5.1 Hasil KLT Kromatografi Kolom dengan fase gerak kloroform : Etanol ( 8,5 : 1,5 ) pada panjang gelombang 365 nm



Gambar 5.2 Hasil KLT Kromatografi Kolom dengan fase gerak kloroform : Etanol ( 8,5 : 1,5 ) pada panjang gelombang 254 nm

5 10 20 30 40 50 60 70 80 90 100 110 120 130

Gambar 5.3 Hasil KLT Kromatografi Kolom dengan fase gerak kloroform : Etanol ( 8,5:1,5 ) dengan penampak noda pereaksi Dragendorff

### 5.3. Hasil Isolasi Alkaloid dengan Kromatografi Preparatif

Dari ketiga macam fraksi yang positif alkaloid, yaitu fraksi 31 - 44, fraksi 45 - 59 dan fraksi 80 - 130 kemudian dilakukan isolasi dengan kromatografi preparatif. Untuk fraksi ke 31 - 44 dan fraksi ke 45 - 59, digunakan fase gerak kloroform : etanol (8,5 : 1,5) ; sedangkan fraksi ke 80 - 130 digunakan fase gerak etil asetat : metanol (7 : 3). Pada fraksi ke 31 - 44 dan fraksi ke 45 - 59 didapatkan isolat alkaloid dengan harga R<sub>f</sub> yang sama, yaitu 0,25 ( Kloroform : etanol = 8,5 : 1,5 ), sehingga kedua isolat tersebut kemudian dijadikan satu. Sedangkan

pada fraksi 80 - 130 didapatkan isolat alkaloid dengan harga  $R_f = 0,17$  ( Kloroform : etanol = 8,5 : 1,5 ). Gabungan antara fraksi ke 31 - 44 dan fraksi ke 45 - 59 untuk selanjutnya disebut isolat A dan fraksi ke 80 -130 untuk selanjutnya disebut isolat B. Dari hasil isolasi dengan kromatografi preparatif, didapatkan isolat A sebanyak 11,5 mg (0,012 % dari serbuk daun) dan isolat B sebanyak 1,4 mg (0,0015 % dari serbuk daun).

#### **5.4. Identifikasi Senyawa Alkaloid Hasil Kromatografi Preparatif**

##### **5.4.1. Identifikasi Alkaloid Dengan Reaksi Pengendapan**

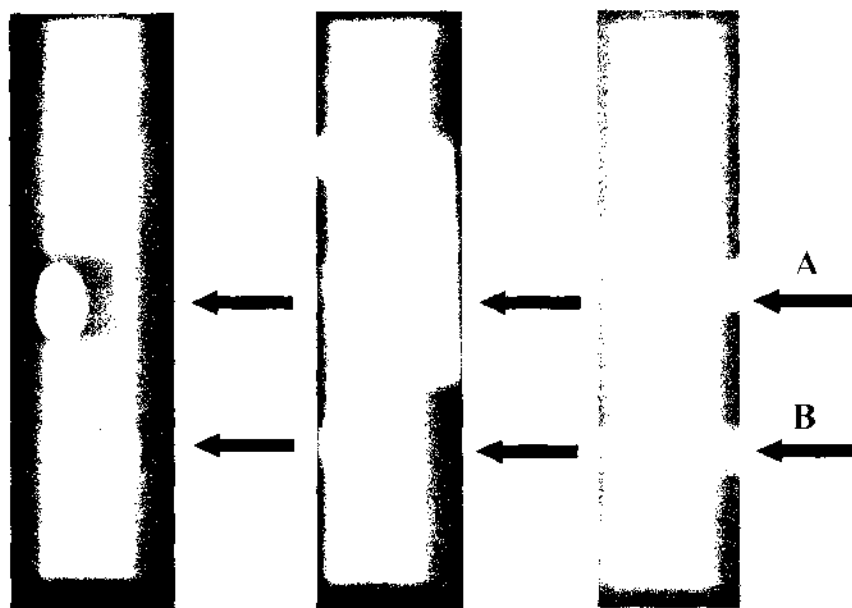
Senyawa alkaloid hasil isolasi dilarutkan, kemudian ditambahkan dengan reagen pengendapan. Hasil yang diperoleh pada isolat A dan isolat B adalah sebagai berikut :

- Pereaksi Dragendorf : Timbul endapan merah jingga
- Pereaksi Mayer : Timbul endapan putih
- Pereaksi Wagner : Timbul endapan merah kecoklatan
- Pereaksi Bouchardat : Timbul endapan merah kecoklatan

##### **5.4.2. Identifikasi Alkaloid Dengan Kromatografi Lapis Tipis**

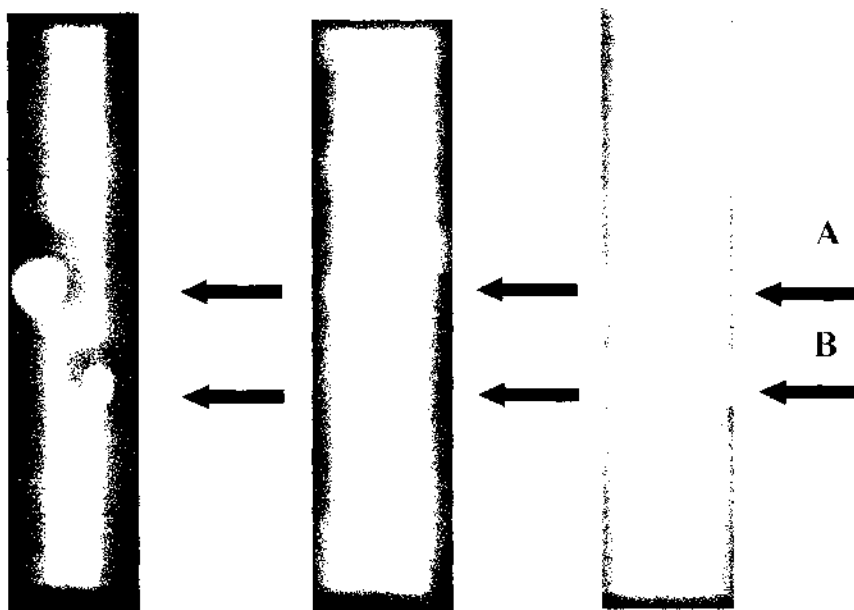
Isolat A dan B masing-masing dilakukan KLT dengan 3 macam fase gerak yang berbeda. Adapun hasil identifikasi isolat Alkaloid dengan Kromatografi Lapis Tipis dapat dilihat pada gambar 5.4, gambar 5.5 dan gambar 5.6

**A. KLT dengan Fase Gerak Kloroform : Etanol (8 : 2)**

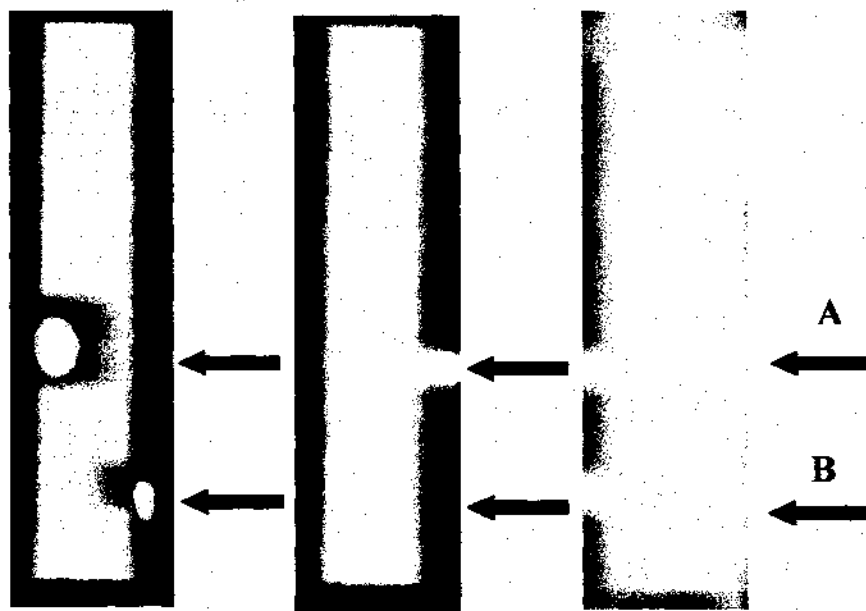


Gambar 5.4. KLT senyawa hasil isolasi dengan fase gerak Kloroform : Etanol (8 : 2) pada panjang gelombang 365 nm, 254 nm dan penampak noda Dragendorff.

**B. KLT dengan Fase Gerak Kloroform : Etil Asetat : Metanol (2 : 1 : 1)**



Gambar 5.5. KLT senyawa hasil isolasi dengan fase gerak Kloroform : Etil-Asetat : Metanol ( 2 : 1 : 1 ) pada panjang gelombang 365 nm, 254 nm dan penampak noda Dragendorff.

**C. KLT dengan Fase Gerak Etil Asetat : Metanol : Air ( 16,2 : 2,2 : 1,6 )**

Gambar 5.6. KLT senyawa hasil isolasi dengan fase gerak Etil Asetat : Metanol : Air ( 16,2 : 2,2 : 1,6 ) pada panjang gelombang 365 nm, 254 nm dan penampak noda Dragendorff

**Keterangan Gambar :**

A : Isolat A

B : Isolat B

Jenis Isolat	Fase Gerak	Harga Rf	Pengamatan Warna Noda		
			UV		Dragendorf
			254 nm	365 nm	
Isolat A	CHCl <sub>3</sub> : Etanol ( 8 : 2 )	0,45	Biru gelap	Biru	Jingga
	CHCl <sub>3</sub> : Etil asetat : Metanol ( 2 : 1 : 1 )	0,47	Biru gelap	Biru	Jingga
	Etil Asetat : Metanol : Air ( 16,2 : 2,2 : 1,6 )	0,37	Biru gelap	Biru	Jingga
Isolat B	CHCl <sub>3</sub> : Etanol ( 8 : 2 )	0,14	Biru muda gelap	Hijau muda	Jingga
	CHCl <sub>3</sub> : Etil asetat : Metanol : ( 2 : 1 : 1 )	0,28	Biru muda gelap	Hijau muda	Jingga
	Etil Asetat : Metanol : Air ( 16,2 : 2,2 : 1,6 )	0,02	Biru muda gelap	Hijau muda	Jingga

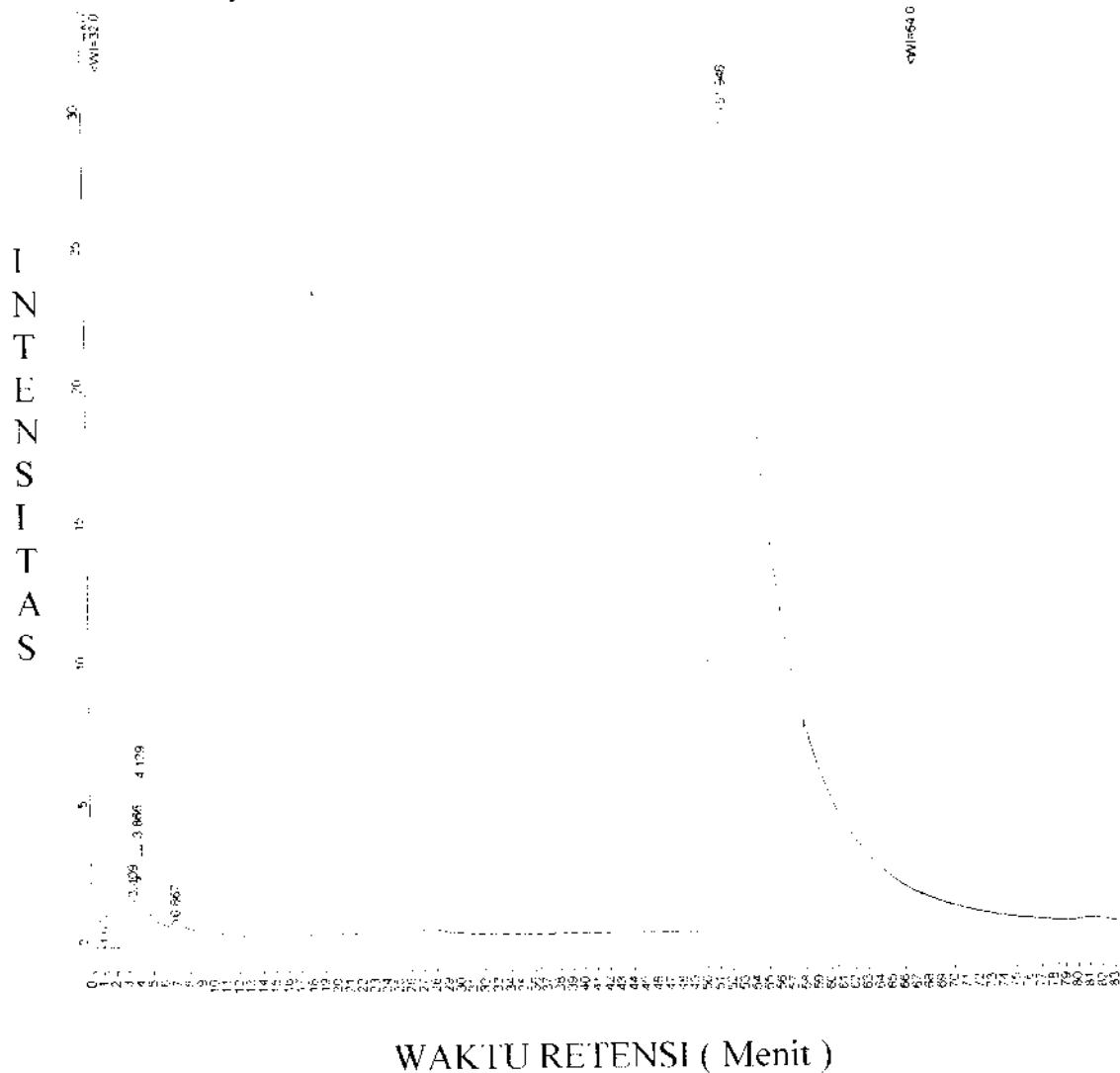
Tabel 5.3. Hasil Identifikasi Isolat Alkaloid dengan KLT Fase Diam silika gel 60 F 254

#### 5.4.3. Identifikasi Kemurnian dengan Kromatografi Cair Kinerja Tinggi (KCKT)

Profil kromatogram Isolat A menggunakan KCKT dengan kondisi sebagai berikut :

- Pelarut pengembang = Metanol : Dapar Phospat 0,005 M ( 34 : 66 ), pH = 5,5
- Pemantauan dilakukan pada : Sinar UV 254 nm
- Instrumen : HPLC Varian
- Kolom : RP 8
- Kecepatan aliran : 10.00 Hz, isokratik





Peak No.	Time (min)	Area	Area (%)	Area (Normalized)	Identifikasi	Asam Lemak
1	1.495	11.377	0.03	0.88	BP	11.12
2	3.886	41.209	0.12	1.280	DV	31.11
3	4.109	8.100	0.02	0.607	UV	1.12
4	11.946	61.129	0.17	6.426	VE	1.12
5	11.946	61.129	0.17	6.426	BP	1.12
6	11.946	11.946	0.03	1.12	BP	1.12
Totals:		36.800	0.10	3.320123		

Gambar 5.7. Profil Kromatogram KCKT dari isolat A pada panjang gelombang 254 nm

#### 5.4.4. Identifikasi dengan Spektrofotometri UV- Vis

1 mg isolat A dilarutkan dengan metanol p.a. dalam labu ukur 10 ml sampai tanda batas, kemudian dimasukkan dalam kuvet sampel dan diukur panjang gelombang maksimumnya pada 200-400 nm. Adapun hasil yang didapat adalah sebagai berikut :

Jenis Isolat	$\lambda_{\max}$ ( nm )
Isolat Alkaloid A	253,8; 269

Tabel 5.4. Hasil pengukuran  $\lambda_{\max}$  dari isolat A

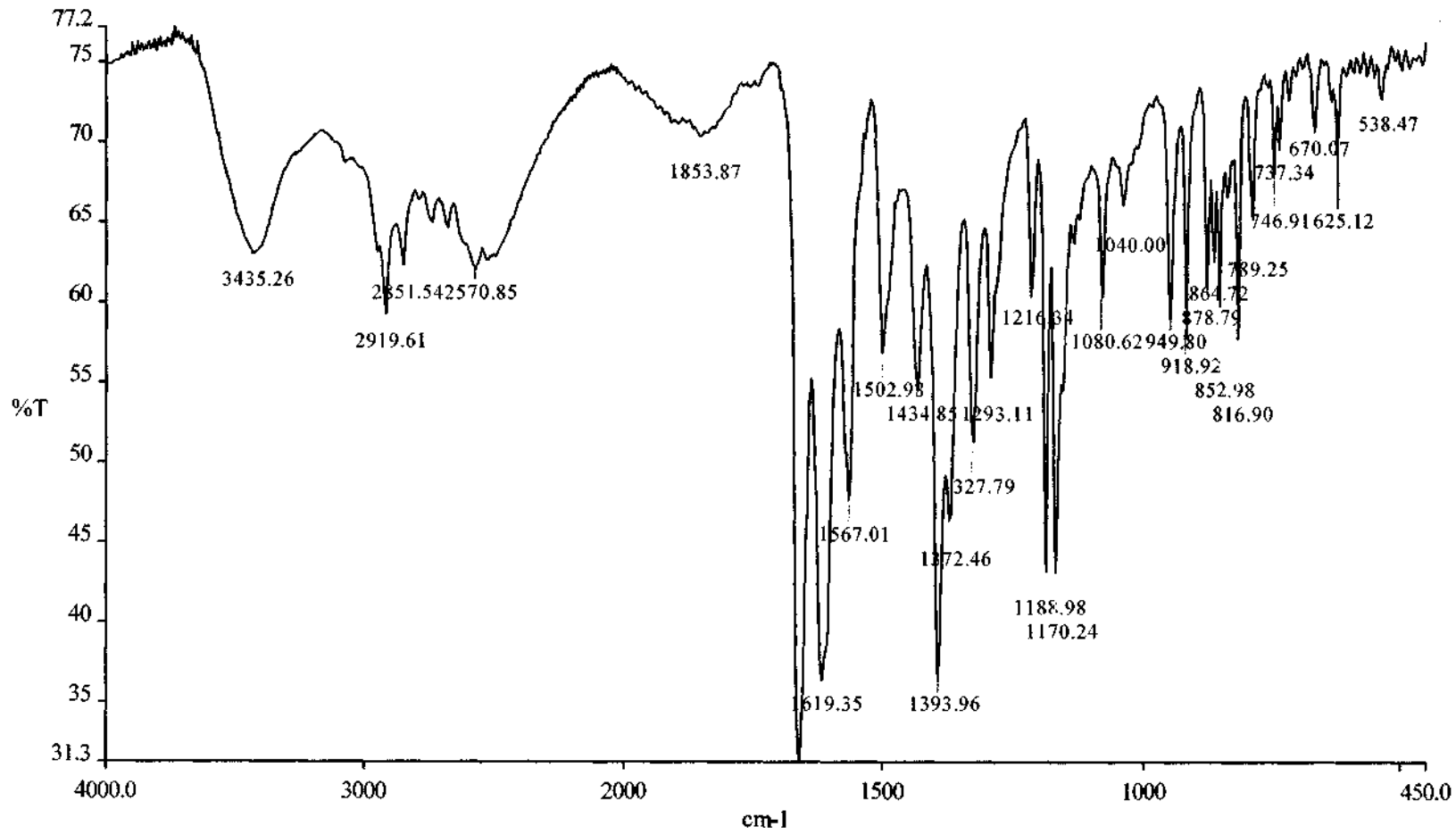
#### 5.4.5. Identifikasi dengan Spektrometer Infra Merah

Spektrum Infra Merah dari Isolat A dapat dilihat pada gambar 5.9. Sedangkan untuk isolat B tidak dilakukan, dikarenakan jumlah sampel yang sedikit. Hasil identifikasi dengan Spektrometer Infra Merah dari isolat A dapat dilihat di tabel 5.5

Spektrum Infra Merah	Bilangan Gelombang ( $\text{cm}^{-1}$ )	
	Isolat A	Pustaka *)
Vibrasi ulur O-H	3435,26	3000 - 3700
Vibrasi ulur C-O	1188,98 dan 1170,24	1050 - 1260
Vibrasi ulur -C=C- aromatis	1619,35	1650 - 1450
Vibrasi ulur C-N aromatis	1327,7 dan 1393,96	1266 - 1342
Vibrasi ulur C-H	2919,61 dan 2851,54	2800 - 3000
Vibrasi tekuk aromatis luar bidang	852,98 dan 816,90	675-900

Tabel 5.5. Hasil spektrum Infra Merah dari isolat A

Gambar 5.9. Spektrum Infra Merah dari Isolat A



#### 5.4.6. Identifikasi dengan Spektrometer Resonansi Magnetik Inti (RMI)

Pada hasil identifikasi dengan Spektrometer Resonansi magnetik inti ( $^1\text{H-RMI}$ ) 800 MHz didapatkan hasil sebagai berikut :

Daerah Pergeseran kimia / $\delta$ (ppm)	Interpretasi
2,3479; 2,2115; 2,1966	Proton dari gugus metil
6,7149; 6,4811; 6,4788; 6,4610; 6,4582. 6,0382	Proton aromatis
7,6002	Proton dari OH fenolik

Tabel 5.6. Hasil spektrum  $^1\text{H-RMI}$  dari isolat A

Spektrum Resonansi Magnetik Inti dari Isolat A dapat dilihat pada gambar 5.10. Sedangkan untuk isolat B tidak dilakukan identifikasi dengan spektrometri RMI dikarenakan jumlah sampel yang sedikit.



## BAB VI

### PEMBAHASAN

*Cassia siamea* adalah salah satu jenis tanaman yang telah banyak dimanfaatkan sebagai obat tradisional. Di kalangan masyarakat, tanaman ini banyak dimanfaatkan sebagai obat malaria, obat cacing, tonikum serta untuk menghilangkan gatal-gatal dan penyakit kulit (Heyne, 1987). Penggunaan daun *Cassia siamea* sebagai obat untuk malaria telah banyak diteliti, mengingat banyak terjadi resistensi terhadap obat anti malaria modern. Kandungan utama dari daun *Cassia siamea* yang diduga memiliki aktivitas antimalaria, salah satunya adalah senyawa alkaloid. Pada penelitian sebelumnya, uji aktivitas antimalaria fraksi alkaloid daun *Cassia siamea* secara *in vitro* dan *in vivo* memberikan hasil yang positif. Ekasari (2001) melakukan uji aktivitas antimalaria secara *in vitro* dari fraksi kloroform yang positif alkaloid dan didapatkan  $IC_{50}$  sebesar 2,41  $\mu\text{g/ml}$ . Kemudian dilanjutkan dengan Puspadina (2005) yang meneliti tentang aktivitas fraksi alkaloid total hasil isolasi dari daun *Cassia siamea* terhadap *Plasmodium berghei* secara *in vivo* dan didapatkan harga  $ED_{50}$  sebesar 0,2529 mg/kg BB.

Berdasarkan pada penelitian yang dilakukan oleh El Sayyad (1984), pada daun *Cassia siamea* ditemukan empat macam alkaloid yang mempunyai inti isoquinolina, yaitu alkaloid siamin, siaminin A, siaminin B dan siaminin C dengan total kandungan alkaloid mencapai 0,17 %. Pada proses isolasi yang dilakukan oleh El Sayyad, digunakan pelarut benzena yang tergolong pelarut yang sangat toksik dan berbahaya. Oleh karena itu pada penelitian kali ini, dilakukan isolasi dan identifikasi senyawa alkaloid dari daun *Cassia siamea* yang mengacu pada metode isolasi yang dilakukan oleh El Sayyad dengan menggunakan berbagai modifikasi yang sesuai untuk isolasi alkaloid.

Mula-mula daun *Cassia siamea* (daun johar) yang digunakan sebagai bahan penelitian diambil dari Purwodadi dalam bentuk daun segar selanjutnya dicuci bersih, dikeringkan dengan oven pada suhu  $40^{\circ}\text{C}$  kemudian diserbuk. Tujuan penyerbukan atau pengecilan ukuran partikel ini adalah untuk meningkatkan luas permukaan sehingga mempercepat tercapainya keseimbangan

dalam ekstraksi . Serbuk daun yang diperoleh lalu diekstraksi dengan pelarut n-heksana sampai filtrat berwarna jernih. Tujuan ekstraksi ini adalah untuk menarik kandungan lemak dan senyawa yang bersifat non polar lainnya yang mungkin dapat mengganggu pada proses isolasi selanjutnya. Kemudian serbuk diekstraksi lagi dengan etanol 90 % yang mengandung 1 % asam tartrat, hal ini ditujukan agar alkaloid dalam bentuk basa berubah menjadi bentuk garam sehingga dapat diekstraksi dari tumbuhan dengan menggunakan pelarut polar seperti etanol. Hasil ekstraksi tersebut kemudian diuapkan dengan rotavapor sehingga volume menjadi seperempatnya. Selanjutnya ekstrak etanol pekat ini dibasakan dengan menggunakan  $\text{NH}_4\text{OH}$  2,5% sampai diperoleh pH 8. Penambahan  $\text{NH}_4\text{OH}$  sampai diperoleh pH 8 dimaksudkan untuk mendapatkan alkaloid agar dapat kembali menjadi bentuk basanya sehingga akan larut dalam pelarut yang semipolar seperti kloroform. Tahap selanjutnya adalah melakukan ekstraksi cair-cair terhadap ekstrak etanol pekat yang sudah dibasakan dengan menggunakan pelarut kloroform. Fraksi kloroform ditampung kemudian dikeringkan. Total didapat fraksi kloroform seberat 97 gram (4,216% dari serbuk daun awal).

Tahapan selanjutnya adalah proses pemurnian dengan ekstraksi cair-cair yang menggunakan etanol 90 % yang mengandung asam tartrat 1 % (pH = 5) dan pembasaan dengan menggunakan  $\text{NH}_4\text{OH}$  2,5 % (pH = 8), diikuti ekstraksi dengan pelarut organik (kloroform) secara berulang (3 kali). Tujuan dari proses ini adalah untuk memisahkan positif palsu, seperti protein, dari senyawa alkaloid karena protein dapat mengganggu dalam proses identifikasi alkaloid. Selain itu, juga untuk mendapatkan fraksi kloroform yang lebih murni mengandung alkaloid dari fraksi kloroform sebelumnya.

Kemudian agar didapatkan senyawa alkaloid yang lebih murni dan terpisah dari senyawa lainnya, maka dari fraksi kloroform hasil pengasaman dan pembasaan tersebut dilakukan pemisahan lebih lanjut secara kromatografi kolom lambat dengan menggunakan fase gerak terpilih yaitu kloroform : etanol dengan perbandingan 8,5 : 1,5. Pemilihan fase gerak tersebut berdasarkan hasil orientasi dengan KLT , yang memberikan hasil pemisahan yang baik. Eluat kemudian ditampung tiap 1 ml dan fraksi-fraksi yang dihasilkan dari kromatografi kolom



lambat, selanjutnya dikelompokkan berdasar profil KLTnya sehingga diperoleh tiga macam fraksi yang positif alkaloid yaitu fraksi 31 - 44, fraksi 45 - 59 dan fraksi 80 - 130.

Dari fraksi-fraksi tersebut, kemudian dilakukan pemurnian lebih lanjut dengan kromatografi preparatif. Pada fraksi ke 31 - 44 dan fraksi ke 45 - 59 digunakan fase gerak kloroform : etanol (8,5 : 1,5). Sedangkan pada fraksi ke 80 - 130 tidak digunakan fase gerak tersebut, dikarenakan noda tidak terpisah dengan baik. Setelah dilakukan orientasi fase gerak, ternyata etil asetat : metanol (7 : 3) memberikan pemisahan yang lebih baik, sehingga fase gerak tersebut digunakan untuk kromatografi preparatif dari fraksi ke 80 - 130.

Pada fraksi ke 31 - 44 dan fraksi ke 45 - 59 didapatkan isolat alkaloid dengan harga Rf yang sama, yaitu 0,25 ( Kloroform : etanol = 8,5 : 1,5 ), sehingga kedua isolat tersebut kemudian dijadikan satu dan untuk selanjutnya disebut isolat A. Sedangkan pada fraksi 80 - 130 didapatkan isolat alkaloid dengan harga Rf = 0,17 dan untuk selanjutnya disebut isolat B. Dari hasil kromatografi preparatif, didapatkan isolasi A sebanyak 11,5 mg (0,012 % dari serbuk daun) dan isolat B sebanyak 1,4 mg (0,0015 % dari serbuk daun). Karena jumlah sampel B yang terbatas, maka untuk identifikasi hanya dilakukan pada reaksi pengendapan dan KLT dengan tiga fase gerak yang berbeda.

Selanjutnya pada senyawa hasil isolasi dengan kromatografi preparatif ini, dilakukan identifikasi dengan reaksi pengendapan menggunakan pereaksi Dragendorff yang menimbulkan endapan berwarna merah jingga dan pereaksi Mayer yang menimbulkan endapan berwarna putih. Pengendapan dengan kedua reagen ini terjadi karena adanya reaksi dengan bentuk tidak larut dari nitrogen alkaloid membentuk kompleks dengan logam berat reagen yang mengandung garam. Sedangkan reaksi pengendapan dengan menggunakan pereaksi Wagner menimbulkan endapan berwarna merah kecoklatan dan pereaksi Bouchardart yang juga menimbulkan endapan berwarna merah kecoklatan. Terjadinya pengendapan dikarenakan kedua reagen ini bereaksi dengan alkaloid sebagai kompleks yang lemah, menjadi bentuk presipitasinya (Ekasari, 2001).

Untuk identifikasi kemurnian, digunakan metode KLT dengan berbagai macam fase gerak dan KCKT. Pada uji KLT dengan menggunakan berbagai

macam fase gerak, kemudian dilakukan pengamatan pada lampu UV dengan panjang gelombang 254 dan 365 nm, serta dengan penampak noda Dragendorf. Hasil yang didapatkan, untuk fase gerak  $\text{CHCl}_3$  : Etanol ( 8 : 2 ) pada isolat A didapatkan noda tunggal dengan  $R_f = 0,45$  dan isolat B didapatkan noda tunggal dengan harga  $R_f = 0,14$ ; fase gerak  $\text{CHCl}_3$  : Metanol : Etil asetat ( 2 : 1 : 1 ) pada isolat A didapatkan noda tunggal dengan  $R_f = 0,47$  dan isolat B didapatkan noda tunggal dengan harga  $R_f = 0,28$ ; fase gerak Etil asetat : Metanol : Air ( 16,2 : 2,2 : 1,6 ) pada isolat A didapatkan noda tunggal dengan  $R_f = 0,37$  dan isolat B didapatkan noda tunggal dengan harga  $R_f = 0,02$ . Dengan penampak noda Dragendorf, semua noda tersebut berwarna jingga yang menunjukkan noda alkaloid. Pada identifikasi kemurnian dengan KCKT, Isolat A didapatkan puncak dengan waktu tambat (Retention time /  $t_R$ ) = 51,946 menit dan tingkat kemurnian sebesar 97,6752 %. Hal ini menandakan bahwa metode isolasi yang digunakan dapat menghasilkan isolat dengan tingkat kemurnian yang cukup tinggi. Dari hasil identifikasi dengan menggunakan reaksi pengendapan dan KLT, maka dapat disimpulkan bahwa isolat A dan isolat B adalah senyawa alkaloid.

Pada penentuan panjang gelombang maksimum ( $\lambda_{\text{maks}}$ ) dengan spektrofotometer UV-Vis, isolat A memberikan serapan maksimum pada dua panjang gelombang, yaitu pada 269 nm dan 253,8 nm. Senyawa hasil isolasi tersebut kemudian juga dianalisa dengan menggunakan spektrometer Infra Merah. Hasil spektrum Infra Merah dari isolat A memperlihatkan puncak yang intensif pada  $3435,26 \text{ cm}^{-1}$  yang menunjukkan adanya senyawa O-H (Fessenden, 1999). Puncak pada  $1327,79 \text{ cm}^{-1}$  dan  $1393,96 \text{ cm}^{-1}$  menunjukkan adanya gugus C-N aromatik. Adanya gugus C-O ditandai dengan puncak pada bilangan gelombang 1188,98 dan  $1170,24 \text{ cm}^{-1}$ . Sedangkan puncak pada 2919,61 dan  $2851,54 \text{ cm}^{-1}$  menunjukkan adanya gugus C-H. Adanya gugus aromatis ditandai dengan puncak pada  $1619,35 \text{ cm}^{-1}$  yang menunjukkan -C=C- aromatis serta adanya vibrasi tekuk aromatis luar bidang pada 852,98 dan  $816,90 \text{ cm}^{-1}$  (Fessenden, 1999).

Untuk hasil analisa dengan menggunakan spektrometer RMI hanya dilakukan analisa dengan metode spektrometri  $^1\text{H}$ -RMI karena keterbatasan bahan, waktu dan alat. Hasil identifikasi dengan spektrometer  $^1\text{H}$ -RMI didapatkan pergeseran kimia pada 2,3479; 2,2115; 2,1966 ppm yang menunjukkan proton

dari gugus metil. Sedangkan proton aromatis ditunjukkan pada pergeseran 6,7149; 6,4811; 6,4788; 6,4610; 6,4582, 6,0382 ppm dan proton dari OH fenolik ditunjukkan pada pergeseran 7,6002 ppm. Dari hasil identifikasi isolat A jika dibandingkan dengan alkaloid siaminin A, siaminin B dan siaminin C adalah sebagai berikut :

Hasil Identifikasi	Isolat A	Siaminin A	Siaminin B	Siaminin C
$\lambda_{maks}$	253,8; 269	244, 265, 286, 325, 350	230, 245, 252, 297, 337, 355	239, 255, 260, 315, 355
Spektrum infra merah ( $cm^{-1}$ )	Vibrasi ulur O-H (3435,26)	Vibrasi ulur O-H (3340-3400)	Vibrasi ulur O-H (3350-3400)	-
	-	Vibrasi ulur N-H (3340-3400)	Vibrasi ulur N-H (3340-3400)	-
	Vibrasi ulur C-O (1188,98 dan 1170,24)	-	-	-
	-	Vibrasi ulur C=O (1635)	Vibrasi ulur C=O (1630)	-
	Vibrasi ulur C=C aromatis (1619,35)	Vibrasi ulur C=C aromatis (1600)	Vibrasi ulur C=C aromatis (1600)	-
	Vibrasi ulur C-N aromatis (1327,7 dan 1393,96)	-	-	-
	Vibrasi ulur C-H (2919,61 dan 2851,54)	Vibrasi ulur C-H (3000)	Vibrasi ulur C-H (3050)	-
	Vibrasi tekuk aromatis luar bidang (852,98 dan 816,90)	Vibrasi tekuk aromatis luar bidang (840)	Vibrasi tekuk aromatis luar bidang (840 dan 910)	-

Hasil Identifikasi	Isolat A	Siaminin A	Siaminin B	Siaminin C
Spektrum NMR	proton dari gugus metil (2,3479; 2,2115; 2,1966)	proton dari gugus metil (2,17; 2,28)	-	-
	proton aromatis (6,7149; 6,4811; 6,4788; 6,4610; 6,4582, 6,0382)	proton aromatis (6,45; 6,48)	proton aromatis (6,75; 6,8; 6,96)	-
	Proton dari OH fenolik (7,6002)	-	-	-
	-	Proton dari N-H aromatis (11,20)	Proton dari N-H aromatis (11,22)	-

Tabel 6.1. Hasil identifikasi isolat A dibandingkan dengan alkaloid siaminin A, siaminin B dan siaminin C

Dari hasil identifikasi diatas, dapat dijelaskan bahwa isolat A adalah senyawa alkaloid , tetapi bukan termasuk dari alkaloid siaminin (siaminin A, siaminin B dan siaminin C) yang telah diisolasi oleh El Sayyad (1984). Pada hasil spektrum IR dari isolat A, menunjukkan adanya gugus C-N aromatik pada bilangan gelombang  $1327,79 \text{ cm}^{-1}$  dan  $1393,96 \text{ cm}^{-1}$  dan tidak menunjukkan puncak N-H pada bilangan gelombang  $3000-3700 \text{ cm}^{-1}$  Hal ini menunjukkan bahwa isolat alkaloid A tersebut memiliki amina tersier ( $R_3N$ ) yang tidak memiliki resapan / puncak pada bilangan gelombang tersebut (Fessenden, 1999). Hal ini diperkuat dengan tidak adanya proton dari N-H pada spektrum NMR. Selain itu pada isolat A tidak mempunyai gugus C=O, tetapi memiliki gugus C-O pada struktur kimianya, sehingga makin memperkuat dugaan bahwa isolat A memiliki struktur kimia yang berbeda dari alkaloid siaminin dan siaminin yang telah diisolasi oleh El Sayyad (1984). Akan tetapi pada penelitian kali ini belum dilakukan analisis secara menyeluruh sehingga struktur kimia dari isolat A tidak dapat ditentukan.

Oleh karena itu masih perlu dilakukan penelitian lebih lanjut tentang elusidasi struktur dari isolat alkaloid A maupun isolat B, sehingga nantinya

diharapkan data yang diperoleh dapat digunakan sebagai riset marker analitik dan riset marker bioaktivitas untuk daun *Cassia siamea* dikembangkan sebagai obat herbal antimalaria yang baru.

## BAB VII KESIMPULAN DAN SARAN

### 7.1 KESIMPULAN

Dari hasil penelitian yang telah dilakukan, dapat disimpulkan bahwa :

1. Pada hasil identifikasi, isolat A dan isolat B mengendap dengan semua reaksi pengendapan untuk senyawa alkaloid serta memberikan noda berwarna jingga pada uji KLT dengan penampak noda Dragendorf , berdasarkan hal tersebut dapat disimpulkan bahwa isolat A dan isolat B adalah senyawa alkaloid
2. Dari data perbandingan hasil analisis dengan menggunakan spektrofotometri UV, Spektrometri IR dan Spektrometri RMI dapat dijelaskan bahwa isolat A bukan termasuk dari alkaloid Siamin dan Siaminin (Siaminin A, Siaminin B dan Siaminin C) yang diisolasi oleh El Sayyad (1984).

### 7.2 SARAN

Perlu dilakukan penelitian lebih lanjut tentang struktur elusidasi dari isolat alkaloid A dan isolat alkaloid B sehingga nantinya data yang diperoleh dapat digunakan sebagai riset marker analitik dan riset marker bioaktivitas untuk daun *Cassia siamea* dikembangkan sebagai obat herbal antimalaria yang baru.

## DAFTAR PUSTAKA

- Backer, C.A dan Backhuizen Van Den Brink, B.C. 1965. **Flora of Java Vol. II.** Groningen The Netherland :NVP. Noordhoff, hal 19
- Sutaryo, BM., 1994. **Tumbuhan sebagai sumber obat anti malaria.** Buletin ISFI Jatim. Vol. 22 (I) hal 8-9
- Depkes Republik Indonesia, 1989. **Cassia siamea Folium, Materia Medika Indonesia** Jilid V, Jakarta, hal. 129-133
- Depkes RI, 2000. **Parameter Standar Umum Ekstrak Tumbuhan Obat,** Jakarta : Depkes RI.
- Ekasari, Wiwied, 2001. Daya hambat senyawa alkaloid daun *Cassia siamea* pada biakan *In vitro Plasmodium falciparum*. Tesis, Universitas Airlangga
- El-Sayyad SM, Ross SA and Sayed HM, 1984. New isoquinolone alkaloids from the leaves of *Cassia siamea*. **Journal of Natural Products.** Vol. 47 (4) : 708-710
- Fessenden, R.J. and Fessenden, J.S., 1999. **Kimia Organik,** Terjemahan Aloysius H. Pudjaatmaka, edisi ketiga, Jakarta, hal. 454-464
- Fong, H.H.S., Tin Wa, M. Forsworth, N.R., 1990. **Phytochemical Screening,** Departement Of Pharmacognosy and Pharmacology, College of Pharmacy, University of Illinois at The Medical Center, Chicago, p. 32-69
- Gritter, R.J., 1991. **Pengantar Kromatografi,** Terjemahan Kosasih Padmawinata,K., edisi kedua, Bandung : Penerbit ITB : hal. 160
- Harborne, J.B., 1987. **Metode Fitokimia penuntun cara modern menganalisis tumbuhan,** Terjemahan Kosasih Padmawinata dan Iwan Soediro, ITB, Bandung , hal. 4-8, 234-259
- Heyne K, 1987. **Tumbuhan berguna Indonesia.** Jilid 3, Terjemahan badan Litbang Kehutanan, Jakarta, hal. 926-927
- Hostettmann, K., Hostettmann M., Marston A., 1995. **Preparative Chromatography Techniques,** Terjemahan Kosasih Padmawinata, ITB, Bandung, hal 33-35, 64-66, 111-134
- Joker, Dorthé, 2001. **Informasi Singkat Benih *Senna siamea* (Lam.),** <http://www.dephut.go.id>. Jum'at, 15 September 2006

- Masroerah, Sutaryo B., 1994. Tumbuhan sebagai sumber Obat Antimalaria. **Bulletin ISFI Jatim** Volume 22 nomor 1 1994. Surabaya
- Mulja, M., Suharman, 1995. **Analisis Instrumental**, Surabaya : Airlangga University press. Hal 26-48, 60-71, 142, 223-259, 374-404
- Mursito, Bambang, 2002. **Ramuan Tradisional untuk Penyakit Malaria**, Jakarta, Penebar Swadaya
- Puspadina, Valiandri, 2005. Uji Aktivitas Antimalaria Fraksi Total Alkaloid Daun Johar (*Cassia siamea*) terhadap *Plasmodium berghei* secara *in vivo*. **Skripsi**, Universitas Airlangga, Surabaya
- Robinson, T., 1983. **The Organic Constituents of Higher Plants, Their Chemistry and Interrelationship**, 5<sup>th</sup> Edition, Cordus Press, North Amherst, MA, p. 281-294
- Svensden, A.B., Verpoorte, R., 1983. **Chromatography of Alkaloids, Part A : Thin Layer Chromatography**, El Sevier Scientific Publishing Company, Amsterdam -Oxford- New York, p. 61-483
- Touchstone Joseph C. Dobbins Murrel F., 1983. **Practice Thin Layer Chromatography**, United States, John and Willey Sons Inc
- Wagner, H., Blatt, S., Zgainski, E.M., 1984. **Plant Drug Analysis, A Thin Layer Chromatography Atlas**, Springer-Verlag, Berlin Heidelberg New York, p.55-60



## LAMPIRAN 1

## Hasil Isolasi Senyawa Alkaloid oleh El-Sayyad (1984)

## a) Siaminin A HCl

Rumus Kimia :  $C_{11}H_{11}O_3N.HCl$ Titik Lebur :  $215^{\circ}C$ Rf : 0,73 (Silica gel G,  $CHCl_3$  : Etanol = 9 : 1)UV  $\lambda_{max}$  (MeOH) (nm, log  $\epsilon$ ) : 245 (2,91), 275 (3,75), 290 (3,81), 325 (3,19), 350 (3,14); +  $AlCl_3$  (+ 25 nm); +  $AlCl_3/HCl$  (+ 23 nm)UV  $\lambda_{max}$  of the base in MeOH (nm) (rel. int.) : 244 (88), 265 (87), 286 (75), 345 (20); + N NaOH 250 (92), 258 (88), 312 (sh, 49), 330 (54), 390 (sh, 9); + N HCl 244 (86), 265 (87), 286 (73), 365 (13)Ir ( $cm^{-1}$ ) : 840, 1600, 1635, 3000, 3340-3400MS  $m/z$  (rel.int %):  $M^+$  241 (29,8), 213 (82,98), 190 (100), 184 (11), 162 (13), 103 (13,83), 78 (26,6), 60 (87,23), 43 (73,2)Pmr (DMSO)  $\delta$  : 2,17 (3H, s, C-3- $CH_3$ ); 2,28 (3H, s, C-4- $CH_3$ ); 6,45 (1H, *d*,  $J = 2,5$  Hz, C-7-H), 6,48 (1H, *d*,  $J = 2,5$  Hz, C-5-H), 11,20 (1H, *brd*, NH)Derivat siaminin A yang terasetilasi mempunyai titik lebur  $310^{\circ}$ . Pmr ( $CDCl_3$ ) : 2,12 (3H,s, C-3- $CH_3$ ); 2,26 (3H,s, C-4- $CH_3$ ); dua singlet (masing-masing 3 H) pada 2,35 dan 2,54 ppm (dua metil asetat), 6,40 (1H, *d*,  $J = 2,5$  Hz); 6,45 (1H, *d*,  $J = 2,5$  Hz, C-7-H),

## b) Siaminin B HCl

Rumus Kimia :  $C_9H_7O_3N.HCl$ Titik Lebur :  $235^{\circ}C$ Rf : 0,47 (Silica gel G,  $CHCl_3$  : Etanol = 9 : 1)

UV  $\lambda_{\max}$  (MeOH) (nm, log  $\epsilon$ ) : 230 (3,71), 245 (3,67), 252 (3,74), 297 (3,12), 337 (3,16), 355 (3,14); + AlCl<sub>3</sub> (+ 25 nm); + AlCl<sub>3</sub>/HCl (+ 24 nm)

UV  $\lambda_{\max}$  of the base in MeOH (nm) (rel. int.) : 230 (sh, 69), 248 (85), 258 (92), 290 (sh, 74), 298 (76), 340 (50), 360 (45) + N NaOH 250 (95), 284 (100), 344 (60), 360 (sh, 38), 374 (32); + N HCl 231 (sh, 62), 249 (80), 259 (87), 290 (sh, 69), 298 (70), 341 (45), 362 (40)

Ir (cm<sup>-1</sup>) : 840, 910, 1600, 1630, 3050, 3350-3400

MS  $m/z$  (rel.int %): M<sup>+</sup> 213 (100), 184 (11,6), 149 (5,26), 106,5 (21), 83 (16,32), 57 (10,5), 43 (18,5)

Pmr (DMSO)  $\delta$  : 6,75 (1H, d,  $J=7,5$  Hz, C-4-H); 6,8 (1H, d,  $J=2,5$  Hz, C-7-H); 6,96 (1H, d,  $J=2,5$  Hz, C-5-H), 7,05 (1H, d,  $J=7,5$  Hz, C-3-H), 11,22 (1H, *brd*, NH)

Pmr (CDCl<sub>3</sub>) untuk derivat siaminin B yang terasetilasi menunjukkan dua singlet (masing-masing 3H) pada 2,33 dan 2,50 ppm (dua metil asetat)

#### c) Siaminin C HCl

Titik Lebur : 240<sup>0</sup> C

Rf : 0,21 (Silica gel G, CHCl<sub>3</sub> : Etanol = 9 : 1)

UV  $\lambda_{\max}$  (MeOH) : 239, 255, 260 (sh), 315, 355 (sh) nm

MS  $m/z$  (rel.int %): M<sup>+</sup> 317 (21), 283 (22,9), 269 (24,7), 213 (100), 184 (18), 149 (14,2), 106,5 (28), 83 (19,04), 57 (55,3), 43 (18,25)

**LAMPIRAN 2****Pembuatan larutan etanol 90% yang mengandung asam tartrat 1%**

Misalkan dibuat 100 ml larutan:

1. Ditimbang asam tartrat seberat  $\frac{1}{100} \times 100 \text{ gram} = 1 \text{ gram}$
2. Diambil etanol 96% sebanyak  $\frac{90}{96} \times 100 \text{ ml} = 93,75 \text{ ml}$
3. Asam tartrat dilarutkan ke dalam etanol.
4. Selanjutnya ditambah aquades ad 100 ml

### LAMPIRAN 3

#### Pembuatan Pereaksi Dragendorf

##### Pembuatan Pereaksi Dragendorf Induk :

1. 0,85 gram Bismuth Subnitrat dilarutkan dalam 10 ml Asam asetat glasial, kemudian ditambah 40 ml Aquadest, dicampur homogen.
2. Dilarutkan 8 gram KI dalam 20 ml air.
3. Kedua larutan di atas dicampur homogen.

##### Pembuatan Pereaksi Dragendorf Spray :

1 ml pereaksi Dragendorf induk ditambah 2 ml asam asetat glasial dan 10 ml aquadest, kemudian dicampur homogen.