

ISOLASI DAN UJI AKTIVITAS ANTIOKSIDAN FRAKSI ALKALOID DARI EKSTRAK METANOL KULIT BATANG BUNGA KUPU-KUPU (*Bauhinia semibifida* Roxb.)

Haiyul Fadhli^{1*}, Mustika Furi¹, Apriko Jauwahir¹

¹Sekolah Tinggi Ilmu Farmasi Riau, Jalan Kamboja, Simpang Baru Panam, 28292

e-mail: ¹haiyulfadhli@stifar-riau.ac.id, ¹mustikafuri@stifar-riau.ac.id, ³aprikojahir25@gmail.com

ABSTRAK

Tumbuhan *Bauhinia semibifida* Roxb. merupakan tumbuhan yang berpotensi sebagai antioksidan. Tujuan dari penelitian ini adalah untuk mengisolasi fraksi alkaloid dari ekstrak metanol dan uji aktivitas antioksidan dengan metode DPPH. Ekstraksi dilakukan dengan metode maserasi menggunakan pelarut metanol dan dilakukan proses asam-basa terhadap ekstrak menggunakan asam sitrat 2% dan amonia, dan kemudian difraksinasi dengan pelarut etil asetat dan butanol. Kemudian fraksi etil asetat dilakukan pemisahan dengan kromatografi kolom. Isolat hasil kromatografi kolom diberi label fraksi SA, berbentuk minyak dan berwarna kuning. Berdasarkan analisis data pemeriksaan fitokimia, spektroskopi UV-Vis, FT-IR, LC-MS, dapat disimpulkan bahwa fraksi SA adalah gabungan senyawa dengan golongan alkaloid yang memiliki gugus fungsi NH (alkaloid), dan memiliki aktivitas antioksidan yang sangat lemah dengan IC₅₀ 429,64 µg/mL.

Kata kunci : Alkaloid, Antioksidan, *Bauhinia semibifida* Roxb., IC₅₀.

ABSTRACT

Bauhinia semibifida Roxb. is a plant has potensial as antioxidant. The purpose of this research is to isolate alkaloids fraction from methanol extract and to examine the activity of antioxidant with DPPH method. The extraction was done by using maceration method with metanol solvent and an acid-base was performed on the extract with acid citric 2% and amonia, and fractionation with ethyl acetat and butanol solvents. The ethyl acetat fraction was separated by column chromatography. The isolates from column chromatography was labeled SA fraction, which a yellow colour oil. Based on phytochemicals data analysis, the spectroscopy of UV-Vis, FT-IR, and LC-MS, it can be concluded that the SA fraction is a compound has a NH functional group (alkaoids), and has very weak antioxidant activity with IC₅₀ 429,64 µg/mL.

Keywords : Alkaloids, Antioxidant, *Bauhinia semibifida* Roxb., IC₅₀.

PENDAHULUAN

Obat tradisional telah mempunyai peranan penting bagi kesehatan masyarakat Indonesia, baik digunakan berupa ramuan bahan alam atau obat jadi yang berasal dari tumbuhan, hewan, mineral, sediaan galenik atau campuran bahan tersebut yang secara tradisional telah digunakan berdasarkan pengalaman untuk pengobatan. Tumbuhan obat memiliki suatu kemampuan yang hampir tidak terbatas untuk mensintesis metabolit sekunder. Walaupun senyawa-senyawa metabolit sekunder seperti alkaloid, flavonoid, terpenoid/steroid, saponin, dan senyawa fenolik dianggap sebagai hasil samping dari metabolit primer, sebagian dari metabolit sekunder ini berfungsi sebagai alat pertahanan tumbuhan terhadap pengaruh lingkungan dari faktor ancaman dari spesies lainnya termasuk manusia (Anonim, 2007).

Pemanfaatan tumbuhan obat untuk mengatasi berbagai penyakit telah lama dikenal oleh nenek moyang kita, namun pembuktiannya secara ilmiah masih terbatas. Hal ini dapat dilakukan dengan cara mengambil bahan bakunya dari bagian tumbuhan seperti dari akar, batang, kulit, daun, umbi, buah, biji maupun getah (Anonim, 2007).

Bauhinia adalah tumbuhan dengan spesies dari keluarga fabaceae yang banyak (sekitar 300 spesies) dan terdistribusi di daerah tropik dan subtropik dari keluarga fabaceae. *Bauhinia* banyak digunakan masyarakat dalam pengobatan umum seperti spesies

Bauhinia purpurea L. yang digunakan sebagai obat bisul, batuk, luka, tumor, kembung, wasir dan gigitan ular (Krishnaveni, 2015). *Bauhinia semibifida* Roxb. juga digunakan sebagai obat pegal linu (Fitmawati, 2017).

Sekarang antioksidan merupakan topik yang sangat penting dalam bidang kesehatan, karena semakin dimengerti biasanya bahwasannya sebagian besar penyakit diawali oleh reaksi oksidasi yang berlebihan di dalam tubuh. Tanpa kita sadari tubuh terus-menerus menghasilkan senyawa radikal bebas. Radikal bebas adalah oksidan yang sangat reaktif, karena radikal bebas merupakan senyawa yang memiliki satu atau lebih elektron yang tidak berpasangan pada orbital luarnya (Sayuti *et al.*, 2015).

Radikal bebas sebagai penyebab penyakit degeneratif bersifat destruktif, sangat reaktif, dan mampu bereaksi dengan makromolekul sel (protein, lipid, karbohidrat, atau DNA). Reaksi antara radikal bebas dan molekul itu berujung pada timbulnya suatu penyakit, antara lain kanker, aterosklerosis, dan penyakit lainnya (Sayuti *et al.*, 2015).

Senyawa yang dapat berfungsi sebagai antioksidan adalah flavonoid, fenol, vitamin A, vitamin C, vitamin E, dan polifenol (Sayuti *et al.*, 2015). Beberapa senyawa alkaloid juga memiliki aktivitas antioksidan dari keluarga fabaceae/leguminosae, seperti senyawa *erysodine* yang telah diteliti oleh Juma dan Majinda (2004), dengan mengisolasi 14 senyawa

alkaloid dari tanaman *Erythrina lysistemon* dari keluarga fabaceae dan di uji aktivitas antioksidan, dari 14 senyawa alkaloid yang diisolasi hanya senyawa kesebelas yaitu *erysodine* yang memiliki aktivitas antioksidan yang baik dengan IC₅₀ yaitu 90 µg/mL.

Pada hasil penelitian oleh Fitmawati (2017) mengenai uji antioksidan ekstrak total metanol tanaman dalam obat pahit yang didalamnya mengandung *Bauhinia semibifida* Roxb. dengan metode DPPH menyatakan bahwa *Bauhinia semibifida* Roxb. memiliki antioksidan yang sangat tinggi dengan IC₅₀ sebesar 6,6247 µg/mL.

Berdasarkan penelitian Fadhli *et al.*, (2019) terhadap ekstrak metanol yang diperoleh dari maserasi bertingkat memiliki nilai IC₅₀ sebesar 16 µg/mL dengan nilai AAI sebesar 2,5 yang dikategorikan sangat kuat.

Berdasarkan uji fitokimia pada ekstrak total metanol tanaman kulit batang *Bauhinia semibifida* Roxb. positif mengandung senyawa alkaloid. Dari latar belakang diatas, peneliti tertarik melakukan isolasi fraksi alkaloid dari ekstrak metanol dan melakukan uji antioksidan pada tumbuhan *Bauhinia semibifida* Roxb. yang terdapat di wilayah Indonesia, khususnya di daerah KHDTK Bukit Suligi, Rokan Hulu, Riau dan diharapkan hasil penelitian ini dapat digunakan sebagai alternatif dalam pengobatan suatu penyakit dan menambah informasi pengobatan dibidang kefarmasian.

METODE PENELITIAN

Alat dan Bahan

Alat yang digunakan dalam penelitian ini adalah seperangkat alat destilasi (Gopal[®]), satu unit *rotary evaporator* (Buchi[®]), lumpang, neraca analitik (Shimadzu[®] AUW-320), kolom kromatografi (Pyrex[®]), plat KLT GF₂₅₄, *chamber* (Pyrex[®]), lampu UV penampak noda (Camag[®]), vial, pipa kapiler, spektrofotometer UV-Vis (Shimadzu[®] UV-1800), spektrofotometer IR (IR Prestige-21[®]), LC *system* (ACQUITY UPLC[®]), LC kolom C18 (17 µm 2,1x50 mm) (ACQUITY UPLC[®]), spektrometer massa (Xevo G2-S QToF), botol gelap, *microplate reader* (Tristar LB 941 BERTHOLD[®]), pipet mikro, dan peralatan gelas yang umum digunakan.

Sampel yang digunakan dalam penelitian ini adalah kulit batang kering *Bauhinia semibifida* Roxb. sebanyak 2 kg. Bahan-bahan yang digunakan adalah metanol, *n*-heksana, etil asetat, asam asetat 2%, asam sitrat 2%, NH₄OH, aquadest, kloroform, kloroform amoniak, logam magnesium, Na₂SO₄ anhidrat, larutan FeCl₃ 1%, HCl pekat, DPPH, norit, H₂SO₄ 2N, silika gel 60 (63-200 µm) (Merck[®]), plat KLT, pereaksi *Liebermann-Burchard*, pereaksi Mayer dan pereaksi Dragendorff, kristal iodium, AlCl₃.

Prosedur Kerja

Pengambilan Sampel

Sampel berupa kulit batang tumbuhan *Bauhinia semibifida* Roxb. yang diambil di KHDTK Bukit Suligi Kabupaten Rokan Hulu, Riau.

Identifikasi Sampel

Identifikasi tumbuhan *Bauhinia semibifida* Roxb. dilakukan di Laboratorium Botani Jurusan Biologi Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam (FMIPA) Universitas Riau, Pekanbaru.

Persiapan Sampel

Sampel tumbuhan bunga kupu-kupu (*Bauhinia semibifida* Roxb.) yang telah diambil dari KHDTK Bukit Suligi dilakukan sortasi basah, tujuan dari sortasi basah adalah memisahkan sampel dari jamur atau pengotor lainnya, setelah dibersihkan sampel dikeringanginkan sampai kering dan kemudian dirajang kecil-kecil.

Skrinning Fitokimia

Pemeriksaan fitokimia yang dilakukan meliputi pemeriksaan alkaloid, terpenoid, fenolik, flavonoid, steroid dan saponin.

Pembuatan Ekstrak metanol *Bauhinia Semibifida* Roxb.

Kulit batang kering *Bauhinia semibifida* Roxb. sebanyak 2 kg dimasukan didalam botol gelap, ekstraksi dilakukan dengan menggunakan metoda maserasi. Ekstraksi sampel dilakukan dengan cara merendam sampel kering didalam botol gelap direndam dengan menggunakan pelarut metanol selama 3 hari dengan 3 kali pengulangan, botol gelap diaduk sebanyak 2 kali sehari. Setelah 3 hari, dilakukan penyaringan untuk memisahkan maserat dengan ampas. Maserat *Bauhinia semibifida* Roxb. yang didapat dipekatkan dengan menggunakan alat *rotary evaporator*, sehingga didapatkan ekstrak metanol.

Pemisahan Senyawa Alkaloid

Ekstrak metanol sebanyak 100 g yang diperoleh diasamkan dengan asam sitrat 2% sampai pH 3-4, selanjutnya lapisan asam dibasakan dengan larutan amonia sampai pH 9-10, selanjutnya dipisahkan dengan etil asetat dan kemudian dipisahkan dengan butanol untuk mengikat alkaloid sampai lapisan basanya negatif alkaloid, masing-masing lapisan etil asetat dan butanol yang mengandung senyawa alkaloid dihilangkan kadar airnya dengan natrium sulfat anhidrat kemudian dipisahkan, lapisan etil asetat dan butanol masing-masing diuapkan dengan *rotary evaporator* sehingga diperoleh fraksi kental butanol dan fraksi kental etil asetat. Fraksi yang mengandung senyawa alkaloid ini dipersiapkan untuk dikromatografi kolom.

Kromatografi Kolom

Pengkoloman diawali dengan penyiapan alat kolom yang kemudian diisi dengan silika gel 60 GF₂₅₄. Pengisian kolom dilakukan dengan membuat bubuk silika dengan pelarut *n*-heksana terlebih dahulu, lalu dimasukkan ke dalam kolom dengan menggunakan corong, kemudian dielus dengan pelarut *n*-heksana sampai kerapatan silika di dalam kolom maksimum.

Fraksi etil asetat *Bauhinia semibifida* Roxb. yang akan dipisahkan sebanyak 2 g diserbukkan dengan silika gel (preabsorpsi) dan dimasukkan dalam kolom. Pengelusan diawali dengan pelarut nonpolar (*n*-heksana), kemudian tingkatkan kepolaran dengan cara mengkombinasikannya dengan pelarut semipolar (etil asetat) dengan perbandingan *n*-heksana : etil asetat (9:1, 8:2, 7:3, 6:4, 5:5, 4:6, 3:7, 2:8, 1:9) dan etil asetat 100 %, selanjutnya etil asetat dikombinasikan dengan pelarut polar (metanol) dengan perbandingan etil asetat : metanol (9:1, 8:2, 7:3, 6:4, 5:5, 4:6, 3:7, 2:8, 1:9) dan metanol 100 %.

Pengujian Hasil Pengujian Kromatografi Kolom dengan KLT

Hasil pemisahan kromatografi kolom selanjutnya dilakukan uji KLT. Tiap fraksi ditotolkan pada plat KLT yang telah diberi nomor sesuai dengan nomor pada vial yang diuji, selanjutnya dilakukan elusi dengan eluen tertentu yang sesuai sampai garis batas atas pada plat KLT, plat dikeluarkan dan dikeringkan. Untuk melihat noda yang dihasilkan dapat dilakukan dengan penyinaran lampu UV dan pereaksi penampak noda Dragendorff. Selanjutnya tentukan R_f dari masing-masing noda.

Identifikasi Senyawa Hasil Isolasi

Senyawa yang diperoleh, dilakukan pemeriksaan organoleptis berupa warna, bentuk, kelarutan, pemeriksaan reaksi warna dengan pereaksi Dragendorff dan karakterisasi menggunakan metode spektroskopi IR, spektroskopi UV dan LC-MS.

Uji Aktivitas Antioksidan Senyawa Hasil Isolasi

Pembuatan Larutan DPPH

Sejumlah 5 mg DPPH ditimbang dan dilarutkan dalam 5 mL metanol sehingga didapatkan konsentrasi DPPH 1000 ppm (1000 $\mu\text{g/mL}$). Kemudian dilakukan pengenceran dengan konsentrasi 40 $\mu\text{g/mL}$.

Pengukuran Sampel

Uji aktivitas antioksidan dilakukan menggunakan *microplate reader* dengan metode DPPH (*1,1-diphenyl-2-picrylhydrazyl*) pada panjang gelombang 517 nm (Kedare dan Singh, 2010; Fadhli *et al.*, 2018)

Sampel diambil sebanyak 5 mg dilarutkan dalam 5 mL metanol sehingga konsentrasi sampel 1000 $\mu\text{g/mL}$. Baris A dimasukkan senyawa sebanyak 100 μL (*plate* terdiri dari baris A-H masing-masing berjumlah 12 lubang). Sebanyak 50 μL metanol dimasukkan pada masing-masing sumur pada baris B-F. Baris A dipipet sebanyak 50 μL dan dimasukkan kebaris B, baris B dipipet 50 μL baris C dan dilakukan sampai kebaris F, baris F dipipet 50 μL dan dibuang, sehingga diperoleh masing-masing konsentrasi 1000, 500, 250, 125, 62,5 dan 31,25 $\mu\text{g/mL}$. Sedangkan baris G-H diisi dengan MeOH 50 μL . Baris A-G ditambahkan DPPH sebanyak 80 μL dengan konsentrasi 40 $\mu\text{g/mL}$, kemudian diinkubasi selama 30 menit pada suhu ruang dan terlindung dari cahaya. Aktivitas penangkapan radikal diukur sebagai

penurunan absorbansi DPPH dengan *microplate reader*.

Analisis Data

Data yang diperoleh dianalisa secara deskriptif disajikan dalam bentuk data, tabel ataupun gambar mengenai organoleptis, sifat fisika, sifat kimia dan analisa pengukuran spektrum UV-Vis, IR dan LC-MS serta hasil uji aktivitas senyawa isolat.

Hitung nilai persentase inhibisi yang diwakili oleh nilai IC_{50} nilai persen inhibisi ini dihitung dengan rumus :

$$\% \text{ Inhibisi} = \frac{A_{kontrol} - A_{sampel}}{A_{kontrol}} \times 100 \%$$

Keterangan : A kontrol : Absorbansi tidak mengandung sampel

A sampel : Absorbansi sampel

Penetapan IC_{50} dilakukan dengan persamaan grafik linear antara persen inhibisi (x) terhadap konsentrasi sampel uji IC_{50} yang diperoleh dibandingkan dengan IC_{50} asam askorbat.

$$y = bx \pm a$$

Ket : y : IC_{50}
a : intersep
b : koefisien regresi
x : ln konsentrasi uji

HASIL DAN PEMBAHASAN

Sebanyak 2 kg simplisia kulit batang bunga kupukupu (*Bauhinia semibifida* Roxb). dimaserasi dengan metode maserasi. Kulit batang *Bauhinia semibifida* Roxb. ini dilakukan pemeriksaan uji fitokimia metabolit sekunder, Hasil uji fitokimia sampel mengandung senyawa alkaloid, terpenoid, flavonoid, saponin, dan fenolik (Tabel 1).

Hasil positif alkaloid pada uji Mayer ditandai dengan terbentuknya endapan putih. Endapan tersebut diperkirakan adalah kompleks kalium-alkaloid yaitu hasil reaksi antara nitrogen pada alkaloid yang bereaksi dengan ion logam K^+ dari kalium tetraiodomerkurat (II) (Setyowati dkk, 2014; Pardede dkk, 2013).

Hasil positif flavonoid menggunakan logam Mg dan asam klorida pekat ditandai dengan terbentuknya warna merah atau jingga. Reaksi yang terjadi pada uji flavonoid ini adalah logam Mg dan asam korida pekat sebagai reagen yang akan mereduksi inti benzopiron yang terdapat pada struktur flavonoid sehingga terbentuk garam flavilium yang ditandai dengan perubahan warna menjadi merah atau jingga. Sedangkan uji fenolik reaksi positif ditandai dengan terbentuk warna biru kehitaman, perubahan warna ini terjadi ketika $FeCl_3$ bereaksi dengan gugus hidroksil yang terdapat pada senyawa fenolik (Setyowati dkk, 2014).

Pemeriksaan terpenoid ditandai dengan warna merah dan steroid dengan warna biru pada penambahan pereaksi *Liebermann-Burchard*. Warna

merah ini terbentuk karena adanya perpanjangan konjugasi pada senyawa yang diawali dengan proses asetilasi asam asetat anhidrat (Setyowati dkk, 2014).

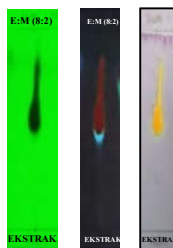
Pada uji fenolik, diketahui sampel mengandung senyawa fenolik. Uji fitokimia adanya fenolik pada sampel terjadi melalui oksidasi sebagian pada benzena atau asam benzoat dengan proses *Rasching*. Ditandai dengan terbentuknya biru (Hanani, 2015).

Pada uji saponin, diketahui sampel mengandung senyawa saponin. Uji fitokimia adanya saponin ditandai dengan terbentuknya busa yang akan bertahan selama 5 menit, timbulnya busa ini menandakan adanya glikosida yang mempunyai kemampuan membentuk buih dalam air yang terhidrolisis menjadi glukosa dan senyawa lain (Hanani, 2015).

Tabel 1. Hasil Skринning Fitokimia Kulit Batang Bunga Kupu-Kupu (*Bauhinia semibifida* Roxb.)

Golongan	Hasil	Keterangan
Alkaloid	+	Terbentuk endapan putih
Steroid	-	Tidak terbentuk warna hijau
Fenolik	+	Terbentuk warna biru
Saponin	+	Terbentuk busa
Flavonoid	+	Terbentuk warna jingga
Terpenoid	+	Terbentuk warna merah

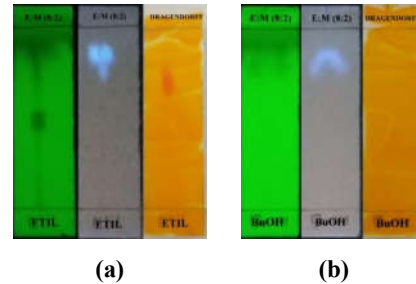
Ekstrak kental metanol tumbuhan bunga kupu-kupu (*Bauhinia semibifida* Roxb.) dari hasil pemekatan didapat sebanyak 145 g. Ekstrak kemudian di KLT kemudian diuji pendahuluan antioksidan penangkap radikal bebas dengan metode Demirezer (Demirezer *et al.*, 2001). Hasil uji pendahuluan antioksidan ekstrak metanol kulit batang bunga kupu-kupu memiliki aktivitas antioksidan (Gambar 1).



Gambar 1. Profil KLT *Bauhinia semibifida* Roxb. dengan Lampu Sinar UV 254 nm, UV 366 nm dan DPPH.

Ekstrak metanol *Bauhinia semibifida* Roxb. yang didapat dilakukan pemisahan alkaloid dengan metode asam-basa (Cordel, 2008) dengan menggunakan asam sitrat 2% sebagai asam dan amonia sebagai basa. Hasil asam-basa kemudian difraksinasi dengan menggunakan pelarut etil asetat dan butanol. Dari hasil pemeriksaan KLT dengan menggunakan reagen Dragendorff, fraksi

etil asetat mengandung senyawa alkaloid ditandai dengan adanya noda jingga pada plat KLT, sedangkan pada fraksi butanol tidak mengandung senyawa alkaloid (Gambar 2).



Gambar 2. (a) Profil KLT Fraksi Etil Asetat (b) Profil KLT Fraksi Butanol.

Sebanyak 2 gram fraksi etil asetat dibuat preabsorpsi dengan mencampurkan silika gel dengan fraksi etil asetat didalam lumpang untuk menghomogenkannya dan memudahkan kontak fraksi dengan silika sebagai fase diam sehingga proses pemisahan lebih mudah. Silika gel yang telah tercampur dengan fraksi etil asetat ini kemudian dimasukkan kedalam kolom dengan cara menaburkannya secara merata, setelah rata kemudian dilapisi dengan silika gel bersih kira-kira setengah cm diatasnya. Hal ini dimasukkan agar pada saat memasukkan pelarut tidak mengganggu sampel.

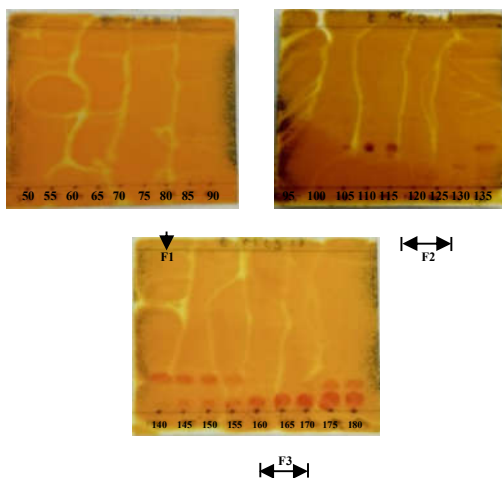
Pengelusan dilakukan dengan prinsip SGP (*Step Gradient Polarity*) yaitu metode elusi dimana pelarut ditingkatkan kepolarannya perlahan dalam berbagai perbandingan dengan menggunakan pelarut *n*-heksana, etil asetat dan metanol. Elusi pada kolom dimulai dengan pelarut yang bersifat non polar yaitu *n*-heksana 100%, dilanjutkan dengan mencampur *n*-heksana dan etil asetat (9:1), (8:2), (7:3), (6:4), (5:5), sampai etil asetat 100% yang bersifat semi polar. Kepolaran eluen ditingkatkan dengan mencampur etil asetat dan metanol (9:1), (8:2), (7:3), (6:4), (5:5), (4:6), (3:7) hingga metanol 100%.

Silika gel yang berada dalam kolom akan mengikat kuat senyawa-senyawa yang polar karena silika gel juga bersifat polar sehingga senyawa-senyawa yang non polar dari kolom akan keluar terlebih dahulu. Eluen akan ditingkatkan kepolarannya apabila pita yang turun dengan eluen sebelumnya telah terelusi semua dan ditampung dalam vial. Hal ini ditandai dengan melihat pita-pita yang sudah tidak turun lagi. Volume eluen yang digunakan bervariasi tergantung kebutuhan untuk mengelusi supaya pita pada kolom yang dielusi dengan eluen tersebut turun semuanya. Kenaikan kepolaran eluen tidak boleh terlalu jauh karena akan menyebabkan turunnya senyawa secara bersamaan dan untuk mendapatkan senyawa murni akan semakin sulit. Dalam proses pengelusan ini silika gel harus senantiasa basah karena jika dibiarkan mengering, kolom yang terbentuk

dari silika gel bisa retak jenuh sehingga mendesak kristal keluar kembali dari pelarut yang melarutkannya (Gritter *et al.*, 1991).

Fraksi etil asetat yang telah dikolom ditampung dalam vial ini dibiarkan menguap. Hasil pemisahan dengan kromatografi kolom diperoleh 520 vial. Kemudian vial di KLT setiap interval 5 vial, lalu ditotolkan pada plat yang telah diberi nomor sesuai dengan nomor vial, kemudian dielusi dengan eluen yang sesuai sampai garis atas plat KLT, plat dikeluarkan dan dikeringkan. Untuk melihat noda yang dihasilkan dapat dilakukan dengan penyinaran lampu UV $\lambda 254$ nm, UV $\lambda 366$ nm, dan penampak noda Dragendorff.

Dari hasil pengamatan KLT dari penyinaran lampu UV dan penyemprotan penampak noda Dragendorff, dipilih F1, F2 dan F3 yang menunjukkan adanya golongan senyawa alkaloid dengan terbentuknya noda jingga dalam latar kuning pada plat KLT (Gambar 3). Reagen ini bereaksi spesifik dengan atom N dan memberikan hasil positif jika terbentuk warna jingga. Pada uji ini nitrogen digunakan untuk membentuk ikatan kovalen koordinat dengan K^+ yang merupakan ion logam (Setyowati *et al.*, 2014).



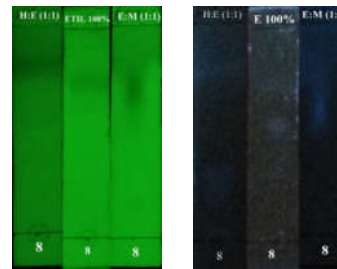
Gambar 3. Profil KLT Hasil Kromatografi Kolom dengan Penampak Noda Dragendorff.

Pada penelitian ini dilakukan uji aktivitas antioksidan terhadap F1, F2 dan F3. Tujuan pengujian ini adalah untuk mengetahui tingkat kemampuan senyawa sebagai antioksidan. Uji aktivitas antioksidan dilakukan dengan metode DPPH (1,1-Difenil-2-Pikrihidrazil) menggunakan *microplate reader* seperti metode yang dilakukan oleh Kedare dan Singh (2011). Prinsip pengukurannya yaitu pengukuran absorbansi sampel yang telah bereaksi dengan DPPH dalam waktu inkubasi 30 menit. Waktu 30 menit adalah waktu optimum bagi sampel untuk dapat bereaksi sempurna dengan DPPH.

Hasil aktivitas antioksidan pada F1 dengan IC_{50} sebesar 945,5697 $\mu\text{g/mL}$, pada F3 yaitu 429,6477

$\mu\text{g/mL}$, dan pada F2 yaitu >1000 $\mu\text{g/mL}$. F3 memiliki aktivitas antioksidan yang lemah, sedangkan pada F1 dan F2 tidak adanya menunjukkan aktivitas antioksidan (Lampiran 13). Dilihat dari hasil antioksidan yang didapat, dipilih F3 karena memiliki aktivitas antioksidan yang baik dibanding fraksi lain dan mengandung senyawa alkaloid dilihat dari penampak noda Dragendorff pada KLT.

Fraksi F3 selanjutnya dikolom kembali dan didapatkan sebanyak 17 vial. Vial tersebut di KLT, noktah yang dihasilkan dapat dilakukan dengan penyinaran lampu UV $\lambda 254$ nm, UV $\lambda 366$ nm, dan penampak noda Dragendorff, kristal Iouim dan pereaksi mayer. Dari hasil noda KLT dipilih fraksi SA yang terbentuk minyak berwarna kuning memiliki noda berwarna jingga saat diberi penampak noda Dragendorff dan mengandung senyawa alkaloid.



Gambar 4. KLT Vial 8 (Fraksi SA) dengan 3 Eluen yang Berbeda dengan Lampu Sinar UV 254 nm dan 366 nm.

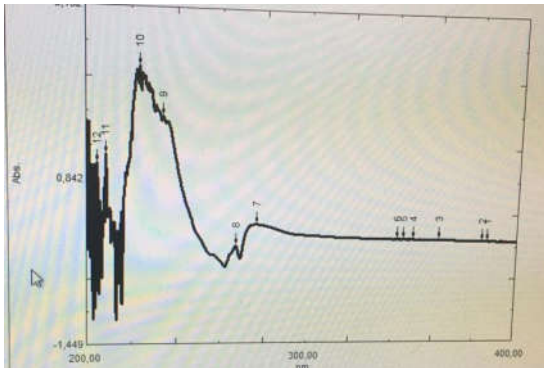
Keterangan gambar:

- a. *n*-Heksana : Etil Asetat (1:1) $R_f = 0,25$
- b. Etil Asetat 100% $R_f = 0,525$
- c. Etil Asetat : Metanol (1:1) $R_f = 0,575$

Fraksi SA selanjutnya dilakukan analisa dengan spektrofotometer UV-Vis, FT-IR, dan LC-MS. Hasil pengukuran spektrofotometer UV fraksi SA dengan pelarut metanol menunjukkan serapan maksimum pada pajang 4 gelombang 276 nm, 233,80 nm, 208,40 nm, 204,80 nm. Fungsi spektrofotometer UV adalah dapat menentukan jenis kromofor, ikatan rangkap terkonjugasi dan auksokrom (gugus jenuh dengan adanya elektron bebas) dari senyawa organik. Dilihat dari hasil UV, fraksi SA memiliki gugus kromofor dan ikatan rangkap terkonjugasi.

Hasil pengukuran FT-IR fraksi SA memperlihatkan adanya serapan pada bilangan gelombang 3417 cm^{-1} terdapat gugus fungsi NH, pada bilangan gelombang 3290 cm^{-1} terdapat gugus fungsi OH, pada bilangan gelombang 3114 cm^{-1} terdapat gugus fungsi CH (aromatik), pada bilangan gelombang 2945 cm^{-1} terdapat gugus fungsi CH (alifatik), pada bilangan gelombang 2869 cm^{-1} terdapat gugus fungsi CH (aldehid), pada panjang gelombang 1693 cm^{-1} terdapat gugus fungsi CN (amida), pada panjang gelombang 1622 cm^{-1} terdapat gugus C=C (alkena),

pada panjang gelombang 1233 cm^{-1} terdapat gugus fungsi C-O-C (eter) (Sastrohamidjojo, 2013) (Gambar 6).



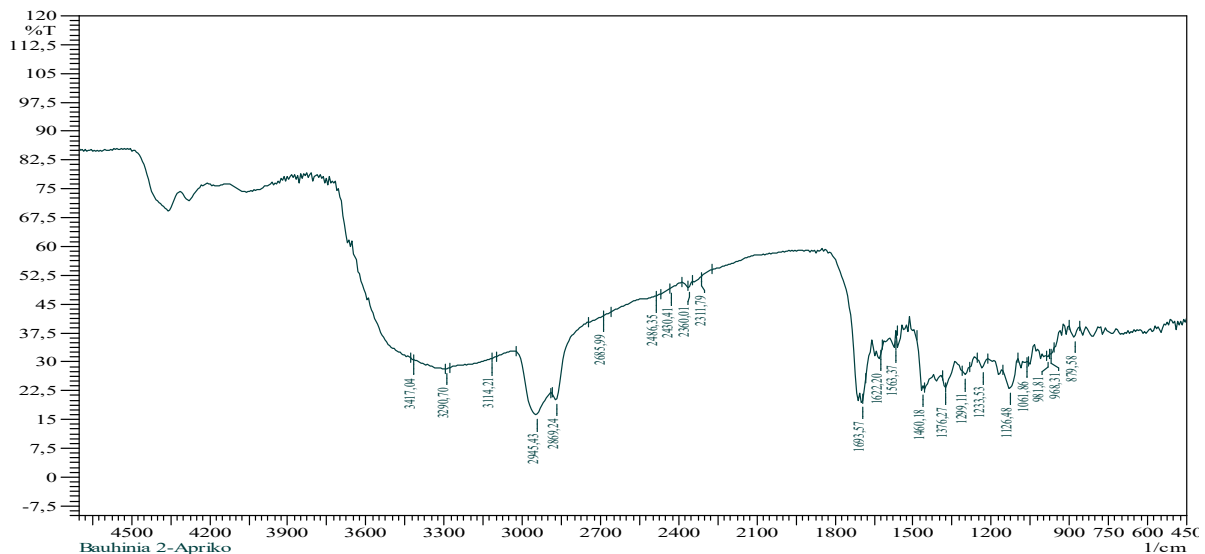
Gambar 5. Spektrum UV Fraksi SA.

Selanjutnya dilakukan analisis LC-MS terhadap fraksi SA, untuk memastikan kemurnian dan berat molekul dari fraksi SA tersebut. Hasil analisis yang diperoleh berupa kromatogram dan spektrum massa yang dapat dianalisis. Berdasarkan hasil analisa spektrum kromatogram LC-MS fraksi SA menunjukkan ada 8 puncak yang menandakan senyawa SA belum murni dengan waktu retensi 4,04; 5,05; 5,35; 5,83; 7,06; 7,94; 8,51; dan 17,13. Terdapat 4 puncak utama yaitu pada waktu retensi (Rt) 5,35; 7,94; 8,51; dan 17,13 (Gambar 7).

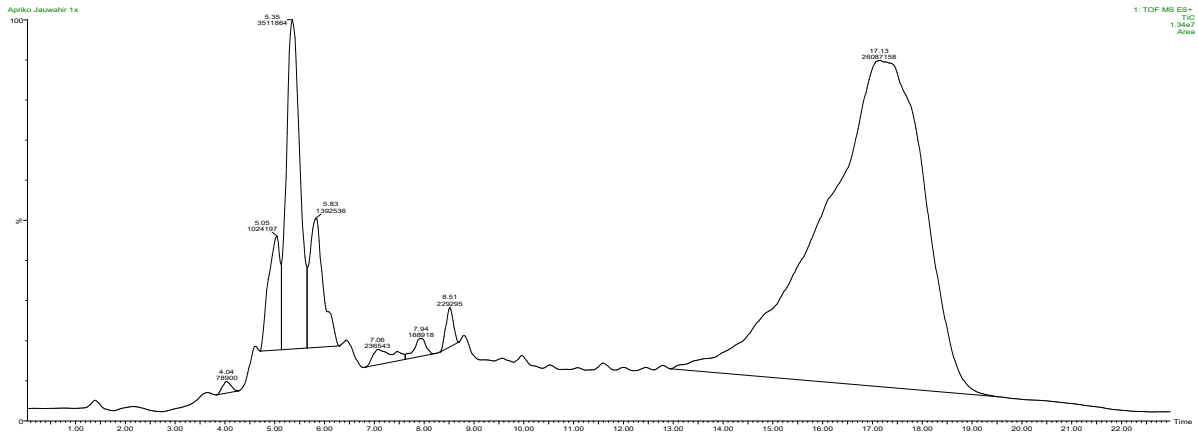
Senyawa pada puncak waktu retensi (Rt) 5,35 memiliki massa 264. Prediksi pola fragment pada fragment 246 ($m/z=246$) diduga senyawa 5-(2-chlorpyrimidin-4-yloxy)-1H-indole dengan rumus molekul $\text{C}_{12}\text{H}_9\text{ClN}_3\text{O}$. Senyawa 5-(2-chlorpyrimidin-4-yloxy)-1H-indole adalah salah satu senyawa alkaloid golongan indol dan imidazole (Gunter *et al.*, 2006) (Gambar 8).

Senyawa pada puncak waktu retensi (Rt) 7,88 memiliki massa 637. Prediksi pola fragment pada m/z 637 adalah $\text{C}_{28}\text{H}_{36}\text{O}_9\text{S}_2$. Pada fragment 107 ($m/z=107$) pola prediksi fragmentnya yaitu senyawa $\text{C}_6\text{H}_5\text{-CH}_2\text{O}$. Pada senyawa ini diduga juga senyawa golongan alkaloid karena pada pada fragment 615 ($m/z=44$) pola prediksi fragmentnya yaitu rumus molekul CH_3CHNH_2 , dan pada fragment 308 ($m/z=44$) juga memiliki pola fragment yang sama dengan fragment pada 615 yaitu rumus CH_3CHNH_2 (Gunter *et al.*, 2006) (Gambar 9).

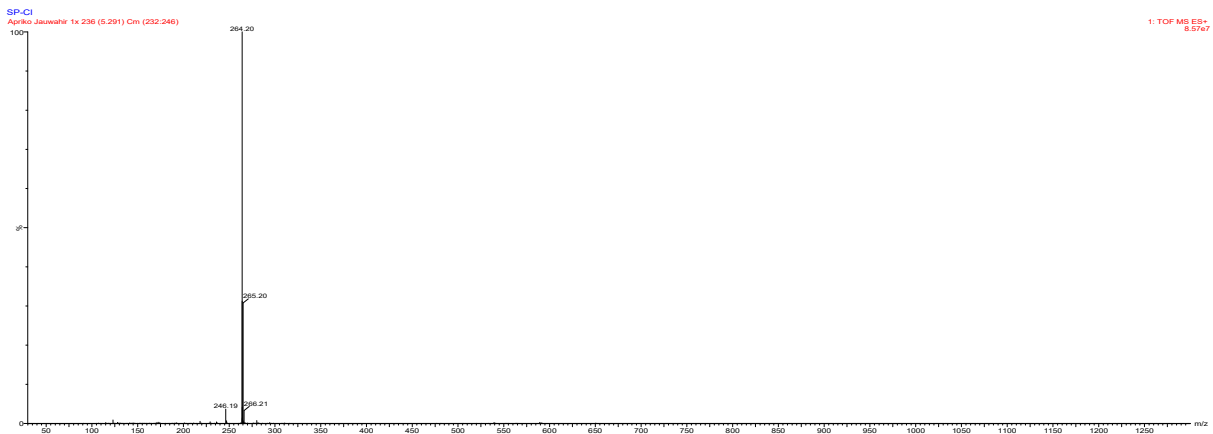
Berdasarkan hasil spektrofotometer UV-Vis, FT-IR, dan LC-MS, Fraksi SA adalah golongan senyawa alkaloid. Dilihat dari data FT-IR, fraksi SA pada bilangan gelombang 3417 cm^{-1} menunjukkan gugus fungsi NH, dan data spektrum LC-MS puncak pada waktu retensi (Rt) 5,35 memiliki massa 264 dengan prediksi pola fragment pada fragment 246 adalah senyawa 5-(2-chlorpyrimidin-4-yloxy)-1H-indole dengan rumus kimia $\text{C}_{12}\text{H}_9\text{ClN}_3\text{O}$, dimana senyawa 5-(2-chlorpyrimidin-4-yloxy)-1H-indole merupakan salah satu senyawa golongan alkaloid, dan puncak pada waktu retensi (Rt) 7,88 prediksi pola fragmentnya adalah senyawa 2-amino-5-((3-((1-carboxy-2-(4-(2-(5-ethylpyridin-2-yl)ethoxy) phenyl)ethyl)disulfanyl)-1-((carboxymethyl)amino)-1-oxopropan-2-yl)amino)-5-oxopentanoic acid dengan rumus kimia $\text{C}_{28}\text{H}_{36}\text{O}_9\text{S}_2$, dimana senyawa ini adalah senyawa alkaloid golongan piridin.



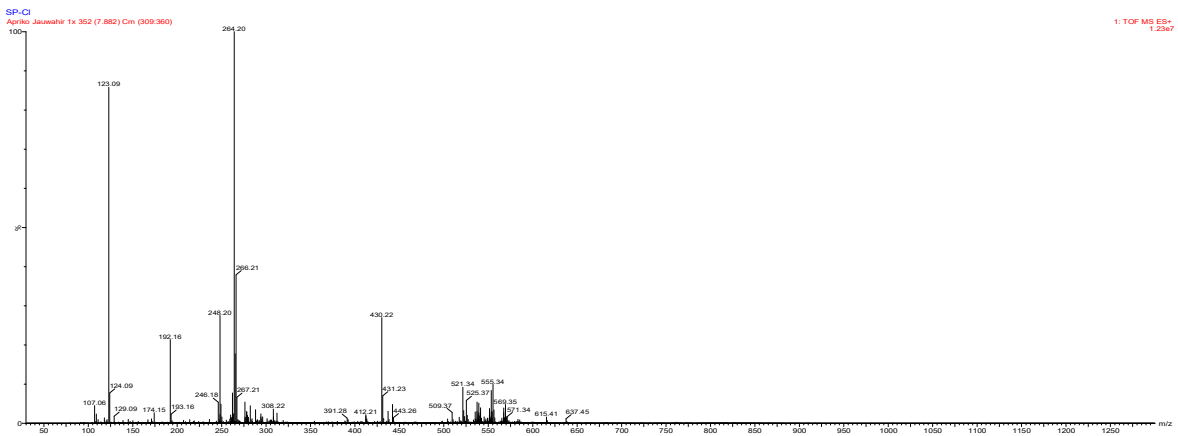
Gambar 6. Spektrum Infra Red Fraksi SA.



Gambar 7. Kromatogram LC-MS Fraksi SA.



Gambar 8. Spektrum Massa Senyawa pada Rt 5,35.



Gambar 9. Spektrum Massa Senyawa pada Rt 7,88.

SIMPULAN

Isolasi fraksi alkaloid dari ekstrak metanol kulit batang bunga kupu-kupu (*Bauhinia semibifida* Roxb.) didapatkan fraksi SA. Identifikasi isolat dengan penampak noda menunjukkan bahwa fraksi SA adalah senyawa golongan alkaloid. Evaluasi antioksidan menunjukkan bahwa fraksi SA memiliki aktivitas antioksidan yang sangat lemah dengan IC_{50} 429,64 $\mu\text{g/mL}$. Berdasarkan hasil identifikasi UV-Vis, FT-IR, dan LC-MS, dapat disimpulkan bahwa fraksi SA adalah senyawa dengan golongan alkaloid yang memiliki gugus fungsi NH didalam spektrum FT-IR dan spektrum massa.

DAFTAR PUSTAKA

- Anonim 2007. Kebijakan Obat Tradisional Nasional. *Departemen Kesehatan Republik Indonesia*, 1–42.
- Fadhli, H., Nurdin, A.N. & Octaviani, M. 2019. Potensi Antioksidan dari Ekstrak Kulit Batang Bauhinia semibifida Roxb. *Jurnal Ilmiah Ibnu Sina*, 4(1): 77–87.
- Fadhli, H., Soeharto, A.B.R. & Windarti, T. 2018. Uji Aktivitas Antioksidan Kulit Buah Pulasan (*Nephelium mutabile* Blume) dan Bunga Turi Putih (*Sesbania grandiflora*) dengan Metoda DPPH. *Jurnal Katalisator*, 3(2): 114–124.
- Fitmawati 2017. Antioxidant Activity of Dominant Plants Species in Obat Pahit from Lingga Malay Ethnic in Riau Archipelago. *Biosaintifika*, 9(2): 325–331.
- Juma, B.F. & Majinda, R.R.T. 2004. Erythraline Alkaloids From The Flowers and Pods of *Erythrina lysistemon* and Their DPPH Radical Scavenging Properties. *Phytochemistry*, 65(10): 1397–1404.
- Kedare, S.B. & Singh, R.P. 2011. Genesis and Development of DPPH Method of Antioxidant Assay. *Journal of food science and technology*, 48(4): 412–422.
- Krishnaveni, M. 2015. Phytochemical study of *Bauhinia purpurea* Linn. Stem. *Research Journal of Pharmacy and Technology*, 8(11): 1555–1559.
- Sayuti, K. & Yenrina, R. 2015. Antioksidan alami dan sintetik. *Padang, Universitas Adalas*.