



Hak Cipta Dilindungi Undang-Undang

1. Dilarang mengutip sebagian atau seluruh karya tulis ini tanpa mencantumkan dan menyebutkan sumber:
 - a. Pengutipan hanya untuk kepentingan pendidikan, penelitian, penulisan karya ilmiah, penyusunan laporan, penulisan kritik atau tinjauan suatu masalah.
 - b. Pengutipan tidak merugikan kepentingan yang wajar Unand.
2. Dilarang mengumumkan dan memperbanyak sebagian atau seluruh karya tulis ini dalam bentuk apapun tanpa izin Unand.

**ISOLASI DAN KARAKTERISASI METABOLIT SEKUNDER DARI
EKSTRAK KULIT BATANG KECAPI {*Sandoricum koetjape*} YANG
AKTIF SEBAGAI ANTIBAKTERI**

SKRIPSI



**POPPY ALAMANDA
0810412032**

**JURUSAN KIMIA
FAKULTAS MATEMATIKA DAN ILMU PENGETAHUAN ALAM
UNIVERSITAS ANDALAS
PADANG 2012**

KATA PENGANTAR



Alhamdulillah, puji syukur kehadiran Allah SWT yang telah melimpahkan rahmat dan karunia-Nya sehingga penulis dapat menyelesaikan skripsi yang berjudul ***“Isolasi dan Karakterisasi Metabolit Sekunder dari Ekstrak Kulit Batang Kecapi (*Sandoricum Koetjape Merr*) yang Aktif sebagai Antibakteri”*** sebagai salah satu syarat untuk memperoleh gelar Sarjana Sain (Strata 1) pada Jurusan Kimia Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam Universitas Andalas

Pada kesempatan ini Penulis mengucapkan terima kasih dan penghargaan yang tulus kepada :

1. Kedua orang tua, kakak serta adik-adik yang senantiasa memberikan dukungan dalam berbagai aspek sehingga penulis dapat terus bergerak hingga penelitian dan penulisan skripsi ini dapat selesai.
2. Bapak Dr.Mai Efdi sebagai pembimbing I dan bapak Dr. Afrizal sebagai pembimbing II yang telah memberikan berbagai ilmu dan saran yang tak ternilai harganya.
3. Ibu Marniati Salim, M.S sebagai pembimbing akademik yang telah membantu, memberi saran dan memotivasi selama penulis menempuh perkuliahan dan penelitian serta memberikan banyak masukan dan ilmu dalam penulisan skripsi ini.
4. Ibu Dr.Suryati, bapak Hasnirwan, M.Si yang telah memberikan ilmu dan saran dalam penulisan skripsi ini.
5. Bapak Bustanul Arifin, M.Si yang telah memberikan saran dan ilmu sebelum penulis memulai penelitian.
6. Ibu Mitralena selaku analis di Laboratorium KOBA yang telah memfasilitasi penulisan selama melakukan penelitian.
7. Uda Moch.Abdussalam.S.Si, uda Kiki Kurniawan, M.Si, uda Dedi Eka Saputra, S.Si yang telah banyak membantu penulis dalam menyelesaikan penelitian.
8. Staff dosen pengajar yang telah memberikan ilmunya selama penulis menyelesaikan perkuliahan
9. Rekan-rekan KOBA dan teman-teman angkatan 08 yang selalu memberi motivasi dan menemani penulisan selama masa kuliah, penelitian hingga penulisan skripsi ini.

Semoga Allah SWT memberikan imbalan atas bantuan yang diberikan. Menyadari keterbatasan yang ada, penulis membuka diri terhadap kritikan dan sarannya agar skripsi ini bermanfaat untuk kita semua

Padang, Juni 2012

Penulis



ABSTRAK

ISOLASI DAN KARAKTERISASI METABOLIT SEKUNDER DARI EKSTRAK KULIT BATANG KECAPI (*Sandoricum koetjape*) YANG AKTIF SEBAGAI ANTIBAKTERI

Oleh

Poppy Alamanda

Pembimbing Dr. Mai Efdi dan Dr. Afrizal

Suatu triterpenoid telah diisolasi dari ekstrak kulit batang kecap yang aktif sebagai antibakteri. Senyawa hasil isolasi berupa kristal berwarna putih berbentuk jarum yang meleleh pada suhu 214,3 – 215,4°C dan memberikan noda tunggal dengan beberapa eluen pada kromatografi lapis tipis. Hasil uji Liebermann-Burchard menunjukkan bahwa senyawa hasil isolasi merupakan golongan triterpenoid. Berdasarkan spektrum UV, senyawa hasil isolasi memiliki ikatan rangkap C=C tak berkonjugasi. Spektrum IR senyawa tersebut menunjukkan beberapa serapan penting yang menandakan adanya gugus OH, C-H alifatis, C=O, C=C, geminal dimetil dan C-O. Hasil uji bioaktivitas sebagai antibakteri menunjukkan fraksi etil asetat merupakan fraksi paling aktif dan senyawa hasil isolasi aktif sebagai antibakteri.

ABSTRACT

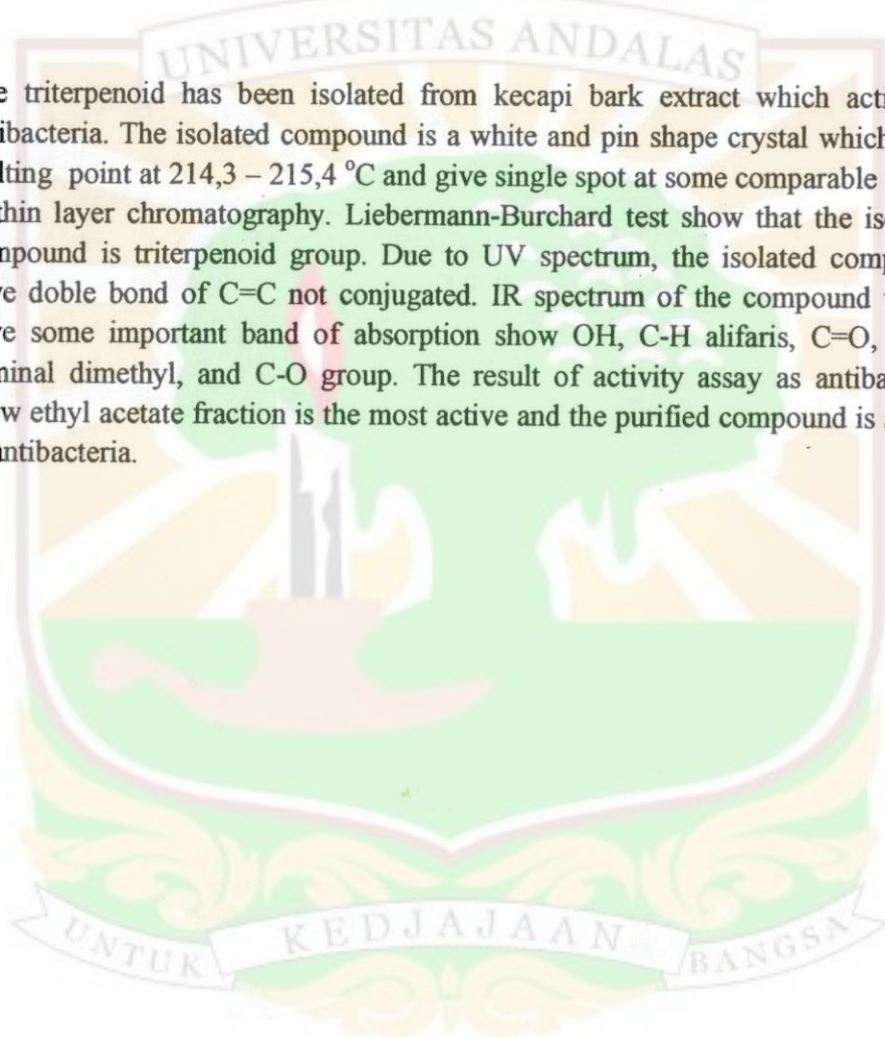
ISOLATION AND CHARACTERIZATION OF SECONDARY METABOLITE FROM KECAPI BARK EXTRACT (*Sandoricum koetjape* Merr) WHICH ACTIVE AS ANTIBACTERIA

by

Poppy Alamanda

Advised by Dr. Mai Efdi and Dr. Afrizal

The triterpenoid has been isolated from kecap bark extract which active as antibacteria. The isolated compound is a white and pin shape crystal which have melting point at 214,3 – 215,4 °C and give single spot at some comparable eluent at thin layer chromatography. Liebermann-Burchard test show that the isolated compound is triterpenoid group. Due to UV spectrum, the isolated compound have double bond of C=C not conjugated. IR spectrum of the compound which have some important band of absorption show OH, C-H alifaris, C=O, C=C, geminal dimethyl, and C-O group. The result of activity assay as antibacteria show ethyl acetate fraction is the most active and the purified compound is active as antibacteria.



DAFTAR ISI

Halaman

HALAMAN PENGESAHAN

| | |
|---|-------------|
| KATA PENGANTAR..... | i |
| ABSTRAK..... | iii |
| DAFTAR ISI..... | v |
| DAFTAR GAMBAR..... | vii |
| DAFTAR TABEL..... | viii |
| DAFTAR LAMPIRAN..... | ix |
| I. PENDAHULUAN | |
| 1.1 Latar Belakang..... | 1 |
| 1.2 Perumusan Masalah..... | 2 |
| 1.3 Tujuan Penelitian..... | 2 |
| 1.4 Manfaat Penelitian..... | 2 |
| II. TINJAUAN PUSTAKA | |
| 2.1 Tinjauan Botani..... | 3 |
| 2.2 Senyawa Metabolit Sekunder yang Terkandung pada Tanaman Kecapi..... | 4 |
| 2.3 Terpenoid..... | 5 |
| 2.3.1 Biosintesis Terpenoid..... | 6 |
| 2.3.2 Triterpenoid..... | 7 |
| 2.4 Metoda Ekstraksi..... | 8 |
| 2.4.1 Maserasi..... | 8 |
| 2.4.2 Perkolasi..... | 8 |
| 2.4.3 Sokletasi..... | 8 |
| 2.5 Kromatografi Lapis Tipis..... | 8 |
| 2.6 Kromatografi Kolom..... | 9 |
| 2.7 Rekrystalisasi..... | 9 |
| 2.8 Metoda Identifikasi Senyawa..... | 10 |
| 2.8.1 Spektroskopi UV/VIS..... | 10 |
| 2.8.2 Spektroskopi Infra Merah..... | 10 |
| 2.9 Antibakteri..... | 11 |
| 2.9.1 Metoda Pengujian Antibakteri..... | 11 |
| 2.9.2 Spektrum Aksi Antibakteri..... | 12 |

| | | |
|-------------|--|----|
| 2.9.3 | Fase Pertumbuhan Bakteri..... | 12 |
| III. | METODE PENELITIAN | |
| 3.1 | Waktu dan Tempat Penelitian..... | 14 |
| 3.2 | Alat dan Bahan..... | 14 |
| 3.2.1 | Alat..... | 14 |
| 3.2.2 | Bahan Tumbuhan dan Mikroba..... | 14 |
| 3.2.3 | Bahan Kimia..... | 14 |
| 3.3 | Pembuatan Reagen untuk Uji Fitokimia..... | 15 |
| 3.3.1 | Pembuatan Besi (III) Klorida 5 %..... | 15 |
| 3.3.2 | Pembuatan Pereaksi Meyer..... | 15 |
| 3.3.3 | Pembuatan Asam Sulfat 2N..... | 15 |
| 3.4 | Uji Profil Fitokimia..... | 15 |
| 3.5 | Isolasi dan Karakterisasi Senyawa Metabolit Sekunder dari Kulit Batang <i>Sandoricum koetjape</i> Merr. | 17 |
| 3.5.1 | Isolasi Senyawa Metabolit Sekunder..... | 17 |
| 3.5.2 | Karakterisasi..... | 18 |
| 3.6 | Uji Aktifitas Antibakteri dengan Metoda Cakram..... | 18 |
| IV. | HASIL DAN PEMBAHASAN | |
| 4.1 | Pengujian Profil Fitokimia dari Kulit Batang Kecapi..... | 20 |
| 4.2 | Hasil Isolasi Senyawa Metabolit Sekunder | 20 |
| 4.3 | Karakterisasi..... | 24 |
| 4.3.1 | Spektroskopi UV..... | 24 |
| 4.3.2 | Spektroskopi Infra Merah..... | 25 |
| 4.4 | Antibakteri Fraksi pada Ekstrak Kulit Batang Kecapi dan Senyawa Hasil Isolasi | 26 |
| V. | KESIMPULAN DAN SARAN | |
| 5.1 | Kesimpulan..... | 27 |
| 5.2 | Saran..... | 27 |
| | DAFTAR PUSTAKA..... | 28 |
| | Lampiran..... | 30 |

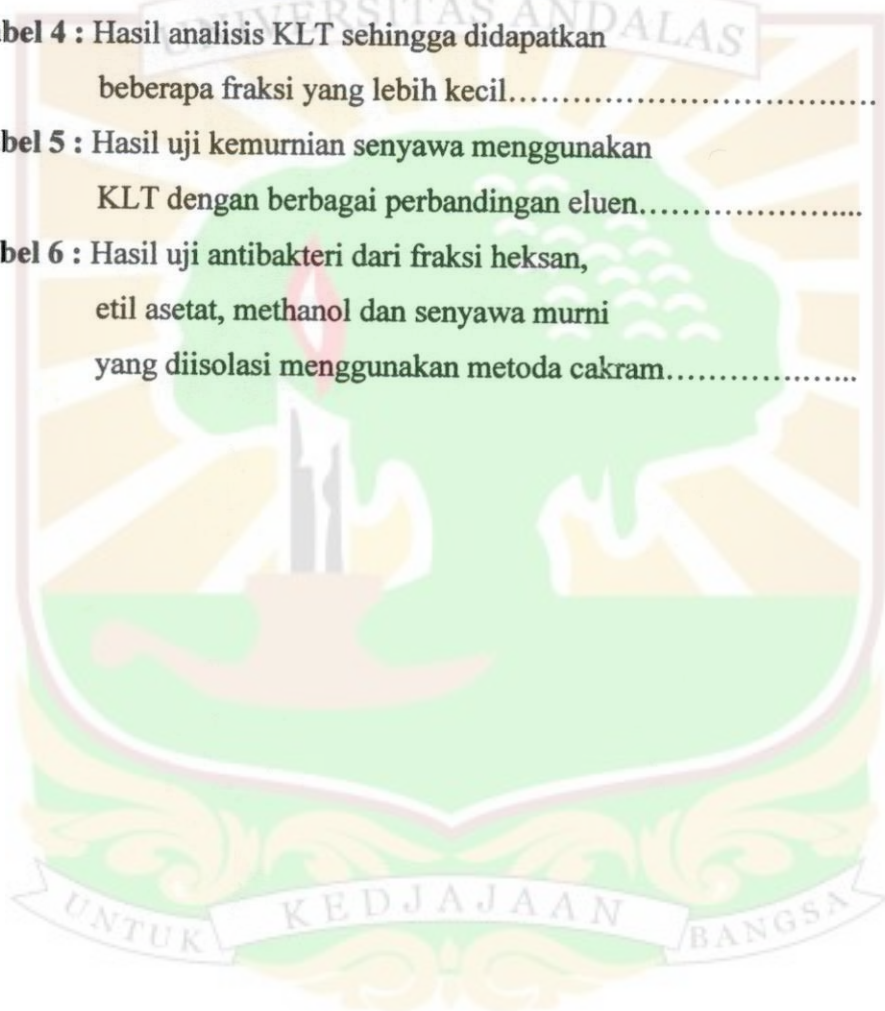
DAFTAR GAMBAR

| | Halaman |
|--|---------|
| 1. Gambar 1 : Pohon, daun dan buah <i>Sandoricum koetjape</i> Merr..... | 4 |
| 2. Gambar 2 : Senyawa yang telah diisolasi dari tanaman kecap..... | 5 |
| 3. Gambar 3 : Biosintesis terpenoid..... | 7 |
| 4. Gambar 4 : Diagram fasa pertumbuhan bakteri..... | 13 |
| 5. Gambar 5 : Spektrum UV dari triterpenoid..... | 24 |
| 6. Gambar 6 : Spektrum IR dari triterpenoid..... | 25 |



DAFTAR TABEL

| | Halaman |
|---|---------|
| 1. Tabel 1 : Pembagian terpenoid berdasarkan jumlah isopren penyusunnya..... | 6 |
| 2. Tabel 2 : Hasil pengujian fitokimia dari kulit batang kecap..... | 20 |
| 3. Tabel 3 : Hasil kromatografi kolom fraksi etil asetat dengan berbagai perbandingan eluen..... | 22 |
| 4. Tabel 4 : Hasil analisis KLT sehingga didapatkan beberapa fraksi yang lebih kecil..... | 23 |
| 5. Tabel 5 : Hasil uji kemurnian senyawa menggunakan KLT dengan berbagai perbandingan eluen..... | 23 |
| 6. Tabel 6 : Hasil uji antibakteri dari fraksi heksan, etil asetat, methanol dan senyawa murni yang diisolasi menggunakan metoda cakram..... | 26 |



DAFTAR LAMPIRAN

| | Halaman |
|---|---------|
| 1. Lampiran 1 : Skema kerja isolasi triterpenoid dari kulit batang kecap (<i>Sandoricum koetjape</i> Merr)..... | 30 |
| 2. Lampiran 2 : Pemurnian senyawa triterpenoid..... | 31 |
| 3. Lampiran 3 : Skema uji aktifitas antibakteri..... | 32 |
| 4. Lampiran 4 : Uji aktifitas antibakteri dengan metoda cakram..... | 33 |



BAB I

PENDAHULUAN

1.1 Latar Belakang

Hutan tropis merupakan sumber yang kaya akan beragam jenis tumbuhan. Tumbuhan ini dapat dimanfaatkan untuk berbagai hal mulai dari pemanfaatan hutan untuk tujuan kayu hingga non-kayu seperti obat-obatan, insektisida dan berbagai manfaat lainnya.

Satu diantara ribuan spesies tumbuhan menarik dari segi fitokimia adalah famili Meliaceae, dimana senyawa metabolit sekunder yang terkandung di dalamnya dilaporkan mempunyai aktifitas biologis sebagai antiplasmodium, sitotoksik, antifeeding, insektisida, anti kanker,^{1,2,3,4,5}. Tumbuhan ini ditemukan didaerah tropis dan sub-tropis, terdiri dari 50 – 52 genus dan 550 spesies. Famili ini terdistribusi di daratan Cina, Indonesia, Vietnam, Malaysia, dan Philipina. Di Indonesia Meliaceae ditemukan sebanyak 91 spesies dari 17 genus, di Afrika ditemukan 84 spesies dan juga ditemukan di Australia.⁶

Salah satu spesies dari Meliaceae adalah kecapi (*Sandoricum koetjape* Merr.) merupakan salah satu spesies dari Meliaceae. Kecapi memiliki nama-nama yang berbeda dari berbagai Negara seperti: sentol, santol, kechapi (Inggris), sentul, kecapi, ketuat (Indonesia), Sino-Tibetan (Laos), santor atau katul (Philippnes). Kecapi ini biasa dimanfaatkan sebagai obat-obatan. Daun dari kecapi biasa digunakan untuk infeksi kulit, menyembuhkan panas dan diare. Bubuk kulit kayu kecapi digunakan sebagai obat kurap, dan anti kanker. Akarnya digunakan sebagai anti-diarrhetic, antiseptic, dan tonik yang diberikan kepada ibu yang baru melahirkan.⁷

Beberapa senyawa yang memiliki bioaktifitas menarik telah diisolasi dari tumbuhan ini. Sebagai contoh sentulic acid diisolasi dari kulit batang kecapi, memiliki aktifitas sebagai sitotoksik³. Senyawa antifeedant yaitu sandiricin dan 6-hidroksisandoricin telah diisolasi dari ekstrak biji tanaman tersebut⁸. Namun dari penelusuran literature, belum ada dilakukan uji bioktifitas antibakteri terhadap kulit batang tanaman kecapi.

Bakteri merupakan mikroorganisme ber-sel satu, tidak berklorofil, yang dapat bersifat patogen bagi tubuh. Bakteri *Escheria coli* merupakan bakteri flora murni usus namun dalam keadaan tidak normal dapat bersifat patogen, umumnya dapat menyebabkan diare. Bakteri ini juga menyebabkan infeksi saluran kemih. Bakteri *Staphylococcus aureus* merupakan bakteri flora normal pada mulut dan saluran pernafasan tetapi dalam keadaan tidak normal dapat bersifat patogen, yang umumnya dapat menyebabkan infeksi pada kulit⁷. Bakteri *Salmonella typhimurium* merupakan bakteri gram negative yang menyebabkan penyakit tifus pada manusia.⁹

Dari uraian diatas maka peneliti akan melakukan isolasi metabolit sekunder yang terkandung pada tumbuhan kecap dan melakukan uji antibakteri terhadap ekstrak tanaman kecap.

1.2 Perumusan Masalah

1. Diantara fraksi heksan, etil asetat dan metanol, fraksi mana yang paling aktif terhadap antibakteri?
2. Bagaimana mengisolasi dan mengidentifikasi senyawa hasil isolasi dari fraksi aktif ?

1.3 Tujuan Penelitian

Penelitian ini bertujuan untuk mengisolasi dan mengkarakterisasi salah satu senyawa metabolit sekunder dari fraksi yang aktif antibakteri pada ekstrak kulit batang kecap.

1.4 Manfaat Penelitian

Hasil penelitian ini diharapkan dapat menginformasikan tentang senyawa triterpenoid yang diisolasi dari fraksi aktif antibakteri. Akhir dari penelitian ini diharapkan dapat memberikan kontribusi positif dalam pengembangan ilmu kimia organik bahan alam serta kemajuan industri obat-obatan.

BAB II

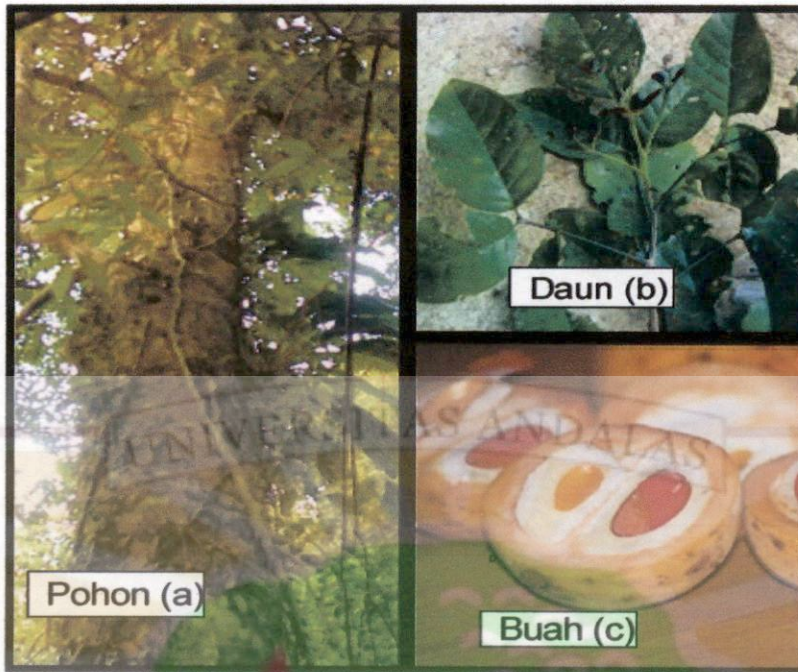
TINJAUAN PUSTAKA

2.1 Tinjauan Botani

Tumbuhan kecapri merupakan tumbuhan yang rimbun dan besar, batangnya dapat tumbuh tegak hingga mencapai 30 m dan diameternya 70-90 cm. Batangnya memiliki getah seperti susu. Bentuk daun pada tumbuhan ini adalah majemuk berselang-seling, bertangkai sampai dengan 18 cm, menyirip beranak daun tiga, bentuk jorong sampai bundar telur, membulat atau agak runcing di pangkal, meruncing di ujung, hijau berkilat di sebelah atas, hijau kusam di bawahnya. Anak daun ujung bertangkai panjang, jauh lebih panjang dari tangkai anak daun sampingnya. Bunga dari tanaman ini berambut, menggantung, sampai dengan 25 cm dan terletak dalam malai di ketiak daun. Bunga berkelamin dua, bertangkai pendek; kelopak bertaju 5, mahkota 5 helai, kuning hijau, samar-samar berbau harum. Bentuk buah bulat agak gepeng, kuning atau kemerahan jika masak, berbulu halus seperti beludru. Daging buah bagian luar tebal dan keras, menyatu dengan kulit, kemerahan, daging buah bagian dalam lunak dan berair, melekat pada biji, putih, masam sampai manis. Biji 2-5 butir, besar, bulat telur agak pipih, coklat kemerahan berkilat; keping biji berwarna merah.¹⁰ Gambar dari kecapri ini dapat dilihat pada Gambar 1.

Klasifikasi dari tumbuhan ini adalah sebagai berikut :

| | |
|---------------|-----------------|
| Kingdom | : Plantae |
| Subkingdom | : Tracheobionta |
| Superdivision | : Spermatophyta |
| Division | : Magnoliophyta |
| Class | : Dicotyledonae |
| Subclass | : Rosidae |
| Order | : Sapindales |
| Family | : Meliaceae |
| Genus | : Sandoricum |
| Species | : Koetjape |

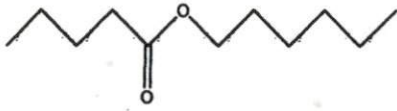


Gambar 1 : Pohon, daun dan buah *Sandoricum koetjape* Merr¹¹

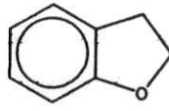
2.2 Senyawa Metabolit Sekunder yang Terkandung pada Tanaman Kecapi

Beberapa penelitian yang telah di publikasikan mengenai tanaman kecapi adalah oleh I.M.Dira Swantara, dkk dari Universitas Udayana, Bali yang mana pada ekstrak daun kecapi terdapat lima metabolit sekunder (heksil n-valerat; 2,3-dihidro benzofuran; 2,6 dimetoksi fenol; 3,5-di-tert-butyl-4 hidroksi-toluena ; dioktil heksadioat) yang identifikasikan dari fraksi yang aktif terhadap antibakteri. Dari kelima senyawa yang dilaporkan, peneliti menyebutkan bahwa dioktil heksadioat merupakan senyawa yang memberikan pengaruh besar terhadap antibakteri.¹²

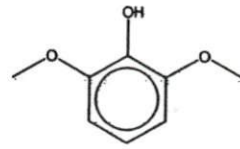
Mai Efdi, dkk juga melaporkan adanya senyawa triterpenoid pada kulit batang tanaman kecapi, yaitu asam sentulik dan asam 3-oksolean-12-en-27-oat. Kedua senyawa ini dilaporkan sebagai *cytotoxic* pada penyakit promyelocytic leukemia HL-60 pada manusia². Asam Katonat dan Asam koetjape telah diisolasi dari kulit batang tanaman kecapi oleh Zeyad D. Nassar, dkk.¹³ Powell,R.G, dkk menginformasikan adanya senyawa limonoid, yaitu sandoricin dan 6-hidroksisandoricin pada ekstrak biji tanaman kecapi yang merupakan senyawa yang aktif sebagai antifeedant⁷ Struktur dari senyawa yang dilaporkan tersebut dapat dilihat pada Gambar 2.



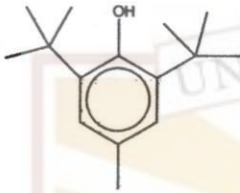
Heksil n-valerat¹²



2,3-dihidro benzofuran¹²



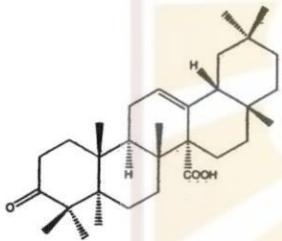
2,6 dimetoksi fenol¹²



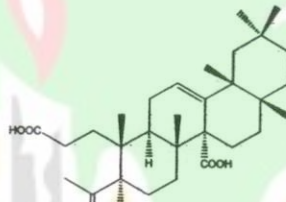
3,5-di-tert-butil-4 hidroksi-toluena¹²



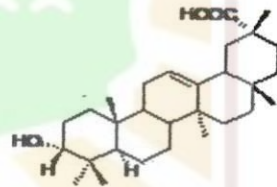
Dioktil heksadioat¹²



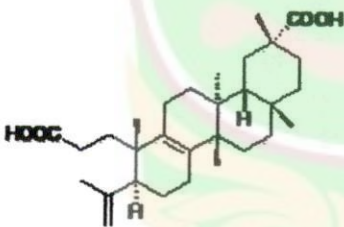
Asam 3-oksolean-12-en-27-oat²



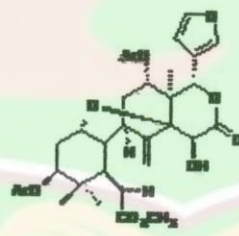
asam sentulik²



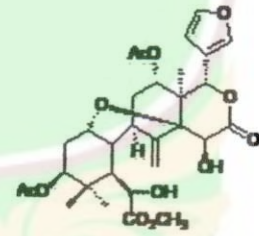
Asam Katonat¹³



Asam Koetjape¹³



Sandoricin⁷

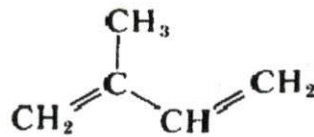


6-hidroksisandoricin⁷

Gambar 2 : Senyawa yang telah diisolasi dari tanaman kecapi

2.3 Terpenoid

Terpenoida merupakan senyawa metabolit sekunder yang tersusun dari kerangka dasar C-5 yang disebut dengan isopren.¹⁴ Bau khas yang terdapat pada tiap tanaman dihasilkan oleh senyawa volatil dengan rantai C₁₀ ataupun C₁₅ yang biasa disebut dengan senyawa terpen¹⁵. Dari struktur dasar isopren, terpenoid dapat dibagi menjadi beberapa jenis, salah satunya adalah triterpenoid.



Isopren

Isopren merupakan ikatan rantai C-5 yang memiliki kepala dan ekor. Beberapa jenis terpenoid berdasarkan jumlah isopren penyusunnya dapat dilihat pada Tabel 1.

Tabel 1. Pembagian terpenoid berdasarkan jumlah isopren penyusunnya

| No | Jenis terpen | Jumlah atom C | Contoh |
|----|--------------|-----------------|-----------|
| 1 | Monoterpen | C ₁₀ | Mircen |
| 2 | Sesquiterpen | C ₁₅ | Cariopile |
| 3 | Triterpenoid | C ₃₀ | Squalen |
| 4 | Tetraterpen | C ₄₀ | lycopen |

2.3.1 Biosintesis Terpenoid

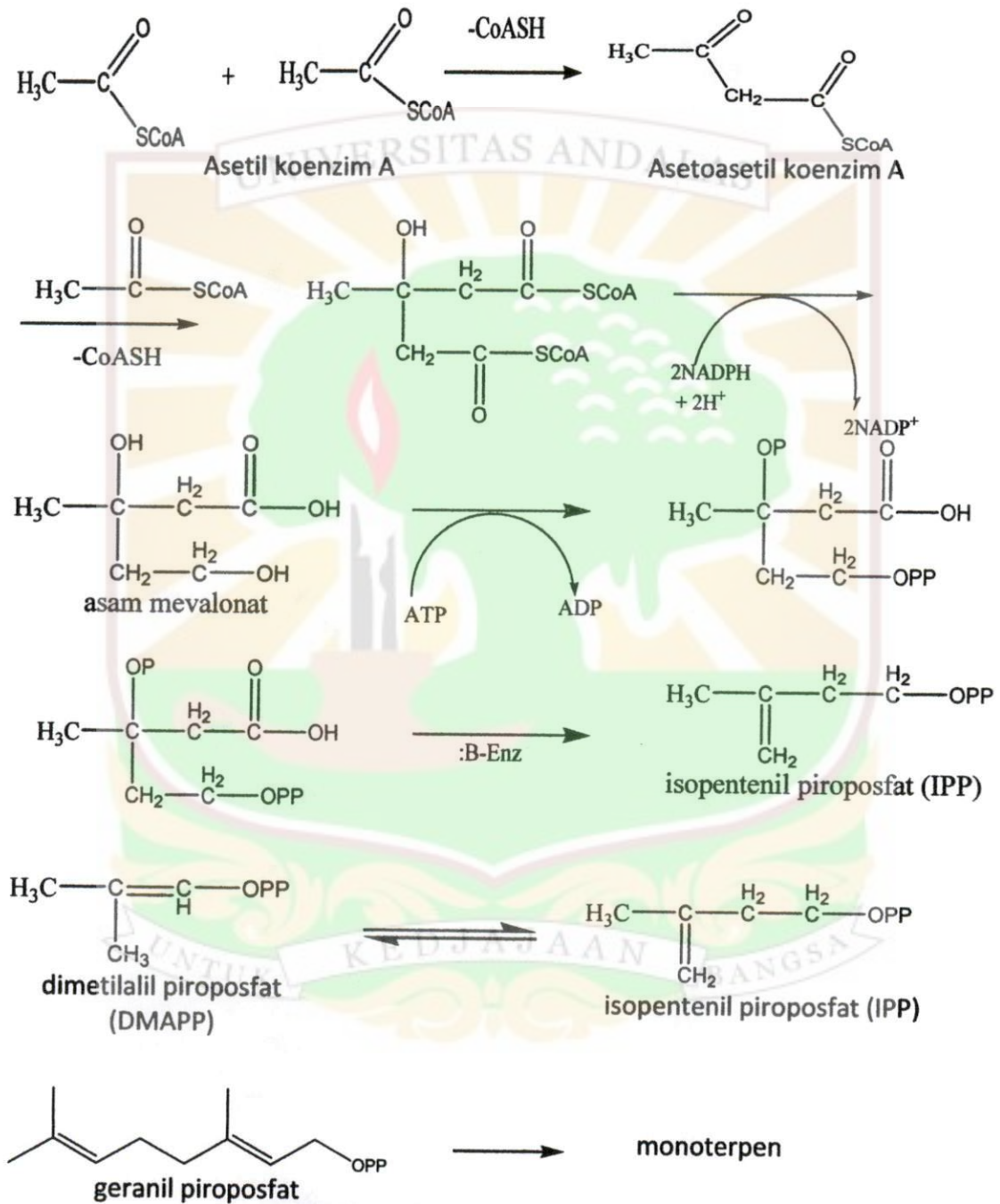
Secara umum biosintesis terpenoid terjadi pada tiga reaksi dasar :

1. Pembentukan isopren aktif berasal dari asam asetat melalui asam mevalonat
 2. Penggabungan kepala dan ekor dua unit isopren atau lebih yang akan membentuk monoterpen, sesquiterpen, dst.
 3. Penggabungan kepala dan ekor dari unit C₁₅ akan menghasilkan triterpenoid
- Biosintesis dari terpenoid dapat dilihat dari Gambar 3.

2.3.2 Triterpenoid

Triterpenoid adalah senyawa berstruktur siklik, terdiri dari 20 jenis kerangka yang tergantung pada kecenderungan skualena dengan keenam ikatan rangkapnya dalam melakukan multisiklisasi. Terikat berupa alkohol, aldehida, atau asam karboksilat. Merupakan senyawa tidak berwarna, berbentuk kristal, sering kali bertitik leleh tinggi dan optis aktif, umumnya sukar dicirikan karena tidak ada kereaktifan kimianya . Uji yang banyak dilakukan adalah reaksi Liebermann-Burchard (Asetat Anhidrat-H₂SO₄p) yang dengan kebanyakan triterpenoid memberikan wama merah-ungu.¹²

Alkaloid, terpenoid dan glikosida merupakan agent yang aktif melawan berbagai patogen (seperti : serangga, jamur, atau bakteri) atau merupakan molekul pertumbuhan (seperti : hormon). Selain itu, senyawa metabolit sekunder ini dapat digunakan untuk obat antikanker yang secara langsung aktif dalam melawan sel.¹⁶



Gambar 3. Biosintesis terpenoid

2.4 Metode Ekstraksi

Semua senyawa organik yang terdapat didalam larutan, tumbuh-tumbuhan dan hewan dapat diekstrak dengan menggunakan berbagai teknik ekstraksi dengan bantuan pelarut seperti heksan, petroleum eter, kloroform, metanol, dan lain-lain. Terdapat berbagai metode dalam mengekstraksi senyawa tersebut. Beberapa metode yang umum digunakan adalah maserasi, perkolasi, dan sokletasi.

2.4.1. Maserasi

Maserasi atau perendaman merupakan teknik pengekstrakan yang paling klasik. Sampel yang telah dihaluskan, direndam dalam suatu pelarut organik selama beberapa waktu. Kemudian disaring, dan hasilnya didapat berupa filtrat. Proses maserasi dapat dilakukan tanpa pemanasan atau dengan pemanasan, atau dengan pengocokan menggunakan ultrasonik.

2.4.2 Perkolasi

Perkolasi merupakan teknik pengekstrakan yang dikembangkan dari maserasi. Sampel dilarutkan dengan pelarut dengan cara melewati pelarut ke sampel. Hasil yang didapat berupa filtrat. Pelarut yang digunakan bisa dalam keadaan dingin atau panas.

2.4.3 Sokletasi

Sokletasi adalah teknik pengekstrakan yang kontinu. Sokletasi ditunjukan untuk menarik zat padat atau cair yang terdapat dalam zat padat dan dapat ditarik dengan menggunakan pelarut.

Pelarut yang digunakan untuk sokletasi adalah pelarut yang titik didihnya rendah. Peralatan sokletasi terdiri dari 3 bagian, yaitu labu, soklet, dan pendingin tegak.¹⁷

2.5 Kromatografi Lapisan Tipis

Kromatografi lapis tipis (KLT) fase diamnya berupa lapisan dan fase geraknya mengalir karena kerja kapiler. Dalam kajian analisis kualitatif, kromatografi lapis tipis sangat umum digunakan dalam teknik analisis kimia, antara lain :

1. Untuk identifikasi suatu senyawa.
2. Untuk mengetahui berapa banyak jenis senyawa dalam suatu campuran (kemurnian)
3. Untuk mengetahui pelarut/ perbandingan pelarut yang cocok untuk pemisahan pada kromatografi kolom.
4. Untuk memonitor pemisahan pada kromatografi kolom.

Visualisasi untuk senyawa yang tidak berwarna harus dideteksi dengan cara penyinaran lampu UV, dengan memasukkan ke dalam uap iodin, atau dengan pereaksi penampak noda seperti dragendorff. Noda yang di dapat ditandai dengan pensil untuk menentukan harga Rf yang berkisar 0-1. Harga Rf dapat dihitung dengan membandingkan jarak yang ditempuh komponen dengan jarak yang ditempuh eluen ¹⁸

2.6 Kromatografi Kolom

Kromatografi kolom merupakan salah satu metode kromatografi dengan fase gerak cair dan fase diam padat. Penggunaan fase gerak (eluen) disesuaikan dengan kepolaran senyawa yang akan dipisahkan.

Fase diam ditempatkan dalam tabung kaca berbentuk silinder, pada bagian bawah tertutup dengan katup atau kran dan fase gerak dibiarkan mengalir ke bawah melaluinya karena gaya berat. Pada kondisi yang dipilih dengan baik, eluen yang merupakan komponen campuran, turun berupa pita dengan laju yang berlainan dan dengan demikian dipisahkan. Eluen biasanya dipisahkan dengan cara membiarkannya mengalir keluar dari kolom dan mengumpulkannya sebagai fraksi, sering kali dengan memakai pengumpul fraksi mekanis ¹⁹

2.7 Rekrystalisasi

Senyawa organik padat yang diisolasi menggunakan reaksi organik jarang didapat dalam bentuk murni. Pemurnian menggunakan rekrystalisasi ini didasarkan pada kelarutan kristal pada pelarut yang sesuai. Cara sederhana pada proses rekrystalisasi adalah sebagai berikut :

1. Larutkan kristal tidak murni pada pelarut yang sesuai dalam keadaan panas
2. Saring larutan dalam keadaan panas dari pengotor yang tidak larut.

3. Biarkan larutan panas menjadi dingin sehingga kristal terbentuk kembali
4. Pisahkan kristal dari larutan.
5. Hasil dari kristal yang dikeringkan adalah kristal murni.²⁰

2.8 Metode Identifikasi Senyawa

2.8.1 Spektroskopi UV/VIS

Spektroskopi UV/VIS didasarkan pada transisi tingkatan energi elektronik. Energi yang dibutuhkan adalah energi eksitasi elektron dari tingkat dasar ke tingkat energi yang lebih tinggi dan berada pada daerah range UV/VIS. Panjang gelombang pada daerah visible adalah antara 400-800nm sedangkan panjang gelombang untuk daerah UV adalah 200-400nm.

Hasil pengukuran yang didapat dari spektrum UV/VIS berupa panjang gelombang maksimal pada serapan maksimum. Panjang gelombang maksimal dikarakterisasi sebagai nilai absorban (A). Untuk mengoreksi efek dari konsentrasi dan panjang kuvet maka nilai absorban ini dikonversi menjadi nilai *absorbivity molar* (ϵ).²¹

$$\epsilon = \frac{A}{c.l}$$

2.8.2 Spektroskopi Infra Merah

IR spektroskopi merupakan salah satu metode yang digunakan untuk menentukan komponen pada suatu senyawa organik. IR sangat berguna dalam menentukan gugus fungsi yang terikat pada suatu molekul. IR merupakan spektrum elektromagnetik yang rangenya berada diantara *microwave* dan daerah *visible*.²¹

Range dari spektrum IR adalah diantara 10.000 – 100 cm^{-1} yang diabsorpsi dan dikonversikan oleh molekul organik yang berasal dari energi vibrasi molekul. Ada dua macam vibrasi molekul, yaitu *stretching* dan *bending*. Posisi pita pada spectra IR dinyatakan dalam bentuk angka gelombang (cm^{-1})²²

Setiap gugus fungsi memiliki serapan pada angka gelombang yang spesifik. Beberapa contoh gugus fungsi beserta dengan angka gelombangnya adalah :

1. CH_3 pada group germinal dimetil memiliki serapan pada panjang gelombang spesifik. Untuk gugus isopropil, serapan maksimumnya ditunjukkan pada

- angka gelombang $1385 - 1380 \text{ cm}^{-1}$ dan $1370 - 1365 \text{ cm}^{-1}$. Gugus tersierbutil muncul pada angka gelombang $1395 - 1385 \text{ cm}^{-1}$ dan sekitar 1370 cm^{-1}
2. Vibrasi gugus C-H muncul pada angka gelombang $3100 - 2850 \text{ cm}^{-1}$
 3. Hidrokarbon aromatik akan terlihat di spektrum IR pada angka gelombang $1300 - 1000 \text{ cm}^{-1}$ (*bending*) dan $1600-1585 \text{ cm}^{-1}$ dan $1500 - 1400 \text{ cm}^{-1}$ (*stretching*)
 4. Gugus O-H tampak pada angka gelombang $3550 - 3200 \text{ cm}^{-1}$ dengan puncak yang meluas.
 5. C-O memiliki serapan maksimal pada angka gelombang $1260 - 1000 \text{ cm}^{-1}$
 6. Gugus C=O terlihat pada angka gelombang $1740 - 1720 \text{ cm}^{-1}$ (aldehid), $1870 - 1540 \text{ cm}^{-1}$ (keton), $1720 - 1706 \text{ cm}^{-1}$ (asam karboksilat), $1750 - 1735 \text{ cm}^{-1}$ (ester).
 7. Serapan pada panjang gelombang $1640 - 1680 \text{ cm}^{-1}$ yang menandakan adanya gugus C=C

2.9 Antibakteri

Antibakteri merupakan suatu zat yang dapat mengganggu metabolisme bakteri. Berdasarkan aktifitasnya antibakteri dapat dibagi menjadi dua, yaitu : memiliki aktifitas bakteristatik (menghambat pertumbuhan bakteri) dan memiliki aktifitas bakterisidal (membunuh bakteri).²³

2.9.1 Metode Pengujian Antibakteri

Penentuan aktivitas antibakteri secara *in vitro* dapat dikelompokkan dalam dua metode, yaitu :

1. Metode turbidimetri (metode tabung)

Pada cara turbidimetri, digunakan medium agar cair dalam tabung reaksi. Pengamatan dengan melihat kekeruhan yang terjadi akibat pertumbuhan bakteri. Kadar antibakteri ditentukan dengan menggunakan spektrofotometer. Kelebihan cara ini adalah lebih cepat dari cara difusi agar karena hasil dapat dibaca setelah 3 atau 4 jam setelah inkubasi.

2. Metode difusi (metode lempeng)

Pada cara difusi agar digunakan media agar padat dan reservoir yang dapat berupa cakram kertas, silinder atau cekungan yang dibuat pada media padat. Larutan uji akan berdifusi dari pencadang ke permukaan media agar padat yang telah diinokulasi bakteri. Bakteri akan terhambat pertumbuhannya dengan pengamatan berupa lingkaran atau zona disekeliling pencadang²⁴.

2.9.2 Spektrum Aksi Antibakteri

Ruang lingkup bakteri yang dapat dipengaruhi oleh zat antibakteri disebut spektrum aksi antibakteri. Berdasarkan spektrum aksinya, antibakteri dapat dibagi menjadi tiga, yaitu :

1. Spektrum luas

Antibakteri dikatakan berspektrum luas apabila zat tersebut mampu melawan bakteri baik menghambat maupun membunuh bakteri gram positif dan gram negatif dalam ruang lingkup yang luas

2. Spektrum sempit

Antibakteri ini hanya efektif melawan sebagian gram positif atau gram negatif

3. Spektrum terbatas

Zat antibakteri ini hanya efektif untuk melawan suatu spesies bakteri tertentu saja.²³

2.9.3 Fase Pertumbuhan Bakteri

Fase pertumbuhan bakteri terbagi menjadi empat tahap dimana diagram fasanya dapat dilihat pada Gambar 4. Adapun fasa pertumbuhan bakteri adalah :

1. Fase penyesuaian (A)

Fase ini merupakan fase dimana terjadi penyesuaian sel-sel yang kekurangan metabolit dan enzim akibat keadaan yang tidak menguntungkan pada pembiakan terdahulu mulai menyesuaikan diri dengan pembiakan yang baru. Pada fase ini tidak terjadi penambahan jumlah bakteri tetapi terjadi penambahan ukuran dari sel hingga enzim dan zat yang dibutuhkan untuk pertumbuhan mencapai konsentrasi yang memungkinkan untuk pertumbuhan.

2. Fase eksponensial (B)

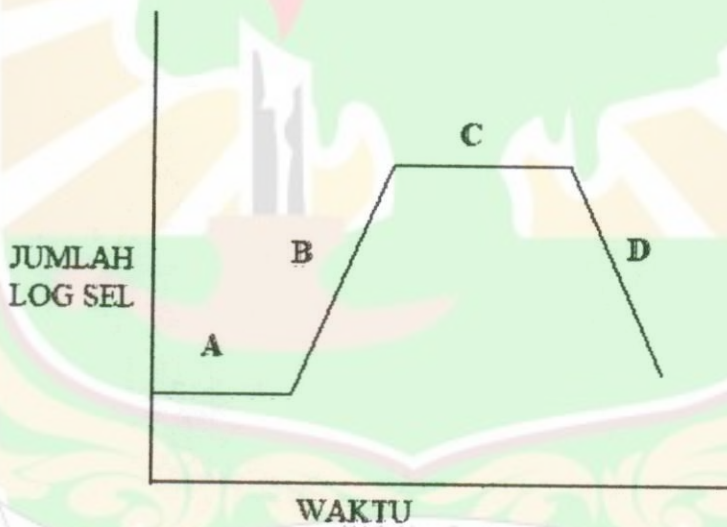
Pada fase ini sel baru mulai terbentuk secara konstan. Selain itu massa dari sel baru yang tumbuh ini juga bertambah sehingga massa menjadi dua kali lipat.

3. Fase stationer (C)

Pada fase ini terjadi penumpukan hasil metabolisme beracun dan kehabisan makanan sehingga pertumbuhan bakteri berhenti. Pada fase ini jumlah kematian bakteri dengan jumlah pertumbuhan sama sehingga jumlah sel konstan.

4. Fase kematian (D)

Fase ini merupakan fase dimana terjadi penumpukan bahan yang bersifat toksik, sementara zat untuk pertumbuhan mulai berkurang sehingga terjadi kematian pada bakteri. Pada fase ini jumlah sel makin menurun.⁸



Gambar 4. Diagram fasa pertumbuhan bakteri

MILIK
UPT PERPUSTAKAAN
UNIVERSITAS ANDALAS

BAB III METODE PENELITIAN

3.1. Waktu dan Tempat Penelitian

Penelitian dilaksanakan mulai bulan Januari sampai Juni 2012 bertempat di Laboratorium Kimia Organik Bahan Alam dan Laboratorium Bioteknologi Jurusan Kimia Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam Universitas Andalas Padang.

3.2. Alat dan Bahan

3.2.1. Alat

Peralatan yang digunakan adalah seperangkat alat distilasi, *rotary evaporator*, plat KLT (silica gel 60 F 254), lampu UV $\lambda = 254$ dan 356 nm, kolom kromatografi, Spektroskopi ultraviolet UV-Vis Secoman S 1000 PC, spektroskopi inframerah FTIR Perkin Elmer 1600 series, fisher melting point apparatus dan berbagai peralatan gelas yang umum digunakan dalam laboratorium.

3.2.2. Bahan Tumbuhan dan Mikroba

Tumbuhan Kecapi (*Sandoricum koetjape* Merr) diperoleh dari Hutan Pendidikan dan Penelitian Biologi (HPPB) Universitas Andalas yang diambil pada tahun 2011. Sampel berupa kulit batang tanaman kecapi yang dikering-anginkan sehingga didapat 2,5 Kg.

Mikroba yang digunakan adalah *Escherichia coli* dan *Salmonella typhimurium* yang merupakan bakteri gram negatif. Sedangkan bakteri gram positif digunakan *Staphylococcus aureus*.

3.2.3. Bahan Kimia

Bahan-bahan kimia yang digunakan antara lain heksana, dikloro metana, dan etil asetat (yang ketiganya merupakan pelarut teknis yang telah didistilasi). Heksana dan etil asetat digunakan sebagai pelarut saat meserasi, sedangkan eluen yang digunakan untuk kromatografi kolom adalah heksana, dikloro metana dan etil asetat. Absorben yang digunakan pada kromatografi kolom adalah silika gel 60

(0,063-0,200 mm), Pereaksi Meyer dipakai untuk identifikasi alkaloid, pereaksi Liebermann- Burchard untuk identifikasi terpenoid dan steroid, HCl pekat dan bubuk Mg untuk identifikasi flavonoid dan FeCl_3 untuk identifikasi fenolik. Medium NA dan LB instan sebagai media pertumbuhan dan peremajaan bakteri.

3.3. Pembuatan Reagen untuk Uji Fitokimia

3.3.1. Pembuatan Besi (III) Klorida 5%

Sebanyak 5 gram besi (III) klorida di larutkan dengan air suling hingga volume 100 mL.

3.3.2 Pembuatan Pereaksi Meyer

Sebanyak 2,266 gram raksa (II) klorida dilarutkan dengan air suling hingga volume 100 mL (menjadi larutan I). Pada wadah lain, dilarutkan 50 gram kalium iodide kedalam air suling hingga volume 100mL (larutan II). Kemudian 60 mL larutan I dicampurkan dengan 10 mL larutan II dan ditambahkan dengan air suling hingga volume 100mL.

3.3.3 Pembuatan Asam Sulfat 2N

Sebanyak 5,6mL asam sulfat pekat diencerkan dengan air suling hingga volume larutan dicukupkan menjadi 100mL.

3.4. Uji Profil Fitokimia

Metode pemeriksaan kandungan flavonoid, triterpenoid, steroid, dan senyawa fenolik diadopsi dari Simens et.al., yaitu :

Sampel bubuk kering sebanyak 2 gram dimasukkan ke dalam tabung reaksi, kemudian dimaserasi dengan metanol yang telah dipanaskan (di atas penangas air) selama 15 menit. Kemudian disaring panas-panas ke dalam tabung reaksi lain dan biarkan seluruh metanol menguap hingga kering. Lalu ditambahkan kloroform dan air suling dengan perbandingan 1:1 masing-masingnya sebanyak 5 mL, kocok dengan baik, kemudian pindahkan ke dalam tabung reaksi, biarkan sejenak hingga terbentuk dua lapisan kloroform-air. Lapisan kloroform di bagian bawah digunakan untuk pemeriksaan senyawa

triterpenoid dan steroid sedangkan fraksi air digunakan sebagai uji terhadap senyawa flavonoid, fenolik dan saponin.

1. Pemeriksaan Flavonoid (Sianidin Tes)

Sebagian dari lapisan air diambil dan dipindahkan dengan menggunakan pipet ke dalam tabung reaksi, kemudian tambahkan asam klorida pekat dan beberapa butir bubuk magnesium, terbentuknya warna orange sampai merah menunjukkan adanya flavonoid (kecuali untuk flavon).

2. Pemeriksaan Fenolik

Sebagian dari lapisan air diambil dan dipindahkan dengan pipet ke dalam tabung reaksi kecil, kemudian tambahkan pereaksi FeCl_3 , terbentuknya warna biru/ungu menandakan adanya kandungan senyawa fenolik.

3. Pemeriksaan Saponin

Dari lapisan air, kocok kuat-kuat dalam sebuah tabung reaksi, terbentuknya busa yang tidak hilang dengan penambahan beberapa tetes HCl pekat menunjukkan adanya saponin.

4. Pemeriksaan Triterpenoid dan Steroid (Liebermann Burchard)

Dari lapisan kloroform diambil sedikit dan dimasukkan ke dalam tiga lubang plat tetes, biarkan hingga kering. Ke dalam satu lubang plat tetes ditambahkan H_2SO_4 pekat, ke dalam lubang plat tetes lainnya ditambahkan setetes anhidrida asetat dan setetes H_2SO_4 pekat. Terbentuknya warna hijau atau hijau biru menandakan adanya steroid, sedangkan bila terbentuknya warna merah atau merah ungu menandakan adanya triterpenoid.

5. Pemeriksaan Alkaloid

Sampel sebanyak 2 – 4 gram dipotong kecil-kecil, kemudian dihaluskan dalam lumpang dengan penambahan sedikit pasir dan 10 mL kloroform-amoniak 0,05 N, kemudian diaduk/digerus perlahan. Larutan disaring dengan corong kecil, di dalamnya diletakkan kapas sebagai penyaring dan hasil saringan dimasukkan ke dalam sebuah tabung reaksi, kemudian tambahkan 10 tetes H_2SO_4 2 N dan kocok secara perlahan. Biarkan sejenak sampai terbentuk pemisahan lapisan asam dan kloroform. Lapisan asam diambil dengan bantuan pipet dan dipindahkan ke dalam sebuah tabung reaksi. Kemudian tambahkan pereaksi

Meyer, reaksi positif ditandai dengan adanya endapan putih (+4), kabut putih tebal (+3), kabut putih tipis (+2), kabut putih sangat tipis (+1).

6. Pemeriksaan Kumarin

Sampel sebanyak 2 – 5 gram dirajang halus dan diekstrak dengan pelarut metanol. Hasil ekstrak ditotolkan pada batas bawah plat KLT dengan menggunakan pipa kapiler, dibiarkan kering pada udara terbuka. Kemudian dielusi dalam bejana yang berisi 10 mL eluen etil asetat 100%. Noda yang dihasilkan dimonitor di bawah lampu UV (365 nm). Hasil KLT kemudian disemprot dengan larutan NaOH 1% dalam etanol : air (1 : 1), dan selanjutnya dilihat dibawah lampu UV (365 nm). Adanya fluoresensi yang bertambah terang setelah disemprot dengan NaOH 1% menandakan adanya senyawa kumarin.

3.5 Isolasi dan Karakterisasi Senyawa Metabolit Sekunder dari Kulit Batang *Sandoricum koetjape* Merr

3.5.1 Isolasi Senyawa Metabolit Sekunder

Sebanyak 670 gram serbuk kulit batang tumbuhan *Sandoricum koetjape* Merr dimasukkan kedalam wadah dan dimaserasi dengan menggunakan heksana sebanyak 550 mL selama 3 hari sambil sesekali diaduk. Setelah itu disaring dan dilakukan sebanyak 5 kali pengulangan. Hasil dari maserasi kemudian diuapkan pelarutnya dengan menggunakan *rotary evaporator* dengan suhu 40°C hingga didapatkan ekstrak kental heksana.

Ampas yang didapat dari maserasi heksana tadi kemudian di maserasi lagi menggunakan etil asetat (550 mL) selama 3 hari dan pengulangan dilakukan juga sebanyak 5 kali. Hasil dari maserasi kemudian diuapkan pelarutnya dengan menggunakan *rotary evaporator* dengan suhu 40°C hingga didapatkan ekstrak kental etil asetat. Skema kerja maserasi dapat dilihat pada **Lampiran 1**

Fraksi etil asetat kemudian dikromatografi kolom menggunakan sistem SGP (*Step Gradient Polarity*) dengan eluen yang digunakan mulai dari heksana : dikloro metana = 7 : 3 hingga diklorometana : etil asetat = 2 : 8. Hasil dari kromatografi kolom ini kemudian di tampung dengan menggunakan vial dengan volume 20 mL. Hasil tampungan ini kemudian di uji dengan menggunakan KLT.

Hasil KLT dengan pola noda dan jumlah noda yang sama kemudian digabungkan sehingga didapatkan fraksi yang lebih kecil. Fraksi dengan jumlah noda yang paling sederhana dan jumlah endapan yang cukup banyak kemudian di murnikan dengan cara pencucian dan rekristalisasi. Skema kerja dapat dilihat pada **Lampiran 2**

3.5.2 Karakterisasi

Senyawa hasil isolasi yang didapatkan berupa kristal kemudian dilakukan uji triterpenoid. Kristal yang ada dilarutkan sedikit kemudian diteteskan pada plat tetes dan ditambahkan pereaksi Liebermann-Burchard.

Kristal tersebut ditentukan titik lelehnya. Yang dilakukan untuk menentukan titik leleh kristal tersebut adalah dengan cara mengambil sedikit kristal triterpenoid yang didapat kemudian dimasukkan kedalam kapiler dan ditempatkan pada alat. Hidupkan alat dan atur kenaikan suhu sedikit demi sedikit. Suhu saat triterpenoid mulai meleleh dan meleleh sempurna dicatat.

Untuk memperoleh spektrum ultraviolet digunakan alat spektrofotometer UV-Vis. Kira-kira 1 mg triterpenoid dilarutkan kedalam 100 mL metanol p.a. Alat spektrofotometer diatur daerah serapannya antara 200 – 400 nm. Masukkan larutan triterpenoid kedalam cuvet dan ukur serapannya dan tentukan serapan maksimumnya.

Selain spektrum UV di ukur juga spektrum IR untuk mengetahui gugus fungsi penyusun triterpenoid tersebut. Cara yang dilakukan untuk mendapatkan spektrum inframerah adalah dengan menggerus 1 mg padatan triterpenoid dengan 100 mg KBr sampai homogen. Kemudian dijadikan pelet dengan memberikan tekanan tinggi. Letakkan pelet pada alat spektrofotometri inframerah dan ukur spektranya.

3.6 Uji Aktifitas Antibakteri dengan Metoda Cakram

Masing-masing fraksi dan senyawa hasil isolasi dilakukan uji bioaktifitas antibakteri dengan metoda cakram. Tahap pengujian uji bioaktifitas adalah sebagai berikut :

a) Peremajaan bakteri

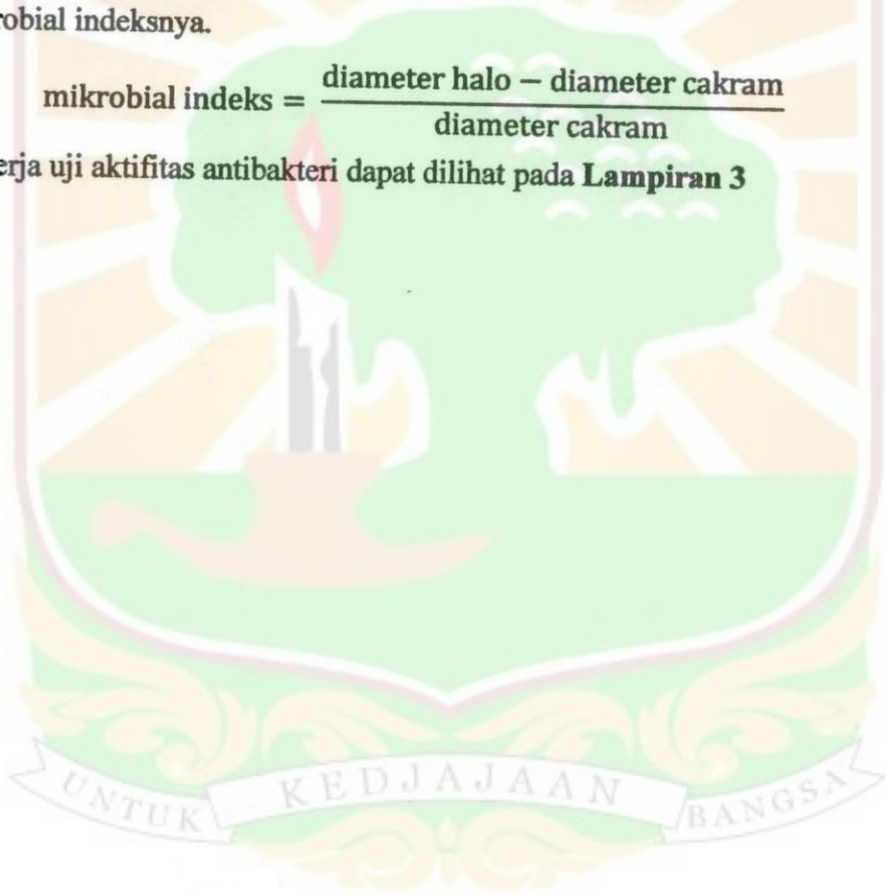
Bakteri diambil 1 ose dan kemudian dimasukkan kedalam medium LB. Biakan tersebut kemudian diinkubasi didalam enkas selama 24 jam dan setelahnya dapat digunakan

b) Prosedur bioaktivitas

Cawan petri yang steril disiapkan dan diisi dengan medium NA sebanyak 15 mL. medium tersebut kemudian dibiarkan dingin dan padat. Bakteri yang telah diremajakan tadi diambil menggunakan cotton bud dan digoreskan merata diatas medium. Cakram yang telah berisi sampel diletakan hati-hati diatas biakan tadi. Setelah 24 jam, halo yang terbentuk diamati dan diukur mikrobial indeksnya.

$$\text{mikrobial indeks} = \frac{\text{diameter halo} - \text{diameter cakram}}{\text{diameter cakram}}$$

Skema kerja uji aktifitas antibakteri dapat dilihat pada **Lampiran 3**



BAB IV HASIL DAN PEMBAHASAN

4.1 Pengujian Profil Fitokimia dari Kulit Batang Kecapi

Hasil dari pengujian kandungan metabolit sekunder (alkaloid, flavonoid, fenolik, saponin, kumarin, triterpenoid dan steroid) yang terkandung pada kulit batang kecap dapat dilihat pada Tabel 2 dibawah ini :

Tabel 2. Hasil pengujian fitokimia dari kulit batang kecap

| No | Metabolit Sekunder | Pereaksi | Pengamatan | Hasil |
|----|--------------------|---------------------|-----------------------------|-------|
| 1 | Alkaloid | Meyer | Tidak ada endapan putih | (-) |
| 2 | Flavonoid | Sianidin | Berwarna orange | (+) |
| 3 | Fenolik | FeCl ₃ | Berwarna ungu | (+) |
| 4 | Saponin | H ₂ O | Tidak terbentuk busa | (-) |
| 5 | Triterpenoid | Liebermann-Burchard | Berwarna merah keunguan | (+) |
| 6 | Steroid | Liebermann-Burchard | Tidak ada warna biru | (-) |
| 7 | Kumarin | NaOH | Berfluoresensi makin terang | (+) |

Keterangan : (+) = mengandung senyawa

(-) = tidak mengandung senyawa

Dari tabel dapat terlihat bahwa kulit batang kecap mengandung senyawa metabolit sekunder yaitu : flavonoid, fenolik, triterpenoid dan kumarin. Namun tidak mengandung metabolit sekunder lainnya, yaitu alkaloid, saponin dan steroid.

4.2 Hasil Isolasi Senyawa Metabolit Sekunder

Hasil maserasi dan pemekatan dari serbuk kulit batang kecap didapatkan fraksi heksana sebanyak 11,838 gram berwarna kuning dan fraksi etil asetat sebanyak 10,185 gram berwarna kuning kecoklatan.

Dari hasil maserasi ini terlihat bahwa jumlah fraksi heksana yang didapatkan lebih banyak dibandingkan dengan fraksi etil asetat. Jika dilihat dari segi warna, fraksi etil asetat memiliki warna yang lebih pekat dari fraksi heksana hal ini dikarenakan fraksi etil asetat mengekstrak senyawa yang bersifat lebih polar dibandingkan dengan pelarut heksana.

Selanjutnya kromatografi kolom yang dilakukan pada fraksi etil asetat. Fraksi ini dipilih karena merupakan fraksi yang paling aktif sebagai antibakteri. Fraksi etil asetat diencerkan dan dilakukan uji KLT untuk mengetahui eluen yang baik digunakan pada kromatografi kolom. Eluen yang dipakai yaitu heksana, diklorometana, dan etil asetat. Dari hasil KLT didapatkan pemisahan noda yang kurang baik sehingga untuk mengatasi hal tersebut maka pada kromatografi kolom digunakan eluen dengan sistem SGP (*Step Gradient Polarity*) dan fasa diam yang digunakan adalah silika.

Kromatografi dilakukan dengan menggunakan eluen yaitu heksana, DCM, dan etil asetat. Hasil dari kromatografi kolom ini sebanyak 222 vial (volume 20 mL) yang ditunjukkan pada Tabel 3.

Setelah dikromatografi, vial-vial tersebut kemudian di KLT kembali dan digabung vial yang memiliki pola noda yang sama sehingga didapatkan fraksi-fraksi yang lebih kecil. Hasil penggabungan ini dapat dilihat pada Tabel 4.

Dari hasil KLT ini dapat terlihat bahwa pada fraksi G merupakan fraksi yang memiliki pola noda yang paling sederhana. Fraksi G ini dipilih juga dikarenakan memiliki jumlah yang cukup memadai dibandingkan fraksi D yang juga memiliki pola noda yang sederhana. Selanjutnya fraksi G dimurnikan dengan cara pencucian dan rekristalisasi.

Pada fraksi G ditambahkan heksana dan dilakukan pengadukan. Penambahan ini menghasilkan larutan hijau dan kristal. Penambahan heksana dilakukan hingga larutan heksana tetap berwarna bening yang juga berarti pengotor yang larut pada heksana telah habis. Selanjutnya pencucian dilakukan dengan menggunakan pelarut etil asetat. Pencucian ini juga dilakukan hingga larutan kuning tidak dihasilkan lagi (artinya pengotor yang larut dalam etil asetat telah habis). Selanjutnya kristal dipindahkan kedalam vial bersih dan dilarutkan dengan aseton. Larutan ini didiamkan beberapa hari hingga aseton menguap dan

terbentuk kristal kembali. Pada vial terbentuk amorf yang menempel pada dinding vial dan kristal yang berbentuk jarum homogen pada dasar vial. Kristal jarum ini kemudian dilakukan uji kemurniannya.

Tabel 3. Hasil kromatografi kolom fraksi etil asetat dengan berbagai perbandingan eluen.

| NO | Perbandingan volume eluen | | | Volume yang digunakan (mL) | Nomor vial |
|----|---------------------------|----------------|-------------|----------------------------|------------|
| | Heksana | Dikloro metana | Etil asetat | | |
| 1 | 7 | 3 | 0 | 300 | 1-12 |
| 2 | 6 | 4 | 0 | 300 | 13-30 |
| 3 | 5 | 5 | 0 | 300 | 31-46 |
| 4 | 4 | 6 | 0 | 300 | 47-61 |
| 5 | 3 | 7 | 0 | 300 | 62-79 |
| 6 | 2 | 8 | 0 | 300 | 80-100 |
| 7 | 1 | 9 | 0 | 300 | 101-117 |
| 8 | 0 | 10 | 0 | 250 | 118-128 |
| 9 | 0 | 9 | 1 | 250 | 129-145 |
| 10 | 0 | 8 | 2 | 250 | 146-159 |
| 11 | 0 | 7 | 3 | 250 | 160-173 |
| 12 | 0 | 6 | 4 | 250 | 174-185 |
| 13 | 0 | 4 | 6 | 250 | 186-196 |
| 14 | 0 | 3 | 7 | 250 | 197-210 |
| 15 | 0 | 2 | 8 | 250 | 211-222 |

Kristal diuji kemurniannya dengan menggunakan KLT. Kristal yang ada kemudian dilarutkan dengan menggunakan aseton. Selanjutnya dielusi dengan menggunakan DCM : Etil asetat (9:1) dan dilihat pada lampu UV pada panjang gelombang 254 dan 356 nm. Hasil dari UV ini tidak menunjukkan noda apapun yang artinya bahwa senyawa ini tidak tampak pada lampu UV. Selanjutnya digunakan asam sulfat 2N sebagai pengungkap noda dan dipanaskan diatas hot plat. Hasil yang didapatkan timbul satu noda berwarna kemerahan dengan Rf

sebesar 0,875. Untuk mempertegas kemurnian dari Kristal yang didapat maka dilakukan pengujian dengan menggunakan berbagai perbandingan eluen. Hasil dari KLT beserta nilai Rfnya dapat terlihat pada Tabel 5.

Tabel 4. Hasil analisis KLT sehingga didapatkan beberapa fraksi yang lebih kecil

| No | Fraksi | No. vial | Pola noda | Rf |
|----|--------|----------|-----------------------|-------------------|
| 1 | A | 1-42 | Tidak ada | - |
| 2 | B | 43- 70 | Tailing | - |
| 3 | C | 71-116 | Tailing | - |
| 4 | D | 117- 122 | Satu noda dan tailing | 0,325 ; - |
| 5 | E | 123-130 | Satu noda dan tailing | 0,35; - |
| 6 | F | 131-136 | Satu noda dan tailing | 0,4; - |
| 7 | G | 137 | Satu noda dan tailing | 0,525 ; - |
| 8 | H | 138-141 | Dua noda dan tailing | 0,275 ; 0,626 ; - |
| 9 | I | 142-155 | tailing | - |
| 10 | J | 156- 170 | Tailing | - |
| 11 | K | 171-183 | Tailing | - |
| 12 | L | 184-222 | Tailing | - |

Tabel 5. Hasil uji kemurnian senyawa menggunakan KLT dengan berbagai perbandingan eluen

| No | Eluen | Rf |
|----|----------------------------|-------|
| 1 | DCM 100% | 0,125 |
| 2 | DCM : Etil asetat (9:1) | 0,875 |
| 3 | DCM : Etil Asetat (8:2) | 0,925 |
| 4 | Heksan : etil asetat (8:2) | 0,175 |

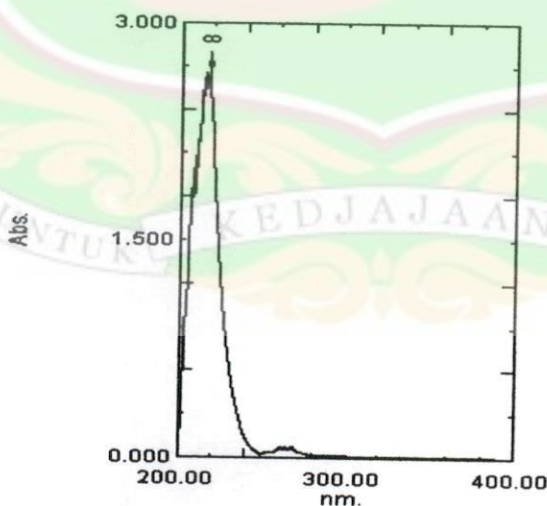
Dari hasil KLT ini terlihat bahwa kristal yang didapat telah murni. Kristal yang didapat berbentuk jarum, putih agak bening, dan memiliki berat 85 mg.

4.3 Karakterisasi

Untuk memastikan senyawa hasil isolasi yang didapatkan telah murni maka dilanjutkan dengan pengujian titik leleh. Dari hasil pengujian titik leleh, didapatkan titik leleh dari kristal ini adalah 214,3 – 215,4°C. Berdasarkan jarak titik leleh yang cukup pendek dapat diindikasikan bahwa senyawa hasil pemurnian telah murni. Pengujian menggunakan pereaksi Liebermann-Burchard memberikan warna merah yang menunjukkan senyawa ini golongan triterpenoid.

4.3.1 Spektroskopi UV

Karakterisasi senyawa hasil isolasi dilakukan dengan menggunakan spektrofotometer UV-1700 Series. Spekturm UV biasanya diperoleh dengan melewatkan cahaya dengan panjang gelombang tertentu melalui larutan encer senyawa tersebut dalam pelarut yang tidak menyerap cahaya pada panjang gelombang tersebut (misalnya air, metanol, etanol dan n-heksana). Spektrum UV yang dihasilkan oleh senyawa hasil isolasi dengan pelarut metanol memberikan serapan maksimum pada panjang gelombang 203,5 nm yang dapat terlihat pada Gambar 5.



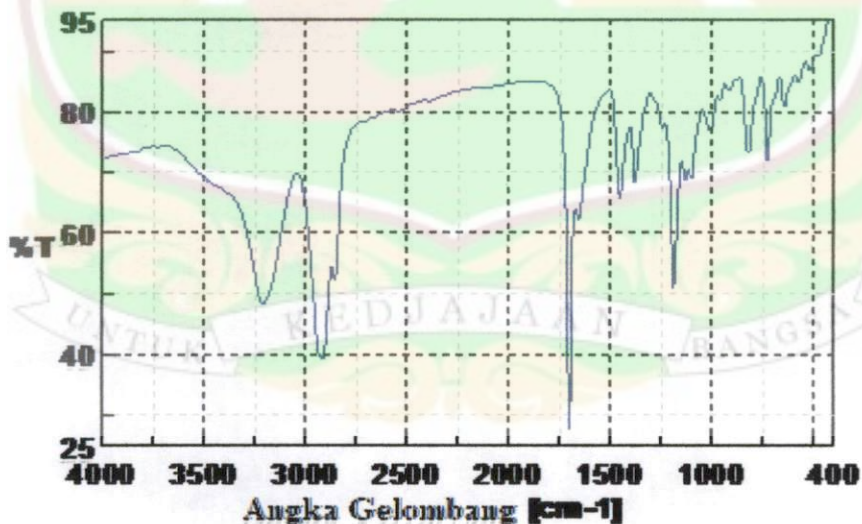
Gambar 5. Spektrum UV dari triterpenoid

Serapan maksimum pada spektrum UV ini, yaitu 203,5 nm menandakan adanya eksitasi elektron dari π ke π^* . Eksitasi elektron ini menandakan adanya ikatan rangkap pada senyawa. Pada serapan ini juga terlihat bahwa pada senyawa hasil isolasi tidak ada ikatan rangkap berkonjugasi walaupun memiliki ikatan rangkap. Dari literature yang dibaca, terlihat bahwa apabila suatu senyawa memiliki ikatan rangkap berkonjugasi maka terjadi eksitasi elektron dari π ke π^* pada serapan sekitar 244 nm.

Senyawa hasil isolasi ini walaupun terlihat pada spektrum UV namun tidak terlihat pada lampu UV yang digunakan untuk melihat pola noda pada KLT. Hal ini dikarenakan serapan maksimum senyawa adalah 203,5 nm sedangkan lampu UV yang digunakan memiliki panjang gelombang 254 dan 356 nm.

4.3.2 Spektroskopi Infra Merah

Karakterisasi senyawa hasil isolasi dilakukan dengan menggunakan FTIR *Perkin Elmer 1600 Series* yang memperlihatkan beberapa serapan penting pada bilangan gelombang 3216 cm^{-1} , 2919 cm^{-1} , 1706 cm^{-1} , 1661 cm^{-1} , 1457 dan 1388 cm^{-1} , 1195 cm^{-1} yang dapat terlihat pada Gambar 6.



Gambar 6 : Spektrum IR dari triterpenoid

Spektrum inframerah senyawa hasil isolasi memberikan indikasi beberapa pita serapan penting yaitu pita serapan OH pada vibrasi regangan didaerah 3216 cm^{-1}

renggang OH bebas ini didukung oleh adanya vibrasi ulur C-O dalam alkohol pada daerah 1195 cm^{-1} . Pada daerah 1706 cm^{-1} menandakan adanya gugus $\text{C}=\text{O}$, sedangkan C-H alifatis terlihat pada daerah 2919 cm^{-1} . Serapan $\text{C}=\text{C}$ muncul pada angka gelombang 1661 cm^{-1} . Geminal dimetil yang merupakan serapan khas senyawa golongan terpenoid ditunjukkan pada daerah 1457 dan 1388 cm^{-1} .

4.4 Antibakteri Fraksi pada Ekstrak Kulit Batang Kecapi dan Senyawa Hasil Isolasi

Hasil dari uji bioaktivitas antibakteri terhadap fraksi heksana, etil asetat, metanol dan senyawa triterpenoid hasil isolasi dapat terlihat pada Tabel 6.

Tabel 6. Hasil uji antibakteri dari fraksi heksana, etil asetat, metanol dan senyawa triterpenoid menggunakan metoda cakram

| No | Sampel | Diameter halo (mm) | | | MikrobiaI indeks (mm) | | |
|----|---------------|--------------------|-----------------|---------------|-----------------------|-----------------|----------------|
| | | <i>E.colli</i> | <i>S.aureus</i> | <i>S.tyhi</i> | <i>E.colli</i> | <i>S.aureus</i> | <i>S.typhi</i> |
| 1 | F.heksana | 12 | 15 | 8 | 14 | 20 | 6 |
| 2 | F.etil asetat | 17 | 25 | 11 | 24 | 40 | 12 |
| 3 | F.metanol | 11 | 16 | 10 | 12 | 22 | 10 |
| 4 | Triterpenoid | 10 | 16 | 10 | 10 | 22 | 10 |

Keterangan :

$$\text{MikrobiaI Indeks (MI)} = \frac{\text{diameter halo (mm)} - \text{diameter cakram (mm)}}{\text{diameter cakram (mm)}}$$

$$\text{Diameter cakram} = 5 \text{ mm}$$

Dari Tabel 6 terlihat bahwa ketiga fraksi yang diujikan aktif sebagai antibakteri. Apabila dilihat dari nilai mikrobiaI indeks maka fraksi etil asetat merupakan fraksi yang paling aktif sebagai antibakteri dibandingkan fraksi heksana dan metanol. Senyawa triterpenoid yang diisolasi juga memiliki aktifitas sebagai antibakteri. Hasil dari uji aktifitas antibakteri dapat dilihat pada Lampiran 4

BAB V

KESIMPULAN DAN SARAN

5.1 Kesimpulan

1. Fraksi etil asetat dari kulit batang kecap merupakan fraksi yang paling aktif terhadap antibakteri dibandingkan dengan fraksi heksana dan metanol.
2. Dari spektrum UV menunjukkan bahwa senyawa hasil isolasi memiliki ikatan rangkap namun tidak memiliki ikatan rangkap berkonjugasi, spektrum IR memperlihatkan adanya gugus OH, C=C, C=O, C-O dan geminal dimetil pada senyawa isolasi, titik leleh senyawa hasil isolasi adalah 214,3 – 215,4°C dan uji menggunakan pereaksi Liebermann-Burchard dapat disimpulkan bahwa senyawa yang telah diisolasi merupakan golongan triterpenoid.
3. Senyawa triterpenoid yang didapatkan aktif sebagai antibakteri

5.2 Saran

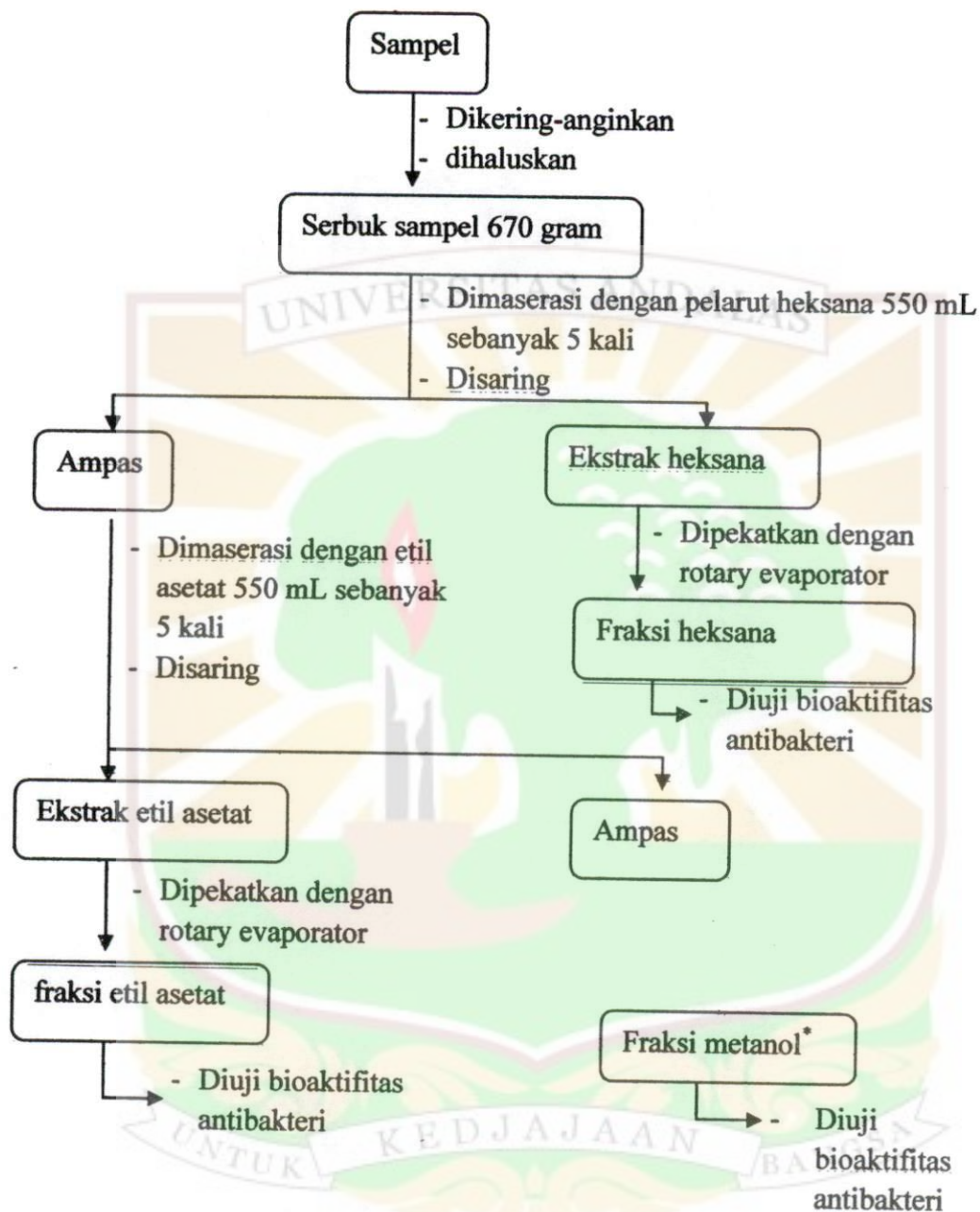
1. Perlu dilakukan karakterisasi lebih lanjut untuk menentukan struktur dari senyawa triterpenoid hasil isolasi dengan melengkapi data MS, ^1H NMR, ^{13}C NMR.
2. Perlu dilakukan isolasi senyawa-senyawa lainnya yang terkandung didalam ekstrak kulit batang kecap

DAFTAR PUSTAKA

1. Muhtadi. Pemisahan Fraksi dan Senyawa yang Berkhasiat Antiplasmodium dari Ekstrak Metanol Kulit Kayu Mimba (*Azadirachta indica* Juss). *Jurnal Penelitian Sains dan Teknologi*. Vol 9. 117-136 (2008)
2. Efdi, Mai., M. Ninomiya, E. Suryani, K. Tanaka, S. Ibrahim, K. Watanabe, M. Koketsu. Sentulic Acid : A Cytotoxic ring A-Seco Triterpenoid from *Sandoricum Koetjape* Merr. *Bioorganic and Medicinal Chemistry Letters*. Volume 22. 4242-4245 (2012)
3. Carpinella, Maria C., M.T. Defago., G. Valladares., S.M. Palacios. Antifeedant and Insecticide Properties of a Limonoid from *Melia azedarach* (MELIACEAE) with Potential Use for Pest Management. *J.Agric.Food Chem.* 51:369-374 (2003)
4. Yunia, Nia. *Aktifitas Insektisida Campuran Ekstrak Empat Jenis Tumbuhan terhadap Larva Crocidolomia pavanana (f)*. Skripsi Sarjana Pertanian. Institut Pertanian Bogor (2006)
5. Ismail, Intan Safinar., H. Ito., T. Mukainata., H. Higashihara., F. Enjo., H. Tokuda., H. Nishiro., T. Yoshida. Ichthyotoxic and Anticarcinogenic Effects of Triterpenoids from *Sandoricum koetjape* Bark. *Biol.Pharm.Bull.* 1351-1353 (2003)
6. Kurniawan, Kiki. *Isolasi dan Karakterisasi Senyawa Turunan Sesquiterpenoid dan Uji Aktifitas Insektisida dari Fraksi Kulit Batang Toona Sinensis*. Thesis. Universitas Andalas (2011)
7. Silaban, Lowysa Wanti. *Skrining Fitokimia dan Uji Aktivitas Bakteri dari Kulit Buah Sentul (*Sandoricum koetjape* (Burm.f.) Merr) Terhadap beberapa Bakteri Secara In Vitro*. Skripsi Sarjana Farmasi. Universitas Sumatra Utara (2009)
8. Powell, R.G., K. Mikolajczak., B.W. Zilkowski. Limonoid Antifeedants From Seed of *Sandoricum Koetjape*. *Jurnal of Natural Products*. Volume 54. (1991). pp 241-246
9. Andriyanto, Fajar. *Kajian Aktifitas Antimikroba Ekstrak Buah Sotul (*Sandoricum koetjape* Merr) terhadap Bakteri Patogen dan Perusak Makanan*. Skripsi Sarjana Teknologi Pertanian. Institut Pertanian Bogor (2001)
10. Astuti, Fera. *Uji Aktivitas Antibakteri Fraksi N-Heksana, Etilasetat dan Etanol Daun Kecapi (*Sandoricum Koetjape*. Merr) Terhadap Beberapa Bakteri Penyebab Penyakit Kulit Secara In Vitro*. Skripsi Sarjana Farmasi. Universitas Sumatera Utara (2010)
11. Abdussalam, Moch. *Isolasi dan Karakterisasi Struktur Kumarin dari Fraksi Etil Asetat Kulit Batang Kecapi (*Sandoricum Koetjape*) serta Uji Antioksidan*. Skripsi Sarjana Kimia. Universitas Andalas (2011)

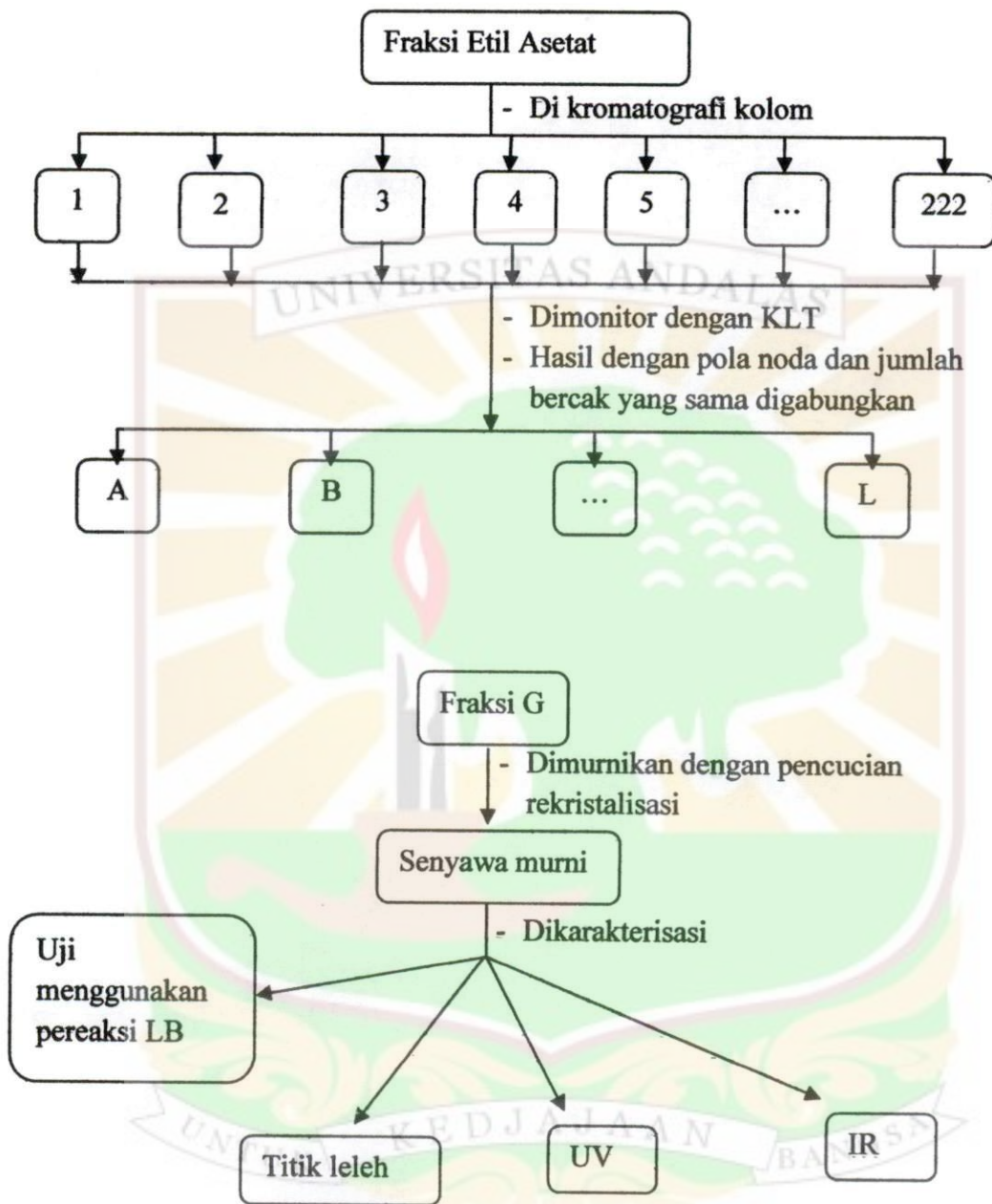
12. Swantara, Dira., Y.Ciawi. Identifikasi Senyawa Antibakteri Pada Daun Kecapi (*Sandoricum Koetjape* (Burm.F). *Jurnal Kimia*. ISSN 1907-9850 (2009)
13. Nassar, Z.D.,Abdalahim A.F. Aisha.,Amin Malik Shah Abdul Majid. *The Pharmacological Properties Of Terpenoids From Sandoricum Koetjape*. Article. ID : WMC001311 (2010)
14. Lenny, Sovia. *Senyawa Terpenoida dan Steroida*. Karya Ilmiah. Universitas Sumatra Utara (2006)
15. Robert, John D and Marjorie C Caserio. *Basic Principles of Organic Chemistry 2nded*. California : Benjamin Inc. (1977)
16. Djunaidi, M Cholid dan Meiny Suzery. *Isolasi Triterpenoid dari Bunga *Artoearpus communis**. Yogyakarta : Universitas Diponegoro (2004)
17. Ibrahim, Sanusi. *Teknik Laboratorium Kimia Organik*. Padang : Universitas Andalas (1998)
18. Sastrohamidjojo, H. *Dasar-dasar Spektroskopi, ed II*. Yogyakarta : Universitas Gajah Mada (1991)
19. Gritter, R.J., J.M. Bobbit dan A.E. Schwarting. *Pengantar Kromatografi*. Bandung : ITB (1991)
20. Furniss, Brian S., Antony J. Hannaford., Peter W. G. Smith and Austin R. Tatchell. *Practical Organic Chemistry ed 5th*. New York : John Willey and Sons (1989)
21. Carey, Francis A. *Organic Chemistry 4thed*. New York : McGraw-Hill (2010)
22. Silverstein, Robert M. *Spectrometric Identification of Organic Compounds 7thed*. United State : John Willey and Sons (2005)
23. Sofiani, Yuyu Srirahayu. *Isolasi, Pemurnian, dan Uji Aktivitas Antibakteri Senyawa Sinensetin dari Ekstrak Daun Kumis Kucing (*Orthosiphonis aristatus*)*. Skripsi Sarjana Sains. Institut Pertanian Bogor. (2003)
24. Wattimena, JR.,dkk., *Farmakodinami dan Terapi Antibiotik* . Yogyakarta : UGM (1981)

Lampiran 1. Skema Kerja Isolasi Triterpenoid dari Kulit Batang Kecapi (*Sandoricum koetjape* Merr)

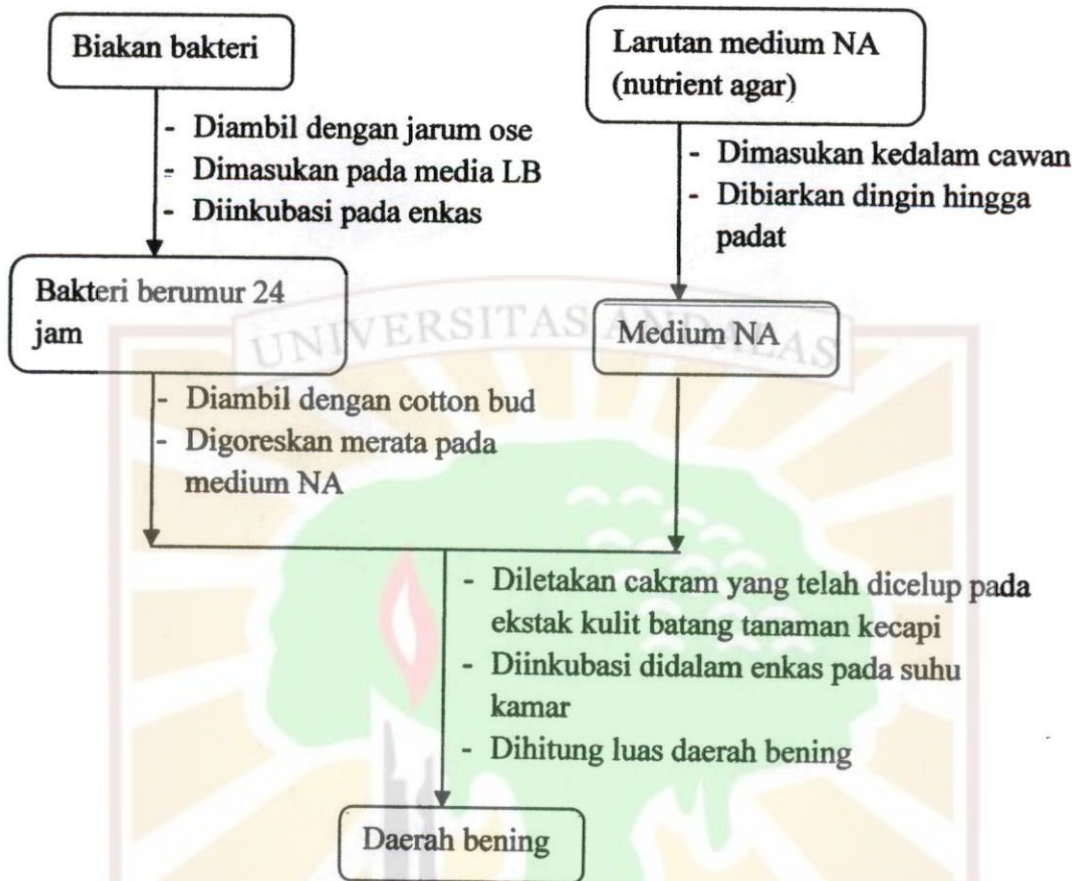


Keterangan : * = Diambil dari penelitian sebelumnya

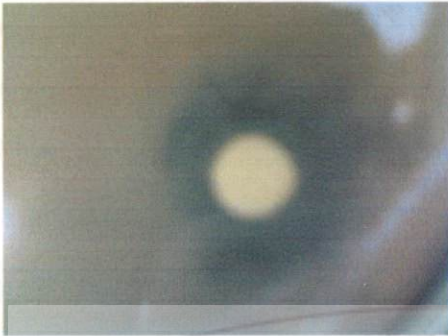
Lampiran 2. Pemurnian Senyawa Triterpenoid



Lampiran 3. Skema Uji Aktifitas Antibakteri



Lampiran 4 , Uji Aktifitas Antibakteri dengan Metoda Cakram



Fraksi Heksan (*S.aureus*)



Fraksi Heksan (*E.coli*)



Fraksi Heksan (*S.typhi*)



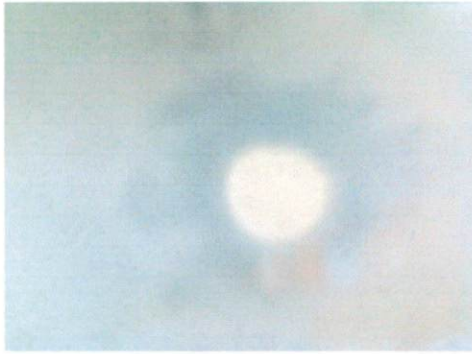
Fraksi Etil Asetat (*S.aureus*)



Fraksi Etil Asetat (*E.coli*)



Fraksi Etil Asetat (*S.typhi*)



Fraksi Metanol (*S.aureus*)

Fraksi Metanol (*E.coli*)



Fraksi Metanol (*S.typhi*)

Kristal Triterpenoid (*S.aureus*)



Kristal Triterpenoid (*E.coli*)

Kristal Triterpenoid (*S.typhi*)