



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 ALKALOID DARI FRAKSI AKTIF EKSTRAK BUAH MELUR (*Brucea javanica* (L) Merr) SEBAGAI ANTIBAKTERI

SKRIPSI



**FEBRINA ZAMAR
07132071**

**JURUSAN KIMIAFAKULTAS
MATEMATIKA DAN ILMU
PENGETAHUAN ALAM
UNIVERSITAS ANDALAS
PADANG 2011**

KATA PENGANTAR

بِسْمِ اللَّهِ الرَّحْمَنِ الرَّحِيمِ

Alhamdulillah, puji syukur kehadiran Allah SWT atas segala rahmat dan hidayah-Nya sehingga penulis dapat menyelesaikan skripsi ini dengan judul **“Isolasi Alkaloid dari Fraksi Aktif Ekstrak Buah Melur (*Brucea javanica* (L) Merr)” Sebagai Antibakteri.** Penulisan skripsi ini bertujuan untuk memenuhi salah satu syarat untuk mengikuti ujian sarjana di Jurusan Kimia Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam Universitas Andalas.

Pada kesempatan ini saya mengucapkan terima kasih kepada Bapak Dr. Mai Efdi, M.Si selaku pembimbing I dan dan Bapak Dr. Afrizal M.S selaku Pembimbing II yang telah memberikan waktu, tenaga dan pikiran untuk membimbing dan mengarahkan penulis dalam penelitian dan penyusunan skripsi ini.

Ucapan terima kasih yang sedalamnya penulis sampaikan kepada Ayahanda Zakirman, Ibunda Mardianis, dan Kakanda Afrini Zamar atas semua doa, kasih sayang serta dukungan yang tak terhingga, baik moril maupun materil.

Selanjutnya ucapan terima kasih juga disampaikan kepada :

1. Bapak Prof. Dr. Emriadi selaku Dekan Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam Universitas Andalas, Padang.
2. Bapak Dr. Adlis Santoni selaku Ketua Jurusan Kimia Universitas Andalas, Padang.
3. Staf pengajar dan karyawan Jurusan Kimia FMIPA Universitas Andalas yang memberikan ilmu dan semangat.
4. Ibu Mitralena selaku analis Laboratorium Kimia Bahan Alam Universitas Andalas atas bantuannya dalam memfasilitasi peneliti selama melaksanakan penelitian di Laboratorium Kimia Bahan Alam Universitas Andalas.
5. Rekan-rekan tim peneliti di Laboratorium KOBA yang senantiasa berbagi ilmu dan selalu memotivasi peneliti bekerja.

6. Teman-teman SO_CH₄ (Kimia Angkatan 2007) yang setia memberikan keceriaan, dukungan dan semangat.
7. Semua pihak yang tidak dapat penulis sebutkan satu-persatu, terimakasih untuk segalanya.

Tentunya penulisan skripsi ini jauh dari kesempurnaan, untuk itu penulis sangat mengharapkan kritik dan saran yang membangun untuk perbaikan di masa mendatang. Semoga skripsi ini bermanfaat untuk perkembangan ilmu pengetahuan. Akhir kata penulis mohon maaf bila ada kesalahan dan kekurangan dalam penulisan skripsi ini.

Padang, November 2011

penulis



ABSTRAK

ISOLASI ALKALOID DARI FRAKSI AKTIF EKSTRAK BUAH MELUR (*Brucea javanica* (L) Merr) SEBAGAI ANTIBAKTERI

Oleh:

Febrina Zamar (07132071)

Dibimbing oleh: Dr. Mai Efdi, M.Si dan Dr. Afrizal, MS

Isolasi dan karakterisasi alkaloid dari fraksi etil asetat ekstrak buah melur *Brucea javanica* L Merr telah dilakukan. Senyawa ini diisolasi dengan metode maserasi, fraksinasi, kromatografi kolom, dan rekristalisasi serta dikarakterisasi dengan metode spektroskopi. Senyawa hasil isolasi dalam pelarut metanol menunjukkan serapan maksimum pada panjang gelombang 202 nm dan memiliki gugus O-H, C-O, C=O, C-N, C=C dan C-H. Namun, belum diketahui posisi dari gugus-gugus tersebut. Uji aktivitas antibakteri dilakukan dengan menggunakan metode difusi cakram. Hasil penelitian menunjukkan bahwa fraksi etil asetat ekstrak buah melur memiliki aktivitas sebagai antibakteri dengan nilai diameter zona hambat terhadap *Escherichia coli* 8,312 mm dan *Staphylococcus aureus* 7,312 mm. Berdasarkan ketentuan kekuatan antibakteri, fraksi etil asetat ekstrak buah melur memiliki kekuatan antibakteri yang sedang (5-10 mm) terhadap *Escherichia coli* dan *Staphylococcus aureus*.



DAFTAR ISI

	Halaman
HALAMAN PENGESAHAN	i
KATA PENGANTAR	ii
ABSTRAK	iv
ABSTRACT	v
DAFTAR ISI	vi
DAFTAR TABEL	viii
DAFTAR GAMBAR	ix
DAFTAR LAMPIRAN	x
BAB I. PENDAHULUAN	
1.1 Latar Belakang Penelitian	1
1.2 Perumusan Masalah	2
1.3 Tujuan Penelitian	2
1.4 Manfaat Penelitian	2
BAB II. TINJAUAN PUSTAKA	
2.1 Tumbuhan <i>Brucea javanica</i> L. Merr	3
2.2 Alkaloid	4
2.2.1 Tinjauan Umum Alkaloid	4
2.2.2 Defenisi Alkaloid	7
2.2.3 Tata Nama Alkaloid	7
2.2.4 Sumber dan Sifat Alkaloid	8
2.2.5 Klasifikasi Alkaloid	9
2.2.6 Biosintesis Alkaloid	13
2.3 Metode Identifikasi Alkaloid	14
2.4 Ekstraksi dan Fraksinasi Alkaloid	15
2.5 Metode Kromatografi	15
2.6 Karakterisasi Senyawa	16
2.6.1 Spektroskopi Ultraviolet dan Visibel (UV-Vis)	16
2.6.2 Spektroskopi Inframerah (IR)	17
2.7 Uji Aktivitas Antibakteri	17

BAB III. METODOLOGI PENELITIAN

3.1 Waktu dan Tempat Penelitian	19
3.2 Alat dan Bahan	19
3.2.1 Alat.....	19
3.2.2 Bahan.....	19
3.3 Pengambilan dan Persiapan Sampel	20
3.4 Uji Fitokimia Buah <i>Brucea javanica L. Merr</i>	20
3.5 Isolasi Alkaloid dari Ekstrak Buah <i>Brucea javanica L. Merr</i>	20
3.6 Pemurnian Fraksi Etil Asetat dari Ekstrak Buah <i>Brucea javanica L. Merr</i>	21
3.7 Karakterisasi Fraksi Etil Asetat Buah <i>Brucea javanica L. Mer</i>	22
3.8 Uji Aktivitas Antibakteri dengan Metoda Cakram.....	22

BAB IV. HASIL DAN DISKUSI

4.1 Pengujian Profil Fitokimia Buah <i>Brucea javanica L. Merr</i>	24
4.2 Isolasi Alkaloid dari Ekstrak Buah <i>Brucea javanica L. Merr</i>	24
4.3 Pemurnian Fraksi Etil Asetat Buah <i>Brucea javanica L. Merr</i>	24
4.4 Karakterisasi Fraksi Etil Asetat Buah <i>Brucea javanica L. Merr</i>	27
4.5 Uji Aktivitas Antibakteri dengan Metode Difusi Cakram	28

BAB V. KESIMPULAN DAN SARAN

5.1 Kesimpulan.....	30
5.2 Saran	30

DAFTAR PUSTAKA

LAMPIRAN

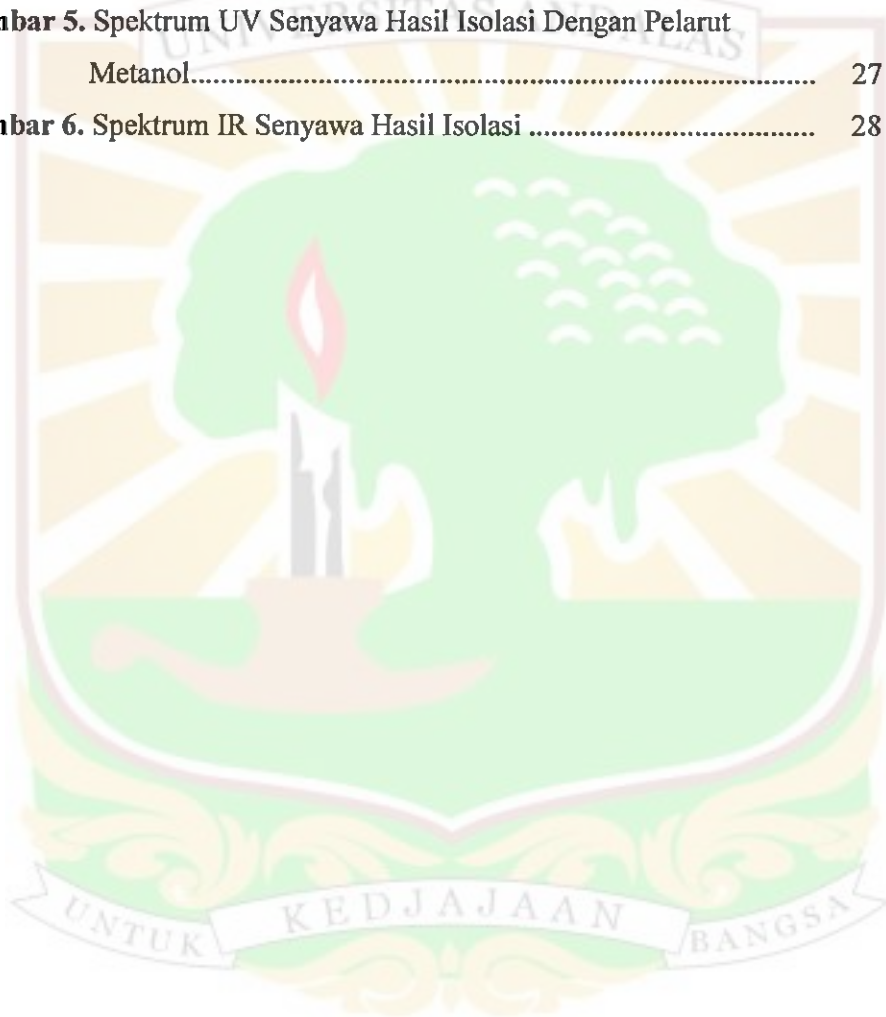
DAFTAR TABEL

	Halaman
Tabel 1 Ketentuan Kekuatan Antibakteri	18
Tabel 2. Hasil KLT Fraksi Etil Asetat dengan Berbagai Perbandingan Eluen.....	24
Tabel 3. Hasil Penggabungan Fraksi dari Kromatografi Kolom Berdasarkan Pola Noda	25
Tabel 4. Uji KLT Senyawa Hasil Isolasi dengan Perbandingan Eluen.....	26
Tabel 5. Hasil Uji Aktivitas Antibakteri fraksi n-heksan, etil asetat Dan air dengan metoda cakram	29



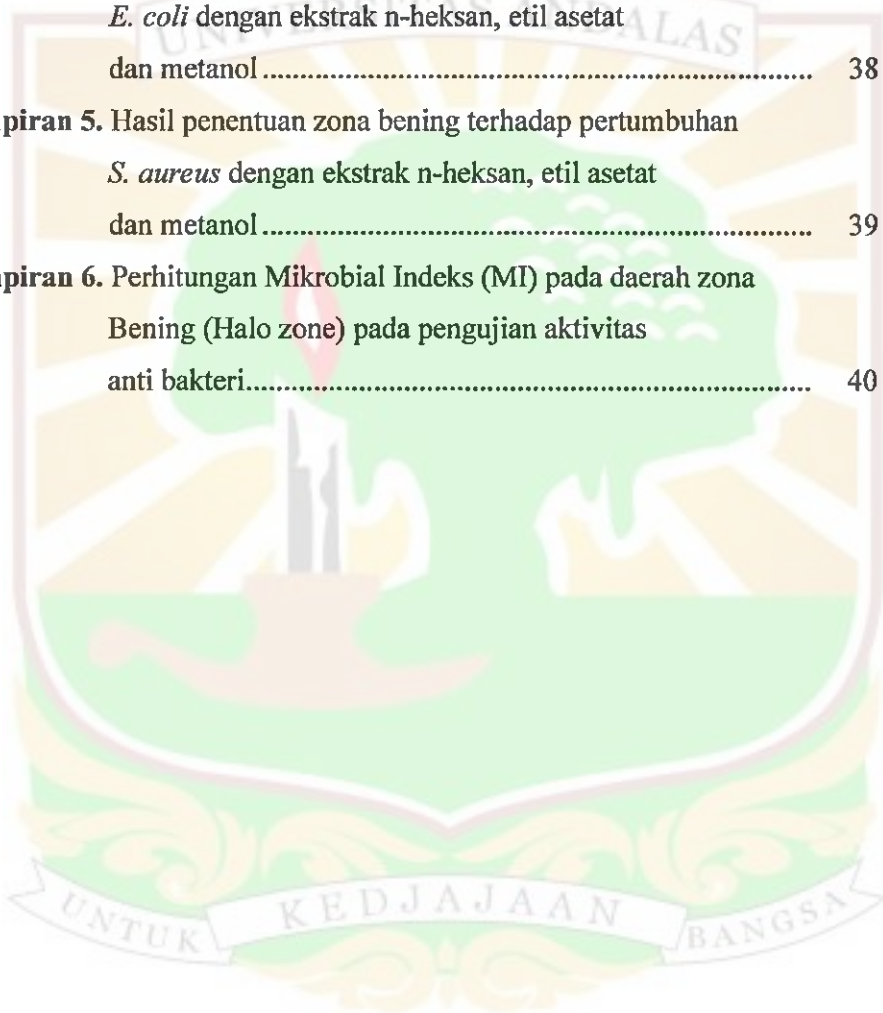
DAFTAR GAMBAR

	Halaman
Gambar 1. (a) Tanaman <i>Brucea Javanica</i> (L) Merr	
(b) Buah <i>Brucea javanica</i> (L) Merr	3
Gambar 2. Struktur senyawa Dehidrobrucein A, B dan Kantin-6-on	4
Gambar 3. Mekanisme Reaksi Mannich.....	13
Gambar 4. Mekanisme Reaksi Kopling Oksidasi Fenol.....	14
Gambar 5. Spektrum UV Senyawa Hasil Isolasi Dengan Pelarut Metanol.....	27
Gambar 6. Spektrum IR Senyawa Hasil Isolasi	28



DAFTAR LAMPIRAN

	Halaman
Lampiran 1. Pengujian profil buah <i>Brucea Javanica L. Merr</i>	33
Lampiran 2. Skema kerja isolasi alkaloid dari fraksi aktif ekstrak Buah <i>Brucea javanica L. Merr</i> sebagai Antibakteri	34
Lampiran 3. Skema uji aktivitas anti bakteri dengan metoda cakram.....	37
Lampiran 4. Hasil penentuan zona bening terhadap pertumbuhan <i>E. coli</i> dengan ekstrak n-heksan, etil asetat dan metanol	38
Lampiran 5. Hasil penentuan zona bening terhadap pertumbuhan <i>S. aureus</i> dengan ekstrak n-heksan, etil asetat dan metanol	39
Lampiran 6. Perhitungan Mikrobial Indeks (MI) pada daerah zona Bening (Halo zone) pada pengujian aktivitas anti bakteri.....	40



BAB I. PENDAHULUAN

1.1. Latar Belakang Penelitian

Indonesia merupakan negara yang terletak disalah satu kawasan tropis yang kaya akan keaneka ragaman jenis tumbuhan. Berbagai tumbuhan ini bisa dimanfaatkan sebagai sumber ramuan obat tradisional. Selain itu juga bisa sebagai sumber bahan kimia alami yang potensial untuk dikembangkan menjadi zat warna, kosmetik, bahan baku industri dan bahan aktif pestisida. Kandungan senyawa kimia dari tumbuhan yang memiliki bioaktivitas umumnya terdapat sebagai metabolit sekunder seperti alkaloid, flavonoid, terpenoid, steroid dan lain-lain.

Salah satu tumbuhan yang digunakan sebagai bahan obat tradisional adalah tumbuhan melur. Melur atau malua (Sumatera Barat) yang dikenal dengan nama latin *Brucea javanica* (L) Merr, termasuk jenis tumbuhan semak. Tumbuhan jenis *B. Javanica* ini mengandung senyawa kuasinoid yang menunjukkan aktivitas sebagai antimalaria, anti amuba, dan sitotoksik (antikanker).¹

Kandungan senyawa kimia pada tanaman *B. javanica* adalah golongan kuasinoid, triterpenoid, alkaloida dan steroid.^{2,3} Senyawa kimia yang telah diidentifikasi sebanyak 73 senyawa kimia, antara lain javanicolid, javanicosid, yadanziosid, yadanzolid, bruceolid, bruceantanol, brucein, brusatol, bruceacantinoside, bruceosid, dan bruceajavanon A, B, C, A-7-asetat serta bruceajavaninon A.²

Banyak penelitian telah dilakukan untuk mendapatkan senyawa kimia aktif dari tumbuhan *B. javanica* ini. Namun, belum ada ditemukan penelitian yang membahas aktivitas senyawa alkaloid sebagai anti bakteri dari tumbuhan *B. Javanica* ini. Untuk itu penelitian ini dilakukan untuk mengisolasi senyawa alkaloid dari buah *B. Javanica* yang aktif sebagai anti bakteri.

Senyawa yang aktif sebagai anti bakteri dapat ditentukan dengan menghitung daya hambatnya terhadap pertumbuhan bakteri dalam medium tertentu. Metode yang digunakan untuk uji aktivitas anti bakteri adalah metode cakram.

Isolasi senyawa murni dilakukan dengan cara maserasi, fraksinasi dengan berbagai pelarut, pemisahan komponen dengan kromatografi kolom, dan selanjutnya dilakukan karakterisasi pada senyawa murni yang didapatkan.

1.2. Perumusan Masalah

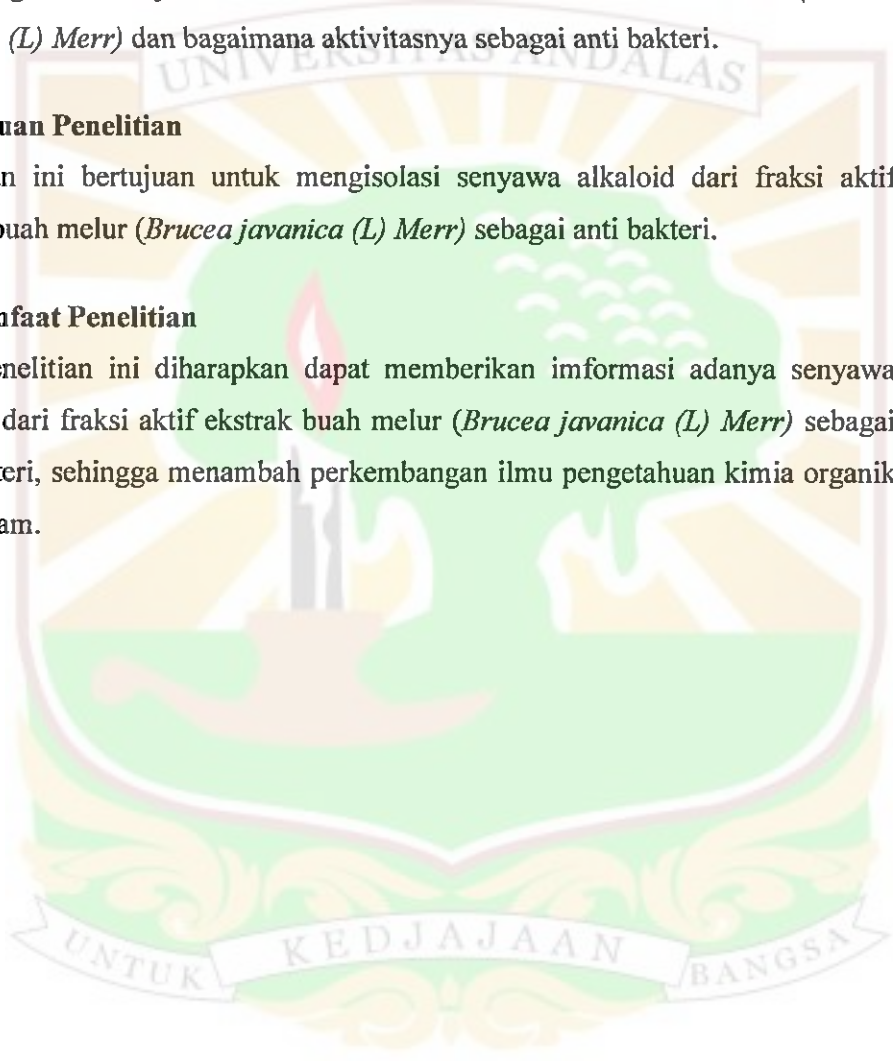
Tumbuhan *B. javanica* telah diketahui mengandung senyawa quasinoid, triterpenoid, alkaloid dan steroid. Dari hal ini, diangkat suatu masalah bagaimana cara mengisolasi senyawa alkaloid dari fraksi aktif ekstrak buah melur (*Brucea javanica* (L) Merr) dan bagaimana aktivitasnya sebagai anti bakteri.

1.3. Tujuan Penelitian

Penelitian ini bertujuan untuk mengisolasi senyawa alkaloid dari fraksi aktif ekstrak buah melur (*Brucea javanica* (L) Merr) sebagai anti bakteri.

1.4. Manfaat Penelitian

Hasil penelitian ini diharapkan dapat memberikan informasi adanya senyawa alkaloid dari fraksi aktif ekstrak buah melur (*Brucea javanica* (L) Merr) sebagai anti bakteri, sehingga menambah perkembangan ilmu pengetahuan kimia organik bahan alam.



BAB II. TINJAUAN PUSTAKA

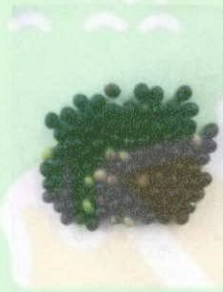
2.1 Tumbuhan *Brucea javanica* L. Merr

Klasifikasi dari tumbuhan melur adalah :

- Kingdom : Plantae
- Subkingdom : Tracheobionta
- Super Divisi : Spermatophyta
- Divisi : Magnoliophyta
- Kelas : Magnoliopsida
- Sub Kelas : Rosidae
- Ordo : Sapindales
- Famili : Simaroubaceae
- Genus : Brucea
- Spesies : *Brucea javanica* (L.) Merr



(a)



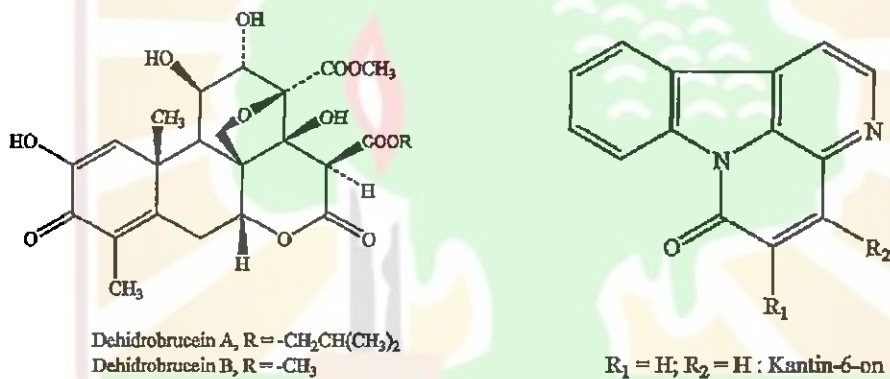
(b)

Gambar 1. (a) Tanaman *B. javanica*. (b) Buah *B. javanica*

Tumbuhan *B. javanica* tumbuh liar di hutan, kadang-kadang ditanam sebagai tanaman pagar. Lebih kurang ditemukan 6 jenis tumbuhan yang tumbuh di Afrika. Di Indonesia banyak tumbuh di Jawa dan Madura, yaitu biasanya terdapat pada belukar, ditepi sungai, hutan jati, hutan sekunder muda. Tumbuh-tumbuhan melur tumbuh pada ketinggian 1-500 m dpl. Perdu tegak, menahun, tinggi 1-2,5 m, berambut halus warna kuning. Daunnya berupa daun majemuk menyirip ganjil, jumlah anak daun 5-13, bertangkai, letak berhadapan. Helaian anak daun berbentuk lanset memanjang, ujung meruncing, pangkal berbentuk baji, tepi bergerigi kasar, permukaan atas berwarna hijau, permukaan bawah berwarna hijau muda, panjang 5-10 cm, lebar 2-4 cm.

Perhiasan bunga berupa kelopak, segmen kelopak sangat kecil, bentuk oval bulat telur terbalik, 0,75 – 1 mm. Mahkota memiliki 5 daun mahkota, bentuk memanjang, tumpul, berambut jarang, sepanjang tepi berkelenjar, berwarna hijau ungu. Benang sari sebanyak mahkota, kepala sari tidak ada pada bunga betina. Putik pada bunga jantan rudimenter, bertaju 4, pada bunga yang berkelamin 2 atau bunga bakal buah dan tangkai putik 4, lepas, tonjolan penebalan dasar bunga jelas. Buah batu bulat memanjang, panjang 8 mm.⁴ Bentuk tumbuhan dan buah melur ini dapat ditunjukkan pada Gambar 1.

Kandungan senyawa kimia dari buah *B. Javanica* ini yaitu terdiri dari Bruseantin, Bruseantinol, brusein A, B, C, D, dehidrobrusein A, brusatol, yadanzolid, yadanzolid A, C, F dan senyawa pahit mirip kantin-6-on. Struktur dari beberapa senyawa diatas dapat dilihat pada Gambar 2.



Gambar 2. Struktur senyawa Dehidrobrucein A, B dan Kantin-6-on

2.2 Alkaloid

2.2.1. Tinjauan Umum Alkaloid

Alkaloid adalah suatu golongan senyawa organik yang terbanyak ditemukan di alam. Hampir seluruh alkaloid berasal dari tumbuh-tumbuhan dan tersebar luas dalam berbagai jenis tumbuhan tingkat tinggi. Semua Alkaloid mengandung paling sedikit satu atom nitrogen yang biasanya bersifat basa dan dalam sebagian besar atom nitrogen ini merupakan bagian dari cincin heterosiklik.⁵

Hampir semua alkaloid yang ditemukan di alam mempunyai keaktifan fisiologis tertentu, ada yang sangat beracun, tetapi adapula yang sangat berguna dalam pengobatan, misalnya kinina, morfina dan strikina adalah alkaloid yang

terkenal dan mempunyai efek fisiologis dan farmakologis. Selain memberikan efek pada manusia, alkaloid juga memberikan efek pada serangga dan juga sebagai bahan dasar pembuatan bahan-bahan sintesis lainnya.⁶

Alkaloid dapat ditemukan dalam berbagai bagian tumbuhan, seperti biji, daun, ranting, dan kulit kayu. Seringkali kadar alkaloid dalam jaringan tumbuhan ini kurang dari 1 %. Akan tetapi, kulit kayu dari tumbuhan tahunan kadang-kadang mengandung 10 -15 % alkaloid, seperti kulit kina yang mengandung sekitar 10 % kuinin.⁶

Sejarah alkaloid telah dimulai sejak awal abad 19, dimana Dersone (1803) mencoba mengisolasi alkaloid dan baru didapatkan setengah murni dari opium yang diberi nama sebagai nikotin. Pada tahun 1805 Sertuner melakukan pangkajian lebih lanjut dan berhasil mengisolasi alkaloid murni dari opium yaitu morfina. Sertuner inilah yang kemudian menemukan sifat basa dari morfina (alkaloid). Dua belas tahun setelah penemuan morfina ini, Pelletier dan Caventou mencoba mengisolasi alkaloid lainnya dan berhasil, diantaranya adalah striknina, emetine, brusina, piperina, kaffeina, kinina, sinkonina, kolkisina dan koniina (1829), dimana koniina merupakan alkaloid pertama yang disintesis pada tahun 1886.⁶

Selanjutnya dalam *Meyer's Conversation Lexicons* tahun 1896 dinyatakan bahwa alkaloid terjadi secara karakteristik di dalam tumbuh-tumbuhan, dan sering dibedakan berdasarkan kereaktifan fisiologi yang khas. Senyawa ini terdiri atas karbon, hidrogen, dan nitrogen. Sebagian besar diantaranya mengandung oksigen. Sesuai dengan namanya yang mirip dengan alkali (bersifat basa) dikarenakan adanya sepasang elektron bebas yang dimiliki oleh nitrogen sehingga dapat mendonorkan sepasang elektronnya.⁷

Garam alkaloid dan alkaloid bebas biasanya berupa senyawa padat, berbentuk kristal tidak berwarna (berberina dan serpentine berwarna kuning). Alkaloid sering kali optik aktif, dan biasanya hanya satu dari isomer optik yang dijumpai di alam, meskipun dalam beberapa kasus dikenal campuran rasemat, dan pada kasus lain satu tumbuhan mengandung satu isomer sementara tumbuhan lain mengandung enansiomernya.⁷

Ada juga alkaloid yang berbentuk cair, seperti konini, nikotina, dan higrina. Sebagian besar alkaloid mempunyai rasa yang pahit. Alkaloid juga mempunyai sifat farmakologi. Sebagai contoh, morfina sebagai pereda rasa sakit, reserfina sebagai obat penenang, atrofina berfungsi sebagai antispasmodia, kokain sebagai anestetik local, dan strisina sebagai stimulan syaraf.⁷

Metode pemurnian dan karakterisasi alkaloid umumnya mengandalkan sifat kimia alkaloid yang paling penting yaitu kebiasaannya, dan pendekatan khusus harus dikembangkan untuk beberapa alkaloid (misalnya rutaekarpina, kolkisina, risinina) yang tidak bersifat basa. Alkaloid biasanya diperoleh dengan cara mengekstraksi bahan tumbuhan memakai asam yang melarutkan alkaloid sebagai garam, atau bahan tumbuhan dapat dibasakan dengan natrium karbonat dan sebagainya lalu basa bebas diekstraksi dengan pelarut organik seperti kloroform, eter dan sebagainya. Beberapa alkaloid jadian/sintesis dapat terbentuk jika kita menggunakan pelarut reaktif. Untuk alkaloid yang dapat menguap seperti nikotina dapat dimurnikan dengan cara penyulingan uap dari larutan yang dibasakan. Larutan dalam air yang bersifat asam dan mengandung alkaloid dapat dibasakan kemudian alkaloid diekstraksi dengan pelarut organik sehingga senyawa netral dan asam yang mudah larut dalam air tertinggal dalam air.⁷

Garam alkaloid berbeda sifatnya dengan alkaloid bebas. Alkaloid bebas biasanya tidak larut dalam air (beberapa dari golongan pseudo dan proto alkaloid larut), tetapi mudah larut dalam pelarut organik agak polar (seperti benzene, eter, kloroform). Dalam bentuk garamnya, alkaloid mudah larut dalam pelarut organik polar.⁷

Beberapa peran senyawa Alkaloid dalam bidang ilmu biologi yaitu :⁸

1. Sebagai hasil buangan nitrogen, seperti urea dan asam urat dalam hewan.
2. Sebagai tempat penyimpanan nitrogen.
3. Sebagai pelindung tumbuhan dari serangan parasit atau pemangsa tumbuhan.
4. Alkaloid dapat berlaku sebagai pengatur tumbuh.
5. Sebagai basa mineral dalam mempertahankan keseimbangan ion dalam tumbuhan

2.2.2 Definisi alkaloid

Istilah alkaloid untuk pertama kalinya diperkenalkan oleh Meisener pada tahun 1819, yang berasal dari kata “ alkali “ yang berarti basa, dan “ oid “ yang berarti sifat. Selanjutnya Meisener memberikan batasan bahwa alkaloid adalah senyawa yang mempunyai atom nitrogen dari hasil isolasi bahan alam dan bersifat basa.⁶

Konings pada tahun 1880 mengusulkan batasan bahwa alkaloid merupakan senyawa yang dijumpai di alam dimana strukturnya memiliki cincin piridina. Sedangkan Landerberg berpendapat bahwa alkaloid adalah senyawa yang terdapat pada tumbuh-tumbuhan yang bersifat basa dan sekurang-kurangnya mempunyai satu atom nitrogen yang terikat pada cincin heterosiklik.⁶

Hegnauer mendefinisikan alkaloid sebagai senyawa yang agak bersifat toksik, terutama bekerja terhadap susunan saraf pusat, mempunyai sifat basa, mengandung nitrogen heterosiklik, pada umumnya tersebar pada dunia tumbuh-tumbuhan.⁶

2.2.3 Tata nama alkaloid

Pada jenis metabolit sekunder lainnya seperti flavonoid dan terpenoid bentuk sistim penamaan jauh lebih tersusun daripada alkaloid, dimana ketidaksamaan dalam sistim penamaan sangat besar sekali pada alkaloid.⁶

Karakterisasi umum dari nama-nama alkaloid diakhiri “in” dalam bahasa Jerman, namun biasanya sistim penamaan diambil dari nama asal tumbuhan, seperti papaverina dari *Papaver*, atau dari nama genusnya seperti atropine dari *Atropa belladonna*. Penamaan dari nama lazim obat juga sering digunakan seperti ergotamine dari ergot, dari senyawa yang punya efek fisiologis seperti emetine, berasal dari emetic (menimbulkan muntah), bahkan spegazinina dari tumbuhan *Aspidopermae chakensis* diambil dari nama seorang ahli botani yaitunya Spegazini.⁶

Tetapi sering terjadi dalam spesies yang sama ditemukan lebih dari satu alkaloid sehingga sistim penamaan menjadi lebih sulit. Untuk mengatasi kesulitan ini maka penamaan alkaloid ditentukan berdasarkan bentuk kerangka dasar alkaloid tersebut, sedangkan untuk pembagian kerangka alkaloid yang sama digunakan akhiran seperti -idina, -anina, -alina, -inina dan sebagainya.⁶

2.2.4 Sumber dan sifat alkaloid

Alkaloid ditemukan pada lebih dari 100 famili tumbuhan dan banyak terdapat pada Liliaceae, Amarylidaceae, Compositae, Menispermaceae, Lauraceae, Papaveraceae, Leguminosae, Rutaceae, Rubiaceae, Loganiaceae, Apocynaceae, Ranunculaceae dan Solanaceae. Pada kebanyakan famili tumbuh-tumbuhan, beberapa genus mengandung alkaloid sedangkan famili lainnya tidak, dan adakalanya dari genus yang berbeda dalam satu famili mengandung alkaloid yang sama.⁶

Umumnya alkaloid yang telah diisolasi berbentuk kristal yang dapat ditentukan titik lelehnya, sedikit yang berbentuk amorf serta yang berbentuk cair seperti nikotina dan koniina. Alkaloid umumnya tak berwarna, tapi ada beberapa dalam bentuk kompleks yang mempunyai warna, seperti berberina berwarna kuning dan betanina berwarna merah.⁶

Alkaloid bebas hanya larut dalam pelarut organik, walaupun ada yang dapat larut dalam air seperti proto alkaloid dan pseudo alkaloid. Garam-garam alkaloid dan alkaloid kuarterner mempunyai kelarutan yang baik dalam pelarut yang bersifat polar seperti air dan metanol. Alkaloid di alam tidak terdapat dalam keadaan bebas tetapi terikat sebagai garam-garam dengan asam-asam organik seperti oksalat, asam asetat dan sitrat.⁶

Alkaloid adalah senyawa yang bersifat basa. Perbedaan kebasaaan terutama dipengaruhi oleh kemampuan dan keterlibatan elektron sunyi pada atom nitrogen, yaitu pada gugus yang menyertai, apakah bersifat menarik elektron atau mendorong elektron sunyi pada atom nitrogen tersebut. Jika gugus yang terikat bersifat pendorong seperti alkil, maka elektron sunyi pada atom nitrogen akan didorong. Namun bila gugus yang terikat bersifat penarik elektron seperti karbonil, maka keberadaan elektron sunyi pada atom nitrogen akan berkurang, dan akibatnya kebasaaan akan berkurang malah bisa bersifat sebagai asam lemah, contohnya pada kelompok amida. Keterlibatan elektron sunyi atom nitrogen didalam sistim aromatis juga akan mempengaruhi sifat kebasaaan.⁶

2.2.5 Klasifikasi Alkaloid

Dalam bukunya, Matsjeh menerangkan beberapa klasifikasi dari alkaloid, diantaranya yaitu berdasarkan lokasi atom nitrogen di dalam struktur alkaloid dan berdasarkan asal mula kejadiannya (biosintesis) dan hubungannya dengan asam amino.⁷

Berdasarkan lokasi atom nitrogen didalam struktur alkaloid, alkaloid dapat dibagi atas 5 golongan. Dari lima golongan tersebut, alkaloid heterosiklis adalah yang terbesar dan yang terkecil adalah alkaloid putressina, spermidina, dan spermina. Ini dapat dilihat dari jumlah anggota dari masing-masing golongan seperti diterangkan dibawah ini :

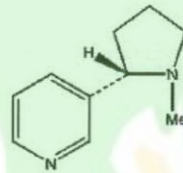
1. Alkaloid heterosiklis

Alkaloid heterosiklis merupakan alkaloid dengan atom nitrogennya terdapat dalam cincin heterosiklis. Alkaloid heterosiklis dibagi menjadi:^{6,7,9,10}

a. Alkaloid pirolidin

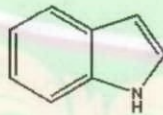


pyrrolidine

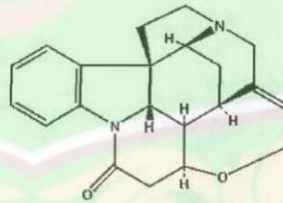


nicotine

b. Alkaloid indol

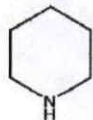


indole

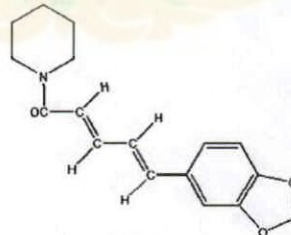


strychnine

c. Alkaloid piperidin

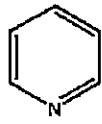


piperidine

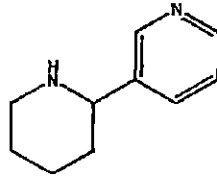


piperine

d. Alkaloid piridin



pyridine



anabasina

e. Alkaloid tropan dan basa yang berhubungan

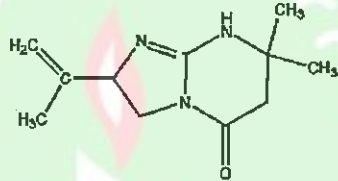


tropane



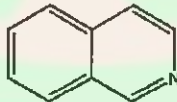
tropinona

f. Alkaloid histamin, imidazol dan guanidin

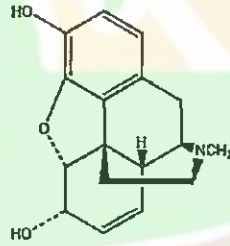


alkomina

g. Alkaloid isokuinolin

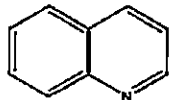


isoquinoline

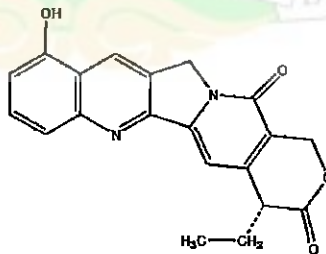


morphine

h. Alkaloid kuinolin

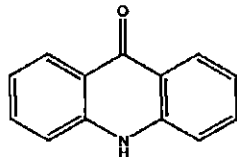


quinoline

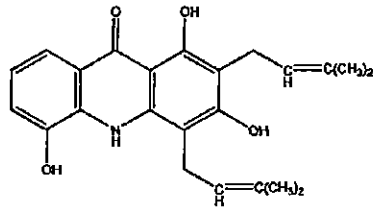


kamptotesina

i. Alkaloid akridin

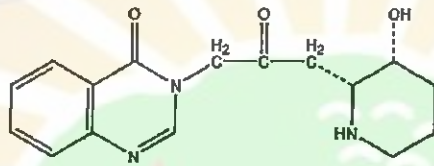


acridone



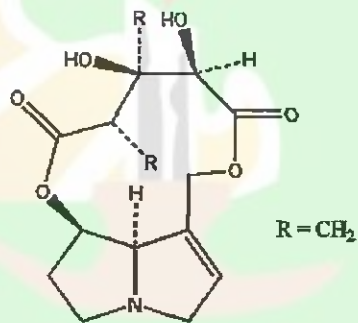
atalephilina

j. Alkaloid kuinazolin



febrifugina

k. Alkaloid izidin



monokrotalina

2. Alkaloid dengan nitrogen eksosiklis dan amina alifatis

- Eritrofleum
- Fenilalkilamina
- Kapsaisin
- Alkaloid dari jenis kolkina

3. Alkaloid putressina, spermidina, dan spermina

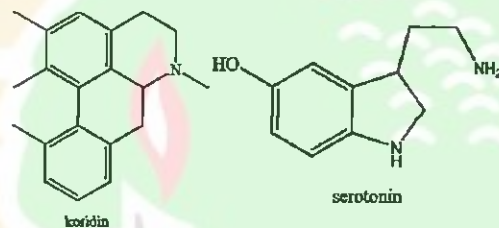
4. Alkaloid peptida

5. Alkaloid terpena dan steroid

Sedangkan berdasarkan asal mulanya (biogenesis) dan hubungannya dengan asam amino, alkaloid dibagi menjadi tiga kelas, yaitu: (1) *True alkaloid*, (2) *Proto alkaloid*, dan (3) *Pseudo alkaloid*. Ciri-ciri dari ketiga kelas alkaloid adalah sebagai berikut:⁷

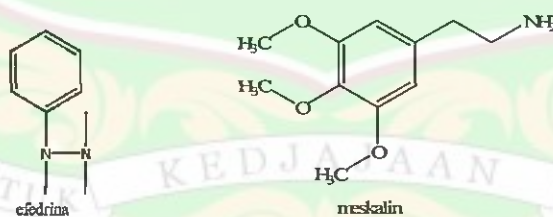
1. True alkaloid

Alkaloid jenis ini memiliki ciri-ciri; toksik, perbedaan keaktifan fisiologis yang besar, basa, biasanya mengandung atom nitrogen di dalam cincin heterosiklis, turunan asam amino, distribusinya terbatas dan biasanya terbentuk di dalam tumbuhan sebagai garam dari asam organik. Tetapi ada beberapa alkaloid ini yang tidak bersifat basa, tidak mempunyai cincin heterosiklis dan termasuk alkaloid kuartener yang lebih condong bersifat asam. Contoh dari alkaloid ini adalah koridin dan serotonin.



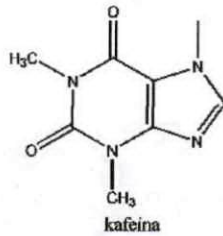
2. Proto alkaloid

Alkaloid jenis ini memiliki ciri-ciri; mempunyai struktur amina yang sederhana, di mana atom nitrogen tidak berada di dalam cincin heterosiklis, biosintesis berasal dari asam amino dan basa, istilah *biological amine* sering digunakan untuk alkaloid ini. Contoh dari alkaloid ini adalah meskalina dan efedrina.



3. Pseudo alkaloid

Alkaloid jenis ini memiliki ciri-ciri; tidak diturunkan dari asam amino dan umumnya bersifat basa. Contohnya adalah kafeina

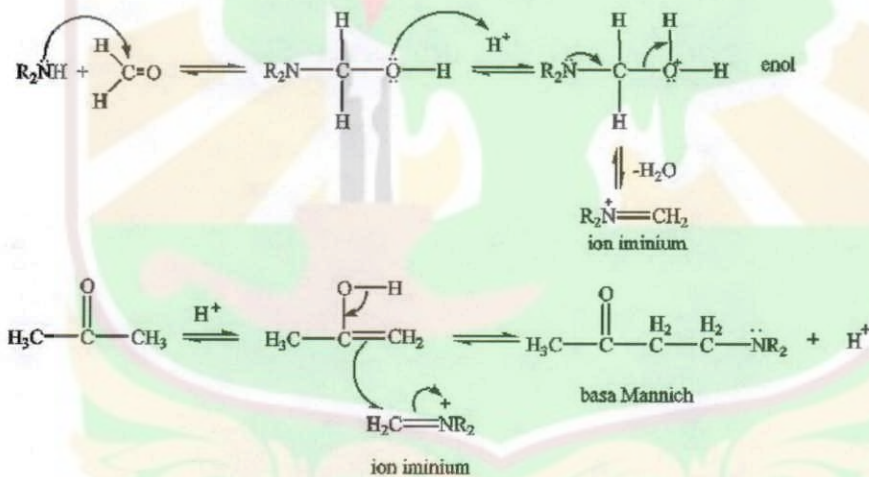


2.2.6 Biosintesis Alkaloid

Robinson dan Barton memperlihatkan suatu biosintesis yang koheren, dimana alkaloid dibiosintesis melalui beberapa cara seperti :⁶

1. Reaksi Mannich

Reaksi Mannich merupakan kondensasi aldehida dengan suatu amina membentuk ikatan karbon-nitrogen dalam bentuk imina (garam iminium), yang diikuti oleh serangan suatu atom nukleofilik yang berupa enol atau fenol membentuk ikatan karbon-karbon. Mekanisme reaksi Mannich dapat dilihat pada Gambar 3.

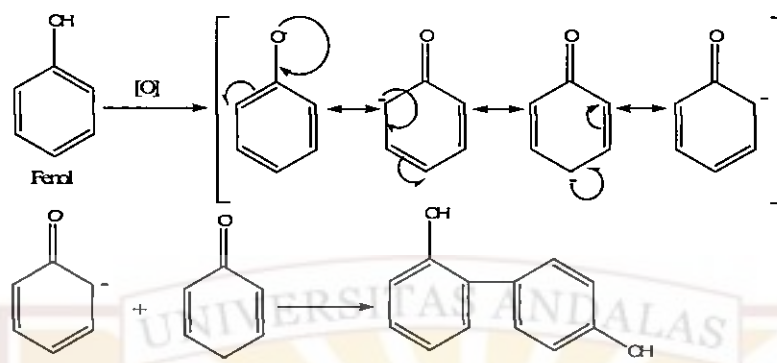


Gambar 3. Mekanisme Reaksi Mannich

2. Reaksi kopling oksidasi fenol

Disamping reaksi Mannich, biosintesis alkaloid melibatkan pula reaksi-reaksi sekunder yang menyebabkan terbentuknya berbagai jenis struktur alkaloid. Salah satu reaksi ini yang terpenting adalah reaksi rangkap oksidasi fenol pada posisi orto atau para dari gugus fenol. Reaksi ini berlangsung dengan mekanisme radikal bebas, diikuti oleh penggabungan radikal menghasilkan

ikatan karbon-karbon. Mekanisme reaksi kopling oksidasi fenol dapat dilihat pada Gambar 4.



Gambar 4. Mekanisme Reaksi Kopling Oksidasi Fenol

2.3 Metoda Identifikasi Alkaloid

Tumbuhan yang mempunyai rasa pahit umumnya diduga mengandung alkaloid, untuk itu cara yang paling mudah untuk mengenal adanya alkaloid dalam tumbuhan adalah dengan jalan mencicipi bahan yang akan dianalisa tersebut, namun cara ini hanyalah merupakan uji pendahuluan saja karena tidak semua alkaloid berasa pahit.⁶

Dalam mengidentifikasi alkaloid secara kimia dapat dilakukan dengan berbagai cara seperti :

1. Prosedur Culvenor dan Fitzgerald.

Dua sampai empat gram sampel segar dirajang halus, gerus dengan bantuan pasir bersih didalam lumping porselen, basahi dengan 10 mL kloroform, tambahkan 10 mL kloroform – ammonia 0,05 M, gerus dan saring kedalam tabung reaksi. Tambahkan asam sulfat 2 N sebanyak 10 tetes, kocok perlahan dan biarkan sampai terjadi pemisahan. Ambil lapisan asam dan pindahkan ke dalam tabung reaksi yang lain dan tambahkan 1 tetes pereaksi Mayer, terbentuk endapan putih berarti menunjukkan adanya alkaloid. Sedangkan uji dengan pereaksi Wagner dan Dragendorff memberikan endapan coklat dan merah jingga.

2. Prosedur Kiang – Douglas.

Sampel yang tersedia dibasakan dengan amoniak, kemudian diekstrak dengan pelarut organik (kloroform). Hasil ekstrak dipekatkan dan ditambahkan HCl 2 N, larutan asam ditambah reagen Mayer, Dragendorff atau reagen Bouchardat. Terbentuknya endapan adalah indikasi untuk alkaloid.

2.4 Ekstraksi dan Fraksinasi Alkaloid

Ekstraksi dilakukan bergantung pada tekstur dan kandungan air bahan tumbuhan yang diekstraksi dan jenis senyawa yang diisolasi. Ekstraksi dapat dilakukan dengan menggunakan sampel segar atau sampel kering. Dalam melakukan proses ekstraksi tersebut dapat digunakan cara maserasi, yaitu proses penyarian sederhana dengan cara merendam tumbuhan dalam pelarut tertentu, tumbuhan menjadi lunak dan senyawa yang dikandungnya akan tertarik ke dalam pelarut.⁶

Ekstrak hasil maserasi diuapkan sampai sekental sirup dan residunya difraksinasi antara larutan asam dengan pelarut organik. Tujuannya agar semua asam-asam organik yang membentuk garam dengan alkaloid lepas. Larutan asam didekantasi atau disaring, dibasakan dengan natrium karbonat atau amoniak agar alkaloid kembali ke dalam bentuk basa bebas. Kemudian diekstraksi dengan pelarut yang sesuai, misalnya kloroform atau etil asetat. Untuk memisahkan pengotor polar fraksi dicuci dengan natrium klorida jenuh dan dengan natrium sulfat anhidrat. Fraksi diuapkan sehingga diperoleh alkaloid kasar.⁶

2.5 Metode kromatografi

Metode kromatografi umumnya digunakan untuk pemisahan komponen-komponen alkaloid, dimana komponen yang akan dipisahkan terdistribusi diantara dua fasa yang saling tidak bercampur, yaitu fasa diam dan fasa gerak.⁶

Metoda kromatografi yang dipakai untuk menganalisis komponen alkaloid adalah kromatografi lapisan tipis (KLT). Fasa diam atau adsorban yang sering digunakan adalah silika gel. Sedangkan untuk fasa gerak dipakai pelarut organik yang kepolarannya sesuai dengan senyawa yang akan dipisahkan. Untuk mendeteksi totalan kromatogram pada plat KLT dapat digunakan lampu UV untuk senyawa yang menyerap sinar UV pada panjang gelombang 254 dan 356

nm. Untuk alkaloid dapat digunakan pereaksi Dragendoff menghasilkan noda berwarna jingga.⁶

Kromatografi kolom digunakan untuk pemisahan alkaloid dalam jumlah besar. Fasa diam dapat berupa zat padat yang tersusun rata dalam kolom, sedangkan fasa gerak mengalir melewati fasa diam berdasarkan gravitasi bumi. Pemilihan fasa gerak tergantung pada sifat dan kelarutan campuran yang akan dipisahkan. Pelarut yang keluar ditampung dalam bentuk fraksi-fraksi, dimonitor dengan KLT, dan fraksi yang nilai R_f relatif sama digabung untuk selanjutnya dilakukan proses pemurnian.⁶

2.6 Karakterisasi Senyawa

2.6.1 Spektroskopi Ultraviolet dan Visibel (UV-Vis)

Spektroskopi UV-Vis adalah metoda yang digunakan dalam penentuan struktur suatu senyawa.¹² Pemakaian spektroskopi UV-Vis dalam penentuan struktur suatu molekul senyawa organik prinsipnya berdasarkan transisi elektron dari orbital yang memiliki tingkat energi yang lebih rendah ke tingkat energi yang lebih tinggi. Elektron dalam molekul pada keadaan biasa berada pada tingkat energi dasar. Adanya energi yang berasal dari energi elektromagnetik dapat berinteraksi dengan molekul organik, akibatnya elektron yang berada pada keadaan dasar dapat berpindah ke orbital yang lebih tinggi elektronnya (terekstisasi). Bagian molekul yang mampu menyerap energi untuk melakukan proses eksitasi disebut kromofor.¹³

Spektrum serapan kandungan tumbuhan dapat diukur dalam larutan yang sangat encer dengan pembanding blanko pelarut serta menggunakan spektrofotometer yang merekam otomatis. Senyawa tanpa warna diukur pada panjang gelombang 200-400 nm. Senyawa berwarna diukur pada panjang gelombang 200-700 nm.¹¹ Panjang gelombang sinar UV berada pada rentang 100-400 nm sedangkan panjang gelombang sinar tampak berada pada rentang 400-750 nm.¹²

Kromofor yang menyebabkan eksitasi dari σ ke σ^* adalah sistem yang mempunyai elektron σ pada orbital molekul. Senyawa-senyawa yang hanya mempunyai orbital σ adalah senyawa organik jenuh yang tidak mempunyai

pasangan elektron bebas. Transisi dari σ ke σ^* ini akan menghasilkan serapan pada λ_{maks} sekitar 150 nm.

Transisi dari n ke σ^* menyerap pada λ_{maks} kecil dari 200 nm, yang diberikan oleh sistem yang mempunyai elektron yang tidak berikatan dan dengan adanya orbital σ pada molekul.

Kromofor yang memberikan transisi dari π ke π^* menyerap pada λ_{maks} kecil dari 200 nm (tidak terkonyugasi). Kromofor ini merupakan tipe transisi dari sistem yang mengandung elektron π pada orbital molekulnya. Sedangkan kromofor yang memberikan transisi dari n ke π^* memberikan serapan pada λ_{maks} 300 nm.¹³

2.6.2 Spektroskopi Inframerah (IR)

Spektroskopi inframerah pada umumnya digunakan untuk menentukan gugus fungsi senyawa organik dan juga memberikan informasi struktur suatu senyawa organik dengan membandingkan daerah sidik jarinya. Pengukuran pada spektrum inframerah dilakukan pada daerah cahaya inframerah tengah (mid-infrared) yaitu pada panjang gelombang 2,5-50 μm atau bilangan gelombang 4000-200 cm^{-1} . Energi yang dihasilkan oleh radiasi ini akan menyebabkan vibrasi atau getaran pada molekul.¹³

2.7 Uji Aktivitas Antibakteri

Mikroorganisme dapat dihambat atau dibunuh dengan proses fisik atau bahan kimia. Bahan antimikroba diartikan sebagai bahan yang mengganggu pertumbuhan dan metabolisme mikroba, sehingga bahan tersebut dapat menghambat pertumbuhan atau bahkan membunuh mikroba. Apabila mikroorganisme yang dimaksud adalah bakteri, maka antimikroba lebih sering disebut dengan bahan antibakteri.¹⁴

Cara kerja bahan antibakteri antara lain dengan merusak dinding sel, merubah permeabilitas sel, merubah molekul protein dan asam nukleat, menghambat kerja enzim, serta menghambat sintesis asam nukleat dan protein.¹⁴

Pengujian aktivitas antibakteri adalah teknik untuk mengukur berapa besar potensi atau konsentrasi suatu senyawa dapat memberikan efek bagi mikroorganisme. Berdasarkan sifat toksisitas selektif, zat anti bakteri ada yang

bersifat menghalangi pertumbuhan bakteri, dikenal sebagai aktivitas bakteriostatik, dan ada yang bersifat membunuh bakteri, dikenal sebagai aktivitas bakterisidal.¹⁴

Kepekaan bakteri terhadap senyawa yang berfungsi sebagai antibiotik bervariasi. Bakteri gram positif biasanya lebih peka dibandingkan bakteri gram negatif. Meskipun beberapa antibiotik dapat bereaksi atau mempengaruhi hanya pada bakteri gram negatif, tetapi tidak menutupi kemungkinan bakteri gram negatif lebih peka dibandingkan bakteri gram positif pada beberapa antibiotik tertentu. Zat antibiotik yang dapat bereaksi dengan bakteri gram positif dan gram negative disebut dengan antibiotik *Broad Spectrum* atau antibiotik berspektrum luas.¹⁴

Salah satu metode yang digunakan untuk uji aktivitas antibakteri yaitu metode difusi cakram. Prinsip dari metode difusi cakram adalah senyawa antibakteri dituangkan ke dalam kertas saring (kertas cakram). Kertas cakram yang mengandung senyawa antibakteri tertentu ditanam pada media pembenihan agar padat yang telah dicampur dengan bakteri yang diuji, kemudian diinkubasi pada suhu dan waktu tertentu, selanjutnya diamati adanya area (zona) jernih di sekitar kertas cakram yang menunjukkan tidak adanya pertumbuhan bakteri. Setelah didapatkan zona beningnya maka ditentukan mikrobial indeksnya. Untuk ketentuan kekuatan antibakteri dapat dilihat pada Tabel 1.¹⁴

$$^{15}\text{Mikrobial indeksnya : } \frac{\text{Diameter halo (cm)} - \text{Diameter cakram (cm)}}{\text{Diameter cakram (cm)}}$$

Tabel 1. Ketentuan Kekuatan Antibakteri

No	Daerah Hambatan	Ketentuan
1	> 20 mm	Sangat kuat
2	10-20 mm	Kuat
3	5-10 mm	Sedang
4	< 5 mm	Lemah

BAB III. METODE PENELITIAN

3.1 Waktu dan Tempat Penelitian

Penelitian dilakukan di Laboratorium Kimia Organik Bahan Alam Jurusan Kimia Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam Universitas Andalas Padang pada bulan Maret 2011 sampai September 2011.

3.2 Alat dan Bahan

3.2.1 Alat

Alat-alat yang digunakan yaitu alat distilasi yang digunakan untuk mendistilasi pelarut, rotari evaporator Heidolp WB 2000 untuk menguapkan pelarut agar sampel menjadi pekat, spektrofotometer UV-Vis Pharmaspec 1700 Shimadzu untuk pengukuran absorbansi sampel, spektroskopi inframerah FTIR Perkin Elmer 1600 series untuk mengetahui gugus fungsi dari sampel, lampu UV model UV GL – 58 UV 254 dan 365 nm untuk melihat noda yang terbentuk pada plat KLT, kolom kromatografi (diameter 3 cm, tinggi 60 cm) untuk pemisahan senyawa-senyawa dalam sampel, plat KLT untuk tempat penotolan noda, autoclave untuk mensterilkan alat. Peralatan lainnya yaitu plat tetes, alu dan lumpang, aluminium foil, , pipa kapiler, jarum ose, pinset, cawan petri, stirrer, enkas, pembakar bunsen, erlenmeyer, pipet tetes, tabung reaksi dan peralatan gelas yang umum digunakan di laboratorium.

3.2.2 Bahan

Bahan – bahan yang digunakan adalah pelarut teknis yang telah didistilasi seperti metanol, etil asetat, serta n-heksan, kertas saring, kertas cakram, kain kasa, dan kapas. Plat KLT yang digunakan plat KLT silika gel 60 F₂₅₄. Adsorben yang dipakai pada proses kolom kromatografi adalah silika gel 60 Art,77733 keluaran Merck. Pereaksi-pereaksi yang digunakan untuk uji pendahuluan : Mayer (Raksa(II) klorida), Dragendorf (Bismut Subnitrat) Lieberman Burchard (anhidrida asetat + asam sulfat pekat), Sianidin test (asam klorida pekat + Bubuk magnesium), dan besi triklorida. Bahan kimia lainnya seperti natrium hidroksida 1 %, natrium bikarbonat, asam asetat 5 % dan aquades, medium Nutrient agar (NA) (peptone 5 g/L dan daging 3 g/mL), aquades, bakteri *Staphylococcus aureus*

(*S.aureus*) dari jenis gram positif dan *Escherichia coli* (*E.coli*) dari jenis gram negatif.

3.3 Pengambilan dan Persiapan Sampel

Sampel diambil di daerah Sicincin, Parit Malintang, dan Kiambang Kabupaten Padang Pariaman pada bulan Januari 2011 sebanyak 12 Kg dan identifikasi tumbuhan dilakukan di Herbarium Jurusan Biologi Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam Universitas Andalas. Bagian yang diisolasi adalah buah dari *B. javanica*. Sampel dikering-anginkan selama kurang lebih tiga minggu pada udara terbuka yang tidak terkena cahaya matahari secara langsung. Setelah sampel tersebut kering kemudian di haluskan dan ditimbang.

3.4 Uji Fitokimia Buah *Brucea javanica* L. Merr

Identifikasi alkaloid dilakukan dengan menggunakan prosedur Culvenor dan Fitzgerald yaitu : sekitar dua gram sampel segar dirajang halus, gerus dengan bantuan pasir bersih didalam lumping porselen, basahi dengan 10 mL kloroform, tambahkan 10 mL kloroform – ammonia 0,05 M, gerus dan saring kedalam tabung reaksi. Tambahkan asam sulfat 2 N sebanyak 10 tetes, kocok perlahan dan biarkan sampai terjadi pemisahan. Ambil lapisan asam dan pindahkan ke dalam tabung reaksi yang lain dan tambahkan 1 tetes pereaksi Mayer, terbentuk endapan putih berarti menunjukkan adanya alkaloid. Sedangkan uji dengan pereaksi Dragendorff memberikan endapan coklat dan merah jingga.

3.5 Isolasi Alkaloid dari Ekstrak Buah *Brucea Javanica* L. Merr

Buah *B.javanica* yang telah berbentuk serbuk (3,2 kg) dimaserasi dengan n-heksan sebanyak 3 kali maserasi dengan jumlah pelarut 1 L, 800 mL, dan 500 mL yang mana jarak maserasi 3 hari. Kemudian dimaserasi dengan 600 mL metanol sebanyak 6 kali maserasi dengan jarak waktu maserasi 3 hari.

Gabungan ekstrak metanol yang diperoleh dipekatkan dengan rotari evaporator sampai volumenya 500 mL. Kemudian diencerkan dengan asam asetat 5 % sampai volume 1 L. diendapkan semalam sampai terbentuk 2 lapisan dan kemudian didekantasi. Bagian larutan (fraksi asam) dinetralkan dengan natrium bikarbonat sampai tidak berbuih (pH 7) dan selanjutnya difraksinasi dengan 300

mL etil asetat sebanyak 13 kali sampai warna fraksi etil asetat menjadi bening. Fraksi etil asetat dipekatkan dengan rotari evaporator sehingga didapatkan alkaloid basa lemah 11.042 g.¹⁶

Fraksi pekat etil asetat ini diambil sedikit dan dilarutkan dengan etil asetat dalam vial, kemudian dilakukan penotolan pada plat KLT dengan pipet kapiler dan dielusi dengan n-heksan-etil asetat dan etil asetat-metanol dengan berbagai perbandingan. Kromatogram hasil elusi dilihat dengan menggunakan pereaksi warna dragendorff. Pada penampakan noda dengan lampu UV dengan panjang gelombang 254 nm noda berwarna kecoklatan, panjang gelombang 365 nm noda berwarna biru terang, dan dengan menggunakan pereaksi Dragendorf noda yang berwarna biru terang berubah menjadi warna merah-jingga.

3.6 Pemurnian Fraksi Etil Asetat dari Ekstrak Buah *Brucea Javanica L. Merr*

Berdasarkan pola KLT, maka pemisahan dengan kromatografi kolom dipilih sistem elusi dengan metoda elusi bergradien. Kromatografi kolom dilakukan dengan mensuspensikan silika gel dengan n-heksan. kemudian bubuk silika ini dimasukkan ke dalam kolom kromatografi yang bagian dasarnya telah dilapisi kapas sebagai penyaring n-heksan, dibiarkan turun sambil dinding kolom diketok-ketok untuk mencegah terbentuknya rongga udara sehingga silika menjadi padat dan rata. Sampel yang akan diuji di preadsorpsi terlebih dahulu. Caranya dengan mencampurkan sampel dengan silika gel dengan perbandingan 1:1, kemudian aduk hingga kering. Setelah itu dimasukkan ke dalam kolom yang telah disiapkan. Tinggi silika gel dalam kolom kromatografi 45 cm dan tinggi sampel yang telah di preadsorpsi 5 cm. Selanjutnya dilakukan elusi dengan menggunakan sistem elusi SGP (Step Gradien Polarity). Pengelusian dimulai dari eluen n-heksan 100 %, n-heksan - etil asetat, etil asetat 100 %, etil asetat - metanol dan metanol 100 % dengan berbagai perbandingan eluen yang masing-masingnya sebanyak 200 mL. Fraksi-fraksi yang turun di tampung dengan vial. Setiap fraksi yang didapatkan dianalisa pola pemisahannya dengan KLT dan noda di amati dibawah lampu UV pada panjang gelombang 254 nm dan 365 nm. Noda yang memiliki Rf yang sama digabung, sehingga nantinya didapatkan beberapa fraksi. Fraksi yang memberikan pola noda yang cukup baik (pola noda tunggal) dimurnikan dengan cara rekristalisasi. Sehingga diperoleh kristal yang bebas dari pengotor dan

memberikan pola noda yang tunggal. Kristal yang didapatkan selanjutnya dilakukan karakterisasi.

3.7 Karakterisasi Fraksi Etil Asetat Buah *Brucea Javanica L. Merr*

Karakterisasi senyawa hasil isolasi dilakukan pengukuran spektroskopi ultraviolet (UV – Vis) dan Inframerah.

a. Pengukuran dengan Spektroskopi Ultraviolet (UV – Vis)

Sebanyak kurang lebih 2 mg alkaloid dilarutkan dalam metanol murni. Alat spektrofotometer diatur daerah serapannya 200 - 400 nm. Larutan senyawa hasil isolasi dimasukkan kedalam kuvet dan kemudian ditentukan serapan maksimumnya.

b. Pengukuran dengan Spektroskopi Inframerah

Kurang lebih 1 mg sampel dengan 100 mg KBr dicampurkan sampai homogen. Kemudian dijadikan pelet dengan memberikan tekanan tinggi. Pellet diletakkan pada alat spektrofotometer inframerah dan ukur spektranya.

Skema kerja dari isolasi alkaloid dari ekstrak buah *B. javanica* ini terdapat pada Lampiran 2.

3.8 Uji Aktivitas Anti bakteri dengan Metoda Difusi Cakram

Aktifitas antibakteri dari fraksi n-heksan, etil asetat dan metanol dilakukan terhadap 2 jenis bakteri yang telah dibiakkan 1 hari. Bakteri gram negatif yang digunakan yaitu *Escherichia coli* dan bakteri gram positif yang digunakan yaitu *Staphylococcus aureus*. Kedua bakteri ini diinkubasi pada suhu kamar selama 1 hari.

Aktivitas antibakteri dilakukan dengan metode difusi kertas cakram. Medium (3.2 g NA di dalam 160 mL akuades, diautoklaf pada suhu 115°C selama 15 menit) kemudian didinginkan pada suhu kamar. Medium (\pm 20 mL) dituangkan kedalam petridish steril dan dibiarkan mengeras. Setelah mengeras bakteri biakkan digoreskan secara merata dipermukaan medium. Masing-masing fraksi (0,02 ppm) dilarutkan dalam 1 ml etanol dan kemudian dicukupkan volumenya menjadi 10 mL dengan akuades steril. Kertas cakram yang steril direndam dalam larutan masing-masing fraksi yang akan diuji aktivitas antibakterinya. Kertas cakram yang telah diinkubasi pada suhu kamar selama 1

jam dimasukkan kedalam petridish yang telah berisi bakteri dan selanjutnya diinkubasi selama 1 hari. Zona bening yang terbentuk diamati (dalam diameter mm). Kesensitifan bakteri juga dilakukan terhadap kontrol negatif (campuran 1 mL etanol dengan 9 mL akuades steril).¹⁷ Mikrobial indeks dapat dihitung dengan rumus:

$$\text{Mikrobial Indeks} : \frac{\text{diameter halo (cm)} - \text{diameter cakram (cm)}}{\text{diameter cakram (cm)}}$$

Skema kerja aktivitas anti bakteri dengan metoda difusi kertas cakram dapat dilihat pada Lampiran 3.



BAB IV. HASIL DAN DISKUSI

4.1. Pengujian Profil Fitokimia Buah *Brucea javanica* L. Merr

Hasil uji pendahuluan kandungan kimia buah *B. javanica* diketahui mengandung alkaloid dimana menunjukkan hasil yang positif karena terbentuknya kabut putih ketika penambahan pereaksi Mayer pada filtrat dan terbentuk larutan berwarna orange ketika penambahan pereaksi Dragendorff. Hasil Uji fitokimia buah *B. javanica* dapat dilihat pada Lampiran 1.

4.2. Isolasi Alkaloid dari Ekstrak Buah *Brucea javanica* L. Merr

Isolasi alkaloid dari ekstrak buah melur dilakukan secara maserasi terhadap buah *B. javanica* kering yang diawali dengan pelarut n-heksan. Ekstrak pekat n-heksan yang didapat berwarna kuning-kehijauan. Maserasi dengan metanol didapatkan ekstrak pekat metanol yang berwarna coklat-kehitaman yang selanjutnya difraksinasi dengan asam asetat 5 %, NaHCO₃ dan etil asetat. Ekstrak pekat etil asetat yang diperoleh dari fraksinasi berwarna merah-kecoklatan. Dari Fraksi etil asetat ini didapatkan alkaloid basa lemah berupa massa kental sebanyak 11,042 gram. Alkaloid ini kemudian diuji dengan KLT dengan menggunakan berbagai variasi eluen.

4.3 Pemurnian Fraksi Etil Asetat Buah *Brucea javanica* L. Merr

Fraksi etil asetat dilakukan analisa pola pemisahan dengan menggunakan KLT. Data hasil KLT fraksi etil asetat dapat dilihat pada Tabel 2.

Tabel 2. Hasil KLT fraksi etil asetat dengan berbagai perbandingan eluen

No.	Eluen	Pola noda
1	N-heksan 100%	tidak naik
2	N-heksan : etil asetat (8 : 2)	1 noda <i>tailing</i>
3	N-heksan : etil asetat (6 : 4)	2 noda
4	N-heksan : etil asetat (4 : 6)	2 noda terpisah
5	N-heksan : etil asetat (2 : 8)	2 noda <i>tailing</i> , 1 noda terpisah
6	Etil asetat 100%	2 noda terpisah
7	Etil asetat : metanol (8 : 2)	1 noda <i>tailing</i> , 1 noda terpisah
8	Etil asetat : metanol (6 : 4)	2 noda <i>tailing</i>
9	Etil asetat : metanol (4 : 6)	1 noda <i>tailing</i>
10	Etil asetat : metanol (2 : 8)	1 noda <i>tailing</i>
11	Metanol 100%	2 noda terpisah

Berdasarkan uji KLT yang dilakukan terhadap fraksi etil asetat diatas, pola noda yang didapatkan dari beberapa perbandingan eluen tidak begitu bagus. Senyawa yang akan diisolasi berpola tailing dan belum terpisah dengan bagus.

Untuk itu maka dilakukan pemurnian lebih lanjut dengan kromatografi kolom. Hasil kromatografi kolom didapatkan 25 fraksi, dan dapat dilihat pada Tabel 3.

Tabel 3. Hasil Penggabungan fraksi dari kromatografi kolom berdasarkan pola noda

Fraksi	No. Vial	Pola Noda ($\lambda = 365 \text{ nm}$)	Warna noda ($\lambda = 365 \text{ nm}$)
I	7-10	Tidak ada noda	Tidak ada noda
II	11-14	Tidak ada noda	Tidak ada noda
III	24-29	1 noda naik, <i>tailing</i>	Biru samar-samar
IV	30-35	1 noda naik, <i>tailing</i>	Biru samar-samar
V	36-50	2 noda naik, <i>tailing</i>	Biru terang Orange
VI	50-53	1 noda naik	Biru terang
VII	54-56	2 noda naik	Biru terang
VIII	57-60	3 noda naik	Biru terang, orange, biru samar-samar
IX	61-66	2 noda naik	Biru terang, orange
X	67-75	1 noda naik	Biru terang
XI	76-84	2 noda naik	Biru terang, biru samar- samar
XII	85-89	1 noda naik, 2 noda <i>tailing</i>	Biru-orange
XIII	90-95	1 noda naik, 2 noda <i>tailing</i>	Biru terang
XIV	96-99	2 noda naik, 2 noda <i>tailing</i>	Biru terang, biru samar- samar
XV	100-103	3 noda naik, <i>tailing</i>	Biru terang
XVI	105-106	4 noda naik	Biru terang
XVII	108-111	5 noda naik, <i>tailing</i>	Biru terang
XVIII	113-116	4 noda naik, <i>tailing</i>	Biru terang, biru muda
XIX	118-119	2 noda naik	Biru terang
XX	120-132	3 noda naik, <i>tailing</i>	Biru terang
XXI	135-138	3 noda naik, <i>tailing</i>	Biru terang
XXII	141-147	4 noda naik, <i>tailing</i>	Biru terang
XXIII	150-152	2 noda naik	Tidak ada

Fraksi-fraksi yang memiliki noda berwarna biru terang pada λ 365 nm seperti fraksi VII, XV dan XX setelah diuji dengan pereaksi penampak noda dragendorff warnanya berubah menjadi kuning keorangan. Ini menandakan fraksi tersebut memiliki kandungan alkaloid. Namun, fraksi tersebut belum murni

alkaloid karena dari warna lain yang terbentuk menandakan masih terdapat senyawa lain yang belum terpisah. Fraksi VI dan X yang nodanya tunggal dan berwarna biru terang memiliki jumlah kristal yang sedikit sekali sehingga sulit dalam karakterisasi. Fraksi yang memiliki jumlah kristal yang banyak adalah fraksi XVIII yang mana kristalnya berwarna kuning kecoklatan dengan pola jarum. Hasil KLT fraksi XVIII dibawah lampu UV ($\lambda = 365 \text{ nm}$) terlihat adanya 3 noda, yaitu 1 noda berwarna biru terang dan 2 noda berwarna biru dengan menggunakan eluen n-heksan : etil asetat (1 : 9), pola noda yang didapatkan pada fraksi ini berpola tailing. Fraksi ini masih belum murni sehingga dilakukan pemurnian dengan cara rekristalisasi. Cara rekristalisasi dilakukan berdasarkan perbedaan kelarutan antara zat yang akan dimurnikan dengan pengotor dalam suatu campuran pelarut yang cocok. Pelarut yang digunakan untuk rekristalisasi yaitu campuran antara metanol dengan etil asetat. Kristal putih yang diperoleh hasil rekristalisasi diuji dengan plat KLT dan memberikan noda tunggal yang berwarna biru terang, kemudian diuji dengan penampak noda menggunakan pereaksi Dragendorff dimana warnanya berubah menjadi kuning-keoranganen. Hal ini menandakan senyawa tersebut mengandung alkaloid.

kristal putih tersebut juga diuji kemurniannya dengan kromatografi lapisan tipis dengan berbagai komposisi eluen dan juga dilakukan pengelusian berulang-ulang memperlihatkan noda tunggal. Data uji KLT senyawa hasil isolasi dengan berbagai perbandingan eluen dapat dilihat pada Tabel 4.

Tabel 4. Uji KLT senyawa hasil isolasi dengan berbagai perbandingan eluen.

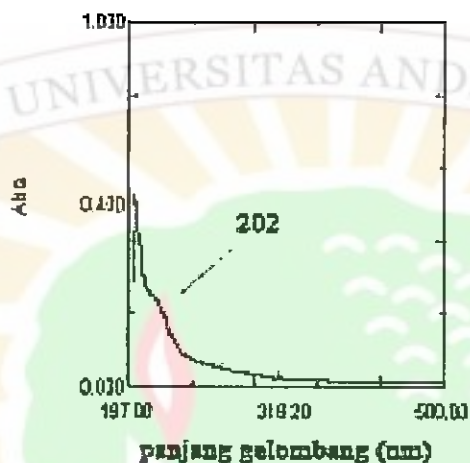
No	Eluen	Warna Noda (UV $\lambda = 365 \text{ Nm}$)	Rf
1	N-heksan : etil asetat (3:7)	Biru terang	0.139
2	N-heksan : etil asetat (0:10)	Biru terang	0.444
3	Etil asetat : metanol (7: 3)	Biru terang	0.722
4	Etil asetat : metanol (3 : 7)	Biru terang	0.833
5	Etil asetat : metanol (0 : 10)	Biru terang	0.639

Dari data diatas dapat dilihat bahwa hasil KLT kristal alkaloid memberikan noda tunggal pada beberapa perbandingan eluen. Hal ini mengindikasikan bahwa senyawa hasil isolasi telah murni. Senyawa hasil isolasi

ini tidak berupa kristal kering tetapi berupa kristal yang basah sehingga tidak bisa dilakukan pengukuran titik leleh.

4.4 Karakterisasi Fraksi Etil asetat Buah *Brucea javanica* L. Merr

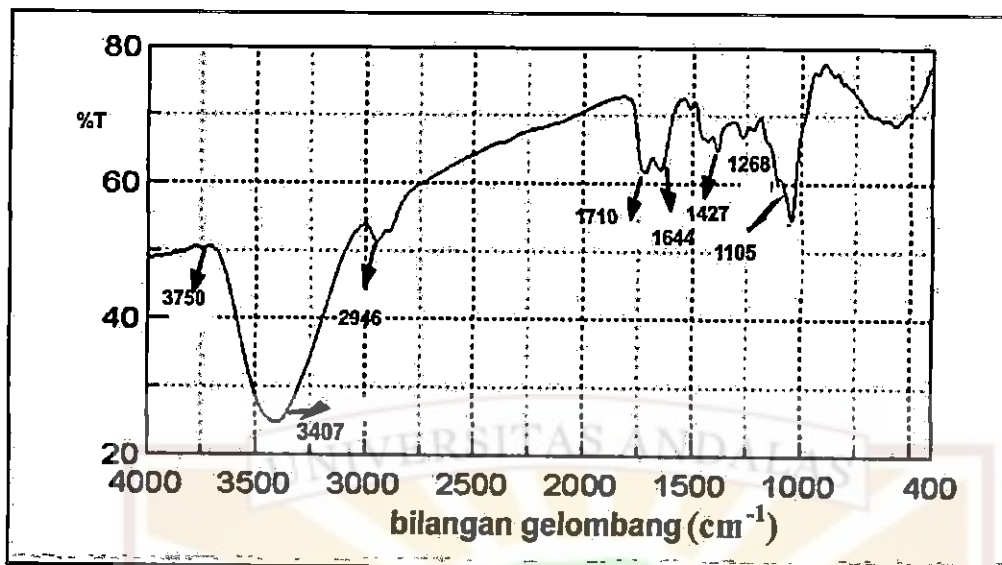
Pada data spektrum UV senyawa alkaloid dengan pelarut metanol memberikan serapan maksimum pada panjang gelombang 202 nm. Hasil spektrum UV dapat dilihat pada Gambar 5.



Gambar 5. Spektrum UV senyawa hasil isolasi dengan pelarut metanol.

Berdasarkan pita serapan maksimum yang diperoleh menandakan bahwa adanya kromofor yang menyebabkan terjadinya transisi $n \rightarrow \sigma^*$. Hal ini berarti sistem memiliki elektron pada orbital molekul tak mengikat (n) dan σ . Senyawa yang hanya memiliki orbital molekul n dan σ ialah molekul organik jenuh yang mempunyai satu atau lebih atom dengan pasangan elektron sunyi. Contoh kromofornya adalah $\equiv\text{C-O-}$, $\equiv\text{C-S-}$, $\equiv\text{C-N-}$ dan $\equiv\text{C-Cl-}$.¹⁸

Karakterisasi senyawa hasil isolasi juga dilakukan dengan spektroskopi inframerah. Hasil pengukuran dapat ditunjukkan pada Gambar 6.



Gambar 6. Spektrum Inframerah senyawa hasil isolasi

Serapan pada bilangan gelombang 3407 cm^{-1} ($3750 - 3000\text{ cm}^{-1}$) dengan pita serapan yang lebar diduga adalah serapan gugus O-H dari air. Ini diperkuat dengan adanya vibrasi ulur C-O dalam alkohol pada daerah 1268 cm^{-1} ($1000 - 1300\text{ cm}^{-1}$). Serapan pada bilangan gelombang 2946 cm^{-1} ($3300-2900\text{ cm}^{-1}$) diperkirakan serapan dari C-H cincin alkana. Dugaan ini diperkuat dengan adanya puncak serapan yang terlihat pada 1644 cm^{-1} ($1675 - 1500\text{ cm}^{-1}$) yang merupakan puncak dari C=C dan 1427 cm^{-1} ($1475 - 1300\text{ cm}^{-1}$) yang merupakan serapan vibrasi bengkok dari CH_2 . Serapan pada bilangan gelombang 1710 cm^{-1} menunjukkan adanya gugus C=O. Serapan pada bilangan gelombang 3750 cm^{-1} ($3750 - 3000\text{ cm}^{-1}$) terdapat puncak kecil yang diperkirakan puncak N-H yang mana diperkuat dengan adanya serapan pada 1105 cm^{-1} ($1350 - 1000\text{ cm}^{-1}$) menunjukkan adanya rentangan C-N yang mencirikan gugus fungsi khas dari alkaloid.

Berdasarkan data spektrum IR makin memperkuat gambaran bahwa senyawa hasil isolasi merupakan senyawa golongan alkaloid yang memiliki gugus O-H, C-O, C=O, C-N, C=C dan C-H. Uji Dragendorff terhadap senyawa hasil isolasi memperkuat bahwa senyawa tersebut merupakan golongan alkaloid.

4.5 Uji Aktivitas Antibakteri dengan Metode Difusi Cakram

Uji aktivitas antibakteri dilakukan terhadap tiga fraksi yaitu n-heksan, etil asetat, dan metanol dengan metoda difusi cakram. Uji yang diutamakan yaitu terhadap

fraksi etil asetat yang mengandung alkaloid, gunanya untuk melihat aktivitas alkaloid yang diisolasi terhadap bakteri *Escherichia coli* dan *Staphylococcus aureus*. Sedangkan untuk fraksi n-heksan dan air hanya untuk menambah informasi ada atau tidaknya aktivitas antibakteri dari kedua fraksi ini. Data hasil uji aktivitas antibakteri yang didapatkan dapat dilihat pada Tabel 5. Gambar hasil uji aktifitas anti bakteri dapat dilihat pada Lampiran 2 dan 3.

Tabel 5. Hasil uji aktifitas antibakteri fraksi n-heksan, etil asetat dan air dengan metoda cakram.

Fraksi	Diameter cakram (mm)	Diameter Zona Bening (mm)				Mikrobal Indeks	
		<i>S. aureus</i>	Diameter kontrol	<i>E. coli</i>	Diameter kontrol	<i>S. aureus</i>	<i>E. coli</i>
N-heksan (0,2 %)	6	6,937	7,750	7,937	8,500	0,1562	0,3228
EtOAc (0,2 %)	6	7,312	6,625	8,312	7,500	0,2187	0,3853
Air (0,2 %)	6	6,500	6,750	6,687	7,125	0,0833	0,1145

Dari data uji aktivitas anti bakteri pada Tabel 5, dapat diketahui bahwa daerah zona bening dari fraksi etil asetat lebih besar dibandingkan dengan fraksi n-heksan dan air terhadap bakteri *E. coli* dan *S. aureus*. Nilai mikrobial indeks fraksi etil asetat buah *B. javanica* pun lebih besar dibandingkan fraksi n-heksan dan air yaitu 0,2187 untuk *E. coli* dan 0,3853 untuk *S. aureus*. Ini menandakan bahwa senyawa alkaloid yang telah diisolasi dari fraksi etil asetat mampu menghambat pertumbuhan kedua bakteri tersebut. Berdasarkan ketentuan kekuatan antibakteri pada Tabel 1, besar zona bening dari fraksi etil asetat (7,312 mm terhadap *S. aureus* dan 8,312 mm terhadap *E.coli*) memiliki kekuatan antibakteri yang sedang. Untuk fraksi n-heksan dan air diperoleh informasi bahwa kedua fraksi ini memiliki kemampuan untuk menghambat pertumbuhan bakteri. Tetapi daya hambat dari kedua fraksi ini lebih kecil dibandingkan daya hambat pada fraksi etil asetat. Untuk itu fraksi etil asetat adalah fraksi yang aktif terhadap uji antibakteri. Perhitungan mikrobial indeks dapat dilihat pada Lampiran 6.

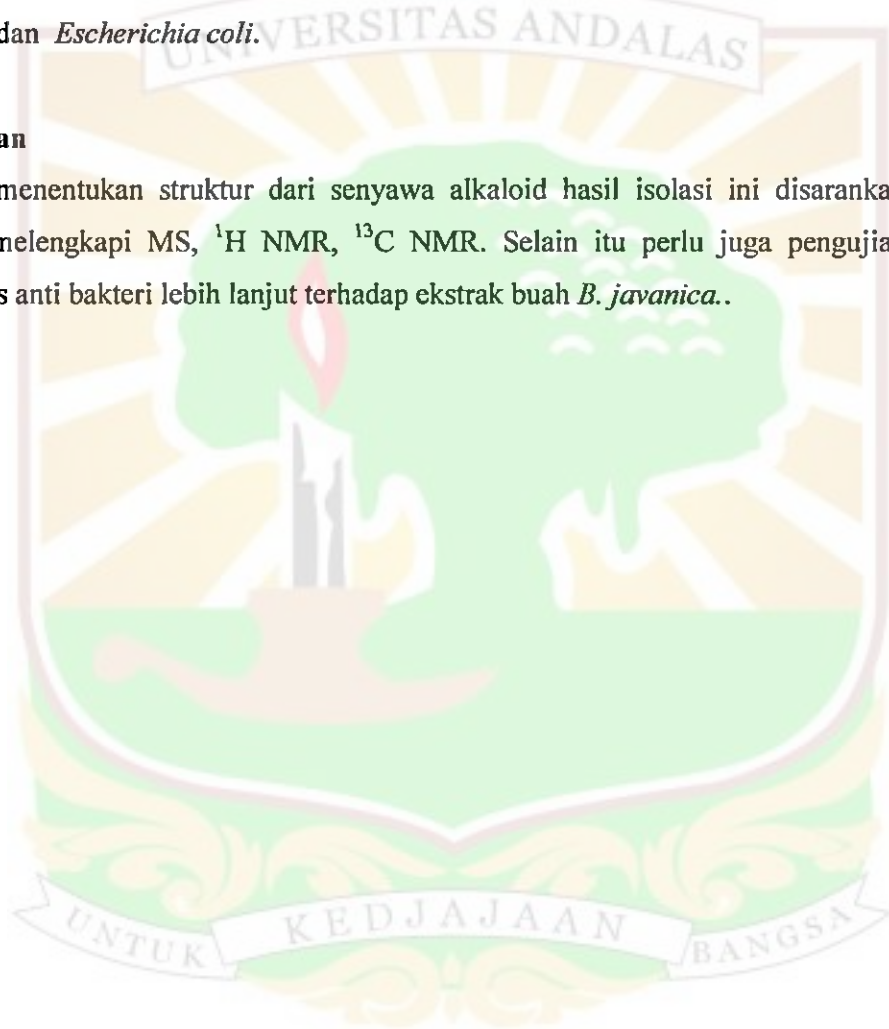
BAB V. KESIMPULAN DAN SARAN

5.1 Kesimpulan

Berdasarkan penelitian yang telah dilakukan dapat disimpulkan bahwa senyawa alkaloid diperoleh dari fraksi etil asetat ekstrak buah *B. javanica*. Senyawa ini memiliki gugus fungsi C=O, O-H, C-O, C-N, C=C dan C-H, namun belum diketahui posisi dari gugus-gugus tersebut. Fraksi etil asetat dari ekstrak buah *B. javanica* memiliki aktivitas sebagai anti bakteri terhadap bakteri *Staphylococcus aureus* dan *Escherichia coli*.

5.2 Saran

Untuk menentukan struktur dari senyawa alkaloid hasil isolasi ini disarankan untuk melengkapi MS, ¹H NMR, ¹³C NMR. Selain itu perlu juga pengujian aktivitas anti bakteri lebih lanjut terhadap ekstrak buah *B. javanica*.

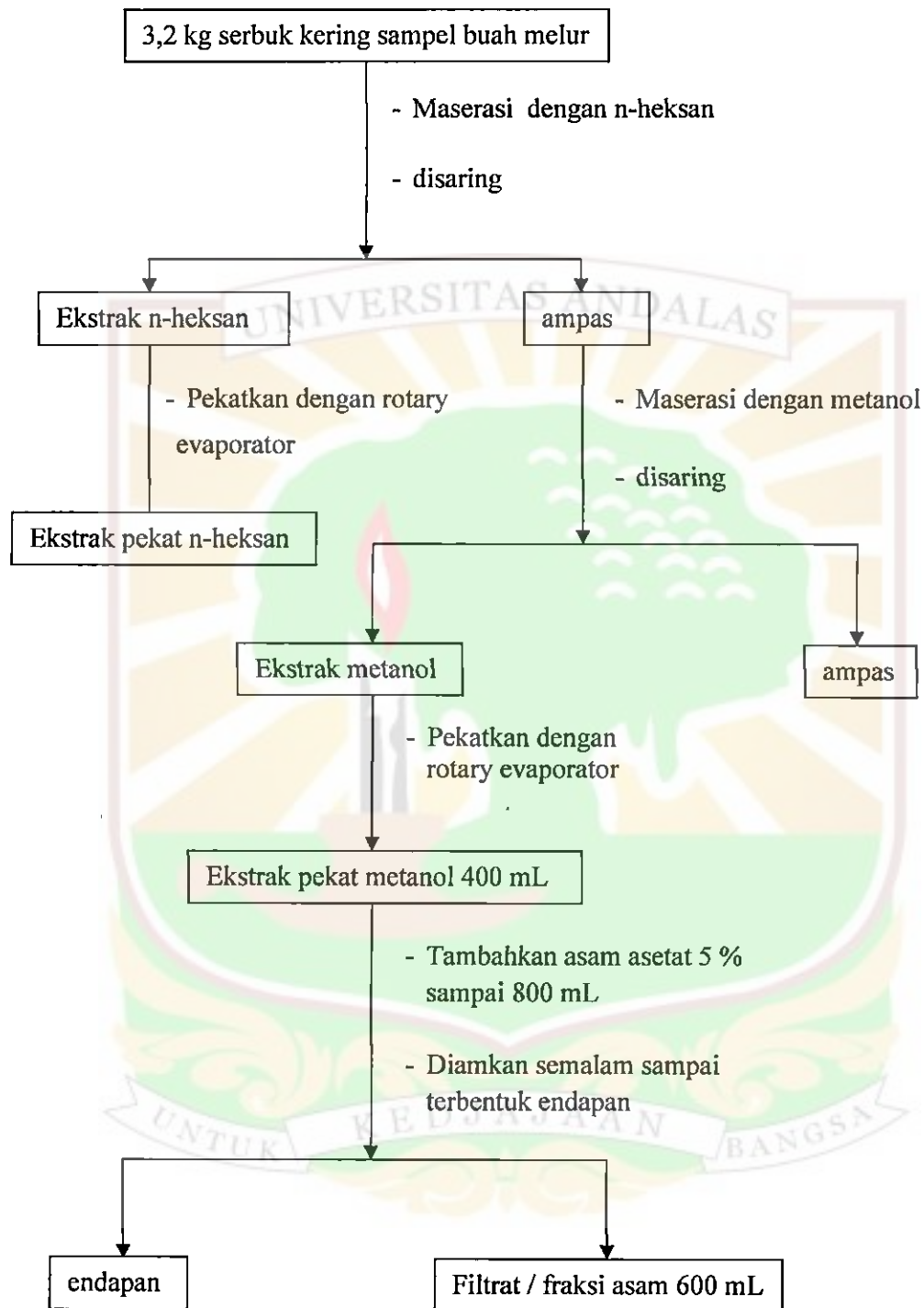


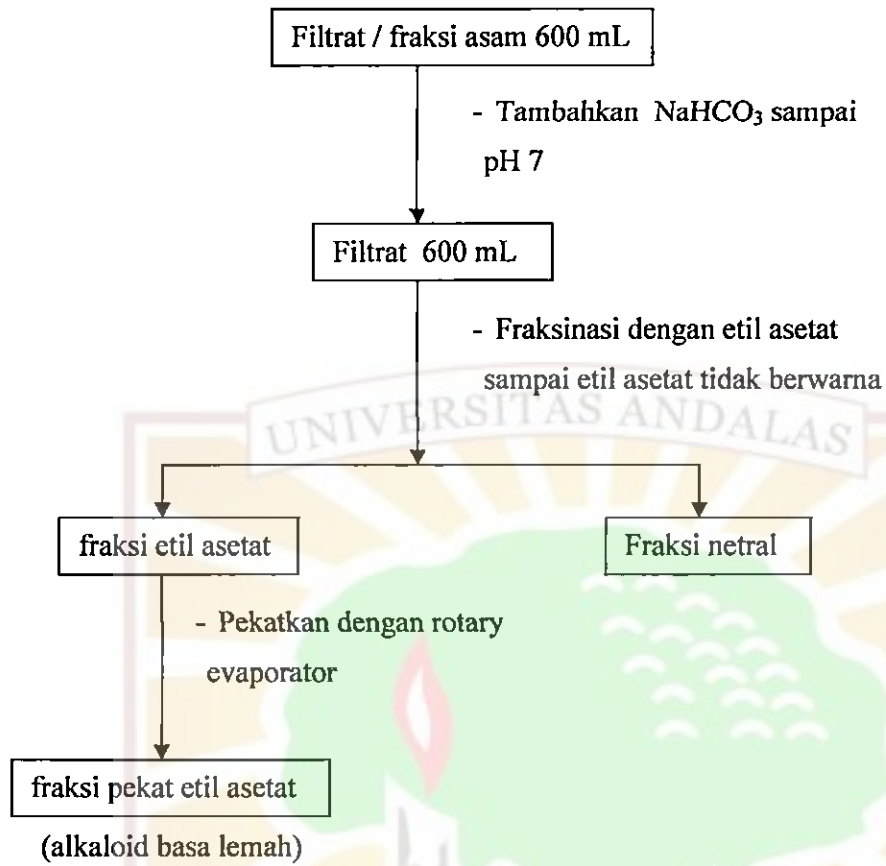
DAFTAR PUSTAKA

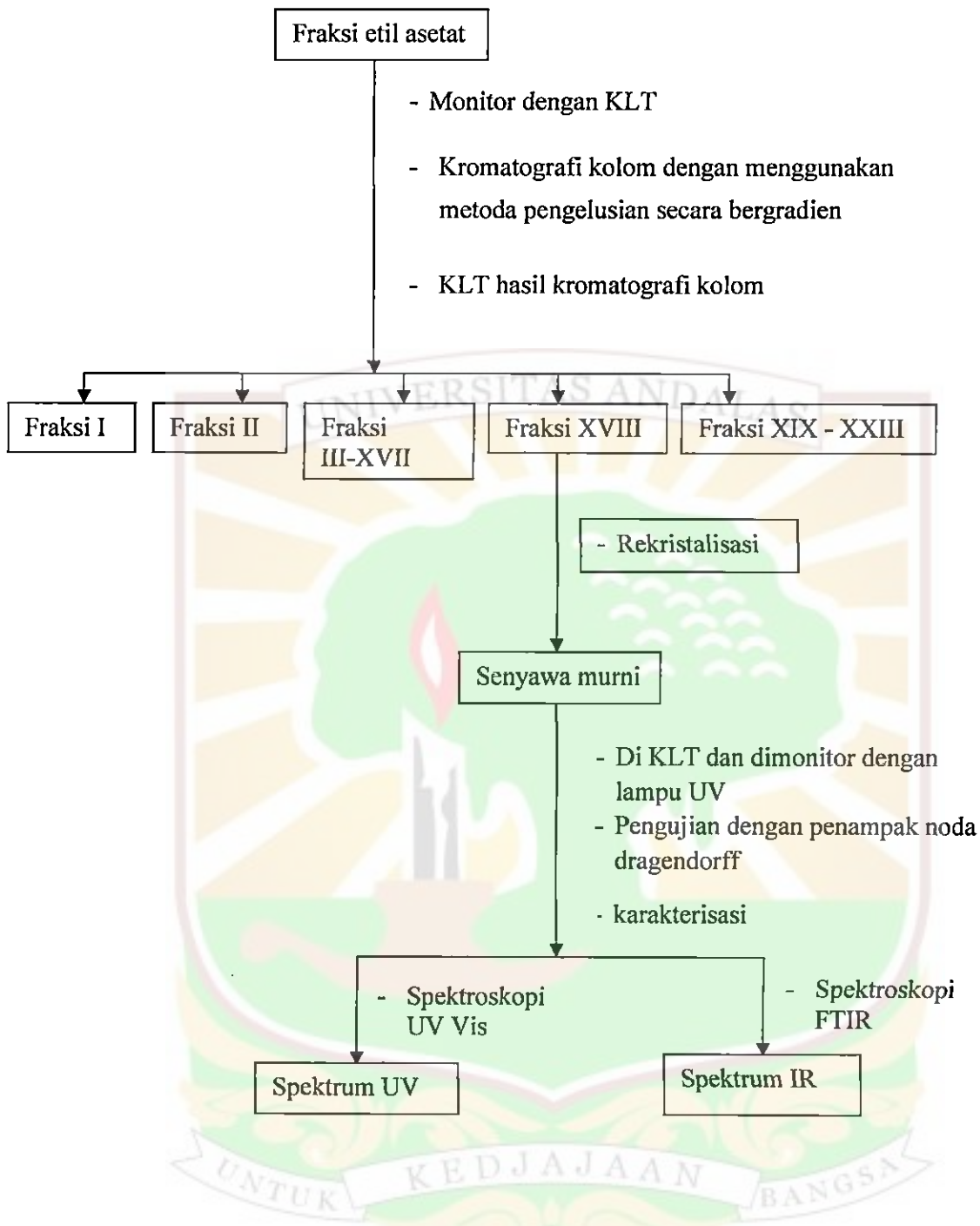
1. Praptiwi, Chairul dan Mindarti Harapini. *Uji Efektivitas Ekstrak Etanol Nuah Makasar (Brucea javanica (L) Merr) Terhadap Plasmodium Berghei Secara In-Vivo Pada Mencit*. Bidang Botani, Puslit Biologi-LIPI. Bogor.
2. Elvi Rusmiyanto Pancaning Wardoyo. 2010. *Kajian Senyawa Bioaktif Brucea javanica (L) Merr. : Identifikasi Struktur Senyawa Toksik Terhadap Sel Kanker Payudara T47D*. Laporan Akhir Kegiatan Penelitian Hibah Disertasi Doktor. Universitas Gajah Mada.
3. Endah Sayekti dan Ari Widiyantoro. 2009. *Aktivitas Anticacing Senyawa Bioaktif dari Buah Makasar (brucea javanica L (Merr)) terhadap Ascaris lumbricoides*. Jurnal Penelitian Vol XVI No. 4. Universitas Tanjungpura.
4. Deni Subara, Mai Efdi dan Afrizal. 2011. *Isolasi Senyawa Aktif Anti Oksidan Dari Tumbuhan Melur (Brucea javanica L. Merr)*. Universitas Andalas.
5. Sovia Lenny, SSi, Msi. 2006. *Senyawa Flavonoida, Fenilpropanoida dan Alkaloida*. Karya Ilmiah Universitas Sumatera Utara. USU Repository. Hal 18
6. Marthia Andiny, SSi. 1997. *Isolasi Alkaloid dari Daun Mycetia cauliflora Reinw*. Skripsi Sarjana Kimia Universitas Andalas. Hal 5-20
7. Nanang widodo. 2007. *Isolasi Dan Karakterisasi Senyawa Alkaloid Yang Terkandung Dalam Jamur Tiram Putih (Pleurotus ostreatus)*. Tugas Akhir II. Jurusan kimia Universitas Semarang.
8. Trevor Robinson. 1995. *Kandungan Organik Tumbuhan Tinggi*. ITB, Bandung. Hal 281-285
9. Leland J. Cseke dkk. 2006. *Natural Product From Plants*. Second Edition. Taylor & Francis, London. New York. Hal 31-36
10. Tadeusz Aniszewski. 2007. *Alkaloids Secrets of Life*. Elsevier. Netherlands. Hal 95-119
11. Harborner, J. B. 1996. *Metode Fitokimia*. ITB. Bandung. Hal 6, 21
12. Fessenden J. Ralp dan Joan S. Fessenden. 1999. *Kimia Organik*. Edisi Ketiga. Erlangga. Jakarta. Hal 436, 440.

13. Creswell, C. J.,dkk. 1982. *Analisis Spektrum Senyawa Organik*. Bandung, ITB. Hal 25-58, 78-98.
14. Nurul Hidayati. 2009. *Uji Efektivitas Antibakteri Ekstrak Kasar Daun Teh (Camellia sinensis L, v, assamica) Tua Hasil Ekstraksi Menggunakan Pelarut Akuades dan Etanol*. UIN Malang.
15. Bema Hastuti, Bustanul Arifin, dan Mai Efdi. 2010. *Isolasi dan Karakterisasi Steroid Pada Fraksi Antibakteri Dari Tumbuhan Sarang Semut (Myrmecodia pendans)*. Universitas Andalas. Hal 14
16. Mai Efdi, Dayar Arbain, M. Husni Muchtar dan Amri Bakhtiar. 2003. *Isolasi dan Elusidasi Struktur Alkaloid Dari Tumbuhan Ophiorrhiza cf. kunstleri King*. Universitas Andalas.
17. Donatus Ebere Okwu dan Ephraim Chintua Igara. 2009. *Isolation, Characterization and Antibacterial Activity of Alkaloid From Datura metel Linn Leaves*. Department of Chemistry, Michael Okpara University Of Agriculture. Abia State, Nigeria.
18. Dachriyanus, Dr. 2004. *Analisis Struktur Senyawa Organik Secara Spektroskopi*. CV. Trianda Anugerah Pratama. Andalas University Press. Padang. Hal 5

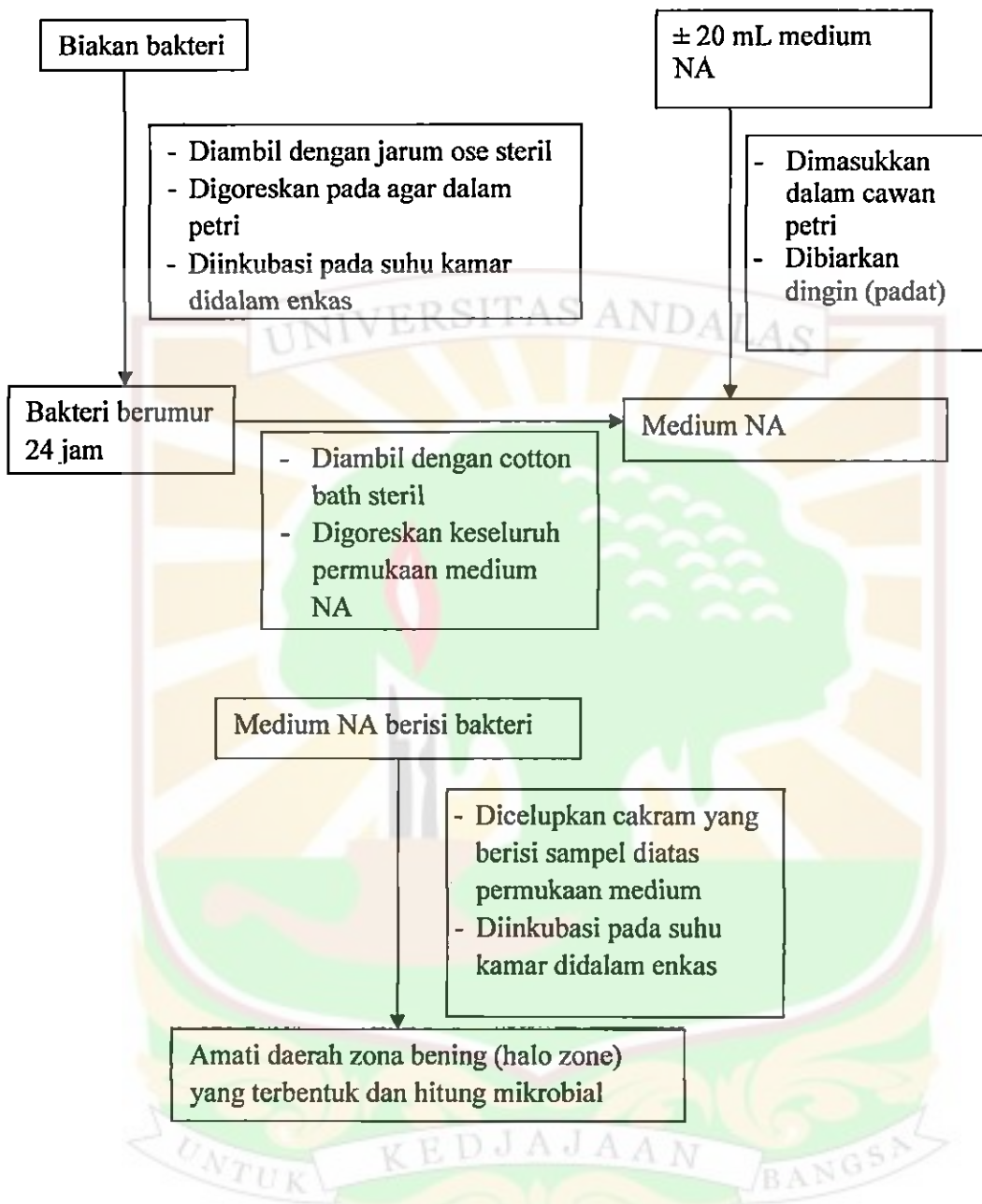
Lampiran 2. Skema kerja isolasi alkaloid dari fraksi aktif ekstrak buah *Brucea javanica* L. Merr sebagai anti bakteri.







Lampiran 3. Skema uji anti bakteri dengan metoda cakram.

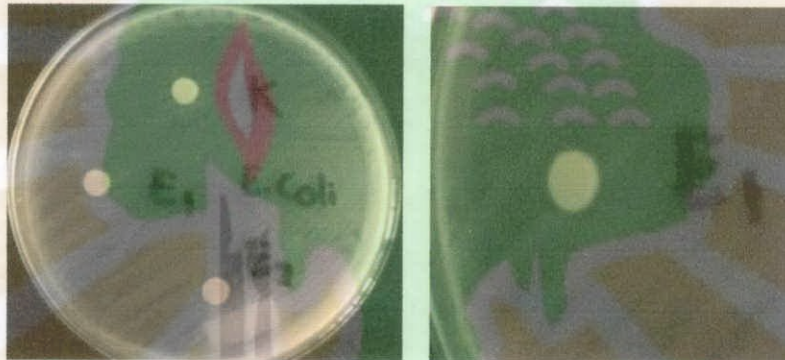


Lampiran 4. Hasil penentuan zona bening terhadap pertumbuhan *E.coli* dengan Ekstrak : a) N-heksan b) Etil asetat c) Metanol

a) N-heksan



b) Etil asetat



c) Metanol

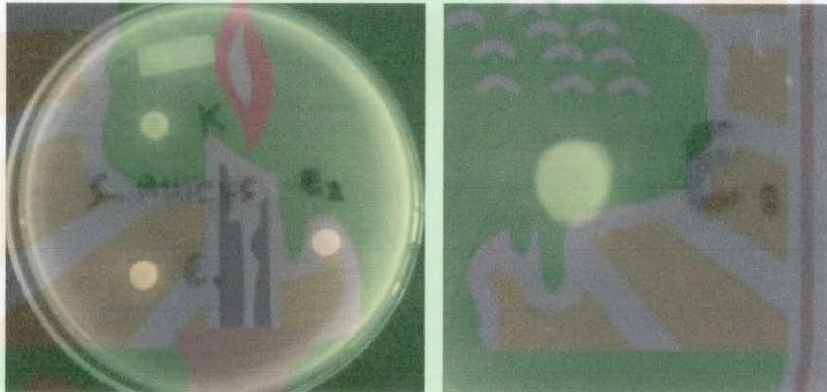


Lampiran 5. Hasil penentuan zona bening terhadap pertumbuhan *S. aureus* dengan ekstrak : a) N-heksan b) Etil asetat c) Metanol

a) N-heksan



b) Etil asetat



c) Metanol



Lampiran 6. Perhitungan Mikrobial Indeks (MI) pada daerah zona bening (halo zone) pada pengujian aktivitas antibakteri

Rumus :

$$\text{Mikrobial indeks (MI)} = \frac{\text{diameter halo (cm)} - \text{diameter cakram (cm)}}{\text{diameter cakram}}$$

1. Mikrobial indeks terhadap bakteri *Staphylococcus aureus*.

a. Fraksi n-heksan 0,2 %

$$\text{Mikrobial indeks (MI)} = \frac{0,6937 - 0,6}{0,6} = 0,1562$$

b. Fraksi etil asetat 0,2 %

$$\text{Mikrobial indeks (MI)} = \frac{0,7312 - 0,6}{0,6} = 0,2187$$

c. Fraksi metanol 0,2 %

$$\text{Mikrobial indeks (MI)} = \frac{0,6500 - 0,6}{0,6} = 0,0833$$

2. Mikrobial indeks terhadap bakteri *Escherichia coli*.

a. Fraksi n-heksan 0,2 %

$$\text{Mikrobial indeks (MI)} = \frac{0,7937 - 0,6}{0,6} = 0,3228$$

b. Fraksi etil asetat 0,2 %

$$\text{Mikrobial indeks (MI)} = \frac{0,8312 - 0,6}{0,6} = 0,3853$$

c. Fraksi air 0,2 %

$$\text{Mikrobial indeks (MI)} = \frac{0,6687 - 0,6}{0,6} = 0,1145$$