

**OPTIMASI DAN VALIDASI METODE ANALISIS UNTUK
PENETAPAN KADAR ALKALOID TOTAL PADA FRAKSI N-
HEKSAN DAUN SIRSAK (*Annona muricata L.*) MENGGUNAKAN
SPEKTROFOTOMETRI UV-VIS**

SKRIPSI



Oleh :

**Khairina Dinda Daniati
NIM 17040092**

**PROGRAM STUDI S1 FARMASI
FAKULTAS ILMU KESEHATAN
UNIVERSITAS dr. SOEBANDI
2021**

**OPTIMASI DAN VALIDASI METODE ANALISIS UNTUK
PENETAPAN KADAR ALKALOID TOTAL PADA FRAKSI N-
HEKSAN DAUN SIRSAK (*Annona muricata L.*) MENGGUNAKAN
SPEKTROFOTOMETRI UV-VIS**

SKRIPSI

Untuk Memenuhi Persyaratan
Memperoleh Gelar Sarjana Farmasi (S.Farm.)



Oleh :

**Khairina Dinda Daniati
NIM 17040092**

**PROGRAM STUDI S1 FARMASI
FAKULTAS ILMU KESEHATAN
UNIVERSITAS dr. SOEBANDI
2021**

LEMBAR PERSETUJUAN

Proposal penelitian/Hasil penelitian ini telah diperiksa oleh pembimbing dan telah disetujui untuk mengikuti seminar proposal/seminar hasil pada Program Studi Sarjana
Farmasi
Universitas dr. Soebandi.

Jember, 05 Agustus 2021

Pembimbing 1



Dr. apt. Ayik Rosita P., M.Farm
NIDN 0001028102

Pembimbing II



apt. Lindawati S., M.Farm
NIDN 07030668903

HALAMAN PENGESAHAN

Skripsi yang berjudul (*OPTIMASI DAN VALIDASI METODE ANALISIS UNTUK PENETAPAN KADAR ALKALOID TOTAL PADA FRAKSI N-HEKSAN DAUN SIRSAK (Annona muricata L.) MENGGUNAKAN SPEKTROFOTO-METRI UV-VIS*) telah diuji dan disahkan oleh Program Studi Sarjana Farmasi Universitas dr. Soebandi pada :

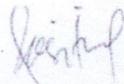
Hari : Kamis
Tanggal : 05 Agustus 2021
Tempat : Program Studi Farmasi
Universitas dr. Soebandi

Tim Penguji
Ketua,



Susilawati, M.Kes
NIDN 4003127401

Penguji II,



Dr. apt. Ayik Rosita P., M.Farm
NIDN 0001028102

Penguji III,



apt. Lindawati S., M.Farm
NIDN 07030668903



Mengesahkan,
Dekan Fakultas Ilmu Kesehatan
Universitas dr. Soebandi,
Hella MeldyTursina, S.Kep.,Ns.,M.Kep
NIDN. 070619104

PERSEMBAHAN

Skripsi ini saya persembahkan untuk :

1. Hella Meldy Tursina, S.Kep.,Ns.,M.Kep selaku Dekan Fakultas Ilmu Kesehatan Universitas dr. Soebandi;
2. apt. Dhina Ayu, S.Farm.,M.Kes. selaku Ketua Program Studi Sarjana Farmasi Universitas dr. Soebandi;
3. Dr. apt. Ayik Rosita Puspaningtyas, M.Farm selaku pembimbing I dan apt. Lindawati Setyaningrum, M.Farm selaku pembimbing II yang telah meluangkan waktu, pikiran, ilmu, motivasi dan perhatian serta dengan sabar membimbing penulis dalam penulisan skripsi ini;
4. Susilawati, M.Kes selaku dosen penguji I yang telah bersedia menjadi Dosen Penguji dan memberikan saran serta kritik yang membangun bagi skripsi penulis;
5. apt. Dina Trianggaluh, M. Farm selaku Dosen Pembimbing Akademik yang telah membimbing selama penulis menjadi mahasiswa;
6. Para dosen yang telah memberikan ilmu selama penulis menjadi mahasiswa;
7. Ayah dan Ibu yang telah memberikan doa, dorongan motivasi, semangat dan usaha lain yang tidak dapat penulis sebutkan satu per satu serta kakak dan adikku yang selalu memberikan dorongan positif;
8. Para sahabatku yang selalu setia memberikan *support* serta dukungan dan mengeluarkan banyak waktunya untuk menemani pendulis;
9. Teman-teman angkatan 2017 Farmasi Universitas dr Soebandi.

MOTTO

“Sesungguhnya Allah beserta orang-orang yang bertakwa dan orang-orang yang berbuat kebaikan.” – (Q.S An-Nahl : 128).

“Dan barang -siapa yang bertakwa kepada Allah, niscaya Allah menjadikan baginya kemudahan dalam urusannya.” – (Q.S At-Talaq : 4).

“Learn as if you will live forever, live like you will die tomorrow.” - Mahatma Gandhi.

“Success is getting what you want, happiness is wanting what you get.” -W. P. Kinsella.

“Setting goals is the first step in turning the invisible into the visible.”-Tony Robbins.

“If you can't get miracle in your life, you can be the miracle”

KEASLIAN PENELITIAN

Saya yang bertanda tangan dibawah ini :

Nama : Khairina Dinda Daniati

NIM : 17040092

Menyatakan dengan sesungguhnya bahwa karya ilmiah yang berjudul "*Optimasi dan Validasi Metode Analisis Untuk Penetapan Kadar Alkaloid Total Pada Fraksi N-Heksan Daun Sirsak (Annona muricata L.) Menggunakan Metode Spektrofotometri UV-Vis*" adalah benar benar hasil karya sendiri, kecuali kutipan yang sudah disebutkan sumbernya, dan belum pernah diajukan pada institusi manapun serta bukan karya jiplakan. Saya bertanggung jawab atas keabsahan dan kebenaran isinya sesuai dengan sikap ilmiah yang harus dijunjung tinggi.

Demikian pernyataan ini saya buat dengan sebenarnya, tanpa adanya tekanan dan paksaan dari pihak manapun serta bersedia mendapat sanksi akademik jika dikemudian hari ini tidak benar.

Jember, 05 Agustus 2021

Yang menyatakan,



Khairina Dinda Daniati

NIM. 17040092

SKRIPSI

**OPTIMASI DAN VALIDASI METODE ANALISIS UNTUK
PENETAPAN KADAR ALKALOID TOTAL PADA FRAKSI N-
HEKSAN DAUN SIRSAK (*Annona muricata L.*) MENGGUNAKAN
SPEKTROFOTOMETRI UV-VIS**

Oleh :

Khairina Dinda Daniati
NIM 17040092

Pembimbing

Dosen Pembimbing Utama : Dr. apt. Ayik Rosita Puspaningtyas, M.Farm
Dosen Pembimbing Anggota : apt. Lindawati Setyaningrum, M.Farm

ABSTRAK

Daniati, Khairina Dinda,* Puspaningtyas, Ayik Rosita,** Setyaningrum, Lindawati***. 2021. ***Optimasi dan Validasi Metode Analisis Untuk Penetapan Kadar Alkaloid Total Pada Fraksi N-Heksan Daun Sirsak (Annona muricata L.) Menggunakan Metode Spektrofotometri UV-Vis.*** Skripsi. Program Studi Farmasi Univeritas dr. Soebandi.

Daun sirsak (*Annona muricata L.*) merupakan salah satu jenis tanaman dari familia *Annonaceae* yang mempunyai manfaat khasiat untuk penyembuhan maupun pencegahan penyakit. Tanaman ini dapat digunakan sebagai obat karena mengandung metabolit sekunder, salah satunya adalah alkaloid. Tujuan dari penelitian ini dilakukan optimasi dan validasi metode analisis untuk penetapan kadar alkaloid total pada fraksi n-heksan daun sirsak (*Annona muricata L.*) menggunakan metode spektrofotometri UV-Vis.

Ekstraksi senyawa alkaloid pada daun sirsak dilakukan menggunakan metode maserasi dengan etanol 96% dan dilanjutkan dengan fraksinasi menggunakan pelarut n-heksan. Dilakukan tahapan proses optimasi dan validasi menggunakan standar kafein. Lalu, hasil fraksi ditentukan kadar alkaloid totalnya dengan menambahkan BCG, buffer fosfat pH 4,7, dan kloroform dalam corong pisah. Diambil fase kloroform dan diidentifikasi menggunakan spektrofotometer UV-Vis pada λ maks 275,8 nm.

Hasil menunjukkan bahwa metode spektrofotometri UV-Visible yang digunakan dalam penelitian telah memenuhi parameter yang telah ditetapkan dalam uji validasi sehingga metode ini dapat diterapkan untuk analisis penetapan kadar alkaloid total fraksi n-heksan daun sirsak di suatu laboratorium dalam kondisi yang optimum. Kadar yang didapatkan untuk alkaloid total fraksi n-heksan daun sirsak (*Annona muricata L.*) yaitu 1,33 %.

Kata kunci : Daun sirsak (*Annona muricata L.*), Alkaloid total, Fraksi n-heksan, Spektrofotometri UV-Vis.

*peneliti

**pembimbing 1

***pembimbing 2

ABSTRACT

Daniati, Khairina Dinda,* Puspaningtyas, Ayik Rosita,** Setyaningrum, Lindawati***. 2021. *Optimization and Validation Of Analysis Methods For Determination Of Total Alkaloid In N-Hexan Fraction Soursop Leaves (Annona muricata L.) Using Spectrophotometric UV-Vis*. Thesis. Department of Pharmacy dr. Soebandi University.

Soursop leaf (*Annona muricata L.*) is a type of plant from the *Annonaceae* that has great benefits for curative as well as disease prevention. This plant can be used as medicine because it contains secondary metabolites, one of which is alkaloids. The purpose of this study was to optimize and validate the analytical method for the determination of total alkaloid content in the n-hexane fraction of soursop leaf (*Annona muricata L.*) using the UV-Vis spectrophotometry method.

Extraction of alkaloid compounds in soursop leaves was carried out using maceration method with 96% ethanol and followed by fractionation using n-hexane as solvent. perform optimization and validation process using caffeine standard. Then, the total alkaloid of the concentrated fraction were determined by total alkaloid content adding with BCG, phosphate buffer pH 4,7, and chloroform in separating funnel. Chloroform phase was taken and identified using UV-Vis spectrophotometer with λ_{max} 275,8 nm.

The results show that the UV-Visible spectrophotometric method used in the study has met the parameters set in the validation test so that this method can be applied to the analysis of the determination of the total alkaloid content of the n-hexane fraction of soursop leaves in a laboratory under optimum conditions. The levels obtained for the total alkaloid fraction of n-hexane from soursop leaves (*Annona muricata L.*) were 1,33 %.

Keywords : Soursop leaf (*Annona muricata L.*), Total alkaloid, N-heksan fraction, Spectrophotometric UV-Vis.

KATA PENGANTAR

Puji dan syukur kehadirat Tuhan Yang Maha Esa atas segala limpahan rahmat, kasih dan karunia-Nya, sehingga penulis dapat menyelesaikan penelitian dan penulisan skripsi ini. Skripsi ini disusun untuk melengkapi salah satu syarat untuk memperoleh gelar Sarjana Farmasi, dengan judul “Optimasi dan Validasi Metode Analisis Untuk Penetapan Kadar Alkaloid Total Pada Fraksi N-Heksan Daun Sirsak (*Annona muricata L.*) Menggunakan Spektrofotometri UV-Vis“.

Tujuan penyusunan skripsi ini yaitu untuk memenuhi salah satu persyaratan menyelesaikan pendidikan Program Studi Ilmu Farmasi. Penyusunannya dapat terlaksana dengan baik berkat dukungan dari banyak pihak. Oleh karena itu, pada kesempatan ini penulis mengucapkan terima kasih kepada :

1. Hella Meldy Tursina, S.Kep.,Ns.,M.Kep selaku Dekan Fakultas Ilmu Kesehatan Universitas dr. Soebandi;
2. apt. Dhina Ayu, S.Farm.,M.Kes. selaku Ketua Program Studi Sarjana Farmasi Universitas dr. Soebandi;
3. Dr. apt. Ayik Rosita Puspaningtyas, M.Farm selaku pembimbing I dan apt. Lindawati Setyaningrum, M.Farm selaku pembimbing II yang telah meluangkan waktu, pikiran, ilmu, motivasi dan perhatian serta dengan sabar membimbing penulis dalam penulisan skripsi ini;
4. Susilawati, M.Kes selaku dosen penguji I yang telah bersedia menjadi dosen penguji dan memberikan saran serta kritik yang membangun bagi skripsi penulis;
5. apt. Dina Trianggaluh, M. Farm selaku Dosen Pembimbing Akademik yang telah membimbing selama penulis menjadi mahasiswa;
6. Para dosen yang telah memberikan ilmu selama penulis menjadi mahasiswa;
7. Mbak Nanda dan Pak Edi selaku laboran laboratorium kimia Universitas dr Soebandi yang telah membantu selama penulis melakukan penelitian;

8. Ayah dan Ibu yang telah memberikan doa, dorongan motivasi, semangat dan usaha lain yang tidak dapat penulis sebutkan satu per satu;
9. Faros, Bella, Whien, Aisyah, Putri dan Dhoni yang telah banyak membantu penulis dalam melakukan persiapan bahan untuk penelitian serta banyak dukungan lain yang membantu penulis;
10. Teman-teman Farmasi 17 B dan pihak lain yang telah membantu penulis dalam penyelesaian penulisan skripsi ini.

Atas segala kekurangan dan ketidaksempurnaan skripsi ini, penulis sangat mengharapkan masukan, kritik dan saran yang bersifat membangun ke arah perbaikan dalam penyempurnaan skripsi ini, agar dapat memberikan manfaat bagi bidang pendidikan dan penerapan dilapangan serta bisa dikembangkan lagi lebih lanjut.

Jember, 05 Agustus 2021

Penulis



Khairina Dinda Daniati
NIM. 17040092

DAFTAR ISI

	Halaman
HALAMAN JUDUL.....	i
LEMBAR PERSETUJUAN.....	ii
HALAMAN PENGESAHAN.....	iii
HALAMAN PERSEMBAHAN.....	iv
MOTTO.....	v
KEASLIHAN PENELITIAN.....	vi
ABSTRAK.....	viii
ABSTRACT.....	ix
KATA PENGANTAR.....	x
DAFTAR ISI.....	xii
DAFTAR TABEL.....	xvi
DAFTAR GAMBAR.....	xvii
DAFTAR LAMPIRAN.....	xviii
BAB 1. PENDAHULUAN.....	1
1.1 Latar Belakang.....	1
1.2 Rumusan Masalah.....	5
1.3 Tujuan Penelitian.....	5
1.4 Manfaat Penelitian.....	5
BAB 2. TINJAUAN PUSTAKA.....	7
2.1 Tanaman Sirsak (<i>Annona muricata L.</i>).....	7
2.1.1 Profil Umum Tanaman Sirsak.....	7
2.1.2 Morfologi Tanaman Sirsak.....	7
2.1.3 Taksonomi dan Klasifikasi Tanaman Sirsak.....	8
2.1.4 Kandungan Kimia Daun Sirsak.....	9
2.1.5 Manfaat Daun Sirsak.....	9
2.2 Ekstrak.....	10
2.3 Ekstraksi.....	11

2.3.1 Pengertian Ekstraksi.....	11
2.3.2 Metode Ekstraksi.....	12
2.4 Fraksinasi.....	13
2.5.1 Teori Dasar Alkaloid.....	15
2.5.2 Tipe dan Struktur Inti Alkaloid.....	15
2.5.3 Sifat Fisika dan Kimia Alkaloid.....	17
2.5.4 Manfaat Alkaloid.....	18
2.6 Kafein.....	18
2.6.1 Struktur Kimia Kafein.....	18
2.6.2 Sumber Kafein.....	19
2.6.3 Manfaat dan Kegunaan Kafein.....	19
2.7 N-Heksan.....	19
2.7.1 Teori Dasar N-Heksan.....	19
2.7.2 Sifat Fisika dan Kimia N-Heksana.....	20
2.8 Spektrofotometri UV-Vis.....	20
2.8.1 Teori Dasar Spektrofotometri UV-Vis.....	20
2.8.2 Prinsip Kerja Spektrofotometri UV-Vis.....	21
2.8.3 Hukum <i>Lambert Beer</i>	24
2.8.4 Warna Komplementer.....	25
2.9 Validasi Metode Analisis.....	25
2.9.1 Spesifisitas.....	26
2.9.2 Linieritas.....	27
2.9.3 <i>Limit Of Detection (LOD)</i>	27
2.9.4 <i>Limit of Quantification (LOQ)</i>	27
2.9.5 Presisi.....	28
2.9.6 Akurasi.....	28
2.9.7 Kisaran (<i>Range</i>).....	29
2.9.8 Ketangguhan/Kekasaran (<i>ruggedness</i>).....	29
2.9.9 Kekuatan/Ketahanan (<i>Robustness</i>).....	30
2.9.10 Stabilitas.....	30

2.10 Penetapan Kadar Alkaloid.....	30
BAB 3. KERANGKA KONSEP.....	33
3.1 Kerangka Konsep.....	33
3.2 Hipotesis Penelitian.....	34
BAB 4. METODE PENELITIAN.....	35
4.1 Desain Penelitian.....	35
4.2 Populasi dan Sampel.....	35
4.2.1 Populasi.....	35
4.2.2 Sampel Penelitian.....	35
4.4 Definisi Operasional.....	36
4.4 Pengolahan dan Analisa Data.....	38
BAB 5. HASIL PENELITIAN.....	45
5.1 Hasil Determinasi Tanaman.....	45
5.2 Pengambilan dan Pengolahan Sampel.....	45
5.3 Ekstraksi.....	45
5.4 Fraksinasi.....	46
5.5 Optimasi Metode Analisis.....	46
5.5.1 Penentuan Panjang Gelombang Maksimum.....	46
5.5.2 Penentuan Konsentrasi Optimum.....	47
5.5.3 Penentuan <i>Operating Time</i>	48
5.5.4 Kurva Baku Larutan Standar Kafein.....	49
5.6 Validasi Metode Analisis.....	50
5.6.1 Spesifisitas.....	50
5.6.2 Linieritas.....	50
5.6.3 Presisi.....	51
5.6.4 Akurasi.....	51
5.6.5 <i>Limit Of Detection</i> dan <i>Limit Of Quantitation</i>	52
5.7 Penentuan Kadar Alkaloid Total Daun Sirsak.....	52
BAB 6. PEMBAHASAN PENELITIAN.....	54
6.1 Ekstraksi.....	55

6.2 Fraksinasi.....	56
6.3 Optimasi Metode Analisis.....	56
6.3.1 Penentuan Panjang Gelombang Maksimum.....	56
6.3.2 Penentuan Konsentrasi Optimum.....	57
6.3.3 Penentuan <i>Operating Time</i>	57
6.3.4 Kurva Baku Larutan Standar Kafein.....	58
6.4 Validasi Metode Analisis.....	58
6.4.1 Spesifisitas.....	58
6.4.2 Linieritas.....	59
6.4.3 Presisi.....	60
6.4.4 Akurasi.....	60
6.4.5 <i>Limit Of Detection</i> dan <i>Limit Of Quantitation</i>	61
6.5 Penentuan Kadar Alkaloid Total Daun Sirsak.....	62
BAB 7. KESIMPULAN DAN SARAN.....	64
7.1 Kesimpulan.....	64
7.2 Saran.....	64
DAFTAR PUSTAKA.....	65
LAMPIRAN.....	72

DAFTAR TABEL

Tabel 2.1 Sifat Fisika dan Kimia N-Heksan	21
Tabel 2.2 Spektrum Cahaya Tampak dan Warna-warna Komplementer.....	27
Tabel 4.1 Definisi Operasional Parameter Validasi Metode Analisis	37
Tabel 4.2 Tabel Persyaratan % RSD.....	42
Tabel 4.3 Persyaratan % <i>Recovery</i>	42
Tabel 5.1 Hasil Panjang Gelombang Maksimum.....	46
Tabel 5.2 Hasil Uji Konsentrasi Standar Kafein.....	47
Tabel 5.3 Hasil Uji Konsentrasi Sampel.....	48
Tabel 5.4 Hasil Kurva Baku Larutan Standar Kafein.....	49
Tabel 5.5 Tabel Linieritas.....	50
Tabel 5.6 Tabel Hasil LOD dan LOQ.....	52
Tabel 5.7 Tabel Penetapan Kadar.....	53

DAFTAR GAMBAR

Gambar 2.1 Morfologi tanaman sirsak (<i>Annona muricata L</i>)	8
Gambar 2.2 Struktur Kimia Alkaloid	15
Gambar 2.3 Struktur Kimia Protoalkaloid	16
Gambar 2.4 Struktur Kimia Pseudoalkaloid	16
Gambar 2.5 Struktur Kimia Kafein	18
Gambar 2.6 Pembacaan Spektrofotometer	22
Gambar 2.7 Proses Dispersi Cahaya	22
Gambar 2.8 Reaksi Alkaloid Dengan Basa	34
Gambar 3.1 Kerangka Konsep	35
Gambar 5.1 Kurva Panjang Gelombang Maksimum.....	47
Gambar 5.2 Kurva Operating Time.....	48
Gambar 5.3 Kurva Linieritas.....	51
Gambar 5.4 Hasil Kurva LOD dan LOQ.....	52
Gambar 6.1 Reaksi Alkaloid Dengan Asam Kuat	63
Gambar 6.2 Reaksi Pembebasan Amina	64
Gambar 6.3 Dugaan Reaksi Antara Alkaloid dan BCG	64

DAFTAR LAMPIRAN

Lampiran 1. Hasil Determinasi Tumbuhan.....	72
Lampiran 2. Dokumentasi Penelitian.....	73
Lampiran 3. Pembuatan Larutan.....	76
Lampiran 4. Spektrofotometri UV-Vis.....	79
Lampiran 5. Perhitungan Hasil Penelitian.....	80

BAB 1. PENDAHULUAN

1.1 Latar Belakang

Indonesia merupakan negara yang kaya akan sumber daya alam, terutama dalam bahan yang mengandung khasiat obat yang telah banyak digunakan untuk obat tradisional sebagai salah satu upaya dalam mengatasi masalah kesehatan pada masyarakat. Obat tradisional dan tanaman obat banyak digunakan dalam kehidupan masyarakat terutama dalam upaya promotif, preventif, kuratif dan rehabilitatif (Saifudin *et al.*, 2011). Penggunaan bahan alam, baik sebagai obat maupun tujuan lain cenderung meningkat, terlebih dengan adanya isu *back to nature*. Pengetahuan tentang tanaman berkhasiat obat bersumber pada pengalaman dan keterampilan yang secara turun temurun telah diwariskan oleh nenek moyang dari satu generasi ke generasi berikutnya (Wullur & Schadu, 2013).

Daun sirsak (*Annona muricata L.*) merupakan salah satu jenis tanaman obat dari familia *Annonaceae*. Tanaman ini mempunyai manfaat besar bagi kehidupan manusia karena khasiat yang terkandung di dalamnya. Tanaman daun sirsak dapat digunakan sebagai sumber gizi dan merupakan sumber bahan obat tradisional. Dalam industri makanan, sirsak dapat diolah menjadi selai buah, sari buah, minuman kemasan atau sirup dan dodol sirsak (Jannah, 2010). Tanaman sirsak banyak juga digunakan sebagai tanaman obat, karena berbagai bagian tanaman ini memiliki khasiat untuk penyembuhan maupun pencegahan penyakit (Malibela *et al.*, 2018). Sirsak merupakan tumbuhan dengan berbagai macam manfaat bagi kes Malibela ehatan baik daging buah, daun maupun bijinya memiliki kandungan kimia yang bermanfaat untuk pengobatan, antara lain sebagai antibakteri, antivirus, antioksidan, antijamur, antiparasit, antistres, dan menyehatkan sistem saraf. Secara umum keberadaan senyawa-senyawa tersebut menegaskan bahwa daun sirsak sangat bermanfaat untuk pengobatan secara tradisional maupun farmasi (Lilbaiq, 2017).

Kandungan fitokimia yang terdapat pada daun sirsak diantaranya yaitu senyawa fenolik (asam klorogenat, antraquinon, asam sinamat, flavonoid, asam hidroksisinamat, hidroquinon, dan tanin), asetogenin, alkaloid, dan minyak esensial (Coria-Tellez *et al.*, 2016). Kandungan fitokimia dapat menentukan aktivitas biologis

dari suatu tanaman (Tursiman et al., 2012). Alkaloid tersebar hampir di semua bagian tumbuhan dengan kadar yang berbeda-beda, antara lain pada batang, kulit batang, daun, akar, buah, biji dan dalam vakuola (Hanani, 2014).

Kafein merupakan senyawa yang termasuk dalam golongan alkaloid. Alkaloid yaitu suatu basa organik mengandung unsur Nitrogen (N) yang pada umumnya berasal dari tanaman, yang mempunyai efek fisiologis kuat terhadap manusia. Setelah dilakukan maserasi, selanjutnya yaitu dilakukan diidentifikasi dengan menggunakan pereaksi umum alkaloid. Ekstraksi senyawa alkaloid dilakukan dengan menggunakan metode maserasi, metode ini dipilih dengan beberapa kelebihan yaitu pengerjaan dan peralatan yang digunakan sederhana dan mudah diperoleh maseratnya, serta proses perendaman yang cukup lama diharapkan dapat menarik lebih banyak zat aktif yang terkandung di dalam simplisia (Wullur, 2012).

Terdapat beberapa metode yang dapat digunakan untuk mengidentifikasi adanya senyawa alkaloid di dalam tanaman, diantaranya yaitu penentuan alkaloid menggunakan metode *High Performance Liquid Chromatography* (HPLC), fluorimetri, kromatografi ion, kolorimetri, kromatografi gas, dan kromatografi lapis tipis (A. M Levent, 2002; K. Masatoki and T. Hirokazu, 2000; C. Qing-Chun and J. Wang, 2001; X Qing-qin *et al.*, 2002; R. Pagliarussi *et al.*, 2002; Aksara, 2013). Identifikasi alkaloid menggunakan metode spektrofotometri UV-Visibel yang didasarkan pada reaksi alkaloid dengan *Bromocresol green* (BCG) membentuk produk berwarna kuning (Ajanal *et al.*, 2012).

Larutan standar yang dapat digunakan untuk mendeteksi alkaloid pada tanaman daun sirsak salah satunya yaitu kafein, larutan standar kafein digunakan sebagai pengidentifikasian senyawa alkaloid dalam tanaman obat itu sendiri (Latifaningsih, 2012). N- heksan banyak digunakan dalam proses fraksinasi alkaloid karena rantai cabang yg aromatik dan bersifat nonpolar. Menurut Harborne (1987) pelarut nonpolar (n-heksana) dikenal efektif terhadap alkaloid selain itu alkaloid dapat juga larut dalam pelarut semi polar (etil asetat) dan polar (metanol). Ekstrak dengan menggunakan pelarut n-heksana positif terhadap alkaloid dan steroid (Haris, 2011). Pada penelitian yang dilakukan oleh Iffah *et al.*, 2018, pelarut n-heksan menunjukkan adanya

kandungan jenis senyawa alkaloid, flavonoid, dan saponin. Senyawa alkaloid yang umumnya bersifat non polar (Dewi, 2016) hanya terikat oleh pelarut yang bersifat non polar. Dengan proses fraksinasi dapat diduga sifat kepolaran dari senyawa yang akan dipisahkan. Senyawa-senyawa yang bersifat non polar akan larut dalam pelarut yang non polar, sedangkan senyawa-senyawa yang bersifat polar akan larut dalam pelarut yang polar (D. M. Sari et al., 2015). Hal ini menunjukkan pelarut n-heksan yang cukup selektif dalam mengisolasi senyawa. Ekstraksi senyawa alkaloid dilakukan dengan menggunakan metode maserasi, metode ini dipilih karena pengerjaan dan peralatan yang digunakan sederhana dan mudah diperoleh maseratnya, serta proses perendaman yang cukup lama diharapkan dapat menarik lebih banyak zat aktif yang terkandung di dalam simplisia (Wullur, 2012).

Identifikasi senyawa alkaloid telah banyak dilakukan oleh para peneliti. Salah satunya adalah dengan menggunakan metode spektrofotometri sederhana dengan cara pengestrasian senyawa alkaloid dari bagian tubuh suatu tanaman obat dan pereaksi yang digunakan adalah *bromocresol green* (BCG). Metode ini dapat mendeteksi seberapa besar kandungan alkaloid total pada suatu bahan dengan menggunakan larutan standar (Sopian et al., 2017). Spektrofotometri UV-Vis adalah alat yang digunakan untuk mengukur serapan yang dihasilkan dari interaksi kimia antara radiasi elektromagnetik dengan molekul atau atom dari suatu zat kimia pada daerah UV-Vis (FI edisi IV, 1995).

Pada perhitungan penetapan kadar dilakukan dengan menggunakan metode spektrofotometri UV-Vis karena memiliki beberapa kelebihan yang diantaranya yaitu memiliki sensitivitas yang baik, dikombinasikan dengan kemudahan dalam preparasi, saat preparasi tidak perlu fase gerak, biaya untuk pelarut yang digunakan tidak mahal, tidak memerlukan waktu yang lama, hasil yang diperoleh cukup akurat, dimana angka yang terbaca langsung dicatat oleh *detector* dan tercetak dalam bentuk angka digital ataupun grafik yang sudah diregresikan, dan dapat menganalisa poli komponen campuran senyawa obat (Schirmer, 1982, Roth dan Blaschke, 1998). Instrumen yang digunakan pada penelitian ini adalah spektrofotometer UV-Vis. Instrumen ini digunakan untuk mengukur konsentrasi analit di dalam larutan yang ditentukan

dengan mengukur absorbansi pada panjang gelombang tertentu dengan menggunakan Hukum *Lambert-Beer* (Dachriyanus, 2004).

Metode yang digunakan di laboratorium kimia analitik harus dievaluasi dan diuji untuk memastikan bahwa metode tersebut mampu menghasilkan data yang valid dan sesuai dengan tujuan (Torbeck L.D, 2007). Validasi metode analisis adalah suatu tindakan penilaian terhadap suatu parameter tertentu, berdasarkan percobaan laboratorium untuk memastikan bahwa parameter tersebut memenuhi syarat untuk penggunaannya (Effendy, 2004). Validasi metode analisis bertujuan untuk memperoleh data yang sesuai dengan kenyataannya (*Fit for Purpose*). Data yang valid dapat diperoleh dengan melakukan evaluasi yang seksama mulai dari proses pengambilan sampel sampai dengan proses analisis data (Rohman, 2014).. Dengan menggunakan sampel yang telah diketahui (atau setidaknya telah dihitung sebelumnya) nilai parameter suatu produk validasi dapat memberikan informasi yang berguna mengenai akurasi, presisi, linearitas, dan karakteristik lainnya dari kinerja suatu metode yang sehari-hari digunakan pada sampel yang tidak diketahui (Torbeck L.D, 2007).

Pada monografi simplisia dan ekstrak tanaman obat terdapat beberapa kelemahan pada teknik metode analisis yang dipakai. Diantara kelemahan itu adalah tidak adanya optimasi dalam penyiapan sampel dan metode analisis, padahal penyiapan tersebut sangat berpengaruh pada perolehan hasil analisis yang akan diperoleh (Gaedcke *et al*, 2003). Optimasi metode analisis adalah cara untuk mengoptimalkan metode yang dipakai dalam suatu analisis agar hasil penelitian yang diperoleh dapat diandalkan (Sudewi & Pontoh, 2018). Penelitian tentang optimasi dan validasi metode analisis perlu dilakukan untuk membuktikan bahwa apakah parameter-parameter validitas suatu metode dapat dipenuhi oleh metode spektrofotometri UV-Vis (Perdana, 2018). Sebagai tambahan, validasi dapat digunakan untuk mengidentifikasi sumber variabilitas yang tidak diinginkan (Torbeck L.D, 2007). Keberhasilan proses optimasi didapat dari kadar alkaloid total ekstrak yang diukur menggunakan instrumen spektrofotometer UV-Vis (Qoriati, 2018). Mengacu pada uraian tersebut, maka dalam penelitian ini akan dilakukan optimasi dan validasi metode analisis untuk penetapan

kadar alkaloid total pada fraksi n-heksan daun sirsak (*Annona muricata L*) menggunakan metode spektrofotometri UV-Vis karena belum ada penelitian yang dilakukan sebelumnya.

1.2 Rumusan Masalah

Berdasarkan latar belakang yang telah disebutkan, maka rumusan masalah yang diperoleh sebagai berikut:

1. Bagaimana optimasi metode analisis untuk penetapan kadar alkaloid total pada fraksi n-heksan daun sirsak ?
2. Apakah metode analisis untuk penentuan kadar alkaloid dari fraksi n-heksan daun sirsak (*Annona muricata L.*) memenuhi parameter validasi metode analisis secara Spektrofotometri UV-Vis ?
3. Berapakah kadar alkaloid total pada fraksi n-heksan daun sirsak secara Spektrofotometri UV-Vis ?

1.3 Tujuan Penelitian

Tujuan dari penelitian ini untuk menjawab rumusan masalah yang telah disebutkan sebagai berikut :

1. Untuk mengetahui optimasi metode analisis untuk penetapan kadar alkaloid total pada fraksi n-heksan daun sirsak.
2. Untuk mengetahui metode analisis untuk penentuan kadar alkaloid dari fraksi n-heksan daun sirsak (*Annona muricata L.*) memenuhi parameter validasi metode analisis secara Spektrofotometri UV-Vis.
3. Untuk mengetahui kadar alkaloid total pada fraksi n-heksan daun sirsak secara Spektrofotometri UV-Vis.

1.4 Manfaat Penelitian

Adapun manfaat yang didapatkan dari penelitian ini yaitu sebagai berikut :

1. Memberikan informasi terkait optimasi metode analisis alkaloid total pada fraksi n-heksan daun sirsak dengan spektrofotometri UV-Vis;
2. Memberikan pengetahuan tentang validasi metode analisis yang lebih tepat, mudah dan sederhana;
3. Memberikan informasi kadar alkaloid total pada fraksi n-heksan daun sirsak;

4. Memberikan informasi yang dapat menjadi sumber data ilmiah atau rujukan bagi peneliti lanjutan, penelitian lainnya dan mahasiswa tentang kadar alkaloid total dalam fraksi n-heksan daun sirsak (*Annona muricata L.*) dengan menggunakan spektrofotometri UV-Vis.

BAB 2. TINJAUAN PUSTAKA

2.1 Tanaman Sirsak (*Annona muricata L.*)

2.1.1 Profil Umum Tanaman Sirsak

Sirsak adalah tanaman buah yang berasal dari Karibia, Amerika Tengah dan Amerika Selatan (Taylor, 1998). Sekarang sirsak telah menyebar ke seluruh wilayah tropis seperti Asia Tenggara termasuk juga Malaysia dan Indonesia (Alias, 2009). Sirsak sampai di Indonesia pada abad ke-19 yang dibawa oleh pemerintah kolonial Belanda, nama sirsak sendiri berasal dari bahasa Belanda yaitu *Zuurzak* yang memiliki makna kantung yang asam (Zuhud, 2011).

Tanaman sirsak saat ini telah menyebar dan tumbuh di banyak bagian wilayah di Indonesia, mulai dataran rendah hingga dataran dengan ketinggian 1000 mdpl. Penyebarannya yang hampir merata dibuktikan dengan adanya nama-nama sebutan berbeda di masing-masing daerah untuk tanaman sirsak (Radi, 1997), yaitu deureuyan belanda (Aceh), tarutung olanda (Batak), durio ulondra (Nias), durian belanda, nangka belanda, nangka walanda (Melayu), durian batawi (Minangkabau), jambu landa (Lampung), nangkawalanda (Sunda), nangka landa, nangka manila, nangka sabrang, mulwa londa, surikaya walonda, srikaya welandi, muris (Jawa), nangka buris, nangka moris, nangka englan (Madura), srikaya jawa (Bali), annona (Flores), atis (Sulawesi Utara), lange lo walanda (Gorontalo), sirikaya belanda (Makassar), srikaya balanda (Bugis), tafena warata (Seram), anad wakano (Nusa Laut), naka walanda (Ternate), dan nada landa (Tidore) (Depkes RI, 1989; Radi, 1997).

2.1.2 Morfologi Tanaman Sirsak

Morfologi umum tanaman sirsak yaitu pohon sirsak mempunyai tinggi $\pm 3-10$ m, daun tunggal, daun berbentuk bulat telur terbalik, berwarna hijau muda sampai hijau tua, ujung daun meruncing, pinggiran rata, permukaan daun mengkilap, tata letak berseling, tidak ada stipula (daun penumpu), tangkai daun berukuran $\pm 0,7$ cm dengan bentuk bulat menggembung, helaian daun seperti kulit, berbentuk bundar panjang, lanset, atau bundar terbalik dengan panjang 6 cm hingga 18 cm dan lebar 2 cm hingga 6 cm, pangkal daun meruncing, tulang daun menyirip, ibu tulang daun menonjol pada permukaan bawah, dan tulang-tulang daun pada helai daun sirsak berjumlah $11 \pm 2,8$

(Zuhud, 2011). Kulit buah berduri lunak, saat masih muda berwarna hijau dengan jarak yang rapat, sedangkan saat mulai menua akan berubah kehitaman dengan jarak merenggang serta tekstur yang lebih lunak. Daging buahnya berwarna putih gading dan memiliki banyak biji kecil berwarna hitam. Bunganya berwarna kuning dan memiliki bentuk kerucut tidak beraturan (Zuhud, 2011). Morfologi tanaman sirsak ditunjukkan oleh Gambar 2.1



Gambar 2.1 Morfologi tanaman sirsak (*Annona muricata L.*) : (A) pohon, (B) daun, (C) bunga, (D) buah (Moghadamtousi dkk., 2015)

Tanaman sirsak dapat tumbuh pada semua jenis tanah pada derajat keasaman (Ph) 5-7. Wilayah yang ideal untuk sirsak dapat tumbuh adalah tempat dengan ketinggian 100-1000 mdpl dengan suhu udara sekitar 22-32°C (Sunarjono, 2005). Bagian tanaman sirsak banyak dimanfaatkan oleh masyarakat sebagai bahan makanan maupun sebagai bahan obat (Greenaway, 2014).

2.1.3 Taksonomi dan Klasifikasi Tanaman Sirsak

Berdasarkan data tanaman oleh Wardani, 2020 taksonomi dan klasifikasi sirsak adalah sebagai berikut:

Kerajaan : Plantae
 Subkerajaan : Tracheobionta
 Superdivisi : Spermatophyta
 Divisi : Magnoliophyta
 Kelas : Magnoliopsida

Subkelas : Magnoliidae
Orde : Magnoliales
Famili : Annonaceae
Genus : *Annona* L.
Spesies : *Annona muricata* L.

2.1.4 Kandungan Kimia Daun Sirsak

Kandungan senyawa kimia dalam sirsak antara lain acetogenin (Bridgemohan *et al.*, 2015), glikosida, saponin, fenol, tanin, flavonoid, alkaloid, steroid, vitamin C (asam askorbat) (Abbas *et al.*, 2015), terpenoid, antrakuinon, minyak atsiri (George *et al.*, 2015), antosianin (Sanusi & Bakar, 2018), vitamin E (tocopherol), dan karoten (Coria *et al.*, 2016). Pada penelitian yang dilakukan Sari *et al.*, (2015) dari hasil skrining fitokimia pada daun sirsak menunjukkan bahwa ekstrak etanol positif mengandung tanin, flavonoid dan alkaloid. Hasil tersebut sesuai dikarenakan pada penelitian lain dikatakan bahwa ekstrak daun sirsak memiliki kandungan alkaloid, flavonoid, dan tanin (Albuquerque *et al.*, 2010; Baskar *et al.*, 2007; De Sousa *et al.*, 2010).

2.1.5 Manfaat Daun Sirsak

Daun sirsak (*Annona muricata* L.) merupakan salah satu jenis tanaman obat dari familia Annonaceae yang mempunyai manfaat besar bagi kehidupan manusia. Tanaman ini digunakan sebagai sumber gizi dan merupakan sumber bahan obat tradisional. Dalam industri makanan, sirsak dapat diolah menjadi selai buah, sari buah, sirup dan dodol sirsak (Jannah, 2010). Tanaman sirsak banyak juga digunakan sebagai tanaman obat, karena berbagai bagian tanaman ini memiliki khasiat untuk penyembuhan maupun pencegahan penyakit. Sirsak berkhasiat sebagai agen antikanker (George *et al.*, 2012, Gavamukulya *et al.*, 2014, Minari & Okeke, 2014), antitumor (Chen *et sal.*, 2013), antidiabetes, antioksidan (Florence *et al.*, 2014), antimikroba, antijamur, antidepresan (Bridgemohan *et al.*, 2015), antiinflamasi, antihipertensi, antiarthritis (Moghadamtousi *et al.*, 2015), renoprotektor, antispasmodik, antidisentri, antiparasit, antikonvulsan (Badrie & Schauss, 2010), antivirus, antiprotozoa, insektisida, larvasida, hepatoprotektor, gastroprotektor (Coria

et al., 2016), pengobatan hiperurisemia dan asam urat (Ewadh *et al.*, 2015), efek sedatif dan hipotensif (Handayani & Heppy Sriherfyna, 2016), antibakteri (Ningsih & Zufahair, 2016, Pinto *et al.*, 2017), imunomodulator (Junaidi *et al.*, 2016) dan antihiperlipidemia (Maramis *et al.*, 2014).

Di Indonesia daun sirsak telah banyak digunakan sebagai pengobatan tradisional oleh masyarakat luas, seperti di Kalimantan digunakan untuk mengobati demam, di Aceh untuk mengobati batuk, etnis Sunda biasa menggunakannya untuk mengobati mual, bisul dan rematik, dan etnis Kutai menggunakannya untuk mengobati diare (HHS, 2012).

2.2 Ekstrak

Ekstrak merupakan sediaan pekat yang dapat didapatkan dengan cara mengekstraksi zat aktif dari simplisia nabati atau simplisia hewani menggunakan pelarut yang sesuai, kemudian semua atau hampir semua pelarut diuapkan dan massa atau serbuk yang diperlakukan sedemikian hingga memenuhi baku yang telah ditetapkan (Depkes RI, 1995). Menurut Voigt & Noerono (1994), ekstrak dikelompokkan atas dasar sifatnya yaitu:

- a) Ekstrak encer adalah sediaan yang memiliki konsistensi semacam madu dan dapat dituang.
- b) Ekstrak kental adalah sediaan yang dilihat dalam keadaan dingin dan tidak dapat dituang. Kandungan airnya berjumlah sampai 30%. Tingginya kandungan air menyebabkan ketidakstabilan sediaan obat karena cemaran bakteri.
- c) Ekstrak kering adalah sediaan yang memiliki konsistensi kering dan mudah dituang, sebaiknya memiliki kandungan lembab tidak lebih dari 5%.
- d) Ekstrak cair, ekstrak yang dibuat sedemikiannya sehingga 1 bagian simplisia sesuai dengan dua bagian ekstrak cair.

2.3 Ekstraksi

2.3.1 Pengertian Ekstraksi

Ekstraksi yaitu perpindahan zat aktif pada sel yang ditarik oleh pelarut sehingga zat aktif akan larut dalam pelarut. Pada umumnya ekstraksi akan

menghasilkan rendemen yang lebih banyak ketika permukaan simplisia kontak dengan pelarut semakin luas (Harborne, 1987). Selama ekstraksi pelarut akan berdifusi ke dalam serbuk simplisia. Hal ini disebabkan adanya perbedaan konsentrasi antara larutan di dalam sel dengan cairan ekstraksi yang berada di luar sel. Pelarut mengalir masuk ke dalam ruang sel, sehingga menyebabkan protoplasma membengkak dan kandungan bahan aktif di dalam sel akan terlarut sesuai sifat fisika kimianya (Ncube *et al.*, 2008). Adapun kriteria pemilihan pelarut sebagai berikut :

1. Murah dan mudah diperoleh,
2. stabil secara fisika dan kimia,
3. bereaksi netral,
4. tidak mudah menguap dan tidak mudah terbakar,
5. selektif,
6. tidak mempengaruhi zat berkhasiat, dan
7. diperbolehkan oleh peraturan yang berlaku.

Simplisia yang akan diekstraksi mengandung senyawa aktif yang dapat larut dan senyawa aktif yang tidak larut seperti serat, karbohidrat, protein dan lain-lain (DirJen POM, 2000). Ada tiga tahapan proses pada waktu ekstraksi yaitu:

- a) Penetrasi pelarut ke dalam sel tanaman dan pengembangan sel.
- b) Disolusi pelarut ke dalam sel tanaman dan pengembangan sel.
- c) Difusi bahan yang terekstraksi ke luar sel.

Dalam pemilihan metode ekstraksi tergantung dengan wujud dan kandungan zat dari bahan yang diekstrak. Cara ekstraksi dapat dibedakan menjadi : infundasi, maserasi, perkolasi, dan penyarian berkesinambungan (Direktorat Jenderal Pengawasan Obat dan Makanan RI, 1986).

2.3.2 Metode Ekstraksi

Ekstraksi adalah suatu proses yang dilakukan untuk memperoleh kandungan senyawa kimia dari jaringan tumbuhan maupun hewan (Depkes RI, 1979). Ekstraksi merupakan proses pemisahan bahan suatu campuran menggunakan jenis pelarut yang sesuai (Mukhriani, 2014). Ekstraksi akan lebih cepat dilakukan pada suhu tinggi tetapi menyebabkan kerusakan pada komponen yang diekstraksi (Kholifah, 2014). Metode

ekstraksi menggunakan pelarut dapat dilakukan secara dingin yaitu maserasi dan digunakan pada temperatur ruangan. Penekanan utama pada maserasi adalah tersedianya waktu kontak yang cukup antara pelarut dan jaringan yang akan diekstraksi (Guether, 1987). Maserasi merupakan cara ekstraksi sederhana. Metode ini dilakukan dengan cara merendam serbuk simplisia dengan pelarut sehingga pelarut akan menembus dinding sel akibatnya larutan perkolasi, dan secara panas yaitu refluks, soxhlet, digesti, infus, dan dekok (Dirjen POM,2000).

A. Cara dingin

1. Maserasi

Maserasi adalah proses perendaman sampel dalam pelarut organik yang dalam sel akan terdesak untuk keluar. Proses tersebut terjadi berulang hingga konsentrasi didalam dan diluar sel seimbang. Dapat dilakukan modifikasi pada metode maserasi, misalnya teknik remaserasi. Pada metode ini, cairan dibagi menjadi dua kemudian seluruh serbuk simplisia dimaserasi dengan cairan penyari pertama, ampas dimaserasi lagi dengan cairan penyari kedua (Direktorat Jenderal Pengawasan Obat dan Makanan RI, 1986).

Proses maserasi menggabungkan bahan ekstraksi dengan bahan yang telah dihaluskan. Pengekstraksian simplisia memanfaatkan suatu pelarut tertentu dilanjutkan dengan pengadukan pada suhu ruangan sekitar 40-50 °C (Simanjuntak, 2008).

2. Perkolasi

Perkolasi adalah ekstraksi dengan pelarut yang selalu baru sampai sempurna (*exhaustive extraction*) yang umumnya dilakukan pada temperatur ruangan. Metode perkolasi mempunyai kelebihan yaitu sampel tetap dialiri oleh pelarut baru, sedangkan kerugian perkolasi yaitu pelarut akan sulit menjangkau seluruh area jika sampel tidak homogen terlebih dahulu, perkolasi membutuhkan banyak pelarut dan waktu yang lama (Mukhriani, 2014).

B. Cara panas

1. Refluks, adalah ekstraksi dengan pelarut pada temperatur titik didihnya, selama waktu tertentu dan jumlah pelarut terbatas yang relatif konstan dengan adanya pendingin balik.
2. Soxhlet, adalah ekstraksi menggunakan pelarut yang selalu baru yang umumnya dilakukan dengan alat khusus sehingga terjadi ekstraksi kontinu dengan jumlah pelarut relatif konstan dengan adanya pendingin balik.
3. Digesti, adalah maserasi kinetik (dengan pengadukan kontinu) pada temperatur yang lebih tinggi dari temperatur ruangan, yaitu secara umum dilakukan pada temperatur 40-50° C.
4. Infus, adalah ekstraksi dengan pelarut air pada temperatur penangas air (bejana infus tercelup dalam penangas air mendidih, temperatur terukur 96- 98° C) selama waktu tertentu (15-20 menit)
5. Dekok, adalah infus pada waktu yang lebih lama dan temperatur sampai titik didih air (Direktorat Jendral Pengawas Obat dan Makanan Departemen Kesehatan Republik Indonesia, 2000).

2.4 Fraksinasi

Fraksinasi adalah tehnik pemisahan dan pengelompokan kandungan kimia ekstrak berdasarkan kepolaran. Pada proses fraksinasi digunakan dua pelarut yang tidak tercampur dan memiliki tingkat kepolaran yang berbeda. Senyawa-senyawa yang terdapat dalam ekstrak akan terpisah menurut kepolarannya (Hawkins, 1997). Kemudian dilanjutkan dengan pemeriksaan kromatografi lapis tipis untuk mengetahui kelompok senyawa yang terdapat pada hasil fraksinasi, pemisahan noda dan eluen yang cocok (Harbone, 1987). Pelarut yang digunakan dalam fraksinasi mempunyai tingkat kepolaran yang berbeda (Akhsanita, 2012). Fraksinasi pada prinsipnya adalah proses penarikan senyawa pada suatu ekstrak dengan menggunakan dua macam pelarut yang saling tidak bercampur. Pelarut yang biasanya dipakai untuk fraksinasi adalah n-heksan, etil asetat dan metanol. Untuk menarik senyawa non polar dan lemak digunakan n-heksan, etil asetat digunakan untuk menarik senyawa semi polar sedangkan metanol untuk menarik senyawa-senyawa polar. Dengan proses fraksinasi

ini dapat diduga sifat kepolaran dari senyawa yang akan dipisahkan. Senyawa-senyawa yang bersifat non polar akan larut dalam pelarut yang non polar, sedangkan senyawa-senyawa yang bersifat polar akan larut dalam pelarut yang polar (D. M. Sari et al., 2015).

Pada umumnya proses fraksinasi dilakukan dengan menggunakan metode corong pisah atau kromatografi kolom. Corong pisah merupakan salah satu alat laboratoritum yang berfungsi sebagai separator komponen-komponen dalam campuran antara dua fase pelarut dengan densitas berbeda yang tidak bercampur (Haznawati, 2013), sedangkan kromatografi kolom termasuk ke dalam metode purifikasi senyawa yang menggunakan kolom (Trifany, 2012). Corong pisah dapat digunakan ketika menemukan kendala dalam memasukkan pelarut ke dalam kolom menggunakan tangan, sehingga corong pisah dapat berfungsi sebagai tendon yang dapat mengisi sendiri (Markham, 1988).

Pemisahan dengan metode kromatografi kolom dilakukan dalam kolom yang diisi dengan fase diam berpori seperti silica gel. Sedangkan, fase gerak diisi dengan cairan yang digunakan untuk mengelusi sempel melalui kolom sehingga sampel akan terpisah sesuai dengan ukuran partikelnya. Partikel yang besar akan tersangkut di kolom. Pemisahan dengan metode partisi cair-cair dilakukan berdasarkan tingkat kepolarannya dari polar, semi polar, nonpolar. Senyawa akan terpisah berdasarkan prinsip *like dissolve like*. Pada umumnya metode ini dilakukan dengan melarutkan ekstrak etanol atau metanol dalam air hingga larut. Selanjutnya dipartisi secara bertingkat mulai pelarut non polar seperti n-heksana, kloroform, kemudian semi polar seperti etil asetat dan n-butanol. Semua pelarut organik akan berada di atas kecuali pelarut klorofom. Alat yang digunakan pada metode ini yaitu corong pisah (Saifudin, 2011).

2.5 Alkaloid

2.5.1 Teori Dasar Alkaloid

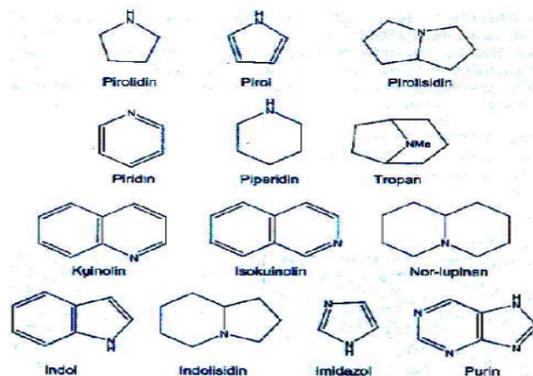
Alkaloid merupakan salah satu metabolisme sekunder yang terdapat pada tumbuhan, yang bisa dijumpai pada bagian daun, ranting, biji, dan kulit batang. Alkaloid merupakan senyawa metabolit sekunder yang melimpah di alam dan mempunyai

banyak manfaat dalam dunia medis. Senyawa alkaloid umumnya bersifat non polar (Lenny, 2006). Kegunaan senyawa alkaloid dalam bidang farmakologi adalah untuk memacu sistem syaraf dan melawan infeksi mikrobial (Pasaribu, 2009). Metode pemisahan yang umum digunakan yaitu ekstraksi soxhlet (Widi dan Indriati, 2007), maserasi (Tabasum, dkk., 2016), dan perkolasi (Perwita).

2.5.2 Tipe dan Struktur Inti Alkaloid

Alkaloid kebanyakan bersifat basa. Sifat tersebut tergantung adanya pasangan elektron pada nitrogen. Kebasaan alkaloid tergantung pada pasangan elektron bebas pada atom nitrogen mereka. Alkaloid dibagi menjadi 3 tipe yaitu alkaloid sejati, protoalkaloid dan pseudoalkaloid. Alkaloid sejati dibentuk dari asam amino yang mempunyai unsur N dalam sistem heterosiklik, memiliki aktivitas biologis, rasa pahit dan berbentuk padatan warna putih. Protoalkaloid memiliki unsur N bukan dalam sistem heterosiklik, strukturnya sederhana dan biasanya merupakan alkaloid minor. Pseudoalkaloid memiliki unsure N dalam kerangka karbon yang tidak atau bukan berasal dari asam amino, tetapi pada kenyataannya berkaitan dengan pembentuk asam amino atau sebagai hasil reaksi aminasi dan transaminasi.

a) Alkaloid sejati

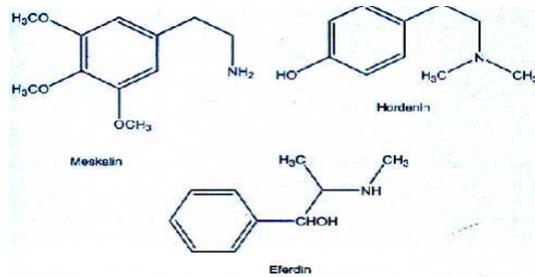


Gambar 2.2 Struktur Kimia Alkaloid (Hanani, 2014)

Alkaloid sejati adalah senyawa yang menunjukkan aktivitas fisiologi yang luas, hampir tanpa terkecuali bersifat basa dan lazim mengandung nitrogen dalam cincin heterosiklik. Alkaloid sejati dibentuk dari asam amino yang mempunyai unsur

N dalam sistem heterosiklik, memiliki aktivitas biologis, rasa pahit dan berbentuk padatan warna putih.

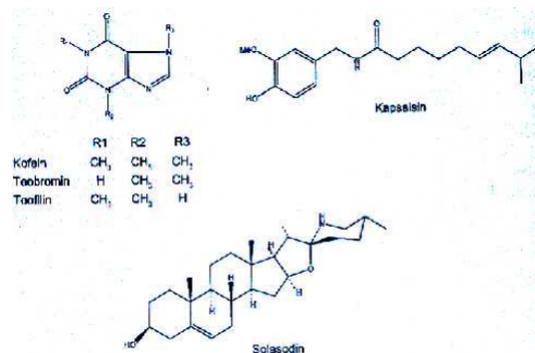
b) Protoalkaloid



Gambar 2.2 Struktur Kimia Protoalkaloid (Hanani, 2014)

Protoalkaloid merupakan asam amino yang relatif sederhana dan nitrogen asam amino tidak terdapat dalam cincin heterosiklik. Protoalkaloid diperoleh berdasarkan biosintesis dari asam amino yang bersifat basa. Contoh meskalin, ephedin, dan N,N- dimetiltriptamin.

c) Pseudoalkaloid



Gambar 2.4 Struktur Kimia Pseudoalkaloid (Hanani, 2014)

Pseudoalkaloid tidak diturunkan dari prekursor asam amino. Senyawa biasanya bersifat basa. Ada dua seri alkaloid yang penting dalam kelas ini yaitu alkaloid stereoidal dan purin (Azzahra *et al.*, 2015).

2.5.3 Sifat Fisika dan Kimia Alkaloid

a. Sifat Fisika

Alkaloid sebagian besar diisolasi berupa padatan kristal dengan titik didih berkisar 87-238°C. Umumnya alkaloid mempunyai 1 atom N meskipun ada beberapa yang mempunyai lebih dari 1 atom N seperti pada ergoramin yang memiliki 5 atom N. Alkaloid sedikit amorf, beberapa berupa cairan seperti nikotin dan konin. Kebanyakan alkaloid tidak berwarna, namun beberapa senyawa kompleks spesies aromatik berwarna seperti berberin berwarna kuning dan betanin berwarna merah. Pada umumnya, alkaloid larut dalam pelarut organik namun ada beberapa yang larut dalam air seperti pseudoalkaloid dan protoalkaloid. Garam alkaloid dan alkaloid quartener sangat larut dalam air (Sastrohamidjojo, 1996).

b. Sifat Kimia

Alkaloid terdiri atas karbon, hidrogen, nitrogen, dan sebagian besar diantaranya mengandung oksigen. Kebiasaan senyawa alkaloid mudah mengalami dekomposisi oleh panas dan sinar matahari dengan adanya oksigen, beberapa tersublimasi tanpa dekomposisi contohnya kafein. Alkaloid sebagian besar sifatnya basa. Menurut Sastrohamidjojo (1996), sifat ini tergantung pada adanya pasangan elektron pada nitrogen. Jika gugus fungsionalnya berdekatan dengan nitrogen maka sifatnya melepaskan elektron, seperti contoh gugus alkil, maka ketersediaan elektron pada nitrogen naik dan senyawa lebih bersifat basa. Trietilamin lebih basa daripada dietilamin dan senyawa dietilamin lebih basa daripada etilamin. Sebaliknya, jika gugus fungsional yang berdekatan bersifat menarik elektron, seperti contoh gugus karbonil, maka ketersediaan pasangan elektron berkurang dan pengaruh yang ditimbulkan alkaloid dapat bersifat netral atau bahkan sedikit asam.

2.5.4 Manfaat Alkaloid

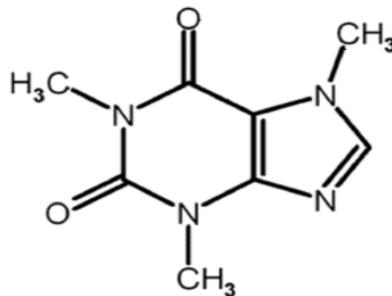
Alkaloid umumnya memiliki aktivitas farmakologi terutama pada mamalia seperti manusia. Kebanyakan alkaloid dengan aktivitas biologis pada manusia mempengaruhi sistem saraf, terutama sebagai neurotransmitter kimia misalnya

asetilkolin, epinefrin, norepinefrin, asam gamma aminobutirat (GABA), dopamin dan serotonin. Alkaloid berfungsi sebagai model untuk sintesis kimia analog dengan sifat yang lebih baik. Contoh penting adalah hiosiamin dan skopolamin (*Atropa belladonna* dan *Datura*) sebagai model untuk bahan parasimpatomimetik sintetis (Azzahra *et al.*, 2015).

2.6 Kafein

2.6.1 Struktur Kimia Kafein

Kafein merupakan alkaloid putih dengan rumus senyawa kimia $C_8H_{10}N_4O_2$, dan rumus bangun 1,3,7-trimethylxanthine. Kafein mempunyai kemiripan struktur kimia dengan 3 senyawa alkaloid yaitu *xanthin*, *theophylline*, dan *theobromine* (Daswin, 2013). Struktur kimia kafein adalah 1,3,7-trimetilxantin dan termasuk dalam molekul xantin. Gugus metilnya berikatan dengan ketiga hidrogen dan nitrogen pada cincin xantin. Nama IUPAC untuk kafein adalah 1,3,7-trimethyl-1H-purine-2,6(3H,7H)-dione, 3,7-dihydro-1,3,7-trimethyl-1H-purine-2,6-dione (Erowid, 2011).



Gambar 2.5 Struktur Kimia Kafein

2.6.2 Sumber Kafein

Kafein ialah senyawa kimia yang dijumpai secara alami didalam makanan contohnya biji kopi, teh, biji kelapa, buah kola (*cola nitide*) *guarana*, dan *mate*. Teh adalah sumber kafein yang lain, dan mengandung setengah dari kafein yang dikandung kopi. Teh mengandung sedikit jumlah *teobromine* dan sedikit lebih tinggi *theophylline* dari kopi (Daswin, 2013).

2.6.3 Manfaat dan Kegunaan Kafein

Kafein memiliki manfaat dan kegunaan yang cukup banyak dalam dunia medis. Kafein sering digunakan dalam terapi kombinasi pengobatan migrain.

Menurut *American Headache Society*, kombinasi pemberian oral antara kafein bersama-sama dengan obat penghilang rasa sakit seperti aspirin dan acetaminophen, efektif untuk mengobati migrain. Hal ini dikarenakan kafein dalam dosis kecil dapat membantu penyerapan obat-obatan penghilang rasa sakit terutama pada paracetamol. Kafein telah disetujui FDA untuk digunakan dengan obat penghilang rasa sakit untuk mengobati sakit kepala migrain. Kafein juga dapat digunakan pada penderita *tension type headache* dan nyeri kepala paska operasi. Pemberian kafein dalam dilakukan per oral maupun intravena (Shapiro & Cowan, 2006).

2.7 N-Heksan

2.7.1 Teori Dasar N-Heksan

Heksana adalah sebuah senyawa hidrokarbon alkana dengan rumus kimia C_6H_{14} . Awalan heks- merujuk pada enam karbon atom yang terdapat pada heksana dan akhiran -ana berasal dari alkana, yang merujuk pada ikatan tunggal yang menghubungkan atom-atom karbon tersebut. Dalam keadaan standar senyawa ini merupakan cairan tak berwarna yang tidak larut dalam air. Keuntungan pelarut ini yaitu bersifat selektif dalam melarutkan zat, menghasilkan jumlah kecil lilin, albumin, dan zat warna, namun dapat mengekstrak zat pewangi dalam jumlah besar (Guenther, 1987). N-heksana merupakan jenis pelarut nonpolar sehingga n-heksana dapat melarutkan senyawa-senyawa bersifat nonpolar (Maulida & Zulkarnaen, 2010).

2.7.2 Sifat Fisika dan Kimia N-Heksana

Tabel 2.1 Sifat Fisika dan Kimia N-Heksana

Karakteristik	Syarat
Bobot molekul	86,2 gram/mol
Warna	Tak berwarna
Wujud	Cair
Titik lebur	-95°C
Titik didih	69°C (pada 1 atm)
Densitas	0,6603 gr/ml pada 20°C

Sumber: Kastianti dan Amalia dalam Munawaroh dan Handayani (2010)

2.8 Spektrofotometri UV-Vis

2.8.1 Teori Dasar Spektrofotometri UV-Vis

Spektrofotometri UV-Vis merupakan salah satu teknik analisis spektroskopi yang memakai sumber radiasi elektromagnetik ultraviolet dekat (190-380) dan sinar tampak (380-780) dengan memakai instrumen spektrofotometer (Mulja dan Suharman, 1995:26). Spektrofotometri UV-Vis melibatkan energi elektronik yang cukup besar pada molekul yang dianalisis, sehingga spektrofotometri UV-Vis lebih banyak dipakai untuk analisis kuantitatif ketimbang kualitatif (Mulja dan Suharman, 1995: 26). Spektrofotometer tersusun atas sumber spektrum yang kontinyu, monokromator, sel pengabsorpsi untuk larutan sampel atau blangko dan suatu alat untuk mengukur perbedaan absorpsi antara sampel dan blangko ataupun pembanding (Khopkar, 1990: 216).

Spektrofotometer adalah alat yang digunakan untuk mengukur serapan yang dihasilkan dari interaksi kimia antara radiasi elektromagnetik dengan molekul atau atom dari suatu zat kimia pada daerah UV-Vis (FI edisi IV, 1995). Spektrofotometri UV-Vis merupakan pengukuran serapan cahaya radiasi elektromagnetik dengan molekul senyawa kimia tertentu pada kisaran panjang gelombang 200-800 nm (Glasston, 1960). Panjang gelombang yang digunakan untuk analisis kuantitatif adalah panjang gelombang yang memiliki absorbansi maksimal. Hal ini disebabkan absorbansi maksimal memiliki kepekaan tinggi dan daya serap relatif konstan. Syarat utama senyawa yang dapat dideteksi dengan spektrofotometri UV-Vis harus memiliki gugus kromofor dan gugus auksokrom (Skoog & West, 1971).

Gugus kromofor merupakan gugus fungsi yang mempunyai spektrum absorpsi pada daerah ultraviolet atau sinar tampak. Gugus kromofor mengandung ikatan kovalen tidak jenuh, seperti: C=C, C=O, dan N=O. Gugus auksokrom merupakan gugus yang dapat meningkatkan absorpsi dari suatu molekul. Gugus ini tidak memiliki pengaruh terhadap absorpsi molekul pada daerah ultraviolet atau sinar tampak. Namun, gugus ini dapat mempengaruhi absorpsi molekul di posisi gugus tersebut terikat. Adapun contoh gugus auksokrom adalah sebagai berikut: OH, OR, dan NHR (Pecsok *et al.*, 1976).

Spektrofotometer UV-Vis dapat melakukan penentuan terhadap sampel yang berupa larutan, gas, atau uap. Untuk sampel yang berupa larutan perlu diperhatikan pelarut yang dipakai antara lain pelarut yang dipakai tidak mengandung sistem ikatan rangkap terkonjugasi pada struktur molekulnya dan tidak berwarna, tidak terjadi interaksi dengan molekul senyawa yang dianalisis, dan kemurniannya harus tinggi atau derajat untuk analisis. (Mulja dan Suharman, 1995: 28).

2.8.2 Prinsip Kerja Spektrofotometri UV-Vis

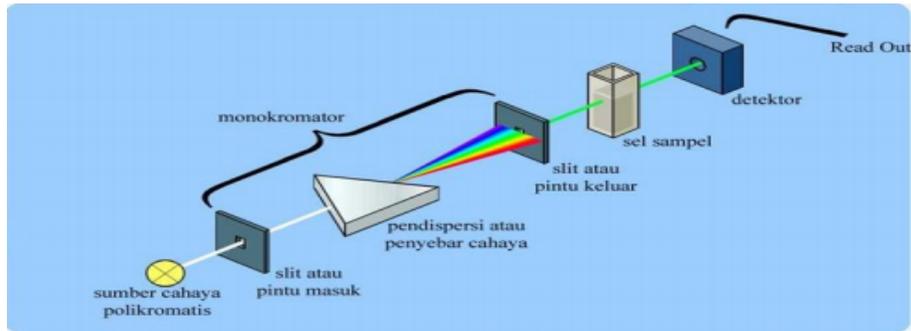
Spektrum elektromagnetik dibagi dalam beberapa daerah cahaya. Suatu daerah akan diabsorpsi oleh atom atau molekul dan panjang gelombang cahaya yang diabsorpsi dapat menunjukkan struktur senyawa yang diteliti. Spektrum elektromagnetik meliputi suatu daerah panjang gelombang yang luas dari sinar gamma gelombang pendek berenergi tinggi sampai pada panjang gelombang mikro (Marzuki Asnah 2012). Spektrofotometer UV-Vis merupakan metode analisa yang penggunaannya cukup luas, baik untuk analisa kualitatif maupun kuantitatif. Untuk analisa kuantitatif yang diperhatikan adalah :

1. Membandingkan λ maksimum.
2. Membandingkan serapan (A), daya serap (a), E_{λ}
3. Membandingkan spektrum serapannya.

Prinsip dari spektrofotometri UV-Vis adalah mengukur jumlah cahaya yang diabsorpsi atau ditransmisikan oleh molekul-molekul di dalam larutan. Ketika panjang gelombang cahaya ditransmisikan melalui larutan, sebagian energi cahaya tersebut akan diserap (diabsorpsi). Besarnya kemampuan molekul-molekul zat terlarut untuk mengabsorpsi cahaya pada panjang gelombang tertentu dikenal dengan istilah absorbansi (A), yang setara dengan nilai konsentrasi larutan tersebut dan panjang berkas cahaya yang dilalui (biasanya 1 cm dalam spektrofotometri) ke suatu point dimana persentase jumlah cahaya yang ditransmisikan atau diabsorpsi diukur dengan phototube (Susanti, 2010).

Serapan cahaya oleh molekul dalam daerah sinar tampak tergantung pada energi elektronik molekul. Penyerapan sejumlah energi menghasilkan transisi elektron dari orbital tingkat dasar ke orbital yang berenergi lebih tinggi dalam

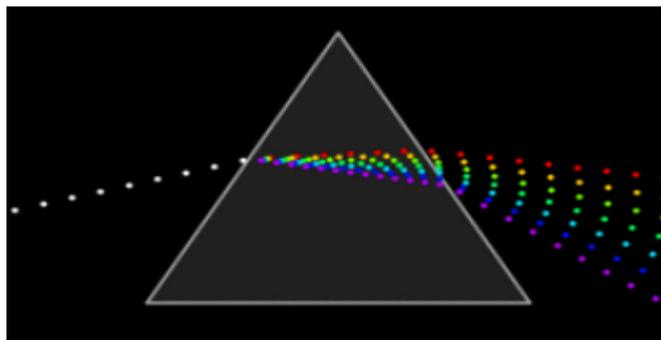
keadaan tereksitasi yang dikenal sebagai orbital elektron anti bonding (Mulja & Suharman, 1995). Secara sederhana instrument spektrofotometri yang disebut spektrofotometer terdiri dari : Sumber cahaya – monokromatis – sel sampel – *detector- read out*.



Gambar 2.6 Pembacaan Spektrofotometer

Komponen-komponen pokok dan fungsi dari spektrofotometer pada masing-masing bagian, antara lain :

1. Sumber sinar polikromatis berfungsi sebagai sumber sinar polikromatis dengan berbagai macam rentang panjang gelombang.
2. Monokromator berfungsi sebagai penyeleksi panjang gelombang yaitu mengubah cahaya yang berasal dari sumber sinar polikromatis menjadi cahaya monokromatis. Pada gambar di atas disebut sebagai pendispersi atau penyebar cahaya. dengan adanya pendispersi hanya satu jenis cahaya atau cahaya dengan panjang gelombang tunggal yang mengenai sel sampel. Pada gambar di atas hanya cahaya hijau yang melewati pintu keluar. Proses dispersi atau penyebaran cahaya seperti yang tertera pada gambar.



Gambar 2.7 Proses Dispersi Cahaya

3. Sel sampel berfungsi sebagai tempat meletakkan sampel

- a. UV, VIS dan UV-VIS menggunakan kuvet sebagai tempat sampel. Kuvet biasanya terbuat dari kuarsa atau gelas, namun kuvet dari kuarsa yang terbuat dari silika memiliki kualitas yang lebih baik. Hal ini disebabkan yang terbuat dari kaca dan plastik dapat menyerap UV sehingga penggunaannya hanya pada spektrofotometer sinar tampak (VIS). Kuvet biasanya berbentuk persegi panjang dengan lebar 1 cm.
 - b. IR, untuk sampel cair dan padat (dalam bentuk pasta) biasanya dioleskan pada dua lempeng natrium klorida. Untuk sampel dalam bentuk larutan dimasukan ke dalam sel natrium klorida. Sel ini akan dipecahkan untuk mengambil kembali larutan yang dianalisis, jika sampel yang dimiliki sangat sedikit dan harganya mahal.
4. Detektor berfungsi menangkap cahaya yang diteruskan dari sampel dan mengubahnya menjadi arus listrik. Macam-macam detector yaitu Detektor foto (*Photo detector*), *Photocell*, misalnya CdS, *Phototube*, Hantaran foto, Dioda foto, Detektor panas.
- a. Pada saat pengenceran alat-alat pengenceran harus betul-betul bersih tanpa adanya zat pengotor.
 - b. Dalam penggunaan alat-alat harus betul-betul steril.
 - c. Jumlah zat yang dipakai harus sesuai dengan yang telah ditentukan
 - d. Dalam penggunaan spektrofotometri UV-Vis, sampel harus jernih dan tidak keruh.
 - e. Dalam penggunaan spektrofotometri UV-Vis, sampel harus berwarna. Serapan dapat terjadi jika foton/radiasi yang mengenai cuplikan memiliki energi yang sama dengan energi yang dibutuhkan untuk menyebabkan terjadinya.
 - f. *Read out* merupakan suatu sistem baca yang menangkap besarnya isyarat listrik yang berasal dari detector.

2.8.3 Hukum Lambert Beer

Cahaya yang diserap diukur sebagai absorbansi (A) sedangkan cahaya yang hamburkan diukur sebagai transmitansi (T), dinyatakan dengan hukum *Lambert-Beer* atau Hukum *Beer*, berbunyi:

“Jumlah radiasi cahaya tampak (ultraviolet, inframerah dan sebagainya) yang diserap atau ditransmisikan oleh suatu larutan merupakan suatu fungsi eksponen dari konsentrasi zat dan tebal larutan”.

Berdasarkan hukum *Lambert-Beer*, rumus yang digunakan untuk menghitung banyaknya cahaya yang hamburkan :

$$T = \dots \text{ atau } \%T = \dots \times 100 \%$$

dan absorbansi dinyatakan dengan rumus:

$$A = -\log T = -\log \dots$$

dimana I_0 merupakan intensitas cahaya datang dan I_t atau I_1 adalah intensitas cahaya setelah melewati sampel. Rumus yang diturunkan dari Hukum Beer dapat ditulis sebagai:

$$A = a \cdot b \cdot c \text{ atau } A = \epsilon \cdot b \cdot c$$

dimana :

- A = absorbansi
- b / l = tebal larutan (tebal kuvet diperhitungkan juga umumnya 1 cm)
- c = konsentrasi larutan yang diukur
- ϵ = tetapan absorptivitas molar (jika konsentrasi larutan yang diukur dalam molar)
- a = tetapan absorptivitas (jika konsentrasi larutan yang diukur dalam ppm).

Faktor – faktor yang sering menyebabkan kesalahan dalam menggunakan spektrofotometer dalam mengukur konsentrasi suatu analit :

1. Adanya serapan oleh pelarut. Hal ini dapat diatasi dengan penggunaan blangko, yaitu larutan yang berisi selain komponen yang akan dianalisis termasuk zat pembentuk warna.
2. Serapan oleh kuvet. Kuvet yang ada biasanya dari bahan gelas atau kuarsa, namun kuvet dari kuarsa memiliki kualitas yang lebih baik.
3. Kesalahan fotometrik normal pada pengukuran dengan absorbansi sangat rendah atau sangat tinggi, hal ini dapat diatur dengan pengaturan konsentrasi, sesuai dengan kisaran sensitivitas dari alat

yang digunakan (melalui pengenceran atau pemekatan) (Sri Suyono, 2013).

2.8.4 Warna Komplementer

Absorbansi maksimum dari larutan berwarna terjadi pada daerah warna yang berlawanan dengan warna yang diamati, misalnya larutan berwarna merah akan menyerap radiasi maksimum pada daerah warna hijau. Dengan kata lain warna yang diserap adalah warna komplementer dari warna yang diamati (Suharta,2005).

Tabel 2.2 Spektrum Cahaya Tampak dan Warna-warna Komplementer (Day dan AL.Underwood,2002)

Panjang Gelombang (nm)	Warna	Warna Komplementer
400-435	Violet	Kuning-Hijau
435-480	Biru	Kuning
480-490	Hijau-Biru	Oranye
490-500	Biru – Hijau	Merah
500-560	Hijau	Ungu
560-580	Kuning – hijau	Violet
580-595	Kuning	Biru
595-610	Oranye	Hijau – biru
610-750	Merah	Biru-Hijau

2.9 Validasi Metode Analisis

Validasi metode analisis adalah suatu tindakan penilaian terhadap suatu parameter tertentu, berdasarkan percobaan laboratorium untuk memastikan bahwa parameter tersebut memenuhi syarat untuk penggunaannya (Effendy, 2004). Validasi metode menurut *United States Pharmacopeia* (USP) dilakukan untuk menjamin bahwa metode analisis akurat, spesifik, reproduibel, dan tahan pada kisaran analit yang akan dianalisis (Rohman, 2007: 463). Suatu metode analisis harus divalidasi untuk melakukan verifikasi bahwa parameter-parameter kinerja cukup mampu untuk mengatasi problem analisis, karenanya suatu metode harus divalidasi ketika :

- a. Metode baru dikembangkan untuk mengatasi problem analisis tertentu.

- b. Metode yang sudah baku direvisi untuk menyesuaikan perkembangan atau karena munculnya suatu problem yang mengarahkan bahwa metode baku tersebut harus direvisi.
- c. Penjaminan mutu yang mengindikasikan bahwa metode baku telah berubah seiring dengan berjalannya waktu.
- d. Metode baku digunakan dilaboratorium yang berbeda atau dikerjakan dengan alat yang berbeda.
- e. Untuk mendemonstrasikan kesetaraan antar 2 metode, seperti antara metode baru dan metode baku.

2.9.1 Spesifisitas

Spesifisitas adalah kemampuan untuk mengukur analit yang dituju secara tepat dan spesifik dengan adanya komponen-komponen lain dalam matriks sampel seperti ketidakmurnian, produk degradasi, dan komponen matriks. Penentuan spesifisitas metode dapat diperoleh dengan 2 jalan. Yang pertama (dan yang paling diharapkan), adalah dengan melakukan optimasi sehingga diperoleh senyawa yang dituju terpisah secara sempurna dari senyawa- senyawa lain (Resolusi senyawa yang ditujuh ≥ 2). Cara kedua untuk memperoleh spesifisitas adalah dengan menggunakan detektor selektif, terutama untuk senyawa-senyawa yang terelusi secara bersama-sama sebagai contoh, detektor elektrokimia atau detektor fluoresent hanya akan mendeteksi senyawa tertentu, sementara senyawa yang lainnya tidak terdeteksi (Rohman, 2007).

2.9.2 Linieritas

Linieritas adalah kemampuan metode analisis memberikan respon proporsional terhadap konsentrasi analit dalam sampel. Rentang metode adalah pernyataan batas terendah dan tertinggi analit yang sudah ditunjukkan dapat ditetapkan dengan kecermatan, keseksamaan, dan linearitas yang dapat diterima. Hubungan linieritas yang baik ditunjukkan oleh koefisien korelasi. ICH merekomendasikan untuk penentuan linieritas menggunakan minimal 5

konsentrasi dengan minimal rentang tertentu yaitu untuk pengujian senyawa obat atau produk jadi sekitar 80-120% dari konsentrasi larutan (USP, 2016).

Parameter hubungan kelinieran yang digunakan yaitu koefisien korelasi (r) dan koefisien determinasi (R) pada analisis regresi linier $y = bx + a$ (b adalah slope, a adalah intersep, x adalah konsentrasi analit dan y adalah respon instrumen). Koefisien determinasi adalah rasio dari variasi yang dijelaskan terhadap variasi keseluruhan. Nilai rasio ini selalu tidak negatif sehingga ditandai dengan R^2 . Koefisien korelasi adalah suatu ukuran hubungan linier antara dua set data dan ditandai dengan r . Hubungan linier yang ideal dicapai jika nilai $a = 0$ dan $r = +1$ atau -1 merupakan hubungan yang sempurna, tanda $+$ dan $-$ bergantung pada arah garis (Riyanto, 2014).

2.9.3 Limit Of Detection (LOD)

LOD atau batas deteksi didefinisikan sebagai konsentrasi analit terendah dalam sampel yang masih dapat dideteksi, meskipun tidak selalu dapat dikuantifikasi. LOD merupakan batas uji yang secara spesifik menyatakan apakah analit di atas atau dibawah nilai tertentu. Definisi batas deteksi yang paling umum digunakan dalam kimia analisis adalah bahwa batas deteksi merupakan kadar analit yang memberikan respon sebesar respon blanko (y_b) ditambah dengan 3 simpangan baku blanko ($3S_b$) (Rohman, 2007).

2.9.4 Limit of Quantification (LOQ)

LOQ atau batas kuantifikasi didefinisikan sebagai konsentrasi analit terendah dalam sampel yang dapat ditentukan dengan presisi dan akurasi yang dapat diterima pada kondisi operasional metode yang digunakan. Sebagaimana LOD, LOQ juga diekspresikan sebagai konsentrasi (dengan akurasi dan presisi jugadilaporkan). Kadang-kadang rasio *signal tnoise* 10:1 digunakan untuk menentukan LOQ. Perhitungan LOQ dengan rasio *signal tnoise* 10:1 merupakan aturan umum, meskipun demikian perlu diingat bahwa LOQ merupakan suatu kompromi antara konsentrasi dengan presisi dan akurasi yang dipersyaratkan. Jadi, jika konsentrasi LOQ menurun maka presisi juga menurun.

Jika presisi tinggi dipersyaratkan, maka konsentrasi LOQ yang lebih tinggi harus dilaporkan. (Rohman, 2007).

2.9.5 Presisi

Presisi atau *precision* adalah ukuran yang menunjukkan derajat kesesuaian antara hasil uji individual, diukur melalui penyebaran hasil individual dari rata-rata jika prosedur diterapkan secara berulang pada sampel-sampel yang diambil dari campuran yang homogen. Presisi diukur sebagai simpangan baku atau simpangan baku relatif (koefisien variasi). Presisi dapat dinyatakan sebagai *repeatability* (keterulangan) atau *reproducibility* (ketertiruan) (Riyanto, 2014).

Repeatability adalah keseksamaan metode jika dilakukan berulang kali oleh analis yang sama pada kondisi sama dan dalam interval waktu yang pendek. *Reproducibility* adalah keseksamaan metode jika dikerjakan pada kondisi yang berbeda. Presisi dari metode uji ditentukan dengan rumus :

$$\text{RSD} = x 100 \%$$

Persyaratan presisi berdasarkan % RSD yang bergantung pada jumlah analit dalam sampel (AOAC, 2013).

2.9.6 Akurasi

Akurasi dinyatakan sebagai persen perolehan kembali (*recovery*) analit yang ditambahkan. Akurasi dapat ditentukan melalui dua cara, yaitu metode simulasi (*spiked-placebo recovery*) atau metode penambahan baku (*standard addition method*). Dalam metode simulasi, sejumlah analit bahan murni ditambahkan ke dalam plasebo (semua campuran reagen yang digunakan minus analit), lalu campuran tersebut dianalisis dan hasilnya dibandingkan dengan kadar standar yang ditambahkan (kadar yang sebenarnya) kemudian ditambah analit dengan konsentrasi tertentu (dengan menggunakan tiga macam konsentrasi antara 80% sampai 120% dari kadar analit yang diperkirakan), atau ditentukan dengan menggunakan tiga macam konsentrasi antara 30% – 60% kali dari kadar analit yang diperkirakan (Riyanto, 2014).

Perhitungan persen perolehan kembali dapat ditentukan dengan rumus matematik sebagai berikut:

$$\% \text{ Recovery} = \frac{\text{Konsentrasi hasil percobaan}}{\text{Konsentrasiteoritis}} \times 100\%$$

Persyaratan % *recovery* untuk bahan alam berdasarkan konsentrasi analit yang berada dalam sampel sesuai *Association of Official Analytical Chemists* (AOAC) (AOAC, 2013).

2.9.7 Kisaran (*Range*)

Kisaran-kisaran konsentrasi yang diuji tergantung pada jenis metode dan kegunaannya. Untuk pengujian komponen utama (Mayor), maka konsentrasi baku harus diukur didekat atau sama dengan konsentrasi kandungan analit yang diharapkan. Suatu strategi yang baik adalah mengukur baku dengan kisaran 25, 50, 75, 100, 125, dan 150% dari konsentrasi analit yang diharapkan (Rohman, 2007).

2.9.8 Ketangguhan/Kekasaran (*ruggedness*)

Kekasaran merupakan tingkat reproduibilitas hasil yang diperoleh dibawah kondisi yang bermacam-macam yang diekspresikan sebagai persen standar defiasi relatif (% RSD) kondisi-kondisi ini meliputi laboratorium, analisis, alat, reagen, dan waktu percobaan yang berbeda. Kekasaran suatu metode mungkin tidak akan diketahui jika suatu metode dikembangkan pertama kali, akan tetapi kekasaran suatu metode akan kelihatan jika digunakan berulang kali. Suatu pengembangan metode yang bagus mensyaratkan suatu evaluasi yang sistematis terhadap faktor-faktor penting yang mempengaruhi kekasaran suatu metode (Rohman, 2007).

2.9.9 Kekuatan/Ketahanan (*Robustness*)

Ketahanan merupakan kapasitas metode untuk tetap tidak terpengaruh oleh adanya variasi parameter metode yang kecil. Ketahanan dievaluasi dengan melakukan variasi parameter-parameter metode seperti: persentase pelarut organik pH kekuatan ionik, suhu dan sebagainya. Suatu praktek yang baik

untuk mengevaluasi ketahanan suatu metode adalah dengan memvariasi parameter- parameter penting dalam suatu metode secara sistematis lalu mengkuatr pengaruhnya pada pemisahan. Sebagai contoh, jika suatu metode menggunakan asetonitril 36% air sebagai fase geraknya, maka seorang analis lalu memvariasi persentase asetonitrilnya menjadi misalkan 33, 36, dan 39% lalu melihat pengaruhnya pada waktu retensi analit yang diuji (Rohman, 2007).

2.9.10 Stabilitas

Untuk memperoleh hasil-hasil analisis yang reproduibel dan reliabel, maka sampel, reagen dan baku yang digunakan harus stabil pada waktu tertentu (misalkan 10 hari, 1 minggu, 1 bulan, atau tergantung kebutuhan). Sebagai contoh, suatu analisis untuk pengujian suatu sampel dapat membutuhkan 10 atau lebih perlakuan kromatografi yakni untuk menentukan kesesuaian sistem, termasuk didalamnya konsentrasi baku untuk membuat kurva baku dan juga untuk membuat 2 atau 3 kali replikasi terhadap sampel yang akan diuji. Dengan demikian, untuk melakukan analisis suatu sampel saja dibutuhkan waktu beberapa jam, karenanya selama analisis harus dipastikan bahwa sampel, reagen, dan pelarut yang digunakan stabil. Untuk analisis sampel dalam jumlah yang banyak, maka dibutuhkan waktu yang lebih lama lagi sehingga stabilitas dapat menjadi faktor yang kritis pada validasi metode (Rohman, 2007).

2.10 Penetapan Kadar Alkaloid

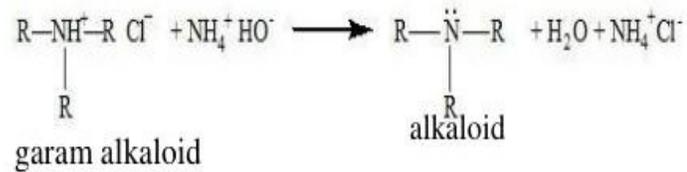
Penetapan kadar merupakan prosedur pengukuran properti atau konsentrasi analit dalam suatu sampel. Ada beberapa instrumen yang dapat digunakan untuk penetapan kadar suatu analit dalam sampel salah satunya dengan spektrofotometer UV-VIS. Prinsip kerja dari spektrofotometer UV-VIS yaitu didasarkan pada transisi $n-\pi^*$ ataupun $\pi-\pi^*$ sehingga memerlukan adanya gugus kromofor dalam molekul. Transisi tersebut terjadi pada daerah spektrum (sekitar 200 hingga 700 nm) yang praktis digunakan untuk eksperimen (Day dan Underwood, 2002). Metode spektrofotometri UV-Vis memiliki keuntungan yaitu memberikan cara sederhana untuk menetapkan kuantitas zat yang sangat kecil (Perkampus, 1992).

Isolasi senyawa alkaloid telah banyak dilakukan, salah satunya adalah dengan menggunakan metode spektrofotometri sederhana dengan cara pengestraksian senyawa alkaloid dari bagian suatu tanaman obat dan pereaksi yang digunakan adalah *Bromocresol Green* (BCG). Larutan standar yang dapat digunakan untuk mendeteksi alkaloid pada tanaman daun sirsak yaitu kafein, dimana standar kafein digunakan sebagai pengidentifikasian total alkaloid dalam tanaman obat itu sendiri (Latifaningsih, 2012).

Penetapan kadar alkaloid total menggunakan metode spektrofotometri dengan *bromocresol green* (BCG) adalah metode yang sederhana, sensitif, stabil dan tidak membutuhkan peralatan yang sangat khusus. Metode tersebut memiliki keuntungan diantaranya adalah hemat waktu, dengan uji yang membutuhkan waktu rata-rata 1 jam (Shamsa et al., 2008). Prinsip dari metode ini adalah pembentukan kompleks antara alkaloid dengan reagen BCG yang akan membentuk senyawa berwarna kuning yang diekstraksi dengan kloroform pada pH 4,7 dan diukur pada panjang gelombang maksimum 415 nm (Patel dkk., 2015). Prinsip metode ini adalah pelarut organik tertentu dapat mengekstrak kompleks berwarna secara kuantitatif. Kompleks berwarna merupakan kombinasi dari BCG dan ion garam yang terbentuk oleh reaksi antara alkaloid dan ion hidrogen pada pH asam. Kandungan senyawa lain yang dapat larut dalam kloroform dihilangkan dengan cara dilakukan pencucian sebanyak tiga kali menggunakan kloroform sebelum direaksikan dengan BCG dan fase air ditampung. Hal ini bertujuan agar senyawa tersebut tidak ikut larut dalam kloroform pada saat ekstraksi kompleks dengan kloroform, sehingga hanya alkaloid yang akan ada pada larutan akhir (Shamsa et al., 2008).

Metode tersebut berdasarkan pada reaksi alkaloid dengan *bromocresol green* (BCG), dan membentuk sebuah olahan berwarna kuning. Metode itu memaparkan sebuah keuntungan dari sensitifitas dan stabilitas (Latifaningsih, 2012). BCG hanya dapat bereaksi dengan kelas tertentu pada alkaloid (alkaloid yang memiliki nitrogen dalam struktur) alkaloid yang memiliki struktur amina atau amida tidak bereaksi dengan reagen ini (Ajanal et al., 2012). Preparasi

deteksi alkaloid yaitu dengan memipet sejumlah tertentu ekstrak sampel ditambahkan dapar fosfat pH 4,7 agar terbentuk garam alkaloid kemudian ditambahkan BCG agar pH larutan menjadi basa, perlakuan tersebut dilakukan agar garam alkaloid membentuk basa bebas alkaloid. Reaksi alkaloid dengan basa secara umum dapat dilihat pada pereaksi berikut (Titis *et al.*, 2013) :

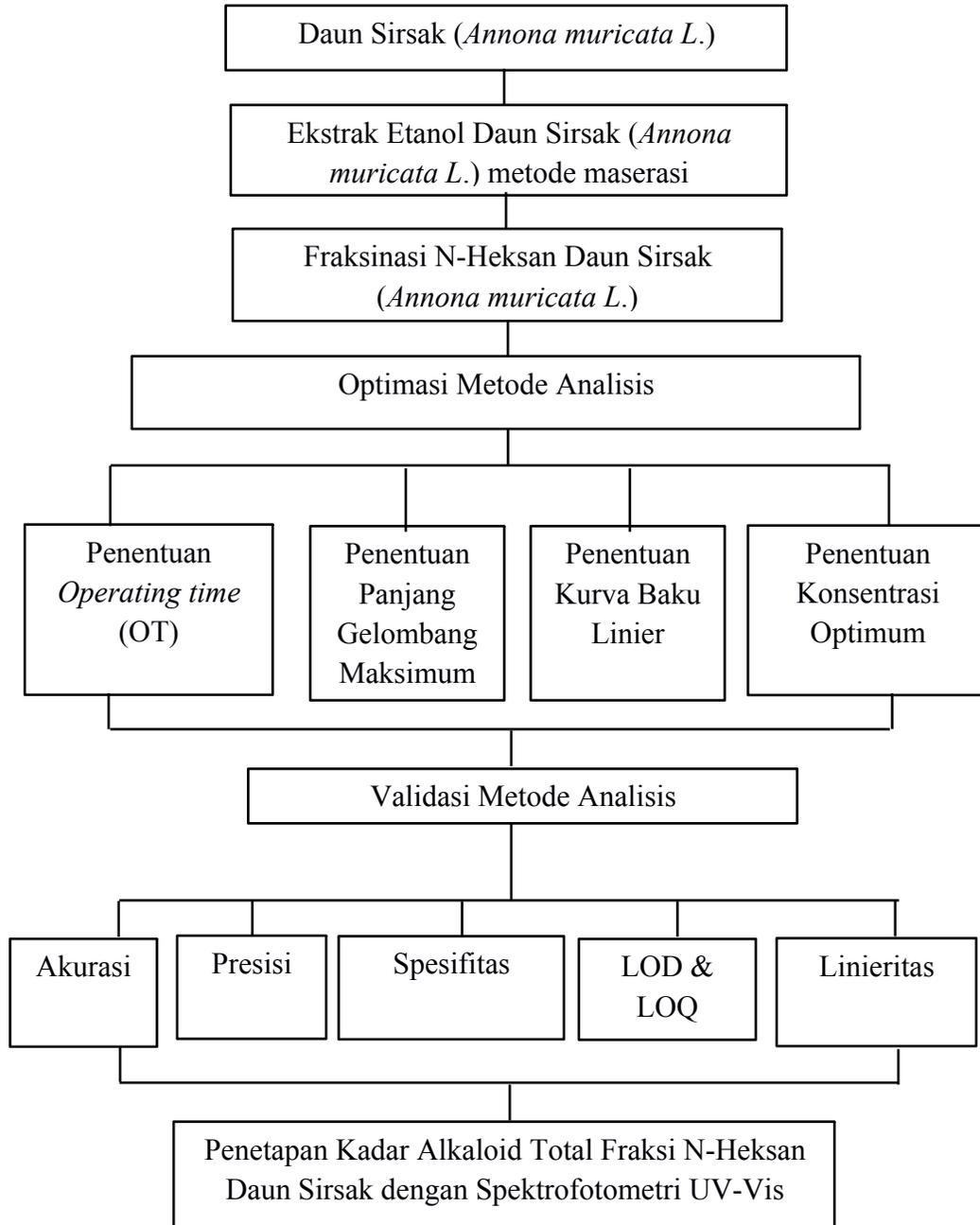


Gambar 2.8 Reaksi Alkaloid Dengan Basa (Titis et al., 2013)

Penentuan alkaloid total menggunakan metode spektrofotometer UV-Vis menghasilkan alkaloid total sebesar 41,666 mg/g (Tabasum, dkk., 2016). Pada penelitian John, dkk. (2014) menyatakan bahwa penentuan alkaloid total dengan metode spektrofotometer UV-Vis menghasilkan alkaloid total sebesar 28,53 mg/g.

BAB 3. KERANGKA KONSEP

3.1 Kerangka Konsep



Gambar 3.1 Kerangka Konsep

3.2 Hipotesis Penelitian

Hipotesis merupakan suatu penjelasan sementara tentang perilaku, fenomena, atau keadaan tertentu yang telah terjadi (Kuncoro, 2011). Hipotesis pada penelitian ini yaitu penelitian optimasi dan validasi metode analisis membuktikan bahwa parameter-parameter validitas suatu metode analisis spektrofotometri UV-Vis telah memenuhi rentang yang ditentukan dan dapat diaplikasikan untuk penetapan kadar alkaloid total fraksi n-heksan daun sirsak (*Annona muricata L*).

BAB 4. METODE PENELITIAN

4.1 Desain Penelitian

Desain penelitian yang dilakukan yaitu desain deskriptif laboratorik dengan pemeriksaan laboratorium secara kualitatif dan kuantitatif. Penelitian yang dilakukan adalah optimasi dan validasi metode analisis untuk penetapan kadar alkaloid total pada fraksi n-heksan daun sirsak menggunakan spektrofotometri UV-Vis. Ekstraksi daun sirsak dilakukan dengan metode maserasi. Setelah dilakukannya ekstraksi, dilanjutkan proses fraksinasi menggunakan n-heksan. Kadar alkaloid ditentukan menggunakan alat spektrofotometer dengan standar kafein.

4.2 Populasi dan Sampel

4.2.1 Populasi

Populasi adalah keseluruhan dari karakteristik atau unit hasil pengukuran menjadi objek penelitian atau populasi merupakan objek atau subjek yang berada pada suatu wilayah dan memenuhi syarat-syarat tertentu yang berkaitan dengan masalah penelitian (Riduwan, *et al.*2007). Populasi penelitian ini yaitu tanaman sirsak (*Annona muricata L*) yang berada di Kemiri, Kabupaten Jember.

4.2.2 Sampel Penelitian

Sampel adalah bagian dari jumlah dan karakteristik yang dimiliki oleh populasi (Sugiyono. 2008). Sampel penelitian yang digunakan yaitu pada bagian daun tanaman sirsak (*Annona muricata L.*) segar dan masih muda. Sebagian komponen kimia tidak berubah pada daun muda dan setengah tua tetapi berkurang pada daun tua (Malibela et al., 2018).

4.3 Tempat dan Waktu Penelitian

Penelitian dilakukan di laboratorium Biologi Farmasi Universitas dr. Soebandi untuk melaksanakan proses ekstraksi atau pengolahan sampel dari simplisia daun sirsak (*Annona muricata L.*) lalu dilanjutkan menggunakan Laboratorium Kimia Farmasi Universitas dr. Soebandi untuk proses optimasi serta validasi, dan CDAST (*Center for Development of Advanced Science and Technology*) Universitas Jember. Waktu penelitian dimulai pada bulan Februari- Mei 2021.

4.4 Definisi Operasional

Definisi operasional variabel merupakan pedoman bagi penelitian untuk mengukur variabel penelitian sehingga memudahkan pengumpulan data dan menghindarkan perbaikan perbedaan interpretasi serta membatasi ruang lingkup variabel (Notoatmodjo, 2012).

Parameter validasi yang diamati dalam penelitian ini terdiri dari akurasi, presisi, *Limit of Detection* (LOD) dan *Limit of Quantification* (LOQ), spesifisitas, dan linieritas. Kadar alkaloid total adalah jumlah kandungan total senyawa alkaloid yang berasal dari daun sirsak (*Annona muricata L.*) dengan metode analisis kuantitatif menggunakan metode Spektrofotometri UV-Vis dengan *Bromocresol green* (BCG) menggunakan standar kafein.

Tabel 4.1 Definisi Operasional Parameter Validasi Metode Analisis

No	Nama Variabel	Definisi	Alat Ukur	Cara Ukur	Hasil Ukur
1	Akurasi	Ukuran yang menunjukkan derajat kedekatan hasil analisis dengan kadar analit sebenarnya (Harmita, 2004).	Spektrofotometer	Pengujian akurasi dengan cara membagi hasil konsentrasi analit yang didapat dengan konsentrasi analit yang sebenarnya.	Satuan hasil ukur akurasi biasanya dinyatakan dalam %.
2	Presisi	Merupakan ukuran keterulangan metode analisis (Rohman, 2014)	Spektrofotometer	Pengujian presisi dengan cara luas area yang diperoleh dirata-ratakan dan dihitung nilai RSD nya.	Satuan hasil ukur presisi dinyatakan dalam %
3	Spesifisitas	Kemampuannya yang hanya mengukur zat tertentu saja secara cermat dan seksama dengan adanya	Spektrofotometer	Pengujian spesifisitas dilakukan dengan cara membandingkan hasil analisis sampel yang	Satuan hasil ukur spesifisitas dinyatakan dalam Rs.

		komponen lain yang mungkin ada dalam matriks sampel (Harmita, 2004)		mengandung cemaran, hasil urai, dan senyawa sejenis.	
4	<i>Limit of Detection</i> (LOD)	Jumlah terkecil analit dalam sampel yang masih memberikan respon signifikan dibandingkan dengan blanko (Harmita, 2004).	Spektrofotometer	Pengujian batas deteksi dilakukan dengan mengukur konsentrasi yang diinjeksikan pada rasio sinyal terhadap noise yang dibagi dengan luas area yang diperoleh (Rohman, 2007).	Satuan hasil ukur batas deteksi dinyatakan dalam ppm.
5	<i>Limit of Quantification</i> (LOQ)	Kuantitas terkecil analit dalam sampel yang masih dapat memenuhi kriteria akurasi dan presisi (Harmita, 2004).	Spektrofotometer	Pengujian batas kuantitasi dengan cara mengukur konsentrasi yang diinjeksikan pada rasio sinyal terhadap noise yang dibagi dengan luas yang diperoleh.	Satuan hasil ukur batas kuantitasi dinyatakan dalam ppm
6	Linieritas	Kemampuan suatu metode untuk memperoleh hasil uji yang secara langsung proporsional dengan konsentrasi analit pada kisaran yang	Spektrofotometer	Pengujian linieritas diukur dengan cara luas area yang diperoleh diplotkan dengan konsentrasi analit lalu dihitung nilainya (Riyanto,	Satuan hasil ukur linieritas dinyatakan dalam nilai r (Riyanto, 2014)

		diberikan (Rohman, 2014)		2014)	
--	--	-----------------------------	--	-------	--

4.4 Pengolahan dan Analisa Data

4.5.1 Preparasi Sampel

1. Determinasi Tanaman

Determinasi tanaman sirsak dilakukan di Politeknik Kesehatan Negeri Jember pada bulan Desember 2020.

2. Pengambilan Sampel

Pengambilan sampel dilakukan di Kemiri, Kabupaten Jember. Bagian yang digunakan dalam penelitian yaitu daun sirsak, sehingga pengambilan sampel dilakukan dengan cara memetik daun sirsak yang masih segar.

3. Pengolahan Sampel

Pengolahan sampel yang dilakukan yakni pengolahan simplisia daun sirsak. Pengolahan meliputi pengeringan sampel dengan cara diangin-anginkan, tidak terkena paparan sinar matahari langsung. Pengeringan dilakukan untuk menghilangkan kadar air yang masih terkandung pada daun sirsak (*Annona muricata L.*). Daun sirsak segar dibersihkan dan dikeringkan kemudian daun dihaluskan menjadi serbuk (Debnath and Hussain, 2013; Kesetyaningsih, 2012; Torres *et al.*, 2014; Eggadi *et al.*, 2014; Rianes, 2012; Solomon-Wisdom *et al.*, 2014).

4. Ekstraksi Sampel

Sampel daun sirsak yang telah dikeringkan dan dihaluskan diekstraksi dengan metode maserasi menggunakan pelarut etanol 96%. Penggunaan etanol 96% sebagai pelarut adalah karena etanol 96% dapat bertindak sebagai pelarut dan pengawet sehingga zat yang diinginkan dapat terekstraksi serta tahan lama dan tidak mudah ditumbuhi jamur (Wullur, *et al.* 2012). Filtrat yang diperoleh dipekatkan menggunakan rotavapor untuk mendapatkan ekstrak kental dan siap digunakan sebagai bahan uji. Ekstraksi daun sirsak dilakukan dengan cara maserasi menggunakan

pelarut etanol 96%. Sebanyak 500 g serbuk simplisia dimaserasi dengan pelarut 2 L etanol 96%, dimasukkan ke dalam bejana tertutup dan dibiarkan pada suhu kamar selama 5 hari terlindung dari cahaya sambil sering diaduk. Seluruh maserat diuapkan dengan alat *rotary evaporator* pada temperatur kurang lebih 40°C dan diperoleh ekstrak etanol kental kemudian dikeringkan diuapkan dengan *water bath* sehingga terbentuk ekstrak kental (Arta, 2018)

5. Fraksinasi N-Heksan Daun Sirsak

Pembuatan fraksi-fraksi dilakukan secara ekstraksi cair-cair (ECC) menggunakan pelarut *n*-heksana dan etilasetat. Sebanyak 50 g ekstrak etanol ditambahkan 200 ml etanol dan 500 ml air suling dihomogenkan lalu dimasukkan ke dalam corong pisah, kemudian diekstraksi dengan 250 ml *n*-heksana, dikocok, didiamkan sampai terbentuk 2 lapisan yaitu fraksi *n*-heksana dan fraksi air. Fraksi *n*-heksana dikumpulkan dan fraksinasi dilakukan sampai lapisan *n*-heksana jernih. Fraksi *n*-heksana kemudian dikeringkan dengan *water bath* (Sertini, 2016).

4.5.2 Preparasi Larutan Induk dan Standar

a) Pembuatan Larutan *Bromocresol green* (BCG) 10^{-4} M

Larutan *bromocresol green* (BCG) dibuat dengan mencampur 69,8 mg *bromocresol green* dengan 3 mL NaOH 2 N dan 5 mL aquades, kemudian dipanaskan pada suhu 50-60°C selama 15 menit hingga larut sempurna. Kemudian larutan campuran diencerkan dengan 1 liter aquades (Patel dkk., 2015).

b) Pembuatan Dapar Fosfat pH 4,7

Larutan dapar fosfat pH 4,7 disiapkan dengan menyesuaikan pH. Larutan dapar fosfat dibuat dengan menimbang natrium fosfat 7,16 g dan 4,202 g asam salisilat kemudian dimasukkan ke dalam labu ukur 100 mL dan ditambahkan akuades sampai batas volume (Aini, 2016).

c) Preparasi Larutan Standar Kafein

Larutan baku dibuat dengan menimbang 1 mg kafein dilarutkan dengan etanol pro analisis sebanyak 10 mL.

4.5.3 Optimasi Metode Analisis

1. Penentuan *Operating Time*

Penentuan *operating time* dilakukan dengan mengambil larutan standar kafein. Larutan diukur absorbansinya pada panjang gelombang maksimum yang telah diperoleh dengan interval waktu 10 menit hingga diperoleh absorbansi yang stabil yaitu tidak terlihat adanya penurunan absorbansi selama waktu 60 menit atau 1 jam (Lukman, 2015).

2. Optimasi Panjang Gelombang Maksimum

Optimasi panjang gelombang dilakukan pada standar kafein 10 ppm, besarnya absorbansi yang diperoleh dari larutan diukur dengan spektrofotometri UV-Vis pada panjang gelombang 200-400 nm. Catat panjang gelombang yang memiliki absorbansi tertinggi (Aini, 2013).

3. Preparasi Kurva Baku Larutan Standar Kafein

Dibuat konsentrasi 4, 6, 8, 10, 12, dan 14 ppm yang dipipet dari larutan induk standar kafein, kemudian masing-masing dimasukkan ke dalam corong pisah. Lalu, ditambahkan 5 mL dapar fosfat pH 4,7 dan 5 mL larutan *bromocresol green* (BCG) 10^{-4} M. Campuran dikocok dan kompleks yang terbentuk diekstraksi dengan 5 mL kloroform. Lapisan kloroform diambil kemudian dilarutkan dalam labu ukur 10 mL dengan kloroform hingga tepat tanda. Absorbansi diukur pada panjang gelombang maksimum. Blanko yaitu semua reagen tanpa larutan standar, kemudian diambil fase kloroformnya. (Aini, 2016).

4. Penentuan Konsentrasi Optimum

Dibuat larutan standar kafein dalam pelarut dengan range konsentrasi 1-200 ppm pada preparasi standar. Pada preparasi sampel, pipet sampel sejumlah tertentu dilarutkan dalam pelarut dengan range konsentrasi 1-200 ppm. Masing-masing diukur dan dianalisis absorbansinya pada panjang gelombang maksimum dengan spektrofotometer UV-Vis.

4.5.4 Validasi Metode Analisis Spektrofotometri UV-Vis

1. Spesifisitas

Pada pengujian spesifisitas dilakukan dengan menguji beberapa sampel uji yaitu standar dengan menggunakan konsentrasi optimum, fraksi n-heksan, standar dan fraksi n-heksan, standar dengan analit, fraksi n-heksan dengan analit. Larutan dibaca serapannya pada λ maksimal. Analisis dengan Spektrofotometer UV-VIS, ukur spektra larutan standar dan spektra larutan sampel dan tentukan spesifisitasnya (Qoriati, 2018).

2. Linearitas

Penentuan linearitas dilakukan dengan mengukur absorbansi suatu seri konsentrasi larutan baku pada panjang gelombang maksimum. Hasil absorbansi yang diperoleh kemudian dianalisis dengan membuat suatu persamaan garis regresi linear dan ditentukan koefisien korelasinya. Hasil absorbansi yang diperoleh kemudian dianalisis dengan membuat suatu persamaan garis regresi linear dan ditentukan koefisien korelasinya. Kemudian hasil analisis tersebut dapat ditentukan linearitasnya, dengan membandingkan nilai r hitung hasil regresi dengan r tabel pada taraf kepercayaan 95%. Menghitung nilai parameter linieritas dan rentang dari data hasil *scanning* dan dicocokkan dengan persyaratan linieritas (Wisudyaningsih, 2012). Hubungan linier yang ideal dicapai jika nilai $a = 0$ dan $r = +1$ atau -1 merupakan hubungan yang sempurna, tanda $+$ dan $-$ bergantung pada arah garis (Riyanto, 2014).

3. Presisi

Pengujian presisi yang dilakukan adalah kategori keterulangan (*repeatability*). Ketelitian ditentukan sebagai simpangan baku (SD) atau koefisien variasi (KV). Uji ketelitian ini dilakukan sebanyak 5 kali pengulangan. Uji presisi (keseksamaan) ditentukan dengan parameter RSD (*Relative Standard Deviasi*) (Sudewi & Pontoh, 2018). Ketelitian untuk keperluan analisis dikatakan cukup baik jika $KV \leq 2\%$ (Wisudyaningsih, 2012). Adapun tabel Persyaratan % RSD menurut AOAC 2013 yaitu :

Tabel 4.2 Tabel Persyaratan % RSD (AOAC, 2013).

Konsentrasi Analit Dalam Sampel	Batas % RSD
100%	1
10%	1,5
1%	2
0,10%	3
0,01%	4
10 µg/g (ppm)	6
1 µg/g	8
10 µg/Kg (ppb)	15

4. Akurasi

Uji ketepatan atau akurasi dapat dilakukan dengan menggunakan metode penambahan baku (*Standar addition method*). Uji dilakukan untuk memperoleh nilai persen perolehan kembali dalam penambahan volume larutan uji yang meningkat pada fraksi n-heksan ditambah dengan larutan standar kafein hingga mencapai konsentrasi optimum 80-120% dan diekspresikan dengan menghitung persentase *recovery*. Ketiga sampel tersebut dianalisis dengan menggunakan spektrofotometer UV pada panjang gelombang maksimum. Hasil pengukuran dibandingkan dengan kurva baku yang telah dibuat dan digunakan untuk menghitung persentase *recovery*. Pengujian akurasi dilakukan dengan 6 kali pengulangan pada masing-masing konsentrasi. *Recovery* dihitung dengan menggunakan rumus:

$$Recovery = x \ 100\%$$

Hasil persentase *recovery* untuk keperluan analisis dikatakan memenuhi syarat jika menunjukkan persentase antara 80- 110% (Wisudyarningsih, 2012). Adapun tabel Persyaratan % *Recovery* menurut AOAC 2013 yaitu :

Tabel 4.3 Persyaratan % *Recovery* (AOAC, 2013)

Konsentrasi Analit Dalam Sampel	Batas % <i>Recovery</i>
100%	98-101
10%	95-102
1%	92-105
0,10%	90-108
0,01%	85-110
10 µg/g (ppm)	80-115
1 µg/g	75-120
10 µg/Kg (ppb)	70-125

5. *Limit Of Detection (LOD)* dan *Limit Of Quantitation (LOQ)*

Batas deteksi dan batas kuantitasi penetapan kadar alkaloid total dengan menggunakan metode spektrofotometri UV dapat dilakukan dengan membuat delapan konsentrasi di bawah konsentrasi terkecil pada uji linearitas. Nilai pengukuran dapat juga diperoleh dari nilai *b (slope)* pada persamaan garis linear $y = a + bx$, sedangkan simpangan blanko sama dengan simpangan baku residu (Sy/x). Batas deteksi dapat ditentukan dengan persamaan:

$$Q = 3,3 (SD/SI)$$

Batas kuantitasi dapat ditentukan dengan persamaan:

$$Q = 10 (SD/SI)$$

Dengan keterangan :

Q = batas deteksi / kuantitasi suatu sampel;

SI = arah garis linear (kepekaan arah) dari kurva antara respon terhadap konsentrasi = slope (*b* pada persamaan garis $y = a + bx$);

SD = simpangan blanko / simpangan baku residual.

(Wisudyarningsih, 2012).

4.5.5 Penetapan Kadar Alkaloid Total Daun Sirsak

Sebanyak 10 mg fraksi n-heksan daun sirsak dilarutkan dalam 2 mL HCl 2 N dan dimasukkan dalam gelas beker 10 mL lalu ditambah 2 mL NaOH 0,1 N.

Diambil 3 mL larutan fraksi n-heksan dan dimasukkan ke dalam corong pisah. Ditambah dengan 5 mL buffer fosfat pH 4,7 dan 5 mL larutan BCG 10^{-4} M. Selanjutnya diekstraksi dengan 5 mL kloroform dan diambil fase kloroform. Hasil ekstraksi dikumpulkan dalam labu takar 10 mL dan ditambahkan dengan kloroform sampai tanda batas. Pembuatan larutan sampel dilakukan sebanyak 3 kali replikasi (Qoriati, 2018). Blanko yaitu semua reagen tanpa larutan ekstrak, kemudian diambil fase kloroformnya. Absorbansi diukur pada panjang gelombang maksimum. Kadar alkaloid total ditentukan berdasarkan interpolasi absorbansi analit ke dalam persamaan regresi linear standar kafein sehingga didapatkan konsentrasi (x) dalam satuan $\mu\text{g/mL}$ (Aini, 2016).

BAB 5. HASIL PENELITIAN

5.1 Hasil Determinasi Tanaman

Determinasi tanaman dilakukan untuk membandingkan suatu tumbuhan dengan satu tumbuhan lain yang sudah dikenal sebelumnya (dicocokkan atau dipersamakan), sehingga dapat menghindari kesalahan dalam pengumpulan bahan yang akan diteliti. Identifikasi tumbuhan dilakukan di UPT. Pengembangan Pertanian Terpadu Politeknik Negeri Jember. Hasil dari determinasi menunjukkan apabila daun sirsak yang digunakan dalam penelitian dapat dipastikan bahwa tanaman yang diteliti adalah spesies *Annona muricata L.* yang tergolong dalam_suku *Annonaceae*. Hasil identifikasi daun sirsak dapat dilihat pada lampiran 1 halaman 72.

5.2 Pengambilan dan Pengolahan Sampel

Pengambilan sampel dilakukan di Kemiri, Kabupaten Jember. Bagian yang digunakan dalam penelitian yaitu daun sirsak sebanyak 500 gram. Pengolahan sampel yang dilakukan yakni pengolahan simplisia daun sirsak. Pengeringan dilakukan untuk menghilangkan kadar air yang masih terkandung pada daun sirsak (*Annona muricata L.*). Pengeringan dilakukan selama 4 hari dengan cara diangin-anginkan menggunakan alas, setelah daun kering dilanjutkan dengan mengubah simplisia kering menjadi simplisia halus berupa serbuk, simplisia dihaluskan menjadi serbuk halus.

5.3 Ekstraksi

Metode penyarian yang digunakan adalah maserasi dengan menggunakan pelarut etanol 96%. Proses ekstraksi dilakukan di laboratorium Biologi Farmasi Universitas dr. Soebandi selama hari. Proses dikerjakan dengan melakukan perendaman serbuk simplisia sebanyak 500 gram dengan pelarut etanol sebanak 2 L. Setelah dilakukan proses ekstraksi selama 5 hari, lalu dilakukan proses penguapan pelarut menggunakan alat *rotary evaporator* di laboratorium CDAST (*Center for Development of Advanced Science and Technology*) Universitas Jember selama 2 hari. Ekstrak etanol daun sirsak yang diperoleh berupa ekstrak kental sebanyak 78,15 gram dari 500 gram daun sirsak (rendemen 15,63 %). Perhitungan hasil % randemen dapat dilihat pada lampiran L.5.1 halaman 81.

5.4 Fraksinasi

Metode fraksinasi yang digunakan adalah partisi cair-cair. Fraksinasi dilakukan dengan menggunakan pelarut yang bersifat non polar yaitu *n*-heksan. Fraksinasi dilakukan dengan menimbang sebanyak 50 g ekstrak kental daun sirsak lalu ditambahkan 200 ml etanol dan 500 ml air suling dihomogenkan, selanjutnya dimasukkan ke dalam corong pisah. Kemudian diekstraksi dengan 250 ml *n*-heksana, dikocok, didiamkan sampai terbentuk 2 lapisan yaitu fraksi *n*-heksana dan fraksi air. Hasil fraksi *n*-heksan daun sirsak diperoleh sebanyak 7,14 gram dari 20 gram ekstrak etanol daun sirsak (rendemen 35,7 %). Perhitungan hasil % randemen dapat dilihat pada lampiran L.5.1 halaman 81.

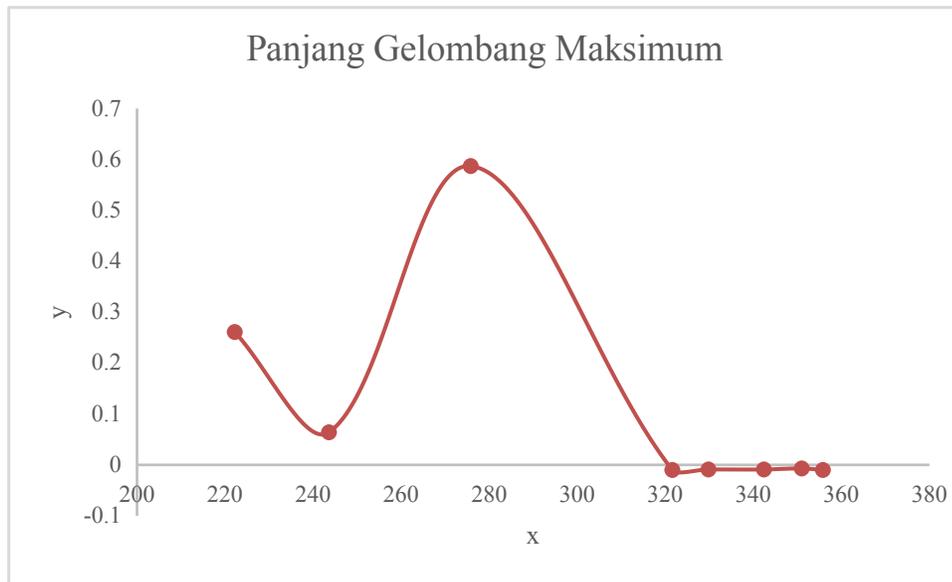
5.5 Optimasi Metode Analisis

5.5.1 Penentuan Panjang Gelombang Maksimum

Pada penentuan panjang gelombang maksimum baku kafein diukur pada panjang gelombang antara 200 – 400 nm. Optimasi panjang gelombang dilakukan pada standar kafein 10 ppm. Dari hasil pengukuran panjang gelombang memberikan serapan tertinggi pada panjang gelombang 275,8 nm dengan nilai absorbansi sebesar 0,587 ppm.

Tabel 5.1 Hasil Panjang Gelombang Maksimum

No	Panjang Gelombang (nm)	Absorbansi (ppm)
1	222,2	0,261
2	243,6	0,064
3	275,8	0,587
4	321,6	-0,01
5	329,8	-0,009
6	342,4	-0,009
7	351	-0,007
8	355,8	-0,01



Gambar 5. 1 Kurva Panjang Gelombang Maksimum

5.5.2 Penentuan Konsentrasi Optimum

Seri konsentrasi larutan standar kafein dan sampel masing-masing dibuat dengan range 6 konsentrasi 1-200 ppm. Masing-masing diukur absorbansinya pada panjang gelombang maksimum yaitu 275,8 dengan spektrofotometer UV-Vis. Hasil penentuan konsentrasi optimum pada standar kafein yaitu pada konsentrasi 10 dengan absorbansi sebesar 0,575 ppm.

Tabel 5.2 Hasil Uji Konsentrasi Standar Kafein

No	Konsentrasi	Absorbansi (ppm)
1	1	0,107
2	2	0,147
3	10	0,575
4	20	1,272
5	100	3,715
6	200	4

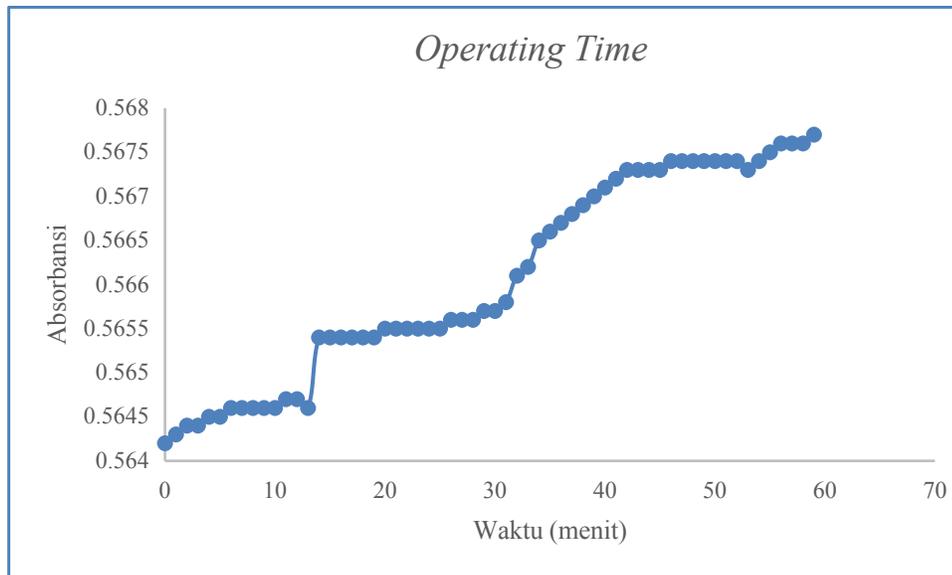
Setelah didapatkan hasil konsentrasi optimum pada standar lalu dilanjutkan dengan melihat hasil penentuan konsentrasi optimum pada sampel yaitu pada konsentrasi 100 dengan absorbansi sebesar 0,607 ppm.

Tabel 5.3 Hasil Uji Konsentrasi Sampel

No	Sampel	Konsentrasi	Absorbansi (ppm)
1	1	-26,5	-0,09
2	2	-21,125	0,013
3	10	-14,566	0,138
4	20	-7,748	0,269
5	100	9,914	0,607
6	200	29,077	0,974

5.5.3 Penentuan *Operating Time*

Penentuan *operating time* dilakukan dengan mengambil larutan standar kafein. Tahap pengukuran waktu kestabilan standar kafein dilakukan dengan variasi waktu tiap 10 menit dan diukur absorbansi masing-masing variasi waktu kestabilan pada panjang gelombang maksimum dengan menggunakan spektrofotometer UV-Vis. Penentuan waktu kestabilan diukur pada menit ke 0, 10, 20, 30, 40, 50, 60 pada panjang gelombang maksimum standar kafein yaitu 275,8 nm. Hasil yang diperoleh berupa kurva hubungan antara waktu pengukuran dan absorbansi.



Gambar 5.2 Kurva Operating Time

Gambar 5.2 menunjukkan bahwa waktu kestabilan yaitu pada rentang waktu 15 sampai 30 menit dengan nilai rata-rata absorbansi 0,565 ppm.

5.5.4 Kurva Baku Larutan Standar Kafein

Pengukuran dilakukan menggunakan spektrofotometer UV-Vis pada panjang gelombang 275,8 nm pada konsentrasi 4, 6, 8, 10, 12, dan 14 ppm Hasil yang diperoleh berupa kurva hubungan antara konsentrasi larutan standar kafein dengan absorbansi. Dari data yang diperoleh persamaan regresi yaitu $y = 0,0585x - 0,0298$ dengan nilai $r^2 = 0,9998$. Adapun tabel dari hasil perhitungan kurva baku sebagai berikut.

Tabel 5.4 Hasil Kurva Baku Larutan Standar Kafein

Sample	Konsentrasi	Absorbansi (ppm)
1	4	0,208
2	6	0,318
3	8	0,436
4	10	0,554
5	12	0,677
6	14	0,789

5.6 Validasi Metode Analisis

5.6.1 Spesifisitas

Pada tahapan spesifisitas hanya dilakukan dengan *scanning* panjang gelombang dimana hanya spesifik pada satu panjang gelombang maksimum yaitu 275,8 nm. Pada proses ini diujikan 6 sampel antara lain yaitu blanko, standar, fraksi n-heksan, standar dan fraksi n-heksan, standar dan analit lain, fraksi n-heksan dan analit lain. Hasil dari nilai panjang gelombang yang dihasilkan oleh beberapa sampel uji yang diantaranya meliputi standar menghasilkan nilai panjang gelombang 276 nm, fraksi n-heksan 275 nm, standar dan fraksi n-heksan 276 nm, standar dan analit lain 275 nm, fraksi n-heksan dan analit lain menghasilkan panjang gelombang 252 nm. Gambar spektrum yang dihasilkan dapat dilihat pada lampiran L.4.3 halaman 80.

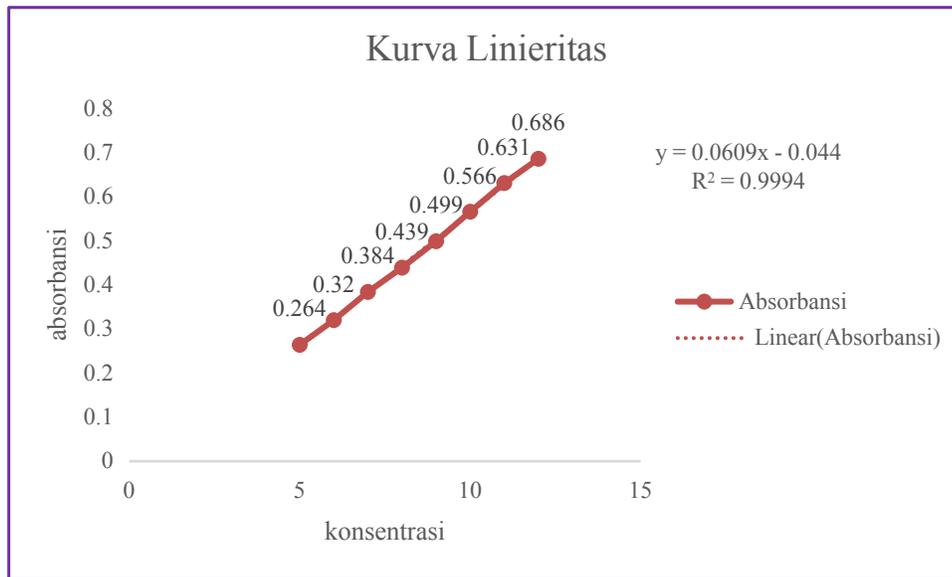
5.6.2 Linieritas

Persamaan regresi linear dilakukan dengan membuat 8 titik konsentrasi dengan rentang konsentrasi antara 50-120%, diukur pada panjang gelombang maksimum yaitu 275,8 nm. Adapun 8 titik konsentrasi yang digunakan antara lain konsentrasi 5; 6; 7; 8; 9; 10; 11; dan 12 ppm seperti pada *tabel 5.5*.

Tabel 5.5 Tabel Linieritas

No	Konsentrasi	Absorbansi (ppm)
1	5	0,264
2	6	0,32
3	7	0,384
4	8	0,439
5	9	0,499
6	10	0,566
7	11	0,631
8	12	0,686
$y = 0,0609x + 0,1996$		
$r^2 = 0,99948$		

Berdasarkan perhitungan data kurva linieritas pada *gambar 5.3* diperoleh $y = 0,0609x + 0,1996$ dengan nilai $r = 0,9994$.



Gambar 5.3 Kurva Linieritas

5.6.3 Presisi

Pengujian presisi dilakukan sebanyak 6 kali replikasi. Hasil uji presisi menunjukkan nilai % RSD pada konsentrasi 5 ppm; 7 ppm; 9 ppm ; 10 ppm; dan 12 ppm secara berurutan yaitu 0,297 ; 0,416 ; 0,141 ; 0,352 ; 0,325 %. Sehingga nilai rata-rata % RSD pada uji presisi yaitu 0,306 %. Perhitungan presisi dapat dilihat pada lampiran L.5.2 halaman 81.

5.6.4 Akurasi

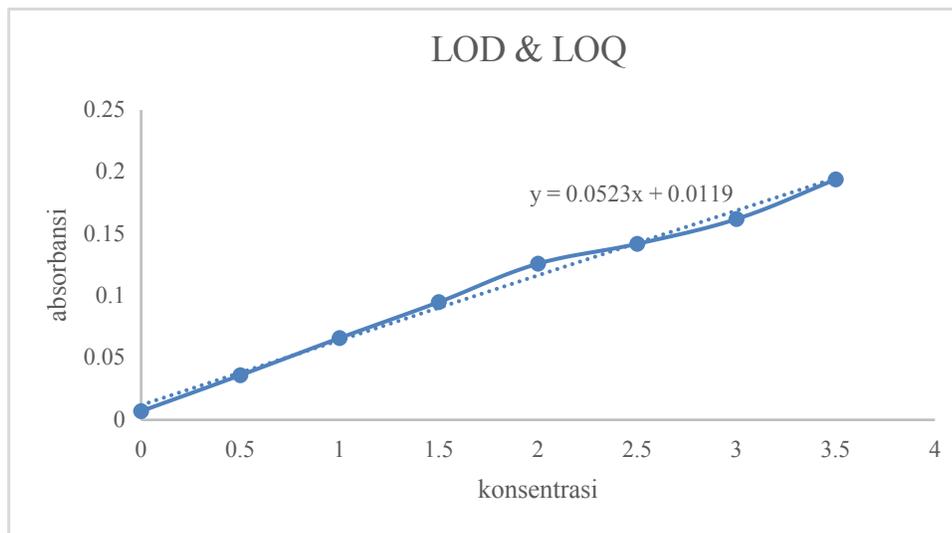
Hasil akurasi dinyatakan dalam persen perolehan kembali (*recovery*) dengan metode adisi. Nilai *recovery* dihitung dengan cara membandingkan nilai konsentrasi terukur dengan nilai konsentrasi yang sebenarnya kemudian dikalikan 100%. Akurasi dari kurva standar kafein dalam % *recovery* untuk konsentrasi 80%, 100%, dan 120%. Persamaan regresi linier yang dihasilkan yakni $y = 0,0585x - 0,0298$. Akurasi dilakukan dengan mencampurkan standar dan sampel menggunakan replikasi atau pengulangan sebanyak 6 kali replikasi. Hasil dari pengujian akurasi secara berurutan yaitu 82,63%, 87,86%, dan 90,84%. Perhitungan hasil analisis dapat dilihat pada lampiran L.5.3 halaman 81.

5.6.5 Limit Of Detection dan Limit Of Quantitation

Hasil LOD yang didapat dari 8 titik di bawah konsentrasi terkecil pada uji linearitas yaitu pada konsentrasi 0; 0,5; 1; 1,5; 2; 2,5; 3; 3,5 ppm. Dari percobaan dihasilkan persamaan regresi $y = 0,052x + 0,0119$. Berdasarkan data tersebut didapatkan nilai SD x/y yaitu 0,00001. Selanjutnya dapat digunakan rumus perhitungan yang menghasilkan nilai LOD yaitu 0,0009 ppm dan nilai hasil LOQ yang diperoleh yaitu sebesar 0,0032 ppm. Perhitungan perolehan nilai LOD dan LOQ dapat dilihat pada lampiran L.5.6 perhitungan hasil penelitian pada halaman 86.

Tabel 5.6 Tabel Hasil LOD dan LOQ

No	Konsentrasi	Absorbansi (ppm)
1	0	0,007
2	0,5	0,036
3	1	0,066
4	1,5	0,095
5	2	0,126
6	2,5	0,142
7	3	0,162
8	3,5	0,194



Gambar 5.4 Hasil Kurva LOD dan LOQ

5.7 Penentuan Kadar Alkaloid Total Daun Sirsak

Penentuan kadar alkaloid dilakukan dengan cara mengukur larutan sampel uji yang diduga mengandung alkaloid pada panjang gelombang maksimum yaitu 275,8

nm dengan menimbang sampel secara berulang sebanyak 3 kali replikasi perlakuan. Kadar alkaloid total ditentukan berdasarkan interpolasi absorbansi analit ke dalam persamaan regresi linear standar kafein sehingga didapatkan konsentrasi (x) dalam satuan $\mu\text{g/mL}$ atau ppm (*parts per million*). Hasil dari konsentrasi yang didapat secara berurutan yakni 13,62 ppm; 12,96 ppm; dan 13,46 ppm. Penetapan kadar alkaloid dapat dihitung menggunakan persamaan regresi $y = 0,0583x - 0,0281$ dengan nilai $r^2 = 0,9994$. Berdasarkan hasil pengujian yang dilakukan didapatkan nilai absorbansi replikasi I, II, dan III secara berurutan yaitu 0,766; 0,728; dan 0,757 ppm. Hasil perhitungan kadar pada setiap replikasi secara berturut-turut 1,356%; 1,294%; dan 1,341%, sehingga menghasilkan nilai kadar rata-rata alkaloid total yaitu sebesar 1,33 % pada tabel 5.7. Data hasil perhitungan dapat dilihat pada lampiran L.5.7 pada halaman 107.

Tabel 5.7 Tabel Penetapan Kadar Alkaloid

No	Sample	Absorbansi	Konsentrasi Alkaloid awal (ppm)	Kadar Alkaloid (%b/b)	Rata-rata Kadar Alkaloid Total (%b/b)	Nilai % RSD Kadar Alkaloid
1	Replikasi I	0,766	13,62	1,356	1,33 %	0,024 %
2	Replikasi II	0,728	12,96	1,294		
3	Replikasi III	0,757	13,46	1,341		

BAB 6. PEMBAHASAN PENELITIAN

Pada penelitian ini dilakukan beberapa tahapan penelitian yang diantaranya yaitu dimulai dari preparasi sampel, preparasi larutan induk dan standar, optimasi metode analisis, validasi metode analisis, dan penetapan kadar alkaloid total pada daun sirsak (*Annona muricata L.*). Penelitian dilakukan di laboratorium Biologi Farmasi Universitas dr. Soebandi untuk melaksanakan proses ekstraksi atau pengolahan sampel dari simplisia daun sirsak (*Annona muricata L.*) dan dilanjutkan dengan proses penguapan menggunakan *rotary evaporator* di laboratorium CDAST (*Center for Development of Advanced Science and Technology*) Universitas Jember, dan laboratorium Kimia Farmasi Universitas dr. Soebandi untuk proses optimasi, validasi dan penetapan kadar alkaloid total daun sirsak (*Annona muricata L.*) menggunakan spektrofotometri UV-Vis. Instrumen yang digunakan yaitu spektrofotometri UV-Vis Shimadzu UV-1900i dengan serial nomor A125357.

.Preparasi sampel merupakan tahapan pembuatan serbuk sampel yang memiliki tujuan untuk memperbesar luas permukaan sampel, sehingga proses ekstraksi akan berjalan lebih maksimal. Sampel yang digunakan pada penelitian ini adalah tanaman daun sirsak (*Annona muricata L.*) yang didapat dari daerah desa Kemiri, kabupaten Jember. Daun sirsak yang digunakan adalah daun yang tidak terlalu tua dan juga tidak terlalu muda. Sebanyak 500 gram tanaman daun sirsak dicuci dengan air mengalir untuk menghilangkan pengotor yang dapat mengganggu proses ekstraksi. Daun sirsak segar dibersihkan dari kotoran-kotoran yang menempel (sortasi basah), dicuci dengan air mengalir sampai bersih, kemudian ditiriskan untuk membebaskan daun dari sisa air cucian. Lalu, proses selanjutnya yaitu pengeringan daun sirsak untuk menghilangkan kadar air pada sampel serta untuk menghindari pertumbuhan mikroba. Pengeringan dilakukan selama 4 hari. Sampel yang kering berwarna coklat kehijauan dihaluskan dengan mesin blender agar diperoleh serbuk sampel yang halus dan memiliki ukuran yang kecil. Sehingga simplisia yang dihasilkan berbentuk serbuk. Menurut Voight (1994), jika ukuran sampel kecil maka semakin besar luas permukaannya, sehingga terjadinya kontak dengan pelarut dalam proses ekstraksi akan semakin besar dan proses ekstraksi akan semakin cepat.

6.1 Ekstraksi

Metode penyarian yang digunakan adalah maserasi dengan menggunakan etanol 96%. Maserasi merupakan metode ekstraksi sederhana karena pengerjaannya yang relatif mudah dan sering digunakan dalam proses penyarian untuk senyawa yang tidak tahan terhadap panas (Tiwari *et al.*, 2011). Ekstraksi senyawa alkaloid dilakukan dengan menggunakan metode maserasi, metode ini dipilih karena pengerjaan dan peralatan yang digunakan sederhana dan mudah diperoleh maseratnya, serta proses perendaman yang cukup lama diharapkan dapat menarik lebih banyak zat aktif yang terkandung di dalam simplisia (Wullur, 2012). Etanol merupakan pelarut yang netral terhadap senyawa yang terkandung dalam simplisia dan mampu mencegah tumbuhnya jamur dan bakteri (Ansel, 1989).

Ekstraksi dengan maserasi dilakukan dengan cara memasukkan serbuk daun sirsak ke dalam botol kaca, kemudian ditambahkan dengan pelarut etanol 96% sebanyak 2 L. Selanjutnya, botol ditutup dan dibiarkan selama 5 hari, terlindung dari cahaya matahari sambil diaduk-aduk satu kali dalam sehari, lalu disaring. Pemisahan dengan pelarut, dilakukan dengan cara diuapkan menggunakan vacuum rotary evaporator. Setelah didapatkan ekstrak kental dilakukan perhitungan persen rendemen. Penentuan rendemen bertujuan untuk mengetahui perbandingan hasil ekstrak terhadap simplisia yang dihasilkan. Berdasarkan nilai rendemen dapat diketahui jumlah ekstrak dari simplisia pada berat tertentu.

Ekstrak kental daun sirsak yang diperoleh sebanyak 78,15 gram dari 500 gram daun sirsak (rendemen 15,63%). Pada umumnya ekstraksi akan menghasilkan rendemen yang lebih banyak ketika permukaan simplisia kontak dengan pelarut semakin luas (Harborne, 1987). Selama ekstraksi pelarut akan berdifusi ke dalam serbuk simplisia. Hal ini disebabkan adanya perbedaan konsentrasi antara larutan di dalam sel dengan cairan ekstraksi yang berada di luar sel. Pelarut mengalir masuk ke dalam ruang sel, sehingga menyebabkan protoplasma membengkak dan kandungan bahan aktif di dalam sel akan terlarut sesuai sifat fisika kimianya (Ncube *et al.*, 2008).

6.2 Fraksinasi

Metode fraksinasi yang digunakan adalah partisi cair-cair. Teknik pemisahan partisi didasarkan pada perbedaan tingkat kepolaran pelarut yang digunakan. Teknik pemisahannya melibatkan dua pelarut yang tidak saling campur dalam corong pisah, setelah itu akan memisah sesuai dengan koefisien partisinya (Sarker *et al.*, 2005). Pelarut yang digunakan untuk fraksinasi adalah n-heksan. Untuk menarik senyawa non polar dan lemak digunakan n-heksan. Dengan proses fraksinasi ini dapat diduga sifat kepolaran dari senyawa yang akan dipisahkan. Senyawa-senyawa yang bersifat non polar akan larut dalam pelarut yang non polar, sedangkan senyawa-senyawa yang bersifat polar akan larut dalam pelarut yang polar (A. K. Sari, 2015). Senyawa alkaloid umumnya bersifat non polar dan pelarut n-heksana merupakan jenis pelarut nonpolar sehingga n-heksana dapat melarutkan senyawa-senyawa bersifat nonpolar seperti alkaloid. Hasil fraksi n-heksan daun sirsak diperoleh sebanyak 7,14 gram dari 20 gram ekstrak etanol daun sirsak (rendemen 35,7 %).

6.3 Optimasi Metode Analisis

6.3.1 Penentuan Panjang Gelombang Maksimum

Penentuan panjang gelombang maksimum mempunyai kepekaan yang optimum, bentuk kurva absorbansinya datar serta pada kondisi tersebut hukum *Lambert-Beer* akan terpenuhi dan jika dilakukan pengulangan pengukuran ulang maka kesalahan yang disebabkan oleh pemasangan ulang panjang gelombang akan sangat kecil. Penentuan panjang gelombang maksimum dilakukan untuk mengetahui ketika absorpsi mencapai maksimum sehingga meningkatkan proses absorpsi larutan terhadap sinar.

Pemilihan panjang gelombang maksimum sangat menentukan dalam percobaan karena apabila terjadi penyimpangan yang kecil selama percobaan akan mengakibatkan kesalahan yang kecil dalam pengukuran. Jika pemilihan panjang gelombang memiliki spektrum perubahan besar pada nilai absorbansi saat panjang gelombang sempit, maka apabila terjadi penyimpangan kecil pada cahaya yang masuk akan mengakibatkan kesalahan besar dalam pengukuran. Pada penentuan panjang gelombang maksimum baku kafein diukur pada panjang gelombang antara 200 – 400 nm. Dari hasil pengukuran panjang gelombang memberikan serapan tertinggi pada panjang gelombang 275,8 nm dengan nilai absorbansi

0,587. Hal tersebut sudah sesuai dengan yang dilaporkan Egan (1981), dalam Fitri (2008), panjang gelombang absorbansi maksimum kafein berada pada rentang panjang gelombang 272-276 nm.

6.3.2 Penentuan Konsentrasi Optimum

Seri konsentrasi larutan standar kafein dan sampel masing-masing dibuat dengan range konsentrasi 1-200 ppm. Masing-masing diukur absorbansinya pada panjang gelombang maksimum yaitu 275,8 dengan spektrofotometer UV-Vis. Hasil penentuan konsentrasi optimum pada standar kafein yaitu pada konsentrasi 10 ppm dengan persen konsentrasi sebesar 99,9%.

6.3.3 Penentuan *Operating Time*

Penentuan *operating time* dilakukan dengan mengambil larutan standar kafein. Penentuan waktu kestabilan (*operating time*) bertujuan untuk mengetahui waktu pengukuran yang optimum dan stabil pada pembentukan kompleks pasangan ion alkaloid-BCG. Penentuan waktu kestabilan ini diperoleh dari hubungan antara waktu pengukuran dengan absorbansi larutan standar kafein. Tahap pengukuran waktu kestabilan standar kafein dilakukan dengan variasi waktu tiap 10 menit dan diukur absorbansi masing-masing variasi waktu kestabilan pada panjang gelombang maksimum dengan menggunakan spektrofotometer UV-Vis. Ketika terjadi reaksi, absorbansi senyawa berwarna akan meningkat sampai waktu tertentu hingga didapat senyawa yang stabil. Penentuan waktu kestabilan diukur pada menit ke 0, 10, 20, 30, 40, 50, 60 pada panjang gelombang maksimum standar kafein yaitu 275,8 nm. Hasil yang diperoleh berupa kurva hubungan antara waktu pengukuran dalam satuan menit dan absorbansi.

Gambar 5.2 menunjukkan hasil pengujian *operating time* terhadap kestabilan larutan standar kafein kompleks pasangan ion alkaloid-BCG yaitu pada rentang waktu 15 sampai 30 menit dengan nilai absorbansi rata-rata 0,5655 ppm. Pada waktu tersebut rentang absorbansinya relatif konstan atau hanya memiliki perubahan absorbansi yang sangat kecil dengan rata-rata yakni 0,0001, sehingga jika dilakukan pada waktu kestabilan tersebut akan mendapatkan hasil yang lebih akurat. Sedangkan pada menit ke 31 sampai 60 menit terdapat adanya ketidakstabilan dari larutan standar kafein dikarenakan sifat pelarut yang digunakan dalam pengujian yaitu etanol 96% dan kloroform yang

mudah menguap sehingga menyebabkan larutan tidak dapat bertahan lama atau tidak stabil dalam pemakaiannya.

6.3.4 Kurva Baku Larutan Standar Kafein

Pembuatan kurva baku dilakukan untuk membuat kurva hubungan antara absorbansi dengan konsentrasi standar kafein. Menurut hukum *Lambert-Beer*, intensitas yang diteruskan oleh larutan zat penyerap berbanding lurus dengan konsentrasi larutan. Variasi konsentrasi standar kafein yang digunakan yaitu 4, 6, 8, 10, 12, dan 14 ppm. Pengukuran dilakukan menggunakan spektrofotometer UV-Vis pada panjang gelombang 275,8 nm. Hasil yang diperoleh berupa kurva hubungan antara konsentrasi larutan standar kafein dengan absorbansi seperti pada Gambar 5.3. Berdasarkan hasil yang diperoleh menunjukkan bahwa semakin besar konsentrasi larutan standar kafein maka akan semakin besar pula nilai absorbansinya. Hal ini sesuai dengan hukum *Lambert-Beer* yang telah dikemukakan sebelumnya. Dari kurva baku tersebut diperoleh persamaan regresi yaitu $y = 0,0585 x - 0,0298$ dengan nilai $r^2 = 0,9998$. Dimana y adalah absorbansi dan x merupakan konsentrasi standar kafein. Persamaan regresi dapat digunakan untuk menentukan konsentrasi standar kafein dan selanjutnya dapat digunakan untuk menghitung kadar alkaloid total yang ada pada tanaman daun sirsak. Dari kurva yang sudah didapat, perlu dilakukan validasi metode untuk mengetahui performa analitik dari spektrofotometer UV-Vis. Validasi metode analisis meliputi uji spesifisitas, linieritas, presisi, akurasi, dan penentuan batas deteksi (*Limit Of Detection*), dan batas kuantitasi (*Limit Of Quantitation*).

6.4 Validasi Metode Analisis

6.4.1 Spesifisitas

Pada tahapan spesifisitas hanya dilakukan dengan scanning panjang gelombang dimana hanya spesifik pada satu panjang gelombang maksimum yaitu 275,8 nm. Spesifitas atau selektivitas merupakan kemampuan suatu alat yang hanya mengukur zat tertentu saja secara cermat dan seksama dengan komponen lain yang mungkin ada dalam matriks sampel yang dapat mempengaruhi hasil pengujian. Spesifitas dapat dinyatakan sebagai derajat penyimpangan. Uji spesifitas dilakukan dengan membandingkan hasil analisis larutan standar kafein dengan matriks selain kafein yang terkandung di dalam sampel (interferens) yaitu paracetamol. Kafein dan

paracetamol memiliki sifat kelarutan yang mirip. Kafein dapat larut dalam air 1 g/ 46 mL. Paracetamol dapat larut dalam air 1 g/ 70 mL. Kafein memiliki nilai serapan maksimum kafein berada pada rentang panjang gelombang 272-276 nm. Analit yang digunakan pada pengujian spesifitas yakni standar paracetamol. Secara teoritis serapan maksimum untuk parasetamol adalah 244 nm (Tulandi, dkk, 2015). Dengan adanya nilai serapan maksimum yang hampir berdekatan tersebut menyebabkan spektrum serapan kedua senyawa menjadi hampir tumpang tindih. Metode spektrofotometri UV dapat digunakan sebagai alat analisis untuk kedua senyawa tersebut dan akan lebih baik hasilnya apabila digunakan metode derivatif untuk aplikasi multikomponennya.

Penelitian dilakukan dengan menggunakan 6 sampel uji yang diantaranya meliputi blanko, standar menghasilkan nilai panjang gelombang 276 nm, fraksi n-heksan 275 nm, standar dan fraksi n-heksan 276 nm, standar dan analit lain 275 nm, fraksi n-heksan dan analit lain menghasilkan panjang gelombang 252 nm. Pada uji fraksi n-heksan dan analit lain menghasilkan nilai panjang gelombang yang tidak sesuai dengan ketentuan panjang gelombang yang dikatakan spesifik yakni 275,8. Hal tersebut dapat terjadi karena sampel yang digunakan yaitu standar paracetamol memiliki serapan yang lebih dominan daripada serapan yang dihasilkan dari fraksi n-heksan, sehingga nilai serapan panjang gelombang lebih mendekati nilai serapan standar paracetamol yaitu 252 nm. Berdasarkan nilai dari beberapa sampel uji rata-rata nilai panjang gelombang dari sampel yang memenuhi yaitu 275,5 nm. Nilai tersebut dapat dikatakan spesifik karena nilai serapan mendekati nilai panjang gelombang maksimum yakni 275,8 nm.

Hasil spesifitas dapat diperoleh dengan melakukan optimasi sehingga diperoleh senyawa kafein yang terpisah secara sempurna dengan interferens. Hasil yang diperoleh dari spektra standar tidak dihasilkan peak sebelum dan sesudah peak analit artinya pada standar kafein tidak terdapat pengotor yang dapat mengganggu standar kafein yang digunakan. Data yang dihasilkan dapat disimpulkan bahwa sampel mengandung kafein dan pada sampel tidak terkandung matriks pengganggu yang dapat mempengaruhi hasil pengujian. Artinya metode yang digunakan juga baik karena mampu mendeteksi, serta mengukur secara tepat dan spesifik analit dalam

sampel meskipun sudah tercampur matriks lain yang terkandung dalam sampel (Listyaningrum, 2020).

6.4.2 Linieritas

Uji linieritas merupakan metode yang digunakan untuk membuktikan kelinieran antara absorbansi dengan konsentrasi analit yang ditunjukkan dengan nilai korelasi (R^2). Uji linearitas dilakukan untuk melihat antara variabel satu dengan variabel lainnya mempunyai hubungan yang linear atau tidak. Persamaan regresi linear larutan kafein diperoleh $y = 0,0609x + 0,1996$ dengan nilai $r = 0,9994$. Hasil uji linearitas dapat diterima karena termasuk dalam kriteria koefisien korelasi yang baik dimana $r = 0,995 \leq r \leq 1$. Hal ini berarti bahwa $\pm 99\%$ perubahan absorbansi yang terjadi dipengaruhi oleh perubahan konsentrasi standar kafein, sedangkan 1% dipengaruhi oleh faktor lain. Berdasarkan penelitian yang dilakukan oleh Harmita, 2004 nilai koefisien regresi r^2 yang hampir mendekati 1 telah memenuhi syarat linieritas yang ditetapkan yaitu $0,98$, maka hubungan antara absorbansi dengan konsentrasi menjadi sangat linear dan sesuai dengan hukum *Lambert-Beer*. Hal ini menunjukkan bahwa instrumen spektrofotometer UV-Vis yang digunakan dalam kondisi baik. Berdasarkan hasil nilai r dalam penelitian dapat dikatakan bahwa pengukuran linieritas yang telah dilakukan telah sesuai dengan syarat validasi linieritas yang ditetapkan yaitu $0,9994$ (Riyanto, 2014).

6.4.3 Presisi

Presisi menunjukkan seberapa dekatnya suatu hasil pemeriksaan yang dilakukan berulang dengan sampel yang sama (ketelitian) (Riyanto, 2014). Uji presisi bertujuan untuk melihat kedekatan serangkaian pengukuran yang dilakukan berulang pada sampel. Presisi dinyatakan dalam persen simpangan baku relatif (% RSD). Pengujian presisi dilakukan sebanyak 6 kali replikasi. Hasil uji presisi menunjukkan nilai % RSD pada konsentrasi 5 ppm; 7 ppm; 9 ppm ; 10 ppm; dan 12 ppm secara berurutan yaitu 0,297 ; 0,416 ; 0,141 ; 0,352 ; 0,325 %. Sehingga nilai rata-rata % RSD pada uji presisi yaitu 0,306 %. Hasil tersebut menunjukkan bahwa uji presisi dikatakan baik karena nilai % RSD $< 2\%$. Hasil yang diperoleh menunjukkan bahwa metode uji yang digunakan pada validasi metode penentuan kadar alkaloid total

dengan menggunakan spektrofotometri UV-Vis memenuhi syarat nilai % RSD yang diterima. Semakin kecil nilai standar deviasi yang diperoleh, maka makin kecil pula nilai koefisien variasinya (Riyadi, 2009). Nilai presisi dapat memberikan informasi bahwa metode ini dapat digunakan sebagai metode tetap yang digunakan pada laboratorium. Ketelitian untuk keperluan analisis dikatakan cukup baik jika $KV \leq 2\%$. Pada penelitian dilakukan replikasi atau pengulangan sebanyak 6 kali replikasi sehingga data yang dihasilkan dapat dianggap valid dan kesesuaian data yang didapat sudah memenuhi prasyarat parameter pengujian presisi. Berdasarkan hasil nilai KV atau % RSD dalam penelitian dapat dikatakan bahwa pengukuran presisi yang telah dilakukan telah sesuai dengan syarat validasi presisi yang ditetapkan yaitu 0,306 % (AOAC, 2013).

6.4.4 Akurasi

Uji akurasi merupakan metode yang digunakan untuk mengetahui keakuratan suatu metode yang digunakan. Akurasi dinyatakan dalam persen perolehan kembali (*recovery*). Nilai *recovery* dihitung dengan cara membandingkan nilai konsentrasi terukur dengan nilai konsentrasi yang sebenarnya kemudian dikalikan 100%. Akurasi dari kurva standar kafein dalam % *recovery* untuk konsentrasi 80-120% secara berurutan yaitu 82,63%, 87,86%, dan 90,84%. Data ini sudah memenuhi syarat nilai akurasi yang ditetapkan yaitu pada rentang 80-115% (AOAC, 2013). Nilai %*recovery* yang diperoleh masuk dalam range yang dapat diterima, sehingga dapat dikatakan metode ini memiliki akurasi yang baik. Jika data diluar rentang tersebut, maka disebabkan adanya gangguan dari pengotor yang ada dalam larutan standar dan dapat mempengaruhi pembacaan absorbansi pada spektrofotometer UV-Vis. Persyaratan % *recovery* untuk bahan alam berdasarkan konsentrasi analit yang berada dalam sampel sesuai *Association of Official Analytical Chemists* (AOAC) (AOAC, 2013). Persyaratan dapat dilihat pada Tabel 4.3 Persyaratan % *recovery* halaman 43. Hasil persentase *recovery* untuk keperluan analisis dikatakan memenuhi syarat jika menunjukkan persentase antara 80- 115%. Pada penelitian dilakukan replikasi atau pengulangan sebanyak 6 kali pada masing-masing konsentrasi, sehingga data yang dihasilkan dapat dianggap valid dan kesesuaian data yang didapat sudah memenuhi prasyarat

parameter pengujian akurasi. Berdasarkan perbandingan hasil nilai % *recovery* dalam penelitian dengan pustaka dapat dikatakan bahwa pengukuran akurasi yang telah dilakukan telah sesuai dengan syarat validasi akurasi yang ditetapkan yaitu 82,63%, 87,86%, dan 90,84% (AOAC, 2013).

6.4.5 *Limit Of Detection* dan *Limit Of Quantitation*

Uji LOD menunjukkan konsentrasi terendah yang masih dapat terdeteksi, sedangkan uji LOQ menunjukkan jumlah terkecil analit dalam sampel yang masih dapat diukur dan memenuhi kriteria cermat dan seksama. Batas deteksi merupakan konsentrasi analit terendah dalam sampel yang masih dapat dideteksi dengan tingkat keyakinan tinggi. Batas deteksi (LOD) merupakan parameter uji batas jumlah analit terkecil dari sampel yang dapat dideteksi dan masih memberikan respon signifikan dibanding blanko (Harmita, 2004).

Hasil LOD yang didapat dari pembuatan kurva baku kafein yaitu 0,0009 ppm, artinya apabila konsentrasi kafein yang terukur dalam instrumen $>0,0009$ ppm, dapat dipastikan bahwa sinyal tersebut berasal dari kafein. Nilai tersebut juga memiliki arti bahwa pada konsentrasi tersebut masih dapat dilakukan pengukuran sampel yang memberikan hasil ketelitian suatu alat berdasarkan tingkat akurasi individual hasil analisis. Batas Kuantitasi (LOQ) adalah konsentrasi atau jumlah terendah dari analit yang masih dapat ditentukan, sehingga memenuhi kriteria akurasi. Hasil LOQ yang diperoleh dari pembuatan kurva baku kafein yaitu sebesar 0,0032 ppm yang artinya pada konsentrasi tersebut bila dilakukan pengukuran masih dapat memberikan kecermatan analisis. Hal ini menandakan bahwa alat memiliki akurasi yang tinggi karena konsentrasi larutan standar lebih besar dari nilai LOQ.

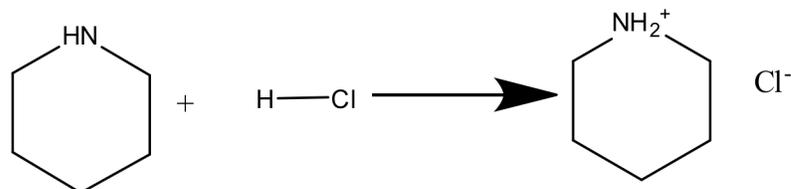
6.5 Penentuan Kadar Alkaloid Total Daun Sirsak

Penentuan kadar alkaloid total digunakan untuk menentukan seberapa besar kandungan alkaloid yang ada pada fraksi n-heksan daun sirsak. Isolasi senyawa alkaloid total pada penelitian ini yaitu menggunakan metode spektrofotometri sederhana dengan pengestraksian senyawa alkaloid pada bagian fraksi n-heksan daun sirsak menggunakan pereaksi BCG. Metode ini dapat mendeteksi seberapa besar kandungan alkaloid total

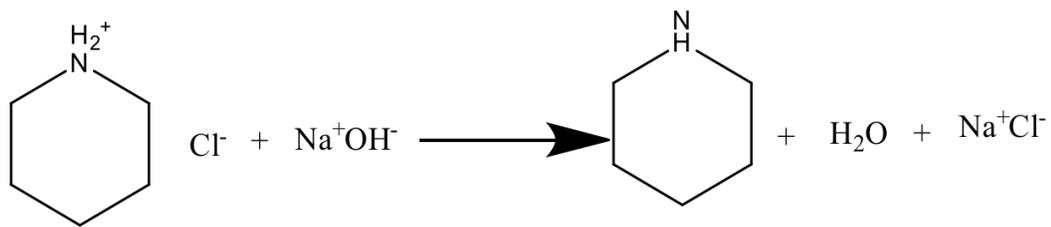
pada fraksi n-haksan daun sirsak menggunakan larutan standar kafein berdasarkan pada reaksi alkaloid dan BCG membentuk warna kuning.

Hasil fraksi dari daun sirsak diambil sebanyak 10 mg. Penambahan HCl 2 N ditujukan agar dapat membentuk garam alkaloid. Menurut Robinson (1995), alkaloid bereaksi dengan asam kuat membentuk garam alkaloid. Penambahan NaOH 0,1 N digunakan untuk membebaskan alkaloid dari garamnya, sehingga terbentuk alkaloid bebas. Alkaloid bebas tidak dapat larut dalam air melainkan dapat larut dalam pelarut organik. Larutan fraksi daun sirsak ditambah dengan larutan buffer/ dapar fosfat pH 4,7 agar memberikan hasil optimum saat BCG bereaksi dengan alkaloid. Penambahan BCG berfungsi sebagai reagen warna yang akan berikatan dengan alkaloid membentuk kompleks pasangan ion alkaloid-BCG.

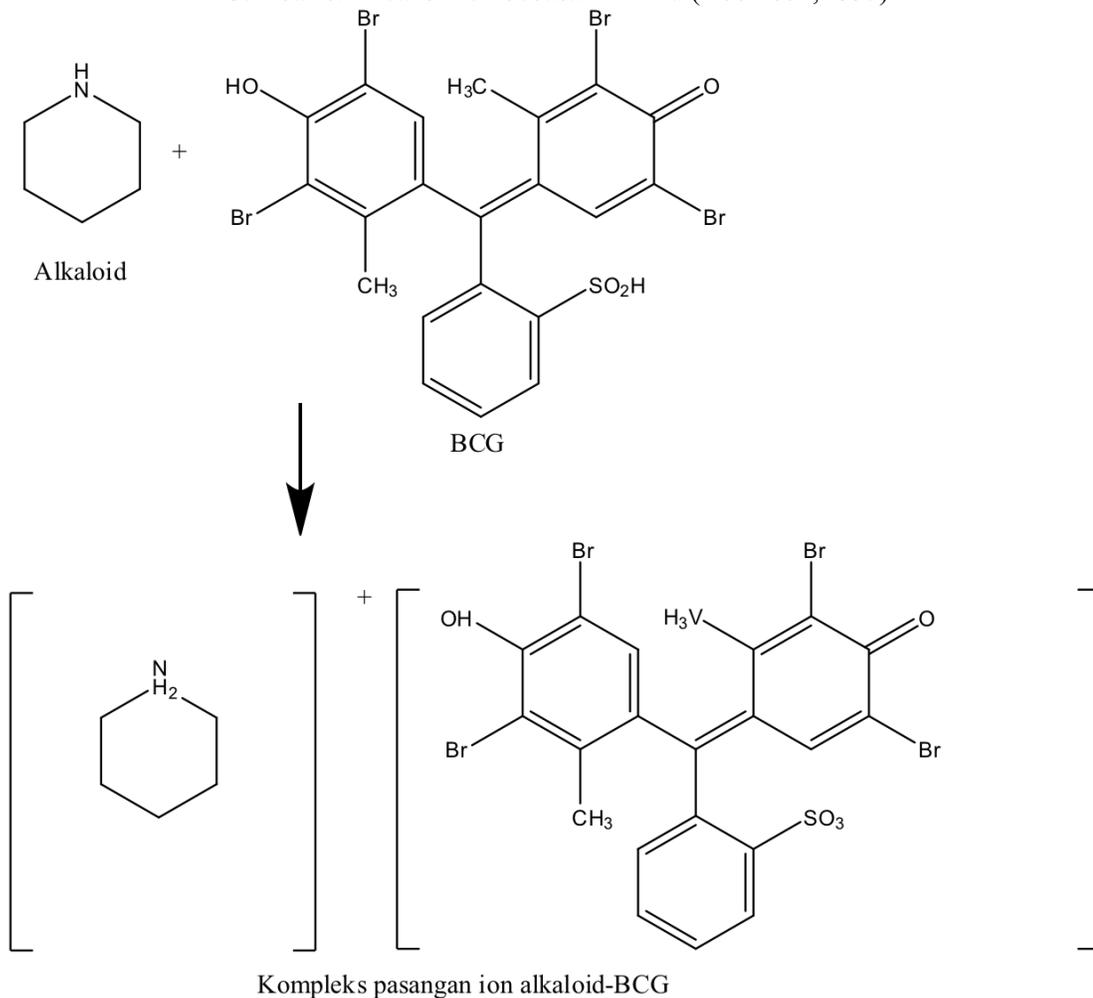
Penambahan larutan kloroform ditujukan untuk menarik alkaloid yang sudah bebas dari garamnya. Hal ini dikarenakan alkaloid bebas mudah larut dalam pelarut organik sedangkan garam alkaloid tidak larut. Fraksi dikocok untuk meningkatkan proses distribusi atau pengikatan alkaloid bebas ke dalam kloroform. Pengocokan dilakukan selama ± 10 menit sampai tidak ada gelembung gas di dalam corong pisah. Corong pisah diletakkan pada posisi tergantung dan dibiarkan hingga terbentuk dua lapisan yang tidak saling bercampur. Lapisan atas merupakan fraksi air dan lapisan bawah merupakan fraksi organik (kloroform). Hal tersebut dapat terjadi dikarenakan massa jenis kloroform yaitu 1,498 g/mL lebih besar daripada massa jenis air yaitu 1 g/mL. Fraksi organik diambil dan ditanda bataskan dengan kloroform. Warna dari fraksi kloroform ini adalah kuning cerah yang selanjutnya diidentifikasi kadar alkaloid total dengan spektrofotometer UV-Vis.



Gambar 6.1 Reaksi Alkaloid Dengan Asam Kuat (Robinson, 1995)



Gambar 6.2 Reaksi Pembebasan Amina (Robinson, 1995)



Gambar 6.3 Dugaan Reaksi Antara Alkaloid dan BCG

Penentuan kadar alkaloid total dilakukan dengan spektrofotometer UV-Vis karena metodenya lebih mudah, sensitifitasnya cukup baik, dan mempunyai kepekaan yang tinggi. Hasil kadar alkaloid total ekstrak daun sirsak terdapat pada tabel 5.7. Berdasarkan nilai yang diperoleh didapatkan konsentrasi berturut-turut yaitu 13,62 ppm; 12,96 ppm; dan 13,46 ppm. Penetapan kadar alkaloid dapat dihitung menggunakan persamaan regresi $y = 0,0583x - 0,0281$ dengan nilai $r^2 = 0,9994$. Berdasarkan hasil pengujian yang

dilakukan didapatkan nilai absorbansi replikasi I, II, dan III secara berurutan yaitu 0,766; 0,728; dan 0,757 ppm. Hasil perhitungan kadar pada setiap replikasi secara berturut-turut 1,3565%; 1,294%; dan 1,341%, sehingga menghasilkan nilai kadar rata-rata alkaloid total yaitu sebesar 1,33 % b/b. Pada penelitian dilakukan replikasi atau pengulangan sebanyak 3 kali, sehingga data yang dihasilkan dapat dianggap valid.

Berdasarkan hasil penelitian yang telah dilakukan oleh Huri, Melinda (2016) yaitu tentang kandungan senyawa alkaloid pada teh celup daun sirsak menunjukkan bahwa teh daun sirsak pada pengujian alkaloid, penyeduhan dengan suhu 100°C selama 5 menit memiliki hasil kandungan alkaloid yang optimal juga yaitu sebesar 0,0200% (199,78 ppm). Penelitian yang dilakukan oleh Habajahan, Jennika (2019) yaitu terkait analisis kadar alkaloid mixing minuman herbal daun sirsak (*Annona muricata L.*) dan kunyit putih menyatakan bahwa kadar rata-rata alkaloid pada mixing minuman herbal daun sirsak dan kunyit putisebah sebesar 0,012 b/b %. Mengacu pada beberapa hasil penelitian yang telah dilakukan pada kadar alkaloid daun sirsak, hasil kadar rata-rata alkaloid dari fraksi n-heksan memiliki nilai kadar yang lebih tinggi yakni 1,33% sehingga menunjukkan hasil yang lebih baik.

BAB 7. KESIMPULAN DAN SARAN

7.1 Kesimpulan

Berdasarkan hasil penelitian yang telah dilakukan dapat disimpulkan bahwa :

1. Optimasi metode analisis untuk penetapan kadar alkaloid total pada fraksi n-heksan daun sirsak pada kondisi yang optimum sehingga dapat dilakukan validasi.
2. Metode spektrofotometri UV-Visible yang digunakan dalam penelitian telah memenuhi parameter validasi metode analisis dan persyaratan yang telah ditetapkan dalam uji validasi sehingga metode ini dapat diterapkan untuk analisis penetapan kadar alkaloid total fraksi n-heksan daun sirsak di suatu laboratorium.
3. Kadar alkaloid total dari fraksi n-heksan daun sirsak yaitu sebesar 1,33 % b/b.

7.2 Saran

Berdasarkan hasil penelitian optimasi dan validasi metode untuk penetapan kadar alkaloid total fraksi n-heksan daun sirsak secara spektrofotometri UV-Visible, maka penulis menyarankan bahwa perlu dilakukan penelitian dan pengembangan lebih lanjut dengan metode spektrofotometri untuk analisis multikomponen dan penggunaan pelarut fraksi yang berbeda untuk penetapan kadar alkaloid total pada daun sirsak.

DAFTAR PUSTAKA

- Abbas, *et al.* (2015). *Identification of some Annona muricata L. (soursop) components and their antioxidant effects in rats. Iraqi Postgraduate Medical Journal.* 14(4): 576-580.
- Aini, N. (2013). *Penentuan Kadar Alkaloid Pada Ekstrak Daun Tanaman Menggunakan Metode NIR dan Kemometrik.*
- Ajanal, *et al.* (2012). *Estimation of total alkaloid in Chitrakadivati by UV-Spectrophotometer, Anc Sci Life (online)*
(<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov>, diakses 10 November 2020)
- Aksara, *et al.* (2003). *Identifikasi Senyawa Alkaloid Dari Ekstrak Metanol Kulit Batang Mangga (Mangifera indica L).* Jurnal Entropi, Volume Viii, Nomor 1.
- Alias, K. (2009). *Physical Properties of Soursop (Annona muricata) Powder Produced by Spray Drying. A Dissertation Submitted in Partial Fulfillment of the Requirements for the Award of the Degree of Bachelor of Engineering (Chemical Engineering) Faculty of Chemical and Natural Resources Engineering Universiti Malaysia Pahang, April.* <http://umpir.ump.edu.my/917/>
- A.M. Levent. (2002). *HPLC method for the analysis of paracetamol, caffeine, and dipyrone.* Turk. J. Chem. 26 : 521-528.
- Azzahra, *et al.* (2015). *Isolasi dan Karakterisasi Alkaloid dari Daun Sirih Merah (Piper Crocatum Ruiz & Pav).* ISSN 2460-6472.
- Badan Pengawas Obat dan Makanan. (2012). *Penerapan Pedoman Cara Pembuatan Obat yang Baik.* Jakarta: Pengarang.
- Baskar, *et al.* (2007). *In Vitro Anti-oxidant Studies in Leave of Annona Species.* Indian J Exp Biol, 45, 480-485.
- Bridgemohan, *et al.* (2015). *Caribbean soursop (Annona muricata) varieties II: annonaceous acetogenin properties. International Journal of Phytocosmetics and Natural Ingredients.* 2(17): 1-4.
- Chen, *et al.* (2013). *Antitumor activity and toxicity relationship of annonaceous acetogenins. Food and Chemical Toxicology.* 58 (2013): 394-400.
- Coria-Téllez, *et al.* (2018). *Arabian Journal of Chemistry.* Vol. 11: 662-691.

- C. Qing-Chun, and J. Wang. (2001). *Simultaneous determination of artificial sweeteners, preservatives, caffeine, theobromine, and theophylline in food and pharmaceutical preparations by ion chromatography*. J. Chromatogr. A 937: 57-64.
- Departemen Kesehatan Republik Indonesia. (1989). *Materia Medika Indonesia Jilid V*. Jakarta:
- Departemen Kesehatan Republik Indonesia. (1995). *Farmakope Indonesia Edisi IV*. Jakarta : Direktorat Jenderal Pengawasan Obat dan Makanan.
- Dirjen POM. (1995). *Materia Medika Indonesia, Jilid VI*. Jakarta: Departemen Kesehatan Republik Indonesia. Hal. 103-113.
- Dirjen POM. (1999). *Farmakope Indonesia, Edisi ke-4*. Jakarta: Departemen Kesehatan Republik Indonesia, 7-8.
- Dewi, M. K. C. (2016). Penetapan Kandungan Fenolik Total Serbuk Daun Sirsak (*Annona muricata* L.) Varietas Ratu dan Lokal dan Model Klasifikasi NIR Kemometrik. In *Skripsi*.
- Ewadh, *et al.* (2015). *Using soursop extracts for natural gout treatment*. American Journal of Bioscience and Bioengineering. 3(5): 37- 39.
- Florence, *et al.* (2014). *Antidiabetic and antioxidant effects of Annona muricata (Annonaceae), aqueous extract on streptozotocin-induced diabetic rats*. *Journal of Ethnopharmacology*. 151(2): 784-790.
- Gaedcke, *et al.* (2003). *Herbal medicine products: Scientific and Regulatory basis for development. Quality Assurance and Marketing Authorisation, Stuttgart: Medpharm Scientific Publisher*.
- Gandjar, *et al.* (2012). *Kimia Farmasi Analisis*. Yogyakarta: Pustaka Pelajar
- Gavamukulya, *et al.* (2014). *Phytochemical screening, anti-oxidant activity and in vitro anticancer potential of ethanolic and water leaves extracts of Annona muricata (Graviola)*. *Asian Pacific Journal of Tropical Medicine*. Vol. 7(Suppl 1): S355-S363.

- George, et al. (2015). *Antioxidant, DNA protective efficacy and HPLC analysis of Annona muricata (soursop) extracts*. *Journal of Food Science and Technology*. 52(4): 2328- 2335.
- Guether. (1987). *Minyak Atsiri Tumbuhan Tropika*. Jakarta: UI Press.
- Greenaway, A. (2014). *Soursoup (Annona Muricata)*. Moscow: National Tropical Botanical Garden.
- Habajahan, Jennika. (2019). *Analisis Kadar Flavonoid dan Alkaloid Mixing Minuman Herbal Daun Sirsak (Annona Muricata) dan Kunyit Outih (Curcuma zadoaria Rosc.)* Sebagai Bahan Media Poster Biologi SMA Berbasis Riset. Skripsi. Universitas Wijaya Kusuma Surabaya, Surabaya.
- Handayani, H., & Heppy Sriherfyna, F. (2016). Antioxidant Extraction of Soursop Leaf with Ultrasonic Bath (Study of Material: Solvent Ratio and Extraction Time). *Jurnal Pangan Dan Agroindustri*, 4(1), 262–272. <https://jpa.ub.ac.id/index.php/jpa/article/view/327>
- Hanani, E. (2014). *Analisis Fitokimia*. Cetakan I, 140, Buku Kedokteran EGC, Jakarta.
- Harborne, J. B. (1987). *Metode Fitokimia*. Diterjemahkan oleh Kosasih Padmawinata dan Iwang Sudiro, Terbitan II, ITB. Bandung.
- Haris M. (2011). *Penentuan Kadar Flavonoid Total dan Aktivitas Antioksidan Dari Daun Dewa (Gynura pseudochina) Dengan Spektrofotometer UV-Visibel*. Skripsi S1 (Tidak dipublikasikan). Universitas Anadala.
- Hartati, I. (2010). *Isolasi Alkaloid Dari Tepung Gadung (Dioscorea hispida Dennst) Dengan Teknik Ekstraksi Berbantu Gelombang Mikro*. Tesis. Semarang: UNDIP.
- Hawkins, D. W & D. W. Rahn. (1997). *Pharmacoteraphy A Phatophysilogic Approach, 3 th Ed*. Stampfor: Appleton and Lange.
- Huri, Melinda. (2016). *Aktivitas Semyawa Oksidan dan Kandungan Senyawa Alkaloid Teh Celup Daun Sirsak (Annona muricata L)*. Skripsi. Universitas Katolik Soegijapranata, Semarang.
- Iffah, et al. (2018). *Skrining Metabolit Sekunder pada Sirip Ekor Hiu Carcharhinus melanopterus*. ISBN 978-602-71759-5-2 Universitas Hasanuddin, Makassar.

- Junaidi, Ardiningsih, P., & Idiawati, N. (2016). Aktivitas Bioinsektisida Ekstrak Daun Sirsak (*Annona Muricata* Linn.) pada Kecoak (*Periplaneta Americanalinn.*). *Jurnal JKK*, 5(3), 60–66.
- Lilbaiq, fifti zuyyina. (2017). Uji Aktivitas Ekstrak Etanol Daun Sirsak (*Annona muricata* Linn.) Yang Diembankan Pada Zeolit NaX Menggunakan Metode Impregnasi Kering Sebagai Antikanker Payudara T-47D. *Central Library of Maulana Malik Ibrahim State Islamic University of Malang*, 19–43.
- Lukman, H. (2015). Penentuan Kadar Flavonoid pada Ekstrak Daun Tanaman menggunakan Metode Spektroskopi Inframerah dan Kemometrik. *Skripsi*, 1–105.
- Latifaningsih, L. (2012). *Pengaruh Konsentrasi Dan Waktu Perendaman Dalam Larutan Asam Asetat Terhadap Sifat Sensoris, Kadar Protein Total, Dan Alkaloid Total Emping Melinjo*. Skripsi. Surakarta : UNS.
- Lenny, S. (2006). *Senyawa Terpenoid dan Steroida*. Departemen Kimia, FMIPA, Universitas Sumatera Utara.
- Listyaningrum, L. (2020). Validasi Metode Uji Kafein Dalam Minuman Kopi Menggunakan Kromatografi Cair Kinerja Tinggi (KCKT) Di PT Saraswati Indo Genetech Bogor. Laporan Tugas Akhir, FMIPA, Universitas Islam Indonesia Yogyakarta.
- Lukmanto. (2015). *Uji Aktivitas Antioksidan Dan Penetapan Kadar Flavonoid Total Ekstrak Dan Fraksi Daun Kenari*. Skripsi. Fakultas Farmasi, Universitas Jember.
- Malibela, Y. F., Pontoh, J., & Abidjulu, J. (2018). PERUBAHAN KOMPONEN KIMIA PADA BEBERAPA TINGKAT KEMATANGAN DAUN SIRSAK (*Annona muricata* L.) MENGGUNAKAN KROMATOGRAFI GAS (KG). *Pharmacon*, 7(3), 1–8. <https://doi.org/10.35799/pha.7.2018.20095>
- Maramis, R., M. Kaseke, dan G. N. Tanudjadja. (2014). *Gambaran histologi aorta tikus wistar dengan diet lemak babi setelah pemberian ekstrak daun sirsak (*Annona muricata* L.)*. *Jurnal e-Biomedik*. 2(2): 431-435.

- Moghadamtousi, *et al.* (2015). *Annona muricata (annonaceae): a review of its traditional uses, isolated acetogenins and biological activities*. International Journal of Molecular Sciences. 16(7):15625–15658.
- Maulida, D., & Zulkarnaen, N. (2010). Ekstraksi Antioksidan (Likopen) dari Buah Tomat dengan Menggunakan Solven Campuran, N – Heksana, Aseton, dan Etanol. *Jurusan Teknik Kimia, Fakultas Teknik*, 1–8.
- Ningsih, D. R., dan K. D. Zufahair. (2016). *Identifikasi senyawa metabolit sekunder serta uji aktivitas ekstrak daun sirsak sebagai antibakteri*. Jurnal Molekul. 11(1): 101-111.
- Patel, R. K., J. B. Patel, dan P. D. Trivedi. (2015). *Spectrophotometric method for the estimation of total alkaloids in the Tinospora cordifolia M. and its herbal formulations*. International Journal of Pharmacy and Pharmaceutical Sciences. 7(10):249–251.
- Pinto, *et al.* (2017). *Antimicrobial Annona muricata L. (soursop) extract targets the cell membranes of Gram- positive and Gram-negative bacteria*. Industrial Crops and Products. 107(2017): 332-340.
- Qoriati. (2018). *Optimasi Ekstraksi Ultrasonik Dengan Variasi Pelarut Dan Lama Ekstraksi Terhadap Kadar Alkaloid Total Pada Tanaman Daun sirsak (Acalpha indica L) Menggunakan Spektrofotometri UV-Vis*. Skripsi. Universitas Islam Negeri Maulana Malik Ibrahim Malang
- Radi, J. (1997). *Sirsak Budi Daya Dan Pemanfaatannya*. Yogyakarta: Kanisius.
- Riyanto. (2014). *Validation dan verifikasi metode uji sesuai dengan ISO/IEC 17025*. Laboratorium Pengujian dan Kalibrasi, 21-71, Deepublish, Yogyakarta.
- Robinson, T. (1995). *Kandungan Senyawa Organik Tumbuhan Tinggi*. Diterjemahkan oleh Prof. Dr. Kosasih Padmawinata. Bandung: ITB.
- Rohman, A. (2007). *Kimia Farmasi Analisis*. Yogyakarta: Pustaka Pelajar.
- Rohman, A. (2014). *Metode Analisis Kimia. Cetakan Pertama*, 1–238.
- Saifudin, A., Rahayu, A., Teruna, H. Y. (2011). *Standarisasi Bahan Obat Alam 2*. Graha Ilmu : Yogyakarta

- Sanusi, S. B., dan M. F. A. Bakar. (2018). Soursop-*Annona muricata*. In *Exotic Fruits*: 391-395.
- Sari, A. K. (2015). *PENETAPAN KADAR POLIFENOL TOTAL, FLAVONOID TOTAL, DAN UJI AKTIVITAS ANTIOKSIDAN EKSTRAK ETANOL DAUN SIRSAK (Annona muricata) DARI JEMBER PADA KETINGGIAN TANAH YANG BERBEDA*. 1–18.
- Sari, D. M., Wijaya, S., & Setiawan, H. K. (2015). Fraksinasi dan Identifikasi Senyawa Antioksidan pada Ekstrak Etanol Daun Sirsak (*Annona muricata* L.) secara Kromatografi Kolom. *Jurnal Farmasi Sains Dan Terapan*, 2(2), 50–53.
- Shamsa, F., Monsef, H., Ghamooshi, R., & Verdian-rizi, M. (2008). Spectrophotometric determination of total alkaloids in some Iranian medicinal plants Abstract : *Thai J. Pharm. Sci*, 32, 17–20.
- Sudewi, S., & Pontoh, J. (2018). OPTIMASI DAN VALIDASI METODE ANALISIS DALAM PENENTUAN KANDUNGAN TOTAL FENOLIK PADA EKSTRAK DAUN GEDI HIJAU (*Abelmoschus manihot* L.) YANG DIUKUR DENGAN SPEKTROFOTOMETER UV-VIS. *Pharmacon*, 7(3), 32–41. <https://doi.org/10.35799/pha.7.2018.20102>
- Sudewi S, Pontoh J. (2008). Penentuan Total Kadar Flavonoid Pada Ekstrak daun Gedi Hijau (*Abelmoschus manihot* L) Yang Diukur Menggunakan Spektrofotometri UV-VIS. 2018;7(3):32–41.
- Sugiyono. (2010). Metode Penelitian Pendidikan Pendekatan Kuantitatif, kualitatif, dan R&D. Bandung: Alfabeta.
- Sunarjono, H. (2005). *Sirsak Dan Srikaya: Budi Daya Untuk Menghasilkan Buah Prima*. Bogor: Penebar Swadaya.
- Taylor, L. (1998). *Herbal Secret of the Rainforest: The Healing Power Over 50 Medicinal Plants You Should Know About*. Roclin: Prima Health Publishing.
- Torbeck L.D., et al. (2007). *Pharmaceutical And Medical Decice Validation By Ekspermental Design*. Informa healthcare. New York. P.4.
- Tursiman, Ardiningsih, P., & Nofiani, R. (2012). Total Fenol Fraksi Etil Asetat dari Buah Asam Kandis (*Garcinia dioica* Blume). *Jkk*, 1(1), 45–48.

Voigt, R. dan S. Noerono. (1994). *Buku Pelajaran Teknologi Farmasi*. Yogyakarta: Gadjah Mada University Press.

Wisudyarningsih, B. (2012). Studi preformulasi: validasi metode spektrofotometri ofloksasin dalam larutan dapar fosfat. *Stomatognatic*, 9(2), 77–81.

Wullur, A., & Schadu, J. (2013). Identifikasi alkaloid pada daun sirsak (*Annona muricata* L.). *JIF-Jurnal Ilmiah*, 1(1), 54–56. <https://ejurnal.poltekkes-manado.ac.id/index.php/jif/article/download/278/247/>

Lampiran 1. Hasil Determinasi Tumbuhan

Kode Dokumen : FR-AUK-064
Revisi : 0



KEMENTERIAN PENDIDIKAN DAN KEBUDAYAAN
POLITEKNIK NEGERI JEMBER
UPT. PENGEMBANGAN PERTANIAN TERPADU
Jalan Mastrip Kotak Pos 164 Jember - 68101 Telp. (0331) 333532 - 333534 Fax. (0331) 333531
E-mail : Polije@polije.ac.id Web Site : <http://www.Polije.ac.id>

Lampiran : 1 Berkas
Perihal : Identifikasi Kalsifikasi dan Morfologi Tanaman Sirsak sebagai Kajian Skripsi

Nama Peneliti : Ayu Dwi Wardani (Mahasiswa Farmasi STIKES dr. Soebandi)
Judul Skripsi: Validasi Metode dan Penetapan Kadar Alkaloid Total Fraksi Etil Asetat Daun Sirsak (*Annona muricata*, L) di Desa Kemiri Kabupaten Jember secara Spektrofotometri UV-Vis.
Pengidentifikasi : Ujang Tri Cahyono, SP.MM

Hasil Identifikasi Klasifikasi dan Morfologi Tanaman Sirsak

Tanaman sirsak (*Annona muricata*, L) termasuk dalam tumbuhan menahun (*perennial crop*) dan ditanam secara komersial atau sambilan untuk diambil daging buahnya, tumbuhan ini dapat tumbuh disembarang tempat paling baik ditanam didaerah yang cukup berair dan pada semua jenis tanah dengan derajat keasaman (pH) antara 5-7. Tanah yang sesuai adalah tanah yang agak asam sampai alkalis. Pohon sirsak bisa mencapai tinggi 3-8 meter, di Indonesia tanaman sirsak dapat tumbuh dengan baik pada ketinggian 100-1000 m di atas permukaan laut. Suhu udara yang sesuai untuk tanaman ini antara 22-32°C dan curah hujan yang optimal untuk pertumbuhan tanaman sirsak ini adalah 1500-3000 mm/pertahun.

Klasifikasi Tanaman Sirsak :

Kingdom/ Regnum : Plantae
Divisio : Spermatophyta
Sub Divisio : Magnoliophyta
Kelas : Magnoliopsida (Dicotyledoneae)
Sub Kelas : Magnoliidae
Ordo : Magnoliales
Famili : Annonaceae
Genus : *Annona*
Spesies : *Annona muricata*, L

Lampiran 2. Dokumentasi Penelitian



(Gambar 1. Proses pengeringan simplisia)



(Gambar 2. Proses evaporasi ekstrak cair)



(Gambar 3. Hasil ekstrak kental daun sirsak)



(Gambar 4. Sampel dan standar yang digunakan dalam penelitian optimasi dan validasi)

Lampiran 3. Pembuatan Larutan

L.3.1 Pembuatan Larutan Dapar Fosfat pH 4,7

Ditimbang 7,16 g Na_2HPO_4 dan 4,202 g Asam sitrat dilarutkan dalam pelarut aquades sebanyak 100 ml.

L.3.2 Pembuatan Larutan *Bromocresol green* (BCG) 10^{-4} M

Ditimbang 69,8 mg BCG dilarutkan dalam 3 ml 2N NaOH dan 5 ml akuades diultrasonik lalu ad 1000 ml.

L.3.3 Pembuatan Larutan NaOH 2N

Pembuatan NaOH 2N dalam 100 ml

$$\text{Mr NaOH} = 40 \text{ g/mol}$$

$$\text{Volume NaOH} = 100 \text{ ml atau } 0,1 \text{ L}$$

$$\text{N NaOH} =$$

$$2 \text{ mol/L} =$$

$$\text{mol NaOH} = 2 \text{ mol/L} \times 0,1 \text{ L}$$

$$= 0,2 \text{ mol}$$

$$\text{mol NaOH} =$$

$$\text{massa NaOH} = \text{mol NaOH} \times \text{Mr NaOH}$$

$$= 0,2 \text{ mol} \times 40 \text{ g/mol}$$

$$= 8 \text{ gram}$$

8 gram dilarutkan dalam 100 mL aquades

L.3.4 Pembuatan Larutan HCl 2 N

$$\text{Berat Jenis } (\rho) = 1,19 \text{ g/mL}$$

$$n = 1 \text{ (jumlah mol ion } \text{H}^+)$$

$$\text{Mr HCl} = 36,5 \text{ g/mol}$$

$$\text{Konsentrasi HCl} = 37\% \text{ (% b/b)}$$

$$37\% =$$

$$\text{Mol HCl} =$$

$$=$$

$$= 1,0137 \text{ mol}$$

$$=$$

$$\begin{aligned}
 \text{Volume (V)} &= \\
 &= 84,03 \text{ mL} \\
 \text{Molaritas (M)} &= = 84,03 \text{ mL} \\
 &= \\
 &= \\
 &= 12,064 \text{ M} \\
 \text{Normalitas (N)} &= \text{mol} \times \text{Molaritas} \\
 &= 1 \times 12,064 \text{ M} \\
 &= 12,064 \text{ M} \\
 N_1 \times V_1 &= N_2 \times V_2 \\
 12,064 \text{ N} \times V_1 &= 2\text{N} \times 50 \text{ mL} \\
 V_1 &= \\
 &= 8,29 \text{ mL} = 8,3 \text{ mL}
 \end{aligned}$$

L.3.5 Pembuatan Larutan Buffer pH 4,7

$$\text{Mr Asam sitrat (C}_6\text{H}_8\text{O}_7) = 192,13 \text{ g/mol}$$

$$\text{Mr Disodium fosfat (Na}_2\text{HPO}_4) = 258,07 \text{ g/mol}$$

$$\text{Volume} = 100 \text{ mL}$$

$$\text{Molaritas (M)} =$$

$$\begin{aligned}
 \text{mol C}_6\text{H}_8\text{O}_7 &= \text{Molaritas} \times \text{Volume} \\
 &= 0,2 \text{ mol/L} \times 0,1 \text{ L} \\
 &= 0,02 \text{ mol}
 \end{aligned}$$

$$\text{mol} =$$

$$\begin{aligned}
 m \text{ C}_6\text{H}_8\text{O}_7 &= \text{mol} \times \text{Mr} \\
 &= 0,02 \text{ mol} \times 192,13 \text{ g/mol} \\
 &= 3,8426 \text{ g}
 \end{aligned}$$

$$\begin{aligned}
 \text{mol Na}_2\text{HPO}_4 &= \text{Molaritas} \times \text{Volume} \\
 &= 2 \text{ mol/L} \times 0,1 \text{ L} \\
 &= 0,2 \text{ mol}
 \end{aligned}$$

$$\text{mol} =$$

$$m \text{ Na}_2\text{HPO}_4 = \text{mol} \times \text{Mr}$$

$$= 0,2 \text{ mol} \times 141,99 \text{ g/mol}$$

$$= 28,398 \text{ g}$$

L.3.6 Pembuatan Larutan Baku Standar Kafein

Larutan baku dibuat dengan menimbang 40 mg kafein dilarutkan dengan etanol pro analisis sebanyak 10 mL

$$\times 1000 \mu\text{g/ml} = 100 \mu\text{g/ml}$$

$$\text{Pengenceran standar } 100 \mu\text{g/ml} \times 100 \mu\text{g/ml} = 4 \mu\text{g/ml}$$

$$\times 100 \mu\text{g/ml} = 6 \mu\text{g/ml}$$

$$\times 100 \mu\text{g/ml} = 8 \mu\text{g/ml}$$

$$\times 100 \mu\text{g/ml} = 10 \mu\text{g/ml}$$

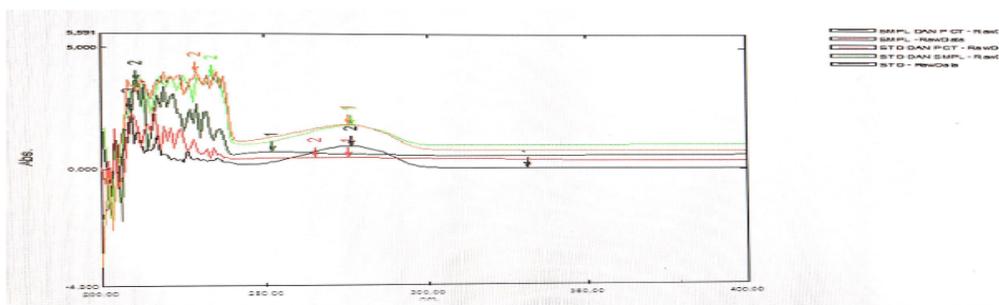
$$\times 100 \mu\text{g/ml} = 12 \mu\text{g/ml}$$

Lampiran 4. Spektrofotometri UV-Vis
 L.4.1 Data *Operating Time*

File_210426_121140 - RawData					
Time	Abs	Abs-Abs(start)	dAbs	Activity	
0.0000	0.5642	0.0050			
0.0167	0.5643	0.0051			
0.0334	0.5644	0.0051	0.0001	0.0001	
0.0501	0.5644	0.0052	0.0001	0.0001	
0.0668	0.5645	0.0052	0.0001	0.0001	
0.0835	0.5645	0.0053	0.0001	0.0001	
0.1002	0.5646	0.0054	0.0001	0.0001	
0.1169	0.5646	0.0054	0.0000	0.0000	
0.1336	0.5646	0.0054	0.0000	0.0000	
0.1503	0.5646	0.0054	0.0000	0.0000	
0.1670	0.5646	0.0054	0.0000	0.0000	
0.1837	0.5647	0.0054	0.0000	0.0000	
0.2004	0.5647	0.0054	0.0000	0.0000	
0.2171	0.5648	0.0055	0.0001	0.0001	
0.2338	0.5649	0.0057	0.0001	0.0001	
0.2505	0.5650	0.0058	0.0001	0.0001	
0.2672	0.5651	0.0059	0.0001	0.0001	
0.2839	0.5652	0.0060	0.0001	0.0001	
0.3006	0.5654	0.0061	0.0001	0.0001	
0.3173	0.5654	0.0062	0.0000	0.0000	
0.3340	0.5654	0.0062	0.0000	0.0000	
0.3507	0.5655	0.0062	0.0000	0.0000	
0.3674	0.5655	0.0063	0.0000	0.0000	
0.3841	0.5655	0.0063	0.0000	0.0000	
0.4008	0.5656	0.0063	0.0000	0.0000	
0.4175	0.5657	0.0065	0.0001	0.0001	
0.4342	0.5658	0.0066	0.0001	0.0001	
0.4509	0.5660	0.0067	0.0001	0.0001	
0.4676	0.5661	0.0068	0.0001	0.0001	
0.4843	0.5662	0.0070	0.0001	0.0001	
0.5010	0.5663	0.0071	0.0001	0.0001	
0.5177	0.5664	0.0071	0.0000	0.0000	
0.5344	0.5664	0.0072	0.0000	0.0000	
0.5511	0.5665	0.0072	0.0000	0.0000	
0.5678	0.5665	0.0073	0.0000	0.0000	
0.5845	0.5665	0.0073	0.0000	0.0000	
0.6012	0.5666	0.0074	0.0001	0.0001	
0.6179	0.5667	0.0075	0.0001	0.0001	
0.6346	0.5668	0.0076	0.0001	0.0001	
0.6513	0.5669	0.0077	0.0001	0.0001	
0.6680	0.5670	0.0078	0.0001	0.0001	
0.6847	0.5671	0.0079	0.0001	0.0001	
0.7014	0.5672	0.0080	0.0001	0.0001	
0.7181	0.5673	0.0080	0.0000	0.0000	
0.7348	0.5673	0.0081	0.0000	0.0000	
0.7515	0.5673	0.0081	0.0000	0.0000	
0.7682	0.5674	0.0081	0.0000	0.0000	
0.7849	0.5674	0.0082	0.0000	0.0000	
0.8016	0.5674	0.0082	0.0000	0.0000	
0.8183	0.5674	0.0082	-0.0000	-0.0000	

File_210426_121140 - RawData					
Time	Abs	Abs-Abs(start)	dAbs	Activity	
0.8350	0.5674	0.0082	-0.0000	-0.0000	
0.8517	0.5674	0.0081	-0.0000	-0.0000	
0.8684	0.5674	0.0081	-0.0000	-0.0000	
0.8851	0.5674	0.0081	-0.0000	-0.0000	
0.9018	0.5673	0.0081	-0.0000	-0.0000	
0.9185	0.5674	0.0082	0.0001	0.0001	
0.9352	0.5675	0.0082	0.0001	0.0001	
0.9519	0.5676	0.0083	0.0001	0.0001	
0.9686	0.5676	0.0084	0.0001	0.0001	
0.9853	0.5677	0.0085	0.0001	0.0001	

L.4.2
 Spesifisitas



(Gambar Spektra spesifisitas)

Lampiran 5. Perhitungan Hasil Penelitian

L.5.1 Perhitungan % Randemen

1. Ekstraksi

Nilai Randemen Ekstrak Etanol Daun Sirsak

Berat simplisia : 500 gram

Berat ekstrak etanol : 78,15 gram

$$\begin{aligned}\text{Randemen} &= \frac{\text{Berat ekstrak etanol}}{\text{Berat simplisia}} \times 100 \% \\ &= \frac{78,15}{500} \times 100 \% \\ &= 15,63 \%\end{aligned}$$

2. Fraksinasi

Nilai Randemen Fraksi Etanol Daun Sirsak

Berat simplisia : 20 gram

Berat ekstrak etanol : 7,14 gram

$$\begin{aligned}\text{Randemen} &= \frac{\text{Berat ekstrak etanol}}{\text{Berat simplisia}} \times 100 \% \\ &= \frac{7,14}{20} \times 100 \% \\ &= 35,7 \%\end{aligned}$$

L.5.2 Perhitungan Presisi

Uji presisi dapat ditentukan dengan menghitung nilai koefisien variasi (KV) atau standar deviasi relatif (RSD) dengan rumus berikut :

$$\text{RSD} = \frac{\text{SD}}{\bar{x}} \times 100 \%$$

Keterangan :

\bar{x} : kadar sampel rata-rata

SD : Standar Deviasi

Uji Tabel Hasil Uji Presisi Standar Kafein

No	Nama	Konsentrasi (ppm)	Absorbansi	RSD
1	Replikasi 1	5	0,27	= 0,2693
2	Replikasi 2	5	0,269	
3	Replikasi 3	5	0,269	SD = 0,0008
4	Replikasi 4	5	0,268	
5	Replikasi 5	5	0,27	RSD = 0,297 %
6	Replikasi 6	5	0,27	

7	Replikasi 1	7	0,385	= 0,3843
8	Replikasi 2	7	0,383	
9	Replikasi 3	7	0,386	
10	Replikasi 4	7	0,386	SD = 0,0016
11	Replikasi 5	7	0,384	RSD = 0,416 %
12	Replikasi 6	7	0,382	
13	Replikasi 1	9	0,494	= 0,4948
14	Replikasi 2	9	0,495	
15	Replikasi 3	9	0,495	SD = 0,0007
16	Replikasi 4	9	0,494	
17	Replikasi 5	9	0,496	
18	Replikasi 6	9	0,495	RSD = 0,141 %
19	Replikasi 1	10	0,566	= 0,568
20	Replikasi 2	10	0,566	
21	Replikasi 3	10	0,567	SD = 0,002
22	Replikasi 4	10	0,569	
23	Replikasi 5	10	0,569	
24	Replikasi 6	10	0,571	RSD = 0,352 %
25	Replikasi 1	12	0,674	= 0,6751
26	Replikasi 2	12	0,677	
27	Replikasi 3	12	0,672	SD = 0,0022
28	Replikasi 4	12	0,674	
29	Replikasi 5	12	0,676	
30	Replikasi 6	12	0,678	RSD = 0,325 %
Rata-rata nilai % RSD = 0,306 %				

Perhitungan presisi standar

1. Konsentrasi 5 ppm

=

= 0,2693

SD = 0,0008

RSD = x 100 %

= 0,297 %

2. Konsentrasi 7 ppm

=

= 0,3843

$$SD = 0,0016$$

$$\begin{aligned} RSD &= \times 100 \% \\ &= 0,416 \% \end{aligned}$$

3. Konsentrasi 9 ppm

=

$$= 0,4948$$

$$SD = 0,0007$$

$$\begin{aligned} RSD &= \times 100 \% \\ &= 0,141 \% \end{aligned}$$

4. Konsentrasi 10 ppm

=

$$= 0,568$$

$$SD = 0,002$$

$$\begin{aligned} RSD &= \times 100 \% \\ &= 0,352 \% \end{aligned}$$

5. Konsentrasi 12 ppm

=

$$= 0,6751$$

$$SD = 0,0022$$

$$\begin{aligned} RSD &= \times 100 \% \\ &= 0,325 \% \end{aligned}$$

$$\text{Rata-rata nilai \% RSD} =$$

$$= 0,306 \%$$

Tabel Hasil Uji Presisi Sampel

No	Nama	Absorbansi	RSD
1	Replikasi 1	0,57	= 0,568
2	Replikasi 2	0,566	
3	Replikasi 3	0,573	SD = 0,0024
4	Replikasi 4	0,568	
5	Replikasi 5	0,567	RSD = 0,422 %
6	Replikasi 6	0,569	

Perhitungan Presisi Sampel

$$\begin{aligned} &= \\ &= 0,568 \\ \text{SD} &= 0,0024 \\ \text{RSD} &= \times 100 \% \\ &= 0,422 \% \end{aligned}$$

L.5.3 Perhitungan Akurasi

Tabel Akurasi

No	Konsentrasi	Absorbansi
1a	80%	0,826
2a	80%	0,83
3a	80%	0,831
4a	80%	0,833
5a	80%	0,839
6a	80%	0,845
1b	100%	0,985
2b	100%	0,99
3b	100%	0,988
4b	100%	0,992
5b	100%	0,99
6b	100%	0,994
1c	120%	1,123
2c	120%	1,126
3c	120%	1,124
4c	120%	1,137
5c	120%	1,132
6c	120%	1,141

a) Konsentrasi 80%

1 mg sampel dari konsentrasi sampel maksimum ditimbang dalam 10 mL larutan ditambahkan 80% konsentrasi standar.

$$\times 100 = 10 \text{ ppm}$$

$$\times 10 \text{ ppm} = 8 \text{ ppm}$$

Konsentrasi 80% : $10 \text{ ppm} + 8 \text{ ppm} = 18 \text{ ppm}$

b) Konsentrasi 100%

1 mg sampel dari konsentrasi sampel maksimum ditimbang dalam 10 mL larutan ditambahkan 100% konsentrasi standar.

$$x \ 100 = 10 \text{ ppm}$$

$$x \ 10 \text{ ppm} = 10 \text{ ppm}$$

Konsentrasi 100% : $10 \text{ ppm} + 10 \text{ ppm} = 20 \text{ ppm}$

c) Konsentrasi 120%

1 mg sampel dari konsentrasi sampel maksimum ditimbang dalam 10 mL larutan ditambahkan 120% konsentrasi standar.

$$x \ 100 = 10 \text{ ppm}$$

$$x \ 10 \text{ ppm} = 12 \text{ ppm}$$

Konsentrasi 120% : $10 \text{ ppm} + 12 \text{ ppm} = 22 \text{ ppm}$

Persamaan regresi kurva baku yaitu $y = 0,0585x - 0,0298$

1. *Konsentrasi 80%*

- Replikasi 1

$$y = 0,058 x - 0,029$$

$$0,826 = 0,058 x - 0,029$$

$$0,855 = 0,058 x$$

$$x = 14,74$$

$$\% \text{ Recovery} = x \ 100 \% = 81,88 \%$$

- Replikasi 2

$$y = 0,058 x - 0,029$$

$$0,830 = 0,058 x - 0,029$$

$$0,859 = 0,058 x$$

$$x = 14,81$$

$$\% \text{ Recovery} = x \ 100 \% = 82,27 \%$$

- Replikasi 3

$$y = 0,058 x - 0,029$$

$$0,831 = 0,058 x - 0,029$$

$$0,860 = 0,058 x$$

$$x = 14,82$$

$$\% Recovery = x 100 \% = 82,33 \%$$

- Replikasi 4

$$y = 0,058 x - 0,029$$

$$0,833 = 0,058 x - 0,029$$

$$0,862 = 0,058 x$$

$$x = 14,86$$

$$\% Recovery = x 100 \% = 82,55 \%$$

- Replikasi 5

$$y = 0,058 x - 0,029$$

$$0,839 = 0,058 x - 0,029$$

$$0,868 = 0,058 x$$

$$x = 14,96$$

$$\% Recovery = x 100 \% = 83,11 \%$$

- Replikasi 6

$$y = 0,058 x - 0,029$$

$$0,845 = 0,058 x - 0,029$$

$$0,874 = 0,058 x$$

$$x = 15,06$$

$$\% Recovery = x 100 \% = 83,66 \%$$

$$Nilai \% Recovery = = 82,63 \%$$

2. Konsentrasi 100%

- Replikasi 1

$$y = 0,058 x - 0,029$$

$$0,985 = 0,058 x - 0,029$$

$$1,014 = 0,058 x$$

$$x = 17,48$$

$$\% Recovery = x 100 \% = 87,4 \%$$

- Replikasi 2

$$y = 0,058 x - 0,029$$

$$0,990 = 0,058 x - 0,029$$

$$1,019 = 0,058 x$$

$$x = 17,56$$

$$\% Recovery = x 100 \% = 87,8 \%$$

- Replikasi 3

$$y = 0,058 x - 0,029$$

$$0,988 = 0,058 x - 0,029$$

$$1,017 = 0,058 x$$

$$x = 17,53$$

$$\% Recovery = x 100 \% = 87,65 \%$$

- Replikasi 4

$$y = 0,058 x - 0,029$$

$$0,992 = 0,058 x - 0,029$$

$$1,021 = 0,058 x$$

$$x = 17,6$$

$$\% Recovery = x 100 \% = 88 \%$$

- Replikasi 5

$$y = 0,058 x - 0,029$$

$$0,990 = 0,058 x - 0,029$$

$$1,019 = 0,058 x$$

$$x = 17,56$$

$$\% Recovery = x 100 \% = 87,8 \%$$

- Replikasi 6

$$y = 0,058 x - 0,029$$

$$0,994 = 0,058 x - 0,029$$

$$1,023 = 0,058 x$$

$$x = 17,63$$

$$\% Recovery = x 100 \% = 88,15 \%$$

Nilai % Recovery = = 87,86 %

3. Konsentrasi 120%

• Replikasi 1

$$y = 0,058 x - 0,029$$

$$1,123 = 0,058 x - 0,029$$

$$1,152 = 0,058 x$$

$$x = 19,86$$

$$\% Recovery = x 100 \% = 90,27 \%$$

• Replikasi 2

$$y = 0,058 x - 0,029$$

$$1,126 = 0,058 x - 0,029$$

$$1,155 = 0,058 x$$

$$x = 19,91$$

$$\% Recovery = x 100 \% = 90,5 \%$$

• Replikasi 3

$$y = 0,058 x - 0,029$$

$$1,124 = 0,058 x - 0,029$$

$$1,153 = 0,058 x$$

$$x = 19,87$$

$$\% Recovery = x 100 \% = 90,31 \%$$

• Replikasi 4

$$y = 0,058 x - 0,029$$

$$1,137 = 0,058 x - 0,029$$

$$1,166 = 0,058 x$$

$$x = 20,10$$

$$\% Recovery = x 100 \% = 91,36 \%$$

• Replikasi 5

$$y = 0,058 x - 0,029$$

$$1,132 = 0,058 x - 0,029$$

$$1,161 = 0,058 x$$

$$x = 20,01$$

$$\% Recovery = x \ 100 \% = 90,95 \%$$

- Replikasi 6

$$y = 0,058 x - 0,029$$

$$1,141 = 0,058 x - 0,029$$

$$1,17 = 0,058 x$$

$$x = 20,17$$

$$\% Recovery = x \ 100 \% = 91,68 \%$$

$$Nilai \% Recovery = 90,84 \%$$

L.5.5 Perhitungan LOD & LOQ

No	Nama	Konsentrasi	y	\hat{y}	$(y-\hat{y})$	$(y-\hat{y})^2$
1	Blanko	0	0,007	0,0119	-0,0049	0,00002401
2	Standar 1	0,5	0,036	0,038	-0,002	0,0000004
3	Standar 2	1	0,066	0,0642	0,0018	0,00000324
4	Standar 3	1,5	0,095	0,0903	0,0047	0,00002209
5	Standar 4	2	0,126	0,1165	0,0095	0,00009025
6	Standar 5	2,5	0,142	0,1426	-0,0006	0,00000036
7	Standar 6	3	0,162	0,1688	-0,0068	0,00004624
8	Standar 7	3,5	0,194	0,2029	-0,0089	0,00007921
Jumlah						0,00010322
SD x/y						0,000012
LOD						0,00098662
LOQ						0,00328872

Persamaan Regresi Linier

$$y = 0,0523x + 0,0119$$

Luas Puncak Berdasarkan Persamaan Regresi (\hat{y})

$$a) \ y = 0,0523x + 0,0119$$

$$y = 0,0523 (0) + 0,0119$$

$$y = 0,0119$$

$$b) \ y = 0,0523x + 0,0119$$

$$y = 0,0523 (0,5) + 0,0119$$

$$y = 0,038$$

$$\text{c) } y = 0,0523x + 0,0119$$

$$y = 0,0523 (1) + 0,0119$$

$$y = 0,0642$$

$$\text{d) } y = 0,0523x + 0,0119$$

$$y = 0,0523 (1,5) + 0,0119$$

$$y = 0,0903$$

$$\text{e) } y = 0,0523x + 0,0119$$

$$y = 0,0523 (2) + 0,0119$$

$$y = 0,1165$$

$$\text{f) } y = 0,0523x + 0,0119$$

$$y = 0,0523 (2,5) + 0,0119$$

$$y = 0,1426$$

$$\text{g) } y = 0,0523x + 0,0119$$

$$y = 0,0523 (3) + 0,0119$$

$$y = 0,1688$$

$$\text{h) } y = 0,0523x + 0,0119$$

$$y = 0,0523 (3,5) + 0,0119$$

$$y = 0,2029$$

$$\text{a. SD} = \frac{\sum((y-\hat{y})^2 : (n-2))}{(0,00010322 : (8-2))}$$

$$= 0,000012$$

$$\text{b. LOD} =$$

$$=$$

$$= 0,00098662$$

$$\text{c. LOQ} =$$

$$=$$

$$= 0,00328872$$

L.5.6 Perhitungan Kadar Alkaloid Total

No	Sample ID	Absorbansi
1	Replikasi I	0,766
2	Replikasi II	0,728
3	Replikasi III	0,757

Persamaan kurva baku linier

$$y = 0,0583x - 0,0281$$

$$r^2 = 0,9994$$

$$\text{Kadar (\% b/b)} = x \cdot 100 \%$$

Keterangan :

C = Konsentrasi dalam larutan sampel (ppm)

V = Volume akhir (mL)

10^{-6} = konversi dari ppm ke gram/mL

W = berat sampel yang dianalisis

1. Replikasi I

$$0,766 = 0,0583x - 0,0281$$

$$0,794 = 0,0583x$$

$$x = 13,62 \text{ ppm}$$

Berat sampel = 10,04 mg

$$\text{Kadar (\% b/b)} = x \cdot 100 \%$$

$$\begin{aligned} \text{Kadar (\% b/b)} &= x \cdot 100 \% \\ &= 1,356 \% \end{aligned}$$

2. Replikasi II

$$0,728 = 0,0583x - 0,0281$$

$$0,756 = 0,0583x$$

$$x = 12,96 \text{ ppm}$$

Berat sampel = 10,01 mg

$$\text{Kadar (\% b/b)} = x \cdot 100 \%$$

$$\begin{aligned} \text{Kadar (\% b/b)} &= x \cdot 100 \% \\ &= 1,294 \% \end{aligned}$$

3. Replikasi III

$$0,757 = 0,0583x - 0,02$$

$$0,785 = 0,0583x$$

$$x = 13,46 \text{ ppm}$$

$$\text{Berat sampel} = 10,03 \text{ mg}$$

$$\text{Kadar (\% b/b)} = x \cdot 100 \%$$

$$\text{Kadar (\% b/b)} = x \cdot 100 \%$$

$$= 1,341 \%$$

Perhitungan %RSD

$$\text{Nilai rata-rata kadar alkaloid (\% b/b)} =$$

=

$$= 1,33 \% \text{ b/b}$$

$$\text{SD} = 0,032$$

$$\% \text{ RSD} = 0,024$$