

BAB IV

PROSEDUR PENELITIAN

4.1. Penyiapan Bahan

Penyiapan bahan meliputi pengumpulan bahan, determinasi, dan pembuatan simplisia yang meliputi pencucian, sortasi bahan, pengeringan, penggilingan dan penyimpanan bahan.

4.1.1. Pengumpulan bahan

Daun tomat yang digunakan merupakan daun yang terletak diantara pucuk dan daun pangkal dari tanaman, dengan waktu pengambilan sebelum tanaman tomat mengalami masa produktif dan sesudah masa panen fase ketiga berakhir, yang diperoleh dari Desa Cibodas, Kecamatan Lembang, Kabupaten Bandung Barat.

4.1.2. Determinasi

Determinasi tanaman dilakukan di Herbarium Bandungense, SITH, ITB. Tujuan determinasi tumbuhan adalah untuk memastikan kebenaran dari jenis tumbuhan yang akan digunakan dalam penelitian.

4.1.3. Pembuatan simplisia

Untuk pembuatan simplisia, daun tomat dibersihkan terlebih dahulu dengan mencucinya dengan air mengalir. Setelah dicuci bersih, bahan ditiriskan untuk membebaskan air cucian. kemudian dikeringkan. Proses pengeringan dilakukan selama 10 hari. Bahan yang telah kering di haluskan menjadi serbuk

kemudian disimpan di dalam wadah kedap udara dan terlindung dari cahaya matahari.

4.2. Pemeriksaan Makroskopik

Makroskopik daun diamati secara langsung menggunakan pancaindra, pengamatan dilakukan pada daun tomat segar, bagian yang diamati meliputi bentuk daun, macam daun, lebar dan panjang daun diukur menggunakan penggaris.

4.3. Pemeriksaan Mikroskopik

Pemeriksaan mikroskopik dilakukan dengan cara melihat struktur dan fragmen khas yang terdapat dalam bahan dibawah mikroskop serta karakteristik penanda lain. Pemeriksaan struktur daun untuk melihat tipe stomata, trikoma, epidermis, mesofil (palisade, spons) dan berkas pembuluh.

4.3.1. Struktur daun tomat

Pereaksi Kloral Hidrat, I₂KI, floroglusinol 1-2 tetes diletakkan pada kaca objek, kemudian ditambahkan irisan tipis daun, lalu ditutup dengan kaca penutup dan diamati dibawah mikroskop. Untuk floroglusinol sebelum ditutup dengan kaca penutup, dikeringkan terlebih dahulu lalu kemudian ditetesi HCl.

4.3.2. Fragmen serbuk daun tomat

Pereaksi pada 4.3.1. secukupnya (1-2 tetes) diletakkan pada kaca objek kemudian ditambahkan serbuk simplisia, lalu ditutup dengan kaca penutup lalu diamati di bawah mikroskop.

4.4. Parameter Standar Non Spesifik

4.4.1. Parameter kadar air

Pengukuran kadar air dilakukan dengan metode *azeotroph*. Metode *azeotroph* ini dapat mengukur secara langsung kadar air dari bahan uji. Pertama-tama dilakukan penjenuhan toluen terlebih dahulu, dimana 20 mL toluene dan 2 mL akuades dimasukkan dalam labu destilasi kemudian dilakukan penjenuhan selama 2 jam, akuades yang terbaca diskala menjadi data n. Tabung penerima dan pendingin dibilas dengan air, kemudian 20 gram serbuk daun tomat dimasukkan ke dalam labu bundar yang berisi toluen yang telah dijenuhkan dengan akuades, dihubungkan ke alat. Toluene yang ada di dalam tabung penerima dituangkan kembali melalui alat pendingin.

Setelah toluene mulai mendidih, dilakukan penyulingan dengan kecepatan 2 tetes per detik, hingga sebagian air sudah tersuling, kemudian kecepatan penyulingan dinaikkan hingga 4 tetes tiap detik hingga semua akuades tersuling. Setelah itu bagian dalam pendingin dicuci dengan toluene, sambil dibersihkan dengan sikat tabung yang disambungkan pada sebuah kawat tembaga. Penyulingan dilanjutkan selama 5 menit. Kemudian tabung penerima pendingin dibiarkan pada suhu kamar. Jika terdapat tetesan akuades melekat pada tabung penerima, maka perlu di gosok dengan karet yang diikatkan pada sebuah kawat tembaga dan dibasahi dengan toluene hingga tetesan akuades turun. Setelah air dan toluene memisah sempurna, volume air dalam tabung penerima dibaca sebagai data n₁, lalu kadar air dihitung (WHO, 2011: 35).

$$\text{kadar air} = \frac{100(n1 - n)}{w} \quad (1)$$

Keterangan :

- w** = berat simplisia yang ditimbang dalam gram
n = jumlah air yang diperoleh dari destilasi pertama
n1 = jumlah air yang diperoleh dari destilasi kedua

4.4.2. Parameter kadar abu

Parameter kadar abu bertujuan untuk memberikan gambaran kandungan mineral internal dan eksternal yang berasal dari proses awal hingga terbentuknya ekstrak.

a. Penetapan kadar abu total

Sebanyak dua gram serbuk daun tomat dimasukkan ke dalam kurs silikat yang telah dipijarkan dan ditara, dan diratakan. Kemudian dipijarkan pada suhu 500-600°C perlahan-lahan hingga arang habis, warna putih menunjukkan tidak adanya karbon. Jika dengan cara ini arang tidak dapat dihilangkan, residu ditambahkan 2 mL larutan jenuh ammonium nitrat lalu diuapkan diatas *waterbath*. Kemudian dipijarkan kembali, dan didinginkan dalam desikator lalu ditimbang. Kadar abu terhadap bahan yang telah dikeringkan diudara dihitung (WHO, 2011: 29).

$$\text{Kadar Abu}(\%) = \frac{\text{Berat abu}}{\text{Berat sampel}} \times 100\% \quad (2)$$

b. Penetapan kadar abu tidak larut asam

Abu yang diperoleh pada penetapan kadar abu, didihkan dengan 20 mL asam klorida 10% selama 5 menit. Bagian yang tidak larut dalam asam dikumpulkan, lalu disaring dengan kertas saring bebas abu, dicuci dengan air panas hingga filtratnya netral, kemudian dipijarkan hingga bobot tetap.

Residu dibiarkan dingin dalam desikator selama 30 menit, dan ditimbang. Kadar abu tidak larut dalam asam terhadap bahan yang telah dikeringkan diudara dihitung (WHO, 2011: 29).

$$\text{Kadar Abu}(100\%) = \frac{\text{Berat abu total} - \text{Berat abu larut asam}}{\text{Berat sampel}} \times 100\% \quad (3)$$

4.4.3. Parameter susut pengeringan

Sebanyak satu gram simplisia dimasukkan ke dalam cawan penguap yang sebelumnya telah dipanaskan pada suhu 105°C selama 30 menit dan telah ditara hingga didapat bobot konstan. Sebelum ditimbang serbuk diratakan dalam cawan, dengan cara cawan digoyang-goyangkan, hingga isi merupakan lapisan setebal lebih kurang 5 mm – 10 mm. Kemudian dikeringkan pada suhu 105°C hingga bobot tetap dengan cara setiap 10 menit sekali cawan di ambil dan ditimbang hingga selisih bobot awal dengan akhir 0,5 mg. Sebelum setiap dilakukan penimbangan, cawan penguap dibiarkan dingin dalam keadaan tertutup di dalam eksikator hingga suhu kamar (WHO, 2011: 35).

$$\text{Susut Pengeringan} = \frac{\text{Berat awal} - \text{Berat zat yang dipanaskan}}{\text{Berat zat awal}} \times 100\% \quad (4)$$

4.4.4. Parameter Bobot Jenis

Digunakan piknometer dan harus dalam keadaan bersih, kering serta telah dikalibrasi terlebih dahulu dengan menetapkan bobot piknometer dan bobot air yang baru dididihkan pada suhu 25°C. Ekstrak cair suhu 20°C dimasukkan ke dalam piknometer, suhu piknometer yang telah terisi diatur hingga mencapai 25°C, kelebihan ekstrak cair dibuang lalu piknometer ditimbang. Bobot piknometer kosong dikurangkan dari bobot piknometer yang telah diisi. Bobot

jenis ekstrak cair adalah hasil yang diperoleh dengan membagi bobot ekstrak dengan bobot air, dalam piknometer pada suhu 25⁰C (Depkes RI, 2000).

$$\text{Berat Jenis Ekstrak Cair } \left(\frac{\text{g}}{\text{mL}} \right) = \frac{W_3 - W_1}{W_2 - W_1} \quad (5)$$

Keterangan:

W1=Bobot piknometer kosong

W2=Bobot piknometer terisi etanol

W3=Bobot piknometer terisi ekstrak cair

4.5. Parameter Standar Spesifik

4.5.1. Parameter organoleptik

Parameter organoleptik dilakukan dengan menggunakan pancaindera, dimana bahan dideskripsikan berdasarkan bentuk, warna, bau, rasa (Depkes RI, 2000: 31). Pengamatan dilakukan oleh lima orang relawan.

4.5.2. Parameter senyawa terlarut dalam pelarut tertentu

Parameter senyawa terlarut dalam pelarut tertentu bertujuan untuk memberikan gambaran awal jumlah senyawa kandungan. Terdapat dua prosedur yang dilakukan, yaitu:

a. Kadar senyawa yang larut dalam air

Serbuk daun tomat sebanyak 2 gram bahan di maserasi selama 24 jam dengan 100 mL campuran akuades kloroform dalam gelas kimia sambil dikocok berkali-kali selama 6 jam pertama dan kemudian dibiarkan selama 18 jam. Filtratnya disaring, kemudian 20 mL filtrat diuapkan dalam cawan dangkal berdasar rata yang telah ditara. Residu dipanaskan pada suhu 105⁰C hingga bobot tetap dengan cara setiap 10 menit sekali cawan ditimbang hingga didapatkan selisih bobot awal dengan akhir 0,5mg.

Kadar dalam persen senyawa yang larut dalam air dihitung terhadap ekstrak awal (WHO, 2011: 31).

$$\text{Kadar Sari Larut Air} = \frac{\text{Berat Sari}}{\text{Berat Bahan}} \times \frac{100}{20} \times 100\% \quad (6)$$

b. Kadar senyawa yang larut dalam etanol

Serbuk daun tomat sebanyak 2 gram bahan dimaserasi selama 24 jam dengan 100 mL etanol (95%) menggunakan maserator sambil berkali-kali dikocok selama 6 jam pertama dan kemudian didiamkan selama 18 jam. Filtrat disaring dengan cepat untuk menghindari penguapan etanol, kemudian 20 mL filtrat diuapkan hingga kering dalam cawan dangkal berdasar rata yang telah ditara. Residu dipanaskan pada suhu 105°C hingga bobot tetap dengan cara setiap 10 menit sekali cawan ditimbang hingga didapatkan selisih bobot awal dengan akhir 0,5mg. Kadar dalam persen senyawa yang larut dalam etanol (95%), dihitung terhadap ekstrak awal (WHO, 2011: 31).

$$\text{Kadar Sari Larut Etanol} = \frac{\text{Berat Sari}}{\text{Berat Bahan}} \times \frac{100}{20} \times 100\% \quad (7)$$

4.6. Penapisan Fitokimia

4.6.1. Senyawa alkaloid

Sebanyak 2 gram serbuk daun tomat ditempatkan ke dalam mortar basah, lalu ditambahkan 5mL amoniak 25%, dicampur dengan 20mL kloroform kemudian digerus kembali dengan kuat. Campuran disaring kemudian filtrat larutan organik diambil sebagai larutan A. Sebagian filtrat A dimasukkan ke dalam tabung reaksi lalu ditambahkan asam klorida 10% v/v. Fraksi air yang

berada di atas dipisahkan sebagai larutan B. Larutan A diteteskan pada kertas saring, lalu disemprot dengan pereaksi Dragendroff, dan terbentuknya warna merah atau jingga pada kertas menunjukkan adanya golongan senyawa alkaloid. Larutan B dibagi menjadi 2 bagian di dalam tabung reaksi, tabung pertama ditambahkan pereaksi Dragendroff, dan tabung kedua ditambahkan pereaksi Mayer. Terbentuknya endapan merah bata dengan pereaksi Dragendroff atau endapan putih dengan pereaksi Mayer menunjukkan adanya golongan senyawa alkaloid (Farnsworth,1966: 245).

4.6.2. Senyawa polifenolat

Serbuk daun tomat sebanyak 1 gram ditempatkan pada tabung reaksi lalu ditambahkan air secukupnya, lalu dipanaskan di atas penangas air dan disaring. Kepada filtrat ditambahkan larutan pereaksi besi (III) klorida dan timbulnya warna hijau atau biru-hijau, merah ungu, biru-hitam hingga hitam menandakan positif fenolat atau timbul endapan coklat menunjukkan adanya fenolat (Farnsworth,1966: 255).

4.6.3. Senyawa flavonoid

Serbuk daun tomat sebanyak 1 gram ditempatkan pada gelas kimia, lalu ditambahkan 100 mL air panas dan didihkan selama 10 menit. Kemudian campuran disaring, filtrat ditampung sebagai larutan C yang nantinya akan digunakan untuk pemeriksaan golongan senyawa flavonoid, saponin, dan kuinon. Larutan C sebanyak 5 mL dimasukkan kedalam tabung reaksi, kemudian ditambahkan serbuk magnesium dan 1 mL asam klorida pekat. Campuran ditambahkan amilalkohol, dikocok dengan kuat lalu dibiarkan hingga terjadi

pemisahan. Terbentuknya warna dalam lapisan amilalkohol menunjukkan adanya golongan senyawa flavonoid (Farnsworth,1966: 263).

4.6.4. Senyawa saponin

Larutan C 5 mL dimasukkan ke dalam tabung reaksi, lalu dikocok selama 10 detik. Dibiarkan selama 10 menit, kemudian diamati. Terbentuknya busa 1cm yang stabil di dalam tabung reaksi menunjukkan adanya golongan senyawa saponin. Busa tersebut masih tetap ada setelah ditambahkan beberapa tetes asam klorida (Farnsworth,1966: 257).

4.6.5. Senyawa kuinon

Larutan C 5 mL dimasukkan ke dalam tabung reaksi, lalu ditambahkan beberapa tetes larutan Natrium hidroksida 1 N. Terbentuknya warna kuning hingga merah menandakan adanya golongan senyawa kuinon (Farnsworth,1966: 265).

4.6.6. Senyawa tanin

Sebanyak 1 gram serbuk daun tomat ditambahkan 100 mL air panas, kemudian dididihkan selama 15 menit. Campuran kemudian didinginkan dan disaring. Filtrat dibagi menjadi 3 bagian didalam tabung reaksi. Filtrat pertama ditambahkan larutan besi (III) klorida 1%. Terbentuknya warna biru atau hitam kehijauan menunjukkan adanya golongan senyawa tanin. Filtrat kedua ditambahkan putih telur, terbentuknya endapan putih menunjukkan adanya golongan tannin, dan filtrat ketiga ditambahkan 15 mL pereaksi Steasny, lalu dipanaskan di atas penangas air. Terbentuknya endapan merah muda menunjukkan adanya tannin katekat. Hasil uji filtrat ketiga disaring, kemudian

dijenuhkan dengan ditambahkan natrium asetat, kemudian beberapa tetes larutan besi (III) klorida 1%. Terbentuknya warna biru tinta menunjukkan adanya tannin galat (Farnsworth,1966: 264).

4.6.7. Senyawa monoterpen dan sesquiterpen

Sebanyak 1gram serbuk digerus lalu ditambahkan dengan eter, dikocok dan disaring. Filtrat yang didapat ditempatkan di dalam cawan penguap dan dibiarkan menguap hingga kering, lalu ditambahkan vanillin 10% dalam asam klorida pekat dan timbulnya warna-warna menandakan positif mengandung senyawa monoterpen dan sesquiterpen (Depkes, 1977: 132).

4.6.8. Senyawa triterpenoid dan steroid

Sebanyak 1gram serbuk digerus lalu ditambahkan dengan eter, dikocok dan disaring. Filtrat yang didapat ditempatkan dalam cawan penguap lalu dibiarkan mengering, kemudian ditambahkan larutan pereaksi Liebermann-Burchard dan terbentuknya warna merah ungu menandakan adanya senyawa terpenoid, sedangkan bila warnanya hijau-biru menandakan positif adanya steroid (Farnsworth,1966: 259).

4.7. Ekstraksi

Serbuk daun tomat 820 gram dimasukkan ke dalam maserator, kemudian ditambahkan pelarut etanol 95% sebanyak 2 liter lalu diaduk secara merata, ditutup dengan menggunakan alumunium foil dan didiamkan selama 24 jam. Maserat pertama ditampung dan disaring, disimpan kemudian diganti dengan pelarut etanol 95% kembali. Langkah diulang hingga 3 kali pengulangan. Ekstrak

yang didapat kemudian di pekatkan dengan *vacum rotatory vaporator* pada suhu 50°C dengan kecepatan 50 rpm. Ekstrak hasil vaporasi kemudian dipekatkan lebih lanjut dengan pemanasan menggunakan penangas air pada suhu 40°C.

4.8. Fraksinasi dan pemantauan fraksi

Ekstrak kental yang didapat ditambahkan HCl 10% sampai pH 2-3 lalu disaring dan diambil filtrat, kemudian filtrat ditambahkan etil asetat dalam corong pisah. Lapisan etil asetat dipisahkan, sedangkan lapisan HCL dimasukkan kembali kedalam corong dan ditambahkan amoniak, lalu dikocok dengan kuat sehingga homogen, lalu ditambahkan kembali dengan etil asetat. Terbentuk dua lapisan yaitu lapisan etil asetat dan lapisan asam. Lapisan asam dibuang, dan lapisan etil asetat lah yang merupakan fraksi alkaloid total, kemudian lapisan etil asetat dipekatkan hingga bau pelarut hilang (Titis dkk., 2013: 197).

Fraksi alkaloid dianalisis dengan KLT, dengan cara cuplikan ditotolkan pada plat silika gel GF 254 dengan fase gerak campuran kloroform-metanol(8:2) dan sebagai penampak bercak disemprotkan Dragendorff. Terbentuknya warna merah bata menandakan adanya alkaloid. Hasilnya diamati di bawah detektor UV 254 nm dan 365 nm, kemudian bercak dihitung harga Rfnya.

4.9. Uji aktivitas Antibakteri

4.9.1. Sterilisasi bahan dan alat

Untuk mencegah terjadinya kontaminasi pada saat melakukan uji difusi dilakukan sterilisasi alat dan bahan yang akan digunakan terlebih dahulu. Proses

sterilisasi menggunakan *autoclave* pada suhu 121°C tekanan 2 atm selama 15 menit.

4.9.2. Pembuatan medium agar dan difusi bakteri

Sebanyak 5 gram *Nutrient Agar* (NA) dimasukkan ke dalam gelas Beaker ukuran 250 mL kemudian ditambahkan 250 mL akuades. Hasil campuran tersebut kemudian dipanaskan di atas *hotplate* dengan *stirrer* hingga agar berubah menjadi kuning jernih (Oktavianus, 2013: 21). Gelas Beaker kemudian ditutup menggunakan sumbat kapas dan aluminium foil, lalu dilakukan sterilisasi dengan *autoclave* pada suhu 121° tekanan 2 atm selama 15 menit, kemudian disimpan dalam lemari es.

Sedangkan untuk suspensi bakteri, inokula *Ralstonia solanacearum* diambil menggunakan jarum ose lalu dimasukkan ke dalam tabung reaksi berisi 5mL *Nutrient Broth* (NB) yang telah steril, kemudian di *vortex* selama 3 menit dan diinkubasi selama 24 jam dalam inkubator bersuhu 37°C. Suspensi yang telah di inkubasi di ukur transmittannya dengan spektrofotometer UV pada panjang gelombang 530 nm hingga transmittan mencapai 25%.

Ekstrak daun tomat sebelum dan sesudah panen ditimbang 0,25 gram kemudian ditambahkan DMSO (Dimetil Sulfoxida) hingga 25 mL dalam labu takar untuk membuat larutan stok 1%. Kemudian larutan stok diencerkan hingga konsentrasi 0,6%, 0,4%, 0,2%. Untuk fraksi sebelum dan sesudah panen ditimbang 1,25gram kemudian ditambahkan DMSO 25mL dalam labu takar untuk membuat larutan stok 5%, kemudian larutan stok diencerkan hingga konsentrasi 3%, 2%, 1%.

4.9.3. Pengujian aktivitas anti bakteri

NA stok steril dicairkan terlebih dahulu dengan dipanaskan diatas penangas api pada suhu 100°C hingga mencair, dan dibiarkan hingga suhu berkisar 45°C .

Sebanyak $10\mu\text{L}$ suspensi bakteri dimasukkan kedalam cawan petri, kemudian ditambahkan NA sebanyak 20mL , lalu digoyang-goyangkan agar homogen dan dibiarkan memadat. Agar dalam cawan petri dilubangi sehingga menghasilkan 4 sumur. Masing-masing sumur kemudian diisi dengan urutan konsentrasi terkecil, konsentrasi terbesar, DMSO sebagai kontrol negatif dan antibiotik pembanding streptomisin 20% sebagai kontrol positif. Cawan petri yang telah siap di inkubasi dalam inkubator 37°C selama 24 jam.

Kemampuan ekstrak dan fraksi sebagai antibakteri ditunjukkan dengan adanya daya hambat (zona bening) disekitar sumur. Untuk mendapatkan nilai dari zona bening yang dihasilkan dilakukan pengukuran diameternya dengan menggunakan jangka sorong. Dari kedua sampel kemudian dibandingkan kemampuan daya hambat dari tiap konsentrasinya (Oktavianus,2013: 22).

4.9.4. Analisis data pengujian antibakteri

Data percobaan dianalisis menggunakan analisis uji Anova satu arah, dilanjutkan dengan uji Tukey, dan analisis T-student, dimana data merupakan tiga kelompok, dan dua kelompok tidak berpasangan, data yang diuji dianggap berdistribusi normal karena pengujian dilakukan dalam laboratorium dan dilakukan secara pengukuran. Hipotesis:

H₀: Tidak terdapat perbedaan zona hambat yang signifikan antara ekstrak sebelum panen, setelah panen dan antibiotik terhadap pertumbuhan bakteri *Ralstonia solanacearum*.

– Tidak terdapat perbedaan zona hambat yang signifikan antara fraksi sebelum panen, setelah panen dan antibiotik terhadap pertumbuhan bakteri *Ralstonia solanacearum*.

– Tidak terdapat perbedaan zona hambat yang signifikan antara fraksi dan ekstrak terhadap pertumbuhan bakteri *Ralstonia solanacearum*.

H₁: Terdapat perbedaan zona hambat yang signifikan antara ekstrak sebelum panen, setelah panen dan antibiotik terhadap pertumbuhan bakteri *Ralstonia solanacearum*.

– Terdapat perbedaan zona hambat yang signifikan antara fraksi sebelum panen, setelah panen dan antibiotik terhadap pertumbuhan bakteri *Ralstonia solanacearum*.

– Terdapat perbedaan zona hambat yang signifikan antara fraksi dan ekstrak terhadap pertumbuhan bakteri *Ralstonia solanacearum*.

4.10. Pembuatan Pereaksi Dragendroff

Pereaksi Dragendroff dibuat dengan dua larutan persediaan. Larutan 1: 0,4 gram Bismuth subnitrat dalam 10 mL HNO₃ 30%. Larutan 2: 13,6 gram Kalium Iodide dalam 25mL air. Larutan persediaan ini kemudian dicampur, dan

didiamkan selama 24 jam. Larutan lalu disaring kemudian ditambahkan akuades hingga 50mL (Harborne, 1996: 240).

4.11. KLT Preparatif

Cuplikan yang akan dipisahkan ditotolkan berupa garis pada salah satu sisi pelat lapisan besar dan tegak lurus berukuran 20x20 cm pada garis cuplikan sehingga campuran akan terpisah menjadi beberapa pita, lalu cuplikan dikembangkan dengan pelarut kloroform-metanol (8:2). Pengembangan dilakukan pada *chamber* penuh uap eluen agar pemisahan lebih sempurna. Pita ditampakkan dengan cara disemprotkan penampak bercak Dragendroff pada sisi kanan kiri plat, dan penjerap yang mengandung pita yang positif alkaloid dikerok dari pelat kaca. Hasil dimasukkan kedalam tabung Erlenmeyer lalu ditambahkan pelarut metanol kedalamnya, lalu larutan disaring hingga silika gel terpisah. Filtrat kemudian diuapkan hingga diperoleh kristal (Gritter *et.al.*, 1991:140).

4.12. Uji Kemurnian

4.12.1. Kromatografi dua dimensi

Pengembangan dilakukan pada plat KLT 10x10 cm. Eluen sebagai pengembang pertama menggunakan fase kloroform dan pengembang kedua menggunakan metanol. Metode ini merupakan cara sederhana untuk menentukan kemurnian isolat alkaloid. Bercak yang dihasilkan pada pengembangan pertama dikeringkan terlebih dahulu, sebelum dilakukan pengembangan dengan kloroform:metanol (8:2). Pada pengembangan kedua, plat KLT hasil

pengembangan pertama diputar 90°C , sehingga posisi bercak berada dibawah. Hasil pengembangan membuktikan bahwa tidak ada bercak baru setelah dilakukan pengembangan kedua dengan kloroform:metanol (4:6). Bercak dideteksi dengan penyemprotan Dragendroff sebagai penampak bercak. Adanya warna merah bata menandakan bercak merupakan alkaloid.

4.12.2. Kromatografi pengembang tunggal

Pengembangan dilakukan pada 3 plat KLT berukuran $1,5 \times 10$ cm. Cuplikan ditotolkan pada masing-masing plat, kemudian dikembangkan dengan eluen yang berbeda kepolarannya. Eluen sebagai pengembang yang bersifat polar plat pertama menggunakan fase kloroform:metanol dengan perbandingan 4:6. Pengembang yang bersifat semi polar plat kedua menggunakan kloroform:metanol 8:2, dan pengembang yang bersifat non polar digunakan kloroform:n-heksan 6:4. Bercak yang didapat dideteksi dengan disemprotkan Dragendroff sebagai penampak bercak. Adanya warna merah bata menandakan bercak merupakan alkaloid.

4.13. Karakterisasi dan Identifikasi Alkaloid

4.13.1. Spektrofotometer UV-Sinar Tampak

Kristal hasil pemurnian dilarutkan dengan metanol. Blanko yang digunakan adalah metanol pro analisis. Optimasi panjang gelombang dilakukan untuk menentukan panjang gelombang maksimum yang akan digunakan dalam pengukuran menggunakan spektrofotometer UV-Sinar Tampak. Langkah

selanjutnya adalah penentuan absorbansi larutan sampel pada panjang gelombang maksimum.

4.13.2. Spektrofotometer Infra Merah Transformasi Fourier (FTIR)

Hasil isolasi diletakan pada alat Spektrofotometer FTIR lalu diukur pada daerah frekuensi $4000-650\text{ cm}^{-1}$, Spektrum yang muncul dianalisis dengan cara dibandingkan dengan pustaka (Panji, 2012: 19).

