

ISOLATION AND DETERMINATION OF *Hibiscus rosa-sinensis* L. FLOWERS ETHANOLIC EXTRACT USING SPECTRODENSITOMETRY

ISOLASI DAN PENETAPAN KADAR ALKALOID EKSTRAK ETANOLIK BUNGA KEMBANG SEPATU (*Hibiscus rosa-sinensis* L.) SECARA SPEKTRODENSITOMETRI

Kurniati Pamungkas, Mimiek Murrulkimihadi*

Faculty of Pharmacy, Universitas Gadjah Mada, Yogyakarta, Indonesia

ABSTRACT

This research aims to isolate and determine relative concentration of alkaloid in Hibiscus rosa-sinensis L flowers. using spectrodensitometry. Ethanolic extract of H. rosa-sinensis flowers was made by maceration methode using etanol 70% as solvent. Fractionation of alkaloid compound was using VLC (Vaccum Liquid Chromatography) and using organic solfent mixture of methanol-ethyl acetate in variation concentration. Isolate was used as standard curve, then the concentration of H. rosa-sinensis flowers extract was determined using spectrodensitometry with silica gel as stationer phase and ethyl acetate: methanol (1:5 v / v) as mobile phase. The relative concentration of alkaloid was calculated by using standard curve $Y = 29023.75 X + 5809.35$, $r = 0.996$. Determination of isolate showed the relative concentration of alkaloid was 0.210 ± 0.035 % and this can be used as marker compound.

Keyword: H. rosa-sinensis flowers, compound isolation, concentration determination, alkaloid, spectrodensitometry

ABSTRAK

*Penelitian ini bertujuan untuk melakukan isolasi dan mengetahui kadar relatif alkaloid pada bunga kembang sepatu (*Hibiscus rosa-sinensis* L.) secara spektrodensitometri. Ekstrak etanolik bunga kembang sepatu dibuat dengan metode maserasi menggunakan pelarut etanol 70%. Pemisahan senyawa alkaloid dilakukan dengan fraksinasi menggunakan VLC (Vaccum Liquid Chromatography) dan menggunakan campuran pelarut metanol-etilasetat dengan variasi konsentrasi. Hasil isolasi selanjutnya digunakan sebagai kurva baku, kemudian ditetapkan kadar sampel ekstrak bunga kembang sepatu secara spektrodensitometri dengan menggunakan fase diam silika gel dan fase gerak etil asetat: metanol (1:5 v/v). Kadar relatif alkaloid dihitung menggunakan kurva baku $Y = 29023,75 X + 5809,35$, $r = 0,996$. Didapatkan kadar relatif alkaloid sebesar $0,210 \pm 0,035$ % dan dapat diijadikan sebagai suatu senyawa penanda.*

Kata kunci : Bunga kembang sepatu, isolasi senyawa, penetapan kadar, alkaloid, spektrodensitometri.

PENDAHULUAN

Tumbuhan-tumbuhan obat perlu diteliti agar diketahui senyawa aktif yang terkandung dan diteliti aspek farmakologinya baik dari segi efektivitas maupun toksisitasnya. Metode ekstraksi dan isolasi komponen aktif menggunakan teknologi modern diharapkan dapat menciptakan standar mutu modern dan pengembangan formulasinya. Hal ini dapat dijadikan bukti ilmiah dari khasiat serta keamanan tumbuhan tersebut untuk dikonsumsi sebagai obat. Dari bukti ilmiah tersebut, pengembangan obat melalui berbagai penelitian senyawa marker

atau senyawa penanda perlu dilakukan bertujuan sebagai standardisasi produk herbal dan dapat menjadi referensi material bagi peningkatan produk herbal Indonesia (Eye, 2007). Salah satu tanaman yang potensial sebagai obat adalah bunga kembang sepatu (*Hibiscus rosa-sinensis* L.) yang berkhasiat sebagai pelembut kulit, peluruh dahak, penurun panas (Anonim, 1985).

Bunga Kembang Sepatu mengandung hibisetin, sedangkan batang dan daunnya mengandung Ca-oksalat, peroxidase, lemak dan protein dan berguna sebagai obat sakit panas, batuk, sariawan, bronkhitis, gonorrhoea, gondok dan sakit kepala (Dalimartha, 1999). Menurut Mishra (2012) ekstrak bunga kembang sepatu mengandung alkaloid.

Corresponding author : Mimiek Murrulkimihadi
E-mail: mimiekmurrulkimihadi@ymail.com

Suatu tanaman obat perlu untuk diketahui senyawa penandanya (Patterson, 2006) baik senyawa aktif, penanda analitik maupun penanda negatif. Senyawa penanda merupakan senyawa yang terdapat dalam bahan alam dan dideteksi untuk keperluan khusus (contoh untuk tujuan identifikasi atau standardisasi) melalui penelitian (Patterson, 2006). Berkaitan dengan itu, alkaloid merupakan senyawa organik yang banyak ditemukan pada akar, biji, ranting, kulit kayu pada banyak tumbuhan (Putra, 2007) dan jarang ditemukan pada bunga. Lenny (2006) melaporkan bahwa alkaloid umumnya ditemukan dalam kadar yang kecil.

VLC merupakan kolom kromatografi dikemas kering dan biasanya menggunakan penjerap dengan mutu KLT dalam keadaan vakum agar diperoleh kerapatan kemasan maksimum (Hostettman *et al.*, 1995). Kromatografi Lapis Tipis preparatif adalah cara yang ideal untuk pemisahan cuplikan kecil (50 mg-1 g) dari senyawa yang tidak mudah menguap. Penetapan kadar suatu senyawa dilakukan dengan mengukur kerapatan noda dari senyawa yang bersangkutan dan telah dipisahkan dengan cara kromatografi lapis tipis, menggunakan spektrodensitometer (Supardjan, 1987).

METODOLOGI

Alat dan Bahan

Alat yang digunakan adalah seperangkat alat untuk pembuatan ekstrak, plat silika gel 60 F₂₅₄ (Merck®), bejana pengembang, Spektrodensitometer (CAMAG TLC Scanner 3), Mikropipet. Bahan yang digunakan adalah bunga kembang sepatu (diperoleh dari taman Graha Sabha Pramana, Bulaksumur, Sleman, DIY dan area taman pom besin Sagan), petroleum eter, etanol 70% derajat teknis, toluen:etil asetat:dietilamin (7: 2: 1 v/v), etil asetat:metanol (1:5 dan 1:9 v/v), n-heksan:etil asetat (1:20 v/v) derajat analisis, pereaksi semprot Dragendorff dan serum (IV) sulfat.

Jalannya Penelitian

Pembuatan Ekstrak

Setelah dilakukan determinasi, sampel kemudian dikeringkan dan diserbuk hingga ukuran yang ditentukan. Serbuk dimaserasi selama tiga hari menggunakan pelarut petroleum eter dengan perbandingan 1:10. Ampas diremaserasi kembali menggunakan etanol 70% selama tujuh hari. Maserat yang diperoleh diuapkan sampai diperoleh ekstrak kental etanolik dan dihitung rendemen ekstraknya.

Identifikasi Senyawa

Sejumlah ekstrak kental etanolik bunga kembang sepatu dilarutkan dalam etanol 70% kemudian ditotolkan pada plat KLT yang telah aktif. Plat elusi menggunakan fase gerak toluen : etil asetat : dietilamin (7: 2: 1 v/v), etil asetat:metanol (9:1 v/v), etil asetat: metanol (1:9 v/v) dan identifikasi untuk keperluan isolasi menggunakan campuran etil asetat:metanol (1:5 v/v). Plat hasil elusi diperiksa di bawah lampu UV 254 nm dan 366 nm kemudian disemprot dengan pereaksi warna Dragendorff dan serum(IV)sulfat. Untuk deteksi menggunakan serum(IV)sulfat, setelah disemprot dilanjutkan dengan pemanasan pada oven selama 5 menit pada suhu 100-105°C.

Fraksinasi dengan VLC

Sejumlah silika gel dimasukkan ke dalam kolom hisap hingga ketinggian \pm 2 cm dalam kolom sebagai fase diam. Kemudian ditambahkan 2,5 g ekstrak yang dicampur dengan 6 g silika gel. Sampel elusi dengan delapan variasi fase gerak yaitu etil asetat 100%, etil asetat:metanol dengan berbagai perbandingan (9:1, 5:1, 2:1, 1:1, 1:2, 1:5, 1:9 v/v) dan metanol 100% dengan volume masing-masing 30mL secara bergantian. Kemudian Kolom dihisap sampai kering pada setiap pengumpulan fraksi dengan tekanan 20-70 mmHg (Hostettmann dkk., 1995) kemudian masing-masing ditampung dan diuapkan hingga volum 2 mL.

Isolasi senyawa alkaloid

Fraksi yang teridentifikasi adanya alkaloid ditotolkan pada KLT preparatif kemudian elusi dengan pelarut etil asetat:metanol (1:5 v/v). Plat hasil elusi dideteksi pada sinar tampak, UV 254 nm, UV 366 nm dan pereaksi Dragendorff pada dua tepi plat sehingga dapat dikerok pada bagian tengah plat yang positif terhadap alkaloid. Cuplikan dilarutkan dalam metanol kemudian disaring dengan kolom hisap dan dikering-anginkan sehingga didapatkan bobot isolat.

Analisis Kemurnian

Isolat dilarutkan dalam metanol kemudian ditotolkan pada plat KLT dan elusi dengan tiga variasi fase gerak yaitu etil asetat:metanol (1:5 v/v), etil asetat:metanol (1:9 v/v) dan n-heksan:etil asetat (1:20 v/v). Hasilnya dilihat pada UV 254 dan 366 dan deteksi dengan Dragendorff.

Pengukuran kadar alkaloid

Kurva baku isolat dibuat dengan menotolkan larutan isolat dengan berbagai konsentrasi dan larutan ekstrak pada satu plat KLT.

Sejumlah 12 mg isolat dilarutkan dalam 0,6 mL metanol kemudian ditotolkan pada plat sebanyak 0,01; 0,02 ; 0,03 dan 0,04 mL sebagai zat baku dan 500 mg ekstrak dilarutkan dalam 10 mL metanol dan ditotolkan sebanyak enam kali replikasi dengan volume 0,04 mL. Kemudian dilakukan penetapan λ_{maks} dengan spektrodensitometer dan penetapan kadar dengan spektrodensitometer.

Hasil KLT diukur luas dan intensitas bercaknya dengan spektrodensitometer sehingga akan didapatkan AUC. Penelusuran bercak untuk penetapan kadar tersebut dilakukan pada λ_{maks} .

Analisis Hasil KLT

Analisis hasil KLT pada identifikasi senyawa isolat, bercak yang muncul diamati warnanya di bawah sinar visibel, UV 366 nm dan UV 254 nm. Harga hRf bercak yang muncul, dihitung. Warna bercak yang muncul sebelum perlakuan dibandingkan dengan warna bercak yang muncul setelah perlakuan dengan pereaksi. Warna bercak yang diperoleh dibandingkan dengan yang tercantum dalam literatur. Plat yang disemprot pereaksi serium(IV)sulfat dan Dragendorff, diamati perubahan warna yang terjadi setelah penyemprotan.

Analisis hasil penetapan kadar

Data luas area yang didapatkan dari isolat dibuat persamaan regresi linier sebagai persamaan kurva baku. Sampel yang telah ditotolkan dan telah diketahui beratnya, setelah dilakukan pengukuran akan didapatkan harga AUC ini ke dalam persamaan garis kurva baku, maka akan didapatkan kadar dari masing-masing sampel. Persamaan garis kurva baku : $Y = a+bx$, dengan perincian $Y = AUC$, $X = \text{kadar isolat}$, $a = \text{tetapan regresi}$, $b = \text{koefisien regresi}$. Masing-masing data luas area ekstrak etanolik dimasukkan dalam persamaan kurva baku sehingga didapatkan kadarnya. Data luas area ekstrak etanolik dimasukkan ke dalam persamaan regresi kurva baku, sehingga didapatkan persen kadar relatif dalam ekstrak.

HASIL DAN PEMBAHASAN

Hasil Pembuatan Ekstrak

Sebanyak 100,00 g serbuk bunga kembang sepatu yang diekstraksi menggunakan etanol 70%, menghasilkan 24,24 g ekstrak kental etanolik berwarna merah kecokelatan. Rendemen yang diperoleh sebesar 24,24%.

Isolasi senyawa alkaloid

Isolasi didahului dengan pemilihan fase gerak yang tepat. Penggunaan fase gerak yang menghasilkan pemisahan yang baik dan terdeteksi

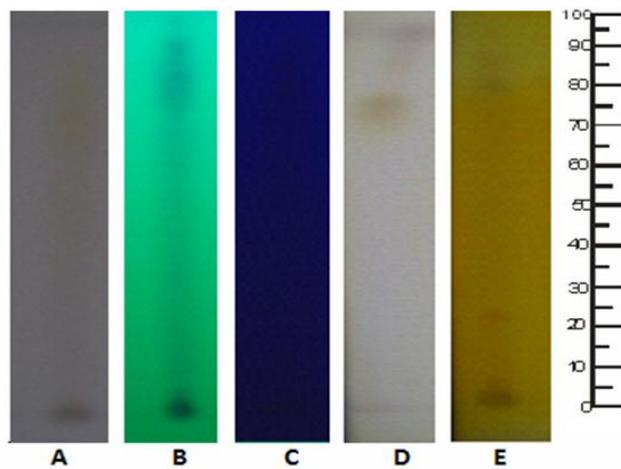
dengan Dragendorff adalah etil asetat:metanol (1:9 v/v). Kemungkinan sifat alkaloid bersifat polar karena dapat dikembangkan dengan pelarut yang polar. Pemilihan fase gerak etilasetat:metanol dengan perbandingan yang berbeda yaitu (1:5 v/v) menjadi alternatif fase gerak selanjutnya untuk memisahkan senyawa dalam ekstrak pada fraksi dengan eluat etil asetat:metanol (1:9 v/v) dan metanol 100% untuk keperluan isolasi.

Hasil KLT setelah dilakukan penyemprotan dengan Dragendorff memperlihatkan adanya bercak alkaloid pada Rf 0,22 (hRf = 22) (gambar 1).

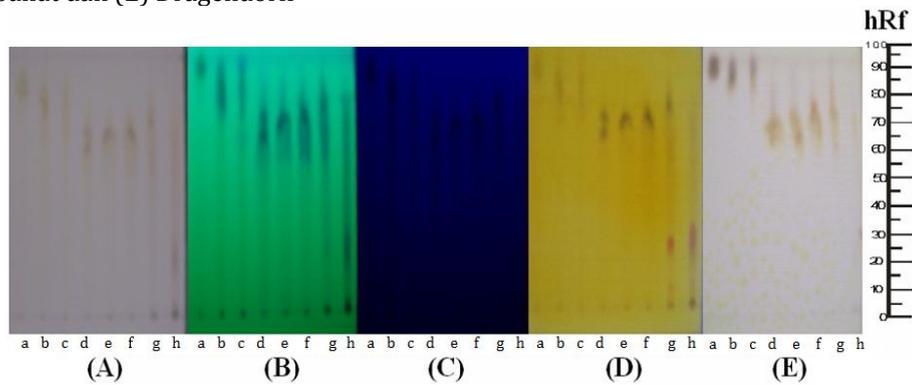
Pemisahan senyawa-senyawa dalam ekstrak etanol 70% dilakukan dengan VLC. Elusi sampel dalam kolom hisap dengan fase gerak dimulai dari eluen yang kepolarannya rendah yaitu dimulai dengan etil asetat 100% v/v, kemudian etil asetat:metanol dengan perbandingan (9:1, 5:1, 2:1, 1:1, 1:2, 1:5, 1:9) v/v dan metanol 100% v/v. Kemudian dilakukan uji KLT hasil fraksinasi dengan menggunakan fase gerak etil asetat:metanol (1:5 v/v). Senyawa alkaloid yang diharapkan pada fraksi (a)-(h) tidak terlihat dengan sinar tampak yang mempunyai panjang gelombang 400-700 nm. Terdapat bercak coklat dengan intensitas berbeda pada fraksi (g) dan (h) namun belum dapat dipastikan benar dan tidaknya alkaloid, sehingga diperlukan penampakan bercak UV dengan panjang gelombang 254 dan 366 nm yang tidak merusak senyawa. Pada UV 254 dan 366 pun juga tidak tampak adanya spot alkaloid yang diharapkan (gambar 2).

Hal ini dimungkinkan mempunyai panjang gelombang yang rendah yaitu 200-254 nm. Deteksi bercak nampak perlu dilakukan dengan menggunakan pereaksi Dragendorff dan serium(IV)sulfat. Pereaksi Dragendorff sensitif terhadap senyawa alkaloid dengan memberikan bercak berwarna merah-coklat jingga. Penggunaan pereaksi ini dalam uji kemurnian memberikan informasi tentang kandungan senyawa yang ada, karena pereaksi lain hanya spesifik terhadap suatu golongan tertentu (Cannel, 1998).

Serium(IV)sulfat digunakan untuk mendeteksi adanya senyawa golongan organik secara umum. Pereaksi ini banyak digunakan dalam deteksi awal terhadap senyawa yang terkandung dalam ekstrak atau fraksi dan didapatkan dua fraksi yang memberikan bercak positif terhadap Dragendorff setelah dielusi dengan eluen etil asetat:metanol (1:5 v/v) yaitu fraksi (g) dan (h). Hasil penyemprotan memperlihatkan adanya bercak sangat intensif senyawa alkaloid berwarna merah jingga pada fraksi.

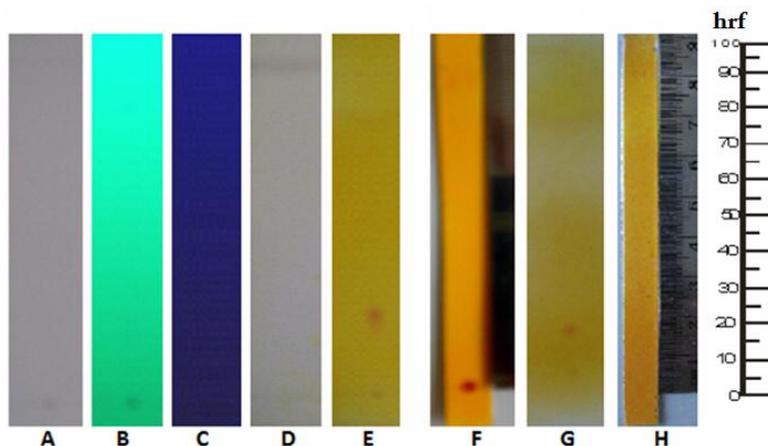


Gambar 1. Hasil Identifikasi senyawa alkaloid ekstrak etanolik bunga kembang sepatu dengan fase gerak etil asetat:metanol (1:5 v/v) pada (A) sinar tampak, (B) UV 254 nm, (C) UV 366 nm, (D) pereaksi serium(IV)sulfat dan (E) Dragendorff



Gambar 2. Hasil identifikasi fraksi (a)-(h)* secara visibel (A), UV 254 nm (B), UV 366 nm (C), setelah penyemprotan dengan Dragendorff (D) dan serium(IV)sulfat (E)

Keterangan: a. fraksi etil asetat 100%; b. fraksi etil asetat: metanol (9:1); c. fraksi etil asetat: metanol (2:1); d. fraksi etil asetat: metanol (1:1); e fraksi etil asetat: metanol (1:2); f. fraksi etil asetat: metanol (1:5); g. fraksi etil asetat: metanol (1:9); h. fraksi metanol 100%

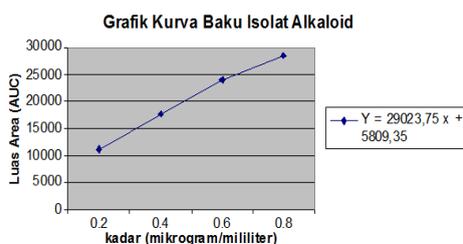


Gambar 4. Hasil KLT isolat dengan fase gerak etil asetat:metanol (1:5 v/v) pada (A) sinar tampak, (B) UV 254 nm, (C) UV 366 nm, (D) pereaksi serium(IV)sulfat dan (E) Dragendorff, Hasil KLT Isolat pada 3 macam fase gerak (F) n-heksan:etil asetat (1:20 v/v); (G) etil asetat:metanol (1:5 v/v); (H) etil asetat:metanol (1:9 v/v)

Tabel I. Nilai Kadar Isolat vs AUC hasil spektrodensitometri

No	Kadar (mg/μL)	AUC
1	0,2	11162,7
2	0,4	17700,9
3	0,6	24013,7
4	0,8	28407,6

Keterangan : Persamaan garis regresi kurva baku adalah $Y = 29023,75 x + 5809,35$ $R = 0,996$, $X =$ kadar alkaloid, $Y =$ AUC (perhitungan pada lampiran)



Gambar 5. Kurva Baku Isolat Alkaloid

Tabel II. Nilai Kadar sampel ekstrak vs AUC

No	Kadar (mg/μL)	AUC	Kadar (%)
1	2,0	19917,5	0,243
2	2,0	17438,7	0,201
3	2,0	19585,7	0,238
4	2,0	19227,8	0,231
5	2,0	17394,5	0,199
6	2,0	14497,0	0,149
		$x = 18010,2$	$x = 0,210$
			$SD = 0,035$

Hal ini menandakan bahwa senyawa alkaloid dalam bunga kembang sepatu ini bersifat polar karena larut dalam eluen polar yaitu metanol. Hasil positif alkaloid pada pereaksi Dragendorff berupa endapan yaitu kalium alkaloid.

Serium (IV) sulfat dapat mengendapkan senyawa yang mempunyai ion hidrogen rendah (Anonim, 2009). Penyemprotan serium(IV)sulfat membuktikan adanya senyawa organik secara umum. Namun tidak ada bercak pada posisi positif alkaloid sebagai senyawa organik. Hal ini kemungkinan karena intensitas senyawa alkaloid yang sedikit. Pada gambar 2 menunjukkan tidak adanya senyawa yang tertinggal dalam totolan yang dimungkinkan adanya senyawa lain seperti fenol. Hasil identifikasi secara kualitatif pada semua kombinasi perlakuan menunjukkan adanya senyawa alkaloid pada bahan.

Penampakan noda dengan pereaksi penampak noda pada Dragendorff, noda nampak jelas, menunjukkan adanya alkaloid yang ditandai dengan adanya warna jingga-kecoklatan berlatar belakang kuning pada lempeng KLT dan serium(IV)sulfat, noda tidak tampak.

Pada penelitian ini berdasarkan hasil identifikasi secara kualitatif diperoleh dua noda alkaloid (noda atas dan bawah) pada (g) dan (h), dinyatakan positif dengan pereaksi penampak noda Dragendorff. Dua noda tersebut dapat teridentifikasi dari kelompok alkaloid. Perbedaan tersebut dapat diketahui berdasarkan alkaloid ini terletak pada jenisnya. Senyawa alkaloid ini bukan termasuk golongan aromatik karena tidak dapat terdeteksi dengan penampak noda sinar UV 254 dan UV 366 (gambar 2).

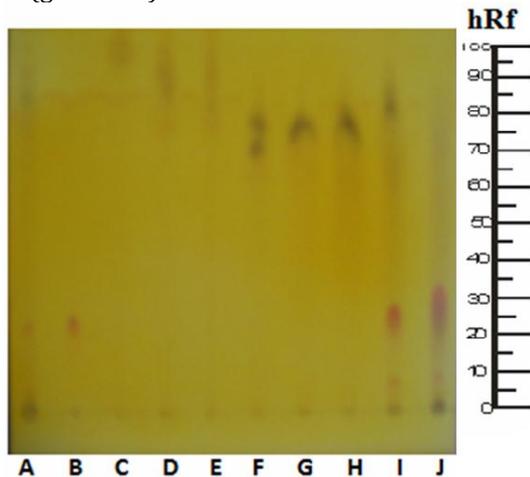
Senyawa alkaloid yang diharapkan tidak terlihat pada visibel, UV 254 dan 366 nm sehingga perlu dilakukan dengan menutup pelat dengan sepotong kaca dan menyemprot salah satu sisi dengan pereaksi semprot (Hostetmann dkk.,1995). Hal ini dapat memudahkan dalam isolasi senyawa alkaloid. Hasil cuplikan kemudian dilarutkan dalam metanol dan disaring dengan kolom hisap, seperti pada VLC. Penyaringan dengan VLC dimaksudkan agar penyarian menghasilkan larutan isolat yang bersih dan tidak ada sisa silika. Larutan dikeringanginkan dengan

mengurangi bobot botol dan isolat dengan bobot botol dan didapatkan sebanyak 12 mg isolat.

Uji Kemurnian Isolat

Larutan isolat ditotolkan pada plat KLT kemudian dielusi dengan tiga fase gerak yaitu etil asetat:metanol (1:9; 1:5 v/v) dan n-heksan:etil asetat (1:20 v/v). Pada etil asetat:metanol yang membuat senyawa alkaloid dapat dideteksi. Gambar 4 merupakan hasil identifikasi isolat dengan fase gerak etil asetat:metanol (1:5 v/v). Pada sinar tampak, UV 256 nm, UV 366 nm dan pereaksi serium(IV)sulfat tidak memberikan bercak pada hRf senyawa alkaloid yaitu 22. Kenampakan bercak muncul setelah penyemprotan Dragendorff.

Pada fase gerak n-heksan:etil asetat (1:20 v/v) hasil deteksi dengan Dragendorff ternyata tidak menunjukkan pemisahan yang jelas, tidak naik dan tetap berada di tempat tolotan, sedangkan pada etil asetat:metanol (1:5 v/v) menghasilkan bercak alkaloid pada Rf = 0,22 dan etil asetat: metanol (1:9 v/v) menghasilkan Rf = 0,31(gambar 4).



Gambar 6. Hasil identifikasi sampel ekstrak, isolat dan delapan fraksi yaitu Fraksi etil asetat 100%; Fraksi etil asetat:metanol (9:1); Fraksi etil asetat:metanol (2:1); Fraksi etil asetat:metanol (1:1); Fraksi etil asetat:metanol (1:2); Fraksi etil asetat:metanol (1:5); Fraksi etil asetat:metanol (1:9); Fraksi metanol 100%, setelah penyemprotan dengan Dragendorff

Penetapan kadar senyawa alkaloid

Penetapan kadar dengan alat spektrodensitometer ditempuh dengan menotolkan sejumlah zat baku (isolat) sebagai pembandingnya. Konsentrasi isolat 0,02 mg/L ditotolkan pada plat silika gel F_{254} dengan volum penotolan 10; 20; 30; dan 40 μ L dengan

konsentrasi masing-masing sebesar 0,2 ; 0,4 ; 0,6 dan 0,8 g/mL. Ekstrak sampel dengan konsentrasi 0,05 mg/L ditotolkan dengan replikasi enam kali dengan volume penotolan 0,04 mL (0,2 g/mL). Plat silika kemudian dikembangkan menggunakan fase gerak etil asetat:metanol (1:5 v/v).

Setelah pengembangan selesai bercak yang diharapkan tidak dapat terdeteksi dengan UV 254 maupun 366 nm, maka bercak yang diharapkan ditandai pada tepi plat sesuai dengan KLT isolat yang telah dilakukan sebelumnya dan dideteksi dengan pereaksi semprot Dragendorff. Hal ini dapat dilakukan karena mempunyai harga Rf sama. Kemudian bercak yang telah ditandai di tentukan AUC (luas dibawah kurva) pada panjang gelombang maksimum (200 nm) menggunakan spektrodensitometer.

Nilai AUC yang dihasilkan isolat ditunjukkan pada tabel I. Kenaikan konsentrasi atau kadar isolat tertentu sebanding dengan kenaikan nilai AUC pada spektrodensitometer. Linieritas merupakan salah satu parameter untuk menilai kesahihan metode analisis dengan melihat nilai hubungan respon dari berbagai konsentrasi zat baku pada suatu kurva baku yang dilihat sebagai nilai koefisien korelasi (r) (Susidarti dkk., 2008). Garis regresi dengan $Y = 29023,75 x + 5809,35$ dapat ditunjukkan pada gambar 5.

Pada tabel II menunjukkan nilai AUC sampel ekstrak bunga kembang sepatu pada kadar yang sama yaitu 2,0 mg/ μ L. Nilai AUC replikasi sampel memenuhi rentang nilai AUC pada isolat yaitu pada 11162,7 hingga 28407,6. Nilai AUC rata-rata sampel yaitu 18010,2 telah memenuhi rentang nilai AUC isolat sehingga dapat ditentukan kadar relatif alkaloid. Kadar relatif alkaloid dalam larutan yaitu 1,006 mg dan kadar relatif dalam ekstrak adalah $0,210 \pm 0,035\%$.

Analisis Hasil KLT

Hasil identifikasi senyawa alkaloid pada uji kemurnian dengan salah satu campuran pelarut yaitu etil asetat:metanol (1:5 v/v) dapat diketahui perbedaan kenampakan senyawa alkaloid. Perbedaan kenampakan terlihat ketiadaan bercak atau spot pada sinar tampak, UV 254 nm, UV 366 nm maupun serium(IV)sulfat yang menunjukkan adanya senyawa alkaloid. Sedangkan pemberian pereaksi semprot Dragendorff menunjukkan kenampakan warna merah jingga sebagai parameter positif adanya senyawa alkaloid. Senyawa alkaloid pada isolat bunga kembang sepatu mempunyai harga Rf yang sama dengan sampel ekstrak maupun fraksi yaitu 0,22 (hRf=22) (gambar 6). Kemunculan bercak setelah diberi pereaksi membuktikan adanya

serapan senyawa alkaloid yang lemah yaitu pada 200 nm.

Analisis Hasil Penetapan Kadar

Dengan diketahuinya banyak sampel yang ditotolkan, harga AUC dan persamaan garis kurva baku maka kadar relatif alkaloid dalam sampel dapat ditentukan. Nilai rata-rata AUC sampel ekstrak bunga kembang sepatu sudah memenuhi rentang AUC yang didapatkan dari kurva baku yaitu sebesar 18010,2. Masing-masing AUC sampel diregresikan ke dalam persamaan kurva baku dan didapatkan kadar relatif alkaloid dalam larutan sampel yaitu 1,006 mg dan kadar relatif alkaloid dalam sampel ekstrak bunga sepatu adalah sebesar $0,210 \pm 0,035 \%$.

KESIMPULAN

Ekstrak etanolik bunga kembang sepatu memiliki kandungan alkaloid yang intensif dan dapat dijadikan sebagai senyawa penanda. Kadar relatif alkaloid ekstrak etanolik bunga kembang sepatu adalah $0,210 \pm 0,035 \%$.

UCAPAN TERIMA KASIH

Seluruh jajaran dosen, staf tata usaha, serta pegawai, dan semua tim di Fakultas Farmasi UGM.

DAFTAR PUSTAKA

Anonim, 1985, *Tanaman Obat Indonesia*, Jilid I, Departemen Kesehatan Republik Indonesia, Jakarta.
Cannell, R.J.P., 1998, *Natural Product Isolation*, Humana press, Totowa, New Jersey, 111-133, 209-229, 365.

Dalimartha, S., 1999, *Atlas Tumbuhan Obat Indonesia*. Ungaran : Trubus Agriwidya.
Eye, 2007, Memodernkan Obat Tradisional dari Tanaman, *Republika*, 23 November 2007 cit
Anonim, 2007, Memodernkan Obat Tradisional dari Tanaman, <http://www.kimia-lipi.net/index.php?pilihan=berita&id=58>, 1 Juli 2009.
Hostettman, K., Hostettman, M., Marston, A., 1995, *Cara Kromatografi Preparatif*, diterjemahkan oleh Kosasih Padmawinata, 9-10, Penerbit ITB, Bandung.
Lenny, S., 2006, Senyawa Flavonoida, Fenil Propanoida dan Alkaloida, <http://library.usu.ac.id/download/fmipa/06003489.pdf>, 3 Agustus 2009.
Mishra, N., Tandon, V.L., Gupta, R., 2012, Immunomodulation by *Hibiscus rosa-sinensis*: effect on the humoral and cellular immune response of *Mus musculus*, *Pakistan Journal of Biological Science*, 15 (6): 277-83.
Patterson, C.A., 2006, *Marker and Natural Health Products*, Wellness Ewst Technology Watch, Canada.
Putra, S.E., 2007, http://www.chem-is-try.org/artikel_kimia/biokimia/alkaloid_senyawa_organik_terbanyak_di_alam/, 23 Juli 2009.
Supardjan, A.M., 1987. Pemisahan Tetrasiklin dan hasil uraiannya dalam sediaan Tetrasiklin secara KLT-densitometri, *Laporan Penelitian*, Lembaga Penelitian, UGM, Yogyakarta. 1-2, 9-10