

Identifikasi dan Penetapan Kadar Kinin Ekstrak Kulit Batang Kina (*Cinchona succirubra*) secara KLT-Densitometri

Identification and Determination of Quinine Stem Bark (*Cinchona succirubra*) by TLC-Densitometry

Ni Kadek Ayu Pramesti^{1*}, Ni Putu Vyra Ginanti Putri¹, Ida Ayu Mas Laksmi Dewi¹,
Mirilia Vital Moreira¹, Lupu Rina Antarini¹

¹Program Studi Farmasi, Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam, Universitas Udayana, Bali

Abstrak: Kulit batang kina (*Cinchona succirubra* Cortex) merupakan salah satu bagian tanaman yang menghasilkan metabolit sekunder yaitu alkaloid kinin dan memiliki aktifitas farmakologi. Selain kandungan kinin, dalam kulit batang kina juga terdapat berbagai senyawa kimia lainnya, yakni kinidin, sinkonin, dan sinkonidin. Adanya kandungan senyawa lain dapat mengurangi efek farmakologi yang dihasilkan oleh kinin bahkan dapat saling meniadakan satu sama lain. Pemilihan metode pemisahan dan isolasi yang tepat merupakan faktor penting yang akan mempengaruhi kemurnian senyawa tunggal yang diperoleh. Ekstraksi dengan metode Soxhlet dan identifikasi golongan dengan metode *screening* fitokimia. Fraksinasi dengan metode ekstraksi cair-cair dan kromatografi vakum cair. Isolasi dengan metode kromatografi preparatif dan metode KLT-Densitometri. Dari proses Ekstraksi metode Soxhlet didapat filtrat dengan warna coklat kemerahan. Hasil skrining fitokimia adalah positif golongan triterpenoid dan alkaloid. Ekstraksi cair-cair didapat hasil fraksi air, fraksi etil asetat I dan fraksi etil asetat II. Hasil KLT dan identifikasi pereaksi kimia adalah positif mengandung kinin pada fraksi etil asetat II. Berdasarkan hasil penelitian dengan metode KLT-Densitometri menunjukkan bahwa ekstrak kulit batang kina positif mengandung senyawa kinin dengan penetapan kadar total kinin dalam standar kinin menghasilkan nilai rata - rata % *recovery* yaitu 100,442 % dan kadar total kinin dalam subfraksi KLT-P I dan II secara berturut-turut menghasilkan kadar sebesar 0,402612 mg/mL dan 0,155830 mg/mL.

Kata Kunci: *Cinchona succirubra* Cortex, fraksi, kinin, KLT-Densitometri, KLT-Preparatif.

Abstract: The stem bark of quinine (*Cinchona succirubra* Cortex) is one part of the plant that produces secondary metabolites, which is alkaloids in the form of quinine and have pharmacological activity. In addition to the content of quinines, in the stem bark of quinine there are also various other chemical compounds, there are quinidine, synconine, and synconidine. The content of other compounds can reduce the pharmacological effects produced by quinine and can even cancel each other out. The selection of the appropriate separation and isolation method is an important factor that will affect the purity of the single compound obtained. Extraction using the Soxhlet method, identification of groups using the phytochemical screening method. Fractionation using liquid-liquid extraction and vacuum liquid chromatography. Isolation by preparative chromatography method and TLC-Densitometry method. Soxhlet extraction obtained the filtrate with a reddish-brown color. Phytochemical screening was positive for triterpenoids and alkaloids. Liquid-liquid extraction resulted in the water fraction, ethyl acetate fraction I and ethyl acetate fraction II. TLC and identification of positive chemical reagents containing quinine in ethyl acetate fraction II. Based on the results of the research using the TLC-Densitometry method, it was shown that the quinine bark extract was positive for Quinine with the Determination of the total quinine level in the quinine standard resulted in an average value of % *recovery* was 100.442% and the total quinine content in the TLC-P I and II subfraction resulted was 0.402612 mg/mL and 0.155830 mg/mL.

Keywords: *Cinchona succirubra* Cortex, fraction, quinine, TLC-Densitometry, TLC-Preparative.

* email korespondensi: ayupramesti844@gmail.com

PENDAHULUAN

Pemanfaatan tanaman sebagai bahan baku obat mulai sering digunakan terkait dengan berbagai macam metabolit sekunder yang dapat dihasilkan oleh tanaman. Setiap tanaman menghasilkan metabolit sekunder yang berbeda-beda dengan jumlah atau kadar yang berbeda. Jenis senyawa metabolit sekunder yang biasa ditemukan dalam tanaman, antara lain: alkaloid, flavonoid, steroid, dan terpenoid (Amalia, Parwati, dan Simanjuntak, 2004). Salah satu tanaman yang sering digunakan karena aktifitas farmakologinya adalah tanaman kina (*Cinchona succirubra*). Kina memiliki aktivitas sebagai anti malaria, anti piretik serta stomakika (obat sakit perut). Kandungan kimia kina berupa alkaloid dengan kadar tidak kurang dari 7% yang dihitung sebagai kinin. Bagian tanaman yang banyak digunakan adalah kulit batangnya. Kinin dapat digunakan sebagai obat malaria dikarenakan memiliki efektivitas yang baik terhadap semua jenis plasmodium dan juga efektif sebagai sizontosida dan gametosida (Harijanto, 2006).

Selain kandungan kinin, dalam kulit batang kina juga terdapat berbagai senyawa kimia lainnya, yakni kinidin, sinkonin, dan sinkonidin. Keempat jenis senyawa alkaloid tersebut memiliki khasiat sebagai antimalaria. Namun, kinin merupakan alkaloid yang paling sering digunakan karena kandungannya dalam kulit batang kina paling besar dibandingkan alkaloid lainnya. Alkaloid merupakan senyawa metabolit sekunder terbanyak yang memiliki atom nitrogen, yang ditemukan dalam jaringan tumbuhan dan hewan. (Wink, 2008). Kandungan alkaloid lain serta senyawa lain dalam kulit batang kina (*C. succirubra*) dapat menyebabkan efek farmakologi yang ditimbulkan tidak optimal saat penggunaan langsung. Adanya kandungan senyawa lain dapat mengurangi efek farmakologi yang dihasilkan oleh kinin bahkan dapat saling meniadakan satu sama lain. Selain itu, senyawa lain yang terkandung dapat menyebabkan efek farmakologi lain yang tidak diinginkan. Kandungan kimia yang banyak dalam kulit batang kina, menyebabkan perlunya dilakukan suatu proses pemisahan, isolasi yang kompleks yaitu defatting, ekstraksi Soxhlet, skrining fitokimia, ekstraksi cair-

cair, KLT, kromatografi vakum cair, KLT fraksinasi, KLT preparatif, KLT subfraksinasi dan terakhir KLT Densitometri. Pemilihan metode pemisahan dan isolasi yang tepat merupakan faktor penting yang akan mempengaruhi kemurnian senyawa tunggal yang diperoleh berupa kinin.

METODE PENELITIAN

Tempat dan Waktu Penelitian

Penelitian dilaksanakan di Laboratorium Fitokimia dan Farmakognosi Program Studi Farmasi, Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam, Universitas Udayana. Waktu pelaksanaan dilakukan pada bulan Agustus hingga Desember 2019.

Alat dan Bahan

Alat yang digunakan yaitu timbangan analitik, *beaker glass*, botol vial, pipet tetes, pipet ukur, gelas ukur, labu ukur, *bulbfiller*, sendok tanduk, seperangkat alat sokhletasi, oven, waterbath, corong pisah, statif dan buret, chamber, kolom vakum, mikropipet 2 µL, plat KLT Al-Silika Gel GF254, CAMAG TLC Scanner 5.

Bahan yang digunakan yaitu serbuk kulit batang kina (*Cinchona succirubra* Cortex), metanol, HCl 37%b/b, akuades, eter, kloroform, asam asetat, H₂SO₄ 37%b/b, standar kinin dan etil asetat.

Defatting dan Ekstraksi dengan Metode Soxhlet

Serbuk kulit batang kina sebanyak 20gram di-Soxhlet menggunakan metanol sebanyak 130mL. Ekstraksi metode Soxhlet dilakukan pada suhu 70 °C dan dilakukan beberapa kali sirkulasi hingga warna pelarut pada kelongsong berwarna bening. Disaring filtrat yang diperoleh dan diukur volumenya. Kemudian ditampung filtrat pada cawan porselin dan diuapkan hingga diperoleh ekstrak kental (Leliqia dkk., 2019).

Skrining Fitokimia

Ekstrak kulit batang kina sebanyak 10mg dilarutkan dengan 10mL metanol sebagai larutan uji. Uji alkaloid yaitu ekstrak kulit batang kina diuapkan sebanyak 2mL, kemudian dilarutkan ke dalam 5mL HCl 2N. Pengujian adanya senyawa alkaloid

dilakukan dengan pereaksi Wagner, Mayer dan Dragendrof, adanya senyawa alkaloid ditunjukkan dengan terbentuknya endapan coklat pada penambahan pereaksi Wagner, warna kuning pada penambahan pereaksi Mayer dan warna jingga pada penambahan pereaksi Dragendrof. Uji flavonoid digunakan larutan aseton, asam oksalat, dan eter kemudian diamati di bawah UV 366nm, larutan berfluoresensi kuning intensif menandakan adanya senyawa flavonoid. Uji steroid dan triterpenoid dilakukan dengan menggunakan pereaksi Liebermann-Burchard, asam asetat anhidrat, dan asam sulfat pekat. Terbentuknya cincin kecoklatan atau violet pada perbatasan larutan menandakan positif triterpenoid, sedangkan apabila muncul cincin biru kehijauan menandakan positif steroid. Uji saponin yaitu larutan uji dikocok secara vertikal selama 10 detik, kemudian didiamkan selama 10 detik. Diamati pembentukan busa, apabila terjadi pembentukan busa setinggi 1-10cm yang stabil selama ± 10 menit menunjukkan adanya saponin dan ditambahkan 1 tetes HCl 2N agar busa tidak menghilang (Leliqia dkk., 2019).

Ekstraksi Cair-Cair

Sebanyak 300mg serbuk kulit batang kina dilarutkan dengan 10mL larutan H_2SO_4 10%. Kemudian dimasukkan ke dalam corong pisah digojog lalu ditambahkan 20mL etil asetat. Ditambahkan 10mL amonia cair, dan ditampung kedua fase hingga diperoleh fraksi air dan fraksi etil asetat. Kemudian fraksi diuapkan dengan oven suhu 40°C (Leliqia dkk., 2019).

KLT dan Identifikasi Alkaloid Kinin dengan Pereaksi Kimia

Masing – masing fraksi air, etil asetat I, etil asetat II, standar kinin sulfat, dan ekstrak metanol ditotolkan sebanyak 6 μL pada plat KLT Al Silika Gel GF 254, kemudian plat dimasukkan ke dalam chamber yang telah dijenuhkan dengan fase gerak kloroform : metanol (9:1) v/v. Plat dielusi hingga batas jarak pengembangan, kemudian dideteksi di bawah sinar UV 254nm dan 366nm. Plat disemprot dengan pereaksi semprot H_2SO_4 10%, diamati kembali plat di bawah sinar UV 254nm dan 366nm,

ditandai spot yang diduga kinin dan dihitung Rf masing-masing spot (Leliqia dkk., 2019).

Kromatografi Vakum Cair

Diawali dengan penyiapan fraksi etil asetat, penyiapan kolom, dan elusi dimana Fraksi ditaburkan dibagian atas kolom yang sudah di kemas, dielusi secara gradien masing-masing dengan 30 ml campuran eluen kloroform: metanol (9:1) v/v sampai (5:5) v/v. Setiap fraksi ditampung dalam botol coklat dan ditiap fraksi diuapkan pelarutnya kemudian ditimbang (Leliqia dkk., 2019).

KLT Hasil Fraksinasi Vakum Cair

Ditotolkan fraksi etil asetat : metanol (7:3)v/v, fraksi etil asetat : metanol (5:5) v/v, fraksi etil asetat : metanol (3:7)v/v, dan standar kinin pada plat KLT yang sudah diaktivasi. Dimasukkan plat ke dalam chamber yang sudah dijenuhkan dengan fase gerak kloroform : metanol (9:1) v/v. Plat diangin-anginkan, kemudian diamati di bawah sinar UV 254 nm dan 366 nm. Disemprotkan plat KLT dengan pereaksi semprot H_2SO_4 10%, lalu diamati kembali di bawah sinar UV 254 nm dan 366 nm (Leliqia dkk., 2019).

Kromatografi Lapis Tipis Preparatif

Ditotolkan larutan uji pada lempeng KLT dalam bentuk pita, lempeng dielusi di dalam chamber yang telah dijenuhkan. Plat yang telah dielusi diamati di bawah sinar UV 254 dan 366 nm. Ditandai bercak yang positif mengandung kinin, bercak tersebut diambil dengan mengerok silika pada plat KLT dengan spatula. Alkaloid kinin yang terikat pada silika diekstraksi dengan pelarut campuran CHCl_3 : MeOH (9:1 v/v) (Leliqia dkk., 2019).

Kromatografi Lapis Tipis Hasil Subfraksinasi

Subfraksi hasil KLT preparatif dilarutkan dengan 1 mL metanol p.a. Ditotolkan pada plat hasil KLT preparatif dan standar kinin. Plat dimasukkan ke dalam chamber yang telah jenuh dan dielusi, kemudian spot pada plat dideteksi di bawah sinar UV 254 nm dan 366 nm. Plat disemprot dengan pereaksi H_2SO_4 10%, kemudian plat diamati lagi di bawah sinar UV 254 nm dan 366 nm ditandai spot yang

diduga senyawa kinin dan dihitung nilai *r_f* masing-masing spot (Leliqia dkk., 2019).

Identifikasi KLT Densitometri

Ditotolkan larutan standar kinin pada plat KLT menggunakan pipet kapiler sebanyak 2 µL, 4 µL, 6 µL, 8 µL dan 10 µL, kemudian ditotolkan larutan subfraksinasi KLT-P masing-masing sebanyak 6 µL dengan 3 kali pengulangan. Plat dielusi dan dikeluarkan dari chamber dan dikeringkan dengan cara diangin-anginkan. Plat dimasukkan ke alat TLC *Scanner*, lalu diamati dengan densitometer, dibuat kurva kalibrasi dan persamaan regresi liniernya, kemudian dilakukan penetapan kadar kinin dalam sampel (Leliqia dkk., 2019).

HASIL DAN PEMBAHASAN

Defatting dan Estraksi Serbuk Kulit Batang Kina dengan Metode Soxhlet

Tabel 1. Jumlah Ekstrak Kulit Batang Kina Hasil Ekstraksi Metode Soxhlet

Nama Bahan	Warna	Jumlah
Ekstrak metanol hasil Soxhlet	Coklat kemerahan	18,6 g

Proses pemisahan, isolasi, dan identifikasi alkaloid dari serbuk simplisia kulit batang kina (*Cinchona succirubra*) diawali dengan proses ekstraksi. Proses ekstraksi dilakukan untuk mengekstrak metabolit sekunder yang terdapat dalam serbuk kulit batang kina. Soxhlet merupakan rangkaian proses ekstraksi dimana selalu menggunakan pelarut baru yang pada umumnya dilarutkan dengan alat khusus yang disebut soklet sehingga terjadi ekstraksi berkelanjutan dengan jumlah pelarut yang relatif konstan (Depkes RI, 2014).

Dipilihnya ekstraksi Soxhlet karena metode Soxhlet memiliki beberapa keuntungan, diantaranya sedikitnya penggunaan pelarut sehingga dapat menyaring senyawa yang terdapat dalam simplisia lebih banyak dalam waktu lebih singkat dibandingkan dengan maserasi. Namun, metode Soxhlet juga memiliki kelemahan yaitu tidak dapat digunakan untuk senyawa-senyawa yang tidak tahan terhadap pemanasan. Metode Soxhlet juga dipilih untuk proses ekstraksi kinin karena kinin memiliki

titik lebur 173-175°C, yang berarti kinin akan tahan (stabil) terhadap pemanasan (Merck, 2001).

Penggunaan metanol sebagai pelarut penyari karena metanol merupakan pelarut universal yang sifatnya semipolar, sehingga mampu masuk ke sel tanaman dan akan terjadi pengembangan sel, dan kemudian akan terjadi perpindahan komponen dan difusi bahan yang diekstraksi ke luar sel serta metanol memiliki kemampuan untuk mengendapkan protein dan menghambat kerja enzim (Harborne, 1987). Selain itu karena alkaloid bersifat basa yang mudah larut dalam larutan beralkohol (Depkes RI, 1995). Pada penelitian ini proses ekstraksi Soxhlet dilakukan sebanyak 8 kali sirkulasi dengan waktu untuk tiap sirkulasi tertera pada tabel hasil. Untuk mendapatkan 8 kali sirkulasi waktu keseluruhan yang dibutuhkan adalah 3 jam 18 menit. Ekstrak hasil Soxhlet berwarna coklat kemerahan dengan volume ekstrak (filtrat) yaitu sebanyak 18,6 gram

Skrining Fitokimia

Tabel 2. Hasil Skrining Fitokimia

Golongan Senyawa	Hasil
Flavonoid	-
Triterpenoid	+
Saponin	-
Alkaloid	+

Skrining fitokimia bertujuan untuk mengetahui kandungan senyawa yang terdapat dalam simplisia tumbuhan. Sebelum melakukan skrining fitokimia, dilakukan pembuatan larutan ekstrak uji terlebih dahulu. Hasil skrining fitokimia dipengaruhi oleh pemilihan pelarut karena pelarut berperan dalam melarutkan senyawa yang diinginkan. Metanol digunakan sebagai pelarut karena metanol merupakan pelarut yang bersifat universal sehingga dapat melarutkan semua komponen, baik yang bersifat polar, semi polar, maupun non polar. Metanol dapat menarik alkaloid, saponin dan flavonoid dari tanaman. Dalam skrining fitokimia pemilihan pelarut merupakan hal yang penting karena pelarut memiliki peran dalam melarutkan senyawa yang dikehendaki dan apabila pemilihan pelarut sudah tepat maka skrining

fitokimia akan menunjukkan hasil yang tepat (Kristanti dkk., 2008).

Uji skrining fitokimia dalam penelitian ini adalah uji kandungan flavonoid, uji steroid dan triterpenoid, uji kandungan saponin, dan uji kandungan alkaloid. Dari hasil pengamatan, larutan ekstrak uji mengandung endapan berwarna coklat yang menunjukkan hasil positif alkaloid dengan pereaksi Wagner. Dan pada sampel positif mengandung steroid dan triterpenoid karena terbentuk cincin berwarna violet pada batas larutan. Hasil tersebut menunjukkan bahwa larutan ekstrak uji yang digunakan tidak mengandung steroid tetapi mengandung triterpenoid.

Ekstraksi Cair-Cair

Tabel 3. Hasil Ekstraksi Cair-Cair dan warna yang dihasilkan

No	Hasil Fraksi	Warna
1	Fase etil asetat	Coklat kemerahan
	Fase air	Bening kekuningan
2	Fase etil asetat	Coklat kekuningan
	Fase air	Bening
3	Fase etil asetat	Kekuningan
	Fase air	Bening
4	Fase etil asetat	Bening
	Fase air	Kecoklatan

Proses ekstraksi cair-cair dilakukan dalam 2 tahap. Tahap pertama merupakan *defatting* (menghilangkan lipid dan resin) dan tahap kedua adalah *purification* (pemurnian). Pertama dilakukan tahap *defatting*, ekstrak dalam asam sulfat dipartisi dengan cara dimasukkan ke dalam corong pisah lalu ditambahkan etil asetat sebanyak 20 mL kemudian dilakukan penggojogan dan dipartisi sebanyak dua kali. Digunakan etil asetat karena etil asetat bersifat nonpolar dan tidak menyatu dengan fase air sehingga dapat digunakan dalam ekstraksi cair-cair. Campuran dalam corong pisah kemudian digojog untuk memperluas kontak antar pelarut tidak saling campur sehingga terjadi perpindahan senyawa terlarut hingga mencapai keadaan kesetimbangannya diantara kedua pelarut.

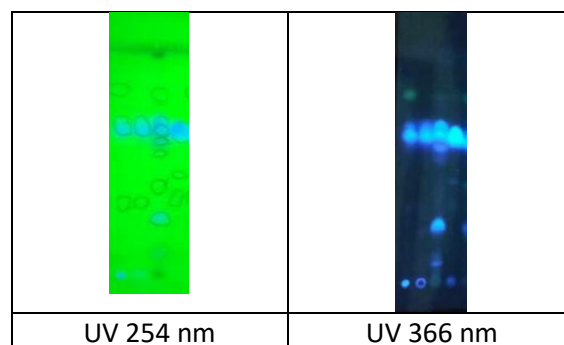
Penggojogan dapat membantu proses distribusi analit di antara campuran pelarut. Setelah dilakukan penggojogan terbentuk dua lapisan yang tidak saling campur pada corong pisah, yaitu fase air pada lapisan bawah yang berwarna kuning bening

dan fase organik pada lapisan atas yang berwarna coklat kemerahan. Hal ini dikarenakan bobot jenis etil asetat lebih kecil yaitu 0,894 – 0,898 g/mL (Moffat *et al.*, 2005) dibandingkan bobot jenis air 0,9971 g/mL (Moffat *et al.*, 2005), sehingga membuat etil asetat berada pada bagian atas pada corong pisah. Selanjutnya fase air ditampung untuk dilakukan proses pemurnian. Proses kedua, dilakukan tahap pemurnian (*purification*) yang dilakukan untuk mendapatkan alkaloid pada fase air yang telah terbebas dari lipid dan resin.

Kromatografi Lapis Tipis dan Identifikasi dengan Pereaksi Kimia

Tabel 4. Pengamatan KLT sebelum disemprot dengan H₂SO₄ 10%

Pengamatan	Fraksi	Rf	HRf
Hasil Pengamatan KLT Sebelum disemprot dengan H ₂ SO ₄ 10% pada UV 366 nm	Fraksi air:		
	Tidak ada spot	-	-
	Fraksi Etil Asetat 1:		
	Tidak ada spot	-	-
	Fraksi Etil Asetat 2:		
	- Spot DI	0,175	17,5
	- Spot DII	0,275	27,5
	- Spot DIII	0,375	37,5
	Fraksi Ekstrak Metanol:		
	Tidak ada spot	-	-
Hasil Pengamatan KLT Setelah disemprot dengan H ₂ SO ₄ 10% pada UV 366 nm	Fraksi Standar Kinin:		
	- Spot EI	0,3125	31,25
	Fraksi air:		
	Tidak ada spot	-	-
	Fraksi Etil Asetat 1:		
	Tidak ada spot	-	-
	Fraksi Etil Asetat 2:		
	- Spot DI	0,25	25
	Fraksi Ekstrak Metanol:		
	- Spot AI	0,2375	23,75
Fraksi Standar Kinin:	- Spot EI	0,25	25
	- Spot EII	0,3125	31,25



Gambar 1. Identifikasi KLT di bawah sinar UV 254nm dan 366nm sesudah disemprot H₂SO₄ 10%

Kromatografi lapis tipis merupakan teknik pemisahan campuran yang didasarkan pada

perbedaan kecepatan perambatan suatu komponen dalam medium tertentu yang banyak digunakan untuk tujuan analisis (Gandjar dan Rohman, 2007). Hasil pada UV 366 sebelum disemprot H_2SO_4 10% menunjukkan penampakan kromatogram yang padam dengan spot-spot yang berpendar. Spot-spot tersebut merupakan analit hasil pemisahan. Nilai R_f dan H_{Rf} yang diperoleh dihitung, sehingga diperoleh nilai H_{Rf} fraksi etil asetat II adalah spot DI yaitu 17,5; spot DII yaitu 27,5; spot DIII yaitu 37,5 dan standar kinin spot EI yaitu 31,25. Untuk fraksi air, fraksi etil asetat I, dan fraksi ekstrak metanol tidak ditemukan adanya spot.

Reagen kimia asam sulfat 10% yang digunakan dapat bereaksi dengan alkaloid kinin membentuk kinin sulfat. Senyawa yang terbentuk akan memberikan fluoresensi biru pada pengamatan di panjang gelombang 366 nm (Stahl, 1985). Hasil UV 366 setelah disemprot dengan H_2SO_4 10% menunjukkan fluoresensi biru yang mengindikasikan hasil positif adanya senyawa alkaloid, dengan nilai H_{Rf} diantaranya pada fraksi etil asetat II dengan spot DI 25; fraksi ekstrak metanol dengan spot AI yaitu 23,75; dan standar kinin dengan spot EI yaitu 25 serta spot EII yaitu 31,25. Untuk fraksi air dan fraksi etil asetat I tidak ditemukan adanya spot. Pengamatan pada UV 366 sebelum penyemprotan menunjukkan hasil pada fraksi etil asetat II terdeteksi kinin karena ditandai fluoresensi warna biru. Pengamatan hasil setelah dilakukan penyemprotan dengan menggunakan pereaksi semprot menunjukkan data yang lebih spesifik. Pengamatan pada UV 366 menunjukkan hasil terdeteksinya senyawa kinin pada fraksi etil asetat II spot DI, dan fraksi ekstrak metanol spot AI karena ditandai dengan adanya fluoresensi biru pada plat.

Hasil pengamatan spot di bawah UV 254nm mengalami pemadaman bercak berdasarkan R_f standar kinin yang diperoleh yaitu 0,65 maka spot 1 (R_f 0,65) spot 2 (R_f 0,65), dan 3b (R_f 0,6625) merupakan senyawa kinin karena R_f yang didapat mendekati R_f standar kinin. Sedangkan pengamatan spot di bawah UV 366nm berdasarkan r_f standar kinin yaitu (0,33; 0,43; 0,63) maka spot 1b (R_f 0,63), dan spot 3e (R_f 0,625) merupakan senyawa kinin karena R_f yang didapat mendekati R_f standar kinin

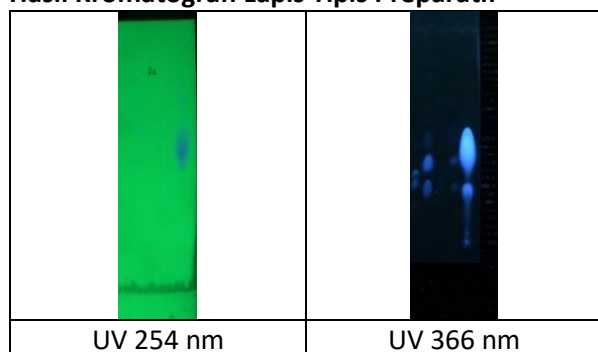
dan dapat berpendar berwarna biru intensif. Hal ini sesuai dengan pustaka yang ada dimana disebutkan bahwa alkaloid kinin apabila bereaksi dengan H_2SO_4 akan memberikan fluoresensi biru intensif (Eagleson, 1993). Kinin mampu berfluoresensi karena memiliki struktur yang kaku dan kromofornya yang diperpanjang. Sistem rangkap terkonjugasi memiliki struktur yang planar dan kaku sehingga akan mampu menyerap secara kuat di daerah UV 200-800 nm pada radiasi elektromagnetik (Gandjar dan Rohman, 2007). Terjadi pengekoran pada hasil pengamatan akibat konsentrasi yang ditotolkan terlalu pekat sehingga banyak spot yang diperoleh dalam 1 fraksi senyawa.

Hasil Kromatografi Lapis Tipis Hasil Fraksinasi

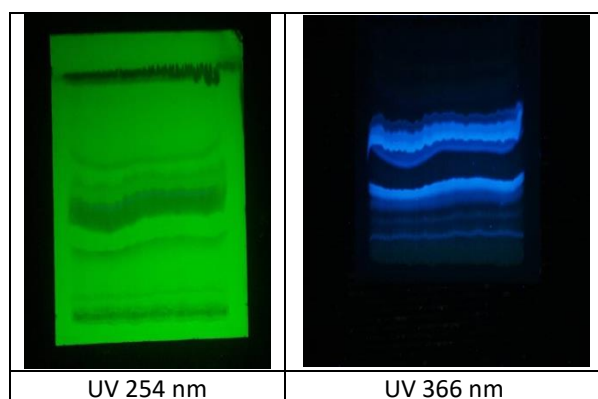
Tabel 6. Hasil Pengamatan KLT Fraksi Kromatografi Vakum Cair

Pengamatan	Fraksi	R_f
Pengamatan pada UV 254nm	1. Fraksi etil asetat: methanol (7:3) v/v	
	- Spot 1	0,65
	2. Fraksi etil asetat: methanol (5:5) v/v	
	- Spot 2	0,65
	3. Fraksi etil asetat: methanol (3:7) v/v	
	- Spot 3A	0,625
	- Spot 3B	0,6625
	- Spot 3C	0,70
	4. Standar kinin	
	- Spot 4	0,65
Pengamatan pada UV 366nm	1. Fraksi etil asetat: methanol (7:3) v/v	
	- Spot 1A	0,28
	- Spot 1B	0,63
	- Spot 1C	0,81
	2. Fraksi etil asetat: methanol (5:5) v/v	
	- Spot 2A	0,30
	- Spot 2B	0,63
	3. Fraksi etil asetat: methanol (3:7) v/v	
	- Spot 3A	0,175
	- Spot 3B	0,237
	- Spot 3C	0,375
	- Spot 3D	0,537
	- Spot 3E	0,625
	- Spot 3F	0,662
	- Spot 3G	0,70
	- Spot 3H	0,78
	4. Standar Kinin	
	- Spot 4A	0,65
	- Spot 4B	0,43
	- Spot 4C	0,63

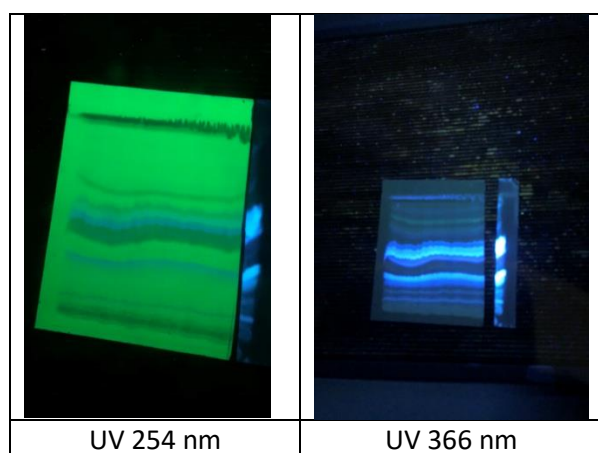
Hasil Kromatografi Lapis Tipis Preparatif



Gambar 2. Hasil subfraksi KLT Preparatif di bawah sinar UV 254 nm dan 366 nm sesudah disemprot H_2SO_4 10%



Gambar 3. Hasil subfraksi KLT Preparatif di bawah sinar UV 254 nm dan 366 nm sebelum disemprot H_2SO_4 10%



Gambar 4. Hasil subfraksi KLT Preparatif di bawah sinar UV 254 nm dan 366 nm sesudah disemprot H_2SO_4 10%.

Keterangan:

Fase diam: KLT Al Silika Gel GF254

Fase gerak: CHCl_3 : MeOH (9:1 v/v)

Penelitian KLT Preparatif dilakukan selama 2 minggu, pada minggu pertama diamati di bawah sinar UV 254 nm sebelum disemprot H_2SO_4 10% didapatkan hasil Rf 1 sebesar 0,1125, Rf 2 sebesar 0,3125, Rf 3 sebesar 0,425, Rf 4 sebesar 0,4875, Rf 5 sebesar 0,55, Rf 6 sebesar 0,625. Hasil di bawah sinar

UV 366 nm sebelum disemprot H_2SO_4 10% adalah Rf 1 sebesar 0,05, Rf 2 sebesar 0,125, Rf 3 sebesar 0,2, Rf 4 sebesar 0,2625, Rf 5 sebesar 0,4375, Rf 6 sebesar 0,4875, Rf 7 sebesar 0,5625, Rf 8 sebesar 0,6625, Rf 9 sebesar 0,75, Rf 10 sebesar 0,7875, Rf 11 sebesar 0,9, Rf 12 sebesar 0,975. Hasil di bawah sinar UV 254 nm setelah disemprot H_2SO_4 10% adalah Rf 4 sebesar 0,2625, Rf 7 sebesar 0,5625. Hasil di bawah sinar UV 366 nm setelah disemprot H_2SO_4 10% adalah Rf 4 sebesar 0,2625, Rf 7 sebesar 0,5625. Analisis kualitatif dilakukan pada penelitian ini dengan membandingkan Rf dan warna fluoresensi yang diperoleh dengan Rf dan warna fluoresensi standar kinin. Penelitian yang dilakukan pada minggu pertama berdasarkan hasil UV 366 nm setelah disemprot H_2SO_4 10% terjadi pendaran biru intensif pada pita 4 dengan Rf 0,2625 dan 7 dengan Rf 0,5625 yang menandakan positif mengandung alkaloid kinin.

Minggu kedua dilakukan penelitian dengan prosedur kerja yang sama seperti minggu pertama dan didapatkan hasil jika diamati di bawah sinar UV 254 nm sebelum disemprot H_2SO_4 10% adalah Rf 1 sebesar 0,5, Rf 2 sebesar 0,237, Rf 3 sebesar 0,41, Rf 4 sebesar 0,625, Rf 5 sebesar 0,91. Hasil di bawah sinar UV 366 nm sebelum disemprot H_2SO_4 10% adalah Rf 1 sebesar 0,075 dengan warna fluoresensi hijau, Rf 2 sebesar 0,2125 dengan warna fluoresensi biru redup, Rf 3 sebesar 0,4375 dengan warna fluoresensi biru intensif, Rf 4 sebesar 0,95 dengan warna fluoresensi biru intensif, Rf 5 sebesar 0,3 dengan warna fluoresensi biru redup. Hal ini menandakan pada sinar UV 366 nm sebelum disemprot H_2SO_4 10% terjadi pendaran biru intensif pada pita 4 dan 5 yang menandakan positif mengandung alkaloid kinin. Hasil pengamatan di bawah sinar UV 254 nm spot tidak berpendar. Hasil pengamatan di bawah sinar UV 366 nm setelah disemprot H_2SO_4 10% adalah Rf 3 sebesar 0,25 dengan warna fluoresensi biru intensif dan Rf 4 sebesar 0,4125 dengan warna fluoresensi biru intensif. Hal ini menandakan pada sinar UV 366 nm sebelum disemprot H_2SO_4 10% terjadi pendaran biru intensif pada pita 3 dan 4 yang menandakan positif mengandung alkaloid kinin. Pita yang positif mengandung kinin kemudian dikerok dan

dilanjutkan dengan proses ekstraksi menggunakan metanol 1 mL selama 1 hari. Kemudian disaring fraksi tersebut menggunakan pipet tetes yang didalamnya telah dimasukkan kapas. Fraksi ditampung dalam botol vial lalu diuapkan dan siap untuk diidentifikasi selanjutnya.

Hasil KLT hasil Subfraksinasi

Tabel 7. Plat KLT yang Diamati di bawah Sinar UV 254nm

Penotolan	Jumlah Spot	Jarak spot (x cm)	Jarak elusi (x cm)	Rf & Hrf
Subfraksi KLT-P IA	-	-	8	-
Subfraksi KLT-P IB	-	-	8	-
Subfraksi KLT-P IIA	-	-	8	-
Subfraksi KLT-P IIB	-	-	8	-
Standar Kinin	1	3,8	8	0,475 & 47,5

Tabel 8. Plat KLT yang Diamati di bawah Sinar UV 366nm

Penotolan	Jumlah Spot	Jarak spot (x cm)	Jarak elusi (x cm)	Rf & Hrf
Subfraksi KLT-P IA	1	2,2	8	0,27 & 27
	2	2,8	8	0,35 & 35
Subfraksi KLT-P IB	1	2	8	0,25 & 25
	2	3,5	8	0,43 & 43
Subfraksi KLT-P IIA	-	-	-	-
Subfraksi KLT-P IIB	1	2	8	0,25 & 25
	2	3,5	8	0,43 & 43
Standar Kinin	1	2	8	0,25 & 25
	2	3,5	8	0,43 & 43

Plat KLT selanjutnya dianalisis pada sinar UV254 dan 366 nm yang pada sinar UV 254 terjadi pepadaman bercak karena yang berfluoresensi pada sinar UV 254 adalah plat KLT karena pada plat tersebut mengandung bahan yang dapat berfluoresensi. Pada UV 366nm sebelum penyemprotan, terlihat 4 spot yang terbentuk yang

menandakan adanya kinin, yaitu subfraksi KLT-P IA dengan nilai Rf 0,27 dan 0,35, subfraksi KLT-P IB dengan nilai Rf 0,25 dan 0,43, subfraksi KLT-P IIB dengan nilai Rf 0,25 dan 0,43, serta standar kinin dengan nilai Rf 0,25 dan 0,43 bercak yang dihasilkan menunjukkan warna biru. Hal tersebut terjadi karena senyawa kinin mampu berfluoresensi memberikan warna biru pada UV366 (Moffat *et al.*, 2005).

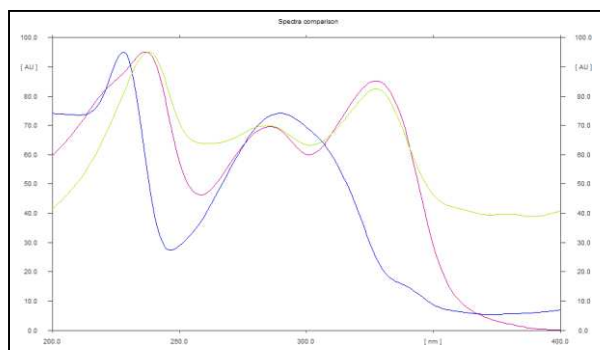
Tabel 9. Plat KLT yang Diamati Di bawah Sinar UV 366 nm setelah disemprot dengan pereaksi H₂SO₄ 10%

Penotolan	Jumlah Spot	Jarak spot (x cm)	Jarak elusi (x cm)	Rf & Hrf
Subfraksi KLT-P IA	1	0,9	8	0,1125 & 11,25
	2	1,7	8	0,2125 & 21,25
	3	2,3	8	0,2875 & 28,75
Subfraksi KLT-P IB	1	1	8	0,125 & 12,5
	2	1,8	8	0,225 & 22,5
	3	3,5	8	0,475 & 47,5
Subfraksi KLT-P IIA	1	2,3	8	0,2875 & 27,5
	1	1,7	8	0,2125 & 21,25
Subfraksi KLT-P IIB	2	3,5	8	0,4345 & 43,45
	1	1,8	8	0,225 & 22,5
Standar Kinin	2	3,4	8	0,425 & 42,5

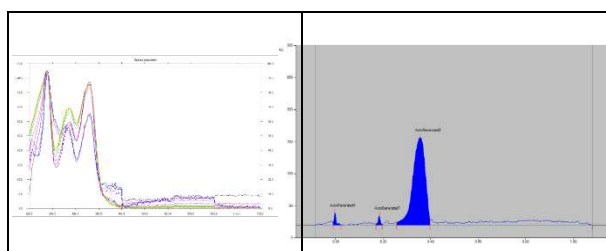
Kinin mampu berfluoresensi karena memiliki struktur yang kaku dan kromofornya yang diperpanjang (Gandjar dan Rohman, 2012). Sistem rangkap terkonjugasi memiliki struktur yang planar dan kaku sehingga akan mampu menyerap secara kuat di daerah 200-800 nm pada radiasi elektromagnetik (Gandjar dan Rohman, 2007). Identifikasi bercak yang dihasilkan dilanjutkan dengan menggunakan pereaksi semprot H₂SO₄ 10%. Pengamatan bercak pada sinar UV254 nm setelah disemprot dengan H₂SO₄ 10% menunjukkan bahwa bercak yang dihasilkan lebih banyak dari sebelum disemprotkan dengan H₂SO₄ 10%. Hal tersebut dapat terjadi karena H₂SO₄ 10% dapat meningkatkan intensitas fluoresensi senyawa kinin, sehingga bercak akan tampak lebih banyak setelah direaksikan

dengan H_2SO_4 10%. Setelah penyemprotan pada UV 366 nm, bercak yang terbentuk 5 spot yaitu subfraksi KLT-P IA dengan nilai R_f 0,1125 : 0,2125 : 0,2875, subfraksi KLT-P IB dengan nilai R_f 0,125 ; 0,225 ; 0,475, subfraksi KLT-P IIA dengan nilai R_f 0,2875, subfraksi KLT-P IIB dengan nilai R_f 0,2125 : 0,4345 serta standar kinin dengan nilai R_f 0,225 dan 0,425. Interpretasi data yaitu pengamatan UV 245 nm sebelum disemprot spot yang sama yaitu standar kinin. Pengamatan di bawah sinar UV 366 sebelum disemprot didapatkan subfraksi KLT-P IB dengan R_f 0,25 dan KLT-P II B dengan R_f 0,43 yang paling sama dengan standar kinin yang mana R_f standar kinin yaitu 0,25 dan 0,43 dan berfluoresensi biru intensif sehingga fraksi yang digunakan selanjutnya yaitu fraksi KLT-P IB dan KLT-P IIB. Pengamatan pada sinar UV 366 nm, setelah disemprot memiliki R_f dan spot yang sama dimana subfraksi KLT-P I B dengan R_f 0,125 ; 0,225 dan 0,475 dan subfraksi KLT-P IIB dengan R_f 0,2125 dan 0,4375 didapatkan fraksi yang sama dengan standar kinin dimana R_f nya adalah 0,225 dan 0,425 sehingga fraksi yang digunakan selanjutnya yaitu subfraksi KLT-P I B dan KLT-P II B.

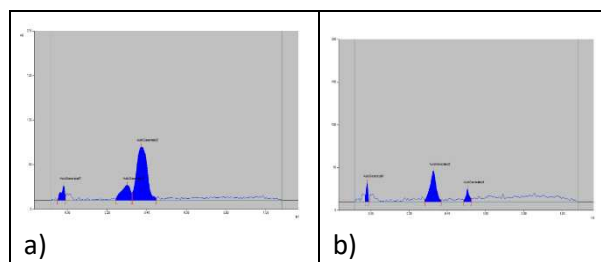
Hasil Identifikasi dengan Metode KLT-Densitometri



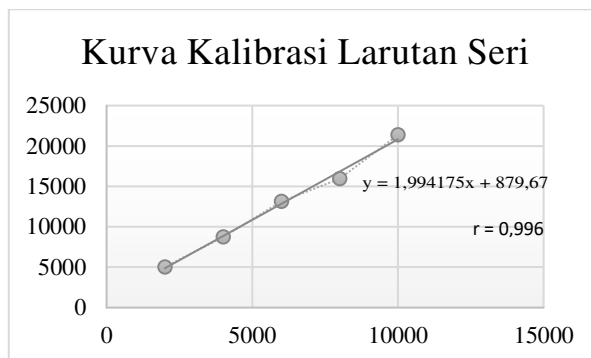
Gambar 5. Spektrogram Standar Kinin (merah muda), Ekstrak Metanol (biru), dan Hasil Subfraksinasi KLT-P (kuning muda)



Gambar 6. Spektrogram dan Kromatogram Standar Kinin



Gambar 7. a) Spektrogram Subfraksi I; b) Spektrogram Subfraksi II



Gambar 8. Kurva Kalibrasi (Hubungan AUC dengan Konsentrasi Larutan Seri)

Pengukuran kadar suatu senyawa dengan sistem Densitometri mode absorpsi dilakukan dengan mengukur serapan dari analit yang menyerap sinar UV sebab senyawa yang ditentukan kadarnya tidak berfluoresensi. Adanya gugus kromofor dari analit akan berinteraksi dengan radiasi elektromagnetik dari sumber lampu UV, mengakibatkan eksitasi elektron ke tingkat energi yang lebih tinggi. Pada proses eksitasi ini, akan diserap energi yang terukur sebagai absorbansi. Absorbansi ini akan dideteksi oleh detektor dari spektrofotodensitometer. Dimana metode ini merupakan suatu metode yang dapat digunakan untuk melakukan suatu analisis baik analisis kualitatif dan kuantitatif. Dimana analisis kualitatif merupakan suatu metode yang dapat digunakan untuk mengetahui ada atau tidaknya suatu senyawa yang ingin dicari dalam suatu komponen atau tumbuhan sedangkan analisis kuantitatif merupakan suatu metode yang digunakan untuk mengetahui kadar dari analit yang sedang dianalisis (Gandjar dan Rohman, 2007).

Hasil dari proses pengukuran menggunakan densitometer tersebut ditemukan *peak* baik itu larutan uji standar kinin, dan larutan subfraksinasi hasil KLT-P I dan II. Hasil yang diperoleh dari dengan menggunakan metode KLT-densitometri nilai R_f ,

spektrum dan AUC. Rf dan spektrum digunakan untuk analisis kualitatif sedangkan AUC dipergunakan untuk analisis kuantitatif. Berdasarkan data AUC dari standar maka diperoleh kurva kalibrasi dengan persamaan $y = 1,994175x + 879,67$ dengan nilai $r = 0,996$. Dilihat dari nilai r mendekati 1, maka persamaan regresi tersebut memenuhi persyaratan linieritas. Kemudian dilakukan penetapan kadar seri dengan 5 konsentrasi berbeda diperoleh hasil kadar berturut-turut yaitu 1039,384 µg/mL; 987,492 µg/mL, 1022,714 µg/mL, 945,305 µg/mL dan 1027,253 µg/mL. Diperoleh % *recovery* dari masing-masing seri 1,2,3,4, dan 5 berturut-turut yaitu 103,938 % ; 98,749 % ; 102,271% ; 94,531 % dan 102,725 % . sehingga diperoleh rata-rata % *recovery* sebesar 100,442 %.

Kandungan minimal alkaloid dalam tanaman kina adalah 6,5%, dimana 30-60% merupakan alkaloid kinin dan kandungan kinin dalam kulit batang kina liar adalah 7% sedangkan untuk tanaman kina yang dibudidayakan dapat mengandung alkaloid kinin sampai 15% (Misra *et al.*, 2008). Jadi, dalam 25 mg serbuk kina yang diekstraksi menggunakan metode Soxhlet diperoleh kadar kinin dengan jumlah yang sangat sedikit hal ini disebabkan oleh metode preparasi sampel yang dilakukan, karena pemisahan yang tidak baik menyebabkan kadar kinin yang terdeteksi menjadi sangat kecil.

SIMPULAN

Berdasarkan hasil identifikasi dan penetapan kadar dengan metode KLT-Densitometri bahwa sampel positif mengandung kinin dan diperoleh perhitungan kadar kinin. Penetapan kadar total kinin dalam standar kinin menghasilkan nilai rata-rata % *recovery* yaitu 100,442 % dan kadar total kinin dalam subfraksi KLT-P I dan II secara berturut-turut menghasilkan kadar sebesar 0,402612 mg/mL dan 0,155830 mg/mL dengan nilai kadar rata-rata yaitu 0,279221 mg/mL.

DAFTAR PUSTAKA

- Amalia, E., Parwati, T., dan Simanjuntak, P. (2004). Produksi Asam Lemak Oleat oleh Mikroba Endofit *Sporodiobolus salmonicolor* dan Tumbuhan Kina (*Cinchona pubescens* Vahl.). Pusat Penelitian Bioteknologi LIPI.
- Depkes RI., (2014). Farmakope Indonesia. Edisi Kelima. Departemen Kesehatan Republik Indonesia.
- Depkes RI., 1995. Farmakope Indonesia. Edisi Keempat. Departemen Kesehatan Republik Indonesia
- Eagleson, M. (1993). Concise Encyclopedia Chemistry. Walter de Gruyter.
- Gandjar, I. G., & Rohman, A. (2007). Kimia Farmasi Analisis. Pustaka Pelajar.
- Gandjar, I. G., & Rohman, A. (2012). Analisis Obat secara Spektroskopi dan Kromatografi. Pustaka Pelajar.
- Harborne, J.B., (1987). Metode Kimia Penuntun Cara Modern Menganalisis Tumbuhan. Penerbit ITB.
- Harijanto., & Paul, N. (2006). Buku Ajar Ilmu Penyakit Dalam. Jilid III edisi V. Pusat Penerbitan Departemen Ilmu Penyakit Dalam.
- Kristanti, A. N., Aminah, N. S., Tanjung, M., Kurniadi, B. (2008). Buku Ajar Fitokimia. Jurusan Kimia Laboratorium Kimia Organik FMIPA Universitas Airlangga.
- Leliqia, N.P.E., Ariantari, N.P., Warditiani, N.K., Paramita, N.L.P.V., Samirana, P.O., Putra., A.A.R.Y. (2019). Petunjuk Praktikum Fitokimia. Jurusan Farmasi FMIPA Universitas Udayana.
- Merck, I. (2001). An Encyclopedia of Chemicals, Drugs, and Biologicals. 13th Edition. Merck & Co Inc.

- Misra, H., Metha, B. K., & Jain, D. C. (2008). Optimization of Extraction Conditions and HPTLC -UV Method for Determination of Quinine in Different Extracts of Cinchona species Bark. *Rec. Nat. Prod.* 2(4), 107-115.
- Moffat, C. A., Osselton, M. D., Widdop, B. (2005). *Clarke's Analysis of Drugs and Poisons, In Pharmaceuticals, Body Fluids, and Postmortem Material.* 3rd Edition. Pharmaceutical Press.
- Stahl, E. (1985). *Analisis Obat Secara Kromatografi dan Mikroskopi.* Penerbit ITB.
- Wink, M. (2008). *Ecological Roles of Alkaloid.* VCH Verlag GmbH & Co. KGaA.