



**ISOLASI DAN IDENTIFIKASI SENYAWA STEROID DARI FRAKSI DIKLOROMETANA
EKSTRAK BATANG SONGGA (*Strychnos lucida*)**

TUGAS AKHIR

Untuk Memenuhi Persyaratan

Memperoleh Gelar Sarjana Farmasi



Oleh:

Istiqomah Fiddini

NIM 175070507111011

PROGRAM STUDI SARJANA FARMASI

FAKULTAS KEDOKTERAN

UNIVERSITAS BRAWIJAYA

MALANG

2021



HALAMAN PENGESAHAN

TUGAS AKHIR

ISOLASI DAN IDENTIFIKASI SENYAWA STEROID DARI FRAKSI DIKLOROMETANA EKSTRAK BATANG SONGGA (*Strychnos lucida*)

Oleh:

Istiqomah Fiddini

175070507111011

Telah diuji pada:

Hari: Selasa

Tanggal: 15 Juni 2021

dan dinyatakan lulus oleh:

Penguji-I

apt. Alvan Febrian Shalas, M. Farm

NIP.198502182019031007

Pembimbing-I/Penguji-II

apt. Uswatun Khasanah, S.Farm., M.Farm

NIP. 2011068502181001

Pembimbing-II/Penguji-II

apt. Bachtiar Rifa'i PI, S.Farm., M.Farm

NIP. 20120587029001

Mengetahui,

Kepala Program Studi Sarjana Farmasi

Fakultas Kedokteran Universitas Brawijaya



apt. Alvan Febrian Shalas, M. Farm

NIP.198502182019031007

**PERNYATAAN KEASLIAN TULISAN**

Saya yang bertanda tangan di bawah ini:

Nama : Istiqomah Fiddini

NIM : 175070507111011

Program Studi : Program Studi Sarjana Farmasi Fakultas Kedokteran Universitas Brawijaya

Menyatakan dengan sebenarnya bahwa Tugas Akhir yang saya tulis ini benar-benar hasil karya saya sendiri, bukan merupakan pengambil-alihan tulisan atau pikiran orang lain yang saya akui sebagai tulisan atau pikiran saya. Apabila di kemudian hari dapat dibuktikan bahwa Tugas Akhir ini adalah hasil plagiasi, maka saya bersedia menerima sanksi atas perbuatan tersebut.

Mataram, Juni 2021

Yang membuat pernyataan,

(Istiqomah Fiddini)

NIM. 175070507111011

KATA PENGANTAR

Segala puji bagi Allah SWT yang telah melimpahkan anugrah dan ridho-Nya hingga penulis dapat menyelesaikan Tugas Akhir yang berjudul “Isolasi dan Identifikasi Steroid dari Fraksi Diklorometana Ekstrak Batang Songga (*Strychnos lucida*)”. Dengan selesainya Tugas Akhir ini, penulis mengucapkan terima kasih yang sebesar-besarnya kepada:

1. Ibu apt. Uswatun Khasanah, S. Farm., M. Farm. selaku dosen pembimbing I yang telah membimbing penulisan naskah serta penelitian dari awal hingga akhir, memberi masukan dan banyak pengetahuan baru, serta senantiasa sabar membimbing sehingga saya bisa menyelesaikan Tugas Akhir ini.
2. Bapak apt. Bachtiar Rifai Pratita Ihsan, S. Farm., M. Farm. selaku dosen pembimbing II yang telah memberikan ilmu, memberi saran, dan banyak membantu dalam penelitian dan penyusunan naskah sehingga saya bisa menyelesaikan Tugas Akhir ini.
3. Bapak apt. Alvan Febrian Shalas, M. Farm. selaku Ketua Program Studi Farmasi Fakultas Kedokteran Universitas Brawijaya dan dosen penguji yang telah memberikan banyak masukan untuk menyempurnakan naskah Tugas Akhir ini.
4. Pihak Laboratorium Farmasi Fakultas Kedokteran Universitas Brawijaya yang selalu membantu dalam proses penelitian.
5. Pihak Lembaga Ilmu Penelitian Indonesia (LIPI), Ciputat, Tangerang yang telah membantu proses identifikasi senyawa dengan FTIR dan LC-MS/MS.
6. Keluarga saya yang telah senantiasa mendukung dan mendoakan saya selama proses pengerjaan Tugas Akhir ini.
7. Kakak-kakak, tema-teman, dan sahabat penulis yang senantiasa berjuang bersama, mendukung, memberikan semangat dan bantuan, memberikan doa, dan mendengar keluh kesah penulis selama ini.



Penulis menyadari bahwa Tugas Akhir ini masih jauh dari kata sempurna. Oleh karena itu, penulis menerima dengan tangan terbuka untuk segala kritik dan saran.

Semoga Tugas Akhir ini bermanfaat bagi pembaca, khususnya bagi profesi di bidang kesehatan.

Mataram, Juni 2021

Penulis



ABSTRAK

Fiddini, Istiqomah. 2021. **Isolasi dan Identifikasi Senyawa Steroid dari Fraksi Diklorometana Ekstrak Batang Songga (*Strychnos lucida*)**. Tugas Akhir, program studi Sarjana Farmasi, Fakultas Kedokteran Universitas Brawijaya. Pembimbing: (1) apt. Uswatun Khasanah, S.Farm.,M. Farm. (2) apt. Bachtiar Rifai Pratita Ihsan, S. Farm., M. Farm.

Indonesia merupakan negara dengan keanekaragaman hayati yang melimpah, terdapat sedikitnya 30.000 jenis tumbuhan obat di Indonesia (Kemendag, 2009). Salah satunya adalah tanaman songga (*Strychnos lucida*) yang secara empiris digunakan sebagai obat malaria oleh masyarakat NTB dan Bali (Setiawan, 2014). Penelitian sebelumnya menunjukkan bahwa serbuk kayu songga mengandung flavonoid, alkaloid, triterpenoid, steroid, tannin, dan hidrokuinon (Syafii, 2016). Tujuan penelitian ini adalah mengisolasi dan mengidentifikasi senyawa steroid dari batang songga (*Strychnos lucida*). Simplisia batang songga diekstraksi dengan etanol 80% dan diekstraksi cair-cair dengan pelarut dikloromeana, etil asetat, dan n-butanol. Fraksi diklorometana diisolasi lebih lanjut dengan metode kromatografi cair vakum dan kromatografi kolom. Kromatografi Lapis Tipis (KLT) dilakukan setelah setiap prosedur isolasi untuk skrining metabolit sekunder dari setiap subfraksi. Identifikasi dilakukan dengan instrumen spektrofotometri UV-Vis, spektroskopi FTIR (*Fourier Transform Infra Red*), dan LC-MS/MS (*Liquid Chromatography-Mass Spectroscopy/Mass Spectroscopy*). Hasil analisis isolat dengan HPLC menunjukkan bahwa waktu retensi peak terluas adalah 1.675 menit dengan panjang gelombang maksimum 202.6 nm. Hasil analisis dengan FTIR menunjukkan isolat mengandung gugus penyusun steroid pada 2924.21^{-1} , 2855.73^{-1} , dan 720^{-1} . Analisis dengan LC-MS/MS menyatakan isolat mengandung senyawa stigmast-4-ene-3,6-dione pada menit ke-9.98 yang merupakan steroid golongan stigmastan.

Kata kunci: Batang songga (*Strychnos lucida*), steroid, HPLC, FTIR, LC-MS/MS, stigmast-4-ene-3,6-dione.



ABSTRACT

Fiddini, Istiqomah. 2021. **Isolation and Identification of Steroids in Dichloromethane Fraction from *Strychnos lucida* wood extract.** Final Project, Bachelor of Pharmacy, Medical Faculty, Brawijaya University. Supervisors: (1) apt. Uswatun Khasanah, S.Farm.,M. Farm. (2) apt. Bachtiar Rifai Pratita Ihsan, S. Farm., M. Farm.

Indonesia is a country with abundant natural resources, one of them is *Strychnos lucida*. In Bali and West Nusa Tenggara, *Strychnos lucida* has been used empirically as a medication for malaria. Previous research stated that the sawdust of *Strychnos lucida* contains flavonoids, alkaloids, terpenoids, steroids, tannins, and hydroquinones. The purpose of this research is to isolate and identify steroids from the wood of *Strychnos lucida*.

Simplicia of *Strychnos lucida*'s wood was extracted with ethanol 80% and separated into four fractions; dichloromethane, ethyl acetate, n-butanol, and water with liquid-liquid extraction method. Dichloromethane fraction was selected to be isolated with vacuum liquid chromatography and column chromatography. After each step of isolation, Thin Layer Chromatography (TLC) was performed to screen the secondary metabolites contain in every subfraction. The isolate obtained then identified with UV-Vis spectrophotometry, FTIR (*Fourier Transform Infra-Red*) spectroscopy, and LC-MS/MS (*Liquid Chromatography-Mass Spectroscopy/Mass Spectroscopy*). UV-Vis spectrophotometry result showed that the isolate has a maximum wavelength of 284 nm. FTIR spectroscopy result showed that the isolate has the functional groups of steroid at 2924.21-1, 2855.73-1, dan 720-1. Analysis with LC-MS/MS stated that the isolate contains a steroid from the stigmastane group, stigmast-4-ene-3,6-dione at minutes 9.98.

Keywords: *Strychnos lucida* wood, steroids, spectrophotometer UV-Vis, FTIR, LC-MS/MS, stigmast-4-ene-3,6-dione.



DAFTAR ISI

ABSTRAK	vi
ABSTRACT	vii
DAFTAR ISI	viii
DAFTAR TABEL	xi
DAFTAR GAMBAR	xii
DAFTAR LAMPIRAN	xiv
BAB I PENDAHULUAN	1
1.1 Latar Belakang Masalah	1
1.2 Rumusan Masalah	3
1.3 Tujuan Penelitian	3
1.3.1 Tujuan Umum	3
1.3.2 Tujuan Khusus	4
1.4 Manfaat Penelitian	4
1.4.1 Manfaat Akademik	4
1.4.2 Manfaat Praktis	4
BAB II	6
2.1 Tinjauan Tanaman Songga	6
2.1.1 Klasifikasi	6
2.1.2 Nama Daerah	7
2.1.3 Habitat	7
2.1.4 Morfologi	7
2.1.5 Kandungan Metabolit Sekunder	8
2.1.6 Aktivitas Farmakologi	9
2.2 Tinjauan Golongan Steroid	10
2.2.1 Definisi dan Struktur	10
2.2.2 Klasifikasi Steroid	11
2.2.2.1 Saponin Steroid	11
2.2.2.2 Glikosida Jantung	12
2.2.2.3 Asam Empedu	12
2.2.2.4 Withasteroid	13
2.2.2.5 Steroid Alkaloid	13
2.2.3 Aktivitas Farmakologi Steroid	14



2.2.4 Pemisahan dan Identifikasi Steroid	15
2.3 Tinjauan Ekstraksi	15
2.3.1 Definisi Ekstrak	15
2.3.2 Metode Ekstraksi.....	15
2.3.2.1 Maserasi.....	16
2.3.2.2 Perkolasi.....	16
2.3.2.3 Refluks	16
2.3.2.4 Soxhlet	16
2.3.2.5 Digesti	17
2.3.2.6 Infus	17
2.3.2.7 Dekok	17
2.3.3 Faktor yang Memengaruhi Ekstraksi.....	17
2.4 Metode Pemisahan.....	19
2.4.1 Ekstraksi Cair-Cair	19
2.4.2 Kromatografi Lapis Tipis (KLT).....	19
2.4.3 Kromatografi Kolom	20
2.4.5 Kromatografi Cair Vakum (KCV)	21
2.5 Identifikasi	22
2.5.1 Spektrofotometri UV-Vis.....	22
2.5.2 Fourier Transform Infrared (FTIR) Spectroscopy.....	25
2.5.3 Liquid Chromatography-Mass Spectroscopy/Mass Spectroscopy (LC-MS/MS).....	27
BAB III KERANGKA KONSEP PENELITIAN.....	34
3.1 Kerangka Konsep.....	34
BAB IV METODE PENELITIAN	36
4.1 Rancangan Penelitian.....	36
4.2 Populasi dan Sampel.....	36
4.2.1 Populasi	36
4.2.2 Sampel.....	36
4.3 Variabel Penelitian.....	36
4.3.1 Variabel Bebas.....	36
4.3.2 Variabel Terikat.....	36
4.4 Lokasi dan Waktu Penelitian.....	37
4.4.1 Lokasi Penelitian.....	37
4.4.2 Waktu Penelitian	37
4.5 Bahan dan Alat/Instrumen Penelitian.....	37
4.5.1 Bahan Penelitian.....	37



4.5.2 Alat/Instrumen Penelitian	37
4.6 Definisi Istilah/Operasional.....	37
4.7 Prosedur Penelitian	38
4.7.1 Ekstraksi	38
4.7.2 Ekstraksi Cair-Cair	39
4.7.3 Kromatografi Cair Kolom Vakum DCM.....	39
4.7.4 Kromatografi Kolom	40
4.7.5 Identifikasi Golongan Senyawa	41
4.7.5.1 KLT.....	41
4.7.6 Identifikasi Struktur.....	41
4.7.6.1 Spektrofotometri UV-Vis	41
4.7.6.2 FTIR	42
4.7.6.3 LC-MS/MS	42
4.7.7 Analisis Data	42
BAB V HASIL.....	43
5.1 Hasil Pembuatan Ekstrak.....	43
5.2 Hasil Ekstraksi Cair-Cair	44
5.3 Hasil Pemisahan dengan Kromatografi Cair Vakum (KCV)	46
5.4 Hasil Pemisahan dengan Kromatografi Kolom Lambat	47
5.5 Hasil Identifikasi Golongan dengan Kromatografi Lapis Tipis.....	49
5.6 Hasil Spektro UV	50
5.7 Hasil Identifikasi dengan FTIR	51
5.8 Hasil Identifikasi dengan LC-MS/MS	52
BAB VI PEMBAHASAN.....	55
6.1 Pembahasan Hasil Penelitian	55
6.2 Implikasi Penelitian	62
6.3 Keterbatasan Penelitian.....	62
BAB 7 PENUTUP.....	62
7.1 Kesimpulan	62
7.2 Saran.....	62
DAFTAR PUSTAKA.....	63



DAFTAR TABEL

Tabel 2.1 Hasil analisis fitokimia serbuk kayu songgga.....	9
Tabel 2. 2 Aktivitas farmakologi steroid.....	14
Tabel 5. 1 Hasil proses ekstraksi cair-cair.....	44
Tabel 5. 2 Interpretasi KLT hasil ekstraksi cair-cair	46
Tabel 5.3 Interpretasi KLT gabungan hasil KCV.....	47
Tabel 5.4 Interpretasi KLT gabungan hasil kromatografi kolom.....	49
Tabel 5.5 Interpretasi spektra IR subfraksi D5.1.....	52
Tabel 5. 6 Hasil analisis MS/MS subfraksi D5.7	53
Tabel 5. 7 Fragmentasi senyawa stigmaster-4-ene-3,6-dione	54
Tabel 6. 1 Kemiripan Spektra IR hasil dengan literatur.....	58
Tabel 6.2 Fragmentasi senyawa stigmaster-4-ene-3,6-dione	60



DAFTAR GAMBAR

Gambar 2.1 (A) Pohon; (B) Buah; (C) Daun tanaman songga.....	6
Gambar 2.2 Struktur dasar (1) dan penomoran karbon pada steroid (2)	11
Gambar 2.3 Struktur Saponin Steroid	11
Gambar 2.4 Struktur kardenolida dan bufadianolida	12
Gambar 2.5 Struktur Asam Empedu	13
Gambar 2.6 Struktur Withaferin A	13
Gambar 2.7 Struktur Solasodin	14
Gambar 2.8 Pelarut yang Dapat Digunakan untuk Ekstraksi	18
Gambar 2.9 Proses Pemisahan pada Kromatografi Kolom	21
Gambar 2.10 Hukum Beer – Penyerapan Radiasi.....	23
Gambar 2.11 Spektrum UV digitoxigenin	24
Gambar 2.12 Spektrum UV kolesterol.....	24
Gambar 2.13 Skema Interferometer pada Spektrometer FTIR	25
Gambar 2.14 Spektra IR 5-hydroxy-5 α -cholestan-6-one	27
Gambar 2.15 Komponen MS.....	28
Gambar 2. 16 Prinsip MS/MS.....	29
Gambar 5. 1 Skema Hasil Penelitian.....	43
Gambar 5. 2 Ekstrak Etanol Simplisia Batang Songga (<i>Strychnos lucida</i>).....	43
Gambar 5.3 Hasil ekstraksi cair-cair.....	44
Gambar 5.4 Profil KLT hasil ECC setelah disempnot H ₂ SO ₄ 10%.....	45
Gambar 5.5 Profil KLT gabungan hasil KCV setelah disempnot H ₂ SO ₄ 10%	47
Gambar 5.6 Profil KLT subfraksi D5.1 sebelum disempnot Liebermann-Burchard	50
Gambar 5.7 Spektrum UV isolat D5.1	50
Gambar 5.8 Panjang gelombang maksimum isolat D5.1.....	51
Gambar 5.9 Spektra IR isolat D5.1.....	51



Gambar 5. 10 Kromatogram Isolat D5.7.....	52
Gambar 5.11 Spektra massa isolat D5.7.....	53
Gambar 6. 1 Struktur senyawa stigmast-4-ene-3,6-dione	59
Gambar 6. 2 Jalur fragmentasi senyawa stigmast-4-ene-3,6-dione.....	60
Gambar 6. 3 Pola Fragmentasi stigmast-4-ene-3,6-dione pada isolat D5.7.....	61



DAFTAR LAMPIRAN

Lampiran 1. Surat Determinasi Tanaman Songga (<i>Strychnos lucida</i>)	67
Lampiran 2. Pembuatan Reagen Penampak Noda	68
Lampiran 3. Foto Hasil Optimasi Fase Gerak.....	69
Lampiran 4. Foto KLT hasil Kromatografi Cair Vakum.....	71
Lampiran 5. Foto KLT hasil Kromatografi Kolom Lambat	73
Lampiran 6. Nilai R _f hasil kolom lambat D5.....	75
Lampiran 7. Hasil identifikasi dengan FTIR	77
Lampiran 8. Hasil identifikasi dengan LC-MS/MS.....	78
Lampiran 9. Detail instrumen dan sistem running LC-MS/MS	85

BAB I

PENDAHULUAN

1.1 Latar Belakang Masalah

Sejak zaman kuno, bahan alam terutama tumbuhan, hewan, dan mineral telah banyak digunakan untuk mengobati banyak penyakit (Calixto, 2019). Sumber bahan alam memiliki keragaman struktur kimia yang sangat luas, yang disertai dengan kemampuannya untuk mengubah fungsi biologis tubuh manusia menyebabkan bahan alam mendapat perhatian yang cukup besar dalam pengembangan obat. Berdasarkan survei lisan yang dilakukan di berbagai belahan dunia, banyak tanaman obat yang secara empiris telah digunakan oleh manusia untuk mengatasi berbagai penyakit (Koparde, 2019). Tanaman obat penting dalam penemuan obat karena mengandung sejumlah besar unsur kimia yang aktif secara biologis. Selama bertahun-tahun, uji klinis telah dilakukan pada berbagai tanaman obat dan sering kali ada korelasi antara penggunaan empiris tanaman obat dan aktivitas biologis dari unsur kimianya (Giang, 2018).

Keberadaan tanaman obat di bumi sangat melimpah, dan setiap tanaman diidentifikasi dengan molekul bioaktif dan sifat terapeutiknya sendiri. Diperkirakan hampir 75.000 spesies tumbuhan tingkat tinggi ada di bumi, dan hanya 1 sampai 5% yang telah dipelajari secara ilmiah dan diketahui memiliki nilai terapeutik (Koparde, 2019). Di Indonesia telah ditemukan sedikitnya 30.000 jenis tumbuhan obat (Kemendag, 2009). Selain itu, penggunaan tanaman obat telah tertanam dalam budaya bangsa sejak berabad-abad lalu. Sebagai negara dengan keanekaragaman hayati yang tinggi, Indonesia dianugerahi kekayaan sumber daya alam termasuk material tanaman obat sebagai aset nasional yang perlu digali, diteliti, dikembangkan dan dioptimalkan pemanfaatannya (Sholikhah, 2016).



Salah satu tanaman obat yang dapat diteliti lebih lanjut adalah tanaman songga.

Secara empiris, batang songga yang dipreparasi dengan cara direbus, satu gelas air rebusan diminum tiga kali sehari digunakan sebagai obat malaria oleh masyarakat Hu'u, Kabupaten Dompu, NTB (Setiawan, 2014). Selain itu, masyarakat juga memanfaatkan hampir semua bagian tanaman songga untuk berbagai penyakit seperti sakit gigi atau gigi berlubang, usus buntu, diare, pegal linu, dan juga sebagai obat luka luar (Hasan, 2011). Kayu songga disebutkan mengandung glikosida bisirdoid, lingustrinosida, dan alkaloid loganin; loganetin, dan asam loganan (Setiawan, 2014). Serbuk kayu tanaman songga terdeteksi mengandung kelompok senyawa flavonoid, alkaloid, triterpenoid, steroid, tannin dan hidrokuinon (Syafii, 2016).

Steroid telah diketahui memiliki banyak aktivitas farmakologi yang berbeda-beda, seperti aktivitas anti-inflamasi (kortikosteroid), hormon seks (progesteron dan estrogen), dan steroid jantung (digoxin dan digitoxin) (Patel S. S., 2015). Steroid tanaman memiliki berbagai efek terapeutik seperti penurunan kadar kolesterol darah hingga 15%, mencegah kanker (Sultan, 2015), *growth-promoting phytohormone*, immunosupresif, hepatoprotektif, antibakteri, antihelmintik, dan aktivitas kardiotonik (Patel S. S., 2015). Penelitian telah menunjukkan bahwa steroid juga dapat mempengaruhi ekspresi gen, translasi, dan aktivitas enzim (Neilsen, 2014). Brassinolide telah terbukti dapat mempengaruhi proses pemanjangan sel, pembelahan sel, dan represi gen yang mengatur stress (Sultan, 2015).

Salah satu golongan steroid yang terkandung dalam tanaman songga (*Strychnos lucida*) adalah steroid saponin (Gusmailina, 2015). Saponin steroid adalah steroid dengan jumlah atom karbon 27 (C27) yang mengalami modifikasi pada rantai sampingnya dan menghasilkan spiroketal (Dewick, 2002). Saponin steroid memiliki beberapa aktivitas farmakologi, diantaranya antitumor, antibakteri, antifungi, antivirus, antiinflamasi, antioksidan, antihiperlipidemia dan efek hipoglikemia (Chen F.-F. Z.-W.-F., 2016). Pada penelitian lain terhadap tanaman dalam genus yang sama dengan *Strychnos lucida*, yaitu *Strychnos potatorum* menunjukkan bahwa ekstrak akar, kulit



kayu, dan biji *Strychnos potatorum* mengandung sterol yang diperkirakan adalah sitosterol, stigmasterol, dan campsterol (Mallikharjuna, 2007).

Berdasarkan penelitian sebelumnya mengenai tanaman songga menyatakan bahwa tanaman songga mengandung senyawa metabolit sekunder golongan steroid.

Senyawa golongan teroid memiliki beberapa aktivitas farmakologi yang bermanfaat dalam pengobatan, maka dilakukan isolasi steroid dari ekstrak batang songga. Untuk mendapatkan senyawa murni dari sampel tanaman, strategi pemurnian selalu terdiri dari beberapa prosedur yaitu ekstraksi, prepurifikasi, dan kemudian satu atau beberapa langkah kromatografi (Dinan, Harmatha, & Lafont, 2001). Metode isolasi yang dipilih adalah metode maserasi karena tidak menggunakan panas sehingga tidak merusak metabolit yang terkandung di dalamnya dan relatif cepat (Depkes RI, 2000).

Setelah ekstraksi, langkah selanjutnya yaitu partisi dengan dua pelarut yang tidak dapat larut (Dinan, Harmatha, & Lafont, 2001). Pada langkah ketiga, prosedur kromatografi mulai digunakan. Selanjutnya, KLT dapat dilakukan untuk memeriksa kemurnian senyawa atau sebagai langkah pemurnian tambahan (Dinan, Harmatha, & Lafont, 2001). Isolat yang diperoleh kemudian dapat diprediksi strukturnya berdasarkan spektra UV, LC-MS/MS, dan FTIR.

1.2 Rumusan Masalah

Bagaimana struktur kimia senyawa steroid yang diisolasi dari fraksi diklorometana ekstrak batang songga?

1.3 Tujuan Penelitian

1.3.1 Tujuan Umum

Tujuan umum dari penelitian ini adalah untuk memperoleh informasi prediksi struktur isolat dari fraksi diklorometana ekstrak batang songga (*Strychnos lucida*).



1.3.2 Tujuan Khusus

Tujuan khusus dari penelitian ini adalah untuk memperoleh informasi prediksi struktur isolat steroid dari fraksi diklorometana ekstrak batang songga (*Strychnos lucida*)

berdasarkan data spektra UV, LC-MS/MS, dan FTIR.

1.4 Manfaat Penelitian

1.4.1 Manfaat Akademik

Hasil dari penelitian ini dapat dijadikan acuan dasar serta refrensi dalam pengembangan ilmu pengetahuan dan penelitian-penelitian kedepannya terkait isolasi dan identifikasi isolat fraksi diklorometana ekstrak batang tanaman songga (*Strychnos lucida*).

1.4.2 Manfaat Praktis

Hasil dari penelitian ini dapat memperluas wawasan pembaca dan masyarakat umum tentang kandungan dan aktivitas tanaman songga (*Strychnos lucida*). Hal ini diharapkan dapat meningkatkan pengetahuan seputar potensi tanaman songga (*Strychnos lucida*).



BAB II

TINJAUAN PUSTAKA

2.1 Tinjauan Tanaman Songga

2.1.1 Klasifikasi

Kingdom : Plantae (Tumbuhan)

Subkingdom : Tracheobionta (Tumbuhan berpembuluh)

Super Divisi : Spermatophyta (Menghasilkan biji)

Divisi : Magnoliophyta (Tumbuhan berbunga)

Kelas : Magnoliopsida (berkeping dua/dikotil)

Sub Kelas : Asteridae

Ordo : Gentianales

Famili : Loganiaceae

Genus : Strychnos

Spesies : Strychnos lucida Blume



Gambar 2.1 (A) Pohon; (B) Buah; (C) Daun tanaman songga

(Setiawan, 2014)



2.1.2 Nama Daerah

Tanaman dengan nama latin *Strychnos lucida* dikenal dengan nama bidara laut. Selain itu tanaman ini memiliki beberapa nama, di Bima dan Dompu (NTB) dikenal dengan nama kayu songga, sedangkan di Bali lebih dikenal dengan sebutan kayu pait (Setiawan, 2014).

2.1.3 Habitat

Tanaman songga pada umumnya dapat tumbuh di dataran sampai dengan perbukitan dengan kemiringan lereng mulai dari landai hingga curam. Batuan permukaan pada habitat bidara laut relatif sedikit. Pada umumnya tekstur tanah pada habitat songga agak kasar, termasuk dalam kelas tekstur lempung-lempung berpasir. Kelas tekstur ini didominasi oleh komponen pasir dengan struktur granuler. Tanah jenis tersebut memiliki laju peresapan air yang baik, kapasitas penyimpanan air rendah, kandungan unsur hara cenderung rendah, namun sistem perakaran dan permeabilitasnya cukup baik (Setiawan, 2014).

Berdasarkan sifat kimia tanah, tanah tempat tumbuh tanaman songga memiliki pH agak asam (5,5–6,5) dan netral (6,6–7,5) dengan pH terendah 5,9 dan tertinggi 7,5. Tanaman songga tetap mampu beradaptasi dan tumbuh pada tanah-tanah dengan kandungan bahan organik (C, N, P) yang variatif (Setiawan, 2014).

2.1.4 Morfologi

Songga merupakan tanaman berjenis perdu dengan diameter rata-rata mencapai 15 – 20 cm. Tinggi pohon songga dapat mencapai 50 cm dan memiliki banyak tonggak dan batang. Buahnya seperti buah jeruk dimana biji songga berada di dalamnya. Besar buah songga rata-rata seukuran kelereng. Dalam kondisi masih mentah buah songga berwarna hijau, dan ketika sudah masak berwarna kuning. Dalam satu buah songga, bijinya dapat mencapai 2 – 3 biji. Biji songga memiliki ukuran sebesar kancing baju berukuran kecil dengan diameter mencapai 2,5 – 4 mm

(Hasan, 2011). Kayu songga berwarna kuning pucat, keras, dan kuat. Daunnya mempunyai ukuran sekitar 2,6 – 6,1 cm x 1,7 – 3,7 cm dan bagian bawah daun pada umumnya mempunyai warna yang lebih pucat daripada bagian atasnya. Bunga mempunyai kelopak antara 1 – 1,3 mm, sedangkan mahkotanya mempunyai panjang 10 – 15 mm, dan tabungnya sekitar 7 – 12 mm. Pada umumnya, tabung kelopak lebih panjang dari lobusnya (Heyne, 1987). Simplisia kayu songga berupa serutan kayu yang kasar, berwarna coklat di bagian luar dan bagian dalam berwarna putih kecoklatan, tidak berbau, dan rasa pahit (Kemenkes RI, 2017).

2.1.5 Kandungan Metabolit Sekunder

Berdasarkan Farmakope Herbal Indonesia (2017), kayu songga mengandung senyawa alkaloid brusin tidak kurang dari 0,1%. Kayu songga mengandung striknin dan brusin, serta ester asam kuinat yaitu 4-O-(3,5-dimetoksi-4-hidroksibensoil) kuinat loganin, mangan dan silikat. Striknin dan brusin merupakan senyawa utama yang dapat ditemukan pada bagian biji, daun kulit kayu, dan seluruh bagian tanaman. Songga diketahui mengandung alkaloid indol alkaloid lainnya seperti α kolubirin, β kolubirin, ikajin, fomisin, novasin, N-oksistriknin, dan pseudistriknin dengan total kandungan alkaloid sebesar 1,8–5,3%. Kayu songga disebutkan juga mengandung glikosida bisirdoid, lingustrinosida, dan alkaloid loganin; loganetin, dan asam loganan (Setiawan, 2014).

Berdasarkan penelitian yang dilakukan Syafii, et al (2016), analisis fitokimia secara kualitatif menunjukkan bahwa kelompok senyawa yang terdeteksi pada serbuk kayu songga antara lain flavonoid, alkaloid, triterpenoid, steroid, tanin, dan hidrokuinon.



Tabel 2.1 Hasil analisis fitokimia serbuk kayu songgga

Kelompok Senyawa	Hasil
Flavonoid	+
Alkaloid	++
Triterpenoid	+++
Steroid	+
Saponin	-
Tanin	++
Hidrokuinon	++

Keterangan : (-): tidak terdeteksi; (+): positif; (++) : positif kuat; (+++): positif sangat kuat

(Syafii, 2016)

Salah satu golongan steroid yang terkandung dalam tanaman songga (*Strychnos lucida*) adalah steroid saponin (Gusmailina, 2015). Saponin steroid adalah steroid dengan jumlah atom karbon 27 (C27) yang mengalami modifikasi pada rantai sampingnya dan menghasilkan spiroketal (Dewick, 2002). Pada penelitian lain terhadap tanaman dalam genus yang sama dengan *Strychnos lucida*, yaitu *Strychnos potatorum* menunjukkan bahwa ekstrak akar, kulit kayu, dan biji *Strychnos potatorum* mengandung sterol yang diperkirakan adalah sitosterol, stigmasterol, dan campsterol (Mallikharjuna, 2007).

2.1.6 Aktivitas Farmakologi

Secara empiris, batang songga yang dipreparasi dengan cara direbus, satu gelas air rebusan diminum tiga kali sehari digunakan sebagai obat malaria oleh masyarakat Hu'u, Kabupaten Dompu, NTB (Setiawan, 2014).

Hasil pengujian aktivitas antimalaria secara *in vitro* menunjukkan bahwa ekstrak n-heksana, etil asetat, dan etanol kayu songga mampu menghambat pertumbuhan *P. falciparum* (Syafii, 2016). Ekstrak metanol batang songga memiliki aktivitas antibakteri; dalam konsentrasi 25, 50, 75, dan 100% mampu menghambat pertumbuhan klinis bakteri *S. aureus*, *K.pneumoniae*, dan *E. coli* dengan kategori sedang, lemah, serta sedang dan lemah, dan terjadi peningkatan besar daya hambat bakteri seiring dengan besarnya konsentrasi ekstrak (Kurniawan, 2018).

Menurut Gusmailina (2015), salah satu golongan steroid yang terkandung dalam tanaman songga (*Strychnos lucida*) adalah steroid saponin, yang memiliki aktivitas antitumor, antibakteri, antifungi, antivirus, antiinflamasi, antioksidan, antihiperlipidemia dan efek hipoglikemia (Chen F.-F. Z.-W.-F., 2016). Selain itu, penelitian lain terhadap tanaman *Strychnos potatorum* menunjukkan bahwa ekstrak akar, kulit kayu, dan biji *Strychnos potatorum* mengandung sterol yang diperkirakan adalah sitosterol, stigmasterol, dan campesterol (Mallikharjuna, 2007). Sitosterol diketahui memiliki aktivitas antioksidan, antimikroba, angiogenik, imunomodulator, antidiabetes, antiinflamasi, antikanker, dan antinosiseptif tanpa toksisitas yang mayor (Sayeed, 2016). Menurut Kaur (2019), stigmasterol memiliki beberapa aktivitas yaitu aktivitas antiosteoarthritis, antitumor, antiinflamasi, antihiperkolesterolemia, antioksidan, antimutagenik, dan hipoglikemik.

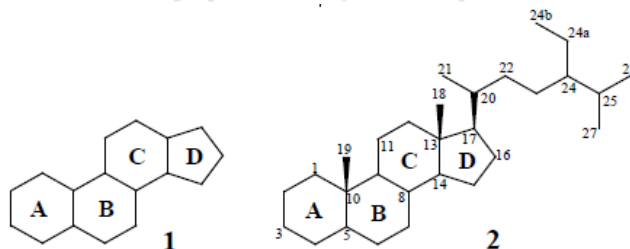
2.2 Tinjauan Golongan Steroid

2.2.1 Definisi dan Struktur

Steroid merupakan modifikasi dari triterpenoid yang memiliki cincin tetrasiklik dari lanosterol (Dewick, 2002). Semua steroid berasal dari kolesterol dengan kerangka dasar siklopentano perhidrofenantrena yang terdiri dari gabungan 3 cincin sikloheksana dan 1 cincin siklopentana dengan 17 atom karbon (C). Biasanya terdapat gugus metil pada C10 & C13 dan sebagian besar rantai samping alkil



terdapat pada C17 (Sultan, 2015). Di antara steroid tanaman, dapat ditemukan senyawa nonpolar, polar atau bahkan yang sangat polar (larut dalam air) (Dinan, Harmatha, & Lafont, 2001).



Gambar 2.2 Struktur dasar (1) dan penomoran karbon pada steroid (2)

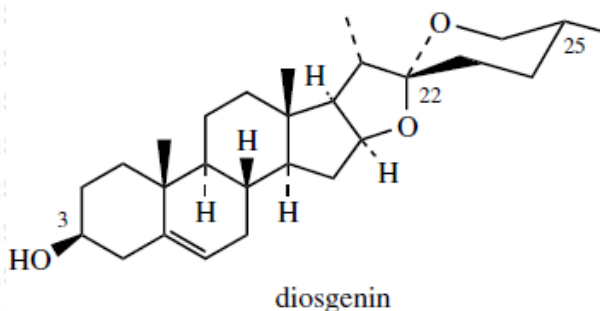
(Sultan, 2015)

2.2.2 Klasifikasi Steroid

Sedikit variasi dalam kerangka dasar steroid atau adanya kelompok fungsional menghasilkan berbagai klasifikasi steroid (Sultan, 2015), antara lain:

2.2.2.1 Saponin Steroid

Saponin steroid banyak banyak ditemukan pada tumbuhan monokotil, khususnya Dioscoreaceae (misalnya Dioscorea), Agavaceae (mis. Agave, Yucca) dan Liliaceae (mis. Smilax, Trillium). Saponin steroid adalah steroid dengan jumlah atom karbon 27 (C27) yang mengalami modifikasi pada rantai sampingnya dan menghasilkan spiroketal. Semua saponin steroid memiliki konfigurasi pusat spiro yang sama yaitu pada C22 (Dewick, 2002).



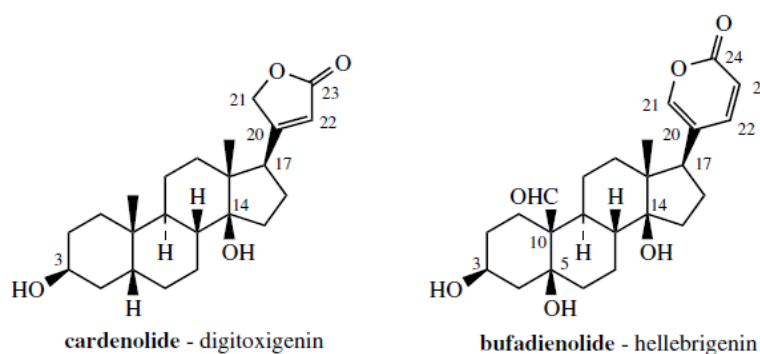
Gambar 2.3 Struktur Saponin Steroid

(Dewick, 2002)

2.2.2.2 Glikosida Jantung

Banyak tumbuhan diketahui mengandung jantung dan telah lama digunakan sebagai racun panah (misalnya *Strophanthus*) atau sebagai obat jantung (misalnya *Digitalis*). Glikosida jantung digunakan untuk memperkuat jantung yang lemah dan memungkinkannya berfungsi lebih efisien, meskipun dosisnya harus dikontrol dengan sangat hati-hati karena indeks terapinya yang sangat sempit (Dewick, 2002).

Aktivitas terapeutik glikosida jantung tergantung pada struktur aglikon yang dimilikinya. Ada dua jenis aglikon yang dikenali, yaitu kardenolida (mis: digitoxigenin) dari *Digitalis purpurea* yang merupakan senyawa C₂₃, dan bufadianolida (mis: hellebrigenin) dari *Helleborus niger*, yang merupakan senyawa C₂₄. Pada kardenolida dan bufadianolida terdapat gugus laktone tak jenuh pada C₁₇ dengan jumlah atom karbon 5 dan 6 berturut (Dewick, 2002).

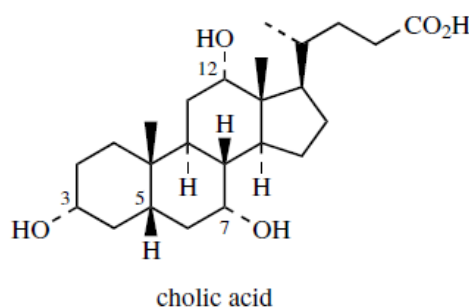


Gambar 2.4 Struktur kardenolida dan bufadianolida

(Dewick, 2002)

2.2.2.3 Asam Empedu

Asam empedu adalah asam steroid C₂₄ dalam bentuk garam empedu yang disekresikan ke dalam usus untuk mengemulsi dan mencerna lemak. Proses pembentukan asam empedu berperan dalam menurunkan kolesterol yang diserap dari makanan. Asam empedu terbentuk di hati dengan oksidasi tiga karbon pada rantai samping dari kolesterol. Karakteristik asam empedu yaitu memiliki 3 gugus hidroksil pada kerangka steroid dan 1 gugus karboksil pada C₂₄ (Dewick, 2002).

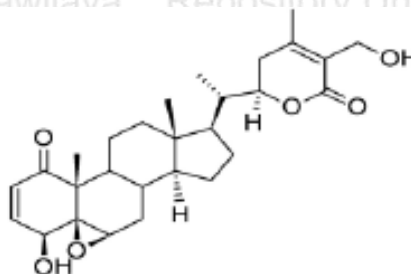


Gambar 2.5 Struktur Asam Empedu

(Dewick, 2002)

2.2.2.4 Withasteroid

Withasteroid merupakan steroid C28 yang memiliki gugus lakton pada C22 dan C26 dan sejumlah gugus fungsi yang mengandung oksigen (mis:hidroksil, karboksil). Pada withasteroid, rantai sampingnya tertaut pada C17 dari kerangka steroid (Patel S. S., 2015).



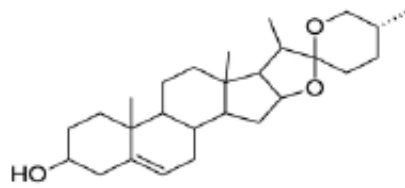
Withaferin A

Gambar 2.6 Struktur Withaferin A

(Patel S. S., 2015)

2.2.2.5 Steroid Alkaloid

Steroid alkaloid merupakan jenis steroid dimana atom nitrogen terintegrasi ke dalam cincin atau sebagai substituen dari kerangka steroid (Patel S. S., 2015). Steroid alkaloid biasanya terdapat pada tanaman Solanaceae (mis: *Solanum mammosum*), yaitu solasodin yang digunakan sebagai bahan baku pembuatan kontrasepsi oral (Endarini, 2016).



Solasodine

Gambar 2.7 Struktur Solasodin

2.2.3 Aktivitas Farmakologi Steroid

Steroid merupakan kelompok metabolit sekunder yang memiliki keanekaragaman dalam struktur dan fungsi biologisnya yang telah terbukti memiliki berbagai macam aktivitas farmakologi, antara lain menurunkan kadar kolesterol, mencegah kanker (Sultan, 2015), sebagai *growth-promoting phytohormone*, immunosupresif, hepatoprotektif, antibakteri, antihelmintik, dan aktivitas kardiotonik (Patel S. S., 2015). Selain itu steroid juga dapat mempengaruhi ekspresi gen, translasi, dan aktivitas enzim (Neilsen, 2014).

Tabel 2. 2 Aktivitas farmakologi steroid

Jenis steroid	Aktivitas farmakologi
Brassinosteroid	<i>Growth-promoting phytohormone</i>
Bufadianolida	Kardiotonik; meningkatkan kekuatan kontraksi jantung
Kardenolida	Kardiotonik, antibakteri
Kukurbitasin	Antitumor, antimikroba, hepatoprotektif, antiinflamasi
Saponin steroid	Antifungi, hormon seks, antitusif
Alkaloid steroid	Antiinflamasi, hormon seks
Withasteroid	Diare, demam rematik, antitumor, immunosupresif, hepatoprotektif

(Patel S. S., 2015)

2.2.4 Pemisahan dan Identifikasi Steroid

Steroid dapat dipisahkan dengan metode Kromatografi Lapis Tipis (KLT) dengan fase diam silika dan fase gerak kloroform:etanol:air (188:12:1) yang kemudian dideteksi di bawah sinar UV 254 dan 366 nm (Bhawani, 2010). Beberapa jenis steroid dapat dipisahkan menggunakan kromatografi kolom atau Kromatografi Lapis Tipis Preparatif (KLTP) dengan adsorben alumina dan eluen berupa campuran sikloheksana-etil asetat atau campuran metilen diklorida-aseton (Endarini, 2016). Identifikasi steroid dapat menggunakan penampak noda Liebermann-Burchard yang dibuat dengan cara menyampurkan 5 ml asetat anhidrida dan 5 ml asam sulfat pekat ditambahkan dengan hati-hati ke dalam 50 ml etanol absolut, sambil didinginkan dalam es. Plat yang telah disemprot kemudian dipanaskan pada suhu 100°C selama 5-10 menit dan diamati di bawah sinar UV 365 nm (Wagner H. a., 1996). Sampel yang jika diamati di bawah sinar UV 365 nm menunjukkan warna biru mengindikasikan bahwa sampel tersebut positif mengandung steroid (Hidayah, 2016).

2.3 Tinjauan Ekstraksi

2.3.1 Definisi Ekstrak

Dalam Farmakope Indonesia edisi 5, ekstrak didefinisikan sebagai sediaan pekat yang diperoleh dengan mengekstraksi zat aktif dari simplisia nabati atau hewani menggunakan pelarut yang sesuai, kemudian semua atau hamper semua pelarut diuapkan dan massa atau serbuk yang tersisa diperlakukan sedemikian hingga memenuhi baku yang telah ditetapkan (Kemenkes RI, 2014).

2.3.2 Metode Ekstraksi

Ekstraksi merupakan proses pemisahan bahan dari campurannya dengan menggunakan pelarut yang sesuai (Abubakar & Haque, 2020). Menurut Depkes RI, ekstraksi dengan menggunakan pelarut dibedakan menjadi 2 cara, yaitu cara dingin



yang terdiri atas maserasi dan perkolasi serta cara panas yang terdiri atas refluks, soxhlet, digesti, infus, dan dekok (Depkes RI, 2000).

2.3.2.1 Maserasi

Metode ini dilakukan dengan memasukkan simplisia dan pelarut yang sesuai ke dalam wadah inert yang tertutup rapat pada suhu ruang. Pengadukan secara berkala dapat mempercepat proses ekstraksi. Setelah proses ekstraksi, pelarut dipisahkan dari sampel dengan penyaringan atau dekantasi (Abubakar & Haque, 2020).

2.3.2.2 Perkolasi

Perkolasi merupakan metode yang lebih efisien daripada maserasi karena merupakan proses berkelanjutan dimana pelarut jenuh terus-menerus diganti dengan pelarut baru (Zhang, 2018). Perkolasi umumnya dilakukan pada suhu ruangan. Prosesnya terdiri dari pengembangan bahan, maserasi antara, tahap perkolasi sebenarnya (penetesan/penampungan ekstrak) yang dilakukan terus menerus sampai diperoleh ekstrak yang jumlahnya 1-5 kali bahan (Depkes RI, 2000).

2.3.2.3 Refluks

Refluks adalah ekstraksi dengan pelarut pada temperature titik didihnya selama waktu tertentu dan jumlah pelarut terbatas yang relative konstan dengan adanya pendingin balik. umumnya dilakukan pengulangan proses pada residu pertama hingga 3-5 kali sehingga dapat termasuk proses ekstraksi sempurna (Depkes RI, 2000). Metode refluks lebih efisien daripada perkolasi dan maserasi serta membutuhkan waktu dan jumlah pelarut yang lebih sedikit. Metode ini tidak dapat digunakan untuk bahan yang termolabil (Zhang, 2018).

2.3.2.4 Soxhlet

Soxhlet adalah ekstraksi dengan pelarut yang selalu baru yang dilakukan dengan alat khusus sehingga terjadi ekstraksi secara kontinu dengan jumlah pelarut yang relative konstan dengan adanya pendingin balik (Depkes RI, 2000). Metode ini



mengintegrasikan keunggulan metode perkolasi dan refluks, yang menggunakan prinsip refluks dan penyedotan untuk terus melakukan ekstraksi dengan pelarut segar. Metode ini memiliki efisiensi ekstraksi tinggi serta waktu dan jumlah pelarut yang lebih sedikit daripada maserasi atau perkolasi. Suhu yang tinggi dan waktu ekstraksi yang lama dalam akan meningkatkan kemungkinan degradasi termal (Zhang, 2018).

2.3.2.5 Digesti

Digesti adalah maserasi kinetik (dengan pengadukan kontinu) pada suhu yang lebih tinggi dari suhu ruangan, umumnya dilakukan pada suhu 40-50°C (Depkes RI, 2000).

2.3.2.6 Infus

Infus adalah ekstraksi dengan pelarut air pada suhu terukur 96-98°C selama 15-20 menit dengan penangas air (bejana indus tercelup dalam penangas air mendidih) (Depkes RI, 2000).

2.3.2.7 Dekok

Dekok adalah infus dengan waktu yang lebih lama pada suhu sampai titik didih air (Depkes RI, 2000). Ekstrak yang diperoleh dari metode ini mengandung sejumlah besar pengotor yang larut dalam air. Dekok tidak dapat digunakan untuk ekstraksi bahan yang termolabil atau mudah menguap (Zhang, 2018).

2.3.3 Faktor yang Memengaruhi Ekstraksi

Sifat-sifat pelarut ekstraksi, ukuran partikel bahan baku, rasio *solvent-to-solid*, suhu ekstraksi dan durasi ekstraksi akan mempengaruhi efisiensi ekstraksi. Pemilihan pelarut sangat penting dalam proses ekstraksi. Selektivitas, kelarutan, biaya dan keamanan harus dipertimbangkan dalam pemilihan pelarut. Berdasarkan prinsip *like-dissolve-like*, pelarut dengan nilai polaritas yang mendekati polaritas zat terlarut akan cenderung bekerja lebih baik, begitu pula sebaliknya. Alkohol (etanol

dan metanol) merupakan pelarut yang umum digunakan dalam ekstraksi pelarut untuk investigasi fitokimia (Zhang, 2018).

Solvent	Polarity index	Boiling point (°C)	Viscosity (cPoise)	Solubility in water (% w/w)
<i>n</i> -Hexane	0.0	69	0.33	0.001
Dichloromethane	3.1	41	0.44	1.6
<i>n</i> -Butanol	3.9	118	2.98	7.81
iso-propanol	3.9	82	2.30	100
<i>n</i> -Propanol	4.0	92	2.27	100
Chloroform	4.1	61	0.57	0.815
Ethyl acetate	4.4	77	0.45	8.7
Acetone	5.1	56	0.32	100
Methanol	5.1	65	0.60	100
Ethanol	5.2	78	1.20	100
Water	9.0	100	1.00	100

Gambar 2.8 Pelarut yang Dapat Digunakan untuk Ekstraksi

(Sarker S. D., 2006)

Umumnya, semakin halus ukuran partikelnya, semakin baik hasil ekstraksi yang dicapai. Efisiensi ekstraksi akan meningkat seiring dengan berkurangnya ukuran partikel karena penetrasi pelarut dan difusi zat terlarut yang meningkat. Namun, ukuran partikel yang terlalu halus akan menyebabkan penyerapan zat terlarut yang berlebih dalam padatan dan menyebabkan kesulitan dalam penyaringan. Temperatur yang tinggi dapat meningkatkan kelarutan dan difusi. Akan tetapi, temperatur yang terlalu tinggi juga dapat menyebabkan hilangnya pelarut (penguapan), yang menghasilkan pengotor yang tidak diinginkan serta terurainya komponen yang termolabil (Zhang, 2018).

Efisiensi ekstraksi meningkat dengan bertambahnya durasi ekstraksi dalam rentang waktu tertentu. Peningkatan waktu tidak akan memengaruhi hasil ekstraksi setelah kesetimbangan zat terlarut dicapai di dalam dan di luar bahan padat. Semakin besar rasio *solvent-to-solid*, semakin banyak hasil ekstraksi; namun rasio *solvent-to-solid* yang terlalu tinggi akan menyebabkan ekstraksi pelarut yang berlebihan dan membutuhkan waktu yang lama untuk pemekatannya (Zhang, 2018).



2.4 Metode Pemisahan

Pemisahan dilakukan untuk memisahkan suatu kuantitas tertentu dari campuran (padat, cair, gas) sehingga dapat terpisah menjadi beberapa jumlah kecil (fraksi). Pemisahan bertingkat biasanya menggunakan pelarut organik seperti eter, aseton, benzene, etanol, diklorometana, atau campuran pelarut tersebut (Adijuwana & M.A., 1989).

2.4.1 Ekstraksi Cair-Cair

Salah satu metode pemisahan yang sering digunakan adalah ekstraksi cair-cair. Ekstraksi cair-cair melibatkan distribusi zat terlarut antara dua fase cair yang tidak bercampur. Teknik ini berguna untuk pemisahan yang sangat cepat dan “bersih” dari kedua zat organik dan anorganik. Alat yang digunakan untuk ekstraksi cair-cair adalah corong pisah. Setelah campuran dikocok selama sekitar satu menit, fase didiamkan agar terjadi pemisahan. Pemisahan ini didasarkan pada massa jenis kedua fraksi, fraksi yang massa jenisnya lebih besar akan berada di bagian bawah (Christian G. D., 2014).

2.4.2 Kromatografi Lapis Tipis (KLT)

Kromatografi lapis tipis (KLT) adalah teknik pemisahan kromatografi cair dimana fase diam terdispersi sebagai lapisan tipis yang ditempatkan pada permukaan pelat yang biasanya terbuat dari kaca atau aluminium foil. Aplikasi KLT yang umum adalah identifikasi bahan aktif dan kontaminan dalam bahan baku atau sediaan farmasi dan analisis herbal yang digunakan sebagai obat atau suplemen makanan. Sampel dilarutkan dalam pelarut yang mudah menguap, ditotolkan dalam jumlah sedikit ($\pm 10 \mu\text{l}$) pada sekitar 2 cm dari ujung pelat dan antar totlan diberi jarak sekitar 1 cm. Pelarut sampel kemudian diuapkan dan pelat dimasukkan ke dalam *chamber* yang berisi fase gerak. *Chamber* kemudian ditutup dan fase gerak bermigrasi ke atas pelat dengan gaya kapiler. Analit bermigrasi di atas pelat tergantung pada distribusinya antara fase gerak dan fase diam. Ketika fase gerak

telah mencapai batas atas pelat, pelat KLT dikeluarkan dari *chamber* dan fase gerak diuapkan dari pelat dalam lemari asam. Posisi, warna dan ukuran noda dalam sampel terlihat pada pelat dan dibandingkan dengan posisi, warna dan ukuran bintik-bintik dalam zat referensi (standar) (Hansen, Bjergaard, & Rasmussen, 2012)

KLT fase normal menggunakan bahan polar silika sebagai fase diam dan pelarut organik sebagai fase gerak sering kali menjadi pilihan utama. Secara umum teknik ini dapat digunakan untuk melihat semua analit. Analit berwarna dapat langsung terlihat, dan zat yang menyerap cahaya UV atau fluoresensi dapat dideteksi ketika pelat KLT diradiasi dengan cahaya dari lampu UV. Pelat KLT juga dapat disemprotkan dengan pereaksi yang bereaksi dengan zat untuk membentuk senyawa berwarna. Selain sebagai teknik yang sederhana dan murah, KLT juga menampilkan semua komponen dalam sampel, termasuk zat dengan interaksi yang kuat ke fase diam, dengan jarak migrasi yang pendek atau bahkan tidak bermigrasi sama sekali (Hansen, Bjergaard, & Rasmussen, 2012).

Retensi zat pada pelat KLT dinyatakan sebagai *retention factor* (R_f). Nilai R_f akan berada dalam rentang antara 0 dan 1 dan. Analit dengan interaksi terkuat dengan fase diam akan memiliki nilai R_f terendah. Nilai R_f didefinisikan sebagai:

$$R_f = \frac{a}{b}$$

Ket:

a = jarak antara batas bawah dan noda

b = jarak antara batas bawah dan batas atas

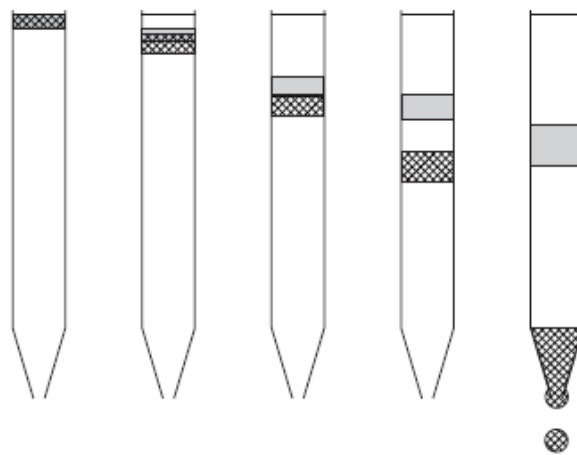
(Hansen, Bjergaard, & Rasmussen, 2012)

2.4.3 Kromatografi Kolom

Pada kromatografi kolom, fase diam ditempatkan dalam kolom sempit tempat fase gerak bergerak di bawah pengaruh gravitasi atau tekanan. Fase diam dapat berupa padatan atau lapisan film tipis yang melapisi dinding kolom. Fase diam yang

telah disiapkan kemudian dimampatkan ke dalam kolom (biasanya berbahan kaca), panjang dan diameternya tergantung pada jumlah sampel yang akan dimuat, mode pemisahan yang akan digunakan, dan tingkat resolusi yang dibutuhkan. Kolom adsorpsi dapat berupa kemasan kering atau basah. Teknik pengepakan basah yang paling umum adalah dengan mencampurkan adsorben dengan pelarut dan dituangkan ke dalam kolom. Saat adsorben mengendap, pelarut berlebih ditampung dan pelarut baru dituangkan ke dalam kolom (Ismail, 2010).

Sampel yang akan dipisahkan dilarutkan dalam fase gerak dengan volume seminimal mungkin dan kemudian diletakkan pada bagian atas kolom. Pada metode ini hanya menggunakan aliran gravitasi atau pompa vakum untuk mempertahankan aliran fase gerak melalui kolom (Ismail, 2010). Pemisahan zat terlarut terjadi sebagai hasil dari migrasi dan diferensiasi melalui kolom, dan analit dapat dipantau saat pemisahan sedang berlangsung (Harvey, 2000).



Gambar 2.9 Proses Pemisahan pada Kromatografi Kolom

(Harvey, 2000)

2.4.5 Kromatografi Cair Vakum (KCV)

Kromatografi Cair Vakum (KCV) digunakan untuk fraksinasi ekstrak total secara cepat. Teknik ini dapat dilakukan dengan menggunakan kolom kromatografi yang dihubungkan dengan pompa vakum, dengan isian kolom silika gel. Sebagai eluen digunakan campuran pelarut dari yang non polar secara bertahap ke yang

polar. Hasil pemisahan dari kromatografi vakum cair adalah fraksi-fraksi yang dapat dikelompokkan menjadi kelompok senyawa non polar, semi polar, dan polar (Heliawati, 2018).

Kromatografi vakum cair merupakan modifikasi dari kromatografi kolom gravitasi. Metode ini lebih banyak digunakan untuk fraksinasi sampel dalam jumlah besar (10-50 g). Kolom yang digunakan biasanya terbuat dari kaca dengan lapisan berpori pada bagian bawah. Kolom disambungkan dengan penampung eluen yang dihubungkan dengan pompa vakum. Pompa vakum akan menghisap eluen dalam kolom, sehingga proses pemisahan berlangsung lebih cepat (Heliawati, 2018).

Kolom KVC dikemas kering dalam keadaan vakum agar diperoleh kerapatan maksimum. Sampel yang akan dipisahkan biasanya sudah diadsorbsikan ke dalam silika kasar terlebih dahulu (ukuran silika kasar 30-70 mesh) agar pemisahannya lebih teratur dan menghindari sampel langsung menerobos ke dinding kaca tanpa melewati adsorben terlebih dahulu, yang dapat berakibat gagalnya proses pemisahan. Pelarut yang kepolarannya rendah dituangkan ke permukaan penyerap yang sebelumnya sudah dimasukkan sampel. Kolom dihisap perlahan-lahan dengan menggunakan vakum. Kolom dieluasi dengan campuran pelarut yang cocok, mulai dengan pelarut yang kepolarannya rendah lalu kepolaran ditingkatkan perlahan-lahan. Kolom dihisap sampai kering pada setiap pengumpulan fraksi, sehingga kromatografi vakum cair disebut juga kolom fraksinasi (Heliawati, 2018).

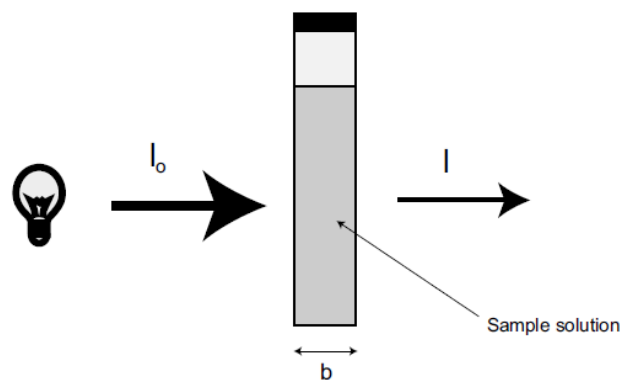
2.5 Identifikasi

2.5.1 Spektrofotometri UV-Vis

Dalam metode spektrofotometri, larutan sampel menyerap radiasi elektromagnetik berupa cahaya dengan panjang gelombang tertentu. Jumlah cahaya yang diserap tergantung pada konsentrasi analit dalam larutan. Panjang gelombang cahaya ultraviolet berkisar antara 10 hingga 380 nm, tetapi rentang yang

paling bermanfaat secara analitis adalah 190 hingga 380 nm. Sedangkan untuk cahaya visual (Vis) memiliki bagian yang sangat kecil dalam spektrum elektromagnetik yaitu antara 380-780, dan itu adalah wilayah panjang gelombang yang bisa dilihat oleh mata manusia (Christian G. D., 2014).

Ketika radiasi elektromagnetik monokromatik (radiasi dengan hanya satu panjang gelombang) dengan intensitas I_0 melewati larutan analit, beberapa radiasi diserap oleh analit sementara sisanya melewati analit (I).



Gambar 2.10 Hukum Beer – Penyerapan Radiasi

(Hansen, Bjergaard, & Rasmussen, 2012)

Menurut hukum Beer, absorbansi (A) sebanding dengan panjang jalur yang dilalui radiasi (b), konsentrasi zat dalam larutan (c), dan absorptivitas molar (ϵ).

Panjang kuvet (b) dinyatakan dalam cm dan konsentrasi analit (c) dalam larutan dinyatakan dalam mol per liter (M).

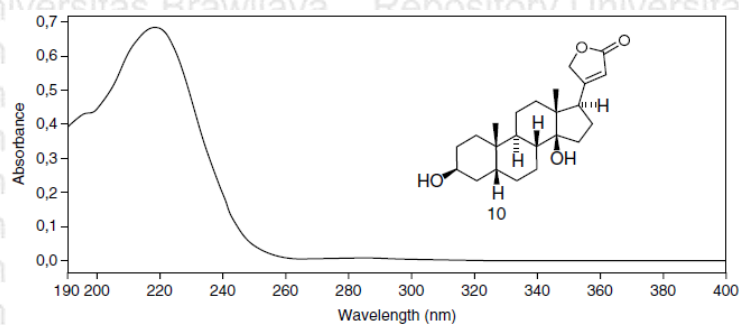
$$A = \epsilon bc$$

(Hansen, Bjergaard, & Rasmussen, 2012)

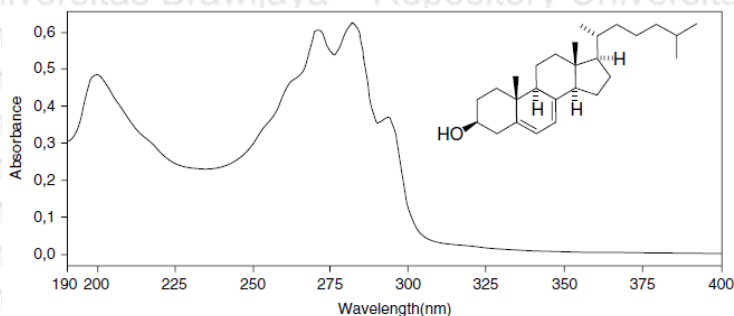
Selain analisis kuantitatif, spektrofotometri UV juga digunakan untuk identifikasi zat. Identifikasi didasarkan pada spektrum UV, dimana absorbansi suatu zat dinyatakan sebagai fungsi panjang gelombang. Zat yang berbeda memiliki

spektrum UV. Zat yang tidak diketahui dapat diidentifikasi dengan spektrofotometri UV jika spektrum dari zat yang tidak diketahui identik dengan spektrum dari zat referensi (standar) yang dikenal. Meski demikian, tidak bisa mendasarkan identifikasi hanya pada UV spektrofotometri karena zat yang berbeda juga dapat memiliki spektrum UV yang serupa. Dalam kasus seperti ini perlu dilakukan identifikasi dengan metode lain seperti IR (Hansen, Bjergaard, & Rasmussen, 2012).

Banyak bentuk spektrum absorpsi UV yang biasa ditemukan pada steroid. Gugus kromofor penting yang terdapat dalam steroid antara lain (i) diena dan triena terkonjugasi dengan λ_{max} berkisar antara 217-313 nm; (ii) keton terkonjugasi tidak jenuh, struktur dasar keton menyerap UV pada panjang gelombang 215 nm (Kasal, 2010).



Gambar 2.11 Spektrum UV digitoxigenin

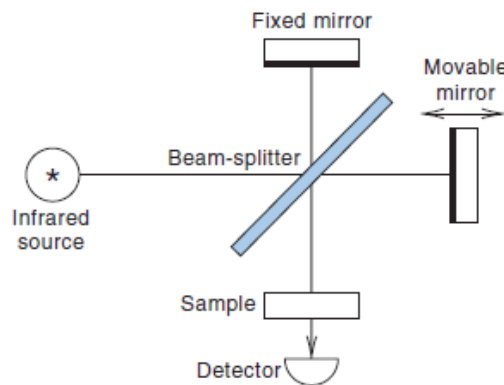


Gambar 2.12 Spektrum UV kolesterol

(Kasal, 2010)

2.5.2 Fourier Transform Infrared (FTIR) Spectroscopy

Spektrometer *Fourier Transform Infrared* (FTIR) menggunakan interferometer untuk mendapatkan spektrum. Cara kerja instrumen ini diilustrasikan pada gambar di bawah.



Gambar 2.13 Skema Interferometer pada Spektrometer FTIR

(Christian G. D., 2014)

Radiasi dari sumber inframerah dipisah menjadi dua oleh *beam splitter*, ada yang menuju ke *fixed mirror*, dan sisanya menuju *moveable mirror*. Berkas sinar yang terbagi 2 tersebut bergabung kembali, karena adanya perbedaan panjang lintasan yang ditempuh oleh 2 berkas cahaya tersebut maka terbentuk lah pola interferensi (dari semua panjang gelombang dalam *beam splitter*) dan kemudian sinar melewati sampel. Hasil penyerapan radiasi oleh sampel berupa spektrum yang disebut interferogram (Christian G. D., 2014).

Spektrofotometri IR didasarkan pada kenyataan bahwa semua atom dalam molekul organik mengalami vibrasi dan rotasi secara terus menerus. Ketika frekuensi vibrasi suatu molekul sama dengan frekuensi radiasi IR yang diarahkan ke molekul, molekul tersebut akan menyerap radiasi. Daerah panjang gelombang inframerah berkisar antara 2.500 hingga 15.000 nm. Spektra IR menunjukkan pita serapan yang lebih rinci daripada spektra UV dari senyawa yang sama. Perbedaan utama antara spektrum UV dan spektrum IR adalah, pada spektrum UV absorbansi diplot sebagai

fungsi dari panjang gelombang (*wavelength*) sedangkan dalam spektrum IR transmitansi diplot sebagai fungsi dari bilangan gelombang (*wavenumber*).

Transmitansi didefinisikan sebagai:

$$\%T = I_0/I \times 100\%$$

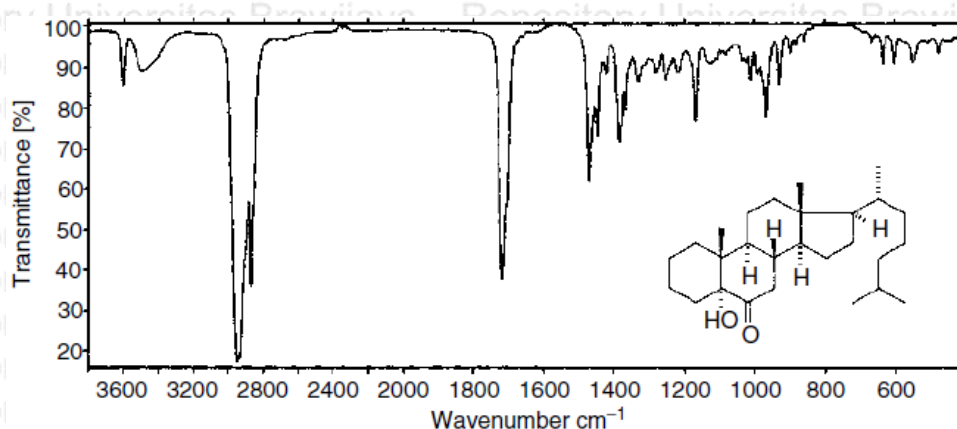
(Hansen, Bjergaard, & Rasmussen, 2012)

Ketika sampel tidak menyerap radiasi, maka $I = I_0$ sehingga transmitansinya adalah 100%. Jika seluruh radiasi diserap oleh sampel, transmisinya adalah 0%. Spektrum IR didapatkan melalui sampel dalam bentuk padatnya. Spektrum seperti itu sebagian besar tidak terpengaruh oleh kondisi eksperimental, berbeda dengan spektra UV yang didapatkan melalui sampel dalam bentuk larutan. Spektrofotometer IR yang *advanced* dilengkapi dengan perpustakaan/database spektrum IR yang disimpan di komputer. Spektrum IR senyawa yang tidak diketahui bisa dibandingkan secara elektronik dengan spektrum referensi. Database dilengkapi dengan lebih dari 100.000 spektrum IR berbeda, yang sangat membantu untuk identifikasi senyawa (Hansen, Bjergaard, & Rasmussen, 2012).

Steroid memiliki banyak mode getaran dengan karakteristik yang berbeda-beda, sehingga spektrum IR-nya memiliki banyak pita serapan. Getaran tersebut berkaitan dengan keberadaan kelompok gugus fungsi tertentu, dan beberapa gugus fungsi dengan ciri struktural yang berbeda (khas) biasanya memberikan pita serapan yang terkuat dalam spektrum. Beberapa gugus yang biasanya teridentifikasi dalam spektrum IR steroid antara lain: (i) kerangka hidrokarbon, yang merupakan kerangka dasar steroid. Spektrum getaran peregangan ikatan C–H bergabung menjadi satu pita lebar berada di antara 2.970 cm^{-1} hingga 2.850 cm^{-1} . Pita yang agak lemah tetapi lebih tajam berada di antara 3.100 dan 3.000 cm^{-1} yang merupakan karakteristik ikatan peregangan C–H pada posisi olefinik atau aromatik; (ii) ikatan C=C tak jenuh, spektrum ikatan C=C berada pada 1.670 cm^{-1} dan 1.625 cm^{-1} tergantung lokasi ikatannya; (iii) gugus hidroksil, biasanya yang paling menonjol dalam spektrum steroid, berada di wilayah $3.625\text{--}3.200\text{ cm}^{-1}$; (iv) gugus karbonil, semua senyawa karbonil

menunjukkan puncak regangan C=O yang sangat kuat di wilayah $1.800\text{--}1.650\text{ cm}^{-1}$.

Untuk keton, bilangan gelombang merupakan karakteristik yang menggambarkan struktural, dan terutama ukuran cincin. Perbedaan terpenting adalah pada keton di cincin D beranggota lima yang menghasilkan pita di wilayah $1.750\text{--}1.740\text{ cm}^{-1}$, dan pada keton di salah satu cincin beranggota enam atau di rantai samping, yang menghasilkan pita dalam kisaran $1.720\text{--}1.700\text{ cm}^{-1}$. Untuk C=O pada aldehida, pita serapan terletak di wilayah $1.730\text{--}1.720\text{ cm}^{-1}$. Aldehida juga memiliki ciri khas pita C–H. Dari kelompok CHO pada $\sim 2,750\text{ cm}^{-1}$ walaupun biasanya lemah (Kasal, 2010).



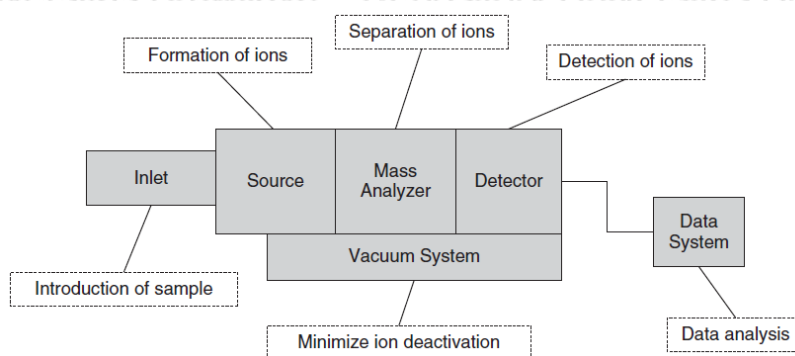
Gambar 2.14 Spektra IR 5-hydroxy-5 α -cholestan-6-one

(Kasal, 2010)

2.5.3 Liquid Chromatography-Mass Spectroscopy/Mass Spectroscopy (LC-MS/MS)

Pada LC-MS, sampel dipisahkan dengan melewati kolom kromatografi.

Setelah itu setiap senyawa terelusi ke dalam spektrometer massa untuk analisis berat molekulnya. Pada metode ini spektrometer massa digunakan sebagai detektor (Prasain, 2012). Spektrometri massa adalah teknik instrumental canggih yang menghasilkan, memisahkan, dan mendeteksi ion dalam fase gas. Secara umum, komponen dari spektrometer massa adalah sebagai berikut:



Gambar 2.15 Komponen MS

(Christian G. D., 2014)

Sampel dimasukkan ke dalam sumber ion melalui sistem saluran masuk (*inlet*). Molekul analit biasanya netral dan akan terionisasi dengan beberapa cara. Analit dapat dikenai sumber energi tinggi, seperti tembakan elektron, laser, atau pelepasan listrik. Ion ditransfer ke dalam vakum (tekanan rendah; 10^{-4} - 10^{-7} Torr) dan dapat dipisahkan berdasarkan rasio massa terhadap muatan/*mass-to-charge* (m/z) melalui penerapan medan listrik dan magnet (Christian G. D., 2014)

Teknik ionisasi yang biasanya digunakan dalam proses ionisasi adalah *electrospray ionization* (ESI) dan desorption. Ada banyak jenis mass analyzer dan setiap jenis memiliki kelebihan dan kekurangannya masing-masing. Di antaranya ada *Time of Flight* (TOF) dan *Quadrupole Mass Filter* (QMF). TOF analyzer menggunakan medan magnet untuk mempercepat pergerakan ion, lalu mengukur waktu yang dibutuhkan untuk mencapai detektor. Massa ion akan menentukan kecepatan pergerakannya, ion yang lebih ringan akan mencapai detektor lebih cepat. QMF menggunakan medan magnet yang berosilasi untuk menstabilkan ion yang melalui jalur frekuensi radio secara selektif. Jenis QMF yang umum digunakan adalah *Triple quadrupole*. *Triple quadrupole* terdiri atas 3 quadrupole secara berurutan. *Quadrupole* pertama adalah mass filter. *Quadrupole* kedua adalah collision cell di mana ion difragmentasi. Fragmen yang dihasilkan dapat difilter lagi atau langsung diteruskan ke detektor untuk menghasilkan pola fragmentasi (Patel, Roy, & Dutta, 2012).

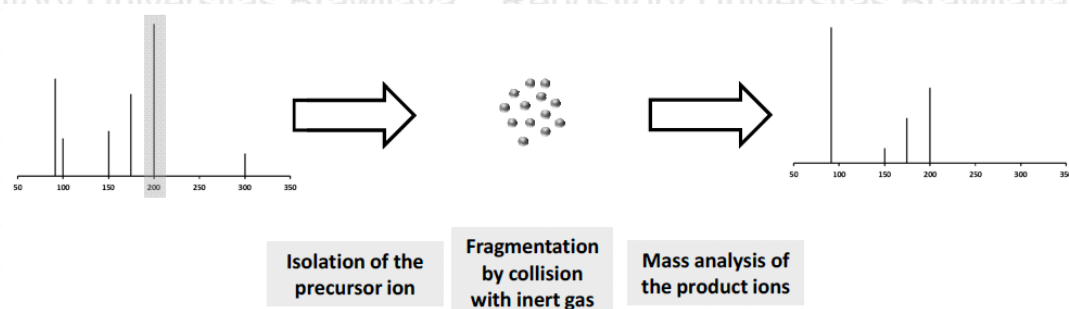
Output dari MS disebut spektrum massa (spektra massa, untuk jamak).

Spektrum massa adalah plot dari rasio kelimpahan ion (*ion abundance*) vs m/z .

Kelimpahan ion menyatakan sejumlah ion yang mengenai detektor, dan dapat dikorelasikan dengan konsentrasi analit untuk melakukan analisis kuantitatif.

Sedangkan m/z adalah parameter kualitatif yang dapat digunakan untuk membantu mengidentifikasi analit (Christian G. D., 2014).

Tandem Mass Spectrometry (MS/MS) merupakan metode spektroskopi massa yang melibatkan setidaknya dua tahap analisis massa, baik dalam hubungannya dengan proses disosiasi atau dalam reaksi kimia yang menyebabkan perubahan massa atau muatan sebuah ion. Dalam eksperimen MS/MS, alat analisis pertama digunakan untuk mengisolasi ion prekursor (mp^+), yang kemudian mengalami fragmentasi (bisa dicapai secara spontan atau dengan menggunakan beberapa teknik aktivasi) untuk menghasilkan ion produk (mf^+) dan fragmen netral (mn) yang kemudian dianalisis dengan alat analisis massa kedua (Prasain, 2012).



Gambar 2. 16 Prinsip MS/MS

(Prasain, 2012)

Spektrometer massa yang dikombinasikan dengan kromatografi dioperasikan menurut beberapa prinsip berbeda, yaitu *full scan and recoring spectra*, *selected ion monitoring* (SIM), dan *selected reaction monitoring* (SRM). *Full scan mode* digunakan jika dibutuhkan sebanyak mungkin informasi struktural mengenai analit, dimana

instrumen terus menerus merekam spektrum massa, biasanya 1-5 spektra terekam setiap detik. Dengan mode ini banyak informasi struktural yang bisa diperoleh untuk masing-masing zat yang terpisah, tetapi kekurangannya adalah sensitivitasnya terbatas dan karena itu mungkin sulit untuk mendeteksi senyawa pada tingkat konsentrasi yang sangat rendah (Hansen, Bjergaard, & Rasmussen, 2012).

Mode SIM dapat digunakan untuk menganalisis sampel dalam jumlah sedikit atau jika menginginkan pengukuran secara kuantitatif. Dengan mode ini, spektrometer massa diatur untuk mengukur hanya satu massa atau beberapa massa yang dipilih selama pemisahan kromatografi. Komponen dalam sampel yang memberikan massa yang dipilih untuk ionisasi dan fragmentasi akan ditemukan sebagai puncak ion terpilih sedangkan senyawa lain yang tidak terbentuk ion dengan massa tertentu tidak ditampilkan. Jika mode SIM tidak memberikan sensitivitas atau spesifisitas yang memadai, dapat menggunakan mode SRM. Analisis SRM dapat dilakukan dengan *triple quadrupole mass spectrometer*, di mana penganalisis massa terdiri dari tiga kuadropol secara seri (Hansen, Bjergaard, & Rasmussen, 2012).

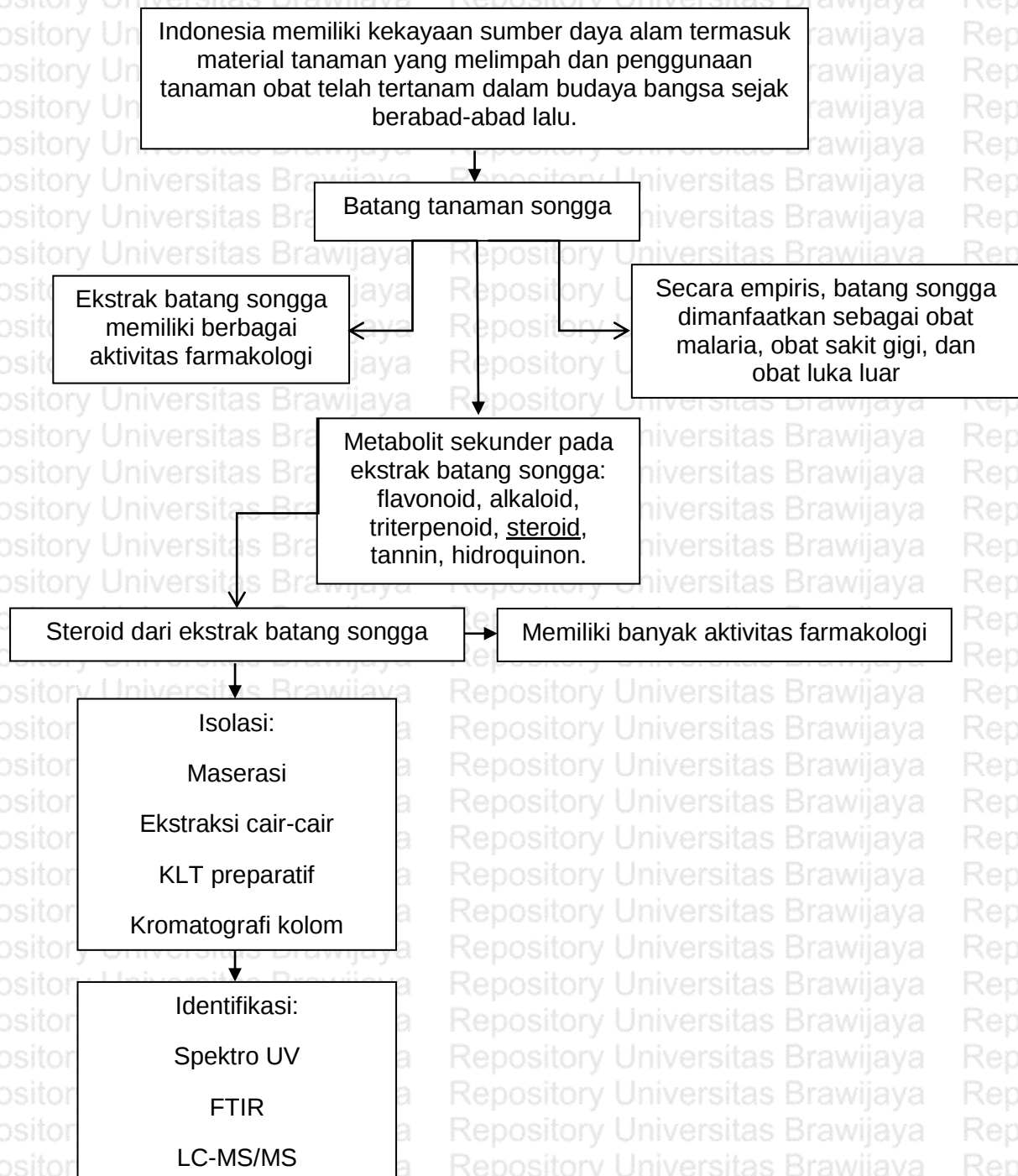
Isolat steroid dianalisis dengan instrumen LC-MS/MS untuk mengetahui perkiraan jenis serta struktur senyawa yang terdapat pada isolat berdasarkan berat molekul yang teridentifikasi (Fauziaa, 2018). Pada ionisasi, elektron dengan potensial ionisasi (PI) terendah paling mudah terionisasi, dan kemudian disebut sebagai "ion molekuler" yang merupakan kation radikal $[M]^+$. Empat jenis fragmentasi steroid yang paling umum adalah: hilangnya gugus metil, kehilangan gugus hidroksil sebagai air, hilangnya rantai samping, dan hilangnya sebagian atau seluruh cincin-D. Fragmentasi ini terlihat dalam kombinasi yang berbeda dan intensitas fragmen ion bervariasi tergantung pada posisi dan orientasi substituen serta jenis steroidnya (Kasal, 2010).



BAB III

KERANGKA KONSEP PENELITIAN

3.1 Kerangka Konsep



Indonesia merupakan negara dengan keanekaragaman hayati yang melimpah, termasuk material tanaman dan penggunaan tanaman obat telah tertanam dalam budaya bangsa sejak berabad-abad lalu. Salah satu tanaman obat yang dapat diteliti lebih lanjut adalah tanaman songga. Secara empiris, batang songga yang dipreparasi dengan cara direbus, satu gelas air rebusan diminum tiga kali sehari digunakan sebagai obat malaria oleh masyarakat Hu'u, Kabupaten Dompu, NTB (Setiawan, 2014). Selain itu, masyarakat juga memanfaatkan hampir semua bagian tanaman songga untuk berbagai penyakit seperti sakit gigi atau gigi berlubang, usus buntu, diare, pegal linu, dan juga sebagai obat luka luar (Hasan, 2011). Serbuk kayu tanaman songga terdeteksi mengandung kelompok senyawa flavonoid, alkaloid, triterpenoid, steroid, tannin dan hidrokuinon (Syafii, 2016).

Steroid telah diketahui memiliki banyak jenis dan aktivitas farmakologi yang berbeda-beda, seperti aktivitas anti-inflamasi (kortikosteroid), hormon seks (progesteron dan estrogen), dan steroid jantung (digoxin dan digitoxin) (Patel S. S., 2015). Penelitian telah menunjukkan bahwa steroid juga dapat mempengaruhi ekspresi gen, translasi, dan aktivitas enzim (Neilsen, 2014). Brassinolide telah terbukti dapat mempengaruhi proses pemanjangan sel, pembelahan sel, dan represi gen yang mengatur stress (Sultan, 2015). Salah satu golongan steroid yang terkandung dalam tanaman songga (*Strychnos lucida*) adalah steroid saponin (Gusmailina, 2015). Saponin steroid memiliki beberapa aktivitas farmakologi, diantaranya antitumor, antibakteri, antifungi, antivirus, antiinflamasi, antioksidan, antihiperlipidemia dan efek hipoglikemia (Chen F.-F. Z.-W.-F., 2016).

Berdasarkan penelitian sebelumnya mengenai tanaman songga menyatakan bahwa tanaman songga memiliki berbagai kandungan senyawa fitokima, salah satunya steroid dengan beberapa aktivitas farmakologi yang bermanfaat dalam pengobatan, maka dilakukan isolasi steroid dari eksrak batang songga yang kemudian dapat diprediksi strukturnya berdasarkan spectra UV, FTIR, dan MS.



BAB IV

METODE PENELITIAN

4.1 Rancangan Penelitian

Penelitian ini dilakukan menggunakan desain penelitian deskriptif. Pada penelitian ini dilakukan isolasi dan identifikasi golongan steroid dari fraksi dikrometana ekstrak batang songga sehingga dapat diperkirakan senyawa apa yang terkandung dalam fraksi dikrometana ekstrak batang songga.

4.2 Populasi dan Sampel

4.2.1 Populasi

Populasi yang digunakan dalam penelitian ini adalah simplisia batang tanaman songga (*Strychnos lucida*) yang diperoleh dari Kabupaten Dompu, Nusa Tenggara Barat.

4.2.2 Sampel

Sampel yang digunakan dalam penelitian ini adalah fraksi diklorometana ekstrak batang songga (*Strychnos lucida*).

4.3 Variabel Penelitian

4.3.1 Variabel Bebas

Variabel bebas pada penelitian ini adalah batang tanaman songga (*Strychnos lucida*).

4.3.2 Variabel Terikat

Variabel terikat pada penelitian ini adalah spektra UV, FTIR, dan MS senyawa steroid ekstrak batang songga (*Strychnos lucida*).

4.4 Lokasi dan Waktu Penelitian

4.4.1 Lokasi Penelitian

Penelitian ini dilakukan di Laboratorium Farmasi Fakultas Kedokteran Universitas Brawijaya, Malang.

4.4.2 Waktu Penelitian

Penelitian ini dilakukan selama bulan Oktober 2019 – Desember 2020.

4.5 Bahan dan Alat/Instrumen Penelitian

4.5.1 Bahan Penelitian

Bahan-bahan yang digunakan pada penelitian ini adalah simplisia batang tanaman songga (*Strychnos lucida*), etanol 96%, diklorometana PA (Merck), n-butanol, etil asetat PA (Merck), kloroform PA (Merck), n-heksana PA (Merck), n-heksana teknis, plat KLT F₂₅₄, silica gel 60 F₂₅₄ (Merck), silica kristal 60 (Merck), reagen H₂SO₄ 10%, reagen vanillin 1%, reagen, aquadest.

4.5.2 Alat/Instrumen Penelitian

Alat-alat yang digunakan dalam penelitian ini adalah neraca analitik (OHAUS), *overheat stirrer* (IKA), *rotary evaporator* (IKA), oven (MEMMERT), alat gelas (PYREC), hot plate, spektrofotometer UV-Vis (Shimadzu UV-1800), FTIR (Shimadzu IR Prestige 21), dan LC-MS/MS (Waters Xevo G2-XS QTOF).

4.6 Definisi Istilah/Operasional

4.6.1 Simplisia batang tanaman songga diperoleh dari Balai Materia Medika, Batu, Jawa Timur.

4.6.2 Ekstrak batang songga (*Strychnos lucida*) merupakan hasil ekstraksi berupa ekstrak kental dari proses maserasi menggunakan pelarut etanol 80%.

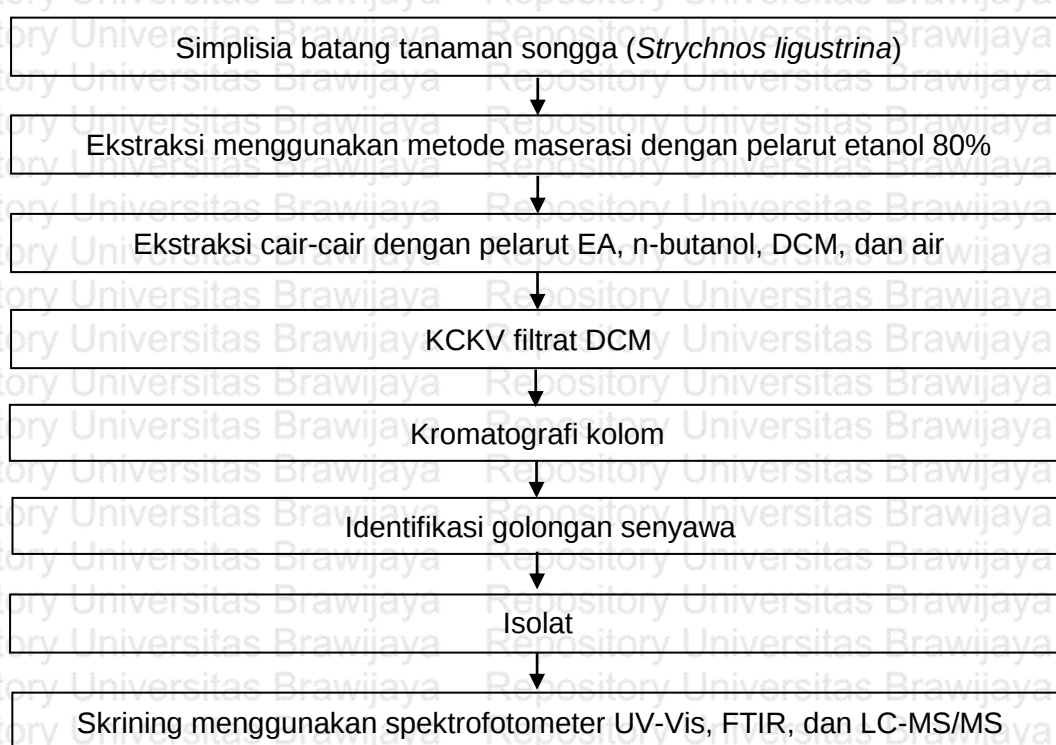
4.6.3 Fraksi diklorometana ekstrak etanol batang songga merupakan larutan kental yang diperoleh dari ekstrak etanol batang songga.

4.6.4 Subfraksi D5.1 dan D5.7 merupakan subfraksi dari fraksi diklorometana 5 yang diperoleh dengan cara kromatografi kolom lambat.

4.6.5 Isolat adalah hasil dari rangkaian proses isolasi menggunakan metode pemisahan ekstraksi cair-cair, kromatografi cair kolom vakum, kromatografi kolom, dan KLT.

4.6.6 Isolat D5.X adalah gabungan dari subfraksi D5.1 dan D5.7

4.7 Prosedur Penelitian



4.7.1 Ekstraksi

1. Ditimbang simplisia batang tanaman Songga (*Strychnos lucida*) sebanyak 1 kg.
2. Dibuat pelarut etanol 80% dari etanol 96% sebanyak 8 L.
3. 1 kg simplisia dilarutkan dengan 2 L etanol 80%.
4. Distirer selama ± 15 menit pada kecepatan 300 rpm
5. Rendaman didiamkan dalam wadah tertutup rapat pada suhu ruang selama ± 24 jam.



6. Hasil maserasi difiltrasi menggunakan vakum.
7. Dilakukan remaserasi sebanyak 2 kali dengan penambahan pelarut etanol 80% sebanyak 3 L pada remaserasi 1 dan 3 L pada remaserasi 2.
8. Keseluruhan hasil maserasi dievaporasi dengan rotary evaporator pada kecepatan 80 rpm dan suhu 40°C hingga diperoleh ekstrak kental.
9. Ekstrak kental dikeringkan dengan oven pada suhu 40°C sampai diperoleh ekstrak kering dengan berat konstan.

4.7.2 Ekstraksi Cair-Cair

1. Ditimbang 50 g sampel lalu disuspensikan dengan 100 ml aquadest secara perlahan di mortar hingga homogen.
2. Tuang (1) ke beaker glass 500 ml.
3. Tambahkan 100 ml DCM ke dalam (2).
4. Masukkan (3) ke corong pisah.
5. Kocok selama $\pm$ 5 menit.
6. Diamkan hingga terpisah sempurna.
7. Tampung fraksi DCM dengan erlenmeyer.
8. Residu air ditambahkan dengan 100 ml DCM.
9. Ulangi langkah 5-7 hingga warna hasil tampungan fraksi DCM stabil lalu seluruh fraksi DCM diuapkan dengan *rotary evaporator*.
10. Tambahkan 100 ml EA ke residu air
11. Lakukan langkah yang sama seperti langkah 5-9.
12. Tambahkan 100 ml n-butanol ke residu air
13. Lakukan langkah yang sama seperti langkah 5-9.

4.7.3 Kromatografi Cair Kolom Vakum DCM

1. Ditimbang silika gel 60 F₂₅₄ 51,94 g.
2. *Setting* silika gel pada kolom dengan tinggi minimal 6 cm.
3. Kolom dialiri dengan n-heksana 200 ml.
4. Ditimbang fraksi DCM dan silica kristal masing-masing 2,37 g (1 : 1).

5. Fraksi DCM dan silika kristal digerus ad homogen.
6. Bagian atas silika gel 60 F₂₅₄ pada kolom dilapisi kertas saring.
7. Campuran fraksi DCM dan silika kristal diletakkan di atas kolom.
8. Dilakukan eluasi dengan fase gerak n-heksana : EA dengan perbandingan:
 - 9 : 1 (2 x 100 ml)
 - 8 : 2 (2 x 100 ml)
 - 7 : 3 (4 x 100 ml)
 - 6 : 4 (4 x 100 ml)
 - 5 : 5 (4 x 100 ml)
 - 4 : 6 (2 x 100 ml)
 - 3 : 7 (2 x 100 ml)
 - 2 : 8 (2 x 100 ml)
 - 1 : 9 (2 x 100 ml)
 - 0 : 10 (2 x 100 ml)
9. Hasil fraksinasi (26 fraksi) dipindahkan ke botol gelap dan tampungan fraksinasi dibilas dengan etanol.
10. Hasil diberi label dan dioven pada suhu 40°C.

4.7.4 Kromatografi Kolom

1. Disiapkan fase diam silika gel 60 F₂₅₄ $\frac{2}{3}$ tinggi kolom, lalu timbang berat silika yang dibutuhkan.
2. Disiapkan eluen N-heksana : aseton 8 : 2 dengan total volume 100-200 ML.
3. Silka gel 60 F₂₅₄ dicampurkan dengan eluen secukupnya, dikocok dalam erlenmeyer hingga larut lalu dan dituang ke dalam kolom.
4. Disiapkan sampel fraksi 1% berat silika dan dilarutkan dengan eluen N-heksan : aseton (8:2) sebanyak 1-2 mL.
5. Dilakukan *loading* sampel dalam kolom, dituang larutan sampel perlahan dan secukupnya hingga batas atas kolom.



6. Sampel ditunggu hingga turun mencapai 1/3 panjang kolom, lalu dimulai penampungan fraksi
7. Fraksi ditampung sebanyak 1 mL tiap vial.
8. Penambahan eluen dan penampungan dilakukan hingga eluen berubah warna menjadi bening.
9. Hasil fraksi diuji KLT dan diamati di bawah sinar UV 254 nm dan 366 nm.

4.7.5 Identifikasi Golongan Senyawa

4.7.5.1 KLT

1. Siapkan plat KLT ukuran 1 x 10 cm
2. Disiapkan kertas saring ukuran 10/3 x 10 cm
3. Disiapkan fase gerak kloroform : aseton 9.5 : 0.5
4. Fase gerak dijenuhkan hingga kertas saring terbasahi sepenuhnya
5. Dilakukan penotolan subfraksi D5.X
6. Setelah fase gerak jenuh, dilakukan eluasi KLT hingga mencapai batas atas
7. Plat KLT dikeringkan, kemudian diamati di bawah sinar UV 366 nm dan 254 nm
8. Plat KLT disemprot dengan penampak noda Liebermann-Burchard
9. Plat KLT dipanaskan pada suhu 100°C selama 5-10 menit.
10. Bercak yang muncul diamati di bawah sinar tampak, UV 254 nm, dan UV 366 nm.

4.7.6 Identifikasi Struktur

4.7.6.1 Spektrofotometri UV-Vis

1. Isolat D5.X dilarutkan dalam 3 mL metanol.
2. Dibuat spektrum kurva absorpsi terhadap panjang gelombang (λ) pada 200 - 400 nm.
3. Diidentifikasi panjang gelombang maksimal pada spektrum ultra violet yang terbentuk.



4.7.6.2 FTIR

1. Isolat D5.X dibuat pellet dengan KBr.
2. Dibuat spektrum kurva % transmisi terhadap bilangan gelombang (μ) pada 400 - 4000 cm^{-1} .
3. Diidentifikasi pita absorpsi yang khas dari gugus-gugus.

4.7.6.3 LC-MS/MS

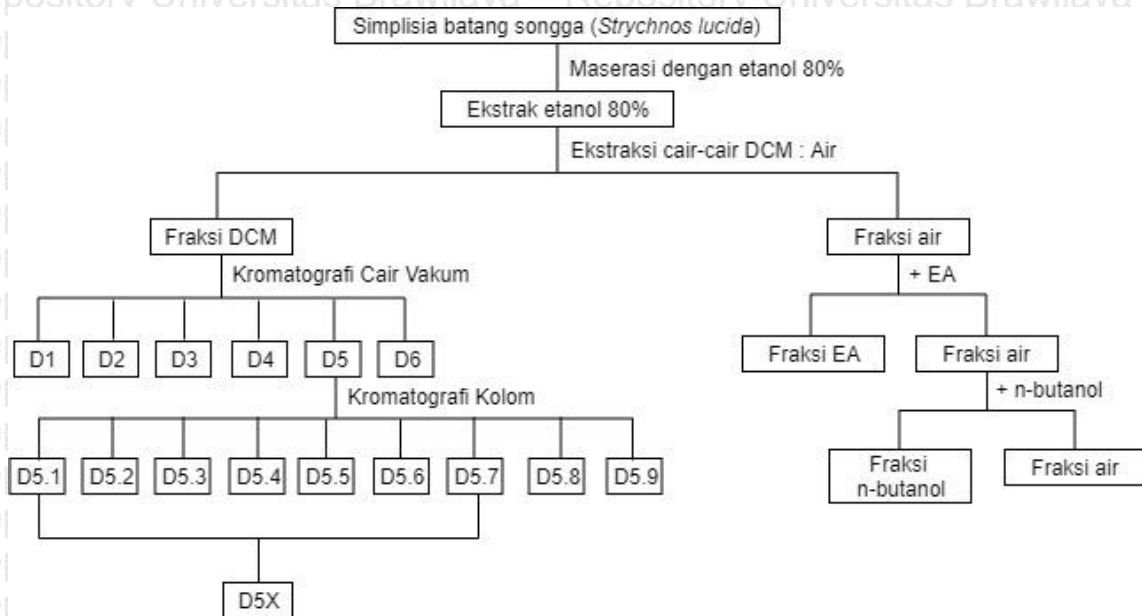
1. Dilakukan optimasi alat (lampiran 9)
2. Isolat D5.X dilarutkan dalam 0.5 mL pelarut pro HPLC yang sesuai.
3. Diinjeksikan pada kolom.
4. Eluasi dengan dengan fase gerak 0.1% FA/WA (formic acid/water) dan ACN (acetonitrile)+0.1FA dengan konsentrasi gradien (lampiran 9).
5. Dilakukan identifikasi fragmen-fragmen massa yang terbentuk dalam spektrum dengan *software OpenMS* yang berisi *database* senyawa.

4.7.7 Analisis Data

Analisa data dilakukan melalui identifikasi penentuan struktur hasil isolat menggunakan spektrofotometer UV-Vis, FTIR, dan LC-MS/MS. Dengan spektrofotometer UV-Vis, panjang gelombang yang terdeteksi akan menunjukkan gugus kromofor dari senyawa steroid dari isolat. Pada spektra inframerah, hasil dari bentuk getaran molekul berupa bilangan gelombang akan menunjukkan gugus fungsional dalam steroid. Dengan LC-MS/MS diperoleh data berupa bobot molekul berupa rasio massa terhadap muatan (m/z) dan fragmentasi dari molekul yang kemudian diprediksi jenis *cleavage* yang terjadi.

BAB V

HASIL PENELITIAN



Gambar 5. 1 Skema Hasil Penelitian

5.1 Hasil Pembuatan Ekstrak

Dari proses ekstraksi diperoleh sejumlah 69 gram ekstrak kental berwarna coklat, konsistensi pasta, dan bau khas aromatik dengan rendemen 6,9%.



Gambar 5. 2 Ekstrak Etanol Simplicia Batang Songga (*Strychnos lucida*)

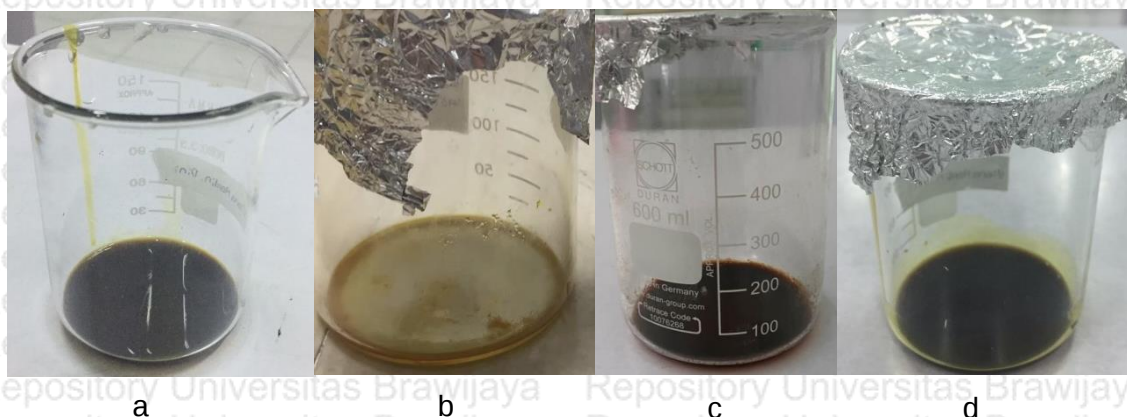


5.2 Hasil Ekstraksi Cair-Cair

Dari proses ekstraksi cair-cair diperoleh 4 fraksi dengan karakteristik tercantum pada tabel berikut.

Tabel 5. 1 Hasil proses ekstraksi cair-cair

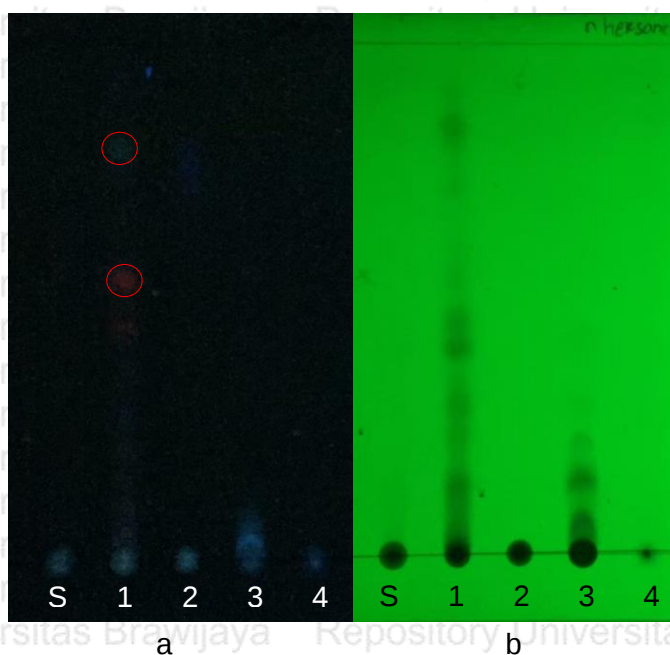
Jenis pelarut	Berat (gram)	Rendemen	Organoleptik
Diklorometana	2,5463	5,0926%	Konsistensi: pasta; warna: coklat gelap; bau: khas aromatik
Etil asetat	1,1876	2,3752%	Konsistensi: pasta; warna: coklat gelap; bau: khas aromatik
N-butanol	1,781	3,4362%	Konsistensi: pasta; warna: coklat gelap; bau: khas aromatik
Air	15,5013	35,0026%	Konsistensi: pasta; warna: coklat gelap; bau: khas aromatik



Gambar 5.3 Hasil ekstraksi cair-cair

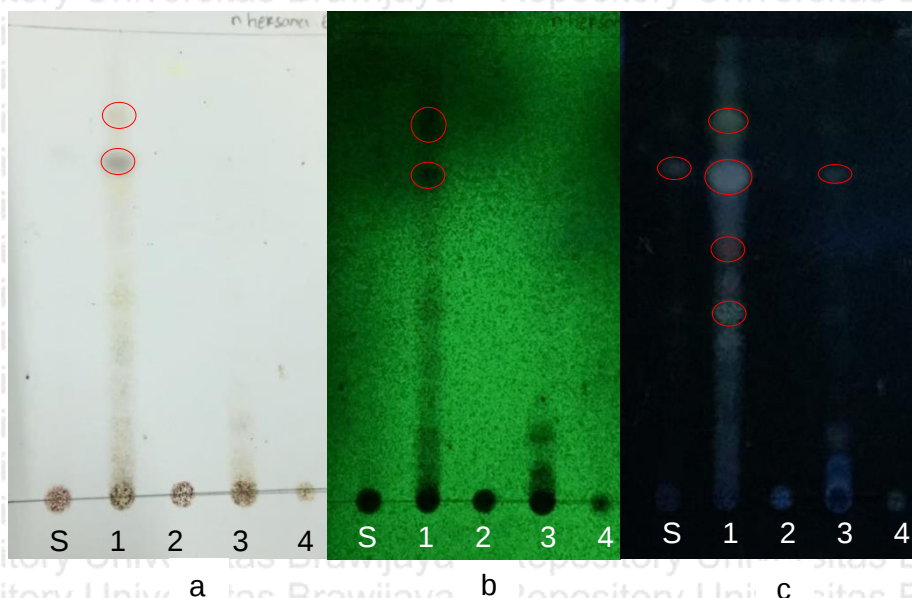
Keterangan: (a) Fraksi DCM, (b) etil asetat, (c) n-butanol, dan (d) air

Hasil ekstraksi cair-cair yang diperoleh kemudian diidentifikasi fitokimia dengan kromatografi lapis tipis (KLT) untuk menentukan fraksi apa yang akan diisolasi lebih lanjut. Fase diam yang digunakan adalah plat KLT silica gel 60 F254 dengan fase gerak n-heksana:EA 7:3 dan 5:5 yang kemudian disemprot penampak noda H₂SO₄ 10%.



Gambar 5.4 Profil KLT hasil ekstraksi cair-cair sebelum disemprot reagen H_2SO_4 10% (a) UV 366 nm; (b) UV 254 nm

Keterangan: fase gerak n-heksana:EA 5:5; (a) UV 366 nm, (b) UV 254 nm; s: standar (ekstrak), 1: fraksi DCM, 2: fraksi etil asetat, 3: fraksi n-butanol, 4: fraksi air



Gambar 5.4 Profil KLT esktraksi cair-cair (n-heksana:EA = 5:5) setelah disemprot reagen H_2SO_4 10% (a) sinar tampak; (b) UV 254 nm; (c) UV 366 nm

Keterangan: S: standar (ekstrak), 1: fraksi DCM, 2: fraksi etil asetat, 3: fraksi n-butanol, 4: fraksi air

Berdasarkan hasil KLT di atas, dapat diketahui kemungkinan-kemungkinan senyawa yang terkandung di dalam setiap fraksi seperti tercantum pada tabel di bawah.

Tabel 5. 2 Interpretasi KLT hasil ekstraksi cair-cair

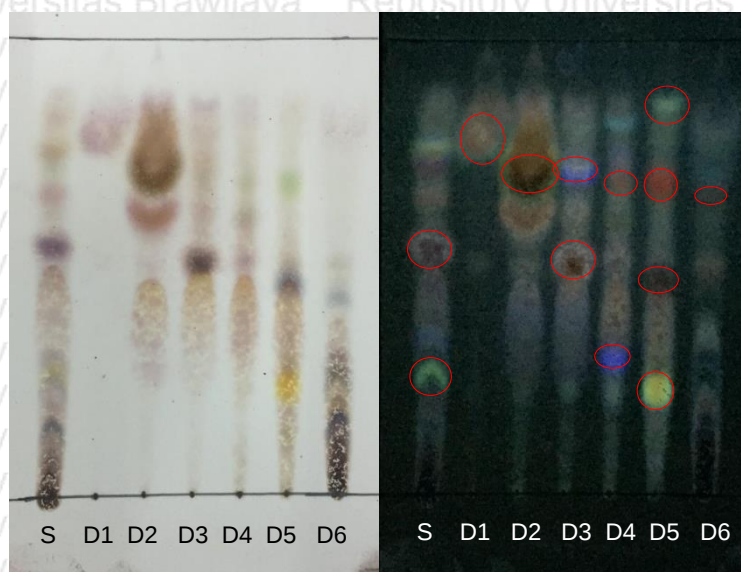
Totolan	Kemungkinan senyawa yang tertarik
S	Terpenoid (coklat muda)
1	Steroid (hijau), alkaloid (merah), terpenoid (coklat muda)
2	-
3	Steroid (hijau)
4	-

Keterangan: urutan noda di setiap totolan dari atas ke bawah

(Heftmann, 1969; Wagner, 2001)

5.3 Hasil Pemisahan dengan Kromatografi Cair Vakum (KCV)

Fraksi DCM dipilih untuk diisolasi lebih lanjut karena jumlah noda pada fraksi diklorometana yang paling banyak. Dari hasil KCV diperoleh 26 fraksi yang selanjutnya dianalisis dengan KLT untuk melihat profil kromatografinya. Berdasarkan hasil KLT 26 fraksi (Lampiran 4), fraksi-fraksi yang profil KLT-nya mirip digabungkan dan diperoleh 6 fraksi (D1-D6) dengan berat 35.8 mg, 66.8 mg, 180 mg, 55.7 mg, 90 mg, dan 822,9 mg berturut-turut.



a

b

Gambar 5.5 Profil KLT gabungan hasil KCV setelah disemprot H_2SO_4 10%

Keterangan: fase gerak n-heksana:EA = 5; (a) pada sinar tampak, (b) pada sinar UV 366 nm;
s: standar (fraksi DCM), 1: subfraksi 1, 2: subfraksi 2, 3: subfraksi 3, 4: subfraksi 4,
5: subfraksi 5, 6: subfraksi 6.

Berdasarkan hasil KLT di atas, dapat diketahui kemungkinan-kemungkinan senyawa yang terkandung di dalam setiap fraksi seperti tercantum pada tabel di bawah.

Tabel 5.3 Interpretasi KLT gabungan hasil KCV

Totolan	Kemungkinan senyawa yang tertarik
S	Terpenoid (ungu), steroid (hijau)
1	Terpenoid (ungu=> coklat)
2	Terpenoid (coklat)
3	Terpenoid (coklat), steroid (biru)
4	Steroid (biru), alkaloid (merah)
5	Flavonoid (kuning), steroid (hijau), alkaloid (merah) terpenoid (coklat)
6	Alkaloid (merah)

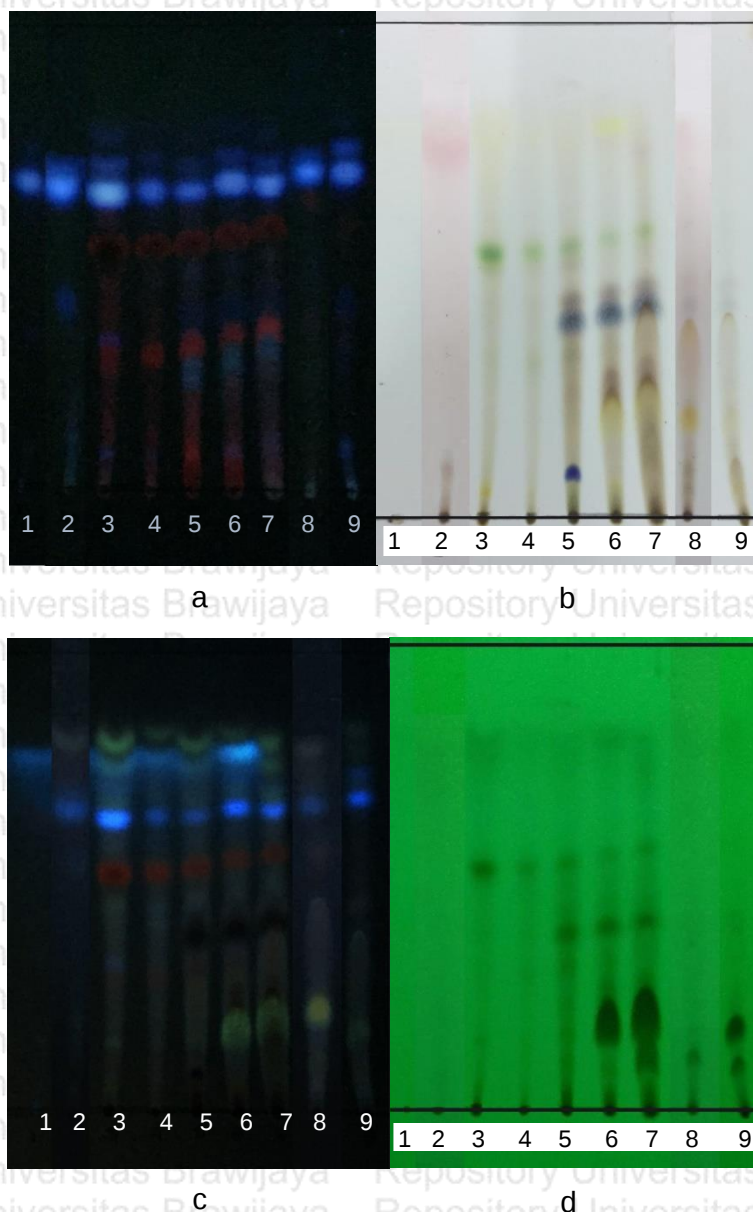
Keterangan: urutan noda di setiap totolan dari atas ke bawah

(Heftmann, 1969; Wagner, 2001; Wulandari, 2018)

5.4 Hasil Pemisahan dengan Kromatografi Kolom Lambat

Berdasarkan hasil KLT 6 fraksi, fraksi yang mungkin mengandung steroid adalah fraksi D3, D4, dan D5 (noda warna biru atau hijau) (Hidayah, 2016). Dari ketiga fraksi tersebut yang paling berat adalah fraksi D5 dan D3 sehingga kedua fraksi tersebut dipilih untuk diisolasi lebih lanjut dengan metode kromatografi kolom lambat. Dari proses tersebut diketahui bahwa fraksi D5 lah yang mengandung steroid. Hasil pemisahan fraksi D5 adalah sebanyak 36 fraksi yang selanjutnya dianalisis dengan KLT untuk melihat profil kromatografinya. Berdasarkan hasil KLT 36 fraksi, fraksi-fraksi

yang memiliki kemiripan jumlah dan letak noda digabungkan sehingga menjadi 9 fraksi dengan berat berturut-turut 0.3 mg, 0.6 mg, 1 mg, 0.1 mg, 183 mg, 5.8 mg, 8.1 mg, 2.9 mg, dan 2.7 mg.



Gambar 5.5 Profil KLT gabungan hasil kromatografi kolom fraksi D5 (kloroform:aseton = 9.5:0.5) sebelum disemprot H_2SO_4 10% (a) UV 366 nm; setelah disemprot H_2SO_4 10% (b) sinar tampak; (c) UV 366 nm; (d) UV 254 nm

Keterangan : 1: fraksi 5.1, 2: fraksi 5.2, 3: fraksi 5.3, 4: fraksi 5.4, 5: fraksi 5.5, 6: fraksi 5.6, 7: fraksi 5.7, 8: fraksi 5.8, 9: fraksi 5.9

Berdasarkan hasil KLT di atas, dapat diketahui kemungkinan-kemungkinan senyawa yang terkandung di dalam setiap fraksi seperti tercantum pada tabel di bawah.



Tabel 5.4 Interpretasi KLT gabungan hasil kromatografi kolom

Totolan	Kemungkinan senyawa yang tertarik
1	Steroid (biru)
2	Steroid (biru, hijau)
3	Steroid (biru, hijau), alkaloid (merah)
4	Steroid (biru, hijau), alkaloid (merah)
5	Steroid (biru, hijau), alkaloid (merah), terpenoid (coklat), flavonoid (kuning)
6	Steroid (biru, hijau), alkaloid (merah), terpenoid (coklat), flavonoid (kuning)
7	Steroid (biru, hijau), alkaloid (merah), terpenoid (coklat), flavonoid (kuning)
8	Steroid (biru, hijau), flavonoid (kuning)
9	Steroid (biru, hijau), flavonoid (kuning)

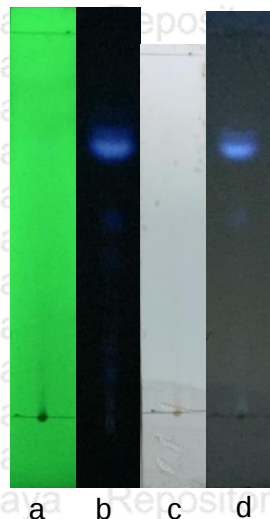
Keterangan: urutan noda di setiap totolan dari atas ke bawah

(Heftmann, 1969; Wagner, 2001; Wulandari, 2018)

Dari hasil hasil kromatografi kolom, dipilih 2 isolat yaitu D5.1 dan D5.7 lalu digabung menjadi isolat D5.X untuk dianalisis dengan instrumen karena keduanya memiliki noda steroid yang sama.

5.5 Hasil Identifikasi Golongan dengan Kromatografi Lapis Tipis

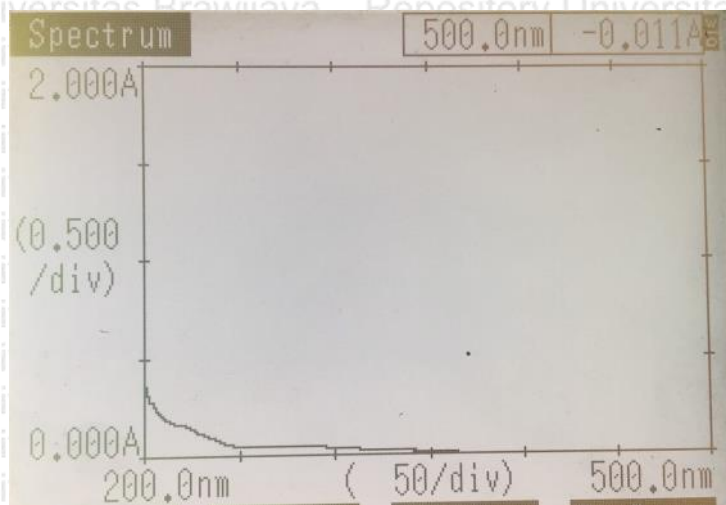
Dilakukan KLT terhadap isolat D5.1 dengan penampak noda Liebermann-Burchard, yang merupakan penampak noda spesifik untuk steroid untuk mengidentifikasi golongan senyawa. Senyawa steroid yang disemprot dengan Liebermann-Burchard menghasilkan warna biru atau hijau di bawah UV 366 nm (Wulandari, 2018).



Gambar 5.6 Profil KLT subfraksi D5.1 sebelum disemprot Liebermann-Burchard

Keterangan: fase gerak kloroform:aseton 9.5:0.5; (a) UV 254 nm, (b) UV 366 nm, setelah disemprot Liebermann-Burchard, (c) sinar tampak. (d) UV 366 nm

5.6 Hasil Spektro UV isolate D5.X (D5.1 + D5.7)



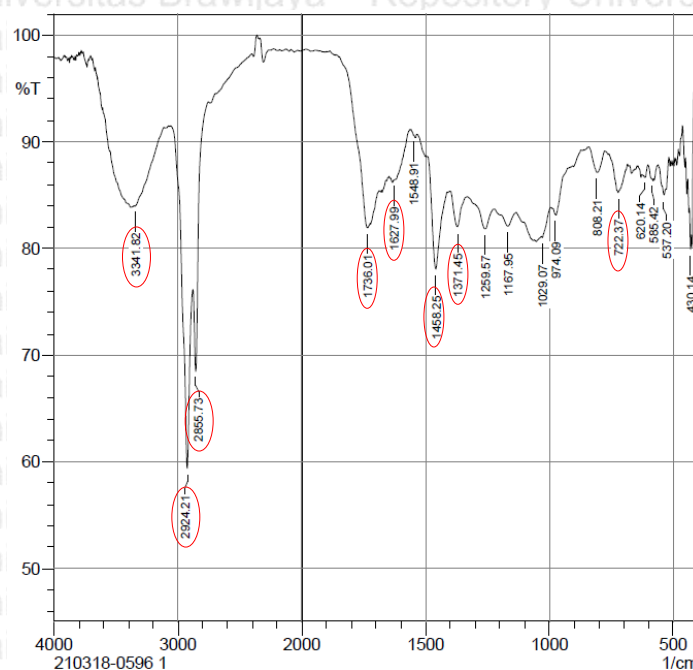
Gambar 5.7 Spektro UV isolat D5.X

Peak Detection	
λ (nm)	Abs
470.60	-0.011
434.60	-0.010
284.40	0.049
267.20	0.045

Gambar 5.8 Panjang gelombang maksimum isolat D5.X

Berdasarkan hasil analisis spektra UV-Vis menunjukkan 2 panjang gelombang yaitu 284.4 nm dengan absorbansi 0.049 dan 267.2 nm dengan absorbansi 0,045. Senyawa steroid memiliki serapan pada rentang panjang gelombang 200-313 nm (Kasal, 2010).

5.7 Hasil Identifikasi dengan FTIR D5.X (D5.1 + D5.7)



Gambar 5.9 Spektra IR isolat D5.X

Tabel 5.5 Interpretasi spektra IR isolat D5.X

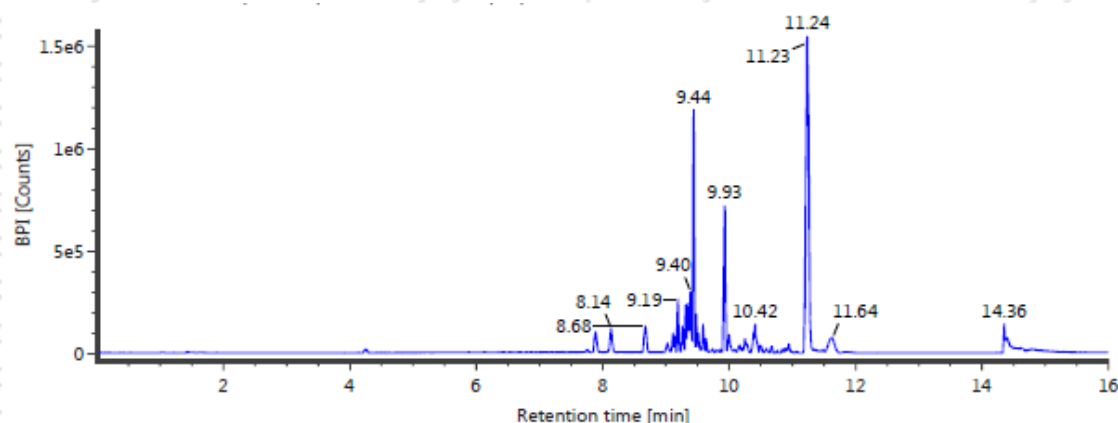
No	Bil. Gelombang (hasil)	Bentuk, intensitas	Bil. Gelombang (literatur)	Kemungkinan gugus fungsi
1	2924.21	t, s	3000-2850	C-H (alifatik)
2	2855.73	t, s		
3	1627.99	t, l ₂	1680-1600	C=C
4	3341.82	l ₁ , l ₂	3625-3200	OH
5	1736.01	t, l ₂	1800-1650	C=O (aldehida)
6	722.37	t, l ₂	720	CH ₂
7	1458.25	t, l ₂	1465	CH ₂ (bend)
8	1371.45	t, l ₂	1375	CH ₃

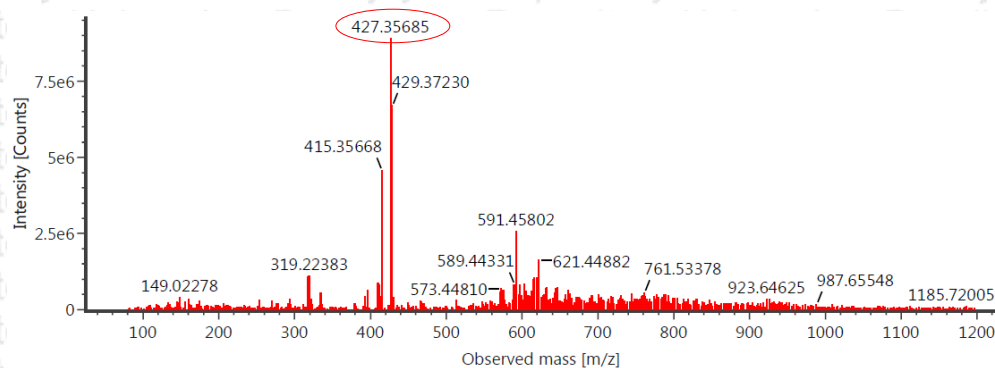
Ket: t = tajam, l₁ = lebar, s = sedang, l₂ = lemah.

(Pavia, 2001)

Hasil pita serapan dari subfraksi D5.X batang Songga (*Strychnos lucida*) pada profil spektra spektrofotometri inframerah menunjukkan bahwa fraksi tersebut mengandung gugus fungsi penyusun senyawa steroid (siklopentano perhidrofenantrena) yaitu dan –C-H alifatik dan –CH₂ (bend).

5.8 Hasil Identifikasi dengan LC-MS/MS D5.X (D5.1 + D5.7)

**Gambar 5. 10 Kromatogram Isolat D5.X**



Gambar 5.11 Spektra massa isolat D5.X

Tabel 5. 6 Hasil analisis MS/MS isolat D5.X

No	Observed RT (menit)	Nama senyawa	Rumus kimia	Observed m/z	Neutral mass (Da)
1	6.92	Atractylon	$C_{15}H_{20}O$	217.1582	216.15142
2	9.98	Stigmast-4-ene-3,6-dione	$C_{29}H_{46}O_2$	427.3566	426.34978
3	9.23	Sugiol	$C_{20}H_{28}O_2$	301.2159	300.20893
4	9.93	Candidate Mass 1 $C_{28}H_{46}O_2$	$C_{28}H_{46}O_2$	415.3569	414.34978
5	9.45	Candidate Mass 2 $C_{36}H_{64}O_4$	$C_{36}H_{64}O_4$	561.4879	560.48046

Dari spektra MS diketahui *molecular ion mass* senyawa stigmast-4-ene-3,6-dione adalah 427.3566. Operasi MS dalam mode ionisasi positif sehingga massa senyawa netralnya adalah 426.34978. Selain *molecular ion mass* juga diketahui fragmentasi senyawa stigmast-4-ene-3,6-dione seperti tertera pada tabel 5.7


Tabel 5. 7 Fragmentasi senyawa stigmast-4-ene-3,6-dione

Waktu Retensi (menit)	m/z (hasil)	Rumus molekul	Prediksi gugus yang lepas
9.94090	321.31330	$C_{22}H_{41}O$	
10.00523	235.24181	$C_{17}H_{31}$	
9.92828	221.22584	$C_{16}H_{29}$	
9.97066	97.10070	C_7H_{13}	
9.96942	83.08499	C_6H_{11}	
9.92728	301.21553	$C_{20}H_{29}O_2$	
10.00159	299.20071	$C_{20}H_{29}O_2$	
9.96046	287.20092	$C_{19}H_{27}O_2$	
9.94044	259.17002	$C_{17}H_{23}O_2$	
9.99488	247.16751	$C_{16}H_{23}O_2$	
9.97782	191.10647	$C_{12}H_{15}O_2$	

BAB VI

PEMBAHASAN

6.1 Pembahasan Hasil Penelitian

Pada penelitian ini didapatkan ekstrak etanol 80% batang songga (*Strychnos lucida*) sebanyak 69 gram (6,9%). Pelarut etanol dipilih karena berdasarkan penelitian yang dilakukan oleh Syafii (2018) diperoleh hasil bahwa kadar ekstrak tertinggi diperoleh dengan maserasi menggunakan etanol dibanding pelarut organik lainnya (n-heksana dan etil asetat). Hasil rendemen yang diperoleh berbeda dengan hasil penelitian yang dilakukan oleh Aprilia (2020), diperoleh rendemen simplisia batang songga dengan pelarut etanol 80% sebesar 8,467%. Langkah kedua pada proses isolasi steroid adalah partisi cair-cair. Ekstrak etanol batang songga kemudian dipartisi dengan dua pelarut yang tidak bercampur (fase organik dan fase air) secara bertahap dari pelarut organik yang paling rendah polaritasnya (DCM-air; EA-air, n-butanol:air). Partisi cair-cair yang seperti itu sangat efektif untuk menyingkirkan kontaminan dengan berbagai polaritas (Dinan, Harmatha, & Lafont, 2001).

Berdasarkan KLT yang dilakukan, noda pada fraksi diklorometana yang paling banyak yang menunjukkan bahwa diklorometana menarik paling banyak senyawa dibandingkan 3 fraksi lain sehingga fraksi diklorometana yang dipilih untuk diisolasi lebih lanjut. Pada penelitian ini menunjukkan bahwa pada fraksi diklorometana ekstrak etanol batang songga ditemukan senyawa golongan steroid yang diketahui dengan KLT dan disemprot dengan reagen penampak noda Liebermann-Burchard menghasilkan warna biru (Hidayah, 2016). Steroid menghasilkan warna biru atau hijau jika disemprot dengan reagen Liebermann-Burchard (Hidayah, 2016) dan asam sulfat (H_2SO_4) 50% (Heftmann E. e., 1969) Berdasarkan beberapa penelitian, pelarut diklorometana terbukti dapat menarik senyawa golongan steroid dari ekstrak tanaman dengan ditemukannya senyawa golongan steroid jenis stigmasterol dan α -spinasterol pada fraksi

diklorometana ekstrak tanaman *Vervenia tweediana* (Zanon, 2008) dan *Napoleonaea imperialis* (Jack, Ekong, & Ndukwe, 2020).

Langkah ketiga proses isolasi mulai menggunakan prosedur kromatografi. Prosedur kromatografi yang dipilih tergantung pada skala eksperimen (berat sampel), biasanya eksperimen dengan skala kecil dapat menggunakan KLT preparatif sedangkan eksperimen dengan skala yang lebih besar menggunakan *low pressure column chromatography* (Dinan, Harmatha, & Lafont, 2001). Secara umum sampel dengan berat 10-100 mg dapat dipisahkan menggunakan metode KLT preparatif (Hostettmann, 2010). Pada penelitian ini berat fraksi DCM adalah 2,37 gram sehingga dipilih prosedur kromatografi kolom vakum sebagai langkah isolasi ketiga dengan fase diam silika gel dan fase gerak n-heksana:EA dengan perbandingan 9:1, 8:2 dan seterusnya hingga 0:10. Umumnya kromatografi kolom vakum menggunakan sistem fase normal dengan fase diam polar (alumina/silika) dan dielusi dengan campuran pelarut organik yang kekuatan elusi yang semakin meningkat (*step-gradient*). Setelah proses ini, senyawa hasil pemisahan biasanya sudah dapat dikatakan murni, akan tetapi pada kasus campuran yang kompleks dibutuhkan langkah kromatografi lebih lanjut (Dinan, Harmatha, & Lafont, 2001).

Dari proses kromatografi kolom vakum diperoleh 26 fraksi yang selanjutnya 26 fraksi tersebut di-KLT dan beberapa fraksi yang memiliki kemiripan profil KLT (jumlah dan posisi noda) digabungkan dan diperoleh 6 fraksi. KLT dapat digunakan untuk mengecek kemurnian dan terkadang juga digunakan sebagai langkah pemurnian tambahan (Dinan, Harmatha, & Lafont, 2001). Pada fraksi D3 dan D5 terdapat noda berwarna biru dan hijau yang diduga steroid dengan R_f 0.7 dan 0.86 sehingga kedua fraksi tersebut dipilih untuk diisolasi lebih lanjut dengan metode kromatografi kolom lambat. Dari proses ini diperoleh 36 fraksi yang selanjutnya di-KLT dan beberapa fraksi yang memiliki kemiripan profil KLT (jumlah dan posisi noda) digabungkan dan diperoleh 9 fraksi.

Berdasarkan hasil KLT, pada fraksi D5.1 hanya terdapat satu noda berwarna biru pada UV 366 nm dengan Rf 0.77, berat 0.3 mg dan tidak tampak noda berwarna pada pengamatan di bawah sinar tampak dan UV 254 nm. Noda tersebut diduga adalah senyawa golongan steroid. Menurut Heftmann (1969), beberapa jenis steroid ketika direaksikan dengan asam sulfat (H_2SO_4) menghasilkan warna biru pada pengamatan di bawah sinar UV 366 nm. Selain isolat D5.1, dipilih juga isolat lain yang memiliki noda steroid dengan Rf yang sama dengan isolat D5.1 (0.77), yaitu isolat D5.7 karena berat isolat D5.1 tidak memenuhi syarat untuk diuji dengan berbagai instrumen. Keduanya digabung menjadi isolat D5.X yang selanjutnya dilakukan analisis dengan spektro UV-Vis, FTIR, dan LC-MS/MS.

Skrining panjang gelombang maksimum isolat D5.X dilakukan dengan spektro UV-Vis pada rentang 200-500 nm. Hasil menunjukkan penyerapan maksimum terjadi pada panjang gelombang 284.4 nm dengan absorbansi. Selain itu juga terdapat absorbansi sebesar 0,045 pada panjang gelombang 267.2 nm. Menurut Kasal (2010), senyawa steroid memiliki serapan pada rentang panjang gelombang 200-313 dan erapan pada panjang gelombang 284 dan 267 menunjukkan adanya ikatan rangkap terkonjugasi. spektrum UV-Vis isolat steroid dari alga merah (*Eucheuma spinosum*) menunjukkan 2 *peak* serapan yaitu pada 284 dan 276 nm (Laili, 2016). Sedangkan isolat steroid dari daun rimbang (*Solanum torvum*) menunjukkan serapan pada panjang gelombang 271 dan 281 nm (Susilawati, Indriati, & Limra, 2015).

Berdasarkan spektra inframerah yang diperoleh, diketahui pada sampel D5.X terdapat pita serapan yang lebar pada bilangan gelombang 3341.82 cm^{-1} yang diduga merupakan gugus $-OH$. Menurut literatur, gugus $-OH$ menghasilkan pita serapan lebar pada $3400-3300\text{ cm}^{-1}$. Bilangan gelombang 1371.45 cm^{-1} menunjukkan pita serapan gugus metil (CH_3). Selain itu juga terdapat gugus $C=C$ alkena pada 1627.99 cm^{-1} dengan pita tajam. Serapan pita tajam juga ditunjukkan oleh gugus karbonil ($C=O$) pada 1736.01 cm^{-1} yang diduga merupakan karbonil dari aldehida. Kemudian bilangan gelombang 1458.25 cm^{-1} menunjukkan pita serapan dari gugus metilen (CH_2) dan

bilangan gelombang 723.37 cm^{-1} menunjukkan pita serapan dari *bonding motion* 4 atau lebih gugus metilen pada rantai terbuka. Juga terdapat ikatan C-H alifatik pada 2924.21 cm^{-1} dan 2855.21 cm^{-1} dengan pita tajam dan sinyal kuat (Pavia, 2001; Kasal, 2010). Ikatan C-H alifatik dan CH_2 merupakan ikatan penyusun sikloheksana yg merupakan salah satu penyusun steroid (Pavia, 2001). Berdasarkan profil inframerahnya, sampel D5.X mengandung gugus-gugus penyusun senyawa steroid.

Berikut adalah perbandingan spektra inframerah senyawa stigmast-4-ene-3,6-dione yang diisolasi dari isolat D5.X ekstrak batang songga dengan senyawa stigmast-4,22-dien-3,6-dione (Cui, 2009) dan stigmast-23-ene-3,6-dione (Okoye, 2010).

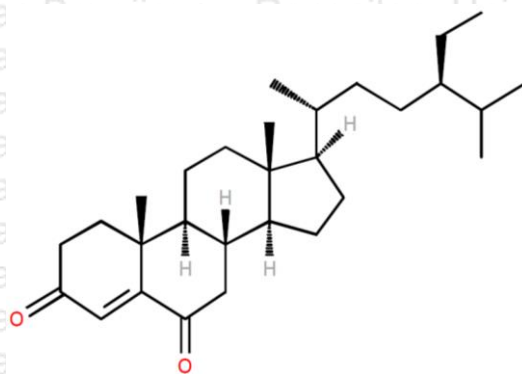
Tabel 6. 1 Kemiripan Spektra IR hasil dengan literatur

Gugus fungsi	Bil. Gelombang (cm^{-1})	Bil. Gelombang literatur	
		(Cui, 2009)	(Okoye, 2010)
C-H (alifatik)	2924.21	2959	2950
	2855.73	-	2850
C=C	1627.99	1686, 1609	-
OH	3341.82	-	-
C=O (aldehida)	1736.01	1714	1700
CH_2	723.37	864	815
CH_2 (bend)	1458.25	-	1430
CH_3	1371.45	-	1370

Pada LC-MS/MS digunakan *Acquity UPLC High Strength Silica* dengan kolom C18 yang bersifat non-polar sedangkan fase gerak yang digunakan bersifat polar (A: asam format 0.1% + akuades steril; B: asetonitril + asam format 0.1%). Spektroskopi massa yang digunakan adalah Waters Xevo G2-XS QTOF MS dengan sumber ionisasi ESI dalam mode positif. QTOF MS (*Quadrupole Time of Flight Mass Spectrometry*) instrumen yang menggabungkan teknologi *quadrupole* dan *time of flight* untuk

menganalisa massa suatu senyawa. Pada QTOF MS terdapat 3 *quadrupole*. *Quadrupole* pertama adalah filter massa. *Quadrupole* kedua adalah sebuah *collision cell* di mana ion difragmentasi. *Quadrupole* ketiga adalah TOF *analyzer* yang menggunakan medan magnet untuk mempercepat pergerakan ion, lalu mengukur waktu yang dibutuhkan untuk mencapai detektor. Massa ion akan menentukan kecepatan pergerakannya, ion yang lebih ringan akan mencapai detektor lebih cepat (Patel, Roy, & Dutta, 2012). Data yang diperoleh dari hasil identifikasi dengan LC-MS/MS kemudian dianalisa dengan *OpenMS Software* yang berisi *database* senyawa.

Identifikasi isolat D5.X dengan LC-MS/MS menunjukkan 5 senyawa antara lain *atractylon*, *stigmast-4-ene-3,6-dione*, *sugiol*, *candidate mass 1*, dan *candidate mass 2*. Di antara kelima senyawa tersebut, yang merupakan steroid adalah *stigmast-4-ene-3,6-dione* dengan waktu retensi 9.98 menit dan massa 426.34978. *Stigmast-4-ene-3,6-dione* merupakan turunan dari *stigmastane*. Struktur dari *stigmast-4-ene-3,6-dione* sesuai dengan gugus fungsi yang diketahui dari spektra inframerah, kecuali gugus $-OH$ karena pada *stigmast-4-ene-3,6-dione* tidak terdapat gugus tersebut. Gugus OH yang muncul pada spektra FTIR kemungkinan berasal dari senyawa lain selain *stigmast-4-ene-3,6-dione* karena isolat yang diperoleh belum murni. Penelitian terdahulu menyebutkan bahwa *stigmast-4-ene-3,6-dione* ditemukan pada beberapa tanaman antara lain *Conium maculatum* L. (Radulovic & Dordevic, 2011), *Echium vulgare* L. (Pardo, Perich, Torres, & Monache, 2000), *Terminalia phanerophlebia* (Nair, Aremu, & Staden, 2012), dan *Curcuma zedoria* (Chen, et al., 2016).



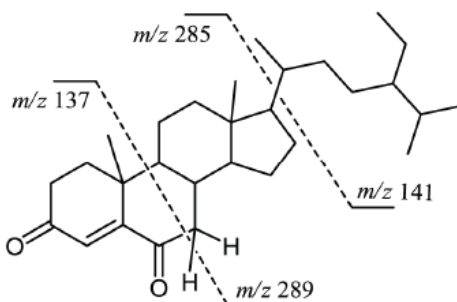
Gambar 6. 1 Struktur senyawa stigmast-4-ene-3,6-dione

Tabel 6.2 Fragmentasi senyawa stigmast-4-ene-3,6-dione

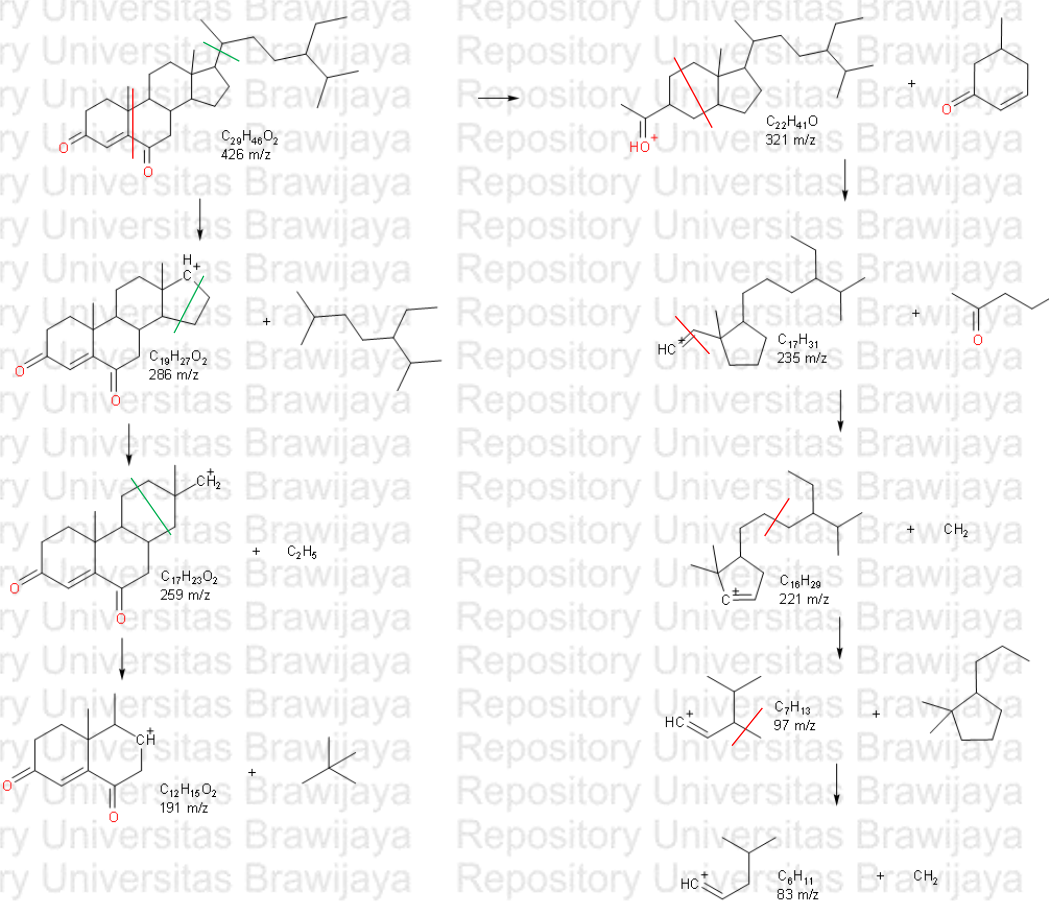
Waktu Retensi (menit)	m/z (hasil)	m/z (database)	Rumus molekul
9.96942	83.08499	82.0861	C ₆ H ₁₁
9.97066	97.10070	97.1017	C ₇ H ₁₃
9.97782	191.10647	191.1072	C ₁₂ H ₁₅ O ₂
9.92828	221.22584	221.2269	C ₁₆ H ₂₉
10.00523	235.24181	235.409210	C ₁₇ H ₃₁
9.99488	247.16751	-	C ₁₆ H ₂₃ O ₂
9.94044	259.17002	259.1698	C ₁₇ H ₂₃ O ₂
9.96046	286.20092	286.2011	C ₁₉ H ₂₇ O ₂
10.00159	299.20071	-	C ₂₀ H ₂₇ O ₂
9.92728	301.21553	-	C ₂₀ H ₂₉ O ₂
9.94090	321.31330	-	C ₂₂ H ₄₁ O

(TMIC, 2015; MoNA, 2020)

Tabel di atas merupakan perbandingan puncak fragmen yang muncul pada isolat D5.X dengan peak fragmentasi senyawa stigmast-4-ene-3,6-dione pada database. Fragmen induk yang memiliki setidaknya dua fragmen. Dari 11 fragmentasi, 7 di antaranya sesuai dengan database. Radulovic & Dordevic menyatakan dalam penelitiannya bahwa jalur fragmentasi utama dari senyawa stigmast-4-ene-3,6-dione ada 2, yaitu dengan pemutusan rantai samping pada C17 dan pemutusan ikatan C9-C10 dan C6-C7 pada cincin B sikloheksana seperti pada gambar 6.2.

**Gambar 6. 2 Jalur fragmentasi senyawa stigmast-4-ene-3,6-dione**

Berikut adalah prediksi pola fragmentasi dari stigmast-4-ene-3,6-dione sampel D5.X. Terdapat 2 jalur fragmentasi dengan pemutusan rantai samping pada C17 dan pemutusan ikatan C9-C10 dan C5-C6 pada cincin B sikloheksana.



Gambar 6. 3 Pola Fragmentasi stigmast-4-ene-3,6-dione pada isolat D5.X

Dari jalur fragmentasi pertama dengan pemotongan rantai samping terdapat beberapa senyawa hasil fragmentasi diantaranya $C_{19}H_{27}O_2$ (m/z 286), $C_{17}H_{23}O_2$ (m/z 259), dan $C_{12}H_{15}O_2$ (m/z 191). Percabangan dalam rantai hidrokarbon biasanya terfragmentasi terlebih dahulu karena ion radikal sekunder dan karbokation sekunder lebih stabil daripada bentuk primernya (Kristianingrum, 2012). Dari jalur kedua dengan pemutusan ikatan C9-C10 dan C5-C6 pada cincin B sikloheksana terdapat beberapa senyawa hasil fragmentasi antara lain $C_{22}H_{41}O$ (m/z 321), $C_{17}H_{31}$ (m/z 235), $C_{16}H_{29}$ (m/z 221), C_7H_{13} (m/z 97), dan C_6H_{11} (m/z 83). Ada 3 faktor utama yang mempengaruhi proses fragmentasi, antara lain: a) kekuatan ikatan, semakin lemah ikatan cenderung

semakin mudah mengalami pemutusan; b) kestabilan fragmen, fragmen yang stabil cenderung paling mudah terbentuk; c) karakteristik proses fragmentasi, beberapa proses fragmentasi bergantung pada kemampuan molekul tersebut membentuk keadaan transisi (Sutrisno, 2018).

Selain stigmast-4-ene-3,6-dione, candidate mass 1 dengan waktu retensi 9.93, berat molekul 414.34978 dan rumus molekul $C_{28}H_{46}O_2$ diduga merupakan steroid.

Berdasarkan database (ChemSpider, PubChem, TMLC) ada beberapa kemungkinan senyawa dengan rumus molekul tersebut antara lain ergosterol, litosterol, kolesterol formate, cholestanone, zymosterol, secoergosterol, dan stenocereol. Sementara itu berdasarkan struktur, rumus molekul, dan berat molekulnya, candidate mass 2 dengan rumus molekul $C_{36}H_{46}O_4$ merupakan senyawa dimer dari asam linoleat. Berdasarkan analisis yang dilakukan, terdapat 2 steroid yang terdeteksi dalam sampel D5 yaitu steroid jenis stigmastan dan 1 jenis steroid lain yang belum diketahui secara pasti.

6.2 Implikasi Penelitian

Penelitian ini dapat menjadi acuan dasar rekomendasi terhadap penelitian lanjutan terkait studi eksplorasi metabolit sekunder dari ekstrak batang *Strychnos lucida* dengan mempertimbangkan betapa banyaknya metabolit sekunder yang terdapat pada tanaman tersebut. Selain itu dengan banyaknya kandungan senyawa dan manfaat yang terkandung, dapat digunakan sebagai alternatif untuk pengembangan obat baru.

6.3 Keterbatasan Penelitian

Keterbatasan dalam penelitian ini antara lain:

1. Proses analisis menggunakan FTIR dan LC-MC/MS dilakukan di laboratorium intitusi lain sehingga peneliti tidak sepenuhnya mengambil alih operasional FTIR dan LC-MS/MS.

BAB 7

PENUTUP

7.1 Kesimpulan

1. Senyawa steroid yang diisolasi dari isolat D5.X ekstrak batang songga (*Strychnos lucida*) diduga adalah senyawa stigmaster-4-ene-3,6-dione dengan rumus molekul $C_{29}H_{46}O_2$.

7.2 Saran

1. Pada penelitian selanjutnya perlu dilakukan pemurnian lebih lanjut terhadap subfraksi hasil isolasi dari fraksi diklorometana daun *Strychnos ligustrina*.
2. Pada penelitian perlu dipertimbangkan identifikasi struktur senyawa isolat fraksi diklorometana batang *Strychnos ligustrina* dengan instrumen NMR (Nuclear Magnetic Resonance).
3. Perlu dipertimbangkan untuk memperbanyak hasil ekstraksi agar bobot akhir isolat yang didapatkan mencukupi untuk pengujian dengan berbagai instrumen.

DAFTAR PUSTAKA

- Abubakar, A. R., & Haque, M. (2020). Preparation of Medicinal Plants: Basic Extraction and Fractionation Procedures for Experimental Purposes. *Journal of Pharmacy and Bioallied Sciences*, 12(1), 1-10.
- Adijuwana, & M.A. N. (1989). *Teknik Spektroskopi dalam Analisis Biologi*. Bogor: IPB.
- Aprilia, Y. N. (2020). *AKTIVITAS HAMBATAN POLIMERISASI HEME EKSTRAK DAN FRAKSI KAYU SONGGA (Strychnos lucida) SECARA IN VITRO MENGGUNAKAN HEMATIN (Skripsi)*. Malang: Universitas Brawijaya.
- Bhawani, S. S. (2010). Thin-Layer Chromatographic Analysis of Steroids: A Review. *Tropical Journal of Pharmaceutical Research*, 301-313.
- Calixto, J. B. (2019). The role of natural products in modern drug discovery. *Anais da Academia Brasileira de Ciências*, 1-7.
- Chen, F.-F. Z.-W.-F. (2016). Steroidal saponins and their pharmacological activities in Solanum plants. *Zhongguo Zhong Yao Za Zhi*, 976-988.
- Chen, J. J., Tsai, T. H., Liao, H. R., Chen, L. C., Kuo, Y. H., Sung, P. J., et al. (2016). New Sesquiterpenoids and Anti-Platelet Aggregation Constituents from the Rhizomes of Curcuma zedoaria. *Molecules*, 1385.
- Christian, G. D., Dasgupta, P. K., & Schug, K. A. (2014). *Analytical Chemistry* (7 ed.). USA: John Wiley & Sons.
- Cui, J., Fan, L., Huang, L. L., Liu, H. L., & Zhou, A. (2009). Synthesis and Evaluation of Some Steroidal Oximes as Cytotoxic Agents: Structure/Activity Studies (I). *Chemistry Faculty Publications*, 62-72.
- Depkes RI. (2000). *Parameter Standar Umum Ekstrak Tumbuhan Obat*. Jakarta: Departemen Kesehatan RI.
- Dewick, P. M. (2002). *Medicinal Natural Products: A Biosynthesis Approach 2nd Edition*. London: John Wiley and Sons.
- Dinan, L., Harmatha, J., & Lafont, R. (2001). Chromatographic procedures for the isolation of plant steroids. *Journal of Chromatography A*, 105-123.
- Endarini, L. H. (2016). *Farmaokognosi dan Fitokimia*. Jakarta: Kemenkes RI.
- Fauziaa, D. V. (2018). Isolation and Testing of Bacteria from Steroid Compounds obtained from Anting-anting Leaf (Acalypha indica L.). *Jurnal Kimia Sains dan Aplikasi*, 64-69.
- Giang, P. M. (2018). New Compounds and Potential Candidates for Drug Discovery from Medicinal Plants of Vietnam. *Chemical and Pharmaceutical Bulletin*, 493-505.

Gusmailina, a. S. (2015). Eksplorasi potensi senyawa organik kayu ular (*Strychnos lucida*). *PROS SEM NAS MASY BIODIV INDON*, 1741-1746.

Hansen, S., Bjergaard, S. P., & Rasmussen, K. (2012). *Introduction to Pharmaceutical Chemical Analysis*. Chichester: John Wiley & Sons.

Harvey, D. (2000). *Modern Analytical Chemistry*. USA: McGraw-Hill.

Hasan, R. A. (2011). Pudarnya Kearifan Lokal dalam Pemanfaatan Tanaman Songga (*Strychnos ligustrina*). *Proceeding Biology Education Conference*, 8(1), 112-117.

Heftmann, E., Tzeko, S., & Bennett, R. (1966). Response of steroids to sulfuric acid in thin-layer chromatography. *Journal of Chromatography A*, 490-494.

Heliawati, L. (2018). *Kimia Organik Bahan Alam*. Bogor: Pascasarjana - Universitas Pakuan.

Heyne, K. (1987). *Tumbuhan Berguna Indonesia III*. Jakarta: Badan Penelitian dan Pengembangan Kehutanan Departemen Kehutanan.

Hidayah, W. W. (2016). Isolasi, Identifikasi Senyawa Steroid dari Daun Getih-Getihan (*Rivina humilis* L.) dan Uji Aktivitas sebagai Antibakteri. *Jurnal Kimia Sains dan Aplikasi*, 32-37.

Hostettmann, K. H. (2010). *Preparative Chromatography Techniques: Applications in Natural Product Isolation 2nd Edition*. New York: Springer.

Ismail, B. N. (2010). *Basic Principles of Chromatography*. New York: Springer.

Jack, I. R., Ekong, R. E., & Ndukwe, G. I. (2020). Phytochemical constituents of dichloromethane fraction and essential oil of *Napoleonaea imperialis* rind. *Journal of Pharmacognosy and Phytochemistry*, 59-66.

Kasal, A. B. (2010). Spectroscopic Methods of Steroid Analysis. In A. e. Kasal, *Steroid Analysis* (pp. 27-161). New York: Springer.

Kemendag. (2009). *Indonesian Herbal: The Traditional Therapy*. Jakarta: Kementerian Perdagangan Indonesia.

Kemenkes RI. (2014). *Farmakope Indonesia Edisi V*. Jakarta: Kementrian Kesehatan RI Direktorat Jenderal Bina Kefarmasian dan Alat Kesehatan.

Kemenkes RI. (2017). *Farmakope Herbal Indonesia Edisi II*. Jakarta.

Koparde, A. A. (2019). Natural Products in Drug Discovery. In S. a.-T. Perveen, *Pharmacognosy - Medicinal Plants* (pp. 1-18). IntechOpen.

Kristianingrum, S. (2012). *Handout Spektroskopi Massa*. Yogyakarta: UNY.

Kurniawan, E. J. (2018). Aktivitas Antibakteri Ekstrak Metanol Batang Bidara Laut (*Strychnos ligustrina*) Terhadap Bakteri Patogen. *Jurnal Biologi Tropis*, 19(1), 61-69.

Laili, R. (2016). *Uji Aktivitas Antioksidan dan Identifikasi menggunakan Spektrofotometer UV-Vis Senyawa Steroid Fraksi Petroleum Eter Hasil Hidrolisis Ekstrak Metanol Alga Merah (Eucheuma spinosum)*. Malang: UIN Maulana Malik Ibrahim.

Mallikharjuna, P. R. (2007). Phytochemical Studies of *Strychnos potatorum* L.f.- A Medicinal Plant. *E-Journal of Chemistry*, 510-518.

MoNA. (2020, April 7). *Spectrum CCMSLIB00005720296 for Stigmast-4-ene-3,6-dione*. Retrieved Mei 1, 2021, from MassBank of North America: <https://mona.fiehnlab.ucdavis.edu/spectra/display/CCMSLIB00005720296>

Nair, J. J., Aremu, A. O., & Staden, J. V. (2012). Anti-inflammatory effects of *Terminalia phanerophlebia* (Combretaceae) and identification of the active constituent principles. *South African Journal of Botany*, 79-80.

Neilsen, W. E. (2014). Steroids: Pharmacology, Complications, and Practice Delivery Issues. *The Ochsner Journal*, 203-207.

Okoye, F. B., Osadebe, P. O., Proksch, P., Edrada-Ebel, R. A., Nworu, C. S., & Esimone, C. O. (2010). Anti-inflammatory and Membrane-stabilizing Stigmastane Steroids from *Alchornea floribunda* Leaves. *Plant Med*, 172-177.

Pardo, F., Perich, F., Torres, R., & Monache, F. D. (2000). Stigmast-4-ene-3,6-dione an unusual phytotoxic. *Biochemical Systematics and Ecology*, 911-913.

Patel, R. S., Roy, M., & Dutta, G. K. (2012). Mass spectrometry - A review. *Vet. World*, 185-192.

Patel, S. S. (2015). Systematic review of plant steroids as potential anti-inflammatory agents: Current status and future perspectives. *The Journal of Phytopharmacology*, 121-125.

Pavia, D. L. (2001). *Introduction to Spectroscopy*. Washington DC: Thomson Learning Academic Center.

Prasain, J. K. (2012). *Tandem Mass Spectrometry – Applications and Principles*. Croatia: InTech.

Radulovic, N. S., & Dordevic, N. D. (2011). Steroids from poison hemlock (*Conium maculatum* L.):. *Journal of the Serbian Chemical Society*, 1471-1483.

Sarker, S. D., Latif, Z., & Gray, A. I. (2006). *Natural Products Isolation* (2 ed.). Totowa: Humana Press.

Sayeed, M. S. (2016). Critical Analysis on Characterization, Systemic Effect, and Therapeutic Potential of Beta-Sitosterol: A Plant-Derived Orphan Phytosterol. *Medicines*, 1-25.

Setiawan, O. e. (2014). *Bidara Laut (Strychnos ligustrina Blume) syn. S. lucida R. Br: Sumber Bahan Obat Potensial di Nusa Tenggara Barat dan Bali*. Mataram: FORDA.

Sholikhah, E. N. (2016). Indonesian medicinal plants as sources of secondary metabolites for pharmaceutical industry. *J Med Sci*, 226-239.

Stahl, E. (1969). *Thin-Layer Chromatography: A Laboratory Handbook*. Berlin: Springer.

Sultan, A. a. (2015). Steroids: A Diverse Class of Secondary Metabolites. *Medicinal Chemistry*, 310-317.

Susilawati, Indriati, H., & Limra, W. (2015). Isolasi dan Identifikasi Senyawa Steroid dari Daun Rimbang (*Solanum torvum*). *Repository Universitas Riau*.

Sutrisno. (2018). *Struktur Organik dari Spektra Massa, UV-Vis, dan IR (Seri buku ajar penentuan struktur organik)*. Malang: PT. Book Mart Indonesia.

Syafii, W. S. (2016). Aktivitas Antimalaria Ekstrak Kayu Bidara Laut. *Jurnal Ilmu dan Teknologi Kayu Tropis*, 14(1), 1-10.

TMIC. (2015). *Stigmast 4 ene 3,4 dione*. Retrieved Mei 1, 2021, from The Metabolomic Innovation Centre: https://foodb.ca/spectra/ms_ms/65448

Wagner, H. (2001). *Plant Drug Analysis: A Thin Layer Chromatography 2nd ed.* New York: Springer.

Wagner, H. a. (1996). *Plant Drug Analysis: A Thin Layer Chromatography Atlas 2nd Edition*. Munich: Springer.

Wahyuningsih, D. (2007). *Pengaruh Pemberian Dosis Berulang Ekstrak Air Kayu Bidara Laut (Strychnos ligustrina Blume) terhadap Pertumbuhan Plasmodium berghei pada Mencit*. Surabaya: Fakultas Farmasi Universitas Airlangga.

Wulandari, E. (2018). *UJI AKTIVITAS ANTIBAKTERI FRAKSI ETANOL BUAH Limonia acidissima L. TERHADAP BAKTERI Escherichia coli DENGAN METODE DIFUSI CAKRAM (Skripsi)*. Malang: Universitas Muhammadiyah Malang.

Zanon, R. B. (2008). Phytoconstituents isolated from dichloromethane fraction of *Vernonia tweediana* Baker leaves. *Brazilian Journal of Pharmacognosy*, 226-229.

Zhang, Q.-W. L.-G.-C. (2018). Techniques for extraction and isolation of natural products: a comprehensive review. *Chinese Medicine*, 13-20.

LAMPIRAN

Lampiran 1. Surat Determinasi Tanaman Songga (*Strychnos lucida*)

 **LEMBAGA ILMU PENGETAHUAN INDONESIA**
(INDONESIAN INSTITUTE OF SCIENCES)
BALAI KONSERVASI TUMBUHAN
KEBUN RAYA PURWODADI
Jl. Raya Surabaya - Malang Km. 65 Purwodadi - Pasuruan 67163
Telp. (+62 343) 615033, Faks. (+62 341) 426046
website : <http://www.krppurwodadi.lipi.go.id>



SURAT KETERANGAN IDENTIFIKASI TUMBUHAN
No: 787 /IPH.06/HM/VII/2019

Kepala Balai Konservasi Tumbuhan Kebun Raya Purwodadi LIPI dengan ini menerangkan bahwa material tumbuhan yang dibawa oleh:

Nama : Uswatun Khasanah, S.Farm.,M. Farm., Apt.
NIK : 2011068512222001
Instansi : Farmasi FKUB
Tanggal material diterima : 24 Juli 2019

Telah diidentifikasi/determinasi berdasarkan koleksi herbarium dan koleksi kebun serta referensi ilmiah, dengan hasil sebagai berikut :

Kingdom : Plantae
Division : Magnoliophyta
Class : Magnoliopsida
Subclass : Asteridae
Ordo : Gentianales
Family : Loganiaceae
Genus : *Strychnos*
Species : *Strychnos lucida* R. Br.

Referensi:

1. Backer CA & Bakhuizen van den Brink RC. 1965. Flora of Java Vol. II. NVP Noordhoff, Groningen, The Netherlands. Hal. 210
2. Cronquist A. 1981. An Integrated System of Classification of Flowering Plants. Columbia University Press, New York, USA. Hal. XVII
3. L.S. de Padua ,N. Bunyaphatsara dan R.H.M.J. Lemmens. 1999 . (esd) PROSEA (Plants Resources of South-East Asia) No 12 (1) : Medicinal and poisonous plants I, Hal. 471

Demikian surat keterangan ini dibuat untuk dapat dipergunakan sebagaimana mestinya.

Purwodadi, 2 Agustus 2019
An. Kepala
Kepala Seksi Eksplorasi dan Koleksi Tumbuhan


Rony Irawanto, S.Si.,M.T.



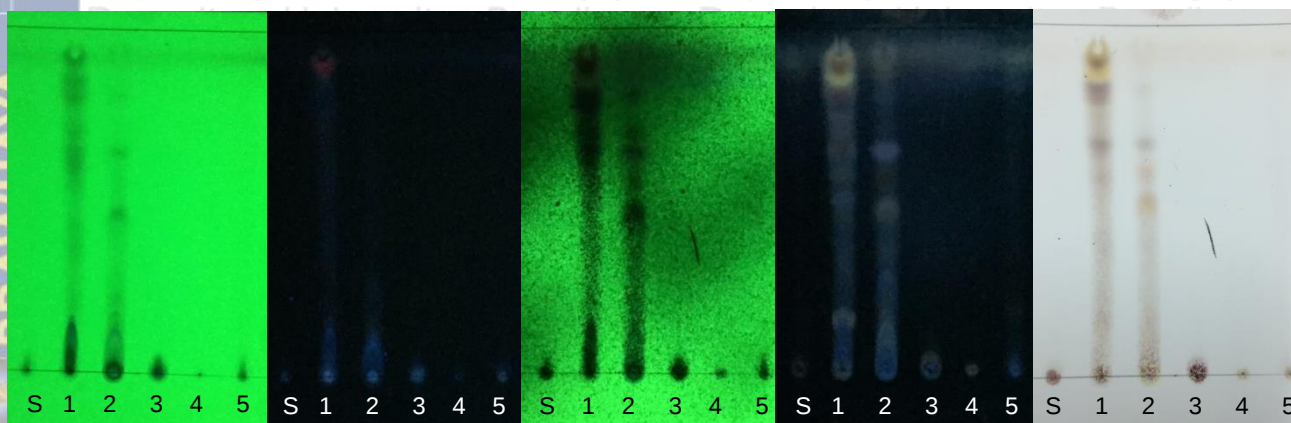
**Lampiran 2. Pembuatan Reagen Penampak Noda****1. H_2SO_4 10%**

Campurkan 10 mL H_2SO_4 pekat dengan 90 mL akuades.

2. Liebermann Burchard

Campurkan asam asetat dengan asam sulfat 97% lalu tambahkan campuran tersebut ke ethanol dengan perbandingan 1:1:10.

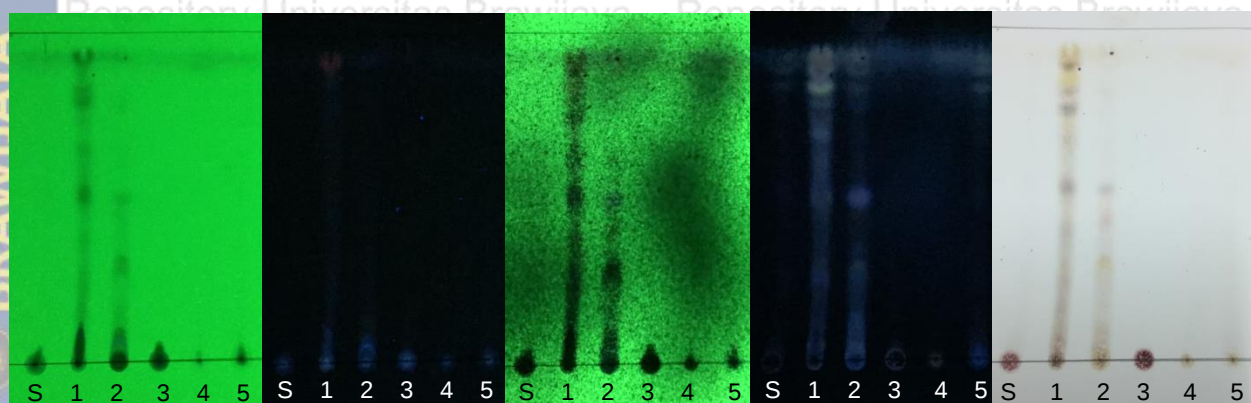
Lampiran 3. Foto Hasil Optimasi Fase Gerak



(a) (b) (c) (d) (e)

Hasil optimasi fase gerak (kloroform:aseton = 6:4) sebelum disemprot H_2SO_4 10% (a) UV 254 nm; (b) UV 366 nm; setelah disemprot H_2SO_4 10% (c) UV 254 nm; (d) UV 366 nm; (e) sinar tampak

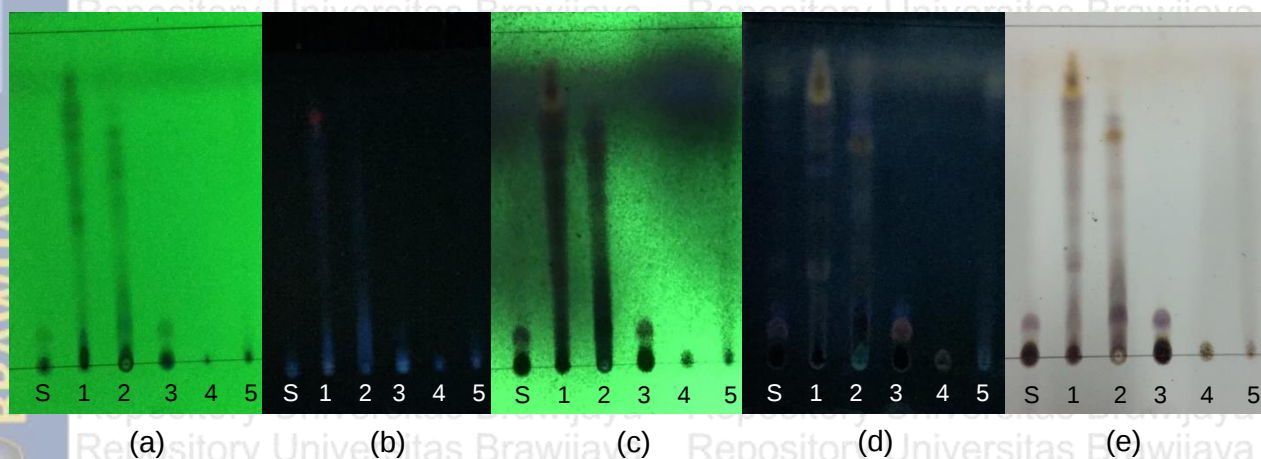
(Keterangan: S: standar (ekstrak), 1: fraksi DCM, 2: fraksi etil asetat, 3: fraksi n-butanol, 4: fraksi air, 5: gumpalan di fraksi air)



(a) (b) (c) (d) (e)

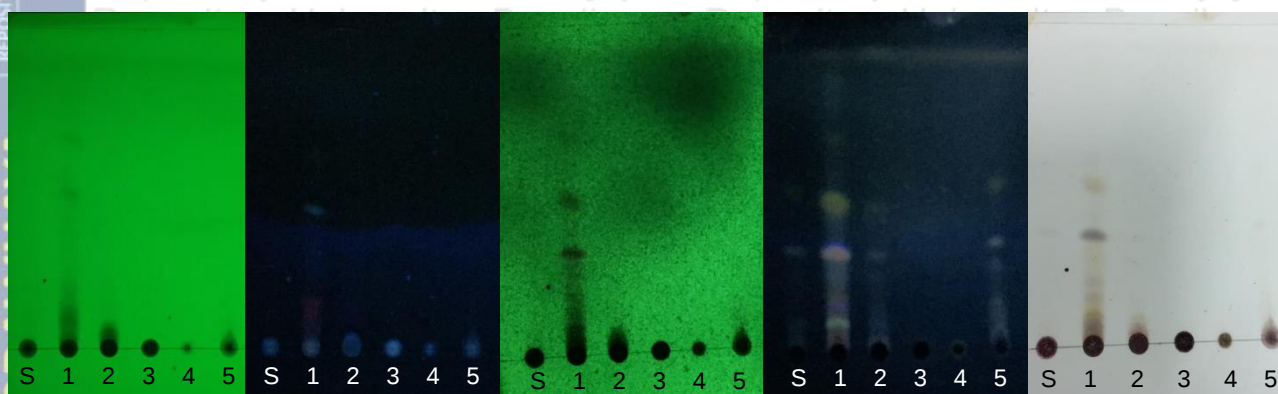
Hasil optimasi fase gerak (kloroform:aseton = 7:3) sebelum disemprot H_2SO_4 10% (a) UV 254 nm; (b) UV 366 nm; setelah disemprot H_2SO_4 10% (c) UV 254 nm; (d) UV 366 nm; (e) sinar tampak

(Keterangan: S: standar (ekstrak), 1: fraksi DCM, 2: fraksi etil asetat, 3: fraksi n-butanol, 4: fraksi air, 5: gumpalan di fraksi air)



Hasil optimasi fase gerak (kloroform:aseton = 5:5) sebelum disemprot H_2SO_4 10% (a) UV 254 nm; (b) UV 366 nm; setelah disemprot H_2SO_4 10% (c) UV 254 nm; (d) UV 366 nm; (e) sinar tampak

(Keterangan: S: standar (ekstrak), 1: fraksi DCM, 2: fraksi etil asetat, 3: fraksi n-butanol, 4: fraksi air, 5: gumpalan di fraksi air)

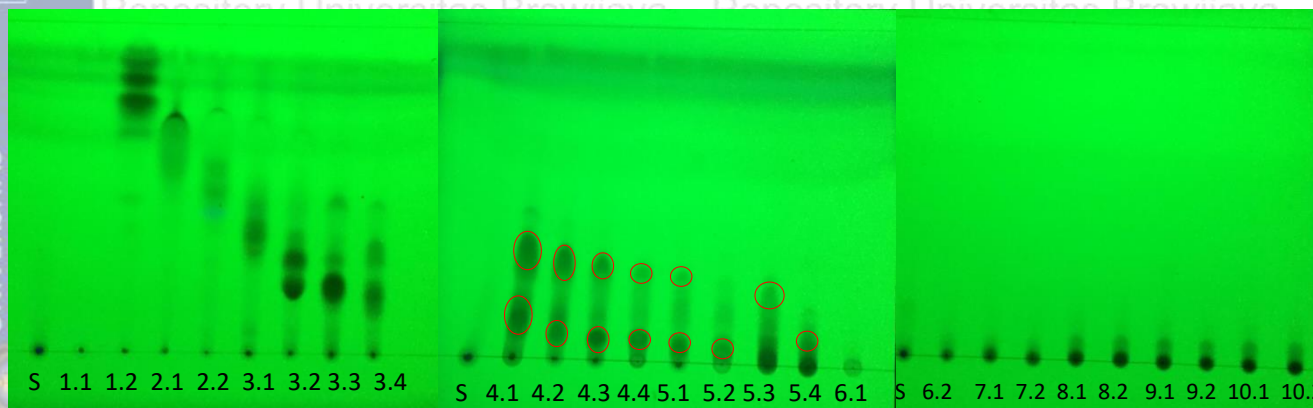


Hasil optimasi fase gerak (n-heksana:etil asetat = 7:3) sebelum disemprot H_2SO_4 10% (a) UV 254 nm; (b) UV 366 nm; setelah disemprot H_2SO_4 10% (c) UV 254 nm; (d) UV 366 nm; (e) sinar tampak

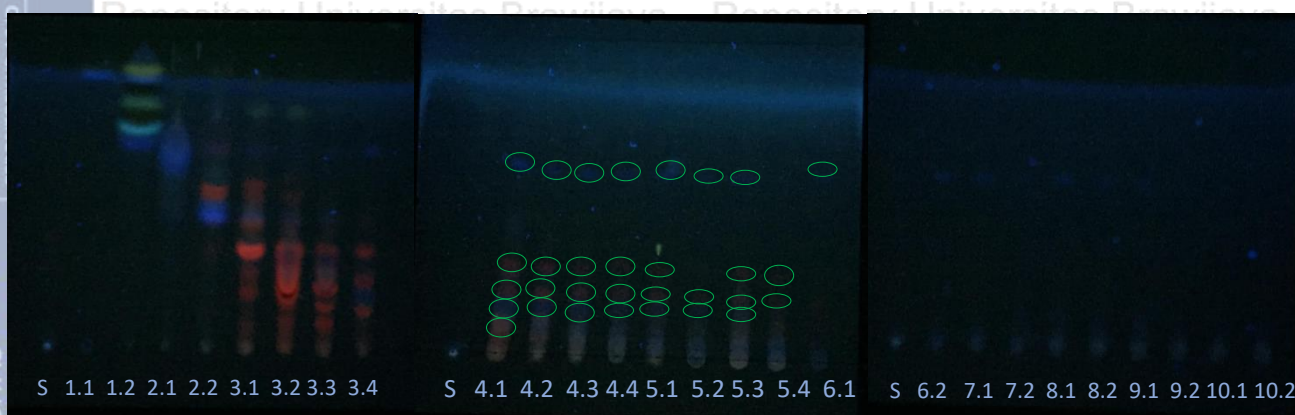
(Keterangan: S: standar (ekstrak), 1: fraksi DCM, 2: fraksi etil asetat, 3: fraksi n-butanol, 4: fraksi air, 5: gumpalan di fraksi air)

Lampiran 4. Foto KLT hasil Kromatografi Cair Vakum

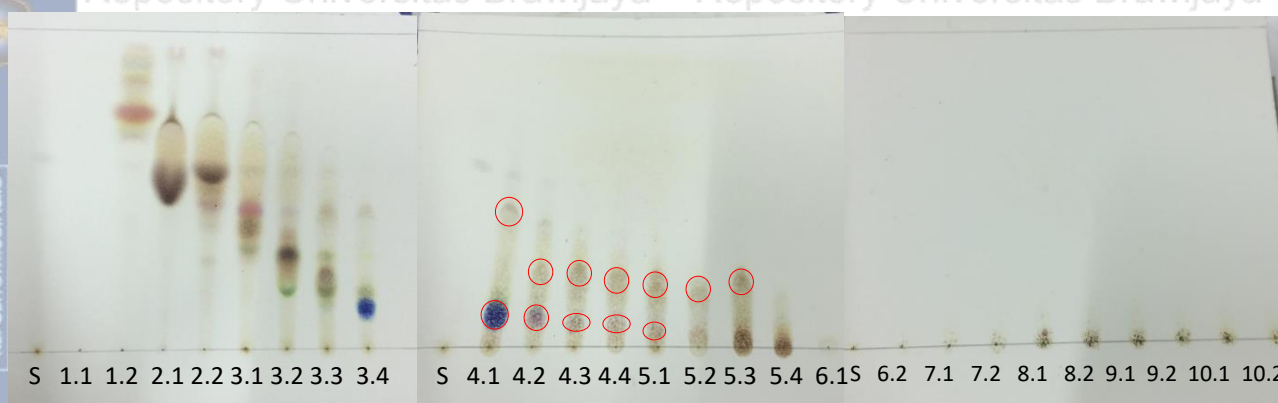
71



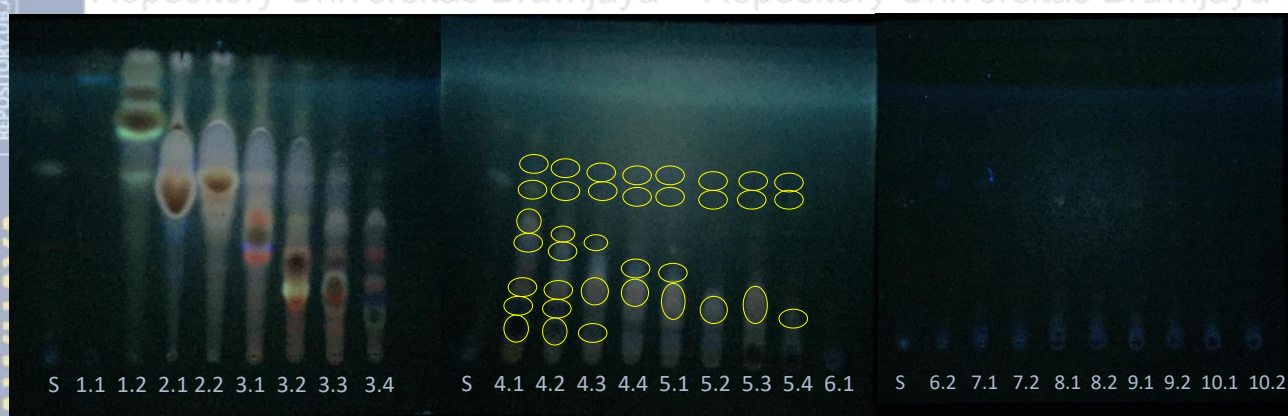
Gambar KLT 26 fraksi si bawah UV 254nm sebelum semprot H_2SO_4 10%



Gambar KLT 26 fraksi si bawah UV 366nm sebelum semprot H_2SO_4 10%

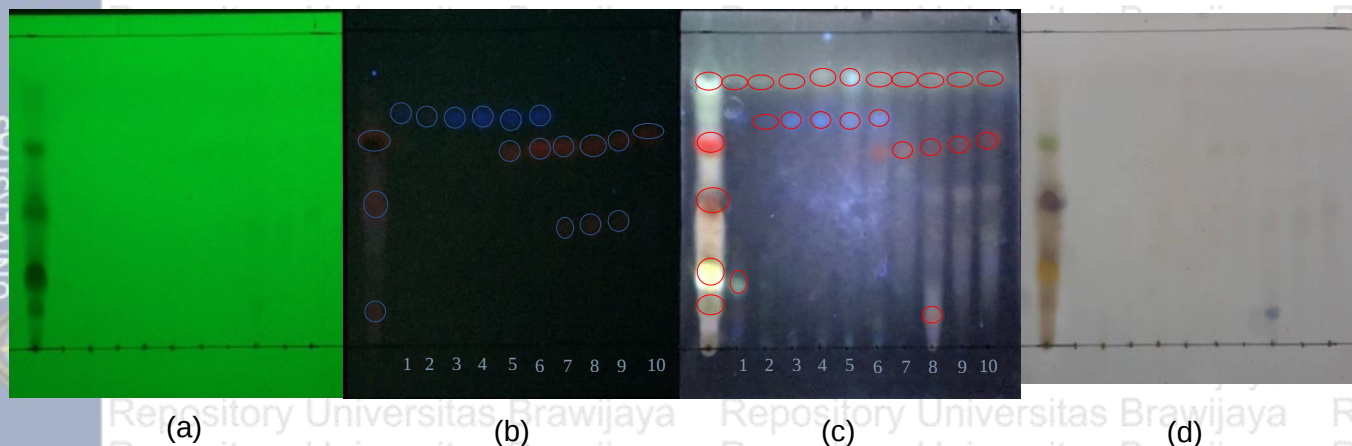


Gambar KLT 26 fraksi pada sinar tampak setelah semprot H_2SO_4 10%

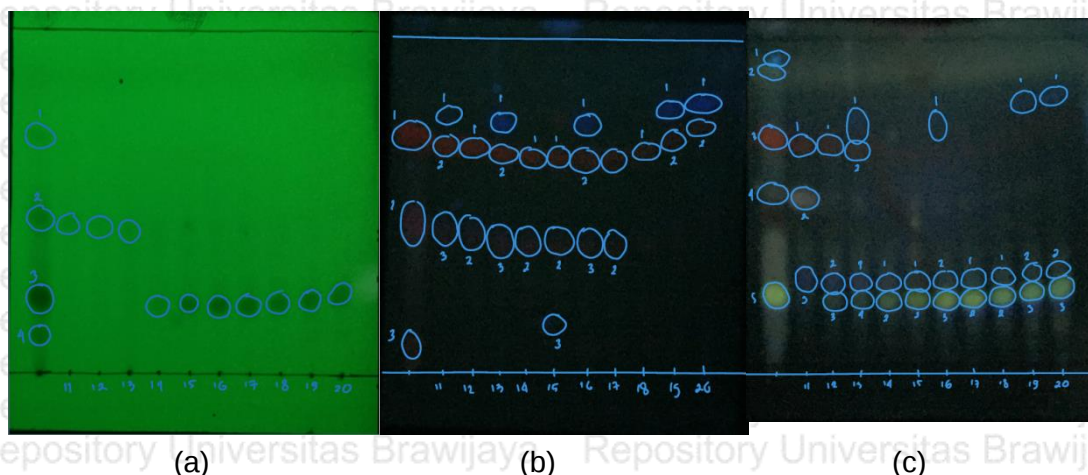


Gambar KLT 26 fraksi di bawah UV 366nm setelah sempnot H_2SO_4 10%

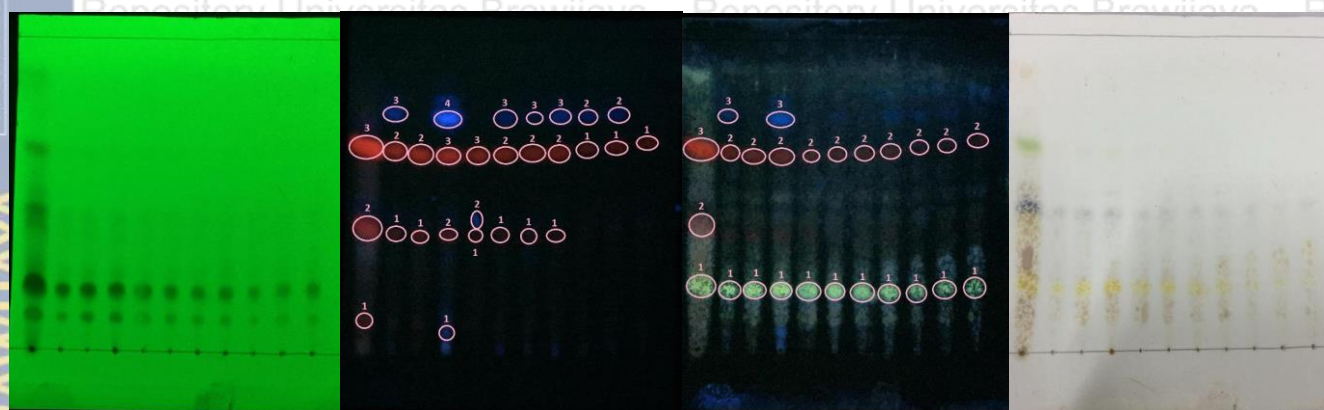
Lampiran 5. Foto KLT hasil Kromatografi Kolom Lambat



Gambar KLT Subfraksi 5.1-5.10 sebelum disempot H₂SO₄ 10% (a) UV 254 nm; (b) UV 366 nm; setelah disempot H₂SO₄ 10% (c) UV 366 nm; (d) sinar tampak

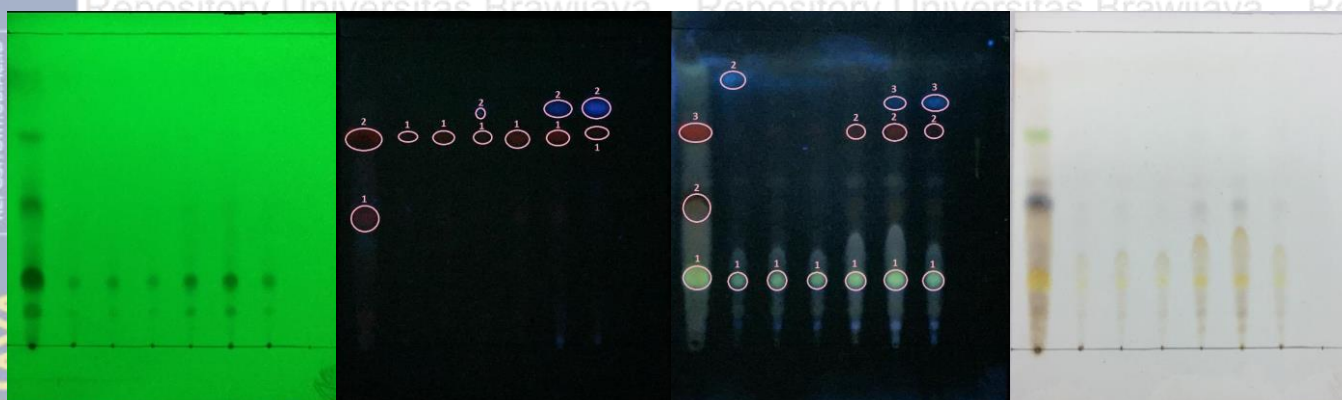


Gambar KLT Subfraksi 5.11-5.20 sebelum disempot H₂SO₄ 10% (a) UV 254 nm; (b) UV 366 nm; setelah disempot H₂SO₄ 10% (c) UV 366 nm



(a) (b) (c) (d)

Gambar KLT Subfraksi 5.21-5.30 sebelum disemprot H_2SO_4 10% (a) UV 254 nm; (b) UV 366 nm; setelah disemprot H_2SO_4 10% (c) UV 366 nm; (d) sinar tampak



(a) (b) (c) (d)

Gambar KLT Subfraksi 5.31-5.36 sebelum disemprot H_2SO_4 10% (a) UV 254 nm; (b) UV 366 nm; setelah disemprot H_2SO_4 10% (c) UV 366 nm; (d) sinar tampak



Lampiran 6. Nilai Rf hasil kolom lambat D5

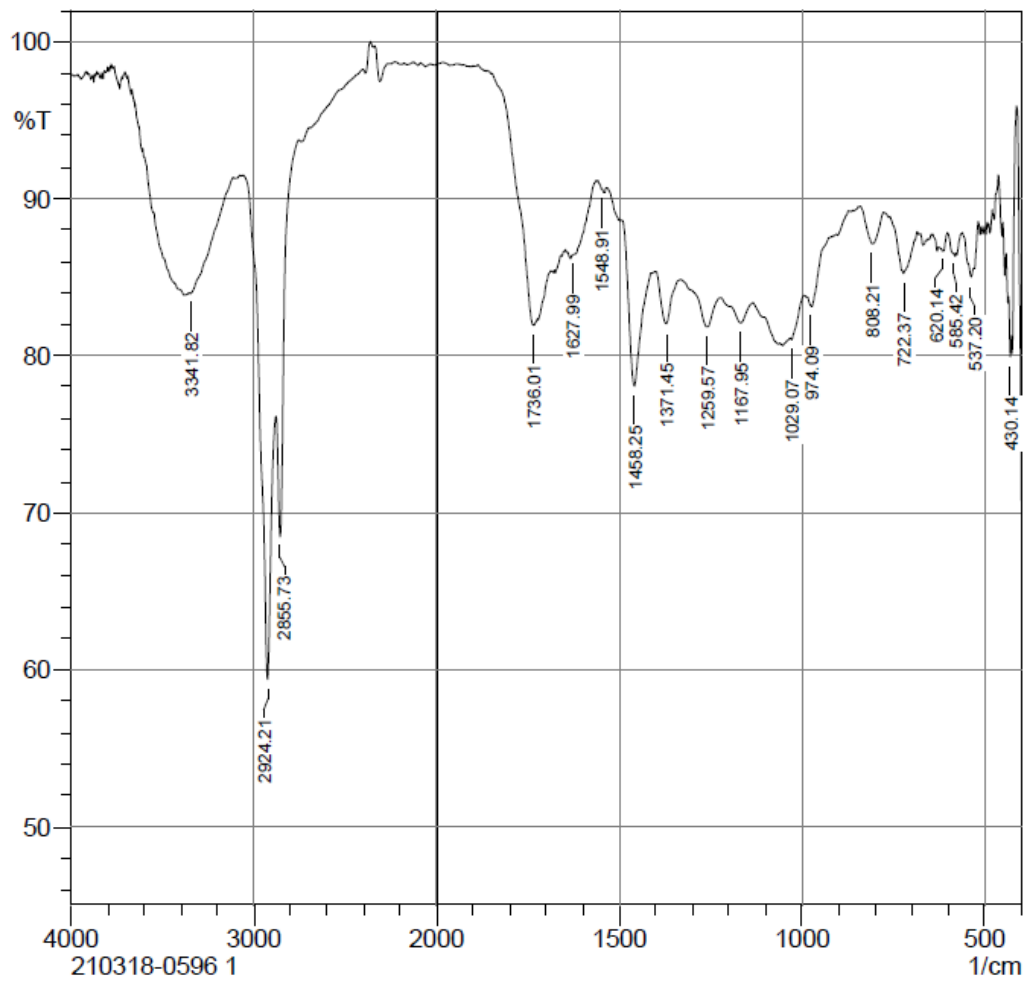
Subfraksi	Rf sebelum semprot H ₂ SO ₄		Rf setelah semprot H ₂ SO ₄	
	366 nm	254 nm	366 nm	Visual
Standar	0.09	0.1	0.11	0.2 0.4 0.52 0.7
		0.21	0.2	
	0.45	0.43	0.44	
	0.65	0.68	0.6	
D5.1	0.74		0.77	
			0.17	
			0.74	
			0.79	
D5.2	0.73		0.73	
			0.79	
D5.3	0.72		0.72	
			0.79	
D5.4	0.72		0.72	
			0.8	
D5.5	0.61		0.72	
	0.72		0.8	
D5.6	0.62		0.62	
	0.7		0.7	
			0.79	
D5.7	0.36		0.62	
	0.62		0.79	
D5.8	0.36		0.12	
			0.62	
	0.79		0.79	
D5.9	0.38		0.62	
	0.62		0.79	
D5.10	0.68		0.68	
			0.79	
D5.11	0.41	0.42	0.29	0.4
	0.65		0.52	0.52
	0.74		0.68	
D5.12	0.4	0.42	0.21	0.21
			0.27	0.43
	0.65		0.68	
D5.13	0.4	0.41	0.21	0.21
			0.27	
	0.62		0.66	0.41
D5.14	0.72		0.73	
	0.4		0.21	0.21
	0.62		0.27	0.43
D5.15	0.14	0.2	0.21	0.21
	0.38		0.27	0.41
	0.62			
D5.16	0.38	0.19	0.21	0.21
	0.62		0.27	0.42
	0.72		0.73	
D5.17	0.38	0.19	0.21	0.21



	0.72		0.27	0.43
D5.18	0.63	0.21	0.21	0.21
			0.27	0.43
D5.19	0.68	0.2	0.25	0.23
			0.3	
	0.76		0.8	
D5.20	0.72	0.24	0.25	0.23
			0.3	
	0.79		0.8	
D5.21	0.38	0.1	0.21	
	0.63	0.2	0.63	
	0.75		0.75	
D5.22	0.37	0.1	0.21	
	0.63	0.2	0.63	
D5.23	0.07	0.1		
	0.38	0.2	0.21	
	0.63		0.6	
	0.72		0.74	
D5.24	0.37	0.1	0.21	
	0.42	0.2		
	0.63		0.63	
D5.25	0.37	0.1	0.21	
	0.63	0.2	0.64	
	0.71			
D5.26	0.38	0.1	0.21	
	0.63	0.2	0.64	
	0.71			
D5.27	0.38	0.1	0.21	
	0.63	0.2	0.64	
	0.72			
D5.28	0.63	0.1	0.21	
	0.72	0.2	0.64	
D5.29	0.63	0.1	0.21	
	0.73	0.2	0.64	
D5.30		0.1	0.22	
	0.64	0.2	0.64	
D5.31	0.69	0.1	0.2	
		0.2	0.84	
D5.32		0.1		
	0.69	0.2	0.2	
D5.33	0.69	0.1		
	0.76	0.2	0.2	
D5.34		0.1	0.2	
	0.68	0.2	0.67	
D5.35		0.1	0.2	
	0.68	0.2	0.66	
	0.77		0.76	
D5.36		0.1	0.2	
	0.69	0.2	0.66	
	0.77		0.76	

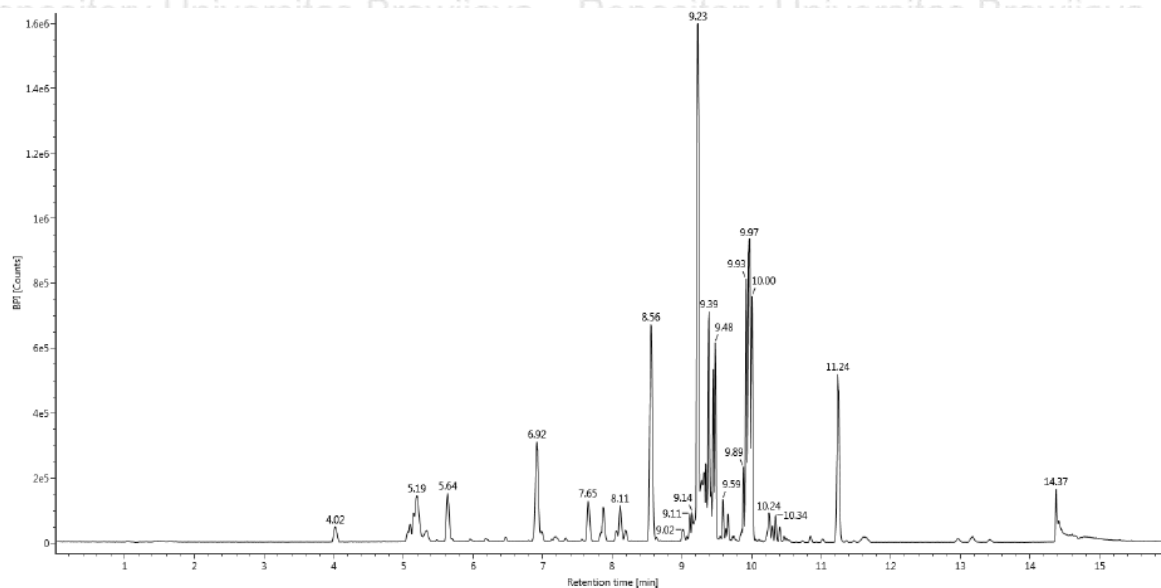


Lampiran 7. Hasil identifikasi dengan FTIR



No.	Peak	Height	Corr. He	Base (H)	Base (L)	Area	Corr. Ar
1	430.14	20.083	2.29	434.97	427.25	0.689	0.044
2	537.2	14.984	0.674	545.88	531.41	0.993	0.026
3	585.42	13.532	0.18	601.82	583.49	1.108	0.016
4	620.14	13.202	0.028	626.89	619.18	0.472	0
5	722.37	14.77	2.823	759.99	691.51	4.239	0.479
6	808.21	12.871	0.22	840.04	805.32	1.895	0.024
7	974.09	16.861	1.344	985.67	925.87	4.144	0.112
8	1029.07	19.002	0.351	1031.96	995.31	3.098	0.032
9	1167.95	17.908	1.16	1195.92	1135.16	5.012	0.179
10	1259.57	18.165	2.2	1330.94	1227.74	8.133	0.454
11	1371.45	17.951	3.096	1397.49	1331.9	5.087	0.489
12	1458.25	21.935	9.125	1492	1412.92	6.53	1.71
13	1548.91	9.39	0.082	1553.73	1547.94	0.244	0.001
14	1627.99	13.629	0.164	1629.92	1564.34	3.545	0.143
15	1736.01	18.051	0.35	1822.81	1734.08	4.095	-0.338
16	2855.73	31.537	10.822	2877.92	2753.5	9.218	1.483
17	2924.21	40.628	20.711	3055.38	2878.88	19.85	6.185
18	3341.82	16.003	0.033	3342.78	3113.24	13.32	0.185

Lampiran 8. Hasil identifikasi dengan LC-MS/MS



Retention time (min)	Area	% Area (%)	Height	Width (s)	Integration type	Peak width parameter (s)	Threshold parameter
0.37	664	0.00	1006	1.12	BB	3.17	1151.67
0.88	873	0.00	2298	1.58	BB	3.17	1151.67
1.51	634	0.00	1857	0.68	BB	3.17	1151.67
2.76	769	0.00	2093	1.12	BB	3.17	1151.67
4.02	145535	0.71	46247	6.17	BB	3.17	1151.67
4.73	3896	0.02	2772	3.20	BB	3.17	1151.67
5.07	55358	0.27	31472	2.74	BV	3.17	1151.67
5.10	115340	0.56	54050	2.74	VV	3.17	1151.67
5.15	153051	0.74	88612	2.26	VV	3.17	1151.67
5.20	575679	2.79	139303	7.09	VV	3.17	1151.67
5.34	142478	0.69	35329	7.75	VB	3.17	1151.67
5.49	7349	0.04	4573	3.18	BB	3.17	1151.67
5.58	802	0.00	1783	0.91	BB	3.17	1151.67
5.64	409856	1.99	143959	5.46	BV	3.17	1151.67
5.70	12172	0.06	10038	2.29	VB	3.17	1151.67
5.96	18986	0.09	7181	5.24	BB	3.17	1151.67
6.18	19654	0.10	9355	3.42	BV	3.17	1151.67
6.22	2740	0.01	5161	0.91	VB	3.17	1151.67
6.47	24226	0.12	12085	4.12	BB	3.17	1151.67
6.91	905335	4.39	296398	7.24	BV	3.17	1151.67
6.98	66806	0.32	30804	3.73	VB	3.17	1151.67
7.08	309	0.00	871	0.69	BB	3.17	1151.67
7.13	9235	0.04	6052	2.32	BV	3.17	1151.67
7.17	13912	0.07	12515	1.64	VV	3.17	1151.67
7.19	33261	0.16	13538	4.16	VB	3.17	1151.67
7.33	18593	0.09	10252	3.37	BB	3.17	1151.67
7.57	9029	0.04	5649	3.02	BB	3.17	1151.67
7.66	329655	1.60	123368	6.24	BB	3.17	1151.67
7.84	22955	0.11	25699	1.89	BV	3.17	1151.67
7.87	252800	1.23	101792	5.55	VB	3.17	1151.67
8.06	70721	0.34	31951	3.67	BV	3.17	1151.67



Repository Universitas Brawijaya	Repository Universitas Brawijaya	Repository Universitas Brawijaya	Repository Universitas Brawijaya	Repository Universitas Brawijaya	Repository Universitas Brawijaya	Repository Universitas Brawijaya
8.11	255308	1.24	108106	4.60	VV	3.17
8.19	83836	0.41	32461	4.87	VB	3.17
8.56	1806074	8.76	666542	6.75	BV	3.17
8.64	16158	0.08	10173	2.97	VB	3.17
8.85	1173	0.01	2050	1.67	BB	3.17
9.01	91960	0.45	37067	5.35	BV	3.17
9.07	20415	0.10	16411	1.88	VV	3.17
9.11	122855	0.60	85261	2.46	VV	3.17
9.14	140671	0.68	88986	2.28	VV	3.17
9.23	3716450	18.04	1567977	5.54	VV	3.17
9.28	373347	1.81	188582	2.15	VV	3.17
9.31	458428	2.22	214477	2.44	VV	3.17
9.34	295320	1.43	252348	1.78	VV	3.17
9.39	1308392	6.35	715408	4.23	VV	3.17
9.45	526414	2.55	528093	1.65	VV	3.17
9.48	819237	3.98	610733	3.80	VV	3.17
9.55	23337	0.11	15339	2.62	VV	3.17
9.59	149406	0.73	130552	3.03	VV	3.17
9.64	43020	0.21	39314	1.60	VV	3.17
9.66	95241	0.46	82337	2.87	VB	3.17
9.73	11103	0.05	12295	1.50	BV	3.17
9.75	14291	0.07	13200	1.67	VB	3.17
9.86	57234	0.28	36869	3.01	BV	3.17
9.89	269433	1.31	229964	1.92	VV	3.17
9.93	1116526	5.42	805721	2.34	VV	3.17
9.97	1766425	8.57	962325	2.47	VV	3.17
10.00	1214989	5.90	757582	3.56	VB	3.17
10.06	3503	0.02	4800	1.30	BB	3.17
10.10	8620	0.04	6203	2.50	BV	3.17
10.14	5531	0.03	4093	2.05	VB	3.17
10.18	2887	0.01	3387	1.26	BV	3.17
10.25	211748	1.03	88090	5.80	VV	3.17
10.30	65784	0.32	50199	2.45	VV	3.17
10.34	124380	0.60	84214	3.26	VB	3.17
10.41	65437	0.32	44513	3.25	BB	3.17
10.47	22930	0.11	15801	2.50	BV	3.17
10.50	12044	0.06	10327	2.21	VB	3.17
10.73	10610	0.05	5742	4.41	BB	3.17
10.85	36661	0.18	19573	3.90	BB	3.17
11.02	18112	0.09	9959	4.84	BB	3.17
11.24	1184192	5.75	489708	7.27	BB	3.17
11.37	10604	0.05	5525	3.65	BB	3.17
11.47	9634	0.05	5191	3.66	BB	3.17
11.61	39899	0.19	17419	5.97	BV	3.17
11.62	33417	0.16	17379	2.15	VV	3.17
11.65	28322	0.14	14736	4.03	VB	3.17
12.98	2494	0.01	3149	1.84	BB	3.17
13.15	12911	0.06	13258	2.55	BV	3.17
13.17	47522	0.23	18032	6.48	VB	3.17
14.37	217538	1.06	160137	2.85	BV	3.17
14.41	187511	0.91	60870	7.24	VV	3.17
14.52	4456	0.02	6343	1.43	VB	3.17
14.60	5307	0.03	6607	2.49	BB	3.17
14.77	3472	0.02	3351	2.04	BV	3.17
14.79	1329	0.01	3328	0.69	VB	3.17
14.82	624	0.00	1609	0.69	BB	3.17
14.91	835	0.00	1679	0.91	BB	3.17
14.94	1967	0.01	3808	1.58	BB	3.17
15.28	1588	0.01	3203	2.03	BB	3.17
15.45	1980	0.01	3469	1.58	BB	3.17
15.80	2275	0.01	3012	2.27	BB	3.17
Repository Universitas Brawijaya	Repository Universitas Brawijaya	Repository Universitas Brawijaya	Repository Universitas Brawijaya	Repository Universitas Brawijaya	Repository Universitas Brawijaya	Repository Universitas Brawijaya



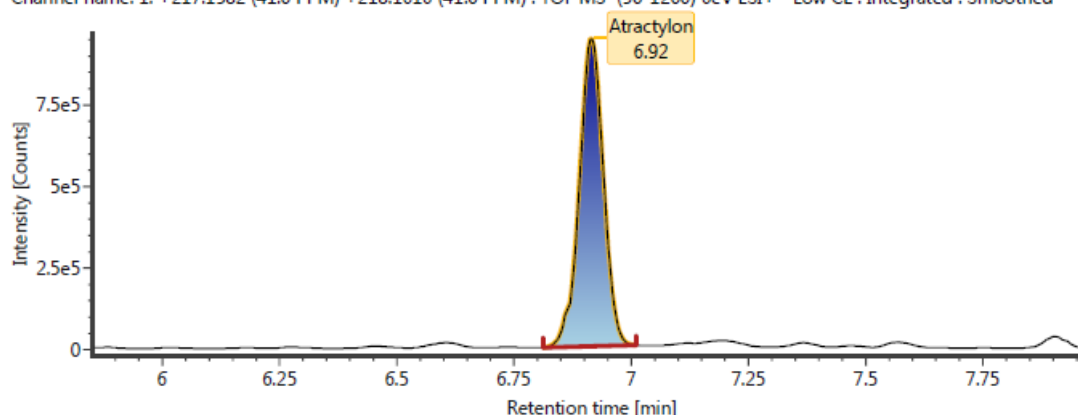
Item name: 210317-0589, Sample position: 1:C,3, Replicate number: 1

	Component name	Identification status	Observed m/z	Neutral mass (Da)	Observed RT (min)	Detector counts
1	Atractylon	Identified	217.1582	216.15142	6.92	337916
2	Stigmast-4-ene-3,6-dione	Identified	427.3566	426.34978	9.98	1560616
3	Sugiol	Identified	301.2159	300.20893	9.23	963469
4	Candidate Mass C28H46O2	Identified	415.3569	414.34978	9.93	454635
5	Candidate Mass C36H64O4	Identified	561.4879	560.48046	9.45	218728

	Component name	Identification status	Response	Adducts	Formula	Mass error (mDa)
1	Atractylon	Identified	288701	+H	C15H20O	-0.5
2	Stigmast-4-ene-3,6-dione	Identified	670860	+H	C29H46O2	-0.4
3	Sugiol	Identified	713837	+H	C20H28O2	-0.3
4	Candidate Mass C28H46O2	Identified		+H	C28H46O2	-0.2
5	Candidate Mass C36H64O4	Identified		+H	C36H64O4	0.2

Component name: Atractylon

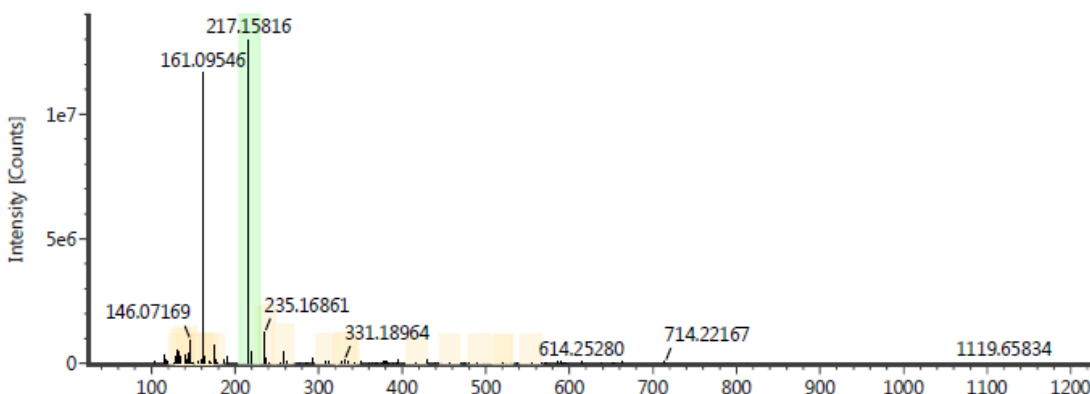
Item name: 210317-0589

Channel name: 1: +217.1582 (41.0 PPM) +218.1616 (41.0 PPM) : TOF MS² (50-1200) 6eV ESI+ - Low CE : Integrated : Smoothed


Item name: 210317-0589

Channel name: Low energy : Time 6.9167 +/- 0.0265 minutes

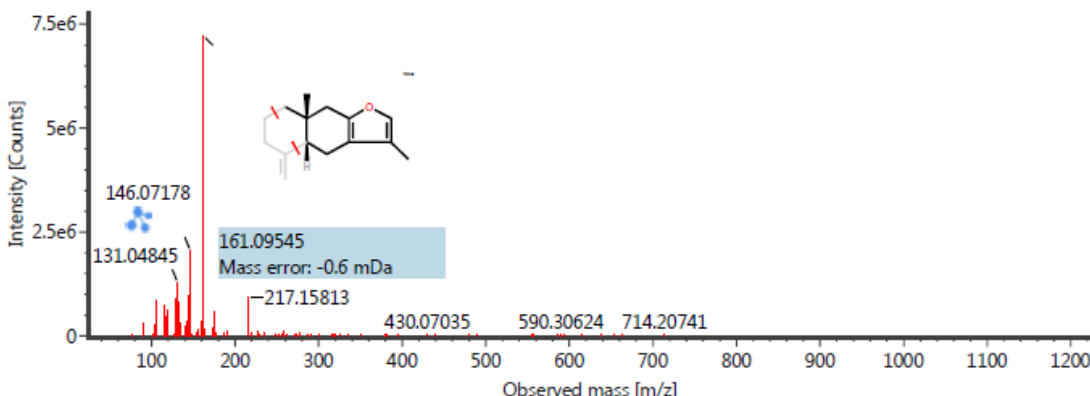
Item description:



Item name: 210317-0589

Channel name: High energy : Time 6.9167 +/- 0.0265 minutes

Item description:

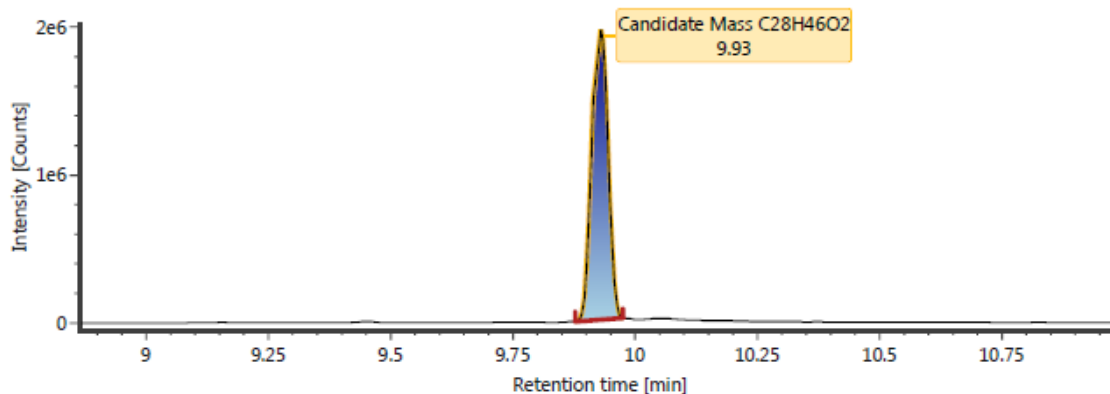


**Component name: Candidate Mass C28H46O2**

Item name: 210317-0589

Channel name: 1: +415.3569 (41.0 PPM) +416.3602 (41.0 PPM) +417.3637 (41.0 PPM) : TOF MS⁺ (50-1200) 6eV ESI+ - Low CE :

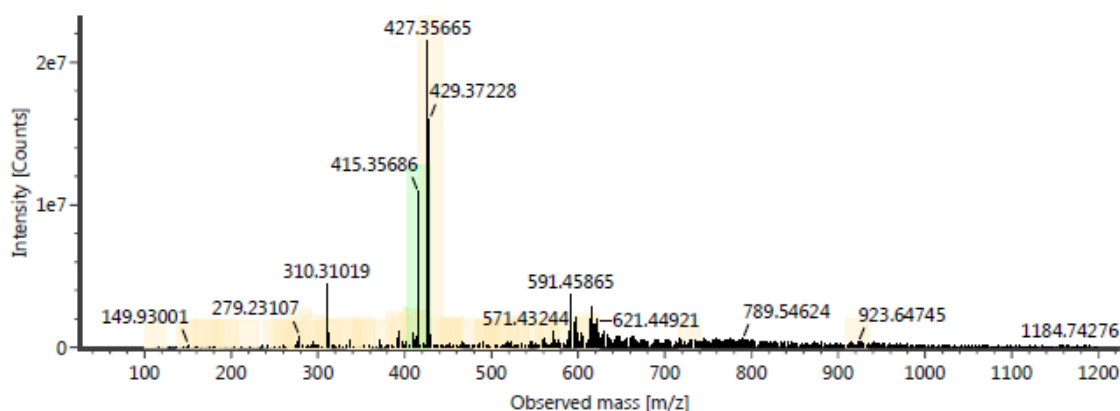
Integrated : Smoothed



Item name: 210317-0589

Item description:

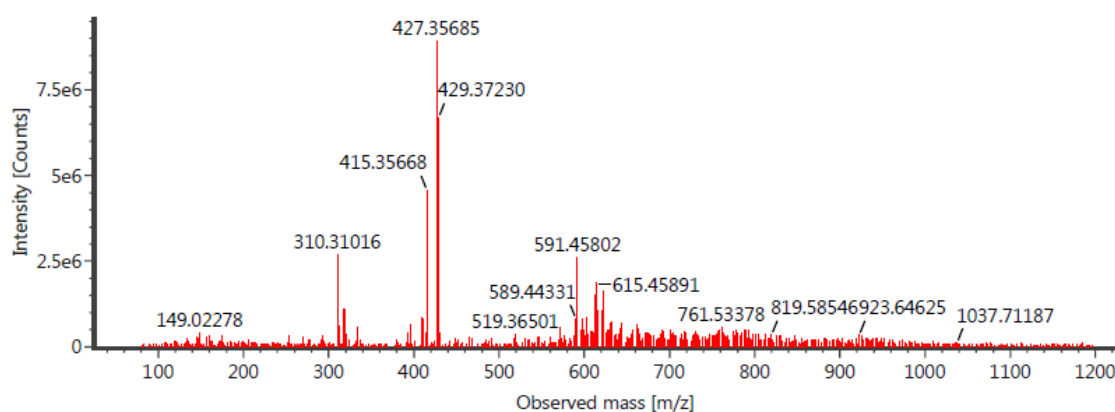
Channel name: Low energy : Time 9.9299 +/- 0.0796 minutes



Item name: 210317-0589

Item description:

Channel name: High energy : Time 9.9299 +/- 0.0796 minut

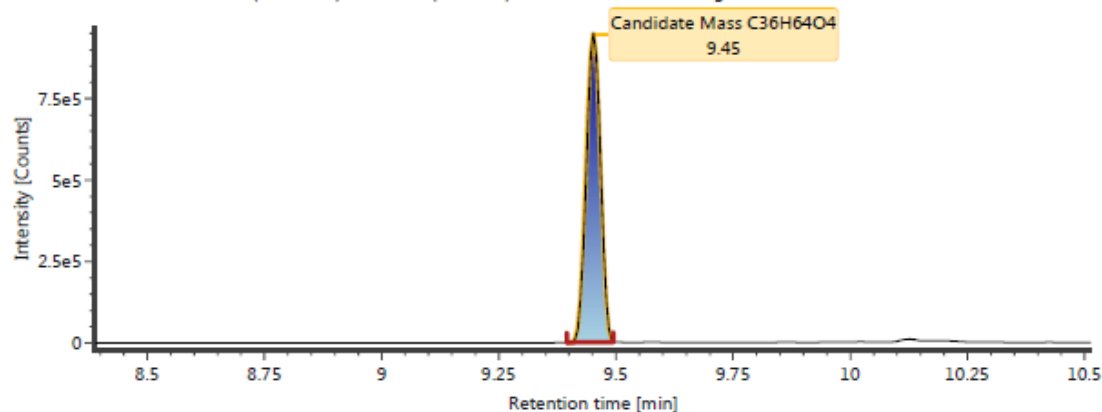




Component name: Candidate Mass C36H64O4

Item name: 210317-0589

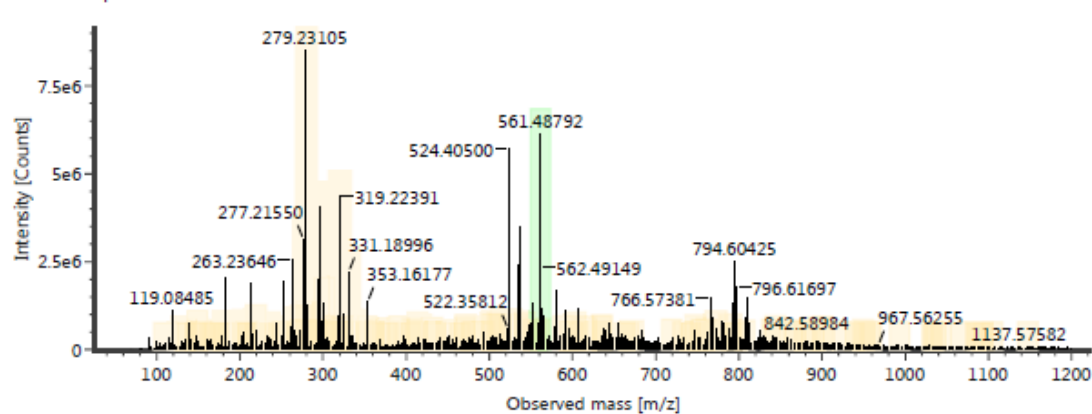
Channel name: 1: +561.4879 (41.0 PPM) : TOF MS² (50-1200) 6eV ESI+ - Low CE : Integrated : Smoothed



Item name: 210317-0589

Channel name: Low energy : Time 9.4529 +/- 0.0796 minutes

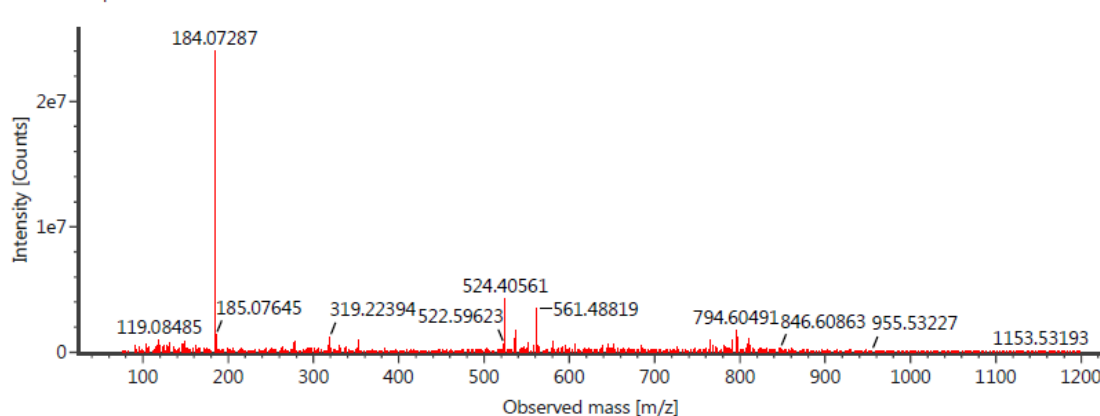
Item description:



Item name: 210317-0589

Channel name: High energy : Time 9.4529 +/- 0.0796 minutes

Item description:

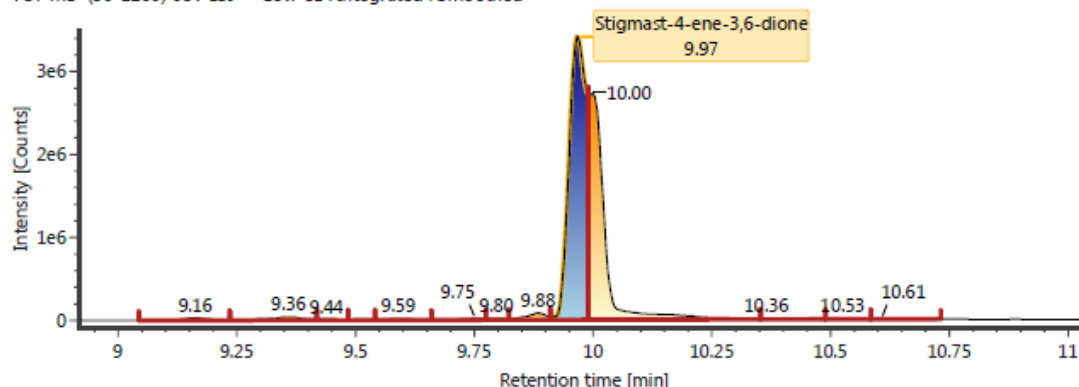




Component name: Stigmast-4-ene-3,6-dione

Item name: 210317-0589

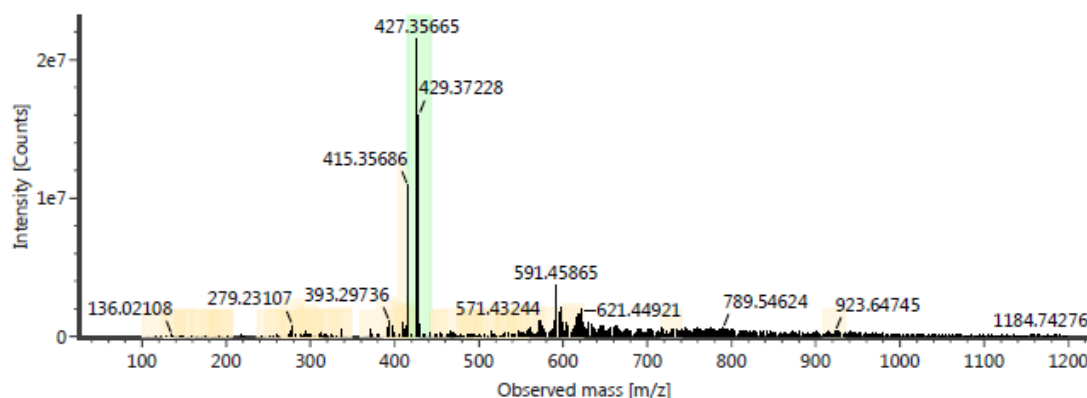
Channel name: 1: +427.3566 (41.0 PPM) +428.3600 (41.0 PPM) +429.3723 (41.0 PPM) +430.3757 (41.0 PPM) +431.3787 (41.0 PPM) :
TOF MS² (50-1200) 6eV ESI+ - Low CE : Integrated : Smoothed



Item name: 210317-0589

Channel name: Low energy : Time 9.9836 +/- 0.0796 minutes

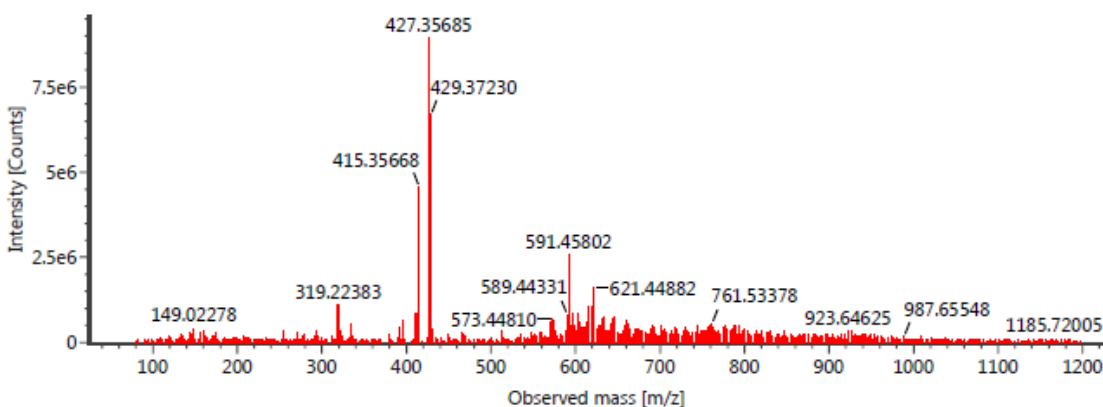
Item description:



Item name: 210317-0589

Channel name: High energy : Time 9.9836 +/- 0.0796 minutes

Item description:

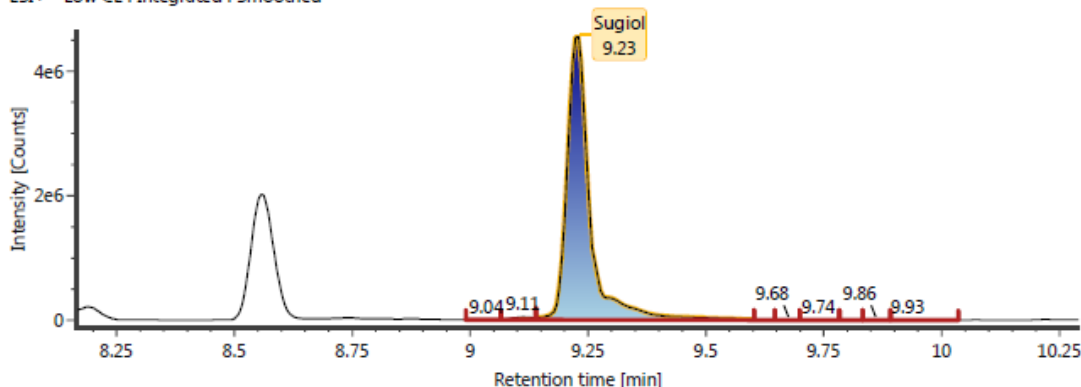




Component name: Sugliol

Item name: 210317-0589

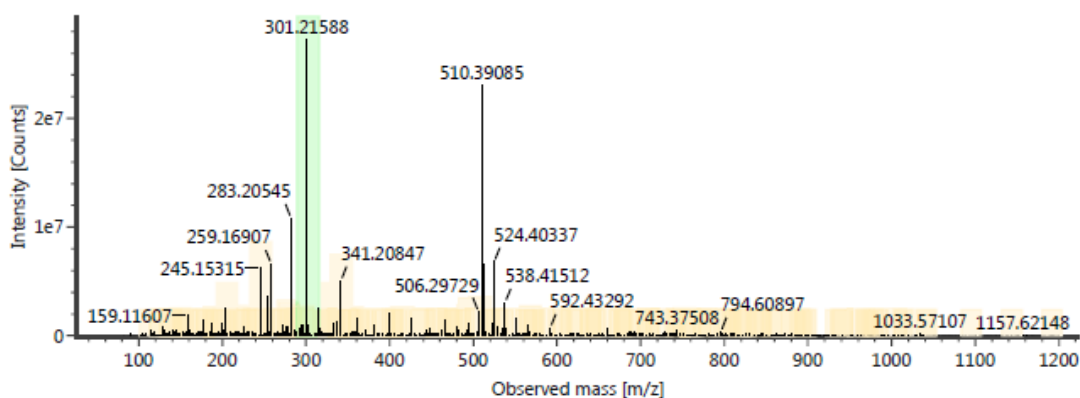
Channel name: 1: +301.2159 (41.0 PPM) +302.2193 (41.0 PPM) +303.2228 (41.0 PPM) +304.2257 (41.0 PPM) : TOF MS⁺ (50-1200) 6eV
ESI+ - Low CE : Integrated : Smoothed



Item name: 210317-0589

Channel name: Low energy : Time 9.2278 +/- 0.0796 minutes

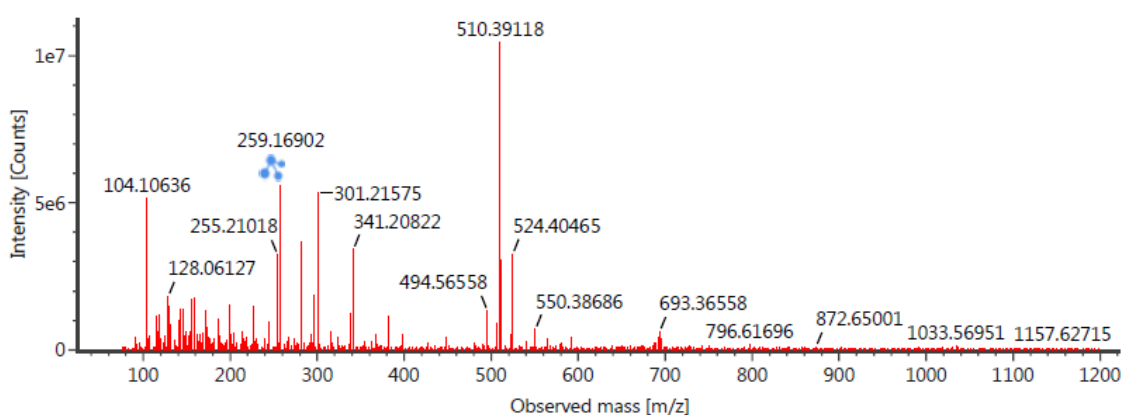
Item description:



Item name: 210317-0589

Channel name: High energy : Time 9.2278 +/- 0.0796 minutes

Item description:





Lampiran 9. Detail instrumen dan sistem running LC-MS/MS

INSTRUMEN & DETAIL RUNNING

Pengaturan Alat

Chromatographic Separation

Column C18

Temperatur: 40°C

Wash solvent: Water:MeOH:ACN:IPA 1:1:1:1

Purge solvent: MeOH:Water 1:9

Mobile phase: A (0.1% FAWA) & B (ACN+0.1FA) (gradient concentration)

Time (min)	Flow rate (mL/min)	Composition A (%)	Composition B (%)
0.00	0.3	95.0	5.0
1.00	0.3	95.0	5.0
8.00	0.3	60.0	40.0
11.00	0.3	0.0	100.0
13.00	0.3	0.0	100.0
16.00	0.3	95.0	5.0

Mass Spectrometry

Spesification: Xevo G2-XS QTOF

System: ESI (electrospray ionization)

Mode: Positive

Mass analysis range: 50-1200 m/z

Source temperature: 120°C

Desolvation temperature: 500°C

Desolvationn gas flow: 100 L/hour

Cone gas flow: 50 L/hour

Collision energy: 6 eV (*low energy*)

Rampt collision energy: 10-40 eV (*high energy*)