

Skrining Fitokimia dan Ekstraksi Senyawa Azadirachtin dari Ampas Biji Mimba

Ananda Pratama Juanda, Ismail*¹, Ikhsan Guswenrivo², Heru Subakti Dwiko Laksono¹

¹Prodi Analisis Kimia, Politeknik AKA Bogor

²Pusat Penelitian Biomaterial, Lembaga Ilmu Pengetahuan Indonesia (LIPI)

*E-mail: ismail.abusyafiq@gmail.com

(Received: 12 Mei 2023; Accepted: 22 Juli 2023; Published: 31 Juli 2023)

Abstrak

Mimba atau juga dikenal sebagai *Azadirachta indica* A. Juss, adalah tanaman yang mengandung zat azadirachtin, yang berfungsi sebagai bioinsektisida. Metode penting untuk memberikan gambaran tentang kelompok senyawa yang terkandung dalam tanaman yang akan diteliti adalah identifikasi senyawa fitokimia. Dengan menggunakan pelarut polar, semi polar, dan nonpolar, penelitian ini bertujuan untuk mengekstraksi senyawa metabolit sekunder, terutama senyawa azadirachtin yang ditemukan pada ampas biji mimba. Penelitian ini juga berfokus pada kemungkinan penggunaan azadirachtin sebagai bioinsektisida sebagai pengganti pestisida sintesis. Fitokimia ampas biji mimba dilihat dari fraksinya. Fraksi n-heksana positif mengandung saponin dan triterpenoid, fraksi etil asetat positif mengandung tanin, alkaloid, flavonoid, saponin, dan steroid, dan fraksi metanol sisa positif mengandung tanin, alkaloid, flavonoid, saponin, dan steroid. Hasil analisis dengan HPLC menunjukkan bahwa ada kandungan azadirachtin sebesar 20,2978 mg/L pada fraksi n-heksana dan 132,6840 mg/L pada fraksi etil asetat.

Kata kunci: biji mimba, fitokimia, azadirachtin, n-heksana, etil asetat

Abstract

Mimba is also known as *Azadirachta indica* A. Juss, is a plant containing the substance azadirachtin, which acts as a bioinsecticide. An important method to give an idea of the group of compounds contained in the plants to be studied is the identification of phytochemical compounds. By using polar, semi-polar, and nonpolar solvents, the study aims to extract the secondary metabolite compounds, the azadirachtin compound found in embryonic seeds. The study also focused on the possibility of using azadirachtin as a bioinsecticide as a substitute for a synthetic pesticide. The phytochemistry of pregnancy seeds is seen from its fraction. The positive n-hexane fraction contains saponins and triterpenoids, the positive ethyl acetate fractions contain tanins, alkaloids, flavonoids, saponines, and steroids, and the residual positive methanol fraction includes tanins, alkaloid, flavonoid, saponin and steroid. The results of HPLC analysis showed an azadirachtin content of 20.2978 mg/l in the n-hexane fraction and 132.6840 mg/L in the ethyl acetate fraction.

Keywords: mimba seed, fitokimia, azadirachtin, n-heksana, ethyl acetate

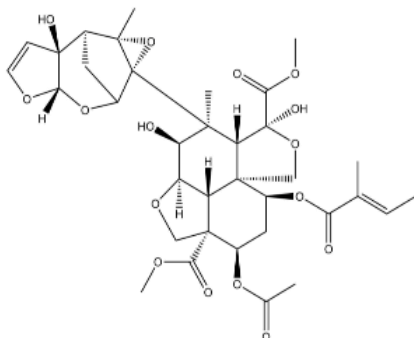
PENDAHULUAN

Mimba (*Azadirachta indica* A. Juss) adalah tanaman yang mengandung senyawa azadirachtin, yang dapat digunakan sebagai bioinsektisida. Tanaman mimba terutama mengandung beberapa komponen dari produksi metabolit sekunder, seperti azadirachtin, salanin, meliantriol, nimbin, dan nimbidin (Sumaryono et al., 2013). Komponen-komponen ini dianggap sangat bermanfaat baik dalam industri pertanian (untuk membuat pestisida dan pupuk) maupun farmasi (untuk membuat kosmetik dan obat-obatan) (Aradilla, 2009).

Salah satu metabolit sekunder tanaman mimba (*Azadirachta indica* A. Juss) adalah

azadirachtin, menurut Samsudin (2013). Metabolit ini termasuk dalam kelompok triterpenoid yang telah digunakan sebagai insektisida nabati, dan telah terbukti memiliki kemampuan untuk mengendalikan lebih dari 300 spesies serangga hama. Azadirachtin berfungsi sebagai zat penolak makan, atau antifeedant, dengan menciptakan stimulan penolak makan tertentu dan menghentikan seseorang dari menganggap ada rangsangan untuk makan. Azadirachtin menghentikan serangga berganti kulit (*ecdysone blocker*), yang menghambat pertumbuhan dan perkembangan serangga. Azadirachtin juga berfungsi sebagai insektisida yang mematikan secara langsung pada beberapa jenis serangga. Serangga yang dimaksud

mungkin mati dalam beberapa hari, tergantung pada siklus hidupnya. Struktur azadirachtin dapat dilihat pada Gambar 1.



Gambar 1 Struktur Azadirachtin

Ekstraksi azadirachtin pada ampas biji mimba menggunakan metode maserasi yaitu dengan perendaman menggunakan pelarut metanol pada suhu kamar. Maserat selanjutnya difraksinasi dengan teknik ekstraksi cair-cair untuk memisahkan senyawa berdasarkan kelompok polaritas. Fraksinasi ini menggunakan berbagai pelarut berdasarkan kepolarannya, diawali dari pelarut dengan kepolaran yang rendah yang dilanjutkan dengan kepolaran yang lebih tinggi.

Metode penting untuk memberikan gambaran tentang kelompok senyawa yang terkandung dalam tanaman yang akan diteliti adalah identifikasi senyawa fitokimia. Skrining fitokimia dilakukan dengan menggunakan pereaksi untuk mengamati reaksi pengujian warna dan endapan (Palupi et al., 2016). Identifikasi golongan senyawa yang terkandung pada ampas biji mimba meliputi alkaloid, flavonoid, saponin, triterpenoid, steroid, dan tanin.

Penelitian ini dimaksudkan untuk mengekstraksi senyawa metabolit sekunder terutama senyawa azadirachtin yang terkandung pada ampas biji mimba menggunakan pelarut polar, semi polar, dan nonpolar. Penelitian ini berfokus pada kemungkinan pemanfaatan azadirachtin sebagai bioinsektisida pengganti pestisida sintetis.

BAHAN DAN METODE

Bahan-bahan yang digunakan dalam percobaan ini meliputi bahan uji dan bahan kimia. Bahan uji yang digunakan adalah ampas biji mimba didapatkan dari gudang kompos LIPI. Bahan kimia yang digunakan untuk ekstraksi adalah metanol (CH₃OH) merek Merck, heksana (C₆H₁₄) merek Merck, dan etil asetat (CH₃CH₂OC(O)CH₃) merek Merck. Pada percobaan fitokimia bahan-bahan kimia yang digunakan meliputi: asam sulfat (H₂SO₄) pekat, asam sulfat (H₂SO₄) 2N, kloroform (CHCl₃), amoniak (NH₄OH), pereaksi Dragendorff, etanol (C₂H₅OH), serbuk logam Mg, asam klorida (HCl) pekat, natrium hidroksida (NaOH) 10%, asam asetat (CH₃COOH) glasial, metanol (CH₃OH), dan larutan besi klorida

(FeCl₃). Peralatan yang digunakan meliputi alat uji dan alat pendukung. Alat uji yang digunakan adalah *High Performance Liquid Chromatography Photo Iode Array* (HPLC-PDA) kolom Zorbax Eclipse Plus Agilent C18. Alat pendukung yang digunakan meliputi *rotary evaporator* BUCHI R-300, oven, neraca analitik Shimadzu AP225WD, cawan porselen, corong pemisah, vacuum, corong Buchner, tabung reaksi, mikropipet 1 mL, mikropipet 5 mL, pipet tetes, pipet volumetri, pipet Mohr, kertas saring, filter membran 0,45 µm erlenmeyer, spatula, desikator, gelas piala, dan gelas ukur.

Penentuan Kadar Air

Kadar air ampas biji mimba ditentukan dengan metode gravimetri. Cawan porselen kosong dipanaskan dalam oven pada suhu 105°C selama 30 menit, didinginkan dalam desikator selama 15 menit, lalu ditimbang (W₀). Ampas biji mimba sebanyak 3 gram dimasukkan pada cawan porselen, ditimbang (W₁), lalu dikeringkan dalam oven pada suhu 105°C selama 24 jam. Didinginkan dalam desikator selama 30 menit, kemudian cawan porselen dan ampas biji mimba ditimbang (W₂). Kadar air dihitung berdasarkan rumus:

$$\% \text{kadar air} = \frac{(w_1 - w_0) - (w_2 - w_0)}{w_1 - w_0} \quad (1)$$

Keterangan:

w₀: berat cawan porselen kosong

w₁: berat cawan porselen + ampas biji mimba (sebelum pemanasan)

w₂: berat cawan porselen + ampas biji mimba (setelah pendinginan)

Ekstraksi Minyak Ampas Biji Mimba dengan Pelarut Metanol

Ampas biji mimba sebanyak 1000 gram ditambahkan pelarut metanol (polar) hingga terendam, direndam selama 24 jam, kemudian disaring. Tahap tersebut diulang sebanyak empat kali dengan perendaman kembali residu menggunakan pelarut metanol baru. Maserat digabung dan dipekatkan dengan *vacuum rotary evaporator* BUCHI R-300. Rendemen ditentukan dengan rumus:

$$\% \text{rendemen} = \frac{\text{berat ekstrak}}{\text{berat sampel} - (\text{berat sampel} \times \text{kadar air})} \times 100\% \quad (2)$$

Fraksinasi Minyak Ampas Biji Mimba dengan Pelarut N-heksana

Ekstrak metanol sebanyak 90 mL dicampur dengan n-heksana (non-polar) dengan perbandingan 1:1, dikocok dalam corong pemisah, dan didiamkan hingga terbentuk dua fasa. Fasa n-heksana dipisahkan dari fasa metanol. Fraksinasi diulang sebanyak tujuh kali hingga fasa n-heksana jernih. Hasil fraksinasi digabung dan disaring dengan kertas saring *whatman No 42*. Filtrat dipekatkan dengan *vacuum rotary evaporator* BUCHI R-300.

Fraksinasi Minyak Ampas Biji Mimba dengan Pelarut Etil Asetat

Dalam corong pemisah, ekstrak metanol sisa dari fraksinasi n-heksana sebanyak 55 mililiter dicampur dengan etil asetat (semi polar) dengan perbandingan 1:1 dan didiamkan hingga terbentuk dua fasa. Fasa etil asetat selanjutnya dipisahkan dari fasa metanol. Fraksinasi diulang sebanyak 12 kali hingga fasa etil asetat jernih. Hasil fraksinasi digabung dan disaring dengan kertas saring *whatman No 42*. Filtrat dipekatkan dengan *vacuum rotary evaporator BUCHI R-300*.

Skrining Fitokimia

Pemeriksaan Alkaloid

2 mL kloroform dan 2 mL amoniak dicampur dengan masing-masing fraksi, kemudian dipanaskan, dikocok, dan disaring. Lima tetes asam sulfat 2N ditambahkan ke filtrat dan kemudian dikocok dan didiamkan. Lima tetes pereaksi Dragendorff ditambahkan ke bagian atas masing-masing filtrat. Adanya alkaloid menunjukkan terbentuknya endapan jingga.

Pemeriksaan Flavonoid

2 mL fraksi masing-masing dicampur dengan 2 mL etanol. Kemudian dicampur, dipanaskan, dan dikocok lagi. Selanjutnya, pada masing-masing filtrat ditambahkan serbuk Mg 0,2 g dan tiga tetes asam klorida pekat. Adanya flavonoid menunjukkan bahwa ada warna jingga atau merah.

Pemeriksaan Saponin

2 mL fraksi natrium hidrosida 10% ditambahkan dan dididihkan dengan 20 mL air dalam penangas air. Dianalisis dan diamati perubahan. Adanya saponin menunjukkan terbentuknya busa yang stabil.

Pemeriksaan Steroid

2 mL fraksi masing-masing dicampur dengan 2 mL kloroform, kemudian 10 tetes asam asetat glasial dan 3 tetes asam sulfat pekat. Perubahan diamati. Jika warnanya berubah menjadi biru atau hijau, hal itu berarti terdapat steroid didalamnya.

Pemeriksaan Triterpenoid

2 mL fraksi masing-masing dicampur dengan 2 mL kloroform dan 2 mL asam sulfat pekat. Perubahan diamati. Adanya triterpenoid menunjukkan warna merah kecokelatan pada permukaan.

Pemeriksaan Tanin

Untuk masing-masing fraksi 2 mL, 1 mL metanol dan beberapa tetes feriklorida 1% ditambahkan. Dikocok dan diamati perubahannya. Adanya tanin menunjukkan terbentuknya warna coklat kehijauan.

Analisis dengan *High Performance Liquid Chromatography*

Preparasi Standar Azadirachtin 500 mg/L

Standar azadirachtin 0,005 gram ditimbang dan dilarutkan dengan 10 mL metanol.

Preparasi Sampel Azadirachtin

Masing-masing fraksi sebanyak 5 mL disaring dengan filter membran ukuran 0,45 µm dan diambil filtratnya untuk diuji.

Pengujian

Masing-masing sampel dan standar azadirachtin diinjeksikan sebanyak 10 µL ke dalam *High Performance Liquid Chromatography Photo Diode Array* (HPLC- PDA). Pengkondisian alat HPLC-PDA ditunjukkan pada Tabel 1.

Tabel 1. Pengkondisian HPLC-PDA

Kondisi	Keterangan
Merk	Shimadzu
Volume injeksi	10 µL
Kolom	ZORBAX Eclipse 4 C18 (4,6 mm ×150 mm, <i>particle size</i> 5 µm)
Suhu kolom	40°C
Detector	λ214 nm
Laju alir	1 mL/menit
Waktu akhir	30 menit
Fase gerak	asetonitril/air (40:60)

Untuk mengetahui konsentrasi larutan sampel, luas area sampel dibandingkan dengan luas area standar.

Perhitungan kadar azadirachtin sebagai berikut:

$$C_x = \frac{\text{luas area sampel}}{\text{luas area standar}} \times C_s \quad (3)$$

keterangan:

C_x : konsentrasi sampel

C_s : konsentrasi standar (mg/L)

HASIL DAN PEMBAHASAN

Penentuan Kadar Air

Kadar air yang diperoleh adalah sebesar 9,20%. Nilai kadar air ini digunakan sebagai faktor koreksi berat sampel ampas biji mimba untuk menentukan rendemen. Menurut Mailuhu et al. (2017), kandungan air pada biji mimba harus rendah, setidaknya 10%, karena hal itu dapat menyebabkan peluang hidup mikroorganisme yang tinggi, yang berdampak pada kandungan kimia dalam sampel. Kadar air dalam ampas biji mimba juga mempengaruhi aktivitas mikroba dan ketahanan

penyimpanan, sedangkan kadar air yang rendah akan menyebabkan penyimpanan tidak bertahan lama.

Ekstraksi Pelarut Metanol

Menurut Jannah et al. (2020), metode maserasi dilakukan dengan merendam ampas sampel dengan pelarut organik. Perbedaan tekanan di dalam dan di luar sel memicu pemecahan membran dan dinding sel. Akibatnya, metabolit sekunder di dalam sampel akan terlarut dengan pelarut organik. Sebagai pelarut universal, metanol dapat melarutkan analit polar dan non polar, menurut Astrina et al. (2013). Alkaloid, triterpenoid, steroid, saponin, dan flavonoid dapat diambil dari tanaman oleh metanol. Menurut Romadanu et al. (2014), tingginya rendemen pelarut metanol menunjukkan bahwa pelarut tersebut memiliki kemampuan untuk mengekstrak lebih banyak bahan bioaktif dengan sifat kepolaran yang lebih tinggi.



Gambar 2 Ekstrak Metanol

Ampas biji mimba di maserasi dengan metanol 4 × 24 jam untuk mengekstrak senyawa metabolit sekunder terutama senyawa azadirachtin yang termasuk golongan triterpenoid. Maserat dipekatkan untuk mengurangi pelarut metanol dari maserat. Berdasarkan perhitungan diperoleh 138,9462-gram pasta berwarna cokelat ekstrak metanol dengan rendemen 15,30%, seperti yang ditunjukkan pada Gambar 2. Hasil rendemen dapat dilihat pada Tabel 2.

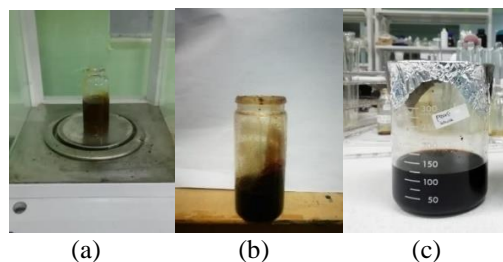
Tabel 2. Hasil Rendemen Ekstrak Metanol, Fraksi N-heksana, Etil Asetat, dan Metanol Sisa

Nama	Berat (gram)	Rendemen (%)
Ekstrak metanol	138,9462	15,30
Fraksi n-heksana	40,5640	4,47
Fraksi etil asetat	44,4409	4,89
Fraksi metanol sisa	20,2043	2,22

Fraksinasi

Pelarut non polar n-heksana dapat mengekstrak lilin, lipid, minyak, dan senyawa kimia lainnya yang mudah menguap (Putri et al., 2015). Menurut Artini et al. (2013), etil asetat, senyawa semi polar dengan rumus $\text{CH}_3\text{CH}_2\text{OC}(\text{O})\text{CH}_3$, memiliki kemampuan untuk menarik analit-analit baik polar maupun nonpolar.

Penyaringan pada fraksi n-heksana dan etil asetat untuk memisahkan padatanhalus yang terbawa saat pemisahan masing-masing fasa dari fasa metanol setelah proses fraksinasi. Ekstrak metanol sisa hasil fraksinasi n-heksana didapatkan ± 57 mL namun digunakan sebanyak 55 mL untuk difraksinasi oleh etil asetat. Fraksi n-heksana yang dapat dilihat pada Gambar 3(a) diperoleh berupa pasta berwarna kuning kecokelatan seberat 40,5640 gram dengan rendemen sebesar 4,47%. Fraksi etil asetat yang dapat dilihat pada Gambar 3(b) diperoleh berupa cairan kental berwarna cokelat kehitaman seberat 44,4409 gram dengan rendemen sebesar 4,89%. Fraksi metanol sisa yang dapat dilihat pada Gambar 3(c) diperoleh berupa cairan residu berwarna cokelat kehitaman seberat 20,2043 gram dengan rendemen sebesar 2,22%. Fraksinasi berulang pelarut n-heksana dan etil asetat menghasilkan fraksi metanol sisa yang kecil, yang ditunjukkan dalam Tabel 2.



Gambar 3. (a) Fraksi N-heksana, (b) Fraksi Etil Asetat, (c) Fraksi Metanol Sisa

Skrining Fitokimia

Aminah et al., (2001) menyatakan bahwa uji fitokimia dilakukan terhadap bahan alkaloid, flavonoid, saponin, tanin, dan fenol yang ditemukan pada mimba. Untuk memastikan bahwa senyawa tersebut ada di ekstrak yang diperoleh, pengujian warna diperlukan untuk mengidentifikasi senyawa tersebut. Metode skrining fitokimia pada ampas biji mimba didasarkan pada jurnal penelitian sebelumnya dengan penyesuaian (Palupi et al., 2016). Tabel 3 menunjukkan hasil skrining fitokimia.

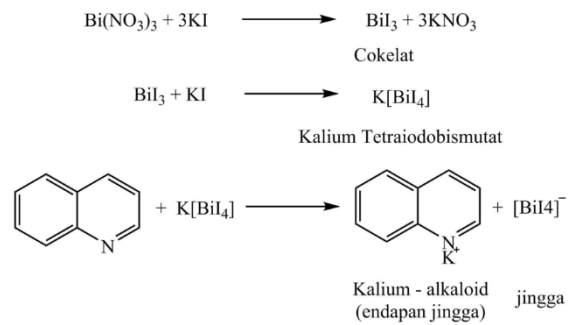
Tabel 3. Hasil Skrining Fitokimia Fraksi N-heksana, Etil Asetat, dan Metanol Sisa

Golongan Senyawa	Hasil Pengamatan			Acuan Hasil Positif
	Fraksi N-heksana	Fraksi EtilAsetat	Fraksi Metanol Sisa	
Alkaloid	(-) Tidak ada endapan	(+) Endapan jingga	(+) Endapan jingga	Endapan jingga
Flavonoid	(-) Tidak ada perubahan warna	(+) Larutan jingga	(+) Larutan jingga kecokelatan	Jingga atau merah
Saponin	(+) Adanya busa stabil	(+) Adanya busa stabil	(+) Adanya busa stabil	Adanya busa stabil
Steroid	(-) Larutan merah kecokelatan	(-) Larutan merah kecokelatan	(+) Cincin biru kehijauan	Warna biru atau hijau
Triterpenoid	(+) Merah kecokelatan	(+) Merah kecokelatan	(-) Tidak ada perubahan warna	Merah kecokelatan pada antar permukaan
Tanin	(-) Larutan coklat muda	(+) Larutan coklat kehijauan	(+) Larutan coklat kehijauan	Cokelat kehijauan

Pemeriksaan Alkaloid

Reaksi pengendapan yang terjadi akibat penggantian ligan adalah inti dari pendekatan analisis ini. Atom nitrogen dengan pasangan elektron bebas pada alkaloid dapat berfungsi sebagai pengganti ion iodo dalam pereaksi-pereaksi. Dalam larutan asam asetat glasial, reaksi Dragendorff mengandung kalium iodida dan bismut nitrat (Ergina et al., 2014).

Penambahan amoniak yaitu membantu melarutkan sampel yang terekstraksi dalam kloroform. Penambahan asam sulfat 2N untuk meningkatkan kelarutan alkaloid. Setelah itu, masing-masing fraksi ditambahkan pereaksi spesifik alkaloid yaitu reagen Dragendorff. Berdasarkan hasil percobaan yang dapat dilihat pada Tabel 3 fraksi etil asetat dan metanol sisa positif mengandung senyawa alkaloid dengan terbentuknya endapan jingga, sedangkan fraksi n-heksana tidak terbentuk endapan jingga menunjukkan hasil negatif. Endapan jingga terbentuk karena nitrogen membentuk ikatan kovalen koordinat dengan ion K^+ membentuk kalium alkaloid. Reaksi alkaloid dapat dilihat pada Gambar 4 berikut:



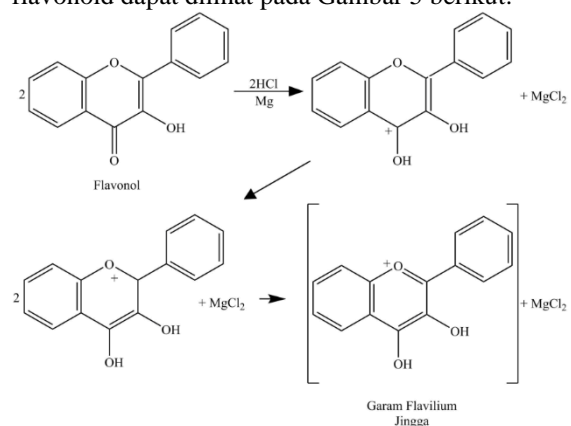
Gambar 4 Reaksi Alkaloid

Pada tumbuh-tumbuhan, alkaloid biasanya dalam bentuk garam, sehingga hanya dapat larut dalam pelarut organik seperti kloroform, etil asetat, aseton, benzena, alkohol, etanol, dan metanol. Namun, alkaloid sulit larut dalam air (Romadanu et al., 2014).

Pemeriksaan Flavonoid

Ergina et al., (2014) menyatakan bahwa flavonoid adalah senyawa dengan dua cincin aromatik dengan gugus hidroksil lebih dari satu. Senyawa fenol dengan gugus hidroksil semakin banyak memiliki tingkat kelarutan dalam air yang lebih tinggi atau bersifat polar, sehingga dapat diekstrak dalam pelarut polar. Tanaya et al., (2015) menyatakan bahwa pelarut etil asetat adalah pelarut yang digunakan untuk mengekstrak senyawa dengan polaritas menengah seperti flavonoid dalam bentuk O-glikosida.

Pada percobaan ini masing-masing fraksi ditambahkan etanol dan pemanasan untuk melarutkan senyawa flavonoid. Berdasarkan hasil percobaan yang dapat dilihat pada Tabel 3 fraksi metanol sisa menghasilkan larutan jingga kecokelatan sedangkan fraksi etil asetat menghasilkan larutan jingga yang menandakan mengandung senyawa golongan flavonoid. Ergina et al., (2014) menyatakan bahwa tujuan penambahan logam Mg dan HCl adalah untuk mengurangi inti benzopiron yang terdapat dalam struktur flavonoid, sehingga terbentuk garam flavilium berwarna jingga atau merah. Reaksi flavonoid dapat dilihat pada Gambar 5 berikut:

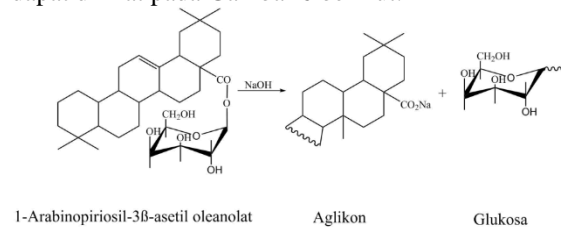


Gambar 5 Reaksi Flavonoid

Pemeriksaan Saponin

Menurut Agustina *et al.*, (2017) uji saponin menghasilkan busa karena glikosida yang memiliki gugus hidrofob, yaitu aglikon (steroid atau triterpenoid), terhidrolisis menjadi glukosa dan senyawa lainnya. Karena metode ini mudah dilakukan, cepat, dan tidak memerlukan peralatan atau bahan yang rumit, metode identifikasi dengan pengocokan dan melihat terbentuknya busa stabil digunakan.

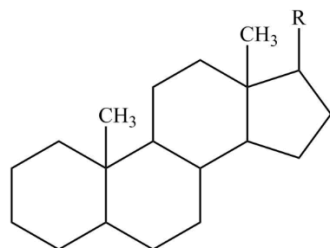
Hasil percobaan menunjukkan bahwa fraksi n-heksana, etil asetat, dan metanol sisa berkontribusi pada pembentukan busa yang stabil; fraksi metanol sisa menghasilkan banyak busa, dan fraksi n-heksana dan etil asetat menghasilkan sedikit busa pada permukaan larutan, seperti yang ditunjukkan dalam Tabel 3. Penambahan natrium hidroksida untuk menghidrolisis glikosida menjadi aglikon dan glukosa menggunakan basa kuat. Reaksi saponin dapat dilihat pada Gambar 6 berikut:



Gambar 6 Reaksi Saponin

Pengujian Steroid

Sari *et al.*, (2017) menyatakan bahwa senyawa steroid dapat memberikan warna hijau biru melalui reaksi dengan asam sulfat pekat dalam pelarut asam asetat anhidrat. Sifat non polar steroid disebabkan oleh isopren-isopren rantai panjang hidrokarbon. Menurut Robinson (1995) dan Sholikhah (2016), beberapa senyawa steroid mengandung gugus -OH yang dikenal sebagai sterol, yang menyebabkan sifatnya lebih polar. Steroid alkohol dan sterol adalah beberapa turunan steroid penting. Fitosterol adalah steroid dalam jaringan tumbuhan, sedangkan kolesterol adalah steroid dalam jaringan hewan. Gambar struktur steroid ditunjukkan pada Gambar 7 berikut:



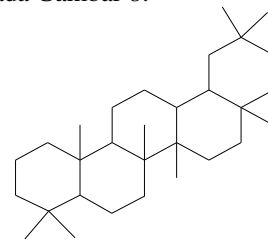
Gambar 7 Struktur Steroid

Menurut hasil percobaan pada Tabel 3, fraksi metanol sisa membentuk cincin biru kehijauan pada permukaan larutan, menunjukkan bahwa larutan mengandung senyawa steroid. Sebaliknya, n-heksana dan etil asetat menunjukkan hasil negatif karena tidak menghasilkan warna hijau atau biru. Membentuk

turunan asetil dicapai melalui penggunaan asam asetat glasial sebagai pengganti asam asetat anhidrat. Jumlah air pada asam asetat glasial memengaruhi proses asetilasi; jika ada air yang tinggi, reaksi tidak dapat terjadi. Untuk dehidrogenasi air, asam sulfat pekat ditambahkan. Reaksinya dengan turunan asetil memberikan warna biru atau hijau.

Pemeriksaan Triterpenoid

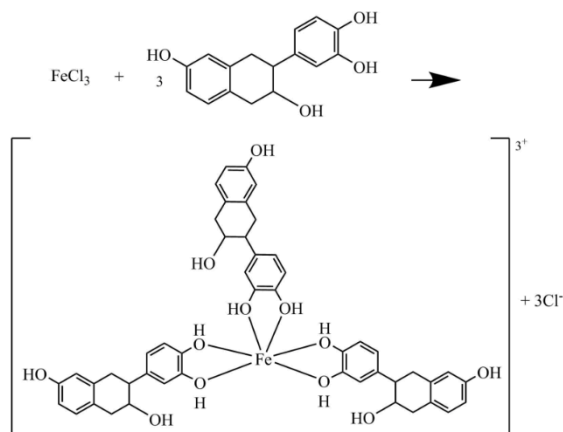
Sifat non polar dan polar dimiliki oleh triterpenoid karena rantai panjang hidrokarbon C30 membuatnya non polar dan memiliki gugus hidroksil yang membuatnya polar (Jannah *et al.*, 2020). Dibandingkan dengan fraksi n-heksana, etil asetat dan fraksi n-heksana menghasilkan warna merah kecokelatan yang menunjukkan bahwa mereka mengandung senyawa triterpenoid, sedangkan fraksi metanol sisa menghasilkan larutan dua fasa dan tidak menghasilkan warna merah kecokelatan. Robinson (1995) dalam Supriyanto (2017) menyatakan bahwa penambahan pereaksi asam klorosulfonat atau pereaksi Brieskorn dan Briner, yang sering digunakan untuk membedakan secara khusus triterpenoid berwarna merah, menyebabkan daerah antarmuka berwarna merah kecokelatan. Struktur triterpenoid ditunjukkan pada Gambar 8:



Gambar 8 Struktur Triterpenoid

Pemeriksaan Tanin

Dengan menggunakan feriklorida, uji fitokimia dilakukan untuk mengetahui apakah sampel mengandung gugus fenol. Setelah ditambahkan dengan FeCl₃, gugus fenol ditunjukkan dengan warna hijau hitam atau biru tua (Ergina *et al.*, 2014). Karena banyaknya gugus -OH pada senyawa tanin yang menyebabkan sifatnya polar, metanol berfungsi untuk melarutkan senyawa tanin dalam pelarut metanol. Karena terbentuknya senyawa kompleks antara tanin dan Fe³⁺, yang menunjukkan perubahan warna hijau, fraksi etil asetat dan metanol sisa menghasilkan warna cokelat kehijauan, menurut hasil eksperimen, yang dapat dilihat pada Tabel 3. Reaksi tanin dapat dilihat pada Gambar 9 berikut.



Gambar 9 Reaksi Tanin

Golongan polifenol yang disebut tanin memiliki sifat polar dan dapat larut dalam pelarut polar (Romadanu *et al.*, 2014). Uji tanin menunjukkan bahwa fraksi etil asetat menghasilkan senyawa kompleks berwarna hijau kehitaman, ungu, biru, atau hitam. Perubahan warna ini disebabkan oleh ikatan koordinasi antara ion Fe³⁺ dengan atom O dari gugus -OH senyawa tanin, yang melepaskan atom H (Tanaya *et al.*, 2015).

Analisis High Performance Liquid Chromatography

Analisis HPLC-PDA menggunakan pengukuran azadirachtin yang dimodifikasi. Kolom Zorbax Eclipse Plus Agilent C18 (250 mm x 4,6 mm, 5 µm) digunakan untuk kromatografi fase terbalik isokratik menggunakan asetonitril/air (40:60), aliran 1,0 mL/menit, dan deteksi pada 214 nm (PAULA *et al.*, 2015). Dengan menggunakan standar azadirachtin 500 mg/L dalam metanol, kandungan azadirachtin dinilai (PRIANTO *et al.*, 2019).

Tabel 4. Hasil Analisis Senyawa Azadirachtin High Performance Liquid Chromatography

Nama	Waktu Retensi (menit)	Luas Area	Kadar (mg/L)
Standar Azadirachtin	5,559	497690	500
Fraksi metanol sisa	Tidak ada	Tidak ada	Tidak ada
Fraksi n-heksana	5,738	20204	20,2978
Fraksi etil asetat	5,615	132071	132,6840

Kadar azadirachtin dapat dihitung menggunakan HPLC dengan melihat kesamaan waktu retensi masing-masing fraksi dengan standar azadirachtin. Ini dilakukan dengan membandingkan luas area sampel dengan luas area standar. Karena perbedaan suhu kolom dan kolom, waktu retensi dari acuan

dengan penelitian yang dilakukan berbeda. Senyawa azadirachtin keluar lebih cepat ketika suhu kolom analisis adalah 40°C. Hasil analisis kadar azadirachtin dapat dilihat pada Tabel 4.

Analisis kuantitatif HPLC menunjukkan bahwa kadar azadirachtin pada fraksi n-heksana adalah 20,2978 mg/L dan fraksi etil asetat adalah 132,6840 mg/L. Karena fraksi n-heksana dan fraksi etil asetat telah terekstrak sempurna, fraksi metanol sisa tidak menunjukkan adanya senyawa azadirachtin. Namun, senyawa azadirachtin memiliki gugus -OH yang memungkinkannya untuk ditarik dari etil asetat.

SIMPULAN

Fitokimia ampas biji mimba dilihat dari fraksinya. Fraksi n-heksana positif mengandung saponin dan triterpenoid, fraksi etil asetat positif mengandung tanin, alkaloid, flavonoid, saponin, dan steroid, dan fraksi metanol sisa positif mengandung tanin, alkaloid, flavonoid, saponin, dan steroid. Hasil analisis dengan HPLC menunjukkan bahwa ada kandungan azadirachtin sebesar 20,2978 mg/L pada fraksi n-heksana dan 132,6840 mg/L pada fraksi etil asetat.

DAFTAR PUSTAKA

- Agustina, W., Nurhamidah & D. Handayani. 2017. Skrining fitokimia dan Aktivitas Antioksidan Beberapa Fraksi dari Kulit Batang Jarak (*Ricinus communis* L.). *Jurnal Pendidikan dan Ilmu Kimia*. 1(2):117-122.
- Aminah. 2001. S. Lerak, D Metel dan E. Prostata Sebagai Larvasida *Aedes aegypti*. *Cermin Dunia Kedokteran* No.131. Jakarta: Grup PT Kalbe Farma.
- Aradilla, A. 2009. Uji Efektivitas Larvasida Ekstrak Ethanol Daun Mimba (*Azadirachta Indica*) Terhadap Larva *Aedes Aegypti*. *Skrpsi. Universitas Diponegoro*. Semarang.
- Artini, P. E. U. D., Astuti, K. W & Warditiani, N. K. 2013. Uji Fitokimia Ekstrak Etil Asetat Rimpang Bangle (*Zingiber purpureum* Roxb.). *Jurnal Udayana*. 1-7.
- Astarina, N. W. G., Astuti, K. W & Warditiani, N. K. 2013. Skrining Fitokimia Ekstrak Metanol Rimpang Bangle (*Zingiber purpureum* Roxb.). *Jurnal Farmasi Udayana*. 1-7.
- Ergina, Siti. N., & Indarini D. P. 2014. Uji Kualitatif Senyawa Metabolit Sekunder Pada Daun Palado (*Agave angustifolia*) yang Diekstraksi dengan Pelarut Air dan Etanol. *J. Akad. Kim.* 3:165-172.
- Jannah, N., C. Saleh & D. R. Pratiwi. 2020. Skrining Fitokimia Ekstrak Etanol dan Fraksi-Fraksi Daun Alamanda (*Allamanda Catharica* L.). hlm. 81-85. *Prosiding Seminar Nasional Kimia Berwawasan Lingkungan 2020*. Jakarta.
- Javandira, C., K. Widnyana & G. A. Suryadarmawan.

2016. Kajian Fitokimia dan Potensi Ekstrak Daun Tanaman Mimba (*Azadirachta indica* A. Juss) Sebagai Pestisida Nabati. Seminar Nasional 2016. 402-406.
- Mailuhu, M., M. R. J. Runtuwene & H. S. J. Koleangan. Skrining Fitokimia dan Aktivitas Antioksidan Ekstrak Metanol Kulit Batang Soyogik (*Saurauia bracteosa* DC). *Chem. Prog.* 1(10):1-6.
- Palupi, D., E. Kusdiyantini., R. Rahadian., A. H. Prianto. 2016. Identifikasi Kandungan Senyawa Fitokimia Minyak Biji Mimba (*Azadirachta Indica*, A. Juss). *Jurnal Biologi.* 5:23-28.
- Paula, J.A.M., L. F. Brito., K. L. F. N. Caetano., M. C. M. Rodrigues., L. L. Borges & E. C. Conceicao. 2016. Ultrasound-assisted Extaction of Azadirachtin from Dried Entire Fruits of *Azadirachtin Indica* A. Juss. (*Meliaceae*) and its Determination by a Validated HPLC-PDA Method. 149:77-84. *Talanta*.doi: 10.1016/j.talanta.2015.11.005. [diakses tanggal 2 Juli 2021 pukul 20.58 WIB].
- Prianto, A. H., Budiawan., Y. Yulizar & P. Simanjuntak. 2019. Pengaruh Sinergi Azadirachtin dan Komponen Minor Dalam Minyak Biji Mimba Terhadap Aktivitas Antifeedant Spodoptera Litura. *Buletin Penelitian Tanaman Rempah dan Obat.* 30:27-38.
- Putri, H. L., R. Retnowati & Suratmo. 2015. Fraksi N-heksana dari Ekstrak Metanol Daun Mangga Kasturi (*Mangifera Casturi* Koesterm) Dan Uji Fitokimia. *Kimia Student Journal.* 1(1):772-777.
- Robinson, Trevor. 1995. Kandungan Organik Tumbuhan Tinggi. Institut Teknologi Bandung. Bandung.
- Romadanu, S. H. Rachmawati & S. D. Lestari. 2014. Pengujian Aktivitas Antioksidan Ekstrak Bunga Lotus (*Nelumbo Nucifera*). *Fishtech.* 3:1-7.
- Samsudin. 2013. Biosintesa Dan Cara Kerja Azadirachtin Sebagai Bahan Aktif Insektisida Nabati. <https://balittro.litbang.pertanian.go.id/?p=631> [diakses tanggal 18 Juni 2021 pukul 03:06 WIB].
- Sari, I & R. Nursanty. 2017. Skrining Fitokimia dan Uji Aktivitas Antibakteri Ekstrak N-heksana dan Metanol dari Daun Tutup Bumi (*Elephantopus scaber*) Terhadap Pertumbuhan Bakteri Methicillin Resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA), hlm 397-402. Di dalam Pendidikan Sains Islami dalam Konteks Pengaplikasian Etnobiologi untuk Mewujudkan Generasi Berkarakter. Prosiding Seminar Nasional Biotik 2017. Program Studi Pendidikan Biologi Fakultas Tarbiyah dan Keguruan UIN Ar-Raniry.
- Sholikhah, R. M. 2016. Identifikasi Senyawa Triterpenoid dari Fraksi N- Heksana Ekstrak Rumput Bambu (*Lophatherum gracile* Brongn.) dengan Metode UPLC-MS. Skripsi. Universitas Islam Negeri Maulana Malik Ibrahim. Malang.
- Sumaryono, Latifah & S. M. R. Sedyawati. 2013. Identifikasi dan Uji Toksisitas Azadirachtin dari Daun Mimba Sebagai Bioinsektisida Walang Sangit. *Indonesian Journal of Chemical Science.* 2:46-50.
- Supriyanto, W. B. Simon., M. Rifa'i & Yunianta 2017. Uji Fitokimia Dan Aktivitas Antioksidan Ekstrak Daun Mimba (*Azadirachta Indica* Juss), hlm. 523-528. Di dalam Strategi Pengembangan Perekonomian Masyarakat Melalui Gerakan Starup Digital. Prosiding Seminar Nasional Teknologi dan Informatika. Universitas Muria Kudus. Kudus.
- Tanaya, V., R. Retnowati & Suratmo. 2015. Fraksi Semi Polar Daun Mangga Kasturi (*Mangifera casturi* Kosterm). *Kimia Student Journal.* 1(1):778-784