



## Optimasi Penggunaan *High Shear Mixer* pada Pembuatan Fraksi Alkaloid dari Daun Awar-awar (*Ficus septica*) dengan Desain Faktorial

### *Optimization of High Shear Mixer Application in the Production of Alkaloid Fraction from Ficus Septica Leaves with Factorial Designs*

Chelvin Ari Kusnanto<sup>1</sup>, Andayana Puspitasari Gani<sup>2</sup>, Subagus Wahyuono<sup>2</sup>, Nanang Fakhrudin<sup>2\*</sup>

<sup>1</sup>Program Sarjana, Fakultas Farmasi, Universitas Gadjah Mada, Yogyakarta, Indonesia

<sup>2</sup>Departemen Biologi Farmasi, Fakultas Farmasi, Universitas Gadjah Mada, Yogyakarta, Indonesia

\*E-mail: [nanangf@ugm.ac.id](mailto:nanangf@ugm.ac.id)

#### Abstrak

Awar-awar (*Ficus septica*) merupakan tumbuhan Indonesia yang berpotensi antikanker, dengan alkaloid sebagai senyawa aktifnya. Fraksi tidak larut n-heksana (FTLH) merupakan fraksi alkaloid aktif hasil fraksinasi ekstrak etanol daun *F. septica* (EEDFS). *High shear mixer* (HSM) merupakan alat yang bisa digunakan untuk meningkatkan efektivitas proses pemisahan, termasuk fraksinasi. Efektivitas HSM dalam fraksinasi EEDFS dapat dipengaruhi oleh lama waktu fraksinasi, jumlah pelarut yang digunakan dan kekuatan pengadukan. Agar proses produksi FTLH efektif dan efisien, maka perlu optimasi parameter-parameter tersebut berdasarkan kadar alkaloid totalnya. Penelitian ini bertujuan untuk mengoptimasi proses fraksinasi EEDFS menggunakan HSM dengan desain faktorial guna menghasilkan FTLH. Desain eksperimen diawali dengan *single factor experiment* untuk mengetahui faktor berpengaruh terhadap kadar alkaloid dalam fraksi serta menentukan nilai rentang faktor tersebut. Selanjutnya dilakukan eksperimen menggunakan *full factorial design* dengan 2 faktor dan 2 level untuk mengetahui adanya interaksi antar faktor dan menentukan kondisi optimum fraksinasi EEDFS. Faktor yang dioptimasi dalam proses fraksinasi ini adalah jumlah pelarut (ml) untuk setiap gram ekstrak, kekuatan pengadukan, dan lama waktu fraksinasi. Respon yang diamati adalah kadar alkaloid total yang ditentukan dengan spektrofotometer. Hasil penelitian menunjukkan bahwa ketiga faktor secara *independent* berpengaruh terhadap kadar alkaloid. Jumlah pelarut 14-18 mL/gram ekstrak, lama waktu fraksinasi 2,5-5 menit, dan kekuatan pengadukan 3000 rpm merupakan rentang nilai optimum dari masing-masing faktor. Kondisi optimum fraksinasi diperoleh jumlah pelarut 14,0-14,4 mL/gram ekstrak, lama waktu fraksinasi 2,5-2,7 menit, dan kekuatan pengadukan 3000 rpm. Kondisi tersebut menghasilkan FTLH dengan kadar alkaloid total sebesar 0,1466 % atau 1,3 kali lebih tinggi dibandingkan ekstraknya (0,1128 %).

#### Abstract

Awar-awar (*Ficus septica*) is an Indonesian anticancer plant that contains alkaloids as the active compound. The n-hexane insoluble fraction (FTLH) is alkaloid-containing fraction obtained from the ethanolic extract of *F. septica* leaves (EEDFS) by fractionation using n-hexane. *High shear mixer* (HSM) can be used to optimize the separation processes, including fractionation. The application of HSM in the fractionation of EEDFS is affected by fractionation duration, amount of solvent per gram extract, and stirring strength. Thus, these parameters must be optimized to obtain the optimum condition for the production of FTLH with the highest alkaloid content. This study aimed to optimize the production of FTLH using HSM with factorial designs. The single factor experimental design was employed to determine the influence of the individual variable on the alkaloid content and to define the optimum range value of each variable. A full factorial design was used to determine the presence of interaction among the factors and to determine the optimal fractionation condition. The results showed that all investigated factors independently affected alkaloid contents. The solvent volume of 14-18 mL per gram extract, the fractionation duration of 2.5-5.0 minutes, and the stirring strength of 3000 rpm are the optimal range value of each factor. The optimal conditions were solvent volume of 14.0-14.4 mL/gram extract, fractionation duration of 2.5-2.7 minutes, and stirring strength at 3000 rpm. At the optimal condition, the total alkaloid content in the FTLH reached 0.1466% or 1.3 times higher than the extract (0.1128%).

#### Kata kunci:

Fraksinasi; Awar-awar; Alkaloid; Ultra-turrax; Desain faktorial

#### Keywords:

Fractionation; *Ficus septica*; Alkaloid; Ultra-turrax; Factorial design

#### Received:

10-05-2021

#### Revised:

13-07-2021

#### Accepted:

23-07-2021

#### Jurnal

Kefarmasian Indonesia, 2021;11(2):76-89

#### DOI:

<https://doi.org/10.2435/jki.v11i2.4874>

## PENDAHULUAN

Awar-awar (*Ficus septica* Burm. F.) secara empiris digunakan oleh masyarakat untuk pengobatan penyakit kulit, radang usus buntu, bisul, gigitan ular berbisa, dan sesak napas.<sup>1</sup> Penelitian menunjukkan bahwa ekstrak daun *F. septica* memiliki aktivitas sitotoksik terhadap sel kanker.<sup>2, 3</sup> Efek sitotoksik yang dihasilkan tersebut disebabkan oleh adanya senyawa-senyawa alkaloid (tilophorin sebagai senyawa utama) yang terkandung di dalam daunnya.<sup>2, 4, 5</sup>

Proses ekstraksi daun *F. septica* akan menghasilkan ekstrak yang masih mengandung berbagai macam senyawa metabolit. Untuk mempertajam aktivitasnya, diperlukan fraksinasi ekstrak atau pemisahan lanjutan dengan suatu pelarut, misalnya dengan n-heksana. Fraksinasi dengan n-heksana bertujuan membuang zat penyerta yang tidak diperlukan atau yang bersifat *inert* seperti lemak, minyak, dan klorofil. Dengan demikian, zat aktif yang dikehendaki berupa senyawa alkaloid lebih tinggi kadarnya.<sup>6</sup> Penelitian sebelumnya menunjukkan bahwa fraksinasi ekstrak etanol daun *F. septica* dengan n-heksana mampu menghasilkan fraksi tidak larut n-heksana (FTLH) yang mengandung alkaloid dan memiliki aktivitas sitotoksik pada beberapa sel kanker secara *in vitro*.<sup>2, 3, 7</sup>

Fraksinasi bisa dilakukan dengan banyak metode, salahsatunya dengan bantuan alat *high shear mixer* (HSM). Alat ini biasanya digunakan untuk mengefektifkan proses pencampuran dan homogenisasi dengan bantuan pengadukan menggunakan rotor berkecepatan tinggi.<sup>8</sup> Dalam proses fraksinasi cair-cair, lapisan fase atas dan fase bawah diaduk dan dicampur dengan kuat sehingga interaksi antara dua fase menjadi lebih intensif yang mampu meningkatkan proses transfer masa.<sup>9, 10</sup> Dalam penelitian ini, HSM digunakan untuk melakukan fraksinasi ekstrak etanol daun *F. septica* dengan menggunakan n-heksana sebagai pelarut untuk menghasilkan fase atas atau fraksi larut n-heksana (FLH); dan fase bawah

atau fraksi tidak larut n-heksana (FTLH). FTLH merupakan fraksi aktif yang mengandung senyawa-senyawa alkaloid yang bersifat sitotoksik terhadap sel kanker.<sup>3</sup> Fraksinasi yang dibantu dengan HSM dipengaruhi oleh beberapa faktor. Beberapa faktor yang berpengaruh antara lain jumlah pelarut untuk setiap gram ekstrak, waktu lamanya fraksinasi, dan kekuatan pengadukan.<sup>11-13</sup>

Sebelum proses optimasi, faktor tunggal maupun interaksi antar faktor yang berpengaruh terhadap respon harus ditentukan. Desain faktorial merupakan desain eksperimen yang digunakan untuk menentukan secara simultan efek tunggal maupun kombinasi antar faktor yang menyebabkan perubahan respon dibandingkan hanya dengan penjumlahan faktor tunggal.<sup>14, 15</sup> Belum ada penelitian yang mengkaji tentang optimasi proses fraksinasi pada ekstrak etanol daun *F. septica* untuk menghasilkan FTLH yang kaya akan alkaloid. Penelitian ini bertujuan untuk melakukan optimasi produksi FTLH dari ekstrak etanol *F. septica* melalui fraksinasi dengan pelarut n-heksana menggunakan alat HSM dan rancangan desain faktorial. Pelarut n-heksana dipilih karena dapat memisahkan senyawa-senyawa relatif non polar yang tidak dikehendaki sebagaimana dilakukan pada penelitian sebelumnya.<sup>6</sup>

## METODE PENELITIAN

### Alat dan bahan

Alat utama yang digunakan pada penelitian ini adalah alat untuk fraksinasi berupa *high-shear mixer* Ultra-turrax<sup>®</sup> (IKA T25). Alat lain yang digunakan antara lain *waterbath* (Memmert WNB14RACK), mikropipet (Eppendorf), neraca analitik (Metler Toledo), spektrofotometer UV-Vis (Shimadzu UV-1800), *rotary evaporator* (Buchi), *moisture analyzer* (Metler Toledo), dan pH-meter,

Bahan yang digunakan dalam penelitian ini antara lain etanol, aquadest, butanol p.a (Merck), n-heksana (Merck), pereaksi Dragendorff (Sigma Aldrich), kloroform p.a (Merck), metanol p.a

(Merck), toluen p.a (Merck), etil asetat (Merck), dietilamin (Merck), NaOH (Merck), Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> (Merck), asam sitrat (Sigma Aldrich), kloroquin (Sigma Aldrich), tilophorin (TRC Canada), silica gel F254 (Merck) dan bromocresol green (Sigma Aldrich).

### Bahan tanaman dan penyiapan simplisia

Bahan tanaman yang digunakan yaitu daun Awar-awar (*F. septica*) yang diambil dari Tawangmangu, Jawa Tengah, Indonesia, pada bulan Januari 2019. Untuk memastikan kebenarannya, identitas tanaman sudah dideterminasi oleh botanis (Dr. Djoko Santosa, M.Si.) dari Departemen Biologi Farmasi, Fakultas Farmasi UGM. Daun dicuci dengan air mengalir lalu dibiarkan pada suhu kamar sambil diangin-anginkan hingga air cucian kering. Daun lalu dipotong-potong selanjutnya dikeringkan dalam oven pada suhu 60 °C selama 48 jam. Setelah kering, daun diserbuk sehingga diperoleh serbuk kering daun *F. septica* yang siap untuk diekstraksi.

### Ekstraksi tanaman

Ekstraksi simplisia dilakukan menggunakan metode maserasi dengan mengacu kepada penelitian sebelumnya<sup>6</sup>. Serbuk kering daun *F. septica* (1 kg) diekstraksi dalam etanol 60% (15 L) selama 24 jam. Filtrat dipisahkan dari residu dengan cara disaring dengan kertas saring dengan bantuan corong Buchner. Filtrat diuapkan pelarutnya pada *rotary evaporator* (suhu 60°C) dan dihentikan ketika total solid mencapai 35-40% yang diukur dalam *moisture analyzer*. Filtrat (ekstrak) kental tersebut digunakan untuk proses fraksinasi.

### Fraksinasi dengan high-shear mixer

Proses fraksinasi ekstrak dilakukan dengan 2 tahap. Tahap pertama adalah *single factor experimental design*. Tahap ini digunakan untuk melihat pengaruh masing-masing parameter secara *independent* (jumlah pelarut per gram ekstrak, lama waktu fraksinasi, dan

kekuatan pengadukan). Tahap yang kedua yaitu *full factorial design* dengan 2 faktor dan 2 level. Tahap ini digunakan untuk mengetahui pengaruh multi-faktor atau interaksi antar faktor terhadap kadar alkaloid total dalam FTLH yang dihasilkan. Faktor dalam proses fraksinasi yang dioptimasi meliputi jumlah pelarut (*n*-heksana) per gram ekstrak, lama waktu fraksinasi, dan kekuatan pengadukan (putaran mesin).

Prosedur fraksinasi dilakukan mengikuti cara kerja dari penelitian sebelumnya.<sup>6</sup> Secara singkat, 10 g ekstrak etanol kental daun *F. septica* ditimbang kemudian dimasukkan ke dalam wadah gelas alat HSM Ultra-turrax<sup>®</sup>. Fraksinasi dilakukan dengan menambahkan pelarut *n*-heksana (100 mL) kedalam alat gelas, lalu rotor pada HSM dijalankan untuk menghasilkan putaran untuk mengaduk campuran. Setelah proses fraksinasi dengan HSM selesai, campuran didiamkan selama 20 jam (variabel terkontrol) hingga terbentuk 2 lapisan fraksi, yaitu fase atas atau fraksi larut *n*-heksana (FLH); dan fraksi bawah atau fraksi tidak larut *n*-heksana (FTLH) yang dapat dipisahkan dengan corong pisah. FTLH yang merupakan fraksi mengandung alkaloid dipisahkan lalu diuapkan pelarutnya hingga diperoleh fraksi yang kental.

### Analisis profil kromatografi

Analisis profil kromatografi terhadap FTLH dilakukan dengan mengacu kepada penelitian sebelumnya<sup>16</sup>. Sebanyak 10 µL larutan ekstrak (1 mg/mL), FTLH, dan senyawa pembanding tilophorin (salah satu alkaloid dalam daun *F. septica*) dilarutkan dalam metanol hingga larut sempurna lalu ditotolkan pada lempeng plat Kromatografi Lapis Tipis (KLT). Fase diam dan fase gerak yang digunakan masing-masing adalah silika gel F<sub>254</sub>, dan toluen : etil asetat : dietilamin (7:2:1). Deteksi senyawa alkaloid dilakukan dibawah sinar UV<sub>254</sub> nm, UV<sub>366</sub> nm, dan pada sinar tampak setelah disemprot dengan pereaksi Dragendorff. Profil KLT didokumentasikan dan dilakukan analisis

terkait keberadaan alkaloid berdasarkan pada reaksi dengan reagen Dragendorff dimana alkaloid akan memberikan warna kemerahan.<sup>17, 18</sup>

### Analisis kadar alkaloid total

Senyawa yang memiliki aktivitas sitotoksik dalam daun *F. septica* adalah alkaloid. Ada beberapa senyawa alkaloid aktif yang ada di dalam daun *F. septica* sehingga kadar alkaloid total digunakan sebagai parameter kuantitatif dalam fraksinasi. Kadar alkaloid dalam fraksi ditentukan dengan metode spektrofotometri yang mengacu kepada penelitian sebelumnya yang dilakukan oleh Nagib *et al.*<sup>19</sup> Berdasarkan penelitian tersebut, kadar alkaloid total dapat ditetapkan secara spektrofotometri menggunakan reagen *bromocresol green* (BCG). Kloroquin yang merupakan senyawa alkaloid golongan fenantroindolizidin digunakan sebagai senyawa baku pembanding.

#### - Penyiapan larutan BCG

Larutan BCG disiapkan dengan menimbang 69,8 mg BCG lalu dilarutkan dengan 3 mL 2 N NaOH dan 5 mL aquadest dalam labu takar 1000 mL. Selanjutnya, ditambahkan aquadest hingga tanda batas dan dipanaskan di atas *waterbath* selama 2 jam (60 °C). Larutan buffer fosfat (pH 4,7) sebagai penyangga keasaman disiapkan dengan cara melarutkan 71,6 g Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> dalam 1 L aquadest hingga pH 4,7 lalu ditambah 0,2 M asam sitrat (42,02 g asam sitrat dalam 1 L aquadest).

#### - Pembuatan kurva baku kloroquin

Larutan baku kloroquin dibuat dengan melarutkan 10 mg kloroquin ke dalam 250 mL aquadest sehingga diperoleh konsentrasi 40 ppm. Larutan baku kloroquin 40 ppm dipipet sebanyak 0,5; 1,0; 1,5; 2,0; 2,5; dan 3,0 mL dan dimasukkan ke dalam corong pisah lalu ditambahkan 5 mL larutan buffer fosfat dan 5 mL larutan BCG. Larutan tersebut dipartisi dengan 5 mL kloroform (2 kali) dan diambil fase kloroformnya. Fase

kloroform disentrifugasi selama 10 menit dengan kecepatan 3000 rpm kemudian diambil lapisan kloroformnya dan dimasukkan ke dalam labu takar 10 mL sehingga diperoleh larutan baku kloroquin dengan konsentrasi 2, 4, 6, 8, 10, dan 12 ppm. Absorbansi diukur pada panjang gelombang maksimum (420 nm) dan dibuat persamaan regresi linearnya untuk kurva baku.

#### - Penentuan kadar alkaloid total dalam FTLH

FTLH ditimbang sebanyak 100 mg dan dimasukkan ke dalam labu ukur 10 mL kemudian dilarutkan dengan aquadest hingga tanda batas. Larutan selanjutnya diultrasonik selama 10 menit dan disentrifugasi selama 10 menit dengan kecepatan 3000 rpm. Larutan fraksi diambil sebanyak 1 mL dan dimasukkan ke dalam corong pisah lalu ditambahkan 5 mL larutan buffer fosfat dan 5 mL larutan BCG. Campuran ini dipartisi dengan penambahan 5 mL kloroform. Fraksi kloroform diukur absorbansinya pada spektrofotometer dengan cara yang sama pada pembuatan kurva baku pada sesi sebelumnya. Hasil absorbansi yang diperoleh kemudian diinterpolasikan ke dalam persamaan kurva baku untuk perhitungan kadar alkaloid totalnya dengan rumus berikut:

Kadar alkaloid total (% b/b) =

$$\frac{\text{Kadar cuplikan (mg/L)} \times \text{Volume larutan (L)}}{\text{Bobot sampel (mg)}} \times 100\%$$

### Optimasi fraksinasi dengan *single factor experimental design*

Optimasi fraksinasi dengan *single factor experimental design* digunakan untuk mengetahui pengaruh dari setiap variabel bebas terhadap kadar alkaloid total. Adapun faktor yang dikendalikan adalah bobot ekstrak (10 g) dan waktu pendiaman setelah fraksinasi (20 jam). Optimasi dilakukan terhadap 3 faktor bebas sebagai berikut:

- *Kekuatan pengadukan*

Variasi kekuatan pengadukan pada mesin yang digunakan untuk proses fraksinasi didesain pada 3000 rpm, 5200 rpm, 7600 rpm, 9800 rpm, dan 12000 rpm. Jumlah pelarut (n-heksana) per gram ekstrak yang digunakan yaitu 14 mL dengan lama waktu 15 menit. Fraksi-fraksi yang diperoleh (FTLH) ditentukan kadar alkaloid totalnya pada masing-masing perlakuan. Kekuatan pengadukan optimum dipilih berdasarkan kadar alkaloid total tertinggi dalam FTLH yang dihasilkan.

- *Jumlah pelarut per gram ekstrak*

Variasi jumlah pelarut per gram ekstrak yang digunakan untuk proses fraksinasi ditentukan sebesar 10, 12, 14, 16, 18, 20, dan 22 (g/mL). Lama waktu yang digunakan yaitu 15 menit dan kekuatan pengadukan berdasarkan nilai optimum yang diperoleh dari percobaan sebelumnya. Fraksi yang diperoleh ditetapkan kadar alkaloid totalnya pada masing-masing perlakuan. Jumlah pelarut per gram ekstrak optimum dipilih

berdasarkan kadar alkaloid total tertinggi dalam FTLH yang dihasilkan.

- *Pengaruh lama waktu fraksinasi*

Penentuan pengaruh waktu fraksinasi dilakukan dengan melakukan fraksinasi dengan durasi selama 2,5; 5,0; 10,0; 15,0; 25,0; 35,0 dan 45,0 menit. Kekuatan mesin dan jumlah pelarut per gram ekstrak yang digunakan dalam optimasi ini diperoleh dari hasil percobaan sebelumnya. Fraksi yang diperoleh dilakukan penetapan kadar alkaloid total pada masing-masing perlakuan. Lama waktu optimum dipilih berdasarkan kadar alkaloid total tertinggi dalam FTLH yang dihasilkan.

**Optimasi fraksinasi dengan *full factorial design***

Optimasi kondisi fraksinasi dilakukan dengan pendekatan desain faktorial penuh (*full factorial design*) dengan 2 faktor dan 2 level, sehingga jumlah rancangan percobaan adalah 2<sup>2</sup>. Dengan adanya 3 kali replikasi maka pada penelitian ini dilakukan 12 percobaan (Tabel 1).

**Tabel 1. Rancangan percobaan menggunakan *full factorial design* dengan 2 faktor, 2 level, dan 3 kali replikasi**

No	Faktor		Kecepatan Pengadukan (rpm)	Bobot ekstrak (g)
	Jumlah pelarut per gram ekstrak (mL)	Lama Waktu (menit)		
1	14	5	3000	10,007
2	18	5		10,004
3	18	2.5		10,007
4	14	2.5		10,007
5	18	2.5	3000	10,004
6	14	2.5		10,004
7	18	5		10,006
8	14	5		10,001
9	18	2.5	3000	10,001
10	14	2.5		10,003
11	18	5		10,001
12	14	5		10,006



Rancangan ini dipilih untuk mengetahui adanya interaksi antara faktor yang pada *single factor experiment* telah terbukti memiliki pengaruh terhadap fraksinasi. Hasil optimasi dengan *single factor experiment design* didapatkan bahwa faktor yang secara signifikan berpengaruh dalam proses fraksinasi adalah jumlah pelarut per gram ekstrak dan waktu fraksinasi, sehingga selanjutnya digunakan *full factorial design* dengan 2 faktor dan 2 level yaitu tinggi (*high*) dan rendah (*low*). Data dari seluruh respon digunakan untuk menyusun persamaan matematika menggunakan *software* Minitab 19.

### Verifikasi hasil optimasi

Faktor (variabel) optimum yang diperoleh dari hasil optimasi menggunakan *full factorial design* dengan 2 faktor dan 2 level diverifikasi dengan percobaan yang dilakukan pada kondisi optimum tersebut. Satu titik pada daerah optimum hasil dari percobaan menggunakan *full factorial design* dengan 2 faktor dan 2 level yang menghasilkan kadar alkaloid total tertinggi dipilih, lalu kadar alkaloid total yang diperoleh dari hasil percobaan tersebut dihitung dengan spektrofotometri sebagaimana diuraikan sebelumnya. Hal ini dilakukan untuk memastikan bahwa fraksinasi yang dilakukan pada kondisi optimum hasil optimasi faktor-faktor yang ada mampu menghasilkan FTLH dengan kadar alkaloid yang lebih tinggi dibandingkan dengan fraksinasi yang dilakukan pada kondisi non optimum.

### Analisis statistik

Analisis statistik dilakukan dengan menggunakan *software* SPSS 25 untuk membandingkan nilai kadar alkaloid total dari masing-masing perlakuan. Pada *factorial design*, data kadar alkaloid total dari seluruh respon digunakan untuk menyusun persamaan matematika (kurva regresi) dengan bantuan *software* Minitab 19, dan analisis statistik dilakukan dengan *One-Way ANOVA* ( $p=0,05$ ).

## HASIL DAN PEMBAHASAN

Ekstrak merupakan hasil penyarian dari simplisia yang masih memiliki berbagai macam kandungan kimia termasuk adanya senyawa non aktif atau zat *ballast* yang tidak dibutuhkan untuk aktivitas yang diinginkan. Oleh karena itu, perlu dilakukan proses pemisahan lanjutan dengan fraksinasi untuk mendapatkan fraksi dengan kandungan zat aktif yang lebih tinggi kadarnya dari ekstrak.<sup>20</sup> Metode fraksinasi yang digunakan pada penelitian ini adalah fraksinasi cair-cair dengan bantuan alat *high shear mixer* (HSM). Fraksinasi dalam penelitian ini menggunakan pelarut n-heksana untuk menghilangkan kandungan senyawa-senyawa non polar yang tidak dikehendaki (klorofil, lemak, minyak) dalam ekstrak etanol daun *F. septica* sehingga dihasilkan FTLH yang memiliki kadar alkaloid yang lebih tinggi. Efektivitas dan efisiensi proses fraksinasi dengan HSM dipengaruhi oleh beberapa faktor, diantaranya waktu fraksinasi, kekuatan pengadukan, dan jumlah pelarut per gram ekstrak.

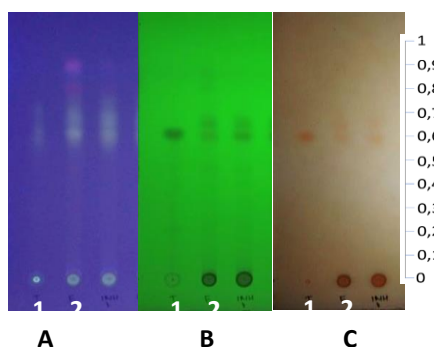
Dalam penelitian ini, dilakukan optimasi masing-masing faktor dengan rancangan uji *single factor experimental design*. Sedangkan untuk melihat interaksi antar faktor yang mampu menghasilkan FTLH dengan kadar alkaloid tertinggi digunakan rancangan *full factorial design*. Optimasi terhadap beberapa faktor yang berpengaruh terhadap proses fraksinasi didasarkan pada kadar alkaloid total yang dihitung dengan spektrofotometer.

### Analisis profil kromatografi

Analisis profil kromatografi dilakukan untuk melihat apakah proses fraksinasi yang dilakukan mampu menghilangkan atau mengurangi kandungan senyawa non alkaloid yang bersifat non polar dalam ekstrak etanol daun *F. septica*. Senyawa-senyawa non polar yang umumnya berupa klorofil dan lemak akan muncul pada *Rf* besar (0,9) pada hasil KLT serta terlihat sebagai bercak berpendar kemerahan dibawah UV<sub>366</sub> nm (Gambar 1A, totalan nomor 2). Proses fraksinasi dengan HSM

menggunakan n-heksana sebagai pelarut tersebut mampu membersihkan FTLH dari senyawa-senyawa non polar (Gambar 1A, totalan nomor 3). Fraksinasi tersebut tidak menghilangkan kandungan alkaloid dalam ekstrak yang terlihat dari masih adanya senyawa tilophorin pada  $R_f$  sekitar 0,5 (Gambar 1B, totalan nomor 1). Senyawa alkaloid akan memberikan respon warna bercak kemerahan pada penyemprotan dengan reagen Dragendorff.<sup>17, 18</sup> Selain tilophorin, senyawa-senyawa alkaloid yang lebih polar dari tilophorin juga masih ada di dalam FTLH yang terlihat warna kemerahan ditempat penotolan atau  $R_f$  0 (Gambar 1C, totalan 2 dan 3).

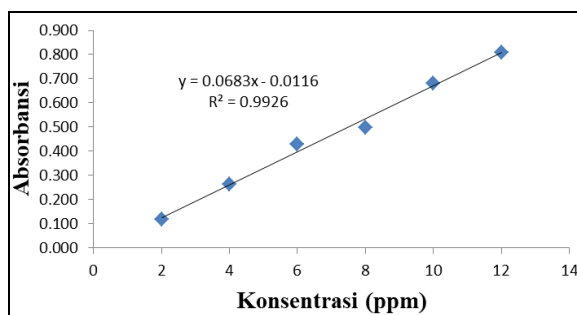
Hasil analisis ini menunjukkan bahwa metode fraksinasi yang digunakan mampu menghilangkan senyawa-senyawa non alkaloid yang bersifat non polar yang direpresentasikan oleh bercak-bercak pada  $R_f$  sekitar 0,8-0,9 di totalan nomor 2 Gambar 1. Data yang diperoleh ini sejalan dengan penelitian lain dimana penambahan n-heksana pada ekstrak etanol daun *F. septica* mampu menghilangkan komponen non polar dan menghasilkan FTLH dengan kandungan utama senyawa alkaloid.<sup>6, 21</sup> Selanjutnya kandungan alkaloid total dalam FTLH yang diproduksi ditetapkan dengan spektrofotometri.<sup>22</sup>



**Gambar 1. Profil kromatografi dari FTLH hasil dari fraksinasi ekstrak etanol daun *F. septica* menggunakan alat HSM dengan pelarut n-heksana.** Analisis KLT dilakukan dengan fase gerak toluen : etil asetat : dietilamin (7:2:1), pada fase gerak silika gel F<sub>254</sub>, dan diamati pada sinar UV<sub>366</sub> nm (A); UV<sub>254</sub> nm (B); dan sinar tampak setelah disemprot dengan pereaksi Dragendorff (C). Totalan nomor 1, 2, dan 3 masing-masing adalah tilophorin, ekstrak etanol daun *F. septica*, dan FTLH.

### Analisis kadar alkaloid total

Kadar alkaloid total dalam FTLH digunakan sebagai parameter untuk menentukan kondisi optimum dalam proses fraksinasi dengan HSM. Pengukuran kadar alkaloid total dilakukan menggunakan metode spektrofotometri.<sup>19, 22</sup> Prinsip penetapan kadarnya adalah adanya reaksi ikatan kompleks ionik antara *bromocresol green* (BCG) sebagai reagen dengan atom Nitrogen pada alkaloid sehingga dapat membentuk kompleks berwarna kuning yang dapat dibaca absorbansinya secara spektrofotometri visibel. Sebagai senyawa standar untuk kurva baku digunakan kloroquin yang merupakan senyawa alkaloid fenantroindolizidin yang memiliki kemiripan kerangka dengan senyawa-senyawa yang ada di dalam daun *F. septica* seperti ficuseptin, (+)-tilophorin, (+)-tilocrebrin, dan (+)-isotilocrebrin.<sup>4</sup> Hasil pengukuran pada spektrofotometer terhadap baku standard kloroquin disajikan dalam bentuk kurva baku dilengkapi dengan persamaan regresi linearnya (Gambar 2). Persamaan regresi linear tersebut digunakan untuk menghitung kadar alkaloid total dalam FTLH pada setiap percobaan.



**Gambar 2. Kurva baku kloroquin yang digunakan untuk penetapan kadar alkaloid total dengan spektrofotometer dan persamaan regresi linear yang dihasilkan.**

### Optimasi dengan *single factor experimental design*

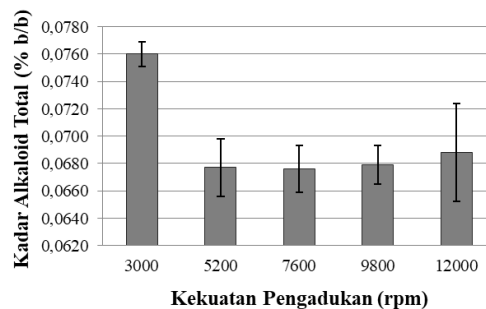
Optimasi dengan *single factor experimental design* dilakukan untuk mengetahui faktor-faktor yang berpengaruh pada proses fraksinasi atau menentukan hubungan antara faktor

(variabel bebas) dengan respon (kadar alkaloid total). Pada penelitian ini, faktor yang dioptimasi yaitu kekuatan pengadukan, jumlah pelarut per gram ekstrak, dan lama waktu fraksinasi. Optimasi dengan *single factor experimental design* dilakukan dengan cara memvariasi satu faktor sedangkan faktor yang lain dibuat tetap. Hasil optimasi setiap faktor adalah sebagai berikut.

### 1. Kekuatan pengadukan

Mekanisme kerja HSM menggunakan putaran rotor dengan kecepatan tinggi yang mengakibatkan kenaikan suhu selama proses fraksinasi berlangsung. Panas yang muncul tersebut berpotensi merusak senyawa-senyawa kandungan, termasuk alkaloid. Oleh karena itu, kekuatan pengadukan perlu dipertimbangkan dengan tepat untuk menjaga kenaikan suhu sekecil mungkin.<sup>12</sup> Pada penelitian ini, kekuatan putaran pengadukan mesin yang digunakan yaitu 3000 rpm, 5200 rpm, 7600 rpm, 9800 rpm, dan 12000 rpm. Untuk mengetahui pengaruh kekuatan mesin maka faktor (variabel bebas) lain seperti jumlah pelarut per gram ekstrak dan lama waktu fraksinasi dibuat konstan. Berdasarkan Gambar 3, kadar alkaloid total pada kekuatan putaran pengadukan 3000 rpm, 5200 rpm, 7600 rpm, 9800 rpm, dan 12000 rpm secara berturut-turut adalah sebesar 0,0760%; 0,0677%; 0,0676%; 0,0679%; dan 0,0688% b/b. Hasil uji ini menunjukkan bahwa kekuatan pengadukan yang lebih besar cenderung menghasilkan kadar alkaloid total yang lebih rendah. Kadar alkaloid total tertinggi dalam uji ini diperoleh sebesar 0,0760% b/b ketika proses fraksinasi menggunakan kekuatan mesin 3000 rpm. Hasil analisis statistik menunjukkan bahwa pada pengadukan dengan 3000 rpm tersebut memberikan kadar alkaloid total yang berbeda bermakna dengan kekuatan pengadukan lain ( $p < 0,05$ ). Kekuatan pengadukan 3000 rpm merupakan kecepatan pengadukan yang optimum untuk mendapatkan kadar alkaloid total tertinggi dari FTLH. Pengadukan pada 3000 rpm tersebut merupakan kekuatan terendah dari

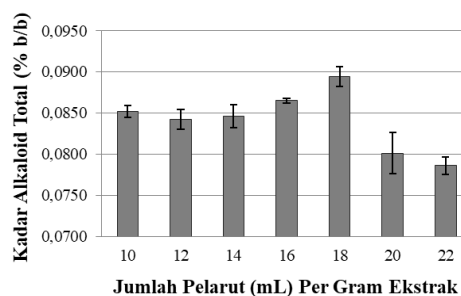
spesifikasi alat *high-shear mixer* yang digunakan sehingga variabel kekuatan pengadukan tidak diikuti dalam *full factorial design*.



**Gambar 3. Pengaruh kekuatan pengadukan terhadap kadar alkaloid total dalam FTLH pada fraksinasi dengan HSM. Jumlah pelarut per gram ekstrak yang digunakan sebesar 14 mL, sedangkan lama waktu fraksinasi 15 menit.**

### 2. Pengaruh jumlah pelarut per gram ekstrak

Jumlah pelarut per gram ekstrak dapat mempengaruhi jumlah alkaloid yang diperoleh. Secara teoritis, semakin banyak pelarut n-heksana yang digunakan maka alkaloid yang diperoleh akan semakin banyak. Namun, porsi pelarut yang semakin banyak juga dapat menyebabkan zat-zat lain yang tidak diinginkan juga ikut tertarik ke dalamnya. Penggunaan pelarut yang terlalu banyak juga akan menaikkan biaya produksi. Oleh karena itu, perbandingan antara pelarut dengan sampel perlu dioptimasi untuk memperoleh kadar alkaloid total yang tinggi dengan jumlah pelarut yang minimal.<sup>8, 12</sup>



**Gambar 4. Pengaruh jumlah pelarut per gram ekstrak terhadap kadar alkaloid total dalam FTLH pada fraksinasi dengan HSM. Percobaan dilakukan pada kekuatan pengadukan 3000 rpm dan lama waktu fraksinasi 15 menit.**



Untuk mengetahui pengaruh dari jumlah pelarut per gram ekstrak terhadap kadar alkaloid maka dibuat variasi jumlah pelarut sebesar 10, 12, 14, 16, 18, 20, dan 22 mL per gram ekstrak. Kekuatan pengadukan dibuat tetap pada 3000 rpm; sedangkan lama waktu fraksinasi adalah 15 menit sebagaimana hasil optimasi menggunakan *single factor experimental design*. Pada Gambar 4 terlihat bahwa kadar alkaloid total yang dihasilkan cenderung lebih tinggi akibat bertambahnya jumlah pelarut yang digunakan. Kenaikan kadar alkaloid tersebut mencapai titik tertinggi pada jumlah pelarut 18 mL per gram ekstrak yaitu sebesar 0,0894%. Selanjutnya kadar alkaloid total tersebut kembali mengalami penurunan. Turunnya kadar alkaloid tersebut dapat disebabkan karena semakin bertambahnya jumlah pelarut (peningkatan kapasitas penyarian) kurang sebanding dengan spesifitas pelarut. Akibatnya, sebagian senyawa-senyawa non target yang awalnya tidak terlarut dalam n-heksana dalam porsi yang kecil menjadi ikut terlarut sebagian. Hal ini dapat mengakibatkan kadar alkaloid total di dalam FTLH menjadi cenderung menurun. Hasil analisis menunjukkan bahwa ada kenaikan kadar alkaloid yang signifikan ( $p < 0,05$ ) pada penggunaan jumlah pelarut 18 mL per gram ekstrak, sehingga kondisi tersebut merupakan jumlah pelarut per gram ekstrak yang optimum untuk mendapatkan kadar alkaloid total tertinggi dalam FTLH. Jumlah pelarut 18 mL per gram ekstrak selanjutnya ditetapkan sebagai level atas untuk optimasi *full factorial design*, sedangkan jumlah pelarut 14 mL per gram ekstrak sebagai level bawah.

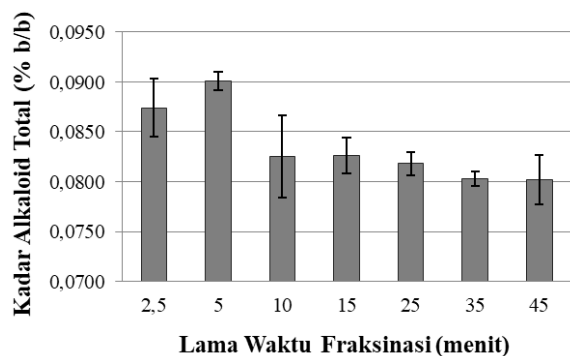
### 3. Pengaruh lama waktu fraksinasi

Saat proses fraksinasi berlangsung, terjadi pertukaran masa antara larutan ekstrak dalam medium yang berair dengan pelarut n-heksana untuk mencapai kesetimbangan. Ketika kadar zat yang terlarut di dalam suatu pelarut telah mencapai titik jenuh maka terjadi kesetimbangan dan proses fraksinasi bisa

dihentikan. Keadaan ini salah satunya dipengaruhi oleh waktu. Ketika waktu fraksinasi terlalu cepat maka jumlah zat yang ingin dipisahkan dalam pelarut n-heksana belum maksimal. Sebaliknya, jika waktunya terlalu lama hingga melewati titik jenuh atau profil kesetimbangan, maka hal ini kurang efisien. Untuk mendapatkan hasil yang efektif dan efisien, maka diperlukan optimasi lama waktu fraksinasi.<sup>23</sup>

Variasi waktu yang digunakan pada penelitian ini yaitu 2,5; 5; 10; 15; 25; 35; dan 45 menit. Sedangkan kekuatan pengadukan dan jumlah pelarut per gram ekstrak yang digunakan berdasarkan pada hasil optimasi pada percobaan dengan *single factorexperimental design* yaitu masing-masing sebesar 3000 rpm dan 1:18. Gambar 5 menunjukkan bahwa pada 5 menit fraksinasi sudah dapat mencapai keadaan setimbang dan menghasilkan kadar alkaloid total paling tinggi yaitu 0,0901% b/b. Namun semakin lama kadar alkaloid menjadi cenderung menurun. Penurunan kadar alkaloid total akibat semakin lamanya waktu fraksinasi ini diduga karena rusaknya senyawa-senyawa alkaloid akibat kenaikan suhu sebagai konsekuensi dari putaran rotor mesin pengaduk pada 3000 rpm dalam waktu lama. Beberapa senyawa alkaloid memang memiliki sifat yang kurang stabil terhadap kenaikan suhu (termolabil).<sup>24, 25</sup> Kenaikan suhu selama proses fraksinasi bisa mendegradasi senyawa-senyawa alkaloid tersebut sehingga menurunkan kadarnya.

Hasil analisis statistik dengan *One-Way ANOVA* ( $p < 0,05$ ) menunjukkan bahwa lama waktu fraksinasi 5 menit memberikan kadar alkaloid total yang berbeda bermakna dibandingkan waktu 10; 15; 25; 35; dan 45 menit, namun tidak berbeda signifikan dengan dibandingkan fraksinasi 2,5 menit. Oleh karena itu, dilakukan optimasi waktu menggunakan *full factorial design* dimana lama waktu 5 menit sebagai level atas (*high level*) dan lama waktu 2,5 menit sebagai level bawah (*low level*).



**Gambar 5. Pengaruh lama waktu fraksinasi terhadap kadar alkaloid total dalam FTLH pada fraksinasi dengan HSM. Percobaan dilakukan pada jumlah pelarut 18 mL per gram ekstrak, dan kekuatan pengadukan 3000 rpm.**

**Optimasi dengan *full factorial design***

Optimasi faktor-faktor yang berpengaruh dalam proses fraksinasi dengan HSM selanjutnya dilakukan dengan menggunakan rancangan *full factorial design* dengan 2 faktor dan 2 level. Faktor yang digunakan adalah jumlah pelarut per gram ekstrak dan lama waktu fraksinasi; sedangkan levelnya adalah level bawah (*low level*) dan level atas (*high level*). Rancangan ini digunakan untuk mengetahui korelasi antara faktor-faktor yang secara teoritis berpengaruh signifikan terhadap proses fraksinasi. Hasil percobaan dengan *single factor experimental design* ditemukan bahwa jumlah pelarut per gram ekstrak dan lama waktu fraksinasi memiliki pengaruh yang signifikan dalam proses fraksinasi dengan parameter kadar alkaloid total. Namun, pengaruh dari interaksi antara keduanya secara simultan belum diketahui.

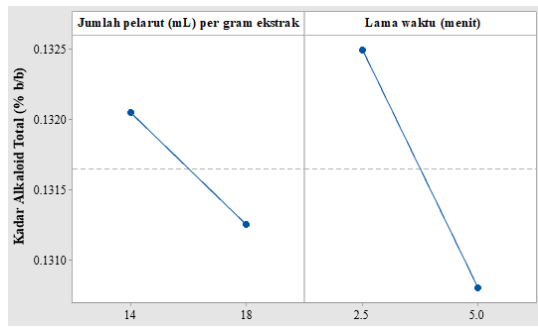
Berdasarkan hasil percobaan pada *single factor experimental design* maka pada rancangan *full factorial design* ditetapkan faktor jumlah pelarut 14 mL per gram ekstrak sebagai level bawah dan 1:18 sebagai level atas. Untuk faktor lamanya waktu fraksinasi digunakan 2,5 menit sebagai level bawah dan 5 menit sebagai level atas. Kekuatan pengadukan yang digunakan adalah tetap yaitu 3000 rpm berdasarkan optimasi sebelumnya. Percobaan dilakukan dengan masing-

masing 3 kali replikasi dan hasilnya tersaji di Tabel 2.

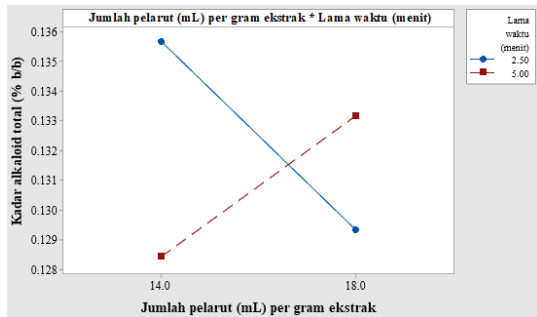
**Tabel 2. Kadar alkaloid total dalam FTLH hasil fraksinasi menggunakan HSM dengan *factorial design***

Kondisi Fraksinasi	Faktor		Rerata Kadar Alkaloid Total (% b/b)
	jumlah pelarut per gram ekstrak (mL)	Lama waktu fraksinasi (menit)	
1	14	2,5	0,1395
	14	2,5	0,1335
	14	2,5	0,1340
2	14	5	0,1303
	14	5	0,1279
3	14	5	0,1271
	18	2,5	0,1239
	18	2,5	0,1367
4	18	2,5	0,1274
	18	5	0,1356
	18	5	0,1355
	18	5	0,1284

Hasil fraksinasi dalam Tabel 2 menunjukkan bahwa kombinasi faktor jumlah pelarut per gram ekstrak dan lama waktu fraksinasi dalam proses fraksinasi mempengaruhi kadar alkaloid total di dalam FTLH yang dihasilkan. Data yang telah diperoleh selanjutnya diolah untuk menghasilkan persamaan regresi  $Y = 0,2038 - 0,00435 A - 0,01839 B + 0,001107 AB$ . Persamaan tersebut menggambarkan besarnya pengaruh dan interaksi faktor jumlah pelarut per gram ekstrak (A) dengan faktor lama waktu fraksinasi (B) terhadap kadar alkaloid total. Berdasarkan persamaan tersebut, maka terlihat bahwa pengaruh dari setiap faktor secara individual adalah negatif. Dengan kata lain, bertambahnya jumlah pelarut per gram ekstrak dan semakin lamanya waktu fraksinasi memberikan efek turunya kadar alkaloid total. Interaksi ini disajikan dalam Gambar 6a. Namun secara bersamaan, interaksi antara kedua faktor tersebut memberikan efek yang positif yaitu peningkatan kadar alkaloid total (Gambar 6b).



(a)



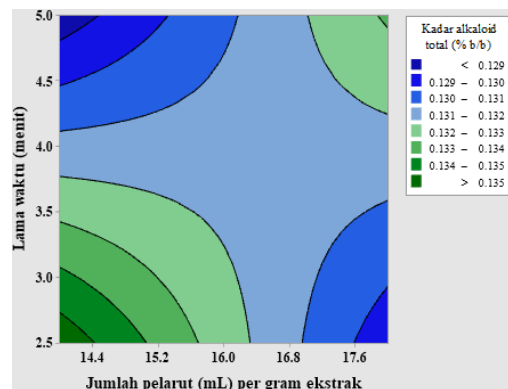
(b)

**Gambar 6. Grafik pengaruh faktor jumlah pelarut per gram ekstrak dan lama waktu fraksinasi terhadap kadar alkaloid total pada FTLH. (a) Pengaruh masing-masing faktor tunggal terhadap kadar alkaloid total; (b) Plot interaksi antar faktor terhadap kadar alkaloid total.**

Berdasarkan Gambar 6b dapat diketahui bahwa terdapat hubungan antara jumlah pelarut per gram ekstrak dan lama waktu fraksinasi dengan kadar alkaloid total dalam FTLH. Pada lama waktu fraksinasi 2,5 menit terlihat bahwa naiknya jumlah pelarut per gram ekstrak cenderung menurunkan kadar alkaloid dalam FTLH. Namun, jika lama waktu fraksinasi yang digunakan adalah 5 menit maka kenaikan jumlah pelarut per gram ekstrak cenderung menyebabkan naiknya kadar alkaloid total dalam FTLH.

Pengaruh faktor lama waktu fraksinasi dan jumlah pelarut per gram ekstrak secara simultan terhadap kadar alkaloid total dalam FTLH dapat diilustrasikan pada Gambar 7. Dari grafik *contour plot* tersebut terlihat bahwa faktor waktu fraksinasi dan jumlah pelarut per gram ekstrak berpengaruh terhadap kadar alkaloid total tetapi tidak ada interaksi

antara kedua faktor tersebut. Hal ini terlihat dari tidak adanya area singgungan di tengah kurva. Secara umum, kenaikan porsi pelarut dan lama waktu fraksinasi justru akan menurunkan kadar alkaloid dalam fraksi. Hal ini diduga disebabkan oleh tercapainya kondisi tunak pada proses fraksinasi sehingga bertambahnya volume pelarut dalam fraksinasi tidak menambah jumlah alkaloid yang terlarut. Adapun pertambahan waktu fraksinasi yang juga cenderung menurunkan kadar alkaloid dapat disebabkan oleh adanya kenaikan suhu pada sistem sehingga meningkatkan kelarutan senyawa lain (non alkaloid) yang sebelumnya relatif sulit larut. Hal ini akan menurunkan kapasitas pelarut (n-heksana) yang digunakan dalam melarutkan alkaloid sebagai senyawa target. Walaupun demikian, dari Gambar 6 dapat diperoleh informasi yang penting bahwa kondisi optimum proses fraksinasi dengan metode HSM untuk mendapatkan FTLH dengan kadar alkaloid tertinggi adalah menggunakan jumlah pelarut 14,0-14,4 (g/mL) per gram ekstrak dan lama waktu fraksinasi 2,5-2,7 menit. Untuk memverifikasi kondisi optimum dari tiap faktor tersebut, maka dilakukan proses fraksinasi pada kondisi optimum dengan kadar alkaloid total sebagai paramaterya.



**Gambar 7. Contour plot yang menunjukkan pengaruh lama waktu fraksinasi dan jumlah pelarut per gram ekstrak terhadap kadar alkaloid total.**

### Produksi FTLH pada kondisi optimum

Untuk memverifikasi bahwa produksi FLTH dengan HSM yang dilakukan pada kondisi optimum (*contour plot* warna hijau tua pada Gambar 7) menghasilkan FTLH

dengan alkaloid total yang tinggi (>0,135%), maka dilakukan percobaan fraksinasi pada kondisi optimal tersebut. Dalam hal ini dipilih salah satu representasi dari daerah *contour plot* warna hijau tua yaitu pada jumlah pelarut 14,4 mL per gram ekstrak dan lama waktu fraksinasi 2,5 menit. Seperti percobaan-percobaan sebelumnya, kekuatan pengadukan digunakan sebesar 3000 rpm. Hasil fraksinasi dengan HSM pada kondisi optimum tersaji dalam Tabel 3.

**Tabel 3. Kadar alkaloid total hasil fraksinasi ekstrak dengan HSM pada kondisi optimum**

Replikasi	Variabel Bebas		Rerata Kadar Alkaloid Total (% b/b)
	Rasio jumlah pelarut per gram ekstrak (mL)	Lama Waktu (menit)	
1	14,4	2,5	0,1452
2	14,4	2,5	0,1474
3	14,4	2,5	0,1473
Kadar alkaloid total rata-rata FTLH			0,1466±0,0012
Kadar alkaloid total rata-rata ekstrak			0,1128±0,0089

Berdasarkan Tabel 3 dapat diketahui bahwa proses fraksinasi dengan HSM yang dilakukan 3 kali pada kondisi optimum mampu menghasilkan FTLH dengan kadar alkaloid total masing-masing sebesar 0,1452%; 0,1474%; dan 0,1473%, atau dengan rata-rata sebesar 0,1466%. Kadar alkaloid total yang diperoleh lebih besar dari 0,135% yang merupakan kadar alkaloid total pada kondisi optimal (*contour plot* warna hijau tua) yang diperoleh dari hasil optimasi (Gambar 6). Hasil verifikasi ini menunjukkan bahwa metode optimasi yang digunakan valid dan benar-benar mampu menghasilkan FTLH dengan kadar yang diharapkan (>0,135%). Penelitian ini memberikan informasi terkait metode alternatif yang efektif dan efisien dalam pembuatan FTLH dari daun *F. septica* menggunakan proses fraksinasi dengan HSM. Metode ini mampu menghasilkan FTLH dengan kadar alkaloid

total yang mencapai 1,3 kali lebih tinggi dari ekstraknya. Pada penelitian sebelumnya, FTLH juga berhasil diproduksi dengan proses fraksinasi yang dibantu dengan gelombang ultrasonik.<sup>6</sup> Metode fraksinasi tersebut menghasilkan FTLH yang mengandung alkaloid total hampir dua kali lipat dari kadar dalam ekstraknya, namun metode tersebut kurang efektif karena kadar alkaloid total yang dihasilkan hanya sebesar 0,035%, jauh lebih sedikit dari metode dalam penelitian ini (>0,135%). Selain itu, metode tersebut kurang efisien karena menggunakan gelombang ultrasonik yang membutuhkan energi lebih tinggi, investasi yang relatif mahal, desain alat yang rumit, dan proses produksinya memerlukan perhatian lebih dari aspek keamanan karena penggunaan gelombang energi ultrasonik.

Metode fraksinasi ataupun ekstraksi dengan menggunakan HSM juga terbukti efektif untuk sampel tanaman atau bahan alam lain. Sebelumnya, Kwak *et al.*<sup>26</sup> menunjukkan bahwa HSM efektif digunakan dalam pemisahan lemak dari alga hijau. Temuan terkini juga menunjukkan efektivitas HSM dalam memisahkan karbohidrat berbobot molekul rendah dalam serbuk umbi ketela pohon.<sup>27</sup> Hasil penelitian ini dapat diterapkan pada proses produksi obat tradisional dengan bahan baku daun *F. septica* atau diterapkan lebih luas pada bahan baku ekstrak tumbuhan lain dengan tujuan memperbanyak kandungan senyawa aktif dalam fraksi atau ekstrak. Penelitian ini juga menegaskan bahwa HSM dapat diaplikasikan dalam proses ekstraksi dan fraksinasi untuk memproduksi FTLH atau produk lain sebagaimana juga sudah dilakukan oleh peneliti lain dengan tumbuhan yang berbeda.<sup>9</sup>

## KESIMPULAN

Penelitian ini menunjukkan bahwa penggunaan HSM dengan desain faktorial pada produksi FTLH dari daun awar-awar (*Ficus septica*) dapat menghasilkan kadar alkaloid total 0,1466% atau 1,3 kali lebih besar dari ekstraknya (0,1125%). Kondisi



optimal untuk produksinya adalah pada jumlah pelarut 14,0-14,4 mL/gram ekstrak, lama waktu fraksinasi 2,5-2,7 menit, dan kekuatan pengadukan 3000 rpm.

### UCAPAN TERIMAKASIH

Penelitian ini dibiayai oleh Lembaga Pengelola Dana Pendidikan (LPDP) melalui skema pendanaan penelitian Risperone Invitasi dengan nomor SK: Kep-85/LPDP/2019. Penulis mengucapkan terima kasih yang sebesar-besarnya kepada PT. Konimex Pharmaceutical Laboratories, Solo, yang telah menyediakan alat *high-shear mixer* Ultra-turax® dan fasilitas pendukung penelitian ini.

### DAFTAR RUJUKAN

1. Syamsuhidayat SS, Hutapea JR. Inventaris tanaman obat indonesia. 2 ed. Jakarta: Kementerian Kesehatan RI; 2013.
2. Nugroho AE, Akbar FF, Wiyani A, Sudarsono. Cytotoxic effect and constituent profile of alkaloid fractions from ethanolic extract of *Ficus septica* burm. f. leaves on T47D breast cancer cells. *Asian Pacific journal of cancer prevention* : APJCP. 2015;16(16):7337-42.
3. Nugroho AE, Ikawati M, Hermawan A, Putri DDP, Meiyanto E. cytotoxic effect of ethanolic extract fractions of indonesia plant *Ficus septica* burm. f. on human breast cancer T47D cell lines. *International Journal of Phytomedicine*. 2011;3(2):216-26.
4. Wu PL, Rao KV, Su CH, Kuoh CS, Wu TS. Phenanthroindolizidine alkaloids and their cytotoxicity from the leaves of *Ficus septica*. *Heterocycles*. 2002;57(12):2401-8.
5. Pratama NP, Wulandari S, Nugroho AE, Fakhrudin N, Astuti P, Sudarsono. Tylophorine abrogates G2/M arrest induced by doxorubicin and promotes increased apoptosis in T47D breast cancer cells. *Asian Pacific journal of cancer prevention* : APJCP. 2018;19(11):3065-9.
6. Ridho MH, Gani AP, Wahyuono S, Fakhrudin N. Application of ultrasonic-assisted fractionation with full-factorial design for the production of alkaloid-rich fraction from *Ficus septica* Leaves. *Journal of Food and Pharmaceutical Sciences*. 2020;8(3).
7. Nugroho AE, Hermawan A, Putri DD, Novika A, Meiyanto E, Kawaichi M. Combinational effects of hexane insoluble fraction of *Ficus septica* Burm. F. and doxorubicin chemotherapy on T47D breast cancer cells. *Asian Pac J Trop Biomed*. 2013;3(4):297-302.
8. Zhang J, Xu S, Li W. High shear mixers: A review of typical applications and studies on power draw, flow pattern, energy dissipation and transfer properties. *Chemical Engineering and Processing: Process Intensification*. 2012;57-58:25-41.
9. Xu W-J, Zhai J-W, Cui Q, Liu J-Z, Luo M, Fu Y-J, et al. Ultra-turrax based ultrasound-assisted extraction of five organic acids from honeysuckle (*Lonicera japonica* Thunb.) and optimization of extraction process. *Separation and Purification Technology*. 2016;166:73-82.
10. Kwak M, Roh S, Yang A, Lee H, Chang YK. High shear-assisted solvent extraction of lipid from wet biomass of *Aurantiochytrium* sp. KRS101. *Separation and Purification Technology*. 2019;227:115666.
11. Baldyga J, Jasinska M, Kotowicz M. Mass transfer, micromixing and chemical reactions carried out in the rotor-stator mixer. *Chemical Engineering Transactions*. 2017; 57:1321-6.
12. Wu J, Yu D, Sun H, Zhang Y, Zhang W, Meng F, et al. Optimizing the extraction of anti-tumor alkaloids from the stem of *Berberis amurensis* by response surface methodology. *Industrial Crops and Products*. 2015;69:68-75.
13. Akbar MA. Pengaruh kecepatan ultra turrax® terhadap karakter submikro partikel poly(lactic co-glycolic acid) pembawa rifampisin dengan polyvinyl alcoholskripsi. Indralaya: Universitas Sriwijaya; 2017.
14. Fukuda IM, Pinto CFF, Moreira- C, Saviano Am, Lourenço FR. Design of experiments (DoE) applied to pharmaceutical and analytical quality by design (QbD). *Brazilian Journal of Pharmaceutical Sciences*. 2018;54.
15. Oliveira M, Lima V, Yamashita S, Alves P, Portella A. Experimental planning factorial: a brief review. *International Journal of Advanced Engineering*

- Research and Science. 2018;5(6):166-77.
16. Lailiana Garna N, Agung Endro N, Bambang R, Sudarsono S, Nanang F. Antiangiogenesis activity study of awar-awar leaf ethanolic extract (*Ficus Septica* Burm. F.) by chick chorioallantoic membrane method. *Indonesian Journal of Pharmacy*. 2021;32(1).
  17. Brechú-Franco AE, Laguna-Hernández G, De la Cruz-Chacón I, González-Esquina AR. In situ histochemical localisation of alkaloids and acetogenins in the endosperm and embryonic axis of *Annona macrophyllata* Donn. Sm. seeds during germination. *Eur J Histochem*. 2016;60(1):2568-.
  18. Karthika K, Paulsamy S. TLC and HPTLC Fingerprints of various secondary metabolites in the stem of the traditional medicinal climber, *Solena amplexicaulis*. *Indian journal of pharmaceutical sciences*. 2015;77(1):111-6.
  19. Qarah NAS, Basavaiah K, Swamy N. Sensitive and selective extraction-free spectrophotometric assay of chloroquine phosphate in pharmaceuticals based on ion-pair reaction with bromocresol green and bromocresol purple. *Pharmaceutica Analytica Acta*. 2017;8(3):1-9.
  20. Abubakar A, Haque M. Preparation of medicinal plants: Basic extraction and fractionation procedures for experimental purposes. 2020;12(1):1-10.
  21. Nugroho AE, Hermawan A, Nastiti K, Suven, Elisa P, Hadibarata T, et al. Immunomodulatory effects of hexane insoluble fraction of *Ficus septica* Burm. F. in doxorubicin-treated rats. *Asian Pacific journal of cancer prevention : APJCP*. 2012;13(11):5785-90.
  22. Ajanal M, Gundkalle MB, Nayak SU. Estimation of total alkaloid in *Chitrakadivati* by UV-Spectrophotometer. *Anc Sci Life*. 2012;31(4):198-201.
  23. Hikmah NN. Optimasi ekstraksi biji kedelai (*Glycine max* (L.) Merr) terhadap kandungan stigmasterol menggunakan response surface methodology. Yogyakarta: UGM; 2017.
  24. Zou L, Lu F, Lin B, Zhou Y, Liu T, Sun Y. Stability of alkaloids during drying process and their effect on anticoagulating activity of *uncariae ramulus cum uncis*. *Journal of Analytical Methods in Chemistry*. 2019;2019:7895152.
  25. Fui-Seung C, Khim-Phin C, Atong M, Nyet Kui W. Tea polyphenols and alkaloids content using soxhlet and direct extraction methods. *World Journal of Agricultural Sciences* 2013;9(3):266-70.
  26. Kwak M, Kang SG, Hong WK, Han JI, Chang YK. Simultaneous cell disruption and lipid extraction of wet *aurantiochytrium* sp. KRS101 using a high shear mixer. *Bioprocess and biosystems engineering*. 2018;41(5):671-8.
  27. Airlangga B, Puspasari F, Trisanti PN, Juwari, Sumarno. Structural properties change of cassava starch granule induced by high shear mixer. *Starch-Starke*. 2020;72(11-12):2000004.