

**ISOLASI DAN KARAKTERISASI FLAVONOID DARI DAUN
BELIMBING (*Averrhoa carambola* Linn.L)**

SKRIPSI

*Diajukan sebagai salah satu persyaratan guna memperoleh
Gelar Sarjana Sains*



Oleh :
RIDO ARDIANTO
73303/2006

**PROGRAM STUDI KIMIA
JURUSAN KIMIA
FAKULTAS MATEMATIKA DAN ILMU PENGETAHUAN ALAM
UNIVERSITAS NEGERI PADANG
2013**

PERSETUJUAN SKRIPSI

Isolasi dan Karakterisasi Flavonoid dari Daun Belimbing

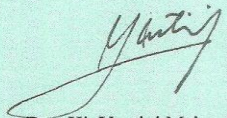
(*Averrhoa carambola* Linn.L)

Nama : Rido Ardianto
NIM/BP : 73303/2006
Program Studi : Kimia
Jurusan : Kimia
Fakultas : Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam

Padang, 24 Juli 2013

Disetujui oleh:

Pembimbing I,



Dra. Hj. Yustini Ma'aruf, M.Si

NIP. 19500819 198010 2 001

Pembimbing II,



Dra. Sri Benti Etika, M.Si

NIP. 19620913 198803 2 002

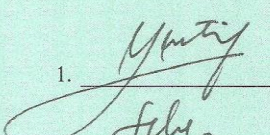
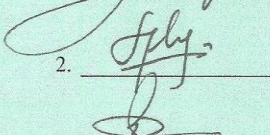
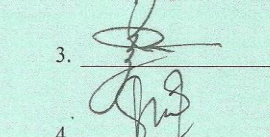
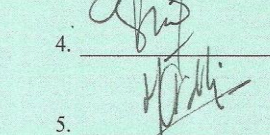
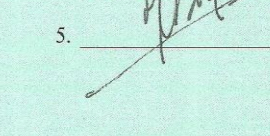
PENGESAHAN

Dinyatakan lulus setelah dipertahankan di depan Tim Penguji Skripsi Program Studi Kimia Jurusan Kimia Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam Universitas Negeri Padang

Judul : Isolasi dan Karakterisasi Flavonoid dari Daun Belimbing
(*Averrhoa carambola* Linn.L)
Nama : Rido Ardianto
NIM/BP : 73303/2006
Program Studi : Kimia
Jurusan : Kimia
Fakultas : Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam

Padang, 24 Juli 2013

Tim Penguji

Nama	Tanda Tangan
1. Ketua : Dra. Hj. Yustini Ma'aruf, M.Si	1. 
2. Sekretaris : Dra. Sri Benti Etika, M.Si	2. 
3. Anggota : Drs. H. Nazulis Z, M.Si	3. 
4. Anggota : Dra. Hj. Isniyetti, M.Si	4. 
5. Anggota : Dr. Hardeli, M.Si	5. 

Kata Persembahan

Bismillahirrahmanirrahim

*Skripsi ini saya persembahkan untuk kedua orang tua saya tercinta :
Ayahanda Suhardi (alm) & Ibunda Artini*

Dan terima kasih kepada Bapak Muzardi S.E atas bantuannya selama ini.

Rido Ardianto, S.Si

SURAT PERNYATAAN

Dengan ini saya menyatakan bahwa skripsi ini benar-benar karya saya sendiri. Sepanjang pengetahuan saya tidak terdapat karya atau pendapat yang ditulis atau diterbitkan orang lain kecuali sebagai acuan atau kutipan dengan mengikuti tata penulisan karya ilmiah yang lazim.

Padang, 24 Juli 2013
Yang menyatakan,

Rido Ardianto

ABSTRAK

Rido Ardianto,2013 : “Isolasi dan Karakterisasi Flavonoid dari Daun Belimbing (*Averrhoa carambola* Linn.L)”

Telah dilakukan penelitian tentang isolasi dan karakterisasi flavonoid dari daun belimbing (*Averrhoa carambola* Linn.L). Sebanyak 393 g ekstrak kental metanol diperoleh dari 5 kg daun segar belimbing. Ekstrak metanol tersebut ditambahkan air panas. selanjutnya difraksinasi berturut-turut dengan pelarut n-heksana dan etil asetat, sehingga menghasilkan 4000 ml fraksi n- heksana dan 5000 ml fraksi etil asetat. Uji fitokimia flavonoid dari hasil fraksinasi menunjukan fraksi n-heksana negatif, fraksi etil asetat dan fraksi air positif flavonoid. Hasil pemisahan dengan kromatografi kolom ekstrak pekat fraksi etil asetat dihasilkan 6 fraksi, yaitu fraksi A, B, C, D, E dan F. Karakterisasi dengan menggunakan lampu UV memberikan warna coklat sebelum kromatogram diuapi amonia dan memberikan warna hijau coklat tua setelah diuapi dengan amonia. Berdasarkan literatur yang ada diduga dalam fraksi B terdapat flavon glikosida, biflavonil atau flavon yang tersulih tak biasa.

KATA PENGANTAR

Puji syukur penulis haturkan kehadiran Allah SWT yang telah melimpahkan rahmat dan karunia-Nya kepada penulis sehingga penulis dapat menyelesaikan skripsi yang berjudul **“Isolasi dan Karakterisasi Flavonoid dari Daun Belimbing (*Averrhoa carambola* Linn.L)”**. Skripsi ini merupakan salah satu syarat yang harus dipenuhi untuk mendapatkan gelar sarjana sains pada Jurusan Kimia Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam Universitas Negeri Padang.

Pada kesempatan ini penulis mengucapkan terima kasih kepada semua pihak yang telah membantu dan membimbing penulis dalam penulisan skripsi ini. Secara khusus penulis mengucapkan terima kasih kepada:

1. Ibu Dra. Hj. Yustini Ma'aruf, M.Si. selaku Dosen Penasehat Akademik dan Pembimbing I.
2. Ibu Dra. Sri Benti Etika, M.Si. sebagai Pembimbing II.
3. Bapak Drs. H. Nazulis Z, M.Si., Ibu Dra. Hj. Isniyeti, M.Si. dan Bapak Dr. Hardeli, M.Si. sebagai Tim Penguji Skripsi
4. Ibu Dra. Andromeda, M.Si dan Bapak Drs. Bahrizal, M.Si selaku Ketua dan Sekretaris Jurusan Kimia FMIPA UNP.
5. Bapak Budhi Oktavia, M.Si, Ph.D selaku Ketua Program Studi Kimia FMIPA UNP.
6. Bapak dan Ibu Dosen Jurusan Kimia FMIPA Universitas Negeri Padang.

7. Bapak dan Ibu Laboran Jurusan Kimia FMIPA Universitas Negeri Padang.
8. Rekan - rekan mahasiswa Universitas Negeri Padang, terutama Jurusan Kimia.

Semoga bantuan dan bimbingan yang Bapak, Ibu dan teman-teman berikan menjadi amal kebaikan dan mendapat balasan yang sesuai dari Allah SWT.

Penulis menyadari keterbatasan ilmu yang dimiliki, karena itu demi kesempurnaan skripsi ini, penulis mengharapkan saran dan masukan dari pembaca. Atas saran dan masukan yang diberikan penulis ucapkan terima kasih.

Padang, Juli 2013

Penulis

DAFTAR ISI

KATA PENGANTAR	i
DAFTAR ISI	ii
DAFTAR GAMBAR.....	iv
DAFTAR TABEL.....	v
DAFTAR LAMPIRAN	vi
 BAB I PENDAHULUAN	
A. Latar Belakang	1
B. Rumusan Masalah	2
C. Batasan Masalah.....	2
D. Tujuan Penelitian	2
E. Manfaat Penelitian	3
 BAB II TINJAUAN PUSTAKA	
A. Botani Tumbuhan	4
B. Flavonoid	6
C. Identifikasi Flavonoid	10
D. Metode Ekstraksi.....	11
E. Pemisahan Komponen Kimia	12
F. Rekristalisasi	15
G. Uji Kemurnian	15
H. Karakterisasi	16
 BAB III METODOLOGI PENELITIAN	
A. Jenis, Tempat, dan Waktu Penelitian.....	25

B. Sampel Penelitian	25
A. Alat dan Bahan.....	25
B. Prosedur Peneliatian	26
BAB IV HASIL DAN PEMBAHASAN	35
A. Hasil	35
B. Pembahasan.....	37
BAB V KESIMPILAN DAN SARAN	41
A. Kesimpulan	41
B. Saran	41
DAFTAR PUSTAKA	

DAFTAR GAMBAR

Gambar	Halaman
1. Kerangka Dasar Flavonoid	6
2. Jenis Flavonoid Berdasarkan Susunan Kerangka Atom Karbon	7
3. Jenis Utama dan Struktur Dasar Flavonoid Alam	7
4. Struktur Kaemferol	8
5. Apigenin 7-O- β -D-glukopiranosida	8
6. Apigenin 8-C- β -D-glukopiranosida	9
7. Plat Kromatografi Lapis Tipis pada Lempengan Alumina	13
8. Kromatogram Flavonoid yang dikembangkan dengan TBA/HOAc 15% ..	18
9. Spektrum Luteolin pada Penambahan AlCl_3/HCl	24

DAFTAR TABEL

Tabel	Halaman
1. Warna Flavonoid dengan Beberapa Pereaksi	16
2. Daftar Frekuensi Serapan Inframerah beberapa Gugus Fungsi	20
3. Rentangan Serapan Spektrum UV-Vis Flavonoid	22
4. Perbandingan dan Volume Eluen untuk Kromatografi Kolom	30
5. Hasil Uji Kandungan Metabolit Sekunder pada Daun Belimbing (<i>Averrhoa carambola</i> Linn.L)	35
6. Warna Kromatogram Eluet dengan Sinar / Lampu UV	36
7. Warna Eluet dengan Pereaksi Warna	37

DAFTAR LAMPIRAN

Lampiran	Halaman
1. Gambar Daun Belimbing (<i>Averrhoa carambola</i> Linn.L).....	42
2. Skema Kerja Isolasi dan Karakterisasi Flavonoid	43
3. Kromatogram KKt 2A Daun Belimbing (<i>Averrhoa carambola</i> Linn.L)	48
4. Spektrum FTIR Daun Belimbing (<i>Averrhoa carambola</i> Linn.L)	46
5. Spektrum UV-Vis Daun Belimbing (<i>Averrhoa carambola</i> Linn.L)	47

BAB I

PENDAHULUAN

A. Latar Belakang

Indonesia merupakan salah satu negara yang kaya akan keanekaragaman hayati dan sangat potensial dalam mengembangkan obat herbal yang berbasis pada tumbuhan. Keanekaragaman hayati dapat juga dipandang sebagai keanekaragaman kimiawi yang mampu menghasilkan bahan-bahan kimia baik untuk kebutuhan manusia maupun untuk organisme lain seperti untuk obat-obatan, insektisida, kosmetika dan sebagai bahan dasar sintesis senyawa organik yang lebih bermanfaat (Dorly, 2005: 1).

Flavonoid adalah golongan fenol alam yang tersebar luas dalam tumbuhan yang terdapat pada tumbuhan angiospermae, gymnospermae, dan pteridopita. Flavonoid ini memberikan efek fisiologis dan farmakologis terhadap makhluk hidup. Pada tumbuhan, flavonoid berfungsi sebagai zat warna, pengatur tumbuh, penangkal serangan penyakit dan sebagai penanda (markers) dalam mengklasifikasi tumbuhan (Bakhtiar, 1992: 91 – 96).

Salah satu tumbuhan yang mengandung flavonoid dan dapat dimanfaatkan sebagai obat adalah tanaman belimbing (*Averhoa carambola* Linn.L). Tanaman belimbing ditanam sebagai pohon buah, kadang tumbuh liar dan ditemukan dari dataran rendah sampai 500 m di atas permukaan laut (dpl). Buah belimbing sangat bermanfaat. Selain itu, pada bunga, daun, dan akarnya diyakini memiliki khasiat untuk obat anti malaria, maag, bisul, rematik dan lain-lain. Akar belimbing manis juga berkhasiat untuk menyembuhkan sakit kepala

dan nyeri persendian. Sedangkan daunnya dapat digunakan untuk mengatasi radang lambung, radang kulit bernanah, dan bisul (Nature Indonesia Singapore, 2008: 5 – 8). Dari penelusuran informasi di internet atau perpustakaan UNP dan UNAND yang telah dilakukan, belum ada ditemukan laporan tentang penelitian terhadap senyawa metabolit sekunder dari daun belimbing.

Uji pendahuluan terhadap daun belimbing yang diambil dari Kelurahan Piai Tengah Kecamatan Pauh Kota Padang, ternyata positif mengandung flavonoid dan saponin. Berdasarkan uraian di atas maka penulis tertarik untuk melakukan isolasi dan karakterisasi flavonoid dari daun belimbing.

B. Perumusan Masalah

Yang menjadi permasalahan dalam penelitian ini adalah

1. Apakah flavonoid yang terdapat pada daun belimbing dapat diisolasi ?
2. Bagaimana karakterisasi senyawa flavonoid hasil isolasi tersebut ?

C. Pembatasan Masalah

Adapun yang menjadi batasan masalah dalam penelitian ini adalah:

1. Ekstraksi dilakukan dengan teknik maserasi.
2. Uji kemurnian dari senyawa hasil isolasi dilakukan dengan Kromatografi Lapis Tipis (KLT) dan penentuan titik leleh.
3. Karakterisasi dari senyawa hasil isolasi dilakukan dengan pereaksi warna, spektroskopi inframerah dan spektroskopi UV-Vis.

D. Tujuan Penelitian

Penelitian ini bertujuan untuk mengisolasi dan mengetahui karakteristik senyawa flavonoid dari daun belimbing.

E. Manfaat Penelitian

Dari hasil penelitian yang dilakukan diharapkan dapat:

1. Mengetahui cara isolasi flavonoid dari daun belimbing
2. Memberikan informasi jenis-jenis flavonoid yang terdapat dalam daun belimbing.

BAB II

TINJAUAN PUSTAKA

A. Botani Tumbuhan

1. Klasifikasi

Berdasarkan hasil identifikasi dari herbarium Universitas Andalas (UNAND), tumbuhan ini dapat diklasifikasikan sebagai berikut:

Kingdom	: Plantae (Tumbuhan)
Subkingdom	: Tracheobionta (Tumbuhan berpembuluh)
Super Divisi	: Spermatophyta (Menghasilkan biji)
Divisi	: Magnoliophyta (Tumbuhan berbunga)
Kelas	: Magnoliopsida (berkeping dua/dikotil)
Sub Kelas	: Rosidae
Ordo	: Geraniales
Famili	: Oxalidaceae (suku belimbing-belimbingan)
Genus	: <i>Averrhoa</i>
Spesies	: <i>Averrhoa carambola</i> Linn. L

2. Deskripsi, Kegunaan dan Kandungan

Belimbing adalah tumbuhan penghasil buah berbentuk khas yang berasal dari Indonesia, India, dan Sri Lanka. Pohon ini memiliki daun majemuk yang panjangnya dapat mencapai 50 cm, bunga berwarna merah muda yang umumnya muncul di ujung dahan. Pohon ini bercabang banyak dan dapat tumbuh hingga mencapai 5 m. Tidak seperti tanaman tropis lainnya, pohon belimbing tidak memerlukan banyak sinar matahari. Ditanam sebagai

pohon buah, kadang tumbuh liar dan ditemukan dari dataran rendah sampai 500 m dpl. Daun berupa daun majemuk menyirip ganjil dengan 21 – 45 pasang anak daun. Anak daun bertangkai pendek, bentuknya bulat telur sampai jorong, ujung runcing, pangkal membulat, tepi rata, panjang 2 – 10 cm, lebar 1 – 3 cm, warnanya hijau, permukaan bawah hijau muda. Perbungaan berupa malai, berkelompok, keluar dari batang atau percabangan yang besar, bunga kecil-kecil berbentuk bintang warnanya ungu kemerahan. Buahnya buah buni, bentuknya bulat lonjong bersegi, panjang 4 – 6,5 cm, warnanya hijau kekuningan, bila masak berair banyak, rasanya asam. Biji bentuknya bulat telur, gepeng.

Buah belimbing berwarna kuning kehijauan. Saat baru tumbuh, buahnya berwarna hijau. Jika dipotong, buah ini mempunyai penampang yang berbentuk bintang. Biji kecil dan berwarna coklat. Buah ini renyah saat dimakan, rasanya manis dan sedikit asam. Buah ini mengandung banyak vitamin C.

Orang yang bermasalah pada ginjalnya harus menghindari konsumsi buah ini karena mengandung asam oksalat. Jus yang terbuat dari belimbing lebih berbahaya karena konsentrasi asamnya yang lebih tinggi. Orang yang memiliki kolesterol tinggi atau penderita diabetes juga harus menghindari buah ini, karena kandungan gulanya yang tinggi (Nature Indonesia Singapore, 2008: 5 – 8).

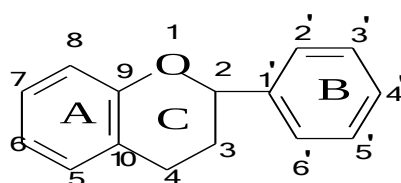
Rasa buahnya asam, digunakan sebagai sirop penyegar, bahan penyedap masakan, membersihkan noda pada kain, mengkilapkan barang-

barang yang terbuat dari kuningan, membersihkan tangan yang kotor atau sebagai bahan obat tradisional. Perbanyak dengan biji dan cangkok.

B. Flavonoid

Flavonoid adalah suatu kelompok senyawa fenol terbesar yang ditemukan di alam. Senyawa ini merupakan zat warna merah, ungu, biru, dan sebagian zat warna kuning. Ditemukan dalam tumbuh-tumbuhan bahkan semua tumbuhan hijau mengandung flavonoid (Achmad, 1986: 2).

Golongan flavonoid digambarkan sebagai deretan senyawa C₆–C₃–C₆, artinya kerangka karbon terdiri dari gugus C₆ (cincin benzen tersubstitusi) disambung oleh rantai karbon alifatik agar memudahkan cincin diberi tanda A, B, C. Atom karbon dinomori menurut sistem penomoran angka biasa untuk cincin A dan C, serta angka beraksen untuk cincin B, seperti diperlihatkan pada gambar 1.

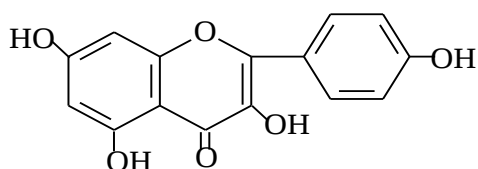


Gambar 1. Kerangka Dasar Flavonoid (Markham, 1988: 3)

1. Klasifikasi Flavonoid

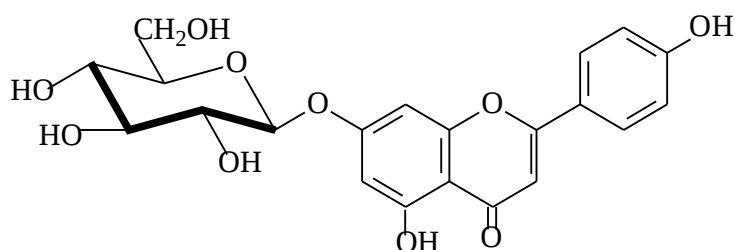
Dari kerangka dasar flavonoid dapat menghasilkan 3 jenis struktur yaitu: 1,3-diarilpropan atau flavonoid, 1,2-diaril propan atau isoflavonoid, dan 1,1-diaril propan atau neoflavonoid. Ketiga kerangka dapat dilihat dalam gambar 2.

1. Aglikon flavonoid adalah flavonoid yang tidak mengandung molekul gula dalam senyawanya, dengan kerangka dasar yang terdapat di alam seperti flavon, flavonol, antosianidin, khalkon, auron, dll. Contohnya:



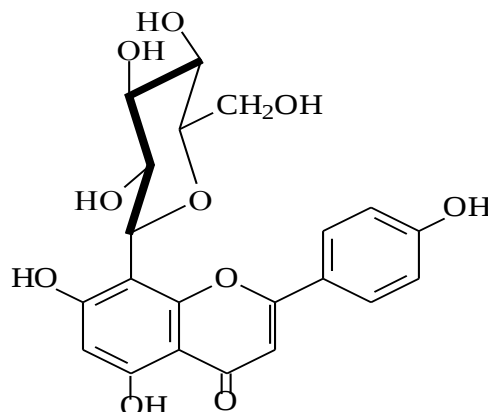
Gambar 4. Struktur Kaemferol. (Markham, 1988: 4)

2. Glikosida flavonoid, yaitu flavonoid yang mengandung molekul gula dalam senyawanya. Berdasarkan dimana terikatnya molekul gula dalam kerangka karbon flavonoid, maka glikosida flavonoid dibedakan atas:
 - a. Flavonoid O-glikosida; pada senyawa tersebut satu atau lebih gugus hidroksil flavonoid terikat pada satu molekul gula atau lebih dengan ikatan C-O yang tak tahan asam (akan terurai menjadi aglikon dan molekul gula oleh hidrolisis). Contoh :



Gambar 5. Apigenin 7-O-β-D-glukopiranosida (Markham, 1988: 6)

- b. Flavonoid C-glikosida; molekul gula terikat langsung pada inti benzena dengan suatu ikatan C-C yang tahan asam (tak terurai oleh hidrolisis). Contoh:



Gambar 6. Apigenin 8-C- β -D-glukopiranosida (Markham, 1988: 7)

2. Sifat Fisika dan Kimia Flavonoid

Flavonoid merupakan senyawa polar karena mempunyai sejumlah gugus hidroksil atau suatu gula, sehingga dapat larut dalam pelarut polar seperti etanol (EtOH), metanol (MeOH), butanol (BuOH), aseton, dimetil sulfoksida (DMSO), dimetilformamida (DMF), dan air. Adanya gugus gula yang terikat pada flavonoid menyebabkannya mudah larut dalam air, jadi flavonoid dalam bentuk glikosida lebih mudah larut dalam campuran air dengan pelarut polar. Sebaliknya aglikon yang kurang polar seperti isoflavan, flavanon, dan flavon serta flavonol yang termetoksilasi cenderung lebih mudah larut dalam pelarut yang semi polar seperti eter dan kloroform. Flavonoid merupakan suatu polifenol, sehingga mempunyai sifat kimia seperti senyawa fenol yaitu bersifat agak asam dan dapat larut dalam basa (Markham, 1988: 15).

3. Fungsi Flavonoid

Flavonoid berfungsi sebagai pengatur tumbuh, dan fotosintesis. Bagi organisme lain flavonoid merupakan senyawa pereduksi yang baik,

menghambat reaksi oksidasi, baik secara enzim maupun non enzim. Flavonoid bertindak sebagai penampung yang baik radikal hidroksi dan superoksida, dengan demikian melindungi lipid membran terhadap reaksi yang merusak. Aktifitas antioksidannya dapat menjelaskan mengapa flavonoid tertentu merupakan komponen aktif tumbuhan yang digunakan secara tradisional untuk mengobati gangguan fungsi hati (Robinson, 1995).

Flavonoid mencakup banyak pigmen yang umum terdapat pada dunia tumbuhan mulai dari fungus sampai angiospermae. Flavonoid sebagai pigmen bunga berperan dalam menarik burung dan serangga penyerbuk bunga. Flavonoid dapat menyerap sinar UV dan berfungsi sebagai pengatur tumbuh, pengatur fotosintesis, anti mikroba, antivirus (Robinson, 1995: 191 – 192).

4. Sumber Flavonoid.

Flavonoid terdapat pada semua tumbuhan berpembuluh dimana kandungannya berbeda-beda, satu kelas bisa mengandung lebih banyak dari yang lain. Pada tumbuhan tinggi flavonoid terdapat baik dalam bagian vegetatif maupun generatif (Robinson, 1995: 191).

C. Identifikasi Flavonoid

Metode yang digunakan untuk mengidentifikasi senyawa flavonoid adalah Shinoda test: kira-kira 0,5 gram sampel yang telah dirajang halus, diekstrak dengan metanol dan dipanaskan selama 5 menit dalam tabung reaksi. Ekstraknya ditambahkan beberapa tetes HCl pekat dan sedikit serbuk Mg. Jika terbentuk warna merah/pink atau kuning menunjukkan sampel mengandung flavonoid (Theresia, 1988: 25).

D. Metode Ekstraksi

Ekstraksi adalah proses penarikan komponen/zat aktif suatu simplisia dengan menggunakan pelarut tertentu. Prinsip ekstraksi adalah melarutkan senyawa polar dalam pelarut polar dan senyawa non polar dalam senyawa non polar. Secara umum ekstraksi dilakukan secara berturut-turut mulai dengan pelarut non polar (n-heksan) lalu pelarut yang kepolarannya menengah (diklor metan atau etilasetat) kemudian pelarut yang bersifat polar (metanol atau etanol) (Harborne, 1987).

Ekstraksi merupakan metode yang lazim digunakan untuk mengisolasi komponen kimia tertentu dalam jaringan tumbuhan atau hewan yang menggunakan pelarut tertentu sehingga komponen kimia yang diinginkan terekstrak dalam pelarut. Beberapa metode ekstraksi senyawa organik bahan alam yang umum digunakan antara lain:

1. Perkolasi

Perkolasi dilakukan dengan menggunakan alat perkulator, dimana pelarut dilewatkan perlahan-lahan (tetes demi tetes) kepada bahan alam yang mengandung senyawa organik tersebut. Teknik perkolasi ini menggunakan pelarut yang tidak mudah menguap dan tidak mempunyai bau yang merangsang tapi dapat melarutkan senyawa organik lebih baik. Teknik ini digunakan jika persentase senyawa organik yang terdapat dalam bahan alam cukup besar (Darwis, 2000: 13).

2. Maserasi

Maserasi digunakan jika senyawa organik yang ada dalam tumbuhan cukup banyak, dengan menggunakan suatu pelarut yang dapat melarutkan senyawa organik tersebut tanpa pemanasan. Metode maserasi merupakan proses perendaman sampel dengan pelarut organik yang dilakukan pada temperatur ruangan. Proses ini sangat menguntungkan dalam isolasi bahan alam karena dengan perendaman sampel tumbuhan akan terjadi pemecahan dinding dan membran sel akibat perbedaan tekanan antara didalam dan diluar sel sehingga metabolit sekunder yang ada dalam sitoplasma akan terlarut dalam pelarut organik dan ekstraksi senyawa akan sempurna karena dapat diatur lama perendaman yang dilakukan (Darwis, 2000: 13).

3. Sokletasi

Pada prinsipnya sokletasi menggunakan pelarut yang mudah menguap atau memiliki titik didih yang rendah dan dapat melarutkan senyawa organik yang terdapat dalam senyawa bahan alam tersebut dalam suhu panas (Manjang, 1985: 6).

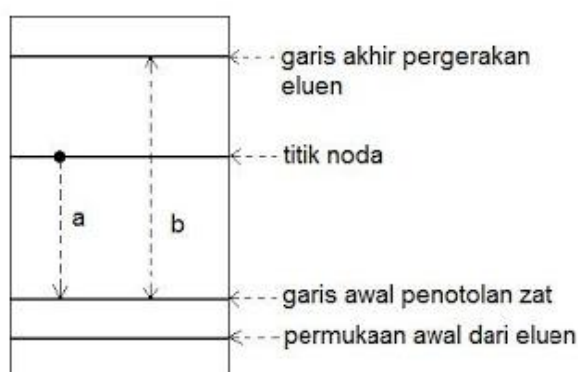
E. Pemisahan Komponen Kimia

1. Kromatografi Lapis Tipis

Kromatografi lapis tipis adalah suatu teknik partisi padat-cair. yang berguna sebagai langkah awal untuk mencari adsorben dan pelarut yang cocok yang melibatkan dua fasa yaitu fasa diam dan fasa gerak (campuran pelarut-pengembang). Fasa diam (adsorben) dapat berupa serbuk halus yang berfungsi sebagai permukaan penyerap (Manjang, 1985: 10 – 11).

Kromatografi lapis tipis digunakan untuk memisahkan senyawa-senyawa yang sifatnya hidrofob seperti lipida-lipida dan hidrokarbon. Sebagai fase diam digunakan senyawa yang tak bereaksi seperti silika gel atau alumina. Silika gel biasa diberi pengikat yang dimaksudkan untuk memberikan kekuatan pada lapisan dan menambah adhesi pada gelas penyokong. Pengikat yang biasa digunakan adalah kalsium sulfat (Sastrohamidjojo, 1991).

Jika noda pada plat KLT tidak berwarna maka dapat ditampakan dengan menyemprotnya memakai pereaksi penampak noda yang sesuai atau dengan menyinari plat KLT memakai sinar ultra violet (Gritter, 1991: 8).



Gambar 7. Plat Kromatografi Lapis Tipis pada Lempengan Alumina (Rahmat, 2010: 1).

Nilai R_f merupakan perbandingan jarak yang ditempuh senyawa dengan jarak yang ditempuh pelarut dan dinyatakan dengan suatu angka desimal:

$$R_f = \frac{\text{jarak yang ditempuh zat}}{\text{jarak yang ditempuh pelarut}}$$

Harga R_f beragam mulai dari 0 sampai 1 (Gritter, 1991: 8).

Harga-harga R_f untuk senyawa-senyawa murni dapat dibandingkan dengan harga standar. Perlu diperhatikan bahwa harga-harga R_f yang

diperoleh hanya berlaku untuk campuran tertentu dari pelarut dan penyerap yang digunakan. (Sastrohamidjojo, 1991: 35).

2. Kromatografi Kolom

Kromatografi cair yang dilakukan di dalam kolom besar merupakan metoda kromatografi terbaik untuk pemisahan campuran dalam jumlah besar (lebih dari 1 g), kadang-kadang cara ini disebut kromatografi cair preparatif (KCP = PLC). Pada kromatografi kolom, campuran yang akan dipisahkan diletakkan berupa pita pada bagian atas kolom penyerap yang berada dalam tabung kaca, tabung logam atau bahkan tabung palstik. Pelarut (fase gerak) dibiarkan mengalir melalui kolom karena aliran yang disebabkan oleh gaya berat atau didorong dengan tekanan. Pita senyawa linarut bergerak melalui kolom dengan laju berbeda, memisah, dan dikumpulkan berupa fraksi ketika keluar dari alas kolom (Gritter, 1991: 160).

Dalam metode ini, campuran senyawa yang akan dipisahkan, diletakkan diatas suatu kolom silinder kaca yang diisi dengan partikel-partikel silika gel sebagai fasa diam. Mula-mula komponen-komponen campuran diadsorb oleh partikel-partikel alumina atau silika gel pada puncak kolom. Aliran kontinyu dari pelarut melalui kolom akan mengelusi, menyebabkan zat terlarut (materi yang akan dipisahkan) turun ke bagian bawah kolom. Senyawa-senyawa dalam campuran tadi akan bergerak melalui kolom dengan laju yang berbeda, komponen akan keluar dan ditampung dengan botol kecil (vial), kemudian dimonitor dengan KLT. Diukur R_f -nya, R_f yang sama

digabung menjadi fraksi-fraksi dan dibiarkan sampai semua pelarut menguap.
(Gritter, 1991: 160)

F. Rekristalisasi

Salah satu metoda yang digunakan untuk pemurnian suatu senyawa adalah dengan cara rekristalisasi. Pada prinsipnya metoda pemurnian dengan rekristalisasi, adalah pengkristalan kembali salah satu baik pengotor ataupun hasil isolasi keduanya dilarutkan dalam suasana panas. Dalam metoda rekristalisi harus dicari satu pelarut atau lebih yang dapat melarutkan pengotor dan hasil isolasi pada suasana panas, tetapi tidak melarutkan keduanya dalam suasana dingin (Manjang, 1985: 8).

G. Uji Kemurnian

Setelah dilakukan pemurnian, hasil isolasi dari pengotor perlu dilakukan pengujian kembali apakah hasil isolasi tersebut sudah murni. Cara yang digunakan untuk menentukan kemurnian hasil isolasi adalah dengan kromatografi lapis tipis dan penentuan titik leleh (Manjang, 1985: 19 – 20).

1. Kromatografi Lapis Tipis (KLT)

Kemurnian hasil isolasi diketahui melalui noda yang dihasilkan pada plat. Jika noda yang dihasilkan tunggal, setelah diganti beberapa pelarut yang lain maka kemungkinan hasil isolasi tersebut sudah murni.

2. Penentuan Titik Leleh

Pada penentuan titik leleh dilakukan pemanasan dua kali, pertama dengan api besar temperatur dinaikkan secara cepat sehingga dapat diketahui kira-kira titik lelehnya. Pada saat berikutnya dilakukan secara

lambat temperatur dinaikkan secara pelan sehingga didapat titik leleh yang lebih teliti. Suatu zat dikatakan murni, kalau range titik leleh tersebut lebih kecil dari 2°C , yang diamati saat mulai meleleh sampai semua zat mencair.

H. Karakterisasi

1. Reaksi Warna

Mereaksikan senyawa flavonoid dengan pelarut tertentu menjadi senyawa berwarna merupakan cara untuk menentukan senyawa flavonoid apakah termasuk flavon, flavonol atau antosianin. Pereaksi yang digunakan adalah larutan NaOH, H_2SO_4 pekat dan Mg-HCl. Dari warna yang dihasilkan dapat diketahui jenis senyawa flavonoid hasil isolasi tersebut seperti yang terlihat pada tabel 2 berikut:

Tabel 1. Warna Flavonoid dengan Beberapa Pereaksi Warna

Jenis flavonoid	NaOH	H_2SO_4 pekat	Mg-HCl
Antosianin	Biru sampai violet	Kekuningan sampai orange	Merah (pink)
Flavon	Kuning	Kuning sampai orange	Kuning sampai merah
Flavonol	Kuning sampai orange	Kuning sampai orange	Merah sampai magenta

Sumber: Finar, 1976: 677.

2. Kromatografi Kertas Dua Arah (KKt-2A)

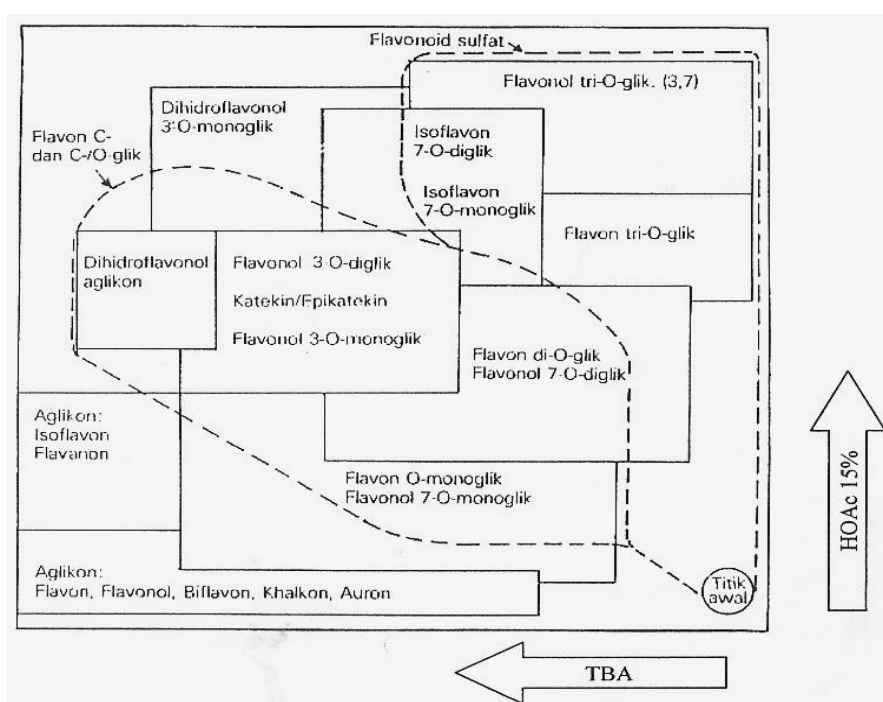
Cara yang paling umum digunakan untuk analisa flavonoid dalam jaringan tumbuhan adalah kromatografi kertas dua arah, dimana

prinsipnya adalah mengelusi campuran komponen dengan dua macam pelarut yang kepolarannya berbeda. Pelarut pengelusi yang digunakan adalah BAA ($n\text{-BuOH} : \text{HOAc} : \text{H}_2\text{O} = 4 : 1 : 5$) sebagai pengembang pertama dan asam asetat 15% sebagai pengembang kedua. Kertas yang digunakan adalah kertas Whatman 3 MM (46 x 57 cm). Ekstrak tumbuhan ditotolkan pada kertas disuatu titik kira-kira 8 cm dari tepi kertas dan 3 cm dari lipatan akhir. Kertas dicelupkan kedalam larutan pengembang pertama (BAA) dengan digantung tegak lurus didalam bejana sehingga larutan pengembang bergerak keatas. Setelah larutan pengembang sampai pada garis batas, kertas diangkat dari bejana kromatografi dan dikeringkan dalam lemari asam. Kertas kromatogram yang telah kering dideteksi dengan lampu UV pada panjang gelombang (366 nm, bukan 254 nm). Kemudian posisi kertas diputar 90°C dari posisi awal dan dicelupkan ke bejana lain yang berisi larutan pengembang asam asetat 15%. Elusi larutan pengembang sampai pada garis batas, kertas diangkat dari bejana kromatografi dan dikeringkan dalam lemari asam. Kertas kromatogram yang telah kering dideteksi dengan lampu UV pada panjang gelombang 366 nm dan noda diberi tanda dengan pensil (Markham, 1988: 17 – 19).

Kebanyakan flavonoid tidak terlihat pada kromatogram kertas, kecuali antosianin (bercak jingga sampai lembayung yang menjadi biru bila diuapi NH_3) dan khalkon, auron dan 6-hidroksi flavonol (kuning). Karena alasan tersebut untuk mendeteksi bercak, kromatogram diperiksa

dengan sinar UV (366 nm, bukan 254 nm). Untuk meningkatkan kepekaan deteksi dan menghasilkan perubahan warna pada kertas kromatogram maka kertas kromatogram yang sudah kering diuapi dengan NH_3 (Markham, 1988: 19).

Petunjuk untuk menentukan jenis flavonoid tertentu dengan menggunakan kondisi kromatografi baku dapat dilihat pada gambar 8.



Gambar 8. Kromatogram Flavonoid yang dikembangkan dengan TBA/HOAc 15% (Markham, 1988: 22).

3. Spektroskopi Inframerah

Spektroskopi inframerah adalah studi yang mempelajari interaksi antara sinar inframerah dengan materi yang akan menghasilkan suatu spektrum, dimana sinar inframerah menyebabkan kenaikan energi vibrasi suatu molekul. Spektroskopi inframerah berguna untuk menentukan gugus fungsi suatu senyawa organik. Penggunaan spektroskopi inframerah pada bidang kimia

organik menggunakan daerah dari $650 - 4000 \text{ cm}^{-1}$ ($15,4 - 2,5 \text{ }\mu\text{m}$). Bila sinar inframerah dilewatkan melalui senyawa organik, maka sejumlah frekuensi diserap sedang frekuensi yang lain diteruskan (Sastroamidjojo, 1991: 1 – 4).

Radiasi inframerah merupakan radiasi yang berenergi relatif rendah. Absorpsi radiasi inframerah oleh suatu molekul mengakibatkan naiknya vibrasi ikatan-ikatan kovalen, dimana inti-inti atom yang terikat oleh ikatan kovalen mengalami getaran (vibrasi) atau osilasi. Bila molekul menyerap radiasi inframerah, energi yang diserap menyebabkan kenaikan dalam amplitudo getaran atom-atom yang terikat, molekul ini dikatakan berada dalam keadaan vibrasi tereksitasi. Keadaan vibrasi dari ikatan terjadi pada keadaan tetap atau terkuantitas, tingkat-tingkat energi.

Tabel 2. Daftar Frekuensi Serapan Inframerah beberapa Gugus Fungsi

Gugus fungsi	Frekuensi cm^{-1}
C=C - Alkena	1680-1600
- Aromatik	1600-1475
C $\equiv$ C - Alkuna	2250-2100
C=O - Aldehid	1740-1720
- Keton	1725-1705
- Asam karboksilat	1725-1700
- Ester	1750-1730
- Anhidrida	1810-1760
C-O - Eter	1300-1000
O-H - Alkohol	3000-3700

Sumber: Sastroamidjojo, 1991: 15-16

Panjang gelombang dari absorpsi oleh suatu ikatan tertentu, bergantung pada macam getaran dari ikatan tersebut. Oleh karena itu, tipe ikatan yang berlainan (C–H, C–C, O–H dan sebagainya) menyerap radiasi inframerah pada panjang gelombang karakteristik yang berlainan. Banyak energi yang diabsorpsi oleh suatu ikatan bergantung pada perubahan dalam momen ikatan, jika perubahan momen ikatan besar maka energinya juga besar. Ikatan non polar tidak mengabsorpsi radiasi inframerah karena tidak ada perubahan momen ikatan apabila atom beresilasi. Ikatan non polar (ikatan C–C dan C–H dalam molekul organik) relatif menyebabkan absorpsi yang lemah. Pada ikatan polar (seperti C=O) menunjukkan absorpsi yang kuat (Fessenden, 1997: 315). Daftar frekuensi serapan inframerah beberapa gugus fungsi dapat dilihat pada tabel 2.

4. Spektroskopi Ultraviolet (UV-Vis)

Spektroskopi ultraviolet merupakan salah satu metode untuk mengetahui adanya ikatan rangkap atau ikatan rangkap konjugasi yang terdapat dalam suatu senyawa. Absorpsi cahaya ultraviolet atau cahaya tampak mengakibatkan transisi elektron dari orbital keadaan dasar yang berenergi rendah ke orbital keadaan transisi berenergi lebih tinggi. Dimana transisi ini memerlukan energi 40 – 300 kkal/mol. Disini molekul-molekul mempunyai energi yang lebih banyak akan mempromosi elektron dan akan menyerap energi pada panjang gelombang yang lebih pendek, sedangkan molekul yang memerlukan energi lebih sedikit akan menyerap pada panjang gelombang yang lebih panjang (Fessenden, 1990: 437).

Spektrofotometri ultraviolet adalah pengukuran absorpsi radiasi elektromagnetik suatu senyawa di daerah ultraviolet (200 – 350 nm). Gugusan atom mengabsorpsi sinar ultraviolet adalah gugus kromofor yang mempunyai ikatan kovalen tak jenuh. Absorpsi radiasi dipengaruhi oleh organ gugus fungsi lain dalam molekul gugus tersebut adalah gugus auksokrom. Bila gugus auksokrom diikat oleh gugus kromofor maka intensitas absorpsi radiasi akan meningkat.

Alat spektrofotometri ultraviolet terdiri atas sumber radiasi, monokromotor, wadah sampel, detektor dan rekorder. Sumber radiasi untuk pengukuran di daerah ultraviolet adalah lampu deuterium. Monokromotor berfungsi untuk memperoleh radiasi monokromatis dari sumber radiasi polikromatis. Sampel yang akan dianalisis ditempatkan dalam suatu selatan kuvet berbentuk kotak persegi panjang atau silinder kemudian kuvet ini ditempatkan dalam wadah sampel yang terdapat pada alat spektrofotometer. Detektor berfungsi sebagai petunjuk adanya radiasi yang ditransmisikan oleh sampel dan mengukur intensitas radiasi tersebut. Rekorder dapat menggambarkan secara otomatis kurva serapan pada kertas rekorder.

Pelarut yang biasa digunakan dalam spektrofotometer ultraviolet adalah etanol 95% karena kebanyakan senyawa larut dalam pelarut ini. Pelarut lain yang dapat dipakai adalah air, metanol, n-heksan, eter minyak bumi dan eter (Harborne, 1987).

Spektroskopi serapan ultraviolet dan serapan tampak merupakan cara yang paling berguna untuk menganalisis flavonoid. Cara ini digunakan untuk

membantu mengidentifikasi jenis flavonoid dan memecahkan pola oksigenasi. Disamping itu, kedudukan gugus hidroksil fenol bebas pada inti flavonoid dapat ditentukan dengan menambahkan pereaksi geser ke dalam larutan cuplikan dan diamati pergeseran puncak serapan yang terjadi sehingga secara tidak langsung cara ini berguna untuk memecahkan kedudukan gula atau metil yang berikat pada salah satu gugus hidroksi fenol. Spektrum flavonoid biasanya ditentukan dalam pelarut metanol atau etanol, meskipun perlu diingat bahwa spektrum yang dihasilkan dalam etanol kurang memuaskan (Markham, 1988). Petunjuk mengenai rentang serapan maksimum utama yang diperkirakan untuk setiap jenis flavonoid dapat dilihat pada tabel 3.

Tabel 3. Rentangan Serapan Spektrum UV-Vis Flavonoid

Pita II (nm)	Pita I (nm)	Jenis flavonoid
250-280	310-350	Flavon
250-280	330-360	Flavonol (3-OH tersubstitusi)
250-280	350-385	Flavonol (3-OH bebas)
245-275	310-330 bahu kira-kira 320 puncak	Isoflavon Isoflavon(5-deoksi-6,7-dioksigenasi)
275-295	300-330 bahu	Flavonon dan dihidroflavonol
230-270 (kekuatan rendah)	340-390	Khalkon
230-270 (kekuatan rendah)	380-430	Auron
270-280	465-560	Antosianidin dan antosianin

Sumber: Markham, 1988: 39

Kedudukan gugus hidroksil fenol bebas pada inti flavonoid dapat ditentukan dengan menambahkan pereaksi geser ke dalam larutan cuplikan dan mengamati pergeseran puncak serapan yang terjadi. Dengan demikian, secara tidak langsung cara ini dapat menentukan kedudukan gula atau metil yang terikat pada salah satu gugus hidroksil fenol (Markham, 1988: 38).

Perubahan spektrum dapat disebabkan oleh beberapa pereaksi geser yaitu:

1. Spektrum NaOMe

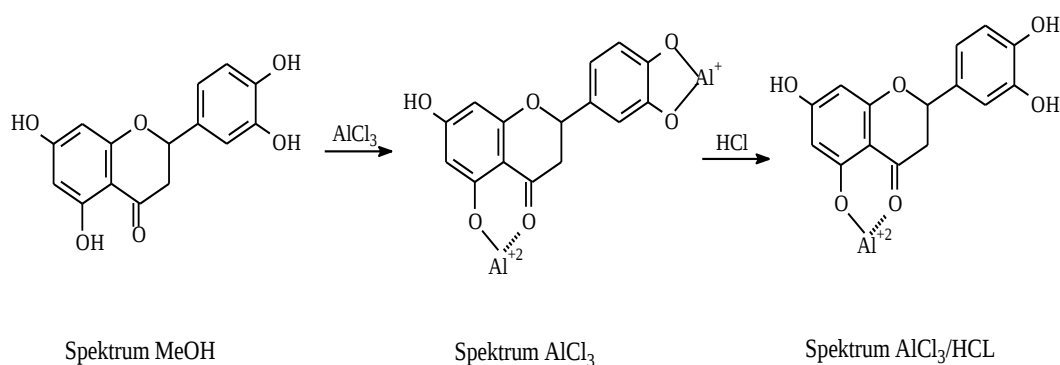
Natrium metoksida adalah basa kuat yang dapat mengionisasi semua gugus hidroksil pada cincin flavonoid. Akibatnya akan terjadi pergeseran batokromik pada pita I dan pita II pada flavonoid. NaOMe sering digunakan untuk mendeteksi gugus OH pada posisi 4', karena gugus ini memberikan pergeseran batokromik pada pita I. Penggunaan NaOMe dapat digantikan oleh NaOH. Pemeriksaan ulang setelah lima menit perlu dilakukan terhadap spektrum sampel untuk mendeteksi penguraian yang terjadi pada sampel, ditandai dengan adanya penurunan intensitas. Perubahan ini menunjukkan adanya gugus OH pada posisi 4'.

2. Spektrum NaOAc dan NaOAc/H₃BO₃.

Natrium asetat menyebabkan pengionan yang berarti pada gugus hidroksil flavonoid yang paling asam, terutama untuk mendeteksi adanya gugus 7-hidroksil bebas. NaOAc/H₃BO₃ menjembatani kedua gugus hidroksil pada gugus o-dihidroksil dan digunakan untuk mendeteksinya.

3. Spektrum AlCl_3 dan AlCl_3/HCl .

Pereaksi AlCl_3 berguna untuk mendeteksi adanya kompleks tahan asam antara gugus hidroksil dan keton yang bertetangga seperti OH pada C-5 dengan keton dan membentuk kompleks tahan asam, ini digunakan untuk mendeteksi adanya OH di C-5. AlCl_3/HCl merupakan pereaksi geser untuk menentukan adanya O-di OH pada cincin B yaitu pada C-3' dan C-4' atau C-4' dan C-5' yang membentuk kompleks tidak tahan asam gugus orto hidroksil, yang terlihat dengan pergeseran hipsokromik dari spektrum AlCl_3 , dengan contoh reaksi sebagai berikut :



Gambar 9. Spektrum Luteolin pada Penambahan AlCl_3/HCl (Markham, 1988: 47)

BAB V

KESIMPULAN DAN SARAN

A. Kesimpulan

Berdasarkan hasil penelitian yang telah dilakukan maka dapat disimpulkan bahwa:

1. Isolasi 5 kg sampel menghasilkan 393 g ekstrak pekat metanol, dan 14 g ekstrak pekat fraksi etil asetat yang digunakan untuk kromatografi kolom.
2. Karakterisasi dengan menggunakan sinar/lampu UV menunjukkan dalam daun belimbing (*Averrhoa carambola* Linn.L) terdapat flavon glikosida atau biflavonil atau flavon yang tersulih tak biasa.

B. Saran

Disarankan untuk mencari suatu pelarut yang lebih cocok untuk mengekstrak flavonoid dari fraksi etil asetat. Atau disarankan juga untuk melanjutkan pengerjaan pada fraksi berair.

DAFTAR PUSTAKA

- Achmad, S.A. 1986. *Kimia Organik Bahan Alam*. Jakarta: Universitas Terbuka
- Bakhtiar, A. 1992. *Diktat Kuliah Flavonoid*. Padang: Universitas Andalas
- Darwis, D. 2000. *Teknik Dasar Laboratorium dalam Penelitian Senyawa Organik Bahan Alam, Workshop Pengembangan Sumber Daya Manusia dalam Bidang Kimia Organik Bahan Alam Hayati*. Padang: Jurusan Kimia FMIPA, Universitas Andalas
- Dorly. 2005. *Makalah Pengantar Falsafah Sains*. Bogor: Institut Pertanian Bogor
- Fessenden, R.J. & Fessenden, J.S. 1990. *Kimia Organik*. Edisi Ketiga Jilid I. Terjemahan Aloysius Hadyana Pudjaatmaka. Jakarta: Erlangga
- Fessenden, R.J. & Fessenden, J.S. 1990. *Kimia Organik*. Edisi Ketiga Jilid II. Terjemahan Aloysius Hadyana Pudjaatmaka. Jakarta: Erlangga
- Finar, I.L. 1976. *Organic Chemistry Stereochemistry and Natural Product*, Volume Two, Fifth edition. London: The English Language Society and Longman Group Limited
- Gritter, R.J. 1991. *Pengantar Kromatografi*. Edisi Kedua. Bandung: Institut Teknologi Bandung
- Harborne, J.B. 1987. *Metode Fitokimia*, terjemahan Kosasih Padmawinata dan Iwang Soediro, Edisi kedua. Bandung: Penerbit ITB
- Manjang, Y. 1985. *Kimia Analisis Organik*. Proyek Peningkatan Perguruan Tinggi. Padang: Universitas Andalas
- Markham, K.R. 1988. *Cara Mengidentifikasi Flavonoid*. Bandung: Institut Teknologi Bandung
- Nature Indonesia Singapore. 2008. *Rediscoveri Family Oxalidaceae : Averrhoa carambola*. Singapore
- Robinson, Trevor. 1995. *Kandungan Organik Tumbuhan Tingkat Tinggi*. Bandung: Institut Teknologi Bandung