

**ISOLASI DAN KARAKTERISASI FLAVONOID DARI DAUN  
SAMBANG DARAH (*Excoecaria cochichinensis*.L)**

**TUGAS AKHIR**

*Diajukan kepada Tim Penguji Tugas Akhir Jurusan Kimia  
Untuk Memenuhi Persyaratan Guna Memperoleh Gelar Sarjana Sains*



**Oleh:**

**SISKA OKTARIZA  
NIM.73265/2006**

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

## HALAMAN PERSETUJUAN SKRIPSI

Judul : Isolasi dan Karakterisasi Flavonoid dari Daun Sambang Darah  
(*Excoecaria cochichinensis*.L)

Nama : Siska Oktariza

NIM/Bp : 73265/2006

Program Studi : Kimia

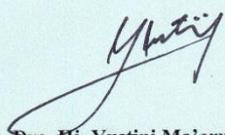
Jurusan : Kimia

Fakultas : Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam

Padang, 25 Juli 2013

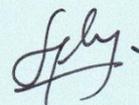
Disetujui oleh :

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 SKRIPSI

Judul : Isolasi dan Karakterisasi Flavonoid dari Daun Sambang Darah  
(*Excoecaria cochichinensis*. L)

Nama : Siska Oktariza

NIM/Bp : 73265/2006

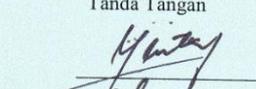
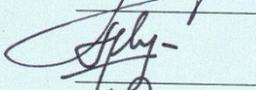
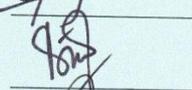
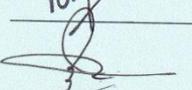
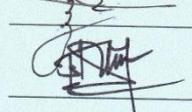
Program Studi : Kimia

Jurusan : Kimia

Fakultas : Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam

Padang, 25 Juli 2013

### Tim Penguji

Nama	Tanda Tangan
1. Ketua : Dra. Hj. Yustini Ma'aruf, M.Si	
2. Sekretaris : Dra. Sri Benti Etika, M.Si	
3. Anggota : Dra. Hj. Isniyetti, M.Si	
4. Anggota : Drs. H. Nazulis Z, M.Si	
5. Anggota : Drs. Bahrizal, M.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 acuan atau kutipan dengan mengikuti tata penulisan karya ilmiah yang lazim.

Padang, 25 Juli 2013

Yang menyatakan,

Siska Oktariza

## ABSTRAK

### **SISKA OKTARIZA, 2013 : Isolasi dan Karakterisasi Flavonoid dari Daun Sambang Darah (*excoecaria cochichinensis* L).**

Senyawa flavonoid merupakan suatu kelompok senyawa fenol yang terbesar yang ditemukan di alam. Salah satu tanaman yang mengandung flavonoid dan dimanfaatkan sebagai bahan obat adalah daun sambang darah (*excoecaria cochichinensis* L). Penelitian ini bertujuan untuk mengisolasi dan mengkarakterisasi flavonoid dari daun sambang darah (*excoecaria cochichinensis* L). Metoda yang digunakan adalah maserasi dengan menggunakan pelarut metanol dan fraksinasi dengan n-heksana dan etil asetat. Pemisahan dilakukan dengan kromatografi kolom dengan adsorben silika gel 60 dan eluen etil asetat:metanol secara SGP (*Step Gradien Polarity*) dan pemurnian dilakukan secara rekristalisasi. Dari hasil isolasi diperoleh flavonoid berupa zat padat berwarna kuning kecoklatan, maka flavonoid yang didapatkan belum murni.

## KATA PENGANTAR



Segala puji bagi Allah SWT atas berkat rahmat dan kasih sayang-Nya,serta shalawat dan salam semoga senantiasa tercurah kepada junjungan kita Nabi Muhammad SAW. Alhamdulillah penulis dapat menyelesaikan tugas akhir yang berjudul *"Isolasi dan Karakterisasi Flavonoid dari Daun Sambang Darah (Excoecaria cochichinensis. L).* Dalam penyelesaian tugas akhir ini, penulis banyak mendapatkan bantuan, bimbingan, arahan serta petunjuk dari berbagai pihak. Untuk itu penulis mengucapkan terima kasih yang setulusnya kepada :

1. Ibu Dra.Hj.Yustini Ma'aruf, M.Si sebagai pembimbing I
2. Ibu Dra. Sri Benti Etika, M.Si sebagai pembimbing II
3. Bapak Drs. H. Nazulis, M.si, Ibu Dra.Hj.Isniyetti, M.Si, sebagai dosen penguji.
4. Bapak Drs. Bahrizal, M.Si sebagai dosen penguji, Penasehat Akademik dan Sekretaris Jurusan Kimia.
5. Bapak Budhi Oktavia, S.Si M.Si sebagai Ketua Prodi Kimia Jurusan Kimia Universitas Negeri Padang
6. Bapak dan Ibu Staf Pengajar Jurusan Kimia FMIPA UNP.
7. Semua pihak yang telah ikut serta memberi bantuan dan dorongan yang tidak dapat disebutkan satu persatu

Dengan bantuan semua pihak tugas akhir ini dapat penulis selesaikan, semoga segala bantuan, dorongan, dan pengorbanan yang telah diberikan menjadi

amal ibadah dan dibalas oleh Allah SWT. Amiiin. Semoga tugas akhir ini dapat bermanfaat bagi semua pihak serta bagi perkembangan ilmu pengetahuan.

Padang, 25 Juli 2013

Penulis

## DAFTAR ISI

	Halaman
<b>ABSTRAK</b> .....	i
<b>KATA PENGANTAR</b> .....	ii
<b>DAFTAR ISI</b> .....	iv
<b>DAFTAR TABEL</b> .....	vi
<b>DAFTAR GAMBAR</b> .....	vii
<b>DAFTAR LAMPIRAN</b> .....	viii
 <b>BAB I. PENDAHULUAN</b>	
A. Latar Belakang .....	1
B. Perumusan Masalah .....	2
C. Pembatasan Masalah .....	3
D. Tujuan Penelitian .....	3
E. Manfaat Penelitian .....	3
 <b>BAB II. TINJAUAN PUSTAKA</b>	
A. Tinjauan Botani .....	4
B. Flavonoid .....	5
C. Metode Ekstraksi .....	11
D. Pemisahan Komponen Kimia.....	13
E. Uji Kemurnian .....	15
F. Karakterisasi .....	16
 <b>BAB III. METODOLOGI PENELITIAN</b>	

A. Tempat dan Waktu Penelitian .....	23
B. Sampel Penelitian .....	23
C. Alat dan Bahan .....	23
D. Prosedur Penelitian.....	24

#### **BAB IV. PEMBAHASAN**

A. Hasil .....	34
B. Pembahasan .....	37

#### **BAB V. KESIMPULAN DAN SARAN**

A. Kesimpulan .....	41
B. Saran.....	41

#### **DAFTAR PUSTAKA**

#### **LAMPIRAN**

## DAFTAR TABEL

Tabel	Halaman
1. Warna Flavonoid dengan Beberapa Pereaksi .....	17
2. Rentangan Serapan Spektrum UV-Vis Flavonoid.....	20
3. Daftar Frekuensi Serapan Inframerah Beberapa Gugus Fungsi .....	22
4. Perbandingan Eluen yang Digunakan pada Kromatografi Kolom .....	29
5. Hasil Uji Pendahuluan Kandungan Metabolit Sekunder pada Daun Sambang Darah.....	34

## DAFTAR GAMBAR

Gambar	Halaman
1. Tiga Jenis Flavonoid Berdasarkan Susunan Kerangka Dasar atom Karbon.....	6
2. Jenis Utama dan Struktur Dasar Flavonoid Alam .....	8
3. Struktur Kaemferol.....	8
4. Apigenin 7-O- $\beta$ -D-glukopiranosida.....	9
5. Apigenin 8-C- $\beta$ -D-glukopiranosida .....	9
6. Petunjuk Penyebaran Jenis Flavonoid pada Kromatogram yang Dikembangkan dengan TBA/HOAc 15 % .....	18

## DAFTAR LAMPIRAN

Lampiran	Halaman
1. Daun Sambang Darah ( <i>Excoecaria cochichinensis</i> .L) .....	42
2. Skema Kerja Isolasi dan Karakterisasi Flavonoid .....	43
3. Spektrum Inframerah Flavonoid Hasil Isolasi .....	45
4. Spektrum UV-Vis Flavonoid Hasil Isolasi dengan Pelarut MeOH .....	46
5. Spektrum UV-Vis Flavonoid Hasil Isolasi dengan Pelarut MeOH + NaOH.....	47
6. Spektrum UV-Vis Flavonoid Hasil Isolasi dengan Pelarut MeOH + AlCl <sub>3</sub> + HCl.....	48
7. Spektrum UV-Vis Flavonoid Hasil Isolasi dengan Pelarut MeOH + NaOAc + H <sub>3</sub> BO <sub>3</sub> .....	49
8. Distribusi Flavonoid Hasil Isolasi pada Kromatogram Kkt-2A.....	50

# **BAB I**

## **PENDAHULUAN**

### **A. Latar Belakang**

Indonesia sangat kaya dengan keanekaragaman hayati dengan berbagai potensi yang umumnya belum banyak diketahui, yang tersebar di daratan dan lautan, seperti: hutan, sungai, dan laut. Kekayaan akan keragaman hayati ini sekaligus merupakan sumber senyawa kimia tergolong metabolit sekunder yang hampir tak terbatas jumlahnya (Tersonoadi, 2008: 147).

Penggunaan tumbuhan sebagai obat berkaitan dengan kandungan kimianya terutama zat bioaktif. Senyawa bioaktif dapat ditemukan pada bunga, daun, akar, dan batang. Senyawa bioaktif yang terdapat dalam tumbuhan merupakan senyawa metabolit sekunder seperti golongan alkaloid, flavonoid, steroid, terpenoid, dan saponin (Kusuma, 1988: 11).

Flavonoid adalah salah satu senyawa kimia yang berasal dari tumbuhan yang merupakan kelompok metabolit sekunder. Flavonoid tersebar luas 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 dari tumbuhan yang berkhasiat obat adalah daun sambang darah (*Excoecaria cochinchinensis* L). Daun sambang darah ini berkhasiat menghilangkan gatal-gatal (anti pruritik), penghenti perdarahan (hemostatis), mengobati disentri dan muntah darah. Di Kelurahan Lapai Kecamatan Nanggalo Kota Padang, daun sambang darah ini biasa digunakan sebagai obat penghilang rasa gatal, mengobati disentri dan muntah darah.

Daun sambang darah ini biasanya ditanam di pekarangan sebagai pagar hidup atau tanaman obat, di taman-taman sebagai tanaman hias, atau tumbuh liar di hutan dan di ladang, pada tempat yang terbuka atau sedikit terlindung (Tersonoadi, 2008: 148)

Berdasarkan penelusuran pustaka, laporan tentang kandungan senyawa kimia dari daun sambang darah belum ditemukan. Hasil uji pendahuluan yang telah dilakukan terhadap kandungan kimia daun sambang darah menunjukkan bahwa positif mengandung flavonoid dan saponin.

Oleh karena itu penulis tertarik untuk melakukan penelitian sesuai dengan judul, yaitu **"Isolasi dan Karakterisasi Flavonoid dari daun sambang darah (*Excoecaria cochinchinensis* L)"**.

## **B. Perumusan Masalah**

Berdasarkan dari latar belakang di atas, maka yang menjadi permasalahan dalam penelitian ini adalah "apakah senyawa flavonoid dalam daun Sambang Darah (*Excoecaria cochinchinensis* L) dapat diisolasi dan bagaimana karakteristiknya"

### **C. Pembatasan Masalah**

Sesuai dengan permasalahan di atas, maka penelitian ini dibatasi pada masalah:

1. Sampel yang digunakan adalah daun sambang darah (*Excoecaria cochinchinensis L*), yang diperoleh dari Kelurahan Lapai, Kecamatan Nanggalo, Kota Padang.
2. Isolasi senyawa flavonoid dilakukan dengan cara maserasi, fraksinasi dan kromatografi kolom.
3. Karakterisasi senyawa hasil isolasi dilakukan dengan pereaksi warna, kromatografi kertas dua arah, dan spektroskopi Inframerah dan UV-Vis.

### **D. Tujuan Penelitian**

Penelitian ini bertujuan untuk mengisolasi dan mengkarakterisasi senyawa flavonoid dari daun sambang darah (*Excoecaria cochinchinensis L*).

### **E. Manfaat Penelitian**

Hasil penelitian ini diharapkan dapat:

1. Memberikan sumbangan informasi tentang tanaman yang mengandung senyawa flavonoid.
2. Memberikan informasi tentang karakteristik senyawa flavonoid yang terdapat dalam daun sambang darah.

## **BAB II**

### **TINJAUAN PUSTAKA**

#### **A. Tinjauan Botani**

##### **1. Taksonomi Daun Sambang Darah (*Excoecaria cochinchinensis* L)**

Berdasarkan hasil identifikasi yang dilakukan di Herbarium Universitas Andalas (ANDA), maka diperoleh klasifikasi daun Sambang Darah, yaitu:

Kingdom	: Plantae
Sub Kingdom	: Tracheobionta
Super Divisi	: Spermatophyta
Divisi	: Magnoliophyta
Kelas	: Magnoliopsida
Sub Kelas	: Rosidae
Ordo	: Euphorbiales
Famili	: Euphorbiaceae
Genus	: <i>Excoecaria</i>
Spesies	: <i>Excoecaria cochinchinensis</i> Lour

##### **2. Morfologi Daun Sambang Darah**

Tumbuhan sambang darah merupakan tumbuhan perdu, berumur panjang (perennial), tinggi 0,5 – 1,5 meter. Akar tunggang, batang berkayu, silindris, tegak, percabangan banyak, keatas atau mendatar. Daun tunggal, bertangkai, tersusun berhadapan, warna atas hijau tua – bawah merah gelap, bentuk jorong hingga lanset, panjang 4 -15 cm, lebar 1,5 – 4 cm, helaian daun tipis, tegar, ujung

dan pangkal runcing, tepi bergerigi halus, pertulangan menyirip (*pinnate*), permukaan atas mengkilat, permukaan bawah halus, tidak pernah meluruh. Bunga tunggal, muncul di sebelah ketiak daun, mahkota berwarna putih. Buah bulat, panjang  $\pm 1$  cm, warna merah, terdiri dari tiga keping yang menyatu. Perbanyak generative (biji) dan vegetatif (cangkok, stek batang) (Tersonoadi, 2008: 148)

Umumnya, sambang darah di tanam di pekarangan sebagai pagar hidup atau tanaman obat, di taman-taman sebagai tanaman hias, atau tumbuh liar di hutan dan di ladang pada tempat yang terbuka atau sedikit terlindung. Tanaman yang berasal dari Indocina ini tidak menyukai tanah yang tergenang air.

### **3. Khasiat Sambang Darah**

Bagian dari sambang darah yang dapat digunakan sebagai obat adalah daun, ranting, dan akarnya. Sambang darah rasanya pedas, sifatnya hangat. Daun sambang darah berkhasiat mengobati disentri, muntah darah, luka berdarah, serta mengobati gatal-gatal dan penyakit kulit kronis. Ranting sambang darah berkhasiat mengobati perdarahan haid. Sedangkan akarnya berkhasiat mengobati perdarahan setelah bersalin, dan keguguran.

## **B. Flavonoid**

### **1. Tinjauan Umum Flavonoida**

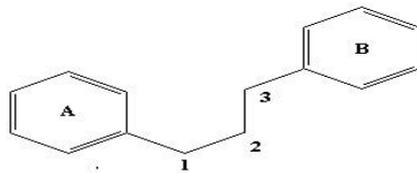
Senyawa flavonoid adalah suatu kelompok senyawa fenol yang terbesar yang ditemukan di alam. Senyawa-senyawa ini merupakan zat warna merah, ungu, dan biru. Dan sebagai zat warna kuning ditemukan dalam tumbuh-tumbuhan (Achmad, 1986: 2). Kemungkinan keberadaan flavonoid dalam daun

(tumbuh-tumbuhan) dipengaruhi oleh adanya proses fotosintesis sehingga daun muda belum terlalu banyak mengandung flavonoid (Markham, 1988: 1)

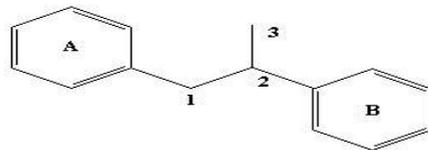
## 2. Klasifikasi Flavonoid

Dari kerangka dasar flavonoid dapat menghasilkan tiga jenis struktur yang dapat dilihat pada Gambar 1.

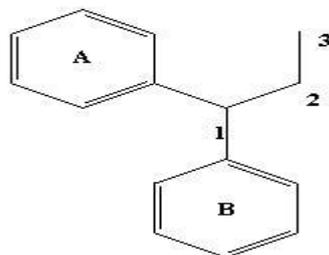
- a. Flavonoida atau 1,3-diarilpropana



- b. Isoflavonoid atau 1,2- diarlpropana



- c. Neoflavonoida atau 1,1- diarlpropana

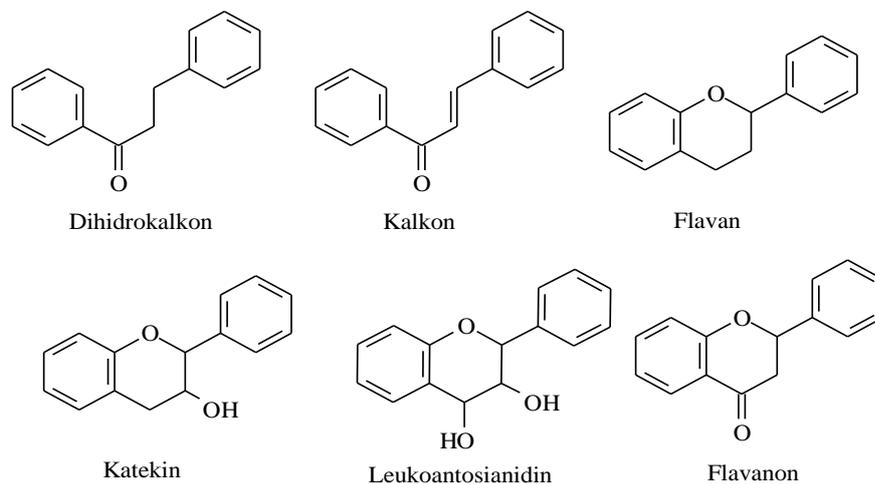


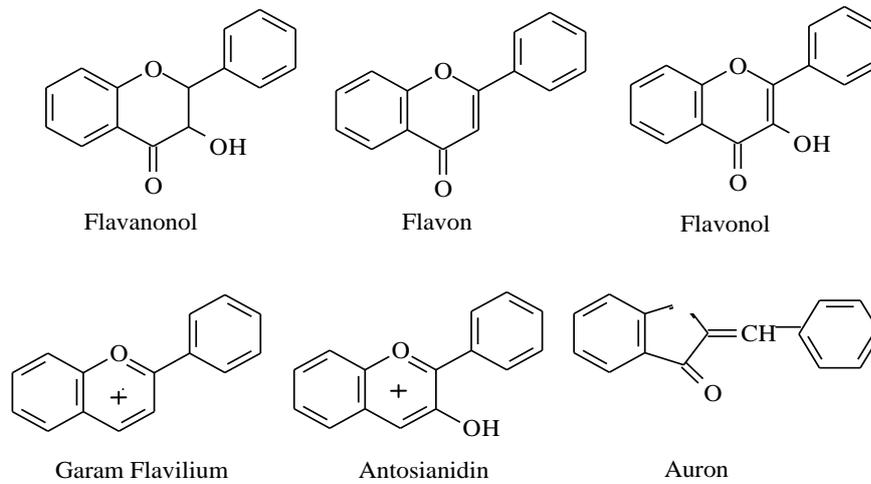
**Gambar 1:** Tiga jenis struktur Flavonoid Berdasarkan Susunan Kerangka Dasar Atom Karbon (Achmad, 1986: 2)

Dari berbagai jenis flavonoid tersebut, flavon, flavonol dan antosianidin adalah jenis yang banyak ditemukan di alam sehingga disebut sebagai flavonoid utama. Sedangkan jenis-jenis flavonoid yang tersebar di alam dalam jumlah terbatas adalah kalkon, auron, katekin, flavanon, dan leukoantosianidin. Banyaknya senyawa flavonoid ini disebabkan oleh berbagai tingkat hidroksilasi, alkoksilasi, atau glikosilasi dari struktur tersebut (Achmad, 1986: 4).

Senyawa-senyawa isoflavonoid dan neoflavonoid hanya ditemukan dalam beberapa jenis tumbuhan, terutama suku Leguminosae. Jenis-jenis yang termasuk isoflavonoid adalah isoflavon, rotenoid, pterokarpan dan kumestan. Sedangkan, neoflavonoid meliputi jenis-jenis 4-arilkumarin dan berbagai dalbergion (Achmad, 1986: 4)

Beberapa jenis flavonoid serta struktur dasar masing-masing jenis tercantum pada gambar 2 berikut ini:



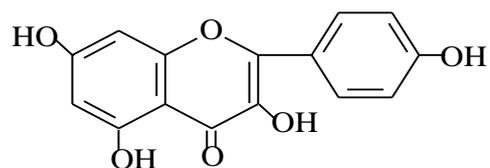


**Gambar 2:** Jenis Utama dan Struktur Dasar Flavonoid Alam (Achmad, 1986: 3-4)

Menurut Markham (1988, 3-7) flavonoid terdiri atas dua tipe, yaitu:

- Aglikon flavonoid adalah flavonoid yang tidak mengandung molekul gula dalam senyawanya dengan kerangka dasar yang terdapat di alam seperti flavon, flavonol, antosianidin, kalkon dan auron.

Contohnya : Kaemferol

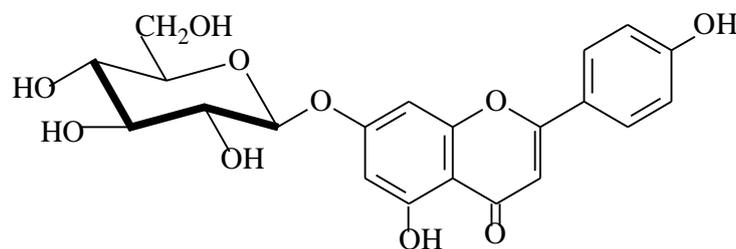


**Gambar 3 :** Struktur Kaemferol. (Markham, 1988: 4)

- Glikosida flavonid, yaitu flavonoid yang mengandung molekul gula dalam senyawanya. Berdasarkan dimana terikatnya molekul gula dalam kerangka karbon flavonoid, maka glikosida flavonoid dibedakan atas:

- 1). 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).

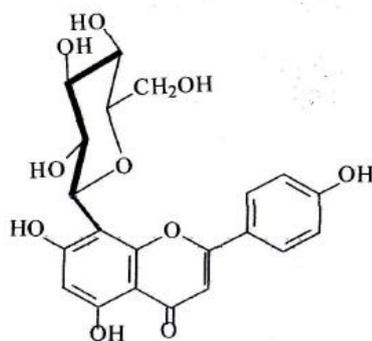
Contoh :



**Gambar 4 :** Apigenin 7-O- $\beta$ -D-glukopiranosida  
(Markham, 1988:6)

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

Contoh :



**Gambar 5 :** Apigenin 8-C- $\beta$ -D-glukopiranosida. (Markham, 1988:7)

### **3. Kegunaan Flavonoid**

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 yang bersifat menyerap sinar UV berperan penting dalam mengarahkan serangga (Robinson, 1995: 191)

Bagi tumbuhan yang mengandung flavonoid, flavonoid berfungsi dalam pengaturan tumbuh, pengaturan fotosintesis, kerja antimikroba dan antivirus, dan kerja terhadap serangga. 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 membrane 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).

### **4. Sifat-sifat Flavonoid**

Flavonoid merupakan senyawa polar karena mempunyai sejumlah gugus hidroksil suatu gula, sehingga dapat larut dalam pelarut polar seperti etanol, metanol, butanol, aseton, dimetilsulfoksida, dimetilformamida, dan air. Adanya gula yang terikat pada flavonoid cenderung menyebabkan flavonoid lebih mudah larut dalam air dan dengan demikian campuran pelarut di atas dengan air merupakan pelarut yang lebih baik untuk glikosida. Sebaliknya, aglikon yang

kurang polar seperti isoflavon, flavanon, dan flavon serta flavonol yang termetoksilasi cenderung lebih mudah larut dalam pelarut seperti eter dan kloroform (Markham, 1988).

### **5. Identifikasi Flavonoid**

Identifikasi flavonoid dapat dilakukan dengan cara Shinoda test. Cara melakukannya adalah: 0,5 gram sampel yang telah di rajang halus diekstrak dengan metanol dan di panaskan selama 5 menit dalam tabung reaksi. Ekstraknya ditambahkan beberapa tetes asam klorida pekat dan sedikit serbuk Magnesium. Sampel mengandung flavonoid ditunjukkan dengan adanya perubahan warna menjadi merah / pink atau kuning (Kusuma,1988: 17).

### **C. 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).

Secara umum ekstraksi senyawa metabolit sekunder dari seluruh bagian tumbuhan seperti bunga, akar, buah, daun, kulit, dan akar menggunakan sistem maserasi yang menggunakan pelarut organik polar, seperti metanol.

Beberapa metode ekstraksi senyawa organik bahan alam yang umum digunakan antara lain: (Darwis, 2000)

### **1. Maserasi**

Maserasi merupakan proses perendaman sampel dengan pelarut organik yang digunakan pada temperatur ruangan. Proses ini sangat menguntungkan dalam isolasi senyawa bahan alam, karena dengan perendaman sampel tumbuhan akan terjadi pecahan dinding dan membrane sel akibat perbedaan tekanan antara di dalam dan di luar 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. Pemilihan pelarut untuk proses maserasi akan memberikan efektifitas yang tinggi dengan memperhatikan kelarutan senyawa bahan alam dalam pelarut tersebut. Secara umum pelarut metanol merupakan pelarut yang paling banyak digunakan dalam proses isolasi senyawa organik bahan alam, karena dapat melarutkan seluruh golongan metabolit sekunder.

### **2. Perkolasi**

Merupakan proses melewatkan pelarut organik pada sampel, sehingga pelarut akan membawa senyawa organik bersama-sama pelarut. Tetapi efektifitas dari proses ini hanya akan lebih besar untuk senyawa organik yang sangat mudah larut dalam pelarut yang digunakan.

### **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. Kelebihan teknik

ini yakni penyaringan dilakukan beberapa kali dan pelarut yang digunakan tidak habis karena pelarut tersebut didinginkan melalui pendingin dan dapat digunakan lagi setelah isolasi dipisahkan (Manjang,1985: 5-6)

#### **D. Pemisahan Komponen Kimia**

##### **1. Kromatografi Lapis Tipis**

Kromatografi Lapis Tipis (KLT) adalah salah satu metoda yang dapat digunakan untuk memisahkan suatu komponen dalam suatu komponen. KLT merupakan suatu langkah awal mencari adsorben dan pelarut yang cocok untuk kromatografi kolom (Manjang, 1985 : 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 (Hardjono, 1991).

Kromatografi Lapis Tipis digunakan untuk:

- a. Mencari pelarut untuk kromatografi kolom
- b. Analisa fraksi yang diperoleh dari kromatografi kolom
- c. Menyigi arah atau perkembangan reaksi seperti hidrolisis atau metilasi
- d. Identifikasi flavonoid secara ko-kromatografi
- e. Isolasi flavonoid murni skala kecil.(Markham, 1988: 33)

Keuntungan kromatografi lapis tipis adalah;

- a. Dapat memisahkan senyawa yang sangat berbeda, seperti senyawa organik alam dan senyawa organik sintesis, kompleks organik dan anorganik serta ion anorganik.
- b. Waktu yang digunakan singkat.
- c. Alat yang digunakan tidak terlalu mahal.
- d. Kepekaannya cukup tinggi dengan jumlah cuplikan beberapa mikrogram.
- e. Dapat menggunakan pereaksi asam sulfat pekat yang bersifat korosif (Harborne, 1987).

Kelemahan kromatografi lapis tipis adalah harga  $R_f$  yang tidak tetap.

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

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

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

## 2. Kromatografi Kolom

Kromatografi kolom digunakan untuk memisahkan senyawa hasil isolasi dalam jumlah yang cukup banyak. Kromatografi kolom mempunyai dua fasa, yaitu fasa gerak dan fasa diam. Fasa gerak merupakan pelarut yang digunakan untuk mengelusi campuran, dan fasa diam yang biasanya digunakan adalah silika gel, alumina, dan selulosa.

Campuran yang akan dipisahkan diletakkan di bagian atas kolom penyerap yang berada dalam tabung kaca. Pelarut (fasa gerak) dibiarkan mengalir melalui kolom. Senyawa bergerak melalui kolom dengan laju yang berbeda, dengan konsentrasi yang berbeda, kemudian dimonitor dengan kromatografi lapis tipis. Diukur  $R_f$ -nya,  $R_f$  yang sama digabung (Step Gradien Polarity) (Gritter, 1991: 60).

### **3. Rekristalisasi**

Metode rekristalisasi dilakukan jika senyawa hasil isolasi sudah diperoleh dalam keadaan padat. Pada proses ini suatu padatan dilarutkan dalam suatu pelarut dan kemudian dapat dibuat kembali menjadi padatan kristal dengan cara pengendapan. Pemurnian secara rekristalisasi didasarkan pada perbedaan kelarutan antar senyawa dengan pengotor dalam pelarut. Pelarut yang baik adalah pelarut yang mempunyai daya melarutkan maksimum dalam keadaan panas dan dalam keadaan dingin, dapat memisahkan kotoran dan kembali menghasilkan kristal, mudah dipisahkan dari kristal yang terbentuk, dan tidak bereaksi secara kimia dengan zat yang dimurnikan (Manjang, 1985: 11-12).

### **E. Uji Kemurniaan**

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 dengan berbagai perbedaan maka kemungkinan hasil isolasi tersebut sudah murni. (Manjang, 1985: 20)

### **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 (Manjang, 1985: 19)

## **F. 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<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> pekat dan Mg-HCl. Dari warna yang dihasilkan dapat diketahui jenis senyawa flavonoid hasil isolasi tersebut seperti yang terlihat pada tabel 1 berikut:

**Tabel 1 .** Warna Flavonoid dengan Beberapa Pereaksi

<b>Jenis Flavonoid</b>	<b>NaOH</b>	<b>H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> pekat</b>	<b>Mg-HCl</b>
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

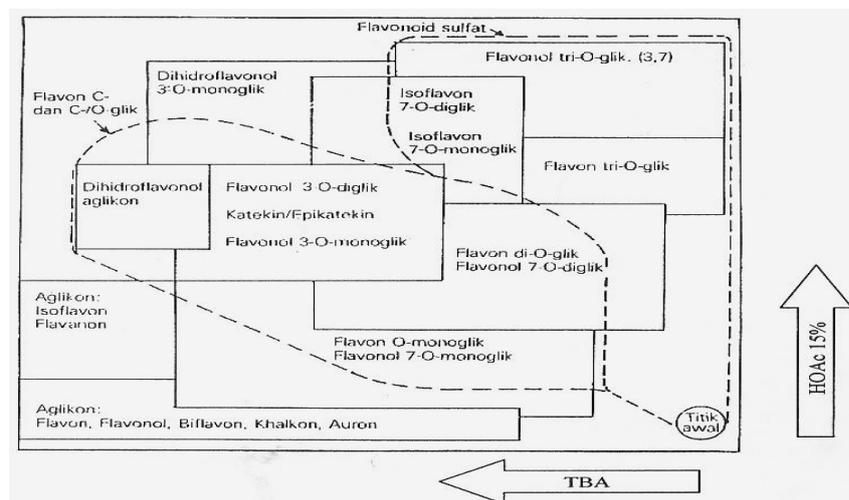
## 2. Kromatografi Kertas Dua Arah (KKt-2A)

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-BuOH : HOAc : H<sub>2</sub>O = 4:1:5) sebagai pengembang pertama dan asam asetat 15% sebagai pengembang kedua. Kertas yang digunakan adalah kertas Whatman 3MM (46x57 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. 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  $\text{NH}_3$ ) dan khalkon, auron dan 6-hidroksi flavonol (kuning). Karena alasan tersebut untuk mendeteksi bercak, kromatogram diperiksa dengan sinar UV (366 nm). Untuk meningkatkan kepekaan deteksi dan menghasilkan perubahan warna pada kertas kromatogram maka kertas kromatogram yang sudah kering diuapi dengan  $\text{NH}_3$  (Markham, 1988:19).

Petunjuk untuk menentukan jenis flavonoid tertentu dengan menggunakan kondisi kromatografi baku dapat dilihat pada Gambar 6:



**Gambar 6:** Petunjuk Penyebaran Jenis Flavonoid pada Kromatogram kromatografi kertas dua arah (kkt-2A) dengan pengembang TBA/HOAc 15% (Markham, 1988:22).

### 3. Spektrofotometri Ultraviolet

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 oksigenisasi. 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 terikat pada salah satu gugus hidroksil fenol. Spektrum flavonoid biasanya ditentukan dalam pelarut metanol atau etanol, meskipun perlu diingat bahwa spektrum yang dihasilkan dalam etanol kurang memuaskan. Ciri khas spektrum tersebut adalah kekuatan yang relatif rendah pada pita I dalam dihidroflavon, dihidroflavonol, dan isoflavon serta kedudukan pita I pada spektrum kalkon, auron, dan antosianin yang terdapat pada panjang gelombang yang tinggi (Markham. 1985: 38-39).

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 2:

**Tabel 2.** 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- ioksigenasi)
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

#### 4. Spektrofotometri Infra merah

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

Proses penyerapan inframerah terjadi bila frekuensi vibrasi sama dengan frekuensi sinar inframerah atau energi sinar inframerah sama dengan energi vibrasi molekul. Spektrum inframerah merupakan gambaran yang menyatakan hubungan antara intensitas serapan (transmitan atau absorban) lawan bilangan gelombang atau panjang gelombang (Hardjono, 1991:5).

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. 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 diadsorpsi oleh suatu ikatan bergantung pada perubahan dalam momen ikatan, jika perubahan momen ikatan besar maka energinya juga besar. Ikatan non polar tidak mengadsorpsi 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).

Yang harus diperhatikan dalam menginterpretasikan spektrum inframerah yaitu:

- Intensitas : *weak* (w/lemah), *medium* (m/sedang), *strong* (s/kuat), *variable* (v/berubah-ubah).
- Bentuk/*shape* : *Broad* (lebar) dan *sharp* (tajam)
- Pita lemah yang bertumpang tindih dengan pita kuat: bahu (*sh/shoulder*)
- Posisi ( $\text{cm}^{-1}$ ) dalam spektrum.

Daftar frekuensi serapan inframerah beberapa gugus fungsi dapat dilihat pada tabel 3:

**Tabel 3.** Daftar Frekuensi Serapan Inframerah Beberapa Gugus Fungsi

Gugus fungsi	Frekuensi $\text{cm}^{-1}$
C=C - Alkena	1680-1600
- Aromatik	1600-1475
C=C - Alkuna	2250-2100
C=O - Aldehyd	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 : Hardjono, 1991:15-16

## **BAB V**

### **KESIMPULAN DAN SARAN**

#### **A. Kesimpulan**

Berdasarkan hasil penelitian yang dilakukan, maka dapat disimpulkan bahwa :

1. Dari 2,5 kg Daun Sambang Darah (*Excoecaria cochichinensis L.*) didapatkan flavonoid kasar dari fraksi etil asetat sebanyak 24,1998 gram. Hasil kromatografi kolom 5,5 gram flavonoid kasar dari fraksi etil asetat diperoleh flavonoid berupa zat padat amorf berwarna kuning kecoklatan sebanyak 0,35 gram, dengan range titik leleh 195<sup>0</sup>C-197,5<sup>0</sup>C.
2. Berdasarkan data yang didapatkan maka, flavonoid yang terdapat pada daun sambang darah tidak murni, karena pada KLT memiliki noda tidak tunggal.

#### **B. Saran**

Disarankan untuk melakukan penelitian lebih lanjut agar didapatkan flavonoid yang murni.

## DAFTAR PUSTAKA

- Achmad, S.A. 1986. *Kimia Organik Bahan Alam*. Universitas Terbuka, Jakarta
- Bakhtiar, A. 1992. *Diktat Kuliah Flavonoid*. Universitas Andalas: Padang.
- Darwis, D. 2000. *Teknik Dasar Laboratorium Dalam Penelitian Senyawa Organik Bahan Alam, Workshop Pengembangan Sumber Daya Manusia Dalam Bidang Kimia Organik Bahan Alam Hayati*. Universitas Andalas: Padang.
- Fessenden, R.J. dan Fessenden J.S. 1997. *Kimia Organik*, terjemahan oleh A. Hadyana P., Jilid I, Edisi ketiga. Erlangga: Jakarta.
- Fessenden, R.J. dan Fessenden J.S. 1997. *Kimia Organik*, terjemahan oleh A. Hadyana P., Jilid II, Edisi ketiga. Erlangga: Jakarta.
- Finar, I.L., 1976. *Organic Chemistry Stereochemistry and Natural Product*, Volume two, Fifth edition. The English Language Society and Longman Group Limited, London.
- Gritter, R.J. 1991. *Pengantar Kromatografi*. edisi kedua. ITB: Bandung.
- Harborne, J.B. 1987. *Metode Fitokimia*, terjemahan Kosasih Padmawinata dan Iwang Soediro, Edisi kedua. ITB: Bandung.
- Hardjono, Sastrohamidjojo. 1991. *Spektroskopi Inframerah*. Liberty, Yogyakarta.
- Manjang, Y. 1985. *Kimia Analisis Organik*. Proyek Peningkatan Perguruan Tinggi. Universitas Andalas: Padang.
- Markham, K. R. 1988. *Cara Mengidentifikasi Flavonoid*. ITB: Bandung.