

**ISOLASI DAN KARAKTERISASI FLAVONOID DARI DAUN BIYIANG
INGGOK (*Aeshynanthus albidus* (Blome) Steud)**



Oleh :

**WIRDA HASTUTI
73283 / 2006**

**PROGRAM STUDI KIMIA
JURUSAN KIMIA
FAKULTAS MATEMATIKA DAN ILMU PENGETAHUAN ALAM
UNIVERSITAS NEGERI PADANG
2011**

ABSTRAK

WIRDA HASTUTI, 2011: Isolasi dan Karakterisasi Flavonoid dari Daun Biyang Inggok (*Aeshynanthus albidus* (Blome) Steud).

Indonesia merupakan salah satu negara yang kaya akan keanekaragaman hayati dan sangat potensial dalam mengembangkan obat herbal, penggunaan tumbuhan sebagai obat sangat berkaitan dengan kandungan kimia yang terdapat dalam tumbuhan tersebut, seperti flavonoid. Uji pendahuluan terhadap daun Biyang inggok (*Aeshynanthus albidus* (Blome) Steud) dengan Shinoda tes menunjukkan positif mengandung flavonoid. Isolasi flavonoid dari 6,5 kg daun Biyang inggok (*Aeshynanthus albidus* (Blome) Steud) telah dilakukan di Laboratorium penelitian Kimia jurusan Kimia FMIPA UNP. Penelitian ini bertujuan untuk mengisolasi dan mengkarakterisasi flavonoid dari daun Biyang inggok (*Aeshynanthus albidus* (Blome) Steud). Metoda isolasi yang digunakan adalah maserasi dengan pelarut metanol, fraksinasi menggunakan n-heksana, etil asetat dan pemisahan fraksi etil asetat sebanyak 5,6 gram dengan kromatografi kolom sebagai adsorbennya adalah silika gel dan eluen etil asetat:metanol secara SGP(*Step Gradien Polarity*) dan pemurnian dilakukan secara rekristalisasi. Uji kemurnian dilakukan dengan KLT dan uji titik leleh. Dari hasil isolasi diperoleh zat padat amorf berwarna kuning sebanyak 0,6325 gram dengan range titik leleh 1,4⁰C (183,3⁰C-184,7⁰C). Hasil uji dengan pereaksi warna dan KKt-2A menunjukkan bahwa flavonoid hasil isolasi adalah flavonol. Dari hasil analisis spektrum UV-Vis dan spektrum inframerah, flavonoid hasil isolasi diduga 5, 7, 3', 4'tetrahidroksiflavonol-3-O-glikosida.

KATA PENGANTAR

Alhamdulillah, dengan mengucapkan puji syukur kehadiran Allah SWT dan berkat rahmat dan karunia-Nya penulis telah dapat menyelesaikan skripsi ini dengan judul **”Isolasi dan Karakterisasi Flavonoid dari Daun Biyang Inggok (*Aeshynanhus albidus* (Blome) Steud)”**

Skripsi ini dibuat sebagai salah satu syarat yang harus dipenuhi untuk mendapatkan gelar sarjana sains pada Jurusan Kimia Fakultas Matematika dan Ilmu pengetahuan Alam Universitas Negeri Padang

Dalam penulisan skripsi ini, penulis banyak mendapat bantuan dan bimbingan dari berbagai pihak. Untuk itu penulis mengucapkan terima kasih yang setulusnya kepada :

1. Ibu Dra. Hj. Erda Sofjeni, M.Si selaku pembimbing I sekaligus penasehat akademik.
2. Bapak Drs. H. Nazulis.Z, M.Si selaku pembimbing II .
3. Ibu Dra. Sri Benti Etika, M.Si, Dra.Suryelita M.Si dan Desy Kurniawati, S.Pd.M.Si selaku dosen pembahas.
4. Rekan-rekan mahasiswa yang turut membantu penulis dalam penyusunan skripsi ini .

Penulis berharap skripsi ini bermanfaat bagi semua pembaca dan khususnya mahasiswa jurusan Kimia.

Padang, januari 2011

Penulis

DAFTAR ISI

	Halaman
ABSTRAK	i
KATA PENGANTAR	ii
DAFTAR ISI	iii
DAFTAR GAMBAR.....	v
DAFTAR TABEL.....	vi
DAFTAR LAMPIRAN.....	vii
 BAB I PENDAHULUAN	
A Latar Belakang.....	1
B. Rumusan Masalah	3
C. Batasan masalah.....	3
D. Tujuan penelitian.....	3
E. Manfaat penelitian.....	3
 BAB II TINJAUAN PUSTAKA	
A. Botani Tanaman.....	4
B. Flavonoid.....	5
C. Identifikasi Flavonoid.....	11
D. Metode Ekstraksi.....	11
E. Pemisahan Komponen Kimia	11
F. Metode Pemurnian.....	12
G. Uji Kemurnian.....	15
H. Karakterisasi.....	16

BAB III METODOLOGI PENELITIAN

A. Jenis, Tempat dan Waktu Penelitian.....	26
B. Sampel Penelitian.....	26
C. Alat dan Bahan.....	26
D. Prosedur Penelitian.....	27

BAB IV HASIL DAN PEMBAHASAN

A. Hasil.....	38
B. Pembahasan.....	41

BAB V PENUTUP

A. Kesimpulan.....	45
B. Saran.....	45

DAFTAR PUSTAKA.....	46
---------------------	----

LAMPIRAN

DAFTAR GAMBAR

Gambar	Halaman
1. Penomoran Kerangka Dasar Flavonoid	6
2. Tiga Jenis Flavonoid Berdasarkan Susunan Kerangka Dasar Atom Karbon.....	6
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. Proses KLT	13
8. Petunjuk Penyebaran Jenis Flavonoid pada KKt-2 Arah.....	18
9. Sistem Benzoil Dan Sinamoil Dalam Cincin Flavonoid.....	21
10. Spektrum Serapan UV-Vis Jenis Flavonoid.....	23
11. Senyawa Kompleks yang Menjelaskan Terjadinya Pergeseran pada Penambahan $AlCl_3/HCl$	25
12. Senyawa Hasil Isolasi 5, 7, 3', 4'Tetrahidroksi Flavonol.....	44

DAFTAR TABEL

Tabel	Halaman
1. Penyebaran Flavonoid pada Tumbuhan	10
2. Warna Flavonoid dengan Beberapa Pereaksi.....	16
3. Daftar Frekuensi Serapan Infra Merah.....	20
4. Rentangan Spektrum UV-Vis Flavonoid.....	22
5. Perbandingan Eluen dan Volum yang digunakan dalam Kromatografi Kolom.....	32
6. Hasil Uji Pendahuluan Kandungan Metabolit Sekunder pada Daun Biyiang Ingok.....	38
7. Hasil Uji Kemurnian Flavonoid Hasil Isolasi dengan KLT.....	39

DAFTAR LAMPIRAN

Lampiran	Halaman
1. Gambar Daun Biyiang Inggok.....	48
2. Skema Kerja Isolasi Flavonoid dari Daun Biyiang Inggok.....	50
3. Kromatogram KLT dengan Berbagai Eluen.....	51
4. Hasil KKt-2A Flavonoid Hasil Isolasi.....	52
5. Spektrum Infra Merah Senyawa Flavonoid Hasil Isolasi.....	53
6. Spektrum Uv-Vis Flavonoid Hasil Isolasi dengan MeOH.....	54
7. Spektrum Uv-Vis Flavonoid Hasil Isolasi dengan NaOMe.....	55
8. Spektrum Uv-Vis Flavonoid Hasil Isolasi dengan AlCl ₃ /HCl.....	56
9. Spektrum Uv-Vis Flavonoid Hasil Isolasi dengan NaOAc+H ₃ BO ₃	57

BAB I

PENDAHULUAN

A. Latar Belakang

Indonesia merupakan salah satu negara yang kaya akan keanekaragaman hayati dan tentu sangat potensial dalam mengembangkan obat herbal. Disamping itu 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).

Penggunaan tumbuhan sebagai obat sangat berkaitan dengan kandungan kimia yang terdapat dalam tumbuhan tersebut terutama zat aktif biologisnya. Senyawa bioaktif yang terdapat dalam tumbuh-tumbuhan biasanya merupakan senyawa metabolit sekunder seperti: flavonoid, alkaloid, steroid, saponin, terpenoid, tanin dan lain-lain (Kusuma, 1988:11).

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 yang dapat dimanfaatkan sebagai obat adalah tanaman Biyiang inggok (*Aeshynanthus albidus* (Blome) Steud). Tanaman ini bersifat epifit dan bisa ditemukan pada ketinggian 1700-2500m dari permukaan laut. Kandungan kimia yang terdapat dalam tumbuhan biyiang inggok (*Aeshynanthus albidus* (Blome) Steud) diantaranya adalah flavonoid, tannin, saponin dan alkaloid. Tanaman biyiang inggok (*Aeshynanthus albidus* (Blome) Steud) ini berkhasiat sebagai penghilang rasa nyeri (analgesik), penetralisir racun (antitoksik), menghambat pertumbuhan bakteri (antiseptik). Flavonoid dari tanaman biyiang inggok ini digunakan sebagai anti toksik sedangkan alkaloid nya sebagai analgesik (Nature Indonesia Singapore 2008 1 :5-8).

Dari penelusuran pustaka seperti skripsi dan internet yang telah dilakukan, belum ada ditemukan penelitian tentang isolasi dan karakterisasi terhadap senyawa metabolit sekunder dari daun Biyiang inggok (*Aeshynanthus albidus* (Blome) Steud).

Uji pendahuluan terhadap daun biyiang inggok (*Aeshynanthus albidus* (Blome) Steud) yang diambil dari Jorong Guguk Naneh Kenagarian Tanjung Gadang, Kabupaten Sijunjung ternyata positif mengandung flavonoid, alkaloid dan saponin.

Berdasarkan uraian diatas maka penulis tertarik untuk melakukan isolasi dan karakterisasi flavonoid dari daun biyiang inggok (*Aeshynanthus albidus* (Blome) Steud).

B. Perumusan Masalah

Yang menjadi permasalahan dalam penelitian ini adalah :

1. Apakah flavonoid yang terdapat pada daun biyang inggok (*Aeshynanthus albidus* (Blome) Steud) dapat diisolasi ?
2. Bagaimana karakterisasi senyawa flavonoid hasil isolasi tersebut?

C. Pembatasan Masalah

Adapun yang menjadi batasan masalah dalam penelitian ini adalah:

1. Isolasi senyawa flavonoid di lakukan dengan cara maserasi, fraksinasi dan kromatografi kolom sedangkan uji kemurnian dilakukan dengan kromatografi lapis tipis dan penentuan titik leleh.
2. Karakterisasi dari senyawa hasil isolasi dilakukan dengan pereaksi warna, KKt-2A, spektroskopi inframerah dan spektroskopi UV-Vis.

D. Tujuan Penelitian

Penelitian ini bertujuan untuk mendapatkan dan mengetahui karakterisasi senyawa flavonoid dari daun Biyang inggok (*Aeshynanthus albidus* (Blome)Steud).

E. Manfaat Penelitian

Dari hasil penelitian yang dilakukan diharapkan dapat:

1. Untuk mengetahui jenis flavonoid yang terdapat dalam daun Biyang inggok (*Aeshynanthus albidus* (Blome)Steud).
2. Memberikan kontribusi dalam pengembangan kimia bahan alam tentang tanaman yang mengandung flavonoid.

BAB II

TINJAUAN PUSTAKA

A. Botani Tumbuhan

1. Klasifikasi

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

Kingdom	:	Plantae
Divisi	:	Magnoliophyta
Kelas	:	Magnoliopsida
Ordo	:	Lamiales
Famili	:	Genesriaceae
Genus	:	Aeshynanthus
Spesies	:	<i>Aeshynanthus albidus</i> (Blome) Steud

2. Deskripsi, Kegunaan dan Kandungan

Tanaman Biyang ingkok merupakan tanaman yang hidup didaerah tropik. Tanaman ini tumbuh dengan subur di daerah 1700-2500 meter diatas permukaan laut, tersebar di perkebunan sawit dan karet. Tanaman ini cenderung memiliki organ-organ yang sukulen/berdaging. Daun tebal dengan kandungan air yang tinggi. Dengan demikian ia dapat hidup pada kondisi ketersediaan air yang rendah. Air diperoleh dari hujan, tetesan embun, atau uap air di udara. Tanaman ini menyukai cahaya matahari tetapi tidak langsung sehingga ia biasa ditemukan di alam sebagai tumbuhan lantai hutan atau di bawah naungan.

Habitus : Epifit pada karet dan sawit.

- Akar : Akar serabut dan melekat pada inangnya.
- Bunga : Bunga majemuk dan muncul dari ketiak daun.
- Batang : Beruas-ruas
- Daun : Pertulangan daun menyirip, daun berlilin dan bertikula, daun berbentuk ellip, atas daun berwarna hijau, sedangkan dibawahnya agak keungu-unguan.

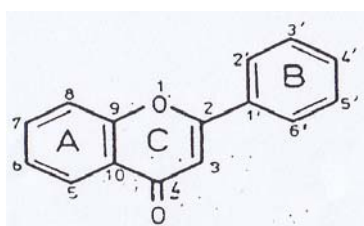
Kandungan kimia yang terdapat dalam tumbuhan Biyang ingkok (*Aeshynanthus albidus* (Blome) Steud) diantaranya adalah flavonoid, tannin, saponin dan alkaloid. Tanaman Biyang ingkok (*Aeshynanthus albidus* (Blome) Steud) ini berkhasiat sebagai penghilang rasa nyeri (analgesik), penetralisir racun (antitoksik), menghambat pertumbuhan bakteri (antiseptik). Flavonoid dari tanaman Biyang ingkok ini digunakan sebagai anti toksik sedangkan alkaloid nya sebagai analgesik (Nature Indonesia Singapore 2008 1 :5-8).

B. Flavonoid

1. Tinjauan Umum Flavonoid

Flavonoid adalah suatu kelompok senyawa fenol terbesar yang ditemukan di alam. Semua flavonoid menurut strukturnya merupakan turunan senyawa induk flavon yang terdapat pada tumbuhan *Primula*. Flavonoid dapat dideteksi berdasarkan warnanya dibawah sinar UV, disamping itu flavonoid mempunyai sistem aromatik yang berkonyugasi sehingga senyawa-senyawa ini menyerap sinar dari panjang gelombang tertentu di daerah UV dan IR (Bakhtiar, 1992:1).

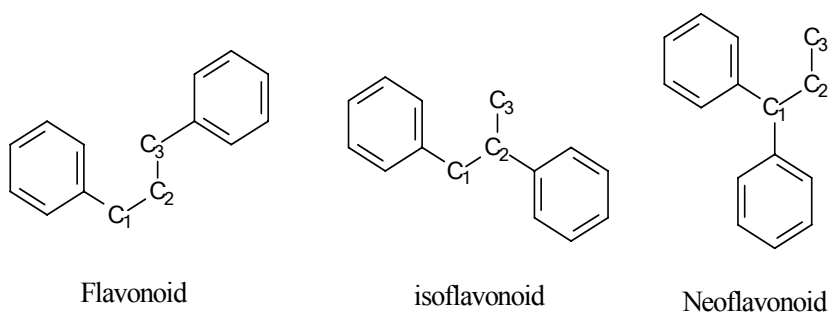
Golongan flavonoid digambarkan sebagai deretan senyawa C₆-C₃-C₆, artinya kerangka karbon terdiri dari gugus C₆ (cincin benzena tersubstitusi) disambung oleh rantai karbon alifatik. Agar memudahkan cincin diberi tanda A, B, C. Atom karbon dinomori menurut sistem penomoran angka biasa untuk cincin A dan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



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

2. Klasifikasi Flavonoid

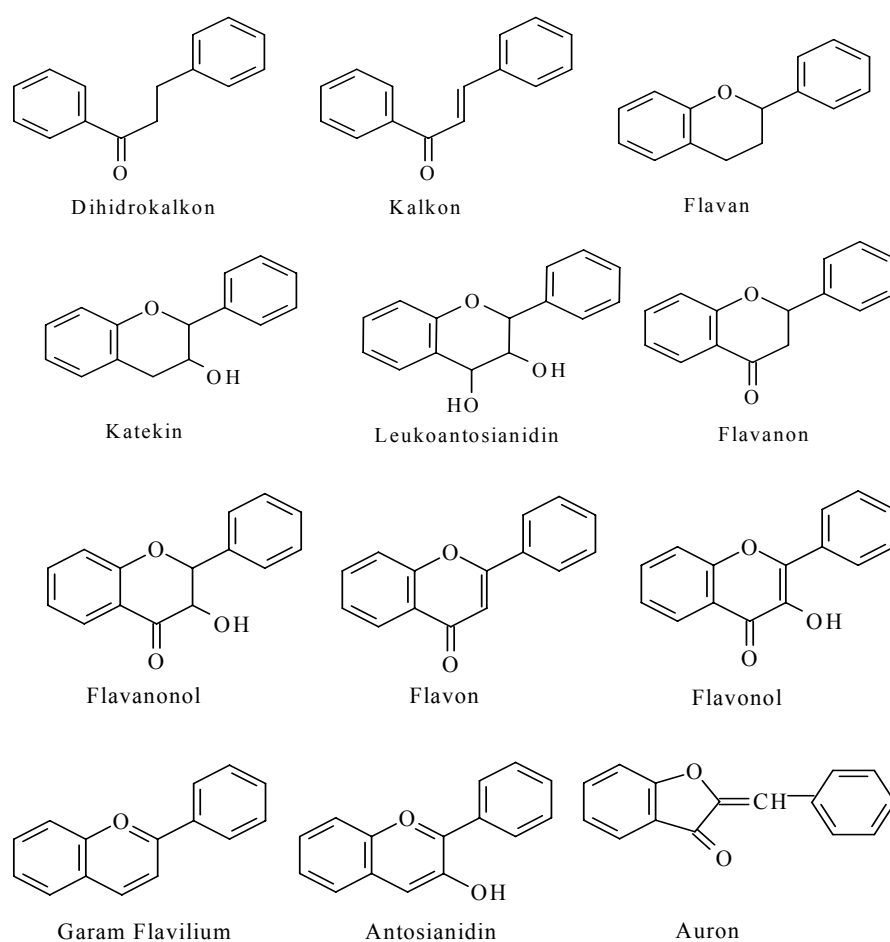
Dari kerangka dasar flavonoid dapat menghasilkan 3 jenis struktur yaitu 1,3-diarilpropan atau flavonoid, 1,2-diarilpropan atau isoflavonoid, dan 1,1-diarilpropan atau neoflavonoid. Ketiga kerangka dapat dilihat dalam gambar 2:



Gambar 2 : Tiga Jenis Flavonoid Berdasarkan Susunan Kerangka Dasar Atom Karbon (Achmad, 1986:2).

Senyawa flavonoid terdiri dari beberapa jenis tergantung pada tingkat oksidasi dari rantai propan dalam sistem 1,3-diarilpropan. Dalam hal ini flavan mempunyai tingkat oksidasi terendah sehingga dianggap sebagai senyawa induk dalam tata nama senyawa turunan flavon (Achmad, 1986 :30).

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

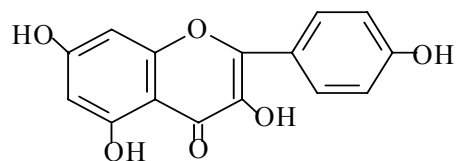


Gambar 3 : Jenis Utama dan Struktur Dasar Flavonoid Alam (Achmad, 1986:3-4).

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

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 : Kaemferol

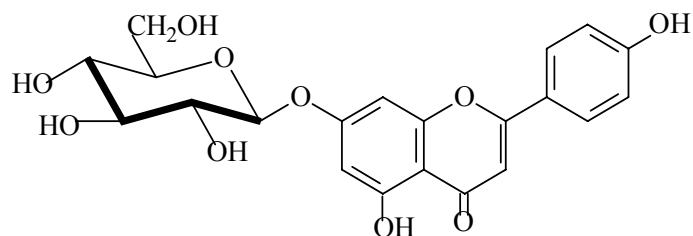


Gambar 4 : Struktur Kaemferol (Markham, 1988: 4).

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).

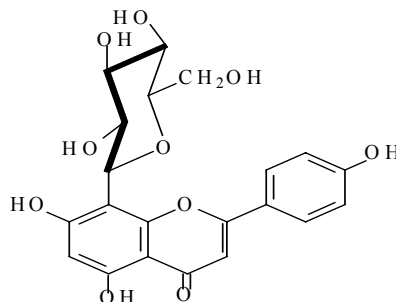
Contoh :



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).

3. 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 menyebabkan flavonoid lebih mudah larut dalam air dan dengan demikian flavonoid dalam bentuk glikosida lebih mudah larut dalam campuran air dengan pelarut polar. Sebaliknya aglikon yang kurang polar seperti isoflavon, 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).

4. Fungsi 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 dapat menyerap sinar UV dan berfungsi sebagai pengatur tumbuh, pengatur fotosintesis, anti mikroba, antivirus (Robinson, 1995:191).

5. 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).

Penyebaran flavonoid dalam tumbuhan dapat dilihat dalam tabel 1 sebagai berikut :

Tabel 1. Penyebaran Flavonoid pada Tumbuhan

Golongan flavonoid	Penyebaran
Protosianidin	Terdapat pada anggur dan cherries
Flavonol	Terdapat pada bawang merah
Flavon	Terdapat pada tumbuhan hijau seperti thyme dan peterselli
Katekin	Terdapat pada teh dan apel
Flavanon	Terdapat dalam buah citrus
Isoflavon	Terdapat dalam kedelai

Sumber : Harborne, 1987:69

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 (Kusuma, 1988:25).

D. Metode Ekstraksi

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 perkolator, 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).

Pelaksanaan kromatografi lapis tipis menggunakan sebuah lapis tipis silika atau alumina yang seragam pada sebuah lempeng gelas atau logam atau plastik yang keras. Jel silika (atau alumina) merupakan fase diam. Fase gerak merupakan pelarut atau campuran pelarut yang sesuai. Pelaksanaan ini biasanya dalam pemisahan warna yang merupakan gabungan dari beberapa zat pewarna atau pemisahan dan isolasi pigmen tanaman yang berwarna hijau dan kuning.



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

Nilai R_f dapat dihitung dengan rumus sebagai berikut:

$$\text{Harga } R_f = \frac{\text{jarak yang ditempuh oleh komponen}}{\text{jarak yang ditempuh oleh pelarut}}$$

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 gr), 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 plastik. (Gritter, 1991: 161).

Dalam kromatografi kolom adsorben yang biasa digunakan adalah silika gel (70-230 mesh) dan selulosa. Pelarut (fase gerak) dibiarkan mengalir melalui kolom karena aliran yang disebabkan oleh gaya berat atau didorong dengan tekanan. 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. Metode Pemurnian

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 rekristalisasi 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) sebagai berikut:

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, H₂SO₄ pekat dan Mg-HCl. Dari warna yang dihasilkan dapat diketahui jenis senyawa flavonoid hasil isolasi tersebut seperti yang terlihat pada tabel 2 berikut:

Tabel 2. Warna Flavonoid dengan Beberapa Pereaksi

Jenis flavonoid	NaOH	H ₂ SO 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

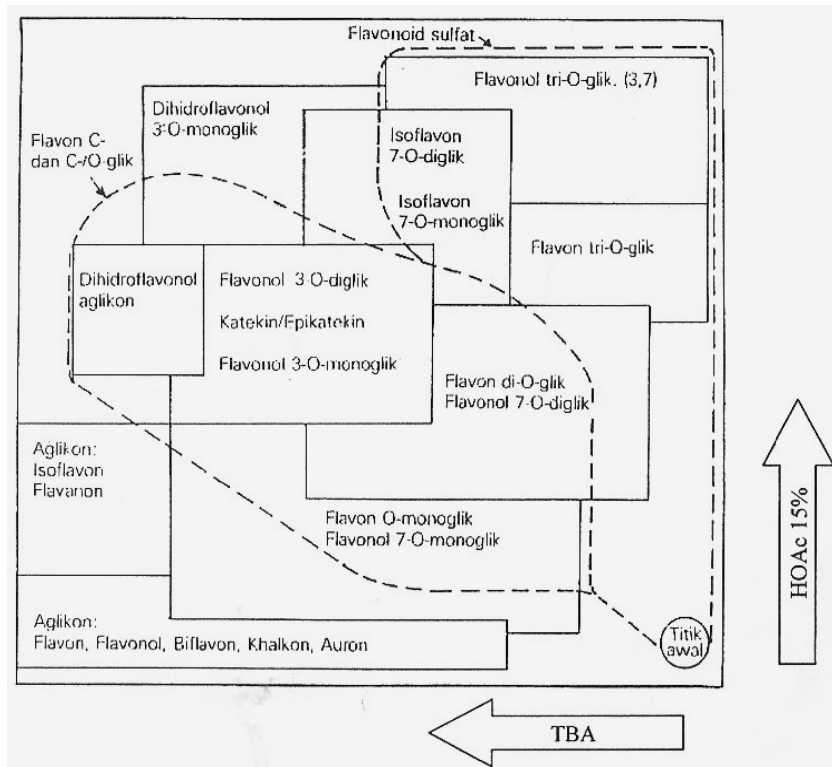
2. Kromatografi Kertas Dua Arah (KKt-2A)

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-BuOH:HOAc:H₂O=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 NH_3) dan khalkon, auron dan 6-hidroksi flavonol (kuning). Karena alasan tersebut untuk mendeteksi bercak, kromatogram diperiksa dengan sinar UV (366nm). 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 : Petunjuk Penyebaran Jenis Flavonoid pada Kromatogram 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 $650\text{-}4000\text{ cm}^{-1}$ ($15,4\text{-}2,5\text{ }\mu\text{m}$). Bila sinar inframerah dilewatkan melalui senyawa organik, maka

sejumlah frekuensi diserap sedang frekuensi yang lain diteruskan (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. 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 berosilasi. 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 3:

Tabel 3. Daftar Frekuensi Serapan Inframerah Beberapa Gugus Fungsi

Gugus fungsi	Frekuensi cm^{-1}
C-H - Alkana	2850-3000
=C-H - Alkena (rentangan)	3000-3100
- Aromatik (rentangan)	3159-3050
- Aromatik (serapan keluar bidang)	900-690
C=C - Alkena	1680-1600
- Aromatik	1600-1475
C≡C - Alkuna	2250-2100
C=O - Aldehid	1740-1720
- Keton	1725-1705
- Asam karboksilat	1725-1700
- Aromatik	1650-1850
- Ester	1750-1730
- Anhidrida	1810-1760
C=O	1650-1780
C-O - Eter	1300-1000
O-H - Alkohol	3000-3700

Sumber : Hart, 1990:313. Sastroamidjojo, 1991:15-16

4. Spektroskopi Ultraviolet (UV-Vis)

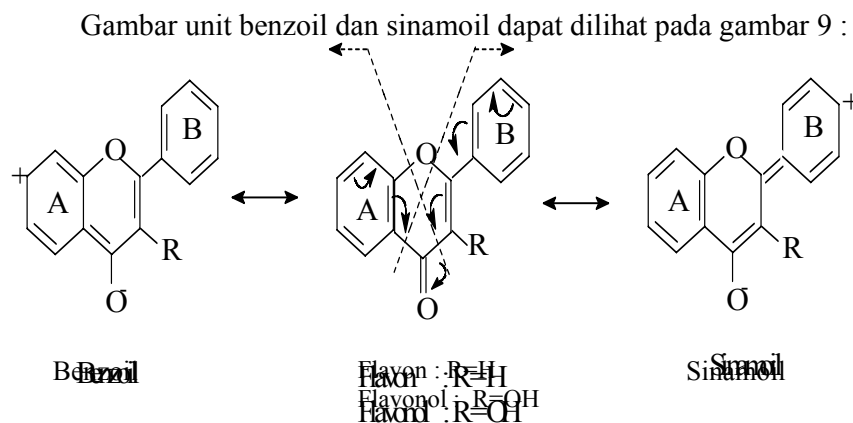
Spektroskopi ultraviolet merupakan salah satu metode untuk mengetahui adanya ikatan rangkap atau ikatan rangkap berkonjugasi yang terdapat dalam suatu senyawa. Absorpsi cahaya ultraviolet atau cahaya tampak mengakibatkan transisi elektron dari orbital keadaan dasar yang berenergi rendah ke orbital keadaan 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)

Daerah yang paling berguna dari spektrum ultraviolet adalah daerah dengan panjang gelombang 200-400 nm yaitu transisi $\pi \rightarrow \pi^*$ untuk senyawa dengan ikatan rangkap berkonjugasi serta beberapa transisi $n \rightarrow \sigma^*$ dan $n \rightarrow \pi^*$ (Fessenden, 1997:440).

Flavonoid mempunyai sistem karbonil yang berkonjugasi dengan cincin aromatik, sehingga senyawa-senyawa ini menyerap sinar dari panjang gelombang tertentu di daerah ultraviolet maupun inframerah.

Spektrum ultraviolet dalam metanol atau etanol umumnya memberikan dua puncak maksimum : puncak pertama terletak antara 240-285 nm (pita II) yang berasal dari kromofor sinamoil B, sedangkan yang kedua terletak antara 300-550 nm (pita I) yang berasal dari kromofor benzoil A. (Bakhtiar, 1992: 60)



Gambar 9 : Sistem Benzoil dan Sistem Sinamoil dalam Cincin Flavonoid (Achmad, 1986:17).

Kedua pita serapan ini, masing-masing berhubungan dengan resonansi gugus sinamoil yang melibatkan cincin B dan gugus benzoil yang

melibatkan cincin A dari molekul flavonoid. Oleh karena itu, penambahan gugus fungsi yang dapat menyumbangkan elektron (donor elektron) seperti gugus hidroksil (O-H) atau gugus metoksil (-OCH₃) pada cincin B akan meningkatkan peranan sinamoil terhadap resonansi molekul. Hal ini akan mengakibatkan perpindahan batokromik atas pita I. Di lain pihak, penambahan gugus hidroksil atau metoksil pada cincin A akan menaikkan panjang gelombang dari serapan maksimum serta intensitas dari serapan pita II (Achmad, 1986:17).

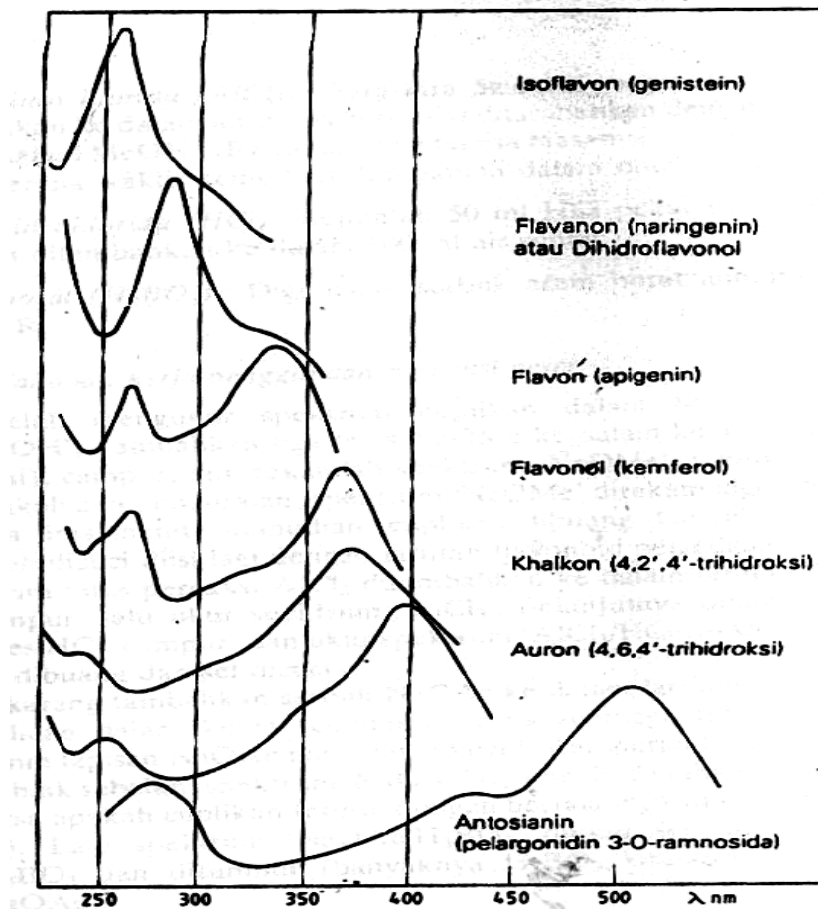
Petunjuk mengenai rentang serapan maksimum utama yang diperkirakan untuk setiap jenis flavonoid dapat dilihat pada tabel 4 :

Tabel 4 . 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

Selain itu juga dapat dilihat spektrum khas jenis flavonoid dengan pola oksigenasi yang setara pada gambar 10 berikut ini:



Gambar 10: Spektrum Serapan UV-Vis Jenis Flavonoid yang Berbeda Tetapi Pola Hidroksilasinya Sama (Markham, 1988: 40).

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'.

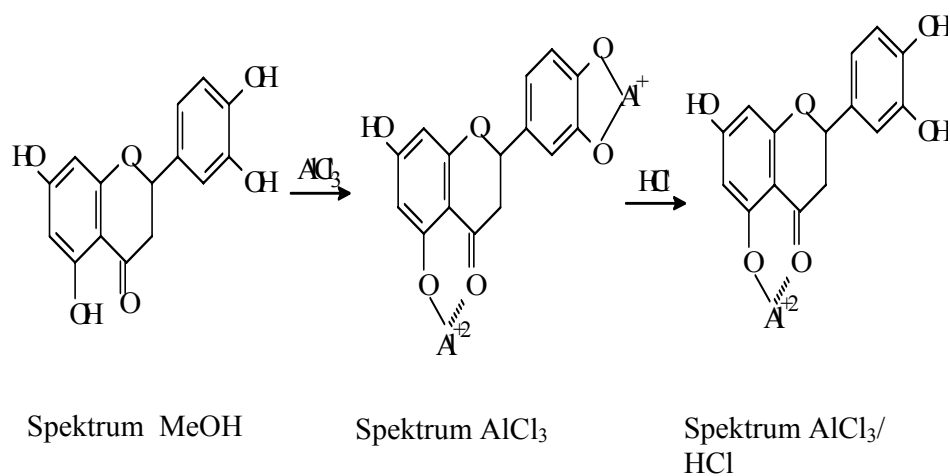
2. Spektrum NaOAc dan NaOAc/H₃BO₃.

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 AlCl₃ dan AlCl₃/HCl.

Pereaksi AlCl₃ 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 11 : Senyawa kompleks yang menjelaskan terjadinya pergeseran dalam spektrum luteolin pada penambahan AlCl_3/HCl (Markham, 1988: 47).

BAB V

PENUTUP

A. Kesimpulan

Berdasarkan hasil penelitian yang telah dilakukan maka dapat disimpulkan bahwa :

1. Dari isolasi 6,5 kg daun Biyang Inggok (*Aeshynanthus albidus* (Blome) Steud) didapatkan flavonoid murni berbentuk zat padat amorf berwarna kuning sebanyak 0,6325 gram dengan jarak titik leleh 183,3⁰C-184,7⁰C.
2. Dari pemeriksaan dari pereaksi warna, KKt-2A, spektroskopi inframerah dan spektroskopi UV-Vis menunjukkan bahwa flavonoid hasil isolasi adalah : 5,7, 3',4' tetrahidroksiflavonol-3-O-glikosida.

B. Saran

Disarankan untuk melakukan analisis lebih lanjut tentang spektra RMI dan spektroskopi massa untuk menentukan struktur yang pasti senyawa flavonoid dari daun Biyang inggok (*Aeshynanthus albidus* (Blome) Steud). Dan disarankan juga untuk melakukan uji bioaktivitas dari hasil isolasi flavonoid dari daun Biyang inggok (*Aeshynanthus albidus* (Blome) Steud).

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*. Jurusan Kimia FMIPA, Universitas Andalas, Padang.
- Dorly, 2005. *Makalah Pengantar Falsafah Sains*. Institut Pertanian Bogor:IPB
- Fessenden, R.J & Fessenden, J. S. 1990. *Kimia Organik*. Edisi Ketiga jilid I. Terjemahan Aloysius Hadyana Pudjaatmaka. Erlangga, Jakarta.
- Fessenden, R.J., dan Fessenden J.S., 1997. *Kimia Organik*, terjemahan oleh A.Hadyana P., Jilid II, Edisi ketiga. Penerbit 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. Institut Teknologi Bandung, Bandung.
- Harborne, J.B., 1987. *Metode Fitokimia*, terjemahan Kosasih Padmawinata dan Iwang Soediro, Edisi kedua. Penerbit ITB, Bandung.
- Kusuma, S.T, 1988. *Kimia dan Lingkungan*. Jurusan Kimia FMIPA UNAND, Padang.
- Manjang, Y. 1985. *Kimia Analisis Organik*. Proyek Peningkatan Perguruan Tinggi. Universitas Andalas, Padang.
- Markham, K. R., 1988. *Cara Mengidentifikasi Flavonoid*. ITB, Bandung.
- Nature Indonesia Singapore. 2008. *Rediscoveri Family Genesraceae :Aeshinanthus Albidus* (Blome) Steud: Singapore
- Robinson, Trevor., 1995. *Kandungan Organik Tumbuhan Tingkat Tinggi*. ITB, Bandung