

**ISOLASI DAN KARAKTERISASI FLAVONOID DARI BUNGA
TUMBUHAN PAGODA**

(Clerodendron paniculatum L.).

SKRIPSI

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



Oleh :

DESRIKARWATI

73287/2006

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

2011

ABSTRAK

Desrikarwati, 2011: Isolasi dan Karakterisasi Flavonoid dari Bunga Tumbuhan Pagoda (*Clerodendron paniculatum* L.)

Bunga tumbuhan pagoda (*Clerodendron paniculatum* L.) dapat digunakan untuk pengobatan keputihan dan penambah darah pada penderita anemia. Uji pendahuluan terhadap bunga segar tumbuhan pagoda (*Clerodendron paniculatum* L.) dengan Shinoda tes (Mg-HCl) menunjukkan positif mengandung flavonoid. Penelitian ini bertujuan untuk mengisolasi dan mengkarakterisasi senyawa flavonoid yang terdapat dalam bunga tumbuhan pagoda (*Clerodendron paniculatum* L.). Metode isolasi yang digunakan adalah maserasi dengan pelarut MeOH, fraksinasi dengan n-heksana, etil asetat serta n-butanol dan pemisahan fraksi n-butanol sebanyak 40 g dengan kromatografi kolom dan sebagai adsorben silika gel dan eluen EtOAc : MeOH secara SGP. Dihasilkan 5 fraksi, yaitu fraksi A, B, C, D dan E. 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, C dan D terdapat flavon glikosida, biflavonil atau flavon yang tersulih tak biasa.

KATA PENGANTAR

Puji syukur penulis ucapkan kepada Allah SWT karena berkat rahmat dan bimbinganNYA penulis mampu menyelesaikan skripsi ini dengan judul **“Isolasi dan Karakterisasi Flavonoid dari Bunga Tumbuhan Pagoda (*Clerodendron paniculatum* 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. Suryelita, M.Si selaku dosen penasehat akademik dan pembimbing I.
2. Ibu Dra. Sri Benti Etika, M.Si selaku pembimbing II.
3. Ibu Prof. Dra. Hj. Ellizar, M.Pd, Ibu Dra. Hj. Isniyetti, M.Si dan Ibu Dra. Hj. Erda Sofjeni, M.Si sebagai tim penguji Skripsi.
4. Bapak Nazir KS., M.Pd selaku Ketua Program Studi Kimia Jurusan Kimia FMIPA Universitas Negeri Padang.
5. Bapak Drs. Zul Afkar, M.S dan Drs. Bahrizal, M.Si selaku Ketua dan Sekretaris Jurusan Kimia FMIPA Universitas Negeri Padang.
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, Mei 2011

Penulis

DAFTAR ISI

	Halaman
ABSTRAK.....	i
KATA PENGANTAR.....	ii
DAFTAR ISI.....	iv
DAFTAR TABEL.....	vi
DAFTAR GAMBAR.....	vii
DAFTAR LAMPIRAN.....	viii
 BAB I PENDAHULUAN	
A. Latar Belakang	1
B. Perumusan Masalah	3
C. Pembatasan Masalah	3
D. Tujuan Penelitian	3
E. Manfaat Penelitian	4
 BAB II TINJAUAN PUSTAKA	
A. Tinjauan Botani.....	5
B. Flavonoid.....	7
C. Metode Ekstraksi	14
D. Pemisahan Komponen Kimia.....	16
E. Uji Kemurnian.....	19

	F. Karakterisasi.....	19
BAB III	METODOLOGI PENELITIAN	
	A. Tempat dan Waktu Penelitian	31
	B. Sampel Penelitian.	31
	C. Alat dan Bahan	31
	D. Prosedur Penelitian.....	32
BAB IV	HASIL DAN PEMBAHASAN	
	A. Hasil.	41
	B. Pembahasan.	42
BAB V	PENUTUP	
	A. Kesimpulan.	47
	B. Saran.	47
DAFTAR PUSTAKA		
LAMPIRAN		

DAFTAR TABEL

Tabel	Halaman
1. Warna Flavonoid dengan Sinar/Lampu UV.....	12
2. Warna Flavonoid dengan Beberapa Pereaksi.....	20
3. Rentangan Serapan Spektrum UV-Vis Flavonoid.....	24
4. Daftar Frekuensi Serapan Inframerah Beberapa Gugus Fungsi.....	29
5. Perbandingan Eluen yang Digunakan pada Kromatografi Kolom.....	38
6. Hasil Uji Kandungan Metabolit Sekunder pada Bunga Tumbuhan Pagoda (<i>Clerodendron paniculatum</i> L.).....	40
7. Warna Kromatogram Eluat dengan Sinar/Lampu UV.....	42
8. Warna Eluat dengan Pereaksi Warna.....	42

DAFTAR GAMBAR

Gambar	Halaman
1. Kerangka Dasar Flavonoid.....	7
2. Tiga Jenis Flavonoid Berdasarkan Susunan Kerangka Dasar Atom.....	8
3. Jenis Utama dan Struktur Dasar Flavonoid Alam.....	9
4. Struktur Kaemferol.....	10
5. Apigenin 7-O- β -D-glukopiranosida.....	10
6. Apigenin 8-C- β -D-glukopiranosida.....	11
7. Petunjuk Penyebaran Jenis Flavonoid pada Kromatogram yang Dikembangkan dengan TBA/HOAc 15%.....	22
8. Sistem Benzoil dan Sistem Sinamoil Dalam Cincin Flavonoid.....	23
9. Spektrum Serapan UV-Vis Jenis Flavonoid yang Berbeda, tetapi Pola Hidroksilasinya Sama.....	26
10. Senyawa Kompleks yang Menjelaskan Terjadinya Pergeseran Dalam Spektrum Luteolin pada Penambahan $AlCl_3/HCl$	28

DAFTAR LAMPIRAN

Lampiran	Halaman
1. Gambar Bunga Pagoda.....	47
2. Gambar Uji Identifikasi Flavonoid.....	48
3. Skema Kerja Isolasi Flavonoid.....	49

BAB I

PENDAHULUAN

A. Latar Belakang

Tumbuhan merupakan bahan alam yang sangat penting bagi manusia, diantaranya sebagai bahan obat. Penggunaan tumbuhan sebagai bahan obat pada awalnya berdasarkan pengalaman yang diwariskan secara turun temurun dan sampai saat ini masih banyak kandungan kimia dari tumbuhan tersebut belum diketahui dan diteliti. Tumbuhan tersebut tersebar hampir di seluruh wilayah Indonesia. Dari 30.000 spesies tumbuhan yang terdapat di hutan tropis Indonesia, baru sekitar 9.600 spesies diketahui berkhasiat obat dan baru sekitar 200 spesies yang telah dimanfaatkan sebagai bahan baku pada industri obat (Hapsah & Rahmawawati).

Penggunaan tumbuhan sebagai obat berkaitan dengan kandungan kimia tumbuhan tersebut 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 merupakan salah satu senyawa metabolit sekunder yang berasal dari tumbuhan. Senyawa ini tersebar luas pada tumbuhan angiospermae, gymnospermae dan pteridopita. Senyawa 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 tumbuhan pagoda (*Clerodendron paniculatum* L.). Tumbuhan pagoda (*Clerodendron paniculatum* L.) umumnya ditanam di taman, pekarangan rumah atau di pinggir jalan sebagai tanaman hias. Akar bunga ini berkhasiat antiradang, peluruh kencing (*diuretic*), menghilangkan bengkak dan menghancurkan darah beku. Daunnya berkhasiat sebagai antiradang dan mengeluarkan nanah. Bunganya dapat digunakan untuk pengobatan keputihan dan penambah darah pada penderita anemia (Subandono, 2010). Daun, batang dan bunga tumbuhan pagoda mengandung saponin dan polifenol. Disamping itu, daun dan batangnya juga mengandung alkaloid dan flavonoid (Anonim, 2007). Senyawa flavonoid yang terdapat dalam daun tumbuhan pagoda sudah diisolasi dan diidentifikasi oleh Hendro Faisal (2002). Pada senyawa tersebut terdapat gugus hidroksil (OH) pada atom C₅, C₇ dan C₄' dengan gugus metoksi pada atom C₆, berbentuk amorf warna kuning muda dengan titik lelehnya 275,6 - 276,67°C.

Berdasarkan uji pendahuluan yang telah dilakukan terhadap bunga tumbuhan pagoda (*Clerodendron paniculatum* L.) menunjukkan positif mengandung flavonoid dan saponin. Oleh karena itu, penulis tertarik untuk melakukan penelitian dengan judul “Isolasi dan Karakterisasi Flavonoid dari Bunga Tumbuhan Pagoda (*Clerodendron paniculatum* L.)”.

B. Perumusan Masalah

Berdasarkan latar belakang di atas, maka yang menjadi permasalahan dalam penelitian ini adalah apakah senyawa flavonoid dalam bunga tumbuhan pagoda (*Clerodendron paniculatum* L.) dapat diisolasi dan bagaimana karakteristik senyawa tersebut.

C. Pembatasan Masalah

Sesuai dengan permasalahan di atas, maka dilakukan pembatasan masalah sebagai berikut:

1. Sampel yang digunakan adalah bunga tumbuhan pagoda (*Clerodendron paniculatum* L.) yang diperoleh dari Kec. Koto Tengah, Padang.
2. Isolasi senyawa flavonoid dilakukan dengan cara maserasi, fraksinasi dan kromatografi kolom.
3. Uji kemurnian senyawa hasil isolasi dilakukan dengan menggunakan Kromatografi Lapis Tipis (KLT) dan uji titik leleh.
4. Karakterisasi senyawa hasil isolasi dilakukan dengan pereaksi warna, sinar/lampu UV, kromatografi kertas dua arah dan menggunakan metode spektroskopi Ultraviolet (UV-Vis) dan Inframerah.

D. Tujuan Penelitian

Penelitian ini bertujuan untuk mengisolasi dan mengkarakterisasi flavonoid dari bunga tumbuhan pagoda (*Clerodendron paniculatum* L.).

E. Manfaat Penelitian

Hasil penelitian ini diharapkan dapat:

1. Memberikan informasi tentang tanaman yang mengandung senyawa flavonoid.
2. Memberikan informasi tentang karakteristik senyawa flavonoid yang terdapat dalam bunga tumbuhan pagoda (*Clerodendron paniculatum* L.).

BAB II

TINJAUAN PUSTAKA

A. Tinjauan Botani

1. Taksonomi Tumbuhan Pagoda (*Clerodendron paniculatum* L.).

Berdasarkan hasil identifikasi yang dilakukan di Herbarium Universitas Andalas (ANDA), maka diperoleh klasifikasi tumbuhan pagoda 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	: Asteridae
Ordo	: Lamiales
Famili	: Verbenaceae
Genus	: <i>Clerodendron</i>
Spesies	: <i>Clerodendron paniculatum</i> L.

Kerabat dekat dari tumbuhan pagoda adalah kapitatum, gambir laut, genje dan senggugu.

2. Morfologi Tumbuhan Pagoda

Tumbuhan pagoda merupakan tanaman perdu meranggas, tingginya sekitar 1-3 m. Batangnya dipenuhi rambut halus. Helaian daun berbentuk bulat telur melebar, tunggal, bertangkai, letaknya berhadapan, pangkal daun berbentuk jantung dan daun tua panjangnya dapat mencapai 30 cm. Bunganya bunga majemuk berwarna merah, terdiri dari bunga kecil-kecil yang berkumpul membentuk piramid yang keluar dari ujung tangkai. Tumbuhan pagoda biasanya ditanam di taman, pekarangan rumah atau di pinggir jalan sebagai tanaman hias. Tumbuhan pagoda dapat diperbanyak dengan biji (Subandono, 2010).

3. Khasiat Bunga Pagoda

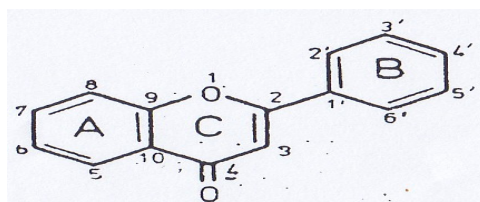
Bagian dari tumbuhan pagoda yang dapat digunakan untuk pengobatan adalah akar, bunga dan daun. Akar digunakan untuk pengobatan sakit pinggang (lumbago), nyeri pada rematik, tuberkulosis paru (TB paru) yang disertai batuk darah, wasir darah (hemoroid), berak darah (disentri), susah tidur (insomnia) dan bengkak akibat benturan benda keras. Bunganya dapat digunakan untuk pengobatan keputihan dan penambah darah pada penderita anemia. Sedangkan daunnya berkhasiat sebagai antiradang dan dapat mengeluarkan nanah (Subandono, 2010).

B. Flavonoid

1. Tinjauan Umum Flavonoid

Senyawa flavonoid adalah suatu kelompok senyawa fenol yang terbesar yang ditemukan di alam. Senyawa-senyawa ini merupakan zat warna merah, ungu, biru dan sebagian zat warna kuning yang ditemukan dalam tumbuh-tumbuhan (Achmad, 1986: 2). Flavonoid dalam daun (tumbuh-tumbuhan) dipengaruhi oleh adanya proses fotosintesis sehingga daun muda belum terlalu banyak mengandung flavonoid (Markham, 1988: 1). Flavonoid dalam bunga biasanya terdapat dalam sel-sel jaringan. Senyawa ini merupakan pigmen tumbuhan yang penting setelah klorofil dan karotena, yang menyebabkan timbulnya banyak macam warna dan shade dalam bunga (Manitto, 1982: 440).

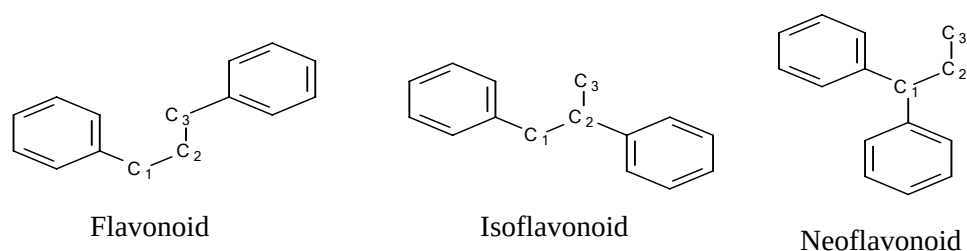
Flavonoid mempunyai kerangka dasar karbon yang terdiri dari 15 atom karbon dalam inti dasarnya yang tersusun dalam konfigurasi $C_6-C_3-C_6$, yaitu dua cincin aromatik yang dihubungkan oleh tiga atom karbon yang dapat atau tidak dapat membentuk cincin ketiga. Agar memudahkan cincin diberi tanda A, B dan 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

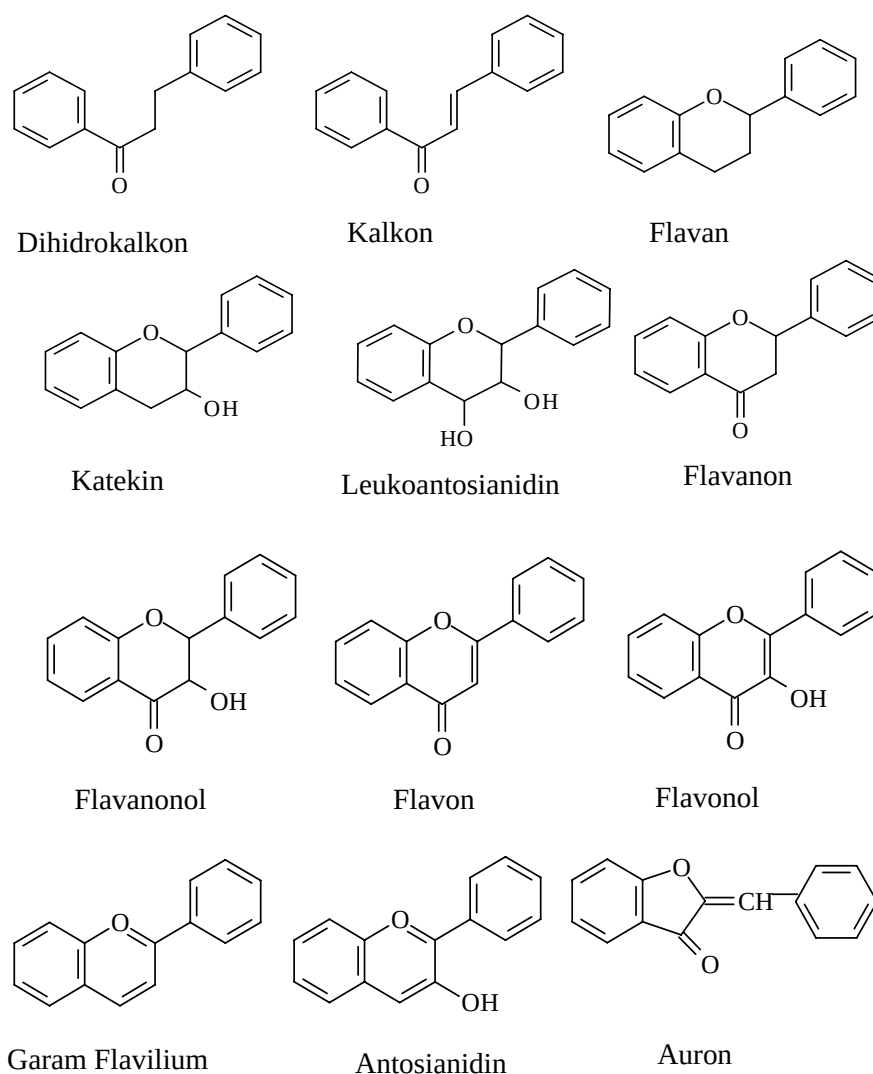
Dari kerangka dasar flavonoid dapat menghasilkan tiga jenis struktur, yaitu 1,3-diarilpropana (flavonoid), 1,2-diarilpropana (isoflavonoid) dan 1,1-diarilpropana (neoflavonoid). Ketiga kerangka dasar flavonoid ini dapat dilihat pada Gambar 2 (Achmad, 1986: 3-4).



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

Senyawa flavonoid terdiri dari beberapa jenis tergantung pada tingkat oksidasi propana dari sistem 1,3-diarilpropana antara lain dihidrokalkon, kalkon, flavan, katekin, leukoantosianidin, flavanon, flavanonol, flavon, flavonol, garam flavilium, antosianidin dan auron. Dalam hal ini flavan mempunyai tingkat oksidasi terendah sehingga dianggap sebagai senyawa induk dalam tata nama senyawa turunan flavonoid. Beberapa jenis flavonoid serta struktur dasar masing-masing jenis tercantum pada Gambar 3 di halaman 9. 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: 3- 4).

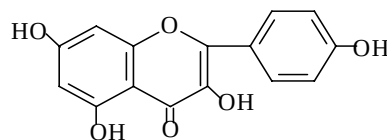


Gambar 3. Jenis Utama dan Struktur Dasar Flavonoid Alam
(Achmad, 1986: 3-4).

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, kalkon dan auron.

Contohnya : Kaemferol

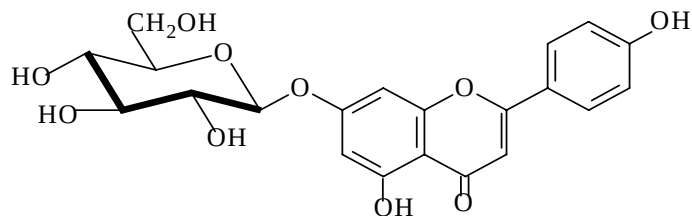


Gambar 4. Struktur Kaemferol (Markham, 1988: 4)

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).

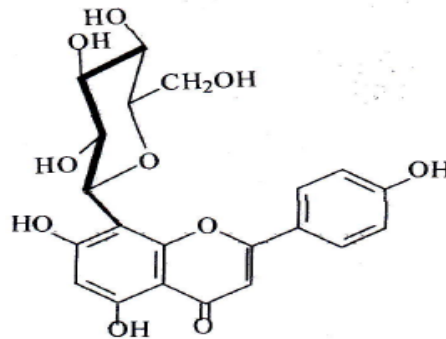
Contoh:



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. Kegunaan Flavonoid

Flavonoid merupakan pigmen-pigmen yang terdapat dalam tumbuhan. Sebagai pigmen bunga, flavonoid berperan dalam menarik burung dan serangga penyerbuk bunga. Untuk tumbuhan yang mengandungnya, flavonoid berfungsi sebagai pengatur tumbuh, pengatur fotosintesis, antimikroba dan antivirus (Robinson, 1995: 191). Bagi organisme yang lain, flavonoid memberikan efek farmakologis, yaitu antihipertensi, antialergi, antitumor, antiinflamasi dan antidiabetes (Bakhtiar, 1992: 94-96).

4. Sifat-sifat flavonoid

Tabel 1. Warna Flavonoid dengan Sinar/Lampu UV

Warna	Warna dengan sinar/lampu UV		
	Sendiri	Dengan amonia	Petunjuk
Jingga Merah Merah senduduk	Jingga redup, merah atau merah senduduk Fluoresensi merah kuning atau merah jambu	Biru Biru	Antosianidin 3-glikosida Kebanyakan antosianidin 3,5-diglikosida
Kuning murup	Coklat tua atau hitam Kuning murup atau hijau kuning	Coklat tua atau hitam Merah tua atau jingga murup Jingga murup atau merah	6-hidroksi flavonol dan flavon; beberapakhalkon glikosida Kebanyakan khalkon Auron
Kuning pucat	Coklat tua	kuning murup atau coklat kuning Kuning kunyit-hijau coklat tua	Kebanyakan flavonol glikosida Kebanyakan flavon glikosida, biflavonil dan flavon yang tersulih tak biasa
Nihil	Merah senduduk tua Biru lemah Merah senduduk tua	Coklat lemah Biru kuat Kuning pucat atau hijau kunig	Kebanyakan isoflavon dan flavononol 5-desoksiisoflavon dan 7,8-dihidroksi flavanon Flavanon dan flavanonol 7-glikosida

Sumber: Harbone, 1987:70

Flavonoid merupakan senyawa polar karena mempunyai sejumlah gugus hidroksil atau suatu gula, sehingga akan larut dalam pelarut polar seperti etanol (EtOH), metanol (MeOH) , butanol (BuOH), aseton, dimetilsulfoksida (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, flavon dan flavonol yang termetoksilasi cenderung lebih mudah larut dalam pelarut seperti eter dan kloroform (Markham, 1988: 15). Menurut Harborne, J.B. (1987: 70), jika ke dalam larutan flavonoid ditambahkan basa atau amonia, maka larutan akan berubah warnanya. Sifat ini dapat digunakan untuk mendeteksi flavonoid pada kromatogram atau dalam larutann seperti yang terlihat pada Tabel 1 di atas.

5. Identifikasi Flavonoid

Sebagian besar senyawa flavonoid alam ditemukan dalam bentuk glikosida, dimana unit flavonoid terikat pada suatu gula. Glikosida dihidrolisa dengan asam akan terurai menjadi komponen-komponennya, yaitu gula dan alkohol. Residu gula dari glikosida flavonoid alam adalah glukosa, ramnosa, galaktosa dan gentiobiosa sehingga glikosida tersebut masing-masing disebut glukosida, ramnosida, galaktosida dan gentiobiosida. Flavonoid dapat ditemukan sebagai mono-, di- atau triglikosida dimana satu, dua atau tiga gugus hidroksil dalam molekul flavonoid terikat oleh gula. Poliglikosida larut dalam air dan sedikit larut dalam pelarut organik seperti eter, benzena, kloroform dan aseton (Achmad, 1986: 17).

C. 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 ke dalam pelarut. Metode ekstraksi dipengaruhi oleh beberapa faktor, yaitu sifat jaringan tanaman, sifat kandungan zat aktif serta kelarutan dalam pelarut yang digunakan. Prinsip ekstraksi adalah melarutkan senyawa polar dalam pelarut polar dan senyawa non polar dalam senyawa non polar (Harborne, 1987: 4-6). Beberapa metode ekstraksi senyawa organik bahan alam yang umum digunakan antara lain:

1. Maserasi

Maserasi digunakan jika senyawa organik yang ada dalam tumbuhan cukup banyak, dengan menggunakan suatu pelarut yang dapat melarutkan senyawa organik tersebut tanpa pemanasan. Maserasi merupakan proses perendaman sampel dengan pelarut organik yang digunakan pada temperatur ruangan. Proses ini sangat menguntungkan dalam isolasi senyawa bahan alam, karena dinding dan membran sel akan pecah 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 dan memiliki titik didih yang rendah sehingga mudah menguap (Darwis, 2000).

2. Perkolasi

Perkolasi merupakan proses melewati pelarut organik pada sampel sehingga pelarut akan membawa senyawa organik. Teknik ini menggunakan pelarut yang tidak mudah menguap dan tidak mempunyai bau yang merangsang tetapi dapat melarutkan senyawa organik dengan lebih baik. Teknik ini digunakan pada sampel yang mengandung senyawa organik dalam jumlah besar (Manjang, 1985: 4-5).

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 penyarian dapat 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 dapat digunakan untuk memisahkan berbagai senyawa seperti senyawa organik yang terdapat di alam dan senyawa organik sintesis. Pemisahan terjadi karena perbedaan daya absorpsi adsorben tertentu terhadap komponen-komponen kimia yang dipisahkan. Kromatografi lapis tipis juga dapat digunakan untuk mencari adsorben dan pelarut yang akan dipakai dalam kromatografi kolom (Adnan, 1997: 9).

Kromatografi lapis tipis 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). Adsorben yang umum digunakan adalah silika gel, alumina, kiselgur dan selulosa. Fase gerak dapat berupa bermacam-macam pelarut atau campuran pelarut (Gritter, 1991: 109).

Kromatografi Lapis Tipis digunakan untuk:

- a. Mencari pelarut yang cocok untuk kromatografi kolom
- b. Analisa fraksi yang diperoleh dari kromatografi kolom
- c. Isolasi flavonoid murni skala kecil

(Markham, 1988: 33).

Penentuan besarnya retensi suatu komponen pada plat kromatografi dapat dinyatakan dengan nilai R_f (*Retention factor*). Nilai R_f diperoleh dengan

membandingkan jarak titik pusat noda akhir dengan jarak yang ditempuh eluen dari titik awal.

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

Untuk melihat noda pada plat kromatografi lapis tipis dapat digunakan uap iodium, sinar UV dan reagen-reagen pewarna tertentu (Gritter, 1991: 116).

Kromatografi lapis tipis memiliki beberapa kelebihan, diantaranya:

1. Plat kromatografi lapis tipis dapat menggunakan adsorben (penyerap) yang berbeda-beda.
2. Waktu yang digunakan singkat.
3. Alat yang digunakan tidak terlalu mahal.
4. Kepekaannya cukup tinggi dengan jumlah cuplikan beberapa mikrogram.
5. Plat kromatografi lapis tipis dapat disemprot dengan asam sulfat pekat untuk mendeteksi steroid dan lipid.

(Harbone, 1987: 13-14).

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. 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 linarut bergerak melalui kolom dengan laju yang berbeda, memisah dan dikumpulkan berupa fraksi, kemudian dimonitor dengan kromatografi lapis tipis. Pelarut yang digunakan ditingkatkan kepolarannya secara bertahap (Step Gradien Polarity) (Gritter, 1991: 60).

3. Rekristalisasi

Rekristalisasi adalah pengkristalan kembali salah satu komponen baik pengotor ataupun hasil isolasi. Pada metode rekristalisasi harus dicari satu pelarut atau lebih yang dapat melarutkan pengotor dan hasil isolasi pada suasana panas, tetapi tidak melarutkan salah satunya dengan baik dalam suasana dingin. Hasil isolasi yang akan dimurnikan tersebut dilarutkan terlebih dahulu dalam suatu pelarut, dimana pelarut tersebut dapat melarutkan keduanya. Kemudian dipanaskan perlahan-lahan sambil ditambahkan suatu pelarut lain yang daya larutnya terhadap pengotor atau hasil isolasi lebih kecil. Pada akhirnya didapatkan suatu keadaan jenuh, dimana kedua pelarut tersebut mempunyai kelarutan minimal, yang biasanya dapat dilihat dengan mulai terjadinya kekeruhan. Lalu dilakukan pendinginan di udara terbuka. Akhirnya didapatkan dua fase, fase pertama berupa padatan (kristal) dari hasil isolasi dan fase kedua berupa cairan dari pengotor. Setelah pengkristalan sempurna maka kristal dapat dipisahkan melalui penyaringan (Manjang, 1985: 8-9).

E. 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, 1988: 19-20).

1. Kromatografi Lapis Tipis (KLT)

Kemurnian hasil isolasi diketahui melalui noda yang dihasilkan pada plat KLT. Jika noda yang dihasilkan tunggal, maka kemungkinan senyawa hasil isolasi tersebut telah murni. Untuk memastikannya perlu diganti pelarut yang digunakan sebagai pengelusi. Jika setelah diganti dengan berbagai pelarut masih tetap membentuk noda tunggal, maka kemungkinan hasil isolasi tersebut sudah murni. Jika belum tunggal, kemungkinan hasil isolasi belum murni (Manjang, 1988: 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 leleh senyawa tersebut. Pada saat berikutnya temperatur dinaikkan secara pelan sehingga didapat titik leleh yang lebih teliti. Suatu zat dikatakan murni apabila range titik leleh tersebut kurang dari atau sama dengan dari 2°C, yang diamati saat mulai meleleh sampai semua zat mencair. Makin

kecil jarak perbedaan titik lelehnya, maka tingkat kemurnian akan makin besar (Manjang, 1985: 29).

F. Karakterisasi

1. Reaksi Warna

Mereaksikan senyawa flavonoid dengan pereaksi 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.

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	Merah (pink)
Flavonol	Kuning sampai orange	Kuning sampai orange	Merah (pink)

Sumber : Kusuma, 1988.

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

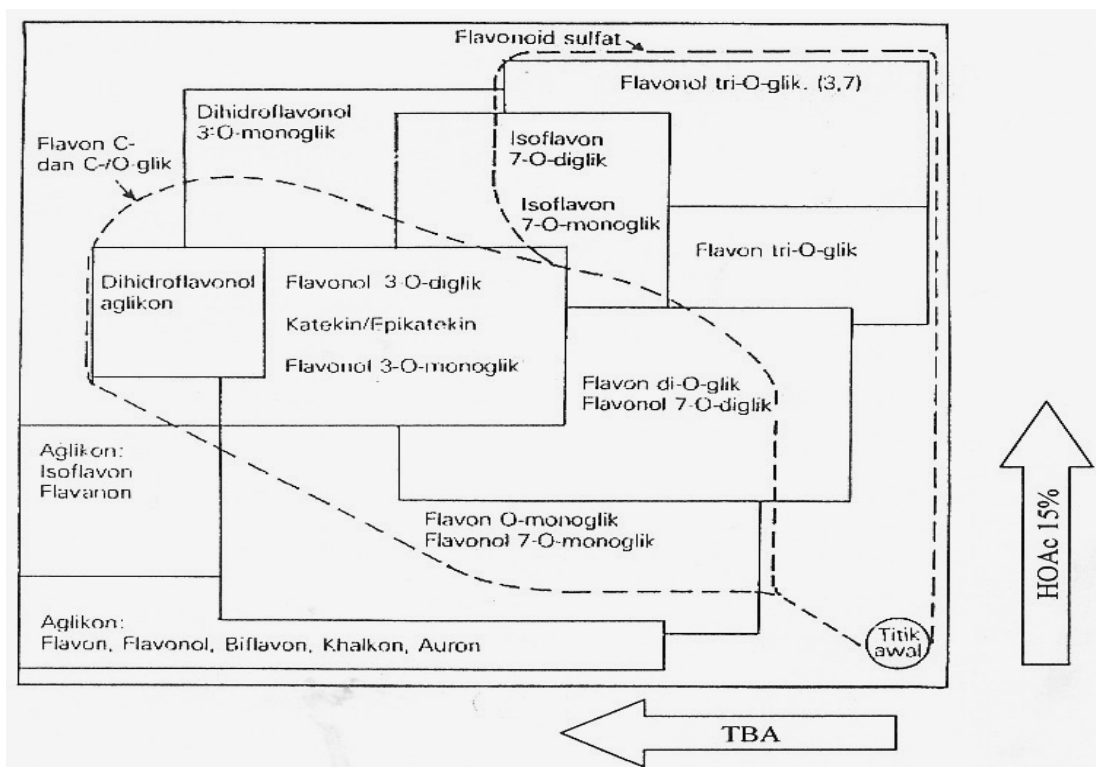
Cara yang paling umum digunakan untuk analisa flavonoid dalam jaringan tumbuhan adalah kromatografi kertas dua arah. Prinsipnya adalah

mengelusikan campuran komponen dengan dua macam pelarut yang kepolarannya berbeda. Pelarut pengelusi yang digunakan adalah BAA ($n\text{-BuOH:HOAc:H}_2\text{O} = 4:1:5$) sebagai pengembang pertama dan asam asetat 15 % sebagai pengembang kedua. Kertas yang digunakan adalah kertas Whatman 3MM (46x57 cm). Ekstrak tumbuhan ditotolkan pada kertas di suatu titik kira-kira 8 cm dari tepi kertas dan 3 cm dari lipatan akhir. Kertas dicelupkan ke dalam larutan pengembang pertama (BAA) dengan digantung tegak lurus di dalam bejana sehingga larutan pengembang bergerak ke atas. Setelah larutan pengembang sampai pada garis batas atas, 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 kalkon, auron dan 6-hidroksi flavonol (kuning). Oleh karena itu, 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 diuapkan dengan NH_3 (Markham, 1988: 19).

Petunjuk untuk menentukan jenis flavonoid tertentu dengan menggunakan kondisi kromatografi baku dapat dilihat pada Gambar 7.



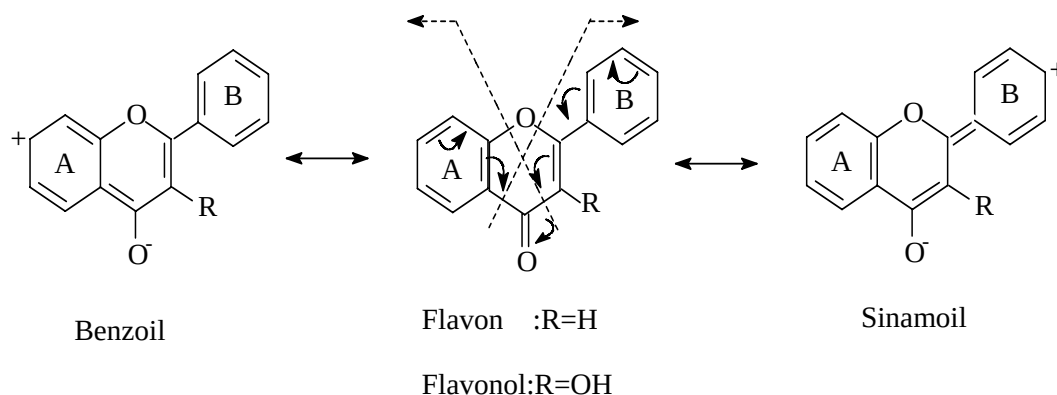
Gambar 7. Petunjuk Penyebaran Jenis Flavonoid pada Kromatogram yang Dikembangkan dengan TBA/HOAc 15% (Markham, 1988: 22).

3. 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 mengakibatkan transisi elektron dari orbital keadaan dasar yang berenergi rendah ke orbital keadaan

tereksitasi berenergi tinggi. Dimana transisi ini memerlukan energi 40-300 kkal/mol. Disini molekul yang memerlukan lebih banyak energi untuk promosi elektron akan menyerap pada panjang gelombang yang lebih pendek, sedangkan molekul yang memerlukan energi lebih sedikit akan menyerap pada panjang gelombang yang lebih panjang. 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. Misalnya flavon dan flavonol, mempunyai serapan maksimum di daerah ultraviolet pada dua panjang gelombang, yakni sekitar 330-550 nm (Pita I) dan sekitar 240-285 nm (Pita II).



Gambar 8. 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, seperti yang terlihat pada Gambar 8 di halaman 22. Oleh karena itu, penambahan gugus fungsi yang dapat menyumbangkan elektron (donor elektron) seperti gugus hidroksil (O-H) atau gugus metoksil ($-\text{OCH}_3$) 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).

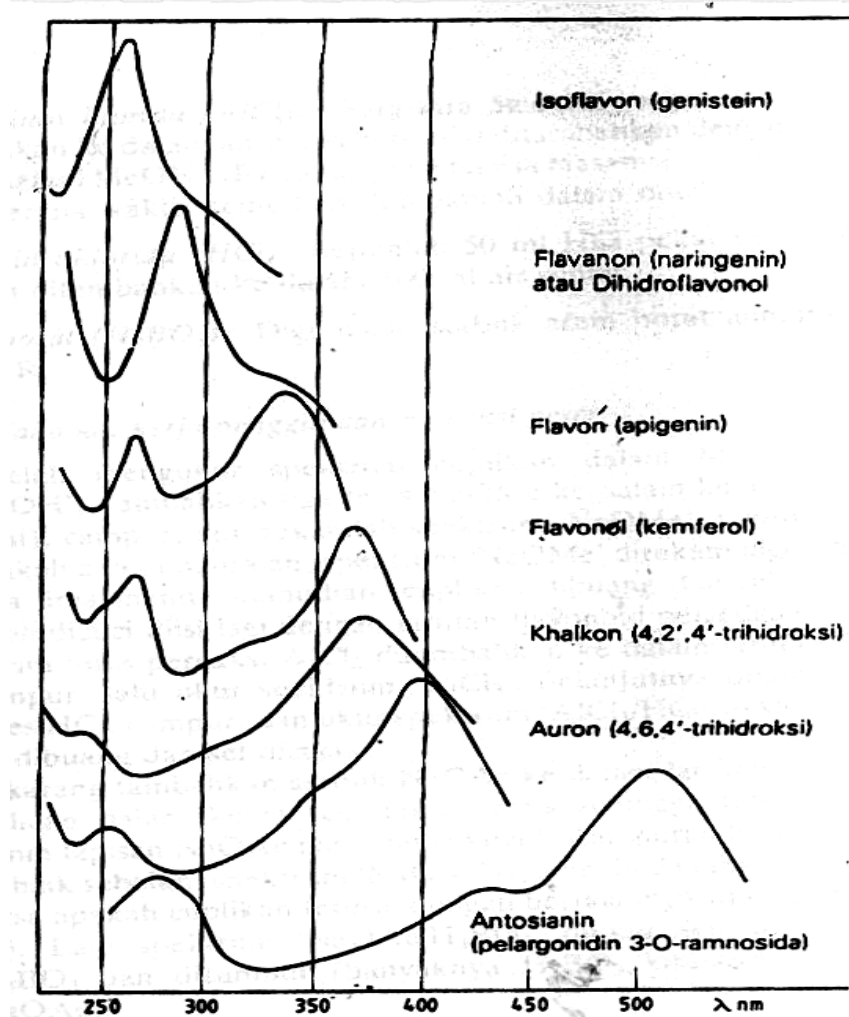
Spektroskopi serapan ultraviolet dan serapan tampak merupakan cara yang paling berguna untuk menganalisis flavonoid. Cara ini digunakan untuk membantu mengidentifikasi jenis flavonoid dan memecahkan pola oksigenasi. Disamping itu kedudukan gugus hidroksil fenol bebas pada inti flavonoid dapat ditentukan 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 terikat pada salah satu gugus hidroksi fenol. Spektrum flavonoid biasanya ditentukan dalam pelarut metanol atau etanol, namun spektrum yang dihasilkan dalam etanol kurang memuaskan. Petunjuk mengenai rentang serapan maksimum utama yang diperkirakan untuk setiap jenis flavonoid dapat dilihat pada Tabel 3 di halaman 25 (Markham, 1988: 38).

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	Kalkon
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 9 di halaman 26:



Gambar 9. Spektrum Serapan UV-Vis Jenis Flavonoid yang Berbeda tetapi Pola Hidroksilasinya Sama (Markham, 1988: 40).

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

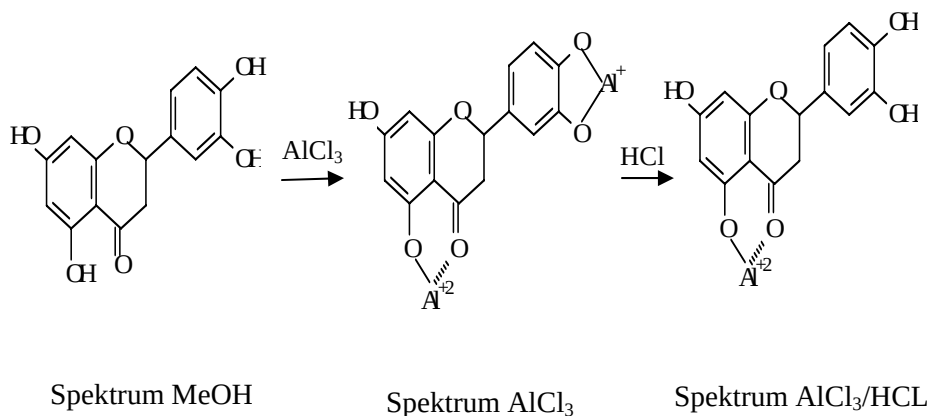
batokromik pada pita I dan pita II pada flavonoid. NaOMe sering digunakan untuk mendeteksi gugus OH pada posisi 4', karena gugus ini memberikan pergeseran batokromik pada pita I. Penggunaan NaOMe dapat digantikan oleh NaOH. Pemeriksaan ulang setelah lima menit perlu dilakukan terhadap spektrum sampel 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. AlCl₃/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 AlCl₃, dengan contoh reaksi sebagai berikut :



Gambar 10. Senyawa Kompleks yang Menjelaskan Terjadinya Pergeseran Dalam Spektrum Luteolin pada Penambahan AlCl₃/HCl (Markham, 1988: 47).

4. Spektrofotometri 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 digunakan untuk menentukan gugus fungsi suatu senyawa organik. Penggunaan spektroskopi inframerah pada bidang kimia organik menggunakan daerah dengan frekuensi $650\text{--}4000\text{ cm}^{-1}$ ($15,4\text{--}2,5\text{ }\mu\text{m}$). Bila sinar inframerah dilewatkan melalui senyawa organik maka sejumlah frekuensi diserap sedang frekuensi yang lain diteruskan. Daftar frekuensi serapan inframerah beberapa gugus fungsi dapat dilihat pada Tabel 4 di halaman 29 (Sastrohamidjojo, 1991: 1-4).

Proses penyerapan radiasi inframerah terjadi bila suatu frekuensi tertentu dari radiasi inframerah dilewatkan pada sampel suatu senyawa organik. Detektor yang ditempatkan pada posisi lain dari senyawa akan dideteksi frekuensi yang dilewatkan pada sampel yang tidak diserap oleh senyawa. Banyaknya frekuensi yang melewati senyawa (yang tidak diserap) akan diukur sebagai persen transmittan (Dachriyanus, 2003: 22-23).

Tabel 4. Daftar Frekuensi Serapan Inframerah Beberapa Gugus Fungsi

Gugus fungsi	Frekuensi cm^{-1}
C=C - Alkena	1680-1600
- Aromatik	1600-1475
C=O - Aldehid	1740-1720
- Keton	1725-1705
- Asam karboksilat	1725-1700
- Ester	1750-1730
C-O - Eter, alcohol	1300-1000
O-H - Alkohol	3000-3700
C-H - Alkana	3000-2850

Sumber : Sastrohamidjojo, 1991: 15-16.

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 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).

BAB V

PENUTUP

A. Kesimpulan

Berdasarkan hasil penelitian yang telah dilakukan maka dapat disimpulkan bahwa:

1. Ditinjau dari kelarutannya, sampel bunga tumbuhan pagoda (*Clerodendron paniculatum* L.) mengandung senyawa polar.
2. Karakterisasi dengan menggunakan sinar/lampu UV menunjukkan dalam bunga tumbuhan pagoda (*Clerodendron paniculatum* 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 berair.

Lampiran 1. Gambar Bunga Tumbuhan Pagoda (*Clerodendron paniculatum* L.).



Lampiran 2. Gambar Uji Identifikasi Flavonoid



Keterangan gambar:

- Warna kuning kehijauan : ekstrak metanol
- Warna merah : ekstrak metanol + Mg-HCl

DAFTAR PUSTAKA

- Achmad, S.A. 1986. *Kimia Organik Bahan Alam*. Jakarta: Universitas Terbuka
- Adnan, Mochamad. 1997. *Teknik Kromatografi Untuk Analisis Bahan Makanan*. Yogyakarta: ANDI Yogyakarta
- Anonim. 2007. *Clerodendron squamatum Vahl*. (<http://www.warintek.ristek.go.id>). Diakses tanggal 22 Februari 2010
- Bakhtiar, A. 1992. *Diktat Kuliah Flavonoid*. Padang: Universitas Andalas
- Dachriyanus. 2002. *Analisis Struktur Senyawa Organik Secara Spektroskopi*. 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: Universitas Andalas
- Fessenden, R.J., dan Fessenden J.S. 1992. *Kimia Organik* (A. Hadyana P. Terjemahan). Jilid I, Edisi ketiga. Jakarta: Erlangga. Buku asli diterbitkan tahun 1986
- _____. 1992. *Kimia Organik* (A. Hadyana P. Terjemahan). Jilid I, Edisi ketiga. Jakarta: Erlangga. Buku asli diterbitkan tahun 1986
- Gritter, R.J. 1991. *Pengantar Kromatografi* (Kosasih Padmawinata. Terjemahan). Edisi kedua. Bandung: ITB. Buku asli diterbitkan tahun 1985
- Harborne, J.B., 1987. *Metode Fitokimia* (Kosasih Padmawinata dan Iwang Soediro. Terjemahan). Edisi kedua. Bandung: ITB. Buku asli diterbitkan tahun 1973
- Hapsoh & Rahmawawati, Nini. .*Pendahuluan*. (<http://e-course.usu.ac.id/content/>). Diakses tanggal 11 Januari 2010.
- Faisal, Hendro. 2002. *Isolasi Flavonoid dari Daun Tumbuhan Pagoda (Clerodendron paniculatum L.)*. Skripsi Padang: UNP
- Kusuma, T.S. 1988. *Kimia dan Lingkungan*. Padang: Universitas Andalas
- Manitto, Paolo. 1992. *Biosintesis Produk Alami* (Koensoemardiyah. Terjemahan). Semarang: IKIP Semarang. Buku asli diterbitkan tahun 1981.