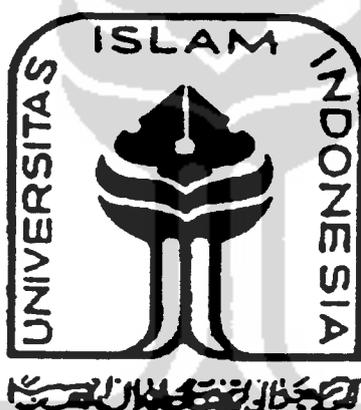


**ISOLASI SENYAWA FLAVONOID  
DARI KULIT JERUK LIMAU GEDANG ( *Citrus paradisi* )  
DAN PEMANFAATAN EKSTRAKNYA SEBAGAI ZAT  
PEWARNA**

**SKRIPSI**

**Diajukan untuk memenuhi salah satu syarat mencapai  
gelar Sarjana Sain ( S.Si ) Program Studi Kimia  
pada Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam  
Universitas Islam Indonesia  
Jogjakarta**



**Disusun oleh :**

**WIDI UTAMA  
No Mhs : 98 612 021**

**JURUSAN ILMU KIMIA  
FAKULTAS MATEMATIKA DAN ILMU PENGETAHUAN ALAM  
UNIVERSITAS ISLAM INDONESIA  
JOGJAKARTA  
2003**

**ISOLASI SENYAWA FLAVONOID  
DARI KULIT JERUK LIMAU GEDANG (*Citrus paradisi*)  
DAN PEMANFAATAN EKSTRAKNYA SEBAGAI ZAT  
PEWARNA**

**Oleh :**

**WIDI UTAMA**  
No Mhs : 98 612 021

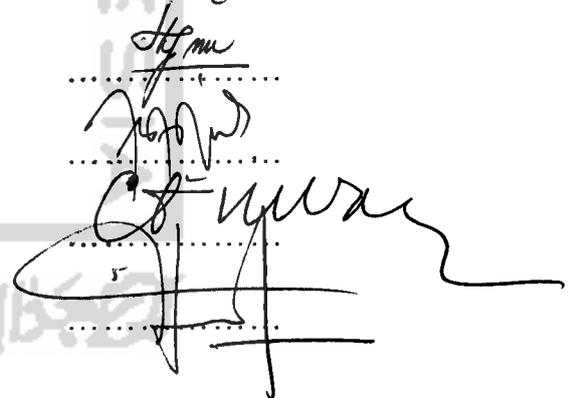
Telah dipertahankan dihadapan Panitia Penguji skripsi  
Jurusan Kimia Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam  
Universitas Islam Indonesia

Tanggal : ... 2 - Juli - 2003 .

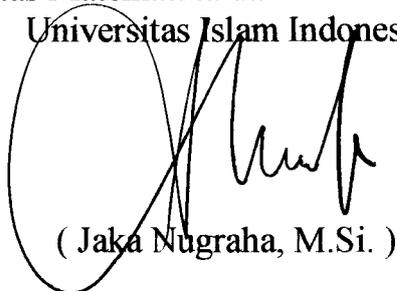
Dewan Penguji

1. Dra. Suparmi, M.Si. Apt
2. Is Fatimah, M.Si
3. Dr. Chairil Anwar
4. Tatang Shabur. J, S.Si

Tanda tangan

  
.....  
.....  
.....  
.....

Mengetahui,  
Dekan Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam  
Universitas Islam Indonesia

  
( Jaka Nugraha, M.Si. )

## *Halaman persembahan*

*Kupersembahkan karya sederhana ini  
Untuk Ibunda dan Ayahanda tercinta  
Engkau begitu mulia, hanya ini yang bisa ananda berikan  
Walaupun semua ini belum cukup dengan pengorbanan yang engkau  
berikan kepada ananda ini, semoga Allah membalas semua  
ketulusan dan pengorbanan yang engkau berikan  
Amieen...*

*Kedua adiku, Eusi dan widiana  
Dari kalian berdua tumbuh dan tercipta cinta dan kasih sayang  
Yang abadi, semoga Allah menjaga persaudaraan ini hingga  
Akhir hayat*

*Terimakasih untuk kedua eyangku  
Atas Doa dan petuahnya*

## MOTTO

“ Sesungguhnya sesudah kesulitan itu ada kemudahan. Maka apabila kamu telah selesai (darisegala urusanmu), kerjakanlah dengan sungguh-sungguh (urusan lain). dan hanya kepada Tuhanmulah hendaknya kamu berharap “

ISLAM (QS. Alam Nasrah, 6- 8)

“...Sesungguhnya Allah tidak merubah keadaan suatu kaum sehingga mereka merubah keadaan yang ada pada diri mereka sendiri “

(QS. Ar- Ra'ad , 11)

“ Dengan ilmu kehidupan menjadi mudah, dengan seni hidup menjadi indah, dengan agama hidup terarah dan bermakna “

(Prof. Dr. HA. Mukti Ali)

“ Hidup adalah soal keberanian menghadapi tanda Tanya. Tanpa kita bisa mengerti, tanpa kita bisa menawar, terimalah dan hadapilah “

(Soe Hok Gie)

“ Jika seorang ahli kimia dapat menyarikan dalam bagian-bagian hatinya rasa kasihan, hormat, damba, sabar, sesal, kejut, maaf dan menjadikannya satu kesatuan, maka dia telah menciptakan suatu atom yang disebut CINTA...?

(Kahlil gibran)

Sederhana dalam sikap, kaya dalam berkarya

## DAFTAR ISI

	<i>Halaman</i>
HALAMAN JUDUL .....	i
HALAMAN PENGESAHAN .....	ii
HALAMAN PERSEMBAHAN .....	iii
HALAMAN MOTTO .....	iv
DAFTAR ISI .....	v
KATA PENGANTAR .....	viii
DAFTAR TABEL .....	x
DAFTAR GAMBAR .....	xi
INTISARI .....	xii
ABSTRACT .....	xiii
<b>BAB I PENDAHULUAN</b>	
1.1 Latar belakang .....	1
1.2 Perumusan Masalah .....	3
1.3 Tujuan Penelitian .....	3
1.4 Manfaat Penelitian .....	3
<b>BAB II TINJAUAN PUSTAKA</b> .....	4
<b>BAB III LANDASAN TEORI</b>	
3.1 Morfologi tanaman jeruk.....	6
3.2 Flavonoid	
3.2.1 Penggolongan flavonoid.....	7
3.2.2 Penyebaran flavonoid pada tumbuhan .....	9
3.2.3 Naringin .....	12
3.3 Zat warna .....	13

3.3.1 Zat warna azo .....	14
3.3.2 Pembuatan zat warna azo.....	16
3.4 Ekstraksi .....	18
3.5 Kromatografi.....	21
3.5.1 Kromatografi lapis tipis.....	22
3.6 Spektrofotometer UV - Vis .....	25
3.6.1 Prinsip dasar spektrofotometer UV-Vis .....	25
3.6.2 Instrumentasi .....	26
3.6.3 Identifikasi flavonoid.....	28
3.7 spektroskopi Inframerah.....	32
HIPOTESIS PENELITIAN.....	34
BAB IV METODOLOGI PENELITIAN.....	36
4. 1 Alat dan Bahan Yang digunakan .....	36
4.1.1 Alat-alat Yang Digunakan .....	36
4.1.2 Bahan-bahan Yang Digunakan .....	36
4.2 Sampel.....	37
4. 3 Cara kerja.....	37
4.3.1 Preparasi kulit jeruk.....	37
4.3.2 Ekstraksi soxhlet.....	37
4.3.3 Identifikasi pendahuluan kromatografi lapis tipis.....	38
4.3.4 Pemisahan flavonoid dengan kromatografi KLT preparatif.....	38
4.3.5 Identifikasi dengan spektrofotometer UV-Vis.....	38
4.3.6 Reaksi kopling.....	40
BAB V HASIL DAN PEMBAHASAN.....	41
5.1 Hasil penelitian .....	41
5.2 Identifikas pendahuluan KLT.....	40
5.3 Pemisahan flavonoid dengan KLT preparatif.....	43
5.4 Identifikasi dengan Spektrofotometer UV-Vis.....	44
5.5 Spektroskopi IR.....	49

5.6 Reaksi pengkoplingan .....	50
5.6.1 Pencelupan .....	50
5.6.2 Reaksi pembangkitan .....	53
<b>BAB VI KESIMPULAN DAN SARAN</b>	
6.1 Kesimpulan .....	59
6.2 Saran .....	59
DAFTAR PUSTAKA .....	60
LAMPIRAN .....	61



## KATA PENGANTAR

AssalamMu'alaikum Wr Wb.

Puji syukur penulis panjatkan kehadirat Allah SWT yang telah memberikan kekuatan, rahmat dan hidayah – Nya, sehingga penulis dapat menyelesaikan skripsi dengan judul “ Isolasi senyawa flavonoid dari kulit jeruk limau gedang ( *Citrus paradisi* ) dan pemanfaatan ekstraknya sebagai zat pewarna ” dengan baik

Penulisan skripsi ini diajukan sebagai syarat untuk memperoleh gelar sarjana S1 pada jurusan ilmu kimia yang telah ditetapkan oleh Fakultas matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam Universitas Islam Indonesia, Jogjakarta

Penulis berharap skripsi ini dapat memberikan manfaat dan sumbangan informasi bagi kemajuan ilmu pengetahuan, meskipun penulis menyadari bahwa skripsi ini masih banyak kekurangan dan jauh dari kesempurnaan. Oleh karena itu dengan rasa rendah hati penulis menerima segala kritik, saran, dan koreksi demi kesempurnaan skripsi ini.

Dalam kesempatan ini penulis ingin menyampaikan ucapan terimakasih yang sebesar – besarnya kepada yang terhormat :

1. Bapak Jaka Nugraha M.Si selaku Dekan Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam Universitas Islam Indonesia, Jogjakarta.
2. Bapak Riyanto M.Si selaku Ketua Jurusan Kimia Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam Universitas Islam Indonesia, Jogjakarta

3. Bapak DR. Chairil Anwar selaku Dosen Pembimbing I, terimakasih atas bimbingan dan waktunya
  4. Bapak Tatang Shabur Julianto S.Si selaku Dosen Pembimbing II, terimakasih atas bimbingan dan dorongan semangatnya.
  5. Segenap Staf Laboratorium Kimia Dasar Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam Universitas Islam Indonesia, Jogjakarta
  6. Segenap Staf Pengajar dan Civitas Akademika Jurusan Kimia Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam Universitas Islam Indonesia, Jogjakarta
  7. Sahabat – sahabatku (A'Agus, Aji, Arie, Aulia, Lidya, Yuni, Yos, Jamal, gubuk ijo geng, anak SWR ) dan teman – teman Kimia 98, terimakasih atas pengertian kalian semua semoga Allah menjaga persaudaraan kita
- Besar harapan penulis semoga skripsi ini dapat bermanfaat dan berguna bagi penulis sendiri , Agama, Nusa dan Bangsa dan Almamater tercinta.  
Amieen...

Billahitaufik Walhidayah

Wassalamu'alaikum Wr. Wb

Jogjakarta, 2003

Penulis

## DAFTAR TABEL

Tabel 1 Penyebaran flavonoid pada tumbuhan .....	10
Tabel 2 Penafsiran warna bercak dari segi struktur flavonoid.....	24
Tabel 3 Rentangan serapan UV – Vis flavonoid.....	28
Tabel 4 Penafsiran spektrum MeOH + NaOH.....	29
Tabel 5 Penafsiran spektrum AlCl <sub>3</sub> dan AlCl <sub>3</sub> / HCl.....	30
Tabel 6 Penafsiran spektrum NaOAc .....	31
Tabel 7 Penafsiran spektrum NaOAc / H <sub>3</sub> BO <sub>3</sub> .....	31
Tabel 8 Daerah serapan IR.....	33
Tabel 9 Data hasil pengembangan dengan berbagai eluen.....	42
Tabel 10 Data hasil deteksi bercak dengan eluen TBA(3:1:1v/v).....	43
Tabel 11 Data penafsiran spektrum fraksi 1.....	47
Tabel 12 Data pengamatan terhadap warna hasil reaksi kopling.....	55



## DAFTAR GAMBAR

<b>Gambar 1. Struktur umum flavonoid.....</b>	<b>7</b>
<b>Gambar 2. Struktur aglikon flavonid.....</b>	<b>8</b>
<b>Gambar 3. Struktur senyawa naringin dan hisperidin.....</b>	<b>11</b>
<b>Gambar 4. Struktur Senyawa naringin.....</b>	<b>12</b>
<b>Gambar 5. Spektra khas naringin dan pola pergrserannya.....</b>	<b>13</b>
<b>Gambar 6. Bagan instrumen Spektrofotometer UV – Vis.....</b>	<b>26</b>
<b>Gambar 7. Bagan Instrumen Spektroskopi Infra merah.....</b>	<b>32</b>
<b>Gambar 8 Struktur senyawa naringin.....</b>	<b>34</b>
<b>Gambar 9 Struktur senyawa hisperidin.....</b>	<b>35</b>
<b>Gambar 10 Spektrum MeOH + NaOH fraksi 1.....</b>	<b>45</b>
<b>Gambar 11 Spektrum MeOH + AlCl<sub>3</sub> + HCl.....</b>	<b>46</b>
<b>Gambar 12 Spektrum MeOH + NaOAC + H<sub>3</sub>BO<sub>3</sub>.....</b>	<b>46</b>
<b>Gambar 13 Gambar struktur flavanoid fraksi 1.....</b>	<b>48</b>
<b>Gambar 14 Spektrum IR ekstrak kulit jeruk.....</b>	<b>48</b>
<b>Gambar 15 Proses pembangkitan warna.....</b>	<b>53</b>

**ISOLASI SENYAWA FLAVONOID  
DARI KULIT JERUK LIMAU GEDANG (*Citrus paradisi*)  
DAN PEMANFAATAN EKSTRAKNYA SEBAGAI ZAT  
PEWARNA**

**INTI SARI**

**Widi utama  
98 612 021**

Telah dilakukan penelitian tentang isolasi senyawa naringin dari kulit jeruk limau gedang (*Citrus paradisi*) dan pemanfaatannya sebagai zat pewarna.

Isolasi senyawa naringin dilakukan dengan mengekstrak langsung dari kulit jeruk menggunakan metode soxhletasi. Identifikasi terhadap senyawa naringin dilakukan dengan metode kromatografi lapis tipis (KLT) menggunakan eluen TBA 3:1:1 v/v, selanjutnya dilakukan kromatografi preparatif. Untuk memperoleh spektrum khas naringin, dilakukan indentifikasi menggunakan spektrofotometer UV-Vis pada panjang gelombang 200-500 nm. Isolat yang diperoleh di indentifikasi menggunakan IR untuk mengetahui gugus – gugus fungsi dan isolat tersebut dilarutkan dalam detergen dan dilakukan reaksi kopling antara naringin dan garam diazonium untuk menghasilkan zat warna

Hasil penelitian menunjukkan diperoleh spektrum khas naringin pada panjang gelombang 280 nm dengan spektrofotometer UV-Vis, adapun warna bercak lembayung dan harga  $R_F$  yang diperoleh 0,89. Hasil IR menunjukkan bahwa pada  $\lambda$  3363,3-3712,2  $\text{cm}^{-1}$  terdapat gugus OH, pada  $\lambda$  1608-1647,1  $\text{cm}^{-1}$  terdapat gugus  $\text{C}=\text{O}$  dan pada  $\lambda$  2918,1  $\text{cm}^{-1}$  merupakan cincin aromatik. Penggunaan pereaksi geser memberikan pola pergeseran +20,4 pada pita II menunjukkan penafsiran pola hidroksi 5, 7- OH. Munculnya bahu pada panjang gelombang yang lebih panjang menunjukkan pola hidroksi 4'OH. Hasil reaksi pengkoplingan dengan garam diazonium memberikan corak warna yang berbeda tergantung dari jenis garam diazonium yang digunakan.

**Kata kunci : Soxhletasi, kromatografi lapis tipis, kopling, Naringin, Citrus paradisi**

**ISOLATION OF COMPOUND FLAVONOID  
FROM HUGE LEMON PEEL ( *Citrus Paradisi* )  
AND ITS EXPLOITING EKSTRAKS AS COLOURANT DYES**

**ABSTRACT**

Widi utama  
98 612 021

It has been done research about isolation of compound naringin from huge lemon peel (*Citrus Paradisi*) and its exploiting as colour dyes.

isolation of naringin compound done with the direct extract from peel use the method soxhletation. Indentification to compound naringin conducted with the method of thin layer chromatography ( TLC ) with the eluen TBA 3:1:1 v /v by chromatography preparation. To obtain get the typical spectrum of naringin, conducted by indentification use the spectrophotometer UV-VIS at wavelength 200-500 nm. Isolat obtained in indentification use the IR to know the bunch of function. and tan isolat function dissolved in detergen and conducted by a coupling reaction between naringin and salt to yield the colour dyes.

Result of research show that spectrophotometer UV-VIS obtained by a typical spectrum of naringin at wavelength 280 nm, with the crimson pock colour and  $R_F$  value obtained by 0,89. Result of IR show that at 3363,3-3712,2  $\text{cm}^{-1}$  there are bunch OH, at 1608-1647,1  $\text{cm}^{-1}$  there are bunch C=O and at 2918,1  $\text{cm}^{-1}$  representing ring of aromatik of use reactan shift to give the fraction pattern + 20,4 at ribbon of II show of interpretation of pattern hidroxy 5, 7- OH. Shoulder appearance at longer wavelength of show pattern hidroxy 4'OH. Result reaction the coupling with the salt. give the different colour pattern depended from salt type used

*Keyword : Soxhletation, thin layer chromatography, coupling, Naringin, Citrus Paradisi*

# BAB I

## PENDAHULUAN

### 1.1 Latar belakang

Pada umumnya pewarna (dyes) merupakan barang impor. Di Indonesia masih sedikit industri bahan dasar pewarna, terutama zat warna untuk industri kain batik. Zat warna yang di impor itu umumnya dari petrokimia, oleh karena itu penelitian tentang zat warna alami sangat penting. Misalnya katekin yang terdapat dalam gambir dan tanin dalam daun teh ini dapat dipakai sebagai bahan dasar pembuatan zat warna azo. Begitu juga hisperidin yang terdapat didalam kulit jeruk *Citrus nobilis*, yang memberikan warna coklat kekuning – kuningan.

Buah jeruk merupakan salah satu jenis buah – buahan yang paling banyak digemari oleh masyarakat kita , karena banyak mengandung vitamin terutama vitamin C dan vitamin A. Bukan hanya dinikmati rasanya yang segar saja, melainkan buah jeruk juga sebagai pelepas dahaga dan sebagai buah pencuci mulut, ternyata buah jeruk memiliki khasiat ganda yaitu selain dapat diolah sebagai minuman atau makanan juga dapat dimanfaatkan untuk obat, misalnya jeruk nipis untuk menurunkan demam.

Dinegara - negara maju hasil ikutan dari buah jeruk sudah lama dikembangkan menjadi produk-produk yang bermanfaat . Di negara Amerika Serikat penanaman tanaman jeruk sudah merupakan industri tersendiri dalam satu areal, karena terlalu banyaknya buah jeruk yang berupa kulit luar. Kulit dalam dan biji dari sampah buah jeruk tersebut setelah diteliti dan dikaji ternyata dapat menghasilkan hasil ikutan yang mempunyai nilai ekonomi yang tinggi. Dari sampah buah jeruk dapat

diperoleh produk – produk baru berupa Gula tetes ( Mollase )atau sirop, alkohol, minyak dari kulit dan bijinya, pektin untuk pembuatan jelly dan hisperidin sebagai zat warna.

Senyawa hisperidin termasuk kelompok senyawa – senyawa bioflavonoid yang juga merupakan vitamin P kompleks atau disebut flavonoida jeruk karena banyak terdapat pada kulit jeruk bagian dalam yang biasa disebut sebagai *Albedo*. Selain hisperidin terdapat senyawa flavanoid lain dalam kulit jeruk yaitu naringin. Naringin merupakan senyawa yang sangat pahit, mempunyai rumus molekul  $C_{27}H_{32}O_{14}$  (BM= 580,53). Naringin disebut juga sebagai *aurantin*.

Di dorong kenyataan bahwa tidaklah sulit untuk diusahakan di lingkungan kita sehari – hari , karena potensi bahan relatif lebih murah bahkan dibuang begitu saja sebagai limbah yang tidak dimanfaatkan dalam skala besar. Maka perlu adanya penelitian lebih lanjut tentang senyawa naringin yang terdapat didalam kulit jeruk jenis limau gedang ( *Citrus paradisi* ) sebagai bahan dasar pembuatan zat warna. (AAK, 1994)

Untuk mengisolasi senyawa naringin tersebut digunakan metode ekstraksi soxhletasi dan untuk menentukan jenis flavonoid digunakan kromatografi lapis tipis ( KLT ). Sedangkan untuk indentifikasi digunakan Spektroskopi UV- VIS dan IR dalam menentukan gugus fungsi yang terkandung dalam ekstrak kulit jeruk.

## 1.2 Perumusan Masalah

1. Apakah Kulit jeruk *Citrus paradisi* mengandung senyawa naringin
2. Dapatkah senyawa naringin digunakan sebagai bahan dasar pembuatan zat warna pengganti naftol

## 1.3 Tujuan Penelitian.

1. Mengisolasi naringin dari limbah kulit jeruk
2. Membuat zat warna dengan cara reaksi kopling antara naringin dengan garam diazonium

## 1.4 Manfaat Penelitian

1. Limbah kulit jeruk dapat dimanfaatkan sebagai bahan dasar pembuatan zat warna
2. Zat warna azo dari kulit jeruk yang dihasilkan dapat digunakan dan dimanfaatkan untuk industri tekstil dalam mewarnai kain

## BAB II

### TINJAUAN PUSTAKA

Raphael Ikan (1969 ) telah mengemukakan tentang metoda isolasi hisperidin dari kulit jeruk dengan cara sebagai berikut :

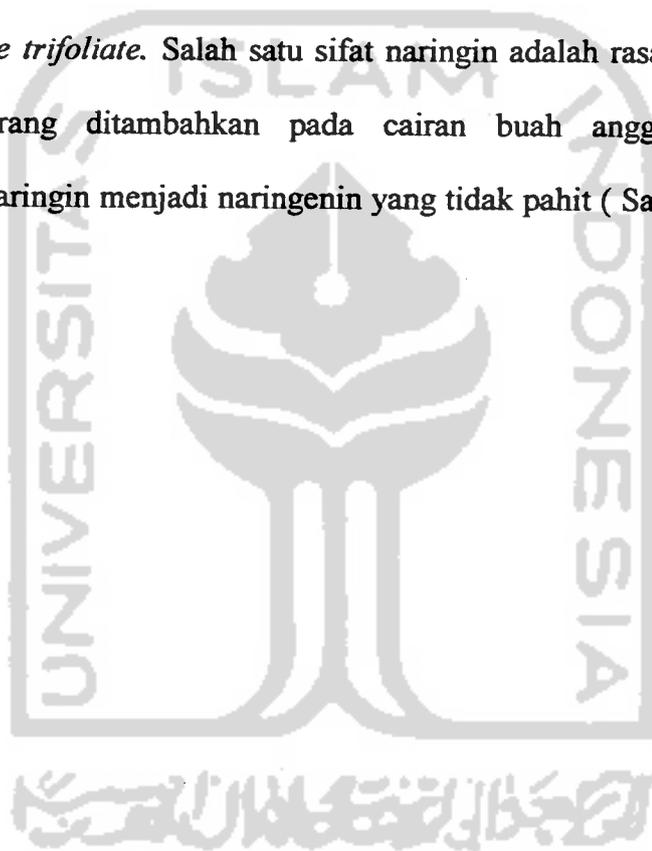
200 gram kulit jeruk yang dihaluskan ditambahkan 750 ml larutan  $\text{Ca(OH)}_2$  10 % dalam erlenmeyer 2 L dan dicampurkan kemudian didiamkan selama 1 malam pada suhu kamar. Setelah didiamkan satu malam campuran tersebut disaring dengan menggunakan corong buchner dan diperoleh filtrat yang berwarna kuning, lalu filtrat tersebut diasamkan dengan hati – hati sampai dengan pH 4 – 5 dengan HCl pekat. Kemudian akan di peroleh hisperidin yang terpisah akan tetapi tidak dalam bentuk serbuk, untuk memisahkannya di gunakan corong buchner. Jika dalam penyaringan masih ada hisperidin yang masih tertinggal maka dapat dicuci dengan air dan dapat dilakukan rekristalisasi dengan larutan formadida berair. Apabila lapisan endapan hisperidin dengan penambahan HCl lambat, maka larutan dapat dipisahkan dengan jalan diupkan.

Dr. Ir. Warsito telah mengerjakan metoda isolasi tersebut dan memperoleh hisperidin didalam kulit jeruk *Citrus nobilis lour*. Tri Hartati (1982) telah memperkuat penelitian tersebut tentang kandungan senyawa hisperidin X yang terdapat didalam kulit jeruk *Citrus Nobilis lour*, dimana hisperidin ini mempunyai sifat yang sama dengan hisperidin yang ada pada kulit jeruk tersebut. Dalam penelitiannya, dikemukakan bahwa senyawa hisperidin X dapat digunakan sebagai zat warna azo dimana warna yang ditimbulkan hampir sama seperti hisperidin yaitu coklat kekuning – kuning yang dapat digunakan untuk



mewarnai kain. Dari hasil penelitiannya dengan 200 gram kulit jeruk kering diperoleh hisperidin X sebanyak 5,04 gram.

Flavanoid albedo disebut naringin dan ditemukan oleh de Vry pada tahun 1886 dalam bunga tanaman buah anggur Jawa. Naringin di isolasi juga dari bunga dan kulit *Citrus decummana*, dari anggur, dari jeruk pahit asal Jepang, dan dari daun *Pseudogle trifoliata*. Salah satu sifat naringin adalah rasa pahitnya, enzim hidrolitik sekarang ditambahkan pada cairan buah anggur agar supaya menghidrolisi naringin menjadi naringenin yang tidak pahit ( Sastrohamidjojo. H, 1996).



### BAB III

#### DASAR TEORI

##### 3.1 Morfologi tanaman jeruk *Citrus paradisi*

Klasifikasi dari tanaman jeruk limau gedang adalah sebagai berikut :

Divisio : Spermatophyta

Sub divisio : Angiospermae

Kelas : Dikotyledoneae

Famili : Rutaceae

Ordo : Rurales

Genus : *Citrus*

Spesies : *Citrus paradisi*

Nama umum / dagang : jeruk galiprut atau limau gedang

Jenis jeruk ini dapat tumbuh dengan baik di dataran rendah hingga ketinggian kira – kira 800 meter diatas permukaan laut dengan persentase kelembapan sedikit rendah. Jenis jeruk ini tidak menyukai tempat yang tergenang atau ditempat yang airnya lambat meresap dalam tanah. Adapun ciri – ciri pohon jeruk ini sebagai berikut :

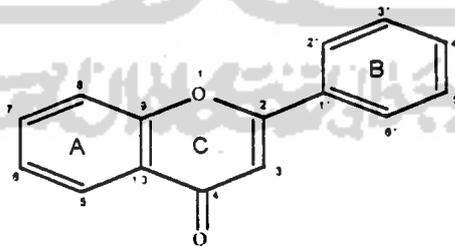
- a. mempunyai tinggi pohon sekitar 5 – 10 meter, percabangan dan ranting tidak begitu banyak.
- b. Kulit buah tebal dan bergabus
- c. Rasa buah agak masam dan pahit
- d. Cara mengkonsumsi buah jeruk ini adalah dengan cara diperas dan dibubuhi gula.

- e. Daunnya agak besar dan tebal , tetapi agak jarang
- f. Bunganya selalu tumbuh di pucuk – pucuk ranting atau di ketiak daun.( AAK, 1994)

## 3.2 Flavonoid

### 3.2.1 Penggolongan flavonoid

Flavonoid merupakan salah satu golongan fenol alam yang terbesar. Dalam tumbuhan, aglikon flavonoid ( yaitu flavonoid tanpa gula terikat ) terdapat dalam berbagai bentuk struktur. Semua kelas ini mengandung 15 atom karbon dalam inti dasarnya, yang tersusun dalam konfigurasi  $C_6 - C_3 - C_6$  . dimana  $C_6$  adalah cincin benzena. Kelas dan sifat dari setiap senyawa ditentukan oleh keadaan oksidasi dari bagian  $C_3$ . Agar mudah, cincin diberi tanda A, B dan C. Atom karbon pada cincin A dan C diberi nomor menurut sistem penomoran yang menggunakan angka biasa, sedangkan untuk cincin B menggunakan angka beraksen. Struktur umum flavonoid dapat dilihat pada gambar 1 dibawah ini :



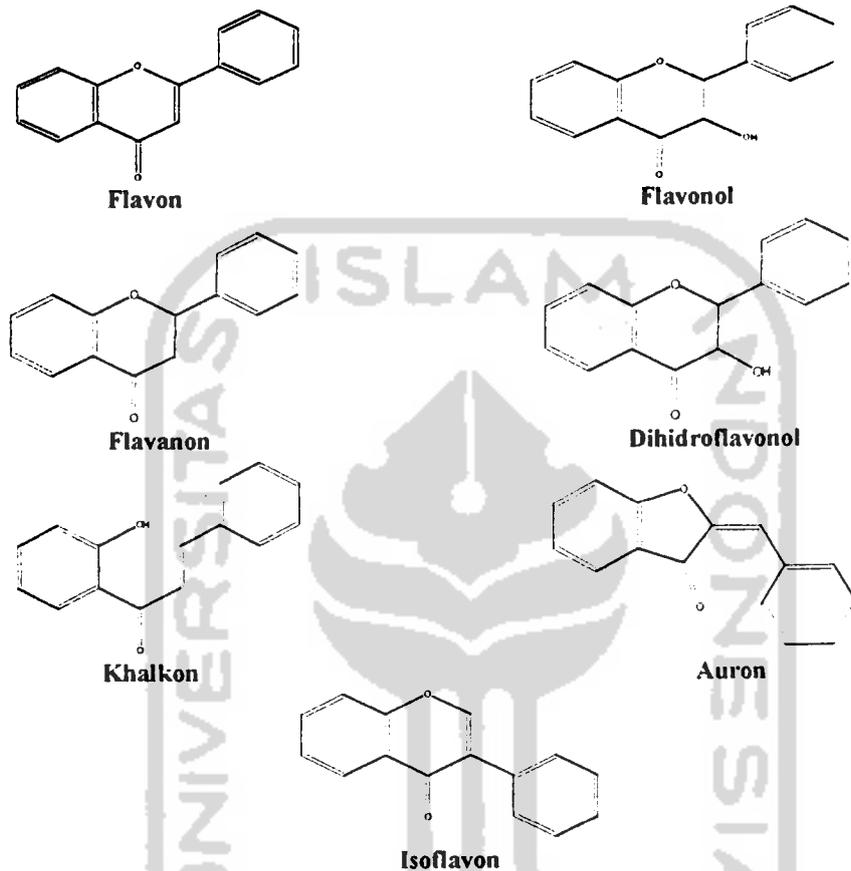
**Gambar 1. Struktur umum flavonoid**

Secara umum aglikon flavonoid dapat digolongkan menjadi sembilan golongan yaitu flavon, flavonol, antosianidin, isoflavon, flavanon,

### 3.2.2 Penyebaran Flavonoid pada tumbuhan

Senyawa – senyawa flavonoid terdapat di dalam tumbuh – tumbuhan sebagai glikosida yang mengandung satu atau lebih gugus fenolat hidroksil yang dapat bergabung dengan residu gula. Flavonoid terdapat dalam semua jaringan tumbuhan berpembuluh dan tersebar sebagai campuran karena jarang sekali di jumpai hanya sebagai flavonoid tunggal. Flavonoid mengandung sistem aromatik yang terkonjugasi dan karena itu menunjukkan pita serapan kuat pada daerah spektrum UV dan spektrum tampak. Flavonoid terdapat dalam tumbuhan sebagai campuran, jarang sekali dijumpai hanya flavanoid tunggal dalam jaringan tumbuhan. Disamping itu, sering terdapat campuran yang terdiri atas flavonoid yang berbeda kelas. Penggolongan jenis flavanoid dalam jaringan tumbuhan mula – mula didasarkan pada telaah sifat kelarutan dan reaksi warna, kemudian diikuti dengan pemeriksaan ekstrak tumbuhan yang telah dihidrolisis secara kromatografi satu arah dan pemeriksaan ekstrak metanol secara dua arah. Akhirnya, flavanoid dapat dipisahkan secara kromatografi. Masing – masing komponen di indentifikasi dengan membandingkan kromatografi dan spektrum, dengan memakai senyawa pembanding yang sudah dikenal. Senyawa baru yang diketemukan sewaktu menelaah memerlukan pemeriksaan kimia dan spektrum yang lebih terinci (Harbone, 1987). Berikut ini penyebaran flavonoid yang terdapat dalam tumbuhan dapat dilihat dalam tabel I dibawah ini.

dihydroflavonol, dihydrochalcon, chalcon and auron. Struktur aglikon dapat flavonoid dapat dilihat pada gambar 2 dibawah ini.



**Gambar 2. Struktur aglikon flavonoid (Sumber : Mabry, 1970)**

Modifikasi lebih lanjut mungkin terjadi pada berbagai tahap dan menghasilkan penambahan atau pengurangan hidroksilasi, metilasi gugus hidroksi atau inti flavonoid, metilasi gugus orto hidroksi dimerisasi (Pembentukan). Bioflavonoid pembentukan bisulfat dan yang terpenting glikosilasi gugus hidroksi ( Pembentukan flavonoid O – Glikosida ) atau inti flavonoid Pembentukan flavonoid C – Glikosida. ( Markham 1988)

Tabel 1. Penyebaran flavonoid pada tumbuhan

Golongan flavonoid	Penyebaran	Ciri khas
Antosianin	Pigmen bunga merah marak, merah, merah senduduk, dan biru juga dalam daun dan jaringan lain.	Larut dalam air, $\lambda$ maks 515-545 nm. Bergerak dengan BAA pada kertas
Proantosianidin	Terutama tanwarna. dalam galih dan daun tumbuhan berkayu	Menghasilkan antosianidin (warna dapat diekstraksi dengan amil alkohol) bila jaringan dipanaskan dalam HCl 2M selama setengah jam
Flavonol	Terutama kopigmen tanwarna dalam bunga sianik dan asianik; tersebar luas dalam daun	Setelah dihidrolisis, berupa bercak kuning murup pada kromatogram forestall bila disinari dengan sinar UV; maksimum spektrum pada 350-386
Flavon	Seperti flavonol	Setelah dihidrolisis, berupa bercak coklat redup pada kromatogram forestall. maksima spectrum pada 330-350
Glikoflavon	Seperti flavonol	Mengandung gula yang terikat melalui ikatan C-C; bergerak dengan pengembang air, tidak seperti flavon biasa
Bitlavonil	Tanwarna; hampir seluruhnya terbatas pada gimnospermae	Pada kromatogram BAA berupa bercak redup dengan $R_F$ tinggi
Khalkon dan Auron	Pigmen bunga kuning. kadang - kadang terdapat juga dalam jaringan lain	Dengan amonia berwarna merah (perubahan warna dapat diamati in situ) maks spectrum 370-410 nm
Flavanon	Tanwarna dalam daun dan buah (terutama dalam citrus)	Berwarna merah kuat dengan Mg/Cl; kadang sangat pahit
Isoflavon	Tanwarna; sering kali dalam akar; hanya terdapat dalam satu suku, Leguminosae	Bergerak pada kertas dengan pengembang air; tak ada uji warna yang khas

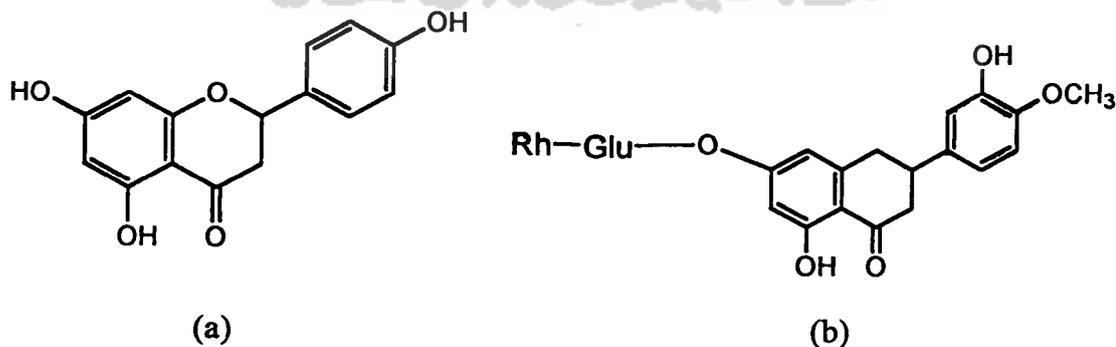
(Sumber: Harborne, 1982)

Gugus hidroksil hampir selalu ditemukan pada kedudukan 5 dan 7 pada cincin A, sedangkan cincin B biasanya mengandung gugus hidroksil atau alkoksil pada kedudukan 4' atau antara 3' dan 4'. Glikosida – glikosida dari senyawa flavonoid dapat mengandung gula pada setiap gugus hidroksil yang tersedia.

Salah satu dari flavonoid adalah flavanon. Flavanon belum pernah di ketemukan di alam , dimana flavanon terhidroksi di alam dalam keadaan bebas atau sebagai glikosida – glikosida. Di dalam tumbuh – tumbuhan, flavanon terhidroksi sering terdapat bersama – sama dengan flavon.

- a. Hesperidin dan Diosanin dalam kulit pohon dan *Thoxylum avicennae*
- b. Rhoifolin dan naringin dalam kulit jeruk *Citrus aurantin*

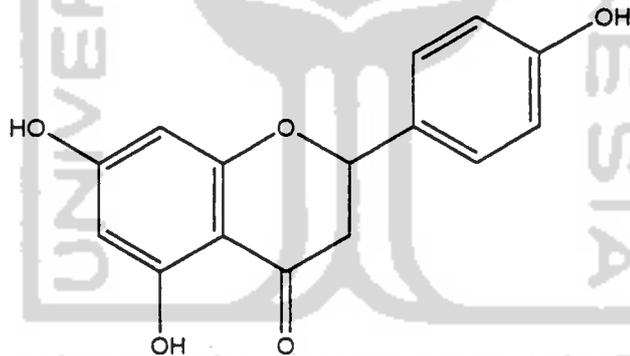
Berlainan dengan flavon tidak jenuh , flavanon jenuh menunjukkan sifat reaktif pada gugus karbonil no 4. Sifat flavanon terhadap alkali berbeda dengan flavon, dimana flavanon oleh aktivitas alkali dipecah menjadi benzal dehid , asam asetat dan fenol dalam kondisi yang drastis akan menghasilkan fenol dan asam sinamat. Macam – macam senyawa flavanon ditunjukkan pada gambar 3 dibawah ini :



Gambar 3. Struktur (a) naringin dan (b) hesperidin

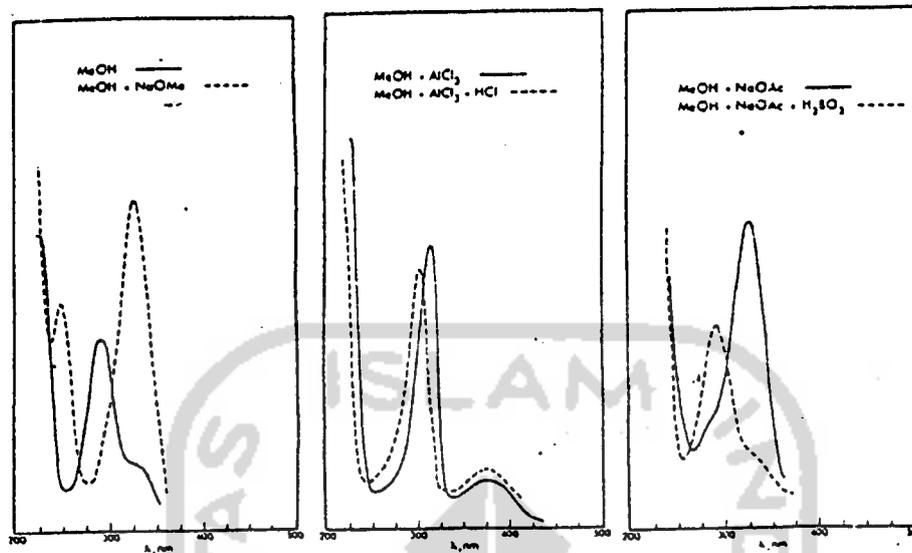
### 3.2.3 Naringin

Naringin merupakan senyawa yang sangat pahit mempunyai rumus molekul  $C_{27}H_{22}O_{14}$  ( Berat Molekul 580, 53 ). Karena terdapat banyak dalam jaringan tanaman jeruk, naringin disebut juga sebagai *aurantin*. Bagian tanaman yang telah terbukti banyak mengandung naringin ini adalah bunga atau buah dan kulit jeruk *Citrus paradisi* ( Famili Ruataceae ) terutama yang masih muda. Senyawa naringin ini sangat pahit sehingga pengeceranya sampai 1: 10.000 dalam air masih terasa pahitnya. Dalam suhu kamar, naringin agak sukar larut dalam air , yaitu hanya 1 gram dalam 1000 ml air. Dapat larut dalam aseton, alkohol atau asam asetat yang hangat. Bentuk struktur kimiawi naringin terlihat dalam gambar 4 dibawah ini :



Gambar 4. Struktur senyawa naringin

Berikut ini spektra khas naringin dengan penambahan reaksi penggeser untuk mengetahui pola hidrogenasinya ditunjukkan pada gambar 5.



( Sumber: Mabry, 1970)

Gambar 5. Spektra khas naringin dan pola pergeserannya

### 3.3 Zat Warna

Zat warna dapat dibagi menjadi dua golongan besar yaitu zat warna alam dan zat warna sintetis. Zat warna alam dapat dibagi lagi menjadi zat warna organik dan zat warna alam mineral. Zat warna alam organik dapat berasal dari tumbuh – tumbuhan dan hewan. Zat warna alam tumbuh – tumbuhan biasanya disebut “ Plant pigmen “ misalnya klorofil, flavonoid, kurkumin dan sebagainya. Sedangkan yang berasal dari hewan, misalnya Cochineal yang terdapat pada serangga *Coctus cacti*. Zat warna alam mineral biasanya disebut “ Pigmen “ dan sering digunakan sebagai bahan pewarna dalam pembuatan kosmetik dan sediaan farmasi untuk obat luar, misalnya feri oksida. Zat warna sintetis ,misalnya antrazin, amaran dan sebagainya.

Berdasarkan kelarutannya zat warna dapat dibagi menjadi dua macam , Yaitu :

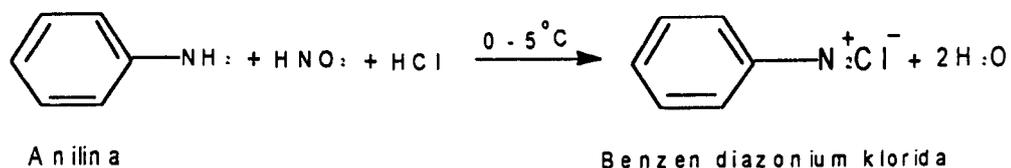
- a. Zat warna yang larut dalam air disebut “ Dye “
- b. Zat warna yang tidak larut dalam air disebut sebagai Pigmen ( Hoover, J.E, 1970 )

Banyak dye yang dirubah menjadi pigmen dengan membentuk garam – garam yang tak larut dalam air, yaitu dengan penggantian natrium dari garamnya dengan kalsium, seperti penggunaan dalam cat pewarna batik. Garam – garam yang tak larut ini disebut “ Toner “ (Parker,Ps. 1983 ). Ketidakstabilan zat warna dipengaruhi oleh beberapa faktor yaitu :

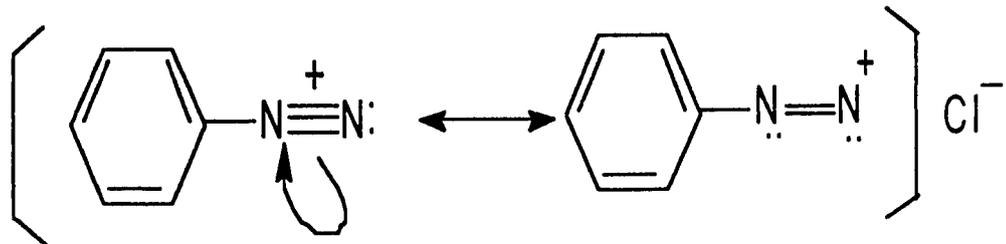
Sinar, panas, oksidator, reduktor, mikro organisme dan logam – logam.

### 3.3.1 Zat Warna Azo

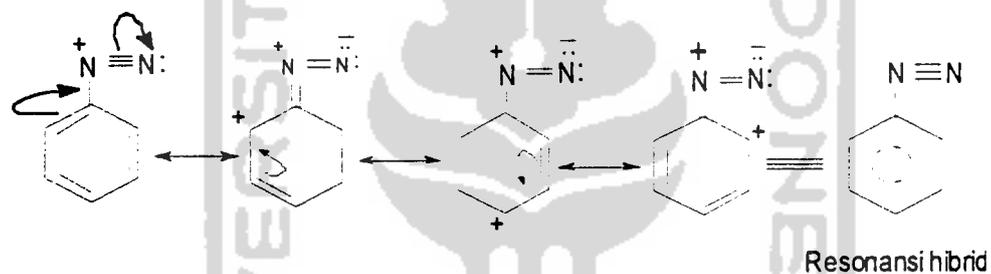
Garam aril diazonium ditemukan oleh Johan Peter Gries pada tahun 1858. Bila amina aromatik direaksikan dengan asam nitrit dalam larutan asam mineral dalam keadaan dingin akan menghasilkan garam aril diazonium, sebagai contoh anilin direaksikan dengan asam nitrit dalam larutan HCl pada suhu  $0 - 5^{\circ}\text{C}$ , maka terbentuk larutan benzena diazonium klorida dengan reaksi sebagai berikut :



Pada struktur benzen diazonium klorida , kation  $\text{C}_6\text{H}_5 - \text{N}_2$  beresonansi sebagai berikut:



Muatan positif dari kation di distribusikan diantara kedua atom nitrogen. Stabilitas relatif dari kation diazonium , juga disebabkan kenyataan bahwa dalam struktur terjadi resonansi hibrid dalam cincin benzena.



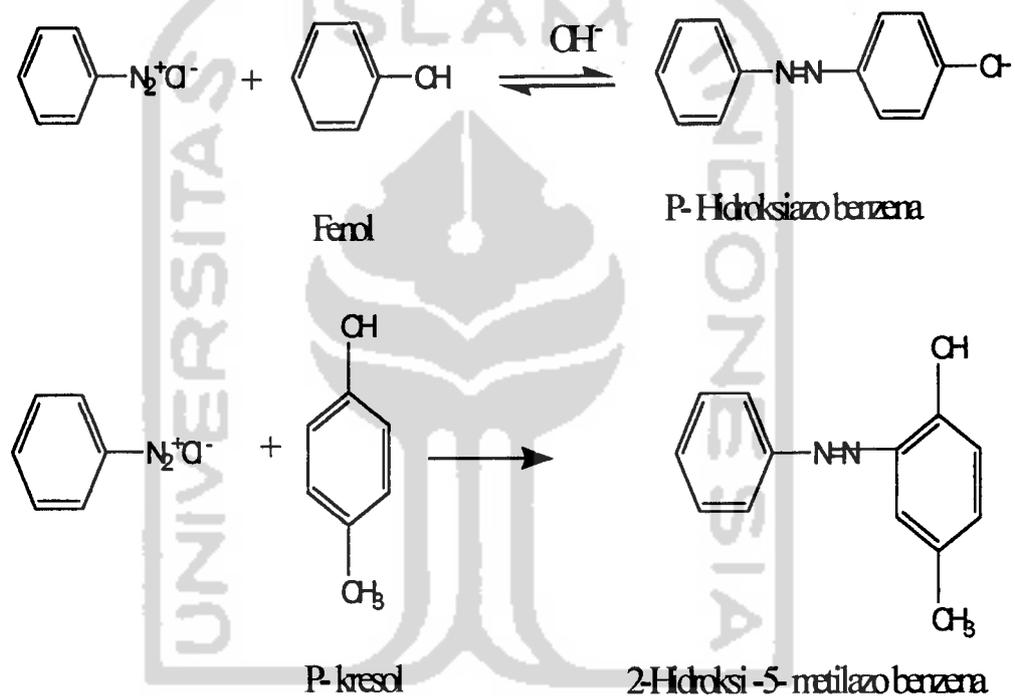
Struktur hibrid menunjukkan bahwa :

- Cincin benzena tidak mengaktifkan serangan elektrofil
- Ikatan C – N memiliki beberapa sifat ikatan rangkap , sehingga lebih kuat.

Garam aril diazonium tidak beresonansi , oleh karena itu ikatan C – N di dalamnya lemah. Hal ini menyebabkan garam alkil diazonium relatif tidak stabil dibandingkan dengan garam aril diazonium.

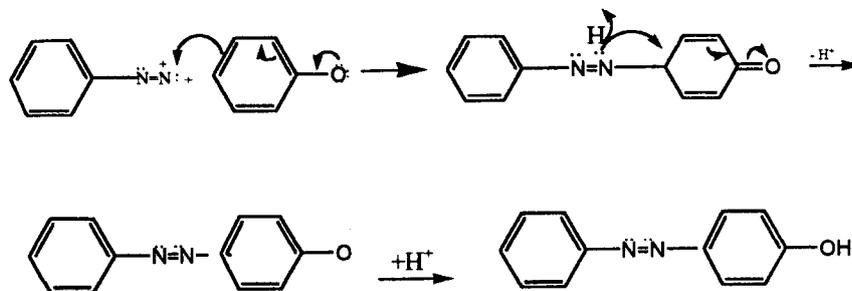
dan gugus hidroksil atau gugus amina adalah auksokrom. Reaksi antara kation diazonium dengan fenol atau amina tersier tersebut disebut reaksi kopling. Kation diazonium umumnya terikat pada cincin aromatik dari fenol atau amina pada kedudukan para, tetapi jika kedudukan para di tempati substituen lain kopling terjadi pada kedudukan orto.

Reaksi Kopling dengan fenol



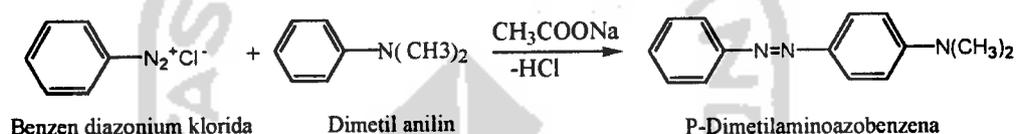
Mekanisme reaksinya :

Kopling fenol adalah reaksi substitusi elektrofilik. Kation diazonium yang mempunyai muatan positif pada atom N sehingga bersifat elektrofil. Kopling dengan fenol terjadi melalui anion feroksida.



P - Hidroksi azo benzena

## b. koping dengan amina tertier



Mekanisme reaksinya :

Kopling dengan amina juga sama, merupakan reaksi substitusi elektrofilik.

Disini penambahan kation diazonium pada amina tertier di kedudukan para.

## 3.4 Ekstraksi

Ekstraksi adalah suatu proses pemisahan dimana zat terlarut di distribusikan diantara dua pelarut yang tidak saling bercampur. Peristiwa pemisahan ini melibatkan perpindahan zat terlarut dari suatu pelarut ke pelarut lain. Apabila dua pelarut merupakan dua cairan yang tidak bercampur, maka dikenal dengan ekstraksi cair – cair. Kesempurnaan pemisahan dalam ekstraksi cair – cair itu tergantung pada perbedaan kelarutan zat terlarut dalam kedua pelarut. Pada umumnya senyawa atau zat terlarut yang di ekstrak tidak larut atau larut sedikit dalam satu pelarut tetapi mudah larut dalam pelarut lain.



Pada pemisahan yang ideal, semua zat yang diinginkan akan larut dalam satu larutan dan semua zat yang tidak diinginkan akan larut dalam pelarut lain. Akan tetapi peristiwa pemisahan semacam itu jarang terjadi. Biasanya suatu zat cenderung berpindah dari satu pelarut ke pelarut yang lain dalam jumlah yang sedikit, jadi dalam ekstraksi cair – cair ini jika dilakukan satu kali pemisahan tidak akan diperoleh pemisahan yang benar – benar murni. Ekstraksi cair – cair ini lebih efisien apabila dilakukan berulang – ulang dengan volume yang sedikit. Selain ekstraksi cair – cair dikenal juga ekstraksi terhadap padatan. Ekstraksi terhadap padatan biasanya digunakan untuk memisahkan senyawa – senyawa hasil alam dari tumbuhan dimana proses ekstraksinya dikenal dengan istilah “Ekstraksi Soxhlet”.

Ekstraksi soxhlet merupakan suatu proses ekstraksi yang berlangsung secara berulang – ulang dan teratur. Dalam Ekstraksi soxhlet bahan yang akan diekstrak biasanya berupa padatan yang dibuat serbuk. Padatan yang telah dibuat serbuk ini di letakan dalam pembungkus yang berpori ( terbuat dari kertas saring ) pembungkus tersebut dimasukan di bagian dalam alat soxhlet, bagian atas alat ini dihubungkan dengan kondensor atau pendingin. Pelarut dipanaskan sehingga uapnya naik dan terjadi kondensasi pada kondensor. Pelarut yang sudah terkondensasi jatuh kedalam ruang soxhlet tempat bahan yang di ekstrak. Bila pelarut sudah memenuhi ruangan soxhlet sampai batas tertentu, maka secara otomatis pelarut yang membawa zat ekstrak jatuh kedalam labu pemanas ( bercampur dengan pelarut ) proses ini dapat terulang kembali sampai di dapatkan ekstrak yang sempurna.

Pelarut yang digunakan untuk ekstraksi harus memenuhi persyaratan sebagai berikut :

1. Bersifat inert atau tidak dapat bereaksi dengan komponen – komponen yang akan di ekstrak
2. Bersifat selektif yaitu hanya melarutkan zat – zat yang diinginkan
3. Mempunyai titik didih rendah, sehingga mudah diupkan pada temperatur rendah

Ekstraksi flavonoid dari tumbuhan dapat dilakukan dengan menggunakan pelarut polar, semi polar maupun non polar sesuai dengan kelarutan flavonoid yang diekstraksi. Pelarut yang kurang polar digunakan untuk glukosida flavonoid atau antosianin, karena mempunyai sejumlah gugus hidroksida atau suatu gula , flavonoid merupakan senyawa polar maka umumnya flavonoid cukup larut dalam pelarut polar seperti Etanol ( ETOH ), Metanol (MeTOH), Butanol (BuTOH), Aseton , Dimetil Sulfoksida ( DMSO), Dimetil Formadida, Air dan lain-lain.

Adanya gula yang terikat pada flavonoid ( bentuk yang umum ditemukan) cenderung menyebabkan flavonoid lebih mudah larut dalam air dengan demikian campuran pelarut diatas dengan air merupakan pelarut yang lebih baik untuk glukosida. Sebaiknya aglikon yang kurang polar seperti isoflavan, flavanon , flavon dan flavanol yang termetoksilasi cenderung lebih mudah larut dalam pelarut seperti eter dan klorform.

Umumnya pelarut alkoholik merupakan pilihan untuk mengekstraksi semua golongan flavonoid. Bahan segar dapat di ekstraksi dengan alkohol

absolut, sedangkan untuk bahan kering dan berkayu dapat menggunakan alkohol berair.

Glukosida flavonoid dan aglikon seperti flavon terhidroksilasi, flavanol, dan khalkon biasanya di isolasi dengan aseton, alkohol, air atau kombinasi bahan tersebut. Pelarut yang banyak digunakan untuk mengetahui kelompok ini adalah campuran metanol – air ( 1 : 1 ) merupakan metanol atau etanol yang berkadar 70 - 80 % ( Harbone dan Marby, 1975 ).

### 3.5 Kromatografi

Kromatografi merupakan metode pemisahan suatu komponen dari suatu campuran dan komponen yang akan dipisahkan, di distribusikan antara 2 fase, yaitu fase stasioner atau fase diam dan fase gerak yang mengalir lambat menembus lapisan stasioner (Day dan Underwood, 1986). Fase stasioner dapat berupa zat padat atau cairan dan fase geraknya berupa cairan atau gas. Jika fase geraknya berupa cairan disebut kromatografi cair, sedangkan jika fase geraknya berupa gas disebut kromatografi gas. Disamping itu dikenal juga istilah kromatografi gas-padat (*gas-solid chromatography*) dan kromatografi gas-cair (*gas-liquid chromatography*). Berdasarkan mekanisme interaksi antara sampel dengan fase tetap, metode kromatografi di bedakan menjadi kromatografi adsorpsi, kromatografi partisi, kromatografi penukar ion, dan kromatografi *size-exclusion*.

### 3.5.1 Kromatografi lapis tipis ( KLT )

Kromatografi merupakan salah satu metode pemisahan flavonoid yang umum yang banyak digunakan saat ini, salah satunya adalah kromatografi lapis tipis (KLT). Kromatografi lapis tipis merupakan kromatografi serapan dalam lapisan tipis yang diletakan pada suatu penyokong yang inert pada suatu plat. Metode ini merupakan metode analisis yang cepat hanya memerlukan sedikit sampel. Pada analisis flavonoid kromatografi lapis tipis berfungsi sebagai :

1. mencari pelarut untuk kromatografi kolom
2. Analisis fraksi yang di peroleh dari kromatografi kolom
3. Menyigi arah atau perkembangan reaksi seperti hidrolisis atau metilasi
4. Identifikasi flavonoid secara ko-kromatografi
5. Isolasi flavonoid murni skala kecil

Sifat umum penyerapan pada kromatografi lapis tipis mirip dengan penyerapan pada kromatografi kolom. Penyerapan dipengaruhi oleh besar partikel dan homogenitas. Penyerapan yang banyak digunakan adalah silika gel di samping alumina. Silika gel yang digunakan di beri pengikat untuk memberikan kekuatan pada lapisan dan menambah adhesi pada gelas penyokong. Pengikat yang digunakan pada umumnya adalah kalsium sulfat yang dikenal dengan silika gel G.

Fase gerak (eluen) yang digunakan adalah eluen yang biasa digunakan yaitu BAA (n – butanol – asam asetat – air ; 4:1:5; lapisan atas ). Berdasarkan strukturnya, pelarut dibedakan menjadi 3 yaitu :

1. Pelarut polar, misalnya metanol, etanol dan asam asetat
2. Pelarut semi polar, misalnya aseton, etil asetat dan kloroform
3. Pelarut non polar, misalnya n- heksana, benzena dan karbon tetra klorida

Penempatan cuplikan menggunakan pipa kapiler atau mikro pipet yang baik. Penempatan noda di atas plat sekitar 1 cm dari salah satu ujung yang dicelupkan pada eluen. Plat diberi garis awal dan akhir dengan menggunakan pensil. Pengembangan dapat dilakukan dengan dua cara, yaitu kearah atas dengan menggunakan gaya kapiler dan kebawah dengan menggunakan gaya gravitasi.

Identifikasi senyawa yang terpisah pada lapis tipis dilakukan dengan pereaksi lokasi kimia dan reaksi- reaksi warna. Identifikasi yang umum digunakan adalah harga  $R_f$  (retardation faktor ). Harga  $R_f$  didefinisikan sebagai :

$$\text{Harga } R_f = \frac{\text{jarak yang ditempuh oleh senyawa}}{\text{jarak yang ditempuh oleh eluen}}$$

Harga  $R_f$  untuk senyawa – senyawa murni dapat di bandingkan dengan harga  $R_f$  standar.

Identifikasi kromatogram pada plat kromatografi lapis tipis dapat dilakukan dengan menggunakan sinar UV. Metode ini dapat bermanfaat dalam menentukan harga  $R_f$  dan dalam menafsirkan struktur flavonoid. Pada penafsiran struktur flavonoid dapat dilakukan dengan menggunakan petunjuk penafsiran warna bercak flavonoid, dilakukan tanpa amoniak dan dengan uap amoniak, seperti yang ditunjukkan pada tabel 2.

Tabel 2. Penafsiran warna bercak dari segi struktur flavonoid

Warna bercak dengan sinar UV		Jenis flavonoid yang mungkin
Tanpa NH <sub>3</sub>	Dengan NH <sub>3</sub>	
Lembayung gelap	Kuning, Hijau-kuning/ Hijau	5-OH flavon atau flavonol (tersulih pada 3-O dan 4'-OH), Kadang-kadang 5-OH flavanon dan 4'-OH khalkon tanpa OH pada cincin B
	Perubahan warna sedikit atau tanpa perubahan warna	Flavon/flavonol tersulih pada 3-O mempunyai 5-OH tetapi tanpa 4'-OH bebas, Beberapa 6- atau 8-OH flavon dan flavonol tersulih pada 3-O dan 5-OH, Isoflavon, dihidroflavonol, biflavonil dan beberapa flavanol dengan 5-OH, Khalkon dengan 2'- atau 4-OH bebas
	Biru muda	Beberapa 5-OH flavanon
	Merah atau jingga	Khalkon dengan 2- dan atau 4-OH bebas
Fluoresensi biru muda	Fluoresensi Hijau-kuning/ Hijau-biru	Flavon dan flavanon tanpa 5-OH, misal 5-OH-glikosida, Flavonol tanpa 5-OH bebas, tersulih pada 3-OH
	Perubahan warna sedikit /tanpa perubahan	Isoflavon yang tak mengandung 5-OH bebas
	Fluoresensi biru muda	Isoflavon yang tak mengandung 5-OH bebas
Tak tampak	Fluoresensi biru muda	Isoflavon tanpa 5-OH bebas
Kuning redup dan kuning/ fluoresensi jingga	Perubahan warna sedikit atau tanpa perubahan	Flavonol dengan 3-OH bebas dan dengan 5-OH bebas (kadang-kadang berasal dari dihidroflavonol)
Fluoresensi kuning	Jingga atau merah	Auron dengan 4'-OH bebas dan beberapa 2- atau 4-OH khalkon
Hijau-kuning, Hijau-biru, atau Hijau	Perubahan warna sedikit atau tanpa perubahan	Auron dengan 4'-OH bebas dan flavanon tanpa 5-OH bebas Flavanol dengan 3-OH bebas dan disertai atau tanpa 5-OH bebas
Merah jingga redup/merah	Biru	Antosianidin 3-glikosida
Merah jambu/ fluoresensi kuning	Biru	Sebagian besar antosianidin 3,5-diglikosida

(Sumber : Markham, 1988)

### 3.6 Spektrofotometer UV-Vis

#### 3.6.1 Prinsip dasar spektrofotometer UV- Vis

Spektrofotometri merupakan metode analisis yang didasarkan pada interaksi radiasi elektromagnetik dengan suatu senyawa (Day dan Underwood, 1986). Jika radiasi gelombang elektromagnetik dilewatkan pada suatu senyawa, maka sebagian akan diserap oleh molekul sesuai dengan struktur molekul dengan panjang gelombang tertentu. Setiap senyawa mempunyai tingkatan energi yang spesifik. Jika energi radiasi mempunyai energi yang sesuai maka elektron akan tereksitasi. Elektron yang tereksitasi melepaskan energi dengan proses radiasi panas dan kembali ke keadaan dasar. Perbedaan energi antara tingkat dasar dan tingkat tereksitasi spesifik untuk tiap-tiap senyawa, maka frekuensi yang diserap juga tertentu. Hubungan intensitas radiasi sebagai fungsi panjang gelombang atau frekuensi disebut dengan spektrum serapan (Sastrohamidjojo, 1985).

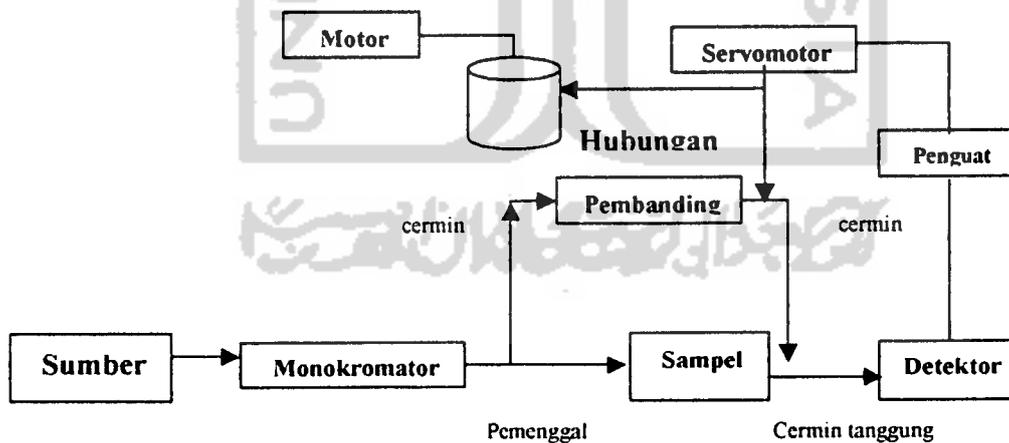
Menurut Sastrohamidjojo (1985), istilah yang sering digunakan dalam spektrum elektronik adalah kromofor. Kromofor digunakan untuk menyatakan gugus jenuh kovalen yang dapat menyerap radiasi dalam daerah UV-Vis. Beberapa istilah penting lainnya adalah auksokrom, pergeseran batokromik, pergeseran hipsokromik, efek hiperkromik, dan efek hipokromik.

1. Auksokrom adalah gugus jenuh yang jika terikat pada kromofor dapat mengubah panjang gelombang dan intensitas serapan maksimum. Auksokrom merupakan heteroatom yang langsung terikat pada kromofor, misalnya  $-OCH_3$ ,  $-Cl$ ,  $-OH$ , dan  $-NH_2$ .

2. Pergeseran batokromik adalah pergeseran serapan ke arah panjang gelombang yang lebih panjang, disebabkan substitusi atau pengaruh pelarut. Pergeseran ini sering juga disebut pergeseran merah.
3. Pergeseran hipsokromik adalah pergeseran ke arah panjang gelombang yang lebih pendek, disebabkan oleh substitusi atau pengaruh pelarut. Pergeseran ini sering juga disebut pergeseran biru.
4. Efek hiperkromik adalah kenaikan dalam intensitas serapan.
5. Efek hipsokromik adalah penurunan dalam intensitas serapan.

### 3.6.2 Instrumentasi

Instrumen spektrofotometer UV-Vis terdiri dari beberapa bagian penting, yaitu sumber energi radiasi, monokromator, tempat cuplikan, dan detektor. Instrumen spektrofotometer dapat ditunjukkan pada gambar 3.



**Gambar 6. Bagan instrumen spektrofotometer UV-Vis**

(Sumber : Day dan Underwood, 1986)

Sumber radiasi ultra violet yang banyak digunakan adalah lampu hidrogen atau lampu deuterium. Lampu terdiri dari sepasang elektroda yang terselubung dalam tabung gelas yang berisi gas hidrogen atau deuterium pada tekanan rendah. Jika dikenai tegangan tinggi, akan dihasilkan elektron-elektron yang mengeksitasikan elektron-elektron lain dalam molekul gas ke tingkat energi yang lebih tinggi. Jika elektron kembali ke tingkat dasar akan melepaskan radiasi kontinyu pada daerah 180-350 nm. Sedangkan sumber radiasi tampak berupa lampu filamen tungsten.

Radiasi kontinyu yang dihasilkan dalam kisaran panjang gelombang yang luas. Radiasi harus diubah menjadi radiasi monokromatik dengan monokromator. Monokromator merupakan serangkaian alat optik yang menguraikan radiasi polikromatik menjadi radiasi tunggal (monokromatik). Monokromator hanya meneruskan radiasi pada panjang gelombang tertentu dan menyerap radiasi pada panjang gelombang lain.

Detektor dalam spektrofotometer UV-Vis harus mempunyai kepekaan dan respon yang linier terhadap daya radiasi, waktu respon cepat, dapat digandakan, dan mempunyai kestabilan yang tinggi. Detektor yang banyak digunakan adalah detektor fotolistrik. Detektor berupa tabung hampa udara terdapat sepasang elektroda, dengan jendela tembus cahaya. Sinyal dari detektor diperkuat oleh amplifier dan diteruskan ke pencatat.

### 3.6.3 Identifikasi flavonoid

Spektrum serapan ultra violet dan serapan tampak merupakan cara tunggal yang paling bermanfaat untuk mengidentifikasi struktur flavonoid. Metode ini dapat digunakan untuk mengidentifikasi jenis flavonoid, menentukan pola oksigenasi, kedudukan gugus hidroksil fenol bebas pada inti flavonoid dengan pereaksi geser, dan menentukan kedudukan gula atau metil yang terikat pada salah satu gugus hidroksil fenol (Markham, 1988).

Spektrum flavonoid ditentukan dengan pelarut metanol, kecuali antosianidin perlu ditambahkan HCl 0,4 M. Spektrum umum terdiri atas 2 puncak optimum pada panjang gelombang 240-285 nm (pita I) dan 300-550 nm (pita I). Spektrum khas beberapa aglikon flavonoid berada dalam interval panjang gelombang, seperti yang ditunjukkan pada tabel 3.

**Tabel 3. Rentangan serapan spektrum UV-Vis flavonoid**

$\lambda_{\text{maks}}$ utama (nm)	$\lambda_{\text{maks}}$ tambahan (nm)	Petunjuk
475 – 650	$\pm 275$ (55%)	Antosianin
390 – 430	240 – 270 (32 %)	Auron
365 – 390	240 – 260 (30 %)	Khalkon
350 – 390 250 – 270	$\pm 300$ (40 %)	Flavonol
330 – 350 250 – 270		Flavon dan biflavonil
275 – 290 $\pm 225$	310 – 330 (30 %)	Flavanon dan flavanonol
255 – 265	310 – 330 (25 %)	Isoflavon

(Sumber : Harborne, 1987)

Penafsiran spektrum flavonoid dapat dilakukan dengan menggunakan pereaksi geser. Pereaksi geser yang digunakan adalah natrium metoksida, natrium asetat, aluminium klorida, asam klorida, dan asam borat. Penafsiran senyawa

flavonoid berdasarkan spektrum NaOMe, NaOAc, NaOAc/H<sub>3</sub>BO<sub>3</sub>, dan AlCl<sub>3</sub>, dan AlCl<sub>3</sub>/HCl dapat ditunjukkan pada tabel 4, tabel 5, tabel 6, dan tabel 7.

**Tabel 4. Penafsiran spektrum natrium metoksida**

Jenis flavonoid	Pergeseran yang tampak		Petunjuk penafsiran
	Pita I	Pita II	
Flavon Flavonol	Kekuatan menurun terus		3,4'-OH, <i>o</i> -diOH pada cincin A; pada cincin B; 3-OH berdampingan
	+45 - 65 nm		4'-OH
	+45 - 65 nm, kekuatan menurun		3-OH, tidak ada 4'-OH bebas
	Pita baru, 320-335 nm		7-OH
Isoflavon		Tidak ada pergeseran	Tidak ada OH pada cincin A
Flavanon Dihidroflavonol		Kekuatan menurun sebanding dengan waktu	<i>o</i> -diOH pada cincin A (penurunan lambat : <i>o</i> -diOH pada cincin B isoflavon)
		Bergeser dari $\pm 280$ nm ke $\pm 325$ nm kekuatan naik ke 330-340 nm	Flavanon dan dihidroflavonol dengan 5,7-OH 7-OH, tanpa 5-OH bebas
Khalkon Auron	+80 - 95 nm (kekuatan naik)		4'-OH (auron)
	+60 - 70 nm (kekuatan naik) Pergeseran lebih kecil		6-OH tanpa OR pada 4' (auron) 6-OH dengan oksigenasi pada 4' (auron)
	+60 sampai 100 nm (kekuatan naik)  (kekuatan tidak naik) +40 - 50 nm		4-OH (khalkon) 2-OH/4'-OH dan tanpa 4-OH 4'-OH (2'-OH/4-OR)
Anto- sianidin Antosianin	Semuanya terurai kecuali 3-deoksi antosianidin		Nihil

(Sumber : Markham, 1988)

Tabel 5. Penafsiran spektrum  $AlCl_3$  dan  $AlCl_3/HCl$ 

Jenis flavonoid	Pergeseran yang tampak		Petunjuk penafsiran
	Pita I	Pita II	
Flavon dan Flavonol $AlCl_3/HCl$	+35 - 55 nm +17 - 20 nm Tidak berubah +50 - 60 nm		5-OH 5-OH, OR pada 6 Mungkin 5-OH dengan gugus prenil pada 6 Mungkin 3-OH (dengan /tanpa 5-OH)
$AlCl_3$	Pergeseran ( $AlCl_3/HCl$ ) +30 - 40 nm Pergeseran ( $AlCl_3/HCl$ ) +20 - 25 nm		<i>o</i> -diOH pada cincin B  <i>o</i> -diOH pada cincin A (tambahan pergeseran <i>o</i> -diOH pada cincin B)
Isoflavon Flavanon Dihydroflavon $AlCl_3/HCl$ $AlCl_3$		+10 - 14 nm +20 - 26 nm  Pergeseran ( $AlCl_3/HCl$ ) +11 - 30 nm Pergeseran $AlCl_3/HCl$ +30 - 38 nm (peka terhadap NaOAc)	5-OH (isoflavon) 5-OH (flavanon, dihydroflavonol)  <i>o</i> -diOH pada cincin A (6,7 dan 7,8)  Dihydroflavonol tanpa 5-OH (tambahan pada sembarang pergeseran <i>o</i> -diOH)
Auron Khalkon $AlCl_3/HCl$ $AlCl_3$	+48 - 64 nm +40 nm  +60 - 70 nm Pergeseran $AlCl_3/HCl$ +40 - 70 nm Penambahan lebih kecil		2'-OH (khalkon) 2'-OH, OR pada 3'  4-OH (auron) <i>o</i> -diOH pada cincin B  Mungkin <i>o</i> -diOH pada cincin A
Antosianidin Antosianin $AlCl_3$	+25 - 35 nm (pada pH 2-4)  Pergeseran lebih besar		<i>o</i> -diOH  Banyak <i>o</i> -diOH atau <i>o</i> -diOH (3-deoksi antosianidin)

(Sumber : Markham, 1988)

Tabel 6. Penafsiran spektrum natrium asetat

Jenis Flavonoid	Pergeseran yang tampak		Petunjuk penafsiran
	Pita I	Pita II	
Flavon Flavanol Isoflavon		+5 - 20 nm (berkurang bila ada OR pada 6 atau 8)	7-OH
	Kekuatan berkurang dengan bertambah- nya waktu		Gugus yang peka terhadap basa, misal 6,7/7,8 atau 3,4'-diOH
Flavanon Dihidro- flavanol		+35 nm  +60 nm	7-OH (dengan 5-OH bebas) 7-OH (tanpa 5-OH bebas)
	Kekuatan berkurang dengan bertambah- nya waktu		Gugus yang peka terhadap basa, misal 6,7 / 7,8-diOH
Khalkon Auron	Pergeseran batokrom/bahu pada $\lambda$ lebih panjang		4' dan atau 4-OH (khalkon) 4' dan atau 6-OH (auron)

(Sumber : Markham, 1988)

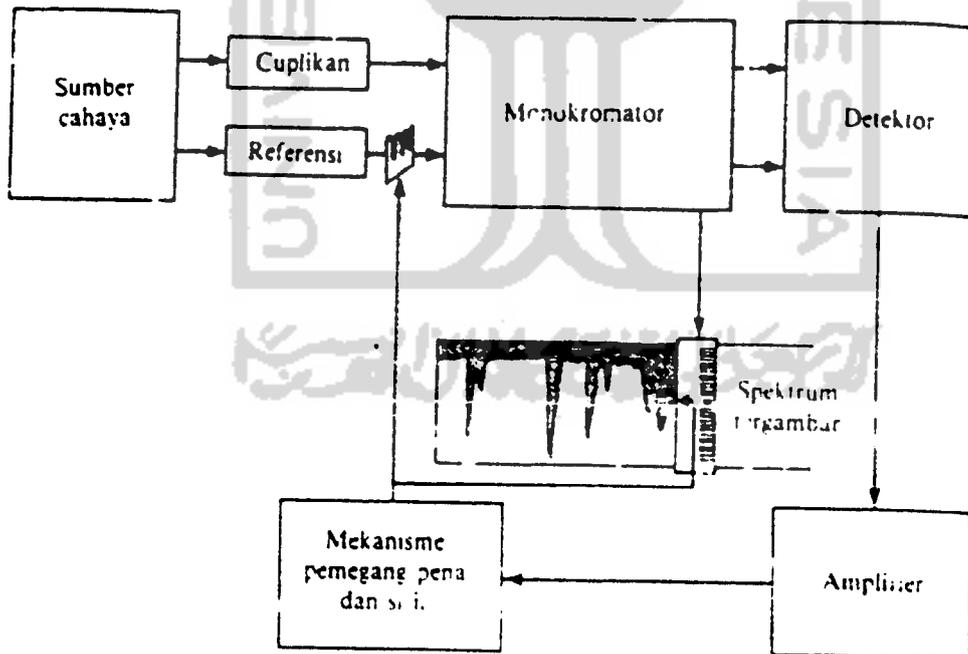
Tabel 7. Penafsiran spektrum natrium asetat/asam borat

Jenis flavonoid	Pergeseran yang tampak		Petunjuk penafsiran
	Pita I	Pita II	
Flavon Flavanol Auron Khalkon	+12 - 36 nm (nisbi terhadap spektrum metanol)		<i>o</i> -diOH pada cincin B
	Pergeseran lebih kecil		<i>o</i> -diOH pada cincin A (6,7 atau 7,8)
Isoflavon Flavanon Dihidro- flavon		+10 sampai 15 nm (nisbi terhadap spektrum metanol)	<i>o</i> -diOH pada cincin A (6,7 atau 7,8)

(Sumber : Markham, 1988)

### 3.7 Spektroskopi inframerah

Spektrum inframerah senyawa tumbuhan dapat diukur dengan spektrofotometer inframerah yang merekam secara otomatis dalam bentuk larutan. (J.B. Harbhone, 1996) Komponen dalam spektrofotometer inframerah terdiri dari sumber radiasi inframerah yang memancarkan sinar yang mengenai cuplikan yang akan dianalisis. Monokromator yang mendispersikan energi sinar awal menjadi banyak frekuensi dan komponen ketiga adalah detektor yang berfungsi mengubah energi dari frekuensi serapan menjadi sinyal listrik yang kemudian diperkuat hingga cukup untuk dicatat. Diagram rangkaian komponen tersebut dapat dilihat pada gambar 5.



Gambar 7. Bagan instrumen spektroskopi inframerah

( Sumber: Hardjono, 1992 )

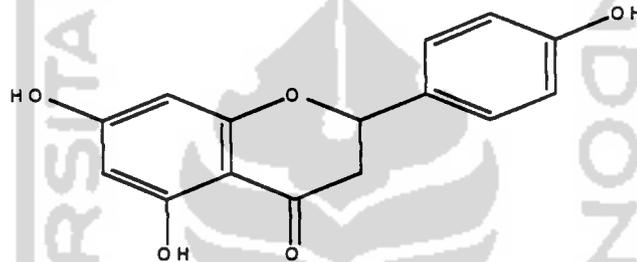
Kegunaan yang lebih penting dari spektrum inframerah adalah memberikan keterangan tentang molekul. Serapan setiap tipe ikatan (N - H, C - H, O - H, C - X, C - O, C = O, C - C, C = C, C = N dan sebagainya ) hanya di peroleh dalam bagian - bagian kecil tertentu dari daerah vibrasi inframerah. Kisaran serapan yang kecil dapat digunakan untuk menentukan setiap tipe ikatan. Spekrtofotometer menentukan kekuatan dan kedudukan relatif dari semua serapan dalam daerah inframerah dan melukiskanya pada kertas grafik yang telah di kalibrasi. Dalam tabel dibawah ini tersusun secara sistematis daerah serapan yang sesuai dengan ikatan yang terdapat dalam senyawa.

Tabel 8. Daerah serapan inframerah

		Bilangan gelombang dalam $\text{cm}^{-1}$						
		4000	2500	2000	1800	1650	1550	650
O-H	C-H			C $\equiv$ C	sangat	C=O	C=N	C-C1
				C $\equiv$ N	sedikit			C-O
N-H				X=C=Y (C,O,N,S)	serapan		C=C	C-N
								C-C
							N=O N=O	
		2.5	4	5	5.5	6.1	6.5	15.4
		Panjang gelombang dalam mikrometer						

## HIPOTESIS PENELITIAN

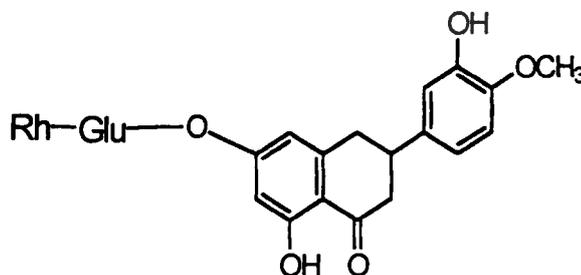
Pada penjelasan di depan bahwa semua gugus OH pada senyawa flavonoid dapat diganti dengan glukosida atas dasar pengertian ini maka dapat dibuat suatu hipotesa yang menyatakan bahwa di dalam kulit jeruk selain terdapat senyawa hisperidin yang telah digunakan sebagai zat warna, terdapat juga senyawa naringin yang dapat dipisahkan dengan menggunakan pelarut polar.



Gambar 8. Struktur senyawa naringin

Berdasarkan atas struktur ini maka naringin dengan garam diazonium dapat dikopling untuk menghasilkan suatu zat warna azo, karena perbedaan gugus yang dimiliki naringin dan hisperidin hanya terletak pada gugus  $\text{OCH}_3$  yang seperti kita ketahui bahwa gugus glukosida bukanlah merupakan kromofor.

Rumus senyawa :



Gambar 9. Struktur senyawa hisperidin

Dari gambar struktur diatas dapat di lihat bahwa kedudukan yang akan mengikat garam aril diazonium dengan naringin yaitu pada posisi :

- a. Orto terhadap OH dan
- b. Para terhadap gugus OH

Atas dasar inilah, maka apabila naringin direaksikan dengan garam aril diazonium akan membentuk senyawa berwarna yang disebut zat warna azo.



## BAB IV METODOLOGI PENELITIAN

### 4.1 Alat dan bahan yang digunakan

#### 4.1.1 Alat yang digunakan

1. Labu alas bulat 250 ml
2. penyaring Buchner
3. Erlenmeyer
4. Gelas beker 250 ml
5. Kertas saring
6. Kromatografi lapis tipis (KLT)
7. Seperangkat alat soxhlet
8. Spektroskopi UV – Vis
9. Spektroskopi inframerah
10. Kompokor listrik
11. Pipa kapiler
12. Termometer

#### 4.1.2 Bahan yang digunakan

1. Petroleum eter
2. Metanol
3. n- Butanol
4. Asam asetat
5. NaOH



6. Garam diazonium merah B, Kuning, Blue black, Hitam Black
7. detergen
8. amoniak

#### **4.2 Sampel**

Sampel yang digunakan adalah kulit jeruk yang diperoleh dengan cara membeli di toko buah . Sampel diambil secara acak dan di pilih dalam keadaan tidak busuk dan masih segar.

#### **4.3 Cara kerja**

##### **4.3.1 Preparasi kulit jeruk**

Kulit buah yang masih segar di potong kecil – kecil dan dikeringkan di dalam oven dengan suhu pemanasan  $40^{\circ}\text{C}$ . Setelah kering kulit jeruk tersebut di blender sampai halus.

##### **4.3.2 Ekstraksi soxhlet**

Serbuk kulit jeruk disiapkan sebanyak 100 gram dan dibungkus dengan kertas saring kemudian dimasukan kedalam ruang soxhlet dengan ditambahkan Petroleum eter dan di ekstraksi dengan menggunakan metode soxhletasi selama 3 – 4 jam untuk menghilangkan lemak. Proses ini berlangsung sampai di dapatkan ekstrak yang sempurna.

Kulit jeruk yang telah bebas lemak kemudiaan di soxhletasi kembli dengan metanol pada temperatur  $83^{\circ}\text{C}$  selama 5 jam dan disaring dalam keadaan panas

untuk memperoleh filtrat metanol. Filtrat metanol tersebut diuapkan dan dipekatkan dengan evaporator sampai diperoleh destilat yang kental.

#### **4.3.3 Identifikasi pendahuluan dengan kromatografi lapis tipis**

Ekstrak yang telah pekat tersebut kemudian ditotolkan dengan pipa kapiler pada plat KLT 2x10 cm. Eluen yang digunakan pada pengembangan ini adalah BAA dengan perbandingan yang bervariasi untuk memperoleh hasil pemisahan yang baik. Selain itu juga digunakan eluen TBA dengan perbandingan 3 : 1 : 1 v/v. Elusi dilakukan setelah bejana penuh dengan uap eluen. Untuk mendeteksi bercak dilakukan dengan menggunakan lampu UV pada panjang gelombang 254 nm dan 366 nm, kemudian bercak tersebut ditandai dengan menggunakan pensil dan ditentukan harga  $R_F$  nya.

#### **4.3.4 Pemisahan flavonoid menggunakan kromatografi lapis tipis preparatif**

Pemisahan flavonoid digunakan kromatografi lapis tipis preparatif dimana pada pemisahan dilakukan dengan menggunakan eluen terbaik pada identifikasi awal. Setelah itu bercak di deteksi dengan menggunakan lampu UV pada panjang gelombang 366 nm dan di tandai dengan pensil. Selanjutnya bercak yang sesuai di kerok dan di larutkan dalam metanol.

#### **4.3.5 Identifikasi menggunakan spektrofotometer UV-Vis**

Diambil 2-3 mL fraksi metanol, dimasukkan dalam kuvet dan diukur spektrumnya pada panjang gelombang 200 – 400 nm. Blanko yang digunakan adalah metanol. Identifikasi dilakukan dengan menggunakan pereaksi geser.

Pereaksi yang digunakan adalah pereaksi NaOMe,  $\text{AlCl}_3$ , HCl, NaOAc dan  $\text{H}_3\text{BO}_3$ . Pembuatan pereaksi tersebut dilakukan dengan cara sebagai berikut :

1. Natrium metoksida

Sebanyak 2,5 gram logam natrium dipotong dengan hati-hati dan dimasukkan dengan hati-hati ke dalam 100 mL metanol. Pereaksi ini disimpan dalam botol kaca bertutup plastik. Pereaksi pengganti yang cocok adalah NaOH 2 M.

2. Aluminium klorida

Sebanyak 5 g  $\text{AlCl}_3$  dilarutkan dalam 100 mL metanol. Pereaksi disimpan dalam botol plastik.

3. Asam klorida

Sebanyak 50 mL HCl pekat dilarutkan dalam 100 mL akuades.

Tahapan penggunaan pereaksi geser adalah sebagai berikut :

1. Ditambahkan 3 tetes pereaksi natrium metoksida ke dalam kuvet yang berisi ekstrak metanol kemudian diukur spektrumnya. Setelah 5 menit spektrum diukur kembali untuk mengetahui kemungkinan terjadi dekomposisi flavonoid.
2. Ekstrak metanol dimasukkan dalam kuvet, ditambah 6 tetes  $\text{AlCl}_3$  dan diukur spektrumnya. Ditambah 3 tetes HCl dan diukur spektrumnya.
3. Ekstrak metanol dimasukkan dalam kuvet, ditambah serbuk natrium asetat sampai kira-kira terdapat 2 mm pada dasar kuvet, kemudian diukur spektrumnya. Ditambah serbuk asam borat setengah dari penambahan natrium asetat dan diukur spektrumnya.

spektrumnya. Ditambah serbuk asam borat setengah dari penambahan natrium asetat dan diukur spektrumnya.

#### **4.3.6 Reaksi Kopling (Penggandengan)**

Kemudian langkah selanjutnya dapat dilakukan reaksi kopling antara garam diazonium dengan naringin dan dilakukan pengamatan terhadap warnanya. Untuk menguji warna dari hasil reaksi kopling tersebut, dapat dilakukan dengan menggunakan kain katun putih yang dicelupkan terhadap larutan hasil reaksi kopling tersebut.



## **BAB V**

### **HASIL DAN PEMBAHASAN**

#### **5.1 Hasil penelitian**

Dari penelitian diatas, ekstrak yang diperoleh dari kulit jeruk sebanyak 200 ml. Kemudian ekstrak yang berwarna coklat pekat tersebut diuapkan sampai semua metanol menguap. Pada proses penguapan, terdapat endapan pada ekstrak dan endapan tersebut berwarna kuning. Endapan tersebut dipisahkan secara dekantir dan diperoleh 5,29 gram endapan.

#### **5.2 Identifikasi pendahuluan kromatografi lapis tipis ( KLT )**

Dari analisa senyawa flavonoid yang dilakukan dengan menggunakan kromatografi lapis tipis silika gel G, dimana pada indentifikasi awal ini diperoleh harga  $R_f$  dan bercak yang dihasilkan dari pengembangan pada plat KLT yang telah diamati dibawah lampu UV pada panjang gelombang 336 nm. Langkah ini sangat bermanfaat dalam proses pemisahan flavonoid agar diperoleh senyawa murni.

Eluen yang digunakan pada proses indentifikasi awal adalah fase atas BAA. Perbandingan BAA yang digunakan pada proses indentifikasi awal adalah 4:1:5 v/v dan menghasilkan bercak yang kurang baik setelah di deteksi dibawah lampu UV 336 nm. Pada pengamatan dengan lampu UV terdapat empat bercak yaitu biru, lembayung, coklat dan biru flourecent. Pemisahan dengan menggunakan perbandingan BAA 4:1:5 v/v belum memberikan hasil pemisahan

yang sempurna. Untuk menghasilkan pengembangan yang baik digunakan eluen yang bervariasi. Hasil pengembangan dengan eluen bervariasi ditunjukkan pada tabel

**Tabel 9. Hasil pengembangan menggunakan berbagai eluen**

Eluen ( v/v )	Jumlah bercak	Pemisahan	Kesimpulan
BAA 4 : 1 : 5	4	Cukup terpisah	Kurang baik
BAA 7 : 2 : 5	4	Cukup terpisah	Kurang baik
BAA 7 : 2 : 9	2	Cukup terpisah	Kurang baik
BAA 9 : 2 : 6	1	Cukup terpisah	Kurang baik
BAA 10 : 1 : 7	1	Cukup terpisah	Baik
TBA 3 : 1 : 1	2	Sangat baik	Sangat baik

Dari data tabel diatas, menunjukkan bahwa dengan menggunakan eluen TBA dengan perbandingan 3 : 1 : 1 v/v menghasilkan pemisahan yang sangat baik setelah diamati dibawah sinar UV pada panjang gelombang 366 nm. Dari pengamatan tersebut terdapat dua bercak diantaranya lembayung dan biru flourecent. Deteksi bercak juga dilakukan dengan diuapi menggunakan amoniak. Hasil dteksi bercak dapat dilihat pada tabel 10.

**Tabel 10. Data hasil deteksi bercak dengan eluen TBA ( 3 : 1 : 1 v/v )**

No	Rf x 100	Warna	
		UV 366 nm tanpa NH <sub>3</sub>	UV 366 nm dengan NH <sub>3</sub>
1	0,89	Lembayung	Hijau kuning
2	0,86	Biru berfluoresensi	Biru berfluoresensi

Dari pengamatan diatas, bercak pertama bewarna lembayung setelah di uapi dengan amoniak terjadi perubahan warna dari lembayung menjadi hijau kuning. Menurut Markham (1988) dan Marby bercak ini menunjukkan adanya 5-OH flavon atau flavonol tersulih pada 3-OH dan mempunyai 4'-OH . Akan tetapi kadang – kadang 5-OH flavanon dan 4'-OH dan khalkon tanpa OH pada cincin B. Bercak ini dapat digunakan sebagai petunjuk sementara dalam membuktikan senyawa yang diteliti sebelum dilakukan indentifikasi dengan menggunakan spektrofotometer UV-Vis terhadap panjang gelombang dan pola pergeseran dari senyawa tersebut.

Pada bercak kedua yang tidak menunjukkan perubahan warna menurut Markham (1988) , adanya isoflavon yang tidak mengandung 5-OH bebas.

### 5.3 Pemisahan flavonoid menggunakan kromatografi lapis tipis preparatif

Identifikasi pendahuluan dengan menggunakan kromatografi lapis tipis sangat berguna untuk pemisahan kromatografi lapis. Penggunaan eluen pada pemisahan ini dilakukan dengan menggunakan eluen terbaik pada indentifikasi pendahuluan pada fraksi metanol kulit jeruk. Pada dasarnya pemisahan kromatografi lapis tipis preparatif tidak jauh berbeda dengan pemisahan pada

KLT. Adapun ukuran yang digunakan pada pemisahan ini yaitu 4 x 8 cm., atau dapat juga disesuaikan dengan kebutuhan.

Pemisahan dilakukan pada tiga buah plat KLT ukuran 4 x 8 cm. Eluen yang digunakan adalah TBA (3:1:1 v/v). Penotolan dilakukan dalam bentuk pita yang memanjang, Pengembangan dilakukan dalam bejana yang terisi oleh uap sampai dengan batas yang telah ditentukan.

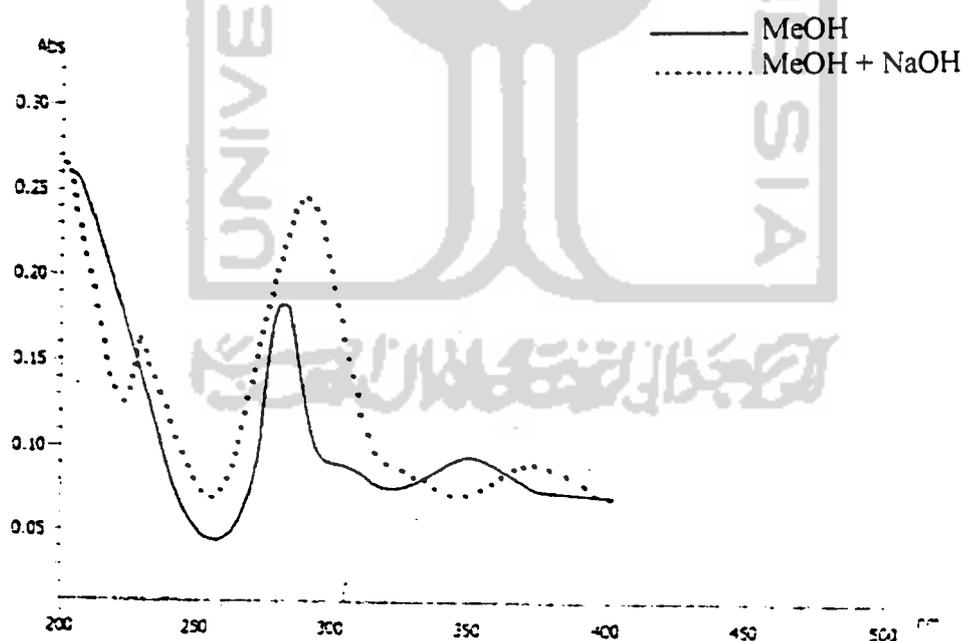
Hasil deteksi dengan lampu UV 336 nm menghasilkan dua bercak yang kemudian ditandai dengan pensil. Bercak yang dihasilkan berupa pita yang memanjang dan menunjukkan warna bercak yang sama pada indentifikasi pendahuluan. Warna bercak pertama yaitu lembayung dengan harga  $R_F$  0,89 dan disebut sebagai fraksi 1. Sedangkan bercak kedua berwarna biru flouresensi dengan harga  $R_F$  0,86 dan disebut sebagai fraksi 2. Kedua fraksi tersebut kemudian dikerok dan dilarutkan dalam metanol. Sebelum diukur kedua fraksi tersebut disaring terlebih dahulu menggunakan kertas whatman no 1 agar di peroleh filtrat metanol yang jernih. Kedua fraksi tersebut tidak berwarna.

#### 5.4 Identifikasi menggunakan spektrofotometer UV-Vis

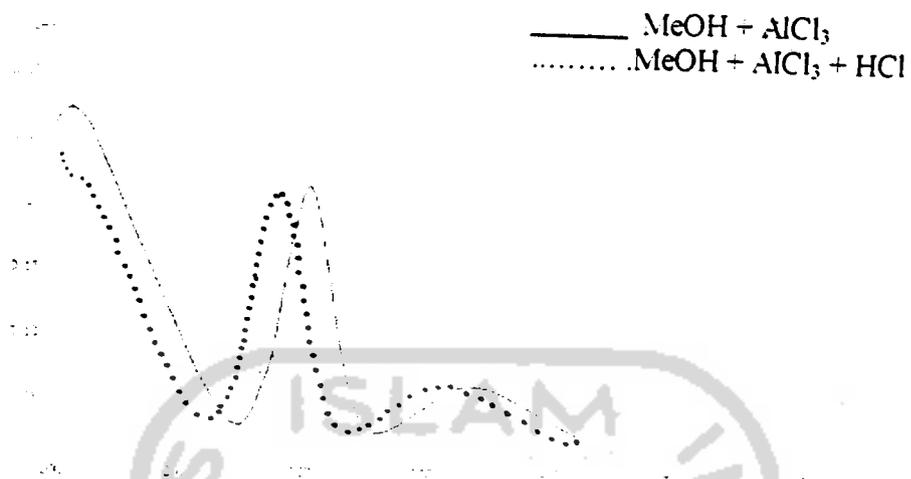
Pada tahap ini, fraksi metanol di indentifikasi dengan spektrofotometer UV-Vis. Metoda ini dilakukan untuk mengetahui jenis flavanoid dan menentukan pola oksigenasinya. Di samping itu, kedudukan gugus hidroksil fenol bebas pada inti flavonoid dapat ditentukan dengan menggunakan pereaksi geser pada larutan cuplikan dan mengamati pola pergeserannya. Kedua fraksi tersebut kemudian diukur panjang gelombangnya pada 200 sampai 500 nm. Selain itu fraksi metanol

dengan penambahan pereaksi geser juga diukur dan direkam spektrumnya sehingga dapat diketahui pola pergeseran pada pita I dan pita II. Pereaksi geser yang digunakan antara lain NaOH 2 M sebagai pengganti NaOMe, larutan AlCl<sub>3</sub> 5 % , larutan HCl pekat, serbuk NaOAc dan serbuk H<sub>3</sub>BO<sub>3</sub>. Sebelum dilakukan pengukuran dengan menggunakan pereaksi geser terlebih dahulu diukur fraksi MeOH untuk mengetahui spektrum khas flavonoid.

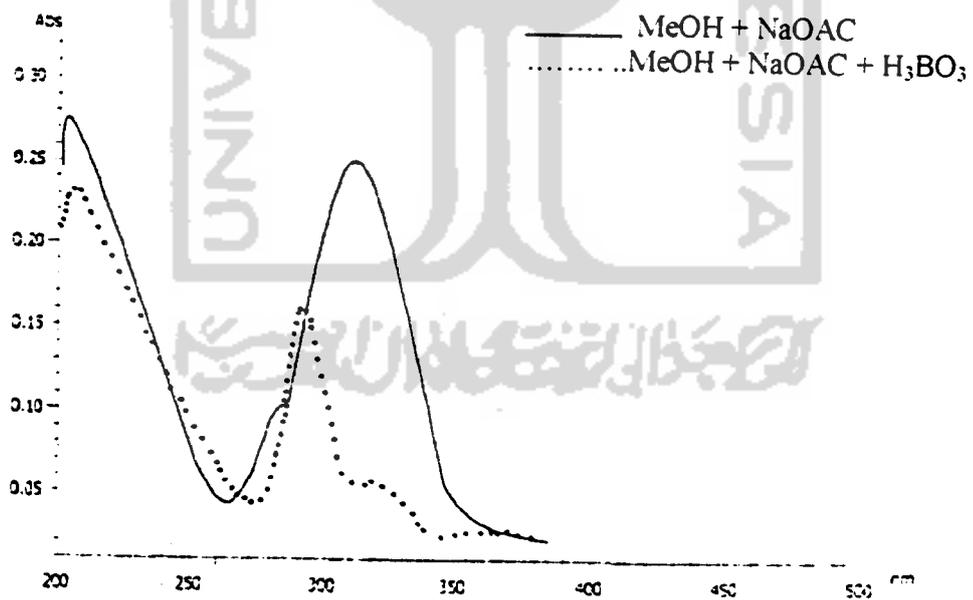
Untuk mengetahui hasil pengukuran spektrum MeOH dan MeOH + NaOH dapat dilihat pada gambar 10. Spektrum MeOH + AlCl<sub>3</sub> dan MeOH + AlCl<sub>3</sub> + HCl dapat dilihat pada gambar 11. Spektrum MeOH + NaOAc dan MeOH + NaOAc + H<sub>3</sub>BO<sub>3</sub> dapat dilihat pada gambar 12 dibawah ini.



Gambar 10. Spektrum MeOH dan MeOH+NaOH fraksi 1



Gambar 11. Spektrum MeOH+AlCl<sub>3</sub> dan MeOH+AlCl<sub>3</sub>+HCl fraksi 1



Gambar 12. Spektrum MeOH+NaOAc dan MeOH+NaOAc+H<sub>3</sub>BO<sub>3</sub> fraksi 1

Berdasarkan hasil pengukuran fraksi 1 dengan menggunakan MeOH dan dengan penambahan pereaksi geser untuk menafsirkan spektrum khas flavonoid dan pola oksigenasinya. Berikut ini tabel penafsiran spektrum fraksi 1

**Tabel 11. Penafsiran spektrum fraksi 1 indentifikasi golongan flavonoid**

Spektrum	$\lambda_{maks}$ (nm)		Pergeseran $\lambda_{maks}$ (nm)		Penafsiran
	Pita I	Pita II	Pita I	Pita II	
MeOH	280	350			Flavanon/ Dihydroflavonol
MeOH+NaOH	290	370,4	+10	+20,4	Dengan 5,7-OH
MeOH+NaOH t=5'	290	370,4			4' dan/atau 4-OH khalkon 4'/6-OH auron
MeOH+AlCl	300	370,2	+20	+20,2	5-OH (flavanon, dihydroflavanon)
MeOH+AlCl <sub>3</sub> + HCl	290,5	350,5	+10,5	+5	
MeOH+NaOAc	280,3	310	0,3	-40	
MeOH+ NaOAc+H <sub>3</sub> BO <sub>3</sub>	290	320,1	+10,3	-30,1	

Penafsiran dilakukan dengan terlebih dahulu melihat bentuk umum dari spektrum MeOH. Pada fraksi I dihasilkan penafsiran spektrum khas flavanon atau dihidroflavonol, dimana pita 1 serapannya pada panjang gelombang maksimum 280 nm dan pita II 350 nm. Pergeseran panjang gelombang ini menunjukkan adanya 5-OH dimana senyawa ini adalah flavanon. Penafsiran ini juga didukung oleh bercak lembayung pada kromatogram yang mengalami perubahan warna menjadi hijau kuning dimana mengandung 5-OH flavanon dan 4' OH khalkon tanpa OH pada cincin B.

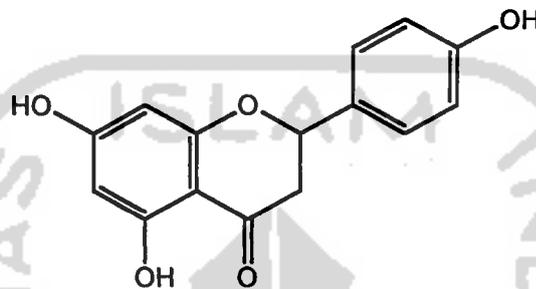
Langkah selanjutnya adalah mengamati pergeseran spektrum yang disebabkan oleh penambahan pereaksi geser. Pada perlakuan pertama digunakan pereaksi geser NaOH untuk mengetahui pola hidroksilasi, mendeteksi gugus hidroksi yang lebih asam dan tidak tersubstitusi. Pada spektrum NaOH mengalami pergeseran batokromik sebesar 10 nm pada pita I dan pada pita II sebesar 20,4 nm. Pergeseran ini juga mengalami efek hiperkromik dimana terjadi kenaikan intensitas sebesar 0,26 pada pita II. Sedangkan pada Pita I muncul puncak baru, dimana puncak baru ini menunjukkan adanya senyawa flavonol yang mengandung 7-OH.

Pada spektrum MeOH+AlCl<sub>3</sub> dan MeOH+AlCl<sub>3</sub>+HCl terjadi pergeseran pada pita II sebesar 20,2 dan 20 pada pita I. Pergeseran ini menunjukkan adanya pergeseran batokromik sebesar + 20,2 memperkuat indikasi adanya senyawa flavanon yang mengandung 5-OH.

Spektrum MeOH+NaOAc dan MeOH+NaOAc+H<sub>3</sub>BO<sub>3</sub> tidak memberikan pergeseran yang berarti, akan tetapi pada spektrum ini muncul bahu pada panjang gelombang yang lebih panjang. Hal ini menunjukkan adanya 4'dan / atau 4-OH (khalkon).

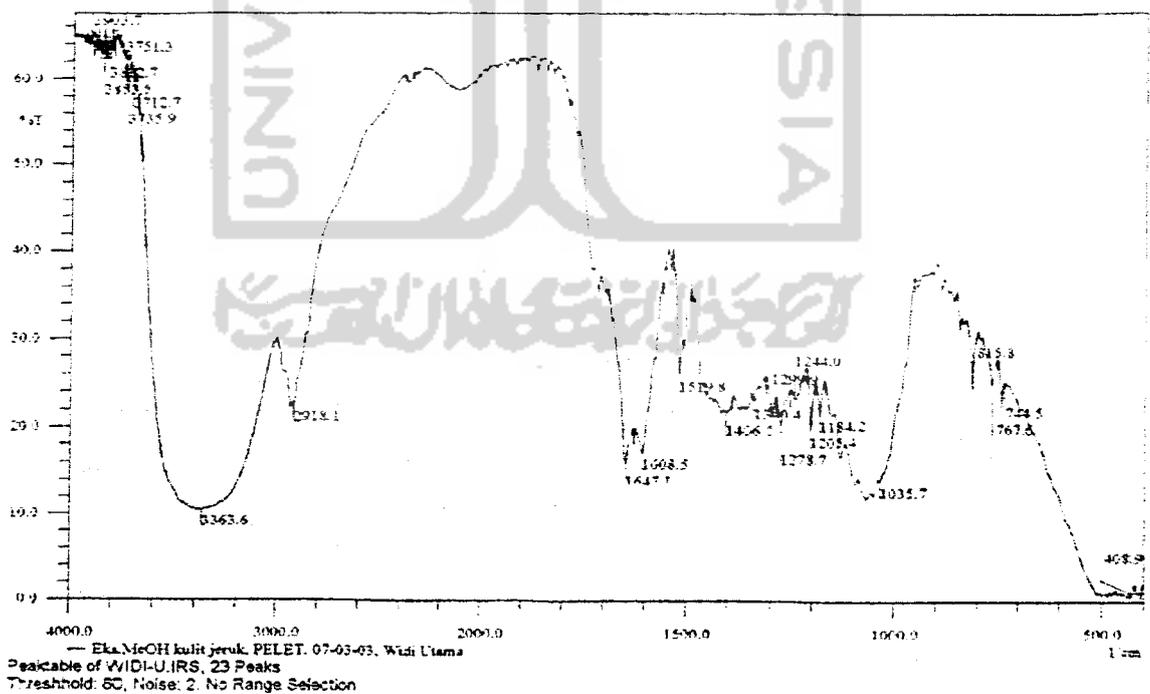
Dari penafsiran diatas dapat di simpulkan bahwa flavanoid pada fraksi I menunjukkan senyawa flavanon dengan gugus hidroksi pada posisi 5,7-OH. Hal ini juga di dukung oleh penafsiran pada spektrum MeOH+NaOAc dan MeOH+NaOAc+H<sub>3</sub>BO<sub>3</sub> dimana muncul bahu pada panjang gelombang yang lebih panjang, sehingga mengindikasikan pola hidroksi pada posisi 4'OH. Selain itu juga data penafsiran ini diperkuat oleh data kromatografi lapis tipis yang

menunjukkan pola hidroksi pada posisi yang sama yaitu 4'OH, sehingga dapat diusulkan jenis flavanoid fraksi 1 tersebut adalah naringin yang merupakan turunan flavanon dengan pola hidroksi 5,7 dan 4' OH. Struktur tersebut dapat dilihat pada gambar 13.



Gambar 13. Struktur flavanoid fraksi 1

### 5.5 Spektroskopi IR



Gambar 14. Spektrum Infra merah ekstrak kulit jeruk

Spektra infra merah dari ekstrak kulit jeruk dapat dilihat pada gambar diatas. Dari spektrum tersebut dapat dilihat bahwa adanya puncak – puncak pada panjang gelombang  $3363,3 - 3712,7 \text{ cm}^{-1}$  menunjukkan adanya gugus OH, pada  $2918, 1$  merupakan cincin aromatik. Kemudian pada daerah sekitar  $1608 - 1647,1 \text{ cm}^{-1}$  menunjukkan adanya gugus C=O yang terikat pada asil walaupun puncak serapan tidak terlalu kuat.

## **5.6 Reaksi pengkoplingan**

### **5.6.1 Pencelupan**

Pencelupan pada umumnya terdiri dari melarutkan atau mendispersikan zat warna dalam air atau medium lain, kemudian memasukan bahan tekstil kedalam larutan tersebut sehingga terjadi penyerapan zat warna kedalam serat. Endapan yang diperoleh dari hasil ekstraksi soxhlet dilarutkan di dalam detergen sampai diperoleh larutan yang homogen. Setelah terbentuk larutan yang homogen, kain yang telah disiapkan dan dipotong dengan ukuran yang disesuaikan di celupkan kedalam larutan tersebut dan kemudian dikeringkan dengan cara diangin- anginkan pada suhu kamar.

Pada proses pencelupan harus memperhatikan beberapa faktor untuk mengatur agar supaya kecepatan celup dalam suatu proses pencelupan menjadi optimum. Faktor – faktor tersebut diantaranya adalah pengaturan suhu celup atau penambahan zat – zat kimia yang membantu agar diperoleh hasil celupan yang baik. Pencelupan yang terlalu cepat atau lambat sangat tidak dikehendaki , karena pencelupan yang terlalu cepat mempunyai kecenderungan sukar rata. Sedangkan pencelupan yang lambat akan merusak serat yang dicelup.

Menurut Vickerstaff, pada proses pencelupan terhadap kain terjadi tiga peristiwa penyerapan zat warna kedalam serat. Penyerapan tersebut dikarenakan terjadi reaksi eksotermik dan reaksi kesetimbangan. Berikut ini tahapan peristiwa penyerapan zat warna terhadap serat kain :

1. Melarutkan zat warna dan mengusahakan agar zat warna bergerak menempel pada serat, peristiwa ini disebut migrasi
2. Mendorong larutan zat warna agar dapat terserap menempel pada serat, dimana molekul – molekul zat warna yang mempunyai tenaga yang cukup besar dapat mengatasi gaya – gaya tolak dari permukaan serat sehingga molekul zat warna tersebut dapat terserap menempel pada permukaan serat, peristiwa ini disebut adsorpsi
3. Penyerapan zat warna dari permukaan serat kedalam bahan, peristiwa ini disebut difusi kemudian terjadi fiksasi

Selain ketiga peristiwa diatas, pada proses pencelupan juga terjadi gaya ikat terhadap serat yang dicelup. Agar supaya pencelupan dari hasil celupan baik dan tahan cuci, maka gaya – gaya ikat antara zat warna dan serat harus lebih besar dari pada gaya – gaya yang bekerja antara zat warna dan air. Hal tersebut dapat dicapai apabila molekul zat warna mempunyai susunan atom tertentu sehingga akan memberikan daya serap yang baik dan ikatan yang kuat terhadap serat.

Pada dasarnya dalam pencelupan terdapat empat jenis gaya ikat yang menyebabkan adanya daya serap atau tahan cuci suatu zat warna pada serat. Keempat gaya ikat tersebut adalah :

1. Ikatan hidrogen
2. Gaya yang bersifat ion atau elektrostatis
3. Gaya vander Walls
4. Ikatan kovalen

Ikatan hidrogen merupakan ikatan sekunder yang terbentuk karena atom hidrogen pada gugus hidroksi mengadakan ikatan yang lemah dengan atom lainnya. Pada umumnya molekul – molekul zat warna dan serat mengandung gugusan – gugusan yang memungkinkan terbentuknya ikatan hidrogen.

Ikatan antara zat warna dan serat yang kedua merupakan ikatan yang timbul karena gaya tarik menarik antara muatan yang berlawanan. Dalam air serat – serat bermuatan negatif, sedangkan pada umumnya zat warna yang larut merupakan anion sehingga penetrasi akan terhalang. Pada proses pencelupan ditambahkan garam dapur yang bersifat elektrolit. penambahan garam dapur ini berfungsi untuk menghilangkan atau mengurangi sifat negatif dari serat atau zat warna, sehingga zat warna dan serat dapat lebih saling mendekat dan gaya – gaya non polar dapat bekerja lebih baik.

Pada umumnya terdapat kecenderungan bahwa atom – atom atau molekul – molekul satu dan lainnya saling tarik menarik. Pada proses pencelupan daya tarik antara zat warna dan serat akan bekerja lebih sempurna bila molekul – molekul zat warna tersebut berbentuk memanjang dan mendatar atau antara molekul zat warna dan serat mempunyai gugus hidrokarbon yang sesuai sehingga waktu pencelupan zat warna akan lepas dari air dan bergabung dengan serat. Gaya – gaya tersebut sering disebut gaya Vander Walls ( Rasjid, 1973 ).

### 5.6.2 Reaksi Pembangkitan

Tahap selanjutnya adalah pembentukan pigmen zat warna terhadap serat kain dengan menggunakan garam diazonium sebagai pembangkit warna. Dalam reaksi pembangkitan ini digunakan garam diazonium yang telah diazotasi terlebih dahulu sehingga garam tersebut stabil dan dapat digunakan secara langsung. Pada tahap ini digunakan beberapa jenis garam diazonium diantaranya adalah garam merah B, garam kuning, garam blue black dan garam hitam. Adapun cara pelarutannya adalah garam diazonium yang telah disediakan dilarutkan dalam air dingin dan suhu air yang digunakan tidak boleh lebih dari 30<sup>0</sup> C, dan garam diazonium dilarutkan sedikit demi sedikit dan terus diaduk sampai larutan tersebut homogen.

Reaksi pembangkitan berjalan baik pada pH yang tidak terlalu rendah. Oleh karena itu perlu penambahan natrium asetat untuk mengatur pH disekitar 4,5. Akan tetapi sebaliknya, pH yang terlalu tinggi juga akan menghambat reaksi pembangkitan dan untuk menetralkannya dapat ditambahkan asam asetat, natrium karbonat atau asam sulfat. Pada reaksi pembangkitan suhu tidak boleh lebih dari 20<sup>0</sup> C untuk mencegah migrasi senyawa yang telah tercelup pada kain (Winarti katib, 1980 ). Berikut ini proses pembangkitan warna yang dilakukan terhadap kain.



Larutan 1

Larutan 2

**Gambar.15 Proses pembangkitan warna**

1. Larutan senyawa naringin dalam detergen
2. larutan garam diazonium dari jenis yang berbeda

Pada proses pembangkitan ini, kain yang telah disediakan dengan ukuran yang disesuaikan terlebih dahulu dimasukkan kedalam larutan pertama yang berisi naringin yang dilarutkan dalam detergen proses ini adalah proses pencelupan seperti yang di jelaskan diatas. Kemudian kain yang telah di celupkan tersebut di keringkan terlebih dahulu dengan cara diangin – anginkan pada suhu kamar. Setelah kering kain tersebut di celupkan kedalam larutan kedua, dimana larutan tersebut adalah garam diazonium dari jenis yang berbeda untuk membangkitkan warna. Pembangkitan warna dilakukan sekitar sepuluh menit untuk memperoleh hasil yang baik. Berikut ini hasil pengamatan terhadap reaksi pembangkitan warna dari jenis garam diazonium yang berbeda terhadap kain yang diwarnai ditunjukkan pada tabel 12.

**Tabel 12. Data pengamatan terhadap corak warna hasil reaksi pembangkitan dengan garam diazonium**

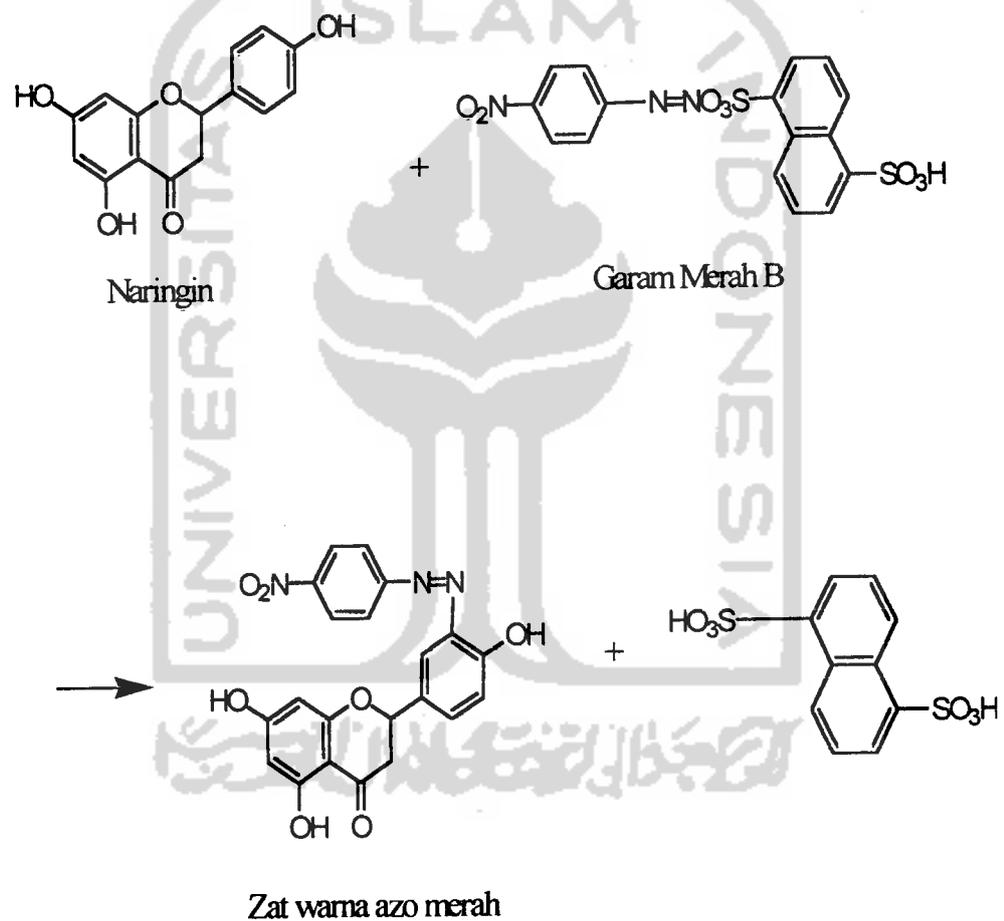
<b>Naringin dalam detergen</b>	<b>Garam Merah B</b>	<b>Garam Kuning</b>	<b>Garam Blue black</b>	<b>Garam hitam</b>
<b>Warna Pada kain</b>	Merah bata	Orange	Ungu	Colkat muda

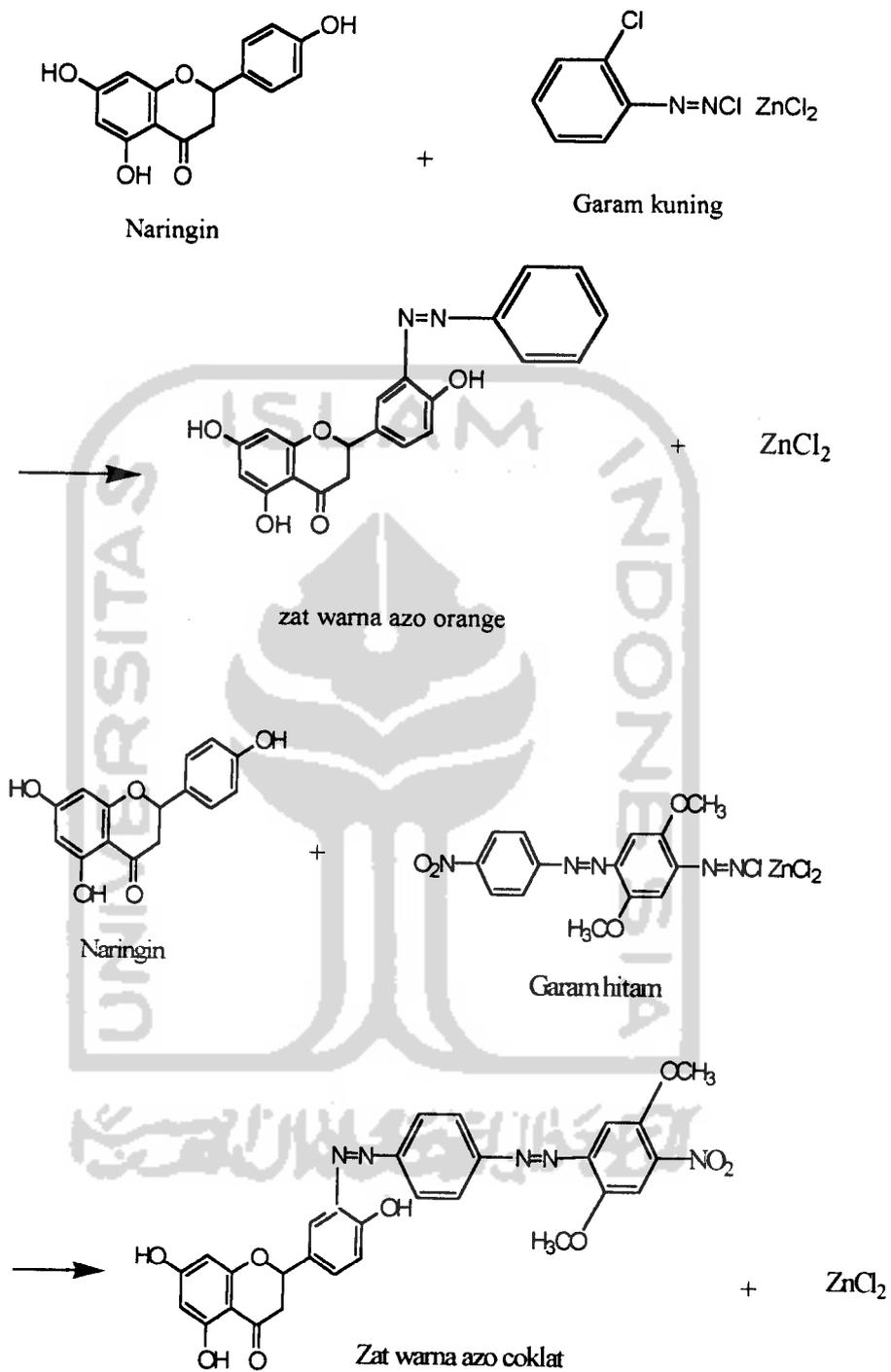
Dari data diatas, corak warna yang ditimbulkan terhadap kain sangat berbeda. Hal ini disebabkan oleh adanya sifat poligenetik yang dimiliki oleh senyawa naringin sebagai zat pewarna alam. Sifat ini sama dengan penggolongan terhadap zat warna naftol yang memberikan warna yang berbeda tergantung dari jenis garam diazonium yang digunakan.

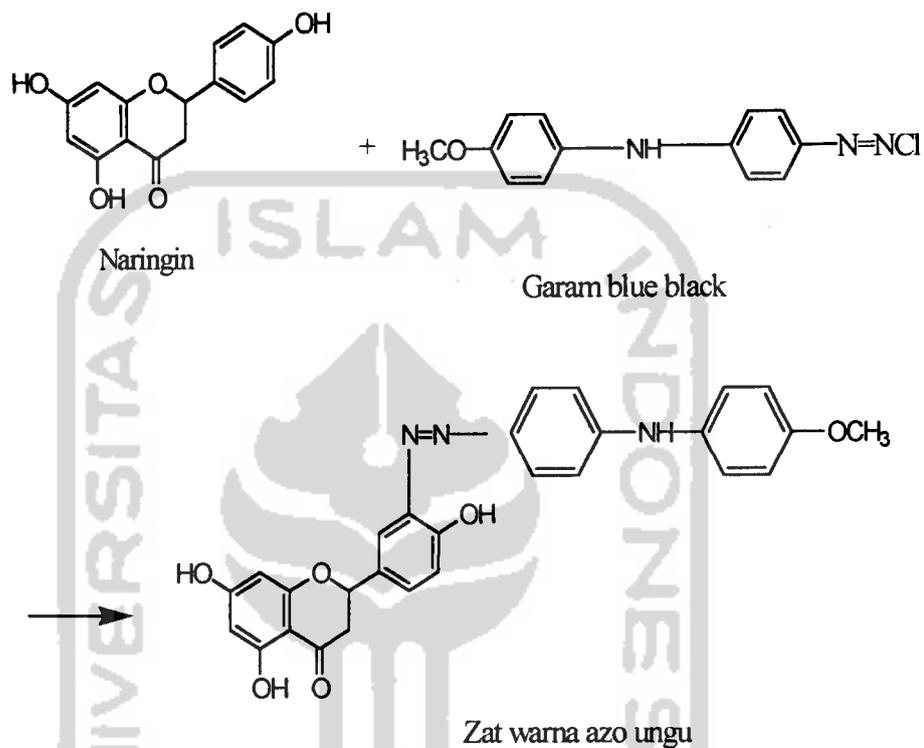
Pada reaksi penggantian antara komponen garam diazonium dengan naringin sangat dipengaruhi oleh gugus – gugus yang dimiliki oleh kedua komponen tersebut. Jika dilihat dari struktur senyawa naringin, terdapat gugus auksokrom ( OH ) dimana gugus ini dapat mengaktifkan kerja dari gugus kromofor ( -N=N- ) yang dimiliki oleh garam diazonium sebagai pembangkit warna (Ismaningsih,1978). Selain itu adanya gugus auksokrom dapat memberikan daya ikat terhadap serat yang diwarnai.

Gugus OH pada senyawa naringin dapat menyebabkan bertambah besarnya aktivasi sehingga cincin lebih terbuka terhadap substitusi. Adanya elektron bebas yang dimiliki oleh gugus OH mampu menarik elektrofil yang akan masuk, sehingga mengakibatkan cincin mengalami resonansi dan mengaktifkan

terhadap substitusi elektrofilik. Akibat resonansi tersebut cincin pada senyawa naringin menjadi negatif sebagian dan mengarahkan pada posisi orto dan para yang mengemban muatan negatif parsial ( Fessenden, 1997). Berikut ini reaksi yang terjadi antara senyawa naringin dengan garam diazonium pada proses pembangkitan warna.







Zat warna azo yang terbentuk akan masuk kedalam serat kain dimana serat kain mengalami pembesaran pori – pori setelah ditambahkan dengan NaOH dan zat warna akan teragregad atau terjebak didalam serat kain setelah kain tersebut kering sehingga menghasilkan warna.

## BAB VI

### KESIMPULAN DAN SARAN

#### 6.1 Kesimpulan

1. Berdasarkan hasil penelitian dapat disimpulkan bahwa ekstrak metanol kulit jeruk *Citrus paradisi* mengandung senyawa flavonoid naringin yang merupakan turunan flavanon dengan pola hidroksi 5,7 dan 4' OH
2. Ekstrak kulit jeruk dapat dikoplingkan dengan garam diazonium dan memberikan corak warna yang bermacam-macam tergantung dari jenis garam diazonium yang digunakan
3. Interaksi antara pewarna dengan serat lebih bagus pada serat katun dari pada serat poliester

#### 6.2 Saran

1. Perlu dilakukan penelitian lebih lanjut tentang isolasi senyawa naringin dengan metoda yang lebih baik
2. Perlu adanya pemanfaatan kulit jeruk sebagai alternatif zat warna untuk pewarna pada industri pencelupan kain



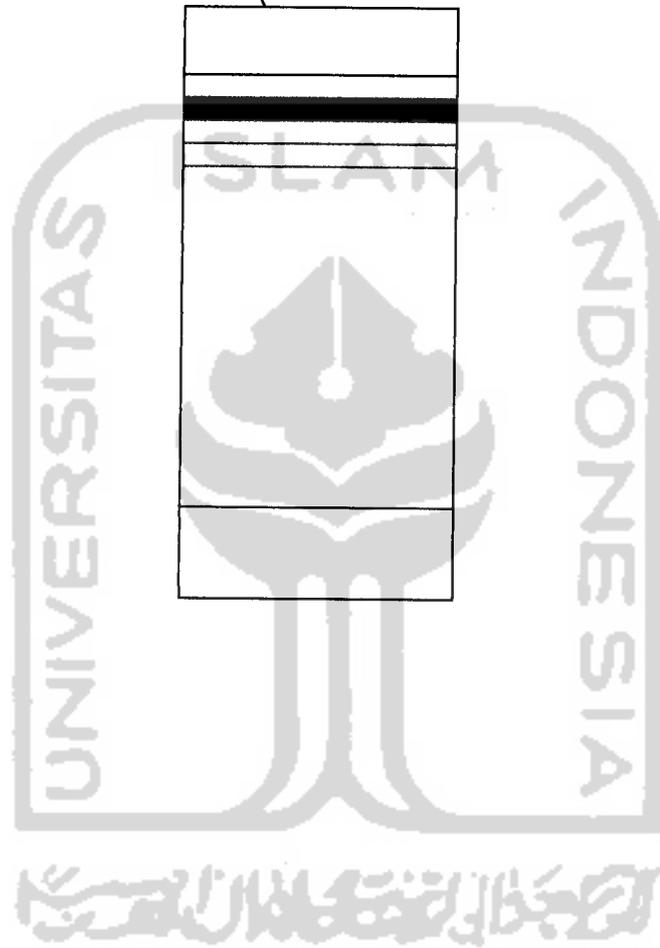
## DAFTAR PUSTAKA

- AAK, 1994, *Budidaya Tanaman Jeruk*, Penerbit Kanisius, Yogyakarta
- Day, Jr., R.A. and Underwood, A.L., 1986, *Quantitative Analysis*, Diterjemahkan oleh A. Hadyana Pudjaatmaka, Edisi ke Lima, Penerbit Erlangga, Jakarta
- Fessenden dan Fessenden, 1997, *Kimia Organik jilid 1*, diterjemakan oleh A. Hadyana Pudjaatmaka, Penerbit Erlangga Jakarta, Jakarta
- Hoover, J.E. 1970, Remingtons, *Pharmaceutical Science, part .4*, Macek publishing company, Easton
- Hartati. Tri, 1982, *Kandungan hesperidin x dalam kulit jeruk citrus nobilis lour*, Skripsi, Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam, Universitas Gajah Mada, Jogjakarta.
- Harborne.J.B., 1996, *Metode Fitokimia*, diterjemahkan oleh Kosasih Padmawinata, Penerbit ITB, Bandung
- Harborne and Marby. ,1975, *Metode Fitokimia* , diterjemahkan oleh Kosasih padmawinata, Penerbit ITB, Bandung
- Ismaningsih.G,1978, *Pengantar Kimia Zat Warna*, Penerbit Institut Teknologi Tekstil Bandung, Bandung
- Marby, J.T., Markham, K.R., Thomas, M.B., 1970, *The Systematic Identification of Flavonoids*, Springer Verlag, Berlin
- Markham, K.R., 1988, *Techniques of Flavonoids Identification*, diterjemahkan oleh Kosasih Padmawinata, Penerbit ITB, Bandung
- Parker.Ps., 1983, *Encyclopedia of Chemistry*, MC Graw Hill Book Company, New York
- Pracaya, 1992, *Jeruk Manis Varietas, Budidaya dan Pasca Panen*, Penebar Swadaya, Yogyakarta
- Rasjid.D, 1973, *Teknologi Pengelantangan, Pencelupan dan Pencapan*, Penerbit Institut Teknologi Tekstil Bandung, Bandung
- Sastrohamidjojo.H.,1985, *Kromatografi*, Penerbit Liberty Yogyakarta, Yogyakarta
- Sastrohamidjojo. H, 1992, *Spektroskopi inframerah*, Penerbit Liberty Yogyakarta, Yogyakarta



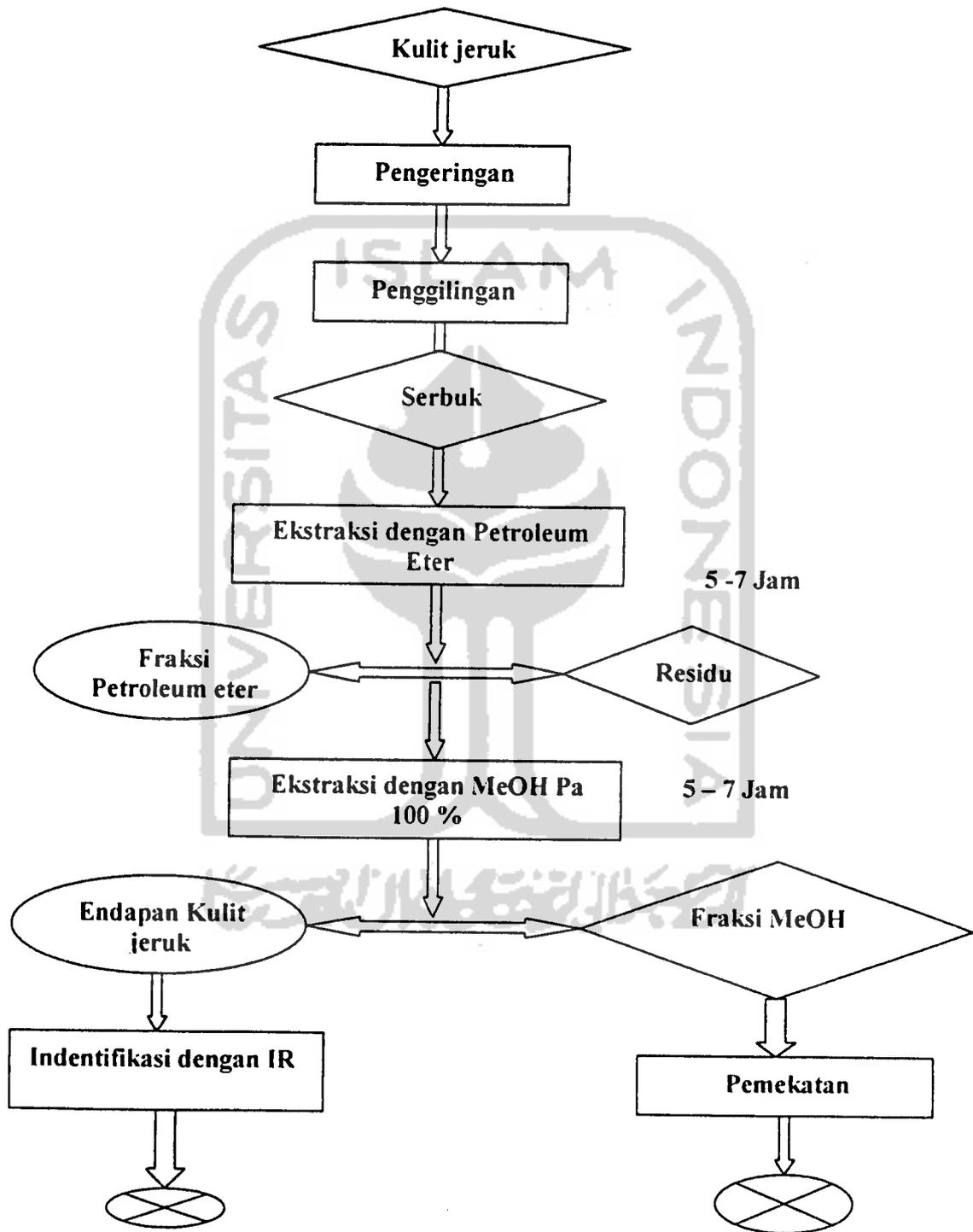
*Lampiran 1*

**Data Pengembangan kromatografi Lapis Tipis  
Dengan Eluen TBA ( 3:1:1 v/v)**

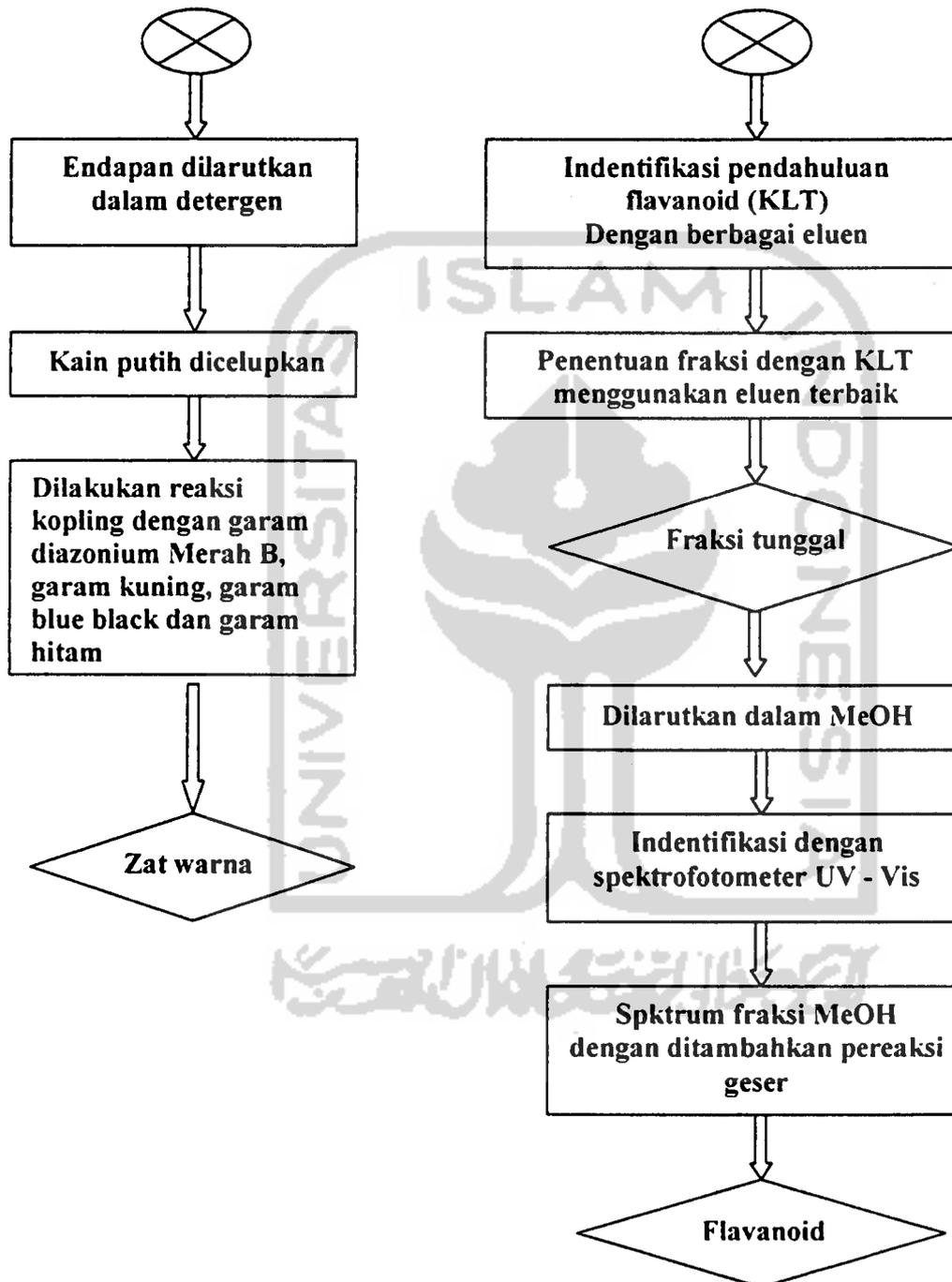


Lampiran 2

Skematika kerja



*Lanjutan lampiran 2*



**Lampiran 3**

**Pengamatan terhadap warna hasil reaksi pembangkitan dengan garam diazonium pada kain**

<b>Naringin dalam detergen</b>	<b>Garam Merah B</b>	<b>Garam Kuning</b>	<b>Garam Blue black</b>	<b>Garam hitam</b>
<b>Warna Pada kain</b>	Merah bata	Orange	Ungu	Colkat muda

