

**IDENTIFIKASI FLAVONOID DALAM EKSTRAK METANOL
DAUN MAHKOTA DEWA (*Phaleria macrocarpa* (Scheff.) Boerl.)
MENGUNAKAN SPEKTROFOTOMETER UV-Vis**

SKRIPSI

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



**Diajukan oleh :
RENI BANOWATI ISTININGRUM
No. Mhs : 99612039**

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

**IDENTIFIKASI FLAVONOID DALAM EKSTRAK METANOL
DAUN MAHKOTA DEWA (*Phaleria macrocarpa* (Scheff.) Boerl.)
MENGUNAKAN SPEKTROFOTOMETER UV-Vis**

**oleh :
RENI BANOWATI ISTININGRUM
No Mhs : 99612039**

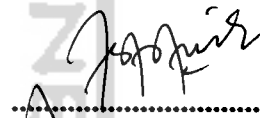
**Telah dipertahankan dihadapan Panitia Penguji Skripsi Jurusan Kimia
Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam
Universitas Islam Indonesia**

Tanggal 4 November 2003

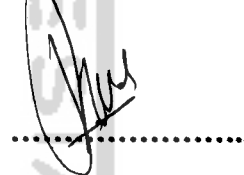
Dewan Penguji

Tanda Tangan

Is Fatimah, M.Si



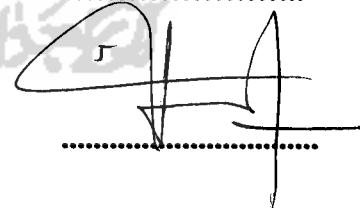
Rudy Syahputra, M.Si



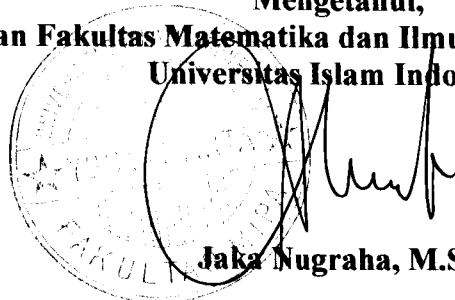
Dr. Chairil Anwar



Tatang Shabur Julianto, S.Si



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



Jaka Nugraha, M.Si

*Pesungguhnya sholatku, ibadahku, dan matiku
hanya untuk Allah, Rabb Semesta Alam*

(Q.S.6 : 162)



*Kupersembahkan untuk Ibu Bapakku,
pemberi semangat hidupku
My "one and only" Little Brother
(I'm glad that You are my family)*

Terimakasih kuucapkan kepada :

*Ust. Hamdani, pembuka mata hatiku
Saudari-saudariku, Mbak Anis, Dik Santi, Dik Dhias dan
santri-santriwan di IPA Al-Falah
Mbak Erni dan teman-teman PD, Oot, Pia, Puli, Pupi,
Vita, Ida, dan Erlin
My forever friends : Dharu, Febra and Olen
Pobat-sobatku Kimia '99, Shari, Yuli, Ratih, Melati,
Bheta, Rifa, Nurul, Ana, dan Dewi
Teman-teman KMI, KKN KP-137 Ankt. 26, teman-
teman di Lab Kimia, dan rekan-rekan MUIPBA*



KATA PENGANTAR

Tidak ada kata lain yang bisa kami ucapkan selain puja dan puji syukur ke hadirat Allah SWT, Sang Pencipta Alam Semesta, karena tanpa limpahan rahmat dan hidayah-Nya kami tidak akan menyelesaikan penelitian dan menyusun skripsi sebagai syarat kelulusan. Shalawat dan salam tak lupa kami haturkan kepada junjungan besar Nabi Muhammad SAW keluarga, sahabat dan para pengikutnya yang senantiasa istiqomah di jalan-Nya.

Skripsi ini diajukan sebagai syarat mendapatkan gelar Sarjana Sains di Jurusan Kimia Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam Universitas Islam Indonesia. Skripsi ini berjudul Identifikasi Flavonoid dalam Ekstrak Metanol Daun Mahkota Dewa (*Phaleria macrocarpa* (Scheff.) Boerl.) Menggunakan Spektrofotometer UV-Vis.

Skripsi ini tidak akan selesai tanpa bantuan berbagai pihak, oleh karena itu kami ingin mengucapkan banyak terima kasih kepada :

1. Bapak Jaka Nugraha, M.Si selaku Dekan Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam Universitas Islam Indonesia
2. Bapak Riyanto, M.Si selaku Ketua Jurusan Kimia Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam Universitas Islam Indonesia
3. Bapak Dr. Chairil Anwar selaku Dosen pembimbing I
4. Bapak Tatang Shabur Julianto, S.Si selaku Dosen Pembimbing II
5. Ibu Is Fatimah selaku Kepala Laboratorium Kimia Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam Universitas Islam Indonesia beserta staf.

Dan semua pihak yang tidak bisa kami sebut satu per satu yang dukungan, saran, dan bantuannya tidak bisa kami lupakan.

Tak ada gading yang tak retak. Manusia hanyalah makhluk dimana kekurangan selalu melekat padanya. Oleh karena itu penyusun sangat mengharapkan kritik dan saran dari pembaca. Semoga skripsi ini dapat dimanfaatkan sebaik-baiknya.

Jogyakarta, Oktober 2003

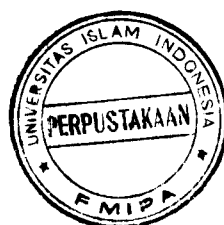
Penyusun



DAFTAR ISI

HALAMAN JUDUL.....	i
HALAMAN PENGESAHAN.....	ii
KATA PENGANTAR.....	iii
DAFTAR ISI.....	v
DAFTAR TABEL.....	viii
DAFTAR GAMBAR.....	ix
INTISARI.....	x
ABSTRACT.....	xi
BAB I PENDAHULUAN.....	1
1.1 Latar Belakang.....	1
1.2 Perumusan Masalah.....	3
1.3 Tujuan Penelitian.....	3
1.4 Manfaat Penelitian.....	4
BAB II TINJAUAN PUSTAKA.....	5
BAB III DASAR TEORI.....	8
3.1 Tanaman Mahkota Dewa.....	8
3.2 Flavonoid.....	10
3.3 Bioaktivitas Flavonoid.....	13
3.4 Ekstraksi.....	14
3.5 Kromatografi.....	15
3.5.1 Kromatografi lapis tipis.....	17

3.5.2 Deteksi bercak pada KLT	
untuk senyawa flavonoid.....	17
3.6 Spektroskopi UV-Vis.....	19
3.6.1 Instrumentasi.....	20
3.6.2 Identifikasi flavonoid dengan	
spektrofotometer UV-Vis.....	21
3.7 Hipotesis.....	27
BAB IV METODOLOGI PENELITIAN.....	28
4.1 Alat dan Bahan.....	28
4.1.1 Alat.....	28
4.1.2 Bahan.....	28
4.2 Sampel.....	29
4.3 Cara Kerja.....	29
4.3.1 Preparasi Sampel.....	29
4.3.2 Ekstraksi flavonoid.....	29
4.3.3 Penentuan eluen melalui KLT.....	30
4.3.4 Uji warna senyawa flavonoid	
dengan uap NH ₃	30
4.3.5 Uji kemurnian flavonoid	
dengan KLT dua dimensi.....	30
4.3.6 Pemisahan flavonoid dengan	
kromatografi preparatif.....	31



4.3.7 Identifikasi flavonoid dengan spektrofotometer UV-Vis.....	31
BAB V HASIL DAN PEMBAHASAN.....	33
5.1 Preparasi Sampel.....	33
5.2 Ekstraksi Flavonoid dari Sampel Daun Mahkota Dewa.....	34
5.3 Penentuan Eluen dengan KLT	37
5.4 Penafsiran Warna Bercak dengan UV 366 nm dan Uap NH ₃	40
5.5 Uji Kemurnian Senyawa dengan KLT Dua Dimensi	42
5.6 Isolasi Senyawa Flavonoid dengan KLT Preparatif.....	42
5.7 Identifikasi Senyawa Flavonoid dengan Spektrofotometer UV-Vis.....	43
5.7.1 Penafsiran spektrum fraksi 1	44
5.7.2 Penafsiran spektrum fraksi 2.....	45
5.7.3 Penafsiran spektrum fraksi 3, fraksi 4, dan fraksi 5.....	52
BAB VI KESIMPULAN DAN SARAN.....	55
6.1 Kesimpulan	55
6.2 Saran.....	56
DAFTAR PUSTAKA	
LAMPIRAN	

DAFTAR TABEL

Tabel 1. Penyebaran flavonoid pada dunia tumbuhan	10
Tabel 2. Jenis-jenis kromatografi	15
Tabel 3. Penafsiran warna bercak dengan UV 366 nm dan uap NH ₃	18
Tabel 4. Rentang serapan spektrum UV-Vis flavonoid	22
Tabel 5. Penafsiran spektrum NaOMe	24
Tabel 6. Penafsiran spektrum AlCl ₃ dan AlCl ₃ /HCl	25
Tabel 7. Penafsiran spektrum NaOAc	26
Tabel 8. Penafsiran spektrum NaOAc/H ₃ BO ₃	26
Tabel 9. Data sampel daun mahkota dewa	34
Tabel 10. Eluen KLT untuk pemisahan flavonoid	39
Tabel 11. Hasil pemisahan senyawa dan uji dengan uap NH ₃	40
Tabel 12. Penafsiran spektrum fraksi 2	51

DAFTAR GAMBAR

Gambar 1. Struktur dasar flavonoid	12
Gambar 2. Beberapa kelas flavonoid	12
Gambar 3. Reaksi pengikatan radikal bebas oleh flavonoid	14
Gambar 4. Diagram spektrofotometer	20
Gambar 5. Spektrum khas berbagai jenis flavonoid	23
Gambar 6. Spektrum MeOH fraksi 1	44
Gambar 7. Spektrum MeOH fraksi 2	45
Gambar 8. Spektrum MeOH dan MeOH+NaOH fraksi 2	46
Gambar 9. Spektrum MeOH dan MeOH+AlCl ₃ +HCl fraksi 2	48
Gambar 10. Spektrum AlCl ₃ dan MeOH+AlCl ₃ +HCl fraksi 2	48
Gambar 11. Spektrum MeOH dan MeOH+NaOAc fraksi 2	49
Gambar 12. Spektrum MeOH dan MeOH+NaOAc+H ₃ BO ₃ fraksi 2	50
Gambar 13. Spektrum MeOH+NaOAc dan MeOH+NaOAc+H ₃ BO ₃ fraksi 2	50
Gambar 14. Struktur flavonoid fraksi 2	52
Gambar 15. Spektrum MeOH fraksi 3	53
Gambar 16. Spektrum MeOH fraksi 4	53
Gambar 17. Spektrum MeOH fraksi 5	54

**IDENTIFIKASI FLAVONOID DALAM EKSTRAK METANOL DAUN
MAHKOTA DEWA (*Phaleria macrocarpa* (Scheff.) Boerl.)
MENGUNAKAN SPEKTROFOTOMETER UV-Vis**

**Oleh :
RENI BANOWATI ISTININGRUM**

INTISARI

Berbagai bukti empiris menunjukkan bahwa daun mahkota dewa (*Phaleria macrocarpa* (Scheff.) Boerl.) berkhasiat sebagai obat. Daun mahkota dewa mengandung senyawa alkaloid, saponin, dan flavonoid.

Flavonoid diekstrak dari serbuk daun mahkota dewa dengan menggunakan sokhletasi. Sampel diekstrak terlebih dahulu dengan n-heksana untuk menghilangkan senyawa-senyawa non polar seperti lemak dan klorofil. Selanjutnya ekstraksi dilakukan dengan menggunakan metanol 80 %.

Pemisahan senyawa dalam ekstrak metanol dilakukan dengan menggunakan kromatografi lapis tipis (KLT) dengan silika gel sebagai fase diamnya. Eluen terbaik yaitu campuran BAA (Butanol:Asam Asetat:Air=10:1:7). Noda dilihat dibawah lampu UV 366 nm dan diperoleh lima noda/fraksi dengan warna noda adalah merah, lembayung gelap, jingga, biru fluorosensi dan hijau fluorosensi. Uji pendahuluan dilakukan dengan uap NH₃. Hasil uji flavonoid dengan uap NH₃ menunjukkan bahwa fraksi 1 adalah flavonoid, fraksi 2 adalah flavon/flavonol; isoflavon/dihidroflavonol/biflavonil; khalkon, fraksi 3 adalah flavonol, fraksi 4 adalah isoflavon, dan fraksi 5 adalah auron/flavanon; flavonol. Uji kemurnian noda dilakukan dengan KLT dua dimensi.

Setiap fraksi dipisahkan dengan KLT perparatif dan dilarutkan kembali dalam metanol. Setiap fraksi dianalisis dengan spektrofotometer UV-Vis. Pereaksi geser yang digunakan adalah NaOH 2 M, AlCl₃ 5 %, HCl, serbuk NaOAc dan serbuk H₃BO₃. Dari kelima fraksi, fraksi 2 menunjukkan spektrum positif untuk flavonoid. Senyawa fraksi 2 adalah flavon dengan gugus-gugusnya adalah 4'-OH, 5-OH dengan gugus prenil pada 6, *o*-diOH pada cincin A, *o*-diOH pada cincin B, dan 7-OH. Sedangkan srtuktur flavonoid yang dapat diusulkan adalah 5,7,8,3',4'-heksahidroksi, 6-prenil flavon.

kata kunci : *daun mahkota dewa, flavonoid, kromatografi lapis tipis, spektrofotometer UV-Vis*

**IDENTIFICATION OF FLAVONOID IN METHANOL EXTRACT OF
MAHKOTA DEWA LEAVES (*Phaleria macrocarpa* (Scheff.)Boerl.)
USING UV-Vis SPECTROPHOTOMETER**

**By :
RENI BANOWATI ISTININGRUM**

ABSTRACT

Many empirical proofs have showed that mahkota dewa (*Phaleria macrocarpa* (Scheff.)Boerl.) leaves can be used as a drug. Mahkota dewa leaf contains alkaloids, saponins, and flavonoids.

Flavonoids were extracted from mahkota dewa leaves powder using soxhlet. Firstly, sample was extracted by n-hexane in order to remove no polar compound, such as fats and chlorophylls. Subsequently, extraction was performed by methanol 80 %.

Methanol extract was separated by thin layer chromatography (TLC) on silica gel as adsorbent. The eluent was a mixture of BAW (Butyl alcohol : Acetic acid : Water = 10 : 1 : 7). Spots were identified under UV lamp at 366 nm. It showed five spots/fractions whose color red, dark violet, orange, blue fluorescence, and green fluorescence. Early identification of spots was made using NH₃ vapor. The result of flavonoids identification using NH₃ vapor showed that fraction 1 was flavonoid, fraction 2 was flavon/flavonol; isoflavonol/dihydroflavonol/biflavonil; khalkon, fraction 3 was flavonol, fraction 4 was isoflavon, and fraction 5 was auron/flavanon; flavonol. The spots purity test was done using two dimensional TLC.

Each fraction was separated by preparative TLC and was dissolved in methanol. Each fraction was analyzed by UV-Vis spectrophotometer. Flavonoids structure identification was done by shift reagents i.e.: NaOH 2 M; AlCl₃ 5 %; HCl; NaOAc powder and H₃BO₃ powder. From the five fractions, fraction 2 showed positive identity of flavonoid. Fraction 2 is flavon with 4'-OH, 5-OH with prenyl in 6, *o*-diOH in ring A, *o*-diOH in ring B, and 7-OH. Its structure that can be suggested is 5,7,8,3',4'-hexahydroxyl, 6-prenyl flavon .

key words : *mahkota dewa leaf, flavonoids, thin layer chromatography, UV-Vis spectrophotometer*

BAB I

PENDAHULUAN

1.1 Latar Belakang

Indonesia adalah salah satu negara tropis yang kaya akan keragaman tumbuh-tumbuhan, termasuk tumbuhan obat. Tumbuhan, baik tingkat tinggi maupun tingkat rendah, adalah gudang senyawa kimia yang sangat penting dalam menunjang kesejahteraan manusia. Senyawa aktif yang terkandung dalam bagian-bagian tumbuhan merupakan senyawa yang berperan penting dalam menyembuhkan suatu penyakit sehingga digunakan sebagai bahan baku pembuatan obat. Secara umum dapat disebutkan bahwa sekurang-kurangnya 119 obat yang beredar di dunia diperoleh dengan cara ekstraksi langsung dari sekitar 91 spesies tumbuhan (Syah).

Banyaknya bukti-bukti empiris yang menunjukkan khasiat tanaman obat menyebabkan pengobatan tradisional menjadi populer. Selain itu mahalnya biaya pengobatan modern menyebabkan orang berpikir untuk kembali ke alam dalam mengatasi penyakit. Oleh karena itu, pengadaan tanaman obat keluarga (TOGA) menjadi salah satu alternatif upaya perlindungan dan peningkatan kesehatan masyarakat.

Salah satu jenis tanaman yang mempunyai khasiat menyembuhkan berbagai macam penyakit adalah tanaman mahkota dewa. Tanaman ini sudah sejak dahulu menjadi tanaman obat di Keraton Mangkunegaran Solo dan Keraton Jogjakarta. Tanaman mahkota dewa mempunyai manfaat yang banyak karena

hampir semua bagian tumbuhan ini dapat digunakan sebagai obat. Mahkota dewa dapat menyembuhkan penyakit berat seperti kanker, jantung, kencing manis, ginjal, darah tinggi, dan kecanduan narkoba. Sedangkan penyakit ringan yang dapat disembuhkan antara lain eksim, jerawat, dan gatal-gatal. Ramuan mahkota dewa juga dapat memacu kerja otot rahim sehingga memperlancar persalinan. Mahkota dewa dapat digunakan sebagai obat dalam dengan cara dimakan atau diminum dan sebagai obat luar dengan cara dioleskan atau dilulurkan. Para pengusaha yang menyadari banyaknya manfaat tanaman ini kemudian menjadikannya sebagai peluang usaha dengan membudidayakan dan meraciknya menjadi obat tradisional yang siap pakai.

Walaupun bukti-bukti empiris dari pengalaman pengguna ramuan tanaman ini sudah cukup banyak, tetapi bukti-bukti ilmiah akan manfaat mahkota dewa masih sangat terbatas. Salah satu bukti ilmiah tersebut menunjukkan bahwa mahkota dewa mengandung zat antihistamin. Sedangkan informasi mengenai kandungan senyawa aktifnya masih sangat sedikit. Dari penelitian yang sangat terbatas tersebut diketahui bahwa mahkota dewa mengandung alkaloid, saponin, dan flavonoid.

Daun adalah bagian tanaman mahkota dewa yang juga sering digunakan sebagai obat disamping buahnya. Daun mahkota dewa sering digunakan untuk mengobati desentri, alergi, dan tumor. Dalam penelitian ini akan diidentifikasi senyawa flavanoid dalam daun mahkota dewa dengan menggunakan metode Spektrofotometer UV-Vis. Flavonoid merupakan salah satu golongan fenol alam yang terbesar dan terdapat dalam semua tumbuhan hijau. Lebih dari satu dekade

yang lalu, telah ditemukan bukti-bukti bahwa flavonoid termasuk dalam kelas antioksidan. Bahkan beberapa penelitian tentang aktivitas antioksidan flavonoid juga telah dilakukan (Yang, 2001).

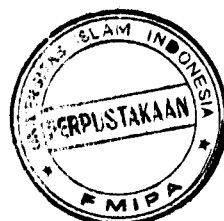
Oleh karena itu penelitian mengenai identifikasi senyawa flavonoid dalam daun mahkota dewa yang telah diketahui khasiat obatnya sangat penting. Hasil penelitian ini diharapkan dapat digunakan sebagai bahan baku dalam pembuatan obat. Selain itu, pengetahuan mengenai potensi tumbuhan Indonesia sangat penting karena kita dapat menjadikannya sebagai produk ekspor. Dengan demikian nantinya tumbuhan obat Indonesia tidak hanya bermanfaat dalam meningkatkan kesehatan masyarakat, tetapi juga dapat meningkatkan perekonomian masyarakat.

1.2 Perumusan Masalah

Dari latar belakang dapat dibuat suatu rumusan masalah yaitu senyawa flavonoid apakah yang terkandung dalam ekstrak metanol daun mahkota dewa melalui identifikasi dengan Spektrofotometer UV-Vis?.

1.3 Tujuan Penelitian

Tujuan penelitian ini adalah untuk mengetahui senyawa flavonoid yang terkandung dalam ekstrak metanol daun mahkota dewa melalui identifikasi dengan Spektrofotometer UV-Vis.



1.4 Manfaat Penelitian

1. Memberikan informasi mengenai senyawa flavonoid dalam daun tanaman mahkota dewa sehingga dapat dimanfaatkan lebih lanjut dalam bidang farmasi dan kedokteran
2. Memberikan informasi tentang potensi mahkota dewa sebagai bahan baku pembuatan obat sehingga dapat dibudidayakan untuk meningkatkan perekonomian masyarakat.



BAB II

TINJAUAN PUSTAKA

Tanaman mahkota dewa mempunyai khasiat menyembuhkan berbagai macam penyakit dari yang berat sampai yang ringan. Berdasarkan bukti-bukti empiris mahkota dewa dapat menyembuhkan penyakit berat seperti lever, kanker payudara, kanker rahim, penyakit jantung, kencing manis, asam urat, reumatik, ginjal, tekanan darah tinggi. Penyakit ringan seperti eksim, jerawat, dan luka gigitan serangga juga dapat disembuhkan dengan ramuan mahkota dewa. (Siswono, 2001). Daun mahkota dewa dapat menyembuhkan penyakit desentri, alergi, dan tumor. Selain itu menurut Ning Harmanto yang menekuni pengobatan dengan mahkota dewa menyatakan bahwa 26 orang berhasil sembuh dari penyakitnya berkat mahkota dewa (Yudana, 2002).

Mahkota dewa mempunyai efek antihistamin. Hal ini dibuktikan dari penelitian Sumastuti (2001) yang membuktikan bahwa ekstrak daun dan buah mahkota dewa dapat menurunkan kontraksi histamin murni pada marmot. Dengan demikian mahkota dewa dapat menyembuhkan penyakit alergi yang disebabkan histamin seperti biduren, gatal-gatal, salesma, dan sesak napas. Penelitian dr. Regina juga membuktikan bahwa mahkota dewa dapat memacu kerja otot rahim sehingga persalinan berjalan lebih lancar.

Tanaman mahkota dewa kaya akan kandungan bahan kimia aktif. Daun dan kulit buah mahkota dewa mengandung alkaloid, saponin, dan flavonoid

(Siswono, 2001). Sedangkan berdasarkan penelitian Mursiti, ekstrak kloroform biji buah mahkota dewa mengandung alkaloid dan terpenoid.

Flavonoid merupakan kelompok antioksidan polifenol yang dapat mengikat radikal bebas dalam tubuh dan membentuk radikal fenoksil. Antioksidan dapat mempertahankan tubuh dari penyakit-penyakit seperti kardiovaskuler, disfungsi otak, penurunan kekebalan tubuh dan juga penuaan (Pietta, 1996). Selain itu antioksidan juga dapat menekan peroksidasi lemak dalam jaringan tubuh dan subseluler seperti mitokondria, mikrosom, liposom, dan membran eritrosit (Yang, 2001).

Ekstraksi flavonoid dari jaringan tumbuhan kering dilakukan dengan ekstraksi sinambung serbuk bahan dengan alat sokhlet dengan menggunakan sederet pelarut yang berbeda kepolarannya secara berganti-ganti (Harborne, 1987). Cara lain adalah dengan merendam serbuk bahan yang dilakukan dengan dua tahap yaitu dengan campuran pelarut MeOH:H₂O (9:1) dan MeOH:H₂O (1:1) selama 6-12 jam (Markham, 1988).

Pemisahan dan pemurnian kandungan tumbuhan terutama dilakukan dengan menggunakan salah satu dari empat teknik kromatografi atau gabungan teknik tersebut. Keempat teknik tersebut adalah kromatografi kertas, kromatografi lapis tipis, kromatografi gas cair, dan kromatografi cair kinerja tinggi (Harborne, 1987).

Analisis pendahuluan ekstrak tumbuhan untuk menguji adanya flavonoid dilakukan dengan menggunakan kromatografi kertas, sedangkan pemisahan dilakukan dengan kromatografi dua dimensi. Informasi awal tentang struktur

flavonoid dari data kromatografi kertas dapat dilakukan dengan sinar UV dan dengan menggunakan pereaksi warna. Harga R_f juga merupakan nilai yang penting untuk penentuan awal struktur flavonoid (Markham, 1988).

Analisis flavonoid dapat dilakukan lebih cepat, kepekaan tinggi dan hanya memerlukan bahan yang sedikit dengan menggunakan kromatografi lapis tipis. Kromatografi lapis tipis juga berguna untuk mencari pelarut yang sesuai untuk kromatografi kolom dan untuk menganalisis fraksi hasil isolasi dari kromatografi kolom (Markham, 1988). Identifikasi struktur flavonoid dilakukan dengan menggunakan metode spektroskopi UV-Vis, IR, MS, dan NMR. Dengan menggunakan metode ini dapat dilakukan analisis kualitatif maupun kuantitatif (Harborne, 1987).

Penelitian Primsa (2002) membuktikan bahwa ekstrak air daging buah mahkota dewa menghasilkan efek hipoglikemik sehingga dapat digunakan untuk mengobati penyakit diabetes melitus. Sedangkan penelitian Mursiti (2002) membuktikan bahwa hasil fraksinasi ekstrak kloroform biji buah mahkota dewa mempunyai aktivitas antikanker. Berdasarkan penelitian Pratiwi (2002), ekstrak kloroform, metanol, dan air daun mahkota dewa mempunyai aktivitas antikanker. Ekstrak yang paling aktif adalah ekstrak kloroform. Identifikasi senyawa kimia dalam ekstrak kloroform ini menunjukkan hasil positif untuk terpenoid dan negatif untuk flavonoid dan alkaloid.

BAB III

DASAR TEORI

3.1 Tanaman Mahkota Dewa

Tanaman mahkota dewa banyak mempunyai nama sinonim. *Phaleria papuana* Warb. Var. *Wichanii* (val.) Back adalah nama yang diberikan berdasarkan tempat asalnya. Sedangkan *Phaleria macrocarpa* (Scheff.) Boerl. adalah nama yang diberikan berdasarkan ukuran buahnya yang besar-besar.

Klasifikasi tanaman mahkota dewa adalah sebagai berikut :

Divisi	: Spermatophyta
Sub divisi	: Angiospermae
Kelas	: Dicotylodoneae
Bangsa	: Thymelacales
Suku	: Thymelaeaceae
Marga	: Phaleria
Jenis	: <i>Phaleria macrocarpa</i> (Scheff.) Boerl.

Mahkota dewa mempunyai nama lain yang berbeda-beda di berbagai daerah. Orang Jawa Tengah menyebut mahkota dewa sebagai *makuto mewe*, *makuto rojo*, atau *makuto ratu*. Orang Banten menyebutnya raja obat karena tanaman ini terbukti mampu menyembuhkan aneka macam penyakit. Sementara orang Cina menamainya *pau* yang berarti obat pusaka. Bahasa Inggris mempunyai sebutan sendiri yaitu *The Crown of God*.

Tanaman mahkota dewa termasuk jenis perdu. Ketinggiannya sekitar 1,5 – 2,5 m dan jika dibiarkan dapat mencapai 5 m. Mahkota dewa dapat hidup sampai puluhan tahun. Pohon mahkota dewa terdiri dari akar, batang, daun, bunga, dan buah. Akar berupa akar tunggang dengan panjang mencapai 100 cm. Batangnya terdiri dari kulit dan kayu dimana kulitnya berwarna coklat kehijauan dan kayunya berwarna putih. Diameter batang dapat mencapai 15 cm. Daun mahkota dewa merupakan daun tunggal dengan bentuk lonjong langsing memanjang berujung lancip. Warna daun hijau dengan permukaan licin dan tidak berbulu. Panjang daun dapat mencapai 7 – 10 cm sedangkan lebarnya 3 – 5 cm.

Bunga mahkota dewa berwarna putih, berbentuk terompet kecil dan berbau harum. Bunga mahkota dewa merupakan bunga majemuk yang tersusun dalam 2 – 4 bunga dan pertumbuhannya di batang dan ketiak daun. Buah mahkota dewa merupakan ciri khas dari tanaman mahkota dewa dengan bentuk bulat dan warna merah menyala. Permukaan buah licin dengan ukuran buah bervariasi dari sebesar bola pingpong sampai sebesar apel merah. Buah mahkota dewa terdiri dari kulit, daging, cangkang, dan biji. Kulit buah muda berwarna hijau dengan ketebalan sekitar 0,5 – 1 mm. Daging, cangkang, dan biji berwarna putih.

Tanaman mahkota dewa dapat hidup baik di dataran rendah maupun di dataran tinggi, yaitu pada ketinggian 10 – 1200 dpl (dari permukaan laut). Perbanyakan tanaman ini dapat dilakukan secara generatif maupun vegetatif. Perbanyakan secara generatif dilakukan dengan menggunakan biji, sedangkan perbanyakan secara vegetatif dilakukan dengan pencangkakan. Tanaman mahkota dewa dapat ditanam di pekarangan atau pot.

3.2 Flavonoid

Kira-kira 2 % dari seluruh karbon yang difotosintesis oleh tumbuhan (kira-kira 1×10^9 ton/tahun) diubah menjadi flavonoid atau senyawa yang berkaitan erat dengannya (Markham, 1988). Flavonoid merupakan golongan fenol alam terbesar. Flavonoid mencakup banyak pigmen dan terdapat pada seluruh dunia tumbuhan dari fungus sampai angiospermae (Robinson, 1995). Penyebaran flavonoid pada dunia tumbuhan ditunjukkan pada tabel 1.

Tabel 1. Penyebaran flavonoid pada dunia tumbuhan

Divisi	Nama Umum	Flavonoid yang ditemukan
Prokariotik		
Sizofita	Bakteria	Tidak ada
Sianofita	Alga hijau-biru	Tidak ada
Eukariotik		
Klorofita	Alga hijau	Tidak ada
	Lumut batu (Charophyceae)	C-glikosida flavon (jarang, <i>Nitella</i>)
Feofita	Alga coklat	Tidak ada
Rodofita	Alga merah	Dihidrikhalkon (jarang, <i>Phallus</i>); flavon tak lazim (jarang, <i>Aspergillus</i>)
Fungus	Fungus	
	Lumut kerak	Tidak ada
	Lumut hati	^a C- dan O-glikosida flavon
Briofita		O-glikosida flavonol (jarang)
		O-glikosida flavanon (jarang, <i>Riccia</i>)
		O-glikosida auron (jarang)
		C-glikosida dihidrokhalkon (jarang? <i>Hymenophyton</i>)
	Lumut	(O-glikosida flavonol?)
		Biflavon (jarang, <i>Dicranum</i>)
		Auron (jarang, <i>Funaria</i>)
		^a C-dan O-glikosida flavon
		3-deoksiantosianin
Trakeofita	Psilofita	^a Biflavon, O-glikosida
		Flavon, O-glikosida (sesepora)
		C-glikosida flavon (sesepora)

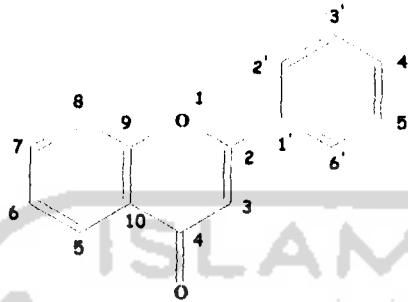
Angio spermae	Lycopodium	^a Flavon, <i>O</i> -glikosida Flavon, <i>C</i> -glikosida (langka, <i>L.cernuum</i>) Biflavon (hanya <i>Selaginella</i>)
	Ekor kuda	^a <i>O</i> -glikosida flavonol <i>O</i> -glikosida flavon Proantosianidin <i>C</i> -glikosida flavon (sesepora?) Flavanon, dihidroflavonol
	Paku	^a <i>O</i> -glikosida flavonol <i>C</i> - dan <i>O</i> -glikosida flavon (langka) 3-deoksiantosianidin Flavanon Khalkon, dihidrokhalkon Biflavon (langka, hanya <i>Osmunda</i>) Proantosianidin, antosianidin Flavon Biflavonoid Flavanon
	Gimnospermae	<i>C</i> -glikosida flavon Isoflavon (langka, mis. <i>Juniperus</i>) Proantosianidin, antosianin Flavonol, dihidroflavonol
	Angiospermae	^a Flavon dan flavonol, <i>C</i> - dan <i>O</i> - glikosida dan bisulfat Isoflavon, <i>C</i> - dan <i>O</i> -glikosida (<i>Leguminosae</i>) <i>C</i> - dan <i>O</i> -glikosida khalkon dan dihidrokhalkon Proantosianidin dan antosianin Auron, <i>O</i> -glikosida Biflavon (langka) Dihidroflavonol, <i>O</i> -glikosida

^a Yang lazim dijumpai

sumber : Markham, K.R., 1988, Cara Mengidentifikasi Flavonoid, 11-12, Penerbit ITB, Bandung

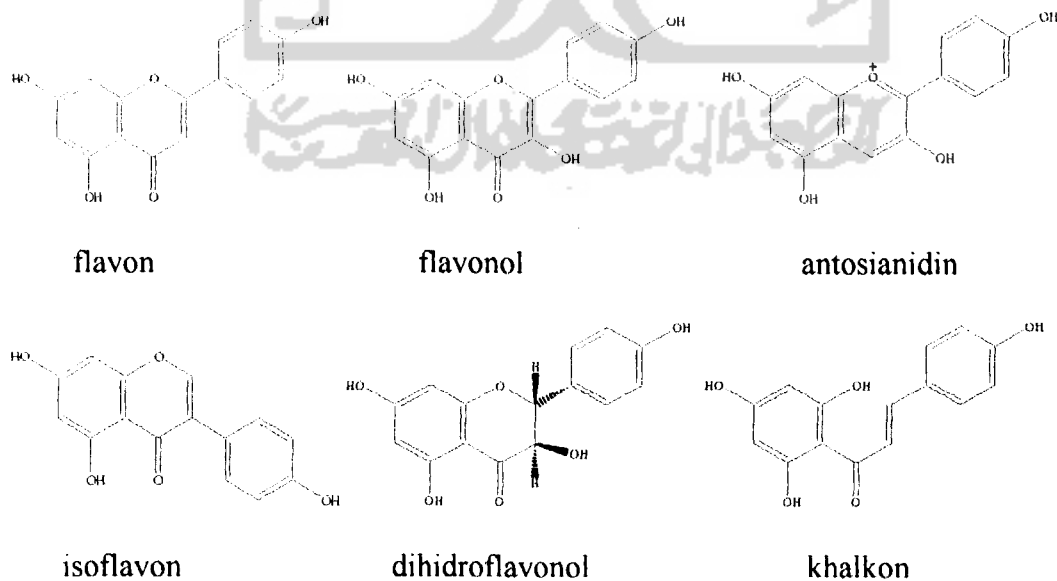
Flavonoid terdapat dalam berbagai bentuk struktur yang berbeda, tetapi inti dasarnya mengandung 15 atom C dengan susunan $C_6 - C_3 - C_6$, yaitu dua cincin aromatis yang dihubungkan oleh satuan tiga karbon yang dapat atau tidak

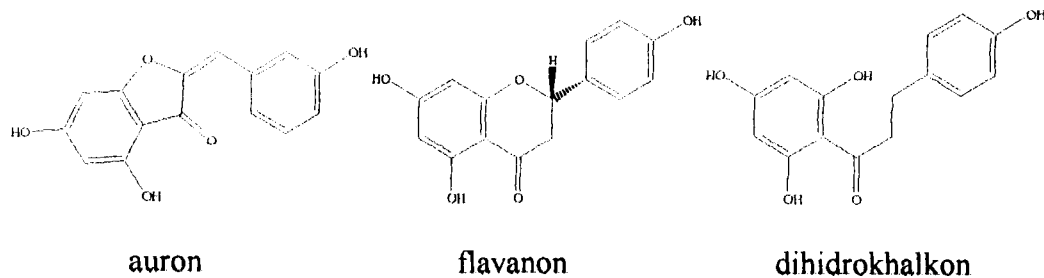
dapat membentuk cincin ketiga. Struktur dasar dan sistem penomorannya ditunjukkan pada gambar 1.



Gambar 1. Struktur dasar flavonoid (Markham, 1988)

Kelas-kelas flavonoid digolongkan berdasarkan cincin heterosiklik-oksigen tambahan dan gugus hidroksil yang tersebar menurut pola yang berlainan dan berdasarkan keragaman lain pada rantai C_3 . Kelas-kelas flavonoid tersebut adalah flavon, flavonol, antosianidin, isoflavon, dihidroflavonol, flavanon, khalkon, dan auron. Kelas-kelas flavonoid ditunjukkan pada gambar 2.





Gambar 2. Beberapa kelas flavonoid (Markham, 1988)

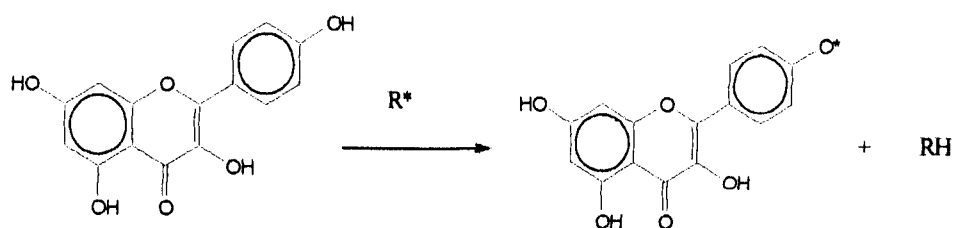
Flavonoid biasanya terdapat sebagai flavonoid *O*-glikosida, yaitu satu gugus hidroksil flavonoid (atau lebih) terikat pada satu gula (atau lebih) dengan ikatan hemiasetal yang tidak tahan asam. Glikosidasi menyebabkan flavonoid menjadi mudah larut dalam air. Gula juga dapat terikat pada atom karbon flavonoid yaitu terikat langsung pada inti benzen dengan ikatan karbon-karbon. Flavonoid ini disebut flavonoid *C*-glikosida. Flavonoid dapat berbentuk dimer yang disebut biflavonoid (Markham, 1988).

3.3 Bioaktivitas Flavonoid

Flavonoid mempunyai efek bermacam-macam pada organisme dan dapat menjelaskan mengapa tumbuhan yang mengandung flavonoid dipakai dalam pengobatan tradisional. Flavonoid mempunyai aktivitas kardiotonik, antiinflamatori, antineoplastik, antimikrobia, dan antioksidan (Narayana, 2001).

Aktivitas antioksidan flavonoid disebabkan karena flavonoid merupakan senyawa pereduksi yang baik dan menghambat banyak reaksi oksidasi. Flavonoid dapat mengikat radikal bebas dan menghasilkan radikal fenoksil.





Gambar 3. Reaksi pengikatan radikal bebas oleh flavonoid (Pietta, 1996)

Radikal bebas dalam tubuh dapat menyebabkan berbagai penyakit. Flavonoid yang termasuk dalam kelas flavonol seperti kuersetin, kaemferol, morin, mirisetin, dan rutin menunjukkan aktivitas antioksidan yaitu antiinflamatori, antialergi, antivirus, dan antikanker. Senyawa-senyawa ini dapat melindungi tubuh dari penyakit liver, katarak dan penyakit kardiovaskuler (Narayana, 2001).

3.4 Ekstraksi

Ekstraksi favonoid dari sampel bahan alam menggunakan alat yang disebut sokhlet. Ekstraksi sokhlet merupakan ekstraksi yang berlangsung secara berulang-ulang dan teratur sehingga dapat diharapkan hasil yang maksimal.

Padatan sampel dibuat menjadi serbuk. Ekstraktor sokhlet dihubungkan dengan labu, pemanas, dan pendingin. Pada saat dipanaskan pelarut dalam labu akan menguap dan akan didinginkan menjadi embun. Embun akan jatuh ke dalam sokhlet dan akan melarutkan analit dalam sampel. Setelah sokhlet penuh dengan pelarut maka pelarut akan turun kembali ke dalam labu sambil membawa analit. Peristiwa ini akan berlangsung berulang-ulang sampai semua analit yang diinginkan terpisah dari sampel padatnya.

Pelarut yang digunakan dalam ekstraksi sokhlet harus memiliki syarat-syarat sebagai berikut :

1. tidak bereaksi dengan komponen yang akan diekstrak
2. selektif, hanya melarutkan zat-zat yang diinginkan
3. titik didih rendah sehingga mudah diuapkan

3.5 Kromatografi

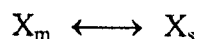
Kromatografi adalah nama umum yang diberikan untuk metode pemisahan dua komponen atau lebih dalam campuran berdasarkan distribusi komponen-komponen tersebut diantara dua fase yaitu fase tetap dan fase gerak. Berdasarkan fase tetap dan fase geraknya, kromatografi digolongkan menjadi empat jenis. Keempat jenis kromatografi tersebut ditunjukkan pada tabel 2.

Tabel 2. Jenis-jenis kromatografi

Fase tetap	Padat		Cair	
	Cair	Gas	Cair	Gas
Contoh	Kromatografi adsorpsi : Kromatografi lapis tipis, kromatografi penukar ion	Kromatografi gas-padat	Kromatografi partisi: Kromatografi kertas	Kromatografi gas-cair

Sampel dimasukkan dalam kolom atau ditotolkan pada kertas atau plat yang mengandung fase tetap. Masing-masing komponen dalam sampel akan mengalami adsorpsi dan desorpsi pada kolom tersebut dan akan mengalami perlambatan dengan tingkat yang berbeda-beda sesuai dengan daya ikat masing-masing komponen terhadap fase tetap.

Tiap-tiap komponen X akan terdistribusi antara fase tetap (s) dan fase gerak (m) dan terjadi kesetimbangan terus menerus,



Sehingga koefisien distribusi X pada kedua fase adalah

$$K_x = \frac{[X]_s}{[X]_m}$$

Nilai K_x besar menunjukkan komponen X lebih lama tinggal dalam fase tetap sehingga bergerak secara perlahan sepanjang kolom. Sebaliknya, nilai K_x kecil menunjukkan komponen X menyukai fase gerak sehingga bergerak cepat sepanjang kolom. Setiap senyawa mempunyai nilai K sendiri-sendiri sehingga dengan metode kromatografi campuran senyawa-senyawa dapat dipisahkan dengan baik.

3.5.1 Kromatografi lapis tipis

Kromatografi lapis tipis (KLT) adalah salah satu jenis kromatografi yang berbentuk planar. Fase tetapnya berupa lapisan tipis yang dilekatkan pada plat kaca atau alumunium atau plastik. Plat ini dimasukkan dalam bejana yang telah berisi fase gerak. Sampel ditempatkan pada plat dengan menggunakan injektor.

Penyerap yang paling sering digunakan dalam KLT adalah silika gel dan alumina. Fase gerak yang digunakan dalam KLT harus mempunyai kemurnian yang tinggi. Pelarut yang digunakan sebaiknya pelarut tunggal atau paling banyak campuran dari tiga pelarut.

Komponen-komponen sampel akan terpisah membentuk bercak pada plat. Tingkat pemisahan komponen dalam sampel dinyatakan dengan harga R_f .

$$R_f = \frac{\text{jarak naiknya zat}}{\text{jarak naiknya permukaan fase gerak}}$$

Harga R_f ini dapat digunakan untuk identifikasi senyawa dalam sampel karena masing-masing senyawa mempunyai harga R_f yang berbeda-beda.

Komponen-komponen sampel yang dapat berfluoresensi dapat dideteksi dengan cara menyinari plat dengan sinar UV. Cara lain adalah penyemprotan plat dengan menggunakan reagen pembentuk warna. Analisa kuantitatif dapat dilakukan dengan mengelupas/mengeruk lapisan tipis yang mengandung komponen sampel dan kemudian dilarutkan pada pelarut yang sesuai untuk selanjutnya dilakukan pengukuran kadarnya.

3.5.2 Deteksi Bercak pada KLT untuk Senyawa Flavonoid

Kebanyakan flavonoid tidak terlihat dengan mata biasa. Oleh karena itu untuk mendeteksi bercak, kromatogram diperiksa dengan menggunakan sinar UV 366 nm. Kepekaan deteksi dapat ditingkatkan dengan menguapi kromatogram yang sudah benar-benar kering dengan uap NH_3 . Penafsiran warna bercak dengan sinar UV dan uap NH_3 ditunjukkan pada tabel 3.

Tabel 3. Penafsiran warna bercak dengan UV 366 nm dan uap NH₃

Warna bercak		Jenis flavonoid yang mungkin
UV tanpa NH ₃	UV dengan NH ₃	
Lembayung gelap	Kuning, hijau-kuning, hijau	a. biasanya 5-OH flavon atau flavonol (tersulih pada 3-O dan mempunyai 4'-OH) b. kadang-kadang 5-OH flavanon dan 4'-OH khalkon tanpa OH pada cincin B
	Perubahan warna sedikit atau tanpa perubahan warna	a. Biasanya flavon atau flavonol tersulih pada 3-O mempunyai 5-OH tetapi tanpa 4'-OH bebas b. Beberapa 6- atau 8-OH flavon dan flavonol tersulih pada 3-O serta mengandung 5-OH c. Isoflavon, dihidroflavonol, biflavonil dan beberapa flavanon yang mengandung 5-OH d. Khalkon yang mengandung 2'- atau 6'-OH tetapi tidak mengandung 2- atau 4-OH bebas
	Biru muda, Merah atau jingga	Beberapa 5-OH flavanon, Khalkon yang mengandung 2- dan atau 4-OH bebas
Fluorosensi biru muda	Fluorosensi hijau-kuning atau hijau-biru	a. Flavon dan flavanon yang tidak mengandung 5-OH, misalnya 5-OH-glikosida b. Flavonol tanpa 5-OH bebas tetapi tersulih pada 3-OH
	Perubahan warna sedikit atau tanpa perubahan	Isoflavon yang tidak mengandung 5-OH bebas
	Fluorosensi murup biru muda	Isoflavon yang tak mengandung 5-OH bebas
Tak tampak	Fluorosensi biru muda	Isoflavon tanpa 5-OH
Kuning redup dan kuning, atau fluoresensi jingga	Perubahan warna sedikit atau tanpa perubahan	Flavonol yang mengandung 3-OH bebas dan mempunyai atau tak mempunyai 5-OH bebas (kadang-kadang berasal dari dihidroflavonol)

Fluorosensi kuning	Jingga atau merah	Auron yang mengandung 4'-OH bebas dan beberapa 2- atau 4-OH khalkon
Hijau-kuning, hijau-biru, atau hijau	Perubahan warna sedikit atau tanpa perubahan	a. Auron yang tak mengandung 4'-OH bebas dan flavanon tanpa 5-OH bebas b. Flavonol yang mengandung 3-OH bebas dan disertai atau tanpa 5-OH bebas
Merah jingga redup atau merah senduduk	Biru	Antosianidin 3-glikosida
Merah jambu atau fluorosensi kuning	Biru	Sebagian besar antosianidin 3,5-diglikosida

sumber : Markham, K.R., 1988, Cara Mengidentifikasi Flavonoid, 11-12, Penerbit ITB, Bandung

Selain dengan sinar UV, bercak dapat dideteksi dengan menyemprot kromatogram dengan pereaksi yang dapat menimbulkan warna. Penggunaan pereaksi semprot dapat meningkatkan kepekaan deteksi bercak flavonoid terutama untuk sampel yang jumlahnya sedikit. Reagen yang sering digunakan untuk uji warna flavonoid adalah $AlCl_3$, $FeCl_3$, $NaOH$, asam sulfat pekat, Na_2CO_3 , $NaBH_4$, magnesium/ HCl .

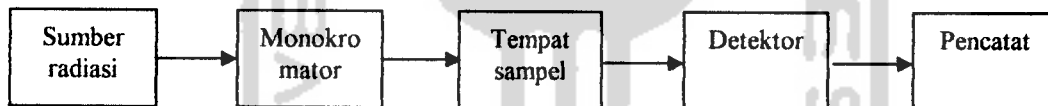
3.6 Spektroskopi UV-Vis

3.6.1 Instrumentasi

Spektroskopi adalah suatu metode analisis yang berdasarkan interaksi antara radiasi gelombang elektromagnetik dengan molekul sampel. Spektrum elektromagnetik dikelompokkan berdasarkan pada sifat dan panjang gelombangnya. Spektrum sinar UV terletak pada panjang gelombang 10 – 380 nm. Sedangkan spektrum sinar tampak terletak antara 380 – 780 nm.

Jika suatu molekul dikenai radiasi UV-Vis maka energi yang disumbangkan oleh foton-foton memungkinkan elektron mengatasi kekangan inti dan pindah ke orbital baru yang lebih tinggi energinya (Underwood, 1996). Setiap molekul akan menyerap energi yang berbeda-beda sehingga spektrum absorpsinya dapat digunakan untuk analisa kualitatif. Sedangkan jumlah radiasi yang diabsorpsi sebanding dengan jumlah molekul sehingga spektra absorpsinya dapat digunakan untuk analisa kuantitatif.

Instrumen spektroskopi terdiri dari lima komponen dasar yaitu, sumber radiasi yang stabil, monokromator, tempat sampel, detektor dan pencatat. Kelima komponen ini dirangkai seperti gambar 4.



Gambar 4. Diagram spektrofotometer UV-Vis

Sumber harus dapat menghasilkan pancaran radiasi dengan kekuatan yang cukup untuk dideteksi dan diukur. Radiasi ini juga harus stabil untuk jangka waktu yang cukup lama. Sumber radiasi yang ideal harus menghasilkan spektrum kontinyu dengan intensitas yang seragam. Sumber radiasi UV yang sering digunakan adalah lampu hidrogen dan lampu deuterium yang dapat menghasilkan radiasi kontinyu dalam daerah antara 180 nm sampai 350 nm. Sumber radiasi UV lain adalah lampu xenon, tetapi lampu ini kurang stabil. Sedangkan sumber radiasi tampak biasanya adalah lampu filamen tungsten yang dapat mengasilkan radiasi kontinyu dalam daerah antara 350 nm sampai 2500 nm.

Monokromator merupakan penyeleksi panjang gelombang yang dapat mengubah radiasi polikromatik menjadi monokromatik. Monokromator merupakan serangkaian alat optik yang menguraikan radiasi polikromatik menjadi panjang gelombang tunggalnya dan memisahkan panjang gelombang tersebut menjadi jalur-jalur yang sempit.

Sampel yang akan dipelajari ditempatkan di dalam suatu sel/cuvet. Untuk sampel larutan, sel dapat berukuran antara 1 sampai 10 nm. Sebelum dipakai cuvet harus dibersihkan terlebih dahulu.

Detektor berfungsi untuk menyerap tenaga foton yang mengenainya dan mengubahnya sehingga dapat diukur secara kuantitatif seperti arus listrik atau perubahan panas. Detektor yang sering dipakai dalam spektrofotometer UV-Vis adalah detektor fotolistrik. Kebanyakan detektor menghasilkan sinyal listrik yang dapat mengaktifkan pencatat.

3.6.2 Identifikasi flavonoid dengan spektrofotometer UV-Vis

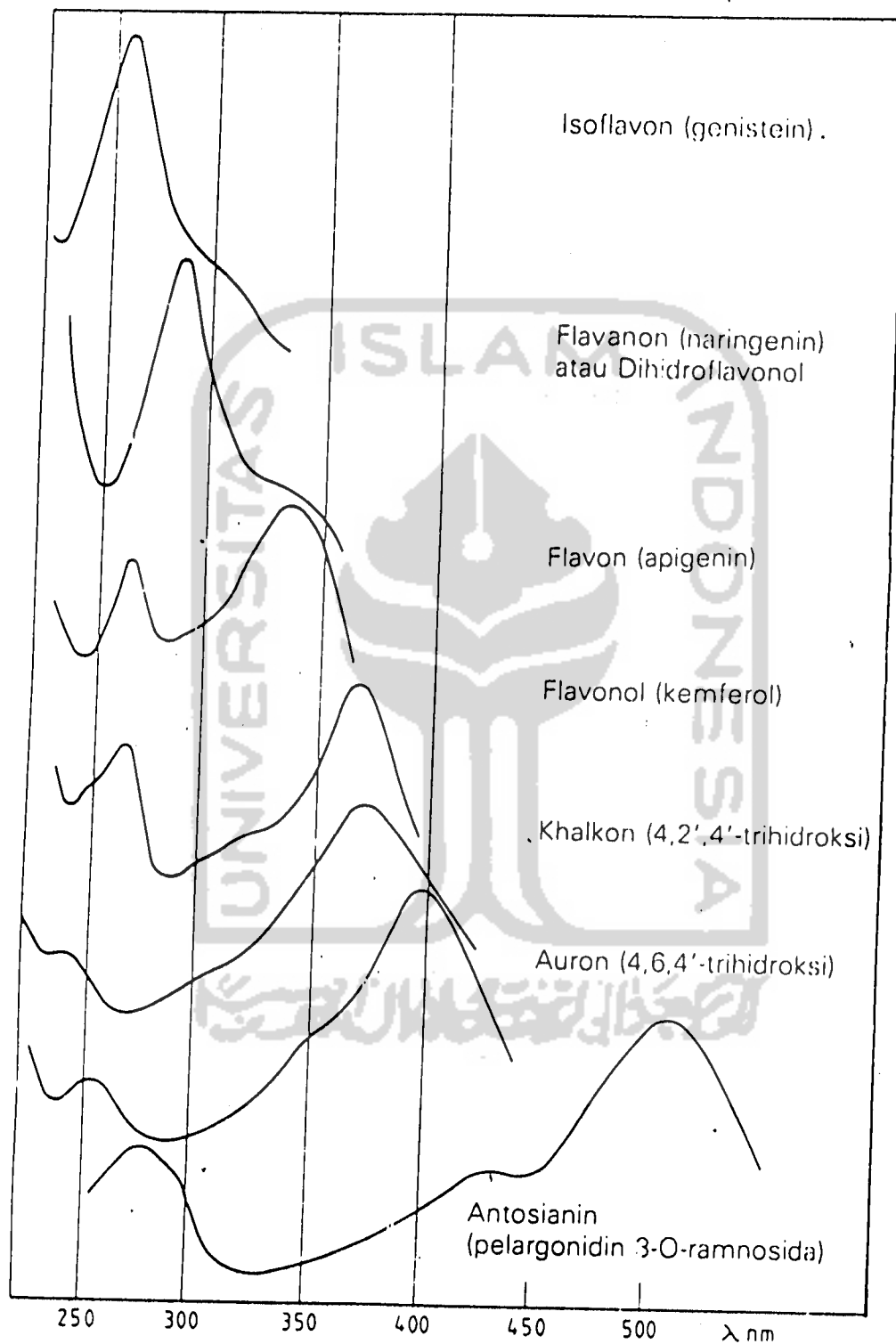
Spektrofotometer UV-Vis dapat digunakan untuk membantu mengidentifikasi jenis flavonoid dan menentukan pola oksigenasinya. Spektrum flavonoid biasanya ditentukan dalam larutan metanol. Spektrum khas untuk flavonoid terdiri atas dua maksimal pada rentang 240-285 nm (pita II) dan 300-550 nm (pita I). Rentang serapan UV-Vis ditunjukkan pada tabel 4, sedangkan spektrum khas untuk berbagai kelas flavonoid dapat dilihat pada gambar 5.

Tabel 4. Rentang 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 dioksidasi)
275-295	300-330 bahu	Flavanon dan dihidroflavonol
230-270 (kekuatan rendah)	340-390	Khalkon
230-270 (kekuatan rendah)	380-430	Auron
270-280	465-560	Antosianodin dan antosianin

sumber : Markham, K.R., 1988, Cara Mengidentifikasi Flavonoid, 39, Penerbit ITB, Bandung

Kedudukan gugus hidroksil fenol bebas pada inti flavonoid dapat ditentukan dengan menambahkan pereaksi geser ke dalam sampel dan mengamati pergeseran puncak serapan. Ada dua jenis pergeseran yaitu pergeseran batokromik atau pergeseran merah dan pergeseran hipsokromik atau pergeseran biru. Pergeseran batokromik adalah pergeseran serapan ke arah panjang gelombang yang lebih panjang. Pergeseran hipsokromik adalah pergeseran ke arah panjang gelombang yang lebih pendek. Identifikasi struktur juga dapat dilakukan dengan menafsirkan ada tidaknya perubahan intensitas. Efek hipokromik adalah efek yang menyebabkan penurunan intensitas serapan sedangkan efek hiperkromik adalah efek yang menyebabkan kenaikan intensitas serapan. Pereaksi geser yang sering digunakan adalah NaOMe, NaOAc, HCl, dan H₃BO₄. Penafsiran spektrum berbagai pereaksi geser tersebut dapat dilihat pada tabel 6, 7, 8, dan 9.



Gambar 5. Spektrum khas berbagai jenis flavonoid

Tabel 5. Penafsiran spektrum NaOMe

Jenis Flavonoid	Pergeseran yang tampak		Petunjuk penafsiran
	Pita I	Pita II	
Flavon Flavonol	Kekuatan menurun terus (artinya penguraian)		3,4'-OH, <i>o</i> -diOH pada cincin A; pada cincin B: 3 OH yang berdampingan
	Mantap + 45 sampai 65 nm, kekuatan tidak menurun		4'-OH
	Mantap + 45 sampai 65 nm Kekuatan menurun		3-OH, tak ada 4'-OH bebas
		Pita baru (bandingkan dengan MeOH), 320-335 nm	7-OH
Isoflavon Flavanon Dihidroflavonol		Tak ada pergeseran	Tak ada OH pada cincin A
		Kekuatan menurun dengan berjalannya waktu	<i>o</i> -diOH pada cincin A (penurunan lambat : <i>o</i> -di-OH pada cincin B isoflavon)
		Bergeser dari k (kira-kira).280 nm ke k.325 nm, kekuatan naik tetapi ke 330-340	Flavanon dan dihidroflavonol dengan 5,7,-OH 7-OH, tanpa 5-OH bebas
Khalkon Auron	+ 80 sampai 95 nm (kekuatan naik)		4'-OH (auron)
	+60 sampai 70 nm (kekuatan naik) pergeseran lebih kecil		6-OH tanpa oksigenasi pada 4' (auron) 6-OH dengan oksigenasi pada 4' (auron)
	+ 60 sampai 100 nm (kekuatan naik) (tanpa kenaikan kekuatan) + 40 sampai 50 nm		4-OH (khalkon) 2-OH atau 4'- OH dan tanpa 4-OH 4'-OH (2'-OH atau 4-OR juga ada)
Antosianidin Antosianin	Semuanya terurai kecuali 3-deoksiantosianidin		Nihil

sumber : Markham, K.R. 1988, Cara Mengidentifikasi Flavonoid, Penerbit ITB I

Tabel 6. Penafsiran spektrum $AlCl_3$ dan $AlCl_3/HCl$

Jenis Flavonoid	Pergeseran yang tampak		Petunjuk penafsiran
	Pita I	Pita II	
Flavon dan flavonol ($AlCl_3/HCl$) nisbi terhadap MeOH ($AlCl_3$)	+ 35 sampai 55 nm + 17 sampai 20 nm Tak berubah + 50 sampai 60 Pergeseran $AlCl_3/HCl$ tambah 30 sampai 40 nm Pergeseran $AlCl_3/HCl$ tambah 20 sampai 25 nm		5-OH 5-OH dengan oksigenasi pada 6 mungkin 5-OH dengan gugus prenil pada 6 mungkin 3-OH (dengan atau tanpa 5-OH) <i>o</i> -diOH pada cincin B <i>o</i> -diOH pada cincin A (tambahan pada pergeseran <i>o</i> -diOH pada cincin B)
Isoflavon, flavanon, dan dihidroflavonol ($AlCl_3/HCl$) ($AlCl_3$)		+10 sampai 14 nm +20 sampai 26 nm Pergeseran $AlCl_3/HCl$ tambah 11 sampai 30 nm Pergeseran $AlCl_3/HCl$ tambah 30 sampai 38 nm (peka terhadap NaOAc)	5-OH isoflavon 5-OH (flavanonon, dihidroflavonol) <i>o</i> -diOH pada cincin A (6,7 dan 7,8) Dihidroflanonol tanpa 5-OH (tambahan pada sembarang pergeseran <i>o</i> -diOH)
Auron Khakon ($AlCl_3/HCl$) ($AlCl_3$)	+48 sampai 64 nm +40 nm +60 sampai 70 nm Pergeseran $AlCl_3/HCl$ tambah 40 sampai 70 nm Penambahan lebih kecil		2'-OH (khalkon) 2'-OH (khalkon) dengan oksigenasi 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 sampai 35 nm (pada pH 2-4) Pergeseran lebih besar		<i>o</i> -diOH Banyak <i>o</i> -diOH atau <i>o</i> -diOH (3-deoksiantosianidin)

sumber : Markham, K.R. 1988, Cara Mengidentifikasi Flavonoid, Penerbit ITB

Tabel 7. Penafsiran spektrum NaOAc

Jenis Flavonoid	Pergeseran yang tampak		Petunjuk penafsiran
	Pita I	Pita II	
Flavon Flavonol Isoflavon		+5 sampai 20 nm (berkurang bila ada oksigenasi pada 6 atau 8)	7-OH
	Kekuatan berkurang dengan bertambahnya waktu		Gugus yang peka terhadap basa, misalnya 6,7 atau 7,8 atau 3,4'- diOH
Flavanon Dihidroflavonol		+35 nm +60 nm	7-OH (dengan 5-OH) 7-OH tanpa 5-OH gugus yang peka terhadap basa misal 6,7 atau 7,8-diOH
Khalkon Auron	Pergeseran batokrom atau bahu pada panjang gelombang yang lebih panjang		4' dan/atau 4-OH (khalkon) 4'-dan atau 6-OH (auron)

sumber : Markham, K.R. 1988, Cara Mengidentifikasi Flavonoid, 44-45, Penerbit ITB,Bandung

Tabel 8. Penafsiran spektrum NaOAc/H₃BO₃

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

sumber : Markham, K.R. 1988, Cara Mengidentifikasi Flavonoid, 44-45, Penerbit ITB,Bandung

Keuntungan penggunaan spektrofotometer UV-Vis adalah sangat sedikit jumlah flavonoid yang diperlukan untuk analisa struktur flavonoid, yaitu hanya sekitar 0,1 mg. Karena jumlah yang sedikit ini, maka pemisahan atau isolasi flavonoid cukup dilakukan dengan kromatografi preparatif. Analisa biasanya dilakukan dengan membuat larutan persediaan yang mengandung 0,1 mg flavonoid dalam 10 mL metanol p.a. Larutan ini kemudian diencerkan sesuai kebutuhan dan sampai dihasilkan spektrum dengan puncak serapan yang baik.

3.7 Hipotesis

Dari penelitian-penelitian terdahulu dan teori yang ada dapat dibuat hipotesis bahwa senyawa flavonoid yang terdapat dalam ekstrak metanol daun mahkota dewa adalah flavon atau flavonol dan strukturnya dapat diidentifikasi dengan menggunakan metode Spektrofotometer UV-Vis.

BAB IV
METODOLOGI PENELITIAN

5.1 Alat dan Bahan

5.1.1 Alat

1. Alat penggiling
2. Pemanas air
3. Satu set alat sokhlet
4. Alat gelas
5. Plat KLT kresgel 60 F 254
6. Pipet mikro
7. Lampu UV 366 nm
8. Spektrofotometer UV-Vis Hitachi U-2010

5.1.2 Bahan

1. Serbuk daun mahkota dewa
2. n-heksana, C_6H_{14} p.a, E Merck
3. Metanol 80 %, (80 % metanol : 20 % akuades v/v)
4. Metanol, CH_3OH p.a, 99,8 %, E Merck
5. Etil Asetat, $CH_3COOC_2H_5$ p.a, E Merck
6. Akuades
7. Kertas saring
8. Kertas Whatman No. 41
9. Butanol, C_4H_9OH , 99,5 %, E Merck

10. Amoniak, NH_3 , 25 %, E Merck
11. Alumunium Klorida, AlCl_3 p.a, E Merck
12. Natrium Hidroksida, NaOH p.a, 99 %, E Merck
13. Asam Klorida, HCl , 37 %
14. Natrium Asetat, NaOAc , E Merck
15. Asam Borat, H_3BO_3 , E Merck
16. Asam Asetat, CH_3COOH , 99,8 %, E Merck

5.2 Sampel

Sampel yang digunakan adalah daun mahkota dewa yang sudah tua, yaitu yang berwarna hijau tua. Daun dipetik langsung dari pohonnya yang tumbuh di daerah Srandakan, Bantul.

5.3 Cara Kerja

5.3.1 Preparasi sampel

Daun mahkota dewa dikeringkan menggunakan sinar matahari. Kemudian digiling dan diayak. Diperoleh serbuk daun mahkota dewa.

5.3.2 Ekstraksi flavonoid

Sebanyak 30 gram serbuk daun dibungkus dengan menggunakan kertas saring dan kemudian dimasukkan ke dalam alat sokhlet. Ekstraksi dilakukan kurang lebih selama 7 jam dengan menggunakan 150 ml n-heksana untuk menghilangkan lemak. Residu didiamkan semalam dan diekstrak lagi dengan metanol sebanyak 150 mL. Ekstrak metanol dipekatkan dengan kipas angin.

5.3.3 Penentuan eluen melalui KLT

Ekstrak metanol diencerkan kemudian ditotolkan pada plat KLT dengan menggunakan pipet mikro. Plat KLT dibiarkan di udara terbuka untuk menghilangkan pelarut. Plat KLT dimasukkan dalam bejana pengembang dan dielusi. Plat diangkat dan dikeringkan di udara terbuka untuk menghilangkan pelarut. Jumlah bercak diamati dengan menggunakan cahaya tampak dan sinar UV 366 nm. Bercak ditandai dengan pensil. Elusi diulangi lagi dengan menggunakan variasi eluen yang berbeda-beda. Eluen terbaik adalah yang dapat menghasilkan noda terbanyak dan pemisahan yang terbaik.

5.3.4 Uji warna flavonoid dengan uap NH_3

Uji warna dengan uap NH_3 dilakukan dengan suatu pembanding. Pengembangan sanpel dengan eluen terbaik dilakukan dua kali. Kromatogram pertama tidak diuapi dengan NH_3 , sedangkan kromatogram kedua diuapi dengan NH_3 . Perubahan warna noda diamati dengan membandingkan keduanya dibawah lampu UV 366 nm.

5.3.5 Uji kemurnian flavonoid dengan kromatografi dua dimensi

Noda yang diperoleh dari pengembangan dengan eluen terbaik diuji kemurniannya dengan kromatografi dua dimensi. Plat KLT dipotong dengan ukuran 5 x 5 cm. Sampel ditotolkan pada pojok kiri plat. Pengembangan pertama dilakukan dengan eluen terbaik. Setelah sampai batas atas, plat dikeringkan dan dibalik sehingga noda-noda yang terpisah oleh eluen pertama berada di bawah. Plat dimasukkan dalam bejana yang telah berisi eluen kedua yaitu asam asetat 15 %. Noda yang terpisah dilihat dibawah lampu UV 366 nm.

5.3.6. Pemisahan flavonoid dengan kromatografi preparatif

Noda-noda dipisahkan dengan menggunakan kromatografi preparatif. Plat dipotong dengan ukuran 6 x 10 cm sebanyak 6 buah atau sesuai kebutuhan. Sampel diaplikasikan pada plat dengan bentuk pita. Sampel dikembangkan dengan menggunakan eluen terbaik. Masing-masing noda yang terlihat dibawah lampu UV 366 nm dipisahkan dengan mengerok lapisan plat dan kemudian dilarutkan dengan metanol p.a. Larutan kemudian disaring dengan kertas Whatman No 41 untuk memisahkan lapisan silikanya. Larutan ini digunakan sebagai larutan induk untuk selanjutnya dianalisis dengan Spektrofotometer UV-Vis.

5.3.7 Identifikasi flavonoid dengan spektrofotometer UV-Vis

Larutan masing-masing noda atau fraksi dianalisis dengan Spektrofotometer UV-Vis dengan daerah panjang gelombang antara 200-400 nm. Pengukuran spektrum UV-Vis melalui tahap-tahap sebagai berikut :

Tahap 1

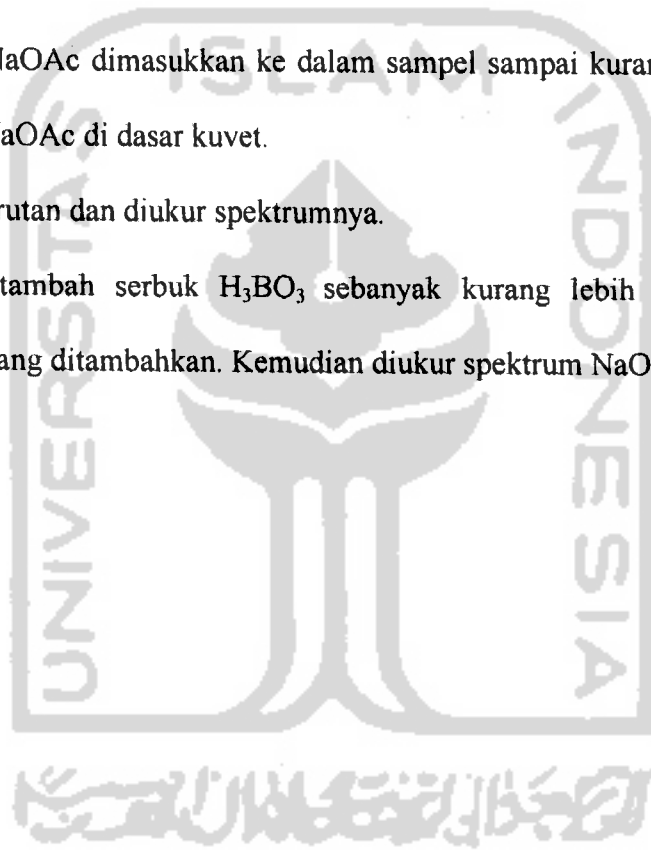
1. Sebanyak 2-3 ml sampel dalam metanol dimasukkan dalam kuvet dan bersama-sama dengan metanol murni diukur spektrumnya sebagai pembanding.
2. Dalam sampel ditambah 3 tetes pereaksi geser NaOH 2 M dan diukur spektrumnya dan setelah 5 menit diukur kembali.

Tahap 2

1. Sampel diukur spektrumnya dan kemudian ditambah pereaksi geser AlCl_3 sebanyak 6 tetes. Diukur spektrumnya.
2. Dalam kuvet ditambahkan HCl dan diukur spektrum AlCl_3/HCl .

Tahap 3

1. Serbuk NaOAc dimasukkan ke dalam sampel sampai kurang lebih 2 mm lapisan NaOAc di dasar kuvet.
2. Kocok larutan dan diukur spektrumnya.
3. Kuvet ditambah serbuk H_3BO_3 sebanyak kurang lebih setengah dari NaOAc yang ditambahkan. Kemudian diukur spektrum $\text{NaOAc}/\text{H}_3\text{BO}_3$



BAB V

HASIL DAN PEMBAHASAN

5.1 Preparasi Sampel

Penelitian tentang identifikasi senyawa flavonoid dalam ekstrak metanol daun mahkota dewa meliputi beberapa tahap. Tahap awal penelitian ini adalah preparasi sampel. Sebelum sejumlah sampel daun diambil dari pohonnya, harus dipastikan terlebih dahulu bahwa tanaman tersebut benar-benar tanaman mahkota dewa atau *Phaleria macrocarpa* untuk menghindari kesalahan penyebutan nama yang sama pada dua jenis tanaman yang berbeda. Hal ini dapat dilakukan dengan penelusuran tanaman atau mencocokkannya dengan referensi yang ada melalui gambar dan ciri-ciri tanaman tersebut. Tanaman mahkota dewa mempunyai ciri-ciri yang khas dan mudah dikenali karena buahnya yang mempunyai bentuk seperti apel dan berwarna merah.

Daun mahkota dewa yang diambil sebagai sampel adalah daun yang sudah tua yaitu daun yang berwarna hijau tua. Selain itu daun yang diambil sebagai sampel harus berupa daun yang sehat, karena perubahan senyawa-senyawa kimia oleh mikroorganisme dimungkinkan terjadi pada daun yang tidak sehat.

Daun segar dicuci terlebih dahulu untuk menghilangkan partikel debu kemudian segera dikeringkan dibawah sinar matahari. Daun yang sudah kering tersebut digiling menjadi serbuk halus dan disimpan untuk perlakuan selanjutnya. Penelitian tentang identifikasi senyawa alam idealnya menggunakan sampel yang

Penelitian tentang identifikasi senyawa alam idealnya menggunakan sampel yang masih segar untuk mengurangi resiko perubahan komposisi senyawa akibat pengeringan. Penggunaan sampel segar kurang praktis karena sampel harus diambil sesaat sebelum dilakukan suatu perlakuan. Sedangkan sampel yang sudah dikeringkan dapat bertahan dalam jangka waktu yang cukup lama karena proses pengeringan menghilangkan kandungan air yang merupakan syarat pertumbuhan mikroorganisme. Senyawa flavonoid cukup stabil dan telah dibuktikan bahwa sampel herbarium yang telah disimpan bertahun-tahun masih dapat digunakan untuk menganalisa flavonoid (Harborne, 1987). Dengan demikian proses pengeringan tidak mempengaruhi analisa flavonoid. Dibawah ini adalah data sampel daun mahkota dewa.

Tabel 9. Data sampel daun mahkota dewa

Sampel daun mahkota dewa	Warna	Berat
Basah	Hijau tua	200 gr
Kering	Hijau pupus	72 gr

5.2 Ekstraksi Flavonoid dari Sampel Daun Mahkota Dewa

Flavonoid diambil dari sampel daun mahkota dewa dengan menggunakan metode sokhletasi. Seperangkat alat sokhlet terdiri dari kompor listrik, penangas, labu alas bulat, sokhlet dan pendingin. Semua alat ini dirangkai. Daun mahkota dewa dihaluskan terlebih dahulu dengan cara digiling menjadi serbuk halus. Sampel yang sudah dihaluskan akan mempunyai luas permukaan yang lebih besar. Luas permukaan sampel mempengaruhi hasil ekstraksi dimana ekstraksi terhadap

sampel halus lebih optimal dibanding sampel dengan ukuran besar.

Daun yang sudah dihaluskan kemudian dibungkus dengan kertas saring. Penggunaan kertas saring ini bertujuan untuk memudahkan pengambilan residu dari sokhlet dan mencegah serbuk sampel masuk ke dalam pipa kapiler sehingga sulit untuk dibersihkan. Selain itu, penggunaan kertas saring untuk membungkus serbuk sampel juga merupakan cara yang praktis, karena setelah ekstraksi kita langsung mendapatkan ekstrak yang tidak perlu disaring lagi.

Bungkusan serbuk daun kemudian dimasukkan ke dalam sokhlet dimana tinggi sampel tidak boleh melebihi tinggi pipa kapiler. Jika tinggi sampel melebihi tinggi pipa kapiler maka ekstraksi menjadi tidak optimal karena sampel yang terletak di atas pipa kapiler tidak terendam oleh pelarut. Oleh karena itu, sebelum membungkus sampel dengan kertas saring perlu diperkirakan tinggi sampel agar tidak melebihi tinggi pipa kapiler.

Setelah sampel dimasukkan kemudian pelarut juga dimasukkan ke dalam sokhlet sampai pelarut turun ke dalam labu alas bulat. Setelah dipanaskan dan mendidih pelarut akan menguap dan naik ke atas sampai ke pendingin balik. Di dalam pendingin uap mengembun dan menetes ke dalam sokhlet. Tetesan-tetesan pelarut ini merendam serbuk sampel sampai mencapai tinggi pipa kapiler, kemudian pelarut turun ke dalam labu alas bulat sambil membawa senyawa-senyawa yang larut padanya dan memisahkannya dari residu. Pelarut kemudian menguap lagi sedangkan analit tetap tinggal di dalam labu. Proses diatas berlangsung berulang-ulang oleh karena itu sokhletasi disebut juga ekstraksi sinambung.

Ekstraksi terhadap daun mahkota dewa dilakukan melalui dua tahap, yaitu ekstraksi dengan menggunakan pelarut n-heksana dan dilanjutkan dengan menggunakan pelarut metanol. Kedua pelarut ini merupakan pelarut organik yang mempunyai titik didih rendah, yaitu 69 °C untuk n-heksana dan 64 °C untuk metanol. Oleh karena itu pemanasan cukup dilakukan dengan penangas air. Ekstraksi ini dilakukan selama kurang lebih 5 jam atau sampai ekstrak yang menetes berwarna cukup bening. Batu didih ditambahkan ke dalam labu pada saat pemanasan. Hal ini dimaksudkan untuk mencegah terjadinya *bumping* dan mengurangi resiko kecelakaan. Pelarut n-heksana merupakan pelarut non polar sehingga akan melarutkan senyawa-senyawa yang bersifat non polar, seperti lemak, terpenoid, klorofil, xantofil, dan lain-lain. Senyawa-senyawa non polar ini terutama lemak dan klorofil yang banyak terdapat dalam daun dipisahkan terlebih dahulu dari sampel, baru kemudian residunya diekstrak kembali dengan pelarut yang lebih polar yaitu metanol 80 %. Flavonoid umumnya merupakan senyawa polar karena mempunyai sejumlah gugus hidroksil yang tidak tersulih atau suatu gula yang terikat padanya. Oleh karena itu flavonoid umumnya larut dalam pelarut polar seperti metanol.

Sebanyak 30 gram serbuk daun mahkota dewa diekstrak dengan 150 mL n-heksana. Kemudian residu diekstrak kembali dengan metanol 80 % sebanyak 150 mL. Ekstrak n-heksana berwarna biru tua sedangkan ekstrak metanol berwarna hijau kecoklatan. Ekstrak metanol ini kemudian diuapkan sehingga diperoleh ekstrak yang lebih pekat. Ekstrak yang sudah pekat ini kemudian digunakan untuk analisa selanjutnya.

5.3 Penentuan Eluen dengan KLT

Ekstrak metanol daun mahkota dewa masih mengandung campuran senyawa-senyawa yang larut dalam metanol. Pemisahan flavonoid dari senyawa-senyawa lain dilakukan dengan metode kromatografi. Kromatografi merupakan metode pemisahan campuran senyawa berdasarkan distribusi komponen tersebut dalam dua fase yaitu fase tetap dan fase gerak. Pada penelitian ini digunakan metode Kromatografi Lapis Tipis (KLT). KLT merupakan cara pemisahan yang lazim digunakan untuk memisahkan flavonoid dan mempunyai kelebihan yaitu cara analisisnya cepat dan hanya membutuhkan bahan atau sampel yang sedikit. Penelitian ini menggunakan plat KLT kresgel 60 F 254 dengan fase tetapnya berupa silika gel yang dilekatkan pada plat aluminium sehingga plat bisa dipotong-potong sesuai dengan ukuran yang diinginkan.

Tahap yang paling penting adalah penentuan eluen. Penentuan eluen dilakukan dengan cara coba-coba karena dalam penentuan eluen tidak ada ketentuan pasti. Hal ini tergantung pada komposisi senyawa dalam sampel dan koefisien distribusi masing-masing senyawa tersebut pada fase tetap dan fase gerak. Eluen ideal adalah eluen yang mampu memisahkan komponen sampel dengan baik, yaitu yang menghasilkan noda terbanyak dan setiap noda terpisah dengan baik.

Plat KLT dipotong-potong dengan ukuran 2 x 10 cm. Bagian atas dan bawah diberi batas selebar 1 cm dengan menggunakan pensil karena pensil terbuat dari karbon yang sifatnya inert sehingga tidak memberikan kontaminasi pada sampel. Sebelum ekstrak daun mahkota dewa diaplikasikan atau ditotolkan

pada plat, ekstrak diencerkan terlebih dahulu dengan perbandingan 1:1. Sampel yang terlalu pekat akan menghasilkan pemisahan yang kurang baik karena eluen tidak mampu membawa sampel tersebut sehingga noda akan berekor. Setelah diencerkan, sampel ditotolkan pada batas bawah plat dengan menggunakan pipet mikro. Plat kemudian dikeringkan untuk menguapkan pelarut. Setelah kering sampel ditotolkan lagi pada tempat yang sama. Hal ini dilakukan agar sampel yang sudah encer ini dapat terdeteksi di bawah sinar UV. Kemudian noda dikeringkan lagi baru kemudian dimasukkan ke dalam bejana yang telah berisi fase gerak. Saat dimasukkan dalam eluen, noda sampel tadi harus diatas fase gerak agar sampel tidak larut dalam fase gerak sebelum dikembangkan. Bejana harus ditutup rapat dan diusahakan agar tidak bocor untuk menghindari hilangnya komponen yang mudah menguap.

Setelah plat dimasukkan dalam bejana, eluen akan bergerak ke atas akibat adanya gaya kapiler sambil membawa sampel dan komponen-komponen dalam sampel akan terpisah. Setelah eluen sampai ke batas atas, plat harus segera dikeluarkan dari bejana. Jika tidak segera diambil maka noda akan memancar akibat adanya difusi dan penguapan. Plat dikeringkan dan noda dilihat dibawah lampu UV dengan panjang gelombang 366 nm. Jika hasil pemisahan kurang baik maka dicoba pemisahan dengan menggunakan eluen lain. Tabel 10 menunjukkan data eluen dan noda yang diperoleh sedangkan ilustrasi KLTnya dapat dilihat pada lampiran 3.



Tabel 10. Eluen KLT untuk pemisahan flavonoid

Eluen	Jumlah noda	Pemisahan	Kesimpulan
n-heksana	1	Tidak memisah	Tidak baik
MeOH	2	Tidak memisah	Tidak baik
AtOAc	1	Tidak memisah	Tidak baik
EtOAc:MeOH (3:1)	5	Tidak memisah	Tidak baik
EtOAc:MeOH (5:1)	4	Kurang memisah	Kurang baik
EtOAc:MeOH (7:1)	5	Kurang memisah	Kurang baik
BuOH:HOAc:H ₂ O (4:1:5)	5	Kurang memisah	Kurang baik
BuOH:HOAc:H ₂ O (7:1:5)	5	Cukup memisah	Cukup baik
BuOH:HOAc:H ₂ O (7:2:5)	5	Kurang memisah	Kurang baik
BuOH:HOAc:H ₂ O (9:1:5)	5	Cukup memisah	Cukup baik
BuOH:HOAc:H ₂ O (7:2:6)	5	Kurang memisah	Kurang baik
BuOH:HOAc:H ₂ O (9:2:5)	4	Kurang memisah	Kurang baik
BuOH:HOAc:H ₂ O (9:1:6)	4	Memisah	Baik
BuOH:HOAc:H ₂ O (9:2:6)	4	Memisah	Baik
BuOH:HOAc:H ₂ O (10:1:7)	5	Memisah	Baik

Pemilihan eluen pertama kali dicoba dengan menggunakan pelarut tunggal dari pelarut nonpolar, semipolar dan polar, yaitu n-heksana, etil asetat dan metanol. Hasil yang diperoleh ternyata tidak baik, karena noda tidak terpisah bahkan dengan menggunakan pelarut n-heksana sampel sama sekali tidak naik.

Kemudian dicoba dengan menggunakan 2 campuran pelarut, yaitu Etil Asetat dan metanol dengan berbagai perbandingan. Dari tabel diatas terlihat bahwa dengan menggunakan eluen ini dihasilkan noda lebih dari satu. Eluen EtOAc:MeOH(3:1) dan (7:1) menghasilkan 5 noda sedangkan eluen EtOAc:MeOH(5:1) menghasilkan 4 noda. Tetapi noda-noda ini belum memisah baik. Data ini menunjukkan bahwa campuran pelarut dapat menghasilkan noda yang lebih banyak.

Kemudian dicoba campuran dari tiga pelarut yaitu BAA(Butanol:Asam Asetat:Air). BAA merupakan eluen yang lazim digunakan untuk analisa flavonoid. Perbandingan yang biasa digunakan adalah BAA(4:1:5) dan ternyata menghasilkan 5 noda. Tetapi kelima noda tersebut kurang terpisah sehingga dilakukan pengembangan dengan BAA dengan berbagai perbandingan seperti pada tabel 10. Dari tabel tersebut terlihat bahwa eluen BAA (10:1:7) menghasilkan noda paling banyak dan pemisahan yang paling baik. BAA(10:1:7) ini kemudian digunakan untuk analisa selanjutnya.

5.4 Penafsiran Warna Noda dengan UV 366 nm dan Uap NH₃

Pemisahan senyawa dalam ekstrak metanol daun mahkota dewa dengan menggunakan eluen BAA (10:1:7) menghasilkan pemisahan yang baik. Noda-noda ini kemudian diuji dengan uap NH₃. Perubahan warna noda-noda tersebut akan terlihat jika digunakan pembanding. Dibutuhkan dua buah plat dimana noda pada plat pertama tidak diuapi dengan NH₃ sedangkan noda pada plat kedua diuapi NH₃. Keduanya dilihat dibawah lampu UV 366 nm dan perubahan warna dibandingkan antara plat pertama dan plat kedua. Warna noda, harga R_f dan perubahan warna ditunjukkan pada tabel 11.

Tabel 11. Hasil pemisahan senyawa dan uji dengan uap NH₃

Noda/Fraksi	R _f (x100)	UV 366 nm	UV 366 dengan NH ₃
1	81	Merah	Merah
2	66	Lembayung gelap	Perubahan sedikit
3	58	Jingga	Perubahan sedikit
4	41	Biru fluoresensi	Biru fluoresensi
5	31	Hijau fluoresensi	Hijau fluoresensi

R_f dikali 100 sehingga rentang R_f antara 0-100

Penafsiran setiap noda dilakukan dengan melihat data diatas dengan data standar seperti dalam tabel 3. Penafsiran setiap noda adalah sebagai berikut. Fraksi 1 dengan harga Rf 81 berwarna merah dan tetap merah setelah diuapi amonia. Menurut Markham noda yang terlihat dibawah lampu UV kebanyakan disebabkan oleh flavonoid. Noda merah ini untuk sementara dapat dianggap flavonoid dan untuk memastikannya harus diperiksa lebih lanjut dengan spektrofotometer UV-Vis.

Fraksi 2 dengan harga Rf 66 berwarna lembayung gelap dibawah lampu UV 366 nm dan hanya mengalami perubahan sedikit setelah diuapi NH_3 . Data ini menunjukkan empat kemungkinan penafsiran yaitu senyawa ini biasanya flavon atau 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 serta mengandung 5-OH; isoflavon, dihidroflavon, biflavonil dan beberapa flavonon yang mengandung 5-OH; khalkon yang mengandung 2'-atau 6'-OH tetapi tidak mengandung 2-atau 4-OH bebas.

Harga Rf 58, berwarna jingga dan hanya mengalami perubahan yang sedikit pada fraksi 3 menunjukkan bahwa senyawa tersebut adalah flavonol yang mengandung 3-OH bebas dan mempunyai atau tidak mempunyai 5-OH bebas

Penafsiran fraksi 4 dengan harga Rf 41, berwarna biru fluoresensi dan tanpa mengalami perubahan warna setelah diuapi NH_3 adalah isoflavon yang tidak mengandung 5-OH. Fraksi 5 mempunyai harga Rf 31, berwarna hijau fluoresensi dan tidak mengalami perubahan warna setelah diuapi NH_3 . Ini menunjukkan 2 kemungkinan penafsiran, yaitu senyawa tersebut adalah auron

yang tidak mengandung 4'-OH bebas dan flavanon tanpa 5-OH bebas; flavonol yang mengandung 3-OH bebas dan disertai atau tanpa 5-OH bebas.

5.5 Uji Kemurnian Senyawa dengan KLT Dua Dimensi

Noda yang diperoleh dengan menggunakan eluen BAA (10:1:7) perlu diuji kemurniannya sehingga noda yang diperoleh benar-benar noda dari satu senyawa dan bukan dua buah noda atau lebih yang bertumpuk menjadi satu. Uji kemurnian ini dilakukan dengan KLT dua dimensi dimana eluen pertama adalah BAA (10:1:7) dan eluen kedua asam asetat 15 % (v/v).

Plat dipotong dengan ukuran 5 x 5 cm dan dikembangkan dengan BAA (10:1:7). Setelah mencapai batas, plat dikeringkan dan dikembangkan lagi dalam asam asetat 15 % dengan noda-noda yang telah terpisahkan berada di batas bawah. Pemisahan dengan asam asetat 15 % tidak menunjukkan adanya noda baru. Ini menunjukkan bahwa noda-noda yang terpisah dengan BAA sudah murni. Hasil KLT dua dimensi dapat dilihat pada lampiran 3.

5.6 Isolasi Senyawa Flavonoid dengan KLT Preparatif

Senyawa flavonoid yang akan diidentifikasi dengan spektrofotometer UV-Vis harus merupakan senyawa yang murni, oleh karena itu setiap fraksi yang terdapat dalam sampel harus dipisahkan terlebih dahulu. Cara yang paling sederhana untuk mengisolasi flavonoid adalah dengan cara KLT preparatif.

Dalam penelitian ini dilakukan pemisahan senyawa flavonoid dengan menggunakan KLT berukuran 5 x 10 cm sebanyak 6 kali. Eluen yang digunakan

adalah BAA (10:1:7). Sampel ditotolkan dengan bentuk pita sehingga akan diperoleh pemisahan sampel yang lebih banyak. Setelah pengembangan selesai, plat dikeringkan, dan noda dilihat dibawah lampu UV 366 nm. Noda-noda yang telah terpisahkan ini kemudian diambil dengan cara dikerok dengan pisau. Noda yang mempunyai Rf sama dikumpulkan menjadi satu dan dilarutkan dengan metanol p.a. Larutan ini kemudian disaring untuk memisahkan serbuk silika gel. Penyaringan dilakukan dengan menggunakan kertas Whatman No 41 yang mempunyai pori-pori yang kecil sehingga diperoleh larutan yang bening. Larutan yang keruh akan mengganggu analisis dengan Spektrofotometer UV-Vis. Larutan ini digunakan sebagai larutan induk dan dapat diencerkan sehingga diperoleh spektrum serapan yang baik.

5.7 Identifikasi Senyawa Flavonoid dengan UV-Vis

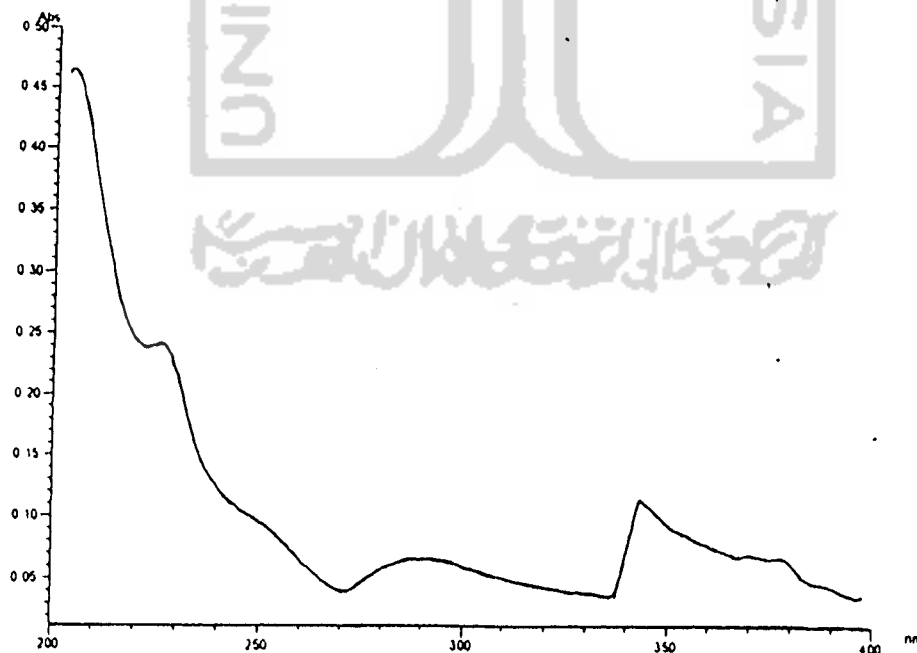
Setiap fraksi yang telah terpisahkan kemudian dianalisis dengan menggunakan UV-Vis. Walaupun data sementara telah diperoleh yaitu dari uji dengan uap amoniak tetapi setiap fraksi harus tetap dianalisis dengan UV-Vis karena menurut Markham walaupun seringkali noda yang terlihat dengan lampu UV disebabkan oleh flavonoid tetapi noda berfluoresensi biru, merah jambu, keputihan, jingga dan kecoklatan harus dianggap bukan flavonoid sebelum diperiksa dengan spektrofotometer UV-Vis.

Analisis dengan UV-Vis dilakukan dengan menggunakan pereaksi geser yang ditambahkan pada sampel. Struktur flavonoid ditentukan dengan mengamati puncak serapan dan pergeserannya, baik pergeseran batokromik maupun

pergeseran hipsokromik. Perubahan kekuatan puncak serapan juga dapat digunakan untuk menafsirkan struktur senyawa sampel. Pengukuran dilakukan pada λ antara 200-400 nm. Pereaksi geser yang digunakan untuk analisa flavonoid adalah NaOMe atau dalam penelitian ini digunakan NaOH 2 M, $AlCl_3$ 5 %, HCl, serbuk NaOAc, dan serbuk H_3BO_3 . Hasil pergeseran dibandingkan dengan data standar yang sudah ada (Markham, 1988).

5.7.1 Penafsiran spektrum fraksi 1

Fraksi 1 yang berwarna merah di bawah lampu UV 366 nm untuk sementara dapat dianggap flavonoid. Untuk lebih menyakinkannya, fraksi 1 dalam pelarut metanol diukur serapannya. Spektrum metanol fraksi 1 dapat dilihat pada gambar 6.

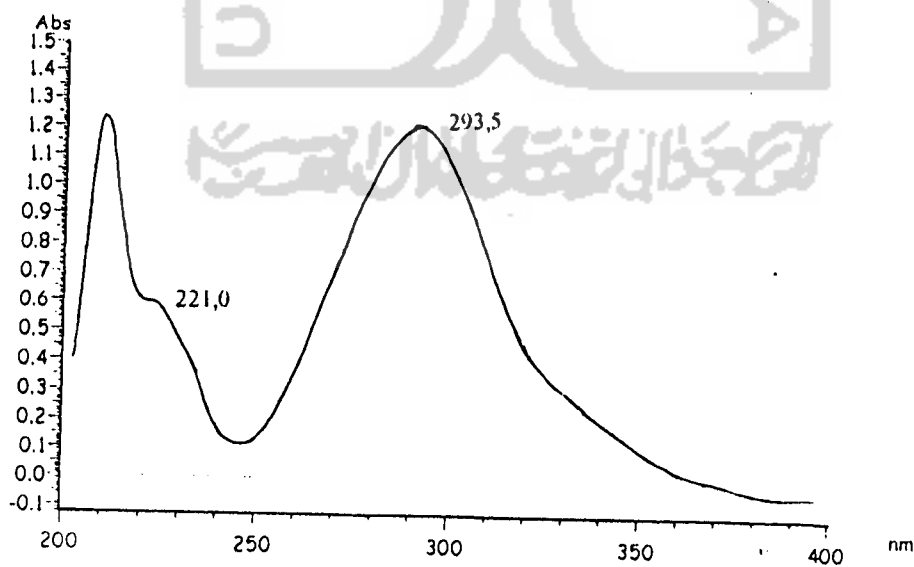


Gambar 6. Spektrum MeOH fraksi 1

Dari gambar tersebut terlihat bahwa spektrum metanol fraksi 1 tidak menunjukkan spektrum khas untuk flavonoid. Spektrum khas flavonoid berupa dua buah puncak dengan intensitas yang cukup tinggi. Jadi dapat disimpulkan bahwa fraksi 1 bukan senyawa flavonoid, sehingga analisis dengan pereaksi geser tidak perlu dilakukan. Analisa dilanjutkan terhadap fraksi 2.

5.7.2 Penafsiran spektrum fraksi 2

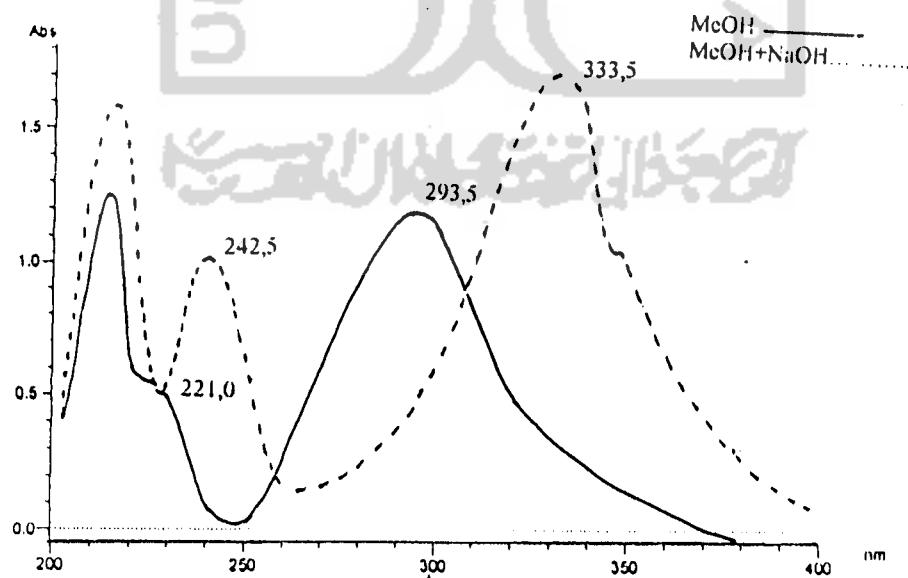
Frakasi 2 yang berwarna lembayung gelap dibawah lampu UV 366 nm dan hanya mengalami perubahan sedikit setelah diuapi NH_3 menunjukkan 3 kemungkinan senyawa flavonoid yaitu flavon/flavonol, isoflavon/dihydroflavonol/biflavonil, dan khalkon. Data diatas harus didukung dengan data spektrum UV-Visnya. Spektrum metanol fraksi 2 dapat dilihat pada gambar 7.



Gambar 7. Spektrum MeOH fraksi 2

Dari gambar diatas terlihat bahwa spektrum metanol fraksi 2 menunjukkan spektrum khas flavonoid dengan 2 buah pita dengan λ_{maks} pita I adalah 293,5 nm dan λ_{maks} pita II adalah 221 nm. Karena spektrum metanol fraksi 2 positif untuk senyawa flavonoid maka pengukuran dilanjutkan dengan menggunakan pereaksi geser. Pergeseran puncak serapan dengan menggunakan pereaksi geser NaOH 2 M dapat dilihat pada gambar 8.

Spektrum NaOH merupakan spektrum yang berguna untuk menunjukkan pola hidroksilasi dan mendeteksi gugus hidroksil yang lebih asam dan tidak tersubstitusi. Gambar 8 menunjukkan adanya pergeseran batokromik pada pita I sebesar 40,0 nm yaitu dari 293,5 nm ke 333,5 nm dengan disertai efek hiperkromik sebesar 0,491. Sedangkan pita II mengalami pergeseran batokromik sebesar 21,5 nm dari 221,0 nm ke 242,5 nm dan juga disertai efek hiperkromik sebesar 0,379.



Gambar 8. Spektrum MeOH dan MeOH+NaOH fraksi 2

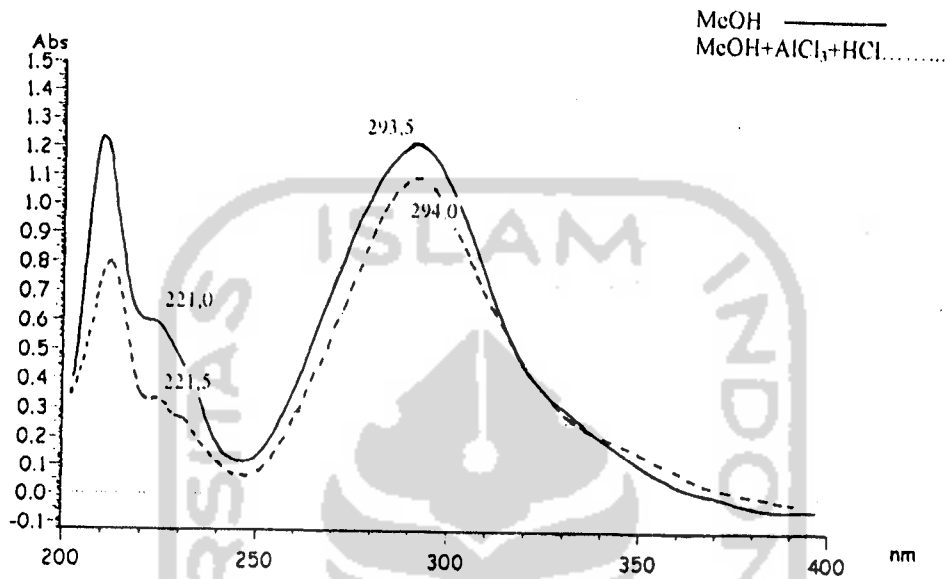
Dari tiga kemungkinan senyawa berdasarkan warna noda dan digabung dengan data pergeseran pita I dengan merujuk pada tabel 5, dapat ditunjukkan bahwa kemungkinan senyawa fraksi 2 adalah flavon/flavonol dan khalkon. Data ini tidak merujuk pada isoflavon/dihydroflavonol/biflavonil. Selain itu dari pola hidroksilasinya tidak menunjukkan spektrum khas isoflavon (gambar 4). Pergeseran sebesar 40,0 nm ini menunjukkan 4'-OH baik pada flavon/flavonol maupun pada khalkon.

Adanya peruraian senyawa dapat ditentukan dengan merekam lagi spektrum MeOH+NaOH setelah 5 menit. Penurunan kekuatan setelah waktu tertentu menunjukkan adanya gugus yang peka terhadap basa. Ternyata tidak terjadi perubahan sehingga dapat disimpulkan bahwa tidak terjadi peruraian senyawa dalam sampel.

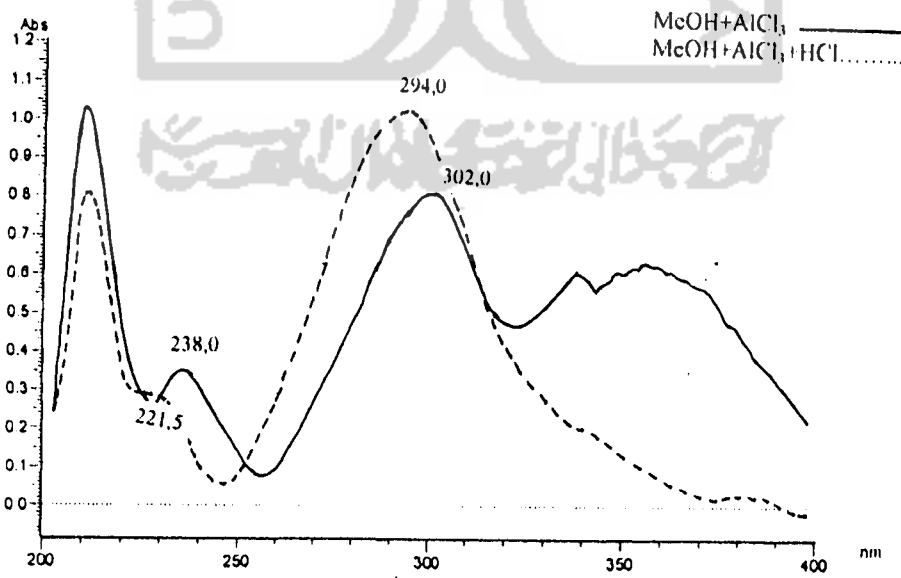
Pereaksi $AlCl_3$ dapat membentuk kompleks tahan asam antara gugus hidroksil dan keton yang berdampingan dan membentuk kompleks tidak tahan asam dengan gugus ortodihidroksi, sehingga pereaksi ini dapat digunakan untuk menentukan kedua gugus tersebut.

Dari gambar 9 terlihat bahwa tidak terjadi perubahan yang berarti. Penafsiran data ini setelah melihat data pada tabel 6 yaitu adanya gugus 5-OH dengan gugus prenil pada 6 untuk senyawa flavon/flavonol. Sedangkan gambar 10 menunjukkan adanya pergeseran hipsokromik pada pita I sebesar 8 nm. Pita II juga mengalami pergeseran hipsokromik sebesar 16,5 nm. Pergeseran hipsokromik setelah penambahan asam menunjukkan gugus *o*-di OH pada cincin A untuk senyawa flavon/flavonol. Pergeseran-pergeseran yang terjadi baik pada

pita I maupun pita II akibat pereaksi AlCl_3 ternyata tidak merujuk ke senyawa khalkon.

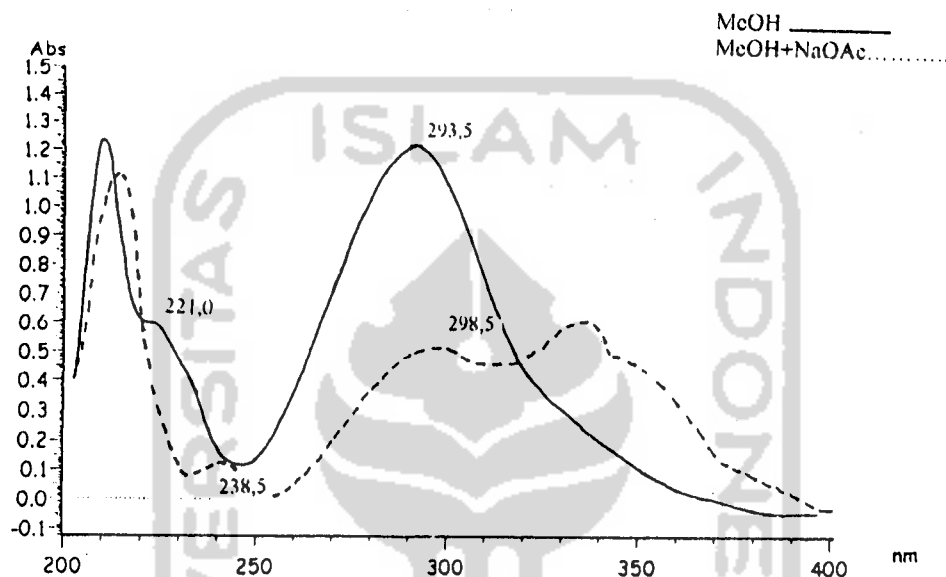


Gambar 9. Spektrum MeOH dan MeOH+AlCl₃+HCl fraksi 2



Gambar 10. Spektrum MeOH+AlCl₃ dan MeOH+AlCl₃+HCl fraksi 2

Spektrum MeOH+NaOAc menunjukkan adanya pergeseran batokromik pada pita I nisbi terhadap metanol sebesar 5 nm dari 293,5 nm ke 298,5 nm. Sedangkan pita II mengalami pergeseran batokromik sebesar 17,5 nm dari 221 nm ke 238,5 nm. Pergeseran-pergeseran ini dapat dilihat pada gambar 11.

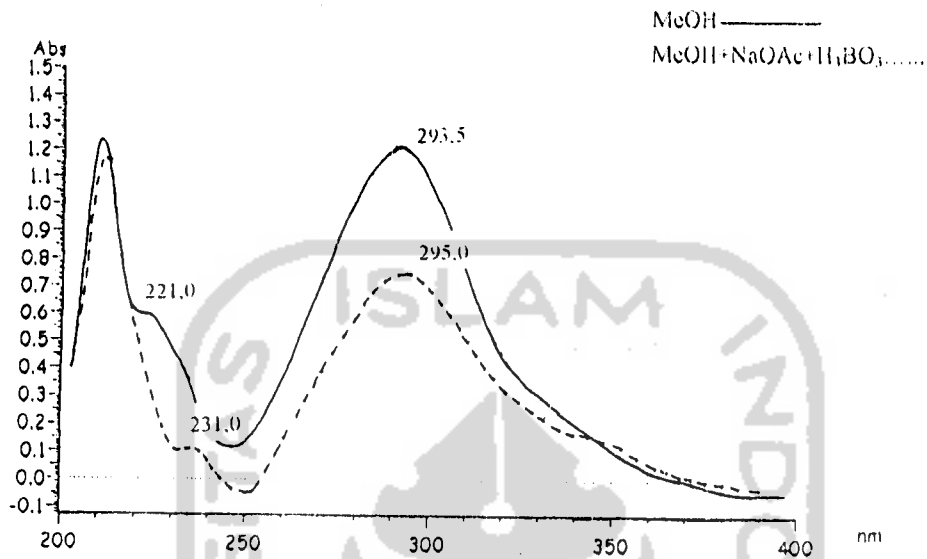


Gambar 11. Spektrum MeOH dan MeOH+NaOAc fraksi 2

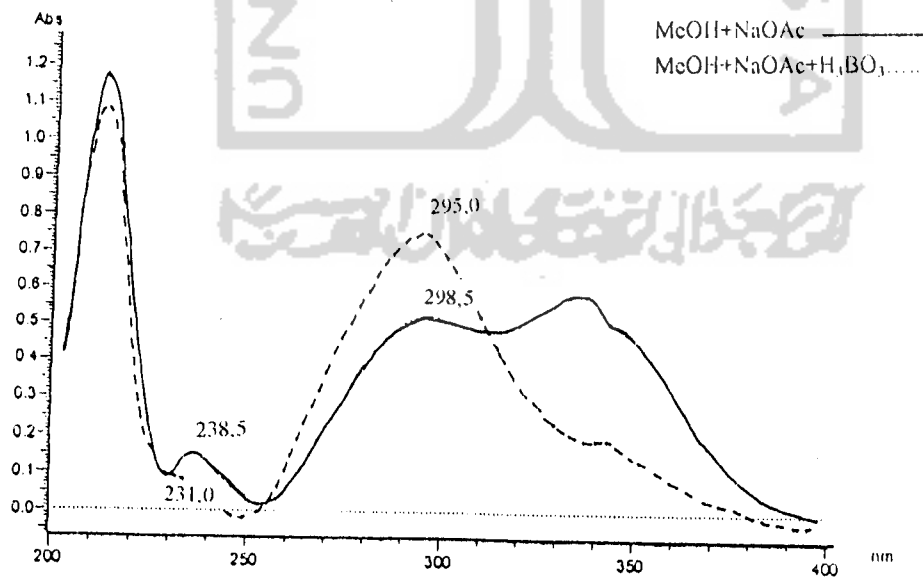
Pergeseran pada pita I dan II menurut tabel 7 menunjukkan dua kemungkinan. Pergeseran batokromik pada pita I merujuk gugus 4' dan atau 4-OH khalkon, sedangkan pergeseran batokromik sebesar 5 nm pada pita II merujuk pada gugus 7-OH senyawa flavon/flavonol.

Spektrum MeOH+NaOAc+H₃BO₃ berguna untuk mendeteksi gugus *o*-hidroksi. Pita I spektrum MeOH+NaOAc+H₃BO₃ mengalami pergeseran batokromik nisbi terhadap spektrum metanol walaupun hanya sebesar 1,5 nm, dan bukannya pergeseran hipsokromik. Pergeseran batokromik pita I menunjukkan senyawa flavon/flavonol dengan gugus *o*-diOH pada cincin B. Penambahan pereaksi asam H₃BO₃ ternyata menyebabkan terjadinya pergeseran hipsokromik

baik pada pita I maupun pada pita II. Hal ini terlihat jelas pada gambar 13.



Gambar 12. Spektrum MeOH dan MeOH+NaOAc+H₃BO₃ fraksi 2



Gambar 13. Spektrum MeOH+NaOAc dan MeOH+NaOAc+H₃BO₃ fraksi 2

Penafsiran fraksi 2 dengan menggunakan spektrum dari berbagai pereaksi geser menunjukkan dua kemungkinan senyawa yaitu flavon/flavonol dan khalkon. Tetapi penafsiran terbanyak merujuk pada senyawa flavon/flavonol. Penafsiran-penafsiran ini dapat dirangkum seperti pada tabel 12 berikut.

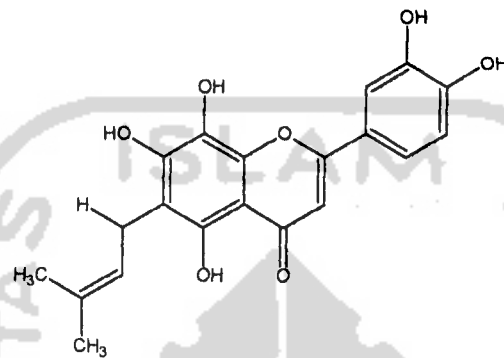
Tabel 12. Penafsiran spektrum fraksi 2

Spektrum	λ_{maks} (nm)		Pergeseran (nm)		Penafsiran
	Pita I	Pita II	Pita I	Pita II	
MeOH	293,5	221,0			Flavon/flavonol
MeOH+NaOH	333,5	242,5	+40,0	+21,5	4'-OH
MeOH+NaOH t=5 menit	334,0	242,5			
MeOH+AlCl ₃	302,0	238,0			
MeOH+AlCl ₃ +HCl (terhadap MeOH)	294,0	221,5	+0,5	+0,5	5-OH dengan gugus prenil pada 6
(terhadap AlCl ₃)			-8	-16,5	<i>o</i> -diOH pada cincin A
MeOH+NaOAc	298,5	238,5	+5	+17,5	7-OH
MeOH+NaOH +H ₃ BO ₃	295,0	231,0	+1,5	+10	<i>o</i> -diOH pada cincin B

Dari tabel diatas terlihat bahwa tidak ada penafsiran yang menunjukkan gugus 3-OH yang merupakan pembeda antara senyawa flavon dan flavonol. Senyawa flavonol mengandung gugus 3-OH sedangkan senyawa flavon tidak, sehingga dapat disimpulkan bahwa fraksi 2 adalah senyawa flavon.

Spektrum MeOH+NaOH+H₃BO₃ menunjukkan adanya gugus *o*-diOH pada cincin B, sedangkan spektrum MeOH+NaOH menunjukkan adanya gugus 4'-OH sehingga ada dua kemungkinan posisi gugus *o*-diOH pada cincin B yaitu 3',4'-diOH atau 4',5'-diOH. Tetapi penafsiran-penafsiran di atas tidak

menunjukkan adanya gugus lain pada posisi 2' maupun 6'. Sehingga posisi *o*-diOH pada 3',4' adalah sama dengan posisi *o*-diOH pada 4',5'. Jadi struktur senyawa flavonoid fraksi 2 yang dapat diusulkan adalah sebagai berikut:

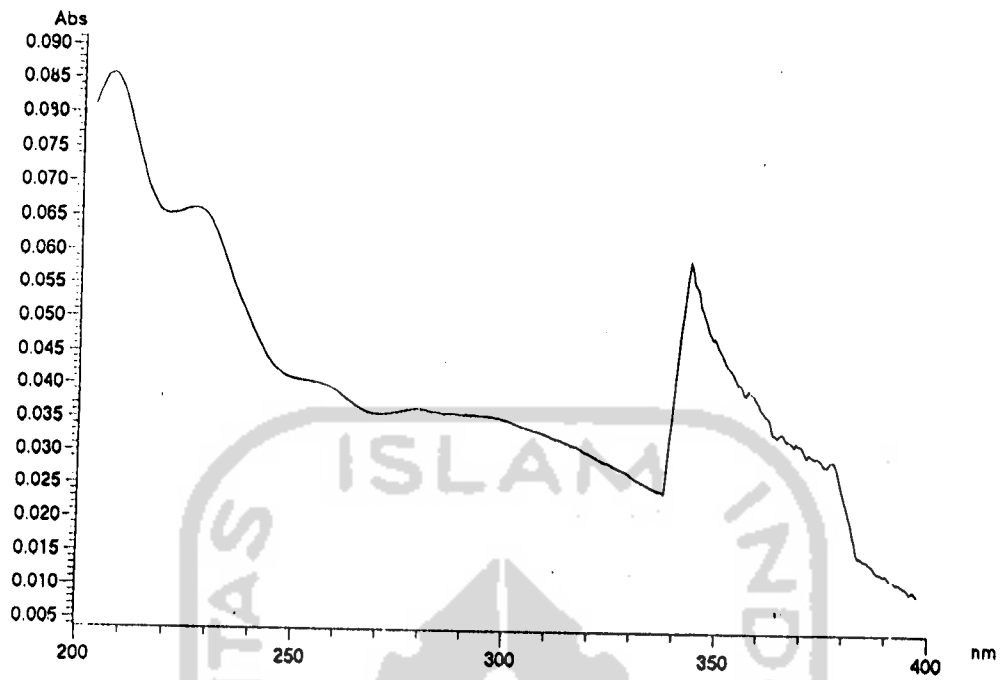


5,7,8,3',4'-heksahidroksi, 6-prenil flavon

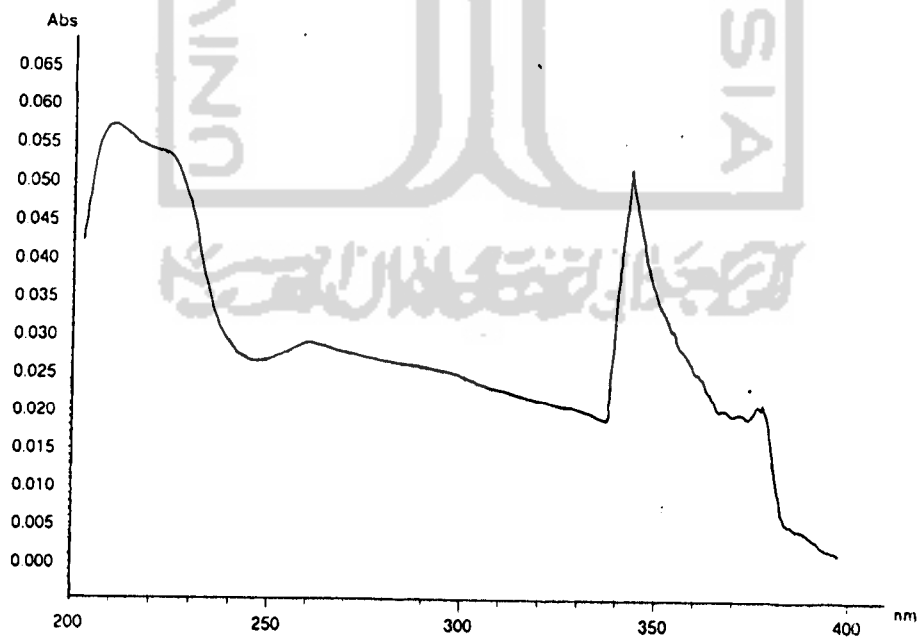
Gambar 13. Struktur flavonoid fraksi 2

5.7.3 Penafsiran spektrum fraksi 3, fraksi 4, dan fraksi 5

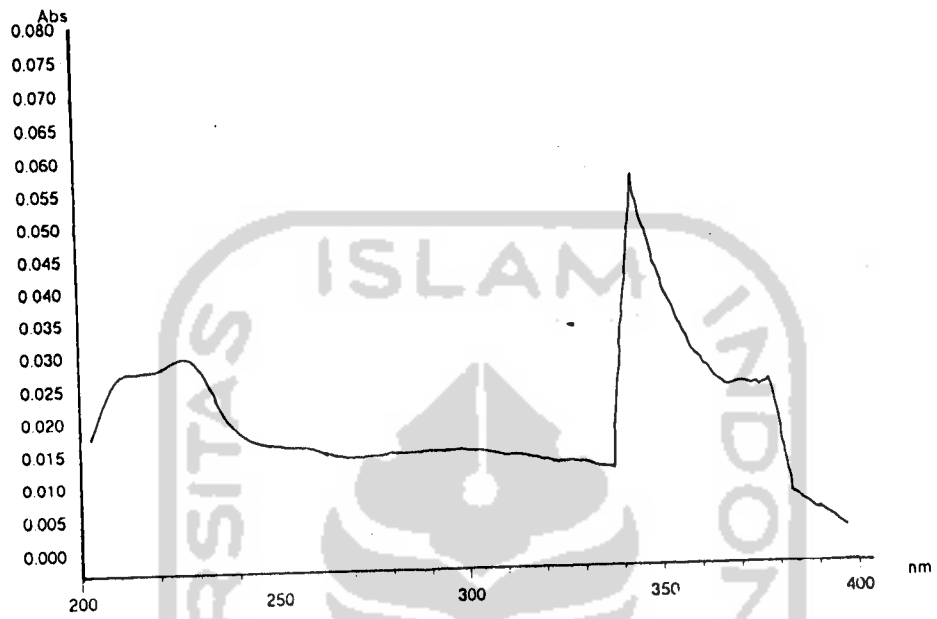
Berdasarkan data kromatogram dimana fraksi 3 berwarna jingga, fraksi 4 berwarna biru fluoresensi dan fraksi 5 berwarna hijau fluoresensi menunjukkan bahwa ketiganya positif untuk senyawa flavonoid. Tetapi data ini harus diperkuat dengan data spektrum UV-Visnya. Setelah spektrum metanol ketiga fraksi ini diukur ternyata spektrum ketiganya tidak menunjukkan adanya dua buah puncak yang baik yang merupakan serapan khas flavonoid. Oleh karena itu pengukuran dengan pereaksi geser tidak perlu dilakukan. Jadi dapat disimpulkan bahwa fraksi 3, fraksi 4, dan fraksi 5 bukan senyawa flavonoid. Spektrum metanol ketiga fraksi ini dapat dilihat pada gambar berikut.



Gambar 15. Spektrum MeOH fraksi 3



Gambar 16. Spektrum MeOH fraksi 4



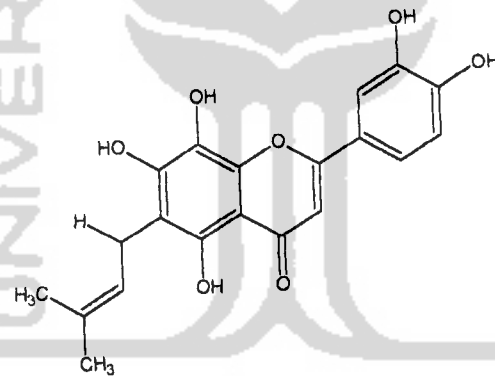
Gambar 17. Spektrum MeOH fraksi 5

BAB VI

KESIMPULAN DAN SARAN

7.1 Kesimpulan

Dari penelitian ini dapat disimpulkan bahwa senyawa flavonoid terkandung dalam fraksi 2 ekstrak metanol daun mahkota dewa (*Phaleria macrocarpa* (Scheff.) Boerl.), yaitu senyawa flavon dengan gugus-gugusnya adalah 4'-OH, 5-OH dengan gugus prenil pada 6, *o*-diOH pada cincin A, *o*-diOH pada cincin B dan 7-OH. Struktur senyawa yang dapat diusulkan adalah sebagai berikut :



5,7,8,3',4'-heksahidroksi, 6-prenil flavon

7.2 Saran

1. Perlu dilakukan identifikasi flavonoid dalam ekstrak non polar daun mahkota dewa untuk mengetahui senyawa flavonoid yang bersifat kurang polar.
2. Jika diperlukan isolat dalam jumlah banyak maka kromatografi kolom dapat digunakan untuk mengisolasi flavonoid
3. Uji aksivitas terhadap fraksi 2 dapat digunakan untuk mengetahui khasiat yang dimilikinya sehingga dapat dimanfaatkan lebih lanjut dalam dunia farmasi dan kedokteran.



DAFTAR PUSTAKA

- Fessenden, R.J. dan Fessenden J.S., 1989, *Kimia Organik*, Diterjemahkan oleh A.H. Pudjaatmaka, Edisi Ketiga, Penerbit Erlangga, Jakarta
- Harborne, J.B., 1987, *Metode Fitokimia*, Penerbit ITB, Bandung
- Harmanto, N., 2001, *Mahkota Dewa Obat Pusaka Para Dewa*, Agromedia Pustaka, Jakarta
- Anonim, *Mahkota Dewa Obat Pusaka para Dewa*, <http://www.mahkotadewa.com>
- Markham, K.R., 1988, *Cara Mengidentifikasi Flavonoid*, Penerbit ITB, Bandung
- Mursiti, H., 2002, *Uji Toksisitas Hasil Fraksinasi Ekstrak Kloroform Biji Phaleria macrocarpa (Scheff.) Boerl. terhadap Artemia salina Leach dan Profil Kromatogram Hasil Lapis Tipisnya*, Fakultas Farmasi, Universitas Gadjah Mada, Jogjakarta
- Narayana, K.R., et al., 2001, *Bioflavonoid Classification, Pharmacological, Biochemical Effect and Therapeutical Potential*, *Indian Journal of Pharmacology*, 33, 2-16
- Pratiwi, R.W., 2002, *Uji Toksisitas Daun Phaleria macrocarpa (Scheff.) Boerl. terhadap Artemia salina Leach serta Profil Kromatogram Lapis Tipis Ekstrak Aktif*, Fakultas Farmasi, Universitas Gadjah Mada, Jogjakarta
- Primsa, E., 2002, *Efek Hipoglikemik Infusa Simplisia Daging Mahkota Dewa (Phaleria macrocarpa (Scheff.) Boerl.) pada Tikus Putih Jantan*, Fakultas Farmasi, Universitas Gadjah mada, Jogjakarta
- Purwaningsih, D., 2001, *Isolasi dan Identifikasi Senyawa Flavonoid dari Daun Kacang Panjang (Vigna sinensis (L) Savi Ex Hassk)*, Skripsi, Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam, Universitas Gadjah Mada, Jogjakarta
- Robinson, T., 1995, *Kandungan Organik Tumbuhan Tinggi*, 191-216, Penerbit ITB, Bandung
- Sant, J.B. 2002, *Makhutodewo dan Oleander Dijagokan Melawan Kanker*, Minggu Pagi, Minggu V September 2002
- Sastrohamidjojo, H., 2001, *Kromatografi*, Penerbit Liberty, Jogjakarta
- Sastrohamidjojo, H., 2001, *Spektroskopi*, Penerbit Liberty, Jogjakarta

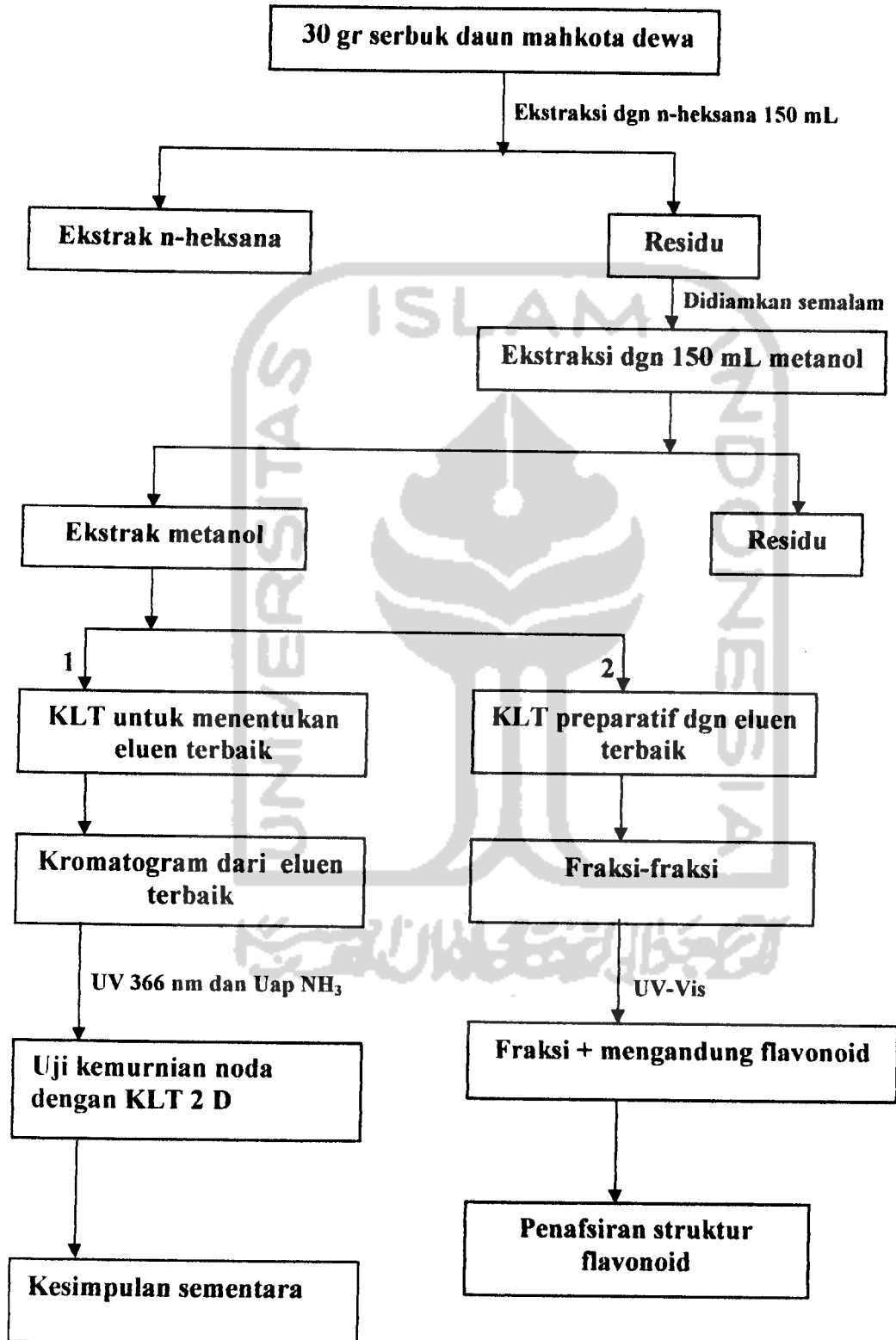
- Syah, Y.M., *Potensi Kimia Tumbuhan Indonesia*, Penelitian, Institut Teknologi Bandung, Bandung
- Underwood, 1996, *Kimia Analitik Kuantitatif*, Erlangga, Jakarta
- Wahyuni, S., 1997, *Penjaringan dan Isolasi Senyawa Flavonoid dalam Tanaman Kecombrang (Nicolaia speciosa Horan)*, Skripsi, Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam, Universitas Gadjah Mada, Jogjakarta
- Yang, B., Kotani, A., Arai, K., Kusu, F., 2001, *Estimation of Antioxidant Activities of Flavonoid from Their Oxidation Potential*, Anal. Sci., May, 17, 599-674
- Yudana, I.G.A., 2001, *Mahkotadewa Musuh Baru Aneka Penyakit*, Intisari, Januari, 58-138



Lampiran 1. Gambar Pohon dan Daun Mahkota Dewa



Lampiran 2. Skematika Kerja



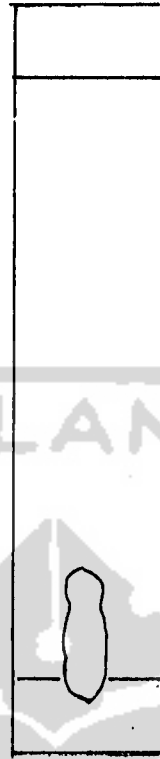
Lampiran 3. Hasil Pengembangan dengan Berbagai Variasi Eluen



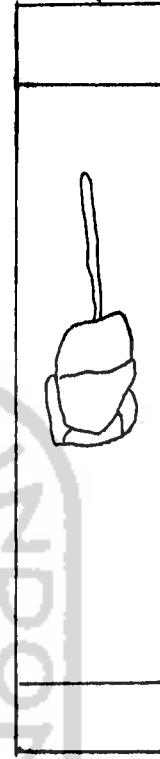
n-heksana



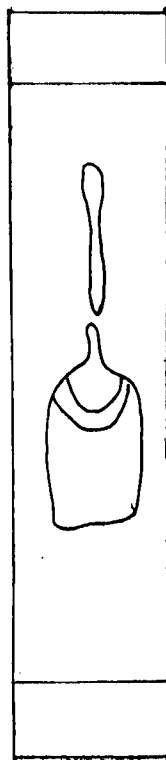
Metanol



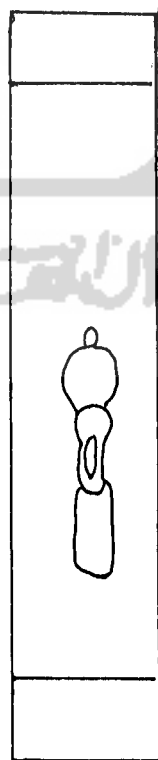
Etil Asetat



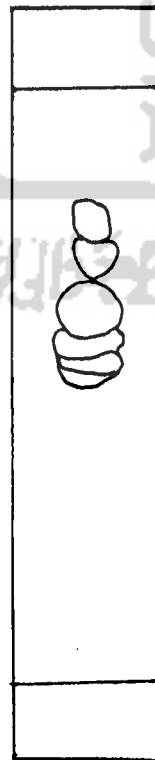
EtOAc : MeOH (3:1)



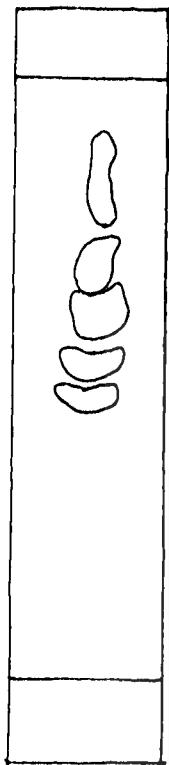
EtOAc : MeOH (5:1)



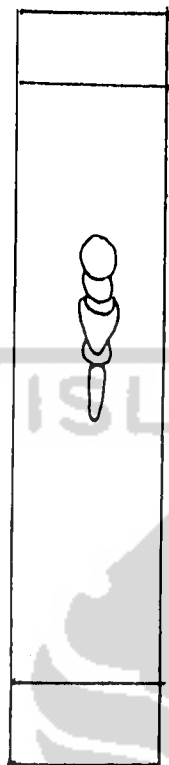
EtOAc : MeOH (7:1)



BAA (4:1:5)



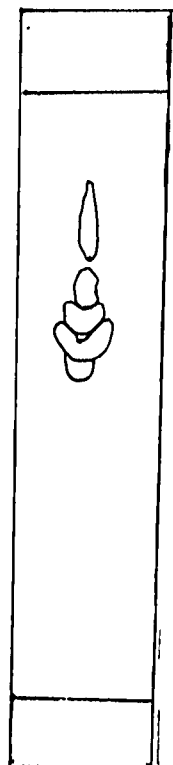
BAA (7:1:5)



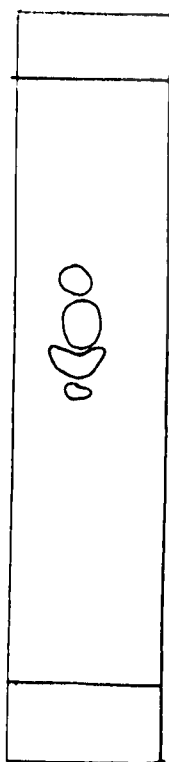
BAA (7:2:5)



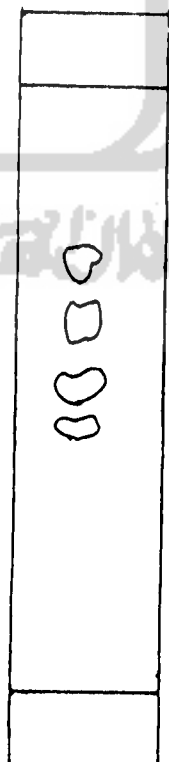
BAA (9:1:5)



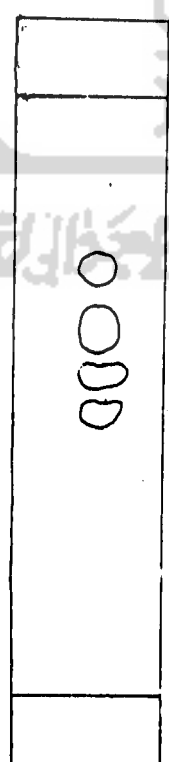
BAA (7:2:6)



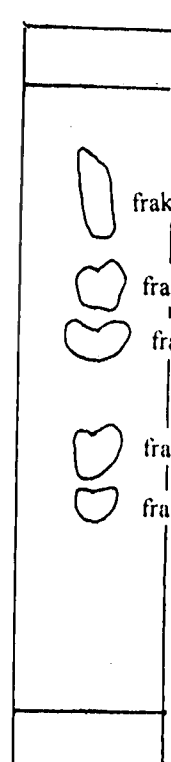
BAA (9:2:5)



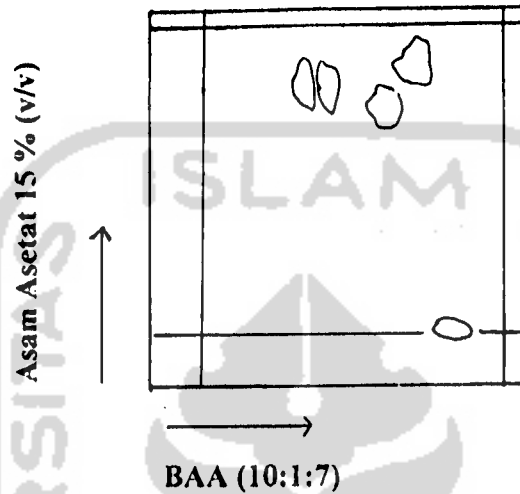
BAA (9:1:6)



BAA (9:2:6)



BAA (10:1:7)



Pembuktian kemurnian isolat flavonoid dengan KLT dua dimensi

Lampiran 4. Cara Pembuatan Eluen BAA

Pembuatan eluen BAA (10:1:7) dilakukan dengan menyampurkan 10 mL butanol, 1 mL asam asetat, 7 mL akuades atau 5 mL butanol, 0,5 mL asam asetat, 3,5 akuades dalam tabung reaksi. Larutan akan membentuk dua lapisan. Tabung reaksi ditutup rapat dan disimpan selama satu hari. Lapisan yang digunakan sebagai eluen adalah lapisan atas.

Lampiran 5. Cara Pembuatan Pereaksi Geser

1. Larutan NaOMe

Sebanyak 2,5 g logam natrium dimasukkan dalam 100 mL MeOH p.a. Larutan ini disimpan dalam botol kaca yang bertutup plastik. Pereaksi NaOMe dapat diganti dengan NaOH 2 M. Sebanyak 4 g NaOH dilarutkan dalam 50 mL akuades.

2. Larutan AlCl₃ 5 %

Sebanyak 5 g AlCl₃ kering dimasukkan dalam 100 mL MeOH p.a (sebaiknya dilakukan dalam lemari asam). Larutan disimpan dalam botol plastik.

3. Larutan HCl

Sebanyak 50 mL HCl pekat p.a ditambahkan ke dalam 100 mL akuades dengan menggunakan labu ukur.

