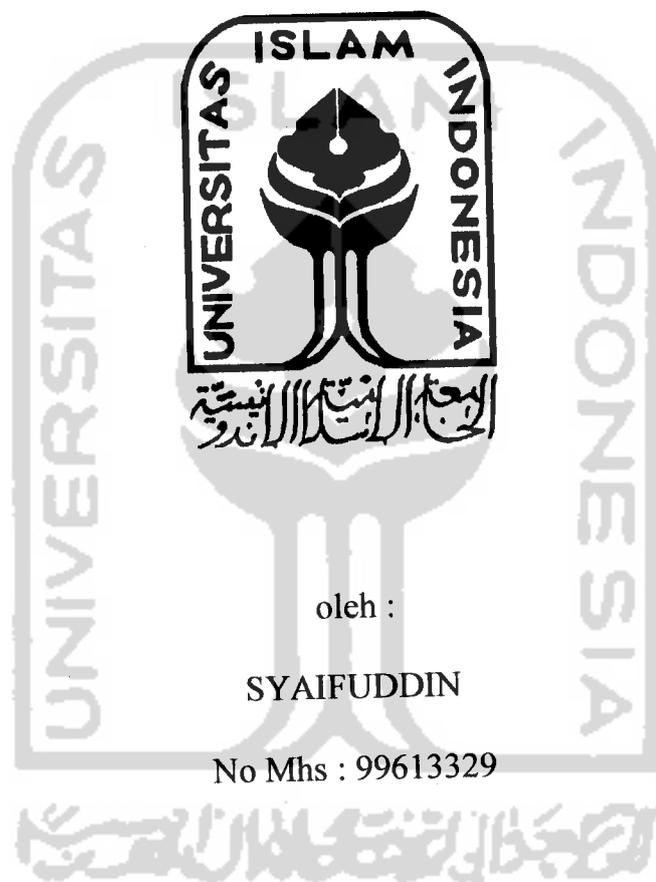


ISOLASI DAN IDENTIFIKASI SENYAWA FLAVONOID
DARI DAUN WARU (*Hibiscus tiliaceus*, L.)

SKRIPSI



oleh :

SYAIFUDDIN

No Mhs : 99613329

JURUSAN FARMASI
FAKULTAS MATEMATIKA DAN ILMU PENGETAHUAN ALAM
UNIVERSITAS ISLAM INDONESIA
JOGJAKARTA
SEPTEMBER
2004

**ISOLASI DAN IDENTIFIKASI SENYAWA FLAVONOID
DARI DAUN WARU (*Hibiscus tiliaceus.*, L.)**

SKRIPSI

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



Oleh :

**SYAIFUDDIN
99613329**

**JURUSAN FARMASI
FAKULTAS MATEMATIKA DAN ILMU PENGETAHUAN ALAM
UNIVERSITAS ISLAM INDONESIA
JOGJAKARTA
SEPTEMBER 2004**

SKRIPSI

ISOLASI DAN IDENTIFIKASI SENYAWA FLAVONOID
DARI DAUN WARU (*Hibiscus tiliaceus.*, L.)



Yang diajukan oleh :

SYAIFUDDIN
99613329

Telah disetujui oleh :

Pembimbing Utama

A handwritten signature in black ink, which appears to read 'Dr. C.J. Soegihardjo', is written over the watermark. The signature is fluid and cursive, with a long horizontal flourish at the end.

Dr. C.J. Soegihardjo, Apt

SKRIPSI

ISOLASI DAN IDENTIFIKASI SENYAWA FLAVONOID
DARI DAUN WARU (*Hibiscus tiliaceus.*, L.)

Oleh :

SYAIFUDDIN
99613329

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

Tanggal : 22 September 2004

Ketua Penguji,



Dr. C.J Soegihardjo, Apt

Anggota Penguji,



Dra. Suparmi, M.Si Apt

Anggota Penguji,



Rivanto, M.Si

Mengetahui

Dekan Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam
Universitas Islam Indonesia



Jaka Nugraha, M.Si

PERNYATAAN

Dengan ini saya menyatakan bahwa dalam skripsi ini tidak terdapat karya yang tak pernah diajukan untuk memperoleh gelar kesarjanaan disuatu Perguruan Tinggi dan sepanjang pengetahuan saya, juga tidak terdapat karya atau pendapat yang pernah ditulis atau diterbitkan oleh orang lain kecuali yang secara tertulis diacu dalam naskah ini dan diterbitkan dalam Daftar Pustaka.

Jogjakarta, 22 September 2004

Penulis,

Syaifuddin



MUTIARA HIKMAH

*Pikirkanlah oleh kamu tentang ciptaan Allah,
janganlah berpikir tentang zat Allah,
niscaya kamu pasti hancur.
(HR Asy Syaikh)*

mari kita renungkan tentang

*kehidupan, ilmu dan kebaikan yang kita terima
bukanlah sesuatu yang harus kita hitung,
sebab waktu yang kita butuhkan menghitungnya
tidak akan pernah cukup walaupun sampai ajal menjemput
Maka balaslah dengan mengingat, mensyukuri dan
Taburkanlah kehidupan, ilmu dan kebaikan itu kepada
Siapa pun, lebih dari yang kita terima dengan sepenuh hati.
(jogjakarta 2004)*

Rasulullah SAW bersabda

**Sebaik-baiknya manusia adalah orang
yang banyak bermanfaat bagi orang lain
(Al-Hadist)**

Demi masa
sesungguhnya manusia itu benar-benar berada dalam kerugian,
Kecuali orang-orang yang beriman dan mengerjakan amal sholeh dan
nasehat menasehati supaya mentaati kebenaran dan nasehat menasehati
supaya menepati kesabaran. (QS. Al 'Ashr)

Akhirnya

Ingatlah 5 perkara sebelum datangnya 5 perkara karena usia kita tak akan pernah kembali lagi waktu mudamu sebelum datang waktu tuamu, waktu luangmu sebelum datang waktu sempitmu, waktu sehatmu sebelum datang waktu sakitmu, waktu kaya sebelum datangnya waktu miskinmu, serta waktu hidupmu sebelum datangnya waktu kematian.

PERSEMBAHAN

Karya kecil ini 'ku persembahkan kepada

Ibu dan Ayah,

Sebagai ungkapan terima kasihku dan sujud baktiku
Tuk semua cinta kasih sayang , doa dan dukungan, dorongan dan
Pengorbanannya

Kakak dan adik-adikku

Sebagai ungkapan terimakasihku atas doa dan spirit selama ini

Sahabat-sahabatku

Terimakasih atas kebersamaan suka dan dukanya

Almamaterku,

Jurusan Farmasi Universitas Islam Indonesia

Takmir Masjid Ulil Albab

Terimakasih atas kebersamaan kita dalam memakmurkan rumah Allah

Special Thanks

1. Ibu dan Ayah, terima kasih untuk cinta , kasih sayang , restu, doa, dukungan dorongan dan pengorbanannya.
2. Adik-adiku Kahar kapan wisudanya dan Yuni Misliaty terimakasih atas doa dan dukungannya.
3. Kakakku Awal kapan bisa berkumpul bersama lagi serta Arif bagaimana keadaan kakak sekarang ini.
4. Seluruh keluargaku dikolaka dan dimana saja, terimakasih atas doa dan dorongannya.
5. Bapak Joko Santoso , S.Si. (Bagian Biologi Farmasi Fakultas Farmasi Universitas Gadjah Mada) atas bantuannya dalam melakukan determinasi tumbuhan.
6. Bapak Heri dan Anom (Bagian Instrument LAKFIP Universitas Gadjah Mada) atas bantuannya dalam melakukan spektroskopi UV-Vis.
7. Ketua Takmir Masjid Ulil Albab periode 2002-2003, 2003-2004, 2004-2005. Terima kasih atas bantuan dan dukungan selama ini.
8. Teman kerja seperjuangan Mariatul Kiftiah atas kebersamaan dan kerja samanya selama ini,
9. Keluarga besar Takmir Masjid Ulil Albab Universitas Islam Indonesia.
10. Semua teman angkatan '99 Ountuk kebersamaan selama masa kuliah.
11. Saudara-saudaraku di Korp Dakwah Universitas Islam Indonesia.
12. Saudara-saudaraku di Jamaah Al Ghuroba FMIPA UII.
13. Saudara-saudaraku di Ash Shohwah Farmasi Universitas Islam Indonesia.
14. Saudara-saudaraku di Himpunan Mahasiswa farmasi UII
15. Keluarga di Asrama putri Al Mahfuzh Takmir masjid Ulil Albab Universitas Islam Indonesia. Yuni Darti, Wa Ode Misran, Arikha Ayu Susilowati, Upy Ferdiani, Dian Ma'arifa, Rika Yulianti, Siti Annadhoroh, Riza Umami, Winda Ayu Lestari, Rika Noviana, Urni Rahmani, Siti Rofi'ah dan wulan. Terima kasih Untuk perhatian dan dukungannya selama ini.
16. Keluarga di Asrama putra Al Zain Takmir masjid Ulil Albab Universitas Islam Indonesia. Saudaraku Nurul Hakki, Reza, Cecep, Budiono, Heri, Dody, Dwi, Taufiq, Donny, Purwadi, Salim, Abdul, Fadhil , Pika, Anang. Terima kasih untuk perhatian dan dukungannya selama ini.
17. M'ba Lila yang lembut dan baik hati terimakasih yang sebesar-besarnya yang telah meminjamkan komputer kesayangannya hingga selesainya penyusunan skripsi ini.
18. Yuni Darti yang baik hati terimakasih atas pinjaman komputernya selama proses penyusunan proposal skripsi serta doa dan dukungannya.
19. Muchlis sahabatku yang ada di kost etnic for male terimakasih atas pinjaman scanernya dan printernya sehingga sangat membantu dalam kelancaran penyusunan skripsi ini.
20. Cecep ,SR terimakasih atas pinjaman printer dan komputernya dan juga atas waktunya untuk berdiskusi dalam penyelesaian proposal sampai penulisan sriksi ini.
21. Purwadi, Elvan, Amir, dan teman-teman yang pernah meminjamkan kendaraannya terimakasih sebanyak-banyak atas pinjaman motor perjuangannya sehingga sangat membantu kelancaran transportasi dalam penulisan skripsi ini jangan bosan-bosan ya...



22. Teman-temanku yang terbaik AA sabar ya terus maju, Miss jangan bersedih terus kapan menyusul pendaranya, dan Ria kapan selesai PKLnya terimakasih atas doa, motivasi dan kebersamaannya suka maupun duka mudah-mudah persahabatan tetap ada walaupun nantinya kita semua akan berpisah dilain tempat dan waktu.
23. Mas teguh terimakasih atas waktunya dan pinjaman skripsinya
24. Mas Harum terimakasih atas motivasinya serta bantuannya dalam penyusunan abstrak dalam skripsi ini.
25. Buat Rika ayo semangat tinggal sebentar lagi kan bulan 12 maju pendaran semoga sukses.
26. Tuk my sister 41. 5Y.4 terimah kasih atas semua cinta, kasih sayangnya dan dukungannya yang telah kau curahkan untukku, tetaplah menjadi my sister yang baik, hadirmu memberi makna dalam hidupku semoga kita berdua menjadi orang yang selalu jujur dan menerima.
27. Saudara-saudarku di asrama takmir " Al Zain " periode yang kedua Iwan, Arif, Chairul, Rifki, yudha, Rudi, Wahyu, Haris, Umar, baim, Putra, Firman, Arja, amir, terimakasih atas kebersamaannya serta dukungannya.
28. Saudari-saudariku di asrama "Al Mahfuzh " periode yang kedua Yulika, Fitriani, Peni, Novi, Tari, Betty, Heni, Aida, Intan syukron atas doa, dukungan dan kasih sayangnya.
29. Sahabatku Endang ,Tono, Ade terimakasih atas doa, dukungan, bantuan serta kebersamaannya selama ini.
30. Buat abdul ayo semanagat terus , kapan menyusul
31. Sahabat-sahabatku dikost Etnic For Male, Fridi dan muchlis yang sudah jadi sarjana jangan lupa syukurannya ya, irfan ,dani kapan selesainya ayo cepat menyusulade,fani, aris ayo semanagat jangan mau kalah .
32. teman-teman 99",adik-adikku 00, 01, 02, 03, makasih atas kebersamaan dan keperdulianya.
33. Semua pihak yang tidak dapat saya sebutkan satu persatu, terimakasih atas segala hal, baik langsung maupun tidak langsung yang diberikan selama persiapan, pelaksanaan dan penyelesaian skripsi ini.

PRAKATA

Bismillahirrahmaanirrahiim

Alhamdulillah Rabbil 'Aalamiin, dengan segala kerendahan hati kita panjatkan syukur kepada Allah SWT yang selalu mencurahkan Rahman dan Rahim-NYA kepada kita dan memberi petunjuk pada jalan yang lurus. Salam dan Salawat atas Rasulullah Muhammad SAW, keluarga, sahabat dan para pengikut beliau hingga akhir zaman.

Skripsi ini disusun untuk memenuhi salah satu syarat dalam menyelesaikan studi dan mencapai derajat Sarjana Farmasi (S.Parm) Program Studi Farmasi pada Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam Universitas Islam Indonesia.

Skripsi ini hanya dilakukan secara eksploratif yang bertujuan untuk mengisolasi dan mengidentifikasi kandungan senyawa flavonoid dari daun waru (*Hibiscus tiliaceus*, L.), sehingga dapat diketahui komponen-komponen dan struktur parsialnya. Penelitian ini diharapkan dapat memberikan informasi ilmiah dalam kepustakaan dan dapat digunakan sebagai senyawa penuntun dalam upaya penemuan dan pengembangan obat baru.

Segala puji bagi Allah SWT, akhirnya penulis dapat menyelesaikan penyusunan dan penulisan skripsi ini, dengan segala keterbatasan dan kekurangan.

Skripsi ini tidak akan dapat disusun tanpa bantuan dari berbagai pihak. Penulis ingin menyampaikan terima kasih yang sebesar-besarnya kepada :

1. Dosen Pembimbing Utama, Dr. C.J Soegihardjo, Apt atas kesabaran dan waktu luangnya membimbing dan mengarahkan selama penyusunan skripsi.

2. Ibu Dra. Suparmi, M.Si, Apt dan bapak Riyanto, M.Si selaku dosen penguji yang telah berkeanian memberikan masukan, saran dan pengarahannya.
3. Dekan Fakultas MIPA Universitas Islam Indonesia, Jaka Nugraha M.Si.
4. Dosen Pembimbing Akademik, Sri Mulyaningsih, M.Si, Apt dan Yandi Syukri, M.Si, Apt untuk bimbingannya selama peneliti menjadi mahasiswa di Fakultas MIPA.
5. Ketua Jurusan Farmasi Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam Farida Hayati, M.Si, Apt.
6. Staf Pengajar dan seluruh karyawan MIPA UII, terima kasih atas dedikasi selama ini Semua staf Laboratorium Farmasi Universitas Islam Indonesia, terimakasih atas bantuan yang telah diberikan kepada penulis.
7. Semua pihak yang tidak mampu kami sebutkan satu persatu yang telah memberi dukungan dan bantuan selama penyusunan skripsi, hanya Allah SWT yang dapat membalasnya.

Penulis menyadari masih terdapat kekurangan dalam skripsi ini, untuk itu penulis sangat mengharap kritik dan saran yang bersifat membangun. Semoga skripsi ini dapat bermanfaat bagi perkembangan Fitokimia dan Farmakognosi pada khususnya serta dunia kefarmasian pada umumnya.

Jogjakarta, 22 September 2004

Penulis,

Syaifuddin

DAFTAR ISI

HALAMAN JUDUL	i
HALAMAN PENGESAHAN	ii
HALAMAN PERNYATAAN	iv
MUTIARAH HIKMAH	v
HALAMAN PERSEMBAHAN	vi
PRAKATA	ix
DAFTAR ISI	xi
DAFTAR TABEL	xiv
DAFTAR GAMBAR	xv
DARTAR LAMPIRAN	xvii
INTISARI	xviii
ABSTARAK	xix
BAB I PENDAHULUAN	1
A. Latar Belakang Masalah	1
B. Perumusan Masalah	3
C. Tujuan Penelitian	3
BAB II TINJAUAN PUSTAKA	4
A. Tinjauan Pustaka	4
1. Tinjauan umum	4

2. Uraian tentang tumbuhan	5
3. Uraian tentang senyawa flavonoid	8
4. Uraian tentang KKt	9
5. Uraian tentang spektrofotometri UV.Vis	25
B. Landasan Teori	35
C. Keterangan Empirik Yang Diharapkan	35
BAB III METODOLOGI PENELITIAN	36
A. Alat dan Bahan	36
1. Alat yang digunakan	36
2. Bahan yang digunakan	37
B. Jalannya Penelitian	37
1. Determinasi tumbuhan	37
2. Penyiapan bahan utama	38
3. Penyarian flavonoid	38
4. Fraksinasi flavonoid	39
5. Pemeriksaan kandungan flavonoid secara KKt	39
6. Isolasi flavonoid dengan KKt 2A	39
7. Identifikasi isolat flavonoid dengan spektroskopi	40
C. Analisa Hasil	41

BAB IV. HASIL DAN PEMBASAN	43
1. Determinasi tumbuhan	43
2. Pengumpulan dan penyiapan bahan	43
3. Ekstraksi senyawa flavonoid	44
4. Fraksinasi senyawa flavonoid	46
5. Pemeriksaan kandungan senyawa flavonoid.....	47
6. Isolasi senyawa flavonoid	56
7. Identifikasi senyawa flavonoid	57
BAB V . KESIMPULAN DAN SARAN	61
A. Kesimpulan	61
B. Saran.....	61
DAFTAR PUSTAKA	62
LAMPIRAN- LAMPIRAN	64



DAFTAR TABEL

Tabel I	Hubungan warna bercak dan struktur flavonoid	22
Tabel II.	Rentangan serapan spektrum UV-Vis flavonoid	30
Tabel III.1	Penafsiran spektrum NaOMe	32
Tabel III.2	Penafsiran spektrum NaOAc	33
Tabel III.3	Penafsiran spektrum NaOAc / H ₃ BO ₃	33
Tabel III.4	Penafsiran spektrum AlCl ₃ dan AlCl ₃ / HCl.....	34
Tabel IV	Data kromatogram pemeriksaan kandungan flavonoid	52
Tabel V	Data spektrum UV-Vis dari isolat n-butanol noda nomor satu....	58



DAFTAR GAMBAR

Gambar 1.	Kerangka dasar flavonoid beserta penomorannya (Markham, 1988)	8
Gambar 2	Kerangka dasar tipe-tipe flavonoid (Mabry <i>et al.</i> ,1970)	13
Gambar 3	Pembentukan struktur kuinoid dari flavonoid dengan penambahan basa (Robinson, 1995).....	17
Gambar 4	Reaksi kompleks flavonoid dengan asam borat dan natrium asetat (Mabry <i>et al.</i> , 1970)	18
Gambar 5	Reaksi kompleks flavonoid dengan AlCl ₃ (Mabry <i>et al.</i> ,1970).....	18
Gambar 6	Petunjuk-penyebaran jenis flavonoid pada kromatogram yang dikembangkan dengan TBA/HOAc 15% Markham ,1988).....	25
Gambar 7	Kerangka flavonoid dengan cincin dengan cincin benzoil dan sinamoil	29
Gambar 8	Skema jalannya penelitian.....	42
Gambar 9	Skema ekstraksi senyawa flavonoid.....	46
Gambar 10	Skema fraksinasi senyawa flavonoid.....	47
Gambar 11	Kromatogram kertas dua arah fraksi PE dengan fase gerak BAW dan asam asetat.....	48
Gambar 12	Kromatogram kertas dua arah fraksi etil asetat dengan fase gerak BAW dan asam asetat.....	49
Gambar 13	Kromatogram kertas dua arah fraksi n-butanol dengan fase gerak BAW dan asam asetat.....	50
Gambar 14	Kromatogram kertas dua arah fraksi air dengan fase gerak BAW dan asam asetat.....	51
Gambar 15	Spektrum ultraviolet noda nomor satu fraksi n-butanol dalam metanol dengan penambahan pereaksi diagnostik (MeOH, NaOH, NaOH 5')	53

Gambar 16	Spektrum ultraviolet noda nomor satu fraksi n-butanol dalam methanol dengan penambahan pereaksi diagnostik (MeOH, NaOAc, NaOAc / H ₃ BO ₃).....	54
Gambar 17	Spektrum ultraviolet noda nomor satu fraksi n-butanol dalam metanol dengan penambahan pereaksi diagnostik (MeOH, AlCl ₃ , AlCl ₃ / HCl)	55
Gambar 18	Skema isolasi kandungan senyawa flavonoid pada masing-masing fraksi.....	56
Gambar 19	Struktur 3, 5, 7, 4'-tetrahidroksiflavonol atau kaemferol.....	60



DAFTAR LAMPIRAN

Lampiran 1.	Surat keterangan determinasi tumbuhan	64
Lampiran 2.	Foto tanaman waru (<i>Hibiscus tilaiceus</i> , L.)	65
Lampiran 3.	Foto Bejana kromatografi KKt 2A buatan sendiri menurut Mabry <i>et al.</i> , 1970.....	66



ISOLASI DAN IDENTIFIKASI SENYAWA FLAVONOID DARI DAUN WARU (*Hibiscus tiliaceus*, L.)

INTISARI

Daun waru (*Hibiscus tiliaceus*, L.) banyak digunakan sebagai obat tradisional yang berkhasiat sebagai anti radang, antitoksik, peluruh dahak, peluruh kencing dan sebagai penyubur rambut (*hair tonic*). Kandungan senyawa dalam daun waru antara lain senyawa golongan saponin, flavonoid, dan polifenol. Senyawa flavonoid biasanya terdiri dari beberapa komponen, dan dalam penelitian ini diisolasi dan diidentifikasi salah satu senyawa flavonoid tersebut. Pemeriksaan kandungan flavonoid dari fraksi PE, etil asetat, n-butanol dan air menggunakan Kromatografi Kertas dua arah (KKt 2A), dengan fase diam Kertas Whatman no 41 dan fase gerak BAW (6:2:1v/v) sebagai fase satu dan asam asetat glasial 2% sebagai fase dua, kemudian dideteksi dengan uap amoniak dan sinar UV 366 nm sebelum dan sesudah diuapi amoniak. Hasil kromatografi fraksi n-butanol pada noda nomor satu yang menunjukkan keberadaan flavonoid dengan deteksi awal warna kuning dengan uap amoniak, yang selanjutnya dianalisis lebih lanjut. Identifikasi flavonoid menggunakan spektrofotometer UV-Vis. Analisis struktur parsial flavonoid berdasarkan hubungan antara warna bercak dan struktur flavonoid, harga Rf pada KKt 2A, dan hubungan antara panjang gelombang dalam spektrum UV-Vis dengan atau tanpa pereaksi diagnostik. Hasil analisis menunjukkan bahwa isolat fraksi n-butanol pada noda nomor satu mengarah pada 3, 5, 7, 4' tetrahidroksiflavonol atau kaempferol.

Kata kunci : Daun waru (*Hibiscus tiliaceus*, L.), Senyawa flavonoid dan spektrofotometer UV-Vis.

ISOLATION AND IDENTIFICATION OF FLAVONOIDS FROM IN THE LEAVES OF *Hibiscus tiliaceus*, L.

ABSTRACT

The waru of leaves (*Hibiscus tiliaceus*, L.) more used as traditional medicine who has to effect such as bronchitis, antitocsic, espectorant, diabetes also growt by hair (hair tonic). Contents by soul of the waru namely as saponin soul, flavonoid, and polifenol. The soul flavonoid usually any more ingredients and to research this disolation and identified one of soul flavonoid. The investigation of flavonoid consists of petroleum ether (PE) fraction and each of fraction used two ways paper chromatography with phase of Whatman paper no.41 and the phase of BAW mobile phase stationary as the first phase and glacial acetic acid as the second phase, then detected by ammonia vapor and ultraviolet light 366 nm before and after ammonia vapor. The identification of flavonoid used spectrofotometer UV-Vis with diagnostic reagens treatments. This structure flavonoid partial analysis was based on the relationship between stained colour and flavonoid structure, the calculation of Rf on KKt 2A based on bathochromic shif is the leght waves move to another places the shift causes by subtituen or solute involves, also caused by hypsochromic shift of the spectra is the short waves to another places, and the relationship between wave way the spectrum of UV-Vis without diagnostic reaction factor. This finding analysis shows that the isolation of n-buthanol tends to 3, 5, 7, 4' tetrahidroksiflavanol.

Key words : The waru of leaves (*Hibiscus tiliaceus*, L.), flavonoids, and spectrofotometer UV-Vis.

BAB I

PENDAHULUAN

A. Latar Belakang Masalah

Sejak ribuan tahun yang lalu, obat dan pengobatan tradisional sudah ada di Indonesia, jauh sebelum pelayanan kesehatan formal dengan obat-obatan modernnya dikenal di masyarakat. Pengobatan tradisional dengan memanfaatkan tumbuhan berkhasiat obat merupakan pengobatan yang dimanfaatkan dan diakui masyarakat dunia, yang menandai kesadaran untuk kembali ke alam (*back to nature*) adalah untuk mencapai kesehatan yang optimal dan untuk mengatasi berbagai penyakit secara alami.

Indonesia memiliki lahan hutan tropis cukup luas dan beraneka ragam hayati, lebih kurang 30.000 sampai 40.000 jenis tumbuhan tersebar dari Aceh sampai Papua. Dari dataran rendah hingga dataran tinggi, dari daerah tropis hingga daerah sejuk, bahkan hingga tumbuhan dan kekayaan laut dapat dimanfaatkan sebagai bahan obat.

Keberadaan pengobatan tradisional Indonesia saat ini dikhawatirkan hilang karena pengobatan tradisional yang dianggap kuno, tidak ilmiah, tidak rasional, kampungan, primitif karena tidak dilakukan uji klinis. Agar peranan pengobatan tradisional lebih dapat ditingkatkan, perlu didorong upaya pengenalan, penelitian pengujian dan pengembangan khasiat obat dengan disertakan ilmu yang saling mendukung.

Oleh karena itu, penentuan kandungan senyawa kimia dalam suatu tumbuhan obat sangat diperlukan dalam upaya pengembangan obat tradisional ke arah fitofarmaka. Flavonoid merupakan salah satu komponen dari tumbuhan obat yang mempunyai aktivitas biologi. Penelitian farmakologi terhadap senyawa flavonoid menunjukkan bahwa beberapa flavonoid memperlihatkan aktivitas seperti antifungi diuretik, antihistamin, antihipertensi, insektisida, antialergi, antitrombosis, dan menghambat pertumbuhan tumor (Evans, 1989). Penelitian struktur dan aktivitas flavonoid yang telah dilakukan antara lain antifungi (Woodward, 1979), insektisida (Miller, 1979), antihepatotoksik (Soegihardjo, 1984), dan esterogenik (Untoro, 1990).

Waru yang selama ini dikenal sebagai tumbuhan yang tumbuh liar di hutan dan di ladang dan kadang-kadang ditanam di pekarangan atau tepi jalan sebagai tanaman pelindung. Di masyarakat daun mudanya bisa dimakan sebagai sayuran. Selain itu daunnya berkhasiat sebagai antiradang, antitoksik, peluruh dahak dan peluruh kencing, sedangkan akarnya berkhasiat sebagai penurun panas dan peluruh haid.

Adanya khasiat sebagai obat tersebut yang mendasari penelitian ini dilakukan. Penggunaan daun *Hibiscus tiliaceus*, L. sebagai obat tradisional perlu didukung dengan data hasil penelitian yang menunjukkan adanya kandungan senyawa yang berkhasiat sebagai obat. Diharapkan dengan penelitian ini dapat dikembangkan potensi atau manfaat lain dari tanaman *Hibiscus tiliaceus*, L. selain sebagai tanaman pelindung atau tanaman liar.

B. Perumusan Masalah

Flavonoid merupakan salah satu komponen dari tumbuhan yang mempunyai khasiat atau aktivitas biologis. Oleh karena itu, dalam penelitian ini dilakukan isolasi dan identifikasi untuk mengetahui :

1. Apakah kandungan kimia senyawa flavonoid yang terdapat di dalam daun waru (*Hibiscus tiliaceus*, L.) dapat diisolasi secara kromatografi kertas dan diidentifikasi secara spektrofotometri UV-Vis ?
2. Salah satu komponen utama apakah yang menyusun dan bagaimana struktur parsial senyawa flavonoid yang ditemukan ?

Hasil penelitian kandungan kimia senyawa flavonoid dalam daun waru (*Hibiscus tiliaceus*, L.) diharapkan dapat memberi manfaat bagi ilmu pengetahuan dan obat bahan alam yang rasional.

C. Tujuan Penelitian

Penelitian ini bertujuan untuk mengisolasi dan mengidentifikasi senyawa flavonoid dari daun waru (*Hibiscus tiliaceus*, L.), sehingga dapat diketahui struktur flavonoidnya. Diharapkan dapat memberikan informasi ilmiah dalam kepustakaan dan dapat digunakan sebagai senyawa penuntun dalam upaya penemuan dan pengembangan obat baru.

BAB II

TINJAUAN PUSTAKA

A. TINJAUAN PUSTAKA

1. Tinjauan umum

Dengan hujan itu, Dia menumbuhkan tanaman, juga zaitun, kurma, anggur dan segala macam buah-buahan. Yang demikian itu benar-benar ayat kekuasaan Allah bagi yang mau berpikir (Q.S An-Nahl 16 : 11). Dialah yang menurunkan air dari langit dan kami tumbuhkan segala macam tetumbuhan, juga kami tumbuhkan macam-macam sayur yang hijau mengeluarkan biji-biji yang tersusun. Dan pohon kurma menjunglah mayang-mayangnya dan tandan-tandan yang mudah dipetik, maka terbentangleh kebun-kebun anggur, zaitun dan delima yang serupa dan yang berbeda. Lihatlah buahnya, sewaktu berbuah dan sewaktu masak. Semuanya itu merupakan ayat yang jelas bagi orang-orang yang jelas bagi orang-orang yang beriman.(Q.S Al An'aam 6 : 99). Allahlah yang membelah buah dan biji, Dia pula yang mengeluarkan yang hidup dari yang mati, dan yang mengeluarkan yang mati dari yang hidup. Itulah kekuasaan Allah. Bagaimana pula kamu masih mendustakan Nya. (Q.S Al An'aam 6 : 95) (Dahlan, 1999)

Dewasa ini, penelitian dan pengembangan tumbuhan obat baik di dalam maupun luar negeri berkembang pesat. Penelitian yang berkembang terutama pada segi farmakologi maupun fitokimianya berdasarkan indikasi tumbuhan yang telah digunakan oleh sebagian masyarakat dengan khasiat yang teruji secara empiris.

Di seluruh dunia terdapat lebih kurang 600.000 jenis tumbuh-tumbuhan, lebih kurang 400.000 diantaranya merupakan tanaman tinggi, tetapi baru sekitar 10% diantaranya telah diteliti secara kimia dan farmakologi (Diyah dan Purwanto, 1988). Indonesia sendiri memiliki keanekaragaman hayati terbesar di dunia dengan lebih kurang 30.000 jenis tanaman, dan diantaranya sekitar 940 jenis telah diketahui khasiatnya dan baru 180 jenis yang digunakan oleh industri Obat Asli Indonesia (OAIN) (Azwar, 2001).

2. Uraian tentang tanaman waru (*Hibiscus tiliaceus*, L.)

a. Nama tanaman

Nama latin	: <i>Hibiscus tiliaceus</i> L.
Nama umum	: Waru
Nama daerah	: Di beberapa daerah tumbuhan waru dikenal berbagai nama antara lain :
Sumatra	: kioko , siron, baru, buluh, bou, beruk, melanding.
Jawa	: waru, waru laut , waru lot, waru lenga, waru lengis, waru lisah, Waru rangkang, Wende, baru
Nusa tenggara	: Baru, waru, wau, kabaru, bau, fau
Sulawesi	: Belebirang, bahu, molowahu, lamogu, molowagu
Maluku	: War, papartale, haru, palu, faru, haaro, fanu, halu, balo, kalo, pa.
Irian jaya	: Kasyanaf, iwal, wakati.

(Dalimarta, 2001)

b. Sistematika tumbuhan

Divisi	: Spermatophyta
Sub divisi	: Angiospermae
Kelas	: Dicotyledonae
Bangsa	: Malvales (Columniferae)
Suku	: Malvaceae
Marga	: Hibiscus
Jenis	: <i>Hibiscus tiliaceus</i> , L.

(Tjitrosoepomo, 1994)

c. Morfologi tumbuhan

Tinggi pohon 5-15 meter. Daun bertangkai, berbentuk jantung lingkaran lebar atau bulat telur, tak berlekuk, sampai garis tengah 19 cm, bertulang daun menjari, sebagian dari tulang daun utama dengan kelenjar berbentuk celah pada sisi bawah pada pangkal, sisi bawah berambut abu-abu rapat. Daun penumpuh bulat telur memanjang, panjang 2,5 cm, meninggalkan tanda bekas berbentuk cincin. Bunga berdiri sendiri atau 2-5 dalam tandan. Daun kelopak tambahan sampai lebih dari separohnya melekat, dengan 8-11 taju. Kelopak panjang 2,5 cm beraturan bercangap 5. Daun mahkota bentuk kipas berkuku pendek dan lebar, panjang 5-7,5 cm, kuning dengan noda ungu pada pangkal, orange dan akhirnya berubah warna menjadi kemerah-merahan. Tabung benang sari keseluruhan ditempati oleh kepala sari, kuning. Bakal buah beruang 5, tiap ruang dibagi dua oleh sekat semu, dengan banyak

bakal biji. Buah bentuk telur, berparuh pendek, panjang 3 cm, beruang 5 tidak sempurna, membuka dengan 5 katup.

(van Steenis, 1972)

d. Ekologi dan penyebaran

Tumbuhan tropis berbatang sedang, terutama tumbuh di pantai yang tidak berawa atau di dekat pesisir. Waru tumbuh liar di hutan dan di ladang, kadang-kadang ditanam di pekarangan atau di tepi jalan sebagai pohon pelindung. Pada tanah yang subur, batangnya lurus, tetapi pada tanah yang tidak subur batangnya tumbuh membengkok, percabangan dan daun-daunnya lebih lebar (Anonim, 2001)

e. Bagian yang digunakan

Bagian yang digunakan adalah daun, akar dan bunga dalam keadaan segar. Daun digunakan untuk pengobatan TB paru-paru, batuk, sesak napas, radang amandel (tonsillitis), demam, berak darah dan lendir pada anak, muntah darah, radang usus, bisul, abses, keracunan singkong, penyubur rambut, rambut rontok. Akar digunakan untuk mengatasi terlambat haid, demam. Bunga digunakan untuk pengobatan radang mata (Anonim, 2000).

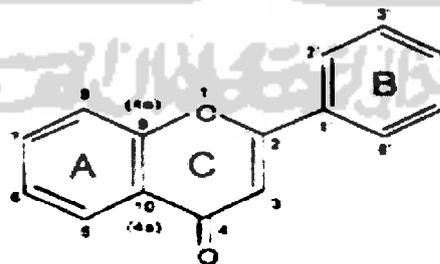
f. Kandungan kimia

Daun mengandung saponin, flavonoid, dan polifenol, sedangkan akarnya mengandung saponin, flavonoid, dan tanin (Anonim, 2001)

3. Uraian tentang senyawa flavonoid

a. Pengertian dan struktur flavonoid.

Menurut perkiraan, kira-kira 2% dari seluruh karbon yang difotosintesis oleh tumbuhan diubah menjadi flavonoid atau senyawa yang berkaitan erat dengannya (Smith, 1972). Flavonoid merupakan salah satu golongan fenol alam terbesar (Harbone, 1987 ; Markham, 1988). Dalam tumbuhan aglikon flavonoid (flavonoid tanpa gula terikat) mengandung 15 atom karbon dalam inti dasarnya, yang tersusun dalam konfigurasi $C_6 - C_3 - C_6$, yaitu dua cincin aromatik yang dihubungkan oleh satuan tiga karbon yang dapat atau tidak dapat membentuk cincin yang ketiga (Markham, 1988), tiap bagian C_6 merupakan cincin benzena yang terdistribusi dan dihubungkan oleh tiga atom karbon rantai alifatik (Pramono, 1989; Pramono dan Koensoemardijah, 1999). Agar mudah cincin diberi tanda A, B, dan C; atom karbon dinomori menurut sistem penomoran yang menggunakan angka biasa untuk cincin A dan C, serta angka 'beraksen' untuk cincin B (lihat gambar 1) (Markham, 1988)



Gambar 1. Kerangka dasar flavonoid beserta penomorannya (Markham, 1988)

Semua varian flavonoid saling berkaitan karena alur biosintesis yang sama, yang memasukkan prazat dari alur 'siklamat' dan alur asetat malomat', flavonoid pertama dihasilkan segera setelah kedua alur itu bertemu. Sekarang, flavonoid yang dianggap pertama kali terbentuk pada biosintesis adalah Khalkon (Hahlbrock, 1980 ; Markham, 1988). Modifikasi flavonoid lebih lanjut mungkin terjadi pada berbagai tahap dan menghasilkan penambahan atau pengurangan hidroksilasi; metilasi gugus hidroksil atau inti flavonoid; isoprenilasi gugus hidroksil atau inti flavonoid; metilenasi gugus ortho-dihidroksil; dimerisasi (pembentukan biflavonoid); pembentukan bisulfat; dan yang terpenting, glikosida gugus hidroksil (pembentukan flavonoid O-glikosida) atau inti flavonoid (pembentukan flavonoid C-glikosida) (Harborne dkk., 1975; Markham, 1988)

b. Jenis substituen

Jenis substituen yang umum terdapat pada flavonoid adalah gugus hidroksi (-OH), metoksi (-OCH₃), metil (-CH₃), dan O-glikosida (mono, diglukosil, rhamnosil) (Manitto, 1981; Pramono dan Koensoemardijah, 1999). Ikatan antara aglikon dengan gugusan gula biasanya terletak pada posisi atom C₃, posisi lain yang biasa digunakan adalah C₇, C₅, dan C₄' pada O-glikosida sedangkan pada C-glikosida, terletak pada posisi C₆ dan C₈. Senyawa-senyawa flavonoid berbeda hanya dalam jumlah dan posisi gugus hidroksil, metoksi dan gugus lainnya yang tersubstitusi pada cincin A dan cincin B. Senyawa flavonoid yang terdapat di alam kebanyakan mempunyai pola oksigenasi tertentu, misalnya cincin A sering kali teroksidasi pada atom C₅ dan C₇ saja. Cincin B biasanya tersubstitusi oleh satu, dua atau tiga gugus hidroksil dan atau

metoksi pada atom C₃', C₄', C₅' kedudukan para, yaitu pada atom C₄' jarang termetilasi, sedangkan kedudukan orto dari C₄', yaitu C₃' dan C₅' sering termetilasi. (Pramono dan Koensoemardijah, 1999 *cit* Teguh, 2002)

c. Flavonoid O-glikosida

Flavonoid biasanya terdapat sebagai flavonoid O-glikosida; pada senyawa tersebut satu gugus hidroksil flavonoid atau lebih terikat pada satu gula atau lebih dengan ikatan hemisetal yang tak tahan asam. Pengaruh glikosida yang menyebabkan flavonoid menjadi kurang reaktif dan lebih mudah larut dalam air (cairan); sifat terakhir ini memungkinkan penyimpanan flavonoid didalam vakuola sel. (Markham, 1988).

d. Flavonoid C-glikosida

Gula dapat juga terikat pada atom karbon flavonoid dan dalam hal ini gula tersebut terikat langsung pada inti benzena dengan suatu ikatan karbon-karbon (misal : Apegenin 8-C beta-D-glukopiranosida (viteksin) yang tahan asam (bandingkan dengan O-glikosida). Glikosida yang demikian disebut C-glikosida. Sekarang gula yang terikat pada atom C hanya ditemukan pada atom C nomor 6 dan 8 dalam inti flavonoid. Jenis gula yang terlibat ternyata jauh lebih sedikit ketimbang jenis gula pada O-glikosida, biasanya dari jenis glukosa yang paling umum (misal : viteksin, orientin), dan juga galaktosa (misal : apegenin 8-C-galaktosa), ramnosa, xilosa, dan arabinosa. Jenis aglikon flavonoid yang terlibat pun sangat terbatas. Walaupun isoflavon, flavanon, dan flavonol kadang-kadang terdapat dalam bentuk C-glikosida, sebegitu jauh hanya flavon C-glikosida yang paling lazim ditemukan. (Markham, 1988).

e. Distribusi flavonoid

Flavonoid merupakan kandungan khas tumbuhan hijau dengan mengecualikan alga dan *hornwort*. Flavonoid sebenarnya terdapat semua bagian tumbuhan termasuk daun, akar, kayu, kulit, tepung sari, nektar, bunga, buah buni, dan biji. Hanya sedikit saja catatan yang melaporkan adanya flavonoid pada hewan misalnya dalam kelenjar bau berang-berang, propolis' (sekresi lebah) dan di dalam sayap kupu-kupu; itu pun dengan anggapan bahwa flavonoid tersebut berasal dari tumbuhan yang menjadi makanan hewan tersebut dan tidak dibiosintesis di dalam tubuh mereka. (Markham, 1988). Semua flavonoid, menurut strukturnya merupakan turunan senyawa induk flavon yang terdapat berupa tepung putih pada tumbuhan primula dan berpembuluh dan semuanya mempunyai sejumlah sifat yang sama. Dikenal sekitar sepuluh kelas flavonoid. Flavonoid terutama berupa senyawa yang larut dalam air. Mereka dapat diekstraksi dengan etanol 70% dan tetap ada dalam lapisan air setelah ekstrak ini dikocok dengan eter mianyak bumi. Flavonoid berupa senyawa fenol, karena itu warnanya berubah bila ditambah basa atau ammoniak; jadi mudah dideteksi pada kromatogram atau dalam larutan. Pada paku-pakuan terdapat banyak flavonoid polimetoksi atau polimetil. Pada tumbuhan tingkat tinggi terdapat pada semua bagian akar, batang, daun, kulit batang, biji, buah terutama suku Polygonaceae, Rutaceae, Legumenocae, Umbelliferae, dan Compositae. (Harborne, 1978).

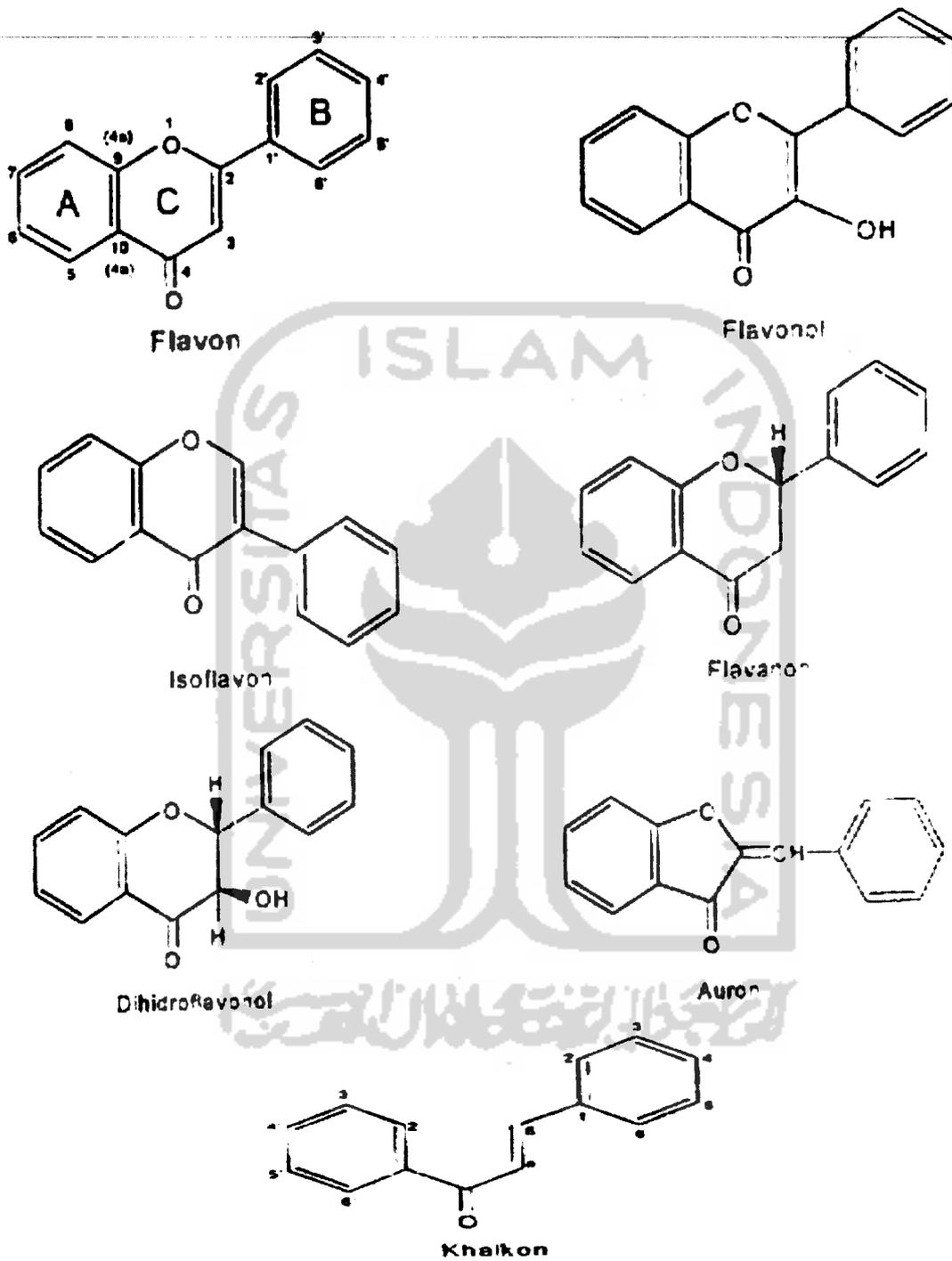
Flavonoid terdapat dalam tumbuhan sebagai campuran, jarang sekali dijumpai hanya flavonoid tunggal dalam jaringan tumbuhan. Disamping itu, sering terdapat campuran yang terdiri atas flavonoid yang berbeda kelas. (Harborne, 1967). Segi

penting dari penyebaran flavonoid dalam tumbuhan ialah adanya kecenderungan kuat bahwa tumbuhan yang secara taksonomi berkaitan akan menghasilkan flavonoid yang jenisnya serupa, jadi informasi yang berguna tentang jenis flavonoid yang mungkin ditemukan pada tumbuhan yang sedang ditelaah sering kali dapat diperoleh dengan melihat pustaka mengenai telaah flavonoid terdahulu dalam tumbuhan yang berkaitan, misal dari marga atau suku yang sama. (Markham, 1988)

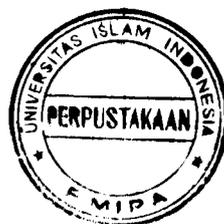
f. Penggolongan flavonoid

Penggolongan jenis flavonoid dalam jaringan tumbuhan mula-mula didasarkan kepada telaah sifat kelarutan dan reaksi warna. Kemudian diikuti dengan pemeriksaan ekstrak tumbuhan yang telah dihidrolisis, secara kromatografi satu arah. Akhirnya, flavonoid dapat dipisahkan dengan kromatografi dan spektrum, dengan memakai senyawa pembanding yang sudah dikenal. Senyawa baru yang ditemukan sewaktu menelaah memerlukan pemeriksaan kimia dan spektrum yang lebih terinci (Harborne, 1987)

Senyawa flavonoid selanjutnya dibedakan atas beberapa kelompok, yaitu flavon, flavonol, flavanon, dihidroflavonon, chalkon, auron, dan isoflavon, dengan flavon dan flavonol sebagai golongan terbesar. Kerangka dasar tipe-tipe flavonoid terlihat seperti pada gambar 2 :



Gambar 2. Kerangka dasar tipe-tipe flavonoid (Mabry *et al.*, 1970 ;Manitto, 1981)



g. Flavon dan flavonol

Flavon dan flavonol barang kali merupakan senyawa yang paling tersebar luas dari semua pigmen tumbuhan kuning. Mereka beragam dalam derajat hidroksilasi mulai dari flavon sendiri yang terdapat berupa serbuk pada bunga sejenis ros, *Primula* sp sampai nobiletin pada jeruk (*Citrus nobilis*). Akan tetapi senyawa turunan yang paling umum ialah hidroksilasi 5 dan atau 7 pada cincin A dan hidroksilasi 4' pada cincin B. Cincin B hanya dihidroksilasi pada posisi 3' dan 5' jika posisi 4' dihidroksilasi juga. Hidroksilasi pada pada 2' jarang ditemukan. Bagian gula yang terikat secara 4'-glikosida langka dan 6-glikosida belum dikenal (Robinson, 1995)

Flavon terdapat juga sebagai glikosida tetapi jenis glikosidanya lebih sedikit dari pada jenis glikosida flavonol. Jenis yang paling umum adalah 7-glukosida, contohnya luteolin 7-glukosida. Tidak seperti pada flavonol, flavon sungguh berbeda, terdapat juga yang terikat pada gula melalui ikatan karbon-karbon. Ikatan karbon-karbon sangat tahan terhadap hidrolisis asam sehingga membedakan C-glikosida dengan O-glikosida yang lebih mudah terhidrolisis menjadi relatif mudah. (Harborne, 1987)

h. Flavanon dan dihidroflavonol

Senyawa ini terdapat hanya sedikit sekali jika dibandingkan dengan flavonoid lain. Mereka tak warna atau hanya kuning sedikit. Karena konsentrasinya rendah dan tak berwarna, maka sebagian besar diabaikan. Flavanon (atau dihidroflavon) sering terjadi sebagai aglikon tetapi beberapa glikosidanya dikenal, misalnya hesperidin dan naringin dari kulit buah jeruk (aglikonnya hesperitin naringenin). Flavon (atau

dihidroflavonol) barangkali merupakan flavonoid yang paling kurang dikenal dan kita tidak mengetahui apakah senyawa ini terdapat sebagai glikosida (Robinson, 1995)

i. Sifat-sifat flavonoid

Kelarutan senyawa flavonoid secara individual sangat bermacam-macam sehingga sulit untuk menentukan kelarutannya secara umum. Aglikon flavonoid yang banyak mengalami metilasi pada umumnya larut dalam eter, tetapi tidak larut dalam air.

j. Ekstraksi flavonoid

Menurut Trease dan Evans (1978) kelarutan flavonoid dalam berbagai macam pelarut berbeda-beda tergantung pada golongan dan substitusi yang terjadi. Oleh karena itu, dalam memilih penyari yang akan digunakan untuk mengekstraksi harus disesuaikan dengan sifat polaritas atau kelarutan dari senyawa tersebut (Markham, 1988)

Bila flavonoid terdapat dalam vakuola sel, umumnya bersifat hidrofilik, maka penyarian dilakukan dengan menggunakan air atau pelarut-pelarut alkoholik. Bila flavonoidnya terdapat dalam kloroplas digunakan pelarut-pelarut non polar sebelum melakukan penyarian dengan alkohol (Goodwin, 1976)

Pelarut yang digunakan untuk mengekstraksi dipilih menurut polaritas flavonoid yang telah dikaji dari pustaka. Pelarut yang kurang polar khusus untuk mengidentifikasi aglikon, sedangkan yang paling polar digunakan untuk glikosida. Aglikon yang kurang polar seperti isoflavon dan aglikon yang lain, biasanya diekstraksi dengan pelarut dengan pelarut alkoholik umumnya merupakan pelarut

pilihan untuk mengekstraksi semua golongan flavonoid (Markham, 1988). Ekstraksi awal dengan petroleum eter atau heksan sering dilakukan untuk membebaskan bahan tanaman dari sterol, karoten, klorofil dan sebagainya. Namun, perlu diperhatikan bahwa perlakuan ini mungkin dapat menyebabkan hilangnya aglikon flavonoid tertentu (Harborne, 1967).

Bila digunakan lebih dari satu pelarut maka dicoba dari yang paling lipofilik ke hidrofilik seperti petroleum eter, lalu eter, etil asetat, kemudian baru pelarut yang bercampur dengan air. Penggunaan pelarut dengan polaritas yang bervariasi akan memisahkan glikosida dari aglikon dan memisahkan aglikon yang polar dari yang non polar (Pramono, 1994; Mabry *et al.*, 1970; Markham, 1988).

k. Isolasi dan pemurnian flavonoid

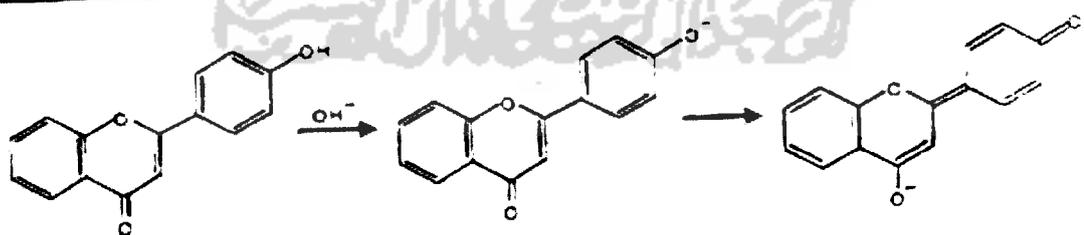
Kromatografi kertas (KKt) mungkin merupakan cara kromatografi yang paling umum dan berguna pada saat ini. Analisis pendahuluan ekstrak tumbuhan untuk menguji adanya flavonoid tepat sekali dilakukan dengan cara ini, sedangkan pemisahan biasanya dilakukan dengan kromatografi kertas dua arah (KKt 2A), menurun.

Tipe flavonoid yang dipisahkan akan berpengaruh dalam memilih fase gerak dan fase diam dari kromatografi (Markham, 1988). Keuntungan metode dari KKt dan KLT dalam mengisolasi campuran flavonoid adalah sampel yang relatif sedikit dengan waktu yang cukup singkat.

1. Identifikasi flavonoid

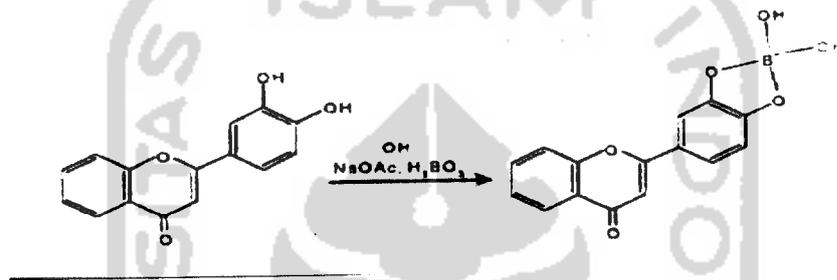
Dalam mengidentifikasi senyawa flavonoid sangat berhubungan erat dengan struktur molekul flavonoid, karena flavonoid merupakan senyawa fenolik-fenolik bersifat asam, jika bereaksi dengan basa akan berubah warnanya. Hal ini disebabkan terbentuknya gugus kuinoid dengan ikatan rangkap lebih panjang, sehingga panjang gelombang bergeser kepanjang gelombang sinar tampak (Silverstein *et al.*, 1974).

Deteksi bercak dilakukan tanpa uap amoniak dan dengan uap amoniak (Markham, 1988; Purwaningsih, 2001; Handayani, 1998). Deteksi bercak dapat dilakukan dengan menggunakan pereaksi semprot vanilin HCl ; FeCl₃ 5% ; AlCl₃ 5% ; dan preaksi Dragendorff (Markham, 1998; Handayani, 1998; Astuti, 2002). Flavonoid menjadi kuning terang atau jingga dalam larutan basa dan dapat dideteksi jika bagian tumbuhan tidak berwarna diuapi amoniak. Timbulnya warna ini disebabkan oleh pembentukan garam dan terbentuknya struktur kuinoid pada cincin B seperti pada gambar 3:



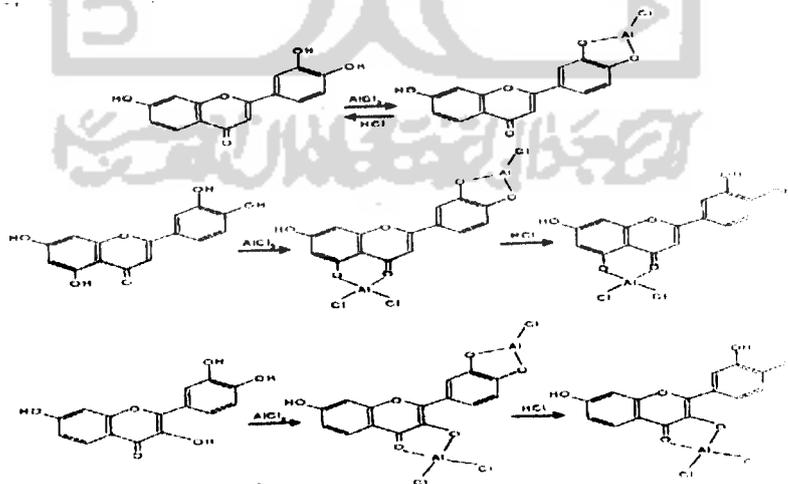
Gambar 3 . Pembentukan struktur kuinoid dari flavonoid dengan penambahan basa (Robinson, 1995)

Asam borat dengan adanya natrium asetat dapat membentuk kompleks dengan sistem ortodihidroksi pada semua lokasi inti flavon kecuali pada sistem ortodihidroksi C₅ dan C₆ (Mabry *et al.*, 1970 ; Harborne, 1987). Reaksi NaOAc/H₃BO₃ pada kedudukan ortodihidroksi akan memberikan warna kuning yang intensif, sebagaimana terlihat pada gambar 4 :



Gambar 4 . Reaksi kompleks flavonoid dengan asam borat dan natrium Asetat (Mabry *et al.*, 1970)

Adapun pembentukan kompleks antara flavonoid dengan aluminium (III) Klorida akan memberikan warna kuning dengan reaksi seperti pada gambar 5 :



Gambar 5 . Reaksi pembentukan kompleks flavonoid dengan AlCl₃ (Mabry *et al.*, 1970)

j. Manfaat flavonoid

Flavonoid dapat bekerja sebagai inhibitor kuat pernafasan, juga menghambat fosfodifester. Flavonoid lainnya menghambat aldoreduktase, mono amina oksidase, protein kinase, balik transkriptase, DNA polimerase dan lipooksigenase. Karena flavonoid merupakan senyawa preduksi yang baik, karena banyak menghambat reaksi oksidasi, baik secara enzim maupun non enzim. Flavonoid bertindak sebagai penampung yang baik radikal hidroksi dan superoksida dan dengan demikian melindungi lipid membran terhadap reaksi yang merusak. Aktivitas antioksidannya mungkin dapat menjelaskan mengapa flavonoid tertentu merupakan komponen aktif tumbuhan yang digunakan sebagai secara tradisional untuk mengobati gangguan fungsi hati. Dari berbagai efek terhadap macam-macam organisme yang sangat banyak sehingga dapat dijelaskan mengapa tumbuhan yang mengandung flavonoid dipakai dalam pengobatan tradisional.

4. Uraian tentang kromatografi kertas

Kromatografi adalah metode pemisahan analisis dan preparatif, dimana sampel dipisahkan berdasarkan pada perbedaan perpindahan sampel dalam sistem dua fase. Gaya perpindahan yang terjadi adalah secara fisika dan kimia (Gasparic dan Chuzacek, 1978 *cit* Teguh, 2002) Kromatografi kertas pada hakekatnya adalah KLT pada lapisan tipis selulosa atau kertas. Kedua cara ini serupa dalam hal fase diamnya berupa lapisan tipis dan fase gerak mengalir karena kerja kapiler. Perbedaannya dalam sifat dan fungsi fase diam (Gritter dkk., 1991; *Cit* Teguh, 2002). Pemilihan teknik kromatografi sebagian besar bergantung pada sifat kelarutan dan keatsirian

senyawa yang akan dipisahkan. Kromatografi kertas dapat digunakan terutama bagi kandungan tumbuhan yang mudah larut dalam air (Harborne, 1987).

Satu keuntungan utama kromatografi kertas ialah kemudahan dan kesederhanaan pada pelaksanaan pemisahan, yaitu hanya pada lembaran kertas saring yang berlaku sebagai medium pemisahan dan juga sebagai penyangga (Harborne, 1967). Keuntungan lain adalah keterulangan bilangan Rf yang besar pada kertas sehingga pengukuran Rf merupakan parameter yang berharga dalam memaparkan senyawa tumbuhan baru (Harborne, 1987)

a. Fase diam.

Kromatografi kertas merupakan perkembangan dari sistem partisi yang menggunakan kertas sebagai penunjang fase diam. Fase diam umumnya adalah air, yang dipegang secara absorpsi oleh molekul selulosa dari kertas, yang selanjutnya ditahan dalam posisi yang tetap oleh struktur serabut dari kertas (Sabikis dkk., 1986; *cit* Teguh, 2002)

b. Fase gerak

Fase gerak adalah medium angkut dan terdiri atas satu atau beberapa pelarut. Ia bergerak di dalam fase diam, yaitu suatu lapisan berpori, karena adanya gaya kapiler (Stahl, 1985). Fase gerak biasanya merupakan campuran yang terdiri atas satu komponen organik yang utama, air dan berbagai tambahan seperti asam-asam, basa atau pereaksi-pereaksi kompleks untuk memperbesar kelarutan dari beberapa senyawa atau untuk mengurangi yang lainnya (Sabikis dkk., 1986; Sastrohamidjojo, 1991)

Untuk penilaian pendahuluan kandungan flavonoid suatu ekstrak sudah menjadi suatu kebiasaan umum untuk menggunakan pengembang beralkohol pada pengembangan pertama pada kromatografi kertas, misalnya BAW (n-BuOH-HOAc-H₂O; 4 : 1 : 5 v/v) atau TBA (t-BuOH- HOAc-H₂O ; 3: 1 : 1 v/v) (Markham, 1988).

Persyaratan pokok untuk pelarut sebagai fase gerak dalam kromatografi kertas adalah harus murah, murni, tidak terlalu mudah menguap agar dapat dicapai keseimbangan yang seksama tetapi cukup mudah menguap agar bila percobaan telah selesai mudah dihilangkan dari kertas, dan kecepatan pengaliran harus tidak sangat dipengaruhi oleh pergantian suhu (Sabikis dkk., 1986 *cit* Teguh, 2002)

c. Metode identifikasi

Keberhasilan dari pemisahan kromatografi tergantung juga pada proses deteksi. Senyawa-senyawa yang berwarna tentu saja terlihat sebagai noda-noda berwarna pada akhir pengembangan. Untuk senyawa-senyawa tak berwarna memerlukan deteksi secara kimia dan fisika. Sering menjadi pekerjaan rutin bahwa kromatogram-kromatogram diuji dibawah sinar UV sebelum dan sesudah setiap metode dikerjakan (Sastrohamidjojo, 1990). Kebanyakan senyawa fenol (terutama flavonoid) dapat dideteksi pada kromatogram, berdasarkan warnanya atau flourosensinya dibawah sinar UV, warnanya diperkuat atau berubah bila diuapi amoniak.

(Harbone, 1987 *cit* Teguh, 2002)

Menurut Mabry *et al.*, (1970) dan Markham (1988), hubungan antara warna bercak dibawah sinar UV 366 nm sebelum dan sesudah diuapi amoniak dengan struktur terlihat pada tabel I

Tabel I. Hubungan warna bercak dan struktur flavonoid (Markham, 1988)

WARNA BERCAK		Jenis flavonoid
Sinar UV	Sinar UV / NH ₃	
Lembayung gelap	Kuning, Hijau-Kuning, atau Hijau	<ol style="list-style-type: none"> 1. Biasanya flavon dengan 5-OH atau flavonol 3-OH tersubstitusi, dengan 5-OH dan 4'-OH 2. Kadang-kadang 5-OH flavanon dan 4'-OH khalkon tanpa OH pada cincin B
	Perubahan warna sedikit atau tanpa perubahan warna	<ol style="list-style-type: none"> 1. Flavon atau flavonol tersulih pada 3-O mempunyai 5-OH bebas 2. Beberapa 6- atau 8-OH flavon dan flavonol tersulih pada 3-O serta mengandung 5-OH 3. Isoflavon, dihidroflavonol, biflavonil dan beberapa flavanon yang mengandung 5-OH. 4. Khalkon yang mengandung 2'- atau 6'-OH tetapi tidak mengandung 2- atau 4-OH bebas
	Biru Muda	Beberapa 5-OH flavanon
	Merah atau Jingga	Khalkon yang mengandung 2- dan atau 4-OH bebas
Flourosensi biru muda	Flurosensi hijau-Kuning atau hijau biru	<ol style="list-style-type: none"> 1. Flavon dan flavanon yang tak mengandung 5-OH, missal 5-OH-glikosida 2. Flavonol tanpa 5-OH bebas tetapi tersulih pada 3-OH
	Perubahan warna sedikit atau tanpa perubahan	Isoflavon yang tak menagandung 5-OH bebas
Tak tampak	Flourosensi biru	Isoflavon tanpa 5- OH bebas
Kuning redup dan kuning atau flurosensi jingga	Perubahan warna sedikit atau tanpa perubahan	Flavonol yang mengandung 3-OH bebas yang mempunyai 5-OH bebas(kadang-kadang berasal dari dihidroflavonol)
Flourosensi kuning, hijau, kuning-biru, atau hijau	Jingga atau merah	Auron yang mengandung 4'-OH bebas dan beberapa 2- atau 4-OH khalkon
	Perubahan sedikit atau tanpa warna	<ol style="list-style-type: none"> 1. Auron yang tak mengandung 4'-OH bebas dan flavanon tanpa 5-OH bebas 2. 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 flurosensi kuning	Biru	Sebagian Besar antosianidin 3,5 diglikosida
Kuning pucat	Kuning terang-Ungu	Dihidroflavonol tanpa 5-OH bebas

Metode identifikasi yang paling mudah adalah berdasarkan pada kedudukan dari noda relatif terhadap permukaan pelarut, menggunakan harga R_f . Kadang-kadang, terutama pada gugus-gugus yang besar dari senyawa-senyawa yang susunan kimianya mirip, seperti asam-asam amino, harga R_f sangat berdekatan satu sama lain. Dalam hal ini perlu melakukan teknik dua jalan. Kertas yang berbentuk persegi digunakan dan cuplikan ditempatkan pada satu sudut (Satrohamidjojo, 1991 *cit* Teguh, 2002)

Bilangan R_f diperoleh dengan mengukur jarak titik awal kepusat bercak yang dihasilkan senyawa dan jarak ini dibagi dengan jarak antara titik awal kegaris depan, yaitu jarak yang ditempu cairan pengembang (Harbone, 1987)

$$R_f = \frac{\text{Jarak yang ditempu oleh senyawa}}{\text{Jarak yang ditempu oleh pelarut}}$$

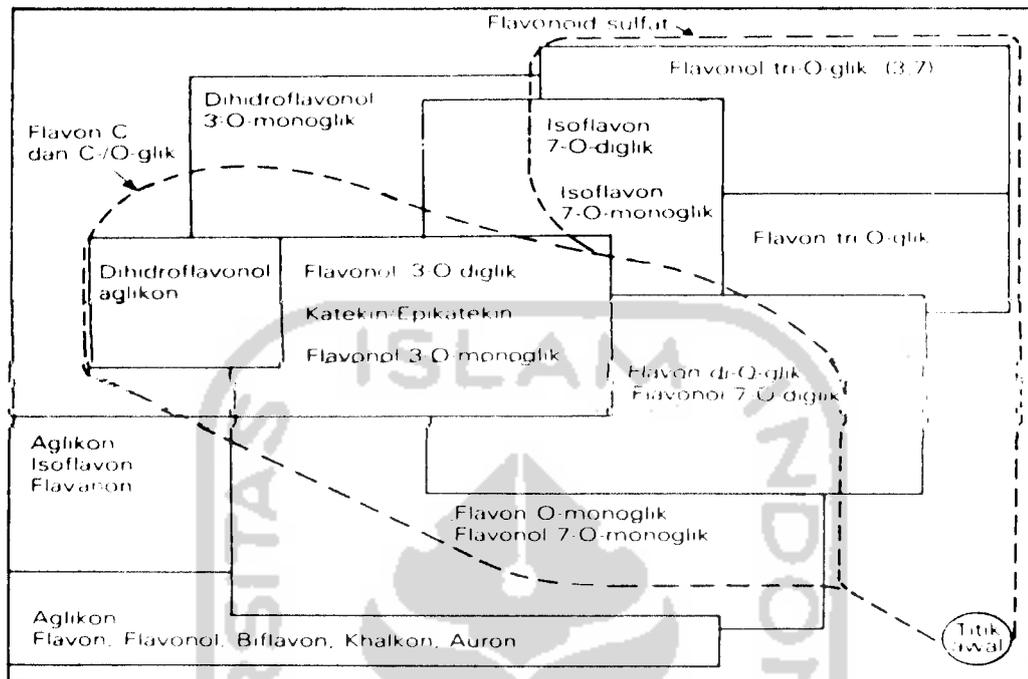
Angka R_f berkisar antara 0,00 – 1,00 dan hanya dapat ditentukan dua desimal. hR_f adalah angka R_f dikalikan faktor 100 (h), menghasilkan nilai berkisar antara 0 – 100 . Hasilnya merupakan bilangan utuh (Stahl, 1985)

Identifikasi bercak senyawa pada kromatogram dapat dilakukan dengan tiga cara : pertama, bercak langsung dilihat dengan sinar tampak atau ultraviolet, kedua bercak terlebih dahulu disemprot atau diuapi dengan pereaksi tertentu, kemudian dilihat pada sinar tampak atau ultraviolet. Ketiga bercak dikerok lalu diidentifikasi dengan beberapa cara, misalnya dengan ditambah pereaksi tertentu dalam tabung dan mencari panjang gelombangnya pada serapan maksimum (Macek, 1972).

d. Kromatografi kertas dua arah.

Kromatografi Kertas mungkin merupakan cara kromatografi yang paling umum dan berguna yang tersedia pada saat ini. Analisis pendahuluan ekstrak tumbuhan untuk menguji adanya flavonoid tepat sekali dilakukan dengan cara ini, sedangkan pemisahan biasanya dilakukan dengan cara kromatografi kertas dua arah (KKt 2A) menurun (Markham, 1988). Untuk pemisahan skala besar dapat digunakan lembaran kertas saring yang tebal (Whatman no 3 atau 3MM), dan kertas semacam ini dapat menampung beberapa mg senyawa perlembar (Harbone , 1987).

Cara yang populer untuk menelaah pola flavonoid dalam jaringan tumbuhan secara rutin ialah KKt 2A. Pola metode ini fase gerak pertama biasanya digunakan TBA, sedang fase gerak keduanya adalah asam asetat 15%. Perbedaan antara berbagai jenis flavonoid diketahui dari pemisahan pada daerah yang karakteristik pada kromatogram kertas dua arah. Sumber informasi struktur yang berharga adalah bercak pada kromatogram kertas dua arah. Bila kromatogram diletakkan sedemikian rupa sehingga titik awal berada pada sebelah kanan bawah, kromatogram akan menunjukkan penyebaran flavonoid seperti pada gambar 6 :



Gambar 6. Petunjuk penyebaran jenis flavonoid pada kromatogram kertas dua arah yang dikembangkan dengan TBA / HOAc 15% (Markham, 1988)

5. Uraian tentang spektrofotometri UV-Vis

a. Tinjauan umum

Spektroskopi adalah studi mengenai interaksi antara energi radiasi dengan materi. Interaksi akan menghasilkan spektrum yang berguna dalam elusidasi struktur. Jadi spektroskopi antara lain dapat memberikan informasi secara lengkap tentang struktur suatu senyawa (Hadjar, 1987). Spektroskopi serapan ultraviolet dan serapan tampak barangkali merupakan cara tunggal yang paling berguna untuk menganalisis struktur flavonoid. Cara tersebut digunakan untuk membantu mengidentifikasi jenis flavonoid dan menentukan pola oksigenasi. Disamping itu, kedudukan gugus hidroksil fenol bebas pada inti flavonoid dapat ditentukan dengan menambahkan pereaksi ('Pereaksi

geser') kedalam larutan cuplikan dan mengamati pergeseran puncak serapan yang terjadi. Dengan demikian secara tidak langsung cara ini berguna untuk menentukan kedudukan gula dan metal yang terikat pada salah satu gugus hidroksi fenol. (Markham, 1988).

Serapan cahaya oleh molekul dalam daerah spektrum UV-Vis tergantung pada struktur elektronik dari molekul. Spektrum UV-Vis dari senyawa- senyawa organik berkaitan erat transisi-transisi di antara tingkatan-tingkatan tenaga elektronik. Disebabkan karena hal itu, maka serapan radiasi UV-Vis sering dikenal sebagai spektroskopi elektronik. Transisi-transisi tersebut biasanya diantara orbital ikatan atau orbital pasangan bebas dan orbital non ikatan tak jenuh atau orbital inti ikatan (Sastrohamidjojo, 1985)

Panjang gelombang cahaya UV atau cahaya tampak tergantung pada mudanya promosi elektron. Molekul-molekul yang memerlukan energi lebih sedikit akan menyerap pada panjang gelombang yang lebih panjang (Fessenden dan Fessenden, 1994).

Bila suatu senyawa organik menyerap sinar UV atau tampak, maka di dalam molekul akan terjadi transisi elektron dari berbagai jenis tingkat energi orbital dalam molekul tersebut. Ada empat tipe transisi elektron, yaitu :

1) Transisi sigma ke sigma star ($\sigma \rightarrow \sigma^*$)

sebuah elektron yang terdapat dalam orbital ikatan σ akan tereksitasi ke orbital σ^* . energi yang diperlukan untuk jenis transisi ini besarnya sesuai dengan sinar frekuensinya tereletak di daerah UV vakum.

2) Transisi n ke sigma star ($n \rightarrow \sigma^*$)

Jenis transisi ini terjadi pada senyawa organik jenuh yang mengandung atom-atom yang mempunyai elektron bukan ikatan. Energi yang diperlukan untuk transisi ini lebih rendah dibandingkan dengan transisi σ ke σ^* . Dengan demikian sinar yang diserap mempunyai panjang gelombang yang lebih panjang, yaitu pada kisaran 150-250 nm. Umumnya terjadi pada panjang gelombang kurang dari 200 nm. Pada transisi ini pelarut akan menggeser puncak serapan ke panjang gelombang yang lebih pendek.

3) Transisi n ke phi star ($n \rightarrow \pi^*$) dan transisi phi ke phi star ($\pi \rightarrow \pi^*$)

Merupakan jenis transisi yang paling cocok untuk analisis, sebab energi yang dibutuhkan untuk terjadinya transisi sesuai dengan panjang gelombang yang berada pada daerah 200-700 nm. Dan panjang gelombang ini dapat digunakan pada spektrofotometer. Untuk terjadi transisi ini molekul senyawa organik harus mempunyai gugus fungsional tidak jenuh sehingga ikatan rangkap yang ada dalam gugus tersebut dapat menyediakan orbital π yang diperlukan.

Pengaruh pelarut yang makin polar maka perbedaan energi pada transisi n dan π^* makin besar, sehingga menyebabkan pergeseran biru, sedangkan pada transisi π ke π^* pelarut yang makin polar menyebabkan pergeseran merah.

(Skoog, 1985; Gandjar, 1991).

Dalam spektroskopi dikenal istilah sebagai berikut:

1) Gugus kromofor

Suatu gugus kovalen tidak jenuh yang dapat menyerap radiasi dalam daerah-daerah UV dan tampak. Hal ini disebabkan oleh adanya transisi elektron.

2) Gugus auksokrom

Suatu gugus fungsional bersifat jenuh yang tidak menyerap sinar UV di atas 200 nm, akan tetapi jika pada suatu gugus kromofor maka akan menyebabkan timbulnya pergeseran puncak serapan gugus kromofor tersebut ke panjang gelombang yang lebih besar dan dapat juga mempertinggi intensitasnya.

3) Pergeseran batokromik (pergeseran merah)

Pergeseran gelombang ke arah panjang gelombang yang lebih besar disebabkan adanya substituen atau pengaruh pelarut.

4) Pergeseran hipsokromik (pergeseran biru)

Pergeseran gelombang ke arah panjang gelombang yang lebih pendek.

5) Efek hiperkromik

Peristiwa bertambah besarnya intensitas serapan suatu gugus kromofor.

6) Efek hipokromik

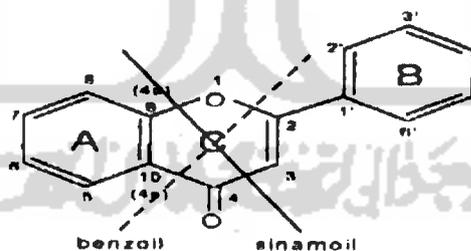
Peristiwa bertambah kecilnya intensitas serapan suatu gugus kromofor.

b. Spektrofotometri UV-Vis untuk flavonoid

Flavonoid mempunyai sistem aromatik yang terkonjugasi sehingga menunjukkan pita serapan kuat pada daerah spektrum UV-Vis (Harborne, 1987). Spektrum UV dari kebanyakan flavonoid mempunyai dua serapan maksimum yang terletak pada daerah

antara 240 – 280 nm (disebut pita II). Dan yang lain pada daerah antara 300 – 400 nm (disebut pita I). Pita II merupakan serapan dari cincin A bagian benzoil, dan pita I merupakan serapan dari cincin B bagian sinamoil. Intensitas dari masing-masing serapan tergantung pada panjangnya sistem terkonjugasi serta adanya substitusi terutama pada kedudukan atom C₃ dan C₅.

Untuk menganalisis struktur flavonoid, spektroskopi UV-Vis digunakan dalam mengidentifikasi jenis flavonoid dan menentukan pola oksigenasinya. Selain itu, kedudukan gugus hidroksilfenol bebas pada inti flavonoid dapat ditentukan dengan penambahan pereaksi geser ke dalam cuplikan dan diamati pergeseran puncak serapan yang terjadi. Secara tidak langsung, cara ini berguna untuk menentukan gula atau metal yang terikat pada salah satu gugus hidroksil fenol. Kerangka flavonoid dengan sistem konjugasi dan cincin benzoil sinamoilnya seperti pada gambar 7 :



Gambar 7 . Kerangka flavonoid dengan cincin benzoil dan sinamoil

Spektrum flavonoid biasanya ditentukan dalam larutan dengan pelarut metanol (MeOH, AR atau yang setara) atau etanol (EtOH), meski perlu diingat bahwa spektrum yang dihasilkan dalam etanol kurang memuaskan (Porter dan Markham,

1970). Spektrum khas terdiri atas dua pita maksimum pada rentang 240-285 nm (Pita II) dan 300-550 nm (Pita I). Kedudukan yang tetap dan kekuatan nisbi maksimal tersebut memberikan informasi yang berharga mengenai sifat flavonoid dan pola oksigenasinya. Ciri khas spektrum tersebut ialah kekuatan nisbi yang rendah pada pita I dalam hidroflavonon, dihidroflavonol, dan isoflavon serta kedudukan pada pita I pada spektrum chalkon, auron, dan antosianin yang terdapat pada panjang gelombang yang tinggi. Ciri ini nisbi tak berubah bahkan juga bila pola oksigenasi berubah, sekalipun rentang maksimal serapan pada jenis flavonoid yang berlainan tumpang tindih sebagai keberagaman pola oksigenasi. Petunjuk mengenai tentang maksimal utama yang diperkirakan untuk setiap jenis flavonoid disajikan pada tabel.II sebagai berikut :

Tabel II. Rentangan serapan spektrum UV-Vis flavonoid

Pita II	Pita I	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-dioksi-6,7-dioksigenasi)
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	Antosianidin dan antosianin

Penafsiran lengkap seperangkat spektrum yang diperoleh dengan tahapan kerja dengan penambahan pereaksi geser sering dilakukan, hanya dapat dilakukan jika informasi dari sumber lain juga tersedia. tetapi banyak informasi yang dapat diperoleh hanya dari spektrum saja. Menurut Markham, (1988) langkah awal dalam penentuan jenis flavonoid adalah sebagai berikut :

1. Langkah awal dalam menentukan jenis flavonoid dengan memperhatikan beberapa hal :

- a. Bentuk umum spektrum flavonoid.
- b. Panjang gelombang pita serapan.
- c. Data kromatografi kertas.

2. Langkah kedua ialah mempertimbangkan arti perubahan spektrum yang disebabkan oleh berbagai pereaksi geser. Penafsiran perubahan ini dibahas dengan kunci berupa tabel yang didasarkan pada jenis flavonoid disertakan untuk setiap pergeseran. Penafsiran tersebut terlihat pada tabel. III sebagai berikut :

Tabel III. 1 Penafsiran spektrum NaOMe (Markham, 1988)

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

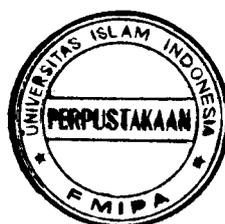
k = kira-kira

Tabel III.2 Penafsiran spektrum NaOAc (Markham, 1988)

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, mis 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)
Khalkon Auron		Kekuatan berkurang dengan bertambahnya waktu	Gugus yang peka terhadap basa, mis 6,7 atau 7, 8 di-OH
		Pergeseran batokrom atau bahu pada panjang gelombang yang lebih panjang	4' dan / atu 4-OH (khalkon) 4' dan / tanpa 6-OH (auron)

Tabel III.3 Penafsiran spektrum NaOAc/ H₃BO₃ (Markham, 1988)

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



Tabel III.4 Penafsiran spektrum AlCl_3 / dan AlCl_3 / HCl (Markham, 1988)

Jenis flavonoid	Pergeseran yang tampak		Petunjuk penafsiran
	Pita I	Pita II	
Flavon Flavonol (AlCl_3 /HCL) AlCl_3	+35 sampai 55 nm +17 sampai 20 nm Tak berubah		5-OH 5-OH dengan oksigenasi pada 6 mungkin 5-OH dengan gugus prenil pada 6
	+50 sampai 60 nm Pergeseran AlCl_3 / HCL tambah 30 sampai 40 nm		Mungkin 3-OH Dengan atau tanpa 5-OH 0-diOH pada cincin B
	Pergeseran AlCl_3 / HCL , tambah 20 sampai 25 nm		0-diOH pada cincin A(Tambahan pada pergeseran 0-diOH pada cincin B)
		+10 sampai 14 nm + 20 sampai 26 nm	5-OH (Isoflavon) 5-OH (flavanon , dihidroflavanol
Isoflavon Flavanon Dihidroflavanon (AlCl_3 / HCL) (AlCl_3)		Pergeseran AlCl_3 / HCL , tambah 11 sampai 30 nm	o-diOH pada cincin A (6, 7 dan 7,8)
		Pergeseran AlCl_3 / HCL, tambah 30 sampai 38 nm(peka terhadap NaOAc)	Dihidroflavanol tanpa 5-OH (tambahan pada sembarang pergeseran o-diOH)
	Auron khalkon	+48 sampai 64 nm + 40 nm	2'-OH (khalkon) 2'-OH (Khalkon) dengan oksigenasi pada 3'
AlCl_3	+ 60smpai 70 nm		4'-OH
	Pergeseran AlCl_3 /HCL tambah 40 sampai 70 nm		o-diOH pada cincin B
	Penambahan lebih kecil		Mungkin o-diOH pada cincin A
Antosianidin Antosianin (AlCl_3)	+ 25 sampai 35 nm (pada pH 2-4) Pergeseran lebih besar		o-diOH Banyak o-diOH atau o-diOH(3 Deoksiantosianidin)

B. Landasan Teori

Flavonoid merupakan senyawa alam yang tersebar disemua tumbuhan / tanaman. Daun waru yang dilaporkan antara lain sebagai obat anti radang dan anti toksik didalamnya terkandung senyawa flavonoid (Anonim, 2001) Untuk mengetahui jenis dan struktur senyawa flavonoid yang ada dalam daun waru dilakukan ekstraksi dengan pelarut yang sesuai berdasarkan sifat polaritas senyawa dan diisolasi dengan cara yang paling cocok berdasarkan sifat fisikokimia.

C. Keterangan Empirik yang Diharapkan

Penelitian ini bersifat eksploratif, diharapkan dapat ditemukan senyawa flavonoid dalam daun waru (*Hibiscus tiliaceus*, L.) yang dapat diisolasi secara kromatografi kertas dan diidentifikasi struktur parsialnya dengan metode spektrofotometri UV-Vis berdasarkan sifat fisiko-kimianya.

BAB III
METODE PENELITIAN

A. Alat dan Bahan

a. Alat-alat yang digunakan

1. Alat pembuatan serbuk.

Alat yang digunakan untuk pembuatan serbuk daun waru adalah blender dan ayakan.

2. Alat untuk penyarian dan fraksinasi

Alat yang digunakan adalah seperangkat alat gelas, rota evaporator, cawan porselen, almari es, corong pisah.

3. Alat untuk kromatografi

Alat yang digunakan adalah chamber kromatografi yang terbuat dari kayu (Sesuai konstruksi pada Mabry dkk halaman 5), Lampu UV 366 nm, kipas angin, *Hair dryer*, pipa kapiler kecil.

4. Alat untuk spektroskopi

Alat yang digunakan adalah seperangkat alat spektrofotometer UV-Vis model Hitachi seri 150 – 20 , buatan Jepang yang dilengkapi dengan pencatat (*recorder*) untuk skaning spektrum ultraviolet dari flavonoid.

b. Bahan-bahan yang digunakan :

1. Bahan utama

Bahan utama yang digunakan dalam penelitian ini adalah daun tanaman waru (*Hibiscus tiliceus*, L.) yang diperoleh dari Kecamatan Ngaglik, Kabupaten Sleman, Daerah Istimewa Jogjakarta.

2. Bahan kimia

Bahan untuk ekstraksi dan fraksinasi adalah petroleum eter, Etanol 70 % , Etil asetat, n-butanol, asam asetat glasial, aquades.

3. Bahan untuk Kkt. Bahan yang digunakan adalah :

Fase diam : Kertas Whatmann no 41 (Whatman International Ltd.)

Fase gerak : asam asetat 2 %, BAW (n-BuOH-HOAc-Air, 6 : 1 : 2 v/v)

4. Bahan deteksi awal flavonoid : uap amoniak

5. Bahan pereaksi diagnostik flavonoid untuk spektrofotometri UV-Vis adalah metanol, natrium hidoksida 2M, natrium asetat , asam borat , $AlCl_3$, asam klorida.

B. Jalannya Penelitian

1. Determinasi tumbuhan

Tumbuhan waru (*Hibiscus tiliaceus*, L.) didapat dari Kecamatan Ngaglik, Kabupaten Sleman, Daerah Istimewa Jogjakarta dideterminasi menurut buku “ Flora untuk sekolah di Indonesia “ ditulis oleh van Steenis 1975. Dan literatur “ *Flora of Java Spermatopytes only* “ ditulis oleh Backer dan Bakhuizen van den Brink(1965)

2. Penyiapan bahan utama

Daun waru (*Hibiscus tiliaceus*, L.) dipanen dari Kecamatan Ngaglik, Kabupaten Sleman, Daerah Istimewa Jogjakarta, pada waktu tanaman sedang berbunga belum berbuah pada bulan Maret. Daun yang telah didapat dicuci bersih, kemudian dikeringkan secara konvensional dengan sinar matahari di bawah kain hitam. Setelah kering daun tersebut diserbuk dengan menggunakan blender, kemudian diayak. Kemudian pada penelitian ini bahan utama yang digunakan adalah serbuk daun dari tumbuhan waru (*Hibiscus tiliaceus*, L.)

3. Penyarian flavonoid

Serbuk daun waru (*Hibiscus tiliaceus*, L.) ditimbang dengan berat tertentu, kemudian dilakukan penyarian dengan menggunakan metode maserasi atau maserasi berulang secara konvensional. Dalam penelitian ini dilakukan penyarian dengan dua penyari yaitu petroleum eter (PE) dan etanol 70 %. Pertama, serbuk diekstraksi dengan menggunakan PE secara bertahap, selanjutnya ekstrak PE dipisahkan dari bahan (ampas) dan disimpan dalam lemari es. Ampas yang telah dikeringkan diekstraksi kembali dengan menggunakan pelarut etanol 70 % secara bertahap pula. Ekstrak etanol yang didapat dan ampas dikeringkan kemudian disimpan. Ekstrak etanol yang didapat dipekatkan dengan menggunakan rota epevaporator. Selanjutnya ekstrak tersebut siap untuk difraksinasi.

4. Fraksinasi flavonoid

Pada penelitian ini ekstrak PE tidak difraksinasi, karena dianggap bersifat selektif terhadap senyawa non polar. Pada ekstrak etanol yang telah dipekatkan ditambah air 100 ml, kemudian difraksinasi dengan etil asetat 100 ml dengan menggunakan corong pisah secara bertahap, selanjutnya lapisan air difraksinasi kembali dengan n-butanol secara bertahap pula. Dengan demikian pada akhir fraksinasi diperoleh fraksi PE, fraksi etil asetat, fraksi n-butanol, dan fraksi air.

5. Pemeriksaan kandungan flavonoid secara KKt 2A

Keempat sampel yang diperoleh yaitu fraksi PE, fraksi etil asetat, fraksi n-butanol, dan fraksi air, masing - masing dilakukan pemeriksaan kandungan flavonoid dengan menggunakan KKt 2A. Fase gerak yang digunakan adalah asam asetat 2 %, BAW (6:1:2 v/v), sedangkan fase diam yang digunakan adalah kertas Whatman No 41. deteksi awal senyawa flavonoid dilakukan dengan menggunakan uap amoniak dan sinar UV 366 nm.

6. Isolasi flavonoid secara KKt 2A

Isolasi kandungan senyawa flavonoid dilakukan secara KKt 2A, yaitu dengan cara menotolkan sampel pada kertas kromatografi pada satu titik penotolan dengan jumlah sampel yang telah ditentukan. Fase diam yang digunakan adalah kertas Whatman No 41, sedangkan fase gerak pertama adalah BAW (6 : 1 : 2 v/v), dan fase gerak kedua adalah asam asetat 2 %. Masing-masing bercak dipisahkan dan dipotong kecil-kecil serta dikelompokkan berdasarkan warna yang terbentuk dan harga Rf-nya. Selanjutnya kertas yang sudah dipotong-potong kecil dimaserasi / dilarutkan dalam metanol p.a.

7. Identifikasi isolat flavonoid dengan spektrofotometer UV-Vis.

Untuk menganalisis senyawa flavonoid dan mengidentifikasi struktur parsialnya dilakukan dengan spektrofotometer UV-Vis. Senyawa flavonoid hasil isolasi dilarutkan dalam metanol p.a, kemudian dilakukan penambahan pereaksi diagnostik NaOH, NaOAc, NaOAc/H₃BO₃, AlCl₃ dan AlCl₃/HCl. Langkah-langkah identifikasi struktur parsial flavonoid dengan spektrofotometer UV-Vis adalah sebagai berikut :

Tahap I : Larutan isolat senyawa flavonoid dalam metanol dimasukkan dalam kuvet (5 ml larutan sampel), sebagai pembanding digunakan metanol p.a. tanpa sampel. Kedua larutan direkam spektrumnya secara bersama-sama pada panjang gelombang 200 - 450 nm dengan kecepatan scanning 800 nm/menit.

Tahap II : Larutan isolat senyawa flavonoid dalam metanol dari tahap I ditambahkan 3 tetes pereaksi diagnostik NaOH 2M, dicampur kemudian direkam spektrumnya. Setelah lima menit direkam kembali spektrumnya, untuk mengetahui kemungkinan terjadinya dekomposisi flavonoid.

Tahap III : Larutan isolat senyawa flavonoid dalam metanol yang baru ditambah serbuk NaOAc anhidrat p.a sedemikian rupa sehingga terdapat lapisan NaOAc kira-kira 2 mm, dicampur kemudian direkam spektrumnya.

Tahap IV : Larutan tahap III ditambahkan asam borat kira-kira setengah dari jumlah serbuk NaOAc yang digunakan, dicampurkan dan direkam spektrumnya.

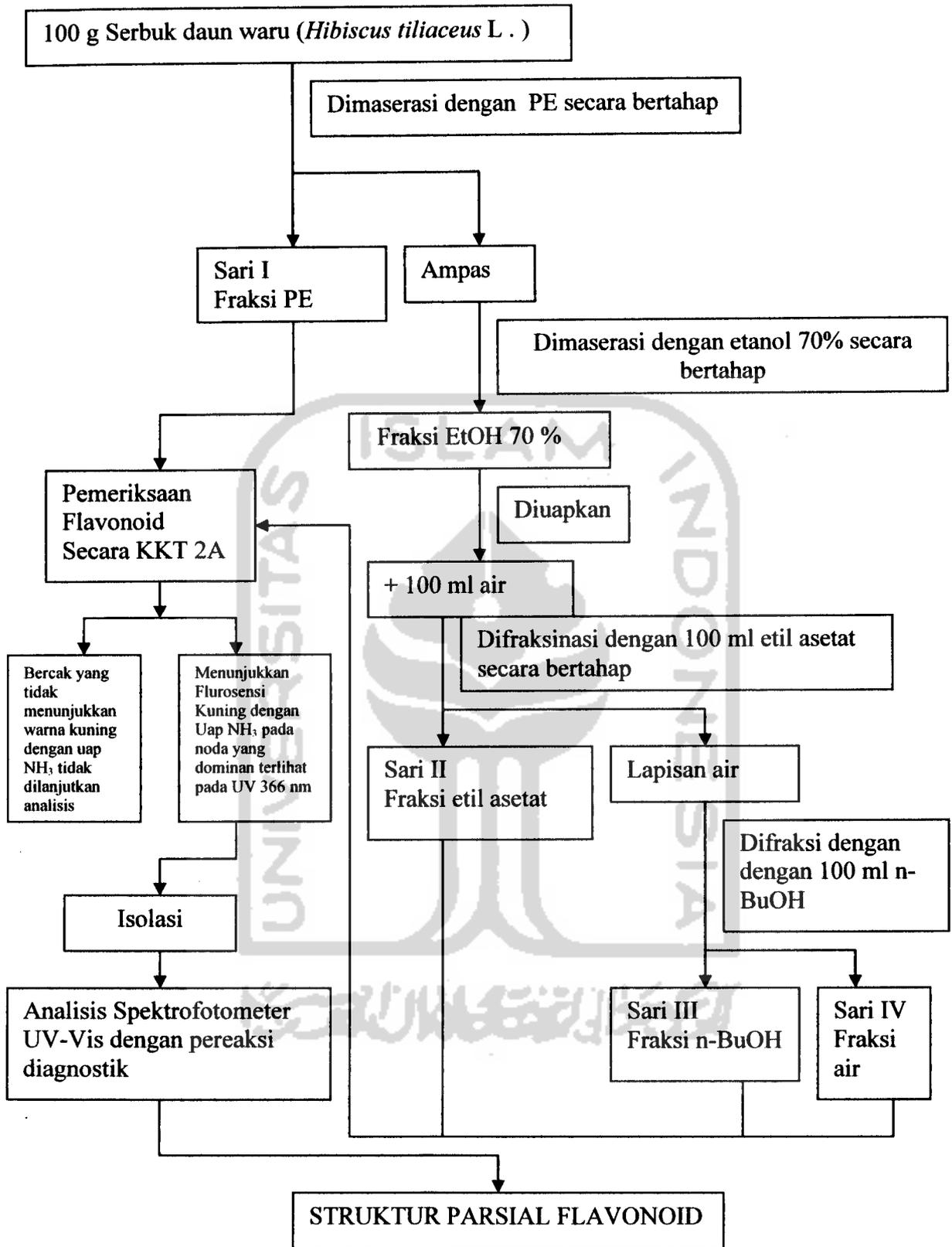
Tahap V : Larutan isolat senyawa flavonoid yang baru (5 ml) dalam metanol ditambahkan 6 tetes larutan AlCl₃, dicampurkan dan direkam spektrumnya.

Tahap VI : Larutan dari tahap V tersebut ditambahkan 3 tetes larutan HCl, dicampur dan direkam spektrumnya. (Mabry *et al.*, 1970; Harborne, 1987; Markham, 1988; Untoro, 1990 *cit* Teguh, 2002)

C. Analisis Hasil

Dalam penelitian ini digunakan metode analisis sebagai berikut :

1. Determinasi tumbuhan waru dengan menggunakan acuan buku “ Flora untuk sekolah di Indonesia “ ditulis oleh van Steenis tahun 1975 dan “ *Flora of Java Spermopytes only* “ ditulis oleh Backer dan Bakhuizen van den Brink(1965)
2. Hasil data berupa warna bercak pada kromatogram kertas , harga R_f. Pola spektrum UV-Vis dan pergeseran panjang gelombang yang terjadi karena adanya penambahan pereaksi diagnostik, kemudian dianalisis berdasarkan pustaka acuan dan dibandingkan dengan data yang dilaporkan.



Gambar 8. Skema jalannya penelitian

BAB IV
HASIL DAN PEMBAHASAN

A. Determinasi Tumbuhan

Determinasi tumbuhan merupakan langkah awal dalam penelitian ini untuk mendapatkan kebenaran identitas tumbuhan yang akan diteliti, sehingga dapat memberikan kepastian tentang tumbuhan tersebut. Hal ini dilakukan untuk menghindari kesalahan dalam pengumpulan bahan utama dan kemungkinan tercampurnya tumbuhan yang diteliti dengan tumbuhan lain. Determinasi dilakukan dengan mencocokkan dengan kunci-kunci determinasi sesuai petunjuk literatur “ *Flora of Java Spermatopytes only* “ ditulis oleh Backer Bakhuizen van den Brink (1965)

Hasil determinasi tanaman sebagai berikut :

1b-2a-3b-4b-12b-13b-14b-17b-18b-19b-20b-21b-22b-23b-24b-25b-26b-27a-28b-
29b-30b-31b-403b-404b-405bh414a-415b-416b-451a-452b-453c-
465b..... (Suku 96 Malvaceae)1a 2b (Hibiscus) 13
.....1a- 2a-3a (*Hibiscus tiliaceus*, L.)

B. Pengumpulan dan Penyiapan Bahan

Pengumpulan daun dilakukan didaerah Kecamatan Ngaglik, Kabupaten Sleman , Daerah Istimewa Jogjakarta pada bulan Maret 2004. Dengan penyiapan bahan sebagai berikut : Daun segar yang telah dipanen disortasi kemudian dibersihkan dengan mencuci menggunakan air, kemudian dikeringkan secara konvensional dibawah sinar matahari dengan menggunakan kain hitam. Pengeringan ini dimaksudkan untuk mengurangi perusakan maupun perubahan

kandungan kimia sekecil mungkin yang diakibatkan oleh reaksi enzimatis dan hidrolisis. Pengeringan yang dilakukan secara tidak langsung, dibawah kain hitam, hal ini dilakukan untuk mencegah perusakan atau perubahan kandungan kimia oleh sinar UV dari matahari.

Selanjutnya daun yang telah kering diserbuk dengan menggunakan blender, kemudian diayak untuk mendapatkan serbuk yang lebih halus dan untuk memisahkan dari kotoran yang terikut, sehingga dapat mengurangi gangguan yang mungkin terjadi pada proses analisis berikutnya oleh kotoran yang ada pada daun yang tidak diperlukan. Dimana tujuan penyerbukan ini adalah untuk memperluas permukaan kontak antara bahan dengan larutan ekstraksi, sehingga penyarian lebih efektif dan zat yang tersari lebih sempurna.

C. Ekstraksi Senyawa Flavonoid

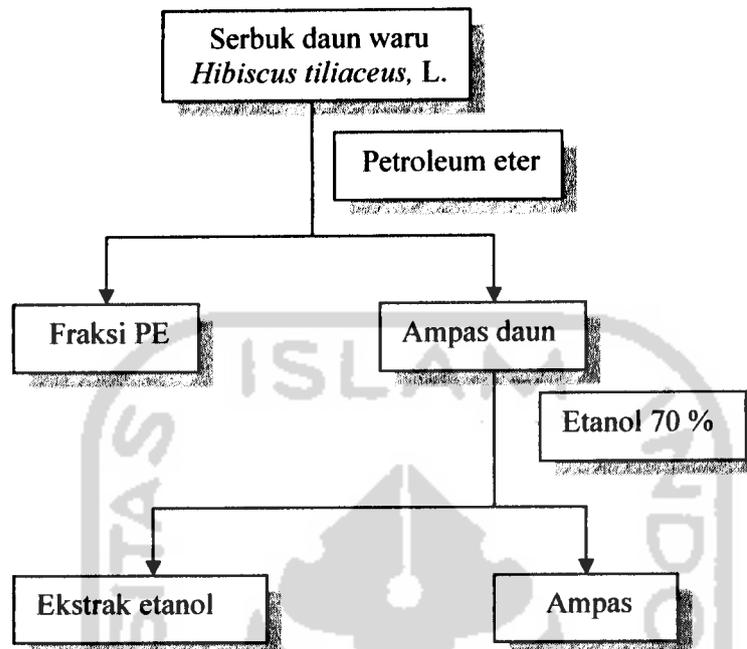
Penyarian dalam penelitian ini menggunakan metode maserasi dengan penyarian bertingkat menggunakan pelarut yang tingkat kepolarannya berbeda, penyari yang digunakan, yaitu petroleum eter (PE) dan etanol 70%. Penyarian ini merupakan prosedur yang biasa dilakukan untuk memperoleh kandungan senyawa organik dari jaringan tumbuhan kering (Harborne, 1987).

Dipilih cara maserasi sebab cara ini merupakan cara yang paling mudah pengerjaannya dan alat yang digunakan sederhana, mudah diusahakan dapat diefektifkan dengan penggojokan (pengadukan) atau remaserasi dan zat aktifnya tidak mudah rusak karena tidak ada faktor pemanasan. Selain memiliki keuntungan cara ini juga mempunyai kekurangan antara lain volume pelarut yang

dibutuhkan cukup banyak, pengerjaan yang lama dan penyarian kurang sempurna serta terjadinya kejenuhan sehingga pelarutan kandungan kimia terbatas.

Penyari yang digunakan berturut-turut adalah petroleum eter kemudian etanol 70%. Pertama kali serbuk diekstraksi menggunakan petroleum eter, bertujuan untuk menghilangkan senyawa-senyawa dengan polaritas rendah seperti lemak, karotin dan lilin yang akan mengganggu proses ekstraksi. Serbuk daun waru direndam dalam penyari sehingga larutan PE terlihat diatas permukaan serbuk, perendaman dilakukan selama 5 hari sambil sering digojok atau dilakukan pengadukan. Pengadukan diperlukan untuk meratakan konsentrasi larutan didalam serbuk simplisia, melalui upaya ini dapat dijamin bahan ekstraktif yang lebih cepat didalam cairan sehingga zat aktif dapat larut dan larutan yang terpekat akan terdesak keluar. Selanjutnya, setelah 5 hari disaring, ampas dikeringkan dalam udara terbuka. Penyarian ini dilakukan secara bertahap dengan dua kali penyarian. Tujuan pengeringan ampas sebelum direndam dengan penyari lain adalah untuk menghilangkan sisa pelarut yang digunakan sebelumnya.

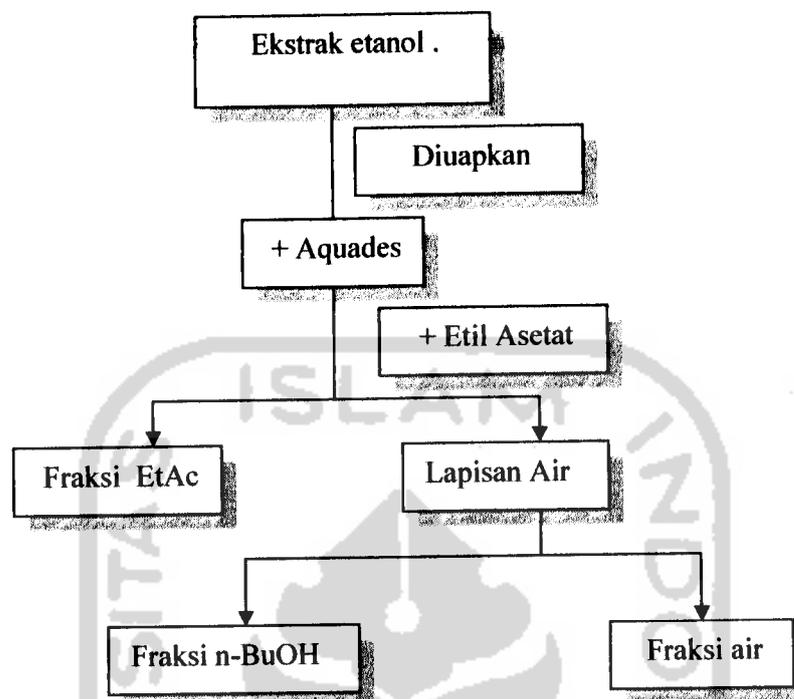
Penyari yang kedua menggunakan etanol 70 %, yang merupakan pelarut yang baik untuk senyawa hidrofilik dan lipofilik serta lebih polar dibanding petroleum eter. Filtrat etanol yang didapatkan dipekatkan dengan menggunakan rota evaporator. Selanjutnya ekstrak siap untuk difraksinasi.



Gambar 9. Skema ekstraksi senyawa flavonoid

D. Fraksinasi Senyawa Flavonoid

Hasil ekstraksi dengan pelarut PE tidak difraksinasi, karena dianggap bersifat selektif terhadap senyawa non polar. Fraksinasi dilakukan dengan sistem cair-cair. Tujuan fraksinasi ini adalah untuk memisahkan senyawa flavonoid sesuai dengan tingkat polaritasnya. Pada ekstrak etanol yang telah dipekatkan dengan rotaevaporator ditambahkan air 100 ml, kemudian difraksinasi dengan etil asetat menggunakan corong pisah secara bertahap. Setelah lapisan air dan etil asetat dipisahkan maka didapatkan fraksi etil asetat. Selanjutnya lapisan air difraksinasi kembali dengan n-butanol secara bertahap pula. Dengan demikian pada akhir fraksinasi diperoleh fraksi PE, fraksi etil asetat, fraksi n-butanol, dan fraksi air.

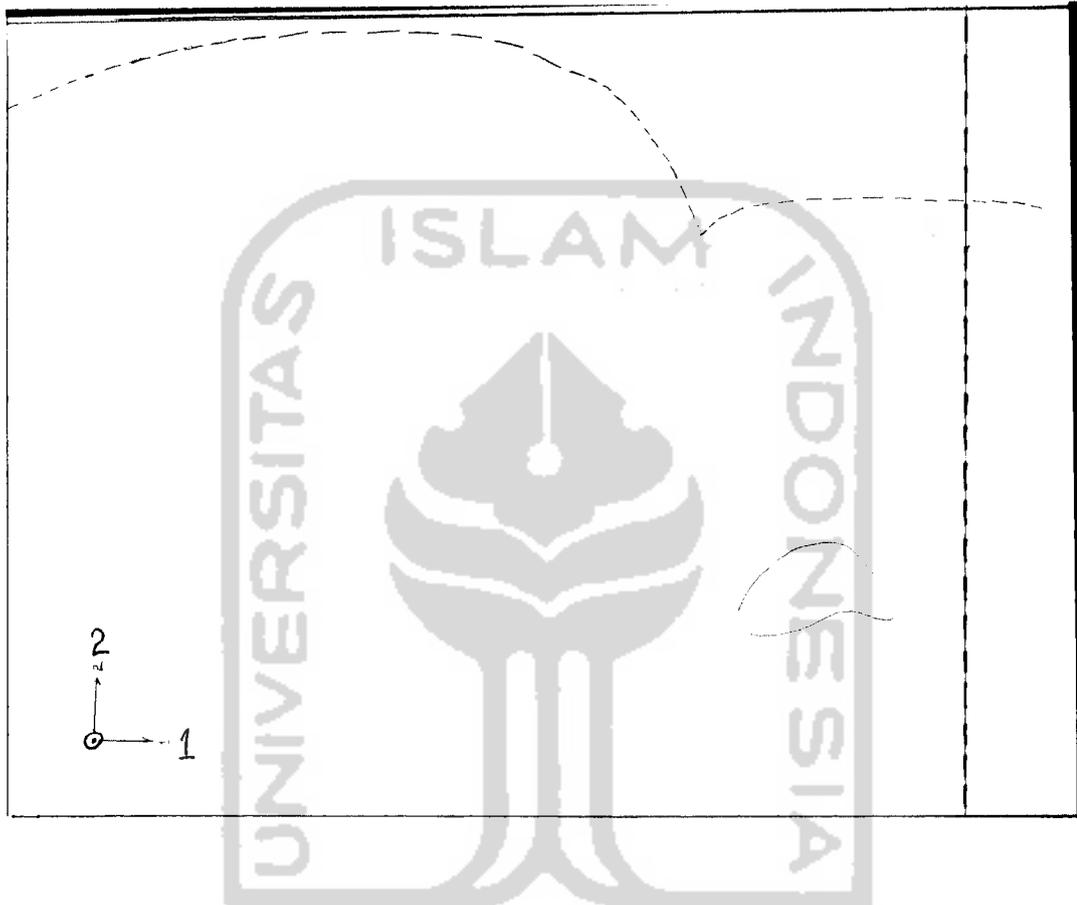


Gambar 10. Skema fraksinasi senyawa flavonoid

E. Pemeriksaan Kandungan Senyawa Flavonoid

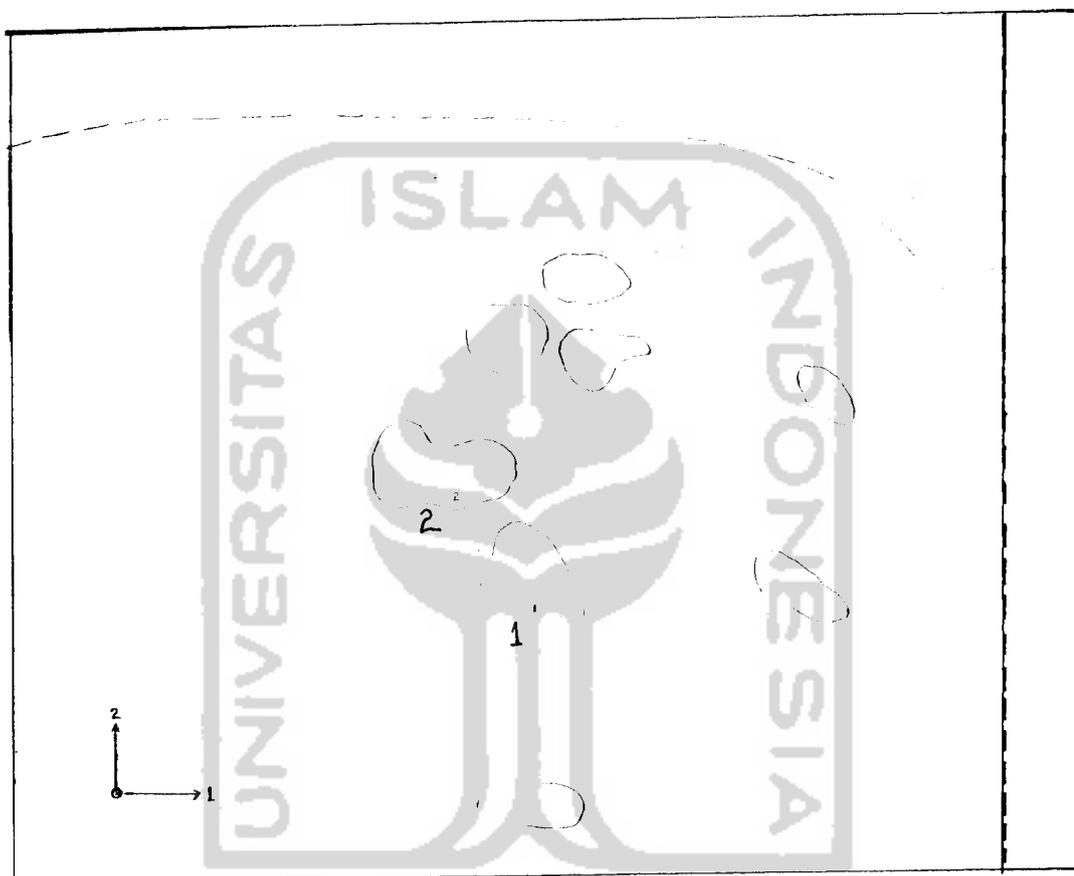
Hasil ekstraksi PE dan dan fraksinasi yang diperoleh yaitu faraksi etil asetat , fraksi n-butanol, dan fraksi air, masing-masing dilakukan pemeriksaan kandungan flavonoidnya dengan menggunakan KKt 2A dengan menggunakan fase gerak awal, yaitu TBA (6 : 1 : 2 v/v) dan fase gerak kedua asam asetat 2 %, sedangkan untuk fase diam yang digunakan adalah kertas Whatman No 41.

Dari pemisahan dengan beberapa pengembang tersebut, didapat pemisahan yang memuaskan untuk masing-masing fraksi. Adapun kromatogram yang diperoleh terlihat pada gambar 11, 12, 13, 14 sedangkan data kromatogram dapat dilihat pada table IV.



Gambar 11. Kromatogram kertas dua arah fraksi PE dengan fase gerak BAW (1) serta asam asetat (2)

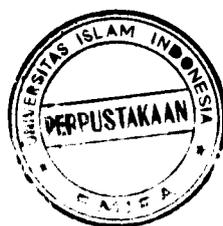
Keterangan : Terdapat 1 noda dengan harga Rf 0.91 fase BAW dan 1.29 untuk fase HOAc 2%

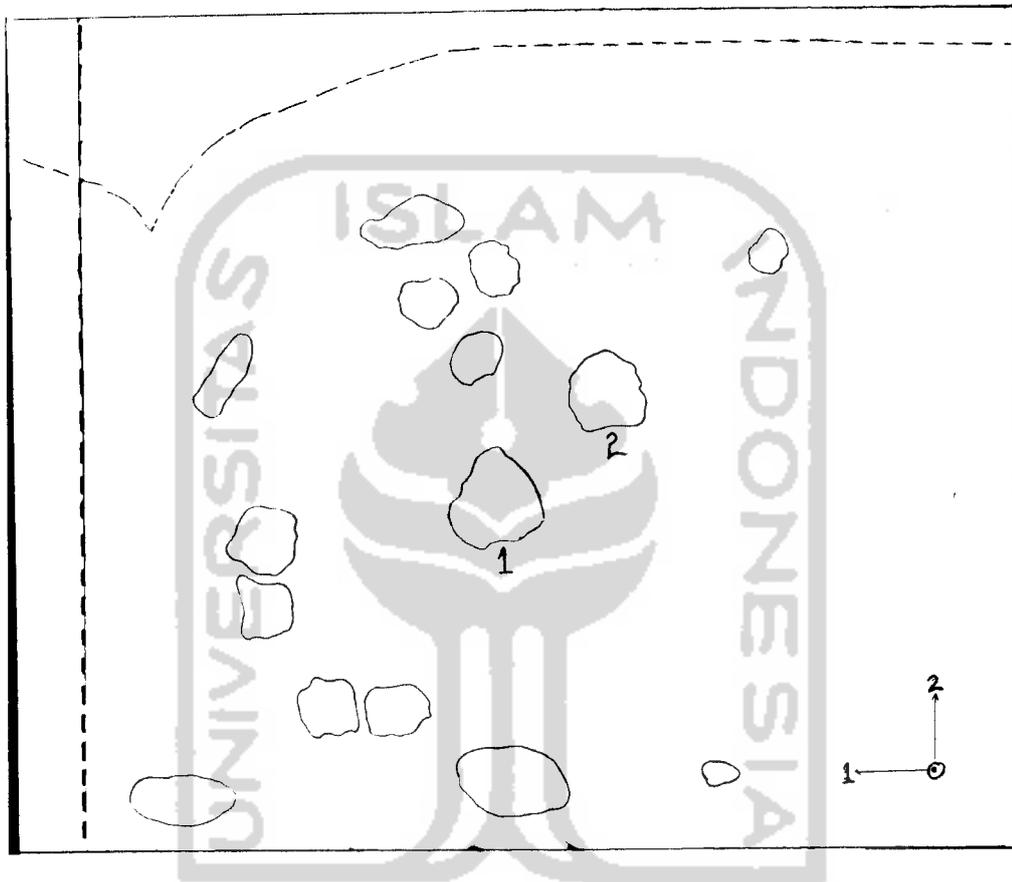


Gambar 12. Kromatogram kertas dua arah fraksi etil asetat dengan fase gerak BAW (1) serta asam asetat (2)

Keterangan : Terdapat delapan noda dan 2 noda diidentifikasi dengan harga R_f :

1. Noda nomor satu 0.46 untuk fase BAW dan 0.34 untuk fase HOAc
2. Noda nomor dua 0.36 untuk fase BAW dan 0.36 untuk fase HOAc

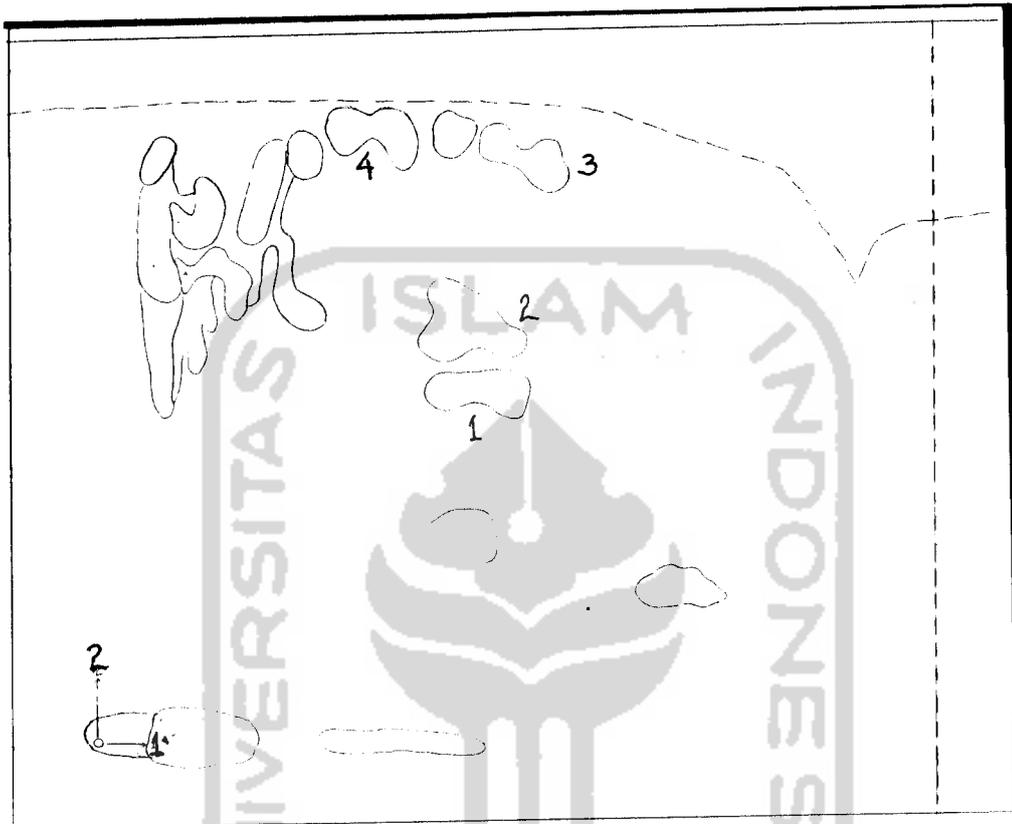




Gambar 13. Kromatogram kertas dua arah fraksi n-butanol dengan fase gerak BAW (1) serta asam asetat (2)

Keterangan : Terdapat 15 Noda dan 2 noda diidentifikasi dengan harga Rf :

1. Noda nomor satu 0.51 untuk fase BAW dan 0.31 untuk fase HOAc
2. Noda nomor dua 0.62 untuk fase BAW dan 0.52 untuk fase HOAc



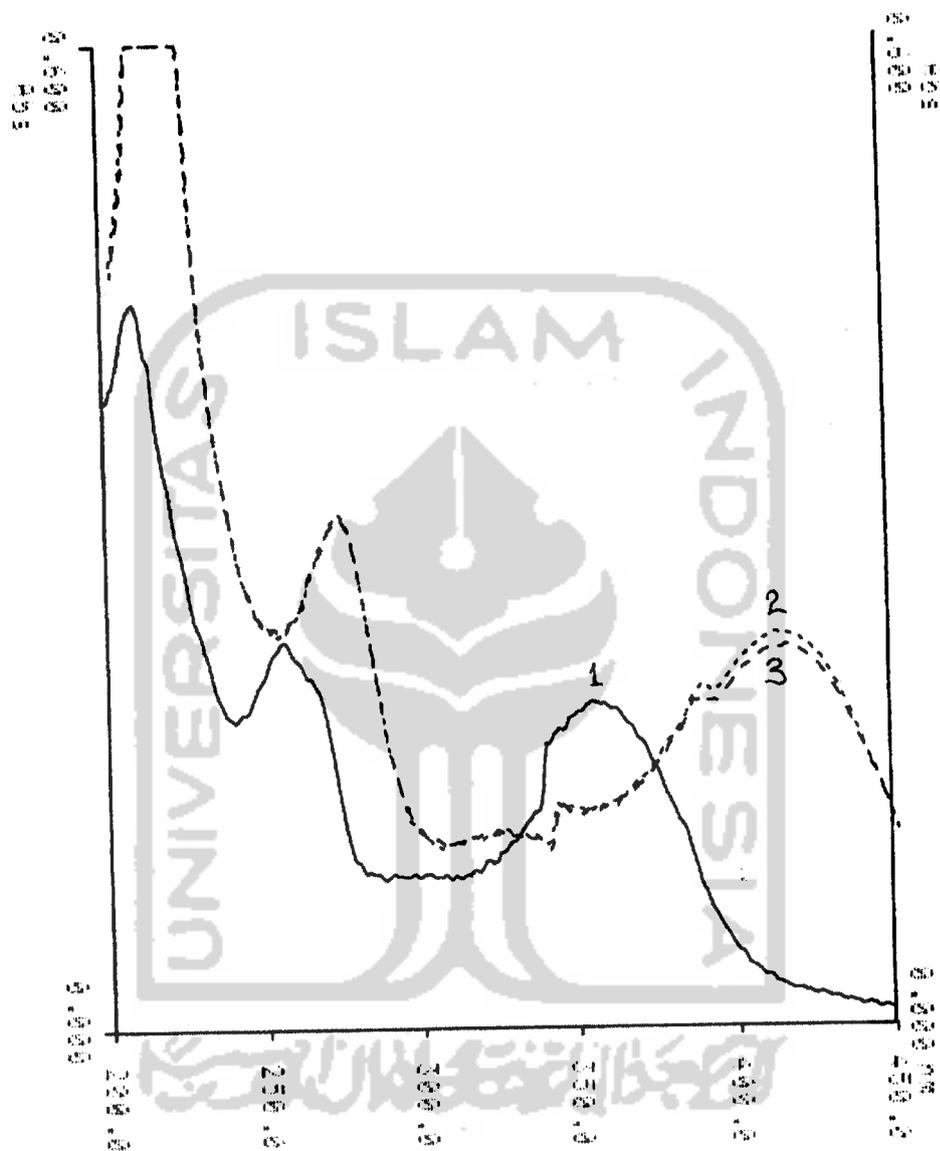
Gambar 14. Kromatogram kertas dua arah fraksi air dengan fase gerak BAW (1) serta asam asetat (2)

Keterangan : Terdapat 4 noda yang diidentifikasi harga Rf :

1. Noda nomor satu 0.46 untuk fase BAW dan 0.56 untuk fase HOAc
2. Noda nomor dua 0.45 untuk fase BAW dan 0.65 untuk fase HOAc
3. Noda nomor tiga 0.51 untuk fase BAW dan 0.92 untuk fase HOAc
4. Noda nomor empat 0.33 untuk fase BAW dan 0.94 untuk fase HOAc

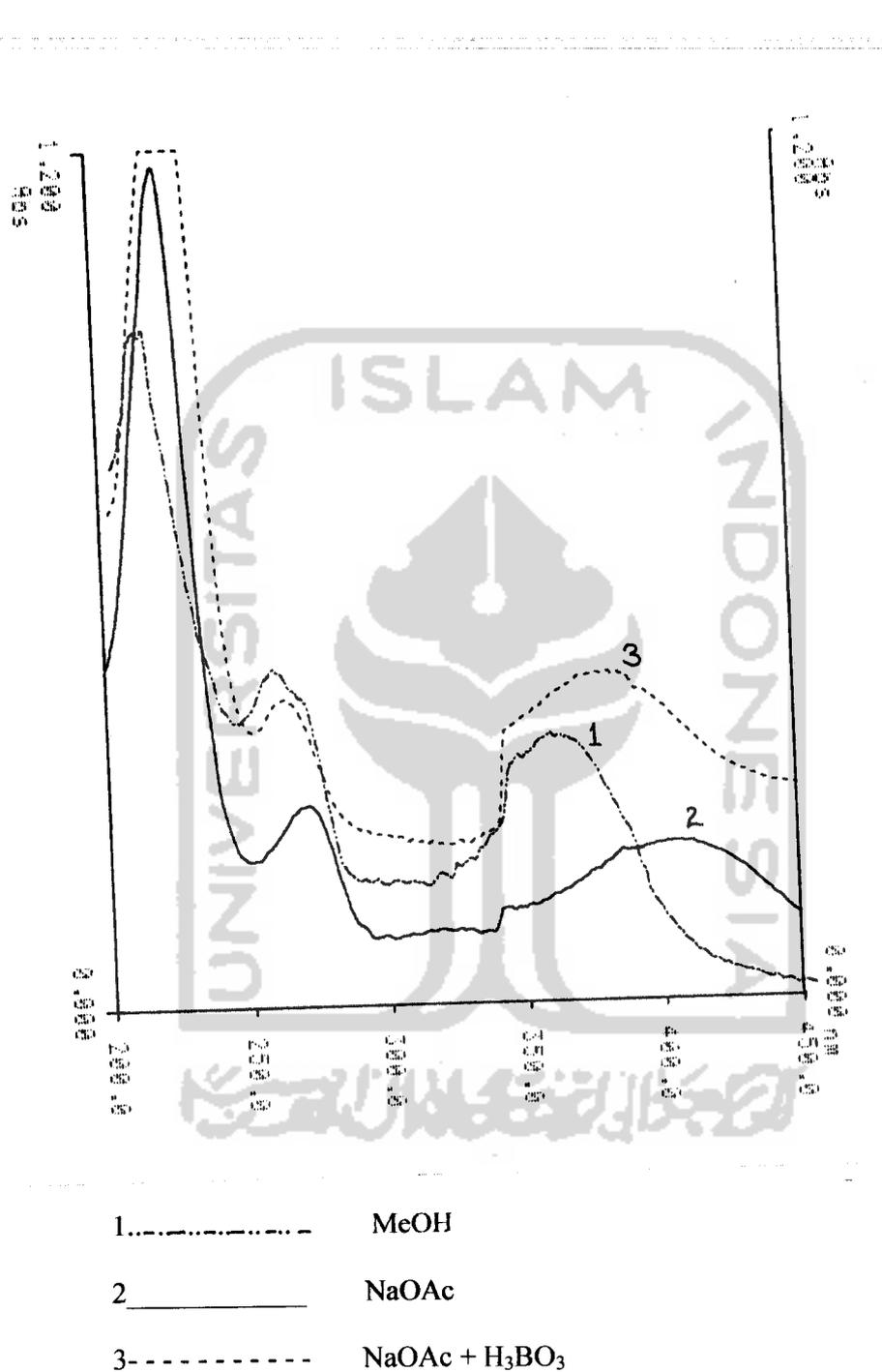
Tabel IV . Data kromatogram pemeriksaan kandungan flavonoid

Fraksi	Fase Gerak	Rf	Warna Bercak			Jenis Flavonoid
			UV366 nm	NH3	UV / NH3	
PE Noda no 1	BAW	0.91	Merah	-	Merah	Khalkon yang mengandung 2-dan / atau 4-OH bebas
	As asetat	0.29				
n-butanol noda no 1	BAW	0.51	Lembayung gelap	kuning	Kuning	Biasanya 5-OH Flavon atau Flavonol (tersulih) pada 3-O dan mempunyai 4'-OH
	As asetat	0.31				
Noda no 2	BAW	0.62	Ungu	-	Biru muda	Beberapa 5-OH flavanon
	As asetat	0.52				
Etil asetat Noda no 1	BAW	0.46	Tidak tampak	-	Berflourose nsi biru muda	Isoflavon tanpa 5-OH bebas
	As asetat	0.34				
Noda no 2	BAW	0.36	Tidak tampak	-	Berflourose nsi biru muda	Isoflavon tanpa 5-OH
	As asetat	0.46				
Air Noda no 1	BAW	0.46	Kuning kehijauan	-	Kuning kehijauan	Flanonol yang mengandung 3-OH bebas dan mempunyai /tidak 5-OH bebas (kadang-kadang berasal dari dihidro flavonol.
	As aetat	0.56				
Noda no 2	BAW	0.45	Biru muda	-	Biru muda	Isoflavon yang tak mengandung 5-OH bebas.
	As asetat	0.65				
Noda no 3	BAW	.051	Kuning kehijauan	-	Kuning kehijauan	Auron ysg mengandung 4'-OH bbebas dan flavanon tanpa 5-OH
	As asetat	0.92				
Noda no 4	BAW	0.33	Kuning kehijauan	-	Kuning kehijauan perubahan sedikit /tanpa perubahan	Flavanol yang mengandung 3-OH bebas dan disertai/tanpa 5-OH bebas
	As asetat	0.94				

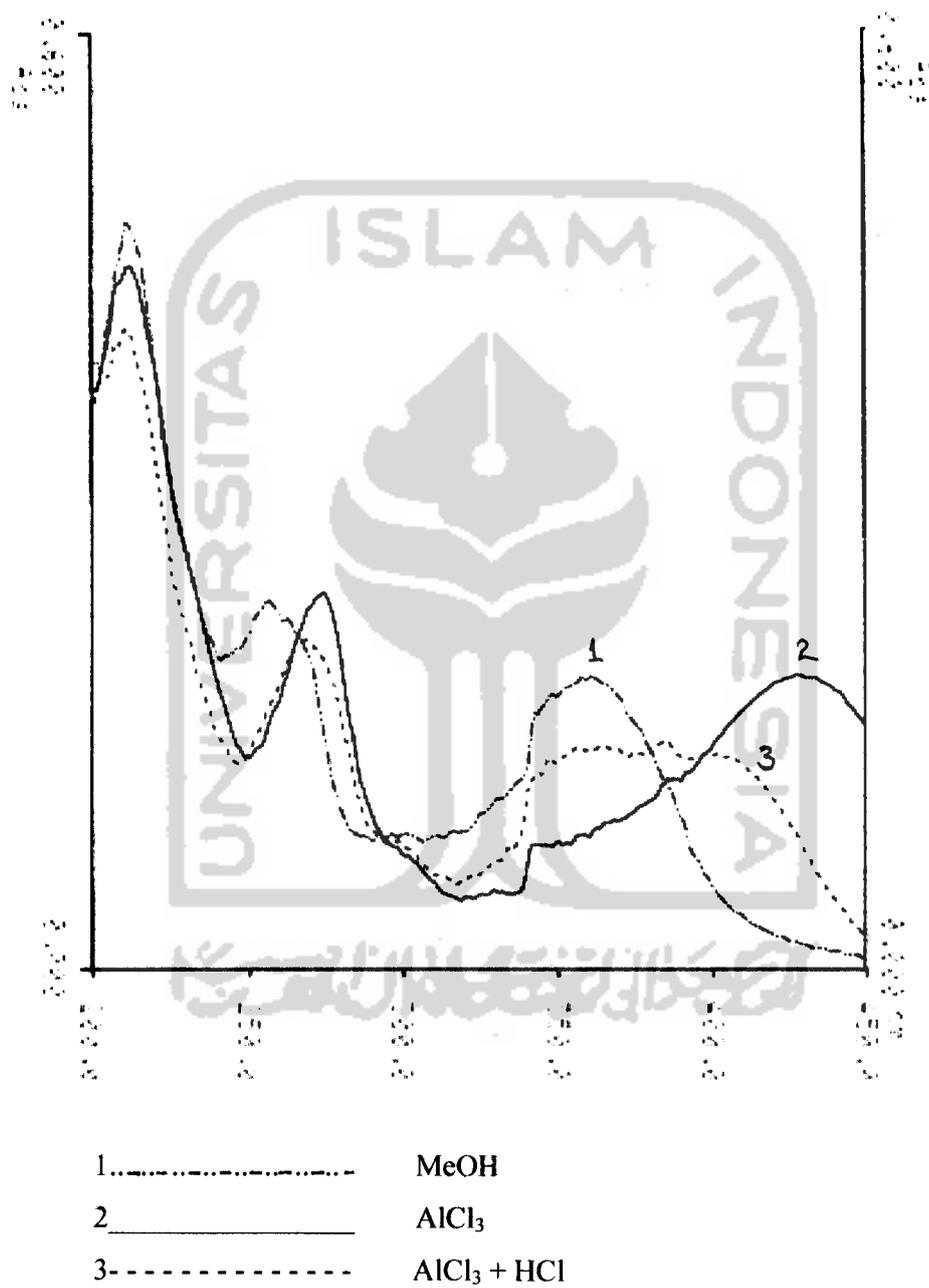


- 1 _____ MeOH
 2..... NaOH
 3----- NaOH 5'

**Gambar 15 . Spektrum ultraviolet noda nomor satu fraksi n-butanol
 (Lihat gambar 13)**



**Gambar 16. Spektrum ultraviolet noda nomor satu fraksi n-butanol
(Lihat gambar 13)**



**Gambar 17. Spektrum ultraviolet noda nomor satu fraksi n-butanol
(Lihat gambar 13)**

Terhadap Fraksi PE yang telah ditotolkan pada fase diam kertas Whatman no.41, kemudian dikembangkan dengan menggunakan fase gerak BAW (6 : 1 : 2 V/V). Pada saat pemeriksaan fraksi ini tidak menunjukkan adanya flavonoid, karena ketika bercak diuapi amoniak tidak berwarna kuning.

Demikian halnya fraksi etil asetat dan air tidak menunjukkan adanya flavonoid karena ketika bercak diuapi amoniak tidak berwarna kuning yang jelas sehingga pada fraksi-fraksi ini tidak dilakukan pemeriksaan lebih lanjut.

Fraksi n-BuOH dikembangkan dengan menggunakan fase gerak BAW (6 : 1 : 2 v/v) pada fase diam kertas Whatman no. 41 dari hasil pemeriksaan pada kromatogram, fraksi ini dapat dipastikan mengandung senyawa flavonoid yang ditunjukkan oleh warna kuning yang terbentuk setelah diuapi amoniak, warna kuning yang terbentuk dengan uap amoniak berkaitan dengan terbentuknya struktur kuinoid dari senyawa flavonoid tersebut yang terlihat pada noda nomor satu yang tampak pada kromatogram kertas yang terlihat pada gambar 13.

F. Isolasi senyawa Flavonoid

Isolasi kandungan senyawa flavonoid dilakukan secara kromatografi kertas dua arah, yaitu dengan menggunakan dua fase gerak, sehingga tidak perlu lagi dilakukan pemurnian isolat.

Isolasi ini bertujuan untuk memperoleh cuplikan murni dalam jumlah yang cukup untuk digunakan pada proses analisis selanjutnya. Selanjutnya dari hasil pengembangan maka fraksi n-butanol paling jelas memberikan bercak yang menunjukkan adanya flavonoid . Deteksi dengan menggunakan uap amoniak dan

diperjelas dibawah sinar lampu UV 366 nm sebelum dan sesudahnya. Selanjutnya bercak yang didapatkan dipisahkan dan dipotong kecil-kecil kemudian dimaserasi dengan metanol p.a, maserasi dilakukan selama satu hari untuk melarutkan senyawa flavonoid yang ada pada bercak kertas. Isolat selanjutnya disaring kemudian diidentifikasi strukturnya dengan menggunakan spektrofotometer UV-Vis. Pereaksi diagnostik digunakan digunakan untuk menentukan posisi dan karakterisasi gugus hidroksi bebas pada struktur flavonoid.

G. Identifikasi Isolat Senyawa Flavonoid

Isolasi senyawa flavonoid dari fraksi n-butanol yang diperoleh dengan kromatografi Kkt dua arah, kemudian diidentifikasi strukturnya dengan spektrofotometer UV-Vis dalam metanol. dengan atau tanpa preaksi diagnostik. Pereaksi diagnostik digunakan untuk menentukan posisi dan karakterisasi gugus hidroksi bebas pada struktur flavonoid.

Tabel V. Data spektrum UV-Vis dari isolat n-butanol

Isolat dalam MeOH dengan penambahan Pereaksi diagnostik	Serapan (nm)		Pergeseran (nm)		Penafsiran
	Pita II	Pita I	Pita II A	Pita I B	
MeOH	255,6	356,4	—	—	Flavonol
NaOH	272	410,4	+16,4	+54	4'-OH
NaOH 5'	272	410,4	+16,4	+54	Tidak adanya sistem 3, 3', 4'-OH yang peka terhadap basa
NaOAc	271,6	406,4	+16	+50	7-OH
NaOAc / H ₃ BO ₃	261,6	378,8	+6	+22,2	o-diOH pada cincin B
AlCl ₃	274	428	+18,4	+71,4	o-diOH pada cincin B
AlCl ₃ /HCl	269,6	398,4	+14	+41,8	5-OH

Pada analisis isolat fraksi n-butanol dengan spektrofotometer UV-Vis dalam metanol dihasilkan spektrum dengan serapan maksimum 356,4 nm (Pita I) dan 255,6 nm (Pita II). Berdasarkan serapan-serapan tersebut menunjukkan isolat senyawa flavonoid fraksi n-butanol adalah senyawa flavonoid golongan flavonol dengan 3-OH bebas karena masuk dalam daerah panjang gelombang 350-385 nm pada pita I (Flavonol 3-OH bebas) dan 250-280 nm pada pita II dari Flavonol 3-OH bebas (Markham, 1988).

Berdasarkan spektra MeOH pada pita I 356,4 nm dan pita II 255,6 nm dapat disimpulkan bahwa senyawa flavonoid tersebut termasuk golongan

flavonol, menurut SIM (1978), bahwa flavonol pada pita I 352 – 385 nm dan pita II 240 – 285 nm.

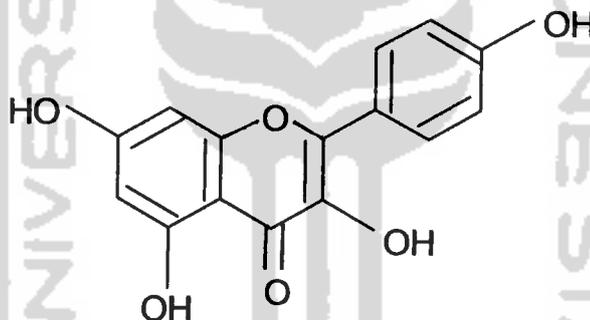
Dalam spektra yang terjadi dengan penambahan pereaksi diagnostik (NaOH) kedalam larutan isolat senyawa flavonoid pada pita I terjadi pergeseran batokromik sebesar 54 nm (dari 356,4 nm ke 410,4 nm), untuk lebih jelasnya lihat (gambar 15) dan disini tanpa penurunan intensitas , hal ini menunjukkan positif adanya gugus 4'-OH pada cincin B (Markham, 1988). Perekaman kembali setelah lima menit menunjukkan tidak terjadinya penurunan serapan dan intensitas yang berarti hal ini menunjukkan tidak adanya sistem 3, 3', 4'-OH yang peka terhadap basa (Mabry *et al.*, 1970; Markham, 1988)

Pergeseran batokromik sebesar 5 – 20 nm pada pita II dengan penambahan NaOAc menunjukkan adanya gugus OH (7- OH) SIM 1978. Sedangkan pada spektra untuk senyawa ini terjadi pergeseran batokromik sebesar 16 nm (dari 255,6 – 271,6 nm) seperti yang terlihat pada (gambar 16) pada pita II hal ini menunjukkan adanya gugus (7- OH) . Penambahan asam borat (H_3BO_3) kedalam isolat yang telah ditambahkan NaOAc pada spektra menunjukkan pergeseran batokromik sebesar 22,2 nm pada pita I hal ini menunjukkan adanya gugus o-diOH pada cincin B (Mabry *et al.*, 1970; Markham , 1988) .Pada umumnya adanya gugus o-diOH akan diperkuat oleh data lain dari penambahan $AlCl_3$.

Selanjutnya bila diperhatikan spektrum $AlCl_3$ menunjukkan adanya pergeseran puncak pada pita I sebesar 71,4 nm (dari 356,4 nm ke 428 nm) menunjukkan kemungkinan adanya gugus hidroksi pada posisi C3 dengan atau tanpa 5-OH (Markham, 1988), demikian pula pada spektrum $AlCl_3/HCl$

menunjukkan pergeseran batokromik pada pita I sebesar 41,8 nm. Dengan penambahan asam (HCl) pergeseran mengalami pengurangan menunjukkan adanya gugus o-diOH pada cicin B, seperti terlihat pada (gambar 17) hal ini juga memperkuat adanya gugus hidroksi pada posisi C5 tanpa oksigenasi pada 6.

Berdasarkan data KKt 2A dan spektrum ultraviolet maka noda nomor satu Pada fraksi n-butanol ini maka dapat diketahui bahwa struktur parsial isolat senyawa flavonoid adalah flavonol dengan gugus OH bebas pada C3, C5, C7, C4'. Oleh karena itu, struktur parsial mengarah pada 3, 5, 7, 4' tetrahidroksiflavonol atau kaemferol . Struktur sebagai berikut :



Gambar 18. Struktur 3, 5, 7, 4'-tetrahidroksiflavonol atau kaemferol

BAB V

KESIMPULAN DAN SARAN

A. Kesimpulan

Dari hasil dan evaluasi dari penelitian ini dapat ditarik kesimpulan sebagai berikut :

1. Kromatografi kertas dua arah dengan fase gerak BAW untuk arah pertama dan asetat 2 % untuk arah kedua dari empat fraksi yang dilakukan pemeriksaan maka fraksi n-butanol paling menunjukkan adanya senyawa flavonoid yang ditunjukkan pada noda nomor satu sehingga perlu dilakukan analisis lebih lanjut.
2. Dari sekian noda yang ada pada kromatogram kertas fraksi n-butanol, noda nomor satu yang paling dominan menunjukkan warna kuning yang dapat diidentifikasi, berdasarkan hubungan antara warna bercak dan struktur flavonoid, harga R_f pada KKt 2A, hubungan antara panjang gelombang dalam spektrum UV-Vis dengan atau tanpa pereaksi diagnostik isolat mengarah 3, 5, 7, 4' tetrahidroksiflavonol atau kaemferol

B. Saran

Untuk penelitian selanjutnya dapat diajukan saran sebagai berikut :

1. Perlu diteliti senyawa flavonoid lainnya yang terdapat dalam tanaman *Hibiscus tiliaceus*, L.
2. Senyawa yang diperoleh dan diidentifikasi masih perlu ditegaskan strukturnya dengan spektroskopi lainnya seperti spektroskopi infra merah (IR), NMR dan spektroskopi massa.

DAFTAR PUSTAKA

- Anonim, 2001, *Atlas Tumbuhan Obat Indonesia*, jilid II, Hal : 191-196, Trubus agriwidya, Jakarta.
- Azwar , A., 2001, *Pemanfaatan FitoFarmaka dalam Sistem Pelayanan Kesehatan Formal*, makalah Diskusi Panel “ Perspektif dan Peluang Fitofarmaka Menghadapi Tantangan Global Menuju Era Obat Asli Indonesia, Fakultas Farmasi Universitas Gadjah Mada, Jogjakarta 3 Februari 2001.
- Backker, C .A dan Bakhuizen van den Brink R.C.,1965,*Flora of Java Spermatopyta Only*. Wolter Noordhofs, NV Broningen the Netherlads.
- Evans, W.C., 1989, *Trease and Evans Pharmacognosy*, 3th ed ., p.420, Bailiere Tindal, London.
- Fessenden, R. J ., and Fessenden, J.S, 1994, *Kimia Organik*, jilid II, hal 143-145,Penerbit Erlangga, Surabaya.
- Goodwin, T.A., 1962, *The Chemistry and Biochemistry of Plant Pigments* ,2nd ed., p.772, Academic Press, New York.
- Harbone, J. B., 1987, *Metode Fitokimia ; Penuntun Cara Modern Menganalisis Tumbuhan* , hal : 9-10, 20, 70-72, 94, diterjemahkan oleh Kosasih Padmawinata dan Iwang Soediro, ed.II Penerbit ITB, Bandung.
- Markham, K.R., 1988, *Cara identifikasi flavonoid* ,, diterjemahkan oleh KosasihPadmawinata , hal1-3, 5-8, 10, 12, 15-24, 26-27, 39-50, Penerbit ITB, Bandung.Miller, J.M and Bohm, B.A.,m 1979. *Flavonoids in Leptarrhenaprolifolia, in Phytochemistry*, 18,1412-1413.
- Manitto, P., 1981, *Biosintesis Produk Alami*, hal. 435-437, diterjemahkan oleh Koensoemardijah, IKIP Semarang Press, Semarang.
- Mabry, T . J., Markham, K. R and Thomas, M.B., 1970, *The Sistematic Identification of Flavonoids*, p1, 4, 8, 10-11, 35-38, 41-42, 44-55, 165 166,168-171, Springer-Verlag ,New York.
- Pramono, S., 2001, *Kontribusi Bahan Obat Alam dalam Mengatasi Krisis Bahan Obat di Indonesia* , Makalah Diskusi Panel “ Perspektif dan Peluang Fitofarmaka Menghadapi Tantangan Global Menuju Era Obat Asli Indonesia “ Fakultas Farmasi Universitas Gadjah Mada , Jogjakarta , 3 Februari 2001.

- Pramono, S., dan Koensoemardijah , 1999, *Hand Out Fitokimia II*, hal.1-12, Fakultas Farmasi Universitas Gadjah Mada, Jogjakarta.
- Robinson, T., 1995, *Kandungan Organik Tumbuhan* tinggi, hal :1-3, 15-25, 39-40 43-47, 191-213, Penerbit ITB, Bandung.
- Silvestein, R. M., Bassler, G.C and Morrill, T.C ., 1974, *Spectrometric Identification of Organic Compounds* , 5th Ed., John Wiley and Sons, Inc., New York.
- Soegihardjo, C.J., 1984, Pemeriksaan Kandungan Flavonoid dan Antihepatoksik dari *Sonchus oleraceus*, L.), *Disertasi*, Institut Teknologi Bandung,
- Sastrohamidjojo, H., 2001, *Spektroskopi*, hal ;11, Liberty, Jogjakarta.
- Sastrohamidjojo, H., 1991m, *Kromatografi*, edisi II, hal ; 13-22, Liberty, Jogjakarta.
- Stahl, E., 1985, *Analisis Obat Secara Kromatografi Dan Mikroskopi*, hal.3-17, 25 diterjemahkan oleh Kosasih Padmawinata dan Iwang Soediro, Penerbit ITB, Bandung.
- Sabikis, Soegihardjo, C.J., dan Sumarno, 1986, *Kromatografi*, Hal.31-35, Panitia Lustrum VIII dan Reuni , Fakultas Farmasi UGM, Jogjakarta.
- SIM, K. Y 1978, *Struktural Elucidation of Flavonoids* , p 102, - 106, Departement of Chemistry, University of Singapore.
- Soegihardjo, C.J.,1985, Isolasi, Identifikasi, dan Karakterisasi kanduganFlavonoddari Daun *Eupatorium inofolium HBK* , *Laporan Penelitian*, Fakultas Farmasi Universitas Gadjah Mada, Jogjakarta.
- Teguh, S.,2002, Isolasi dan Identifikasi Senyawa Flavonoid dari buah *Duranta Erecta*, L.*Skripsi* , Fakultas Matematika dan Ilmu pengetahuan Alam Universitas Islam Indonesia, Jogjakarta.
- Untoro, P.,m 1990, Pemeriksaan Kandungan Flavonoid *Eriobotria japonica* Lindl., *Disertasi* , Institut Teknologi Bandung, Bandung.
- Van Steenis, G.,C., G., J., Dr, 1997, *Flora Untuk Sekolah di Indonesia*, Cetakan ke sembilan , Hal :280, 291, Penerbit PT,Pradnya Paramita, Jakarta.

Lampiran



BAGIAN BIOLOGI FARMASI
FAKULTAS FARMASI UGM

Alamat : Sekip Utara Jogjakarta
Telpon : 542738, 902568

SURAT KETERANGAN

Nomor : UGM/FA/81 /Ident/III/2004

Yang bertanda tangan di bawah ini kepala Bagian Biologi Farmasi Fakultas Farmasi UGM menerangkan bahwa :

Nama : Syaifuddin
No. Mhs. : 99613329

telah mengidentifikasi tanaman *Hibiscus tiliaceus* L. di Laboratorium Farmakognosi Bagian Biologi Farmasi Fakultas Farmasi UGM.

Pada tanggal 19 Maret 2004.
Surat keterangan ini dapat digunakan seperlunya.

Jogjakarta, 23 Maret 2004
Bagian Biologi Farmasi
Kepala


Dr. Subagus Wahyuono, Apt
NIP. 130604698

Lampiran. 1 Surat keterangan determinasi tanaman waru (*Hibiscus tiliaceus* L)

Lampiran 2. Foto tanaman waru (*Hibiscus tiliaceus*, L.)



Lampiran.3. Foto Bejana Kromatografi Kkt 2A buatan sendiri menurut Mabry *et al.*, 1970

