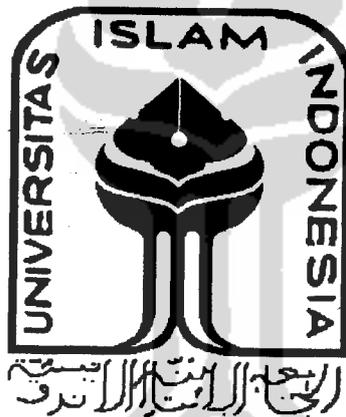


**IDENTIFIKASI FLAVONOID DARI EKSTRAK METANOL  
BUAH MAHKOTA DEWA (*Phaleria macrocarpa* Boerl)  
MENGUNAKAN SPEKTROFOTOMETER UV-Vis**

**SKRIPSI**

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



**Diajukan oleh :**

**YULI ROHYAMI  
No Mhs : 99 612 013**

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

**IDENTIFIKASI FLAVONOID DARI EKSTRAK METANOL  
BUAH MAHKOTA DEWA (*Phaleria macrocarpa* Boerl)  
MENGUNAKAN SPEKTROFOTOMETER UV-Vis**

Oleh :  
**YULI ROHYAMI**  
No Mhs : 99 612 013

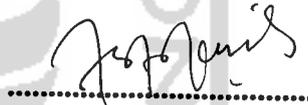
Telah dipertahankan dihadapan Panitia Penguji Skripsi Jurusan Kimia  
Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam  
Universitas Islam Indonesia

Tanggal 24 April 2003

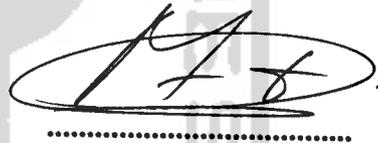
Dewan Penguji

Tanda Tangan

Is Fatimah, M.Si.



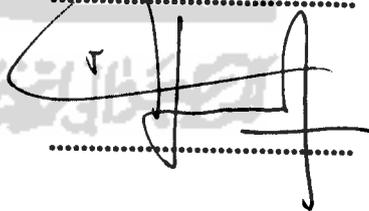
Riyanto, M.Si.



Dr. Chairil Anwar



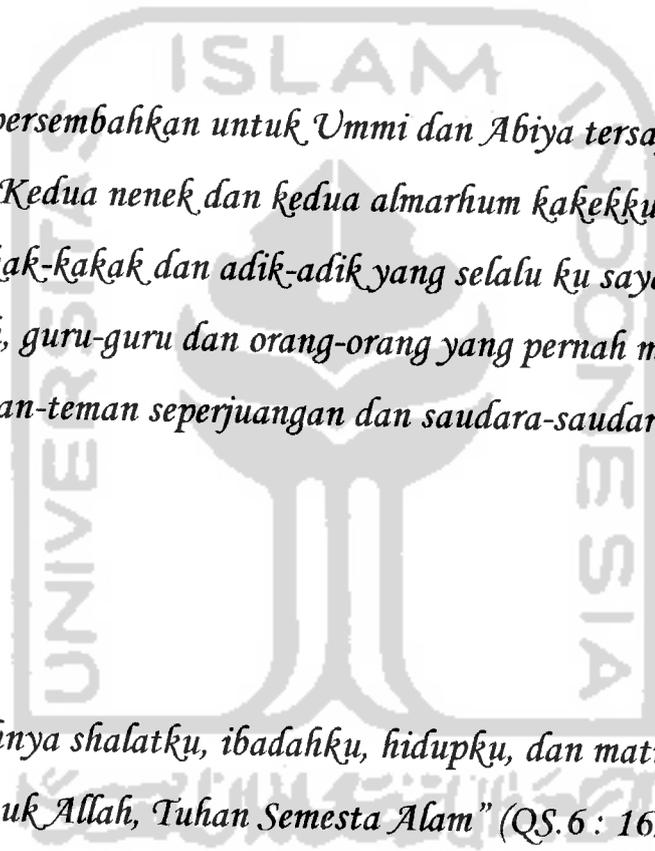
Tatang Shabur Julianto, S.Si.



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



Jaka Nugraha, M.Si.



*Ku persembahkan untuk Ummi dan Abiya tersayang  
Kedua nenek dan kedua almarhum kakekku  
Kakak-kakak dan adik-adik yang selalu ku sayangi  
Murrabi'ah, guru-guru dan orang-orang yang pernah mengasuhku  
Teman-teman seperjuangan dan saudara-saudaraku*

*“Sesungguhnya shalatku, ibadahku, hidupku, dan matiku hanya  
untuk Allah, Tuhan Semesta Alam” (QS.6 : 162)*

## KATA PENGANTAR

Puji dan syukur kehadiran Allah *Azza wa Jalla* atas limpahan ridha, taufik, dan hidayah-Nya, sehingga penelitian tentang identifikasi senyawa flavonoid buah mahkota dewa dapat dilaksanakan dan penyusunan skripsi dapat berjalan dengan lancar. Shalawat dan salam teriring atas Rasulullah SAW, keluarga, sahabat, dan para pengikut beliau hingga akhir zaman.

Skripsi ini diajukan sebagai salah satu syarat untuk mendapatkan gelar Sarjana Sains di Jurusan Kimia Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam Universitas Islam Indonesia, dengan judul Identifikasi Flavonoid dari Ekstrak Metanol Buah Mahkota Dewa (*Phaleria macrocarpa* Boerl) Menggunakan Spektrofotometer UV-Vis.

Pada kesempatan ini, penyusun haturkan banyak terimakasih kepada :

1. Bapak Jaka Nugraha, M.Si. selaku Dekan Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam Universitas Islam Indonesia
2. Bapak Riyanto, M.Si. selaku Ketua Jurusan Kimia Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam Universitas Islam Indonesia
3. Bapak Dr. Chairil Anwar selaku Dosen Pembimbing I yang telah meluangkan waktu, tenaga, dan pikiran serta telah memberikan dukungan selama penelitian sampai penyusunan skripsi
4. Bapak Tatang Shabur J., S.Si. selaku Dosen Pembimbing II yang telah meluangkan waktu, tenaga, dan pikiran serta telah memberikan dukungan selama penelitian sampai penyusunan skripsi

5. Ibu Is Fatimah, M.Si. selaku Kepala Laboratorium Kimia Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam Universitas Islam Indonesia, beserta staf, Pak Arso, Pak Luluk, Pak Irman, dan Pak Dwi yang telah membantu selama pelaksanaan penelitian

Dan semua pihak yang telah membantu selama penelitian dan penyusunan skripsi ini. *Jazakumullahu khairan katsira.*

Skripsi ini tentu saja masih jauh dari sempurna, untuk itu penyusun sangat mengharapkan kritik dan saran yang dapat dijadikan sebagai kajian untuk penelitian selanjutnya agar penelitian ini dapat bermanfaat bagi kemaslahatan umat.

Jogjakarta, April 2003

Penyusun



## DAFTAR ISI

HALAMAN JUDUL.....	i
HALAMAN PENGESAHAN.....	ii
HALAMAN PERSEMBAHAN.....	iii
KATA PENGANTAR.....	iv
DAFTAR ISI.....	vi
DAFTAR TABEL.....	ix
DAFTAR GAMBAR.....	x
INTISARI.....	xi
ABSTRACT.....	xii
BAB I PENDAHULUAN.....	1
1.1 Latar Belakang.....	1
1.2 Rumusan Masalah.....	2
1.3 Tujuan Penelitian.....	3
1.4 Manfaat Penelitian.....	3
BAB II TINJAUAN PUSTAKA.....	4
BAB III DASAR TEORI.....	9
3.1 Mahkota Dewa.....	9
3.2 Flavonoid.....	11
3.2.1 Penggolongan flavonoid.....	11
3.2.2 Penyebaran pada tanaman.....	13

3.3	Ekstraksi.....	15
3.3.1	Pengertian ekstraksi.....	15
3.3.2	Ekstraksi soxhletasi.....	16
3.3.3	Ekstraksi flavonoid.....	17
3.4	Kromatografi.....	18
3.4.1	Kromatografi lapis tipis (KLT).....	18
3.4.2	Identifikasi flavonoid menggunakan kromatografi lapis tipis.....	21
3.5	Spektrofotometer UV-Vis.....	24
3.5.1	Prinsip dasar spektrofotometri.....	24
3.5.2	Instrumentasi.....	25
3.5.3	Identifikasi flavonoid.....	27
3.6	Hipotesis.....	31
BAB IV METODOLOGI PENELITIAN.....		32
4.1	Alat.....	32
4.2	Bahan.....	32
4.3	Sampel.....	33
4.4	Cara Kerja.....	33
4.4.1	Preparasi buah mahkota dewa.....	33
4.4.2	Ekstraksi soxhlet.....	33
4.4.3	Deteksi pendahuluan menggunakan kromatografi lapis tipis.....	34
4.4.4	Pembuktian kemurnian isolat flavonoid.....	34

4.4.5 Pemisahan flavonoid menggunakan kromatografi lapis tipis preparatif.....	35
4.4.6 Identifikasi flavonoid menggunakan Spektrofotometer UV-Vis .....	35
BAB V HASIL DAN PEMBAHASAN.....	37
5.1 Preparasi buah mahkota dewa .....	37
5.2 Ekstraksi soxhlet .....	38
5.3 Deteksi pendahuluan menggunakan kromatografi lapis tipis.....	41
5.4 Pembuktian kemurnian isolat flavonoid.....	44
5.5 Pemisahan flavonoid menggunakan kromatografi lapis tipis preparatif.....	46
5.6 Identifikasi flavonoid menggunakan Spektrofotometer UV-Vis .....	46
BAB VI KESIMPULAN DAN SARAN.....	58
6.1 Kesimpulan.....	58
6.2 Saran.....	58
DAFTAR PUSTAKA	
LAMPIRAN	

## DAFTAR GAMBAR

Gambar 1. Struktur flavonoid .....	11
Gambar 2. Struktur Aglikon flavonoid .....	12
Gambar 3. Bagan instrumen spektrofotometer UV-Vis.....	25
Gambar 4. Spektrum MeOH dan MeOH+NaOH fraksi 1 .....	48
Gambar 5. Spektrum MeOH+ AlCl <sub>3</sub> dan MeOH+ AlCl <sub>3</sub> +HCl fraksi 1 .....	49
Gambar 6. Spektrum MeOH+NaOAc dan MeOH+NaOAc+H <sub>3</sub> BO <sub>3</sub> fraksi 1 .....	49
Gambar 7. Struktur 5,7,3',4'-tetrahidroksi flavanon.....	52
Gambar 8. Spektrum MeOH dan MeOH+NaOH fraksi 2.....	52
Gambar 9. Spektrum MeOH+AlCl <sub>3</sub> dan MeOH+ AlCl <sub>3</sub> +HCl fraksi 2.....	53
Gambar 10. Spektrum MeOH+NaOAc dan MeOH+NaOAc+H <sub>3</sub> BO <sub>3</sub> fraksi 2 .....	53
Gambar 11. Struktur flavonoid fraksi 2.....	55
Gambar 12. Spektrum MeOH fraksi 3 .....	56
Gambar 13. Spektrum MeOH fraksi 4 .....	56

## DAFTAR TABEL

Tabel 1. Penyebaran flavonoid pada tanaman.....	13
Tabel 2. Penafsiran warna bercak dari segi struktur flavonoid.....	22
Tabel 3. Rentangan serapan spektrum UV-Vis flavonoid.....	27
Tabel 4. Penafsiran spektrum natrium metoksida.....	28
Tabel 5. Penafsiran spektrum $AlCl_3$ dan $AlCl_3/HCl$ .....	29
Tabel 6. Penafsiran spektrum natrium asetat.....	30
Tabel 7. Penafsiran spektrum natrium asetat dan natrium asetat/asam borat.....	30
Tabel 8. Hasil pengembangan menggunakan berbagai eluen.....	44
Tabel 9. Hasil deteksi bercak hasil pengembangan dengan BAA (9:2:6 v/v).....	44
Tabel 10. Penafsiran spektrum fraksi 1.....	50
Tabel 11. Penafsiran spektrum fraksi 2.....	54

**IDENTIFIKASI FLAVONOID DARI EKSTRAK METANOL  
BUAH MAHKOTA DEWA (*Phaleria macrocarpa* Boerl)  
MENGUNAKAN SPEKTROFOTOMETER UV-Vis**

Oleh :  
Yuli Rohyami

**INTISARI**

Mahkota dewa (*Phaleria macrocarpa* Boerl) merupakan tanaman obat yang berkhasiat untuk mengobati berbagai penyakit. Mahkota dewa mengandung senyawa aktif dari golongan flavonoid, terpenoid, alkaloid, dan polifenol, namun senyawa aktif yang terdapat dalam ekstrak metanol belum teridentifikasi.

Identifikasi flavonoid dari daging buah mahkota dewa telah dilakukan. Pengambilan dan pemisahan dilakukan dengan metode ekstraksi dan kromatografi lapis tipis. Identifikasi pendahuluan dilakukan dengan kromatografi lapis tipis menggunakan eluen n-heksana, etil asetat, metanol, n-butanol, asam asetat, dan air. Pembuktian kemurnian flavonoid dilakukan dengan kromatografi lapis tipis dua dimensi. Pemisahan flavonoid dilakukan dengan kromatografi lapis tipis preparatif. Fraksi yang diperoleh dilarutkan dalam metanol dan diukur spektrumnya dengan spektrofotometer UV-Vis menggunakan pereaksi geser NaOH, AlCl<sub>3</sub>, HCl, NaOAc, dan H<sub>3</sub>BO<sub>3</sub>.

Identifikasi pendahuluan menggunakan kromatografi lapis tipis dapat ditunjukkan 4 fraksi dengan R<sub>f</sub> = 78,75 ; 70,00 ; 56,25 ; dan 50,00. eluen terbaik yang digunakan pada pengembangan adalah n-butanol : asam asetat : air, 9:2:6 (v/v). Identifikasi menggunakan kromatografi lapis tipis dan spektrofotometer UV-Vis memberikan hasil bahwa fraksi pertama (R<sub>f</sub> = 78,75) dan fraksi kedua (R<sub>f</sub> = 70,00) mengandung flavonoid. Hasil penafsiran spektrumnya, senyawa flavonoid yang dapat diusulkan pada fraksi 1 adalah flavanon dengan gugus -OH pada posisi 5,7,3' dan 4' (5,7,3',4'-tetrahidroksi flavanon). Fraksi 2 adalah flavonol dengan gugus orto-diOH pada posisi 6,7 atau 7,8 ; 3' dan 4'-OH ; dan terdapat oksigenasi pada 7 atau 8.

kata kunci : *flavonoid, mahkota dewa, spektrofotometer UV-Vis*

**IDENTIFICATION OF FLAVONOIDS FROM METHANOL EXTRACT  
OF MAHKOTA DEWA (*Phaleria macrocarpa* Boerl)  
USING UV-Vis SPECTROPHOTOMETER**

**By :  
Yuli Rohyami**

**ABSTRACT**

Mahkota dewa (*Phaleria macrocarpa* Boerl) is one of the plants of drug which has been found special quality to treats various diseases. Mahkota dewa contains active compounds from flavonoids, terpenoids, alkaloids, and polyphenols groups, however the structure of active compounds in methanol extract have not identified yet.

Identification of flavonoids from the flesh of mahkota dewa has been conducted. Isolation and separation has been done by extraction method and thin layer chromatography. Preface identification has been made by thin layer chromatography using eluen of n-hexane, ethyl acetate, methanol, n-buthanol, acetic acid, and water. Authentication purity of flavonoids is made by two-dimensional thin layer chromatography. Separation of flavonoids using preparative thin layer chromatography. Fraction has been obtained were dissolved in methanol and were measured its spectrum at wave-length 200 to 400 nm by UV-Vis spectrophotometer using shift reagents, NaOH, AlCl<sub>3</sub>, HCl, NaOAc, and H<sub>3</sub>BO<sub>3</sub>.

Preface identification using thin layer chromatography be able to showed 4 fraction with R<sub>f</sub> = 78.75, 70.00, 56.25, and 50.00. The best eluen in development using thin layer chromatography is n-buthanol : acetic acid : water, 9:2:6 (v/v). Identification using thin layer chromatography and UV-Vis spectrophotometer have been given a result that the first fraction (R<sub>f</sub> = 78.75) and the second fraction (R<sub>f</sub> = 70.00) contained flavonoids. The result of its spectrum interpretation, flavonoids which be able to suggested in fraction 1 is flavanon with 5,7,3, and 4'-OH groups (5,7,3',4'-tetrahydroxy flavanon). Flavonoid in fraction 2 is flavonol with ortho-diOH groups at 6,7 or 7,8 ; 3' and 4' -OH groups ; and there is oxygenation at 1 or 8.

key word : *flavonoids, mahkota dewa, UV-Vis spectrophotometer*

# BAB I

## PENDAHULUAN

### 1.1 Latar Belakang

Mahkota dewa (*Phaleria macrocarpa* Boerl) merupakan tanaman obat yang belum lama dikenal. Tanaman ini berasal dari Papua, merupakan famili *Thymelaeaceae*. Pada mulanya tanaman ini ditanam sebagai tanaman peneduh atau tanaman hias. Sebagian orang mengidentikkan sebagai daun dewa, sambung nyawa dan dapat mengeluarkan aura untuk meningkatkan derajat bagi yang menanam di halaman rumahnya.

Khasiat tanaman ini telah lama dikenal di lingkungan Kraton Surakarta dan Jogjakarta. Secara turun-temurun, khasiatnya dikenal untuk mengobati luka, diabetes, lever, dan flu. Menurut Harmanto (2001), mahkota dewa berkhasiat untuk mengatasi alergi, sesak nafas, desentri, penyakit kulit, diabetes, jantung, ginjal, kanker, darah tinggi, dan asam urat. Tanaman ini juga dapat digunakan sebagai penambah stamina, mengatasi ketergantungan narkoba, dan dapat digunakan sebagai pemicu kontraksi rahim pada proses persalinan.

Saat ini banyak masyarakat yang beralih pada pengobatan alternatif dengan memanfaatkan produk alam. Mahkota dewa merupakan salah satu tanaman obat yang saat ini sedang naik daun. Menurut Harmanto (2001) tanaman ini merupakan jenis tanaman obat yang keras dan beracun. Daun dan buahnya dapat melepuhkan kulit jika dimakan mentah. Selain getahnya panas, juga dapat

menyebabkan mabuk atau keracunan. Buahnya dapat menyebabkan pusing dan mual, sedangkan bijinya dapat menyebabkan keracunan. Sehingga menurut beberapa peracik obat yang berpengalaman dalam meramu mahkota dewa menyarankan agar sebelum diramu dikeringkan terlebih dahulu. Di pasaran telah tersedia ramuan mahkota dewa dalam bentuk teh racik daun dan buah mahkota dewa (Yudana, 2002).

Seiring dengan perkembangan penelitian tentang obat-obatan tradisional, saat ini tengah digalakkan penelitian untuk menemukan senyawa aktif yang dapat mematikan sel-sel kanker. Buah mahkota dewa mengandung senyawa aktif yang ditemukan pada ekstrak metanol (Sant, 2002). Akan tetapi senyawa ini sampai saat ini belum teridentifikasi. Identifikasi senyawa aktif pada ekstrak metanol buah mahkota dewa penting untuk dilakukan. Salah satu upaya untuk mengetahui senyawa aktif adalah dengan mengidentifikasi senyawa flavonoid. Senyawa inilah yang diduga sangat potensial sebagai antikanker. Untuk itu dilakukan identifikasi senyawa flavonoid pada ekstrak metanol buah mahkota dewa menggunakan spektrofotometer UV-Vis. Identifikasi dengan metode ini dapat digunakan untuk mengetahui struktur senyawa flavonoid yang terdapat pada ekstrak metanol buah mahkota dewa.

## **1.2 Rumusan Masalah**

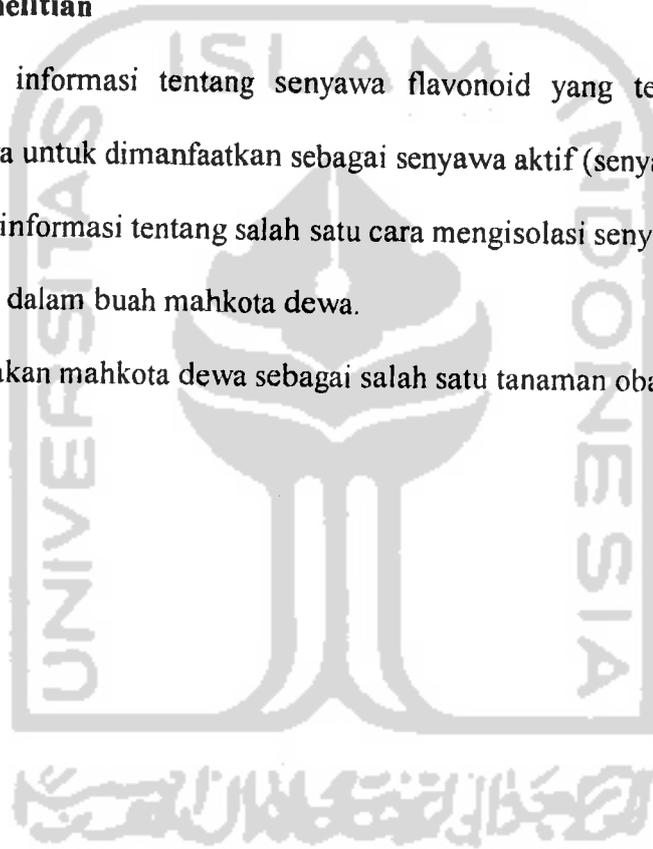
Berdasarkan uraian di atas dapat dirumuskan permasalahan yaitu senyawa flavonoid apakah yang terkandung dalam ekstrak metanol buah mahkota dewa melalui identifikasi menggunakan spektrofotometer UV-Vis?

### 1.3 Tujuan Penelitian

Penelitian ini bertujuan untuk mengetahui senyawa flavonoid yang terdapat dalam ekstrak metanol buah mahkota dewa melalui identifikasi menggunakan spektrofotometer UV-Vis.

### 1.4 Manfaat Penelitian

1. Memberikan informasi tentang senyawa flavonoid yang terdapat dalam mahkota dewa untuk dimanfaatkan sebagai senyawa aktif (senyawa obat).
2. Memberikan informasi tentang salah satu cara mengisolasi senyawa flavonoid yang terdapat dalam buah mahkota dewa.
3. Mendayagunakan mahkota dewa sebagai salah satu tanaman obat.



## BAB II

### TINJAUAN PUSTAKA

Flavonoid merupakan senyawa metabolit sekunder yang terdapat pada tanaman hijau, kecuali alga. Penyebaran flavonoid terdapat pada semua bagian tanaman, baik daun, akar, batang, kulit, serbuk sari, nektar buah, buah buni ataupun pada biji. Flavonoid yang lazim ditemukan pada tumbuhan tingkat tinggi (*Angiospermae*) adalah flavon dan flavonol dengan C- dan O-glikosida, isoflavon C- dan O-glikosida, flavanon C- dan O-glikosida, khalkon dengan C- dan O-glikosida, dan dihidrokhalkon, proantosianidin dan antosianin, auron O-glikosida, dan dihidroflavonol O-glikosida. Golongan flavon, flavonol, flavanon, isoflavon, dan khalkon juga sering ditemukan dalam bentuk aglikonnya (Markham, 1988).

Mahkota dewa (*Phaleria macrocarpa* Boerl) merupakan salah satu tanaman tingkat tinggi (*Angiospermae*) termasuk famili *Thymelaeaceae*. Secara turun-temurun tanaman berkhasiat untuk mengobati berbagai macam penyakit. Khasiat mahkota dewa tidak lepas dari kandungan senyawa kimia di dalamnya. Daun dan buah mahkota dewa mengandung senyawa alkaloid, saponin, flavonoid, dan polifenol (Harmanto, 2001)

Ekstrak daun mahkota dewa dapat memberikan efek antihistamin (Siswono, 2001). Daging buah mahkota dewa mempunyai efek hipoglikemik (dapat menurunkan kadar gula dalam darah). Berdasarkan hasil penelitian dapat ditunjukkan bahwa daging buah mahkota dewa menghasilkan efek

antihipoglikemik pada tikus putih jantan. Dosis terbaik yang digunakan untuk menghasilkan efek tersebut adalah 241,35 mg/kg berat badan (Primsa, 2002).

Hasil uji toksisitas terhadap hasil fraksinasi ekstrak kloroform biji mahkota dewa pada *Artemia salina* Leach dapat ditunjukkan bahwa senyawa antikanker yang ditemukan termasuk senyawa alkaloid, terpenoid, dan polifenol (Mursiti, 2002). Kulit buah mahkota dewa mengandung flavonoid sedangkan ekstrak kloroformnya mengandung alkaloid dan terpenoid. Hasil uji toksisitas terhadap daun mahkota dewa pada ekstrak kloroform, metanol, dan air menunjukkan bahwa ketiga ekstrak tersebut mengandung senyawa aktif. Uji senyawa aktif yang dilakukan dengan kromatografi lapis tipis. Senyawa paling toksik terdapat dalam ekstrak kloroform yang merupakan senyawa terpenoid (Pratiwi, 2002).

Senyawa aktif juga ditemukan pada ekstrak metanol, tetapi sampai saat ini senyawa tersebut belum teridentifikasi (Sant, 2002). Sehingga untuk mengidentifikasi senyawa aktif, khususnya senyawa flavonoid difokuskan pada ekstrak metanol. Menurut Markham (1988) untuk mendapatkan ekstrak flavonoid sebaiknya dilakukan ekstraksi soxhletasi menggunakan pelarut metanol. Ekstraksi dilakukan dua tahap, tahap pertama menggunakan MeOH : air (9 : 1) dan tahap kedua menggunakan MeOH : air (1 : 1).

Senyawa flavonoid pada umumnya mudah larut dalam air, terutama bentuk glikosidanya. Senyawa tersebut dapat diekstrak menggunakan pelarut air. Senyawa yang sedikit larut dalam air bersifat semi polar dapat diekstraksi dengan pelarut metanol 80 % aseton, dan etanol (Robinson, 1991).

Identifikasi pendahuluan pada ekstrak bahan alam dapat dilakukan dengan kromatografi kertas atau kromatografi lapis tipis. Kromatogram dapat berguna dalam mengenali jenis senyawa flavonoid (Markham, 1988). Eluen yang digunakan ditentukan secara coba-coba. Secara umum eluen yang dicoba pertama kali adalah eluen tunggal atau BAA, kemudian dapat dicoba eluen lain. Pengujian kandungan flavonoid dari daun kacang panjang dilakukan dengan kromatografi kertas menggunakan eluen BAA yang terdiri dari n-butanol : asam asetat : air, 4:1:5 (v/v) (Purwaningsih, 2001).

Uji pendahuluan ekstrak metanol 80 % kulit buah manggis dilakukan dengan kromatografi lapis tipis (Astuti, 2002). Metode ini juga dilakukan untuk menentukan eluen yang sesuai untuk keperluan isolasi dan identifikasi selanjutnya. Eluen terbaik yang digunakan pada pengembangan senyawa flavonoid dalam ekstrak tersebut adalah kloroform : etil asetat, 10:1 (v/v). Pengembangan ekstrak kloroform daun kecombrang dengan kromatografi lapis tipis diperoleh terbaik dilakukan dengan menggunakan eluen benzena : etil asetat, 8:2 (v/v) (Eni, 1998). Identifikasi pendahuluan senyawa flavonoid dengan kromatografi lapis tipis juga dilakukan pada ekstrak kloroform biji pinang (Handayani, 1998) dan tempe kedelai (Edfiyenti, 1996).

Deteksi kromatogram dilakukan dengan melihat bercak di bawah lampu UV (Markham, 1988). Lampu UV yang digunakan mempunyai panjang gelombang 254 nm dan 366 nm (Eni, 1998 dan Astuti, 2002). Deteksi bercak dilakukan tanpa uap amoniak dan dengan uap amoniak (Markham, 1988 ; Purwaningsih, 2001 ; dan Handayani, 1998). Deteksi bercak dapat dilakukan

dengan menggunakan pereaksi semprot vanilin-HCl ;  $\text{FeCl}_3$  5 %;  $\text{AlCl}_3$  5 %; dan pereaksi Dragendorff 135 (Markham, 1988 ; Handayani, 1998 ; dan Astuti, 2002).

Isolasi dilakukan dengan menggunakan kromatografi kertas dan kromatografi lapis tipis preparatif atau menggunakan kromatografi kolom (Markham, 1988). Isolasi flavonoid dari daun kacang panjang dilakukan dengan kromatografi kertas preparatif. Kemurnian isolat dibuktikan dengan kromatografi kertas dua dimensi, menggunakan eluen BAA dan pengembangan selanjutnya menggunakan eluen asam asetat 15 % (Purwaningsih, 2001 dan Markham, 1988). Isolasi dari tempe kedelai (Edfiyenti, 1996) dilakukan dengan kromatografi lapis tipis preparatif. Isolasi dengan kromatografi kolom dilakukan pada isolasi flavonoid dari kulit buah manggis (Astuti, 2002) dan biji pinang (Handayani, 1998).

Identifikasi flavonoid dapat dilakukan menggunakan spektrofotometer UV-Vis. Spektrum serapan ultra violet dan serapan tampak merupakan cara tunggal yang paling bermanfaat untuk mengidentifikasi struktur flavonoid (Markham, 1988). Flavonoid mengandung sistem aromatis yang terkonjugasi dan dapat menunjukkan pita serapan kuat pada daerah UV-Vis (Harborne, 1987). Jumlah senyawa dalam bercak kromatogram atau eluat kolom cukup untuk pengukuran spektrum, bahkan dapat dilakukan tanpa mengelusi puncak (Robinson, 1995). Metode ini dapat digunakan untuk mengidentifikasi jenis flavonoid, menentukan pola oksigenasi, kedudukan gugus hidroksil fenol bebas pada inti flavonoid dengan pereaksi geser, dan menentukan kedudukan gula atau metil yang terikat pada salah satu gugus hidroksil fenol (Markham, 1988).

Spektrum flavonoid secara umum dapat ditentukan dengan pelarut metanol atau etanol. Pelarut yang terbaik pada pengukuran spektrum flavonoid adalah metanol, sedangkan spektrum yang dihasilkan dengan menggunakan pelarut etanol kurang baik. Pengukuran spektrum antosianidin digunakan HCl 0,4 M dalam metanol (Markham, 1988). Bercak tunggal dari pemisahan dengan kromatografi kertas preparatif (Purwaningsih, 2001) ataupun pemisahan menggunakan kromatografi lapis tipis preparatif (Eni, 1998) dilarutkan dengan pelarut metanol.

Identifikasi juga dilakukan berdasarkan pergeseran spektrum menggunakan pereaksi geser. Penambahan basa, seperti natrium asetat atau natrium etilat menyebabkan pergeseran spektrum yang khas pada kebanyakan flavonoid (Robinson, 1995). Pereaksi ini untuk menetapkan pola gugus hidroksil, terutama adanya gugus 7-hidroksil bebas atau yang setara (Markham, 1988). Flavonoid yang mengandung gugus hidroksil bebas pada posisi 3 dan 4' terurai oleh basa pereaksi tersebut (Robinson, 1995).

Pola hidroksilasi, keasaman gugus hidroksi, dan substituen ditentukan dengan pereaksi natrium metoksida atau dapat diganti dengan NaOH 2 M. Borat akan membentuk orto hidroksil dan menimbulkan pergeseran pita yang khas. Aluminium klorida memberikan pergeseran 20 nm atau lebih pada gugus tersebut. Pereaksi ini dapat digunakan untuk membedakan flavanon dari isoflavon. Pereaksi lain yang dianjurkan adalah timbal asetat, antimonium, dan zirkonium (Robinson, 1995).

### BAB III

### DASAR TEORI

#### 3.1 Mahkota Dewa

Sebagian ahli botani memberikan nama mahkota dewa berdasarkan asalnya, yaitu *Phaleria papuana* Warb. Var. *Wichannii* (Val.) Back. Ahli botani lainnya memberikan nama sesuai dengan ukuran buahnya yang besar (makro), *Phaleria macrocarpa* (Scheff.) Boerl. Sebutan lain untuk mahkota dewa adalah pusaka dewa, derajat, mahkota ratu, mahkota raja, dan trimahkota. Di Jawa Tengah dikenal dengan nama *mahkuto dewo*, *mahkuto rojo*, atau *mahkuto ratu*. Di Banten dikenal sebagai raja obat kerana mampu mengobati berbagai penyakit. Di Cina lebih dikenal dengan nama *pau*. Beberapa orang menjulukinya dengan nama *The Crown of God*.

Klasifikasi tanaman ini adalah sebagai berikut :

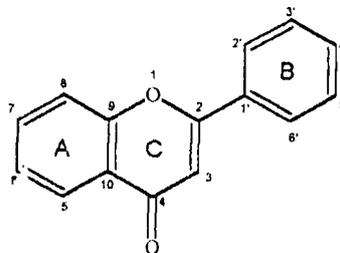
Divisi	: <i>Spermathophyta</i>
Sub-divisi	: <i>Angiospermae</i>
Kelas	: <i>Dicotyledonae</i>
Bangsa	: <i>Thymelacales</i>
Suku	: <i>Thymelaeaceae</i>
Marga	: <i>Phaleria</i>
Spesies	: <i>Phaleria macrocarpa</i> (Scheff) Boerl

Tanaman ini dapat tumbuh pada berbagai kondisi, baik di dataran rendah maupun dataran tinggi dengan ketinggian 10 - 1.200 meter dari permukaan air laut. Namun, pertumbuhan yang paling baik adalah di daerah dengan ketinggian 10 - 1.000 meter dari permukaan air laut. Perkembangbiakannya dapat melalui cara vegetatif dengan mencangkok atau dengan cara generatif dengan memperbanyak melalui biji.

## 3.2 Flavonoid

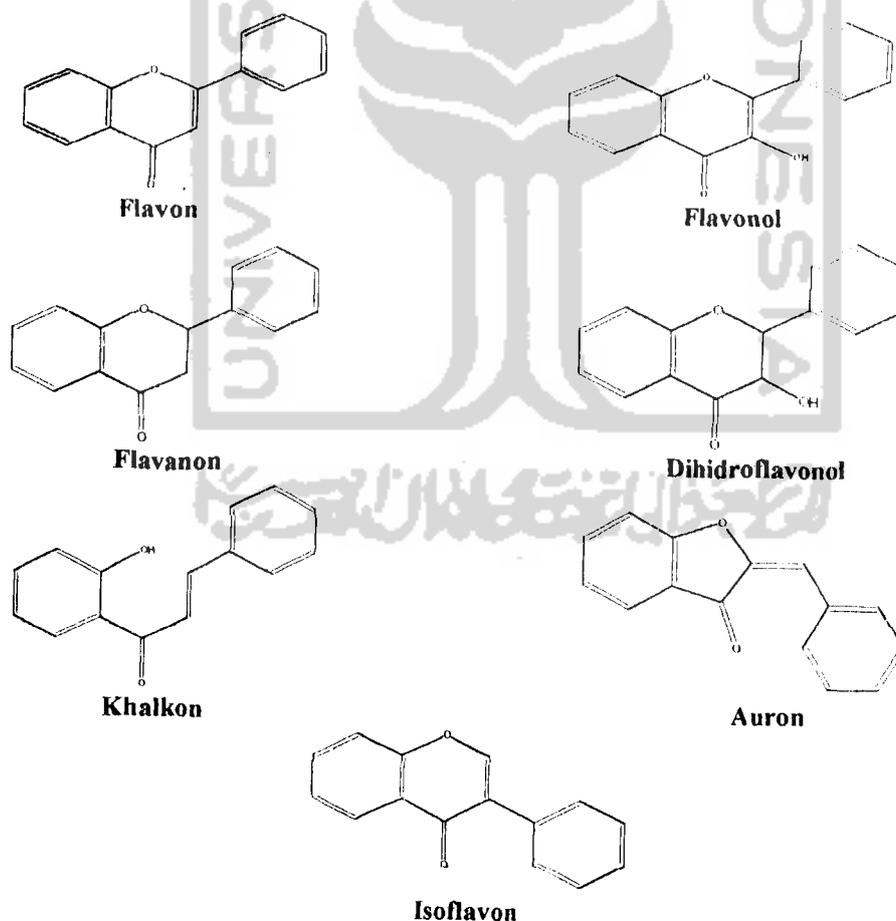
### 3.2.1 Penggolongan flavonoid

Flavonoid merupakan senyawa metabolit sekunder dan termasuk senyawa fenol alam terbesar. Dalam tanaman, aglikon flavonoid, yaitu flavonoid tanpa terikat gula terdapat dalam berbagai bentuk struktur. Jumlah atom C pada rantai dasarnya adalah 15 yang tersusun dalam konfigurasi  $C_6-C_3-C_6$ , yaitu tersusun dari dua cincin aromatis yang dapat atau tidak dapat membentuk cincin ketiga (Markham, 1988). Agar mudah dalam pemberian nama, cincin diberi tanda A, B, dan C. Atom karbon pada cincin A dan C diberi nomor dengan menggunakan angka biasa, sedangkan pada cincin B menggunakan angka beraksen. Struktur flavonoid dapat ditunjukkan pada Gambar 1.



**Gambar 1. Struktur flavonoid**

Semua varian flavonoid saling berkaitan dan berasal dari jalur biosintesis dari alur sikhimat dan jalur asetat malonat (Markham, 1988). Flavonoid yang terbentuk pertama kali adalah khalkon (Hahborck, 1980). Modifikasi flavonoid lebih lanjut terjadi pada berbagai tahap setelah mengalami penambahan dan pengurangan gugus hidroksi atau inti flavonoid, metilenasi gugus orto-hidroksi, dimerisasi, pembentukan bisulfat, dan glikosilasi gugus hidroksil. Flavonoid yang sering dijumpai adalah flavonoid golongan flavon, flavonol, flavanon, dihidroflavonol, khalkon, auron, dan isoflavon. Struktur aglikon flavonoid dapat dilihat pada gambar 2.



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

### 3.2.2 Penyebaran pada tanaman

Flavonoid merupakan kandungan khas tumbuhan hijau kecuali alga. Sedikit catatan yang mengatakan bahwa flavonoid terdapat pada hewan, seperti pada kupu-kupu dan lebah. Kandungan flavonoid pada hewan diduga berasal dari makanan, bukan hasil biosintesis. Penyebaran jenis flavonoid, yang terbesar terdapat pada golongan *Angiospermae*. Flavonoid terdapat pada bagian daun, akar, batang, bunga, buah, dan biji. Flavonoid yang lazim ditemukan pada golongan tanaman ini adalah golongan flavon. Golongan lain yang ditemukan adalah flavonol, auron, biflavon, dan dihidroflavonol (Markham, 1988).

Penyebaran flavonoid mempunyai kecenderungan yang kuat bahwa tumbuhan yang secara taksonomi berkaitan akan menghasilkan flavonoid yang serupa. Informasi ini sangat berguna untuk menentukan kemungkinan flavonoid yang telah ditemukan pada tanaman yang berkaitan taksonominya. Penyebaran flavonoid pada tumbuhan dapat ditunjukkan pada tabel 1.

**Tabel 1. Penyebaran flavonoid pada tumbuhan**

Divisi	Nama <sup>a</sup>	Flavonoid yang ditemukan <sup>b</sup>
<i>Procaryote</i> Sizofita	Bakteria (3.200)	Tidak ada
Sianofita	Alga hijau- biru (2.800)	Tidak ada
<i>Eucaryote</i> Klorofita	Alga hijau (1.000)	Tidak ada
	Lumut hijau (450)	C-glikosida flavon (jarang, <i>Nitella</i> )
Feofita	Alga coklat (400 - 600)	Tidak ada
Rodofita	Alga merah (600 - 900)	Tidak ada

Divisi	Nama <sup>a</sup>	Flavonoid yang ditemukan <sup>b</sup>
Fungus	Fungus (460)	Dihidrokhalkon (jarang, <i>Phallus</i> ), flavon tidak lazim (jarang, <i>Aspergillus</i> )
Briofita	Lumut kerak	Tidak ada
	Lumut hati (380)	<sup>c</sup> C- dan O-glikosida flavon O-glikosida flavonol (jarang) O-glikosida flavanon (jarang, <i>Riccia</i> ) O-glikosida auron (jarang) O-glikosida dihidrokhalkon (jarang, <i>Hymenophyton</i> )
	Lumut (280)	O-glikosida flavonol, Biflavon (jarang), Auron (jarang, <i>Funaria</i> ), <sup>c</sup> C- dan O-glikosida flavon 3-deoksiantosianin
Trakeofita	Lumut tanduk ( <i>Anthoceros</i> )	Tidak ada
	Psilofita (400)	<sup>c</sup> Biflavon, O-glikosida, flavon, O-glikosida (sesepora), C-glikosida flavon (sesepora)
	Lycopodium (380)	<sup>c</sup> Flavon, O-glikosida, flavon, C-glikosida (langka, <i>L.cernuum</i> ), biflavon (hanya <i>Selaginella</i> )
	Ekor kuda (380)	<sup>c</sup> O-glikosida flavonol, O-glikosida flavon, proantosianidin, C-glikosida flavon (sesepora) Flavonon, dihidroflavonol
	Paku (375)	<sup>c</sup> O-Glikosida flavonol, C- dan O-glikosida flavon (langka), 3-deoksiantosianin, flavonon, khalkon, dihidrokhalkon, biflavon (langka, hanya <i>Osmunda</i> ), proantosianidin, antosianidin
Angiospermae	Gymnospermae (350)	Flavon, biflavonoid, flavanon, C-glikosida flavon, isoflavon (langka, mis. <i>Juniperus</i> ) Proantosianidin, antosianidin, flavonol, dihidrokhalkon
	Angiospermae (135)	<sup>c</sup> flavon dan flavonol, C-dan O-glikosida ( <i>Leguminosae</i> ) Flavanon, C- dan O-glikosida khalkon, dan dihidrokhalkon Auron, O-glikosida, biflavon (langka), dihidroflavonol, O-glikosida

(Sumber : Markham, 1988)

<sup>a</sup> angka di dalam tanda kurung setelah lazim menunjukkan umur fosil tertua dalam jutaan tahun (swain, 1975).

<sup>b</sup> Jika disebut O-glikosida, biasanya terdapat juga aglikon, nama generik dicantumkan jika yang terlibat hanya satu genus.

<sup>c</sup> yang lazim dijumpai

### 3.3 Ekstraksi

#### 3.3.1. Pengertian ekstraksi

Ekstraksi merupakan metode pemisahan suatu komponen dalam campuran zat padat atau zat cair dengan menggunakan bantuan zat cair lain sebagai pelarut. Secara umum ekstraksi dibedakan menjadi dua, yaitu ekstraksi zat padat (*solid extraction*) dan ekstraksi zat cair (*liquid extraction*). Ekstraksi zat padat merupakan metode pemisahan zat padat atau zat cair dari suatu zat padat. Metode ini sering dikenal dengan metode pengurasan (*leaching*). Sedangkan pemisahan zat padat atau zat cair dari suatu zat cair disebut dengan ekstraksi cair atau lebih dikenal dengan ekstraksi pelarut (Meloan, 1999).

Prinsip ekstraksi menggunakan prinsip *like dissolve like*. Komponen yang bersifat polar akan mudah larut dalam pelarut polar dan komponen yang bersifat non polar akan mudah larut dalam pelarut non polar. Kelarutan suatu komponen juga dipengaruhi oleh kemampuan zat terlarut untuk membentuk ikatan hidrogen dengan pelarut.

Pelarut yang baik harus memenuhi beberapa kriteria, antara lain adalah :

1. Pelarut harus mampu melarutkan semua komponen yang dipisahkan dan tidak dapat melarutkan bahan yang diekstrak
2. Pelarut harus mempunyai titik didih yang relatif rendah, sehingga mudah dipisahkan
3. Pelarut harus mudah dipisahkan dari komponen yang dipisahkan
4. Secara ekonomis, pelarut murah harganya

### 3.3.2 Ekstraksi soxhletasi

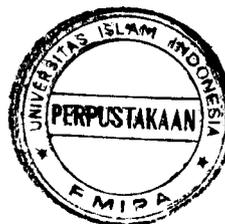
Salah satu metode ekstraksi zat padat adalah menggunakan seperangkat soxhlet. Prinsip pemisahannya adalah dengan membiarkan komponen yang akan dipisahkan bercampur sementara waktu dengan pelarut dengan proses yang berulang-ulang dan teratur. Alat yang digunakan berupa seperangkat soxhlet yang terdiri dari pemanas, labu alas bulat, soxhlet, dan pendingin bola (Meloan, 1999).

Pelarut yang berada dalam labu alas bulat dipanaskan sehingga akan mencapai titik didihnya. Pada saat pelarut mendidih, terjadi kesetimbangan fase cair dan fase uap. Fase uap menguap melalui pipa masuk ke pendingin dan akan mengembun. Embun yang berupa fase cair pelarut menetes dan mengenai zat padat yang diletakkan dalam soxhlet.

Pemanasan dilakukan secara terus menerus sehingga akan dihasilkan fase uap yang terus mengembun di pendingin kemudian menetes ke zat padat. Pelarut akan ditampung sementara waktu dan dibiarkan merendam ekstrak sampai tingginya mencapai tinggi pipa kapiler. Akhirnya pelarut yang telah membawa komponen yang akan dipisahkan kembali ke labu alas bulat melalui pipa soxhlet. Proses ini berlangsung secara terus menerus sampai batas waktu yang diinginkan.

Ekstraksi dipengaruhi oleh beberapa faktor, antara lain adalah :

1. Jenis komponen yang akan dipisahkan
2. Jenis pelarut dan jumlahnya
3. Waktu ekstraksi
4. Temperatur ekstraksi



### 3.3.3 Ekstraksi flavonoid

Aglikon flavonoid termasuk polifenol sehingga mempunyai sifat kimia senyawa fenol, yaitu bersifat agak asam dan dapat larut dalam basa. Jika dibiarkan dalam larutan basa, dengan adanya oksigen akan menyebabkan terjadinya peruraian. Oleh karena itu pada ekstraksi flavonoid harus diperhatikan jenis flavonoid yang akan diekstrak dan kepolarannya. Senyawa flavonoid yang bersifat polar dapat larut dalam pelarut polar seperti etanol, metanol, butanol, aseton, dimetil sulfoksida (DMSO), dimetil formamida (DMF), air, dan lain-lain. Sedangkan senyawa aglikon flavonoid bersifat kurang polar, seperti isoflavan, flavon, dan flavonol yang termetoksilasi cenderung larut dalam pelarut eter dan kloroform (Markham, 1988).

Ekstraksi flavonoid lebih ideal dilakukan pada bahan yang masih segar. Bahan yang sudah lama mempunyai kecenderungan terjadi perubahan dari glikosida menjadi aglikon yang mudah teroksidasi. Isolasi dari bahan segar dilakukan dengan mengeringkan dengan cepat pada temperatur sekitar 100 °C untuk mencegah kerja enzim.

Ekstraksi paling baik dilakukan dengan 2 tahap. Tahap pertama dilakukan dengan pelarut metanol : air (9:1) dan tahap kedua menggunakan pelarut metanol : air (1:1). Pelarut metanol merupakan pelarut yang umum digunakan. Ekstraksi flavonoid yang bersifat kurang polar dapat menggunakan metanol yang mengandung 1 % HCl. Senyawa-senyawa yang kepolarannya rendah, seperti lemak, terpena, klorofil, xantofil, dan lain-lain dipisah dengan ekstraksi pelarut menggunakan pelarut n-heksana atau kloroform.

### 3.4 Kromatografi

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

#### 3.4.1 Kromatografi lapis tipis (KLT)

Kromatografi lapis tipis merupakan kromatografi serapan dalam lapisan tipis yang dilekatkan pada suatu penyokong yang inert pada suatu plat. Kromatografi lapis tipis mempunyai beberapa keuntungan dibandingkan dengan kromatografi kolom. Keuntungan tersebut antara lain yaitu analisisnya lebih cepat dan hanya memerlukan sedikit sampel dan eluen.

Sifat umum penyerapan pada kromatografi lapis tipis mirip dengan penyerapan pada kromatografi kolom. Penyerapan dipengaruhi oleh besar partikel dan homogenitas. Penyerapan yang banyak digunakan adalah silika gel disamping alumina. Silika gel yang digunakan diberi pengikat untuk memberikan

kekuatan pada lapisan dan menambah adhesi pada padatan penyokong. Pengikat yang biasanya digunakan adalah kalsium sulfat yang dikenal dengan silika gel G. Penyerap diletakkan di atas permukaan penyokong yang pada umumnya digunakan plat kaca ataupun aluminium.

Fase gerak (eluen) yang digunakan ada 2 macam, yaitu eluen tunggal dan eluen yang terdiri dari campuran dua atau lebih pelarut. Eluen yang digunakan sifatnya coba-coba. Berdasarkan strukturnya, pelarut dibedakan menjadi 3, yaitu :

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

Penempatan cuplikan menggunakan pipa kapiler atau mikro pipet yang baik. Penempatan noda di atas plat sekitar 1 cm dari salah satu ujung yang dicelupkan pada eluen. Plat diberi garis awal dan akhir dengan menggunakan pensil. Pengembangan dilakukan pada bejana yang telah diisi eluen yang tingginya kurang dari 1 cm dari dasar bejana. Bejana pengembang harus tertutup rapat dan sedapat mungkin ukuran bejana mempunyai volume yang kecil. Elusi dilakukan setelah terjadi kesetimbangan eluen dalam bejana pengembang.

Identifikasi senyawa yang terpisah pada lapisan tipis dilakukan dengan pereaksi lokasi kimia dan reaksi-reaksi warna. Identifikasi yang umum digunakan adalah menggunakan harga  $R_f$  (*retordation factor*). Harga  $R_f$  didefinisikan sebagai :

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

Harga  $R_f$  untuk senyawa-senyawa murni dapat dibandingkan dengan harga  $R_f$  standar. Besarnya harga  $R_f$  berkisar antara 0 sampai 1, atau dapat dinyatakan dalam  $R_f \times 100$ . Besarnya harga  $R_f$  menunjukkan kelincahan suatu senyawa terhadap fase gerak. Semakin besar harga  $R_f$  berarti senyawa tersebut lebih mudah terdistribusi dalam fase gerak. Senyawa dengan harga  $R_f$  lebih kecil berarti senyawa tersebut lebih lama terdistribusi dalam fase diam.

Menurut Sastrohamidjojo (1985), besarnya harga  $R_f$  dipengaruhi oleh pengembangan. Pengembangan noda pada plat kromatografi lapis tipis dipengaruhi oleh beberapa faktor, antara lain adalah :

1. Struktur kimia senyawa yang dipisahkan
2. Sifat penyerap dan derajat aktifitasnya
3. Tebal dan kerataan lapisan penyerap
4. Jenis dan kemurnian eluen
5. Derajat kejenuhan eluen dalam bejana pengembang
6. Teknik pengembangan
7. Penempatan cuplikan
8. Temperatur pengembangan
9. Kesetimbangan dalam plat kromatografi lapis tipis

dengan menggunakan pereaksi semprot vanilin-HCl ;  $\text{FeCl}_3$  5 %;  $\text{AlCl}_3$  5 %; dan pereaksi Dragendorff 135 (Markham, 1988 ; Handayani, 1998 ; dan Astuti, 2002).

Isolasi dilakukan dengan menggunakan kromatografi kertas dan kromatografi lapis tipis preparatif atau menggunakan kromatografi kolom (Markham, 1988). Isolasi flavonoid dari daun kacang panjang dilakukan dengan kromatografi kertas preparatif. Kemurnian isolat dibuktikan dengan kromatografi kertas dua dimensi, menggunakan eluen BAA dan pengembangan selanjutnya menggunakan eluen asam asetat 15 % (Purwaningsih, 2001 dan Markham, 1988). Isolasi dari tempe kedelai (Edfiyenti, 1996) dilakukan dengan kromatografi lapis tipis preparatif. Isolasi dengan kromatografi kolom dilakukan pada isolasi flavonoid dari kulit buah manggis (Astuti, 2002) dan biji pinang (Handayani, 1998).

Identifikasi flavonoid dapat dilakukan menggunakan spektrofotometer UV-Vis. Spektrum serapan ultra violet dan serapan tampak merupakan cara tunggal yang paling bermanfaat untuk mengidentifikasi struktur flavonoid (Markham, 1988). Flavonoid mengandung sistem aromatis yang terkonjugasi dan dapat menunjukkan pita serapan kuat pada daerah UV-Vis (Harborne, 1987). Jumlah senyawa dalam bercak kromatogram atau eluat kolom cukup untuk pengukuran spektrum, bahkan dapat dilakukan tanpa mengelusi puncak (Robinson, 1995). Metode ini dapat digunakan untuk mengidentifikasi jenis flavonoid, menentukan pola oksigenasi, kedudukan gugus hidroksil fenol bebas pada inti flavonoid dengan pereaksi geser, dan menentukan kedudukan gula atau metil yang terikat pada salah satu gugus hidroksil fenol (Markham, 1988).

Spektrum flavonoid secara umum dapat ditentukan dengan pelarut metanol atau etanol. Pelarut yang terbaik pada pengukuran spektrum flavonoid adalah metanol, sedangkan spektrum yang dihasilkan dengan menggunakan pelarut etanol kurang baik. Pengukuran spektrum antosianidin digunakan HCl 0,4 M dalam metanol (Markham, 1988). Bercak tunggal dari pemisahan dengan kromatografi kertas preparatif (Purwaningsih, 2001) ataupun pemisahan menggunakan kromatografi lapis tipis preparatif (Eni, 1998) dilarutkan dengan pelarut metanol.

Identifikasi juga dilakukan berdasarkan pergeseran spektrum menggunakan pereaksi geser. Penambahan basa, seperti natrium asetat atau natrium etilat menyebabkan pergeseran spektrum yang khas pada kebanyakan flavonoid (Robinson, 1995). Pereaksi ini untuk menetapkan pola gugus hidroksil, terutama adanya gugus 7-hidroksil bebas atau yang setara (Markham, 1988). Flavonoid yang mengandung gugus hidroksil bebas pada posisi 3 dan 4' terurai oleh basa pereaksi tersebut (Robinson, 1995).

Pola hidroksilasi, keasaman gugus hidroksi, dan substituen ditentukan dengan pereaksi natrium metoksida atau dapat diganti dengan NaOH 2 M. Borat akan membentuk orto hidroksil dan menimbulkan pergeseran pita yang khas. Aluminium klorida memberikan pergeseran 20 nm atau lebih pada gugus tersebut. Pereaksi ini dapat digunakan untuk membedakan flavanon dari isoflavon. Pereaksi lain yang dianjurkan adalah timbal asetat, antimonium, dan zirkonium (Robinson, 1995).

## BAB III

### DASAR TEORI

#### 3.1 Mahkota Dewa

Sebagian ahli botani memberikan nama mahkota dewa berdasarkan asalnya, yaitu *Phaleria papuana* Warb. Var. *Wichannii* (Val.) Back. Ahli botani lainnya memberikan nama sesuai dengan ukuran buahnya yang besar (makro), *Phaleria macrocarpa* (Scheff.) Boerl. Sebutan lain untuk mahkota dewa adalah pusaka dewa, derajat, mahkota ratu, mahkota raja, dan trimahkota. Di Jawa Tengah dikenal dengan nama *mahkuto dewo*, *mahkuto rojo*, atau *mahkuto ratu*. Di Banten dikenal sebagai raja obat kerana mampu mengobati berbagai penyakit. Di Cina lebih dikenal dengan nama *pau*. Beberapa orang menjulukinya dengan nama *The Crown of God*.

Klasifikasi tanaman ini adalah sebagai berikut :

- Divisi : *Spermathophyta*
- Sub-divisi : *Angiospermae*
- Kelas : *Dicotylodoneae*
- Bangsa : *Thymelacales*
- Suku : *Thymelaeaceae*
- Marga : *Phaleria*
- Spesies : *Phaleria macrocarpa* (Scheff) Boerl

### 3.4.2 Identifikasi flavonoid menggunakan kromatografi lapis tipis

Pada analisis flavonoid, kromatografi lapis tipis berguna untuk :

1. Mencari pelarut atau eluen untuk kromatografi kolom
2. Analisis fraksi yang diperoleh pada pemisahan menggunakan kromatografi kolom (fraksinasi)
3. Mengetahui perkembangan reaksi hidrolisis atau metilasi dengan menggunakan pereaksi warna atau pereaksi semprot
4. Isolasi flavonoid murni skala kecil menggunakan kromatografi lapis tipis preparatif dan uji kemurnian isolat flavonoid menggunakan kromatografi lapis tipis dua dimensi
5. Identifikasi flavonoid dengan menggabungkan warna bercak dengan spektrum khas senyawa flavonoid

Deteksi kromatogram pada plat kromatografi lapis tipis dapat dilakukan dengan menggunakan sinar UV 254 nm atau 366 nm. Bercak yang dihasilkan ditandai dengan pensil. Selain diperoleh harga  $R_f$ , juga akan diperoleh warna bercak. Warna bercak yang dihasilkan dapat digunakan sebagai petunjuk penafsiran struktur flavonoid. Penafsiran struktur flavonoid dapat dilakukan dengan menggunakan petunjuk penafsiran warna bercak flavonoid, dilakukan tanpa uap amoniak dan dengan uap amoniak, seperti yang ditunjukkan pada tabel 2.

Tabel 2. Penafsiran warna bercak dari segi struktur flavonoid

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

(Sumber : Markham, 1988)

Uji warna merupakan salah satu deteksi yang dilakukan pada kromatogram. Uji yang dilakukan menggunakan pereaksi semprot, menurut Markham (1988), ada 4 macam penyemprot yang dapat digunakan dalam mendeteksi flavonoid, yaitu larutan  $\text{AlCl}_3$  5 % ; larutan vanili-HCl; asam sulfanilat yang berdiazotasi; dan kompleks difenil-asam borat-etanolamin.

1.  $\text{AlCl}_3$

Pereaksi ini dapat menunjukkan 5-hidroksi flavonoid sebagai bercak berfluoresensi kuning bila di bawah sinar UV 366 nm. Selain itu bercak yang mula-mula tidak tampak akan terlihat dengan jelas.

2. Kompleks difenil-asam borat-etanolamin (*Naturstoffeagenz A*)

Menunjukkan semua 3',4'-dihidroksi flavon dan 3',4'-dihidroksi flavonol sebagai bercak jingga dengan lampu UV. Bercak hijau kuning menunjukkan 4'-hidroksi flavon dan 4'-hidroksi flavonol.

3. Asam sulfanilat yang terdiazotasi

Kebanyakan senyawa yang mempunyai gugus hidroksi fenol akan terlihat sebagai bercak kuning, jingga, atau merah.

4. Vanilin-HCl

Bercak merah atau merah lembayung terbentuk segera setelah penyemprotan dan pemanasan oleh katekin dan proantosianidin, dan terbentuk lebih lambat oleh flavanon dan dihidroflavonol. Pereaksi bereaksi dengan semua flavonoid yang mempunyai pola oksidasi lingkaran-A fluoroaglusinol dan lingkaran-C jenuh. Senyawa yang demikian sering kali tidak tampak pada kromatogram bila disinari dengan sinar UV.

### 3.5 Spektrofotometer UV-Vis

#### 3.5.1 Prinsip dasar spektrofotometri

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

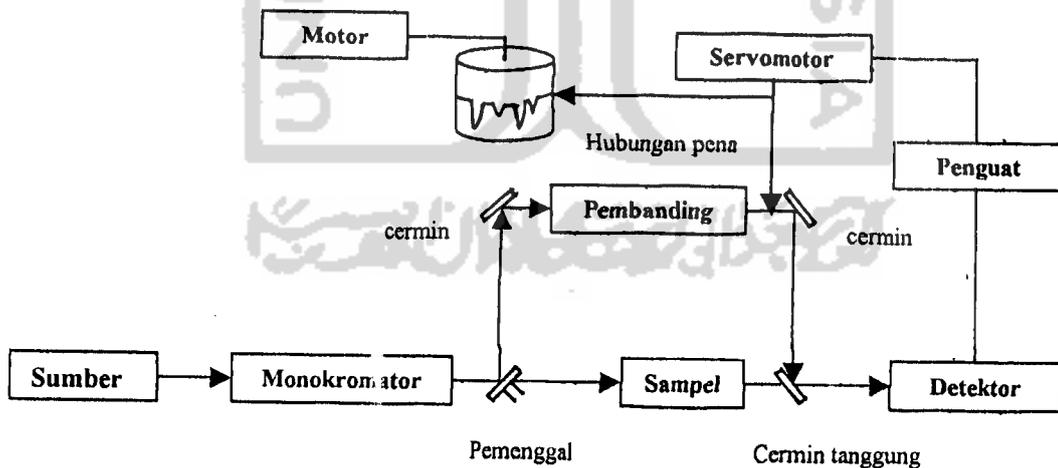
Menurut Sastrohamidjojo (1985), istilah yang sering digunakan dalam spektrum elektronik adalah kromofor. Kromofor digunakan untuk menyatakan gugus jenuh kovalen yang dapat menyerap radiasi dalam daerah UV-Vis. Beberapa istilah penting lainnya adalah auksokrom, pergeseran batokromik, pergeseran hipsokromik,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

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

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

### 3.5.2 Instrumentasi

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



**Gambar 3. Bagan instrumen spektrofotometer UV-Vis**

(Sumber : Day dan Underwood, 1986)

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

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

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

### 3.5.3 Identifikasi flavonoid

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

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

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

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

(Sumber : Harborne, 1987)

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

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

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

(Sumber : Markham, 1988)



Tabel 6. Penafsiran spektrum natrium asetat

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

(Sumber : Markham, 1988)

Tabel 7. Penafsiran spektrum natrium asetat/asam borat

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

(Sumber : Markham, 1988)

### 3.6 Hipotesis

Berdasarkan uraian di atas dapat dibuat hipotesis bahwa senyawa flavonoid dalam ekstrak metanol buah mahkota dewa (*Phaleria macrocarpa* Boerl) yang diidentifikasi menggunakan spektrofotometer UV-Vis merupakan jenis flavon, flavonol, flavanon, dihidroflavonol, auron, dan atau khalkon.



## **BAB IV**

### **METODOLOGI PENELITIAN**

#### **4.1 Alat**

1. Seperangkat soxhlet
2. Peralatan gelas
3. Oven
4. Neraca
5. Blender
6. Kromatografi lapis tipis kresgel 60 F 254
7. Lampu UV 254 nm dan 366 nm
8. Spektrofotometer UV-Vi ; Hitachi U-2010

#### **4.2 Bahan**

1. n-heksana
2. n-Butanol
3. Metanol
4. Etil asetat
5. Asam asetat
6. Natrium hidroksida
7. Aluminium klorida
8. Kertas saring



9. Kertas saring Wathman No.1
10. Serbuk natrium asetat
11. Asam borat
12. Amoniak
13. Akuades

#### **4.3 Sampel**

Sampel yang digunakan adalah buah mahkota dewa yang diperoleh dari dusun Mangiran, Trimurti, Srandakan, Bantul, Jogjakarta. Sampel diambil dengan metode acak sederhana. Buah dipilih yang bentuknya utuh (tidak cacat) dan telah masak.

#### **4.4 Cara Kerja**

##### **4.4.1 Preparasi buah mahkota dewa**

Buah mahkota dewa dipilih yang tua dan tidak cacat. Buah dibersihkan, dikupas, dan dibelah. Diambil bagian dagingnya dan dipotong kecil-kecil. Dikeringkan dengan oven pada temperatur 40 – 45° C selama 24 jam. Setelah kering didinginkan sampai temperatur kamar, kemudian dihaluskan.

##### **4.4.2 Ekstraksi soxhlet**

Ditimbang 20 gram serbuk buah mahkota dewa, dibungkus rapat menggunakan kertas saring kemudian diekstraksi dengan 75 mL n-heksana selama 5 – 7 jam. Residu didiamkan selama 1 malam dalam keadaan terendam

n-heksana. Fraksi n-heksana diambil dan residu diekstraksi dengan metanol 80 % selama 5 – 7 jam. Residu didiamkan selama 1 malam dalam keadaan terendam dalam metanol. Penelitian difokuskan pada ekstrak metanol.

#### **4.4.3 Deteksi pendahuluan menggunakan kromatografi lapis tipis**

Fraksi metanol ditotolkan pada plat KLT 3 x 10 cm. Eluen dipilih secara coba-coba. Eluen yang dicoba terlebih dahulu adalah tunggal, yaitu n-heksana, etil asetat, metanol, dan dicoba menggunakan fase atas n-butanol : asam asetat : air, 4:1:5 (v/v) atau BAA. Jika pemisahan belum baik, dicoba dengan perbandingan yang bervariasi atau dengan menggunakan jenis eluen yang bervariasi. Elusi dilakukan setelah bejana penuh dengan uap eluen, didiamkan sekitar 5 – 10 menit. Untuk mendeteksi bercak dilakukan dengan menggunakan lampu UV pada panjang gelombang 254 nm dan 366 nm. Bercak ditandai dengan menggunakan pensil. Deteksi bercak kromatogram juga dilakukan dengan uap amoniak.

#### **4.4.4 Pembuktian kemurnian isolat flavonoid**

Pembuktian kemurnian isolat flavonoid dilakukan dengan kromatografi lapis tipis dua dimensi. Elusi dilakukan pada plat KLT 6 x 6 cm. Ekstrak metanol ditotolkan 1 cm dari tepi bawah kanan. Eluen yang digunakan pada pengembangan pertama adalah eluen terbaik yang telah diperoleh dari hasil identifikasi pendahuluan. Pengembangan kedua menggunakan pelarut asam asetat 15 %. Posisi plat yang dielusi adalah posisi 90° dari kondisi mula-mula.

#### 4.4.5 Pemisahan flavonoid menggunakan kromatografi lapis tipis preparatif

Pemisahan flavonoid menggunakan beberapa lembar plat KLT 5 x 10 cm. Eluen yang digunakan adalah eluen yang paling baik yang telah ditentukan pada deteksi pendahuluan. Deteksi dilakukan dengan menggunakan lampu UV 366 nm. Bercak yang berupa pita diberi tanda dengan pensil. Setiap bercak yang diperoleh dikerok dan dilarutkan dalam metanol.

#### 4.4.6 Identifikasi menggunakan spektrofotometer UV-Vis

Diambil 2-3 mL fraksi metanol, dimasukkan dalam kuvet dan diukur spektrumnya pada panjang gelombang 200 – 400 nm. Blanko yang digunakan adalah metanol. Identifikasi dilakukan dengan menggunakan pereaksi geser. Pereaksi yang digunakan adalah pereaksi natrium metoksida, serbuk natrium asetat anhidrat,  $\text{AlCl}_3$ , HCl, dan serbuk  $\text{H}_3\text{BO}_3$ . Pembuatan pereaksi tersebut dilakukan dengan cara sebagai berikut :

##### 1. Natrium metoksida

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

##### 2. Aluminium klorida

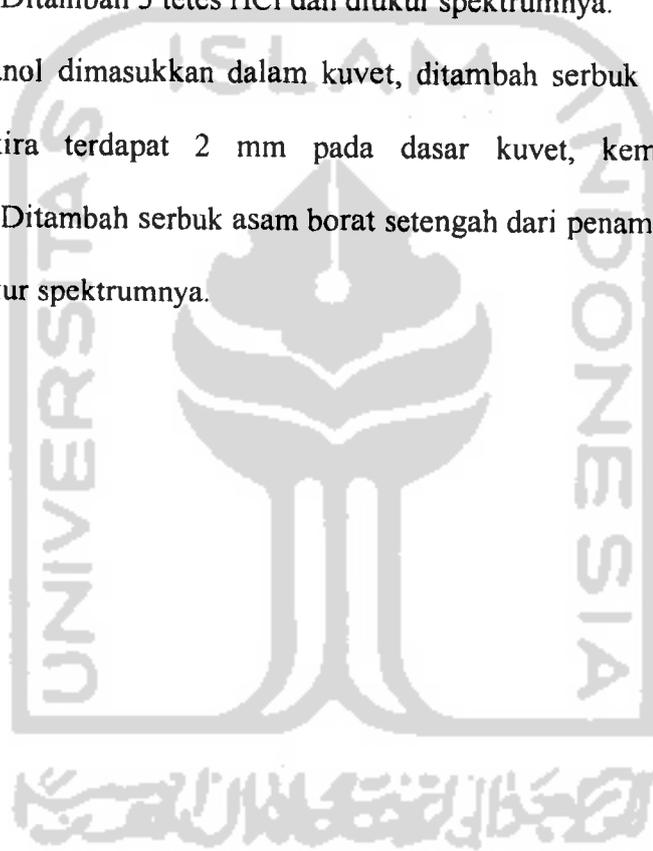
Sebanyak 5 g  $\text{AlCl}_3$  dilarutkan dalam 100 mL metanol. Pereaksi disimpan dalam botol plastik.

##### 3. Asam klorida

Sebanyak 50 mL HCl pekat dilarutkan dalam 100 mL akuades.

Tahapan penggunaan pereaksi geser adalah sebagai berikut :

1. Ditambahkan 3 tetes pereaksi natrium metoksida ke dalam kuvet yang berisi ekstrak metanol kemudian diukur spektrumnya. Setelah 5 menit spektrum diukur kembali untuk mengetahui kemungkinan terjadi dekomposisi flavonoid.
2. Ekstrak metanol dimasukkan dalam kuvet, ditambah 6 tetes  $AlCl_3$  dan diukur spektrumnya. Ditambah 3 tetes HCl dan diukur spektrumnya.
3. Ekstrak metanol dimasukkan dalam kuvet, ditambah serbuk natrium asetat sampai kira-kira terdapat 2 mm pada dasar kuvet, kemudian diukur spektrumnya. Ditambah serbuk asam borat setengah dari penambahan natrium asetat dan diukur spektrumnya.



## BAB V

### HASIL DAN PEMBAHASAN

#### 5.1 Preparasi buah mahkota dewa

Buah mahkota dewa yang digunakan adalah buah mahkota dewa yang telah masak dan tidak cacat. Pemilihan sampel harus diperhatikan dengan cermat untuk menghindari komposisi kimia sampel yang tidak representatif. Buah yang tidak utuh (cacat) telah mengalami kerusakan pada jaringan sel sehingga komposisinya akan berbeda dengan komposisi buah yang utuh.

Buah yang digunakan merupakan bahan segar yang baru dipetik dari pohon mahkota dewa yang ditanam di Dusun Mangiran, Trimurti, Srandakan, Bantul, Jogjakarta. Pengambilan buah dilakukan pada 1 pohon. Buah dipetik pada hari Senin, 21 Januari 2003 sekitar pukul 16.30 WIB.

Identifikasi flavonoid dilakukan pada daging buah mahkota dewa. Bagian kulit, cangkang, dan biji dipisahkan dari dagingnya. Bagian kulit dipisahkan dengan cara dikupas dengan pisau yang bersih. Buah dibelah agar bagian cangkang dan bijinya mudah dipisahkan. Bagian daging dipotong kecil-kecil untuk mempercepat proses pengeringan dan mempermudah penggilingan.

Daging buah mahkota dewa yang dikeringkan sebanyak 250 g. pengeringan dilakukan dengan menggunakan oven pada temperatur 40 °C, selama 24 jam. Pengeringan dilakukan secara perlahan-lahan pada temperatur yang tidak terlalu tinggi atau dijemur di bawah terik matahari. Pengeringan secara langsung

di bawah terik matahari kurang aman karena memungkinkan terjadinya kontaminasi dengan udara terbuka. Pengeringan menggunakan oven dengan temperatur yang terkontrol dapat memperkecil terjadinya kontaminasi.

Pengeringan dimaksudkan untuk mengurangi kadar air, menghentikan reaksi enzimatik, dan mencegah tumbuhnya jamur/cendawan. Bahan kering yang diperoleh dapat disimpan lebih lama dan tidak mudah rusak sehingga komposisi kimianya tidak mengalami perubahan. Setelah dikeringkan selama 24 jam, diperoleh bahan kering sebanyak 29,29 g.

Bahan kering yang diperoleh digiling dengan blender sehingga diperoleh serbuk daging buah mahkota dewa. Ukuran bahan yang akan diekstrak dapat mempengaruhi efisiensi ekstraksi. Ukuran bahan yang terlalu besar mengakibatkan kontak antara komponen yang akan dipisahkan lebih kecil. Jika ukuran bahan lebih kecil, maka pelarut lebih mudah berinteraksi dengan komponen yang akan dipisahkan.

## **5.2 Ekstraksi soxhlet**

Senyawa flavonoid yang terdapat dalam buah mahkota dewa dipisahkan dengan metode ekstraksi soxhlet. Serbuk daging buah mahkota dewa dibungkus rapat dengan kertas saring dan dimasukkan ke dalam soxhlet. Pelarut dimasukkan ke dalam labu alas bulat melalui bagian atas soxhlet agar terjadi kontak antara bahan yang akan diekstrak.

Ekstraksi dilakukan menggunakan penangas air untuk menjaga agar tidak terjadi kelebihan temperatur selama pemanasan. Ekstraksi dilakukan selama

5 – 7 jam, sehingga perlu dihindari terjadinya *bumping*. Sebelum pelarut dimasukkan, 3 butir batu didih dimasukkan ke dalam labu alas bulat. Selain untuk mencegah terjadinya *bumping*, batu didih dapat berfungsi untuk meratakan panas.

Adanya pemanasan, pelarut akan mencapai titik didihnya. Pada saat pelarut mendidih, terjadi kesetimbangan antara fasa uap dengan fasa cair dalam labu alas bulat. Fasa uap keluar melalui pipa menuju ke pendingin dan akhirnya mengembun. Embun menetes pada soxhlet mengenai serbuk daging buah mahkota dewa. Pelarut ditampung dalam soxhlet untuk sementara waktu sampai tingginya mencapai tinggi pipa kapiler.

Selama ditampung di dalam soxhlet terjadi kontak yang lebih lama antara bahan yang diekstrak dengan pelarut sehingga pemisahan lebih optimal. Setelah tingginya sama dengan tinggi pipa kapiler, pelarut yang telah membawa komponen yang akan dipisahkan kembali ke labu alas bulat. Pelarut akan mendidih kembali dan menguap menuju kondensor. Komponen yang dipisahkan tetap berada dalam labu alas bulat. Proses ini berlangsung secara terus-menerus sampai komponen yang akan dipisahkan dapat larut dalam pelarut.

Ekstraksi dilakukan dua langkah, yaitu ekstraksi menggunakan pelarut n-heksana dan ekstraksi menggunakan pelarut metanol 80 %. Ekstraksi yang dilakukan dengan menggunakan pelarut n-heksana dimaksudkan untuk memisahkan senyawa-senyawa non polar yang terdapat dalam daging buah mahkota dewa. Pelarut ini termasuk pelarut non polar, sehingga dapat melarutkan senyawa-senyawa non polar yang terdapat di dalamnya.



Pelarut n-heksana yang digunakan untuk memisahkan senyawa non polar sebanyak 75 mL. Pada putaran pertama fraksi n-heksana berwarna coklat muda. Pada putaran selanjutnya warna fraksi n-heksana dalam soxhlet semakin berkurang. Ekstraksi berlangsung terus-menerus sampai fraksi n-heksana menjadi tidak berwarna. Ekstraksi berlangsung selama 5 jam. Agar pemisahan lebih optimal, ekstrak didiamkan selama satu malam. Pemanasan dihentikan ketika soxhlet mendekati penuh, sehingga pada saat didiamkan selama 1 malam residu dalam keadaan terendam n-heksana. Fraksi n-heksana yang diperoleh berwarna coklat muda.

Senyawa flavonoid dipisahkan dengan pelarut metanol 80 %. Residu yang telah terbebas dari senyawa non polar diekstrak dengan 75 mL metanol 80 %. Ekstraksi dilakukan sampai metanol yang berada dalam soxhlet menjadi tidak berwarna. Proses ini berlangsung selama 4 jam 45 menit. Fraksi metanol yang diperoleh berwarna kuning. Untuk mendapatkan flavonoid yang optimal, ekstrak didiamkan selama 1 malam pada saat bahan yang diekstrak terendam metanol.

Fraksi metanol yang diperoleh sebanyak 28,19 g. Pelarut dibiarkan menguap dengan diletakkan di bawah kipas angin sampai volumenya tinggal setengahnya. Pemekatan dengan cara ini dilakukan karena bahan yang diekstrak sedikit dan untuk menghindari terjadinya perubahan komposisi bahan karena pemanasan. Jika ekstraksi dilakukan dalam jumlah banyak, pemekatan dapat dilakukan dengan menggunakan evaporator buchii.

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

**Tabel 4. Penafsiran spektrum natrium metoksida**

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

(Sumber : Markham, 1988)

### 5.3 Deteksi pendahuluan menggunakan kromatografi lapis tipis

Kromatografi lapis tipis merupakan cara sederhana pada identifikasi pendahuluan senyawa flavonoid. Data yang diperoleh berupa harga  $R_f$  dan warna bercak kromatogram yang diperoleh dari pengembangan bercak pada plat kromatografi lapis tipis. Metode ini juga bermanfaat pada pemisahan flavonoid, baik menggunakan KLT preparatif maupun menggunakan kromatografi kolom.

Fasa diam yang digunakan adalah silika gel G yang dilekatkan pada plat aluminium. Pengembangan dilakukan pada plat KLT dengan ukuran 3 x 10 cm. Penotolan dilakukan 1 cm dari batas bawah plat KLT dengan menggunakan pipet mikro. Noda dikeringkan dengan diletakkan di bawah kipas angin. Eluen dimasukkan dalam bejana pengembang setinggi 0,5 cm. Bejana yang digunakan harus tertutup rapat dan didiamkan selama sekitar 10 menit agar terjadi kesetimbangan uap eluen. Pengembangan dilakukan dalam bejana penuh uap eluen dan tertutup rapat agar pemisahan berlangsung lebih sempurna. Bercak yang diperoleh dikeringkan di bawah kipas angin. Deteksi bercak dilakukan dengan lampu UV 366 nm. Bercak yang diperoleh ditandai dengan pensil.

Fasa gerak yang digunakan ditentukan secara coba-coba. Eluen yang pertama kali dicoba adalah eluen tunggal dan n-butanol : asam asetat : air (BAA) dengan perbandingan 4:1:5 v/v. Eluen tunggal dipilih dari eluen yang bersifat non polar, semi polar, dan polar. Eluen non polar yang digunakan adalah n-heksana. Hasil pengembangan dengan eluen n-heksana menunjukkan bahwa noda sama sekali tidak terdistribusi dalam fase gerak. Hal ini ditunjukkan dengan

letak dan bentuk noda sama dengan posisi dan bentuk noda pada saat penotolan. Noda yang dihasilkan berdasarkan deteksi dengan lampu UV 366 nm berwarna coklat muda. Senyawa yang terdapat dalam ekstrak metanol kemungkinan besar merupakan senyawa yang bersifat semi polar dan atau bersifat polar, sehingga kromatogram yang dihasilkan pada pengembangan dengan eluen non polar tidak menghasilkan pemisahan.

Pengembangan menggunakan eluen semi polar menghasilkan 4 buah bercak, tetapi bercak tersebut belum terpisah dengan baik. Warna bercak dengan lampu UV 366 nm adalah bercak berwarna lembayung, kuning redup, biru berfluoresensi, dan hijau. Keempat bercak tersebut belum terdistribusi dengan baik menggunakan eluen semi polar. Hal ini dapat dilihat dari posisi bercak kromatogram yang berada di atas posisi penotolan noda dan di antara bercak lembayung terdapat bercak kuning redup.

Pengembangan menggunakan eluen metanol menunjukkan bahwa ekstrak metanol dapat terdistribusi dalam eluen metanol, tetapi senyawa yang terdapat dalam ekstrak metanol tidak dapat memisah. Bercak yang dihasilkan memanjang dan berwarna coklat. Hal ini menunjukkan bahwa senyawa-senyawa tersebut memiliki kelarutan relatif yang hampir sama dalam pelarut metanol.

Kromatogram yang dihasilkan pada pengembangan dengan eluen etil asetat dan metanol dapat dijadikan referensi sementara dalam menentukan eluen selanjutnya. Pengembangan berikutnya dicoba dengan menggunakan eluen campuran etil asetat dan metanol dengan perbandingan 3:1, 5:1, dan 7:1 (v/v). pemilihan perbandingan campuran eluen didasarkan pada bercak yang dihasilkan

pada pengembangan dengan eluen etil asetat. Senyawa tersebut dapat terpisah dengan eluen semi polar, tetapi kurang terdistribusi dengan baik dalam eluen semi polar. Oleh karena itu dicoba eluen semi polar yang ditambah kepolarannya dengan menggunakan eluen metanol.

Bercak kromatogram yang dihasilkan pada pengembangan menggunakan campuran eluen etil asetat dan metanol dengan perbandingan 3:1, dan 5:1, (v/v) menunjukkan pemisahan yang kurang baik, sedangkan bercak kromatogram pada eluen dengan perbandingan 7:1 (v/v) menghasilkan pemisahan yang cukup baik, akan tetapi terdapat 2 bercak yang memanjang, sehingga pemisahan senyawa yang terdapat dalam ekstrak metanol pada plat KLT kurang baik.

Hasil pemisahan dengan eluen tunggal dan eluen ganda belum menghasilkan pemisahan yang baik, sehingga dicoba menggunakan eluen fase atas BAA. Hasil pemisahan menggunakan eluen BAA (4:1:5 v/v) menghasilkan pemisahan yang kurang baik. Hasil deteksi menggunakan lampu UV, terdapat 4 bercak, 1 bercak dapat terpisah dengan baik berwarna lembayung, dan 3 bercak tidak terpisah. Terdapat sebuah bercak berwarna kuning redup terletak di antara bercak yang berwarna lembayung. Dua bercak lainnya berwarna biru berfluoresensi dan hijau. Keempat bercak tersebut masih menyatu, sehingga pemisahan tersebut termasuk pemisahan yang kurang baik.

Pengembangan dengan BAA (4:1:5 v/v) belum menghasilkan pemisahan yang baik. Oleh karena itu dilakukan pengembangan dengan perbandingan eluen yang bervariasi. Hasil pengembangan menggunakan berbagai eluen pada berbagai perbandingan dapat dilihat pada tabel 8.

**Tabel 8. Hasil pengembangan menggunakan berbagai eluen**

Eluen (v/v)	Jumlah bercak	Pemisahan	Kesimpulan
n-heksana	1	Tidak terpisah	Tidak baik
Etil asetat	4	Cukup terpisah	Kurang baik
Metanol	1	Tidak terpisah	Tidak baik
EtOAc : MeOH, 3:1	2	Cukup terpisah	Kurang baik
EtOAc : MeOH, 5:1	3	Cukup terpisah	Kurang baik
EtOAc : MeOH, 7:1	4	Cukup terpisah	Kurang baik
BAA, 4 : 1 : 5	4	Cukup terpisah	Kurang baik
BAA, 7 : 1 : 5	4	Cukup terpisah	Kurang baik
BAA, 7 : 2 : 5	4	Cukup terpisah	Kurang baik
BAA, 7 : 2 : 6	4	Cukup terpisah	Kurang baik
BAA, 9 : 1 : 5	4	Cukup terpisah	Kurang baik
BAA, 9 : 1 : 6	4	Cukup terpisah	Cukup baik
BAA, 9 : 2 : 6	4	Terpisah	Baik
BAA, 9 : 3 : 6	2	Terpisah	Kurang baik
BAA, 9 : 4 : 6	3	Terpisah	Kurang baik
BAA, 10 : 1 : 7	4	Cukup terpisah	Cukup baik
BAA, 11 : 1 : 8	4	Cukup terpisah	Cukup baik

Eluen paling baik ditentukan oleh hasil pemisahannya dan jumlah bercak hasil pengamatan dengan lampu UV 366 nm. Hasil pemisahan yang paling baik menggunakan eluen BAA, 9:2:6 (v/v). Hasil pemisahan yang menghasilkan 4 bercak. Deteksi lebih lanjut difokuskan pada pemisahan menggunakan eluen BAA (9:2:6 v/v). Deteksi bercak juga dilakukan dengan menggunakan uap amoniak. Hasil deteksi bercak dapat dilihat pada tabel 9.

**Tabel 9. Hasil deteksi bercak hasil pengembangan dengan BAA (9:2:6 v/v)**

No	Rf x 100	Warna	
		UV 366 nm tanpa NH <sub>3</sub>	UV 366 nm dengan NH <sub>3</sub>
1	78,75	Lembayung	Lembayung
2	70,00	Kuning redup	Hijau-kuning
3	56,25	Biru berfluoresensi	Biru berfluoresensi
4	50,00	Hijau	Hijau

Data di atas berguna dalam penafsiran senyawa flavonoid. Kebanyakan bercak yang dapat terlihat dengan menggunakan lampu UV merupakan senyawa flavonoid, meskipun bercak biru berfluoresensi, jingga, merah muda, keputihan, dan coklat harus dianggap bukan flavonoid sebelum diidentifikasi menggunakan spektrofotometer UV-Vis (Markham, 1988).

Bercak pertama berwarna lembayung dengan tidak mengalami perubahan setelah diuapi dengan amoniak. Menurut Markham (1988) dan Marby, Markham, dan Thomas (1970), bercak ini menunjukkan kemungkinan adanya senyawa flavon atau flavonol dengan 5-OH tanpa 4'-OH bebas, 6- atau 8-OH flavon dan flavonol tersulih pada 3-O dan mengandung 5-OH, isoflavon, dihidroflavanol, biflavonil, dan flavanon yang mengandung 5-OH, dan khalkon yang mengandung 2'- atau 6'-OH dan tidak mengandung 2- atau 4- OH bebas.

Bercak kedua berwarna kuning redup dan menjadi hijau-kuning setelah diuapi dengan uap amoniak. Menurut Markham (1988), bercak ini mungkin merupakan flavonol yang mengandung 3-OH bebas dan dapat mempunyai atau tidak mempunyai 5-OH bebas. Bercak ini merupakan bercak yang dominan dan berwarna coklat tanpa melihat dengan menggunakan lampu UV.

Bercak yang berwarna biru berfluoresensi dan hijau dapat dijadikan petunjuk pendahuluan dalam menafsirkan flavonoid meskipun dapat dianggap bukan flavonoid sebelum diidentifikasi menggunakan spektrofotometer UV-Vis. Bercak biru dan tidak mengalami perubahan setelah diuapi dengan uap amoniak menunjukkan adanya isoflavon yang mengandung 5-OH bebas. Sedangkan bercak yang berwarna hijau menunjukkan adanya auron yang tidak mengandung

4'-OH bebas, beberapa 2- atau 4 -OH khalkon dan flavonol yang mengandung 3-OH bebas dan mempunyai atau tidak mempunyai 5-OH bebas. Dugaan ini merupakan dugaan sementara sebelum melakukan identifikasi menggunakan spektrofotometer UV-Vis. Data di atas dapat digunakan sebagai data pendukung dalam menafsirkan jenis dan struktur flavonoid dalam daging buah mahkota dewa.

#### **5.4 Pembuktian kemurnian isolat flavonoid**

Kemurnian isolat flavonoid dibuktikan dengan kromatografi lapis tipis dua dimensi. Pengembangan dilakukan pada plat KLT 6 x 6 cm. Eluen sebagai pengembang pertama menggunakan fase atas BAA (9:2:6 v/v) dan pengembang kedua menggunakan asam asetat 15 % v/v. Metode ini merupakan cara sederhana untuk menentukan kemurnian isolat flavonoid. Bercak yang dihasilkan pada pengembangan pertama dikeringkan terlebih dahulu menggunakan kipas angin, sebelum dilakukan pengembangan dengan asam asetat 15 %. Hasil pengembangan membuktikan bahwa tidak ada bercak baru setelah dilakukan pengembangan kedua dengan eluen asam asetat 15 % v/v.

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

Identifikasi pendahuluan flavonoid dengan KLT berguna dalam pemisahan flavonoid menggunakan KLT preparatif. Eluen terbaik pada identifikasi pendahuluan digunakan untuk pemisahan flavonoid dari fraksi metanol daging buah mahkota dewa. Prinsip pemisahan pada KLT preparatif tidak berbeda

dengan pemisahan pada KLT. Ukuran plat yang ideal adalah 20 x 20 cm, tetapi ukuran ini dapat disesuaikan dengan kebutuhan.

Pemisahan flavonoid dilakukan pada 6 buah plat KLT dengan ukuran 5 x 10 cm. Penotolan dilakukan dengan bentuk pita yang lebarnya sekitar 5 mm. Eluen yang digunakan adalah fasa atas BAA (9:2:6 v/v). Pengembangan dilakukan pada bejana penuh uap eluen agar pemisahan lebih sempurna.

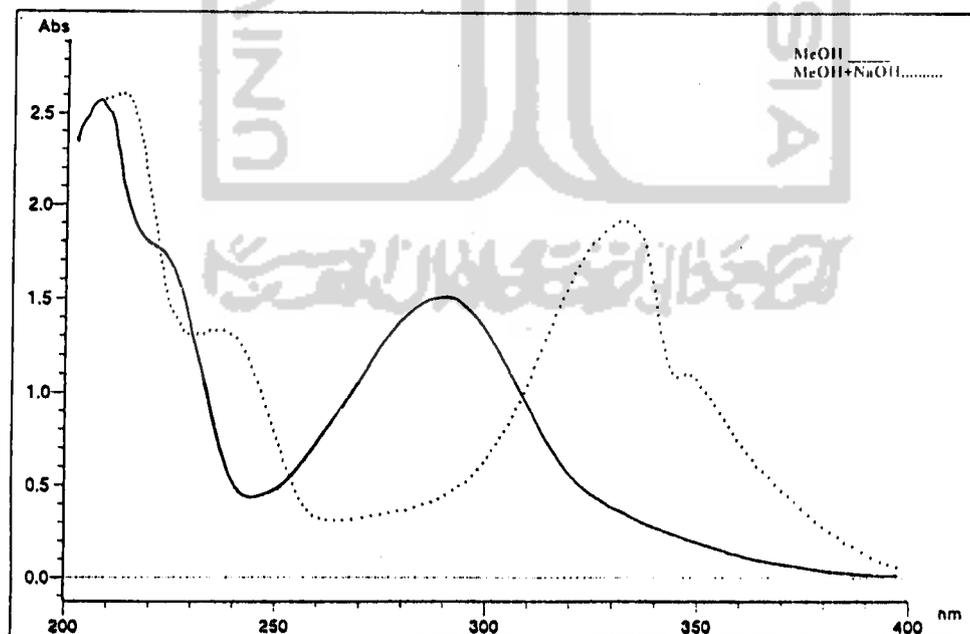
Bercak dideteksi dengan lampu UV 366 nm dan diberi tanda dengan pensil. Bercak yang dihasilkan berupa pita dan bercak yang mempunyai warna sama dengan bercak pada identifikasi pendahuluan akan mempunyai harga Rf yang sama. Bercak pertama berwarna lembayung dengan harga Rf 78,75 disebut sebagai fraksi 1, bercak kedua berwarna kuning redup dengan harga Rf 70,00 disebut sebagai fraksi 2, bercak ketiga berwarna biru berfluoresensi dengan Rf 56,25 disebut fraksi 3, dan bercak keempat berwarna hijau dengan harga Rf 50,00 disebut sebagai fraksi 4. Keempat fraksi tersebut kemudian dikerok dan dilarutkan dalam metanol. Campuran bercak dengan padatan silika gel dipisahkan dengan disaring menggunakan kertas saring Whatman No.1, sehingga diperoleh fraksi metanol yang jernih. Fraksi metanol yang diperoleh pada fraksi 1,3, dan 4 tidak berwarna, sedangkan fraksi 2 berwarna kuning.

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

Fraksi tunggal senyawa flavonoid dididentifikasi dengan spektrofotometer UV-Vis. Metode ini bermanfaat untuk menentukan jenis flavonoid, pola oksigenasi, kedudukan gugus hidroksil fenol bebas pada inti flavonoid,

kedudukan gula atau metil yang terikat pada salah satu gugus hidroksil fenol. Keempat fraksi tunggal flavonoid diukur serapannya pada daerah panjang gelombang 200 sampai 400 nm. Pengukuran serapan setiap fraksi metanol juga dilakukan dengan menggunakan pereaksi geser. Pereaksi geser yang digunakan adalah NaOH 2 M sebagai pengganti NaOMe, larutan AlCl<sub>3</sub> 5 %, larutan HCl, serbuk NaOAc, dan serbuk H<sub>3</sub>BO<sub>3</sub>. Pengukuran spektrum dilakukan dengan mengukur spektrum MeOH. Jika hasil pengukuran spektrum menunjukkan serapan khas flavonoid, maka pengukuran dilanjutkan dengan menambahkan pereaksi geser.

Hasil pengukuran spektrum MeOH dan MeOH+NaOH fraksi 1 dapat dilihat pada gambar 4. Spektrum MeOH+AlCl<sub>3</sub> dan MeOH+AlCl<sub>3</sub>+HCl fraksi 1 dapat dilihat pada gambar 5 dan spektrum MeOH+NaOAc dan MeOH+NaOAc+H<sub>3</sub>BO<sub>3</sub> fraksi 1 dapat dilihat pada gambar 6.



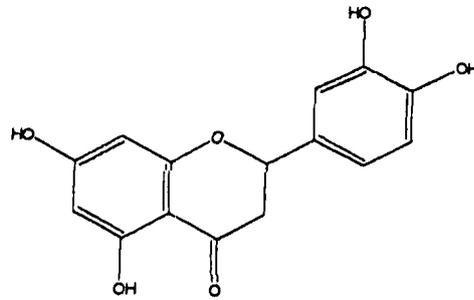
Gambar 4. Spektrum MeOH dan MeOH+NaOH fraksi 1

Tabel 10. Penafsiran spektrum fraksi 1

Spektrum	$\lambda_{maks}$ (nm)		Pergeseran $\lambda_{maks}$ (nm)		Penafsiran
	Pita I	Pita II	Pita I	Pita II	
MeOH	292,5	218,5			Flavanon/ dihydroflavonol
MeOH+NaOH	337,0	243	+44,5	+24,5	5,7-OH <i>o</i> -diOH pd cincin B
MeOH+NaOH <i>t</i> =5'	335,0	240,5	+42,5	+22	5,7-OH <i>o</i> -diOH pd cincin B
MeOH+AlCl <sub>3</sub>	292,5	218,5			
MeOH+AlCl <sub>3</sub> + HCl	292,5	218,5			
MeOH+NaOAc	292,5	218,5			
MeOH+ NaOAc+H <sub>3</sub> BO <sub>3</sub>	292,5	218,5			

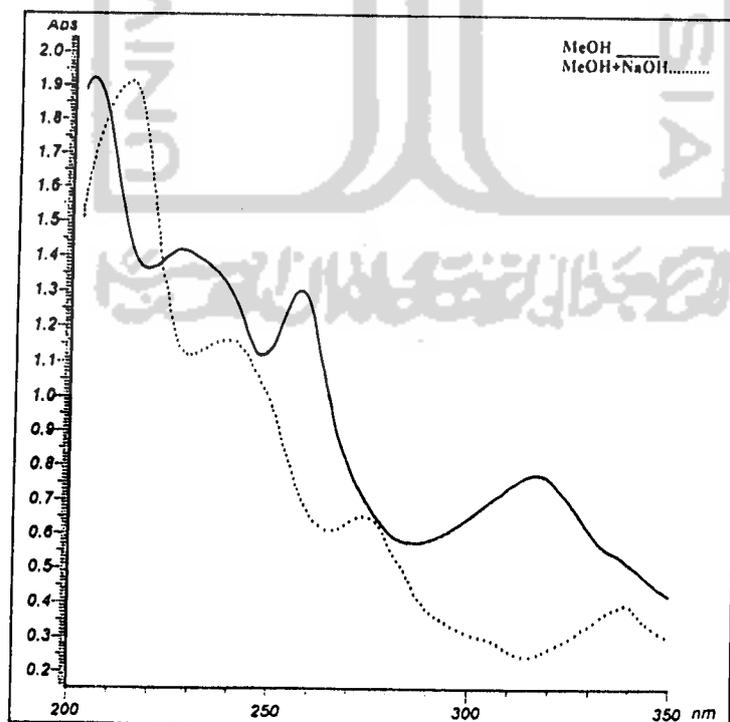
Penafsiran spektrum dilakukan dengan beberapa tahap. Tahap pertama adalah melihat bentuk umum spektrum metanol, panjang gelombang pita serapan, dan data kromatografi lapis tipis. Pengukuran spektrum fraksi 1 dapat ditunjukkan dengan serapan khas flavanon atau dihydroflavonol. Serapan maksimum pada panjang gelombang 292,5 nm dan 218,5 nm. Kekuatan nisbi yang rendah pada pita I merupakan ciri khas flavanon dan dihydroflavonol. Penafsiran ini didukung dengan data bercak kromatogram. Bercak lembayung dan tidak mengalami perubahan warna setelah diuapi dengan amoniak menunjukkan kemungkinan adanya senyawa flavanon atau dihydroflavonol yang mengandung 5-OH.

Tahap berikutnya adalah mempertimbangkan perubahan spektrum yang disebabkan oleh berbagai pereaksi geser. Spektrum NaOH digunakan untuk menentukan pola hidroksilasi, mendeteksi gugus hidroksil yang lebih asam dan tidak tersubstitusi. Spektrum NaOH pada fraksi 1 mengalami pergeseran

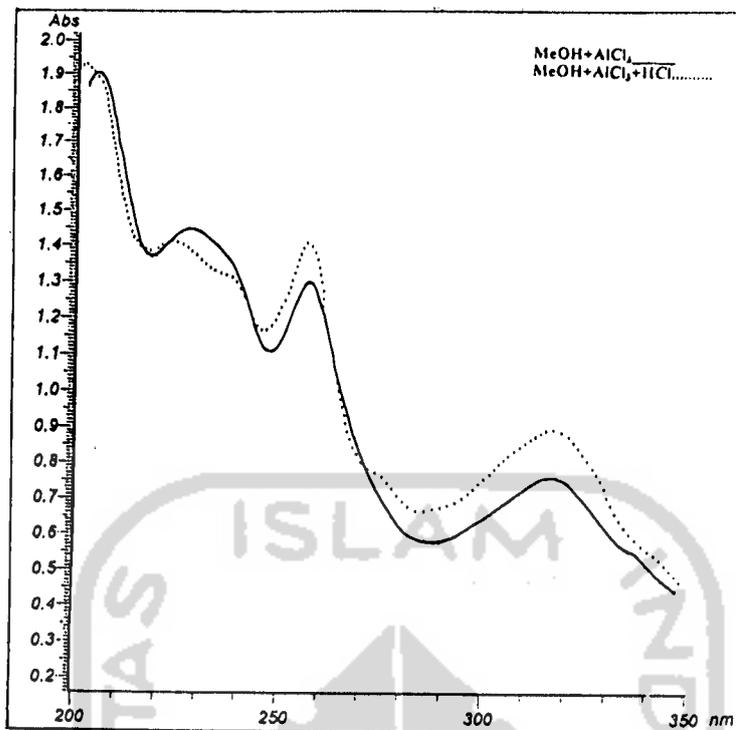


Gambar 7. Struktur 5,7,3',4'-tetrahidroksi flavanon

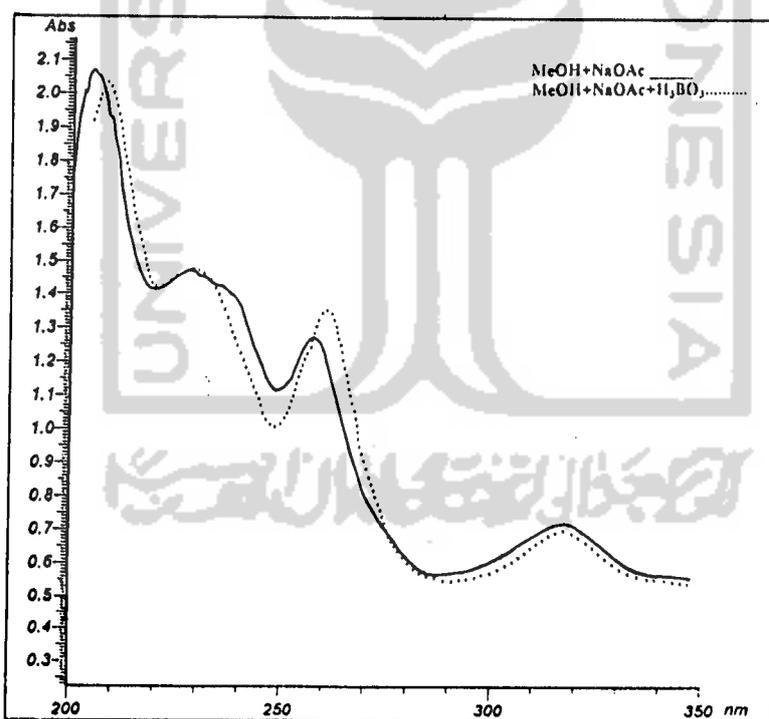
Pengukuran spektrum MeOH pada fraksi 2 menunjukkan serapan khas senyawa flavonoid. Spektrum metanol pada fraksi 2 menunjukkan serapan maksimum pada panjang gelombang 319 nm dan 259,5 nm. Hasil pengukuran spektrum MeOH dan MeOH+NaOH fraksi 2 dapat dilihat pada gambar 8. Sedangkan spektrum MeOH+AlCl<sub>3</sub> dan MeOH+AlCl<sub>3</sub>+HCl serta spektrum MeOH+NaOAc dan MeOH+NaOAc+H<sub>3</sub>BO<sub>3</sub> fraksi 2 dapat dilihat pada gambar 9 dan gambar 10.



Gambar 8. Spektrum MeOH dan MeOH+NaOH fraksi 2



Gambar 9. Spektra MeOH+AlCl<sub>3</sub> dan MeOH+AlCl<sub>3</sub>+HCl fraksi 2



Gambar 10. Spektrum MeOH+NaOAc dan MeOH+NaOAc+H<sub>3</sub>BO<sub>3</sub> fraksi 2

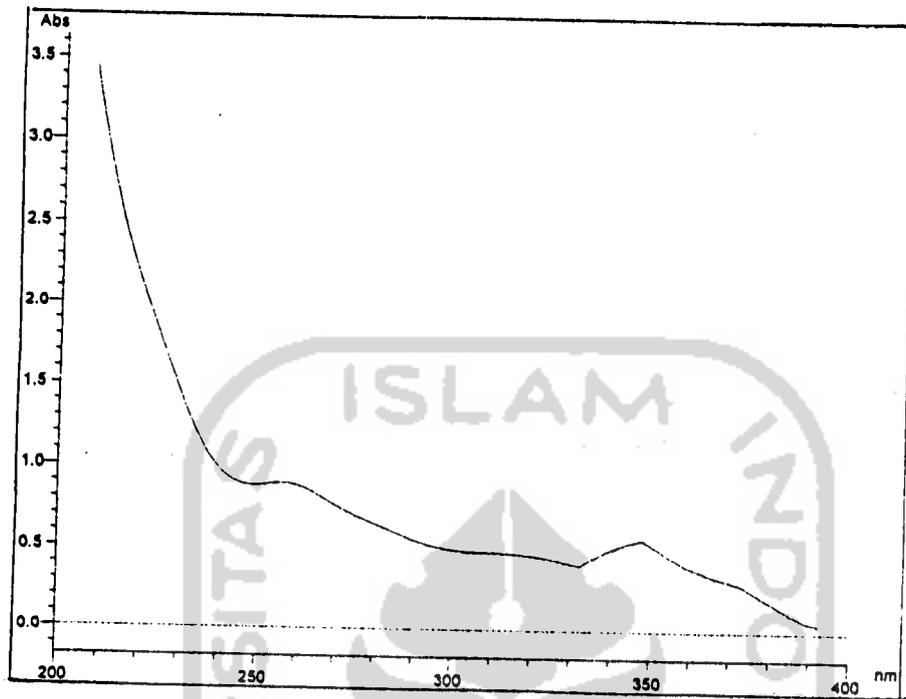
Hasil penafsiran spektrum yang didukung dengan data identifikasi dengan kromatografi lapis tipis pada fraksi 2 dapat dilihat pada tabel 2.

Tabel 11. Penafsiran spektrum fraksi 2

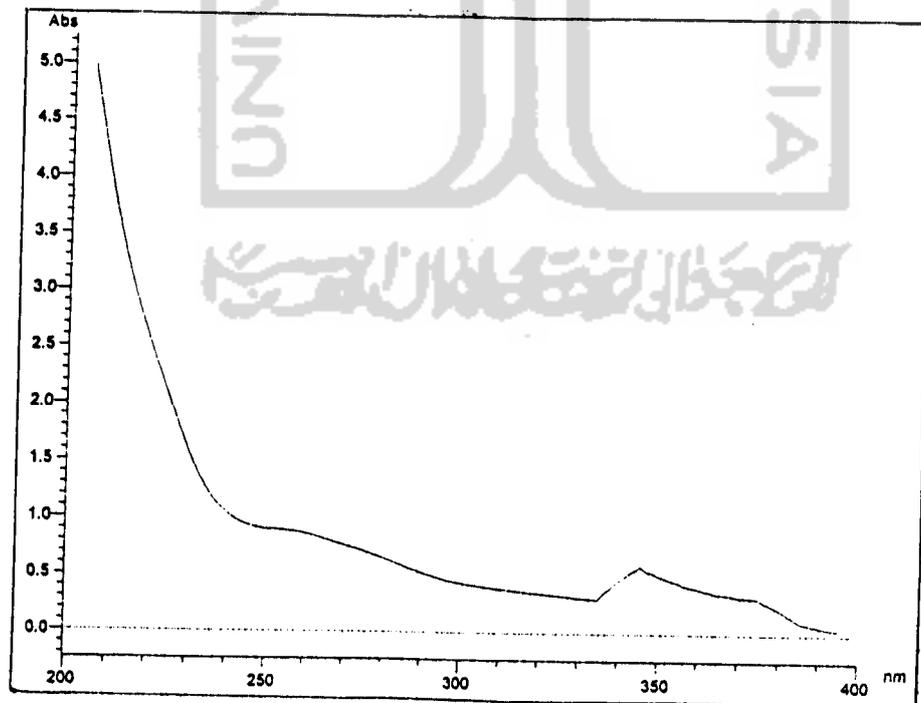
Spektrum	$\lambda_{maks}$ (nm)		Pergeseran $\lambda_{maks}$ (nm)		Penafsiran
	Pita I	Pita II	Pita I	Pita II	
MeOH	319	259,5			flavonol
MeOH+NaOH	340	274	+21	+14,5	3,4'-diOH, <i>o</i> -diOH pd cincin A dan 3 OH pd cincin B
MeOH+NaOH <i>t</i> =5'	340	274,5	+21	+14	3,4'-diOH, <i>o</i> -diOH pd cincin A dan 3 OH pd cincin B
MeOH+AlCl <sub>3</sub>	319	260	+3,5	+3,5	
MeOH+AlCl <sub>3</sub> + HCl	315,5	256,5	-3,5	-3	
MeOH+NaOAc	317	257,5	-2	-2	OR pada 6/8
MeOH+ NaOAc+H <sub>3</sub> BO <sub>3</sub>	323,5	262,5	+4,5	+3	<i>o</i> -diOH pada 6,7/7,8

Spektrum metanol pada fraksi 2 menunjukkan serapan maksimum pita I pada panjang gelombang 319 nm dan pita II pada 259,5 nm. Intensitas serapan pita I lebih rendah dari pita II mendukung penafsiran bentuk spektrum senyawa flavonol. Bentuk bahu pada pita II merupakan ciri khas 3',4'-OH. Penafsiran ini diperkuat dengan data kromatogram yang menunjukkan bahwa bercak kuning redup merupakan petunjuk adanya flavonol yang mengandung 3-OH, mempunyai atau tidak mempunyai 5-OH.

Pergeseran batokromik pada spektrum MeOH+NaOH disertai efek hipsokromik. Indikasi ini merupakan petunjuk adanya 3,4'-OH, *o*-diOH pada cincin A, dan pada cincin B terdapat 3 gugus -OH yang berdampingan. Sedangkan pergeseran spektrum MeOH+AlCl<sub>3</sub> pada pita I dan pita II adalah 3,5 nm disertai kenaikan intensitas. Pergeseran ini relatif kecil sehingga tidak dapat memperkuat petunjuk adanya 5-OH. Adanya pergeseran ini kemungkinan



Gambar 12. Spektrum MeOH fraksi 3



Gambar 13. Spektrum MeOH fraksi 4

Spektrum MeOH fraksi 3 mempunyai panjang gelombang maksimum 340 nm dan 257 nm. Panjang gelombang maksimum ini berada pada kisaran panjang gelombang maksimum senyawa flavonoid, tetapi bentuk serapannya tidak memberikan bentuk khas serapan flavonoid. Dugaan ini diperkuat dengan data kromatogram yang menunjukkan bercak berwarna biru berfluoresensi dan hijau dapat dianggap bukan senyawa flavonoid sebelum diidentifikasi menggunakan spektrofotometer UV-Vis. Untuk spektrum MeOH fraksi 4 dengan panjang gelombang maksimum 340 nm, juga tidak menunjukkan spektrum khas senyawa flavonoid.

Berdasarkan hasil identifikasi dapat diketahui bahwa dalam ekstrak metanol daging buah mahkota dewa mengandung senyawa flavonoid yang terdapat pada fraksi 1 dan fraksi 2. Senyawa flavonoid yang dapat diusulkan pada fraksi 1 adalah flavanon yang mengandung gugus -OH pada posisi 5,7,3', dan 4' (5,7,3',4'-tetrahidroksi flavanon). Senyawa flavonoid pada fraksi 2 adalah flavonol yang mempunyai gugus orto di-OH pada posisi 6 dan 7 atau 7 dan 8 ; mengandung gugus hidroksi pada posisi 3' dan 4' ; serta mempunyai pola oksigenasi pada posisi 6 atau 8.

## BAB VI

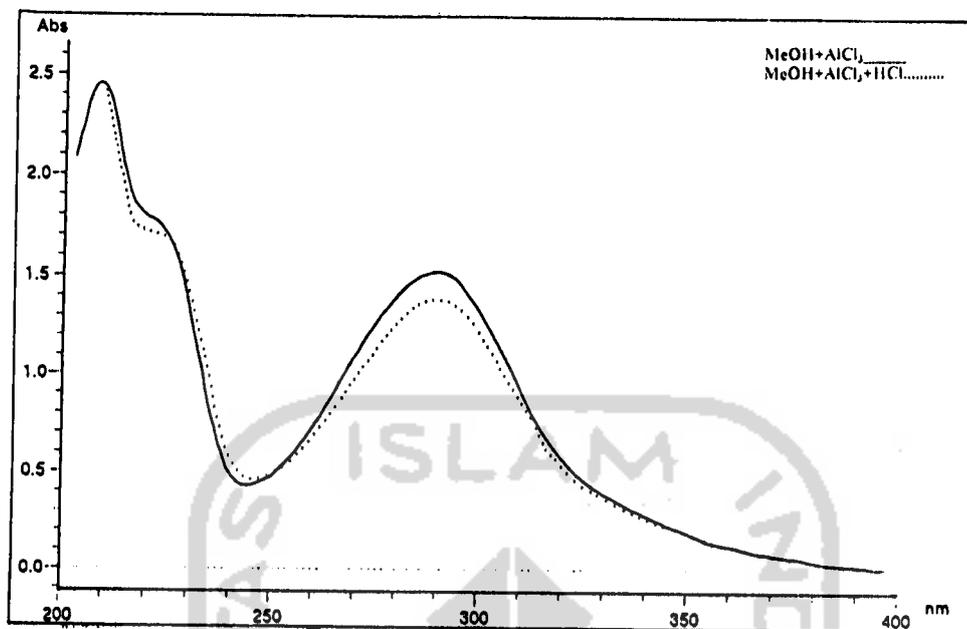
### KESIMPULAN DAN SARAN

#### 6.1 Kesimpulan

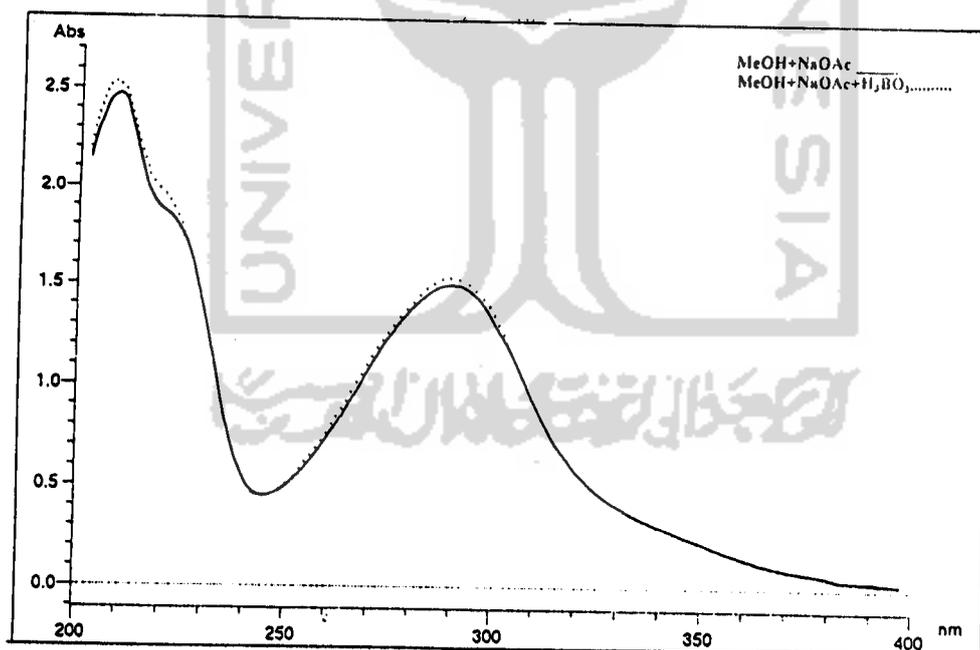
Berdasarkan hasil penelitian dapat disimpulkan bahwa ekstrak metanol daging buah mahkota dewa (*Phaleria macrocarpa Boerl*) positif mengandung senyawa flavonoid pada fraksi 1 dan fraksi 2. Senyawa flavonoid yang dapat diisolasi dalam fraksi 1 adalah flavanon yang mengandung gugus hidroksi pada posisi 5,7,3', dan 4' (5,7,3',4'-tetrahidroksi flavanon). Senyawa flavonoid pada fraksi 2 adalah flavonol yang mempunyai gugus orto di-OH pada posisi 6 dan 7 atau 7 dan 8 ; mengandung gugus hidroksi pada posisi 3' dan 4' ; serta mempunyai pola oksigenasi pada posisi 6 atau 8.

#### 6.2 Saran

1. Perlu dilakukan penelitian lebih lanjut tentang isolasi senyawa flavonoid dari buah mahkota dewa sehingga dapat diketahui kadar senyawa aktifnya.
2. Perlu dilakukan penelitian lebih lanjut tentang uji aktivitas isolat flavonoid pada fraksi 1 dan fraksi 2.



Gambar 5. Spektrum MeOH+AlCl<sub>3</sub> dan MeOH+AlCl<sub>3</sub>+HCl fraksi 1



Gambar 6. Spektrum MeOH+NaOAc dan MeOH+NaOAc+H<sub>3</sub>BO<sub>3</sub> fraksi 1

Berdasarkan pengukuran spektrum MeOH fraksi 1 dan spektrum dengan menggunakan pereaksi geser dapat digunakan untuk menafsirkan struktur flavonoid. Urutan penafsiran spektrum fraksi 1 dapat dilihat pada tabel 10.

batokromik sebesar 44,5 nm pada pita I dan pada pita II mengalami pergeseran batokromik sebesar 24,5 nm. Pergeseran batokromik pada pita I disertai dengan adanya efek hiperkromik yang ditunjukkan oleh kenaikan intensitas sebesar 0,34 sedangkan pada pita II disertai efek hipsokromik yang ditunjukkan adanya penurunan intensitas sebesar 0,471. Adanya pergeseran batokromik tanpa kenaikan intensitas (efek hiperkromik) pada pita II menunjukkan adanya 5- dan 7-OH. Kekuatan intensitas serapan pada pita II mengalami penurunan yang lambat merupakan petunjuk adanya *o*-diOH pada cincin B.

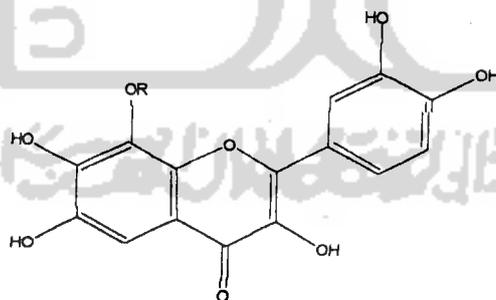
Spektrum MeOH+NaOAc dan MeOH+NaOAc+H<sub>3</sub>BO<sub>3</sub> serta spektrum MeOH+AlCl<sub>3</sub> dan MeOH+AlCl<sub>3</sub>+HCl tidak memberikan pergeseran yang berarti pada pita I dan pita II. Tidak adanya pergeseran pada keempat spektra tersebut, maka untuk menentukan adanya *o*-diOH pada cincin B ditentukan dengan melihat serapan khas pada pita II. Bentuk pita II yang berupa bahu menunjukkan adanya 3',4'-OH.

Berdasarkan penafsiran di atas dapat diusulkan jenis flavonoid pada fraksi 1. Serapan metanol fraksi 1 mempunyai dua kemungkinan, yaitu flavanon dan dihidroflavonol. Kedua jenis flavonoid tersebut dibedakan dengan adanya 3-OH, sehingga senyawa tersebut termasuk jenis flavanon. Berdasarkan hasil penafsiran struktur flavonoid menggunakan data kromatografi lapis tipis dan spektrofotometer UV-Vis, struktur senyawa flavonoid yang dapat diusulkan pada fraksi 1 adalah flavanon yang mengandung gugus hidroksi pada posisi 5,7,3', dan 4' (5,7,3',4'-tetrahidroksi flavanon). Struktur senyawa tersebut dapat dilihat pada gambar 7.

disebabkan oleh gugus *o*-diOH pada cincin A ataupun 3 gugus -OH yang berdampingan pada cincin B. Penambahan HCl menyebabkan penurunan panjang gelombang maksimum.

Penafsiran spektrum MeOH+NaOAc menunjukkan adanya oksigenasi pada 6 atau 8. Adanya oksigenasi dapat ditunjukkan dengan terjadinya pengurangan panjang gelombang maksimum pada pita II. Sedangkan pada spektrum MeOH+NaOAc+H<sub>3</sub>BO<sub>3</sub> menunjukkan adanya pergeseran batokromik sebesar 4,5 nm pada pita I dan 3 nm pada pita II. Pergeseran ini menunjukkan adanya *o*-diOH pada cincin A pada posisi 6,7 atau 7,8.

Berdasarkan hasil penafsiran spektrum pada fraksi 2 dapat diusulkan bahwa senyawa tersebut adalah termasuk senyawa flavonol yang mempunyai gugus orto di-OH pada posisi 6 dan 7 atau 7 dan 8 ; mengandung gugus hidroksi pada posisi 3' dan 4' ; serta mempunyai pola oksigenasi pada posisi 6 atau 8. struktur senyawa tersebut dapat dilihat pada gambar 11.



**Gambar 11. Struktur flavonoid fraksi 2**

Spektrum MeOH fraksi 3 dan fraksi 4 tidak menunjukkan serapan khas flavonoid. Bentuk spektrum MeOH fraksi 3 dan 4 dapat dilihat pada gambar 12 dan gambar 13.

## DAFTAR PUSTAKA

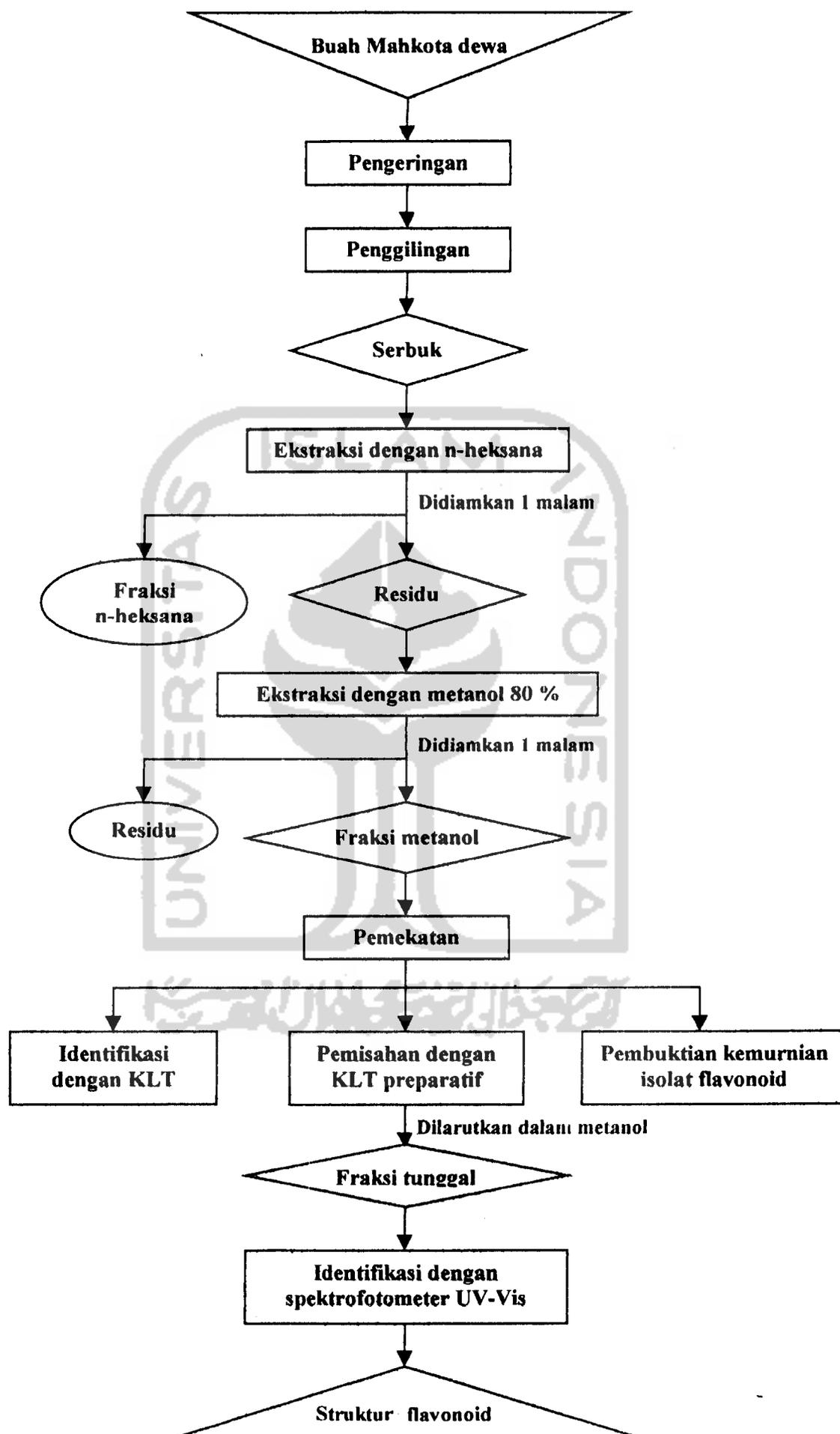
- Astuti, Y.D., 2002, *Identifikasi Flavonoid Ekstrak Metanol 80 % Kulit Buah Manggis (*Gaccinia mangostana L.*) Menggunakan Kromatografi Gas-Spektrometer Massa (GC-MS)*, Skripsi Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam Universitas Gajah Mada, Jogjakarta
- Day, Jr., R.A. and Underwood, A.L., 1986, *Quantitative Analysis*, Diterjemahkan oleh Aloysius Pudjaatmaka, Edisi ke Lima, Penerbit Erlangga, Jakarta
- Edfiyenti, 1996, *Isolasi Isoflavon Aglikon dan Asam Lemak dari Tempe Kedelai*, Skripsi, Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam Universitas Gajah Mada, Jogjakarta
- Eni, M.I., 1998, *Isolasi dan Identifikasi Senyawa Flavonoid dari Ekstrak Kloroform Daun Kecombrang (*Nicolia speciosa Horan*)*, Skripsi, Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam Universitas Gajah Mada, Jogjakarta
- Handayani, S.N., 1998, *Isolasi Isoflavon dan Arekolin dalam Ekstrak Kloroform Biji Pinang (*Areca catethu L.*) dengan Metode Kromatografi Kolom*, Skripsi, Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam Universitas Gajah Mada, Jogjakarta
- Harborne, J.B., 1987, *Phytochemical Methods*, Diterjemahkan oleh Kosasih Padmawinata dan Iwang Sudiro, Penerbit ITB, Bandung
- Harmanto, N., 2001, *Mahkota Dewa : Obat Pusaka Para Dewa*, Agromedia Pustaka, Jakarta
- Marby, J.T., Markham, K.R., Thomas, M.B., 1970, *The Systematic Identification of Flavonoids*, Springer Verlag, Berlin
- Markham, K.R., 1988, *Techniques of Flavonoids Identification*, diterjemahkan oleh Kosasih Padmawinata, Penerbit ITB, Bandung
- Meloan, C.E., 1999, *Chemical Separations : Principles, Techniques, and Experiments*, John Wiley and Sons Inc., New York
- Mursiti, H., 2002, *Uji Toksikologi Hasil Fraksinasi Ekstrak Kloroform Biji Mahkota Dewa (*Phaleria macrocarpa Scheff. Boerl*) terhadap *Artemia salina Leach* dan Profil kromatogram Hasil Kromatografi Lapis Tipisnya*, Skripsi, Fakultas Farmasi Universitas Gajah Mada, Jogjakarta

- Pratiwi, R.W. 2002, *Uji Toksisitas Daun Mahkota Dewa (Phaleria macrocarpa Scheff. Boerl) terhadap Artemia salina serta Profil Kromatogram Kromatografi Lapis Tipis Ekstrak Aktif*, Skripsi, Fakultas Farmasi Universitas Gajah Mada, Jogjakarta
- Primsa, E. ,2002, *Efek Hipoglikemik Infusasi Simpliasia Daging Mahkota Dewa (Phaleria macrocarpa Scheff Boerl) pada Tikus Jantan Putih*, Skripsi, Fakultas Farmasi Universitas Gajah Mada, Jogjakarta
- Purwaningsih, D., 2001, *Isolasi dan Identifikasi Senyawa Flavonoid dari Daun Kacang Panjang (Vigna sinensis L. savi ex Hessk)*, Skripsi, Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam Universitas Gajah Mada, Jogjakarta
- Robinson, T., 1991, *The Organic Constituents of Higher Plants*, 6<sup>th</sup> Ed., Diterjemahkan oleh Kosasih Padmawinata, Penerbit ITB, Bandung
- Sant, J., 2002, *Makuthodewo dan Oleander Dijagokan Melawan Kanker*, Minggu Pagi, Minggu V, September 2002
- Sastrohamidjojo, H.,1985, *Dasar-dasar Spektroskopi*, Liberty, Jogjakarta
- Sastrohamidjojo, H.,1985, *Kromatografi*, Liberty, Jogjakarta
- Siswono, 2001, *Mahkota Dewa "Racun" Irian yang Berkhasiat*, Gizi.net 4 Oktober 2001
- Williams, D.G., 1994, *Quercetin-Protect Your Helth with This Important Flavonoid*, Immune support.com 4 Januari 1994
- Yudana, I.G.A., 2002, *Mahkota Dewa Musuh Baru Aneka Penyakit*, Intisari, Januari 2002

**Lampiran 1. Gambar buah mahkota dewa**



## Lampiran 2. Skema Kerja

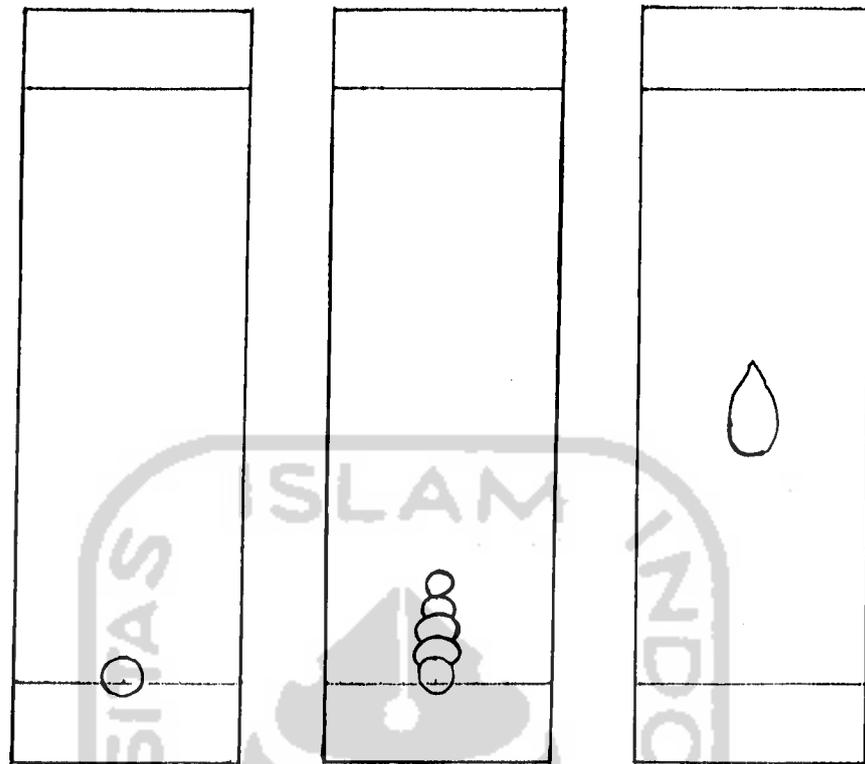


**Keterangan :**

- Sampel** 
- Proses** 
- Hasil proses** 
- Hasil samping** 
- Kesimpulan** 



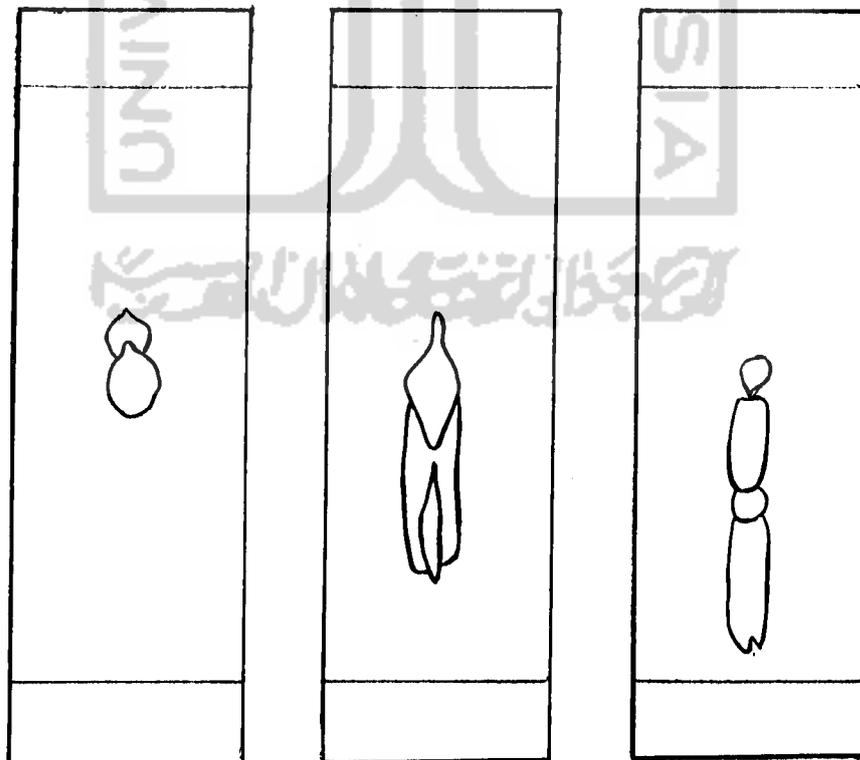
Lampiran 3. Hasil Pengembangan dengan Kromatografi Lapis Tipis



n-heksana

Etil asetat

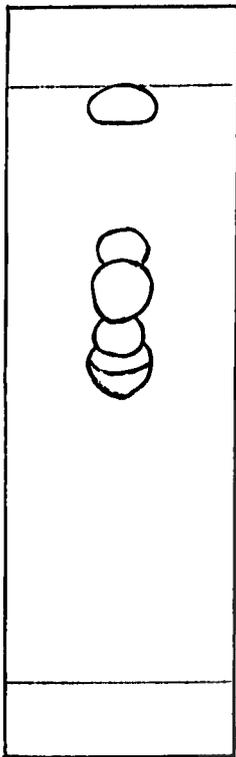
Metanol



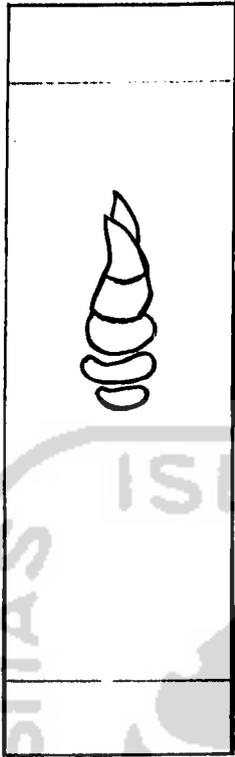
EtOAc : MeOH  
3:1 v/v

EtOAc : MeOH  
5:1 v/v

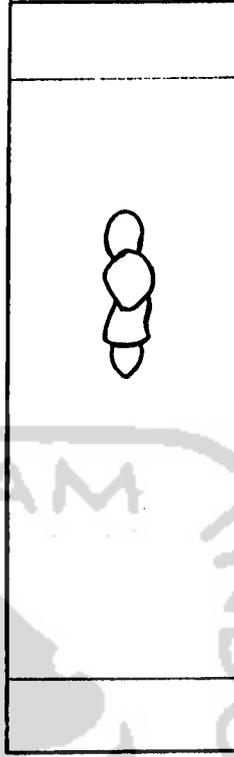
EtOAc : MeOH  
7:1 v/v



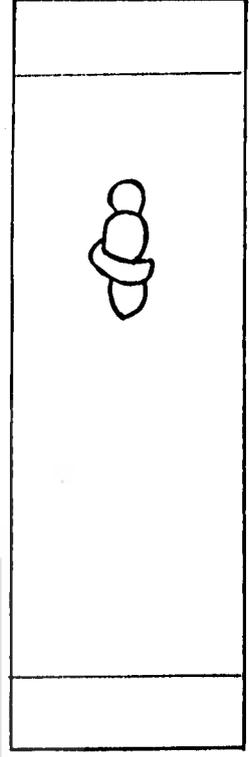
**BAA 4 : 1 : 5 v/v**



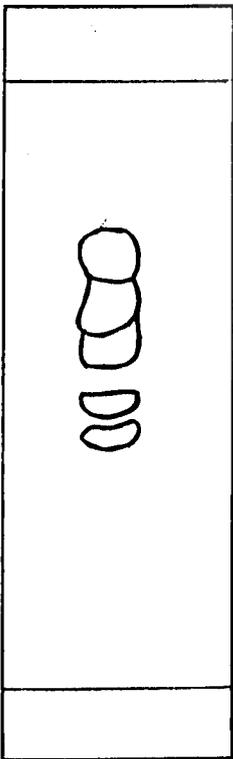
**BAA 7 : 1 : 5 v/v**



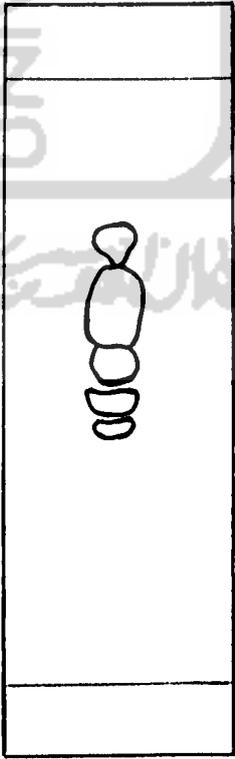
**BAA 7 : 2 : 5 v/v**



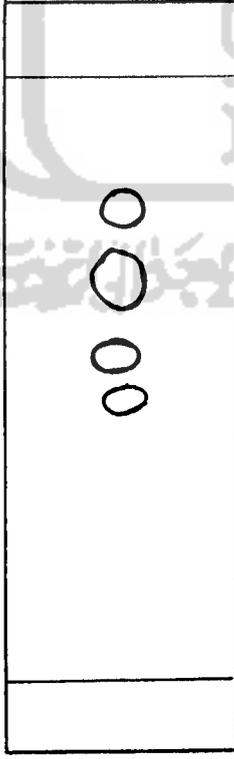
**BAA 7 : 2 : 6 v/v**



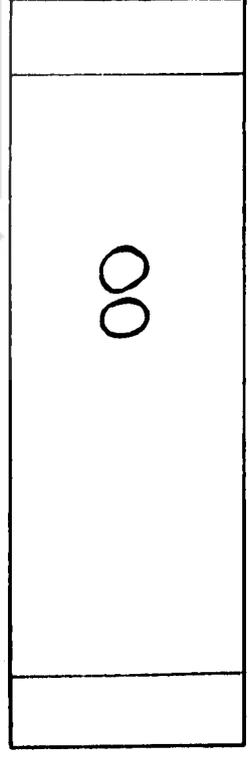
**BAA 9 : 1 : 5 v/v**



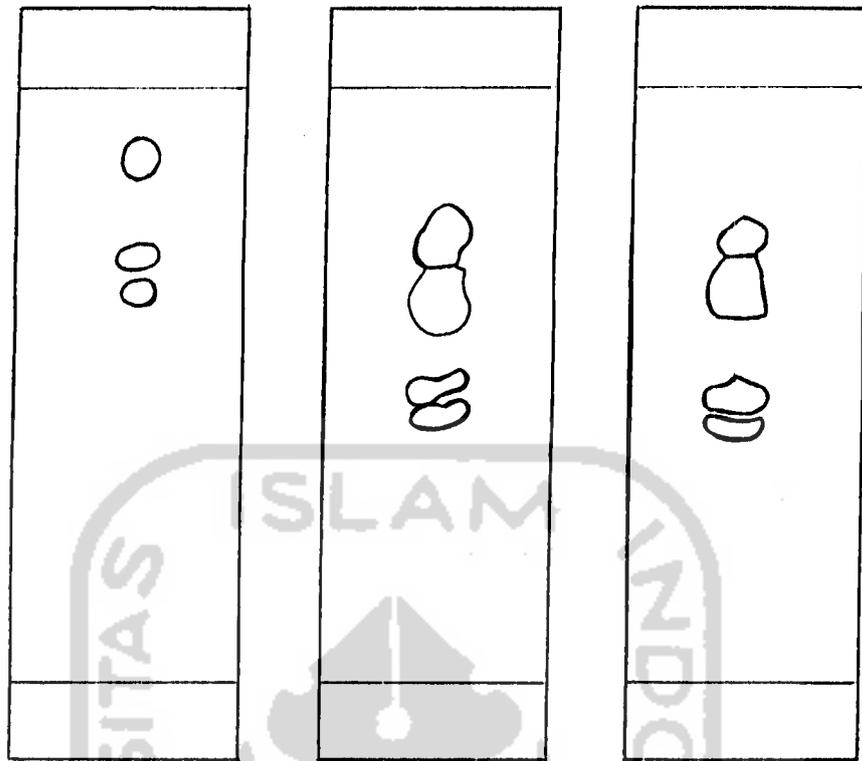
**BAA 9 : 1 : 6 v/v**



**BAA 9 : 2 : 6 v/v**



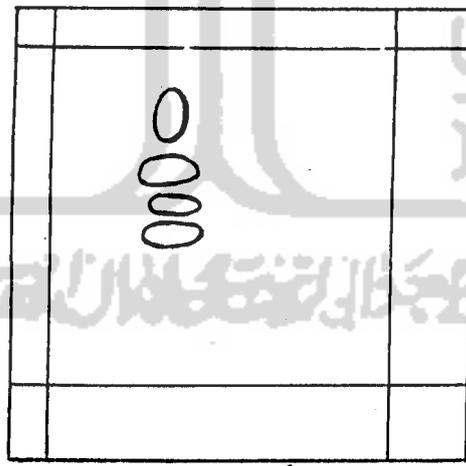
**BAA 9 : 3 : 6 v/v**



BAA 9 : 4 : 6 v/v

BAA 10 : 1 : 7 v/v

BAA 11 : 1 : 8 v/v



Pembuktian kemurnian isolat flavonoid dengan  
Kromatografi Lapis Tipis dua dimensi