

BAB I

PENDAHULUAN

A. Latar Belakang Masalah

Kecenderungan kembali ke alam (*back to nature*) telah mendorong perhatian masyarakat kepada obat-obat herbal yang berasal dari tanaman obat (Winarto, *et al.*, 2004). Penggunaan obat tradisional semakin banyak disukai oleh masyarakat karena bahan nabatinya mudah didapat, mudah diramu dan harganya terjangkau oleh masyarakat, sehingga perlu diimbangi dengan perbaikan kualitas dan peningkatan mutu dari bahan yang digunakan sesuai dengan kebutuhan masyarakat serta perkembangan zaman (Wijayakusuma, 1996).

Salah satu tanaman yang berkhasiat obat adalah tempuyung (*Sonchus arvensis* L.). Sebagian masyarakat banyak memanfaatkannya untuk dijadikan lalap. Tidak hanya itu, tanaman tempuyung juga bermanfaat untuk menyembuhkan berbagai penyakit. Banyak pengalaman yang menunjukkan khasiat dari tempuyung untuk menyembuhkan penyakit, seperti batu ginjal, asam urat, darah tinggi, beberapa kasus sakit kepala, batu empedu, batu kandung kemih dan prostat (Sulaksana, *et al.*, 2004). Di daerah Tawangmangu Surakarta, daun tempuyung sudah dikenal dan dimanfaatkan oleh penduduk setempat sebagai jamu bagi perempuan yang habis melahirkan guna memulihkan kesehatan fisik. Sementara di Cina, daun tempuyung juga digunakan sebagai insektisida selain sebagai tanaman obat (Anonim, 2002).

Studi kepustakaan yang membahas daun tempuyung menyebutkan bahwa kandungan kimia yang banyak terdapat di dalamnya adalah ion-ion mineral antara lain silika, kalium, magnesium, natrium, dan senyawa organik seperti flavonoid, kumarin serta asam fenolat (Anonim, 1999).

Senyawa flavonoid pada daun tempuyung berkhasiat sebagai antiradang juga sebagai peluruh batu ginjal (Anonim, 2002). Flavonoid merupakan kandungan khas tumbuhan hijau dan salah satu senyawa aktif yang menjadi perhatian peneliti dalam mengembangkan obat tradisional Indonesia (Markham, 1988). Flavonoid tersebar dalam tumbuhan tinggi dan mempunyai berbagai macam bioaktivitas sesuai dengan jenis flavonoidnya (Markham, 1988). Sehingga untuk mengetahui struktur parsial dari flavonoid dalam daun tempuyung, perlu dilakukan penelitian untuk mengisolasi dan mengidentifikasi flavonoid dalam daun tempuyung menggunakan metode kromatografi lapis tipis, reaksi warna dan spektrofotometri ultra violet.

B. Perumusan Masalah

Berdasarkan latar belakang di atas, maka permasalahan dapat dirumuskan sebagai berikut :

1. Bagaimana cara mengisolasi dan mengidentifikasi flavonoid dari daun tempuyung (*Sonchus arvensis* L.)?
2. Bagaimana struktur parsial senyawa flavonoid dari daun tempuyung (*Sonchus arvensis* L.)?

C. Tujuan Penelitian

Penelitian ini bertujuan untuk mengisolasi dan mengidentifikasi kandungan flavonoid dari daun tempuyung (*Sonchus arvensis* L.) dengan menggunakan metode kromatografi lapis tipis dan spektrofotometri ultra violet.

D. Tinjauan Pustaka

1. Uraian tentang tanaman tempuyung (*Sonchus arvensis* L.)

a. Nama lain :

- 1) Nama daerah : lempung, rayana, jombang, galibug (sunda)
(Anonim, 1977).
- 2) Nama asing : Niu She Tou (Cina), Laitron des Champs
(Perancis), Sow thistle (Inggris) (Sulaksana, *et al.*, 2004).

b. Taksonomi

Kedudukan tanaman tempuyung (*Sonchus arvensis* L.) dalam tatanama atau taksonomi tumbuhan diklasifikasikan ke dalam :

- 1) Kingdom : Plantae
- 2) Divisio : Spermatophyta
- 3) Sub divisio : Angiospermae
- 4) Classis : Dicotyledonae
- 5) Sub Classis : Sympetalae
- 6) Ordo : Campanulatae (Asterales)
- 7) Familia : Compositae
- 8) Spesies : *Sonchus arvensis* L.

(Backer dan Van Den Brink, 1968)

c. **Pertelaan**

Terna tahunan, tinggi 1 m sampai 2 m, akar tunggang kokoh, batang berusuk, bergetah putih. Daun bagian bawah terpusar membentuk roset, bentuk lonjong atau berbentuk lanset, berlekuk menjari atau tidak teratur, pangkal daun berbentuk panah atau jantung, ujung daun bercuatan pendek, panjang daun 6 cm sampai 48 cm, lebar daun 10 cm, daun bagian atas lebih kecil, duduknya berjauhan dan bergantian serta jelas memeluk batang. Perbungaan berbentuk bonggol yang tergabung dalam malai, bonggol bunga berukuran 2 cm sampai 2,5 cm. Panjang gagang bonggol 1 cm sampai 8 cm, mahkota bunga panjang 2 cm 2,5 cm, mula-mula berwarna kuning terang, lama-lama berwarna merah kecoklatan. Biji panjang 4 mm sampai 4,5 mm, berusuk 5, panjang papus 1,5 cm (Anonim, 1977).

d. **Kandungan kimia**

Kandungan kimia yang terdapat dalam daun tempuyung berupa ion-ion mineral, seperti silika, kalium, magnesium, dan senyawa organik seperti flavonoid, kumarin, taraksasterol, inositol, serta asam fenolat (Anonim, 1999).

e. **Manfaat tanaman**

Daun tempuyung bermanfaat untuk menghancurkan batu ginjal dan batu dalam kandung kemih, selain itu juga berkhasiat sebagai antiradang (Anonim, 2002).

2. **Uraian tentang flavonoid**

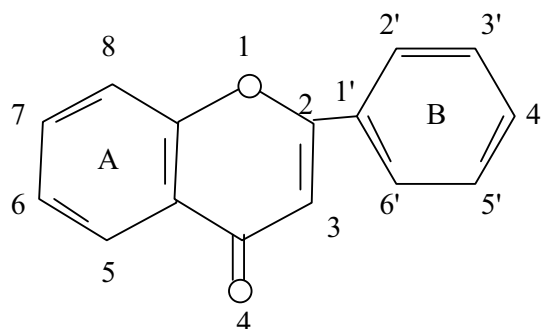
a. **Pengertian flavonoid**

Golongan flavonoid dapat digambarkan sebagai deretan senyawa C₆ - C₃ - C₆, artinya kerangka karbonnya terdiri atas dua gugus C₆ (cincin

benzena tersubstitusi) disambungkan oleh rantai alifatik tiga karbon (Robinson, 1995).

Aglikon flavonoid yaitu (flavonoid tanpa gula terikat) terdapat dalam berbagai bentuk struktur. Semuanya mengandung 15 atom karbon dalam inti dasarnya, yang tersusun dalam konfigurasi C6-C3-C6, yaitu dua cincin aromatik yang dihubungkan oleh satuan tiga karbon yang dapat atau tidak dapat membentuk cincin ketiga (Markham, 1988).

Kelas-kelas yang berlainan dalam golongan ini dibedakan berdasarkan cincin heterosiklik-oksigen tambahan dan gugus hidroksil yang tersebar menurut pola yang berlainan. Flavonoid sering terdapat sebagai glikosida. Golongan terbesar flavonoid berciri mempunyai cincin piran yang menghubungkan rantai tiga karbon dengan salah satu dari cincin benzena. Sistem penomoran untuk flavonoid dapat dilihat pada gambar 1 di bawah ini.



Gambar 1. Penomoran flavonoid (Robinson, 1995)

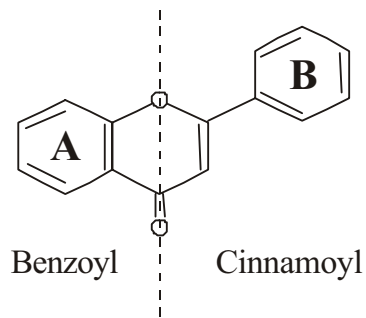
b. Penggolongan flavonoid

Flavonoid merupakan kandungan khas tumbuhan hijau dengan mengecualikan alga. Flavonoid sebenarnya terdapat pada semua bagian tumbuhan termasuk daun, akar, kayu, kulit, tepung sari, bunga, buah, dan

biji. Penyebaran jenis flavonoid pada golongan tumbuhan yang terbesar yaitu angiospermae (Markham, 1998). Flavonoid terdapat dalam semua tumbuhan berbuluh tetapi beberapa kelas lebih tersebar dari pada yang lainnya. Flavon dan flavonol terdapat pada semesta, sedangkan isoflavon dan biflavonol hanya terdapat pada beberapa suku tumbuhan. Sifat berbagai golongan flavonoid tersaji pada tabel 1 (Harborne, 1996). Kerangka flavonoid cincin benzoyl dan cinnamoyl tersaji pada gambar 2 (Mabry, *et al.*, 1970).

Tabel 1. Sifat berbagai golongan Flavonoid (Harborne, 1996)

Golongan Flavonoid	Penyebaran	Ciri Khas
Antosianin	Pigmen bunga merah marak, merah senduduk, dan biru, juga dalam daun dan jaringan lain.	Larut dalam air, λ maks 515-545 nm, bergerak dengan BAA pada kertas
Proantosianidin	Terutama tak berwarna, dalam galih dan daun tumbuhan berkayu.	Menghasilkan antosianidin (warna dapat diekstraksi dengan amil alkohol) bila jaringan dipanaskan dalam HCl 2M selama setengah jam
Flavonol	Terutama ko-pigmen tak warna dalam bunga sianik dan asianik, tersebar luas dalam daun.	Setelah hidrolisis, berupa bercak kuning murup pada kromatogram forestall bila disinari dengan sinar UV maksimal spektrum pada 350 – 386 nm
Flavon	Seperti Flavonol	Setelah dihidrolisis, berupa bercak coklat redup pada kromatogram forestall, maksimal spektrum pada 330 – 350 nm
Glikoflavon	Seperti Flavonol	Mengandung gula yang terikat melalui ikatan GC bergerak dengan pengembang air, tidak seperti flavon biasa
Biflavonil	Tanwarna, hampir seluruhnya terbatas pada gymnospermae	Pada kromatogram BAA berupa bercak redup dengan R_F tinggi.
Khalkon dan auron	Pigmen bunga kuning, kadang terdapat juga dalam jaringan lain.	Dengan ammonia berwarna merah (perubahan warna dapat diamati in situ), maksimal spektrum 370 – 410 nm
Flavonon	Tanwarna, dalam daun dan buah (terutama dalam citrus)	Berwarna merah kuat dengan Mg/HCl kadang – kadang sangat pahit.
Isoflavon	Tanwarna, sering kali, dalam akar, hanya terdapat dalam satu suku leguminosae	Bergerak pada kertas dengan pengembang air; tak ada uji warna yang khas.

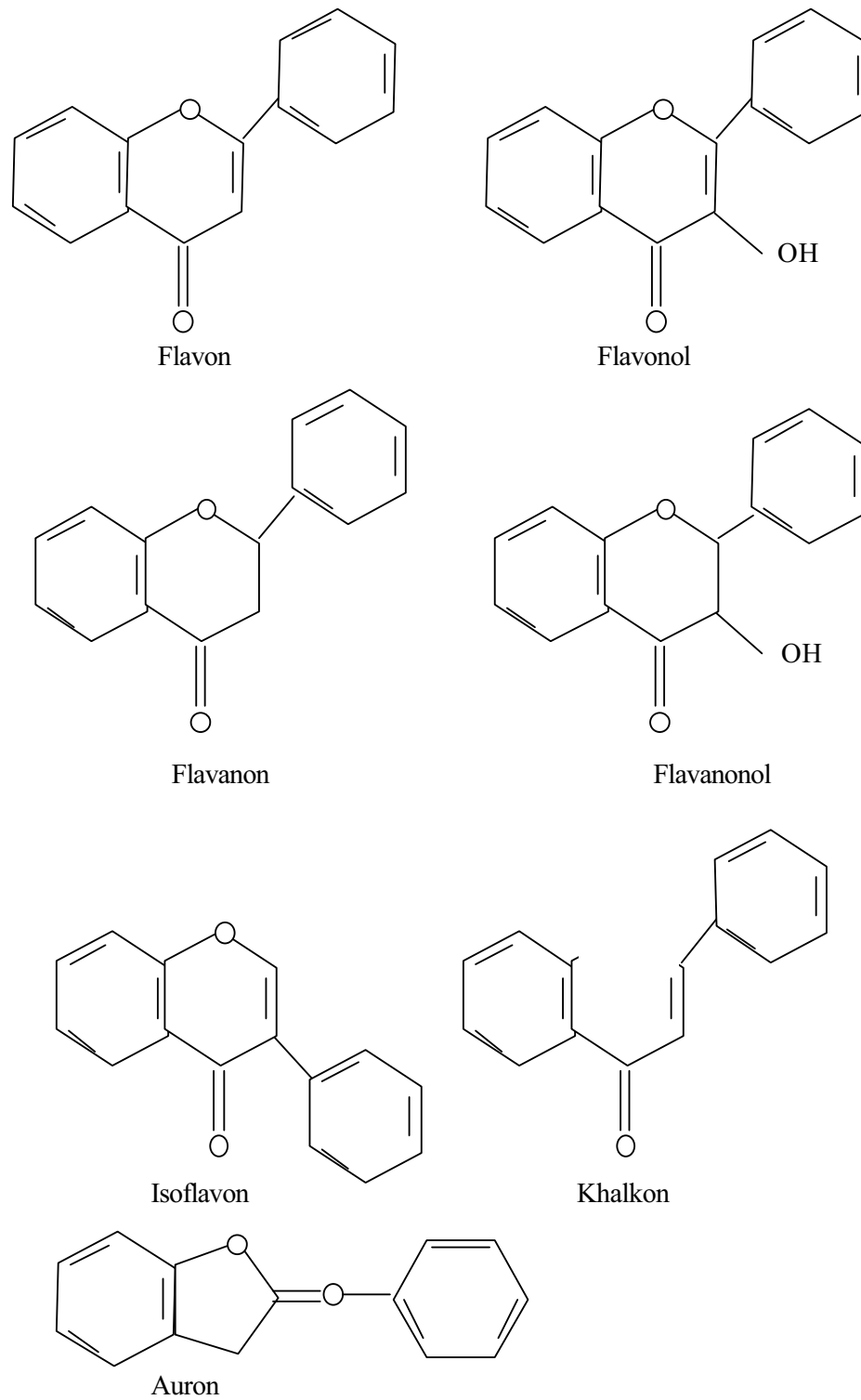


Gambar 2. Kerangka flavonoid cincin benzoyl dan cinnamoyl (Mabry, *et al.*, 1970)

Flavonoid terdapat dalam tumbuhan sebagai campuran, jarang sekali dijumpai hanya flavonoid tunggal dalam jaringan tumbuhan. Disamping itu sering terdapat campuran yang terdiri atas flavonoid yang berbeda kelas (Harborne, 1996).

Penggolongan jenis flavonoid dalam jaringan tumbuhan mula-mula didasarkan kepada telaah sifat kelarutan dan reaksi warna. Kemudian diikuti dengan pemeriksaan ekstrak tumbuhan yang telah dihidrolisis secara kromatografi satu arah dan pemeriksaan ekstrak etanol secara dua arah. Akhirnya flavonoid dapat dipisahkan dengan kromatografi. Komponen masing-masing diidentifikasi dengan membandingkan kromatografi dan spektra dengan memakai senyawa pembanding yang sudah dikenal. Senyawa baku yang ditemukan sewaktu menelaah membutuhkan pemeriksaan kimia dan spektrum yang lebih terperinci (Harborne, 1996).

Perbedaan dibagian rantai karbon nomor 3 menentukan klasifikasi dari senyawa flavonoid yaitu flavon, flavonol, flavanon, flavononol, isoflavon, auron, dan khalkon. Kerangka flavonoid tersaji dalam gambar 3. Tabel reaksi warna flavonoid (Venkataraman, 1962) tersaji pada tabel II.



Gambar 3. Kerangka dari tipe-tipe flavonoid (Mabry, *et al.*, 1970)

Tabel II. Reaksi warna flavonoid (Venkataraman, 1962)

Golongan Flavonoid	Warna			
	Larutan NaOH	HCl pekat	Magnesium/asam klorida	Natrium amalgam
Khalkon	Jingga sampai merah	Jingga sampai merah	Tak warna	Kuning pucat
Dihidrokhalkon	Tak berwarna	Tak berwarna/ kuning	Tak berwarna	Tak berwarna
Auron	Merah/ violet	Merah/ violet	Tak berwarna	Kuning pucat
Flavanon	Kuning/ jingga dipanaskan merah	Jingga	Merah/ violet/ biru	Merah
Flavon	Kuning	Kuning/ jingga berpendar	Kuning/ jingga berpendar	Merah
Flavonol	Kuning/jingga	Kuning/ jingga berpendar	Merah/ violet	Kuning/ merah
Flavanonol	Kuning berubah coklat	Kuning/ merah	Merah/ violet	Kuning/ coklat
Leukoantosianin	Kuning	Merah/ violet	Violet	Violet
Antosianin/ Antosianidin	Biru/ violet	Kuning/ jingga	Merah lalu memucat	Kuning/ jingga
Isoflavon	Kuning	Kuning	Kuning	Merah mudah/ violet
Isoflavanon	Kuning	Kuning	Tak berwarna	Merah

c. Ekstraksi senyawa flavonoid

Kelarutan dari flavonoid dipengaruhi oleh golongan dan substituenya, sehingga flavonoid memiliki kelarutan yang berbeda-beda. Perbedaan kelarutan yang terjadi berdasarkan atas polaritas yang berbeda dari flavonoid tersebut. Sehingga untuk melakukan ekstraksi digunakan pelarut yang mempunyai polaritas yang sesuai dengan flavonoidnya (Markham, 1988).

Pada umumnya flavonoid sedikit larut dalam pelarut polar seperti etanol, metanol, butanol, aseton dan sebagainya. Flavonoid juga mudah larut dalam air karena adanya gula yang terikat. Sedangkan aglikon flavonoid yang kurang polar seperti isoflavon, flavanon dan flavon serta flavonol yang termetoksilasi cenderung lebih mudah larut dalam pelarut seperti eter dan kloroform (Markham, 1988).

Sedangkan untuk flavonoid yang memiliki sifat kepolaran rendah atau dalam tanaman biasa ditemukan pada tumbuhan padang pasir dan paku, dan paling baik diisolasi dengan cara merendam bahan tumbuhan yang masih segar tersebut ke dalam larutan heksana atau eter dan dilakukan selama beberapa menit (Markham, 1988).

Cara ekstraksi yang dapat digunakan adalah Soxhletasi. Dimana cairan penyari diisikan pada labu, serbuk simplisia diisikan pada tabung dari kertas saring atau tabung yang berlubang-lubang dari gelas baja tahan karat, perlu atau bahan lain yang cocok. Cairan penyari dipanaskan ke atas melalui pipa saring. Kemudian diembunkan kembali oleh pendingin tegak. Karena

adanya sifon maka setelah cairan permukaan sifon seluruh cairan akan kembali ke labu (Anonim, 1986)

Keuntungan Soxhlet antara lain cairan penyari yang diperlukan lebih sedikit dan secara langsung diperoleh hasil yang (lebih) pekat, serbuk simplisia disari oleh cairan penyari yang murni, sehingga dapat menyari zat aktif lebih banyak dan penyari dapat diteruskan sesuai dengan keperluan, tanpa menambah volume cairan penyari, sedangkan kerugian Soxhlet antara lain larutan dipanaskan terus menerus, sehingga zat aktif yang tidak tahan panas kurang cocok. Ini dapat diperbaiki dengan menambah peralatan untuk mengurangi tekanan udara. Kerugian lainnya adalah cairan penyari dididihkan terus menerus, sehingga cairan penyari yang terus murni atau campuran azeotrop (Anonim, 1986).

Cara ekstraksi lain yang digunakan adalah maserasi. Istilah dari *maceration* berasal dari bahasa latin *marerare* yang artinya merendam, merupakan proses paling tepat dimana obat yang sudah halus memungkinkan untuk direndam dalam menstrum sampai meresap dan melunakkan susunan sel sehingga zat-zat yang mudah larut akan melarut (Ansel, 1989). Maserasi merupakan penyarian yang sederhana. Maserasi dilakukan dengan cara merendam serbuk simplisia dalam cairan penyari. Cairan penyari akan menembus dinding sel dan masuk ke dalam rongga sel yang mengandung zat aktif, akan larut dan karena adanya perbedaan konsentrasi antara larutan zat aktif di dalam sel dengan di luar sel, maka larutan yang terpekat didesak keluar. Peristiwa tersebut berulang sehingga

terjadi keseimbangan konsentrasi antara larutan di luar sel dan di dalam sel (Anonim, 1986).

Maserasi digunakan untuk penyarian simplisia yang mengandung zat aktif yang mudah larut dalam cairan penyari, tidak mengandung zat yang mudah mengembang dalam cairan penyari. Cairan penyari yang digunakan dapat berupa etanol, air etanol atau pelarut lain. Bila cairan penyari digunakan air maka untuk mencegah timbulnya kapang dapat ditambahkan bahan pengawet, yang diberikan pada awal penyarian (Anonim, 1986).

Keuntungan cara penyarian dengan maserasi adalah cara pengerjaan dan peralatan yang digunakan sederhana dan mudah diusahakan. Kerugian cara maserasi adalah pengerjaannya lama dan penyariannya kurang sempurna (Anonim, 1986).

d. Isolasi flavonoid

Metode paling utama dan berguna untuk mengisolasi atau memisahkan campuran flavonoid adalah kromatografi kertas. Sedangkan kromatografi lapis tipis adalah sebagai cara analisis cepat, karena hanya membutuhkan sampel yang relatif sedikit dengan waktu yang cukup singkat. Tipe flavonoid yang akan dipisahkan akan berpengaruh dalam memilih fase gerak dan fase diam (Markham, 1988).

e. Karakterisasi dan identifikasi flavonoid

Secara umum golongan senyawa flavonoid biasanya ditentukan dengan uji warna, penentuan larutan, bilangan R_f dan ciri spektra ultra violet. Flavonoid dapat diklasifikasikan berdasar pada perbedaan reaksi warna dan kelarutannya (Markham, 1988).

3. Uraian tentang kromatografi lapis tipis

Kromatografi merupakan alat pemisah yang berbeda dengan cara pemisahan yang berdasar kimia dan fisika atau pemisahan cair-cair. Pemisahan yang terjadi di kromatografi menggunakan dua fase yang tidak tercampur tetapi selalu dalam satu sistem yang bercampur, yang dinamakan fase gerak dan fase diam yang umumnya zat padat atau zat cair yang didukung oleh zat padat (Sumarno, 2001).

Kromatografi lapis tipis (KLT) digunakan untuk pemisahan senyawa secara cepat dengan menggunakan zat penjerat berupa serbuk halus yang dilapiskan serba rata pada lempeng kaca (Anonim, 1979). Senyawa yang diuji dapat berupa senyawa tunggal maupun campuran dari produk pabrik, hasil sintesis, isolasi dari hewan percobaan, maupun dari tanaman dan mikroorganisme. Alat ini merupakan alat yang mudah penggunaannya, murah dan selektif, walaupun sekarang telah dikembangkan (Sumarno, 2001).

Fase diam pada kromatografi lapis tipis adalah bahan penjerap atau adsorber. Sifat penting bahan penyerap adalah ukuran partikelnya serta homogenitasnya. Kedua ini menentukan daya lekat pendukung. Panjang lapisan tersebut 200mm atau 100mm. Untuk analisa tebal 0,1mm – 0,3mm biasanya 0,2mm. Sebelum digunakan, lapisan disimpan dalam lingkungan yang tidak lembab dan bebas dari uap laboratoium (Stahl, 1985). Fase diam dalam KLT berupa fase polar (fase normal), seperti silika gel, alumina (aluminium oksida), magnesium silikat, selulosa maupun fase non polar (fase terbalik) seperti fase diam dari silika, resin (Sumarno, 2001).

Fase gerak adalah medium angkut dan terdiri atas satu atau beberapa pelarut. Yang digunakan hanyalah pelarut bertingkat mutu analitik dan bila diperlukan, sistem pelarut multi komponen ini harus berupa campuran sesederhana mungkin yang terdiri atas maximum tiga komponen. (Stahl, 1985).

Noda-noda dalam kromatogram sangat lazim menggunakan harga R_f (Retardation faktor) (Sastrohamidjojo, 1991). Jarak pengembangan senyawa pada kromatogram biasanya dinyatakan dengan angka R_f/hR_f .

$$R_f = \frac{\text{Jarak yang ditempuh solut (cm)}}{\text{Jarak yang ditempuh fase gerak (cm)}}$$

Angka R_f berjangka antara 0,00 dan 1,00 dan hanya ditentukan dua desimal hR_f ialah angka R_f dikalikan faktor 100 (h) menghasilkan nilai berjangka 0 sampai 100 (Stahl, 1985).

Faktor-faktor yang mempengaruhi gerakan dalam kromatografi lapis tipis yang juga mempengaruhi harga R_f : Struktur kimia dari senyawa yang dipisahkan, sifat dari fase diam, tebal dan kelarutan dari fase diam, pelarut fase gerak, kejenuhan dari uap dalam bejana pengimbangan, jumlah cuplikan yang digunakan, suhu (Sastrohamidjojo, 1991).

Berbagai penafsiran bercak dari segi flavonoid tersaji pada tabel III (Mabry, *et al.*, 1991). Berbagai warna bercak flavonoid dengan sinar UV 366 tersaji pada tabel IV (Geissman, 1962).

Tabel III. Penafsiran bercak dari segi struktur flavonoid (Mabry *et al.*, 1970)

Warna bercak flavonoid		
Sinar UV	UV/ NH ₃	Tipe flavonoid
Ungu gelap	Kuning, hijau-kuning atau hijau	a. Biasanya flavon yang mempunyai 5-OH dan 4'OH atau flavonol tersubstitusi pada 3-OH mempunyai 5-OH dan 4-OH b. Kadang-kadang 5-OH flavanon dan 4'OH khalkon tanpa OH pada cincin B
	Perubahan warna sedikit atau tanpa perubahan warna	a. Flavon atau flavonol yang mempunyai 5-OH tetapi tanpa 4'OH atau tersubstitusi b. Isoflavon, dihidroflavonol dan beberapa flavanon yang mempunyai 5-OH c. Khalkon yang mempunyai 2'- atau 6'-OH tetapi tidak mempunyai 2- atau 4-OH bebas
	Biru muda	Kadang-kadang 5-OH flavanon
	Merah atau jingga	Khalkon yang mempunyai 2 dan/atau 4-OH bebas
Fluoresensi biru muda	Fluoresensi hijau-kuning atau hijau-biru	a. Flavon dan flavanon tanpa 5-OH bebas b. Flavonol tanpa 5-OH bebas tetapi mempunyai 3-OH tersubstitusi
	Perubahan warna sedikit atau tanpa perubahan Fluoresensi terang biru muda	Isoflavon tanpa 5-OH bebas Isoflavon tanpa 5-OH bebas
Tak nampak	Fluoresensi biru muda	Isoflavon tanpa 5-OH bebas
Kuning redup dan kuning, atau fluoresensi jingga	Perubahan warna sedikit atau tanpa perubahan	Flavonol yang mempunyai 3-OH bebas dan mempunyai atau tidak mempunyai 5-OH bebas
Fluoresensi kuning, hijau-kuning, hijau-biru	Jingga atau merah	Auron yang mempunyai 4' OH bebas dan beberapa 2- atau 4-OH khalkon
	Perubahan warna sedikit atau tanpa perubahan	a. Auron yang tidak mempunyai 4'OH bebas dan flavanon tanpa 5-OH bebas b. Flavonol yang mempunyai 3OH bebas dan disertai atau tanpa 5-OH bebas
Kuning pucat	Kuning terang-ungu	Dihidroflavonol yang tidak mempunyai 5-OH bebas

Tabel IV. Warna bercak Flavonoid dengan sinar tampak dan UV 366 nm (Geijsman, 1962)

Gol flavonoid	Vis	UV _{366nm}	NH ₃	NH ₃ / UV _{366nm}	AlCl ₃	AlCl ₃ / UV _{366nm}	Na ₂ CO ₃	Na ₂ BH ₄	ArSO ₃ H
Flavon	kuning merah	coklat gelap, coklat merah, kuning coklat	kuning	kuning terang, kuning hijau, kuning gelap	kuning pucat	fluoresensi hijau, kuning, coklat	kuning terang	tidak berwarna	kuning
Flavonol	kuning merah	kuning terang, kuning hijau, coklat	kuning	kuning terang, kuning hijau, hijau	kuning	fluoresensi kuning hijau	kuning, kuning coklat, biru	tidak berwarna	kuning
Isoflavon	tak berwarna	ungu padam, kuning lemah	tak berwarna	ungu padam, kuning lemah	tak berwarna	fluor kuning	hijau lemah	tidak berwarna	
Katekin	tak berwarna	tak berwarna	tak berwarna	fluor, biru lemah, hitam	tak berwarna	tak berwarna, biru lemah, kuning pucat			coklat
Flavanon	tak berwarna	tak berwarna	tak berwarna	tak berwarna, kuning gelap, kuning hijau	tak berwarna	fluor hijau, kuning, biru pucat	kuning lemah, hijau	magenta	tidak berwarna
Leukoantianin	tak berwarna	tak berwarna	-	-	-	-	-	-	merah, merah muda, ungu
Antosianin	merah muda, orange, merah jingga	merah padam, ungu, merah muda, coklat	-	-	-	-	-	-	tidak berwarna
Auron	kuning terang	kuning terang, hijau kuning	orange merah muda	kuning orange, orange, merah, orange coklat	kuning lemah, orange	fluor hijau, kuning, coklat lemah	orange, merah muda, ungu	tidak berwarna	merah muda, orange
Khalikon	coklat, hijau, kuning coklat	coklat, hijau kuning coklat	kuning orange, merah orange, merah muda	orange, merah, ungu, hitam	kuning orange	fluor, orange, coklat, merah muda	orange, coklat merah	tidak berwarna	orange, merah muda

4. Spektrofotometri Ultra violet

a) Tinjauan umum

Spektrofotometri adalah pengukuran serapan radiasi elektromagnetik panjang gelombang tertentu yang sempit, mendekati monokromatik, yang diserap zat. Pengukuran serapan dapat dilakukan pada daerah ultra violet (panjang gelombang 190 nm-380 nm). Meskipun spektrum pada daerah ultra violet dan daerah cahaya tampak dari suatu zat tidak khas, tetapi sangat cocok untuk penetapan kuantitatif, dan untuk beberapa zat berguna untuk membantu identifikasi (Anonim, 1979).

Untuk melukiskan bagaimana radiasi elektromagnetik berinteraksi dengan benda, adalah perlu memikirkan berkas sinar sebagai foton. Tenaga setiap foton berbanding langsung dengan frekuensi radiasi dan hal ini dinyatakan dalam persamaan:

$$E = h \cdot \nu = h \cdot c / \lambda$$

dimana E = tenaga foton dalam erg; ν = frekuensi radiasi elektromagnetik dalam hertz, dan h = tetapan planck $6,624 \times 10^{-35}$ J-detik. Foton yang memiliki frekuensi yang tinggi (panjang gelombang pendek) mempunyai tenaga yang lebih tinggi daripada foton yang berfrekuensi rendah (panjang gelombang panjang) (Sastrohamidjojo, 2001).

Serapan cahaya oleh molekul dalam daerah spektrum ultra violet dan terlihat tergantung pada struktur elektronik dari molekul. Spektra ultra violet dan terlihat dari senyawa-senyawa organik berkaitan erat transisi-transisi diantara tingkatan-tingkatan tenaga elektronik. Disebabkan karena hal ini, maka serapan radiasi ultra violet terlihat sering dikenal sebagai spektroskopi elektronik (Sastrohamidjojo, 2001).

b) Spektrofotometri UV untuk flavonoid

Spektrofotometri serapan ultra violet dan serapan tampak barangkali merupakan cara tunggal yang paling berguna untuk menganalisis struktur flavonoid. Cara tersebut digunakan untuk membantu mengidentifikasi jenis flavonoid dan menentukan pola oksigenasi. Disamping itu kedudukan gugus hidroksil fenol bebas pada inti flavonoid dapat ditentukan dengan menambah pereaksi (pereaksi geser) kedalam larutan cuplikan dan mengamati pergeseran puncak serapan yang terjadi. Dengan demikian, secara tidak langsung cara ini berguna untuk menentukan kedudukan gula atau metil yang terikat pada salah satu gugus hidroksil fenol (Markham, 1988).

Spektrum flavonoid biasanya ditentukan dalam larutan dengan pelarut metanol atau etanol (EtOH), meski perlu diingat bahwa spektrum yang dihasilkan dalam etanol kurang memuaskan. Spektrum khas terdiri atas dua maksimal pada rentang 240 – 285 nm (pita II) dan 300 – 550 nm (pita I) (Markham, 1988). Rentang serapan spektrum UV-VIS flavonoid tersaji pada tabel V (Markham, 1988).

Tabel V. Rentangan serapan spektrum UV – tampak flavonoid (Markham, 1988)

Pita II (nm)	Pita I (nm)	Jenis flavonoid
250 – 280	310 – 350	Flavon
250 – 280	330 – 360	Flavonol (3-OH tersubstitusi)
250 – 280	350 – 385	Flavonol (3-OH bebas)
245 – 275	310 – 330 bahu	Isoflavon
275 – 295	300 – 330 bahu	Flavanon dan dihidroflavonol
230 – 270	340 – 390	Khalkon
(kekuatan rendah) 230 – 270	380 – 430	Auron
(kekuatan rendah) 270 – 280	465 - 560	Antosianidin dan antosianin

c) Pereaksi geser**Flavon dan flavonol:****1. Efek hidroksilasi**

Penambahan gugus OH pada cincin A pada flavon/flavonol menghasilkan pergeseran batokromik yang nyata pada pita serapan I atau pita serapan II pada spektra flavonoid. Apabila gugus hidroksi tidak ada pada flavon atau flavonol, panjang gelombang maksimal muncul pada panjang gelombang yang lebih pendek jika dibandingkan dengan adanya gugus 5 – OH. Substitusi gugus hidroksi pada posisi 3,5,4' mempunyai sedikit efek atau tidak sama sekali pada spektra ultra violet (Mabry, *et al.*, 1970).

2. Efek metilasi dan glikosilasi

Metilasi dan glikosilasi pada pola resapan dari flavon dan flavonol. Jika gugus 3,5 atau 4' – OH pada flavon dan flavonol termetilasi atau terglkosilasi terjadi pergeseran hipsokromik, khususnya dapat dilihat pada pita serapan I. Pergeseran yang terjadi sebesar 12– 17 nm. Dapat juga mencapai 22–25 nm pada flavon yang tidak mempunyai gugus 5 – OH (Mabry, *et al.*, 1970).

3. Efek natrium metoksida

Natrium metoksida pada flavon dan flavonol dalam metanol pada umumnya menghasilkan pergeseran batokromik yang pada semua pita serapan. Walaupun demikian pergeseran batokromik yang besar pada serapan pita I sekitar 40 – 65 nm tanpa penurunan intensitas, menunjukkan adanya gugus-gugus 4'-OH bebas, dan flavonol yang tidak

mempunyai gugus 4'-OH bebas, maka spektranya dengan Na metoksida akan mengalami dekomposisi. Pereaksi pengganti natrium metoksida yang cocok ialah larutan NaOH 2 M dalam air (Mabry, *et al.*, 1970).

4. Efek natrium asetat

Natrium asetat merupakan basa lemah dan hanya akan mengionisasi gugus yang sifat keasamannya tinggi, khususnya untuk mendeteksi adanya gugus 7-OH bebas (Markham, 1988). Flavon dan flavonol yang mempunyai gugus 7-OH bebas menunjukkan pergeseran batokromik sebesar 5-20 nm pada pita serapan II dengan adanya natrium asetat. Na asetat hanya dapat mengionisasi khusus pada gugus 7-OH. Adanya Na asetat dan asam borat akan membentuk kompleks dengan gugus orto dihidrasi pada semua posisi kecuali atom C₅ dan C₆. Flavon dan flavonol yang mempunyai gugus orto dihidroksi pada cincin B menunjukkan pergeseran batokromik pada serapan I sebesar 12 – 30 nm. Gugus orto dihidroksi pada cincin A juga dapat dideteksi dengan efek Na asetat dan asam borat. Adanya pergeseran batokromik sebesar 5-10 nm pada pita I menunjukkan adanya gugus orto dihidroksi pada C₆ dan C₇ atau C₇ dan C₈ (Mabry, *et al.*, 1970).

5. Efek AlCl₃

Pereaksi AlCl₃ ini dapat digunakan untuk mendeteksi gugus hidroksil dan gugus orto karena membentuk kompleks tahan asam antara gugus hidroksil dan keton yang bertetangga dan membentuk kompleks

tak tahan asam dengan gugus orto (Markham, 1988). Gugus OH pada C₃ dan C₅ pada flavon dan flavonol akan membentuk kompleks yang stabil dengan adanya AlCl₃. Sebaliknya kompleks yang terbentuk antara AlCl₃ dengan gugus orto dihidroksi bersifat labil sehingga dengan penambahan asam akan terdekomposisi sedangkan kompleks antara AlCl₃ dengan C-4 keto 3/5-OH tetap stabil dengan adanya asam. Adanya gugus orto dihidroksi pada cincin B dapat diketahui jika pada penambahan asam terhadap spektra kompleks AlCl₃ menghasilkan pergeseran hipsokromik sebesar 30 – 40 nm pada pita 1 (atau pita la jika pita I terdiri dari 2 puncak). Dengan adanya pergeseran batokromik pada pita la (dalam AlCl₃ / HCl) dibandingkan dengan pita I (dalam metanol) 35 – 55 nm, menunjukkan adanya 5 – OH flavon atau flavonol 3 – OH tersubstitusi (Mabry, *et al.*, 1970).

E. KETERANGAN EMPIRIS

Flavonoid yang terkandung dalam daun tempuyung (*Sonchus arvensis* L.) dapat diisolasi secara kromatografi lapis tipis dan diidentifikasi struktur parsialnya berdasarkan data kromatogram KLT, reaksi warna dan spektrofotometri ultra violet.