

BAB I

PENDAHULUAN

A. Latar Belakang

Salah satu jenis obat tradisional yang dikenal masyarakat Indonesia adalah Makuto dewo (*Phaleria macrocarpa* [Scheff] Boerl.). Makuto dewo (*Phaleria macrocarpa* [Scheff] Boerl.) adalah tanaman yang berasal dari kepulauan Papua dan banyak ditanam di Indonesia di kawasan Jawa Tengah dan Yogyakarta. Pohonnya kecil dengan ketinggian mencapai 3 meter.

Makuto dewo tergolong tanaman yang mampu hidup di berbagai kondisi, dari dataran rendah sampai dataran tinggi. Umumnya dibudidayakan sebagai tanaman hias atau tanaman peneduh. Tumbuh baik di tanah gembur dengan kandungan bahan organik yang tinggi

Makuto dewo mengandung antihistamin, alkaloid, saponin, dan polifenol (lignan). Tanaman ini dikatakan mempunyai khasiat sebagai antitumor, obat disentri, obat sakit kulit, juga dipakai untuk pengobatan beberapa penyakit keras seperti sakit lever, diabetes, penyakit ginjal, jantung, asam urat, reumatik, tekanan darah tinggi, lemah syahwat, ketagihan narkoba, penyakit alergi yang disebabkan histamin seperti biduran, gatal-gatal, salesma, dan sesak nafas. Penyakit ringan seperti eksim, jerawat, dan luka gigitan serangga (Harmanto, 2002).

Salah satu bagian terpenting dari tanaman tersebut adalah daunnya, yang selama ini digunakan oleh masyarakat secara turun-temurun untuk mengobati berbagai penyakit antara lain sebagai peluruh batu ginjal (Dalimartha, 2003) dan

menurut Mursito (2001) di dalam daunnya terdapat flavonoid. Penelitian yang telah dilakukan Qurani (2004) menunjukkan adanya kemampuan fraksi air dan etil asetat dari daun Makuto Dewo dalam melarutkan batu ginjal kalsium secara *invitro* dan hasil penelitian lebih lanjut menunjukkan adanya flavonoid di dalam fraksi air maupun etil asetat.

Flavonoid merupakan salah satu senyawa aktif yang menjadi pusat perhatian dalam pengembangan obat tradisional Indonesia. Flavonoid merupakan senyawa alam dalam tumbuhan tinggi dan mempunyai berbagai macam bioaktivitas sesuai dengan jenis flavonoidnya.

Berdasarkan permasalahan tersebut, maka perlu dilakukan penelitian untuk mengisolasi dan mengidentifikasi flavonoid dari daun makuto dewo, dari fraksi eter, fraksi etil asetat, dan fraksi air menggunakan teknik kromatografi lapis tipis. Kemudian untuk menentukan struktur parsialnya digunakan spektrofotometri ultraviolet dengan berbagai pereaksi geser.

B. Perumusan Masalah

Berdasarkan uraian yang disebutkan dalam latar belakang diperoleh rumusan masalah sebagai berikut :

1. Bagaimana cara mengisolasi flavonoid dari daun Makuto dewo (*Phaleria macrocarpa* [Scheff] Boerl.)?
2. Bagaimana struktur parsial flavonoid yang terdapat di dalam daun Makuto dewo (*Phaleria macrocarpa* [Scheff] Boerl.)?

C. Tujuan Penelitian

Penelitian ini dilakukan untuk mengisolasi dan mengidentifikasi kandungan flavonoid dari daun Makuto dewo (*Phaleria macrocarpa* [Scheff] Boerl.). Sekaligus menentukan struktur parsialnya dengan berbagai pereaksi geser.

D. Tinjauan Pustaka

1. Uraian Tentang Tanaman Makuto dewo

a. Sistematika Tanaman

Kedudukan tanaman makuto dewo (*Phaleria macrocarpa* [Scheff] Boerl.) dalam taksonomi tumbuhan adalah sebagai berikut:

Divisio	: Spermatophyta
Subdivisio	: Angiospermae
Classis	: Dicotyledonae
Ordo	: Thymelaeae
Familia	: Thymelaeaceae
Genus	: Phaleria
Spesies	: <i>Phaleria Macrocarpa</i> [Scheff] Boerl

(Winarno, 2004)

b. Nama Daerah

Melayu	: Simalakama
Jawa	: Makuto dewo, takuto mewo, makuto ratu, makuto rojo.
Sinonim	: <i>Phaleria papuana</i> Warb. Var. <i>Wichnannii</i> (Val.) Back.

(Dalimartha, 2003)

c. Morfologi Tumbuhan

Tanaman makuto dewo (*Phaleria macrocarpa* [Scheff] Boerl.) merupakan tanaman perdu, menahun, tumbuh tegak, tinggi 1 – 2,5 meter. Batang tanaman bulat, permukaannya kasar, warna coklat, berkayu dan bergetah, percabangan simpodial. Daun tunggal, letaknya berhadapan, bertangkai pendek, bentuknya lanset atau jorong, ujung dan pangkal runcing, tepi rata, pertulangan menyirip, permukaan licin, warnanya hijau tua, panjang 7–10 cm, lebar 2–5 cm. Bunga keluar sepanjang tahun, letaknya tersebar di batang atau ketiak daun, bentuk tabung berukuran kecil, berwarna putih, dan harum. Buah bentuknya bulat, diameter 3 – 5 cm, permukaan licin, beralur, ketika muda warnanya hijau dan merah setelah masak. Daging buah berwarna coklat, berakar tunggang dan berwarna kuning kecoklatan. Perbanyakkan dengan cangkok dan bijinya (Dalimartha, 2003).

d. Ekologi dan Penyebaran

Tanaman makuto dewo (*Phaleria macrocarpa* [Scheff] Boerl.) bisa ditemukan di pekarangan sebagai tanaman hias atau di kebun-kebun sebagai tanaman peneduh. Menilik dari nama botaninya *Phaleria papuana*, banyak orang yang memperkirakan tanaman ini populasi aslinya dari tanah Papua, Irian Jaya.

Makuto dewo (*Phaleria macrocarpa* [Scheff] Boerl.) tumbuh subur di tanah gembur dan subur pada ketinggian 10 – 1200 m di atas permukaan laut (Dalimartha, 2003).

e. Kandungan Kimia

Daun makuto dewo (*Phaleria macrocarpa* [Scheff] Boerl.) mengandung flavonoid (Mursito, 2001), alkaloid, saponin, dan polifenol (lignan). Kulit buah mengandung alkaloid, saponin dan flavonoid (Dalimartha, 2003).

f. Khasiat

Tanaman makuto dewo (*Phaleria Macrocarpa* [Scheff] Boerl.) memiliki beragam khasiat antara lain daunnya untuk peluruh batu ginjal (Dalimartha, 2003). Selain itu juga dapat menyembuhkan beberapa penyakit berat seperti lever kanker, jantung, kencing manis, asam urat, reumatik, sakit ginjal, tekanan darah tinggi (Harmanto, 2001).

2. Uraian Tentang Flavonoid

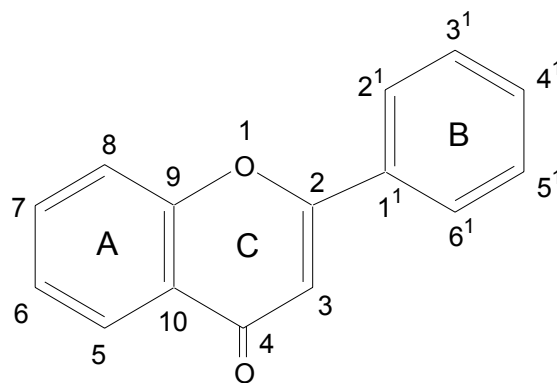
a. Pengertian dan kerangka dasar flavonoid

Flavonoid merupakan suatu senyawa polifenol yang mempunyai 15 atom karbon, terdiri dari dua cincin benzene yang dihubungkan menjadi satu oleh rantai lurus yang terdiri dari tiga atom karbon. Kerangka ini ditunjukkan dalam sistem $C_6 - C_3 - C_6$ (Markham, 1988).

Penggolongan flavonoid berdasarkan substituen cincin heterostik yang mengandung oksigen dan perbedaan distribusi dari gugus hidroksil. Perbedaan oksidasi di bagian atom C_3 menentukan sifat, khasiat, dan golongan atau tipe flavonoid (Markham, 1988).

Dalam tumbuhan, aglikon flavonoid (flavonoid tanpa gula terikat) terdapat dalam berbagai bentuk struktur, semuanya mengandung 15 atom karbon dalam

inti dasarnya, yang tersusun dalam konfigurasi $C_6 - C_3 - C_6$, yaitu dua cincin aromatik yang dihubungkan oleh satuan tiga karbon yang dapat atau tak dapat membentuk cincin ketiga. Cincin diberi tanda A, B, C, atom karbon dinomori menurut sistem penomoran dengan menggunakan angka biasa untuk cincin A dan C, serta angka "beraksen" untuk cincin B (Markham, 1988). Kerangka dasar flavonoid dan cara penomorannya terdapat pada gambar 1.



Gambar 1. Kerangka dasar flavonoid dan cara penomoran (Markham, 1988)

b. Flavonoid *O*-glikosida

Flavonoid biasanya terdapat sebagai flavonoid *O*-glikosida, pada senyawa tersebut satu gugus hidroksil flavonoid (atau lebih) terikat pada satu gula (atau lebih) dengan ikatan hemiasetal yang tak tahan asam. Pengaruh glikosilasi menyebabkan flavonoid menjadi kurang reaktif dan lebih mudah larut dalam air (cairan). Walaupun setiap posisi dalam inti flavonoid dapat diglikosilasi, kenyataannya hidroksi pada tempat tertentu mempunyai peluang yang lebih besar untuk terglykosilasi ketimbang tempat-tempat lain, misalnya 7-hidroksil pada flavon, isoflavon, dan dihidroflavonon, 3-(dan 7-) hidroksil dalam flavonol dan

dihydroflavonol; dan 3-(dan 5-) hidroksil dalam antosianidin. Glukosa merupakan gula yang paling umum terlibat selain galaktosa, ramnosa, xilosa, dan arabinosa (Markham, 1988).

c. Flavonoid C-glikosida

Gula juga terikat pada atom karbon flavonoid dan dalam hal ini gula tersebut terikat langsung pada inti benzena dengan suatu ikatan karbon-karbon yang tahan asam. Glikosida yang demikian disebut C-glikosida. Sekarang gula yang terikat pada atom C hanya ditemukan pada atom C nomor 6 dan 8 dalam inti flavonoid. Jenis gula yang terlibat ternyata jauh lebih sedikit ketimbang jenis gula O-glikosida, dan jenis aglikon flavonoid yang terlibat pun sangat terbatas (Markham, 1988).

d. Penggolongan flavonoid

Penggolongan flavonoid berdasarkan pada substituen cincin heterosiklik yang mengandung oksigen dan perbedaan distribusi dari gugus hidroksil. Perbedaan oksidasi di bagian atom C_3 menentukan sifat, khasiat dan golongan atau tipe flavonoid (Markham, 1988).

Perbedaan pola substitusi dan hidroksilasi pada atom C_3 juga menentukan klasifikasi dari senyawa flavonoid yaitu flavon, flavanon, flavonol, flavononol, isoflavon, auron, chalkon. Bagian terbesar dari golongan tersebut adalah flavon dan flavanol (Markham, 1988).

Berdasarkan bentuk dari kerangka rantai 3 atom karbonnya, senyawa flavonoid dapat digolongkan menjadi :

- 1) Golongan Flavon (Fenil Benzo Piran)

Pada flavonoid golongan ini, rantai 3 atom karbonnya membentuk kerangka senyawa piran dan senyawanya disebut flavonoid.

2) Golongan Flavon (Fenil Benzo- γ -Piron)

Pada flavonoid golongan ini, rantai 3 atom karbonnya membentuk kerangka piron dan senyawa disebut sebagai flavonoid.

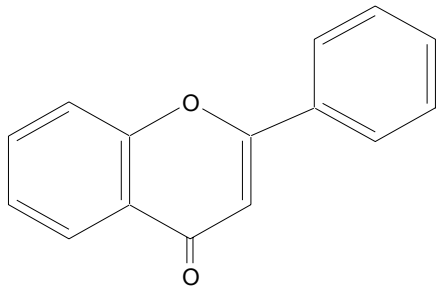
3) Golongan Flavilium (Fenil Benzo Pirilium)

Pada flavonoid golongan ini, rantai 3 atom karbonnya membentuk kerangka senyawa pirilium dan senyawa disebut antosian. (Trease, 1978)

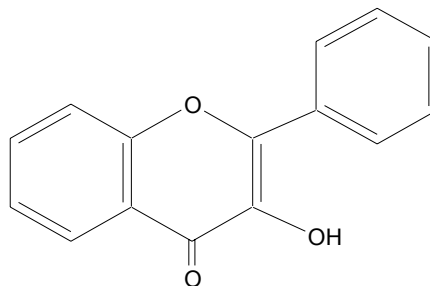
Dalam kombinasi senyawa flavonoid sering tersubstitusi oleh senyawa-senyawa lain diantaranya gugus hidroksi (-OH), metoksi (-OCH₃), metil (CH₃), gula dan prenil. Gugus-gugus substituen tersebut banyak tersubstitusi pada posisi 3, 5, 7, 3¹, dan 4¹. ,oleh karena itu flavonoid merupakan senyawa polar dan dapat larut dalam etanol, air, metanol dan butanol (Trease,and Evans, 1978).

Struktur kerangka dasar flavonoid (turunan flavon) dapat dilihat pada gambar 2.

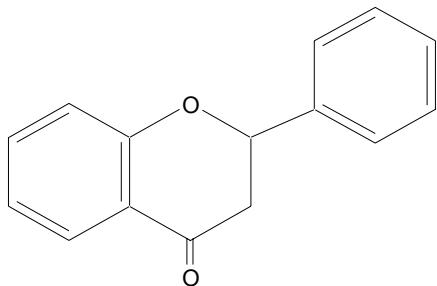
FLAVON



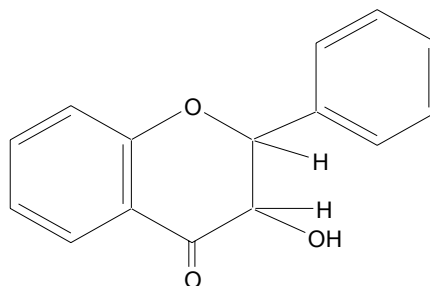
FLAVONOL



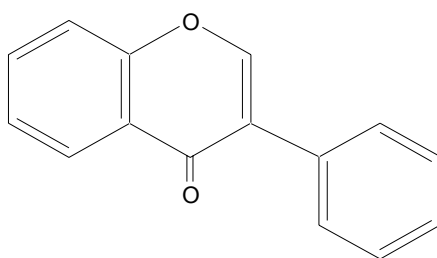
FLAVANON



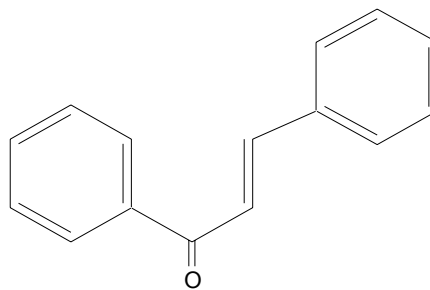
FLAVANONOL



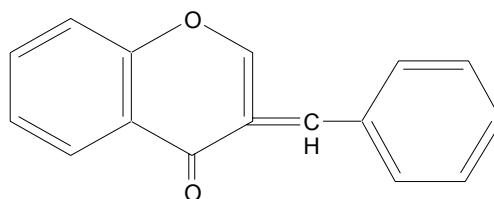
ISOFLAVON



CHALKON



AURON



Gambar 2. Kerangka tipe-tipe flavonoid (Markham, 1988)

Bentuk umum dari flavonoid dalam tumbuhan sering dijumpai dalam bentuk glikosida flavonoid, dalam senyawa tersebut flavonoid berikatan dengan gugus glikon yang merupakan senyawa gula. Pada saat ini dikenal ada 8 macam glikosida flavanol yaitu quercetin, spiracoside, rutin, isoquercetin, quercitrin, eriodictyol, eriodictin, dan hesperidin. Aglikon flavonoid adalah polifenol, sehingga dapat larut dalam basa tetapi banyak yang akan terurai karena adanya oksigen.

Glikosida larut dalam air dan alkohol tapi tidak larut dalam pelarut organik, sedangkan aglikonnya tidak larut dalam air, tetapi larut dalam pelarut organik misalnya aseton, eter, etil asetat dan lain-lain (Trease and Evans, 1978).

Flavonoid dalam bentuk glikosida dapat direaksikan dengan berbagai pereaksi warna (tabel 1, 2, 3) dan fluoresensinya di bawah sinar ultraviolet.

Pereaksi yang banyak digunakan adalah :

1. Amonia dan juga basa lain yang akan mempengaruhi gugus fenol yang bersifat asam dan memberikan warna kuning.
2. Pereaksi pembentuk kompleks misalnya $AlCl_3$ dan pereaksi sitroborat yang dapat memberikan warna kuning (Trease, 1978).

Berdasarkan polaritasnya maka flavonoid dapat diisolasi atau disari dengan air panas dan dikristalkan dengan pendinginan untuk flavonoid yang berada dalam bentuk glikosida, maka untuk memisahkan dari glikonnya dapat dilakukan dengan penambahan asam (Trease, 1978).

Tabel 1. Reaksi warna flavonoid (Venkataraman, 1962)

Golongan Flavonoid	Warna			
	Larutan NaOH	HCl pekat	Magnesium/Asam klorida	Na amalgam
Khalkon	Jingga sampai merah	Jingga sampai merah	Tak bewarna	Kuning pucat
Dihidrokhalkon	Tak bewarna	Tak bewarna atau kuning	Tak bewarna	Tak bewarna
Auron	Merah atau violet	Merah atau violet	Tak bewarna	Kuning pucat
Flavonon	Kuning atau jingga dipanaskan merah	Jingga	Merah atau violet, atau biru	Merah
Flavon	Kuning	Kuning atau jingga berpendar	Kuning atau jingga berpendar	Merah
Flavonol	Kuning atau jingga	Kuning atau jingga berpendar	Merah atau violet	Kuning atau merah
Flavononol	Kuning berubah coklat	Kuning atau merah	Merah atau violet	Kuning atau coklat
Leukoantosianin	Kuning	Merah atau violet	Violet	Violet
Antosianin/antosianidin	Biru atau violet	Kuning atau jingga	Merah lalu memuncak	Kuning atau jingga
Isoflavon	Kuning	Kuning	Kuning	Merah muda atau violet
Isoflavonon	Kuning	Kuning	Tak bewarna	Merah

Tabel 2. Penafsiran bercak dari segi struktur flavonoid (Mabry, *et. al.*, 1970)

Warna bercak flavonoid		Tipe flavonoid
Sinar UV	UV / NH ₃	
Ungu gelap	Kuning, hijau-kuning atau hijau	a. Biasanya flavon yang mempunyai 5 – OH dan 4 ¹ OH atau flavonoid tersubstitusi pada 3 – OH mempunyai 5 – OH b. Kadang-kadang 5 – OH flavonon dan 4 ¹ – 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 ¹ – OH atau tersubstitusi b. Isoflavon, dihidroflavonol dan beberapa flavonon yang mempunyai 5 – OH c. Khalkon yang mempunyai 2 ¹ – atau 6 ¹ – OH tetapi tidak mempunyai 2 – atau 4 – OH bebas
	Biru muda Merah atau jingga	Kadang-kadang 5 – OH flavonon khalkon yang mempunyai 2 – dan/atau 4 – OH bebas
Flouresensi biru muda	Flouresensi hijau-kuning atau hijau-biru	a. Flavon dan flavonon tanpa 5 – OH bebas b. Flavonol tanpa 5 – OH bebas tetapi mempunyai 3 – OH tersubstitusi Isoflavon tanpa 5 – OhH bebas
Tak nampak Kuning redup dan kuning, atau flouresensi jingga	Perubahan warna sedikit atau tanpa tanpa perubahan Flourosensi terang biru muda Flourosensi biru muda Perubahan warna atau sedikit tanpa perubahan	Isoflavon tanpa 5 – OH bebas Isoflavon tanpa 5 – OH bebas Flavonol yang mempunyai 3 – OH bebas dan mempunyai atau tidak mempunyai 4 ¹ OH bebas dan beberapa 2 – atau 4 – OH khalkon Auron yang mempunyai 4 ¹ OH bebas dan beberapa 2 – atau 4 – OH khalkon
Flouresensi kuning hijau-kuning, hijau biru	Jingga atau merah	Auron yang mempunyai 4 ¹ OH bebas dan beberapa 2 – atau 4 – OH khalkon
	Perubahan warna sedikit atau tanpa perubahan	a. Auron yang tidak mempunyai 4 ¹ OH bebas dan flavonon tanpa 5 – OH bebas b. Flavonol yang mempunyai 3 – OH bebas dan disertai atau tanpa 5 – OH bebas
Kuning pucat	Kuning terang-ungu	Dihidroflavonol yang tidak mempunyai 5 – OH

Tabel 3. Warna bercak flavonoid dengan sinar tampak dan UV_{366 nm} (Geissman, 1962)

Golongan Flavonoid	Vis	UV ₃₆₆	NH ₃	NH ₃ /UV ₃₆₆	AlCl ₃	AlCl ₃ /UV ₃₆₆	Na ₂ CO ₃	NaBH ₄	ArSO ₃ H
Flavon	Kuning lemah	Cokelat gelap, kuning merah, kuning cokelat	Kuning	Kuning terang, kuning hijau,	Kuning pucat	Flourosensi hijau, kuning, cokelat	Kuning terang	Tak berwarna	Kuning
Flavonol	Kuning lemah	Kuning terang, kuning hijau, cokelat	Kuning	Kuning terang, kuning hijau, hijau	Kuning	Flourosensi kuning, hijau	Kuning, kuning cokelat, biru	Tak berwarna	Kuning
Isoflavon	Tak berwarna	Ungu padam, kuning lemah	Tak berwarna	Ungu padam, kuning lemah	Tak berwarna	Flouresensi kuning	Hijau lemah	Tak berwarna	-
Katekin	Tak berwarna	Tak berwarna	Tak berwarna	Flouresensi biru lemah, hitam	Tak berwarna	Tak berwarna, biru lemah, kuning pucat	-	-	Cokelat
Flavonon	Tak berwarna	Tak berwarna	Tak berwarna	Tak berwarna, kuning gelap, kuning hijau	Tak berwarna	Flourosensi hijau, kuning, biru pucat	Kuning lemah, hijau	Magenta	Tak berwarna
Leukoantosianin	Tak berwarna	Tak berwarna	-	-	-	-	-	-	Merah, merah muda, ungu
Antosianin	Merah muda, orange, merah, ungu	Merah padam, ungu, merah muda, cokelat	Biru kelabu, biru	-	-	-	-	-	Tak berwarna
Auron	Kuning terang	Kuning terang, hijau kuning	Orange, orange mrah muda	Kuning orange, orange, merah, orange	Kuning lemah, orange	Flouresensi hijau kuning, hijau kuning, cokelat lemah	Orange, merah muda, ungu	Tak berwarna	Merah muda, orange
Khalkon	Cokelat, hijau, kuning cokelat	Cokelat, hijau, kuning cokelat	Kuning orange, merah orange, merah muda	Orange, merah, ungu, hitam	Kuning orange	Flouresensi orange, cokelat muda	Orange, cokelat, merah	Tak berwarna	Orange, merah muda

e. Ekstraksi Senyawa Flavonoid

Aglikon flavonoid adalah polifenol, karena itu mempunyai sifat kimia sebagai senyawa fenol, yaitu bersifat agak asam, sehingga dapat larut dalam basa. Kelarutan flavonoid dipengaruhi oleh golongan dan substituenya, sehingga untuk melakukan ekstraksi digunakan pelarut yang mempunyai polaritas sesuai dengan flavonoidnya (Markham, 1988).

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

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

f. Isolasi flavonoid

Metode paling utama dan berguna untuk mengisolasi atau memisahkan campuran flavonoid adalah kromatografi kertas. Sedangkan kromatografi lapis tipis adalah 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).

Ekstrak yang didapatkan selain mengandung flavonoid dengan tingkat kepolaran yang rendah juga mengandung bahan-bahan lain yaitu lilin dan lemak, dimana kedua bahan tersebut dapat dipisahkan dengan menggunakan kromatografi sehingga didapatkan flavonoid yang bebas dari bahan-bahan tersebut dan murni (Markham, 1988).

g. Karakterisasi dan Identifikasi Flavonoid

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

Spektrofotometri serapan ultraviolet dan serapan tampak barangkali merupakan cara tunggal yang paling berguna untuk menganalisis struktur flavonoid, cara tersebut digunakan untuk membantu mengidentifikasi jenis flavonoid dan menentukan pola oksigen (Markham, 1988).

3. Uraian Tentang Soxhletasi

Cara ekstraksi yang dapat digunakan untuk isolasi flavonoid adalah soxhletasi. Soxhletasi adalah proses pemisahan suatu senyawa secara sederhana yang bertujuan untuk menghilangkan senyawa yang mempunyai polaritas rendah, seperti klorofil, lemak dan terpen, yang dikhawatirkan dapat mengganggu proses isolasi flavonoid. Soxhlet atau ekstraksi berkesinambungan atau fraksinasi ekstrak berair dilakukan dengan metode ekstraksi cair-cair menggunakan etil asetat untuk menarik flavonoid yang sesuai dengan kepolaran dari masing-masing pelarut,

sehingga dengan ekstraksi berkesinambungan ini senyawa yang non polar dan semi polar masuk ke fraksi yang non polar atau semi polar, seperti petroleum eter, etil asetat, alkohol, sedangkan yang polar masuk ke fraksi polar, seperti air.

Cara kerja dari soxhletasi adalah cairan penyari diisikan pada labu, serbuk simplisia diisikan pada tabung dari kertas saring atau tabung yang berlubang-lubang dari gelas baja tahan karat atau bahan lain yang cocok. Cairan penyari dipanaskan ke atas melalui pipa samping, kemudian diembunkan kembali oleh pendingin tegak. Karena adanya sifon maka setelah cairan mencapai permukaan sifon, seluruh cairan akan kembali ke labu (Anonim, 1986).

Keuntungan menggunakan soxhletasi:

1. Cairan penyari yang diperlukan lebih sedikit dan secara langsung diperoleh hasil yang lebih pekat.
2. Serbuk simplisia disari oleh cairan penyari yang murni, sehingga dapat menyari zat aktif lebih banyak
3. Penyari dapat diteruskan sesuai dengan keperluan tanpa menambah volume cairan penyari (Anonim, 1986).

Kerugian menggunakan soxhletasi:

1. Larutan dipanaskan terus-menerus, sehingga zat aktif yang tidak tahan pemanasan kurang cocok hal ini dapat diatasi dengan menambahkan peralatan untuk mengurangi tekanan udara.
2. Cairan penyari dididihkan terus-menerus, sehingga cairan penyari yang baik harus murni atau campuran azeotrop (Anonim, 1986).

4. Uraian Tentang Maserasi

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 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 membutuhkan waktu yang lama dan penyariannya kurang sempurna (Anonim, 1986).

Maserasi pada umumnya dilakukan dengan cara, 10 bagian simplisia dengan derajat halus yang cocok dimasukkan ke dalam bejana, kemudian dituangi dengan 75 bagian cairan penyari, ditutup, dan dibiarkan 5 hari terlindung dari cahaya, sambil berulang-ulang diaduk. Setelah 5 hari diserkai, ampas diperas. Ampas ditambah cairan penyari secukupnya diaduk dan diserkai sehingga diperoleh seluruh sari sebanyak 100 bagian. Bejana ditutup dibiarkan di tempat sejuk, terlindung dari cahaya, selama 2 hari kemudian endapan dipisahkan (Anonim, 1986).

5. Uraian Tentang Kromatografi Lapis Tipis (KLT)

Kromatografi Lapis Tipis (KLT) digunakan untuk pemisahan senyawa secara cepat dengan menggunakan penyerap sebagai fase diam yang berupa serbuk halus yang dilapiskan secara merata pada lempeng kaca (Anonim 1979).

Campuran yang akan dipisahkan berupa larutan, ditotolkan berupa bercak atau pita (awal). Setelah plat atau lapisan ditaruh di dalam bejana tertutup rapat yang berisi larutan pengembang yang cocok (fase gerak), pemisahan terjadi selama perambatan kapiler (pengembangan). Selanjutnya senyawa yang tidak berwarna harus ditampakkan atau dideteksi, dan bercak-bercak yang terjadi selanjutnya dilakukan uji warna (Stahl, 1985).

Keuntungan dari penggunaan metode kromatografi lapis tipis dalam analisis obat adalah:

- a) Peralatan ataupun bahan yang digunakan relatif lebih ekonomis.
- b) Waktu yang diperlukan dalam pemisahan senyawa obat relatif lebih cepat apabila dibandingkan dengan kromatografi kertas.
- c) Jumlah cuplikan yang digunakan relatif sedikit (Sastrohamidjojo, 1985)

Adapun faktor-faktor yang mempengaruhi gerakan noda dalam kromatografi lapis tipis yang juga mempengaruhi harga Rf antara lain:

- a) Struktur kimia dari senyawa yang sedang dipisahkan.
- b) Sifat dari penyerap dan derajat aktivitasnya.
- c) Tebal dan kerataan dari lapisan penyerap.
- d) Pelarut (dan derajat kemurniannya) fase bergerak.
- e) Derajat kejenuhan dari uap dalam bejana pengembangan yang digunakan.

- f) Teknik percobaan.
- g) Jumlah cuplikan yang digunakan.

Penetesan cuplikan didalam jumlah yang berlebihan memberikan tendensi penyebaran noda-noda dengan kemungkinan terbentuknya ekor dan efek tak keseimbangan lainnya hingga akan mengakibatkan kesalahan-kesalahan pada penentuan harga Rf.

- h) Suhu.

Proses pemisahan sebaiknya dilakukan pada suhu yang konstan untuk mencegah terjadinya perubahan komposisi pelarut.

- i) Kesetimbangan.

(Sastrohamidjojo, 1991)

Keberhasilan dari pemisahan kromatografi tergantung juga pada proses deteksi. Senyawa-senyawa yang berwarna tentu saja terlihat sebagai noda-noda berwarna yang terpisah pada akhir pengembangan. Senyawa-senyawa yang tak berwarna memerlukan deteksi secara kimia dan fisika. Cara yang digunakan untuk mendeteksi noda yaitu dengan penyemprotan yang dilakukan perlahan-lahan dari samping ke samping dan dari atas ke bawah. Pelarut yang digunakan untuk penyemprotan harus tidak menguap. Dilain pihak, penguapan yang cepat dari kertas diperlukan untuk mencegah difusi dari noda-noda yang terpisah. Pelarut-pelarut yang digunakan adalah etanol, propanol, n-butanol, atau kloroform. Campuran berair dapat digunakan, tetapi terlalu banyak air harus dicegah, karena harus dilakukan dalam lemari asam dan selesai penyemprotan alat harus

dibersihkan untuk mencegah lubang penyemprotan menjadi buntu (Sastrohamidjojo, 1991).

Dalam mengidentifikasi bercak/noda dalam kertas sangat lazim menggunakan harga Rf atau derajat retensi :

$$R_f = \frac{\text{Jarak yang ditempuh senyawa terlarut}}{\text{Jarak yang ditempuh pelarut}}$$

6. Uraian Tentang Spektroskopi Ultraviolet Dan Visible/Tampak

a. Tinjauan Umum

Spektroskopi merupakan studi mengenai interaksi antar energi cahaya dan materi. Warna-warna yang nampak adalah akibat absorpsi energi oleh senyawa organik maupun anorganik (Fessenden dan Fessenden, 1999).

Berikut adalah dasar spektrofotometri ultraviolet dan tampak antara lain :

- 1) Serapan oleh senyawa
- 2) Analisis kuantitatif dengan serapan radiasi elektromagnetik
- 3) Hukum-hukum kuantitatif
- 4) Sistem lebih dari satu komponen
- 5) Orbital-orbital yang terlihat dalam transisi elektronik
- 6) Klasifikasi transisi serapan elektronik
- 7) Pengaruh konjugasi

Untuk melukiskan bagaimana radiasi elektromagnetik berinteraksi dengan benda, maka berkas sinar dianggap sebagai foton dan besar tenaga foton berbanding langsung dengan frekuensi radiasi yang dinyatakan dalam persamaan:

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

E = tenaga foton dalam erg, ν = frekuensi radiasi elektromagnetik dalam hertz, dan h = tetapan planck $6,624 \times 10^{-34}$ 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).

Analisis kuantitatif dengan metode spektrofotometri ultraviolet dapat digolongkan menjadi 3 macam pelaksanaan pekerjaan, yaitu analisis kuantitatif campuran dua macam zat yang dianalisis serta analisis multikomponen (yang di analisis tiga atau lebih) (Mulja dan Suharman, 1995).

Dalam spektrofotometri dikenal istilah-istilah yang sering digunakan:

- 1) Kromofor: gugus tak jenuh kovalen yang dapat menyerap radiasi dalam daerah-daerah ultraviolet dan tampak.
- 2) Auksokrom: gugus jenuh yang bila diikat pada kromofor mengubah panjang gelombang dan intensitas serapan maksimum. Ciri auksokrom adalah heteroatom yang langsung terikat pada kromofor, misalnya: $-\text{OCH}_3$, $-\text{Cl}$, $-\text{OH}$, dan NH_2 .
- 3) Pergeseran batokromik: pergeseran serapan kearah panjang gelombang yang lebih panjang disebabkan sustitusi atau pengaruh pelarut (pergeseran merah).
- 4) Pergeseran hipsokromik: pergeseran serapan kearah panjang gelombang yang lebih pendek disebabkan substitusi atau pengaruh pelarut (pergeseran biru).

- 5) Efek hiperkromik: kenaikan dalam intensitas serapan.
- 6) Efek hipokromik: penurunan dalam intensitas serapan (Sastrohamidjojo, 2001).

b. Spektroskopi Ultraviolet Untuk Flavonoid

Cara tunggal yang paling berguna untuk menganalisis struktur flavonoid adalah dengan spektroskopi serapan ultraviolet dan serapan tampak/visible. Cara tersebut digunakan untuk membantu mengidentifikasi jenis flavonoid dan menentukan pola oksigenasi. Disamping itu kedudukan gugus hidroksil fenol bebas pada inti flavonoid dapat ditentukan dengan menambahkan pereaksi (pereaksi geser) ke dalam larutan cuplikan dan mengamati pergeseran puncak serapan yang terjadi. Dengan demikian, secara tidak langsung cara ini berguna untuk menentukan kedudukan gula atau metal yang terikat pada salah satu gugus hidroksil fenol.

Keuntungan utama dari spektroskopi ultraviolet adalah sangat sedikitnya flavonoid yang diperlukan untuk analisis (biasanya sekitar 0,1 ml).

Tabel 4. Rentangan serapan spektro 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 kira-kira 320 puncak	Isoflavon Isoflavon (5-deoksi-6,7- dioksigenesi)
275-295	300-330 bahu	Flavonon dan dihidroflavonol
230-270 (kekuatan rendah)	340-390	Khalkon
230-270 (kekuatan rendah)	380-430	Auron
270-280	465-560	Antosianidin dan antosianin

c. Perekasi Geser

1) Flavon dan Flavonol

a) 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. Sedangkan substitusi gugus hidroksi pada posisi 3,5,4' mempunyai sedikit efek atau tidak sama sekali pada spektra ultraviolet (Mabry, *et. al*, 1970).

b) Efek metilasi dan glikosilasi

Metilasi dan glikosilasi pada serapan dari flavon dan flavonol. Jika gugus 3,5 atau 4'-OH pada flavon dan flavonol termetilasi atau terlikosilasi 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).

c) Efek Natrium metoksida

Natrium metoksida pada flavon dan flavonol dalam metanol pada umumnya menghasilkan pergeseran batokromik pada semua pita serapan. Walaupun demikian pergeseran batokromik yang besar pada serapan pita I sekitar 40 – 65 nm tanpa penurunan intensitas, menunjukkan adanya gugus 4'-OH bebas, dan flavonol yang tidak mempunyai gugus 4'-OH bebas juga memberikan pergeseran batokromik disebabkan adanya gugus 3-OH. Jika suatu flavonol mempunyai 3 dan 4'-OH bebas, maka spektranya dengan Na metoksida akan mengalami dekomposisi. Pereaksi pengganti Natrium metoksida yang cocok adalah larutan NaOH 2M dalam air (Mabry, *et. al*, 1970).

d) 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. Natrium asetat hanya dapat mengionisasi khusus pada gugus 7-OH. Adanya natrium asetat dan asam borat akan membentuk kompleks dengan gugus ortohidroksi pada semua posisi kecuali atom C₅ dan C₆ flavon dan

flavonol yang mempunyai gugus ortohidroksi pada cincin B menunjukkan pergeseran batokromik pada serapan I sebesar 12 – 30 nm. Gugus ortohidroksi pada cincin A juga dideteksi dengan efek natrium asetat dan asam borat. Adanya pergeseran batokromik sebesar 5 – 10 nm pada pita I menunjukkan adanya gugus ortohidroksi pada C₆ dan C₇ atau C₇ dan C₈ (Mabry, *et. al*, 1970).

e) Efek AlCl₃

Pembentukan kompleks tahan asam antara gugus hidroksi dan keton yang bertenaga dan membentuk kompleks tahan asam dengan gugus orto, pereaksi ini dapat digunakan untuk mendeteksi kedua gugus tersebut (Markham, 1988). Gugus OH pada C₃ dan C₅ pada flavon dan flavonol akan membentuk kompleks yang stabil dengan adanya AlCl₃, sebaliknya kompleks antara AlCl₃ dengan gugus ortohidroksi bersifat lebih stabil sehingga dengan penambahan asam akan terdekomposisi, sedangkan kompleks antara AlCl₃ dengan C – keto dan 3/5 – OH tetap stabil dengan adanya asam. Adanya gugus ortohidroksi pada cincin B dapat diketahui jika pada penambahan asam terhadap spektra kompleks AlCl₃ menghasilkan pergeseran hipsokromik sebesar 30 – 40 nm pada pita I (atau pita Ia jika pita I terdiri dari 2 puncak). Dengan adanya pergeseran batokromik pada pita Ia (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).

2) Isoflavon, flavonon, dan dihidroflavonol

Spektra ultraviolet isoflavon, flavonon dan dihidroflavonol dalam metanol memberikan bentuk yang mirip antara satu dengan yang lainnya. Senyawa golongan ini sedikit atau tidak mengalami konjugasi antara cincin A dan B. Spektra mereka sangat berbeda dengan flavon dan flavonol, pita serapan I mempunyai intensitas yang lemah/bahu, sedangkan pita II intensitasnya kuat. Pita serapan II dari isoflavon biasanya antara 245 – 270 nm dan relatif tidak mempunyai efek pada cincin B dengan adanya hidroksilasi, sementara pita serapan II dari flavonon dan dihidroflavonol antara 270 – 295 nm (Mabry, *et. al*, 1970).

a) Natrium metoksida

Penambahan natrium metoksida pada isoflavon yang mempunyai gugus OH pada cincin A menyebabkan pergeseran batokromik baik pada pita I maupun pita II. Puncak pada spektra ultraviolet senyawa 3',4'-dihidroksi isoflavon dapat digunakan untuk menentukan bahwa yang berjalan cepat menunjukkan adanya 3',4'-dihidroksi isoflavon (Mabry, *et. al*, 1970).

b) Natrium asetat

Natrium asetat hanya dapat mengionisasi isoflavon khususnya pada gugus 7 – OH, sedangkan gugus 3' atau 4' – OH pada isoflavon tidak dapat terionisasi, berbeda dengan kebanyakan flavon dan flavonon. Oleh sebab itu interpretasi terhadap pergeseran spektra isoflavon untuk penambahan Na asetat menjadi sederhana. Adanya 7 – OH isoflavon menyebabkan

pergeseran batokromik 6 – 20 nm pada pita II setelah penambahan Na asetat (Mabry, *et. al*, 1970).

c) Natrium asetat / asam borat

Gugus ortohidroksi pada cincin B tak dapat dideteksi dengan NaOAc / H₃BO₃ pada spektra UV isoflavon, flavonon, dihidroflavonol karena kurang efektifnya konjugasi dengan kromofor utama. Meskipun demikian ada fakta yang menunjukkan bahwa 6,7 dihidroksi pada cincin A isoflavon dan flavonon (mungkin juga dihidroflavonol) dapat dideteksi dengan adanya pergeseran batokromik 10 – 15 nm pada pita I setelah penambahan NaOAc / H₃BO₃ (Mabry, *et. al*, 1970).

d) AlCl₃ dan AlCl₃/HCl

Adanya gugus 3',4'-dihidroksi pada isoflavon, flavonon atau dihidroflavonol tidak dapat dideteksi dengan AlCl₃ karena cincin B mempunyai sedikit atau tidak ada konjugasi dengan kromofor utama. Jika isoflavon, flavonon (dan mungkin dihidroflavonol) mengandung gugus ortohidroksi pada posisi 6,7 / 7,8 maka spektra AlCl₃ menunjukkan pergeseran batokromik (biasanya pada pita I maupun pita II) dengan membandingkan terhadap spektra AlCl₃ / HCl. Pita serapan II spektra ultraviolet dari semua 5-OH isoflavon, flavonon, dan dihidroflavonol dapat dideteksi dengan penambahan AlCl₃ / HCl kecuali 2-karboksi; 5,7-dihidroksi isoflavon. Adanya gugus tersebut ditandai dengan pergeseran batokromik pada pita II 10 – 14 nm (relative terhadap metanol). Spektra isoflavon, flavonon, dan dihidroflavonol yang tidak mempunyai gugus 5-

OH bebas tidak berefek setelah penambahan AlCl_3/HCl (Mabry, *et. al*, 1970).

Tabel 5. Penafsiran Spektrum NaOMe (Markham, 1988)

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

K = kira-kira

Tabel 6. Penafsiran Spektrum NaOAc (Markham, 1988)

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

Tabel 7. Penafsiran Spektrum NaOAc/H₃BO₃ (Markham, 1988)

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

Tabel 8. Penafsiran Spektrum AlCl₃ dan AlCl₃/HCl (Markham, 1988)

Jenis Flavonoid (pereaksi)	Pergeseran yang tampak		Petunjuk Penafsiran
	Pita I	Pita II	
Flavon dan Flavonol (AlCl ₃ /HCl)	+35 sampai 55nm		5-OH
	+17 sampai 20 nm		5-OH dengan oksigenasi pada 6
	Tak berubah		Mungkin 5-OH dengan gugus prenil pada 6
AlCl ₃	+50 sampai 60		Mungkin 3-OH (dengan atau tanpa 5-OH)
	Pergeseran AlCl ₃ /HCl tambah 20 sampai 40 nm		<i>o</i> -diOH pada cincin B
	Pergeseran AlCl ₃ /HCl tambah 20 sampai 25 nm		<i>o</i> -diOH pada cincin A (tambahan pada pergeseran <i>o</i> -diOH pada cincin B)
Isoflavon Flavonon, dan Dihidroflavonol (AlCl ₃ /HCl)		+10 sampai 14 nm	5-OH (isoflavon)
		+20 sampai 26 nm	5-OH (flavonon, dihidroflavonol)
	(AlCl ₃)	Pergeseran AlCl ₃ / HCl, tambah 11 sampai 30 nm	<i>o</i> -diOH pada cincin A (6,7 dan 7,8)
		Pergeseran AlCl ₃ / HCl, tambah 30 sampai 38 nm (peka terhadap NaOAc)	Dihidroflavonol tanpa 5-OH (tambahan pada sembarang pergeseran <i>o</i> -diOH)
Auron Khalkon (AlCl ₃ /HCl)	+48 sampai 64 nm		2'-OH (Khalkon)
	+40 nm		2'-OH (Khalkon) dengan oksigenasi pada 3'
	(AlCl ₃)	+60 sampai 70 nm	4-OH (Auron)
	Pergeseran AlCl ₃ /HCl tambah 40 sampai 70 nm		<i>o</i> -diOH pada cincin B
	Penambahan lebih kecil		Mungkin <i>o</i> -diOH pada cincin A
Antosianidin			
Antosianin (AlCl ₃)	+25 sampai 35 nm (pada pH 2 – 4)		<i>o</i> -diOH
	Pergeseran lebih besar		Banyak <i>o</i> -diOH atau <i>o</i> -diOH (3-deoksi antosianidin)

E. Hipotesis

Flavonoid yang terkandung dalam daun Makuto dewo (*Phaleria macrocarpa* [Scheff] Boerl.) dapat diisolasi secara kromatografi lapis tipis (KLT) dan diidentifikasi struktur parsialnya berdasarkan data kromatogram, uji warna disertai analisis spektrofotometri ultraviolet.