

# Isolasi dan Karakterisasi Flavonoid dari daun sambang darah (*Excoecaria cochinchinensis* L)

Siska Oktariza<sup>1</sup>, Yustini Ma'aruf<sup>2</sup>, Sri Benti Etika<sup>3</sup>

<sup>#</sup>Jurusan Kimia, Universitas Negeri Padang

Jln. Prof. Dr. Hamka Air Tawar Padang - Sumatera Barat - Indonesia

<sup>1</sup>iecha\_oktariza@yahoo.co.id, <sup>2</sup>yustini@fmipa.unp.ac.id, <sup>3</sup>bentietika@yahoo.com

**Abstract** — Flavonoids are greatest a group of phenolic compounds found in nature. One of the plants that contain flavonoids and used as medicine are the leaves sambang darah (*excoecaria cochichinensis* L). This study aims to isolate and characterize flavonoids from leaves sambang darah (*excoecaria cochichinensis* L). The method used is maceration using solvents methanol and fractionation with n-hexane and ethyl acetate. Separation was performed by column chromatography with silica gel 60 adsorbent and eluent ethyl acetate: methanol in SGP (Step Gradient Polarity) and recrystallization purification done. From the results obtained by the isolation of flavonoids in the form of brownish yellow solid, it has not obtained pure of flavonoids.

**Keywords** — flavonoid, sambang darah, chromatography

## I. PENDAHULUAN

Indonesia sangat kaya dengan keanekaragaman hayati dengan berbagai potensi yang umumnya belum banyak diketahui, yang tersebar di daratan dan lautan, seperti: hutan, sungai, dan laut. Kekayaan akan keragaman hayati ini sekaligus merupakan sumber senyawa kimia tergolong metabolit sekunder yang hampir tak terbatas jumlahnya<sup>[1]</sup>.

Penggunaan tumbuhan sebagai obat berkaitan dengan kandungan kimianya terutama zat bioaktif. Senyawa bioaktif dapat ditemukan pada bunga, daun, akar, dan batang. Senyawa bioaktif yang terdapat dalam tumbuhan merupakan senyawa metabolit sekunder seperti golongan alkaloid, flavonoid, steroid, terpenoid, dan saponin<sup>[2]</sup>.

Flavonoid adalah salah satu senyawa kimia yang berasal dari tumbuhan yang merupakan kelompok metabolit sekunder. Flavonoid tersebar luas pada tumbuhan angiospermae, gymnospermae, dan pteridopita. Flavonoid ini memberikan efek fisiologis dan farmakologis terhadap makhluk hidup. Pada tumbuhan, flavonoid berfungsi sebagai zat warna, pengatur tumbuh, penangkal serangan penyakit dan sebagai penanda (markers) dalam mengklasifikasi tumbuhan<sup>[3]</sup>.

Salah satu dari tumbuhan yang berkhasiat obat adalah daun sambang darah (*Excoecaria cochinchinensis* L). Daun sambang darah ini berkhasiat menghilangkan gatal-gatal (anti pruritik), penghenti perdarahan (hemostatis), mengobati disentri dan muntah darah. Di Kelurahan Lapai Kecamatan Nanggalo Kota Padang, daun sambang darah ini biasa digunakan sebagai obat penghilang rasa gatal, mengobati

disentri dan muntah darah.

Daun sambang darah ini biasanya ditanam di pekarangan sebagai pagar hidup atau tanaman obat, di taman-taman sebagai tanaman hias, atau tumbuh liar di hutan dan di ladang, pada tempat yang terbuka atau sedikit terlindung<sup>[1]</sup>.

Berdasarkan penelusuran pustaka, laporan tentang kandungan senyawa kimia dari daun sambang darah belum ditemukan. Hasil uji pendahuluan yang telah dilakukan terhadap kandungan kimia daun sambang darah menunjukkan bahwa positif mengandung flavonoid dan saponin.

## II. METODA PENELITIAN

### A. Alat dan Bahan

Alat: satu set alat destilasi, satu set *rotaryevaporator*, corong pisah, peralatan gelas, pemanas, kertas saring, lumpang, kertas kromatografi, pipa kapiler, chamber (bejana kromatografi), neraca, lampu UV, spektrofotometer inframerah perkin Elmer 735 B, *gallenkamp melting point apparatus*, dan spektrofotometer UV-Vis.

Bahan: metanol destilasi, asam klorida pekat, aquades, serbuk magnesium, etil asetat, *n*-heksana destilasi, amoniak pekat, larutan aluminium klorida, natrium hidroksida, asam sulfat pekat, silika gel, natrium asetat, natrium metoksida, asam borat, kapas dan kertas whatman 3 MM.

### B. Cara Kerja

#### 1. Pengolahan Sampel

Sampel berupa Daun Sambang Darah (*Excoecaria cochinchinensis* L), segar sebanyak 2,5 kg, dibersihkan dan dirajang halus.

#### 2. Pembuatan Pereaksi

##### a. Larutan Aluminium Klorida ( $AlCl_3$ 5%)

Ditimbang 5 gram  $AlCl_3$ , dimasukkan kedalam gelas piala 100 ml. Dilarutkan dengan sedikit metanol, dipindahkan

Corresponding Author :

Yustini Ma'aruf, Department of Chemistry, Faculty of Mathematics and Natural Sciences, Padang State University, Padang, West Sumatera, Indonesia.



yustini@fmipa.unp.ac.id

kedalam labu ukur 100 ml, ditambahkan metanol sampai tanda batas, dan dihomogenkan.

*b. Larutan Hidrogen Klorida (HCl 6M)*

Diambil HCl p.a sebanyak 50 ml, dimasukkan kedalam gelas piala. Kemudian dilarutkan dengan sedikit aquades, dan dipindahkan kedalam labu ukur 100 ml, tambahkan aquades sampai tanda batas, lalu dihomogenkan.

*c. Larutan Natrium Hidroksida (NaOH 2 M)*

Ditimbang 8 gram kristal NaOH, dimasukkan kedalam gelas piala, dilarutkan dengan sedikit aquades, kemudian diaduk sampai kristal larut. Lalu dimasukkan kedalam labu ukur, ditambahkan aquades sampai tanda batas, kemudian dihomogenkan.

*d. Larutan BAA (Butanol : Asam asetat : Air)*

Dicampurkan butanol, asam asetat, dan air dengan perbandingan 4:1:5 dalam corong pisah, aduk hingga homogen lalu didiamkan selama satu malam. Pisahkan fase atas dengan fase bawah, diambil fase atas (larutan BAA) sedangkan fase bawah tidak digunakan.

*e. Larutan Asam Asetat 15% (v/v)*

Diambil 15 ml asam asetat, dimasukkan kedalam gelas piala, diencerkan dengan sedikit aquades, lalu dimasukkan kedalam labu ukur 100 ml, ditambahkan aquades sampai tanda batas, kemudian dihomogenkan.

*3. Uji Pendahuluan Kandungan Kimia*

Sebelum melakukan isolasi terhadap suatu senyawa kimia yang diinginkan dalam suatu tumbuhan, maka perlu dilakukan identifikasi pendahuluan kandungan senyawa metabolit sekunder yang ada pada masing-masing tumbuhan, sehingga dapat diketahui kandungan senyawa yang ada secara kualitatif dan mungkin juga secara kuantitatif golongan senyawa yang dikandung oleh tumbuhan tersebut. Untuk tujuan tersebut, maka diperlukan metoda persiapan sampel dan metoda identifikasi pendahuluan dari senyawa metabolit sekunder sebagai berikut<sup>[4]</sup>.

*a. Identifikasi Alkaloid: Metode Culvenor-Fitzgerald*

Kira-kira 5 gram sampel segar dirajang dan digerus halus dalam lumpang dengan bantuan pasir halus, lalu ditambahkan kloroform sedikit, digerus lagi sampai membentuk pasta. Tambahkan 10 ml amoniak-kloroform 0,05 N dan digerus lagi. Saring campuran kedalam sebuah tabung reaksi yang kering. Tambahkan 5 ml larutan asam sulfat 2 N dan kocok kuat, diamkan larutan sampai membentuk dua lapisan. Dengan menggunakan pipet yang telah diberi kapas pada ujungnya untuk menyaring, ambil lapisan asam sulfat dan masukkan kedalam tabung reaksi kecil (lapisan kloroform disimpan untuk menguji terpenoid). Filtrat diuji dengan pereaksi Mayer, Wagner dan Dragendorf, terbentuknya endapan putih atau keruh dengan pereaksi Mayer, endapan coklat dengan pereaksi Wagner, atau endapan orange dengan pereaksi Dragendorf menunjukkan sampel mengandung alkaloid.

*b. Identifikasi Flavonoid: Shinoda tes/Sianidin tes*

Kira-kira 0,5 gram sampel yang telah dirajang halus diekstrak dengan metanol dan dipanaskan selama 5 menit

dalam tabung reaksi. Ekstraknya ditambahkan beberapa tetes asam klorida pekat dan sedikit serbuk magnesium. Bila terjadi perubahan warna menjadi merah/pink atau kuning menunjukkan sampel mengandung flavonoid.

*c. Identifikasi Steroid dan Terpenoid: Metode Liberman-Burchard*

Beberapa tetes lapisan kloroform pada uji alkaloid ditempatkan pada plat tetes, tambahkan 5 tetes anhidrida asetat dan biarkan mengering. Kemudian tambahkan 3 tetes asam sulfat pekat. Jika timbul warna merah jingga menandakan uji positif terhadap terpenoid, sedangkan warna biru menunjukkan uji positif terhadap steroid.

*d. Identifikasi Saponin: Uji Busa*

Untuk mengidentifikasi saponin ini sebaiknya digunakan sampel yang telah kering, karena tes yang digunakan tes pembentukan busa. Bila sampel segar/basah dididihkan dengan air suling kemungkinan cairan sel membentuk busa bila dikocok.

Caranya: sampel kering dirajang halus, dimasukkan kedalam tabung reaksi dan ditambahkan air suling, dididihkan selama 2-3 menit, dinginkan, kemudian setelah dingin dikocok kuat-kuat, adanya busa yang stabil selama 5 menit berarti sampel mengandung saponin.

*4. Isolasi Flavonoid*

*a. Ekstraksi*

Sampel segar yang telah dibersihkan sebanyak 2,5 kg dirajang halus, dimaserasi dengan metanol sebanyak 5 liter selama 6 hari (dalam 1x proses maserasi) dengan diaduk sekali-sekali. Maserasi dilakukan sebanyak tiga kali sampai ampas menunjukkan hasil negatif terhadap uji shinoda tes. Selanjutnya di saring dan diuapkan pelarut dengan rotary evaporator sehingga diperoleh ekstrak kental methanol berwarna merah kehitaman sebanyak 240 gram. Ekstrak kental tersebut ditambahkan air panas dengan suhu 50°C sebanyak 100 mL, kemudian disaring sehingga di dapatkan ekstrak berair sebanyak 200 mL.

*b. Fraksinasi*

Dengan menggunakan corong pisah 1000 mL, ekstrak berair difraksinasi dengan n-heksan sebanyak (10x100 mL). Sehingga diperoleh fraksi berair (Mg-HCl (+)) dan fraksi n-heksan (Mg-HCl (-)). Fraksi berair yang mengandung flavonoid difraksinasi dengan etil asetat sebanyak (10x100 mL) sampai lapisan etil asetat memberikan tes negatif dengan shinoda tes. Satukan fraksi etil asetat (Mg-HCl (+)). Kemudian pelarutnya diuapkan dengan rotary evaporator, sampai diperoleh flavonoid kental EtOAc (flavonoid kasar) sebanyak 24,1998 gram.

*c. Pemisahan dan pemurnian Fraksi etil asetat*

Fraksi etil asetat dimonitor dengan kromatografi lapis tipis (KLT) dengan eluen etil asetat:metanol (10:0, 9:1, 8:2, 7:3, 6:4, 5:5, 4:6, 3:7, 2:8, 1:9). Dari perbandingan eluen tersebut diperoleh hasil pemisahan noda yang baik pada perbandingan eluen (10:0, 9:1, 8:2, 7:3, 6:4, 5:5, 4:6, dan 3:7). Proses pemisahan komponen selanjutnya dilakukan dengan kromatografi kolom dan sebagai adsorben digunakan silika

gel (70-230 mesh) dan eluen etil asetat:metanol sesuai dengan perbandingan eluen yang cocok pada kromatografi lapis tipis. Sebelum digunakan, kolom terlebih dahulu dibersihkan, dibilas dengan metanol dan dikeringkan. Kolom yang telah bersih dan kering dijepit dengan klem dengan posisi vertikal. Kemudian diberi glass wol pada dasar kolom, dimana glass wol harus terendam dengan *n*-heksana yang tingginya kira-kira 10 cm. Selanjutnya silika gel dibuat slurry dengan *n*-heksana, dengan hati-hati dimasukkan ke dalam kolom sehingga tidak terdapat gelembung udara dalam kolom. Kemasan dibiarkan turun dan pelarut yang berlebihan dikeluarkan melalui kran dan dibiarkan semalam. Selanjutnya ekstrak pekat etil asetat sebanyak 5,5 gram dimasukkan ke dalam kolom diatas kemasan silika dan dielusi dengan eluen. Adapun perbandingan dan volume eluen yang di gunakan dapat dilihat pada tabel 1.

TABEL I  
PERBANDINGAN ELUEN YANG DIGUNAKAN PADA KROMATOGRAFI KOLOM

No	Eluen (etil asetat : metanol)	Volume (mL)
1	10:0	100
2	9:1	100
3	8:2	150
4	7:3	200
5	6:4	200
6	5:5	200
7	4:6	100
8	3:7	100
9	2:8	100
10	1:9	100
11	0:10	100

Eluat ditampung dengan vial-vial kecil yang telah diberi nomor. Masing-masing vial dimonitor dengan KLT, eluat yang memiliki  $R_f$  sama digabung dalam satu vial. Kemudian dibiarkan menguap pelarutnya sampai terbentuk kristal. Sehingga diperoleh 6 fraksi, dimana 2 fraksi mengandung flavonoid yaitu : fraksi C (10 -15) dan fraksi D (16 – 20). Dibiarkan mengering, fraksi C membentuk padatan berwarna kuning kecoklatan.

Padatan yang terbentuk pada fraksi C dicuci dengan menggunakan pelarut *n*-heksana, *n*-heksana:etil asetat, dan etil asetat dengan cara kristal ditambah *n*-heksana untuk membuang pengotor yang berupa senyawa non polar. Terlihat bahwa tidak ada pengotor non polar pada padatan amorf karena warna *n*-heksana tetap seperti semula walaupun sudah dibantu dengan pemanasan. Selanjutnya proses pemurnian hanya dilakukan pencucian dengan etil asetat karena diduga pengotor ikut terlarut bersama zat padat didalam etil asetat. Pencucian dengan menggunakan pelarut etil asetat dilakukan sampai lima kali pengulangan, sehingga diperoleh zat padat berwarna kuning kecoklatan hasil rekristalisasi sebanyak 0,35 gram.

##### 5. Uji Kemurnian

##### a. Kromatografi Lapis Tipis (KLT)

Untuk uji kemurnian senyawa hasil isolasi digunakan kromatografi lapis tipis. KLT dilakukan dengan menotolkan larutan hasil isolasi dengan menggunakan pipa kapiler pada plat KLT dengan jarak 1-2 cm dari batas bawah plat. Setelah kering, plat dimasukkan kedalam bejana tertutup yang telah dijenuhkan lebih dahulu dengan uap eluen. Kemudian dielusi sampai naik kira-kira 0,5-1 cm dari batas atas plat<sup>[5]</sup>. Lalu plat dikeringkan pada suhu kamar. Noda pada kromatogram dapat diamati langsung atau dengan menggunakan lampu UV pada panjang gelombang 245-366 nm, atau pereaksi semprot penimbul warna yaitu uap  $NH_3$  (untuk noda yang tidak tampak). Senyawa yang murni akan terlihat jika yang dihasilkan sudah tunggal, sedangkan noda yang tidak tunggal menunjukkan senyawa yang diisolasi belum murni<sup>[6]</sup>.

##### b. Penentuan Titik Leleh

Titik leleh ditentukan dengan alat *gallenkamp melting point apparatus*. Zat padat yang akan diuji kemurniannya dimasukkan kedalam pipa kapiler yang tertutup salah satu ujungnya setinggi kira-kira 1 mm, selanjutnya dimasukkan kedalam *gallenkamp melting point apparatus* naikan suhu 5°C per menit. Pengamatan dilakukan saat zat padat tersebut mulai meleleh seluruhnya. Diperoleh titik leleh 195 – 197,5 °C dengan range titik leleh 2,5 °C. Suatu zat dikatakan murni apabila range titik lelehnya kecil dari 2°C.

##### 6. Karakterisasi Senyawa Hasil Isolasi

Karakterisasi yang dilakukan meliputi pemeriksaan kimia dengan pereaksi warna, kromatografi kertas dua arah dengan eluen pertama butanol:asam asetat:air (BAA) (4:1:5) dan eluen kedua asam asetat 15%, penentuan titik leleh, serta data spektrum direkam dengan spektrofotometer ultraviolet dan inframerah.

##### a. Reaksi warna

Senyawa hasil isolasi dikerjakan dengan pereaksi warna yaitu: larutan NaOH 10%,  $H_2SO_4$  pekat, dan Mg-HCl. Sedikit zat padat yang diperoleh dilarutkan dalam metanol, larutan dibagi tiga bagian. Bagian pertama ditambahkan sedikit NaOH 10% timbul warna orange, bagian kedua ditambahkan  $H_2SO_4$  pekat timbul warna kuning, dan bagian ketiga ditambahkan pereaksi Mg-HCl timbul warna merah.

##### b. Kromatogram Kertas Dua Arah (KKt-2A)

Pada kromatografi kertas dua arah (KKt-2A) digunakan kertas Whatman 3 MM (46x47cm). Sampel ditotolkan dengan menggunakan pipa kapiler pada kertas disuatu titik kira-kira 8 cm dari tepi kertas dan 3 cm dari lipatan. Kertas kromatografi dimasukkan kedalam bejana yang telah berisi pengembang BAA (4:1:5). Dielusi sampai pengembang bergerak keatas dengan lama pengembangan 4 jam. Setelah larutan pengembang sampai pada garis batas, kertas diangkat dari bejana kromatografi dan dikeringkan dalam lemari asam. Noda yang diperoleh dideteksi dengan menggunakan lampu UV 366 nm. Kemudian posisi kertas diputar 90° dari posisi awal dan dicelupkan ke bejana lain yang berisi larutan pengembang asam asetat 15%. Dielusi sampai pengembang bergerak sampai batas yang telah ditentukan, dengan lama

pengembangan 2 jam, lalu kertas diangkat dan dikeringkan. Noda yang diperoleh dideteksi dengan menggunakan lampu UV 366 nm, kemudian diuapi dengan uap amoniak. Kemudian warna yang dihasilkan ditandai dengan pensil dan dihitung  $R_f$ -nya<sup>[7]</sup>.

### c. Spektroskopi Ultraviolet

Sedikit flavonoid hasil isolasi dilarutkan kedalam metanol p.a kemudian direkam dengan spektrofotometer UV-Vis secaman S 1000 yang telah distandarkan dengan metanol p.a. Spektrum selanjutnya direkam dengan menambahkan pereaksi geser (NaOH,  $AlCl_3$ ,  $AlCl_3/HCl$ , NaOAc, dan NaOAc/ $H_3BO_3$ ). Spektrum diukur pada panjang gelombang 200-500 nm.

Tahapan kerja penggunaan pereaksi geser<sup>[7]</sup>:

- 1) Setelah diukur spektrum cuplikan dalam MeOH (spektrum 'MeOH'), tambahkan 3 tetes NaOH kedalam kuvet, dicampur, lalu direkam spektrum 'NaOMe'. Untuk memeriksa apakah ada penguraian, spektrum 'NaOMe' direkam lagi setelah kira-kira 5 menit. Kemudian cuplikan dibuang dan kuvet yang telah dicuci diisi lagi dengan larutan flavonoid persediaan.
- 2) Enam tetes pereaksi  $AlCl_3$  ditambahkan kedalam larutan flavonoid, dicampur, lalu diukur spektrum ' $AlCl_3$ '. Selanjutnya ditambahkan 3 tetes HCl, dicampur, dan diukur spektrum ' $AlCl_3/HCl$ '. Cuplikan dibuang dan kuvet yang telah dicuci diisi lagi dengan larutan flavonoid persediaan.
- 3) Tambahkan serbuk NaOAc kedalam larutan flavonoid persediaan dalam kuvet sedemikian rupa sehingga terdapat kira-kira 2 mm lapisan NaOAc pada dasar kuvet. Campuran harus dikocok baik-baik sebelum spektrum 'NaOAc' diukur. Pada tahap ini dapat diperiksa apakah cuplikan terurai dengan berjalannya waktu. Lalu spektrum 'NaOAc/ $H_3BO_3$ ' diukur setelah ditambahkan  $H_3BO_3$  dan dicampur (banyaknya  $H_3BO_3$  kira-kira setengah NaOAc).

### d. Spektroskopi Inframerah

Spektrum inframerah diukur dengan spektrofotometer inframerah yang merekam secara otomatis dalam bentuk padat. Plat dari serbuk yang mengandung sampel  $\pm 1$  mg dan KBr 10-100 mg, diaduk sampai homogen, kemudian dilakukan penekanan sehingga membentuk plat tipis, lalu diukur. Dari hasil pengukuran tersebut didapat puncak-puncak serapan spesifik<sup>[8]</sup>.

## III. HASIL DAN PEMBAHASAN

### A. Hasil

#### 1. Uji Pendahuluan

Hasil uji pendahuluan terhadap kandungan metabolit sekunder yang terdapat pada Daun Sambang Darah (*Excoecaria cochichinensis*.L) dapat dilihat pada tabel 2.

TABEL II

HASIL UJI PENDAHULUAN KANDUNGAN METABOLIT SEKUNDER PADA DAUN SAMBANG DARAH

No	Kandungan kimia	Pereaksi	Hasil
1	Flavonoid	Mg-HCl	+
2	Alkaloid	Mayer, dragendrof, wagner	-
3	Steroid	Lieberman-burchard	-
4	Terpenoid	Lieberman-burchard	-
5	Saponin	Air	+

Ket: (+) terdeteksi

(-) tidak terdeteksi

Dari hasil uji pendahuluan terhadap kandungan Daun Sambang Darah (*Excoecaria cochichinensis*. L) menunjukkan bahwa positif mengandung flavonoid dan saponin.

#### 2. Hasil Isolasi

Dari 2,5 kg Daun Sambang Darah yang dimaserasi dengan metanol diperoleh ekstrak kental metanol sebanyak 240 gram. Maserasi dilakukan sebanyak 3 kali selama 6 hari dengan metanol sebanyak 7,5 L. Penambahan air panas sebanyak 100 ml menghasilkan ekstrak berair 200 ml dan difraksinasi dengan n-heksana menghasilkan fraksi berair sebanyak 200 mL. Selanjutnya difraksinasi dengan etil asetat menghasilkan fraksi etil asetat sebanyak 1000 mL yang positif terhadap Mg-HCl, sedangkan fraksi berair tidak dilanjutkan. Fraksi etil asetat dipekatkan dengan rotary evaporator menghasilkan ekstrak pekat etil asetat sebanyak 24,1998 gram. Hasil kromatografi kolom sebanyak 5,5 gram flavonoid kasar dari fraksi etil asetat diperoleh zat padat berwarna kuning kecoklatan hasil rekristalisasi sebanyak 0,35 gram. Zat padat ini positif terhadap Mg-HCl.

#### 3. Uji Kemurnian

Untuk uji kemurnian senyawa flavonoid hasil isolasi berupa zat padat, dapat dilakukan dengan cara penentuan titik leleh. Diperoleh titik leleh  $195^{\circ}C-197,5^{\circ}C$  dengan range  $2,5^{\circ}C$ . Selanjutnya, uji kemurnian dengan kromatografi lapis tipis dengan menggunakan beberapa eluen, didapatkan noda tidak tunggal. Perbandingan eluen yang digunakan (metanol:etil asetat) adalah (4:6, 3:7, 2:8, 1:9, 0:10, 6:4, 7:3, 8:2, 9:1, 10:0).

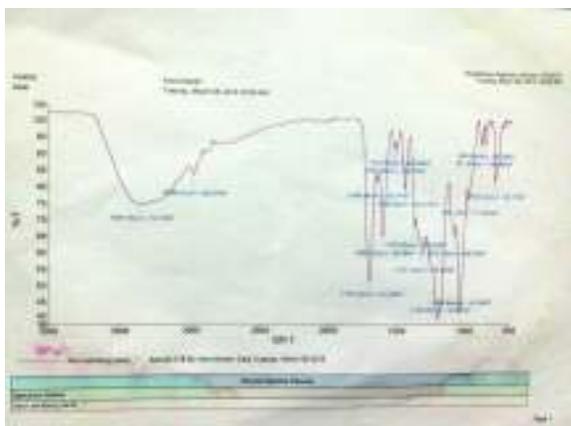
Dari hasil pengujian ini dapat dikatakan bahwa flavonoid hasil isolasi tidak murni. Hal ini tidak sesuai dengan pendapat Manjang<sup>[5]</sup> yang menyatakan bahwa jika sudah terbentuk noda tunggal pada kromatografi lapis tipis dan range titik lelehnya kecil dari  $2^{\circ}C$  maka senyawa hasil isolasi sudah murni.

#### 4. Karakterisasi

Dari pengukuran reaksi warna di dapatkan hasil: di tambahkan NaOH 10% di dapat kan warna orange, di tambahkan  $H_2SO_4$  pa didapatkan warna kuning, dan ditambahkan Mg-HCl di dapatkan warna merah, di duga, flavonoid yang di dapatkan tergolong flavonol.

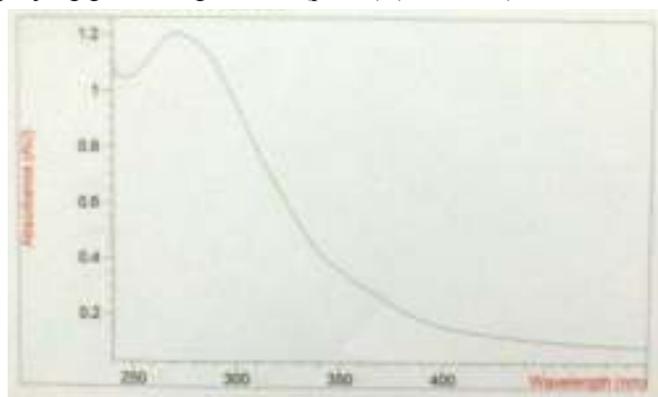
Karakterisasi senyawa flavonoid hasil isolasi dengan kromatografi kertas dua arah (Kkt-2A) menunjukkan noda tunggal berwarna kuning. Nilai  $R_f$  didistribusi flavonoid hasil isolasi pada kromatogram kertas dua arah kalau dibandingkan dengan distribusi flavonoid menurut Markham<sup>[7]</sup> menunjukkan bahwa senyawa hasil isolasi diduga adalah dihidroflavonol aglikon.

Dari hasil pengukuran infra merah senyawa flavonoid, dapat ditentukan gugus-gugus fungsi yang terdapat dalam senyawa hasil isolasi. Serapan pada  $3355\text{ cm}^{-1}$  menunjukkan adanya puncak OH, serapan pada daerah  $1704\text{ cm}^{-1}$  menunjukkan adanya puncak C=O keton, serapan pada daerah  $1649\text{ cm}^{-1}$  menunjukkan adanya puncak C=C alkena, serapan pada daerah  $1609\text{ cm}^{-1}$  menunjukkan adanya puncak C=C, serapan pada daerah  $1534\text{ cm}^{-1}$  menunjukkan adanya puncak C=C aromatik, serapan pada daerah  $1196\text{ cm}^{-1}$  menunjukkan adanya puncak C-O eter. Seperti yang terlihat pada Gambar 1.

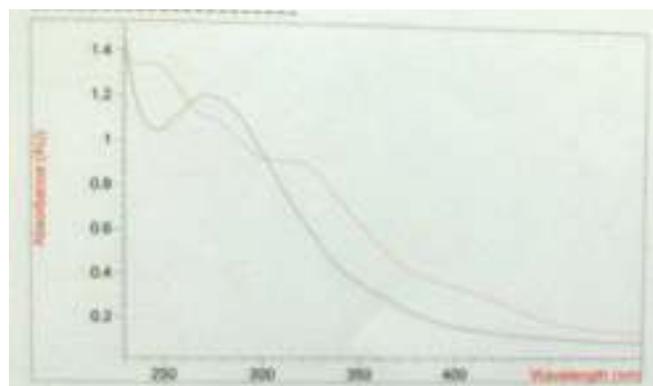


Gambar 1. Spektrum inframerah senyawa flavonoid hasil isolasi

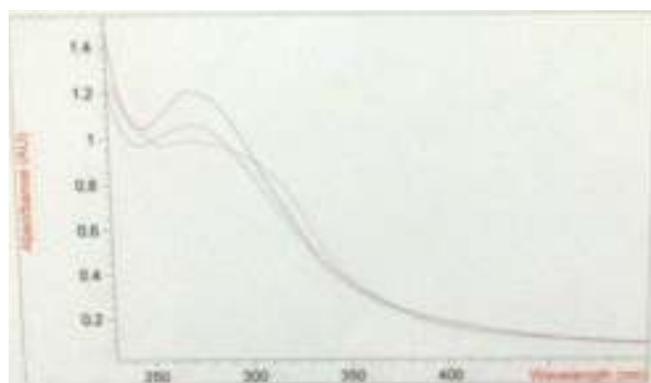
Spektrum UV-Vis flavonoid hasil isolasi dari daun sambang darah (*Excoecaria cochichinensis* L) dalam pelarut methanol dianalisis berdasarkan Markham<sup>[7]</sup>, dimana senyawa flavonoid hasil isolasi memberikan serapan hanya pada satu panjang gelombang 270 nm (pita II) (Gambar 2).



Gambar 2. Spektrum UV-Vis flavonoid hasil isolasi dengan pelarut MeOH



Gambar 3. Spektrum UV-Vis flavonoid hasil isolasi dengan pelarut MeOH + NaOH



Gambar 4. Spektrum UV-Vis flavonoid hasil isolasi dengan pelarut MeOH +  $\text{AlCl}_3$  + HCl

Penambahan pereaksi geser NaOH memberikan serapan pada panjang gelombang 242 nm (pita II) dan 325 nm (Gambar 3). Penambahan pereaksi geser  $\text{AlCl}_3$  memberikan serapan pada panjang gelombang 242 nm (pita II). Penambahan HCl ini menyebabkan terjadinya pergeseran 38 (pita II) (Gambar 3).

Penambahan pereaksi geser NaOAc memberikan serapan pada panjang gelombang 270 nm (pita II). Setelah penambahan  $\text{H}_3\text{BO}_3$  memberikan serapan pada panjang gelombang 290 nm (pita II) (Gambar 4).

## B. Pembahasan

Sebelum dimaserasi, daun sambang darah dirajang terlebih dahulu dengan tujuan untuk memperluas bidang permukaan sampel sehingga kontak antara sampel dan pelarut semakin luas serta mempermudah pelarut masuk kedalam sel, sehingga proses penarikan senyawa yang ada pada sampel ke dalam pelarut yang digunakan lebih mudah. Pada proses ekstraksi, dilakukan dengan metoda maserasi, yaitu perendaman sampel dengan pelarut organik yang dilakukan pada temperatur ruangan. Proses maserasi ini dilakukan karena jumlah sampel yang banyak serta untuk menghindari kerusakan senyawa-senyawa tertentu yang terkandung di dalam sampel yang disebabkan karena adanya pemanasan. Dengan demikian, sampel akan menjadi lunak sehingga pelarut akan masuk kedalam sel dan diharapkan proses ekstraksi telah berjalan dengan sempurna. Selama proses

maserasi, sampel sekali-kali diaduk untuk mempercepat proses pelarutan senyawa yang akan diisolasi. Pelarut yang digunakan dalam maserasi adalah metanol, karena metanol merupakan pelarut yang baik, dapat melarutkan senyawa polar dan nonpolar. Selain itu, metanol memiliki titik didih yang rendah yaitu  $65^{\circ}\text{C}$ , mudah menguap sehingga mudah dipisahkan dari ekstrak.

Selanjutnya, ekstrak metanol yang diperoleh dipekatkan dengan rotari evaporator dengan tujuan untuk menurunkan tekanan uap pelarut, sehingga pelarut akan mendidih pada temperatur yang lebih rendah dari titik didih yang sebenarnya, dan komponen-komponen yang ada dalam sampel terhindar dari proses termolisis. Setelah diperoleh ekstrak kental metanol maka ekstrak ditambahkan air panas  $50^{\circ}\text{C}$ , dengan tujuan untuk mempermudah proses pemisahan pada fraksinasi selanjutnya. Kemudian fraksi berair ini difraksinasi dengan n-heksana beberapa kali agar senyawa yang bersifat non polar tertarik kedalam fraksi n-heksana, seperti: lemak, steroid, terpenoid, klorofil, xantofil, dll<sup>[7]</sup>. Senyawa flavonoid yang terdapat dalam fraksi air diduga terdiri dari senyawa flavonoid semipolar seperti: aglikon flavonoid, dan senyawa polar seperti: flavonoid glikosida. Oleh karena itu, dilakukan fraksinasi dengan etil asetat untuk memisahkan flavonoid polar dan semipolar. Flavonoid semipolar akan terdistribusi kedalam fraksi etil asetat, sedangkan flavonoid polar akan tetap tinggal didalam air. Fraksinasi etil asetat dilakukan beberapa kali hingga uji negatif dengan Shinoda tes.

Uji kemurnian dengan kromatografi lapis tipis menggunakan beberapa perbandingan eluen diperoleh noda yang tidak tunggal, jarak titik leleh besar dari  $2^{\circ}\text{C}$  yaitu  $2,5^{\circ}\text{C}$ , dari kedua data ini diduga senyawa flavonoid tersebut tidak murni, karena tidak sesuai dengan pendapat Manjang<sup>[5]</sup> yang menyatakan bahwa jika sudah terbentuk noda tunggal pada plat KLT dan jarak titik leleh yang kecil dari  $2^{\circ}\text{C}$  menunjukkan kristal hasil isolasi sudah murni.

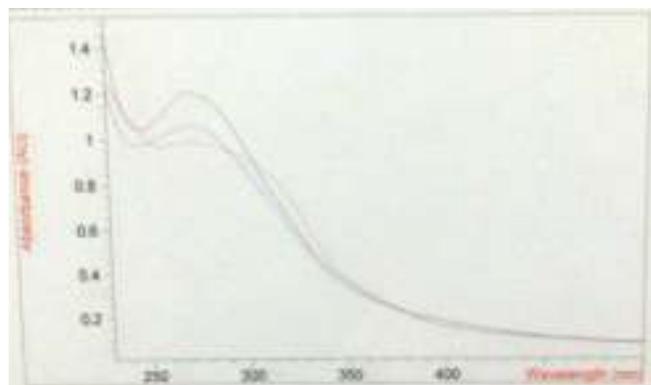
Dari hasil pengukuran Spektroskopi Infra Merah dapat ditentukan gugus fungsi yang terdapat dalam senyawa hasil isolasi dari daun sambang darah (*Excoecaria cochichinensis* L) adalah gugus OH, C=O keton, C=C aromatik, C-O eter, C=C.

Dari hasil reaksi warna, di tentukan bahwa flavonoid yang terdapat pada daun sambang darah tergolong ke kelompok flavonol. Karena yang ditambahkan NaOH 10% berwarna orange, yang di tambahkan  $\text{H}_2\text{SO}_4$  pa berwarna kuning, sedangkan yang ditambahkan Mg-HCl berwarna merah.

Spektrum UV-Vis flavonoid hasil isolasi dari daun sambang darah (*Excoecaria cochichinensis* L) dalam pelarut methanol dianalisis berdasarkan Markham<sup>[7]</sup>, dimana senyawa flavonoid hasil isolasi memberikan serapan hanya pada satu panjang gelombang 270 nm (pita II) (Gambar 2).

Penambahan pereaksi geser NaOH memberikan serapan pada panjang gelombang 242 nm (pita II) dan 325 nm, menunjukkan flavonoid ini tergolong isoflavon (Gambar 3). Penambahan pereaksi geser  $\text{AlCl}_3$  memberikan serapan pada panjang gelombang 242 nm (pita II). Penambahan HCl ini menyebabkan terjadinya pergeseran 38 (pita II) (Gambar 4).

Penambahan pereaksi geser NaOAc memberikan serapan pada panjang gelombang 270 nm (pita II). Setelah penambahan  $\text{H}_3\text{BO}_3$  memberikan serapan pada panjang gelombang 290 (pita II) (Gambar 6).



Gambar 5. Spektrum UV-Vis flavonoid hasil isolasi dengan pelarut MeOH +  $\text{AlCl}_3$  + HCl

Dari data yang di dapatkan dari reaksi warna, spectrum inframerah dan spectrum UV-Vis, tidak bisa ditentukan struktur flavonoid yang di dapatkan, karena penyerapan terjadi pada pita II, dan hanya satu yang menunjukkan serapan pada pita II.

#### IV. KESIMPULAN

Berdasarkan hasil penelitian yang dilakukan, maka dapat disimpulkan bahwa:

1. Dari 2,5 kg Daun Sambang Darah (*Excoecaria cochichinensis* L.) didapatkan flavonoid kasar dari fraksi etil asetat sebanyak 24,1998 gram. Hasil kromatografi kolom 5,5 gram flavonoid kasar dari fraksi etil asetat diperoleh flavonoid berupa zat padat amorf berwarna kuning kecoklatan sebanyak 0,35 gram, dengan range titik leleh  $195^{\circ}\text{C}$ - $197,5^{\circ}\text{C}$ .
2. Berdasarkan data yang didapatkan maka, flavonoid yang terdapat pada daun sambang darah tidak murni, karena pada KLT memiliki noda tidak tunggal.

#### REFERENSI

- [1] Tersenoadi, Lucas. 2008. *Tanaman Obat dan Jus*. Gramedia: Jakarta.
- [2] Kusuma, T.S. 1988. *Kimia Lingkungan*. FMIPA Unand: Padang.
- [3] Bakhtiar, A. 1992. *Diktat Kuliah Flavonoid*. Universitas Andalas: Padang.
- [4] Darwis, D. 2000. *Teknik Dasar Laboratorium Dalam Penelitian Senyawa Organik Bahan Alam, Workshop Pengembangan Sumber Daya Manusia Dalam Bidang Kimia Organik Bahan Alam Hayati*. Universitas Andalas: Padang.
- [5] Manjang, Y. 1985. *Kimia Analisis Organik*. Proyek Peningkatan Perguruan Tinggi. Universitas Andalas: Padang.
- [6] Gritter, R.J. 1991. *Pengantar Kromatografi*. edisi kedua. ITB: Bandung.
- [7] Markham, K. R. 1988. *Cara Mengidentifikasi Flavonoid*. ITB: Bandung.
- [8] Harborne, J.B. 1987. *Metode Fitokimia*, terjemahan Kosasih Padmawinata dan Iwang Soediro, Edisi kedua. ITB: Bandung.