

## BAB I

### TINJAUAN PUSTAKA

#### 1.1. Tinjauan Botani

##### 1.1.1. Klasifikasi Tumbuhan

Kerajaan	: Plantae
Subkingdom	: Tracheobinota
Super Divisi	: Spermatophyta
Divisi	: Magnoliophyta
Kelas	: Liliopsida
Anak Kelas	: Liliidae
Bangsa	: Liliales
Keluarga	: Iridaceae
Marga	: <i>Eleutherine</i>
Jenis	: <i>Eleutherine americana</i> Merr.
Sinonim	: <i>Eleutherine bulbosa</i> (Mill). Urb

(Conqu Coast, 1981: 263; dan Backer, 1968:144).

### 1.1.2. Sinonim

Nama lain *Eleutherine bulbosa* (Mill.) Urb. adalah *Eleutherine americana* (Aubl) Merr. (Heyne, 1987: 551).

### 1.1.3. Nama Daerah

Di Indonesia, tanaman ini juga dikenal dengan nama *bawang kapal*, *babawangan beureum*, *bawang sabrang*, *bawang siyem*, *braambang sabrang*, *luluwan sapi*, *teki sabrang* (Heyne, 1987: 551).

### 1.1.4. Morfologi

Bawang dayak merupakan tumbuhan terana dengan tinggi 26 hingga 50 cm. Umbi berada di bawah tanah berbentuk bulat telur memanjang dan berwarna merah. Bunga berwarna putih, daun tunggal, letak daun berhadapan, warna daun hijau muda, bentuk daun sangat panjang dan meruncing (*acicular*), tepi daun halus tanpa gerigi (*entire*), pangkal daun berbentuk runcing (*acute*) dan ujung daun meruncing (*acuminate*) permukaan daun atas dan bawah halus (*glabrous*), tulang daun paralel/sejajar (Krismawati, dkk, 2004: 20; Heyne, 1987: 552).



**Gambar I.1** Bawang Dayak

### 1.1.5. Kandungan Kimia

Hasil penelitian menunjukkan bahwa umbi bawang dayak mengandung senyawa naftokuinon dan turunannya seperti *elecanasin*, *eleutherin*, *eleutherol*, *eleuthernon* (Hara et al, 1997: 1714). Naftokuinon dikenal sebagai antimikroba, antifungal, antiviral dan antiparasitik. Selain itu, naftokuinon memiliki bioaktivitas sebagai antikanker dan antioksidan yang biasanya terdapat di dalam sel vakuola dalam bentuk glikosida (Babula et al, 2005: 25).

Umbi bawang dayak mengandung senyawa-senyawa turunan anthrakinon yang mempunyai daya pencahar, yaitu senyawa-senyawa *eleutheurin*, *isoeleutherin* dan senyawa-senyawa sejenisnya, senyawa-senyawa lakton yang disebut *eleutherol* dan senyawa turunan *pyron* yang disebut *eleutherinol* (Komura et al. 1983: 4206). Adapun senyawa bioaktif yang terdapat dalam umbi bawang dayak terdiri dari senyawa alkaloid, flavonoid, steroid, glikosida, fenolik, saponin, triterpenoid, tanin dan kuinon (Galingging, 2009:4).

### 1.1.6. Khasiat dan Kegunaan

Bawang dayak merupakan tanaman khas Kalimantan Tengah. Secara empiris bawang dayak sudah dipergunakan masyarakat lokal dalam pengobatan berbagai jenis penyakit seperti kanker payudara, penurunan tekanan darah tinggi, penyakit kencing manis, menurunkan kolesterol, obat bisul, kanker usus, mencegah stroke dan mengurangi sakit perut setelah melahirkan. Selain itu, daun tanaman ini juga dapat digunakan sebagai pelancar air susu ibu (Galingging, 2009:4).

## 1.2. Antioksidan

Radikal bebas (*free radical*) adalah molekul atau gugus atom yang tidak memiliki pasangan elektron. Akibatnya radikal bebas biasanya bersifat tidak stabil dan sangat reaktif karena berusaha berpasangan dengan molekul atau atom lain (Winarsih, 2007).

Senyawa antioksidan memiliki peran yang sangat penting dalam kesehatan. Berdasarkan sumber perolehannya ada 2 macam antioksidan, yaitu antioksidan alami merupakan antioksidan hasil ekstraksi bahan alami dan antioksidan buatan (sintetik) merupakan antioksidan yang diperoleh dari hasil sintesa reaksi kimia. Karakter utama senyawa antioksidan adalah kemampuannya menangkap radikal bebas (Prakash, 2001:4).

Beberapa contoh antioksidan sintetik antara lain *butylated hydroxyanisole* (BHA), *butylated hydroxytoluene* (BHT), *propylgallate* (PG), *tert-butylhydroquinone* (TBHQ). Sedangkan yang termasuk antioksidan alami antara lain fenol, polifenol, flavonoid,  $\alpha$ -tokoferol, karotenoid dan antosianin. Komponen fenolik seperti flavonoid, asam fenolat adalah senyawa-senyawa yang berpotensi sebagai antioksidan (Kiselova *et al.* 2006:961-965).

Vitamin C atau asam askorbat adalah vitamin yang larut dalam air, mempunyai sifat yang asam dan sifat pereduksi yang kuat. Struktur kimianya terdiri dari rantai 6 atom C dan kedudukannya tidak stabil ( $C_6H_8O_6$ ), sehingga mudah bereaksi dengan  $O_2$  di udara menjadi asam dehidroaskorbat. Asam askorbat

pada tumbuhan merupakan metabolit sekunder, karena terbentuk dari glukosa melalui jalur asam D-glukoronat dan L-gulonat (Safaryani et al, 2007).

Manfaat asam askorbat bagi kesehatan yaitu sebagai antioksidan, antiatherogenik, antikarsinogenik dan immnumodulator. Asam askorbat merupakan sumber antioksidan yang sangat baik dalam tubuh yang secara alami melindungi tubuh dari serangan oksidatif akibat radikal bebas. Selain itu, asam askorbat juga berfungsi untuk mengurangi resiko kanker lambung dan mencegah kanker kolektral. Asam askorbat bekerja secara sinergis dengan vitamin E untuk menangkal radikal bebas. Sebagai senyawa peredam radikal bebas, asam askorbat dapat langsung bereaksi dengan anion superoksida, radikal hidroksil, oksigen singlet dan lipid peroksida. Oleh karena kemampuannya sebagai penghambat radikal bebas, maka peranannya sangat penting dalam menjaga integritas membran sel (Safaryani et al. 2007).

### **1.2.1. Pengukuran Antioksidan**

Berbagai macam metode untuk pengukuran aktivitas antioksidan telah banyak digunakan untuk melihat dan membandingkan aktivitas antioksidan pada berbagai macam sumber antioksidan. Beberapa metode pengukuran aktivitas antioksidan yang dapat digunakan antara lain metode beta karoten, metode linoleat, metode terkonjugasi, metode tiosianat, dan metode peredaman radikal bebas DPPH.

Pengujian antioksidan dengan metode DPPH merupakan salah satu metode yang sederhana dengan menggunakan radikal *1,1-diphenyl-2-picrylhydrazil*

sebagai indikator. DPPH merupakan senyawa radikal bebas yang bersifat stabil sehingga dapat bereaksi dengan atom hidrogen yang berasal dari suatu antioksidan membentuk DPPH tereduksi (Molyneux, 2004: 211-219). Pengujian aktivitas antioksidan dengan DPPH menggunakan alat spektrofotometer pada panjang gelombang 515 nm.

Prinsip dari metode DPPH ini, atom hidrogen dari suatu senyawa antioksidan akan membuat larutan DPPH menjadi tidak berwarna yang dapat diukur menggunakan spektrofotometer akibat terbentuknya DPPH tereduksi (DPPH•) (Sharma dan Bhat 2009: 1202-1205).

Apabila larutan DPPH direaksikan dengan senyawa antioksidan, maka akan terjadi perubahan warna dari ungu menjadi kuning (Molyneux, 2004: 211-219). Semakin tinggi kemampuan suatu senyawa antioksidan dalam meredam radikal DPPH, maka warna yang dihasilkan akan semakin kuning dan mendekati jernih. Hal ini ditandai dengan semakin kecilnya nilai absorbansi yang terukur pada spektrofotometer ultraviolet- sinar tampak.

### **1.3. Flavonoid**

Flavonoid merupakan salah satu golongan fenol alam yang terbesar, terutama berupa senyawa yang larut dalam air, dapat diekstraksi dengan etanol 70% karena itu warnanya berubah bila ditambahkan basa atau ammonia. Jadi mudah dideteksi pada kromatografi atau dalam larutan (Harborne, 1987:70).

Flavonoid mengandung sistem aromatik yang terkonjugasi dan karena itu menunjukkan pita serapan kuat pada daerah spektrum UV dan spektrum tampak. Flavonoid pada umumnya terdapat pada tumbuhan, terikat pada gula sebagai glikosida dan aglikon flavonoid yang mana pun mungkin saja terdapat dalam satu tumbuhan dalam beberapa bentuk kombinasi glikosida (Harborne, 1987:71).

Flavonoid bertanggungjawab melindungi tanaman dari pengaruh buruk sinar ultra violet dan berperan sebagai pemberi warna pada tanaman. Flavonoid dapat bekerja sebagai antioksidan untuk mengendalikan radikal bebas, antivirus, antimikroorganisme, mengurangi pembekuan darah, melancarkan aliran darah (Robinson, 1995: 150-160).

### **1.3.1. Keragaman Struktur Flavonoid Secara Umum**

Dalam tumbuhan, aglikon flavonoid (yaitu flavonoid tanpa gula terikat) terdapat dalam berbagai bentuk struktur. Flavonoid mengandung 15 atom karbon dalam inti dasarnya, yang tersusun dalam konfigurasi  $C_6-C_3-C_6$ , yaitu dua cincin aromatik yang dihubungkan oleh satuan tiga karbon yang dapat atau tidak dapat membentuk cincin ketiga. Agar mudah, cincin diberi tanda A, B, dan C; atom karbon dinomori menurut sistem penomoran yang menggunakan angka biasa untuk cincin A dan C, serta angka 'beraksen' untuk cincin B (Markham, 1988:1).

Semua varian flavonoid saling berkaitan karena alur biosintesis yang sama, yang memasukkan prazat dari alur 'sikimat' dan alur 'asetat-malonat' (Hahlbrock & Grisebach, 1975:866; Wong, 1976:464), dan flavonoid pertama dihasilkan segera setelah kedua alur itu bertemu. Flavonoid yang dianggap pertama kali

terbentuk pada biosintesis ialah khalkon (Halhbrock, 1980:617), dan semua bentuk lain diturunkan darinya melalui berbagai alur. Modifikasi flavonoid lebih lanjut mungkin terjadi pada berbagai tahap dan menghasilkan : penambahan (atau pengurangan) hidroksilasi; metilasi gugus hidroksil atau inti flavonoid; isoprenilasi gugus hidroksil atau inti flavonoid; metilenasi gugus orto-dihidroksil; dimerisasi (pembentukan biflavonoid); pembentukan bisulfat; dan yang terpenting, glikosilasi gugus hidroksil (pembentukan flavonoid O-glikosida) atau inti flavonoid (pembentukan flavonoid C-glikosida) (Harborne dkk., 1975: 189).

### **1.3.2. Flavonoid O- glikosida**

Flavonoid biasanya terdapat sebagai flavonoid O-glikosida; pada senyawa tersebut 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); sifat terakhir ini memungkinkan flavonoid tersimpan di dalam vakuola sel. Walaupun gugus hidroksil pada setiap komposisi dalam inti flavonoid dapat diglikosilasi, kenyataannya hidroksil pada tempat tertentu mempunyai peluang yang lebih besar untuk terglykosilasi dibandingkan tempat-tempat lain. (Markham, 1988:5).

### **1.3.3. Flavonoid C-glikosida**

Gula terdapat juga pada atom karbon flavonoid dan dalam hal ini gula tersebut terikat langsung pada inti benzene 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 dibandingkan jenis gula pada *O*-glikosida, biasanya dari jenis glukosa yang paling umum dan juga galaktosa, ramnosa, xilosa dan arabinosa (Markham, 1988:6).

#### 1.3.4. Flavonoid Sulfat

Golongan flavonoid lain yang mudah larut dalam air mungkin ditemukan hanya flavonoid sulfat. Senyawa ini mengandung satu ion sulfat, atau lebih, yang terikat pada hidroksil fenol atau gula. Secara teknis senyawa ini sebenarnya bisulfat karena terdapat sebagai garam, yaitu flavon-*O*-SO<sub>3</sub>K. Banyak yang berupa glikosida bisulfat, bagian bisulfat terikat pada hidroksil fenol yang mana saja yang masih bebas atau pada gula (Harborne, 1977:189). Senyawa ini terdapat terbatas hanya pada angiospermae dan terutama pada angiospermae yang mempunyai hubungan ekologi dengan habitat air (Harborne, 1975: 189).

#### 1.3.5. Biflavonoid

Biflavonoid adalah flavonoid dimer, yang biasanya terdiri dari flavon dan flavanon yang secara biosintesis mempunyai pola oksigenasi yang sederhana 5,7,4' dan ikatan antar flavonoid berupa ikatan karbon-karbon atau (kadang-kadang) ikatan eter (Geiger & Quinn, 1975:692). Monomer flavonoid yang digabungkan menjadi biflavonoid dapat berjenis sama atau berbeda, dan letak ikatannya menjadi berbeda-beda. Jenis ikatan karbon-karbon yang lebih sering ditemukan ialah : ikatan -6,4'(Markham, 1988:8).

#### **1.4. Simplisia**

Simplisia adalah bahan alamiah yang dipergunakan sebagai obat yang belum mengalami pengolahan apapun juga dan kecuali dinyatakan lain berupa bahan yang dikeringkan (Depkes RI, 2000).

#### **1.5. Parameter Standar Simplisia**

Parameter standar simplisia dibagi atas parameter spesifik dan parameter non spesifik (Depkes RI, 2000: 13-32).

##### **1.5.1. Parameter Spesifik**

###### **a. Organoleptis**

Pengujian organoleptis meliputi pendeskripsian bentuk, warna, bau dan rasa dengan menggunakan pancaindra, bertujuan untuk pengenalan awal yang sederhana dan seobjektif mungkin (Depkes RI, 2000).

###### **b. Senyawa terlarut dalam pelarut tertentu**

Pengujian yang dilakukan dengan melarutkan ekstrak dengan pelarut alkohol atau air untuk ditentukan jumlah solut yang identik dengan jumlah senyawa kandungan secara gravimetri. Dalam hal tertentu dapat diukur senyawa terlarut dalam pelarut lain misalnya heksana, diklorometan dan metanol. Tujuan dari pengukuran ini adalah untuk memberikan gambaran awal jumlah senyawa kandungan (Depkes RI, 2000:31).

### 1.5.2. Parameter Non Spesifik

#### a. Susut Pengerinan

Parameter susut pengerinan, yaitu pengukuran sisa zat setelah pengerinan pada suhu  $105^{\circ}\text{C}$  selama 30 menit atau sampai berat konstan, yang dinyatakan sebagai nilai persen. Dalam hal khusus (jika bahan tidak mengandung minyak menguap/atsiri dan sisa pelarut organik menguap) identik dengan kadar air, yaitu kandungan air karena berada di atmosfer/lingkungan udara terbuka. Tujuan dari pengukuran ini adalah untuk memberikan batasan maksimal (rentang) besarnya senyawa yang hilang pada proses pengerinan (Depkes RI, 2000:13).

#### b. Bobot jenis

Parameter bobot jenis adalah masa per satuan volume pada suhu kamar tertentu ( $25^{\circ}\text{C}$ ) yang ditentukan dengan alat khusus piknometer atau alat lainnya. Tujuan dari pengukuran ini adalah untuk memberikan batasan tentang besarnya masa per satuan volume yang merupakan parameter khusus ekstrak cair sampai ekstrak pekat (kental) yang masih dapat dituang, juga memberi gambaran kandungan kimia terlarut kandungan (Depkes RI, 2000).

#### c. Kadar air

Pengukuran kadar air adalah pengukuran kandungan air yang berada di dalam bahan, dilakukan dengan cara yang tepat diantaranya cara titrasi, destilasi, dan gravimetri. Tujuan pengukuran kadar air ini adalah untuk

memberi batas maksimal atau rentang besarnya kandungan air di dalam bahan kandungan (Depkes RI, 2000).

d. Kadar abu

Prinsip pengukuran kadar abu, yaitu bahan dipanaskan pada suhu dimana senyawa organik dan turunannya terdestruksi dan menguap, sehingga tinggal unsur mineral dan anorganik. Tujuan dari pengukuran ini adalah untuk memberikan gambaran kandungan mineral internal dan eksternal yang berasal dari proses awal sampai terbentuknya ekstrak kandungan (Depkes RI, 2000:13).

### **1.6. Skrining Fitokimia**

Penapisan fitokimia ekstrak meliputi pemeriksaan golongan senyawa polifenolat, alkaloid, flavonoid, tanin, triterpenoid dan steroid, dan saponin (Farnsworth 1966 : 225).

### **1.7. Ekstraksi**

Ekstraksi adalah proses penarikan kandungan kimia yang dapat larut sehingga terpisah dari bahan yang tidak dapat larut dengan pelarut cair. Senyawa aktif yang terdapat dalam berbagai simplisia dapat digolongkan ke dalam golongan minyak atsiri, alkaloid, flavonoid dan lain-lain. Diketahuinya senyawa aktif yang dikandung oleh simplisia akan mempermudah pemilihan pelarut dan cara ekstraksi yang tepat. Simplisia yang lunak seperti rimpang dan daun mudah diserap oleh

pelarut, karena itu pada proses ekstraksi tidak perlu diserbuk sampai halus. Simplisia yang keras seperti biji, kulit kayu dan kulit akar susah diserap oleh pelarut, karena itu perlu diserbuk sampai halus (Depkes RI, 2000).

Idealnya untuk analisis fitokimia, harus digunakan jaringan tumbuhan segar. Beberapa menit setelah dikumpulkan, bahan tumbuhan itu harus dimasukkan ke dalam alkohol mendidih. Cara lain, tumbuhan dapat dikeringkan sebelum diekstraksi. Bila ini dilakukan, pengeringan tersebut harus dilakukan dalam keadaan terjaga untuk mencegah terjadinya perubahan kimia yang terlalu banyak. Bahan harus dikeringkan secepatnya, tanpa menggunakan suhu tinggi, lebih baik dengan aliran udara yang baik. Setelah benar-benar kering, tumbuhan dapat disimpan untuk jangka waktu lama sebelum digunakan untuk analisis (Harborne, 1987:4).

Ada beberapa metode ekstraksi yang umum digunakan diantaranya ekstraksi dengan cara dingin dan cara panas. Untuk cara dingin lazimnya digunakan metode maserasi dan perkolasi, sedangkan untuk cara panas dapat digunakan beberapa alat seperti refluks dan soxhlet. Pada penelitian ini dilakukan ekstraksi dengan cara refluks. Refluks adalah ekstraksi dengan pelarut pada temperatur titik didihnya dalam jangka waktu tertentu (Depkes RI, 2000) dimana pelarut akan terkondensasi menuju pendingin dan kembali ke labu (Mayo, et al., 1955; Landgrebe, 1982).

## 1.8. Metode Pemisahan

Pemisahan dan pemurnian kandungan tumbuhan dapat dilakukan dengan menggunakan salah satu dari empat teknik kromatografi atau gabungan dari beberapa kromatografi

Kromatografi adalah suatu metode pemisahan fisik, di mana komponen-komponen yang dipisahkan didistribusikan di antara dua fasa, salah satu fasa tersebut adalah suatu lapisan stasioner dengan permukaan yang luas, yang lainnya sebagai fluida yang mengalir lembut di sepanjang landasan stasioner (Day, 2002:382).

Teknik kromatografi yang dapat digunakan sebagai metode pemisahan kandungan tumbuhan adalah Kromatografi Kertas (KKt), Kromatografi Lapis Tipis (KLT), Kromatografi Gas Cair (KGC) dan Kromatografi Cair Kinerja Tinggi (KCKT).

Pemilihan teknik kromatografi sebagian besar bergantung pada kelarutan dan keatsirian senyawa yang akan dipisah. Sebagai contoh, KKt dapat digunakan terutama bagi kandungan tumbuhan yang mudah larut dalam air, karbohidrat, asam amino, basa asam nukleat, asam organik, dan senyawa fenolat.

### 1.8.1. Kromatografi Lapis Tipis

Kromatografi lapis tipis (KLT) dikembangkan oleh Izmailoff dan Schraiber pada tahun 1938. KLT merupakan bentuk kromatografi planar, selain kromatografi kertas dan elektroforesis. Pada KLT fase diam yang digunakan berupa lapisan

seragam (*uniform*) pada permukaan bidang yang datar yang didukung oleh lempeng kaca, pelat aluminium, atau pelat plastik. Fase gerak yang dikenal sebagai pelarut pengembang akan bergerak sepanjang fase diam karena pengaruh kapilaritas pada pengembangan secara menaik (*ascending*), atau karena pengaruh gravitasi pada pengembangan secara menurun (*descending*) (Gandjar, 2007:353).

Fase gerak adalah medium angkut, terdiri dari satu atau beberapa pelarut, yang bergerak di dalam fase diam, yaitu suatu lapisan berpori karena adanya gaya kapiler (Stahl, 1969). Pemilihan sistem pelarut yang dipakai didasarkan atas prinsip *like dissolves like*, artinya untuk memisahkan sampel yang bersifat nonpolar digunakan sistem pelarut yang bersifat nonpolar juga. Proses pengembangan akan lebih baik bila ruangan pengembangan tersebut telah jenuh dengan uap sistem pelarut (Adnan, 1997:15). Pelarut dalam ruangan pengembang dihindarkan dari atmosfer luar untuk menghindari penguapan komponen-komponen (Sastrohamidjojo, 2005) dan campuran pelarut dianjurkan hanya dipakai untuk sekali pengembangan saja karena susunannya mudah berubah akibat salah satu komponennya menguap (Gritter, et al., 1985).

Fase diam yang digunakan dalam KLT merupakan penjerap berukuran kecil dengan diameter partikel antara 10-30  $\mu\text{m}$ . Semakin kecil ukuran rata-rata partikel fase diam dan semakin sempit kisaran ukuran fase diam, maka semakin baik kinerja KLT dalam hal efisiensinya dan resolusinya. Penjerap yang paling sering digunakan adalah silika dan serbuk selulosa, sementara mekanisme sorpsi

yang utama pada KLT adalah partisi dan adsorpsi. Lapisan tipis yang digunakan sebagai penjerap juga dapat dibuat dari silika yang telah dimodifikasi.

Bilangan  $R_F$  adalah jarak yang ditempuh senyawa pada kromatografi, nisbi terhadap garis besar. Bilangan  $R_F$  diperoleh dengan mengukur jarak antara titik awal dan pusat bercak yang dihasilkan senyawa, dan jarak ini kemudian dibagi dengan jarak antara titik awal dan garis depan (yaitu jarak yang ditempuh cairan pengembang). Harga  $R_F$  dihitung dengan menggunakan perbandingan sebagaimana persamaan sebagai berikut:

$$R_F = \frac{\text{jarak yang ditempuh senyawa}}{\text{jarak yang ditempuh fase gerak}}$$

Harga maksimum adalah 1, sampel bermigrasi dengan kecepatan sama dengan fase gerak. Harga minimum adalah 0, dan ini teramati jika sampel tertahan pada posisi titik awal di permukaan fase diam (Gandjar, 2007).

### 1.8.2. Kromatografi Cair Vakum (KCV)

Cara ini pertama kali dipublikasikan oleh Coll dkk., pada tahun 1977 dengan menggunakan corong Buchner kaca masir atau kolom pendek untuk mengisolasi diterpena sesteronida dari terumbu karang Australia. Kolom kromatografi dikemas kering dalam keadaan vakum agar diperoleh kerapatan kemasan maksimum. Vakum dihentikan, pelarut yang kepolarannya rendah dituangkan ke permukaan penjerap lalu divakumkan lagi. Kolom dihisap sampai kering dan sekarang siap dipakai (Hostettmann, et al., 1995:33).

Sampel dilarutkan dalam pelarut yang cocok, dimasukkan langsung pada bagian atas kolom atau pada lapisan penjerap dan dihisap perlahan-lahan ke dalam kemasan dengan memvakumkannya. Kolom dielusi dengan campuran pelarut yang cocok, mulai dari pelarut yang kepolarannya rendah lalu kepolarannya ditingkatkan perlahan-lahan, kolom dihisap sampai kering pada setiap pengumpulan fraksi, oleh karena itu kromatografi cair vakum menggunakan tekanan rendah untuk meningkatkan laju aliran fase gerak (Hostettmann, et al., 1995:33).

### **1.9. Metode Identifikasi**

Spektrofotometri menyiratkan pengukuran besarnya absorpsi energi cahaya oleh suatu sistem kimia sebagai fungsi dari panjang gelombang radiasi, demikian pula pengukuran pengabsorpsian yang menyendiri pada suatu panjang gelombang tertentu (Day, 2002:382).

Spektroskopi adalah studi mengenai interaksi cahaya dengan atom dan molekul. Radiasi cahaya dan elektromagnetik dapat dianggap menyerupai gelombang (Creswell, et al., 2005:1).

#### **1.9.1. Spektrofotometri UV-Sinar Tampak**

Radiasi elektromagnetik sinar ultra violet dan sinar tampak merupakan energi yang merambat dalam bentuk gelombang. Radiasi pada rentang panjang gelombang 200-800 nm dilewatkan pada suatu larutan senyawa, maka elektron-elektron pada ikatan di dalam molekul tereksitasi sehingga menempati keadaan

yang lebih tinggi dan pada proses tersebut sejumlah energi akan diserap oleh molekul di dalam larutan tersebut (Gandjar dan Rohman, 2007:220 ; Watson, 2009: 135).

Jika lebih banyak ikatan rangkap dalam struktur terkonjugasi, maka serapan terjadi pada panjang gelombang yang lebih besar dan dengan intensitas yang lebih besar. Sistem ikatan rangkap yang diperpanjang tersebut dikenal sebagai kromofor (Watson, 2009: 135).

### 1.9.2. Pereaksi Geser

Spektrofotometri serapan ultraviolet dan sinar tampak merupakan cara tunggal yang paling berguna untuk menganalisis struktur flavonoid. Cara tersebut digunakan untuk membantu mengidentifikasi jenis flavonoid dan menentukan pola oksigenasi. Kedudukan gugus hidroksil fenol bebas pada inti flavon dapat ditentukan dengan menambahkan 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 metil yang terikat pada salah satu gugus hidroksil fenol (Markham, 1988:38).

Jenis pereaksi geser untuk flavonoid diantaranya natrium metoksida (NaOMe), natrium asetat (NaOAc), aluminium klorida ( $AlCl_3$ ), asam hidroklorida (HCl), dan asam borat ( $H_3BO_3$ ). Pereaksi pengganti NaOMe yang cocok ialah larutan NaOH 2 M dalam air.

Natrium metoksida (NaOMe), pada hasil spektrum NaOMe biasanya merupakan petunjuk sidik jari pola hidroksilasi dan juga bermanfaat untuk

mendeteksi gugus hidroksil yang lebih asam dan tidak tersubstitusi. Degradasi atau pengurangan kekuatan spektrum setelah waktu tertentu merupakan petunjuk baik akan adanya gugus yang peka terhadap basa. Natrium asetat hanya menyebabkan pengionan yang berarti pada gugus hidroksil flavonoid yang paling asam. Jadi, natrium asetat digunakan terutama untuk mendeteksi adanya gugus 7-hidroksil bebas.  $\text{AlCl}_3$  digunakan untuk mendeteksi kedua gugus hidroksil dan keton yang bertetangga (Markham, 1988: 47).

