



Penelusuran Senyawa

Tumbuhan Cengkeh

Mohamad Adam Mustapa, S.Si., M.Sc



Editor:
Mu'thi Andy Suryadi, M.farm., Apt
Muhamad Taupik, S.Si., M.Sc

PENELUSURAN SENYAWA TUMBUHAN CENGKEH

Mohamad Adam Mustapa, S.Si., M.Sc.

PENELUSURAN SENYAWA TUMBUHAN CENGKEH

Mohamad Adam Mustapa, S.Si., M.Sc.

Editor:

Mu'thi Andy Suryadi, M.farm., Apt
Muhamad Taupik, S.Si., M.Sc

Diterbitkan oleh
Media Madani

Hak Cipta Dilindungi oleh Undang-Undang

Dilarang mengutip atau memperbanyak sebagian atau seluruh isi buku ini tanpa izin tertulis dari penerbit. Isi diluar tanggung jawab percetakan

Undang-Undang Republik Indonesia Nomor 28 Tahun 2014 Tentang Hak Cipta

Fungsi dan Sifat Hak Cipta

Pasal 2

1. Hak Cipta merupakan hak eksekutif bagi pencipta dan pemegang Hak Cipta untuk mengumumkan atau memperbanyak ciptaannya, yang timbul secara otomatis setelah suatu ciptaan dilahirkan tanpa mengurangi pembatasan peraturan perundang-undangan yang berlaku.

Hak Terkait Pasal 49:

1. Pelaku memiliki hak eksekutif untuk memberikan izin atau melarang pihak lain yang tanpa persetujuannya membuat, memperbanyak, atau menyiarkan rekaman suara dan/atau gambar pertunjukannya.

Sanksi Pelanggaran Pasal 72

1. Barangsiapa dengan sengaja dan tanpa hak melakukan perbuatan sebagaimana dimaksud dalam pasal 2 ayat (1) atau pasal 49 ayat (2) dipidana dengan pidana penjara masing-masing paling singkat 1 (satu) bulan dan/atau denda paling sedikit Rp.1.000.000,00,- (satu juta rupiah), atau pidana penjara paling lama 7 (tujuh) tahun dan/atau denda paling banyak Rp.5.000.000.000,00,- (lima milyar rupiah)
2. Barangsiapa dengan sengaja menyiarkan, memamerkan, mengedarkan, atau menjual kepada umum suatu ciptaan atau barang hasil pelanggaran Hak Cipta sebagaimana dimaksud dalam ayat (1), dipidana dengan pidana penjara paling lama lima (5) tahun dan/atau denda paling banyak Rp. 500.000.000,00,- (lima ratus juta rupiah).

PENELUSURAN SENYAWA TUMBUHAN CENGKEH

Penulis

Mohamad Adam Mustapa, S.Si., M.Sc.

Editor

Mu'thi Andy Suryadi, M.farm., Apt
Muhamad Taupik, S.Si., M.Sc

Lay Out & Design Sampul

Media Madani

Perpustakaan Nasional RI
Katalog Dalam Terbitan (KDT)

Cetakan 1, Mei 2020

xii+ 140 hlm,; 13 x 20 cm

Penerbit & Percetakan

Media Madani

Jl. Syekh Nawawi KP3B Palima Curug Serang-Banten email:

media.madani@yahoo.com media.madani2@gmail.com

Telp. (0254) 7932066; Hp (087771333388)

ISBN. 978-602-0736-73-0

KATA PENGANTAR

Indonesia merupakan salah satu Negara yang memiliki keanekaragaman tumbuhan didunia, sebanyak 40.000 jenis flora yang ada didunia, 30.000 jenis dapat dijumpai di Indonesia dan 940 diantaranya diketahui memiliki banyak manfaat dan kegunaanya besar bagi manusia . Kekayaan alam di Indonesia sangat melimpah, terutama kekayaan floranya yang memiliki banyak ragam, jenis dan memiliki manfaat yang besar bagi kehidupan manusia terutama sebagai sumber makanan dan obat-obatan. Dalam tanaman ada banyak komponen kimia yang dapat dimanfaatkan sebagai bahan obat tradisional yang sudah banyak dimanfaatkan oleh nenek moyang dahulu untuk mengobati berbagai macam penyakit.

Salah satu tanaman yang mengandung senyawa obat yaitu cengkeh (*Syzygium aromaticum* Tanaman cengkeh merupakan tanaman perkebunan/ industri yang banyak ditemukan dikawasan tengah dan timur Indonesia, misalnya Gorontalo. Tanaman yang termasuk dalam family Myrtaceae ini banyak ditemukan didataran rendah dengan ketinggian 200-900 meter diatas permukaan laut dan tinggi dari tanaman cengkeh dapat mencapai 5-10 meter. Cengkeh merupakan tanaman rempah yang sejak lama digunakan dalam industry makanan, minuman, dan obat-obatan.

Tanaman cengkeh juga digunakan sebagai bahan membuat dupa, aroma terapi dan sebagai bahan utama rokok kretek khas Indonesia.

Buku ini merupakan implementasi penulis dari penelitian Bersama mahasiswa untuk mengidentifikasi dan menganalisis tanaman cengkeh yang mengandung suatu senyawa yang sangat bermanfaat sebagai obat.

Dengan kesadaran kami sebagai penulis maka perlu dilakukan pembenahan demi kesempurnaan dari isi buku ini. Dan tentunya kami sebagai penulis mengucapkan banyak terima kasih kepada penerbit buku ini, semoga amal bakti kita semua akan di ridhai, di berkahi dan di rahmati oleh Allah SWT.

Gorontalo, Mei 2020

Penulis

DAFTAR ISI

KATA PENGANTAR	vii
DAFTAR ISI	ix

TOPIK 1

Isolasi Dan Identifikasi Senyawa Flavonoid Ekstrak
Metanol bunga cengkeh dengan menggunakan
metode Lc-ms (Liquid Cromatography-Mass Spektra)

BAGIAN 1

PENGENALAN TANAMAN SENYAWA.....	1
1. Flavonoid.....	3
2. Manfaat Flavonoid	4
3. Struktur Flavonoid dan Penggolongan Flavonoid.....	4
4. Senyawa Kuarsetin.....	6
5. Skrining Fitokimia	8
6. Kromatografi Lapis Tipis.....	11
7. Kromatografi Cair Vakum.....	14
8. LC-MS (<i>Liquid Cromatograph-tandem- Mass Spectormetry</i>).....	15

BAGIAN 2

ISOLASI SENYAWA FLAVONOID	23
1. Ekstraksi Maserasi.....	23
2. Uji Skrining Fitokimia.....	23
3. Fraksinasi.....	25

4. Kromatografi Lapis Tipis.....	25
5. Kromatografi Cair Vakum.....	26
6. Identifikasi Menggunakan Spektrometer LC-MS.....	27
7. Penyajian dan Analisis Data	27

BAGIAN 3

PENENTUAN HASIL SENYAWA	29
-------------------------------	----

BAGIAN 4

PENGUJIAN DAN PEMBAHASAN	35
--------------------------------	----

DAFTAR PUSTAKA	55
----------------------	----

TOPIK 2

Analisis Kadar Senyawa Flavonoid Ekstrak Metanol Bunga Cengkeh Dengan Menggunakan Spektrofotometri Uv-Vis

BAGIAN 1

PENDAHULUAN.....	65
------------------	----

BAGIAN 2

TANAMAN CENGKEH	67
A. Tanaman Cengkeh (<i>Syzygium aromaticum</i> (L.) Merr. & Perry).....	67
B. Morfologi.....	68
C. Kandungan Kimia	69
D. Khasiat	70
E. Flavonoid.....	70
F. Struktur Flavonoid	72
G. Jenis-Jenis Flavonoid.....	73

H. Khasiat Senyawa Flavonoid	74
I. Kuarsetin	75
J. Antioksidan.....	77
K. Antioksidan Menurut Mekanisme Kerjanya.....	77
L. Jenis-jenis Antioksidan	78
M. Hubungan Antara Xantin Oksidase dan Antioksidan.....	79
N. Ekstraksi/ Maserasi.....	80
O. Skrining Fitokimia	81
P. Kromatografi Lapis Tipis (KLT)	82
Q. Keuntungan Kromatografi Lapis Tipis (KLT).....	83
R. Spektrofotometri.....	86
S. Validasi Metode Analisis.....	92

BAGIAN 3

PREPARASI TANAMAN

A. Preparasi Sampel	101
B. Ekstraksi Bunga Cengkeh (<i>Syzygium aromaticum</i>).....	101
C. Analisis Kualitatif.....	102
D. Analisis Kuantitatif	103
E. Validasi Metode Analisis.....	105

BAGIAN 4

PENGUJIAN TANAMAN CENGKEH 107 |

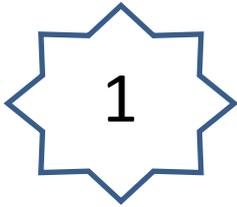
BAGIAN 5

ANALISIS KADAR TANAMAN	111
A. Ekstraksi dan Fraksinasi.....	111
B. Skrining Fitokimia	113
C. Identifikasi dengan Kromatografi	

Lapis Tipis (KLT).....	114
D. Penetapan Kadar Flavonoid dalam Ekstrak Metanol Bunga Cengkeh	116
DAFTAR PUSTAKA	119
LAMPIRAN	127

TOPIK 1

Isolasi Dan Identifikasi Senyawa Flavonoid
Ekstrak Metanol bunga cengkeh dengan
menggunakan metode Lc-ms
(Liquid Chromatography-Mass Spektra)



PENGENALAN TANAMAN SENYAWA

Penggunaan tanaman obat untuk suatu penyakit didasarkan pengalaman yang secara turun- menurun diwariskan oleh generasi terdahulu. Indonesia merupakan negara tropis yang dikenal kaya dengan keanekaragaman hayati, termasuk di dalamnya kekayaan berbagai jenis tumbuhan diketahui memiliki manfaat sebagai obat tradisional. Pemanfaatan tumbuhan sebagai obat dalam pengobatan tradisional telah dikenal oleh masyarakat Indonesia karena diyakini memiliki efek penyembuhan terhadap suatu penyakit. Obat tradisional yang merupakan kekayaan Indonesia perlu dilestarikan dan ditingkatkan kualitasnya melalui pemanfaatan ilmu pengetahuan dan teknologi (Sumaryono, 1996).

Berbagai jenis keanekaragaman hayati yang dimanfaatkan sebagai obat tradisional salah satunya adalah bunga cengkeh (*Syzygium aromaticum* (L.) Merr & Perr). Indonesia dikenal sebagai negara penghasil dan sekaligus sebagai konsumen cengkeh terbesar di dunia (Nurdjannah, 2004). Cengkeh (*Syzygium aromaticum*) termasuk family myrtaceae dan merupakan salah satu tanaman asli Indonesia yang berasal dari kepulauan Maluku (Mu'nisa, 2012). Cengkeh merupakan jenis tumbuhan perdu yang memiliki batang pohon besar dan berkayu keras, cengkeh dapat bertahan hidup puluhan bahkan sampai ratusan tahun, tinggi tumbuhan cengkeh dapat mencapai 20-30 meter dan cabang-

Pengenalan Tanaman Senyawa

cabangnya cukup lebat (Thomas, 2007).

Penggunaan bunga cengkeh secara tradisional dimanfaatkan dalam menyembuhkan berbagai macam penyakit seperti rematik, asam urat tinggi, batuk, masuk angin, gangguan lambung, nyeri dada dan perut serta sakit gigi (Heming, 2006). Khasiat bunga cengkeh dalam menyembuhkan penyakit disebabkan oleh adanya pemisahan kandungan kimia dari serbuk bunga, tangkai bunga dan daun cengkeh yang menunjukkan bahwa serbuk bunga dan daun cengkeh mengandung saponin, tannin, alkaloid, glikosida dan flavonoid. Sedangkan tangkai bunga cengkeh mengandung saponin, tannin, glikosida dan flavonoid (Ferdinanti, 2001). Penelitian Kumar dkk (2012), menyebutkan bahwa cengkeh mempunyai banyak khasiat diantaranya sebagai antibakteri, antivirus, antifungi, antiplatelet, antikanker, antihistamin dan antioksidan. Berdasarkan hasil penelitian yang telah dilakukan Prianto, (2013) mengenai isolasi minyak atsiri dalam bunga cengkeh, minyak bunga cengkeh mengandung eugenol 81,2%, trans-karyofilen 3,92%, alfa-humulene 0,45%, eugenil asetat 12,43 %, karyofilen oksida 0,25 % dan trimeoksiasetofenon 0,53%.

Menurut Mostafa (1991), cengkeh merupakan tanaman yang dapat dimanfaatkan untuk pengobatan tradisional, karena pada bunga cengkeh mengandung flavonoid, tannin, asam olenolat, asam galotانات, saponin, eugenol. Salah satu kandungan senyawa kimia bunga cengkeh adalah flavonoid. Flavonoid merupakan salah satu golongan fenol alam yang tersebar jumlahnya. Tumbuhan yang mengandung flavonoid dapat digunakan untuk pengobatan sitotoksis, gangguan fungsi hati, menghambat pendarahan, antioksidan, antihipertensi dan anti inflamasi (Robinson, 1995). Flavonoid mempunyai sifat khas yaitu bau yang sangat tajam, rasanya pahit, dapat larut dalam air dan pelarut organik, serta terurai pada temperatur tinggi (Faqihhudin, 2014). Flavonoid berpotensi sebagai antioksidan dan mempunyai

Penelusuran Senyawa Tumbuhan Cengkeh

aktivitas sebagai antibakteri, antiinflamasi, antialergi dan antithrombosis (Lipinski, 2011).

Kandungan kimia yang terdapat pada cengkeh adalah saponin, tannin, alkaloid, glikosida, flavonoid dan minyak atsiri. Minyak atsiri pada bagian bunga sekitar 14-21 % dengan kadar eugenol 78-95 % (Hadi, 2012). Bunga cengkeh mengandung Alkaloid, Glycosida, Flavonoid, Fenol, Saponin, Tanin Dan Terpenoid (Ahmed, 2016). Bunga cengkeh berkualitas baik mengandung minyak esensial 1-20%. Minyak didominasi oleh eugenol (70-85) %, eugenil asetat (15%) dan P-caryophyllene (5-12 %), yang membentuk 99% minyak. Ko diidentifikasi 36 senyawa dari minyak atsiri dalam cengkeh (Pino, 2001).

1. Flavonoid

Flavonoid merupakan senyawa polar karena memiliki sejumlah gugus hidroksil yang tidak tersubstitusi. Pelarut polar seperti etanol, metanol, etilasetat atau campuran dari pelarut tersebut dapat digunakan untuk mengekstrak flavonoid dari jaringan tumbuhan (Rijke, 2005). Flavonoid adalah senyawa yang terdiri dari 15 atom karbon yang umumnya tersebar didunia tumbuhan. Flavonoid yang tersebar luas ditanaman mempunyai banyak fungsi. Flavonoid adalah pigmen tanaman untuk memproduksi warna bunga merah atau biru pigmentasi kuning pada kelopak yang digunakan untuk menarik hewan penyerbuk. Flavonoid terdapat pada semua bagian tumbuhan termasuk akar, buah, daun dan kulit luar batang (Worotikan, 2011).

Flavonoid berupa senyawa polifenol, sehingga mempunyai sifat kimia seperti fenol. Adanya gula yang terikat pada aglikon akan menaikkan kepolaran dari flavonoid. Senyawa polar akan larut dalam pelarut polar, oleh karena itu glikosida flavonoid larut dalam pelarut polar (Mursyidi, 1990).

2. Manfaat Flavonoid

Manfaat flavonoid antara lain untuk melindungi struktur sel, meningkatkan efektifitas vitamin C, antiinflamasi, mencegah keropos tulang dan sebagai antibiotic (Haris, 2011). Menurut Patel (2008) kegunaan flavonoid adalah sebagai antioksidan, antiarterosklerosis, antiplatelet, antitrombogenik, antivirus, antiinflamasi, antiarthritis, antidiare. Menurut Kumar (2011), flavonoid memiliki berbagai aktifitas biologis yaitu antiinflamasi, antibakteri, antivirus, anti alergi, antitumor sitotoksik, pengobatan penyakit neurodegeneratif dan vasodilator. Selain itu flavonoid juga menghambat peroksidasi lipid, aggrerasi platelet, permeabilitas dan kerapuhan kapiler, siklooksigenase dan aktivitas enzim lipooksigenase.

Flavonoid banyak terdapat pada jaringan epidermis daun dan kulit buah dengan kegunaan yang bervariasi dan bersifat penting. Pada tumbuhan, flavonoid berguna sebagai pelindung sinar UV, pigmentasi, stimulasi pembentukan nitrogen di nodul dan ketahanan terhadap penyakit. Flavonoid dalam tubuh mempunyai aktivitas yang bermacam-macam yaitu sebagai diuretic, anti virus, antihistamin, antihipertensi, dan bakteriostatik (Retnowati, 2009).

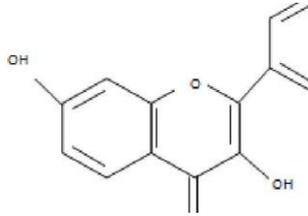
3. Struktur Flavonoid dan Penggolongan Flavonoid

Flavonoid merupakan bioaktif polifenol yang memiliki beratmolekul rendah yang berperan penting dalam fotosintesis sel. Flavonoid merupakan metabolit sekunder yang ditandai dengan inti flavon dan kerangka karbon C₆- C₃-C₆. Ciri struktur dasar flavonoid adalah inti 2-fenil-benzo-γ-pyrane yang terdiri dari dua cincin benzena (A dan B) yang dihubungkan melalui cincin pyran heterosiklik (Kumar, 2011). Struktur Flavonoid ditunjukkan pada Gambar 2.2.

Penelusuran Senyawa Tumbuhan Cengkeh

Oh

OH



O

Gambar 2.2 Struktur Senyawa Flavonoid (Robinson, 1995)

Perbedaan flavonoid terletak pada susunan hidroksil, metoksi dan gugus samping glikosidik dan dalam hubungannya antara cincin A dan B. Pembagian flavonoid berdasarkan variasi susunan pada cincin C (Kumar, 2011). Jenis utama flavonoid adalah antosianidin, flavonol, flavon, flavanon, dan isoflavon (Spencer dkk., 2003).

Menurut Retnowati (Lenny, 2006) sebagian besar senyawa flavonoid ditemukan dalam bentuk glikosida, dimana unit flavonoid terikat pada suatu alkohol yang saling berikatan melalui ikatan glikosida. Flavonoid dapat ditemukan sebagai mono-, di-, atau triglikosida dimana satu, dua, atau tiga gugus hidroksil dalam molekul flavonoid terikat oleh gula. Penggolongan jenis flavonoid dalam jaringan tumbuhan mula-mula didasarkan kepada telaah sifat kelarutan dan reaksi warna. Kemudian diikuti dengan pemeriksaan ekstrak tumbuhan yang telah dihidrolisis, secara kromatografi satu arah, dan pemeriksaan ekstrak etanol secara dua arah. Akhirnya, flavonoid dapat

Pengenalan Tanaman Senyawa

dipisahkan dengan cara kromatografi. Komponen masing-masing diidentifikasi dengan membandingkan kromatografi dan spectrum, dengan memakai senyawa pembanding yang sudah dikenal. Senyawa baru yang telah ditemukan sewaktu menelaah memerlukan pemeriksaan kimia dan spectrum yang lebih terinci (Harborne, 1996).

Struktur berbagai tipe atau golongan flavonoid bervariasi sesuai dengan kerangka dasar heterosiklik beroksigen yang dapat berupa gama piron, piron atau pirilium. Kecuali pada auron dan khalkon, siklisasi terjadi antara atom karbon didekat cincin benzene (B) dan satu gugus hidroksil cincin A. kelas-kelas yang berlainan di flavonoid dibedakan berdasarkan cincin heterosiklik oksigen dan juga hidroksil yang tersebar menurut pola yang berlainan (Robinson, 1991).

4. Senyawa Kuarsetin

Senyawa kuarsetin merupakan golongan flavonol yang paling banyak terdapat dalam tanaman yang merupakan senyawa paling aktif dibandingkan senyawa lain dari golongan flavonol (Fuhrman dan Aviram, 2003). Kuarsetin mampu menghambat oksidasi LDL dengan cara mengkhelat ion tembaga, yang dapat menginduksi dari LDL (Fuhrman dan Aviram, 2003). Kuarsetin merupakan suatu zat yang termasuk dalam golongan flavonol. Flavonol merupakan salah satu dari enam subgolongan flavonoid. Kuarsetin merupakan flavonoid yang secara luas tersebar pada tumbuhan (Kelly, 2010).

Kuarsetin diketahui sangat berperan dalam berbagai efek biologis yaitu sebagai antioksidan dengan menangkap radikal bebas, antikanker, antiviral, mencegah arterosklerosis dan mencegah inflamasi kronis (Coneac dkk., 2009).

Penelusuran Senyawa Tumbuhan Cengkeh

Kuarsetin merupakan golongan flavonoid dilaporkan menunjukkan beberapa aktivitas biologis. Aktivitas ini dikaitkan dengan sifat antioksidan kuarsetin, antara lain karena kemampuan menangkap radikal bebas dan spesi oksigen reaktif seperti superoksida dan radikal hidroksil (Morikawa dkk, 2003).

Metode

Isolasi

Senyawa

Ekstraksi

Maserasi

Ekstraksi adalah suatu proses pemisahan kandungan kimia dari jaringan tumbuhan ataupun hewan dengan menggunakan penyari tertentu (Simanjuntak, 2008). Metode ekstraksi tergantung pada polaritas senyawa yang akan diekstrak. Bahan dan senyawa kimia akan mudah larut pada pelarut yang relatif sama kepolarannya. Ekstraksi biasanya menggunakan pelarut organik secara berurutan dengan kepolaran yang semakin meningkat. Pelarut heksana, eter, petroleum eter, dan kloroform digunakan untuk mengambil senyawa dengan kepolaran rendah sedangkan pelarut yang lebih polar misalnya alkohol dan etil asetat digunakan untuk mengambil senyawa yang lebih polar (Rusdi, 1990). Prinsip kelarutan yang dipakai adalah like dissolve like artinya pelarut polar akan melarutkan senyawa polar dan pelarut non polar akan melarutkan senyawa non polar (Khopkar, 2008).

Maserasi merupakan metode yang sederhana yang paling banyak digunakan. Cara ini sesuai baik untuk skala kecil maupun skala industri (Agoes, 2007). Metode ini digunakan untuk mengekstrak suatu komponen kimia yang tahan panas maupun tidak. Kekurangan dari metode ini yaitu diperlukan waktu yang lama dan banyak menggunakan larutan pengekstrak (Akbar,

2010).

Pemilihan pelarut untuk proses maserasi akan memberikan efektivitas yang tinggi dengan memperhatikan kelarutan senyawa bahan alam dalam pelarut tersebut. Secara umum pelarut-pelarut golongan alcohol merupakan pelarut yang paling banyak digunakan dalam proses isolasi senyawa organik bahan alam, karena dapat melarutkan senyawa metabolit sekunder (Lenny, 2006).

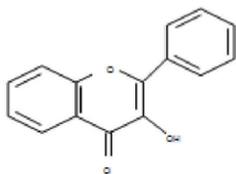
Perendaman suatu bahan alam dalam pelarut dapat meningkatkan permeabilitas dinding sel ke dalam dinding sel tanaman dan membengkakan sel, kemudian senyawa yang terdapat dalam dinding sel akan terlepas dan masuk kedalam pelarut, diikuti oleh difusi senyawa yang terkestraksi oleh pelarut dari dinding sel tanaman (Supriadi, 2008).

5. Skrining Fitokimia

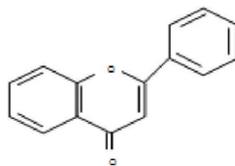
Skrining fitokimia merupakan tahap pendahuluan dalam suatu penelitian fitokimia yang bertujuan untuk memberikan gambaran tentang golongan senyawa yang terkandung dalam tanaman yang sedang diteliti. Metode skrining fitokimia dilakukan dengan melihat reaksi pengujian warna dengan menggunakan suatu pereaksi warna. Hal penting yang berperan penting dalam skrining fitokimia adalah pelarut dan metode ekstraksi (Krsitanti dkk., 2008).

Menurut Siedel (2008), pemilihan pelarut dan metode ekstraksi akan mempengaruhi hasil kandungan senyawa metabolit sekunder yang dapat terekstraksi. Skrining fitokimia dilakukan untuk memberikan gambaran tentang golongan senyawa yang terkandung dalam tanaman yang diteliti. Metode skrining fitokimia dilakukan dengan pengujian warna dengan menggunakan suatu pereaksi warna (Widayanti dkk., 2009).

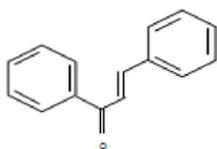
Penelusuran Senyawa Tumbuhan Cengkeh



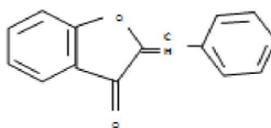
Flavon



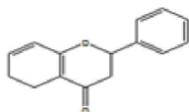
Flavonol



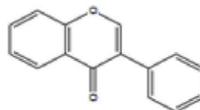
Isoflavones



Flavanones



Khalkon



Auron

Uji pendahuluan golongan flavonoid dilakukan dengan pereaksi spesifik. Jenis pereaksi dan golongan flavonoid akan menghasilkan warna tertentu dapat dilihat pada Tabel 2.1

Tabel 2.1

Identifikasi Senyawa Golongan Flavonoid (Harborne, 2006)

Golongan	Reaksi Warna			
	NaOH	H ₂ SO ₄	Mg-HCl	Na-
Flavonoid		Pekat		amalgamit
				HCl
Kalkon	Jingga, Merah	Jingga, Merah magenta		Kuning Muda
Dihidrosi kalkon	Takberwarna	Tak berwarna- kuning muda		
Auron	Merah-Ungu	Merah Magenta	Merah magenta,	Kuning muda
Flavon	Kuning	Jingga-Merah tua	Kuning	Merah
Flavon	Kuning	Kuning-jingga	Merah- magenta	Merah
Flavonol	Kuning- jingga	Kuning-jingga	Merah, merah	Kuning- merah
Leukoantosiani n , antosianin,	Kuning biru- ungu	Merah tua- kuning-jingga		Pink, kuning,
Katekin	Kuning- merah coklat	Merah	Kuning	
Isoflavon	Kuning	Kuning	Merah magenta,	

6. Kromatografi Lapis Tipis

Kromatografi merupakan metode pemisahan yang berbeda dengan cara pemisahan yang berkadar kimia dan fisika atau pemisahan cair-cair, pemisahan yang terjadi pada kromatografi menggunakan dua fase yang tidak tercampur tetapi selalu dalam satu system yang bercampur, yang dinamakan fase diam dan fase gerak yang umumnya berupa zat padat atau zat cair yang didukung oleh zat padat (Sumarno, 2001).

Kromatografi lapis tipis merupakan suatu teknik pemisahan dengan menggunakan adsorben (fase stasioner) berupa lapisan tipis seragam yang disalutkan pada permukaan bidang datar berupa lempeng kaca, pelat aluminium atau pelat plastic. Pengembangan kromatografi terjadi ketika fase gerak tertapis melewati adsorben (Deinstrop, 2007).

Kromatografi lapis tipis hanya membutuhkan penyerap dan cuplikan dalam jumlah sedikit, waktu yang digunakan untuk mengidentifikasi dengan metode ini lebih cepat dibandingkan dengan metode lain sehingga lebih efektif dan hasil yang diperoleh lebih akurat (Sumarno, 2001).

Penggunaan kromatografi lapis tipis memiliki beberapa keuntungan yaitu pemisahan dapat dilakukan dengan cepat, zat-zat bersifat asam atau basa kuat dapat digunakan, analisis dapat dilakukan lebih sensitif dengan alat sederhana sehingga penggunaannya mudah. Selain itu metode ini sederhana, cepat dalam pemisahan, sensitif dan mudah untuk memperoleh kembali senyawa-senyawa yang terpisahkan (Khopkar, 2002).

Kromatografi lapis tipis ini dikembangkan tahun 1938 oleh Ismailoff dan Schraiber. Adsorben dilapiskan pada lempeng kaca yang bertindak sebagai penunjang fase diam. Fase bergerak

Pengenalan Tanaman Senyawa

akan menyerap sepanjang fase diam dan terbentuklah kromatogram. Ini dikenal juga sebagai kromatografi kolom terbuka. Metode ini sederhana, cepat dalam pemisahan dan sensitif, kecepatan tinggi dan mudah untuk memperoleh kembali senyawa-senyawa yang terpisahkan (Khopkar, 1990).

Dengan memakai kromatografi lapis tipis, pemisahan senyawa yang amat berbeda seperti senyawa organik alam dan senyawa organik sintetik, kompleks anorganik-organik, dan bahkan ion anorganik, dapat dilakukan dalam beberapa menit dengan alat yang harganya tidak terlalu mahal. Jumlah cuplikan serendah beberapa mikrogram atau setinggi 5 g dapat ditangani, bergantung pada alat yang ada dan gejala kromatografi yang terlibat. Kelebihan kromatografi lapis tipis yang lain ialah pemakaian pelarut dan cuplikan yang jumlahnya sedikit, kemungkinan penotolan cuplikan berganda (saling membandingkan langsung cuplikan praktis), dan tersedianya berbagai metode (seperti kromatografi cair padat, kromatografi cair-cair dan kromatografi eksklusif) (Gritter dan Schwarting, 1991).

Beberapa istilah yang digunakan dalam kromatografi lapis tipis. Fase diam pada kromatografi lapis tipis berupa fase yang polar (fase normal) seperti: silika gel, alumina (aluminium oksida), kieselguhr, magnesium silikat dan selulose, maupun fase non polar (fase terbalik) seperti: fase diam dari silika dan resin. Fase gerak baik tunggal maupun campuran pemilihannya tergantung pada solut yang dianalisis dan fase diam yang digunakan. Bila fase telah ditentukan maka memilih fase gerak dapat berpedoman pada kekuatan elusi fase gerak tersebut. Bila fase diam telah ditentukan maka memilih fase gerak dapat berpedoman pada kekuatan elusi fase gerak tersebut (Sumarno, 2001). Titik tempat campuran ditotolkan pada ujung pelat atau lembaran disebut titik awal dan cara menempatkan cuplikan

Penelusuran Senyawa Tumbuhan Cengkeh

disebut penotolan. Garis depan pelarut adalah bagian atas fase atau pelarut ketika ia bergerak melalui lapisan, dan setelah pengembangan selesai, merupakan tinggi maksimum yang dicapai oleh pelarut (Gritter dan Schwarting, 1991)

Identifikasi dari senyawa-senyawa yang terpisah pada lapis tipis diperoleh dengan harga faktor retensi (R_f) yaitu dengan membandingkan jarak yang ditempuh oleh senyawa terlarut dengan jarak tempuh pelarut (Palleros, 2004).

Faktor-faktor yang mempengaruhi gerakan dalam kromatografi lapis tipis yang juga mempengaruhi harga R_f (Sastrohamidjojo, 1991):

1. Struktur kimia dari senyawa yang dipisahkan
2. Sifat dari fase diam
3. Tebal dan kelarutan dari fase diam
4. Pelarut fase gerak
5. Kejenuhan dari uap dalam bejana pengimbangan
6. Jumlah cuplikan yang digunakan
7. Suhu

Beberapa keuntungan lain kromatografi lapis tipis adalah (Gandjar dan Rohman, 2007):

1. Kromatografi lapis tipis banyak digunakan untuk tujuan analisis.
2. Identifikasi pemisahan komponen dapat dilakukan dengan pereaksi warna, fluoresensi, atau dengan radiasi menggunakan sinar ultraviolet.
3. Dapat dilakukan elusi secara mekanik (ascending), menurun (descending) atau dengan cara elusi dua dimensi.
4. Ketepatan penentuan kadar akan lebih baik karena komponen yang akan ditentukan merupakan bercak yang tidak bergerak

Pengenalan Tanaman Senyawa

Nilai utama KLT pada penelitian flavonoid adalah sebagai cara analisis cepat yang memerlukan bahan sangat sedikit, KLT menurut Markham (1988), berguna untuk tujuan:

1. Mencari fase gerak untuk kromatografi kolom
2. Analisis fraksi yang diperoleh dari kromatografi kolom
3. Menyigi arah atau perkembangan reaksi seperti hidrolisis atau metilasi
4. Identifikasi flavonoid secara ko-kromatografi Isolasi flavonoid murni skala kecil

7. Kromatografi Cair Vakum

Salah satu metode pemisahan senyawa dalam jumlah besar adalah menggunakan kromatografi cair vakum atau kromatografi kolom fasa diam yang digunakan dapat berupa silika gel, selulosa atau poliamida. Sedangkan fase geraknya dapat dimulai dari pelarut tunggal ataupun kombinasi dua pelarut yang berbeda kepolarannya dengan perbandingan tertentu sesuai tingkat kepolaran yang dibutuhkan (Stahl, 1969).

- i. Pada kolom kromatografi, campuran yang akan dipisahkan diletakkan berupa pita pada bagian atas kolom penjerap yang berada dalam tabung kaca, tabung logam atau bahkan tabung plastik. Pelarut dibiarkan mengalir melalui kolom karena aliran yang disebabkan oleh gaya berat atau didorong dengan tekanan. Pita senyawa pelarut bergerak melalui kolom dengan laju yang berbeda, memisah dan dikumpulkan berupa fraksi yang keluar dari atas kolom (Gritter, 1991).

8. LC-MS (Liquid Chromatograph-tandem- Mass Spectrometry)

Spektroskopi massa berbeda dengan metode spektroskopi lain. Dalam spectrometer ini, suatu sampel dalam keadaan gas ditabrak atau ditembak dengan electron berenergi tinggi. Penembakan tersebut menyebabkan lepasnya sebuah electron dari molekul sampel dan membentuk suatu ion organik. Ion yang dihasilkan oleh penembakan electron berenergi tinggi tersebut tidak stabil dan pecah menjadi fragmen kecil, baik berbentuk radikal bebas maupun ion-ion lain. Dalam sebuah spektrometer massa yang khas, fragmen yang bermuatan positif akan dideteksi (Supratman, 2010).

Prinsip kerja spektrofotometri massa adalah menembak bahan yang sedang dianalisis dengan berkas electron dan secara kuantitatif mencatat hasilnya sebagai suatu spectrum fragmen ion positif. Fragmen-fragmen tersebut berkelompok sesuai dengan massanya (Yasmin dkk., 2008).

Spektrum massa adalah alur kelimpahan jumlah relative fragmen bermuatan positif berlainan terhadap mass ape muatan (m/z atau m/e) dari fragmen-fragmen tersebut. Muatan ion dari sampel yang dideteksi dalam suatu spectrometer massa adalah +1, maka nilai m/z sama dengan massa molekulnya (M). suatu molekul atau ion dari suatu sampel akan pecah menjadi fragmen-fragmen bergantung pada kerangka karbon dan gugus fungsional yang ada. Oleh karena itu, struktur dan massa fragmen memberikan petunjuk mengenai struktur molekul induknya dan dapat pula menentukan bobot molekul suatu senyawa dari spectrum massanya (Supratman, 2010).

LC-MS adalah salah satu teknik kimia yang menggabungkan kemampuan pemisahan fisik dari kromatografi cair dengan kemampuan analisis spectrometer massa. LC-MS merupakan satu-satunya teknik kromatografi cair dengan

Pengenalan Tanaman Senyawa

detector spectrometer massa. Kelebihan dari teknologi LC-MS yaitu : Hasil analisis yang khas dan spesifik diperoleh dari penggunaan spectrometer massa sebagai detector, aplikasi yang luas dengan system yang praktis karena penerapan LC-MS tidak terbatas untuk molekul volatile (biasanya dengan berat molekul dibawah 500 Da), mampu mengatur analit yang sangat polar, selain itu persiapan sampel cukup sederhana tanpa adanya teknik derivatisasi pengujian yang berbeda dapat dikembangkan dengan tingkat fleksibilitas yang tinggi dan waktu yang singkat (Ginting, 2012).

Spektrrofotometer massa bekerja dengan membangkitkan molekul-molekul bermuatan atau fragmen-fragmen molekul baik dalam keadaan sangat hampa atau segera sebelum sampel memasuki ruangan sangat hampa. Molekul terionisasi harus dibangkitkan dalam fase gas, molekul-molekul tersebut dapat dimanipulasi dengan penerapan medan listrik atau medan magnet agar dapat menentukan bobot molekulnya dan bobot molekul semua fragmen yang dihasilkan dari pemecah molekul (Watson, 2009).

Penggunaan LC-MS/MS untuk penelitian dimulai pada akhir 1980-an. Kelebihan dari teknologi LC-MS/MS meliputi:

1. Spesifitas. Hasil analisis yang khas dan spesifik diperoleh dari penggunaan spektrofotometer massa sebagai detector
2. Aplikasi yang luas dengan system prkatis. Berbeda dengan GC-MS sebagai spectrometer masa "klasik", penerapan LC-MS/MS tidak terbatas untuk molekul volatile (biasanya dengan berat molekul dibawah 500 Da). Mampi mengukur analit yang sangat polar, selain itu persiapan sampel cukup sederhana tanpa adanya derivatisasi.

Penelusuran Senyawa Tumbuhan Cengkeh

3. Fleksibilitas. Pengujian yang berbeda dapat dikembangkan dengan tingkat fleksibilitas yang tinggi dan waktu yang singkat
4. Kaya informasi, Sejumlah data kuantitatif maupun kualitatif dapat diperoleh. Hal ini disebabkan seleksi ion yang sangat cepat dengan banyak parameter

Penelitian Relevan

Safita dan Suyatno (2016)

Meneliti tentang "isolasi senyawa flavonoid dari ekstrak diklorometana batang tumbuhan ashitaba (*Angelica keiskei*)" dengan hasil penelitian menunjukkan bahwa hasil analisis dengan *Liquid Chromatography* menunjukkan satu puncak pada kromatogram dengan waktu retensi 3,1 menit dan memberikan puncak ion semu (M+H)⁺ pada m/z 393. Dengan demikian isolat memiliki massa molekul relatif 392.

Berdasarkan hasil analisis data uji kualitatif dan spektroskopi (UV, IR, dan LC-MS) dapat disimpulkan bahwa senyawa fenolik hasil isolasi merupakan senyawa chalkon yaitu 2',4',4'-trihidroksi-3'-[(E)-3,7-dimetil-2,6-okta-dienil] chalkon atau xanthoangelol dengan rumus molekul C₂₅H₂₈O₄.

Keterkaitan dengan proposal yang akan dibuat yaitu metode yang dipakai, untuk mengekstraksi, mengisolasi, dan mengidentifikasi yaitu menggunakan maserasi, KLT, dan LC-MS. Yang membedakan dengan penelitian yang akan dibuat yaitu pada sampel tanaman yang diteliti, pada penelitian menggunakan sampel tanaman ekstrak diklorometana batang tumbuhan ashitaba.

Pengenalan Tanaman Senyawa

Normaidah (2015)

Meneliti tentang "isolasi dan elusidasi struktur senyawa penanda dari ekstrak meniran (*Phyllanthus niruri* L.)" dengan hasil penelitian menunjukkan bahwa salah satu senyawa yang diprediksi terkandung dalam fraksi 1.8 pada waktu retensi 0,86 menit merupakan senyawa alkaloid dengan rumus formula $C_{12}H_{15}NO_3$ yang memiliki BM 221,104989 g/mol, namun struktur kimia dari senyawa tersebut belum dapat diinterpretasikan.

Keterkaitan jurnal dengan penelitian yang akan dilakukan karena memiliki kesamaan dalam metode yaitu menggunakan kromatografi lapis tipis untuk mengisolasi suatu senyawa dan untuk identifikasi menggunakan Liquid Chromatography- Mass Spectrum (LC-MS). Yang membedakan jurnal ini dengan penelitian yang akan dilakukan adalah sampel yang digunakan, penelitian ini menggunakan sampel ekstrak meniran (*Phyllanthus niruri* L.), sedangkan penelitian yang akan dilakukan adalah bunga cengkeh. Pelarut yang digunakan pada fraksinasi juga berbeda.

Hamdika (2011)

Meneliti tentang "isolasi alkalifin dari daun anting- anting (*acalypha indica*) daerah bogor" dengan hasil penelitian menunjukkan bahwa Ekstrak kasar diperiksa secara kualitatif menggunakan LC- MS dan terdeteksi 12 senyawa dari m/z 300 sampai 400 yang memiliki kelimpahan di atas 20% . Data tersebut menunjukkan nilai m/z alkalifin dengan bobot molekul 360.2 g/mol positif ESI-MS pada m/z 360.3 [M]⁺ , kelimpahan senyawa tersebut sebesar 11%. Hungeling (2009) dalam penelitiannya berhasil mengidentifikasi alkalifin positif ESIMS pada m/z 360.3 [M]⁺ dan m/z 383.2 [M+Na]⁺ . Selain itu, ada m/z 361.2 [M+1] yang kemungkinan merupakan alkalifin juga, berdasarkan

Penelusuran Senyawa Tumbuhan Cengkeh

kelimpahan dari isotop atom C dan H, dengan kelimpahan 17%. Menurut Pavia et al. (2001) penambahan akibat isotop biasanya satu atau dua unit dari massa normal. Akalifin yang diisolasi dari daun dengan KLT preparatif terdapat pada fraksi 1 dan rendemennya sebesar 1.77%. Pencirian akalifin dengan LC-MS menunjukkan hasil positif m/z 360.3 [M]⁺.

Keterkaitan jurnal dengan proposal yang akan dibuat karena memiliki kesamaan dalam metode yaitu menggunakan kromatografi lapis tipis preparatif untuk mengisolasi suatu senyawa dan untuk mengidentifikasi menggunakan Liquid Chromatography- Mass Spectrum. Yang membedakan adalah sampel, dimana sampel dalam penelitian ini adalah Daun Anting-anting (*Acalypha indica*) sedangkan penelitian yang akan dibuat adalah bunga cengkeh.

Sitorus, dkk (2012)

Meneliti tentang "isolasi dan identifikasi senyawa flavonoid pada daun adam hawa (*rhoe discolor*)" dengan hasil penelitian menunjukkan bahwa a. Pada tanaman Adam Hawa (*Rhoe discolor*) terdapat senyawa flavanoid. Jenis senyawaflavanoid yang terdapat pada tanaman Adam Hawa (*Rhoe discolor*) yaitu antosianidin. Keterkaitan dengan proposal penelitian yaitu metode isolasi yang digunakan yaitu menggunakan Kromatografi Lapis Tipis dan Kromatografi Lapis Tipis Preparatif. Yang membedakan dengan proposal yang akan dibuat yaitu sampel tanaman yang akan dilakukan isolasi dan identifikasi, serta metode yang untuk mengidentifikasi. Pada proposal yang akan dibuat digunakan sampel bunga cengkeh dan untuk mengidentifikasi menggunakan metode LC-MS.

Pengenalan Tanaman Senyawa

Fitrya, dkk (2009)

Meneliti tentang "identifikasi flavonoid dari buah tumbuhan mempelas" dengan hasil penelitian menunjukkan hasil uji fitokimia memperlihatkan bahwa buah mempelas mengandung senyawa flavonoid. Spektrum massa untuk puncak dengan waktu retensi 20,377 menit memperlihatkan adanya puncak ion (M+1) pada m/z 285. Pecahan cincin A dan B pada senyawa flavon menghasilkan A1 m/z 182 dan B1 m/z 102. Hilangnya -CH₃ (massa 15) sehingga menghasilkan m/z 167 dari puncak m/z 182 mengindikasikan adanya pola oksigenasi -CH₃ pada senyawa flavon. Selain itu, muncul puncak dasar m/z 139 yang terbentuk dengan hilangnya molekul C=O (massa 28) dari puncak m/z 167. Hal ini lebih memperkuat dugaan bahwa terdapat gugus metoksi pada C8. Berdasarkan data-data spektroskopi dan dibandingkan dengan data pada literature dapat disimpulkan bahwa struktur senyawa flavonoid adalah 5,7-dihidroksi-8-metoksiflavon

Keterkaitan dengan proposal penelitian yaitu metode yang digunakan untuk mengidentifikasi senyawa yaitu menggunakan Kromatografi Lapis Tipis dan Mass Spektra. Yang membedakan dengan proposal yang akan dibuat yaitu sampel yang digunakan, untuk jurnal ini menggunakan sampel buah tumbuhan mempelas, sedangkan pada proposal yang akan dibuat menggunakan sampel bunga cengkeh.

Yanti (2014)

Meneliti tentang "isolasi dan identifikasi senyawa alkaloid dalam ekstrak daun sirsak hutan (*Annona glabra*).". Dengan hasil penelitian menunjukkan bahwa Ekstrak alkaloid total diperoleh sebanyak 0.95 g (0.1%) dari daun sirsak hutan. Pemisahan komponen alkaloid dengan metode kromatografi kolom dan KLT preparatif menghasilkan 3 noda alkaloid (D3, 1.05%; D4, 2.11%;

Penelusuran Senyawa Tumbuhan Cengkeh

D5, 1.48%). Berdasarkan hasil pencirian dengan LC-MS, spektrofotometer UV-Vis dan FTIR, noda D3 diduga merupakan senyawa arnepavina.

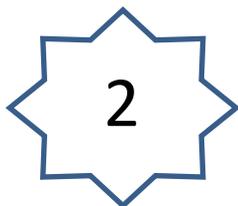
Keterkaitan jurnal dengan proposal yang akan dibuat karena memiliki kesamaan dalam metode yaitu menggunakan kromatografi lapis tipis untuk mengisolasi suatu senyawa dan untuk identifikasi menggunakan Liquid Chromatography- Mass Spectrum (LC-MS). Yang membedakan adalah sampel, dimana sampel dalam penelitian ini adalah Sirsak Hutan sedangkan penelitian yang akan dibuat adalah bunga cengkeh.

Chen, dkk (2012)

Meneliti tentang " *determination of phenolic acids and flavonoids in taraxacum formosanum ktm by liquid chromatography tandem mass spectrometry coupled with a post-column derivatization technique*" dengan hasil penelitian menunjukkan bahwa sebanyak 29 senyawa, termasuk 19 asam fenolik dan 10 flavonoid, dipisahkan dengan menggunakan kolom Gemini C18 dan fase gerak gradien 0,1% asam format dan asetonitril dengan laju alir pada 1,0 mL / menit dan deteksi pada 280 nm. Identifikasi dilakukan berdasarkan perilaku retensi serta karakteristik spektral penyerapan dan massa. Standar baku syringic acid untuk asam fenolik dan naringenin untuk flavonoid digunakan untuk kuantifikasi.

Keterkaitan dengan proposal yang akan dibuat yaitu metode yang dipakai untuk mengidentifikasi senyawa flavonoid yaitu menggunakan LC-MS. Yang membedakan dengan penelitian yang akan dibuat yaitu pada sampel tanaman yang diteliti, pada penelitian menggunakan sampel tanaman *Taraxacum formosanum* dan menggunakan HPLC untuk mengisolasi.

Pengenalan Tanaman Senyawa



2

ISOLASI SENYAWA FLAVONOID

1. Ekstraksi Maserasi

Sebanyak 200 g serbuk bunga cengkeh dimaserasi dengan menggunakan pelarut metanol sebanyak 1000 mL dalam wadah maserasi sambil diaduk dengan batang pengaduk selama kurang lebih 2 jam. Proses maserasi dilakukan selama 3 x 24 jam. Kemudian dilakukan penyaringan untuk mendapatkan filtrate (Ekstrak metanol) setelah itu diuapkan dengan *rotary evaporator* dengan suhu 50 °C sehingga diperoleh ekstrak kental metanol. Ekstrak kental yang diperoleh ditimbang dan dihitung rendamennya dengan menggunakan rumus sebagai berikut :

$$\% \text{ Rendamen ekstrak} = \frac{\text{Bobot ekstrak yang didapat (g)}}{\text{Bobot serbuk simplisia yang diekstraksi (g)}} \times 100\%$$

2. Uji Skrining Fitokimia

Uji ini dilakukan untuk mengetahui golongan senyawa kimia yang terkandung dalam sampel, meliputi uji alkaloid, flavonoid, saponin, tannin, terpenoid dan minyak atsiri.

1. Uji Alkaloid

Sebanyak 0,5 g ekstrak dilarutkan dengan etanol 96% kemudian ditambahkan asam klorida encer 2N. Filtrat yang diperoleh disaring kemudian diidentifikasi menggunakan pereaksi

Isolasi Senyawa Flavonoid

Mayer LP. Hasil positif ditandai dengan terbentuknya endapan berwarna putih atau kuning.

2. Uji Flavonoid

Sebanyak 0,5 g ekstrak bunga cengkeh dimasukkan kedalam tabung reaksi dan ditambahkan sedikit serbuk HCl dikocok dan dibiarkan memisah. Setelah itu ditambahkan serbuk Mg. Uji positif ditunjukkan dengan terbentuk warna merah, kuning, atau jingga.

3. Uji Saponin

Sebanyak 0,5 g ekstrak bunga cengkeh ditambahkan 5 mL aquadest panas, didinginkan setelah itu dikocok kuat selama 5 menit. Hasil positif ditunjukkan dengan terbentuknya buih yang stabil.

4. Uji Terpenoid

Sebanyak 0,5 g ekstrak ditambahkan dengan 2 mL kloroform. Setelah itu ditambahkan H₂SO₄ sebanyak 3 mL sampai membentuk lapisan. Positif ditunjukkan dengan adanya warna merah kecoklatan pada permukaan.

1. Uji Fenolik

Sebanyak 0,5 g ekstrak ditambahkan 3-4 tetes larutan FeCl₃. Hasil positif terbentuknya warna biru-hitam menunjukkan adanya fenolik.

2. Uji tannin

Sebanyak 0,5 g ekstrak dipanaskan dalam 10 mL air kemudian disaring. Ditambahkan beberapa tetes FeCl₃ 0,1 %. Hasil positif ketika terjadi perubahan warna menjadi hijau kecoklatan/ biru kehitaman.

3. Fraksinasi

Proses fraksinasi dilakukan dengan cara partisi cair - cair yaitu dengan menimbang 2 g ekstrak kental metanol yang diperoleh dari proses ekstraksi dengan menggunakan pelarut n-heksan dan metanol perbandingan 4 : 2. Ekstrak kental metanol dan pelarut dimasukkan kedalam corong pisah kemudian akan membentuk dua lapisan. Lapisan atas adalah n-heksan dan lapisan bawah adalah metanol. Setelah itu lapisan metanol dipisahkan dengan menggunakan *rotary evaporator*.

4. Kromatografi Lapis Tipis

Kromatografi Lapis Tipis dilakukan untuk mencari perbandingan eluen terbaik dalam pemisahan senyawa flavonoid sebelum dilakukan isolasi senyawa flavonoid menggunakan kromatografi cair vakum (KCV). Hasil ekstrak fraksinasi bunga cengkeh dilarutkan dalam pelarut metanol. Selanjutnya ditotolkan ekstrak pada lempeng KLT menggunakan pipa kapiler dengan jarak 0,5 cm dari tepi bawah plat, kemudian dikeringkan.

Ekstrak yang telah ditotolkan pada plat kemudian dielusikan dengan masing- masing fase gerak yaitu etil asetat: n-heksan, metanol: n-heksan, metanol: aquadest (9:1, 8:2, 7:3, 6:4). Plat dimasukkan pada chamber yang berisi fase gerak yang telah jenuh. Plat yang telah dielusikan kemudian dikeluarkan dari dalam chamber dan dikeringkan. Noda yang terbentuk kemudian diamati di bawah sinar UV pada panjang gelombang 254 nm dan 366 nm. Kemudian diukur jarak tempuh tiap-tiap noda dan dihitung nilai R_f serta diamati warna noda yang **Fraksinasi**

Proses fraksinasi dilakukan dengan cara partisi cair - cair yaitu dengan menimbang 2 g ekstrak kental metanol yang diperoleh dari proses ekstraksi dengan menggunakan pelarut n-heksan dan metanol perbandingan 4 : 2. Ekstrak kental metanol

Isolasi Senyawa Flavonoid

dan pelarut dimasukkan kedalam corong pisah kemudian akan membentuk dua lapisan. Lapisan atas adalah n-heksan dan lapisan bawah adalah metanol. Setelah itu lapisan metanol dipisahkan dengan menggunakan *rotary evaporator*.

Kromatografi Lapis Tipis dilakukan untuk mencari perbandingan eluen terbaik dalam pemisahan senyawa flavonoid sebelum dilakukan isolasi senyawa flavonoid menggunakan kromatografi cair vakum (KCV). Hasil ekstrak fraksinasi bunga cengkeh dilarutkan dalam pelarut metanol. Selanjutnya ditotolkan ekstrak pada lempeng KLT menggunakan pipa kapiler dengan jarak 0,5 cm dari tepi bawah plat, kemudian dikeringkan. Ekstrak yang telah ditotolkan pada plat kemudian dielusikan dengan masing-masing fase gerak yaitu etil asetat: n-heksan, metanol: n-heksan, metanol: aquadest (9:1, 8:2, 7:3, 6:4). Plat dimasukkan pada chamber yang berisi fase gerak yang telah jenuh. Plat yang telah dielusikan kemudian dikeluarkan dari dalam chamber dan dikeringkan. Noda yang terbentuk kemudian diamati di bawah sinar UV pada panjang gelombang 254 nm dan 366 nm. Kemudian diukur jarak tempuh tiap-tiap noda dan dihitung nilai R_f serta diamati warna noda yang dihasilkan. Eluen yang menghasilkan pemisahan terbaik selanjutnya digunakan untuk Kromatografi cair vakum

5. Kromatografi Cair Vakum

Setelah didapatkan hasil optimasi eluen dengan perbandingan yang terbaik kemudian dipisahkan senyawa flavonoid dengan menggunakan kromatografi cair vakum. Ekstrak metanol bunga cengkeh ditimbang sebanyak 1 g. Pengemasan kolom dilakukan dengan memasukkan 30 g silika gel kering dalam vakum. Serbuk ekstrak dimasukkan merata dibagian atas kolom termampatkan. Kertas saring diletakkan diatas serbuk ekstrak dan selanjutnya di elusi diawali dengan n-

Penelusuran Senyawa Tumbuhan Cengkeh

heksan 100 % , n-heksan :metanol (4:1; 3:2), metanol: n-heksan (1:4; 2:3) dan metanol 100%. Pompa vakum dialirkan secara perlahan hingga seluruh eluen keluar, ditampung dalam wadah atau vial.

6. Identifikasi Menggunakan Spektrometer LC-MS

Hasil isolasi flavonoid pada kromatografi lapis tipis preparatif, selanjutnya diidentifikasi menggunakan LC-MS. Kolom yang digunakan pada penelitian ini adalah Phenomenex C18 (50 mm x 20 mm), suhu kolom diatur pada suhu ruang 25°C. Proses elusi menggunakan 60 % Asetonitril (Larutan A) dan 40% air (Larutan B). Sampel dipisahkan menggunakan kolom C18, kemudian diinjeksikan sebanyak 10 pl kedalam LC-MS.

Diatur panjang kolom 150 mm, diameter dalam kolom 2 mm, ukuran partikel 5 pm dengan kecepatan alir 1 mL/ menit dengan rentang waktu selama 30 menit. Hasil pengukuran dapat disajikan dalam bentuk grafik LC dan MS.

7. Penyajian Dan Analisis Data

Data yang diperoleh dari hasil penelitian yaitu skrining fitokimia golongan senyawa metabolit sekunder yang terkandung dalam ekstrak metanol selanjutnya di isolasi dengan Kromatografi Lapis Tipis. Identifikasi dengan LC-MS digunakan untuk memperkirakan komponen senyawa ekstrak metanol bunga cengkeh. Dari kromatogram LC-MS diperoleh jumlah komponen senyawa. Pola fragmentasi spectra instrument LC-MS dibandingkan dengan spectra massa spectra *reference* dari penelusuran library untuk mengidentifikasi komponen senyawa.

Isolasi Senyawa Flavonoid



PENENTUAN SENYAWA

Perhitungan Rendamen Ekstrak Metanol Bunga Cengkeh

Tabel 3.1 Persen Rendamen Ekstrak Metanol Bunga Cengkeh

Pelarut	Berat Sampel	Berat Ekstrak (g)	Rendamen (%)
Metanol	200 g	10,08	5,04
		6,70	3,35
		6,02	2,02
Rata-rata		23,56	11,78

Berdasarkan hasil ekstraksi maserasi ekstrak metanol bunga cengkeh didapatkan persen rendamen dari 200 g serbuk bunga cengkeh sebesar 11,78 % hal ini sesuai dengan range persen rendamen menurut Vitasari (2013) adalah 10-15 % yang menunjukkan bahwa proses ekstraksi bunga cengkeh (*Syzygium aromaticum*) dengan menggunakan pelarut metanol berlangsung sempurna.

Penentuan Senyawa

Skrining

Telah dilakukan uji skrining fitokimia untuk mengetahui senyawa metabolit sekunder yang terkandung dalam bunga cengkeh. Hasil uji fitokimia ekstrak bunga cengkeh dapat dilihat pada tabel dibawah ini :

Tabel 3.2 Skrining fitokimia ekstrak metanol bunga cengkeh

Sampel	Pereaksi	Hasil	Ket.
Ekstrak Metanol Bunga Cengkeh (Syzygium aromaticum)	Serbuk Mg dan HCl	Terbentuk warna jingga kemerahan	(+) Flavonoid
	Pereaksi Mayer	Tidak terbentuk larutan yang keruh	(-) Alkaloid
	Pemanasan	Terbentuk busa yang stabil	(+) Saponin
	Pemanasan	Memiliki bau khas cengkeh yang menyengat	(+) Minyak atsiri
	FeCl ₃	Terbentuk warna biru tua kehitaman	(+) Tanin

Penelusuran Senyawa Tumbuhan Cengkeh

Berdasarkan tabel diatas setelah dilakukan uji skrining fitokimia menunjukkan bahwa bunga cengkeh mengandung senyawa aktif metabolit sekunder yaitu flavonoid, tanin, saponin dan minyak atsiri. Sedangkan alkaloid menunjukkan hasil yang negatif. Positif flavonoid ditandai dengan adanya perubahan warna dari coklat tua ke warna jingga kemerahan ketika ekstrak direaksikan dengan serbuk Mg dan HCl. Tanin ditandai dengan terbentuknya warna biru tua kehitaman setelah direaksikan dengan FeCl₃. Saponin ditandai dengan terbentuknya busa yang stabil. Minyak atrisri memberikan bau khas cengkeh yang menyengat setelah proses pemanasan. Untuk alkaloid setelah direaksikan dengan pereaksi mayer tidak terjadi kekeruhan maupun adanya endapan.

Kromatografi Cair Vakum

Tabel 3.3 Perbandingan nilai Rf baku kuarsetin dan ekstrak metanol bunga cengkeh

No	Ekstrak Metanol Bunga Cengkeh	Fase Gerak N-heksan : Metanol (2:2)	
		Nilai Rf (UV 254 nm)	Pembanding Kuarsetin
1	Fraksi 1	0,8	0,68
2	Fraksi 2	0,8	
3	Fraksi 3	0,58	
4	Fraksi 4	0,68	

Penentuan Senyawa

5	Fraksi 5	0,62
6	Fraksi 6	0,8

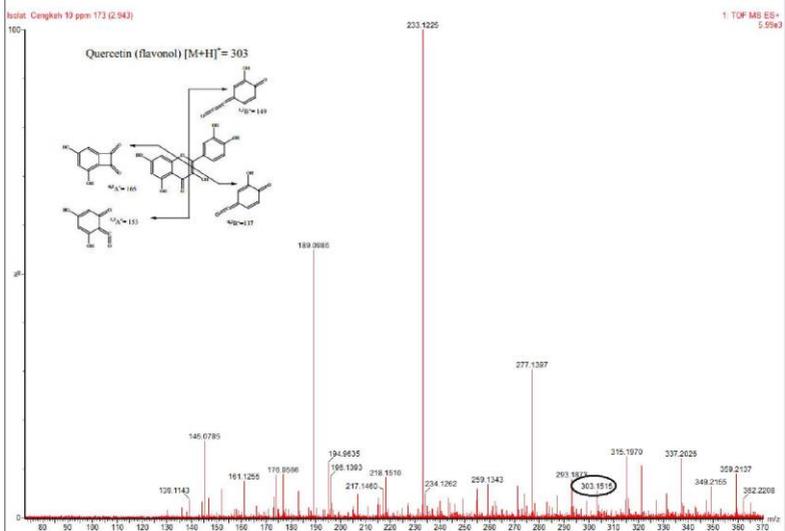
Identifikasi menggunakan Liquid Chromatography Mass Spektra (LC-MS)

Tabel 3.4 Hasil optimasi menggunakan LC-MS

Sampel : Isolat Cengkeh	
Jenis sistem elusi	Isokraktif
Fase gerak	Asetonitril : Air (60 :40 v/v)
Jenis kolom	C ₁₈
Laju alir	0.5 mL/ menit
Volume injeksi	10 pL
Mode operasi	Ion positif (M ⁺)

Fase gerak yang sering digunakan pada metode LC yaitu campuran air dengan asetonitril.. kecepatan alir yang konstan menggunakan laju alir 0,5 mL/menit. Jenis kolom yang digunakan dalam penelitian ini adalah jenis kolom C₁₈ (*Oktadesil silica*), silika gel didalamnya menggunakan fase terbalik (*reversed phase column*). Pada kolom fase terbalik (C₁₈) proses elusi dari senyawa yang bersifat non polar berjalan dengan lambat sedangkan senyawa yang bersifat polar lebih cepat terelusi oleh fase gerak dan keluar dari fase diam C₁₈.

Penelusuran Senyawa Tumbuhan Cengkeh



Gambar 3.1 Identifikasi Pola Fragmentasi

Berdasarkan gambar 4.1 diatas, hasil pola fragmentasi dan berat molekul, dapat diidentifikasi bahwa ekstrak metanol bunga cengkeh mengandung senyawa flavonoid jenis flavonol karena menghasilkan puncak 303 m/z.. Hal ini dibuktikan dengan penelitian yang dilakukan oleh Dimitrios Tsimogiannis et all (2007) dalam jurnal *Characterization of Flavonoid Subgroups and Hydroxy Substitution by HPLC- MS/MS* menunjukkan puncak puncak 303 m/z, 287 m/z, 273 m/z, 305 m/z, 289 m/z.

Penentuan Senyawa



PENGUJIAN DAN HASIL PEMBAHASAN

Preparasi sampel

Tanaman yang digunakan pada penelitian ini adalah bunga cengkeh yang berasal dari Desa Sinombayuga, Kecamatan Posigadan, Kabupaten Bolmong Selatan, Provinsi Sulawesi Utara. Tahapan preparasi yaitu bunga cengkeh yang telah dipanen kemudian dikeringkan dengan cara diangin-anginkan pada suhu ruang, agar senyawa aktif pada sampel tidak rusak. Tujuan pengeringan yaitu untuk menghilangkan kadar air dalam sampel agar terhindar dari perkembangan mikroba selanjutnya disortasi dari kotoran seperti debu yang dapat mengganggu proses ekstraksi.

Sampel yang telah dikeringkan dihaluskan menggunakan blender sehingga diperoleh serbuk yang kecil dan halus. Tujuan dilakukan penyerbukkan agar memperluas permukaan serbuk dan memperluas area kontak antara serbuk simplisia dengan penyari (Agustina dkk, 2014). Penyerbukkan sampel juga dimaksudkan untuk menyeragamkan ukuran sampel sehingga mempermudah saat proses ekstraksi. Untuk mencegah kerusakan pada simplisia, serbuk simplisia di simpan pada wadah bersih, kering dan terlindung dari cahaya.

Ekstraksi Maserasi

Proses ekstraksi serbuk bunga cengkeh (*syzygium aromaticum*) dalam penelitian ini menggunakan metode maserasi. Ekstraksi adalah proses pemisahan senyawa campuran dengan menggunakan pelarut yang sesuai. Maserasi adalah salah satu proses pemisahan senyawa campuran dengan cara perendaman menggunakan pelarut yang sesuai. Metode ini didasarkan pada perendaman sampel didalam pelarut sehingga pelarut akan menembus dinding sel dan masuk ke dalam rongga sel yang mengandung senyawa aktif. Senyawa aktif akan larut dalam pelarut yang sesuai karena adanya perbedaan konsentrasi antara zat aktif didalam sel dan diluar sel, sehingga larutan yang berdekatan terdesak keluar, peristiwa tersebut akan berlangsung terus-menerus sampai terjadi keseimbangan konsentrasi antara larutan yang diluar dengan yang ada didalam sel (Voight, 1995). Kelebihan dari maserasi menurut Kristanti, dkk., (2008), adalah pengerjaannya cukup sederhana, murah, mudah dilakukan dan tidak menggunakan suhu tinggi yang dimungkinkan dapat merusak senyawa- senyawa kimia yang terdapat dalam sampel.

Maserasi pada penelitian ini menggunakan pelarut metanol pada suhu kamar selama 3 x 24 jam. Pelarut metanol merupakan pelarut yang paling banyak digunakan dalam proses isolasi senyawa organik bahan alam. Pelarut metanol dipilih karena pelarut ini sifatnya universal atau semipolar yaitu dapat melarutkan senyawa yang bersifat polar maupun nonpolar, dimana senyawa flavonoid yang akan diekstraksi mempunyai sifat dalam bentuk aglikon bersifat non polar dan dalam bentuk glikosida bersifat polar (Ardiana, dkk., 2012). Serbuk bunga cengkeh ditimbang sebanyak 200 g, dimasukkan kedalam wadah maserasi dan ditambahkan pelarut metanol sebanyak 1000 mL.

Penelusuran Senyawa Tumbuhan Cengkeh

Perendaman sampel dilakukan selama 3 hari 24 jam agar terjadi peristiwa berulang sampai terjadi keseimbangan konsentrasi antara larutan di luar sel dan di dalam sel dengan 6 jam pengadukan menggunakan shaker dengan kecepatan 120 rpm secara konstan, tujuannya untuk mempercepat proses ekstraksi komponen senyawa yang diinginkan terdesak keluar. Tujuannya lainnya dari pengadukan yaitu untuk meratakan konsentrasi larutan diluar serbuk sampel sehingga tetap terjaga adanya derajat perbedaan konsentrasi yang sekecil-kecilnya antara larutan didalam dan diluar sel (Baraja, 2008). Maserasi dalam penelitian ini dilakukan pengulangan sebanyak 3 kali dengan menggunakan pelarut yang baru, sebelum sampel direndam dengan pelarut yang baru, sampel terlebih dulu disaring menggunakan kertas saring pada corong pisah untuk memisahkan filtrat dan residu. Filtrat hasil penyaringan disimpan dalam wadah untuk dilakukan evaporasi menggunakan *rotary evaporator* sedangkan residu dimasukkan kembali kedalam wadah maserasi untuk dilakukan re-maserasi atau maserasi kembali. Tujuan dilakukan evaporasi yaitu untuk memekatkan ekstrak dan memisahkan pelarut dan senyawa aktif, proses evaporasi dilakukan pada suhu 50°C sehingga senyawa yang akan diekstraksi tidak akan mengalami kerusakan (Khunaifi, 2010). Prinsip dari evaporasi yaitu terletak pada penurunan tekanan sehingga pelarut akan menguap dan terpisah pada suhu sebelum mencapai titik didihnya.

ada proses maserasi pertama didapatkan ekstrak kental bunga cengkeh sebanyak 10, 08 g ekstrak, proses maserasi kedua adalah 6,70 g dan yang ketiga yaitu 6, 02 g , dimana rata-rata persen rendamen dari berat ekstrak adalah 11, 78 % yang artinya sesuai dengan range persen rendamen, yaitu 10-15 %, hal ini menunjukkan bahwa proses ekstraksi bunga cengkeh berlangsung sempurna

Pengujian dan Hasil Pembahasan

(Vitasari, 2013).

Skrining Fitokimia

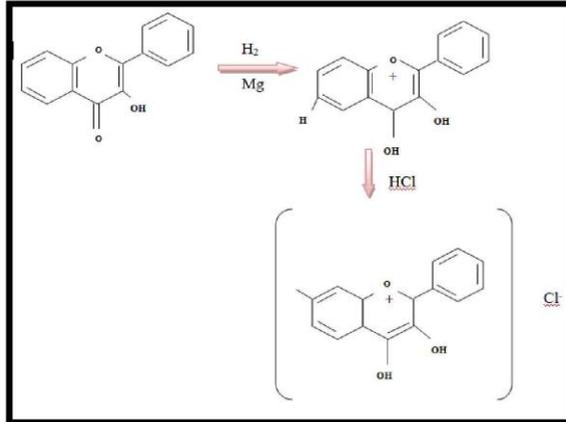
Skrining atau penapisan fitokimia bertujuan untuk memberikan gambaran awal terkait ada atau tidaknya senyawa dalam sampel. Berdasarkan hasil skrining fitokimia terhadap ekstrak metanol bunga cengkeh menunjukkan hasil positif flavonoid, tannin, saponin dan minyak atsiri, serta negatif pada uji alkaloid.

Flavonoid adalah senyawa zat warna yang terjadi secara alami dan terdistribusi secara luas pada berbagai bagian tanaman (Worotikan, 2011). Serbuk Mg dan HCl yang digunakan pada uji flavonoid digunakan untuk pereduksi dimana proses reduksi tersebut dilakukan dalam suasana asam dengan penambahan HCl. Proses reduksi ini akan menghasilkan warna jingga kemerahan. Pada penelitian yang dilakukan oleh Setyowati dkk., (2014) dalam jurnal *Skrining Fitokimia dan Identifikasi Komponen Utama Ekstrak Metanol Kulit Durian (*Durio zibethinus* Murr.) Varities Pertruk* penambahan logam Mg dan HCl pekat dalam uji flavonoid berfungsi untuk mereduksi inti benzopiron. Jika dalam suatu ekstrak terdapat flavonoid maka akan terbentuk garam flavilium saat penambahan

Penelusuran Senyawa Tumbuhan Cengkeh

Mg dan HCl yang berwarna merah atau juga

kemerahan.



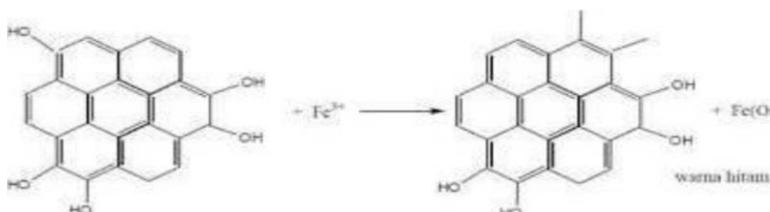
Gambar 4.2 Reaksi Flavonoid Menggunakan Mg dan HCl

Pada uji senyawa tanin digunakan pereaksi $FeCl_3$, hasil positif saat direaksikan dengan pereaksi $FeCl_3$ adalah warna biru kehitaman karena $FeCl_3$ dapat bereaksi dengan salah satu gugus hidroksil pada senyawa tanin. Ion Fe^{3+} akan bereaksi dengan tanin membentuk kompleks. Latifah (2015) menyatakan senyawa kompleks terbentuk karena adanya ikatan kovalen, logam atau non logam. Dalam penelitian yang dilakukan oleh Setyowati dkk, (2012), hasil positif saat ekstrak metanol bunga cengkeh direaksikan dengan pereaksi $FeCl_3$ adalah warna biru kehitaman.

Pengujian dan Hasil Pembahasan

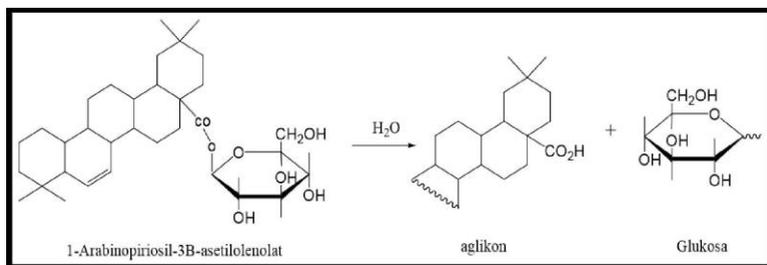
Fed,

Fe³⁺ - J



Gambar 4.1 Reaksi Uji Tanin dengan Pereaksi FeCl₃

Identifikasi senyawa saponin ditandai dengan timbulnya busa jika dikocok dalam air (Kristanti et al, 2008). Timbulnya busa pada uji ini menunjukkan adanya glikosida yang mempunyai kemampuan untuk membentuk buih dalam air yang terhidrolisis menjadi glukosa dan senyawa lainnya senyawa ini cenderung akan tertarik oleh pelarut yang bersifat semi polar seperti metanol (Marliana dkk, 2005).



Gambar 4.2 Reaksi Uji Saponin

Penelusuran Senyawa Tumbuhan Cengkeh

Minyak atsiri merupakan zat yang berbau, terdapat pada berbagai tumbuhan. Pada penelitian identifikasi minyak atsiri pada bunga cengkeh dilakukan dengan uji bau. Pelarut yang digunakan untuk melarutkan minyak atsiri adalah metanol. Metanol mempunyai gugus non polar sehingga digunakan sebagai media untuk melarutkan minyak atsiri (Astarina dkk, 2013). Bunga cengkeh positif mengandung minyak atsiri yang ditandai dengan adanya bau khas dari cengkeh. Penelitian yang telah dilakukan oleh Ferdinanti (2001) dalam jurnalnya Uji Aktivitas antibakteri obat kumur minyak cengkeh (*Syzygium aromaticum* (L.) Merr & Perry) asal bunga, tangkai, dan daun cengkeh terhadap bakteri juga menunjukkan bahwa pemisahan kandungan kimia cengkeh mengandung senyawa flavonoid, tannin, saponin, dan minyak atsiri. Sedangkan pada uji alkaloid dengan menggunakan pereaksi mayer tidak terjadi perubahan larutan menjadi keruh ataupun terdapat endapan putih.

Fraksinasi Ekstrak metanol bunga cengkeh yang diperoleh dari hasil ekstraksi maserasi selanjutnya dilakukan partisi dengan metode ekstraksi cair-cair dalam corong pisah guna mendapatkan ekstrak berdasarkan tingkat kepolaran yang berbeda. Prinsip dari ekstraksi cair-cair adalah "like dissolve like" artinya pelarut akan melarutkan senyawa yang tingkat kepolarannya sama dengan pelarut tersebut atau pemisahan senyawa berdasarkan tingkat kepolarannya menggunakan 2 pelarut yang tidak saling bercampur. Ekstrak metanol bunga cengkeh dimasukkan ke dalam corong pisah kemudian ditambahkan pelarut n- heksan ; metanol (40;20) didiamkan, hingga memisah menjadi 2 lapisan. Pelarut n-heksan ; metanol (40;20) digunakan untuk memisahkan senyawa non polar yang diduga masih banyak terdapat dalam ekstrak metanol bunga

Pengujian dan Hasil Pembahasan

cengkeh sehingga pemisahan senyawa polar lebih optimal, dimana pelarut n-heksan merupakan pelarut non-polar yang dapat menarik senyawa-senyawa yang bersifat nonpolar dan sebaliknya pelarut metanol polar dapat melarutkan senyawa yang bersifat polar (Ardiana, dkk., 2012).



Gambar 4.3 Fraksinasi partisi cair-cair

Fraksinasi menggunakan corong pisah diperoleh 2 lapisan ekstrak metanol bunga cengkeh yaitu lapisan ekstrak n-heksan bunga cengkeh dan lapisan bawah ekstrak metanol bunga cengkeh. Ekstrak metanol bunga cengkeh kemudian masing-masing lapisan dipisahkan dan diambil lapisan methanol di uapkan menggunakan rotary evaporator.

Isolasi Senyawa Flavonoid

Isolasi merupakan suatu metode untuk memisahkan senyawa yang bercampur sehingga dapat menghasilkan senyawa tunggal yang murni. Pada penelitian ini isolasi yang dilakukan menggunakan metode kromatografi lapis tipis dan kromatografi cair vakum. Pemisahan senyawa flavonoid dalam ekstrak metanol bunga cengkeh diawali terlebih dahulu dengan kromatografi lapis tipis yang digunakan untuk menentukan eluen terbaik yang akan digunakan dikolom

Kromatografi Lapis Tipis

Berdasarkan hasil fraksinasi partisi cair-cair diperoleh ekstrak kental metanol bunga cengkeh yang selanjutnya dapat dilakukan isolasi dengan metode kromatografi lapis tipis. Dalam penelitian ini kromatografi lapis tipis dilakukan untuk mengetahui perbandingan eluen terbaik sebelum dilakukan isolasi lebih lanjut menggunakan kromatografi cair vakum. Menurut Hajnos, dkk., (2011), kromatografi cair vakum biasanya sebagian kecil sampel dipisahkan menggunakan KLT terlebih dahulu untuk mengetahui pelarut yang cocok digunakan. Kromatografi lapis tipis atau KLT merupakan metode analisis yang paling sederhana. KLT memiliki kelebihan yang nyata dibandingkan dengan kromatografi kertas selain karena nyaman dan cepat, ketajaman pemisahan dan kepekaannya pun lebih tinggi (Nazer *et al* 2014). KLT juga digunakan untuk mencari eluen terbaik dari beberapa eluen yang baik dalam pemisahan senyawa flavonoid. Syarat eluen terbaik menurut Harborne (1987) adalah yang dapat memisahkan senyawa dalam jumlah yang banyak yang ditandai dengan munculnya noda. Noda yang terbetuk tidak berekor dan jarak antar noda yang satu dan lainnya jelas.

Pengujian dan Hasil Pembahasan

Pemisahan ekstrak metanol bunga cengkeh dengan menggunakan KLT digunakan beberapa eluen terbaik dari penelitian sebelumnya yang mengidentifikasi senyawa flavonoid dari berbagai ekstrak. Adapun fase gerak atau eluen yang digunakan pada penelitian ini yaitu beberapa perbandingan yaitu etil asetat: n-heksan, metanol: n-heksan, metanol: aquadest (9:1, 8:2, 7:3, 6:4). Fase gerak pada KLT dapat dipilih dari pustaka tetapi lebih sering dengan mencoba-coba karena waktu yang diperlukan hanya sebentar. Pencampuran kedua pelarut tersebut merupakan sistem yang paling sederhana karena daya elusi campuran kedua pelarut ini dapat mudah diatur sedemikian rupa sehingga pemisahan dapat terjadi secara optimal (Gandjar dan Rohman 2007) . Fase diam yang digunakan untuk memisahkan senyawa pada ekstrak metanol bunga cengkeh adalah plat silika G₆₀ F₂₅₄ dengan panjang 7 cm dan lebar 2 cm.

Selanjutnya ekstrak dan pembanding kuarsetin ditotolkan pada lempeng KLT menggunakan pipa kapiler pada tepi bawah plat. Senyawa baku atau pembanding yang digunakan adalah kuarsetin, kuarsetin dipilih karena menurut Gandjar dan Rohman(2007), teknik spiking dengan menggunakan senyawa baku yang sudah diketahui sangat dianjurkan untuk lebih memantapkan pengambilan keputusan dalam identifikasi suatu senyawa. Sebelum dilakukan elusi, eluen di jenuhkan dahulu dalam chamber agar campuran eluen dapat mengelusi ekstrak dengan baik dan untuk mempercepat reaksi yang nantinya dapat bercampur sempurna. Plat yang sudah ditotol dimasukkan dalam *chamber*, ditutup rapat agar terbentuk uap yang jenuh dan mengurangi adanya penguapan pelarut. Kemudian diamati proses elusi yang terjadi. Plat sudah dapat diangkat dari *chamber* jika proses elusi selesai yang ditandai dengan naiknya eluen sampai batas garis atas kemudian plat dikeringkan menggunakan *hair dryer* sampai terserap sempurna

Penelusuran Senyawa Tumbuhan Cengkeh

agar hasil penotolan tidak melebar. Plat diamati dibawah sinar UV pada panjang gelombang 254 nm dan 366 nm. Noda yang tampak di tandai dengan pensil selanjutnya noda disemprot dengan pereaksi H₂SO₄. Diukur jarak tempuh tiap-tiap spot noda dan dihitung nilai *R_f* untuk mengetahui golongan senyawanya.

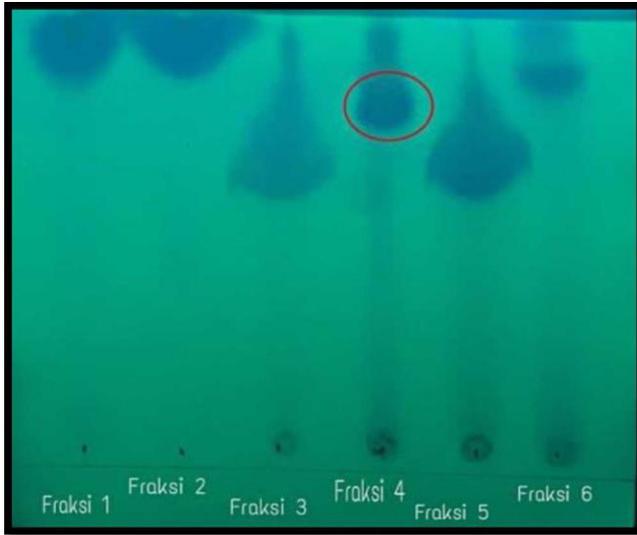
Pereaksi penyemprot seperti H₂SO₄ atau indikator berflouresensi sering digunakan pada identifikasi kromatografi lapis tipis untuk membantu penampakan bercak berpendar (memancarkan cahaya) pada lapisan yang telah terelusi. Indikator flouresensi adalah senyawa yang memancarkan sinar tampak jika disinari dengan sinar yang berpanjang gelombang seperti sinar UV. Beberapa senyawa organik bersinat dan berflouresensi jika disinari pada 254 nm dan 366 nm yang dapat tampak dengan mudah (Gritter, 1991). Menurut Sudjadi (1988) dalam Zahro (2011) penampakan warna pada panjang gelombang tersebut disebabkan adanya interaksi antara sinar UV dengan gugus kromofor yang terikat oleh ausokrom pada noda tersebut. Flouresensi cahaya yang tampak merupakan emisi cahaya yang dipancarkan oleh komponen tersebut Ketika elektron tereksitasi dari tingkat energi dasar ke tingkat energi yang lebih tinggi dan kemudian kembali melepaskan energi.

Selanjutnya dihitung nilai *R_f* masing-masing spot noda, diperoleh *R_f* perbandingan kuarsetin adalah 0,68 dengan perbandingan terbaik n-heksan metanol (2:2) sedangkan ekstrak bunga cengkeh nodanya belum nampak sehingga selanjutnya dilakukan kromatografi cair vakum. Menurut Lipsy (2010) menyatakan bahwa nilai *R_f* dapat dijadikan bukti dalam mengidentifikasi senyawa. Senyawa-senyawa dengan nilai *R_f* yang sama menunjukkan bahwa senyawa tersebut memiliki karakteristik yang sama atau mirip.

Kromatografi Cair Vakum

Kromatografi kolom merupakan metode yang digunakan untuk memisahkan komponen senyawa pada suatu campuran.. Kromatografi jenis ini merupakan metode pemisahan senyawa dalam jumlah besar. Pada kromatografi kolom ini fase diam yang digunakan adalah adsorben bubuk sedangkan fase geraknya dapat dimulai dari pelarut non polar kemudian ditingkatkan kepolarannya dengan perbandingan tertentu sesuai tingkat kepolarannya (Stahl, 1969). Sebanyak 1 gram ekstrak metanol bunga cengkeh dipisahkan menggunakan kromatografi kolom untuk memisahkan komponen-komponen dalam fraksi, Pemisahan fraksi dengan kromatografi kolom ini menggunakan fase gerak yang merupakan eluen terbaik hasil KLT yaitu dimulai dari F1 n- heksan 100 % , n-heksan; metanol F2 (4:1) ,F3 (3:2), metanol : n-heksan F4 (1:4), F5 (2:3) dan F1 metanol 100%. Fase diam berupa adsorben bubuk ditempatkan pada kolom kaca vertical. Fase gerak dituangkan diatas sampel dimana pelarut akan mengalir kebawah dan menyebabkan komponen campuran terdistribusi diantara adsorben bubuk dan pelarut. Pemisahan terjadi saat pelarut yang membawa komponen melalui ujung bawah kolom. Laju elusi yang terjadi dipengaruhi oleh gaya gravitasi. Hasilnya didapatkan 6 fraksi ekstrak metanol bunga cengkeh dari kromatografi kolom. Selanjutnya fraksi-fraksi tersebut dimasukkan dalam vial, dan pelarutnya diuapkan menggunakan *rotary evaporator*. Kemudian 6 fraksi tadi ditotolkan pada lempeng KLT dan dilakukan pengelusian menggunakan fase gerak metanol ; etil asetat (2:2). Bercak pada KLT dideteksi menggunakan lampu UV 254 nm dan 366 nm. Adapun hasil 6 fraksi ekstrak yang diperoleh dari kromatografi cair vakum adalah sebagai berikut:

Penelusuran Senyawa Tumbuhan Cengkeh



Gambar 4.4 Hasil Kromatografi Cair Vakum

Berdasarkan gambar 4.2 diatas, diperoleh nilai Rf dari masing-masing fraksi ekstrak metanol bunga cengkeh yaitu F1 0,8; F2 0,8; F3 0,58; F4 0,68; F5 0,62; F6 0,8 dan untuk untuk senyawa baku kuarsetin memiliki nilai Rf yang mirip dengan fraksi ke 4 yaitu 0,68 yang menunjukkan bahwa dalam ekstrak metanol bunga cengkeh mengandung senyawa flavonoid. Menurut Lipsy (2010) menyatakan bahwa nilai Rf dapat dijadikan bukti dalam mengidentifikasi senyawa. Senyawa-senyawa dengan nilai Rf yang sama menunjukkan bahwa senyawa tersebut memiliki karakteristik yang sama atau mirip. Selanjutnya ekstrak yang diduga mengandung flavonoid yaitu fraksi ke-empat dikerok untuk dilakukan identifikasi lebih lanjut atau untuk lebih memastikan kembali bahwa dalam ekstrak metanol bunga cengkeh mengandung flavonoid menggunakan detektor dari

instrumen LC-MS (*Liquid Chromatography-Mass Spektra*). **4.2.5 Identifikasi menggunakan LC-MS**

Sampel ekstrak metanol bunga cengkeh yang telah di isolasi kemudian dilakukan identifikasi menggunakan metode *Liquid Chromatography Mass Spektra* atau LC-MS. LC-MS adalah metode kromatografi cair dengan detektor spektrometer massa. Pengabungan kedua alat ini akan menghasilkan data dengan tingkat akurasi yang tinggi. Kelebihan dari instrumen ini yaitu spesifik, mampu mengukur analit yang sangat polar, selain itu persiapan sampel cukup sederhana tanpa adanya derivatisasi, fleksibilitas yang tinggi waktu yang singkat kaya informasi, Sejumlah data kuantitatif maupun kualitatif dapat diperoleh. Menurut Edward dan Robert (2015) pemilihan metode ini dalam penelitian identifikasi senyawa karena LC-MS memiliki kelebihan mampu memisahkan senyawa dari suatu campuran, waktu analisis yang lebih cepat, kepekaan tinggi, dan sensitif karena volume sampel yang digunakan lebih sedikit. Sebelum dilakukan pengujian instrumen LC-MS harus dilakukan optimasi terlebih dahulu, tujuannya untuk melihat kondisi yang paling cocok dalam menganalisis suatu senyawa.

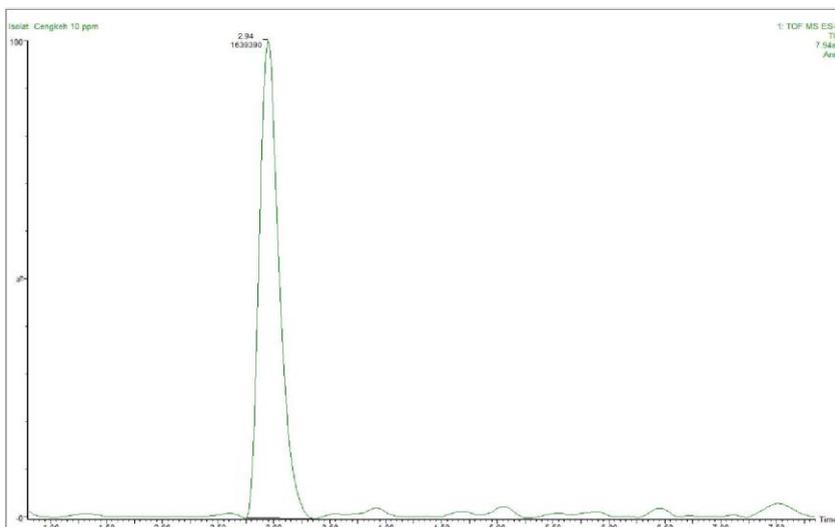
Fase gerak yang sering digunakan pada metode LC yaitu campuran air dengan asetonitril. Eluen atau fase gerak dengan komposisi konstan dipompakan ke dalam kolom selama analisis berlangsung. Pompa berfungsi sebagai sistem pengaliran fase gerak yang mendorong solven untuk melewati instrumen dengan kecepatan alir yang konstan menggunakan laju alir 0,5 mL/menit.

Menurut Gandjar dan Rohman (2007) Fungsi dari penggunaan pompa yaitu untuk menjamin proses penghantaran fase gerak berlangsung secara tepat, reproduksibel, konstan dan bebas dari gangguan kemudian disuntikan secara langsung ke dalam fase gerak yang mengalir ke bawah tekanan menuju kolom

Penelusuran Senyawa Tumbuhan Cengkeh

menggunkan alat peyuntik yang terbuat dari tembaga tahan karat Jenis kolom yang digunakan dalam penelitian ini adalah jenis kolom C18 (*Oktadesil silica*), silika gel didalamnya menggunakan fase terbalik (*reversed phase column*) . C₁₈ atau oktadesil silika merupakan fase diam yang paling banyak digunakan karena mampu memisahkan senyawa-senyawa dengan kepolaran yang rendah, sedang, maupun tinggi. Disebut fase terbalik karena fase gerakanya bersifat polar sedangkan fase diamnya bersifat non polar. Pada kolom fase terbalik (C₁₈) proses elusi dari senyawa yang bersifat non polar berjalan dengan lambat, sedangkan senyawa yang bersifat polar lebih cepat terelusi oleh fase gerak dan keluar dari fase diam C₁₈. Senyawa yang keluar dari kolom akan menuju detektor, lalu oleh detektor senyawa ini akan dibaca dan dihasilkan keluaran berupa kromatogram dan waktu retensi. Pada instrumen LC suatu senyawa dapat diidentifikasi dengan melihat waktu retensi, luas puncak dan untuk detektor massa dapat diidentifikasi dengan membandingkan berat molekul dan pola fragmentasi dari ekstrak dan senyawa baku dalam penelitian ini adalah kuarsetin. Adapun hasil kromatogram dari ekstrak metanol bunga cengkeh yaitu sebagai berikut :

Pengujian dan Hasil Pembahasan



Gambar 4.5 Kromatogram Isolat Cengkeh Menggunakan Liquid Chromatography

Berdasarkan gambar diatas hasil yang peroleh dari kromatogram menggunakan fase gerak asetonitril 60% (larutan A) dan air 40% (larutan B) dengan laju alir 0,6 ml/min menunjukkan waktu retensi dari isolat ekstrak methanol bunga cengkeh adalah 2.94 menit dimana analit terpisah dengan baik dengan volume injeksi 10 pL. Waktu retensi adalah waktu yang diperlukan analit mulai saat injeksi sampai keluar dari kolom dan sinyalnya secara maksimal ditangkap oleh detektor pada mass spektra. Waktu retensi diukur berdasarkan waktu dimana sampel menunjukkan

Penelusuran Senyawa Tumbuhan Cengkeh

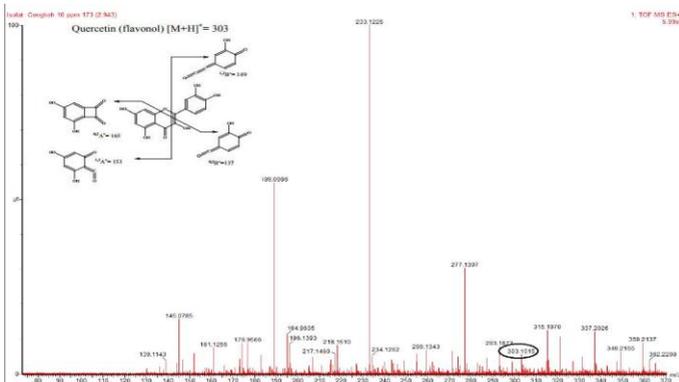
ketinggian puncak maksimum pada grafik dari senyawa tersebut. Hubungan antara waktu retensi dan berat molekul yaitu jika semua partikel memiliki waktu yang sama, maka energi kinetiknya akan sama, dan kecepatan waktu retensinya tergantung pada massanya. Ion-ion akan melintasi wilayah antara sumber ion dan detektor, mereka akan terpisah menjadi kelompok atau paket sesuai dengan kecepatannya yang merupakan fungsi dari nilai rasio m/z , dimana ion yang lebih ringan akan pertama kali mencapai detektor (Pavia *et al*, 2009).

Selanjutnya sampel ekstrak metanol bunga cengkeh diidentifikasi menggunakan detektor Mass spektra atau MS. Prinsip dari MS adalah pengionisasian senyawa kimia menghasilkan molekul atau fragmen molekul dan mengukur rasio massa/muatan. Adapun analisis massa m/z digunakan untuk memisahkan ion menurut rasio m/z berdasarkan karakteristiknya dimedan listrik atau medan magnet. Menurut Ginting (2012) dalam Agilent Technologies (2001) Spectrometer massa bekerja dengan molekul pengion yang kemudian akan memilah dan mengidentifikasi ion menurut massa, sesuai rasio fragmentasi molekul. Dua komponen kunci dalam proses ini adalah sumber ion (*ion source*) yang akan menghasilkan ion dan analisis massa (*mass analyzer*) menyelesaikan ion.

Sistem LC-MS/MS umumnya menggunakan beberapa jenis ion source dan mass analyzer yang dapat disesuaikan dengan kepolaran senyawa yang akan dianalisa. Salah satu metode ionisasi yang biasa digunakan dalam LC-MS adalah ionisasi elektropray (ESI). Sampel berupa larutan memasuki sumber ion melalui pipa kapiler stainless steel, yang dikelilingi oleh aliran co-aksial nitrogen yang disebut dengan gas nebulizing, aliran gas nebulizing langsung mengalir ke spektrofotometri massa. Larutan yang keluar dari pipa kapiler berupa aerosol. Tetesan dalam aerosol disemprot untuk

Pengujian dan Hasil Pembahasan

mengungkapkan pelarut, sehingga konsentrasi hanya berisi ion-ion. Ketika tolakan elektrostatis antara ion-ion muatan sampel mencapai titik kritis, tetapan mengalami "ledakan kolom" dimana terjadi pelepasan ion-ion sampel ke dalam fase uap. Ion-ion fase uap terfokus pada sejumlah lubang sampel dalam spektrofotometer massa (Silverstein, 2005). MS memisahkan komponen ion-ion berdasarkan rasio m/z untuk mengukur kelimpahan ion. Pola fragmentasi dan berat molekul yang dihasilkan pada grafik isolat ekstrak metanol bunga cengkeh adalah pada puncak 233, 259, 277, 293, 303, 315, 337, 349, 359 m/z . Adapun hasil dari pola fragmentasi dan berat molekul pada spektrofotometri massa adalah sebagai berikut:



Gambar 4.6 Identifikasi pola fragmentasi menggunakan Mass Spektra

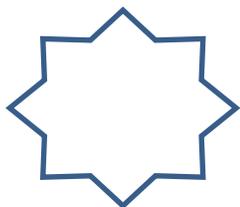
Berdasarkan gambar 4.6 diatas, hasil pola fragmentasi dan berat molekul, dapat diidentifikasi bahwa ekstrak metanol bunga cengkeh mengandung senyawa flavonoid jenis flavonol

Penelusuran Senyawa Tumbuhan Cengkeh

karena menghasilkan puncak 303 m/z. Hal ini dibuktikan dengan penelitian yang dilakukan oleh Dimitrios Tsimogiannis et al (2007) dalam jurnal *Characterization of Flavonoid Subgroups and Hydroxy Substitution by HPLC- MS/MS* menunjukkan puncak puncak 303 m/z, 287 m/z, 273 m/z, 305 m/z, 289 m/z. Fragmentasi terjadi pada ikatan non bonding, contohnya gugus eter, sp³, gugus hidrogen dan gugus karboksil, dimana gugus karboksil akan terpisah dari senyawa inti dengan pecahan terletak pada ikatan C-C disebelah ikatan C-O (Ginting, 2012). Dalam memperoleh informasi struktural, ion analit terfragmentasi karena molekul bertabrakan dengan nitrogen yang dikenal sebagai disosiasi tabrakan induksi atau disosiasi tabrakan diaktifkan. Tegangan diberikan kepada ion-ion analit untuk menambah energi agar mampu melakukan tabrakan sehingga menciptakan fragmentasi.

Berdasarkan struktur dari senyawa flavonoid jenis flavonol diketahui memiliki manfaat sebagai antioksidan khususnya sebagai penangkap radikal bebas. Kemampuan antioksidan flavonoid dapat dipengaruhi oleh gugus fungsional yang berikatan pada struktur utamanya. Struktur dari senyawa flavonoid jenis flavonol menunjukkan gugus fungsional yaitu gugus "hidroksil" dimana menurut penelitian Ammar *et al* (2009), aktivitas penangkap radikal yang diuji pada flavonoid berhubungan dengan jumlah dan posisi ikatan gugus hidroksil dalam molekul.

Pengujian dan Hasil Pembahasan



DAFTAR PUSTAKA

- Agoes, G., 2007. *Teknologi Bahan Alam*. Bandung : Penerbit ITB Press
- Agustina, T., Sunyoto, Agustina, A., 2014. Penetapan Kadar Daun Sirih Merah (*Piper crocatum Ruiz dan Pav*) Secara Spektrofotometri UV-Vis. Klaten : STIKES Muhammadiyah Klaten
- Ahmed, W., 2016. Monitoring and Antitryrosinase activity of clove aromatic flower buds. Pakistan : Comsats University, Islamabad.
- Akbar, H., R., 2010. Isolasi dan Identifikasi Golongan Flavonoid Daun Dandang Gendis (*Clinacanthus nutans*) Berpotensi Sebagai Antioksidan. Skripsi. Bogor : Institut Pertanian Bogor
- Ammar, R. B., Bhourri, W., Sghaier, L. C., Franca- Dijoux, M.G., Ghedira, K. (2009). *Antioxidant and free radical-Scavenging properties of three flavonoids isolated from leaves of Rhamnus alaternus L. (Rhamnaceae) : A Structure- Activity Relationship Study*.
- Ardiana, D., Susanti, A., Gumelar, G., 2 , Bening, Y., 2012. Polaritas pelarut sebagai pertimbangan dalam pemilihan pelarut untuk ekstraksi minyak bekatul dan bekatul varietas ketan (*Oriza sativa glatinosa*). Surakarta : Universitas Sebelas Maret Surakarta

Daftar Pustaka

- Armando. 2009. *Memproduksi Minyak Atsiri Berkualitas*. Jakarta : Penerbit Swadaya
- Ayoola, GA., 2008. Phytochemical Screening and Antioxidan Activities of Some Selected Medicinal Plants Used for Malaria Therapy in Shouthwestrn Nigeria, *Tropical Journal of Pharmaceuatical Research*
- Baraja, M., 2008, Uji Toksisitas Ekstrak Daun Ficus elastica Nois ex Blume Terhadap *Artemia salina* Leach dan Profil Kromatografi lapis Tipis. Surakarta : Skripsi, Fakultas Farmasi Universitas Muhammadiyah Surakarta
- Chen H., Baskaran S., Inbaraj dan Chen B., 2012. Determination of Phenolic Acids and Flavonoids in Taraxacum formosanum Kitam by Liquid Chromatography Tandem Mass Spectrometry Coupled with a Post-Column Derivatization *Technique*. Taiwan : Fu Jen University
- Coneac, G., E., NG., Hadaruga., DI Hadaruga, A Ravis., D Parvu., 2009. Quarsetin and Medicinal Plants Used For Malaria Therapy in Shouthwestrn Nigeria, *Tropical Journal of Pharmaceuatical Research*
- Crozier, a., Clifford, M. N., Ashira, H.,2006 *Phenol, Polyphenols, and Tannins : An Overview In : Pland Secondary Metabolies : Occurrence, Structure and Role in Human Diet*. Blacwell Publishing
- Deinstrop, Elke., 2007. *Applied Thin-Layer Chromatography* 2nd ed. Weinheim: Wiley-VCA.
- Depkes RI, 1995. *Materia Medika Indonesia Jilid VI*. Jakarta : Departemen Kesehatan Republik Indonesia.
- El-Wakil, E. A., Hameed E. S., El-Sayed, M., M.dan Lateef, E. E., 2015. *Identification of the chemical composition of the*

Penelusuran Senyawa Tumbuhan Cengkeh

methanolic extract of Salix tetrasperma Roxb. using LC-ESI-MS and evaluation its potential as antioxidant agent. Saudi Arabia : Chemistry Department, Faculty of Science, Taif University.

- Enayati, D., 2009. *Uji Antimikroba Ekstrak Metanol Bunga Cengkeh Terhadap Bakteri Penyebab Indonesia. Karies Gigi Streptococcus mutans.* Medan : Universitas Sumatera Utara.
- Faqihhudin, 2014. *Fisiologi Herbisida (Ilmu Gulma: Buku II).* Jakarta : Rajawali
- Ferdinanti, F., 2001. *Uji Aktivitas antibakteri obat kumur minyak cengkeh (Syzygium aromaticum) asal bunga, tangkai, dan daun cengkeh terhadap bakteri.* Jakarta : Institut Sains dan Teknologi Nasional Jakarta.
- Fitrya, Lenny A, dan Sari F., 2009, *Identifikasi Flavonoid dari buah Tumbuhan Mempelas.* Sumatera Selatan : Universitas Sriwijaya
- Fuhrman, B., dan Aviram, M., 2003. *Effect of Flavonoids on the Oxidation of Low Density Lipoprotein and Atherosclerosis.* New York : Marcel Dekker, Inc.
- Fuhrman, B., dan Aviram, M., 2002. *Polyphenols and Flavonoids Protect LDL against Atherogenic modification..* New York : Marcel Dekker, Inc.
- Gandjar, I., G., dan Rohman, A., 2007. *Kimia Analisis Farmasi.* Yogyakarta : Pustaka Pelajar.
- Ginting, M.K., 2012. *Validasi Metode LC-MS/ MS Untuk Penentuan Senyawa Asam Trans, Trans-Mukonat, Asam Hippurat, Asam 2-Metil Hippurat, Asam 3- Metol Hippurat, Asam 4-*

Daftar Pustaka

- Metil Hippurat dalam Urin Sebagai Biomaker. Paparan Benzena, Toluena dan Xilena. Skripsi. Jakarta : Universitas Indonesia*
- Gritter, R., J., M., and A., E., Schwarting, 1991. *Pengantar Kromatografi*, terjemahan Kokasih Padmawinata. Bandung : ITB
- Hadi, S., 2012. *Pengambilan Minyak Atsiri Bunga Cengkeh (Clove Oil) Menggunakan Pelarut N-Heksan dan Benzena*. Semarang
- Hajnos, M. W., Sherma, J., 2011. *High Performance Liquid Chromatography in Phytochemical Analysis*. Boca Raton : CRC Press
- Hamdika, A. D., 2011. *Isolasi Akafilin dari Daun Anting-Anting (Acalypha indica) Daerah Bogor*. Bogor : Institut Pertanian Bogor.
- Hapsoh dan Hasanah., 2011. *Budidaya Tanaman Obat dan Rempah*. Medan : Universitas Sumatera Utara
- Harborne, J. B., 1996. *Metode Fitokimia, Penuntun Cara Modern Menganalisa Tumbuhan*. Bandung : ITB.
- Harborne, J. B., 1987. *Metode Fitokimia, Edisi ke dua*, Bandung : ITB.
- Haris, M. 2011. *Penentuan Kadar Flavonoid Total Dan Aktivitas Antioksidan Dari Daun Dewa (Gynura pseudochina (Lour) DC) Dengan Spektrofotometer Uv-Visibel*. Skripsi. Padang: Fakultas Farmasi. Universitas Andalas.
- Hembing, W., 2006. *Atasi Asam Urat & Rematik Ala Hembing*. Jakarta : Puspa Swara.
- Kardinan, A., 2003. *Tanaman Pengusir dan Pembasmi Nyamuk Vol I*. Jakarta : Agro Media Pustaka.

Penelusuran Senyawa Tumbuhan Cengkeh

- Khunaifi, M. (2010). *Uji Aktivitas Antibakteri Ekstrak Daun Binahong (Anredera cordifolia (ten) Steenis) Terhadap Bakteri Staphylococcus aureus dan Pseudomonas aeruginosa*. Malang : Universitas Islam Negeri Maulana Malik Ibrahim
- Kelly GS., 2011. *Quarsetin*. Altern Medical Rev.
- Khopkar, S. M.. 1990. *Konsep Dasar Kimia Analitik*. Jakarta. UI Press.
- Khopkar, S.M., 2002. *Konsep Dasar Kimia Analitik*. Jakarta : UI Press.
- Khopkar, S.M. 2008. *Konsep Dasar Kimia Analitik*. Jakarta : UI Press.
- Kristanti, Alfinda N., 2008. *Buku Ajar Fitokimia*. . Surabaya: Airlangga University Press.
- Kristianti, A. N, N. S. Aminah, M. Tanjung, B. Kurniadi, 2008. *Fitokimia*. Surabaya : Universitas Airlangga press.
- Kumar SG, Saikishore MBP, PanchalS. 2012 *Evaluation of Flower Buds Syzygium Aromaticum For Antimicrobial and Wound Healing Activity in Rats*. Int J Ph Sci.
- Latifah, 2015. *Identifikasi Golongan Senyawa Flavonoid dan Uji Aktivitas Antioksidan Pad Ekstrak Rimpang Kencur (Kaempferia galangal L.) dengan Metode DPPH (1,1-Difenil-2-Pikrilhidrazil) Skripsi*. Malang :Universitas Islam Negeri Maulana Malik Ibrahim.
- Lenny, S., 2006. *Senyawa Terpenoida dan Steroida*. Medan : Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam Universitas Sumatera Utara.
- Lehman, J. W., 2008. *Operational Organic Chemistry 4thEdition*. Prentice Hall: Upper Saddle River, NJ.

Daftar Pustaka

- Lipinski, B. 2011. *Hydroxyl Radical and Its Scavengers in Health and Disease.. Oxidative Medicine and Cellular Longevity.*
- Lipsy, P. 2010. *Thin Layer Chromatography Characterization of the Active Ingredients in Excedrin and Anacin.* USA: Department of Chemistry and Chemical Biology. Stevens Institute of Technology.
- Morikawa, K., Nonaka, M., Narahara, M, Torii, I., Kawaguchi, K., and Yoshikawa, T., Kumazawa, Y., and Morikawa, S., 2003, *Inhibitory effect of quercetin on carrageenan-induced inflammation in rats .* Life Sci.
- Mostafa A. 1991. *Diversifikasi hasil penggunaan cengkeh dan ikutannya.* Bogor : Balai Besar Penelitian dan Pengembangan Industri Hasil Pertanian.
- Munisa, A., 2012. *Aktivitas Antioksidan Ekstrak Daun Cengkeh.* Makassar : Universitas Negeri Makassar.
- Mursyidi, A., 1990. *Analisis Metabolit Sekunder.* Yogyakarta : Universitas Gadjah Mada.
- Normaidah 2015. *Isolasi dan Elusidasi Struktur Senyawa Penanda dari Ekstrak Meniran (Phyllanthus niruri L.).* Surakarta : Universitas Muhamadiyah Surakarta.
- Nurdjannah, N., 2004. *Diversifikasi Penggunaan Cengkeh.* Bogor : Balai Besar Penelitian dan Pengembangan Pasca Panen Pertanian Indonesia.
- Palleros, D.R., 2004, *Solvent-Free Synthesis of Chalcones,* J. Chem. Educ.
- Patel, J., M., 2008. *A Review of Potential Health Benefits of Flavonoids .* Lethbridge Undergraduate Research Journal.

Penelusuran Senyawa Tumbuhan Cengkeh

- Pavia, D. L., G. M. Lampman, G. S. Kriz-jr. 2009. *Introduction to Spectroscopy : A guide for Students of Organik Chemistry*. 4rd Edition. Thomson Learning Inc. London.
- Pino J., A., Marbot R, Agüero J., Fuentes V., 2001. *Essential Oil From Buds and Leaves of Clove (Syzygium aromaticum (L.) Merr. Et Perry) grown in Cuba*. Journal of Essential Oil Research.
- Prianto, H., R., Retnowato, U., P., Juswono. *Isolasi dan Karakterisasi dari minyak bunga cengkeh (Syzygium aromaticum) kering Hasil Distilasi Uap*. Malang : Universitas Brawijaya
- Rijke E., 2005. *Trace-level Determination of Flavonoids and their Conjugates Application Plants of the Leguminosae Family*. Amsterdam : Universitas Amsterdam.
- Retnowati, K., 2009. *Pengaruh Infusa Akar Tempuyung (Sonchus arvensis) Terhadap Penurunan Kadar Asam Urat Pada Tikus Putih (Rattus Norvegicus)*. Surakarta : Universitas Muhamadiyah Surakarta.
- Riyanto, W., 2010. *Efek Ekstrak Daun Cengkeh (Syzygium aromaticum) terhadap Kerusakan Hepatosit Mencit Akibat Minyak Sawit dengan Pemanasan Berulang*. Surakarta : Universitas Sebelas Maret.
- Robinson, T., 1991. *Kandungan Organik Tumbuhan Tinggi*. Edisi ke-6. Bandung : Institut Teknologi Bandung .
- Robinson, T., 1995. *Kandungan Organik Tumbuhan Tinggi* . Bandung : Institut Teknologi Bandung.
- Rusdi, 1990. *Kimia Bahan Alam*. Padang: Universitas Andalas.
- Safita, M., N., dan Suyatno 2016. *Isolasi dari Ekstrak Senyawa Flavonoid Dari Ekstrak Diklorometana Batang Tumbuhan Ashitaba (Augelica keiskei)*. Surabaya : Univesritas

Daftar Pustaka

Negeri Surabaya.

- Sampath M. dan Vasanthi M., 2013. *Isolation, Structural, Elucidation Of Flavonoids From Polyalthia Longifolia (sonn.) Thawaites and Evaluation Of Antibacterial, Antioxidant and Anticancer Potential*. India : Department of Biotechnology, Kamaraj college of Engineering and Technology
- Sastrohamidjojo, H, 1991, *Kromatografi*, Edisi II, Yogyakarta: Yogyakarta.
- Saxena R., Sharma R.,, Nandy B. C., 2017. *Chromatographic Determination Of Phenolic Profile From Punica Granatum Fruit Peels*. India : Jayoti Vidyapeeth Women's University.
- Setyowati, W., Ariani, S., R., Ashadi, Mulyani, Rahmawati, C., 2014. *Skrining Fitokimia dan Identifikasi Komponen Utama Ekstrak Metanol Kulit Durian (Durio zibethinus Murr.) Varites Pertruk*. Surakarta : Universitas Negeri Surakarta
- Simanjuntak, M.R., 2008, *Ekstraksi dan Fraksinasi Komponen Ekstrak Daun Tumbuhan Senduduk (Melastoma malabathricum L.) serta Pengujian Efek Sediaan Krim Terhadap Penyembuhan Luka Bakar*, Skripsi, Medan : Fakultas Farmasi Universitas Sumatera Utara.
- Sitorus, R. M. H., Adeanne C. W., Paulina V.Y.Y., (2012) *Isolasi dan Identifikasi Senyawa Flavonoid Pada Daun Adam Hawa (Rhoe discolor)*. Manado: Universitas Samratulangi.
- Spencer, J.P. E., 2003. *Metabolism in the small intestine ang gastrointestinal tract*.
- Di-dalam : Rice-evans, C. A. dan L.Packer. *Flavonoid in*

Penelusuran Senyawa Tumbuhan Cengkeh

Health and Disease, Second Edition, Revised and Expanded.
New York.

Stahl, E., 1969. *Apparatus and General Techniques in TLC.* Dalam Stahl, E. (ed.)

Thin Layer Chromatography a laboratory handbook. Terj. Dari *Dunnschicht chromatographie*, oleh Ashworth, M.R.F Berlin : Springer- Verlag

Sumarno, 2001. *Teori Dasar Kromatografi.* Yogyakarta : Universitas Gadjah Mada.

Sumaryono, W. 1996. *Teknologi pembuatan sediaan fitofarmaka skala industri.* Warta Tumbuhan Obat Indonesia.

Supratman, U., 2010. *Elusidasi Struktur Senyawa Organik (metode spektroskopi untuk penentuan struktur senyawa organic).* Bandung : Widya Padjajaran

Supriadi, D., 2008. *Optimalisasi Ekstraksi Kurkuminoid Temulawak (Curcuma xanthoriza roxb.).* Bogor : Institut Pertanian Bogor.

Syamsuhidayat. 1991. *Inventarisasi Tanaman Obat Indonesia, edisi kedua, Jakarta : Departemen Kesehatan RI.*

Thomas, A., N., S., 2007. *Tanaman Obat Tradisional.* Yogyakarta : Kanisius.

Waluyo, S., 2004. *Aneka Tip Obat Alami dalam Buah dan Sayuran.* Jakarta : Elex Media.

Watson, D., G., 2009. *Analisis Farmasi : buku ajar untuk mahasiswa farmasi dan praktisi kimia farmasi.* Jakarta : EGC.

Widayanti, S. M., A. W. Permana, H. D. Kusumaningrum. 2009. *Kapasitas Kadar Antosianin Ekstrak Tepung Kulit Buah Manggis (Garcinia mangostana L.) Pada Berbagai Pelarut*

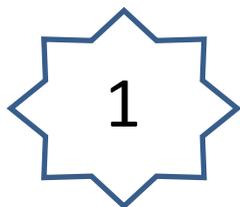
Daftar Pustaka

Dengan Metode Maserasi. J. Pascapanen.

- Worotikan, D., E., 2011. *Efek Buah Lemon Cui (Citrus microcarpo) Terhadap Kerusakan Lipida Pada Ikan Mas (Cyprinus carpio L.) dan Ikan Cakalang (Katsuwonus pelamis) Mentah*. Manado : Universitas Sam Ratulangi
- Vitasari, E W. 2013. *Antihiperlipidemia Ekstrak Etanol Batang Kayu Kuning (Arcangelisia flafa (L.) Merr.) Terhadap Tius Putih Galur Wistar Yang Diinduksi Pakan Tinggi Lemak*. Skripsi. Sekolah Tinggi Ilmu Farmasi "Yayasan Farmasi". Semarang.
- Vogeser, M., Seger, C., 2008. *A decade of HPLC-MS/MS in the routine clinical laboratory-goals for futher development*. Clinical Biochemistry.
- Voight, R., 1995, *Buku Pelajaran Teknologi Farmasi, diterjemahkan oleh Soendari Noerono*. Yogyakarta : Gajah Mada University Press,
- Yanti, M., 2014. *Isolasi dan Identifikasi Senyawa Alkaloid dalam Ekstrak Daun Sirsak Hutan (Annona glabra)*. Bogor : Institut Pertanian Bogor.
- Yasmin N.Y. Azah, N., Chang Y.S., Mailina J., Said A.A., Majid A.J., Husni S.S., Hasnida N.H.,2008. *Comparison of hemical profiles of selected gaharu oils from Peninsular Malaysia*. The Malaysian Journal of Analytical Sciences

TOPIK 2

Analisis Kadar Senyawa Flavonoid Ekstrak
Metanol Bunga Cengkeh Dengan
Menggunakan Spektrofotometri Uv-Vis



PENDAHULUAN

Senyawa flavonoid adalah suatu kelompok senyawa fenol yang terbesar yang ditemukan di alam. Flavonoid merupakan senyawa dengan 15 atom karbon yang tersusun dalam konfigurasi $C_6-C_3-C_6$, yaitu dua cincin aromatik yang dihubungkan oleh tiga atom karbon yang dapat atau tidak dapat membentuk cincin ketiga (Salisbury dan Ross, 1995).

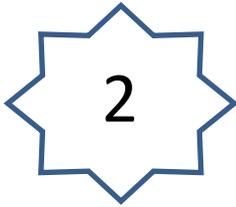
Flavonoid terdapat pada semua bagian tumbuhan termasuk daun, akar, kayu, kulit, bunga, buah dan biji (Worotikan, 2011). Senyawa ini terdiri dari beberapa golongan utama yaitu antosianidin, flavonol, flavone, flavonone, dan isoflavon (Spencer *et al*, 2003). Flavone yang terdiri atas apigenin dan luteolin hanya ditemukan pada bagian pangan tertentu sedangkan flavonol terdiri atas kuarsetin yang umumnya merupakan komponen terbanyak dari tanaman misalnya kaempferol dan myricetin (Lee, 2000). Manfaat flavonoid antara lain memiliki aktivitas antioksidan, antibakteri, antivirus, antiradang, antialergi dan antikanker (Kurniasari, 2006).

Menurut Kumar (2012) cengkeh mempunyai banyak khasiat diantaranya sebagai antibakteri, antivirus, antifungi, antiplatelet, antikanker, antihistamin dan antioksidan. Bagian tanaman yang dapat dimanfaatkan adalah daun, tangkai daun dan bunga cengkeh (Purmorad, 2006). Cengkeh dikenal sebagai antioksidan terbaik diantara rempah-rempah lainnya dan sangat efektif dalam

Pendahuluan

melindungi tubuh dari kerusakan yang disebabkan oleh radikal bebas. Antioksidan menstabilkan radikal bebas dan menghambat terjadinya reaksi berantai dari pembentukan radikal bebas yang dapat menimbulkan stress oksidatif (Packer dan Yoshikawa, 1999).

Penelitian mengenai tanaman cengkeh di Indonesia sebagian besar hanya mencakup bagian daunnya saja sedangkan bagian bunganya masih sedikit yang melakukan penelitian tentang khasiat yang terkandung dalam bunga cengkeh tersebut, padahal didalam bunga cengkeh terkandung suatu komponen fenolik yang merupakan antioksidan yang bermanfaat bagi kesehatan manusia (Khalaf *et al.*, 2007).



TANAMAN CENGKEH

A. Tanaman Cengkeh (*Syzygium aromaticum* (L.) Merr. & Perry)

Sinonim (Thomas, 2007).

Sinonim cengkeh adalah *Syzygium aromaticum* (L.) Merr & Perry, *Eugenia aromatica*, *Carphyllus aromaticus*, *Jambos carryhopyllus*.

Klasifikasi (Bulan, 2004)

Divisi	: Spermatophyta
Sub divisi	: Angiospermae
Kelas	: Dicotyledoneae
Ordo	: Myrtales
Familia	: Myrtaceae
Genus	: <i>Syzygium</i>
Species	: <i>Syzygium aromaticum</i> (L.)

Tanaman Cengkeh



Gambar 2.1 Cengkeh (*Syzygium aromaticum*)

B. Morfologi

Cengkeh merupakan jenis tumbuhan perdu yang dapat memiliki batang pohon besar dan berkayu keras. Cengkeh mampu bertahan hidup puluhan bahkan sampai ratusan tahun, tingginya dapat mencapai 20-30 meter dan cabang-cabangnya cukup lebar (Thomas, 2007).

Daun tunggal, bertangkai tebal, bentuk bulat telur sampai lanset memanjang, ujung runcing, pangkal meruncing, tepi rata, tulang daun menyirip, permukaan atas mengkilap panjang 6-13,5 cm, lebar 2,5-5 cm, warna hijau atau coklat muda saat masih muda dan hijau tua ketika tua (Kardinan, 2003).

Penelusuran Senyawa Tumbuhan Cengkeh

Bunga cengkeh berbilangan 4 warna merah jambu tersusun dalam tendon yang keluar dari ketiak-ketiak daun atau ujung-ujung cabang. Kelopak sedikit memanjang di atas bakal buah, hijau kuning, kemerahan, tinggi 1-1,5 cm, pinggiran taju kelopak bulat telur sampai segitiga, tinggi 4 cm. Buah berupa buni memanjang atau bulat telur berbalik (Enayati, 2009).

Cengkeh atau *syzygium aromaticum* digunakan sebagai rempah-rempah dihampir semua masakan didunia. Pohon cengkeh adalah pohon cemara yang tumbuh hingga ketinggian 8-12 m, memiliki daun persegi besar dan bunga dalam berbagai kelompok. Kuncup bunga pada awalnya berwarna pucat dan secara bertahap menjadi hijau setelah itu berubah menjadi merah terang (Millind & Deepa, 2011).

C. Kandungan Kimia

Bunga cengkeh mengandung Alkaloid, Glycosida, Flavonoid, Fenol, Saponin, Tanin Dan Terpenoid (Ahmed, W., 2016). Bunga cengkeh berkualitas baik mengandung minyak esensial 1-20%. Minyak didominasi oleh eugenol (70-85) %, eugenil asetat (15%) dan β -caryophyllene (5-12 %), yang membentuk 99% minyak. Ko diidentifikasi 36 senyawa dari minyak atsiri dalam cengkeh (Pino, 2001).

Cengkeh mengandung 10 -13% tannin (Milind dan Deepa, 2011). Kandungan kimia yang terdapat pada cengkeh adalah saponin, tannin, alkaloid, glikosida, flavonoid dan minyak atsiri. Minyak atsiri pada bagian bunga sekitar 14-21 % dengan kadar eugenol 78-95 % (Hadi, 2012).

D. Khasiat

Cengkeh mempunyai khasiat dalam mengatasi berbagai penyakit, misalnya dapat digunakan untuk mengatasi penyakit rematik, asam urat tinggi, batuk, masuk angin, gangguan lambung, nyeri dada dan perut, serta sakit gigi (Hemming, 2006).

Cengkeh digunakan secara luas dalam perawatan gigi, untuk menghilangkan sakit gigi, sakit gusi dan bisul dimulut. Berkumur dengan minyak cengkeh juga dapat membantu saat sakit tenggorokan dan ketika sulit bernafas. Minyak cengkeh efektif membunuh banyak bentuk infeksi bakteri dari makanan yang terkontaminasi. Minyak cengkeh dapat digunakan untuk mengurangi infeksi, luka, gigi hitam dan senggatan serangga. Cengkeh juga efektif untuk mengurangi infeksi jamur, sangat baik untuk masalah kulit seperti jerawat. Minyak bunga cengkeh merangsang sistem peredaran darah, mengurangi kelelahan, mengurangi insomnia, kehilangan memori, kecemasan dan depresi (*International Organization for Standarization*, 2002).

E. Flavonoid

Flavonoid adalah senyawa yang terdiri dari 15 atom karbon yang umumnya tersebar didunia tumbuhan. Flavonoid adalah pigmen tanaman untuk memproduksi warna bunga merah atau biru pigmentasi kuning pada kelopak yang digunakan untuk menarik hewan penyerbuk (Worotikan, 2011).

Flavonoid merupakan salah satu kelompok senyawa yang banyak terdapat pada jaringan tanaman. Flavonoid berperan sebagai antioksidan. Aktivitas antioksidan

Penelusuran Senyawa Tumbuhan Cengkeh

flavonoid bersumber pada kemampuan mendonasikan atom hidrogennya atau melalui kemampuannya mengkhelat logam.

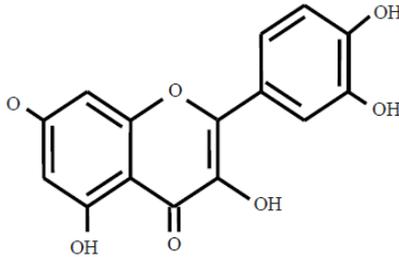
Berbagai hasil penelitian menunjukkan bahwa senyawa flavonoid mempunyai aktivitas antioksidan yang beragam pada berbagai jenis sereal, sayuran dan buah-buahan (Redha, 2010).

Flavonoid merupakan salah satu kelompok senyawa bahan alam yang banyak ditemukan pada tumbuhan. Flavonoid pada umumnya mempunyai kerangka flavon C₆-C₃-C₆ dengan tiga atom karbon sebagai jembatan antara gugus fenil yang biasanya juga terdapat atom oksigen. Berdasarkan pada tingkat ketidakjenuhan dan oksidasi dari segmen karbon, flavonoid selanjutnya dibagi menjadi beberapa kelas. Senyawa ini biasanya terdapat sebagai pigmen tumbuhan untuk menarik *pollinators* atau sebagai bahan pertahanan bagi tumbuhan untuk melawan serangga dan mikroorganisme (Rosa, 2010).

Flavonoid merupakan senyawa pereduksi yang baik, menghambat banyak reaksi oksidasi, baik secara enzim maupun non enzim. Flavonoid bertindak sebagai penampung yang baik radikal hidroksi dan superoksida dengan demikian melindungi lipid membran terhadap reaksi yang merusak. Aktivitas antioksidannya dapat menjelaskan mengapa flavonoid tertentu merupakan komponen aktif tumbuhan yang digunakan secara tradisional untuk mengobati gangguan fungsi hati (Robinson, 1995).

F. Struktur Flavonoid

Berdasarkan strukturnya, flavonoid di golongan dalam enam kelompok antara lain aglikon (flavonoid tanpa gula terikat), flavonoid-C-glikosida (flavonoid yang terikat gula pada inti benzena), flavonoid-O-glikosida (flavonoid yang terikat gula pada gugus hidroksilnya), bioflavonoid (flavonoid biner), flavonoid sulfat (flavonoid yang berikatan dengan satu atau lebih gugus sulfat), dan aglikon yang bersifat optis aktif (Taiz dan Zeiger, 2008).



Gambar 2.2. Struktur Senyawa Flavonoid (Redha, 2010)

Kerangka flavonoid terdiri atas satu cincin aromatik A, satu cincin aromatik B, dan cincin tengah berupa heteroskilik yang mengandung oksigen dan bentuk teroksidasi cincin ini dijadikan dasar pembagian flavonoid ke dalam sub-sub kelompoknya (Hess, tt). Sistem penomoran digunakan untuk membedakan posisi karbon di sekitar molekulnya (Cook dan Samman, 1996).

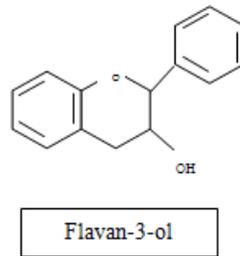
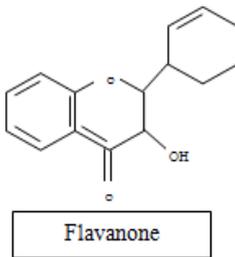
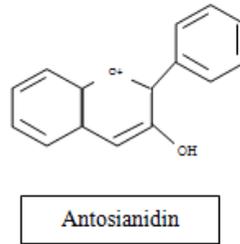
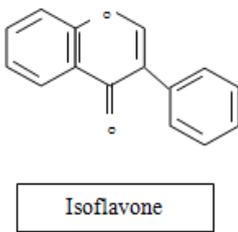
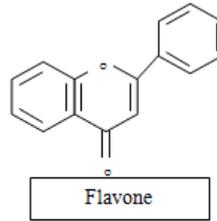
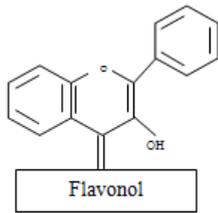
G. Jenis-Jenis Flavonoid

Jenis flavonoid dalam jaringan tumbuhan mula-mula didasarkan kepada telah sifat kelarutan dan reaksi warna. Struktur berbagai tipe atau golongan flavonoid bervariasi sesuai dengan kerangka dasar heterosiklik beroksigen yang dapat berupa gama piron, piron atau pirilium. Kecuali pada auron dan khalkon, siklisasi terjadi antara atom karbon didekat cincin benzene (B) dan satu gugus hidroksil cincin A. Kelas-kelas yang berlainan ini diflavonoid dibedakan berdasarkan cincin heterosiklik oksigen dan juga hidroksil yang tersebar menurut pola yang berlainan (Robinson, 1991).

Menurut fungsi fisiologisnya, flavonoid dikelompokkan menjadi tiga, yaitu antosianin (flavonoid yang berperan sebagai pigmen warna), flavonol dan flavon (perlindungan terhadap radiasi UV berlebih dan sebagai sinyal biologis), dan isoflavon (flavonoid binet yang berperan sebagai senyawa pertahanan). Walaupun terlihat beragam, namun golongan flavonoid disintesis oleh prekursor yang sama (fenilalanin, yang merupakan asam amino aromatik) melalui jalur biosintesis asam sikimat yang khas hanya terdapat pada tumbuhan (Taiz dan Zeiger, 2008).

Flavonoid dibagi menjadi flavon, flavonol, 3-flavanol, isoflavon, flavanon dan antosianidin (Crozier, 2006).

Gambar 2.3 Jenis-Jenis Senyawa Flavonoid (Crozier, 2006)



H. Khasiat Senyawa Flavonoid

Di antara sifat-sifat utama yang dapat menjelaskan potensi manfaat kesehatan dari flavonoid adalah aktivitas antioksidannya. Golongan flavonoid memiliki aktivitas

Penelusuran Senyawa Tumbuhan Cengkeh

antioksidan meliputi flavon, flavonol, isoflavon, dan kalkon (Kumalaningsih, 2007). Menurut Retnowati (2009) flavonoid mempunyai aktivitas menurunkan kadar asam urat melalui penghambatan enzim Xantin Oksidase.

Kekuatan aktivitas antioksidan dari flavonoid bergantung pada jumlah dan posisi dari gugus OH yang terdapat pada molekul. Semakin banyak substitusi gugus hidroksi pada flavonoid, maka aktivitas antiradikalnya semakin besar. Adanya gugus Orto-katekol (3'4 -OH) pada cincin B flavonoid merupakan faktor penentu kapasitas antioksidan yang tinggi (Amic *et al.*, 2003).

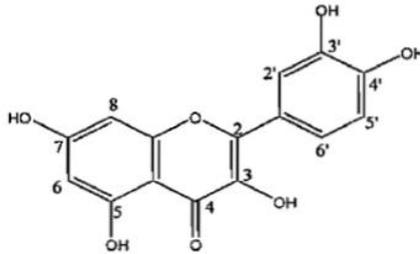
Senyawa flavonoid secara *in vitro* telah terbukti merupakan inhibitor yang kuat pada lipid peroksidasi, menangkap senyawa oksigen atau nitrogen (ROS atau RNS), mengambat kerusakan hem protein dan pengikat ion logam. Adanya hidroksilasi dan posisi relatif dari gugus OH merupakan faktor penting yang menentukan kemampuan flavonoid sebagai antioksidan (Hallwell, *et al.*, 2000). Flavonoid dapat mengikat superoksida, radikal hidroksil, dan peroksil, yang berpengaruh terhadap berbagai langkah dalam aliran arakidonat melalui cyclooxygenase-2 atau lipoxygenase (Tapas, 2008).

I. Kuarsetin

Kuarsetin merupakan suatu zat aktif yang termasuk dalam golongan flavonoid flavonol. Flavonol merupakan salah satu dari enam subgolongan flavonoid. Kuarsetin merupakan flavonoid yang secara luas tersebar pada tumbuhan (Kelly, 2011). Kuarsetin dibedakan menjadi kuarsetin aglikon dan glikosid. Kuarsetin aglikon merupakan kuarsetin yang tidak berikatan dengan gula,

Tanaman Cengkeh

sementara kuarsetin glikosid merupakan kuarsetin yang berikatan dengan gugus glikosil (glukosa, rhamnosa, rutinosa) (Kelly, 2011).



Gambar 2.4 Struktur Kuarsetin (Herowati, 2008)

Kuarsetin (3, 4 -dihidroksiflavanol) merupakan senyawa flavonoid dari kelompok flavonol dan terdapat terutama pada tanaman teh, tomat, apel, kakao, anggur dan bawang yang memiliki sifat antioksidan yang sangat potensial (Kokasih, 2004). Kuarsetin diketahui sangat berperan dalam berbagai efek biologis yaitu sebagai antioksidan dengan menangkap radikal bebas, antikanker, antiviral, mencegah arterosklerosis dan mencegah inflamasi kronis (Coneac *et al.*, 2009). Kuarsetin juga diketahui dapat mengeluarkan histamine sehingga dapat digunakan untuk mencegah terjadinya reaksi alergi. Kuarsetin juga memiliki aktivitas menghambat terjadinya agregasi trombosit dan pembentukan thrombus sehingga dapat menurunkan resiko terjadinya penyakit kardiovaskular (Kelly, 2011).

J. Antioksidan

Definisi Antioksidan

Antioksidan adalah substansi yang diperlukan tubuh untuk menetralkan radikal bebas dan mencegah kerusakan yang ditimbulkan oleh radikal bebas terhadap sel normal, protein, dan lemak. Antioksidan menstabilkan radikal bebas dengan melengkapi kekurangan electron yang dimiliki radikal bebas, dan menghambat terjadinya reaksi berantai dari pembentukan radikal bebas yang dapat menimbulkan stress oksidatif (Packer dan Yoshikawa, 1999).

K. Antioksidan Menurut Mekanisme Kerjanya

Menurut mekanisme kerjanya antioksidan dibagi menjadi 3 mekanisme kerja yaitu sebagai berikut :

1. Antioksidan Primer

Antioksidan primer atau antioksidan endogen disebut juga antioksidan enzimatis, yang dapat memberikan atom hydrogen secara cepat kepada senyawa radikal, kemudian radikal antioksidan yang terbentuk segera berubah menjadi senyawa yang lebih stabil. Antioksidan primer bekerja dengan cara mencegah pembentukan senyawa radikal bebas atau merubah radikal bebas yang telah terbentuk menjadi kurang reaktif (Winarsi, 2007).

2. Antioksidan Sekunder

Antioksidan sekunder atau antioksidan eksogen disebut juga antioksidan non- enzimatis. Antioksidan kelompok ini melakukan pertahanan preventif terhadap radikal bebas. Dalam system pertahanan ini, terbentuknya radikal bebas dihambat dengan cara pengkelatan logam

atau dirusak pembentukannya. Antioksidan non-enzimatis juga bekerja dengan cara menangkap radikal bebas (Free radical Scavenger). Antioksidan sekunder dapat berupa komponen non-nutrisi dan komponen nutrisi meliputi vitamin E, vitamin C, karoten, flavonoid, bilirubin dan albumin (Winarsi, 2007).

3. Antioksidan tersier

Antioksidan tersier meliputi system enzim DNA-repair dan metionin sulfoksida reduktase. Enzim-enzim ini berperan dalam perbaikan biomolekuler yang rusak akibat reaktivitas radikal bebas. Kerusakan DNA yang terinduksi senyawa radikal bebas dicirikan oleh rusaknya single dan double strand (Winarsi, 2007).

L. Jenis-jenis Antioksidan

Adapun jenis-jenis antioksidan adalah sebagai berikut (Pokorny, *et al.*, 2011) :

1. Antioksidan Sintetik

Beberapa dari antioksidan yang populer digunakan adalah komponen fenol seperti butylated hydroxyanisol (BHA), butylated hydroxytoluene (BHT), tersier butylhydroquinone (TBHQ) dan ester dari asam galat. Contohnya propel galat (PG). Antioksidan sintetik telah sepenuhnya diuji reaksi toksisitasnya, tapi beberapa menjadi toksik setelah penggunaan dalam jangka waktu lama, data toksikologi menentukan beberapa peringatan dalam penggunaannya. Dalam hal ini produk alami tampak lebih sehat dan aman dari pada antioksidan sintetik.

2. Antioksidan Alami

Antioksidan alami ditemukan pada sebagian besar tanaman, mikroorganisme, jamur dan jaringan binatang. Sebagian besar antioksidan alami adalah kelompok fenolik seperti tokoferol, flavonoid, lignin dan asam fenol. Sedangkan antioksidan alami dari golongan nitrogen adalah kafein dan asam amino.

M. Hubungan Antara Xantin Oksidase dan Antioksidan

Xantin oksidase mengkatalisis oksidasi hipoxantin dan xantin menjadi asam urat menghasilkan radikal superoksida dan menyebabkan meningkatnya oksidatif pada organism. Pada saat bereaksi dengan xantin untuk membentuk asam urat, atom oksigen ditransfer dari molybdenum ke xantin dan memproduksi ROS yaitu radikal superoksida dan hydrogen peroksida (Cos *et al.*, 1998).

Xantin oksidase merupakan sumber terpenting ROS dan menyebabkan hiperurisemia (gout) dan bertanggung jawab terhadap kerusakan oksidatif pada jaringan. Enzim ini mengurangi oksigen molekul, mengarah ke pembentukan anion superoksida dan hydrogen peroksida (Ahmad, 2012).

Akibatnya aktivitas enzim xantin oksidase memberikan kontribusi terjadinya stress oksidatif. Sehingga pengurangan aktivitas xantin oksidase bermanfaat untuk mencegah terjadinya sters oksidatif dengan memberikan inhibitor xantin oksidase seperti senyawa polifenol. Polifenol, mulai dari senyawa sederhana hingga polimerasi tinggi memiliki aktivitas antioksidan pada beberapa cara seperti ROS- scavenging, pengkelat logam transisi, penghambatan

Tanaman Cengkeh

ROS hasil produksi enzim, dan interaksi dengan antioksidan lainnya (Ahmad, 2012).

Flavonoid memiliki efek utama sebagai inhibitor xantin oksidase dan aktivitas antioksidan. Oleh karena itu, ada korelasi positif antara inhibitor xantin oksidase dan kadar flavonoid pada ekstrak (Owen dan Johns, 1999).

Sebagai salah satu antioksidan, flavonoid memberikan kontribusi mengurangi stress oksidatif melalui penghambatan aktivasi pada regulasi enzim, seperti xantin oksidase, fosfolipase, dan nitrit oksida sintase.

Selain itu flavonoid dapat mengambat pembentukan nitrit peroksida melalui penghambatan induksi nitrit oksida dalam aktivasi makrofag yang dapat mempercepat kondisi stress (Ahmad, 2012).

N. Ekstraksi/ Maserasi

Ekstraksi adalah suatu proses pemisahan substansi dari campurannya dengan menggunakan pelarut yang sesuai. Metode ekstraksi yang dipilih untuk digunakan dalam suatu penelitian fitokimia sangat bergantung pada tekstur dan kandungan air bahan tumbuhan yang di ekstraksi dan pada jenis senyawa yang akan diisolasi (Kristanti, *et al.*, 2008). Pemilihan pelarut merupakan faktor yang menentukan dalam ekstraksi. Pelarut yang digunakan dalam ekstraksi harus dapat menarik komponen aktif dalam campuran. Hal-hal yang harus diperhatikan dalam memilih pelarut adalah selektifitas, sifat pelarut, kemampuan untuk mengekstraksi, tidak bersifat racun, mudah diuapkan, dan harganya relatif murah (Gamse, 2002).

Maserasi merupakan salah satu metode ekstraksi sederhana yang paling banyak digunakan khususnya untuk mengekstraksi senyawa yang lebih polar. Maserasi dilakukan dengan cara merendam serbuk simplisia dalam cairan penyari. Cairan penyari akan menembus dinding sel dan masuk kedalam rongga sel yang mengandung zat aktif dan zat aktif akan larut. Simplisia yang akan diekstraksi ditempatkan pada wadah atau bejana yang bermulut lebar bersama larutan penyari yang telah ditetapkan, bejana ditutup rapat kemudian dikocok berulang-ulang sehingga memungkinkan pelarut masuk keseluruh permukaan simplisia. Rendamen tersebut disimpan terlindung dari cahaya langsung untuk mencegah reaksi yang dikatalis oleh cahaya atau perubahan warna. Waktu maserasi bervariasi antara 15-30 menit tetapi kadang-kadang bisa sampai 24 jam. Jumlah pelarut yang diperlukan juga cukup besar, berkisar antara 10-20 kali jumlah sampel (Kristanti, *et al.*, 2008).

O. Skrining Fitokimia

Menurut Kristanti (2008), skrining fitokimia merupakan tahap pendahuluan dalam suatu penelitian fitokimia yang bertujuan memberi gambaran tentang golongan senyawa yang terkandung dalam tanaman yang diteliti.

Metode skrining fitokimia dilakukan dengan melihat rekasi pengujian warna dengan menggunakan suatu pereaksi warna. Skrining fitokimia merupakan metode yang sederhana, cepat, serta sangat selektif, yang dapat digunakan untuk mengidentifikasi golongan senyawa serta mengetahui keberadaan senyawa-senyawa aktif biologis yang terdistribusi dalam jaringan tanaman (Nohong, 2009). Skrining fitokimia adalah pemeriksaan kimia secara kualitatif terhadap senyawa- senyawa aktif biologis atau senyawa bermanfaat dalam pengobatan yang terdapat dalam

simplicia nabati, oleh karena itu skrining fitokimia ditujukan terhadap golongan senyawa seperti alkaloid, flavonoid, saponin dan tannin (Lumbanraja, 2009).

P. Kromatografi Lapis Tipis (KLT)

Definisi dan Prinsip KLT

Kromatografi didefinisikan sebagai prosedur pemisahan zat terlarut oleh suatu proses migrasi diferensial dinamis dalam sistem yang terdiri dari dua fase atau lebih, salah satu diantaranya bergerak secara berkesinambungan dalam arah tertentu dan didalamnya zat-zat itu menunjukkan perbedaan mobilitas disebabkan adanya perbedaan dalam adsorpsi, partisi, kelarutan, tekanan uap, ukuran molekul atau kerapatan muatan ion. Dengan demikian masing-masing zat dapat diidentifikasi atau ditetapkan dengan metode analitik (Depkes RI, 1995).

Kromatografi lapis tipis (KLT) dikembangkan oleh Izmailoff dan Schraiber pada tahun 1983. KLT merupakan bentuk kromatografi planar, selain kromatografi kertas dan elektroforesis (Gandjar, 2007).

Prinsip kromatografi lapis tipis yaitu memisahkan komponen-komponen campuran atas dasar perbedaan adsorpsi atau partisi oleh fase diam di bawah gerakan pelarut pengembang (Mulja dan Suharman, 1995). Menurut Gritter, (1991) prinsip KLT yaitu perpindahan analit pada fase diam karena pengaruh fase gerak. Proses ini biasa disebut elusi. Semakin kecil ukuran rata-rata partikel fase diam dan semakin sempit kisaran ukuran fase diam, maka semakin baik kinerja KLT dan hal efisiensi dan resolusinya.

Penelusuran Senyawa Tumbuhan Cengkeh

Fase gerak yang dikenal sebagai pelarut pengembang akan bergerak sepanjang fase diam karena pengaruh kapiler pada pengembang secara menaik, atau karena pengaruh gravitasi pada pengembang secara menurun (Gandjar, 2007).

Kromatografi digunakan untuk memisahkan substansi campuran menjadi komponen-komponennya. Pelaksanaan kromatografi lapis tipis (KLT) menggunakan sebuah lapis tipis silika atau alumina yang seragam pada sebuah lempeng gelas atau logam atau plastik yang keras. Gel silika merupakan fase diam. Fase diam untuk KLT seringkali mengandung substansi yang dapat berpendar dalam sinar UV (Masroh, 2010).

Menurut Palleros (2000) identifikasi dari senyawa-senyawa yang terpisah pada lapis tipis diperoleh dengan harga faktor retensi (R_f) yaitu dengan membandingkan jarak yang ditempuh oleh senyawa terlarut dengan jarak tempuh pelarut. Dalam analisis kuantitatif dengan metode KLT nilai R_f diharapkan berada antara 0,2 sampai 0,8 (Kowalska, 2003)

$$R_f = \frac{\text{jarak (cm)titik pusat bercak}}{\text{jarak (cm)rambat fase gerak}} \quad (\text{Gandjar, 2007}).$$

Q. Keuntungan Kromatografi Lapis Tipis (KLT)

Kromatografi lapis tipis (KLT) direkomendasikan sebagai teknik yang efektif untuk identifikasi tanaman obat. Beberapa kelebihan dengan menggunakan KLT yaitu cepat, mudah digunakan pada penapisan awal dengan penelitian semi kuantitatif daripada teknik kromatografi lainnya, sederhana, murah, persiapan sampel yang mudah serta dapat mendeteksi dalam jumlah yang besar (Liang, *et al.*, 2004).

Sistem dalam KLT

Teknik kromatografi umum membutuhkan zat terlarut terdistribusi diantara dua fase, satu diantaranya diam (fase diam), yang lainnya bergerak (fase gerak). Fase gerak membawa zat terlarut melalui media, sehingga terpisah dari zat terlarut lainnya, yang terelusi lebih awal atau lebih akhir.

Umumnya zat terlarut dibawa melewati media pemisah oleh aliran suatu pelarut berbentuk cairan atau gas yang disebut eluen. Fase diam dapat bertindak sebagai penjerap, seperti halnya penjerap alumina yang aktifkan, silica gel, dan resin penukar ion atau dapat bertindak melarutkan zat terlarut sehingga terjadi partisi antara fase diam dan fase gerak (Dirjen POM, 1995).

1. Fase diam

Fase diam yang digunakan dalam KLT merupakan penjerap berukuran kecil dengan diameter partikel 10-30 μm 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 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, resin penukar ion, gel eksklusi, dan siklodekstrin yang digunakan untuk pemisahan kiral (Gandjar, 2007).

2. Fase gerak

Fase gerak pada KLT dapat dipilih dari pustaka, tetapi lebih sering dengan mencoba-coba. Sistem yang paling sederhana ialah campuran 2 pelarut organik karena daya

Penelusuran Senyawa Tumbuhan Cengkeh

elusi campuran kedua pelarut ini dapat sudah diatur sedemikian rupa sehingga pemisahan dapat terjadi secara optimal. Berikut beberapa petunjuk dalam memilih dan mengoptimasi fase gerak (Gandjar, 2007) :

- a. Fase gerak harus mempunyai kemurniaan yang sangat tinggi karena KLT merupakan teknik yang sensitif.
- b. Daya elusi fase gerak harus diatur sedemikian rupa sehingga harga R_f terletak antara 0,2-0,8 untuk memaksimalkan pemisahan
- c. Untuk pemisahan dengan menggunakan fase diam polar seperti silika gel, polaritas fase gerak akan menentukan nilai R_f . Penambahan pelarut yang bersifat sedikit polar seperti dietil eter dalam pelarut non polar seperti metil benzena akan meningkatkan harga R_f secara signifikan.
- d. Solut-solut ionik dan solute-solut polar lebih baik digunakan campuran pelarut sebagai fase geraknya, seperti campuran air dan metanol dengan perbandingan tertentu. Penambahan sedikit asam atenoat atau ammonia masing-masing akan meningkatkan solute-solut yang bersifat basa dan asam.

Penggunaan Kromatografi Lapis Tipis (KLT)

Menurut Gandjar (2007) penggunaan umum KLT adalah untuk menentukan banyaknya komponen dalam campuran, identifikasi senyawa, memantau berjalannya suatu reaksi, menentukan efektifitas pemurnian, menentukan kondisi yang sesuai untuk kromatografi kolom dan melakukan screening sampel untuk obat.

Tanaman Cengkeh

1. Analisis Kualitatif KLT

Kromatografi Lapis Tipis dapat digunakan untuk uji identifikasi senyawa baku, Parameter pada KLT yang digunakan untuk identifikasi adalah nilai R_f . Dua senyawa dikatakan identik jika mempunyai nilai R_f yang sama jika diukur pada kondisi KLT yang sama. Untuk menyakinkan identifikasi dapat dilakukan dengan menggunakan lebih dari 1 fase gerak dan jenis pereaksi semprot. Teknik spiking dengan menggunakan senyawa baku yang sudah diketahui sangat dianjurkan untuk lebih memantapkan pengambilan keputusan identifikasi senyawa (Gandjar, 2007).

2. Analisis Kuantitatif

Ada dua cara yang digunakan untuk analisis kuantitatif dengan KLT. Pertama bercak diukur langsung pada lempeng dengan cara menggunakan ukuran luas atau dengan teknik densitometry. Cara kedua adalah dengan mengerok bercak lalu menetapkan kadar senyawa yang terdapat dalam bercak tersebut dengan metode analisis yang lain misalkan metode spektrofotometri (Gandjar, 2007).

R. Spektrofotometri

Spektrofotometer terdiri atas spektrometer dan fotometer. Spektrofotometer menghasilkan sinar dari spektrum dengan panjang gelombang tertentu dan fotometer adalah alat pengukur intensitas cahaya yang di transmisikan atau diabsorpsi. Spektrofotometer tersusun atas sumber spektrum yang kontiyu, monokromator, sel pengabsorpsi untuk larutan sampel atau

blanko dan suatu alat untuk mengukur perbedaan absorpsi antara sampel dan blanko ataupun pembanding (Khopkar, 1990).

Spektrofotometri serap merupakan pengukuran interaksi antara radiasi elektromagnetik panjang gelombang tertentu yang sempit dan mendekati monokromatik, dengan molekul atau atom dari suatu zat kimia. Hal ini didasarkan pada kenyataan bahwa molekul selalu mengabsorpsi cahaya elektromagnetik jika frekuensi cahaya tersebut sama dengan frekuensi getaran dari molekul tersebut. Elektron yang terikat dan elektron yang tidak terikat akan tereksitasi pada suatu daerah frekuensi, yang sesuai dengan cahaya ultraviolet dan cahaya tampak (UV-VIS) (Roth, *et al.*, 1994).

Teknik spektroskopik adalah suatu teknik analisis fisika kimia yang mengamati tentang interaksi atom atau molekul dengan radiasi elektromagnetik. Pada prinsipnya interaksi radiasi elektromagnetik dengan molekul akan menghasilkan satu atau dua dari tiga kejadian yang mungkin terjadi. Ketiga macam kejadian yang mungkin terjadi adalah hamburan (*Scattering*), absorpsi (*absorption*), dan emisi (*emision*) radiasi elektromagnetik oleh atom atau molekul yang diamati.

Spektrofotometri UV adalah teknik analisis spektroskopik yang memakai sumber radiasi elektromagnetik ultraviolet dekat (190-380 nm) dengan memakai instrumen spektrofotometer. Apabila pada suatu molekul dikenakan radiasi elektromagnetik maka akan terjadi eksitasi ke tingkat energi yang lebih tinggi yang dikenal sebagai orbital elektron "anti-bonding". Diagram tingkat energi elektron pada keadaan dasar dan keadaan tereksitasi ditunjukkan pada gambar (Mulja & Suharman, 1995).

Tanaman Cengkeh

Spektrofotometer yang sesuai untuk pengukuran di daerah spektrum ultraviolet dan cahaya tampak terdiri dari suatu sistem optik dengan kemampuan menghasilkan cahaya monokromatik dalam jangkauan 200 nm hingga 800 nm dan suatu alat yang sesuai untuk menetapkan serapan (Dirjen POM, 1995).

Spektrofotometri UV-Vis

Spektrofotometri UV-Vis dapat melakukan penentuan terhadap sampel yang berupa larutan, gas atau uap. Sampel yang berupa larutan perlu diperhatikan beberapa persyaratan pelarut yang dipakai, antara lain (Mulja dan Suharman, 1995):

- a. Pelarut yang dipakai tidak mengandung sistem ikatan rangkap terkonjugasi pada struktur molekulnya dan tidak berwarna
- b. Tidak terjadi interaksi dengan molekul senyawa yang dianalisis
- c. Kemurniaanya harus tinggi atau derajat untuk analisis

Berikut beberapa jenis flavonoid dapat ditunjukkan pada Tabel 2.1 sebagai berikut :

Tabel 2.1 Rentang Serapan Spektrum UV-Vis Flavonoid (Markham, 1988)

Pita II (nm)	Pita I (nm)	Jenis Flavonoid
250-280	310-350	Flavon
250-280	330-360	Flavonol (3-OH tersubstitusi)

Penelusuran Senyawa Tumbuhan Cengkeh

250-280	350-385	Flavonol (3-OH bebas)
245-275	310-330 bahu kira-kira 320 puncak	Isoflavon, Isoflavon (5-deoksi-5, 7-dioksigenasi)
275-295	300-390	Flavanon dan dihidro flavonol
230-270 (kekuatan rendah)	340-390	Khalkon
270-280 (Kekuatan rendah)	380-430	Auron
270-280	465-580	Antosianidin dan Antosianin

Dasar Analisis Kuantitatif Spektrofotometri UV

Dalam studi kuantitatif, berkas radiasi yang ditransmisikan diukur. Radiasi yang diserap oleh sampel ditetapkan dengan membandingkan intensitas sinar yang ditransmisikan ketika tidak ada senyawa yang mengabsorpsi. Apabila suatu radiasi elektromagnetik dikenakan pada suatu larutan dengan intensitas radiasi semula (I_0) maka sebagian radiasi tersebut akan diteruskan (I_t), dipantulkan (I_r) dan diabsorpsi (I_a) sehingga :

$$I_0 = I_r + I_a + I_t$$

Hukum lambert : Hukum ini menyatakan bahwa bila cahaya monokromatik melewati medium tembus cahaya, laju berkurangnya intensitas oleh bertambahnya ketebalan, berbanding lurus dengan intensitas cahaya. Ini setara dengan menyatakan bahwa intensitas cahaya yang dipancarkan

Tanaman Cengkeh

berkurang secara eksponensial dengan bertambahnya medium yang menyerap (Mulja dan Suharman, 1995).

Hukum Beer : Beer mengkaji efek konsentrasi penyusun yang berwarna dalam larutan, terhadap transmisi dan konsentrasi seperti yang dikemukakan oleh Lambert antara transmisi dan ketebalan lapisan, yakni intensitas berka cahaya monokromatik berkurang secara eksponensial dengan bertambahnya konsentrasi zat penyerap secara linier (Mulja dan Suharman, 1995).

Penyerapan Sinar Ultraviolet dan Sinar Tampak oleh Molekul

Ada 3 macam proses penyerapan energi ultraviolet dan sinar tampak yaitu (Gandjar, 2007) :

1. Penyerapan oleh transisi elektron ikatan dan elektron anti ikatan (elektron sigma, σ ; elektron phi, π ; dan elektron yang tidak berikatan atau non bonding elektron, n). Semua molekul organik mampu menyerap radiasi elektromagnetik karena semua molekul organik mempunyai elektron valensi yang dapat dieksitasikan ketingkat energi yang lebih tinggi. Energi – energi eksitasi yang dihubungkan dengan pembentukan ikatan tunggal biasanya

cukup tinggi sehingga penyerapannya terbatas pada daerah ultraviolet vakum ($\lambda < 185$ nm); yang mana komponen-komponen dalam atmosfer juga ikut menyerap. Percobaan-percobaan pada daerah ultraviolet vakum ini mempunyai tingkat kesulitan yang besar sehingga percobaan-percobaan yang terkait dengan spektrofotometri biasanya dilakukan pada panjang gelombang yang lebih bear dari 185 nm. Penyerapan radiasi ultraviolet dan sinar tampak (visibel) dibatasi oleh sejumlah gugus fungsional (yang disebut dengan

Penelusuran Senyawa Tumbuhan Cengkeh

kromofor) yang mengandung elektron valensi dengan tingkat energi eksitasi yang relatif rendah. Elektron yang terlibat pada penyerapan radiasi ultraviolet dan visibel ini ada tiga, yaitu elektron sigma, elektron phi, dan elektron bukan ikatan atau non bonding elektron yaitu (Ganjar, 2007) :

- a. Elektron sigma (σ)
Orbital molekul ikatan yang menyebabkan terjadinya ikatan tunggal disebut dengan ikatan sigma. Elektron-elektron yang menempatnya disebut dengan elektron sigma. Distribusi rapat muatan di dalam orbital sigma σ adalah simetris di sekeliling poros ikatan, sedangkan pada orbital sigma anti ikatan atau sigma star (σ^*) tidak simetris.
- b. Ikatan phi (π)
Dalam molekul organik yang berikatan rangkap, terdapat dua macam orbital molekul, yaitu orbital sigma (mengandung sepasang elektron) dan orbital phi (mempunyai sepasang elektron). Orbital phi terjadi karena tumpang tindih (over lapping) dua orbital atom p. Distribusi rapat muatan dalam orbital phi adalah sedemikian rupa sehingga sepanjang poros ikatan antara kedua atom terdapat suatu daerah yang disebut dengan daerah nodal yang mana dalam daerah ini rapat muatannya rendah. Daerah diatas dan bawah nodal plane mempunyai rapat muatan yang maksimum.
- a. Elektron bukan ikatan (elektron n = non bonding elektron) Disebut non bonding elektron karena elektron tersebut tidak ikut serta dalam pembentukan ikatan kimia dalam suatu molekul

Tanaman Cengkeh

Non bonding elektron ini biasanya terdapat sekitar atom N, O, S dan halogen.

2. Penyerapan yang melibatkan elektron d dan f
Kebanyakan ion-ion logam transisi menyerap di daerah ultraviolet dan sinar tampak. Untuk seri lantanida dan aktanida, proses absorpsi dihasilkan oleh transisi elektronik elektron-elektron 4f dan 5f.; sementara itu untuk logam-logam golongan transisi pertama dan kedua, yang bertanggung jawab terhadap absorpsi adalah elektron-elektron 3d dan 4d.
3. Penyerapan karena perpindahan muatan.
Untuk tujuan analisis, spesies-spesies yang menunjukkan penyerapan karena perpindahan muatan sangat penting karena absorptivitas molarnya sangat besar. Dengan demikian, senyawa- senyawa kompleks akan memberikan sensitifitas tinggi dalam artian senyawa-senyawa kompleks mudah dideteksi dan ditentukan kadarnya. Beberapa ion anorganik menunjukkan serapan yang disebabkan oleh perpindahan muatan, karenanya kompleks-kompleks ini disebut dengan kompleks perpindahan muatan.

S. Validasi Metode Analisis

Validasi metode analisis adalah suatu tindakan penilaian terhadap parameter tertentu, berdasarkan percobaan laboratorium untuk membuktikan bahwa parameter tersebut memenuhi syarat untuk penggunaannya (Effendy, 2004). Validasi merupakan suatu proses yang terdiri paling tidak 4 langkah yaitu : (1) validasi perangkat lunak (*software validation*), (2) validasi perangkat keras/ instrumen (*instrument/ hardware validation*), (3) validasi metode, dan (4) kesesuaian system (*system suitability*).

Penelusuran Senyawa Tumbuhan Cengkeh

Proses validasi dimulai dengan perangkat lunak yang divalidasi pada system yang terjamin, lalu metode yang divalidasi menggunakan system yang terjamin dikembangkan. Akhirnya, validasi total diperoleh dengan melakukan kesesuaian system (Gandjar, 2007).

Ada beberapa parameter analisis yang digunakan dalam penelitian yaitu :

kecermatan (*accuracy*), keseksamaan (*precision*), spesifisitas, linearitas, batas deteksi, batas kuantitasi, ketangguhan metode, kesesuaian dan kisaran (*range*) (Harmita, 2008).

1. Ketepatan (*accuracy*)

Akurasi atau kecermatan adalah ukuran yang menunjukkan derajat kedekatan hasil analisis dengan kadar analit yang sebenarnya. Range nilai % *recovery* analit yang dapat diterima adalah 90-110%. Range tersebut bersifat fleksibel tergantung dari kondisi analit yang diperiksa, jumlah sampel dan kondisi laboratorium. Akurasi dinyatakan sebagai persen perolehan kembali (*recovery*) analit yang ditambahkan (Harmita, 2004).

Akurasi merupakan ketelitian metode analisis atau kedekatan antara nilai terukur dengan nilai yang diterima baik nilai konveksi, nilai sebenarnya, atau nilai rujukan. Akurasi diukur sebagai banyaknya analit yang diperoleh kembali pada suatu pengukuran dengan melakukan *spiking* pada suatu sampel. Suatu metode dikatakan tepat jika ia menghasilkan hasil yang sama dalam sederet penentuan ulangan (Gandjar, 2007; Johnson, 1991).

Tabel 2.2 Kriteria rentang *recovery* yang dapat diterima (Harmita, 2004)

Analit pada matriks sampel (%)	Rentang <i>recovery</i> yang diperoleh
100	98-102%
>10	98-102 %
>1	97-103 %
>0,1	95-105%
0,01	90-107 %
0,001	90-107 %
0.0001 (1 ppm)	80-110%
0,00001 (100 ppb)	80-110 %
0,000001 (10 ppb)	60-115 %
0,0000001 (1 ppb)	40-120

2. Keseksamaan (*precision*)

Menurut Gandjar (2007), presisi merupakan ukuran keterulangan metode analisis dan biasanya diekspresikan sebagai simpangan baku relatif dari sejumlah sampel yang berbeda signifikan secara statistik.

Presisi atau keseksamaan adalah ukuran yang menunjukkan derajat kesesuaian antara hasil uji individual, diukur melalui penyebaran hasil individual dari rata-rata jika prosedur diterapkan secara berulang pada sampel-sampel yang diambil dari campuran yang homogeny (Harmita, 2004). Suatu metode dapat dinyatakan memiliki presisi yang baik apabila memiliki KV (koefisien variasi) < 2 % tetapi kriteria ini

Penelusuran Senyawa Tumbuhan Cengkeh

fleksibel tergantung dari kondisi analit yang diperiksa, jumlah sampel dan kondisi laboratorium (Harmita, 2004).

Dokumentasi presisi seharusnya mencakup simpangan baku, standar deviasi relatif (RSD) atau koefisien variasi (KV) dan kisaran kepercayaan. Presisi seringkali diekspresikan dengan standar deviasi (SD) atau standar deviasi relative (RSD) dari serangkaian data. Dalam validasi metode analisis untuk validasi pembersihan pada parameter presisi digunakan enam replikasi pada konsentrasi 10 kali LOQ dengan criteria penerimaan RSD tidak lebih dari 20% (Ahuja dan Dong, 2005).

Tabel 2.3. Kriteria KV yang diterima (Harmita, 2004)

Kadar Analit	KV (%)
$\geq 1 \%$	2,5
0,1 %	5
1 ppm	16
1 ppb	32

Pengujian presisi pada saat awal validasi metode seringkali hanya menggunakan 2 parameter yang pertama yaitu keterulangan dan presisi antara. Reprodusibilitas biasanya dilakukan ketika akan melakukan uji banding antar laboratorium. Presisi seringkali diekspresikan dengan SD atau standar deviasi relatif (RSD) dari serangkaian data. Untuk menghitung RSD adalah sebagai berikut :

$$RSD = \frac{100 \times SD}{x} ;$$

Ket :

RSD = Standar Deviasi Relatif

Tanaman Cengkeh

SD = Standar Deviasi serangkaian data
X = Rata-rata Data

3. Linearitas

Linearitas merupakan kemampuan suatu metode untuk memperoleh hasil-hasil uji yang secara langsung proporsional dengan konsentrasi analit pada kisaran yang diberikan. Linearitas suatu metode merupakan ukuran seberapa baik kurva kalibrasi yang menghubungkan antara respon (y) dengan konsentrasi (x). Linearitas dapat diukur dengan melakukan pengukuran tunggal pada konsentrasi berbeda-beda. Data yang diperoleh selanjutnya diproses dengan metode kuadrat terkecil, untuk selanjutnya dapat ditentukan nilai kemiringan (*slope*), intersep, dan koefisien korelasinya (Gandjar, 2007). Linearitas dalam validasi metode analisis untuk validasi pembersihan konsentrasi dengan rentang LOQ hingga 20 kali LOQ dimana criteria penerimaannya $r \geq 0,98$ (Ahuja dan Dong, 2005).

Kajian Penelitian Sejenis

Wahyulianingsih, dkk (2016)

Meneliti tentang “Penetapan Kadar Flavonoid Ekstrak Daun Cengkeh (*Syzygium aromaticum* (L.) Merr & Perry)” Dengan hasil penelitian bahwa ekstrak metanol daun cengkeh (*Syzygium aromaticum*) memiliki kadar flavonoid total sebesar 73.08 mgRE/g ekstrak dengan presentase 7,308 %. Jurnal ini memiliki keterkaitan dengan penelitian yang akan dilakukan yaitu memiliki kesamaan pada sampel namun berbeda di organ tumbuhannya, dan juga

Penelusuran Senyawa Tumbuhan Cengkeh

pada metode yang dipakai yaitu metode spektrofotometri juga pada senyawa yang akan dianalisis yaitu flavonoid.

Agung Nur Cahyanta (2016)

Meneliti tentang “Penetapan Kadar Flavonoid Total Ekstrak Daun Pare Metode Kompleks Kolorimetri dengan Pengukuran absorbansi Secara Spektrofotometri” dengan hasil penelitian : Simplisia daun pare memiliki rendamen terhadap ekstrak etanol sebesar 15,4 % dengan susut pengeringan sebesar 5,792 % dan konsentrasi flavonoid total dalam bentuk flavon dan flavonoid sebesar 8,30 % b/b. Jurnal ini memiliki keterkaitan dengan penelitian yang akan dilakukan yaitu dalam hal metode yang dipakai dan senyawa yang akan dilakukan penetapan kadar.

Ichwan Ridwan Rai (2015)

Meneliti tentang “ Isolasi dan Penentuan Kadar Flavonoid Ekstrak Etanolik Herba Sambiloto” dengan hasil penelitian yaitu : Hasil pengukuran menunjukkan kandungan flavonoid total ekstrak etanol sambiloto sebesar 46, 322 g/kg. Jurnal ini memiliki keterkaitan dengan penelitian yang dilakukan yaitu menentukan kadar suatu senyawa menggunakan metode spektrofotometri UV-Vis.

Tikasari Agustina, dkk. (2016)

Meneliti tentang “Penetapan Kadar Tanin Pada Daun Sirih Merah Secara Spektrofotometri UV-Vis” dengan hasil penelitian kadar tannin dalam daun sirih adalah 0,25 % b/b. Jurnal ini memiliki keterkaitan dalam hal penetapan kadar suatu senyawa dengan menggunakan metode spektrofotometri UV-Vis.

Wina Pakaya, dkk. (2015)

Meneliti tentang “Analisis Kadar Flavonoid dari Ekstrak Metanol Daun dan Bunga Tembelean” hasil penelitian

Tanaman Cengkeh

ini bahwa kadar flavonoid dari ekstrak metanol pada daun tembelekan rata-rata 25,81 mg/L dan bunga tembelekan 21,25 mg/L. Dengan kadar flavonoid total daun 51,63 dan bunga 43,4 µg/g. Keterkaitan dengan penelitian yang akan dilakukan adalah dilakukannya penetapan kadar dari senyawa flavonoid menggunakan metode spektrofotometri UV-Vis.

Youstiana Dwi Rusita dan Suhartono (2016)

Meneliti tentang “Flavonoids Content in Extracts Secang (*Caesalpinia Sappan* L.) Maceration Method Infudation Analysis and Visible Ultraviolet Spectrophotometer” dengan hasil penelitian bahwa ekstrak *Caesalpina* dengan metode maserasi didapatkan hasil yang positif mengandung flavonoid begitu juga dengan metode infudation. Flavonoid yang didapatkan dengan metode maserasi jenis flavonoidnya yaitu flavon, flavonol, flavanols. Hasil penelitian menunjukkan kadar flavonoid maserasi adalah 0,0162%. Keterkaitan dengan proposal penelitian yaitu analisis yang dilakukan, dimana dilakukannya analisis kuantitatif dan kualitatif dari suatu tanaman. Kemudian metode yang digunakan untuk menentukan kadar yaitu dengan menggunakan spektrofotometri UV-VIS, menggunakan standar quersetin dan metode reagen yang dipakai untuk skrining flavonoid.

Rajeswari Sahu dan Jyoti Saxena (2013)

Meneliti tentang “ Screening of Total Phenolic and Flavonoid Content in Conventional and non-Conventional Species of Curcuma” hasil penelitian menyimpulkan bahwa kandungan flavonoid maksimum ditemukan di ekstrak metanol ($79,36 \pm 0,01$ mg/ g). Hasil yang diperoleh dari penelitian ini menunjukkan bahwa ekstrak *C.longga* yang mengandung jumlah tertinggi senyawa flavonoid dan fenolik memiliki aktivitas antioksidan yang besar. Keterkaitan dengan proposal penelitian yaitu analisis yang dilakukan, dimana dilakukannya analisis kuantitatif dari suatu

Penelusuran Senyawa Tumbuhan Cengkeh

tanaman. Kemudian metode yang digunakan untuk menentukan kadar yaitu dengan menggunakan spektrofotometri UV-VIS dan menggunakan standar quersetin.

Zeljan Males, dkk. (2016)

Meneliti tentang “Qualitative and Quantitative Analysis of Flavonoids of The Strawberry Tree – *Arbutus Unedo* L.” dengan hasil penelitian menunjukkan bahwa kandungan tertinggi senyawa flavonoid terdapat pada daun yang didapatkan dari Bo’avadengan persen 2.00 %. Sedangkan untuk daun yang didapatkan dari Orebi dengan persen kadar 0,87 %.

Dan untuk buah strawberry sendiri terkandung flavonoid dengan persen kadar 0,29 %. Keterkaitan dengan proposal penelitian yaitu analisis yang dilakukan, dimana dilakukannya analisis kualitatif dan kuantitatif dari suatu tanaman. Kemudian metode yang digunakan baik secara kuantitatif dan kualitatif.

Meneliti tentang “Total Phenolic Content, Flavonoid Concertation and Antioxidant Activity of Marrubium peregrium ekstrak” hasil penelitian menunjukkan bahwa tanaman ini merupakan sumber alami zat antioksidan tinggi. Keterkaitan dengan proposal yaitu memiliki kesamaan dalam hal menentukan kadar namun berbeda di senyawa yang akan dianalisis.

Riza Andriani Hanifa dan Yani Lukmayani (2015)

Meneliti tentang “Uji Aktivitas Antioksidan Serta Penetapan Kadar Flavonoid Total dari Ekstrak dan Fraksi Daun Paitan”. Hasil penelitian menunjukkan adanya kandungan senyawa alkaloid, flavonoid, monoterpenoid, steroid, kuinon, dan saponin. Hasil pengujian aktivitas antioksidan menunjukkan bahwa fraksi n-heksan memiliki aktivitas antioksidan lebih baik dengan nilai IC_{50} 3,874 ppm, sedangkan nilai untuk fraksi etil

Tanaman Cengkeh

asetat ekstrak etanol dan fraksi air berturut-turut adalah 3,992 ppm, 4,525 ppm, dan 11, 588 ppm. Hasil penetapan kadar flavonoid total dari ekstrak etanol, fraksi n-heksan, etil asetat dan air berturut-turut adalah 4,209 mg QE/g, 8,936 mg QE/g, 5,224 mg QE/g dan 1,163 mg QE/g.



PREPARASI TANAMAN

A. Preparasi Sampel

Bunga cengkeh dikeringkan kemudian dibersihkan dari kotoran yang menempel. Setelah itu dihaluskan menggunakan blender sampai berbentuk serbuk.

B. Ekstraksi Bunga Cengkeh (*Syzygium aromaticum*)

Ekstrak bunga cengkeh dibuat dengan menggunakan metode maserasi menggunakan pelarut metanol. Serbuk simplisia bunga cengkeh ditimbang sebanyak 100 gram kemudian dilarutkan dalam 1200 mL metanol dalam bejana kaca sambil diaduk dengan batang pengaduk selama 2 jam sampai homogen. Proses maserasi dilakukan selama 3 hari. Hari ke-tiga dilakukan penyaringan dan remaserasi dengan menambahkan 1000 mL metanol selama 2 hari dengan perlakuan yang sama yakni diaduk sampai homogen. Hasil penyaringan (*filtrate*) maserasi dan remaserasi dicampur dan diuapkan menggunakan *vacuum rotary evaporator* dengan suhu 50°C hingga diperoleh ekstrak yang kental.

Setelah itu dilakukan ekstraksi cair-cair dengan menggunakan 2 pelarut yang berbeda yaitu n-heksan dan metanol dengan perbandingan 4 : 2. Ditunggu sampai terbentuk 2 lapisan yaitu lapisan atas dan bawah. Diambil lapisan bawah (ekstrak metanol), kemudian disaring. Dipekatkan.

C. Analisis Kualitatif

1. Skrining Fitokimia

Dilakukan uji analisis kualitatif secara skrining fitokimia untuk melihat adanya senyawa flavonoid dalam bunga cengkeh. 2-3 mL filtrat ekstrak bunga cengkeh dimasukkan ke dalam tabung reaksi, tambahkan sedikit serbuk HCl, di kocok dan biarkan memisah. Setelah itu ditambahkan serbuk magnesium (Mg). Uji positif ditunjukkan dengan terbentuk warna merah, kuning atau jingga (Worotikan, 2011).

2. Pengujian dengan Kromatografi Lapis Tipis (KLT)

Kromatografi Lapis Tipis dilakukan untuk mendapatkan isolat murni flavonoid dari ekstrak metanol bunga cengkeh. Pertama dilakukan optimasi eluen yang akan digunakan. Eluen yang digunakan adalah etil asetat: n-heksan dengan perbandingan 9:1 ; 8:2, 7:3, 6:4 v/v.

Elusi dilakukan setelah *chamber* KLT penuh dengan uap eluen, didiamkan selama 5-10 menit. Ekstrak hasil fraksinasi dilarutkan dalam pelarut metanol sebanyak 1 mL, kemudian ditotolkan pada garis batas awal elusi lalu dikeringkan. Sebelumnya plat siliki gel dibuat dengan ukuran lebar 2 cm dan panjang 5 cm dan diberi garis batas awal dan basa akhir 0,5 cm. Setelah totolan tadi kering, lempengan ditempatkan pada sebuah *chamber* bertutup yang berisi pelarut dengan berbagai perbandingan. Plat yang telah dielusi kemudian dikeluarkan dari dalam *chamber* dan dikeringkan. Kemudian difiksasi dengan FeCl_3 5%. Untuk mendeteksi bercak digunakan lampu UV pada panjang gelombang 254 nm dan 366 nm. Bercak

Penelusuran Senyawa Tumbuhan Cengkeh

ditandai dengan menggunakan pensil. Diamati warna bercak yang timbul dan dihitung nilai Rf.

D. Analisis Kuantitatif

Dilakukan uji analisis kuantitatif untuk menghitung kadar senyawa flavonoid yang terkandung dalam bunga cengkeh dengan spektrofotometri UV-Vis.

1. Pembuatan Larutan Baku Standar Kuarsetin

Ditimbang seksama 10 mg kuarsetin baku, dimasukkan kedalam labu ukur 10 mL dan ditambahkan sedikit pelarut, dikocok hingga larut. Selanjutnya diencerkan dengan pelarut sampai garis tanda sehingga diperoleh larutan dengan konsentrasi 1000 ppm. Dari larutan 1000 ppm di pipet 2,5 mL dan dimasukkan kedalam labu ukur 25 mL. Diencerkan dengan pelarut sampai garis tanda, dikocok hingga homogen sehingga diperoleh larutan dengan konsentrasi 100 ppm.

2. Optimasi Panjang Gelombang

Caranya ditotolkan standar kuarsetin yang dilarutkan dalam metanol p.a pada lempeng KLT kemudian dieluasi dengan metanol : n:heksan (4:2). Noda yang dihasilkan discanning pada panjang gelombang 200-700 nm. Panjang gelombang yang dipilih adalah panjang gelombang yang memberikan intensitas spektrum paling tinggi.

3. Penentuan Linearitas Kurva Kalibrasi Baku Pembanding Kuarsetin

Dibuat larutan standar 2, 4, 6, 8 ppm dengan cara di pipet 0,2, 0,4, 0,6, 0,8 mL larutan standar 100 ppm masing-masing diencerkan dengan metanol p.a dalam labu takar

Preparasi Tanaman

10 mL, diaduk hingga homogen. Kemudian masing-masing larutan disaring menggunakan kertas saring Whatman. Selanjutnya diukur dengan Spektrofotometri UV-Vis dan dibuat kurva kalibrasi antara konsentrasi dan absorbansi. Penentuan kurva kalibrasi baku pembanding menggunakan rumus:

$$y = bx + a$$

4. Preparasi Sampel Ekstrak Bunga Cengkeh

Ditimbang 10 mg ekstrak metanol bunga cengkeh, kemudian dilarutkan dalam 10 metanol p.a (Kadar ekstrak menjadi 1000 ppm), dari larutan stok dipipet 1 mL dicukupkan volume sampai 10 mL (Kadar ekstrak menjadi 100 ppm), kemudian diencerkan lagi menjadi 10 ppm dengan cara memipet dengan pelarut metanol p.a, selanjutnya diukur absorbansi pada spektrofotometri UV-Vis.

5. Penetapan Kadar Flavonoid dalam Sampel

Larutan sampel akan diukur serapannya pada panjang gelombang serapan maksimum, kemudian serapan dicatat. Konsentrasi flavonoid dalam sampel akan ditentukan berdasarkan persamaan regresi dari kurva baku kalibrasi standar.

Kadar flavonoid dalam sampel dapat dihitung dengan rumus sebagai berikut :

$$\text{Kadar Flavonoid} = \frac{X (\mu\text{g/mL}) \times \text{Volume (mL)}}{\text{berat sampel (g)}}$$

E. Validasi Metode Analisis

Linearitas

Kriteria penerimaan suatu metode dikatakan linier jika koefisien korelasi (r) $\geq 0,99$. Dengan menggunakan rumus $y = bx + a$

Presisi (Keseksamaan)

Uji presisi ditentukan dengan parameter RSD (*Relatif Standar Deviasi*) yang dirumuskan sebagai berikut :

$$RSD = \frac{SD}{X} \times 100\%$$

Keterangan :

SD = Standar deviasi/ simpangan baku

X = Kadar rerata Quarsetin dalam satu sampel

Akurasi (Kecermatan)

Uji akurasi dengan metode penambahan standar dilakukan dengan menghitung % *recovery* yang dihasilkan dari penambahan standar sebanyak 30 %, 45 %, dan 60 % dari kadar analit dalam sampel yang didapat dari hasil uji presisi (Indrayanto & Yuwono, 2003). Persen perolehan kembali dihitung dengan menggunakan rumus sebagai berikut :

$$\% \text{ Perolehan kembali} = \frac{A_2 - A_1}{B} \times 100 \%$$

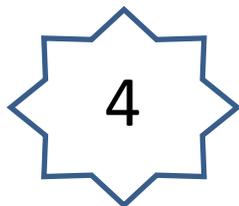
Keterangan :

A₁ = Kadar analit sebelum penambahan Quarsetin baku

A₂ = Kadar analit yang diperoleh setelah penambahan Quarsetin baku

B = Kadar Quarsetin baku yang ditambahkan

Preparasi Tanaman



PENGUJIAN TANAMAN CENGKEH

Hasil Perhitungan Rendamen Ekstrak Metanol Bunga Cengkeh

Tabel 4.1 Persen Rendamen Ekstrak Metanol Bunga Cengkeh

Pelarut	Berat Sampel	Berat Ekstrak (g)	Rendamen (%)
Metanol	200 g	10,0844	5,0422
		6,7021	3,3510
		6,0211	3,0105
Jumlah keseluruhan :		23,5672	11,7836

Pengujian Tanaman Cengkeh

Perhitungan Rendamen Ekstrak :

$$\begin{aligned}\% \text{ Esktrak rendamen} &= \frac{\Sigma \text{Ekstrak yang diperoleh}}{\Sigma \text{Simplisia}} \times 100 \% \\ &= \frac{23,5672 \text{ g}}{200} \times 100 \% = 11,783 \%\end{aligned}$$

Hasil Analisis Flavonoid Menggunakan Kromatografi Lapis Tipis

Tabel 4.2. Identifikasi Flavonoid dengan Kromatografi Lapis Tipis

Fase Gerak Etil Asetat : N-heksan	Rf
9 : 1	0,58
8 : 2	0,44
7 : 3	0,44
6 : 4	0,53

Penelusuran Senyawa Tumbuhan Cengkeh

Hasil Pembacaan Absorbansi Larutan Baku Kuarsetin

Tabel 4.3 Absorbansi Larutan Baku Kuarsetin

No	Kosentrasi (ppm)	Absorbansi
1	2	0,728
2	4	0,846
3	6	0,953
4	8	1,092
5	10	1,126

Tabel 4.4

Hasil Nilai Absorbansi Ekstrak Metanol Bunga Cengkeh Pada Panjang Gelombang 282 nm

Absorbansi Ekstrak Metanol Bunga Cengkeh pada kosentrasi 100 ppm	
R ₁	R ₂
0.211	0.219

Tabel 4.5
Hasil Kadar Flavonoid dalam Ekstrak Metanol Bunga
Cengkeh 100 ppm

Kadar Flavonoid Ekstrak Metanol Bunga Cengkeh 100 ppm	Kadar Flavonoid ($\mu\text{g/g}$)	Persentase Kadar Flavonoid (%)
	92,076 $\mu\text{g/g}$	9,207 %.



5 ANALISIS KADAR TANAMAN

A. Ekstraksi dan Fraksinasi

Tanaman cengkeh (*Syzygium aromaticum*) yang digunakan dalam penelitian ini adalah cengkeh yang berasal dari Desa Sinombayuga, Kecamatan Posigadan, Kabupaten Bolmong Selatan, Provinsi Sulawesi Utara. Bagian cengkeh yang dijadikan sampel penelitian adalah pada bunganya. Bunga cengkeh yang telah dipanen kemudian dikeringkan, setelah itu disortasi dari kotoran seperti debu yang nantinya dapat mengganggu proses ekstraksi. Bunga cengkeh yang telah dikeringkan sebanyak 200 g kemudian diserbuk, karena penyerbukan akan memperluas permukaan serbuk dan memperluas area kontak antara serbuk simpilisia dengan penyari, sehingga kandungan zat aktifnya banyak yang akan tersari (Agustina *et al*, 2014).

Ekstraksi merupakan proses pemisahan senyawa campuran dengan menggunakan pelarut yang sesuai. Metode ekstraksi yang digunakan untuk pemisahan senyawa flavonoid bunga cengkeh adalah maserasi. Maserasi adalah salah satu metode pemisahan senyawa dengan cara perendaman menggunakan pelarut organik pada temperatur ruangan. Serbuk diekstraksi dengan metode maserasi dengan menggunakan pelarut metanol pada suhu kamar selama 3 x 24 jam. Dilakukan pengadukan menggunakan *shaker* dengan kecepatan 120 rpm selama 6 jam. Pengadukan dilakukan dengan kecepatan konstan

Analisis Kadar tanaman

untuk mempercepat proses ekstraksi komponen senyawa yang diinginkan terdesak keluar.

Metode maserasi dipilih karena maserasi merupakan salah satu metode ekstraksi sederhana yang paling banyak digunakan khususnya untuk mengekstraksi senyawa yang lebih polar (Kristanti, *et al.*, 2008). Kelebihan lain dari metode maserasi adalah pengerjaannya cukup sederhana, murah, mudah dilakukan dan tidak menggunakan suhu tinggi yang memungkinkan dapat merusak senyawa-senyawa kimia yang terdapat dalam sampel.

Penggunaan metanol karena pelarut ini dapat bersifat semi polar yaitu yang dapat melarutkan senyawa yang bersifat polar maupun nonpolar (Harborne, 1987). Dimana dapat melarutkan senyawa flavonoid yang akan diambil karena flavonoid berdasarkan sifatnya yaitu dalam bentuk aglikon bersifat non polar dan dalam bentuk glikosida bersifat polar.

Selama proses maserasi pelarut akan menembus dinding dan membrane sel kemudian masuk ke dalam rongga (sitoplasma) sel yang mengandung metolit sekunder. Senyawa metanol sekunder akan terlarut dikarenakan adanya perbedaan konsentrasi antara larutan senyawa-senyawa metabolit sekunder di dalam dan diluar sel, hal ini mengakibatkan cairan hipertonis akan masuk ke cairan yang hipotonis sehingga terjadi keseimbangan (Baraja, 2008).

Setelah 3 hari, dilakukan penyaringan untuk memisahkan residu dan filtrat. Filtrat yang diperoleh kemudian dipisahkan dengan *rotary evaporator*. Menurut (Khunaifi, 2010) tujuan dilakukan evaporasi yaitu untuk memekatkan ekstrak dan memisahkan pelarut dan senyawa aktif, proses evaporasi dilakukan pada suhu 50°C sehingga senyawa yang akan diekstraksi tidak akan mengalami kerusakan. Selanjutnya ekstrak

Penelusuran Senyawa Tumbuhan Cengkeh

kental yang diperoleh dari hasil evaporasi dihitung nilai rendamennya. Hasil yang didapatkan dari 23,5672g ekstrak metanol bunga cengkeh adalah 11,7836 %, hal ini sesuai dengan range persen rendamen yaitu 10-15 % yang menunjukkan bahwa proses ekstraksi bunga cengkeh berlangsung sempurna (Vitasari, 2013).

Bunga cengkeh mengandung senyawa yang berbeda tingkat kepolarannya, sehingga dilakukan suatu pemisahan dengan metode fraksinasi. Sebanyak 23,5672 g ekstrak metanol kental dilarutkan dalam corong pisah dengan menggunakan pelarut n-heksan : metanol (4:2). Dipilih perbandingan 4:2 yaitu untuk memisahkan senyawa non polar yang diduga masih banyak terdapat dalam ekstrak metanol bunga cengkeh sehingga pemisahan senyawa polar lebih optimal. Ditunggu sampai membentuk 2 lapisan (lapisan atas yaitu n-heksan dan lapisan bawah metanol). Lapisan bawah yang diduga mengandung senyawa flavonoid kemudian dievaporasi dan ditimbang nilai ekstrak, hasil yang didapatkan adalah 10,0111 g. Selanjutnya dilakukan analisis kualitatif dengan menggunakan metode kromatografi lapis tipis.

B. Skrining Fitokimia

Pemeriksaan awal flavonoid dilakukan dengan metode skirining fitokimia. Pada tumbuhan tingkat tinggi flavonoid terdapat baik dalam bagian vegetatif maupun dalam bunga (Robinson, 1995). Dari analisis yang telah dilakukan diketahui bahwa sampel bunga cengkeh mengandung flavonoid. Hasil ditunjukkan dengan adanya perubahan warna setelah ekstrak sampel bunga cengkeh diberi pereaksi Mg-HCl.

Analisis Kadar tanaman

Menurut Fatimah (2011) penambahan HCl dalam uji flavonoid sebagai penghidrolisis flavonoid menjadi aglikonnya, yaitu dengan menghidrolisis O-glikosil. O- glikosil akan tergantikan oleh H⁺ dari asam karena sifatnya elektrofilik. Sedangkan serbuk Mg menghasilkan senyawa kompleks yang berwarna merah atau jingga hal ini akibat reduksi oleh asam klorida pekat dan magnesium. Warna jingga pada uji flavonoid dikarenakan terbentuknya garam flavilium.

C. Identifikasi dengan Kromatografi Lapis Tipis (KLT)

Identifikasi flavonoid secara kualitatif dengan menggunakan metode kromatografi lapis tipis (KLT). KLT dalam penelitian ini dilakukan untuk lebih menegaskan hasil yang didapat dari skrining fitokimia. Penggunaan KLT juga bertujuan untuk memisahkan senyawa yang terdapat dalam ekstrak atau menentukan jumlah komponen yang terpisah berdasarkan spot noda. KLT merupakan metode yang digunakan untuk mengidentifikasi senyawa, dimana hanya membutuhkan penyerap dan cuplikan dalam jumlah sedikit, metode ini juga lebih efektif dan hasil yang diperoleh lebih akurat (Sumarno, 2001). Tahap awal yang dilakukan adalah mencari perbandingan eluen terbaik dalam pemisahan senyawa flavonoid, eluen yang baik adalah eluen yang bisa memisahkan senyawa dalam jumlah yang banyak ditandai dengan munculnya noda. Noda yang terbentuk tidak berekor dan jarak antara noda satu dengan lainnya jelas (Harborne, 1987).

Fase gerak (eluen) yang digunakan adalah etil asetat : n-heksan. Pelarut etil asetat dan n-heksan dipilih berdasarkan pustaka yang menjelaskan bahwa sistem yang paling sederhana ialah campuran 2 pelarut organik karena daya elusi campuran kedua pelarut ini mudah diatur sehingga pemisahan dapat terjadi

Penelusuran Senyawa Tumbuhan Cengkeh

secara optimal dan menurut tingkat kepolarannya pelarut etil asetat bersifat polar dan n-heksan non polar sehingga dapat terjadi pemisahan pada lempeng KLT. Dibuat perbandingan pelarut etil asetat : n-heksan yaitu 1: 9 ; 2:8, 3:7, 4:6 v/v.

Tujuan dilakukannya perbandingan pelarut yaitu untuk melihat pelarut dengan perbandingan yang mana yang menunjukkan pemisahan yang baik. Pemisahan senyawa ekstrak metanol bunga cengkeh dilakukan dengan menggunakan plat KLT kresel G 60 F 254 dengan panjang 7 cm, lebar 1 cm dan diberi batas atas dan bawah 0,5 cm. Sebelum dilakukan pengelusan, eluen dalam chamber di jenuhkan dahulu agar campuran eluen dapat mengelusi ekstrak dengan baik dan mempercepat reaksi yang dapat bercampur sempurna. Selanjutnya ekstrak ditotolkan pada plat, kemudian dimasukkan dalam chamber. Proses pengelusan selesai ditandai ketika pelarut naik sampai batas garis atas, kemudian plat dikeringkan dan di dilihat penampakan noda dilihat dibawah sinar UV 366 nm. Menurut Wagner *et al* senyawa flavonoid akan menunjukkan bercak noda berupa flouresen hijau, kuning dibawah sinar UV 366 nm. Hasil penampakan noda yang didapatkan dapat dilihat pada Tabel 4.2.

Untuk hasil optimasi pelarut terbaik, yaitu etil asetat : n-heksan (1:9). Pemisahan baik dilihat ketika noda yang terdapat senyawa naik mengikuti sifat kepolaran pelarut. Setelah didapatkan noda hasil pemisahan yang baik kemudian dilakukan penotolan kembali ekstrak metanol bunga cengkeh dengan pembanding kuarsetin.

Hasil yang didapatkan setelah sampel ditotolkan dengan pembanding kuarsetin didapatkan bahwa dalam ekstrak metanol bunga cengkeh mengandung flavonoid dengan melihat standar Rf kuarsetin. Lipsy (2010) menyatakan bahwa nilai Rf dapat dijadikan bukti dalam mengidentifikasi senyawa. Senyawa-

Analisis Kadar tanaman

senyawa dengan nilai R_f yang sama menunjukkan bahwa senyawa tersebut memiliki karakteristik yang sama atau mirip. Kuarsetin memiliki nilai R_f 0,59 sedangkan nilai R_f dari ekstrak metanol yaitu R_f 0,58 yang mengindikasikan bahwa ekstrak bunga cengkeh mengandung flavonoid. Hasil pemisahan bunga cengkeh ekstrak metanol dikeruk dan selanjutnya dilakukan penetapan kadar menggunakan spektrofotometri UV-Vis.

D. Penetapan Kadar Flavonoid dalam Ekstrak Metanol Bunga Cengkeh

Penetapan kadar flavonoid dalam ekstrak bunga cengkeh dilakukan dengan metode penetapan konsentrasi sampel menggunakan kurva kalibrasi larutan baku (Gandjar, 2007). Tujuan pembuatan kurva kalibrasi larutan standar yaitu untuk mengukur tingkat ketelitian data. Sebelumnya dilakukan optimasi panjang gelombang larutan standar kuarsetin untuk menentukan panjang gelombang maksimum yang akan digunakan dalam pengukuran menggunakan spektrofotometer UV-Vis. Flavonoid mengandung sistem aromatis yang terkonjugasi dan dapat menunjukkan pita serapan kuat pada daerah UV-Vis (Rohyani, 2008). Menurut Gandjar (2007) disekitar panjang gelombang maksimal bentuk kurva absorbansi datar dan pada kondisi tersebut hukum lambert beer terpenuhi.

Hasil pembacaan panjang gelombang maksimum standar kuarsetin yaitu 372 nm dengan nilai absorbansi 0.720. Menurut Sugrani (2009) kuarsetin merupakan salah satu jenis flavonoid yang umum digunakan sebagai standar dalam penentuan kadar flavonoid. Untuk membuat kurva larutan standar diperlukan deret standar kuarsetin dengan variasi 2, 4, 6, 8 ppm. Setelah itu diukur absorbansinya pada panjang gelombang 372 nm. Berdasarkan hasil pengukuran absorbansi larutan standar

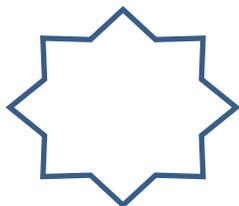
Penelusuran Senyawa Tumbuhan Cengkeh

kuarsetin dapat digambarkan kurva kalibrasi larutan standar dengan persamaan regresi linear $y = -4,577x + 0,052x$ dengan koefisien korelasi (r^2) adalah 1 .

Berdasarkan kurva kalibrasi larutan standar kuarsetin dengan koefisien korelasi mendekati 1 menunjukkan kurva kalibrasi linier dan terdapat hubungan antara konsentrasi larutan kuarsetin dengan nilai serapan. Nilai $r > 0,99$ menunjukkan bahwa terdapat hubungan linearitas yang baik antara variable tersebut (Christian, 2004)

Persamaan regresi linear larutan standar senyawa flavonoid tersebut digunakan sebagai pembanding dalam analisis kuantitatif pada pengukuran kandungan senyawa flavonoid ekstrak metanol bunga cengkeh. Absorbansi pada pengukuran absorbansi sampel kemudian dikalibrasikan dengan persamaan regresi linear dari kurva konsentrasi standar kuarsetin. Dengan menggunakan rumus $y = a + bx$. Hasil penetapan kadar flavonoid dalam ekstrak metanol bunga cengkeh didapatkan sebesar 92,076 $\mu\text{g/g}$ atau 9,207 %.

Analisis Kadar tanaman



DAFTAR PUSTAKA

- Ahmad, A. R., 2012. *Isolasi dan Elusidasi Struktur Antioksidan dan Penghambat Enzim Xantin Oksidase Ekstrak Daun Pletekan (Ruellia tuberosa L.)*. Jakarta: Universitas Indonesia.
- Ahmed, W., 2016. *Monitoring and Antityrosinase activity of clove aromatic flower buds*. Pakistan : Comsats University, Islamabad.
- Ahuja, S., and Dong, M., W., 2005. *Handbook of Pharmaceutical Analysis by HPLC*. Britania Raya : Elsevier
- Amic D., Davidovic- Amic D., Beslo D., and Trinajstic N. 2003. *Structure Radical Scavenging Activity Relationship of F5lavonoids*. Croatia Chemical Acta.
- Ardianto, T., 2008. *Pengaruh ekstrak bunga cengkeh (Syzygium aromaticum L.) terhadap mortalitas larva Aedes aegypti L.* Surakarta: Fakultas Kedokteran Sebelas Maret.
- Bulan, R., 2004. *Reaksi Asetilasi Eugenol dan Oksidasi Metil Iso Eugenol*. Medan : Universitas Sumatera Utara
- Christian, G., D., 2004. *Analytical Chemistry*. USA : John Wiley and Sons, Inc.

Daftar Pustaka

- Coneac G, E Gafitanu, NG Hadaruga, DI Hadaruga, A Rivis, D Parvu. 2009. *Quaracetin and rutin/2-hydroxypropyl- β -cyclodextrin nanoparticles; obtaining, characterization and antioxidant activity*. J Agroalimen Proc Technol.
- Cook, N. C. and S. Samman, 1996. *Review Flavonoids-Chemistry, Metabolism, Cardioprotective Effect, And Dietary Sources*, J. Nutr. Biochem (7): 66-76.
- Cos P, Ying L, Calomme M, Hu JP, Cimanga K, Van Poel B, Pieters L, Vlietinck AJ, Vanden Berghe D., 1998. *Structure-Activity Relationship and Classification of Flavonoids as inhibitors of Xanthin Oksidase and Superoxide Scavengers*. J. Nat. Prod.
- Crozier, A., Clifford, M. N., Ashihara, H.,2006. *Phenol, Polyphenols, and Tannins : An Overview in : Plant Secondary Metabolites : Occurrence, Structure and Role in Human Diet*. Blacwell Publishing.
- Depkes RI, 1995. *Farmakope Indonesia Edisi IV*. Jakarta : Departemen Kesehatan Republik Indonesia.
- Effendy, 2004. *Kromatografi Cair Kinerja Tinggi dalam bidang farmasi*. Medan : FMIPA USU
- Enayati, D., 2009. *Uji Antimikroba Ekstrak Metanol Bunga Cengkeh Terhadap Bakteri Penyebab Karies Gigi Streptococcus mutans*. Medan : Universitas Sumatera Utara
- Fatimah, 2011. *Karactersitik dan Uji Aktivitas Senyawa Antibakteri dari Ekstrak Madu Sumbawa*. Malang : UIN Malik Maulana Malik Ibrahim

Penelusuran Senyawa Tumbuhan Cengkeh

- Ferdinanti, F., 2001. *Uji Aktivitas antibakteri obat kumur minyak cengkeh (Syzygium aromaticum (L.) Merr & Perry) asal bunga, tangkai, daj daun cengkeh terhadap bakteri.* Jakarta : Fakultas Matematika dan Pengetahuan Alam Institut Sains dan Teknologi Nasional Jakarta.
- Gamse, T., 2002. *Liquid-liquid Extraction and Solid Liquid Extraction.* Graz University of Technology.
- Gandjar I. G., dan Rohman A., 2007. *Ki mia Analisi Farmasi.* Yogyakarta : Pustaka Pelajar.
- Gritter, R., J., M. Bobbit, and A. E. Schwarting, 199 dkk. 1991, *Pengantar Kromatografi,* terjemahan Koksasih Padmawinata. Bandung : ITB.
- Hadi, S., 2012, *Pengambilan Minyak Atsiri Bunga Cengkeh (Clove Oil) Menggunakan Pelarut n-Heksana dan Benzena,* Jurnal Bahan Alam Terbarukan. Semarang : Universitas Negeri Semarang
- Halliwell, B., dan Gutteridge J. M. C., 2000. *Free Radical in Biologi and Medicine.* Newyork : Oxford University Press.
- Harborne, J. B., 1987. *Metode Fitokimia, Edisi ke dua,* Bandung : ITB.
- Harmita, 2004. *Petunjuk Pelaksanaan Validasi Metode dan Cara Perhitungannya.* Majalah Ilmu Kefarmasian Vol.1
- Hembing, W., 2006. *Atasi Asam Urat & Rematik Ala Hembing.* Jakarta : Puspa Swara.
- Hernani dan Rahardjo, 2005. *Tanaman Berkhasiat Antioksidan.* Jakarta : Penebar Swadaya.

Daftar Pustaka

- Herowati, R., Ketut, E., K., Nurainin, H., dan Tutus, G., K., 2008. *Aktivitas Antioksidan Antiinflamasi Kuarseti-3-monoasetat*. Hasil asetilasi selektif kuarsetin. Artocarpus.
- International Organization for Standardization, 2002. *Oil of clover leaf [Syzygium aromaticum (Linnaeus) Merril and Perry, syn. Eugenia caryophyllus (Sprengel) Bullock and S. Harrison]*. ISO-Directive 3141/1997, Geneva, Switzerland. .
- Johnson, E.L. dan Stevenson, R., 1991. *Dasar Kromatografi Cair*. Bandung : ITB
- Kardinan, A., 2003. *Tanaman Pengusir dan Pembasmi Nyamuk*. Jakarta : Agro Media Pustaka
- Kelly GS., 2011. *Quarsetin*. Altern Med Rev.
- Khalaf, N., A., Shakya, A., K., Othman, A., A., . 2007. *Antioxidant activities of some common plants*. Turk J Biol.
- Kokasih, E. N., Setiabudhi, T., dan Heryanto, H., 2004. *Peneranan antioksidan pada lanjut usia*. Jakarta : Pusat kajian nasional masalah lanjut usia .
- Kowalska, T., 2003. *Encyclopedia of Cromatography*. New York : Marcell Dekker Inc.
- Kumalaningsih, S., 2007. *Konsentrasi Gula dan Tapioka Terhadap Penerimaan Gel Cincau Hitam Manis Dalam Kemasan*. Malang : Universitas Brawijaya.
- Kumar SG, Saikishore MBP, PanchalS. 2012 *Evaluation of Flower Buds Syzygium Aromaticum For Antimicrobial and Wound Healing Activity in Rats*. Int J Ph Sci.

Penelusuran Senyawa Tumbuhan Cengkeh

- Kurniasari, I., 2006. *Metode Cepat Penentuan Flavonoid Total Meniran (Phyllanthus niruri L.) Berbasis Teknik Spektrofometri Infamerah dan Kemometrik*. Bogor : Institut Pertanian Bogor.
- Kristanti dkk., 2008. *Fitokimia*. Surabaya : Universitas Airlangga press.
- Taiz, E. Zeiger, 2008. *Plant Physiology 5th Ed.*
- Lee, H. S. 2000. *HPLC Analysis of phenolic compounds*. Di dalam : Nollet, L. M. L. (Ed.). *Food Analysis by HPLC*, Second Edition, Revised and Expanded. Marcel Dekker, Inc., New York.
- Liang Y. Z., Xie P., Chan K., 2004. *Quality Control of Herbal Medicines*. Journal of Chromatography
- Lipsy, P. 2010. *Thin Layer Chromatography Characterization of the Active Ingredients in Excedrin and Anacin*. USA: Department of Chemistry and Chemical Biology. Stevens Institute of Technology.
- Lumbanraja, L., B., 2009. *Skrining Fitokimia dan Uji Efek Antiinflamasi Ekstrak Etanol Daun Tempuyung (Sonchus arvensis L.) Terhadap Radang Tikus*. Medan : Fakultas Farmasi Sumatera Utara
- Masroh, L., 2010. *Isolasi dan Uji Toksisitas senyawa aktif ekstrak heksana daun pecut kuda (stachytarpeha jamaicensis L. Vahl)*. Skripsi. Jurusan Kimia. Fakultas Sains dan Teknologi. Universitas Islam Negeri (IAIN) . Malang : Maulana Malik Ibrahim
- Markham, K. R., 1988. *Cara mengidentifikasi flavonoid*, diterjemahkan oleh kosasih padmawinata. Bandung : penerbit ITB.

Daftar Pustaka

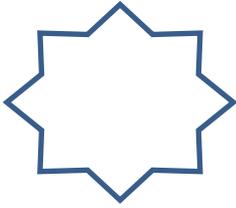
- Masyhud, 2010. *Tanaman Obat Indonesia*. Jakarta : Erlangga.
- Millind, P & Deepa, K., 2011. *Clove: A Champion Spice*. India : Pharmacology Division. Dept. Pharm. Sciences.
- Mulja, M. dan Suharman, 1995, "*Analisis Instrumental*", ed.1, Airlangga University Press, Surabaya.
- Nohong, 2009. *Skrining Fitokimia Tumbuhan Ophiopogon Jaburan Lodd dari Kabupaten Kolaka Provinsi Sulawesi Tenggara*. Jurnal Pembelajaran Sains.
- Nurdjannah, N., 2004. *Diversifikasi Penggunaan Cengkeh*. Bogor : Balai Besar Penelitian dan Pengembangan Pasca Panen Pertanian Indonesia
- Packer dan Yoshikawa, 1999. *Antioxidant Food Supplements*. Academic Press.
- Pino J., A., Marbot R, Aguero J., Fuentes V., 2001. *Essential Oil From Buds and Leaves of Clove (Syzygium aromaticum (L.) Merr. Et Perry) grown in Cuba*. Journal of Essential Oil Research..
- Pokorny, Yanishlieva dan Gordon, 2011. *Antioxidant in Food*. England : Woodhead Publishing Ltd.
- Pourmorad, F., et al. 2006. *Antioxidant activity, phenol and flavonoid contents pf some selected Iranian medical plants. , Afr J. Biotechnol.*
- Redha, A., 2010. *Flavonoid: Struktur, Sifat Antioksidatif dan Peranannya dalam Sistem Biologis*. Pontianak: Politenik Negeri Pontianak

Penelusuran Senyawa Tumbuhan Cengkeh

- Retnowati, K., 2009. *Pengaruh Infusa Akar Tempuyung (Sonchus oerensis) Terhadap Penurunan Kadar Asam Urat Pada Tikus Putih (Rattus Norvegicus)*. Surakarta: Universitas Muhammadiyah Surakarta.
- Robinson, T., 1991. *Kandungan Organik Tumbuhan Tinggi*. Edisi ke-6. Bandung : Institut Teknologi Bandung .
- Robinson, T., 1995. *Kandungan Organik Tumbuhan Tinggi* . Bandung : Institut Teknologi Bandung.
- Rosa, E., dan Gustavo, A., 2010. *Fruit and Vegetable Phytochemicals: Chemistry, Nutritional Value and Stability*. New York: Wiley-Blackwell Publishing
- Roth, H.J., 1994. *Analisis Farmasi*. Yogyakarta : Universitas Gadjah Mada.
- Salisbury, 1995. *Fisiologi Tumbuhan Jilid 2*. Bandung : ITB.
- Spencer, J.P., Rice-Evans, C., & William, R.J., 2003. *Modulation of pro-Survival Akt/Protein Kinase B and ERK 1/2 Signaling Cascade by Quercetin and its in vivo Metabolites Underlie Their Action on Neuronal Viability*. J Biol Chem.
- Sugrani, A., 2009, *Flavonoid (Quercetin)*, Laporan Kimia Organik Bahan Alam Program S2 Kimia, Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam, Universitas Hasanuddin, Makasar.
- Sumarno, 2001. *Teori Dasar Kromatografi*. Yogyakarta : Universitas Gadjah Mada

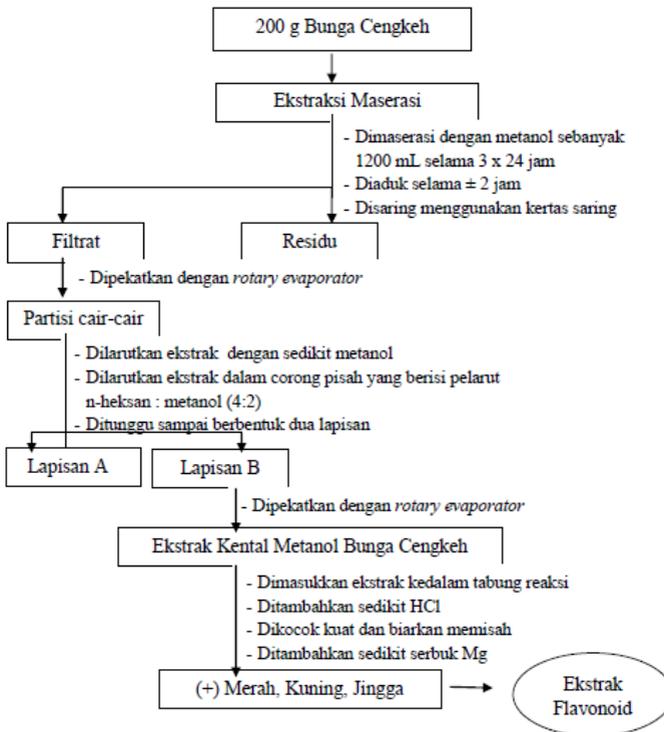
Daftar Pustaka

- Tapas A. M, D. M Sakarkar and R. b Kakde. 2008. *Flavonoids as nutraceuticals: A review*. Tropical Journal of Pharmaceuticals Research.
- Thomas, A., N., S., 2007. *Tanaman Obat Traditional* . Yogyakarta: Kanisus
- Vitasari, E W. 2013. *Antihiperlipidemia Ekstrak Etanol Batang Kayu Kuning (Arcangelisia flafa (L.) Merr.) Terhadap Tius Putih Galur Wistar Yang Diinduksi Pakan Tinggi Lemak*. Skripsi. Sekolah Tinggi Ilmu Farmasi "Yayasan Farmasi". Semarang.
- Winarsi, 2007. *Antioksidan Alami dan Radikal Bebas*. Yogyakarta : Penerbit Kanisius.
- Worotikan, D., E., 2011. *Efek Buah Lemon Cui (Citrus microcarpo) Terhadap Kerusakan Lipida Pada Ikan Mas (Cyprinus carpio L.,) dan Ikan Cakalang (Katsuwonus pelamis) Mentah*. Manado : Universitas Sam Ratulangi



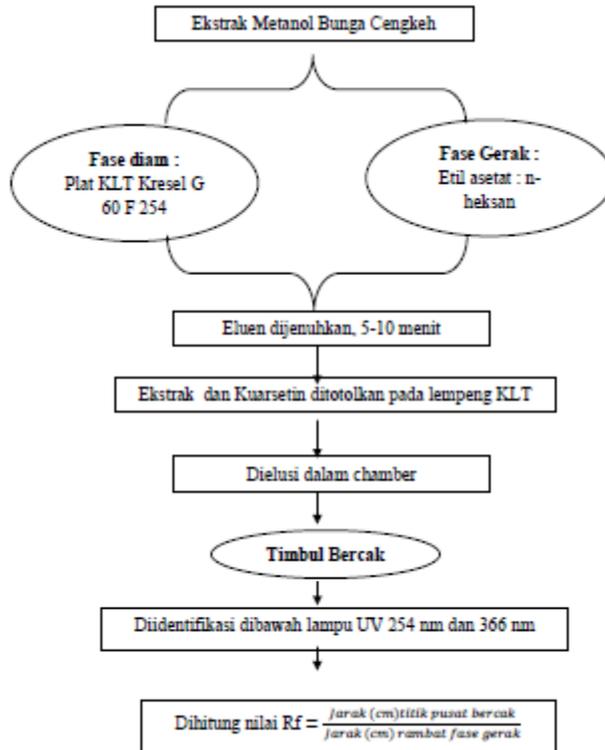
LAMPIRAN

1.1 Ekstraksi dan Skrining Fitokimia

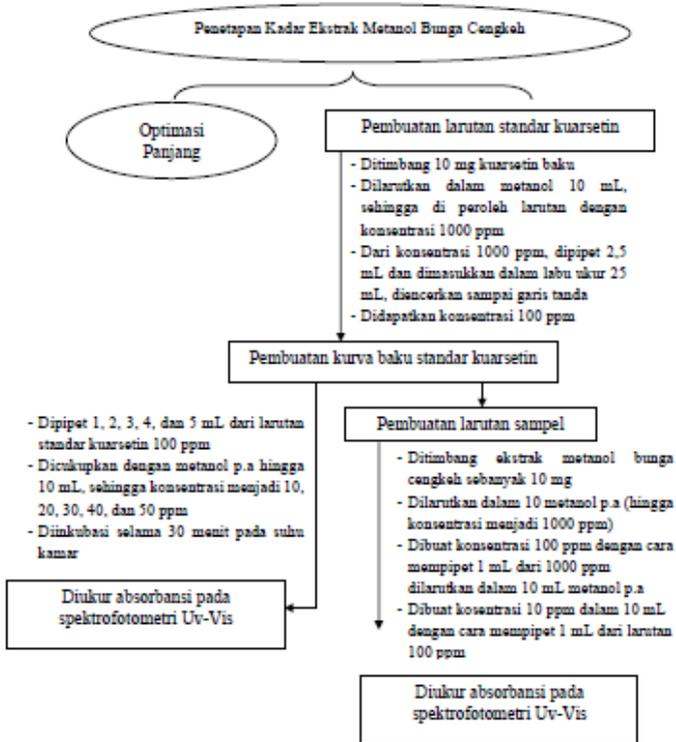


Lampiran

1.2 Identifikasi Ekstrak Metanol Bunga Cengkeh dan Pemandang Kuarsetin menggunakan Kromatografi Lapis Tipis



1.3 Penetapan Kadar Ekstrak Metanol Bunga Cengkeh Menggunakan Spektrofotometri UV-VIS



Lampiran

**LAMPIRAN II
TABEL DAN PERHITUNGAN**

2.1 Tabel Hasil Perhitungan Rendamen Ekstrak Metanol Bunga Cengkeh

Pelarut	Berat Sampel	Berat Ekstrak (g)	Rendamen (%)
Metanol	200 g	10,0844	5,0422
		6,7021	3,3510
		6,0211	3,0105
	Jumlah keseluruhan :	23,5672	11,7836

2.2 Perhitungan Rendamen Ekstrak Metanol Bunga Cengkeh

Perhitungan Rendamen Ekstrak :

$$\begin{aligned} \% \text{ Ekstrak rendamen} &= \frac{\Sigma \text{Ekstrak yang diperoleh}}{\Sigma \text{Simplisia}} \times 100 \% \\ &= \frac{23,5672}{200} \times 100 \% = 11,7836 \% \end{aligned}$$

2.3 Tabel Hasil Skrining Fitokimia Flavonoid Ekstrak Metanol Bunga Cengkeh

	Gambar	Keterangan
Ekstrak Metanol Bunga Cengkeh		(+) Flavonoid Terjadinya perubahan warna ekstrak menjadi jingga

2.4 Tabel Hasil Pembacaan Konsentrasi dan Absorbansi dari Larutan Pembanding Kuarsetin

No	Konsentrasi (ppm)	Absorbansi
1	2	0,0728
2	4	0,846
3	6	0,953
4	8	1,092
5	10	1,126

2.5 Tabel Hasil Perhitungan Regresi Pembanding Kuarsetin

No	X	Y	XY	X ²	Y ²
1	2	0.728	1.456	4	0.529
2	4	0.846	3.384	16	0.715
3	6	0.953	5.718	36	0.908
4	8	1.092	8.736	64	1.192
5	10	1.126	11.26	100	1.267
Σ	30	4.745	30.554	220	4.611

2.6 Perhitungan persamaan regresi Larutan Pembanding Kuarsetin

$$Y = a + bx$$

$$a = \frac{(\Sigma Y) \cdot (\Sigma X^2) - (\Sigma X) \cdot (\Sigma XY)}{n(\Sigma X^2) - (\Sigma X)^2}$$
$$= \frac{(4.745) \cdot (220) - (30) \cdot (30.554)}{5(220) - (30)^2}$$
$$= \frac{1.043 - 916.62}{200} = \frac{-915.577}{200} = -4.577$$

$$b = \frac{n(\Sigma XY) - (\Sigma X) \cdot (\Sigma Y)}{n(\Sigma X^2) - (\Sigma X)^2}$$
$$= \frac{5(30.554) - (30) \cdot (4.745)}{5(220) - (30)^2}$$
$$= \frac{152.77 - 142.35}{200} = \frac{10.42}{200} = 0.052$$

$$y = -4.577 + 0.052x$$

2.7 Perhitungan Pengenceran Larutan Standar Kuarsetin

$$1000 \text{ ppm} = \frac{1000 \text{ mg}}{1.000.000 \text{ mL}} \times 100 \% = 0,1 \%$$

Artinya dalam 100 mL terdapat 0,1 g (% b/v) jika membuat larutan 1000 ppm dengan volume 10 mL maka yang diperlukan adalah :

$$\frac{0,1}{100} \times 10 = 0,01 \text{ g} = 10 \text{ mg}$$

Diencerkan menjadi 100 ppm dengan volume 50 mL

Lampiran

$$V_1 \cdot M_1 = V_2 \cdot M_2$$

$$V_1 = \frac{50 \cdot 100}{1000} = 5 \text{ mL}$$

Kemudian diencerkan menjadi beberapa deret standar dalam 10 mL metanol p.a yaitu 2, 4, 6, 8 ppm :

1. 2 ppm

$$V_1 \cdot M_1 = V_2 \cdot M_2$$

$$V_1 \cdot 100 = 10 \cdot 2$$

$$V_1 = \frac{2 \cdot 10}{100} = 0,2 \text{ mL}$$

2.4 ppm

$$V_1 \cdot M_1 = V_2 \cdot M_2$$

$$V_1 \cdot 100 = 10 \cdot 4$$

$$V_1 = \frac{4 \cdot 10}{100} = 0,4 \text{ mL}$$

3. 6 ppm

$$V_1 \cdot M_1 = V_2 \cdot M_2$$

$$V_1 \cdot 100 = 10 \cdot 6$$

$$V_1 = \frac{6 \cdot 10}{100} = 0,6 \text{ mL}$$

4. 8 ppm

$$V_1 \cdot M_1 = V_2 \cdot M_2$$

$$V_1 \cdot 100 = 10 \cdot 8$$

$$V_1 = \frac{8 \cdot 10}{100} = 0,8 \text{ mL}$$

5. 10 ppm

$$V_1 \cdot M_1 = V_2 \cdot M_2$$

$$V_1 \cdot 100 = 10 \cdot 10$$

$$V_1 = \frac{10 \cdot 10}{100} = 1 \text{ mL}$$

2.8 Penetapan Kadar Flavonoid dalam Ekstrak Metanol Bunga Cengkeh

Sebanyak 9,5 g fraksi metanol ekstrak bunga cengkeh terbaik dibuat menjadi larutan sampel dengan volume 10 mL yang memiliki nilai absorbansi 0.211, maka konsentrasi flavonoid dalam larutan tersebut adalah :

$$y = -4.577 + 0.052x$$

$$0,211 = -4.577 + 0.052x$$

$$0.052x = 0.211 + 4.577$$

$$x = \frac{4788}{0.052} = 92.076 \text{ } \mu\text{g/ mL}$$

$$\begin{aligned} \text{jadi, kadar flavonoid} &= \frac{X \text{ (}\mu\text{g/ mL)} \times \text{volume akhir (mL)}}{\text{berat penimbangan sampel}} \\ &= \frac{92.076 \text{ } \mu\text{g/ mL} \times 10 \text{ mL}}{10 \text{ g}} \\ &= 92,076 \text{ } \mu\text{g/g} = 9.207 \end{aligned}$$

LAMPIRAN III

GAMBAR HASIL PENELITIAN

3.1 Ekstraksi Maserasi dan Fraksinasi Partisi Cair - Cair



Proses Ekstraksi Maserasi



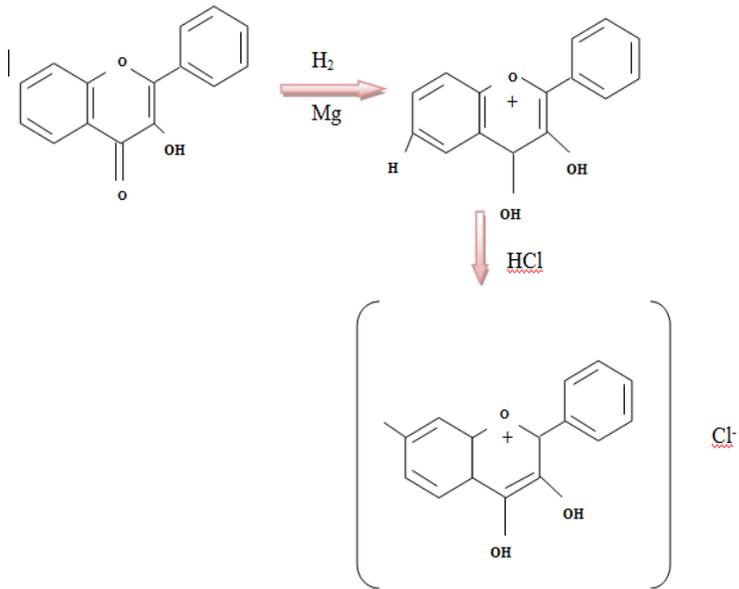
Proses Partisi Cair-cair



Ekstrak Metanol Bunga
Cengkeh

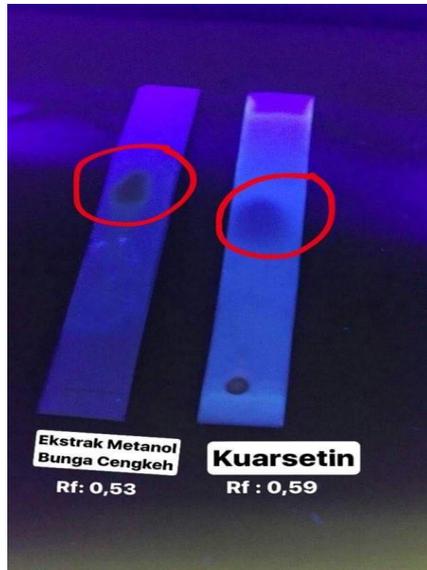
Lampiran

3.2 Reaksi Flavonoid dengan Pereaksi Mg dan HCl (Fatimah, 2011)



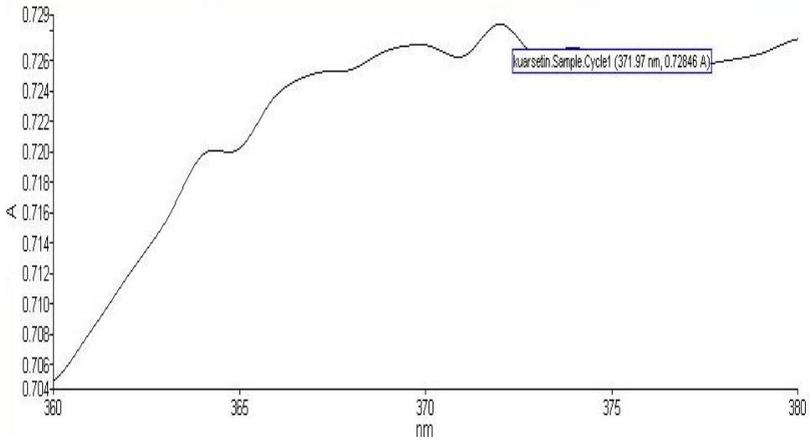
Penelusuran Senyawa Tumbuhan Cengkeh

3.3 Identifikasi Ekstrak Metanol Bunga Cengkeh dan Pembandingan Kuarsetin menggunakan Kromatografi Lapis Tipis

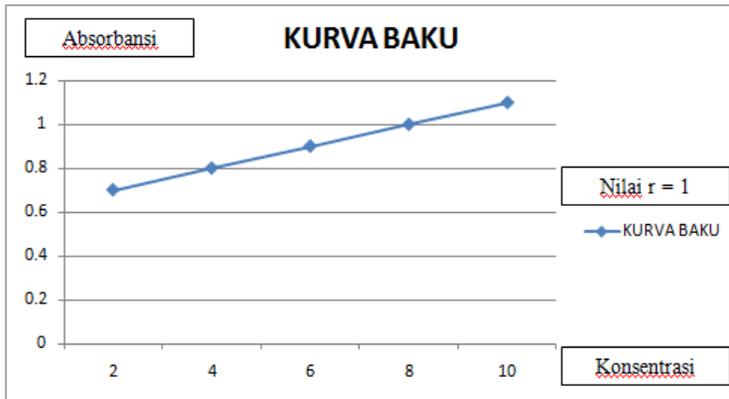


Lampiran

3.4 Optimasi Panjang Gelombang Kuarsetin



3.5 Kurva Kalibrasi Larutan Standar Kuarsetin



Lampiran



Indonesia merupakan salah satu Negara yang memiliki keanekaragaman tumbuhan di dunia, sebanyak 40.000 jenis flora yang ada di dunia, 30.000 jenis dapat dijumpai di Indonesia dan 940 diantaranya diketahui memiliki banyak manfaat dan kegunaanya besar bagi manusia. Kekayaan alam di Indonesia sangat melimpah, terutama kekayaan floranya yang memiliki banyak ragam, jenis dan memiliki manfaat yang besar bagi kehidupan manusia terutama sebagai sumber makanan dan obat-obatan.

Dalam tanaman ada banyak komponen kimia yang dapat dimanfaatkan sebagai bahan obat tradisional yang sudah banyak dimanfaatkan oleh nenek moyang dahulu untuk mengobati berbagai macam penyakit.

Salah satu tanaman yang mengandung senyawa obat yaitu cengkeh (*Syzygium aromaticum*). Tanaman cengkeh merupakan tanaman perkebunan/ industri yang banyak ditemukan dikawasan tengah dan timur Indonesia, misalnya Gorontalo. Tanaman yang termasuk dalam family Myrtaceae ini banyak ditemukan didataran rendah dengan ketinggian 200-900 meter diatas permukaan laut dan tinggi dari tanaman cengkeh dapat mencapai 5-10 meter. Cengkeh merupakan tanaman rempah yang sejak lama digunakan dalam industry makanan, minuman, dan obat-obatan. Tanaman cengkeh juga digunakan sebagai bahan membuat dupa, aroma terapi dan sebagai bahan utama rokok kretek khas Indonesia.



Mohamad Adam Mustapa, S.Si., M.Sc

Lahir di Gorontalo, tinggal di Jl. Roky Kartili, Telaga. Menamatkan S1 ilmu Farmasi dan S2 Ilmu Farmasi, Konsentrasi Kimia Farmasi Bahan Alam, bekerja sebagai dosen di Jurusan Farmasi Universitas Negeri Gorontalo.

 **media madani**
Publishing

Jl. Syekh Nawawi Al-Bantani KM. 2 KP3B
Pujuh Sukajaya Curug Kota Serang
Banten Kode Pos 42177

(0254) 7932066
087771333388

media.madani81@gmail.com
madanibookstore81
Madani Oke

ISBN 978-602-0736-73-0



9 786020 736730