



SIGMA

JURNAL SAINS DAN TEKNOLOGI

Vol. 13, No. 2, Juli 2010

Anuar Kassim, Ho Soon Min, Ngai Chee Fei, and N. Saravanan
**XRD AND SEM INVESTIGATION OF THE INFLUENCE OF pH AND BATH
 TEMPERATURE ON NICKEL SULPHIDE THIN FILMS**

E. Juarlin, A. Limbong, dan P. L. Gareso
**INTEGRASI NUMERIK KAPASITAS PANAS DEBYE MATERIAL LOGAM
 MENGGUNAKAN METODE NEWTON-COTES**

Rini Safitri dan Lenni Fitri
**KAJIAN PEMANFAATAN RADIASI SINAR GAMMA (CO-60) PADA SISTEM
 PENGAWETAN MAKANAN STUDI KASUS PADA SERBUK CABAI**

Herry Pribawanto Suryawan
A WHITE NOISE APPROACH TO MIXED FRACTIONAL BROWNIAN MOTION

Eva Handriyantini
**PERBANDINGAN ALGORITMA SCANLINE DAN ALGORITMA RAY TRACING
 TERHADAP AKURASI PENCAHAYAAN PADA PIRANTI LUNAK 3ds MAX**

Nurul Sumiasri dan Dody Priadi
**AGRO-EKOSISTEM TANAMAN HORTIKULTURA DAN VARIASINYA DI DAERAH
 DATARAN RENDAH DI BOGOR**

Agustine Susilowati, Puspa DN Lotulung, Yati Maryati, Aspiyanto, dan Hakiki Melanie
**PENGARUH PROSES PENGOLAHAN TEH HIJAU (*Camellia sinensis*)
 LOKAL *Aracca Kiara* DAN *Dewata* TERHADAP L-THEANINE SEBAGAI SENYAWA
 ANTI STRESS MELALUI MIKROFILTRASI SEL BERPENGADUK**

Yohanes Dwiatmaka
**IDENTIFIKASI FLAVONOID HERBA PEGAGAN EMBUN (*Hydrocotyle
 sibthorpioides* Lmk.) HASIL ISOLASI SECARA KLTP SERTA UJI KEMURNIANNYA
 DENGAN HPLC**

Christine Patramurti
**PENGEMBANGAN DAN VALIDASI METODE KROMATOGRAFI CAIR KINERJA
 TINGGI (KCKT) FASE TERBALIK PADA ANALISIS MULTIKOMPONEN
 PARASETAMOL, PROPIFENAZON DAN KAFEIN**

Rita Suhadi, Stefani Y Cahyono, Novi L Wibowo, Amanda Marselin
**EVALUASI PENGGUNAAN SEDIAAN RACIKAN PADA PASIEN ANAK
 RS X YOGYAKARTA**

yo

SIGMA

JURNAL SAINS DAN TEKNOLOGI

Vol. 13, No. 2, Juli 2010

ISSN: 1410-5888

DAFTAR ISI

EDITORIAL	iii
XRD AND SEM INVESTIGATION OF THE INFLUENCE OF pH AND BATH TEMPERATURE ON NICKEL SULPHIDE THIN FILMS <i>Anuar Kassim, Ho Soon Min, Ngai Chee Fei, and N. Saravanan</i>	99 - 105
INTEGRASI NUMERIK KAPASITAS PANAS DEBYE MATERIAL LOGAM MENGGUNAKAN METODE NEWTON-COTES <i>E. Juarlin, A. Limbong, dan P. L. Gareso</i>	107 - 113
KAJIAN PEMANFAATAN RADIASI SINAR GAMMA (CO-60) PADA SISTEM PENGAWETAN MAKANAN STUDI KASUS PADA SERBUK CABAI <i>Rini Safitri dan Lenni Fitri</i>	115 - 122
A WHITE NOISE APPROACH TO MIXED FRACTIONAL BROWNIAN MOTION <i>Herry Pribawanto Suryawan</i>	123 - 132
PERBANDINGAN ALGORITMA SCANLINE DAN ALGORITMA RAY TRACING TERHADAP AKURASI PENCAHAYAAN PADA PIRANTI LUNAK 3ds MAX <i>Eva Handriyanti</i>	133 - 144
AGRO-EKOSISTEM TANAMAN HORTIKULTURA DAN VARIASINYA DI DAERAH DATARAN RENDAH DI BOGOR <i>Nurul Sumiasri dan Dody Priadi</i>	145 - 152
PENGARUH PROSES PENGOLAHAN TEH HIJAU (<i>Camellia sinensis</i>) LOKAL <i>Aracca Kiara</i> DAN <i>Dewata</i> TERHADAP L-THEANINE SEBAGAI SENYAWA ANTI STRESS MELALUI MIKROFILTRASI SEL BERPENGADUK <i>Agustine Susilowati, Puspa DN Lotulung, Yati Maryati, Aspiyanto, dan Hakiki Melanie</i>	153 - 165
IDENTIFIKASI FLAVONOID HERBA PEGAGAN EMBUN (<i>Hydrocotyle sibthorpioides Lmk.</i>) HASIL ISOLASI SECARA KLTP SERTA UJI KEMURNIANNYA DENGAN HPLC <i>Yohanes Dwiatmaka</i>	167 - 177
PENGEMBANGAN DAN VALIDASI METODE KROMATOGRAFI CAIR KINERJA TINGGI (KCKT) FASE TERBALIK PADA ANALISIS MULTIKOMPONEN PARASETAMOL, PROPIFENAZON DAN KAFEIN <i>Christine Patramurti</i>	179 - 186
EVALUASI PENGGUNAAN SEDIAAN RACIKAN PADA PASIEN ANAK RS X YOGYAKARTA <i>Rita Suhadi, Stefani Y Cahyono, Novi L Wibowo, Amanda Marselin</i>	187 - 197

IDENTIFIKASI FLAVONOID HERBA PEGAGAN EMBUN (*Hydrocotyle sibthorpioides* Lmk.) HASIL ISOLASI SECARA KLTP SERTA UJI KEMURNIANNYA DENGAN HPLC

Yohanes Dwiatmaka

Fakultas Farmasi, Universitas Sanata Dharma,
Teromol Pos 29, Yogyakarta 55002, Alamat e-mail: atma14@usd.ac.id

Abstract

Isolation of flavonoids from the Hydrocotyle sibthorpioides Lmk. herb (lawn marshpennywort) have been done using preparative thin layer chromatography (preparative TLC). The purity of the flavonoid isolates were checked by multi eluents TLC. This procedure commonly done by many researchers to identify the hydroxylation of flavonoid isolates. According to this procedure, four isolates of flavonoid from the methanolic extract of H. sibthorpioides herb are pure which have the spectra characteristic of flavonoid structure. Rutin used as standard of flavonoid in this research.

Since the high performance liquid chromatography (HPLC) has better performance on separation than TLC, it was used in this research to confirm the purity of flavonoid isolates. The HPLC chromatograms showed that all of the four flavonoid isolates were impure. Thus, for the flavonoid isolates, the HPLC test must be done after the multi eluents TLC purity identification.

Keywords: *Hydrocotyle sibthorpioides* Lmk., flavonoid, purity, multi eluents TLC, HPLC

1. Pendahuluan

Banyak tumbuhan liar telah dimanfaatkan oleh masyarakat secara tradisional sebagai bahan obat. Salah satunya adalah herba pegagan embun (*Hydrocotyle sibthorpioides* Lmk.), yang termasuk dalam familia Umbelliferae (Apiaceae). Tanaman ini dikenal pula dengan sinonim *H. rotundifolia* Roxb. dan *H. formosana* Masamune (Anonim, 2005). Tanaman ini biasanya tumbuh liar pada tempat-tempat yang mendapat naungan dan lembab. Habitusnya yang kecil dan tumbuh merayap menyebabkan tidak banyak diperhatikan orang.

Kandungan *quercetin 3-O-β-D-(6"-caffeoyl)galactoside* dalam herba pegagan embun dilaporkan oleh Shigematsu, Kouno, and Kawano (1981). Terpen, terutama *trans-β-farnesene* dilaporkan keberadaannya oleh Asakawa, Matsuda, and Takemoto (1982). Sedangkan Janardhanan and Thoppil (2001) menemukan kandungan minyak atsiri pada herba pegagan embun ini. Beberapa penelitian berikutnya menyebutkan bahwa herba pegagan embun mengandung tujuh senyawa saponin triterpenoid, salah satunya adalah udosaponin B (Matsushita, Sasaki, Warashina, Miyase, Noguchi, and Velde, 2004). Anonim (2005) melaporkan adanya kandungan minyak atsiri, kumarin dan hiperin.

Herba pegagan embun dapat digunakan untuk mengobati sakit kuning (hepatitis), pengecilan hati dengan busung, batu empedu, batu dan infeksi saluran kencing, batuk, sesak nafas, sariawan, radang tenggorokan, infeksi amandel, dan infeksi telinga tengah (Anonim, 2005).

Salah satu kandungan dalam herba pegagan embun adalah golongan flavonoid. Di dalam tumbuhan, flavonoid biasanya berupa glikosida (Riyanto, 1990). Tanaman yang mengandung flavonoid banyak digunakan dalam dunia pengobatan tradisional. Adanya khasiat herba pegagan embun untuk mengobati sakit kuning (hepatitis), infeksi saluran kencing, infeksi amandel, infeksi telinga tengah dan sariawan kemungkinan karena aktivitas flavonoid yang dikandungnya karena flavonoid sendiri menurut Robinson (1995) memiliki daya sebagai bakterisida, antiinflamasi dan antioksidan.

Aktivitas farmakologis disebabkan oleh senyawa tertentu di dalam tumbuhan. Apabila dapat diidentifikasi senyawa tersebut, bahkan bila dapat dipastikan strukturnya maka akan membuka peluang untuk pengembangan obat baru. Namun belum diketahui secara pasti senyawa yang memiliki masing-masing aktivitas farmakologis dalam herba pegagan embun ini. Oleh karena itu perlu dilakukan suatu tahap isolasi untuk identifikasi senyawa flavonoid yang diduga memiliki aktivitas farmakologis di dalam herba pegagan embun.

Banyak senyawa dari golongan flavonoid ini yang mudah larut dalam air, terutama bentuk glikosidanya, dan oleh karena itu senyawa ini berada dalam ekstrak air tumbuhan. Bahkan senyawa yang hanya larut sedikit dalam air kepolarannya memadai untuk diekstraksi dengan baik memakai metanol, etanol, atau aseton (Robinson, 1995).

Flavonoid yang diperoleh dengan cara penyarian umumnya merupakan campuran. Isolasi masing-masing komponen biasanya dilakukan dengan teknik kromatografi (Riyanto, 1990). Setelah murni maka dapat dilakukan tahap identifikasi.

Flavonoid dapat diidentifikasi dengan mengamati perubahan warna pada kromatografi lapis tipis (KLT) sebelum dan sesudah diuapi amonia yang dilihat pada sinar UV 366 nm. Menurut Markham (1988) warna bercak dapat digunakan sebagai petunjuk identitas golongan flavonoid.

Dalam suasana basa, aglikon flavonoid yang mengandung gugus hidroksi larut dalam air dengan membentuk warna kuning dan jika diasamkan akan mengendap kembali. Pembentukan warna kuning dalam suasana basa tersebut digunakan untuk deteksi pada kromatografi dan spektrofotometri (Riyanto, 1990).

Penelitian fitokimia juga dapat dilakukan dengan uji kimia tertentu seperti menggunakan pereaksi natrium hidroksida, asam sulfat pekat, logam Mg dan asam klorida (Venkataraman, 1962). Uji warna memberikan gambaran umum golongan flavonoid, pola hidroksilasi dan macam substitusinya. Tetapi pada beberapa turunan flavonoid tidak memberikan warna pada uji tersebut. Uji warna selanjutnya didukung analisis spektrofotometri ultraviolet (Markham, 1988).

Isolasi secara cepat dengan hasil pemisahan yang cukup memadai untuk keperluan identifikasi biasa digunakan teknik kromatografi lapis tipis preparatif (KLTP). Kemurnian isolat diuji menggunakan KLT multi eluen. Bercak tunggal pada kromatogram KLT multi eluen menjadi pedoman kemurnian. Tetapi peralatan kromatografi yang lebih baik seperti *high performance liquid chromatography* (HPLC) preparatif tentu akan memberikan hasil pemisahan dengan kemurnian yang lebih baik. Keterbatasan sarana HPLC preparatif sering menjadikan KLTP menjadi pilihan dalam upaya isolasi flavonoid.

Tujuan penelitian ini adalah untuk mengetahui kemurnian isolat flavonoid hasil isolasi secara KLTP. Uji kemurnian dilakukan menggunakan teknik KLT multi eluen dan HPLC.

2. Metode Penelitian

2.1. Bahan

Bahan tumbuhan yang digunakan adalah herba pegagan embun yang telah mulai berbunga (umur 1 - 1½ bulan). Bahan kimia yang digunakan berderajat p.a (*pro analysis*) produk Merck, berupa: metanol, n-butanol, asam asetat, amonia, asam asetat. Rutin (SIGMA) sebagai standard flavonoid.

2.2. Peralatan

Alat-alat yang digunakan terdiri dari perangkat KLTP, lampu UV 365 nm, HPLC (KNAUER HPG-PDA, kolom C-18, detektor UV/Vis 6000 LP, panjang gelombang 320 nm), oven, blender, ayakan, kertas saring, *vaccum rotary evaporator*, penangas air, *shaker*, alat-alat gelas.

2.3. Tata Cara Penelitian

2.3.1. Persiapan bahan dan ekstraksi

Langkah pertama yang dilakukan adalah determinasi herba pegagan embun. Determinasi dilakukan dengan menggunakan kunci determinasi tanaman menurut Backer dan Bakhuizen Van den Brink Jr. (1965). Selanjutnya dilakukan pemanenan.

Setelah pemanenan dilakukan pencucian herba dengan air mengalir, segera ditiriskan. Selanjutnya dikering-anginkan hingga mudah hancur ketika diremas, kemudian dibuat serbuk dengan blender dan diayak.

Selanjutnya dilakukan maserasi terhadap 20 g serbuk herba pegagan embun. Maserasi pertama digunakan penyari metanol : air (9 : 1 v/v) sebanyak 150 ml. Campuran digojog dengan *shaker* selama 12 jam, di tempat yang terlindung cahaya pada suhu kamar. Untuk pemisahan serbuk dan cairan hasil penyarian, dilakukan penyaringan vakum. Setelah dikering-anginkan, sisa serbuk dimaserasi lagi dengan metanol : air (1 : 1 v/v) sebanyak 150 ml. Kedua hasil penyarian dicampur, diuapkan dengan *vacuum rotary evaporator* hingga tinggal sepertiga. Pengeringan ekstrak dilanjutkan di dalam oven (50°C).

2.3.2. Pemeriksaan pendahuluan flavonoid dengan KLT

Pemeriksaan kandungan flavonoid di dalam ekstrak dilakukan secara KLT dengan fase diam selulosa dan fase gerak BAW (n-butanol:asam asetat:air = 4:1:5 v/v, fase atas). Ekstrak metanol dilarutkan (100 mg dalam 1 ml metanol), ditotolkan sebanyak 5 ul, pengembangan sepanjang 10 cm. Pemisahan bercak yang didapat pada kromatogram dideteksi dengan menggunakan lampu UV 365 nm, sebelum dan sesudah diuapi amonia.

2.3.3. Isolasi flavonoid dengan KLTP

Isolasi dengan KLTP dilakukan dengan sistem serupa pada KLT pemeriksaan pendahuluan. Ekstrak metanol ditotolkan berupa garis, pengembangan sejauh 10 cm. Pita bercak flavonoid dikerok, dimasukkan ke dalam *Beaker glass* dan dilarutkan dengan metanol. Selanjutnya dilakukan penyaringan dengan *sintered glass* dan vakum. Filtrat yang didapat dikeringkan kemudian ditimbang. Dilakukan reisolasi dengan fase diam selulosa, fase gerak asam asetat 15 %. Isolat flavonoid yang diperoleh digunakan untuk dianalisis dengan KLT multi eluen, reaksi warna dan uji kemurnian dengan HPLC.

2.3.4. Pemeriksaan kemurnian isolat dengan KLT dan reaksi warna

Kemurnian isolat flavonoid dapat diketahui menggunakan KLT multi eluen. KLT ini menggunakan fase gerak pertama BAW dan fase gerak kedua asam asetat 15 % dengan fase diam selulosa. Jika hasil dari kedua fase gerak tersebut adalah bercak tunggal maka dapat disimpulkan bahwa isolat flavonoid tersebut sudah murni.

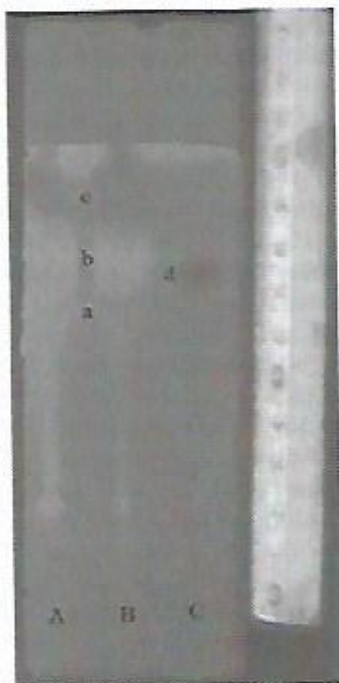
2.3.5. Pemeriksaan kemurnian isolat dengan HPLC

Sistem HPLC yang digunakan adalah kolom C-tech C18 sepanjang 150 mm, eluen berupa 35 % metanol dan 5 % asam asetat, deteksi sinar UV 320 nm, laju eluen 1 ml/menit. Setiap isolat flavonoid dilarutkan dalam metanol, disuntikkan ke dalam kolom sejumlah 20 ul, digunakan standart rutin 0,2 % dalam metanol.

3. Hasil dan Pembahasan

3.1. Pemeriksaan Pendahuluan Flavonoid Secara KLT

Hasil identifikasi awal secara KLT terhadap ekstrak (Gambar 1) menghasilkan tiga bercak flavonoid (a, b, dan c). Bercak flavonoid pada kromatogram KLT tersebut berwarna kuning setelah diberi uap amonia. Di bawah lampu UV 365 nm menampakkan warna khas ungu dan biru. Bercak b (hRf 63) dan c (hRf 90) memiliki warna yang sama dengan rutin (bercak d) yaitu pada cahaya tampak tidak terlihat namun pada UV 365 nm berwarna ungu. Sedangkan bercak dengan a (hRf 76) pada cahaya tampak tidak terlihat, pada UV 365 nm berfluoresensi biru muda. Sesaat setelah kromatogram diberi uap amonia ketiga bercak (a, b, dan c) dan rutin (d) berwarna kuning pada cahaya tampak, pada UV 365 nm warna yang timbul tidak jauh berbeda dengan sebelum diuapi amonia.

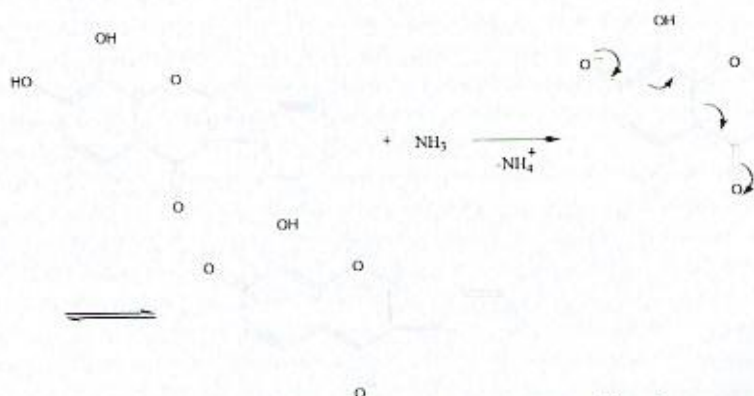


Gambar 1. Kromatogram KLT uji pendahuluan ekstrak metanol herba pegagan embun, deteksi UV 365 nm sesudah diuapi amonia

Keterangan : A dan B : ekstrak metanol herba pegagan embun
C : rutin

Tabel 1. Hasil uji KLT ekstrak metanol dan rutin (berdasarkan Gambar 1)

Sampel	Bercak	Tanpa pereaksi		Diuapi amonia		hRf
		Cahaya tampak	UV 365 nm	Cahaya tampak	UV 365 nm	
Ekstrak metanol (A dan B)	a	tidak tampak	ungu fluoresensi	kuning	ungu fluoresensi	63
	b	tidak tampak	biru muda	kuning	biru muda	76
Rutin (C)	c	tidak tampak	ungu	kuning	ungu	90
	d	tidak tampak	ungu	kuning	ungu	73



Gambar 2. Reaksi yang terjadi setelah diberi uap amonia

Flavonoid memiliki gugus aoksokrom OH. Atom O bersifat elektrofil sehingga adanya basa amonia akan mudah melepaskan H^+ yang kemudian diikat oleh amonia sehingga O memiliki 3 pasang elektron bebas. Adanya tambahan elektron tersebut menyebabkan energi yang diperlukan untuk mempromosikan elektronnya semakin kecil sehingga akan diserap pada panjang gelombang yang lebih besar. Warna kuning terjadi karena terbentuknya kuinoid (Gambar 2). Warna cepat kembali seperti semula karena di udara terdapat banyak uap air ($H-OH$) yang akan memberikan H^+ pada O yang kelebihan elektron sehingga reaksi kembali seperti semula (*reversible*). Berdasarkan data perubahan warna pada ketiga bercak (Tabel 1), dibandingkan acuan menurut Markham (1988), dapat dinyatakan bahwa ketiga bercak tersebut merupakan senyawa flavonoid.

3.2. Isolasi dan Uji Kemurnian Isolat Flavonoid

Isolasi flavonoid secara KLTP menghasilkan 3 pita bercak flavonoid yaitu isolat a, b, dan c dengan nilai R_f dan warna seperti pada uji KLT ekstrak pada Gambar 1. Bercak b dan c dipilih untuk dilakukan isolasi karena kemiripan dengan bercak rutin. Selanjutnya dilakukan uji kemurnian dengan KLT multi eluen. Pada fase gerak BAW kedua bercak masing-masing hanya menunjukkan satu bercak. Pada fase gerak asam asetat 15 % masing-masing menghasilkan tiga bercak. Maka disimpulkan bahwa bercak b dan c belum murni. Maka dilakukan reisolasi secara KLTP dengan fase gerak asam asetat 15 %. Karena ada kesamaan nilai R_f ketiga bercak hasil reisolasi bercak b dan c, maka dilakukan penggabungan, sehingga akhirnya dihasilkan empat isolat flavonoid. Terhadap keempat isolat flavonoid ini selanjutnya dilakukan uji kemurnian secara KLT multi eluen. Ternyata keempat isolat masing-masing hanya menghasilkan satu bercak (Tabel 2). Hal ini menunjukkan bahwa semua isolat (A, B, C, dan D) telah murni berdasarkan pengujian secara KLT multi eluen, maka dapat digunakan untuk analisis selanjutnya.

Tabel 2. Hasil KLT multi eluen untuk uji kemurnian isolat flavonoid

Bercak isolat	Nilai R_f dengan Fase Gerak:	
	BAW	Asam asetat 15 %
A	79	40
B	77	80
C	76	84
D	76	51

Identifikasi golongan flavonoid dilakukan dengan membuat spektra UV untuk setiap isolat. Spektra setiap isolat menunjukkan puncak-puncak serapan pada panjang gelombang yang sesuai dengan golongan flavonoid tertentu (Gambar 3). Nilai panjang gelombang pada puncak-puncak spektra dan hasil KLT setelah dibandingkan dengan acuan menurut Markham (1988) memberikan petunjuk golongan dari masing-masing isolat (Tabel 3). Isolat A dan D mengindikasikan golongan flavon atau flavonol dengan 3-OH tersubstitusi. Isolat B sesuai dengan golongan flavanon atau dihidroflavonol. Isolat C sesuai dengan golongan isoflavan.

3.3. Uji kemurnian isolat dengan HPLC

Menurut hasil uji KLT multi eluen, keempat isolat telah dapat dinyatakan murni karena pada fase gerak yang berbeda kepolarannya, semua isolat masing-masing hanya menghasilkan satu bercak saja. Pada beberapa penelitian, berdasarkan kesimpulan tersebut lalu isolat diidentifikasi letak gugus hidroksilnya sehingga akhirnya dapat disarankan kemungkinan strukturnya. Pada penelitian ini juga telah dilakukan identifikasi tersebut (Gambar 3, Tabel 2, Tabel 3). Namun kemurniannya masih layak dipertanyakan karena daya pisah KLT yang lebih rendah dibandingkan HPLC. Maka pada penelitian ini dilakukan uji kemurnian secara HPLC, sehingga dihasilkan kromatogram HPLC untuk keempat isolat dan standard rutin (Gambar 4-8).

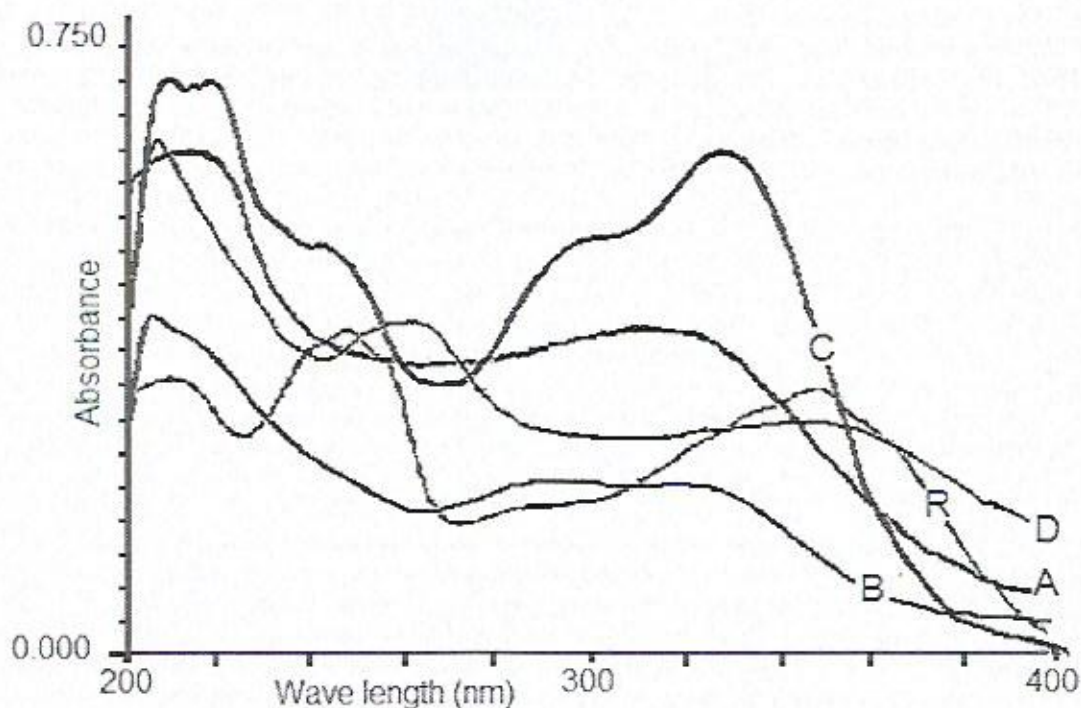
Uji kemurnian juga dilakukan terhadap larutan standard rutin (Gambar 4) sebagai pembanding tingkat kemurniannya. Pada kromatogram larutan rutin tidak menunjukkan

kemunculan senyawa lain. Hal ini menunjukkan bahwa larutan rutin yang digunakan sebagai pembanding pada uji KLT memang murni.

Isolat flavonoid A muncul pada menit 6,5 (Gambar 5) namun pada menit 10,6 tampak kemunculan senyawa lain. Maka isolat A dapat dinyatakan masih tercampur dengan senyawa lain yang juga memiliki serapan pada daerah serapan untuk flavonoid. Demikian pula untuk isolat B, C, dan D masing-masing masih menunjukkan adanya kemunculan senyawa-senyawa lain.

Berdasarkan hasil uji HPLC ini maka keempat isolat flavonoid tersebut masih belum murni. Adanya senyawa yang memiliki serapan pada daerah serapan flavonoid tersebut tentu akan menjadi pengacau ketika dilakukan identifikasi pola hidroksilasi isolat flavonoid. Besar kemungkinan kesamaan struktur senyawa-senyawa pengotor ini dengan isolat flavonoid. Hal ini didukung dari kenyataan bahwa pengotor tidak terpisahkan dari isolat flavonoid secara KLT, dan secara HPLC menunjukkan serapan pada daerah serapan flavonoid.

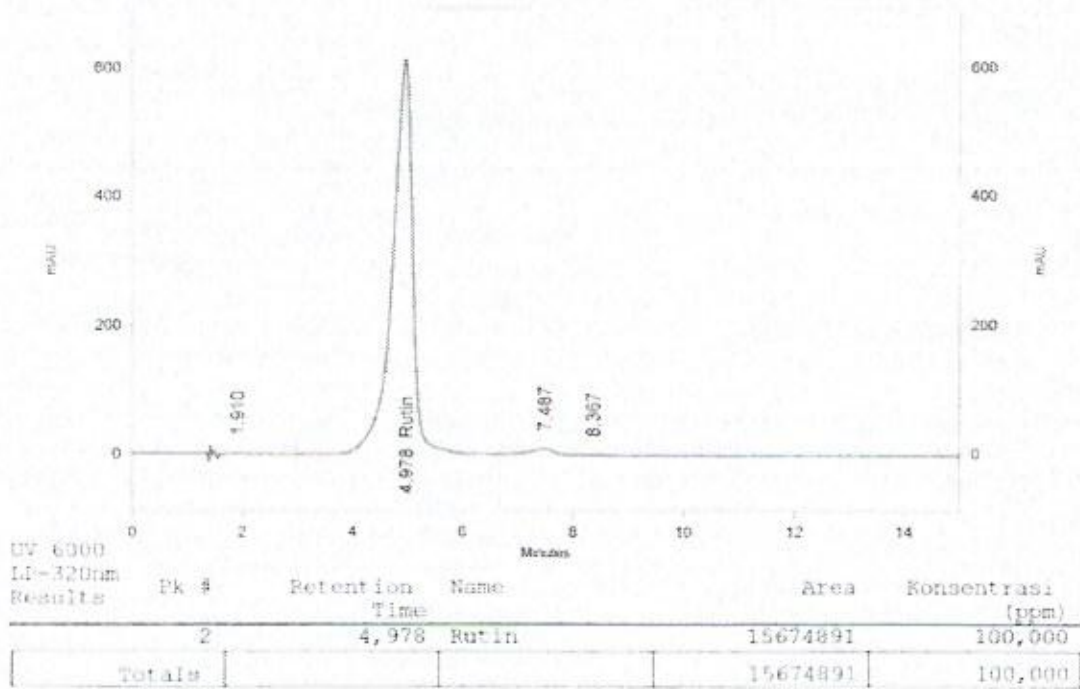
Identifikasi pola hidroksilasi flavonoid didasarkan pada reaksi gugus hidroksil dengan senyawa pereaksi yang diberikan dan diukur serapan pada daerah ultra violet dan visibel. Kesamaan struktur pengotor terhadap isolat flavonoid tentu sangat menurunkan tingkat keakuratan hasil analisis.



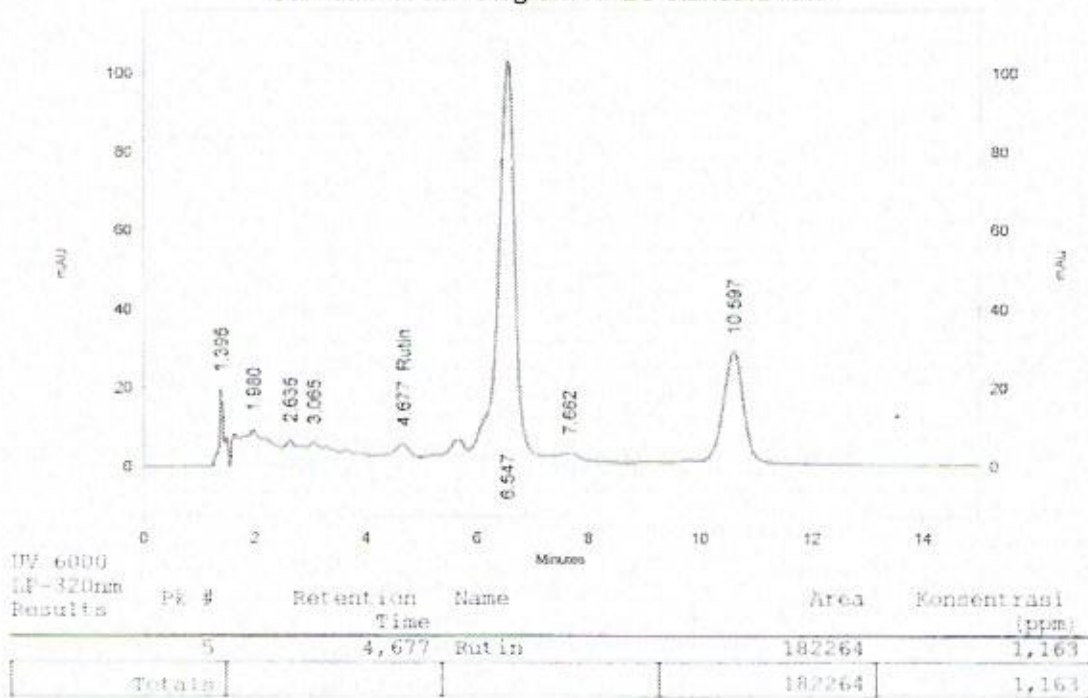
Gambar 3. Spektra serapan UV keempat isolat flavonoid (A, B, C, D) dan rutin (R)

Tabel 3. Hasil uji KLT dan *scanning* Uv isolat A, B, C, dan D dibandingkan dengan acuan menurut Markham (1988)

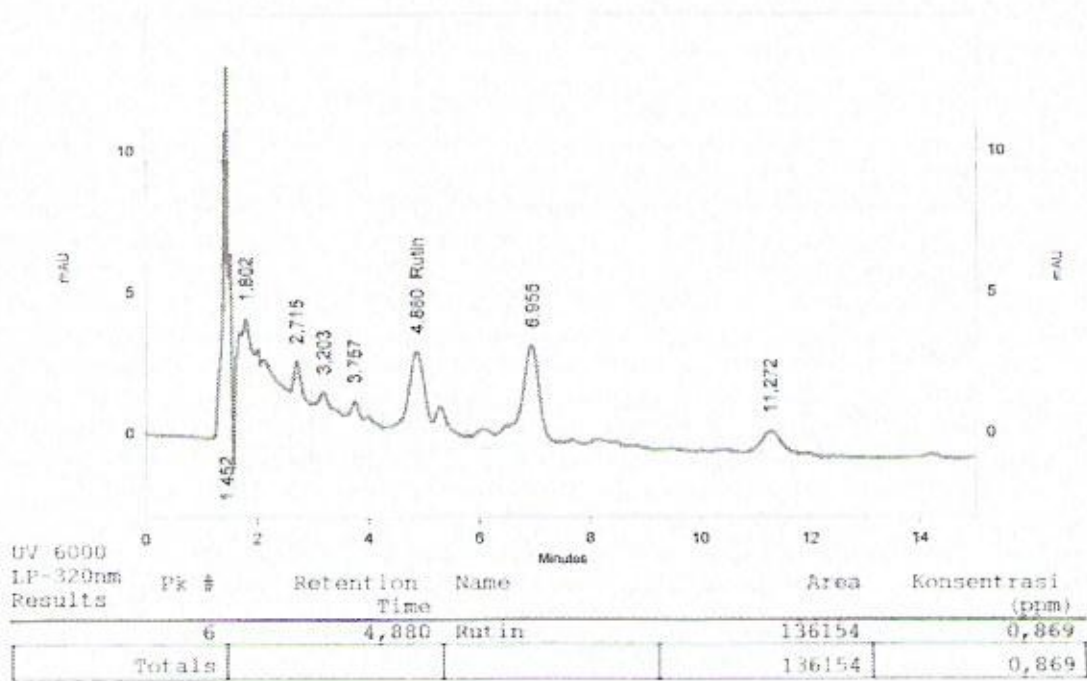
Isolat	Warna bercak pada UV 366 nm		Jenis flavonoid (Markham, 1988)	Puncak spektra (Markham, 1988)		Puncak spektra isolat flavonoid		Kesimpulan: Golongan flavonoid isolat
	Tanpa NH ₃	Dengan uap NH ₃		Pita I (nm)	Pita II (nm)	Pita I (nm)	Pita II (nm)	
A	Lemba yung gelap	Perubahan warna sedikit atau tanpa perubahan	Flavon atau flavonol tersulih pada 3-O mempunyai 5-OH tetapi tanpa 4'-OH bebas	310-350	250-280			Flavon
			Beberapa 6- atau 8-OH flavon dan flavonol tersulih pada 3-O serta mengandung 5-OH	330-360	250-280	343	259	Flavonol (3-OH tersubstitusi)
			Isoflavon, dihidroflavon, biflavonil dan beberapa flavanon yang mengandung 5-OH					
B	Fluoresensi biru muda	Perubahan warna sedikit atau tanpa perubahan	Isoflavon yang tidak mengandung 5-OH	300-330	275-295	319	296	Flavanon dan dihidroflavonol
		Fluoresensi murup muda	Isoflavon yang tidak mengandung 5-OH					
C	Fluoresensi biru muda	Perubahan warna sedikit atau tanpa perubahan	Isoflavon yang tidak mengandung 5-OH	310-330	245-275	327	242	Isoflavon
		Fluoresensi murup muda	Isoflavon yang tidak mengandung 5-OH					
D	Lemba yung gelap	Perubahan warna sedikit atau tanpa perubahan	Flavon atau flavonol tersulih pada 3-O mempunyai 5-OH tetapi tanpa 4'-OH bebas	310-350	250-280	348		Flavon
			Beberapa 6- atau 8-OH flavon dan flavonol tersulih pada 3-O serta mengandung 5-OH	330-360	250-280		263	Flavonol (3-OH tersubstitusi)
			Isoflavon, dihidroflavon, biflavonil dan beberapa flavanon yang mengandung 5-OH					
			Khalkon yang mengandung 2- atau 4-OH bebas					



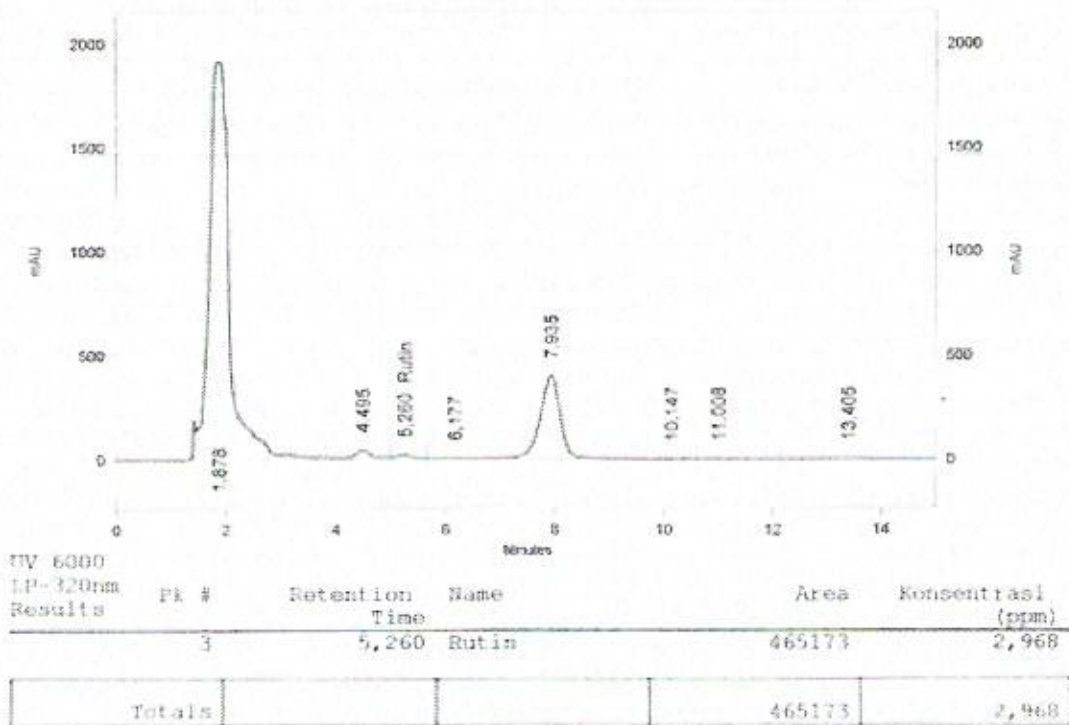
Gambar 4. Kromatogram HPLC standard rutin



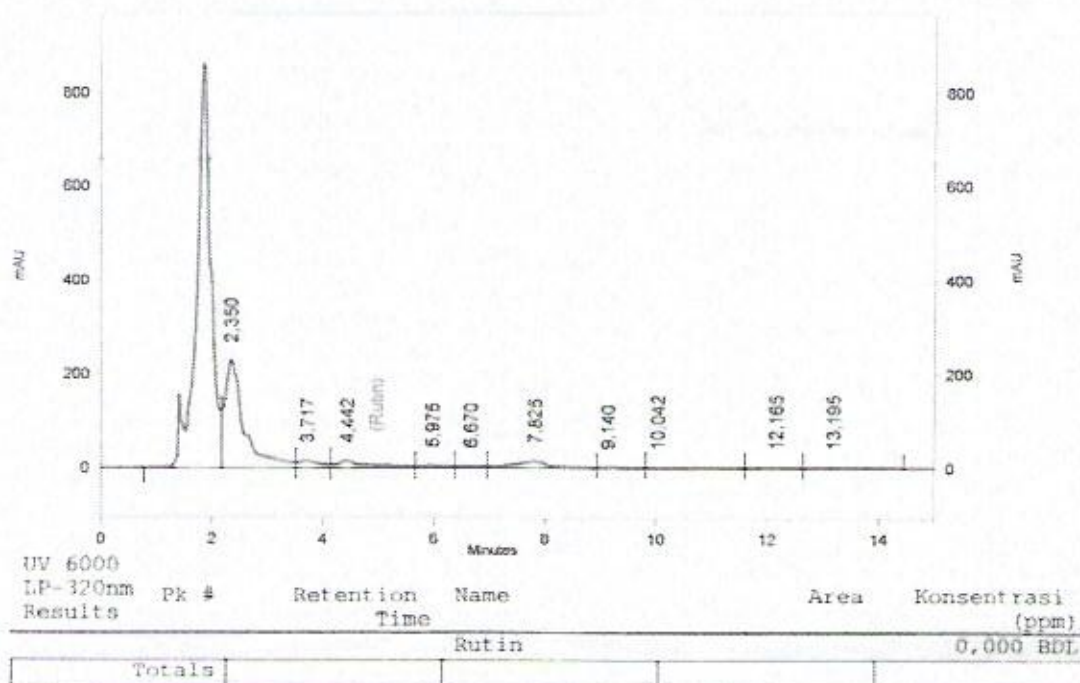
Gambar 5. Kromatogram HPLC isolat flavonoid A



Gambar 6. Kromatogram HPLC isolat flavonoid B



Gambar 7. Kromatogram HPLC isolat flavonoid C



Gambar 8. Kromatogram HPLC isolat flavonoid D

Dalam penelitian ini terbukti, bahwa semua isolat flavonoid yang telah dinyatakan kemurniannya secara KLT multi eluen ketika diuji dengan HPLC ternyata tidak satupun yang murni. Maka walaupun identifikasi flavonoid dapat dilakukan namun hasilnya masih meragukan. Oleh karena itu identifikasi pola hidroksilasi flavonoid harus dilakukan terhadap isolat yang telah benar-benar terbukti kemurniannya, sekurang-kurangnya setelah pengujian secara HPLC.

4. Kesimpulan dan Saran

4.1. Kesimpulan

Uji kemurnian dengan KLT multi eluen masih belum mencukupi untuk dapat memperoleh isolat flavonoid murni.

Uji menggunakan HPLC dapat lebih meyakinkan tingkat kemurnian isolat flavonoid hasil isolasi dengan KLT preparatif.

4.2. Saran

Isolasi dengan HPLC preparatif sebagai pilihan yang lebih baik untuk mendapatkan isolat flavonoid murni.

Kepustakaan

Anonim. 2005. Tanaman Obat Indonesia: *Semanggi Gunung*.

http://www.iptek.net.id/ind/pd_tanobat/view.php?id=57. Diakses pada 19 Juni 2007.

Asakawa, Y., Matsuda, R., dan Takemoto, T. 1982. *Mono- and sesquiterpenoids from Hydrocotyle and Centella species*.

http://www.sciencedirect.com/science?_ob=ArticleURL&_udi=B6TH7-42M84J1-3B&_user=10&_coverDate=12%2F31%2F1982&_rdoc=1&_fmt=&_orig=search&_sort=d&view=c&_acct=C000050221&_version=1&_urlVersion=0&_userid=10&md5=3572055564a7635846ef8a5219ec7afe. Diakses pada 7 Maret 2007.

Backer, C. A. and Bakhuizen Van den Brink Jr., R. C. 1965. *Flora of Java*, Vol. II. Netherlands: N.V.P. Noordhoff.

- Hostettmann, K., Hostettmann, M., and Marston, A. 1995. *Preparative Chromatography Techniques*, diterjemahkan oleh Kosasih Padmawinata. Bandung: Penerbit ITB.
- Janardhanan, M. and Thoppil, J. E. 2001. *Chemical composition of two species of Hydrocotyle*. <http://jagor.srce.hr/acphee/6702.html>. Diakses pada 9 Maret 2007.
- Markham, K. R. 1988. *Techniques of Flavonoid Identification*, diterjemahkan oleh Kosasih Padmawinata. Bandung: Penerbit ITB.
- Matsushita A, et al. 2004. *Hydrocotylosides I-VII, New Oleanane Saponins From Hydrocotyle sibthorpioides*. http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=pubmed&dopt=Abstract&list_uids=15043415. Diakses pada 7 Maret 2007.
- Riyanto, S. 1990. *Flavonoid*. Dalam: Mursyidi, A. Analisis Metabolit Sekunder,. Yogyakarta: Pusat Antar Universitas Bioteknologi, Universitas Gadjah Mada. 171-191.
- Robinson, T. 1995. *The Organic Constituents of Higher Plants*, diterjemahkan oleh Kosasih Padmawinata, edisi VI. Bandung: Institut Tehnologi Bandung.
- Shigematsu, N., Kouno, I., and Kawano, N. 1981. *Quercetin 3-(6"-caffeoylgalactoside) from Hydrocotyle sibthorpioides*, http://www.sciencedirect.com/science?_ob=ArticleURL&_udi=B6TH7-42M84FJ-17M&_user=10&_coverDate=12%2F31%2F1982&_rdoc=1&_fmt=summary&_orig=browse&_sort=d&_view=c&_acct=C000050221&_version=1&_urlVersion=0&_userid=10&md5=4f865a7e8b7b368b4db93909e464ad7d. Diakses pada 7 Maret 2007.
- Venkataraman. 1962. *Method for Determining the Structure of Flavonoid Compound* in: Geissman, T.A. The Chemistry of Flavonoid Compound. 70.

YOHANES DWIATMAKA

Yohanes Dwiatmaka, menyelesaikan pendidikan jenjang S1 pada Fakultas Biologi tahun 1994 di Universitas Gadjah Mada, pendidikan S2 diselesaikan tahun 2001 di Fakultas Farmasi pada universitas yang sama. Sejak tahun 1995 bergabung sebagai staff pengajar pada Fakultas Farmasi Universitas Sanata Dharma. Minat penelitian di bidang Farmakognosi-Fitokimia dan Obat Tradisional, dengan penelitian unggulan mengenai uji bioaktivitas fraksi kulit batang pule dan identifikasi flavonoid pada herba pegagan embun.