

## ISOLATION AND IDENTIFICATION FLAVONOID COMPOUND FROM THE STEM BARK OF *Saccopetalum horsfieldii* BENN

### *Isolasi dan Identifikasi Senyawa Flavonoid dari Kulit Batang Tumbuhan *Saccopetalum horsfieldii* Benn*

Mahmiah\*

Laboratory of Chemistry, Hang Tuah University, Jl. Arif Rahman Hakim 150 Surabaya

Received 27 July 2006; Accepted 12 August 2006

#### ABSTRACT

*Isolation and identification flavonoid compound from the stem bark of Indonesian plant *Saccopetalum horsfieldii* Benn. Annonaceae family have been done. Extraction was carried out by maseration method using methanol at room temperature, the product was then extracted by n-hexane and etil acetate. Etil acetate extract separation carried out by liquid vacuum column chromatography and flash column chromatography. The product purified by recrystalization using acetone p.a. into yellow solid that having melting point of 224-226 °C. The structure of flavonoid compound was determinated by spectroscopy method : UV-vis, IR, <sup>1</sup>H-NMR and <sup>12</sup>C-NMR. The flavonoid compound known as quercetin-3,7-dimetil eter or 3,7-dimetoksi quercetin.*

**Keywords:** *Saccopetalum horsfieldii* Benn, flavonoid, chromatography, quercetin.

#### PENDAHULUAN

Alam tropis Indonesia dengan kekayaan sumber daya hayati yang beraneka ragam merupakan gudang bahan kimia alami yang tidak ternilai harganya. Di Indonesia bahan kimia alami ini dihasilkan oleh 99 % tumbuhan tropis. Tumbuhan tropis merupakan kelompok tumbuhan terbesar di muka bumi dan hidup di bawah kondisi lingkungan yang keras baik faktor iklim maupun gangguan dari herbivora, serangga dan hama penyakit. Oleh karena itu tumbuhan tropis mampu merekayasa beranekaragam senyawa kimia yang mempunyai berbagai bioaktivitas yang menarik dan kemampuan ini dapat pula diartikan sebagai mekanisme pertahanan diri terhadap ancaman lingkungan. Dalam hal ini, tumbuh-tumbuhan dapat menghasilkan senyawa kimia alami yang bersifat insektisida, antifungal atau sitotoksik.

Senyawa kimia alami yang terkandung dalam tumbuhan berupa senyawa metabolit primer dan sekunder yang diperoleh melalui proses metabolisme. Senyawa metabolit primer meliputi polisakarida, protein, lemak dan asam nukleat, sedangkan senyawa metabolit sekunder terdiri dari alkaloid, terpenoid, piron, asetogenin, lignan, flavonoid dan poliketida. Keberadaan senyawa metabolit sekunder sangat tergantung pada jenis tumbuhan [1].

Annonaceae merupakan salah satu famili tumbuhan terbesar yang tersebar di daerah tropis dan subtropis dengan Asia dan Australia sebagai pusat utama penyebarannya. Famili ini memiliki 130 genus dan 2000 spesies. Indonesia memiliki lebih dari 20 genus dengan lebih dari 40 spesies Annonaceae [2]. Dari segi ekonomi, famili ini termasuk tumbuhan yang penting sebagai sumber buah-buahan yang dapat dimakan. Selain itu famili ini menunjukkan aktivitas

insektisida, antitumor dan antifungal berdasar penelitian beberapa spesies dari genus *Annona*, *Polyalthia*, *Uvaria* dan *Xylopia* [3]. Genus lain dari famili Annonaceae masih banyak yang belum diketahui kandungan kimianya salah satunya adalah genus *Saccopetalum*. Sebuah literatur menyatakan bahwa senyawa yang dapat diisolasi dari tumbuhan ini adalah alkaloid dan minyak atsiri. Minyak atsiri diperoleh dari *Saccopetalum tomentosum* [4].

Satu-satunya spesies dari genus *Saccopetalum* yang tumbuh di Indonesia adalah *Saccopetalum horsfieldii* BENN. Senyawa kimia yang terkandung dalam tumbuhan ini belum banyak dilaporkan. Penelitian lain menunjukkan bahwa dari ekstrak diklorometana kulit batang tumbuhan *S. horsfieldii* berhasil diisolasi senyawa lignan yaitu 2-hidroksi-1,4-difenil-but-3-en-1-on [5], senyawa flavonoid yaitu chamuvaretin [6], 2-(3',4'-dihidroksi-2'-metoksifenil)-5,7-dihidroksi-6-metoksi-kromen-4-on [7] dan 5-hidroksi-6,7,3',4'-tetrametoksi flavonon [8]. Diduga masih banyak lagi senyawa flavonoid lain yang terkandung dalam ekstrak etil asetat kulit batang tumbuhan *S. horsfieldii*.

Berdasarkan hasil-hasil penelitian terdahulu tersebut, maka perlu dilakukan penelitian lebih lanjut guna mengetahui senyawa flavonoid lain yang terkandung dalam kulit batang tumbuhan *S. horsfieldii*. Proses ekstraksi menggunakan pelarut semi polar etil asetat. Penentuan struktur dan identifikasi senyawa flavonoid hasil isolasi dilakukan dengan menggunakan metode spektroskopi yang meliputi ultraviolet, inframerah dan resonansi magnetik inti.

Dari hasil penelitian ini akan didapatkan informasi ilmiah mengenai golongan dan struktur dari senyawa flavonoid hasil isolasi yang terkandung dalam

\* Corresponding author.  
Email address : qmia\_05@yahoo.co.id

kulit batang tumbuhan *S. horsfieldii*, yang berguna untuk pengembangan ilmu kimia bahan alam dan memberikan peluang dilakukannya penelitian lanjut yaitu untuk mengetahui bioaktivitas dari senyawa flavonoid hasil isolasi.

## METODE PENELITIAN

### Bahan

Bahan tumbuhan yang digunakan dalam penelitian adalah kulit batang *S. horsfieldii*. Bahan tumbuhan ini diperoleh dari Kebun Raya Purwodadi, Pasuruan, Jawa Timur. Sebelum diberi perlakuan, kulit batang *S. horsfieldii* dikeringkan, dipotong-potong, kemudian dihaluskan dengan mesin giling hingga diperoleh serbuk.

Bahan kimia yang digunakan untuk keperluan ekstraksi adalah yang berkualitas teknis dan telah didestilasi, sedangkan untuk keperluan analisis dan pemurnian digunakan bahan yang berkualitas pro analisis (p.a.). Bahan-bahan yang digunakan dalam penelitian ini adalah NaOH, NaOAc,  $\text{AlCl}_3$  5%,  $\text{H}_3\text{BO}_3$ , metanol, etil asetat, *n*-heksana, kloroform, diklorometana, aseton, magnesium sulfat anhidrat, asam sitrat, pelat silika gel GF<sub>254</sub>, silika Gel G<sub>60</sub>, pereaksi  $\text{CeSO}_4$  dan  $\text{H}_2\text{SO}_4$  pekat.

### Alat

Alat-alat yang digunakan dalam penelitian ini adalah mesin giling, seperangkat alat kromatografi kolom vacum cair, seperangkat alat destilasi, alat kromatografi kolom tekan, *rotary vacuum evaporator*, bejana kromatografi lapis tipis, dan alat-alat gelas yang biasa digunakan di laboratorium.

Untuk keperluan identifikasi diperlukan *Fisher Johns melting point apparatus*, Spektrofotometer UV-Vis Beckman DU 7500, Spektrofotometer FTIR 5300, <sup>1</sup>H-RMI Brucker AM 300 dan <sup>13</sup>C-RMI Brucker AM 300.

### Prosedur Kerja

#### Isolasi dan Pemurnian Senyawa

Serbuk kulit batang *S. horsfieldii* sebanyak 5 kg dimaserasi menggunakan pelarut metanol selama 5 hari pada suhu kamar, dan ekstraksi diulangi dengan pelarut yang sama agar senyawa organik dapat terekstrak semua. Metanol digunakan karena merupakan pelarut universal yang dapat melarutkan semua senyawa organik. Ekstrak metanol disaring dan diuapkan dengan *rotary vacuum evaporator* sehingga diperoleh ekstrak kental. Kemudian diekstraksi dengan *n*-heksana tiga kali untuk menghilangkan lemak dan senyawa non polar lainnya. Ke dalam residu *n*-heksana, selanjutnya ditambahkan asam sitrat 5% (pH 3-4) untuk mendapatkan senyawa alkaloid sebagai garamnya yang larut dalam fasa asam dan tidak larut dalam fasa organik. Ekstraksi dilanjutkan menggunakan etil asetat sebanyak tiga kali untuk mendapatkan senyawa flavonoid dan semi polar lainnya. Ekstrak etil asetat yang

diperoleh, dicuci dengan air untuk menghilangkan fasa asam yang ikut dalam fasa organik. Ekstrak yang bebas asam kemudian dikeringkan dengan magnesium sulfat anhidrat selama 24 jam dan diuapkan dengan *rotary vacuum evaporator* sehingga diperoleh ekstrak kental berwarna coklat sebanyak 28,47 g.

Jumlah komponen senyawa kimia yang terdapat dalam fraksi etil asetat ditentukan dengan kromatografi lapis tipis dengan berbagai macam eluen. Eluen yang menghasilkan komponen terbanyak serta memberikan jarak antar noda yang baik menunjukkan pemisahan terbaik. Dari hasil kromatografi lapis tipis didapatkan eluen terbaik untuk pemisahan komponen senyawa kimia pada fraksi etil asetat yaitu diklorometana:etil asetat (97,5:2,5). Untuk penampak noda dalam hal ini digunakan lampu UV dan pereaksi  $\text{CeSO}_4$ .

Proses selanjutnya, 28,47 g ekstrak etil asetat dilakukan pemisahan dengan kromatografi kolom vakum cair. Ekstrak kental tersebut dilarutkan dengan pelarut etil asetat, kemudian diserapkan pada silika gel G<sub>60</sub> 7733 sebanyak 45 g. Silika gel yang mengandung senyawa tersebut dimasukkan ke dalam kolom yang telah terisi silika gel GF<sub>254</sub> 7730 setinggi 6,5 cm. Elusi dilakukan dengan menggunakan pelarut yang sesuai dan ditingkatkan gradien kepolarannya. Dari proses pemisahan akan diperoleh 22 fraksi dan masing-masing fraksi yang ditampung dilakukan uji KLT menggunakan eluen terbaik. Fraksi A (1-9), B (10-16) dan C (17-22) menghasilkan noda dengan harga  $R_f$  sama digabung. Selanjutnya, pelarut diuapkan menggunakan *rotary vacuum evaporator*.

Fraksi kental hasil gabungan sebanyak 2,87 g tersebut kemudian dipisahkan dengan kromatografi kolom tekan I menggunakan silika gel G<sub>60</sub> 7734 dengan eluen diklorometana:etil asetat (8:2). Dari proses ini dihasilkan 43 fraksi dan fraksi D (1-22) dan E (23-43) mempunyai noda dengan harga  $R_f$  sama digabung menjadi satu. Fraksi E tersebut kemudian diuapkan dan dilakukan pemisahan lebih lanjut.

Pemisahan selanjutnya adalah kromatografi kolom tekan II dengan menggunakan eluen diklorometana: metanol (9,75:0,25). Kromatografi kolom tekan II ini menghasilkan 19 fraksi dan fraksi-fraksi yang mempunyai noda dengan harga  $R_f$  sama digabung menjadi satu yaitu fraksi F (1-5) dan G (6-60). Mengingat masih belum menghasilkan satu noda maka dilakukan pemisahan kembali. Kromatografi kolom tekan III dilakukan menggunakan eluen kloroform 100 % dan dihasilkan 60 fraksi yaitu fraksi H (1-5) dan I (6-60). Setiap fraksi yang dilakukan KLT dan fraksi I (6-60) yang mempunyai satu noda digabung dan selanjutnya dimurnikan melalui proses rekristalisasi. Kemudian dilanjutkan dengan uji KLT dengan tiga macam eluen, uji titik leleh dan analisis spektroskopi.

#### Uji sifat fisika senyawa hasil isolasi

Senyawa hasil isolasi ditentukan titik lelehnya

menggunakan *melting points Fisher Johns apparatus* dengan mengamati saat senyawa mulai meleleh sampai meleleh secara keseluruhan.

#### Analisis spektroskopi senyawa hasil isolasi

Terhadap senyawa dilakukan analisis spektroskopi ultra violet-tampak, spektroskopi infra merah dan spektroskopi resonansi magnetik inti. Analisis spektroskopi UV- tampak dilakukan terhadap dengan perlakuan terhadap senyawa hasil isolasi sebanyak 0,1 mg yang dilarutkan dalam metanol sampai volumenya 10 mL, kemudian diukur panjang gelombang maksimum ( $\lambda_{maks}$ ). Efek batokromik diamati dengan penambahan pereaksi  $AlCl_3$  5%, NaOH, NaOAc, dan  $H_3BO_3$  [9]. Untuk analisis spektroskopi IR dilakukan terhadap senyawa hasil isolasi sebanyak 1 mg yang dicampur dengan 10-100 mg kalium bromida dalam kondisi tanpa air. Bahan dibuat pellet dengan menggunakan cetakan. Pellet KBr tersebut diukur serapannya pada bilangan gelombang 4000-667  $cm^{-1}$  [1]. Pada umumnya untuk analisis proton dan karbon, senyawa hasil isolasi dilarutkan dalam DMSO- $d_6$ , atau  $CDCl_3$ . Analisis proton RMI diukur pada pergeseran 0-14 ppm, sedangkan karbon RMI pada pergeseran 0-200 ppm [9].

## HASIL DAN PEMBAHASAN

### Hasil Ekstraksi dan Isolasi Senyawa

Isolasi senyawa flavonoid tumbuhan *S. horsfieldii* Benn diawali dengan maserasi kulit batang yang berbentuk serbuk menggunakan pelarut metanol selama 5 hari pada suhu kamar. Setelah pelarut diuapkan dengan *rotary vacuum evaporator* diperoleh ekstrak kental kemudian diekstraksi dengan n-heksana tiga kali. Ke dalam residu n-heksana selanjutnya ditambahkan asam sitrat 5% (pH 3-4) untuk mendapatkan senyawa alkaloid sebagai garam yang larut dalam fasa asam dan tidak larut dalam pelarut organik. Ekstraksi dilanjutkan menggunakan etil asetat sebanyak tiga kali untuk mendapatkan senyawa flavonoid. Ekstrak etil asetat yang diperoleh, dicuci dengan air dan selanjutnya dikeringkan dengan  $MgSO_4$  anhidrat yang telah diaktifkan, kemudian dievaporasi sehingga diperoleh ekstrak kental berwarna coklat sebanyak 28,47 g.

Jumlah komponen senyawa kimia yang terkandung dalam ekstrak etil asetat ditentukan dengan uji KLT menggunakan eluen dengan berbagai macam perbandingan. Pemilihan eluen ini berdasarkan hasil pemisahan noda yang lebih baik dan lebih banyak daripada yang lain. Eluen terbaik yang diperoleh adalah campuran diklorometana – etil asetat dengan perbandingan 9,75 : 0,25 yang selanjutnya digunakan sebagai acuan dalam proses pemisahan selanjutnya.

Ekstrak kental sebanyak 28,47 g yang telah dilarutkan dalam etil asetat dipisahkan senyawanya menggunakan kromatografi kolom vakum cair. Eluen

yang digunakan adalah n-heksana – aseton dengan berbagai perbandingan berdasarkan kenaikan gradien kepolaran. Dari proses pemisahan ini diperoleh 25 fraksi. Fraksi-fraksi yang dihasilkan diuji dengan KLT menggunakan eluen terbaik diklorometana – etil asetat dengan perbandingan 9,75 : 0,25. Berdasarkan hasil KLT tersebut diketahui bahwa fraksi A (1-9), B (10-16) dan C (17-22) mempunyai harga  $R_f$  sama digabung, kemudian fraksi C dievaporasi sehingga didapatkan fraksi kental sebanyak 2,8702 g. Fraksi C selanjutnya dijadikan target pemisahan dengan kromatografi kolom tekan untuk mengisolasi senyawa yang terdapat dalam fraksi C tersebut.

Fraksi C sebanyak 2,8702 g dipisahkan lebih lanjut dengan kromatografi kolom tekan I menggunakan eluen diklorometana–etil asetat (8:2). Pada proses ini dihasilkan 43 fraksi. Setiap fraksi diuji KLT menggunakan eluen campuran diklorometana – etil asetat (9:1). Hasil KLT menunjukkan fraksi D (1-22) dan E (23-43) mempunyai harga  $R_f$  sama.

Dua puluh fraksi E tersebut dievaporasi sehingga didapatkan fraksi kental E sebanyak 0,2458 g. Pada fraksi E selanjutnya dilakukan kromatografi kolom tekan II menggunakan eluen diklorometana – methanol (9,75:0,25). Proses ini menghasilkan 19 fraksi dan dilakukan uji KLT dengan eluen yang sama. Dari hasil KLT diketahui bahwa fraksi F (1-5) dan G (6-19) mempunyai harga  $R_f$  sama.

Mengingat pada fraksi G masih belum menunjukkan senyawa murni maka dilakukan kromatografi kolom tekan III menggunakan eluen kloroform p.a. Pada proses ini dihasilkan 60 fraksi. Masing-masing fraksi diuji KLT dengan eluen diklorometana–metanol (9,75:0,25). Hasil uji KLT dapat dilihat pada Tabel 1.

Senyawa dalam fraksi I (6-60) terlihat sebagai komponen mayoritas dan sudah hampir murni, hal ini dapat dilihat dari hasil KLT yang menunjukkan satu noda dengan harga  $R_f$  0,075. Senyawa dalam fraksi I sebanyak 0,0251 g ini kemudian direkristalisasi menggunakan aseton p.a. dingin. Hasil rekristalisasi berupa padatan kuning muda sebanyak 0,0238 g.

**Tabel 1.** Uji KLT kromatografi kolom tekan III

No. Fraksi	Jumlah noda	Harga $R_f$
H (1-5)	2 noda	0,075 ; 0,125
I (6-60)	1 noda	0,075

**Tabel 2.** Uji KLT isolat murni

No	Eluen	Jumlah noda	Warna $CeSO_4$	Harga $R_f$
1.	Diklorometana : Etil	1	Kuning	0,125
2.	Asetat ( 8:2 )	1	Kuning	0,075
3.	Diklorometana : Metanol (9,75:0,25) kloroform (100 %)	1	Kuning	0,060

### Hasil Identifikasi Senyawa Hasil Isolasi

Kemurnian senyawa hasil isolasi diuji menggunakan KLT dengan tiga macam eluen yang berbeda. Hasil KLT dapat dilihat pada Tabel 2.

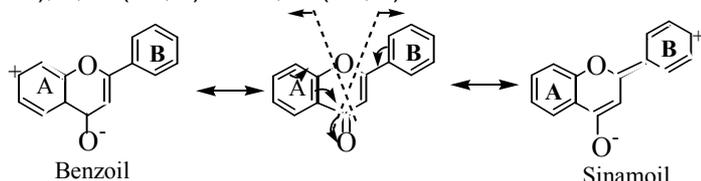
Dari hasil uji KLT tersebut menunjukkan bahwa senyawa yang diperoleh merupakan senyawa tunggal dan mempunyai kemurnian yang tinggi. Hal ini ditunjukkan dengan adanya satu noda pada hasil KLT dengan tiga macam eluen yang berbeda.

Sedikit senyawa hasil isolasi berupa padatan berwarna kuning muda ditentukan titik lelehnya dengan alat *Fisher John Melting Point*. Titik leleh senyawa tersebut adalah 224–226 °C.

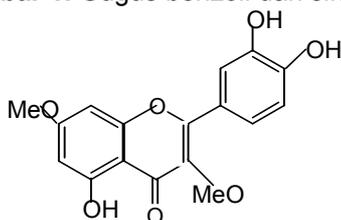
Hasil analisis dengan spektrofotometer UV-Vis menunjukkan pada pergeseran  $\lambda_{maks}$  257 nm dan 349 nm adanya gugus benzoil dan sinamoil sebagai ciri khas senyawa flavonoid. Penambahan  $AlCl_3$  menunjukkan adanya pergeseran  $\lambda_{maks}$  272 nm dan 407 nm sehingga membuktikan adanya OH pada atom  $C_5$ . Untuk OH bebas pada  $C_7$  diketahui dari penambahan pereaksi geser NaOAc yang menyebabkan panjang gelombang bergeser yaitu 260 nm dan 382 nm (Gambar 1).

Analisis spektroskopi infra merah dengan pellet KBr memberikan informasi bahwa senyawa flavonoid mempunyai gugus fungsi antara lain hidroksi, karbonil, eter, alkena dan cincin aromatis. Pita serapan pada bilangan gelombang 3204,05  $cm^{-1}$  merupakan vibrasi ulur OH aromatis. Pita serapan 2924,35  $cm^{-1}$  merupakan vibrasi ulur C-H aromatis, sedangkan gugus keton terkonjugasi ditunjukkan pada pita serapan 1662,79  $cm^{-1}$ . Pada pita serapan 1595,27  $cm^{-1}$  menunjukkan adanya ikatan rangkap cincin aromatis dan pita serapan dengan bilangan gelombang 823,68  $cm^{-1}$  menunjukkan adanya aromatis. Gugus C-O-C ditunjukkan pada bilangan gelombang 1311,03  $cm^{-1}$  [11].

Analisis spektroskopi  $^1H$ -RMI memberikan pergeseran kimia pada signal (ppm) : 12,67; 7,58 (d,  $J=2,2$  Hz); 7,48 dan 7,46 (1H, dd,  $J=2,2$  & 6,10 Hz); 6,91 (1H, d,  $J=8,30$  Hz); 6,68 (1H,  $J=2,2$  Hz); 6,35 (1H,  $J=2,2$  Hz); 3,86 (3H, s) dan 3,80 (3H, s).



Gambar 1. Gugus benzoil dan sinamoil



Gambar 2. Kuersetin 3,7-dimetil eter

Analisis spektroskopi  $^{13}C$ -RMI memberikan pergeseran kimia pada signal (ppm): 55,875; 59,488; 92,008; 97,485; 104,976; 115,362; 115,502; 120,403; 120,502; 137,652; 144,994; 148,558; 155,702; 155,991; 160,693; 164,818; 177,712.

Dari analisis spektroskopi UV, IR dan RMI menunjukkan bahwa senyawa flavonoid hasil isolasi adalah 3,7-dimetoksi kuersetin atau kuersetin 3,7-dimetil eter. Struktur senyawa ditunjukkan pada Gambar 2.

### KESIMPULAN

Berdasarkan hasil penelitian terhadap ekstrak etil asetat kulit batang tumbuhan *S. horsfieldii* diperoleh senyawa hasil isolasi golongan flavonoid berbentuk padatan kuning dengan titik leleh sebesar 224–226°C yang dikenal dengan Kuarsetin 3,7-dimetil eter atau 3,7-dimetoksi kuarsetin.

### DAFTAR PUSTAKA

- Harborne, J.B, 1987, *Metode Fitokimia, Penuntun Cara Modern Menganalisis Tumbuhan* (diterjemahkan oleh K. Panduwinata dan Soediro, I.), terbitan ke-2, Penerbit ITB, Bandung.
- Heyne, K, 1987, *Tumbuhan Berguna Indonesia* (diterjemahkan oleh Badan Litbang Kehutanan), Jilid III, Edisi ke-2, Penerbit Yayasan Wanajaya, Jakarta.
- Hakim, E.H., Achmad, S.A., Makmur, L., Mujahidin, D., and Syah, Y.M., 2001, *Bull. Indo. Soc. Nat. Prod. Chem.*, 1, 1-10.
- Hegnauer, R., 1969, *Chemotaxonomie der Pflanzen III*, 116-123.
- Utomo, P., 2002, *Isolasi dan Identifikasi Senyawa Lignan dari kulit Batang Tanaman Saccopetalum horsfieldii BENN*, Skripsi, Jurusan Kimia, FMIPA, UNAIR, Surabaya.
- Fatatik, R., 2002, *Isolasi dan Identifikasi Senyawa Fenolik dari kulit Batang Tanaman Saccopetalum horsfieldii BENN*, Skripsi, Jurusan Kimia, FMIPA, UNAIR, Surabaya.
- Wibowo, A., 2002, *Isolasi dan Identifikasi Senyawa Flavonoid dari kulit Batang Saccopetalum horsfieldii BENN*, Skripsi, Jurusan Kimia, FMIPA, UNAIR, Surabaya.
- Markham, K.R., 1998, *Cara Mengidentifikasi Flavonoid*, Penerbit ITB, Bandung.
- Masruroh, and Siti, M.R., 2003, *Isolasi dan Identifikasi Senyawa Flavonoid Fraksi Diklorometana dari Kulit Batang Saccopetalum horsfieldii Benn.*, Skripsi, Jurusan Kimia, FMIPA, Universitas Airlangga, Surabaya.
- Silverstein, R.M, Bassler, G.c, and Morril, T.C, 1991, *Spectrometric Identification of Organic Compound*, Fifth Edition, John Wiley, Inc, Toronto.