

Identifikasi Senyawa Flavonoid pada Ekstrak Etanol - Air Daun Sirih Merah (*Piper Crocatum*) dengan Uji Fitokimia Dan GC - MS

I Dewa Gede Abi Darma, Frieda Nurlita, I Wayan Muderawan

Jurusan Pendidikan Kimia, Universitas Pendidikan Ganesha, Singaraja

Email: abidarma99@gmail.com

Abstrak

Penelitian ini bertujuan untuk menentukan jenis flavonoid yang ada pada ekstrak etanol - air daun sirih merah (*Piper crocatum*) dengan uji fitokimia, KLT, UV-Vis, dan GC - MS. Ekstrak diperoleh dari maserasi sampel daun sirih merah selama 3 hari dengan pelarut etanol 96% kemudian dipartisi dengan pelarut etanol :air dan pelarut heksana. Uji fitokimia terhadap ekstrak dilakukan dengan tes Willstätter dan uji dengan NaOH 10% menunjukkan positif flavonoid jenis flavon. KLT terhadap ekstrak dilakukan dengan fase diam silika gel dan fase gerak BAA : Forestal, diperoleh bercak dengan $R_f = 0,8125$ positif flavonoid jenis flavon, flavonon, dan flavonol. Spektrum UV dari ekstrak daun sirih merah ditentukan dengan spektrofotometer UV-Vis pada panjang gelombang 240 nm - 550 nm dengan pelarut etanol memberikan spektrum pada rentangan flavonoid jenis flavon terdapat dua puncak yaitu pita I (323,5 nm) dan pita II (264,5 nm). Penentuan senyawa flavonoid dalam ekstrak daun sirih merah dilakukan dengan GC-MS, memberikan kromatogram *peak* dengan waktu retensi 27,18; 28,15 dan 28,66 diduga merupakan senyawa golongan flavonoid jenis flavon. Berdasarkan hasil penelitian menunjukkan jenis flavonoid yang ada pada ekstrak etanol - air daun sirih merah (*Piper crocatum*) yaitu flavon, flavonon, dan flavonol.

Kata kunci: daun sirih merah, flavonoid, GC-MS

Abstract

This study aims was to determine the type of flavonoid exist in the ethanol - water extract of red betel leaf (*Piper crocatum*) by phytochemical test, TLC, UV-Vis, and GC - MS. Extract was obtained from maceration of red betel leaf samples for 3 days with 96% ethanol and then it was partitioned with ethanol - water and hexane. Phytochemical test against the extract conducted with Willstätter test and test with NaOH 10% showed positive flavonoid types of flavones. TLC to extract conducted with the stationary phase of silica gel and the mobile phase is BAA: Forestal, gave spots with $R_f = 0.8125$ positive flavonoid types of flavones, flavonon, and flavonols. UV spectra of red betel leaf extract was determined by UV-Vis spectrophotometer at a wavelength of 240 nm - 550 nm with ethanol and gave the spectrum in the range of flavonoid of flavones types there are two peaks obtained, namely band I (323.5 nm) and band II (264.5 nm). Determination of flavonoid in red betel leaf extract conducted by GC-MS, providing chromatogram peak with a retention time of 27.18; 28.15 and 28.66 suspected to be flavonoid with the kind of flavones. Based on the results of this study, it was concluded that the types flavonoids contained in extracts of red betel leaf (*Piper crotatum*) the possibility are flavones, flavonols, and flavonol.

Keywords: red betel leaves, flavonoids, GC-MS

1. Pendahuluan

Indonesia sebagai negara tropis memiliki beraneka tanaman yang dapat dimanfaatkan untuk kepentingan manusia. Penggunaan bahan alam kembali digunakan oleh masyarakat dalam pelaksanaannya membiasakan hidup dengan menghindari bahan-bahan kimia sintesis dan lebih mengutamakan bahan-bahan alami. Bahan-bahan alami yang semakin diminati masyarakat Indonesia hingga kini sudah dimanfaatkan untuk pengobatan tradisional².

Obat tradisional dalam kimia bahan alam mengandung senyawa-senyawa yang dikenal dengan metabolit sekunder. Metabolit sekunder merupakan senyawa kimia yang terbentuk dalam tanaman yang umumnya mempunyai kemampuan bioaktifitas dan berfungsi sebagai pelindung tanaman. Senyawa-senyawa yang tergolong ke dalam kelompok metabolit sekunder ini, antara lain: alkaloid, flavonoid, steroid, terpenoid, saponin dan lain-lain¹.

Flavonoid merupakan senyawa fenol yang terdiri atas dua cincin karbon yang membentuk

susunan C6-C3-C6, yaitu dua cincin aromatik yang dihubungkan oleh satuan tiga karbon yang dapat atau tidak dapat membentuk cincin ketiga. Flavonoid dimiliki oleh sebagian besar tumbuhan hijau dan biasanya terkonsentrasi pada biji, buah, kulit buah, kulit kayu, daun, dan bunga⁴.

Penyebaran jenis flavonoid pada golongan tanaman yang terbesar, yaitu golongan *Angiospermae*. Potensi yang besar terhadap kandungan senyawa flavonoid tersebut membuka peluang baru dalam penelitian. Spesies-spesies tanaman yang tergabung dalam *Angiospermae* merupakan sumber penelitian yang penting dalam rangka mencari alternatif senyawa metabolit sekunder yang mempunyai potensi bioaktivitas yang tinggi³. Salah satu upaya mengoptimalkan pemanfaatan bahan alam dari salah satu spesies *Angiospermae* yaitu daun sirih merah (*Piper crocatum*) perlu dilakukan penelitian lebih mendalam tentang golongan senyawa flavonoid dengan pelarut etanol - air.

Flavonoid memiliki sejumlah gugus hidroksil yang disubstitusi oleh suatu gula sehingga flavonoid merupakan senyawa polar yang umumnya larut dalam pelarut polar seperti etanol (EtOH), metanol (MeOH), butanol (BuOH), aseton, dimetilsulfoksida (DMSO), dimetilformamida (DMF), dan air. Adanya gula yang terikat pada flavonoid dalam bentuk umum yang ditemukan cenderung menyebabkan flavonoid lebih mudah larut dalam air dan dengan demikian campuran pelarut diatas dengan air merupakan pelarut yang baik untuk glikosida³. Sehingga dalam penelitian ini, pelarut terpilih adalah etanol - air, ekstraksi etanol - air dari daun sirih merah dapat memfraksinasi kandungan senyawa sirih merah sesuai kepolarannya.

Penelitian yang dilakukan ini memiliki tujuan untuk menentukan jenis flavonoid yang ada pada ekstrak etanol - air daun sirih merah (*Piper crocatum*) dengan uji fitokimia dan GC - MS.

2. Metode yang Diterapkan

2.1 Penyiapan Bahan

Alat yang digunakan dalam penelitian ini, yaitu neraca analitik, corong, corong pisah, batang pengaduk, tabung reaksi, gelas kimia, labu ukur, evaporator (Rotavapor R-210), Pompa evaporator (Vacuum Pump V-700), Merek BUCHI Labortechnik AG, Chromato Vue C-70G UV Viewing System, Merek UVP, inc, UV-Visible Spectrophotometer, Merek Shimadzu, dan Kromatografi Gas - Spektrometer Massa (GC-MS) , merek Agilent Technologies

Bahan daun sirih merah (*Piper crocatum*) yang diperoleh di Banjar Sangging, Desa Kamasan, Kecamatan Klungkung, Kabupaten Semarapura dicuci bersih dengan air mengalir. Tahap selanjutnya daun sirih merah dikeringkan sampai daun mengering. Selanjutnya sampel diblender sehingga diperoleh bubuk sampel kering.

2.2 Maserasi

Sebanyak 50 gram sampel dimaserasi selama 24 jam dengan pelarut etanol 96% (250 mL). Selanjutnya ekstrak disaring, filtratnya ditampung sedangkan ampasnya dimaserasi kembali dengan pelarut etanol 96% (2x250 mL). Maserasi dilakukan sampai filtrat terlihat perubahan warna. Kemudian ekstrak hasil maserasi disaring dengan kapas dan kertas saring. Filtrat yang diperoleh hasil maserasi digabung dan dievaporasi dengan penguap putar (suhu 50°C) sehingga diperoleh ekstrak kental.

2.3 Partisi

Ekstrak kasar hasil evaporasi kemudian dipartisi dengan n-heksana (50 mL). sebelum dipartisi pada corong pisah ditambahkan 100 mL etanol - air (1:1), kemudian ditambahkan dengan heksana 50 mL, setelah itu dikocok 5 menit lalu didiamkan sehingga terbentuk 2 fase. Fase etanol - air dan heksana ditampung, kemudian diuapkan dalam *rotary evaporator* hingga pelarutnya menguap.

2.4 Uji Fitokimia

Uji fitokimia dapat dilakukan dengan pereaksi Willstatter dan NaOH 10%. Pemeriksaan adanya flavonoid dengan pereaksi Willstatter dapat dilakukan dengan mereaksikan beberapa mL sampel ditambahkan beberapa tetes HCl pekat dan 2 potong logam Mg.

Pemeriksaan adanya flavonoid secara kualitatif dapat dilakukan dengan pereaksi NaOH 10%. Sampel sebanyak 2 mL ditambahkan dengan 2-4 tetes NaOH 10%. Reaksi positif pada pereaksi Willstatter dan NaOH 10% akan terjadi perubahan warna.

2.5 Kromatografi Lapis Tipis

Senyawa flavonoid yang terdapat pada ekstrak etanol - air diperiksa secara kromatografi lapis tipis dengan menggunakan absorbent silika-gel GF 254, eluen BAA (n-butanol : asam asetat glasial : air = 4 : 1 : 5) dan forestal (HCL pekat : asam asetat glasial : air = 3 : 30 : 10). Jarak elusi 8 cm dan sebagai penampang noda digunakan lampu UV 366 nm dan uap amonia, dengan jalan meletakkan kertas

kromatogram yang telah dielusi diatas botol yang berisi amoniak cair.

2.6 Spektrofotometer UV-Vis

Senyawa flavonoid hasil kromatografi kertas, diidentifikasi dengan spektrofotometer UV-Vis untuk mengetahui serapan gelombang maksimum senyawa flavonoid yang terkandung di dalam sampel dengan pengukuran spektrum flavonoid. Sebanyak 2 – 3 ml larutan sampel diukur spektrumnya dan ditentukan panjang gelombang maksimumnya.

2.7 Kromatografi Gas-Spektroskopi Massa

Persiapan sampel dengan membuat senyawa turunan dari flavonoid, yaitu sampel (400 µL) dipindahkan ke botol, 100 µL bis (trimetilsilil) trifluoroasetamida (BSTFA) ditambahkan, dan botol dipanaskan pada 70 ° C selama 15 menit.

GC-MS dilakukan dengan peralatan Kromatografi Gas - Spektrometer Massa (GC-MS) , merek *Agilent Technologies* ; kondisi dimodifikasi dari metode yang diterbitkan oleh Tokusoglu et al. Senyawa dipisahkan pada 30 m × 0,25 mm kapiler kolom dilapisi dengan film 0,25 µm HP-5-MS. Sampel disuntik dengan rasio split 50: 1; helium digunakan sebagai gas pembawa pada 1,0 mL min⁻¹. Temperatur kolom dipertahankan pada 100 ° C selama 5 menit setelah injeksi kemudian meningkat pada 10 ° min 280 ° C yang dipertahankan selama 31 menit.

3. Hasil dan Pembahasan

3.1 Maserasi

Filtrat hasil maserasi dievaporasi menghasilkan ekstrak daun sirih merah berwarna hijau pekat. Teknik ekstraksi maserasi didasarkan pada kelarutan komponen terhadap komponen lain dalam campuran. Kelarutan suatu komponen tergantung pada derajat polaritas pelarut yang ditentukan oleh konstanta dielektrikum. Pelarut yang digunakan untuk maserasi serbuk daun sirih merah adalah etanol 96% tujuannya untuk menarik senyawa-senyawa yang lebih polar seperti flavonoid dan asam fenolat. Karena flavonoid memiliki sejumlah gugus hidroksil yang tak tersulih, atau suatu gula, flavonoid merupakan senyawa polar, dan seperti kata pepatah lama ‘suatu golongan akan melarutkan golongannya sendiri’ senyawa yang bersifat polar hanya dapat larut dalam pelarut polar dan semi polar. Begitu juga sebaliknya, senyawa non polar hanya dapat larut dalam pelarut non polar dan semi polar sebagaimana prinsip *like dissolves like*.

3.2 Partisi

Hasil partisi ekstrak n-heksana daun sirih merah diperoleh data ekstrak dengan warna hijau pekat. Sedangkan pada ekstrak etanol - air sirih merah diperoleh data ekstrak dengan warna kuning kecoklatan. Pada proses partisi digunakan pelarut yang kepolarannya meningkat, yaitu heksana, dan etanol - air. Hal ini bertujuan sebagai pemisahan senyawa flavonoid berdasarkan kepolarannya dan tidak mengganggu proses pemisahan senyawa flavonoid yang akan diidentifikasi. Pelarut heksana dalam partisi bertugas untuk melarutkan senyawa non-polar seperti lipid dan asam lemak, karena ekstrak yang diperoleh mengandung juga lilin dan lemak³. Penambahan etanol - air pada proses partisi untuk melarutkan senyawa-senyawa polar pada sampel ekstrak daun sirih merah, sehingga proses pemisahan tidak terganggu.

3.3 Uji Fitokimia

Pada ekstrak etanol - air, hasil uji kualitatif menggunakan tes Willstatter menghasilkan perubahan warna dari coklat menjadi kuning-merah dan warna kuning dihasilkan setelah diuji dengan NaOH 10%. Uji kualitatif ini bertujuan untuk uji pendahuluan terhadap senyawa flavonoid yang terdapat pada masing-masing ekstrak daun sirih merah. Perubahan warna pada tes Willstatter juga disebabkan oleh intensitas karakteristik warna tiap partikel senyawa fenolik yang direduksi oleh magnesium klorida membentuk kompleks magnesium yang menghasilkan perubahan warna sehingga dapat digunakan untuk mengidentifikasi bahwa ekstrak etanol tersebut mengandung senyawa flavonoid.

Perubahan warna pada uji NaOH 10% disebabkan oleh sifat flavonoid yang dapat digunakan sebagai indikator alami untuk menentukan sifat asam, basa, dan garam suatu zat. Karena flavonoid merupakan senyawa fenol yang memberikan kontribusi keindahan dan kesemarakan warna pada tumbuhan hijau di alam. Fenol-fenol didissosiasi pada ikatan O-H dan bersifat sebagai asam lemah, membentuk garam alkoxi dengan alkali.

Hasil uji kualitatif yang diperoleh dari penelitian sesuai dengan teori Geissman (1962), yang menyatakan bahwa hasil positif flavonoid menunjukkan perubahan warna larutan menjadi berwarna kuning-merah untuk tes Willstatter dan berwarna kuning untuk uji NaOH 10%. Jenis flavonoid yang memungkinkan terdapat dalam ekstrak daun sirih merah pelarut etanol yaitu flavon.

3.4 Kromatografi Lapis Tipis

Tabel 1. Hasil Pemeriksaan Flavonoid pada Ekstrak Etanol - Air dengan KLT

No	Harga R _f	Warna Noda		Flavonoid
		UV	UV+ NH ₃	
1	N ₁ = 0,4125	h.k	t	-
2	N ₂ = 0,5875	h.k	t	-
3	N ₃ = 0,8125	f.b	h.k	+

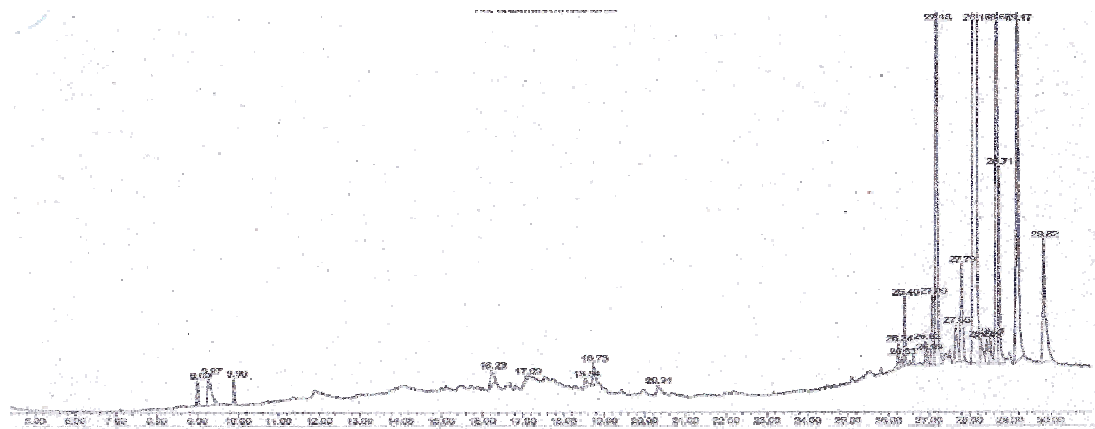
Dari uji kromatografi lapis tipis terlihat bahwa pada ekstrak etanol - air terkandung flavonoid, sebab bercak yang berwarna fluoresensi biru jika dideteksi dengan lampu UV 366 nm dan mengalami perubahan warna menjadi hijau-kuning setelah disemprot dengan amonia cair. Warna bercak ini identik dengan literatur menyebutkan bahwa penafsiran warna bercak dengan sinar UV tanpa NH₃ berwarna fluoresensi biru akan berubah menjadi hijau-kuning dengan NH₃ dan sinar UV termasuk flavonoid jenis flavon dan flavonon yang tak mengandung 5-OH, misalnya 5-OH-glikosida serta flavonol tanpa 5-OH bebas tetapi tersulih pada 3-OH³.

3.5 Spektrofotometer UV-Vis

Dari hasil spektrum UV-Vis dengan pelarut etanol - air, ternyata sampel menunjukkan bentuk spektrum yang spesifik, dimana terlihat adanya dua puncak yaitu pita I (323,5 nm) dan pita II (264,5 nm). Hal ini menunjukkan bahwa senyawa hasil ekstraksi merupakan senyawa golongan flavon (pita I = 310–350 nm, pita II = 250–280 nm). Spektrum flavonoid dapat dilihat pada Lampiran 1. Senyawa golongan flavonoid umumnya memiliki dua pita serapan yaitu pita I dan pita II, karena adanya resonansi yang melibatkan cincin B dan C (pita I) dan cincin A (pita II). Senyawa hasil isolasi ini memiliki pita II karena adanya ikatan rangkap terkonjugasi pada cincin A dan bahu pada pita I yang disebabkan tidak adanya ikatan rangkap terkonjugasi antara C₂ dan C₃.

3.6 Kromatografi Gas-Spektroskopi Massa

Hasil analisis dengan kromatografi gas-spektroskopi massa menunjukkan adanya 25 puncak, ini menunjukkan bahwa dalam sampel masih terdapat banyak senyawa.



Gambar 1. Kromatogram Hasil GC-MS Ekstrak Etanol - Air

Kehadiran flavonoid dalam ekstrak daun sirih merah pelarut etanol - air dikonfirmasi oleh GC-MS. Flavonoid merupakan senyawa yang lebih polar memerlukan suhu yang lebih tinggi untuk pengujian menggunakan analisis GC-MS. Sedangkan prasyarat yang harus dipenuhi agar analisis menggunakan MS berhasil ialah flavonoid dapat menguap pada keadaan hampa udara dalam spektrometer massa. Sebagian besar aglikon cukup atsiri pada suhu 100 - 230 °C, sedangkan polihidroksiflavon dan flavonoid yang lebih polar memerlukan suhu yang lebih tinggi. Tetapi, glikosida, antosianidin, dan biflavonoid keatsiriannya kurang cukup, karena itu harus dibuat turunannya untuk meningkatkan keatsiriannya³.

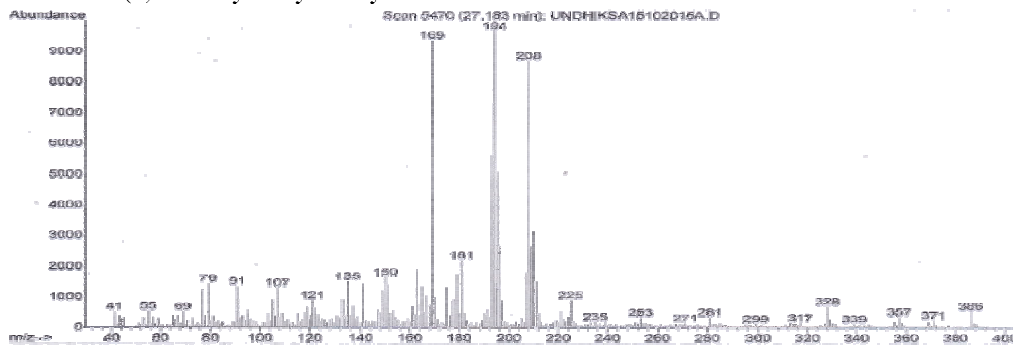
Sililasi adalah metode derivatisasi paling lazim karena sampel mudah volatil dan oleh karena itu sangat cocok untuk sampel non-volatil untuk analisis GC. Derivatisasi adalah proses kimia memodifikasi senyawa untuk menghasilkan senyawa baru yang memiliki sifat yang cocok untuk analisis menggunakan GC. Bis - (trimetilsilil) - trifluoroasetamida (BSTFA) merupakan salah satu senyawa turunan digunakan untuk menganalisis, sifat pelarut yang baik dan dapat berfungsi sebagai reagen sililasi tanpa pelarut tambahan⁵.

Kromatogram hasil analisis sampel ekstrak daun sirih merah (Gambar 1) memperlihatkan 25 peak yang terdeteksi. Namun, hanya 3 peak yang kelimpahannya cukup tinggi yang akan dianalisis

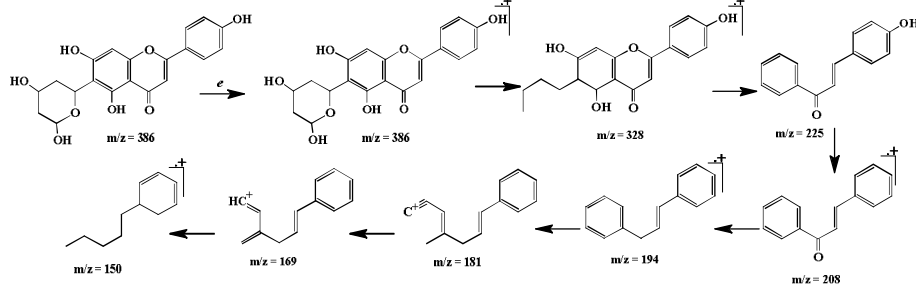
dalam spektrometer massa, yaitu puncak dengan waktu retensi 27,18; 28,15 dan 28,66.

Senyawa target pada kromatogram *peak* dengan waktu retensi 27,18 diduga merupakan senyawa golongan flavonoid jenis flavon dengan nama IUPAC 6 - (4, 6 - dihydroxytetrahydro - 2H -

pyran - 2 - yl) - 5, 7 - dihydroxy - 2 - (4 - hydroxyphenyl) - 4H - chromen - 4 - one dengan formula $C_{20}H_{18}O_8$. Pola fragmentasi terutama pada puncak-puncak utama dengan m/z 386, 328, 225, 208, 194, 181, 169, dan 150.



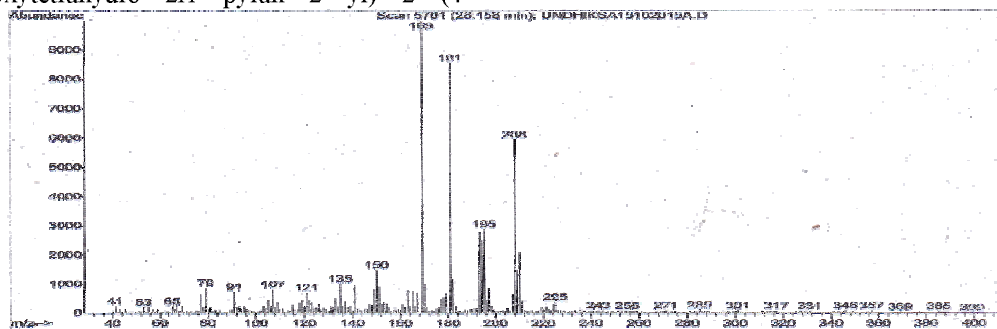
Gambar 2. Spektroskopi Massa Senyawa Waktu Retensi 27,18



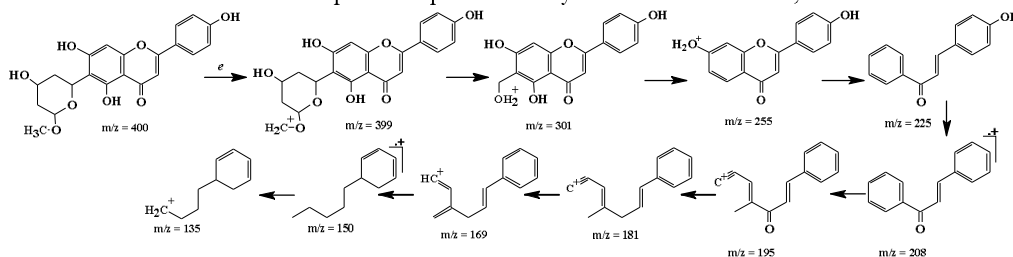
Gambar 3. Mekanisme Pola Fragmentasi Senyawa Waktu Retensi 27,18

Senyawa target pada kromatogram *peak* dengan waktu retensi 28,15 diduga merupakan senyawa golongan flavonoid jenis flavon dengan nama IUPAC 5, 7 - dihydroxy - 6 - (4 - hydroxy - 6 - methoxytetrahydro - 2H - pyran - 2 - yl) - 2 - (4 -

hydroxyphenyl) - 4H - chromen - 4 - one dengan formula $C_{21}H_{20}O_8$. Pola fragmentasi terutama pada puncak-puncak utama dengan m/z 399, 301, 255, 225, 208, 195, 181, 169, 150, dan 135.



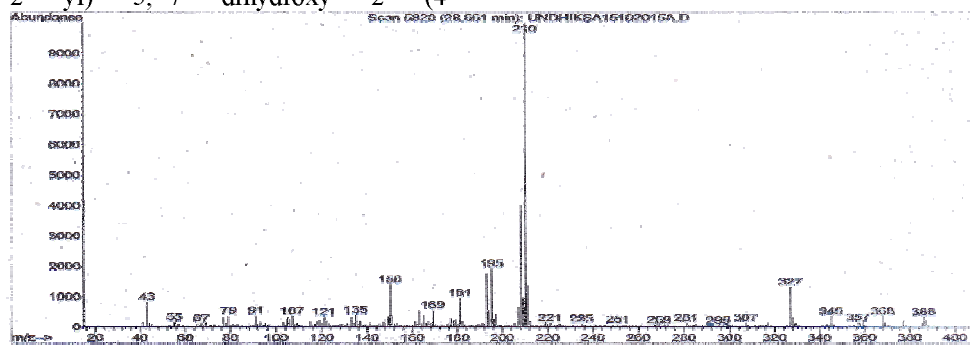
Gambar 4. Spektroskopi Massa Senyawa Waktu Retensi 28,15



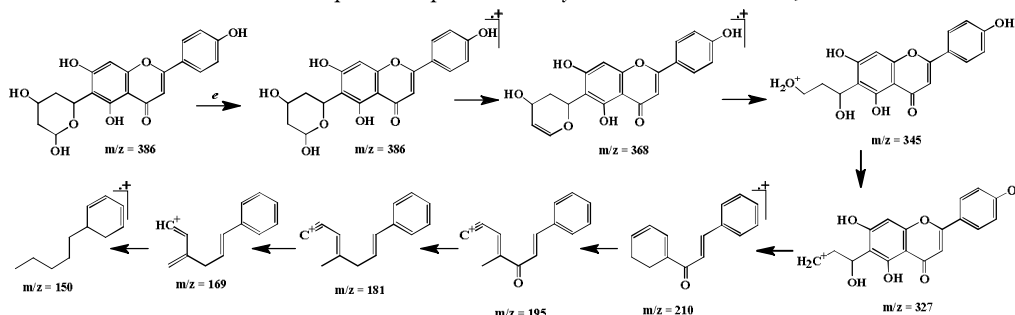
Gambar 5. Mekanisme Pola Fragmentasi Senyawa Waktu Retensi 28,15

Senyawa target pada kromatogram *peak* dengan waktu retensi 28,66 diduga merupakan senyawa golongan flavonoid jenis flavon dengan nama IUPAC 6 - (4, 6 - dihydroxytetrahydro - 2H - pyran - 2 - yl) - 5, 7 - dihydroxy - 2 - (4 -

hydroxyphenyl) - 4H - chromen - 4 - one dengan formula $C_{20}H_{18}O_8$. Pola fragmentasi terutama pada puncak-puncak utama dengan *m/z* 386, 368, 345, 327, 210, 195, 181, 169, dan 150.



Gambar 6. Spektroskopi Massa Senyawa Waktu Retensi 28,66



Gambar 7. Mekanisme Pola Fragmentasi Senyawa Waktu Retensi 28,66

4. Simpulan dan Saran

Berdasarkan penelitian yang telah dilakukan, maka dapat ditarik kesimpulan bahwa jenis flavonoid yang terkandung dalam ekstrak daun sirih merah (*Piper croctatum*), kemungkinan yaitu flavon, flavanon, dan flavonol.

Perlu dilakukan penelitian lanjutan mengenai identifikasi senyawa flavonoid ekstrak daun sirih merah (*Piper croctatum*) dengan mengisolasi dengan menggunakan kromatografi kolom, karena sampel daun sirih merah banyak mengandung senyawa-senyawa lain yang mengganggu identifikasi.

5. Ucapan Terima Kasih

Penulis mengucapkan terimakasih kepada pihak-pihak yang telah membantu dalam proses penelitian di Laboratorium MIPA, Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam, Undiksha Singaraja dan di Laboratorium Kimia Narkoba Forensik, Polresta Denpasar, keluarga serta teman-teman seperjuangan yang telah bersedia membantu dalam proses penelitian dan penulisan ini.

6. Daftar Pustaka

1. Aksara, R., Weny, J. A. M., & La Alio. 2013. Identifikasi Senyawa Alkaloid Dari Ekstrak Metanol

Kulit Batang Mangga (*Mangifera indica* L). *Jurnal Entropi*, Volume VIII, Nomor 1.
 2. Daniel. 2010. Isolasi dan Identifikasi Senyawa Flavonoid pada Fraksi Etil Asetat dari Daun Tumbuhan Sirih Merah (*Piper croctatum* Ruiz & Pav). *Jurnal Mulawarman Scientifie*, Volume 9, Nomor 1. April 2010.
 3. Markham, K. R. 1988. Cara Mengidentifikasi Flavonoid. Terjemahan Kosasih Padmawinata. *Techniques of flavonoid identification*. 1982. Bandung: Penerbit ITB.
 4. Marlina, P.W.N. 2008. Konsentrasi Flavonoid dan Lethal Concentration 50 (LC_{50}) Ekstrak Daun Sirih Merah (*Piper Croctatum*). Skripsi (tidak diterbitkan). Program Studi Biokimia, FMIPA, IPB, Bogor.
 5. Orata, F. 2012. *Derivatization Reactions and Reagents for Gas Chromatography Analysis*, *Advanced Gas Chromatography - Progress in Agricultural, Biomedical and Industrial Applications*, Dr. Mustafa Ali Mohd. (Ed.), Croatia: InTech.
 6. Tokusoglu, Ö., M. K. Unal, & Yildirim. 2003. HPLC-UV And GC-MS Characterization Of The Flavonol Aglycons Quercetin, Kaempferol, and Myricetin in Tomato Pastes and Other Tomato-Based Products. *Acta Chromatographica*, No. 13, 2003.