



PharmaCine

Journal of Pharmacy, Medical and Health Science

<https://journal.unsika.ac.id/>
Volume 02 Nomor 01 Maret 2021
ISSN : 2746-4199

Review Artikel

Metode Isolasi Flavonoid pada Tumbuhan di Indonesia

Bunga Nur Annisa^{1*}, Aditia Putra Tama¹, Cantika Nurul Sa'adah¹, Nena Vauziah Sary¹

*email korespondensi : 1910631210060@student.unsika.ac.id

¹Universitas Singaperbangsa Karawang

Abstrak

Tumbuhan merupakan keanekaragaman hayati yang selalu ada di sekitar kita baik secara liar maupun dibudidayakan. Tumbuhan memiliki dua kelompok senyawa metabolit yakni metabolit primer dan metabolit sekunder. Metabolit sekunder berfungsi dalam perkembangbiakan dan pertahanan tumbuhan. Salah satu contoh metabolit sekunder adalah flavonoid. Tujuan dari artikel ini adalah untuk mengidentifikasi metode yang tepat dalam mengisolasi flavonoid pada tumbuhan di Indonesia. Metode yang digunakan yaitu tinjauan literatur dengan teori-teori yang relevan. Hasil dari tinjauan lima tumbuhan dapat disimpulkan bahwa isolasi senyawa flavonoid dilakukan dalam lima tahap yaitu ekstraksi, fraksinasi, skrining, pemisahan dan pemurnian, serta identifikasi isolat.

Kata kunci : Flavonoid, Isolasi, Metabolit Sekunder, Tumbuhan

Method of Isolation of Flavonoids in Plants in Indonesia

Abstract

Plants are biodiversity that is always around us, both wild and cultivated. Plants have two types of metabolite compounds, namely primary and secondary metabolites. Secondary metabolites function in the reproduction and defense of plants. One example of secondary metabolites is flavonoids. The purpose of this article is to identify the appropriate method of isolating flavonoids from plants in Indonesia. The method used is a literature review with relevant theories. The results of the review of the five plants concluded that the isolation of flavonoids was carried out in five stages, namely extraction, fractionation, screening, separation and purification, and isolate identification..

Key words : *Flavonoids, Isolation, Plants, Secondary Metabolites.*

Pendahuluan

Tumbuhan merupakan keanekaragaman hayati yang selalu ada di sekitar kita baik secara liar maupun dibudidayakan. Indonesia adalah salah satu negara di dunia yang memiliki keanekaragaman tumbuhan.¹ Indonesia memiliki sekitar 4000 jenis tumbuhan tidak kurang 40% merupakan jenis yang hanya terdapat di Indonesia dan tidak terdapat ditempat lain di dunia.² Tumbuhan memiliki dua kelompok senyawa metabolit yakni metabolit primer dan metabolit sekunder. Senyawa metabolit primer berperan pada proses pertumbuhan, sedangkan metabolit sekunder berfungsi dalam perkembangbiakan dan pertahanan tumbuhan.³ Beberapa tumbuhan dapat menghasilkan satu atau lebih senyawa – senyawa metabolit sekunder. Senyawa ini bersifat toksik dan dapat digunakan dalam pengobatan berbagai jenis penyakit. Yang termasuk ke dalam senyawa golongan metabolit sekunder yaitu flavonoid, alkaloid, tanin, saponin, kuinon, steroid dan terpenoid.⁴

Flavonoid adalah salah satu senyawa golongan fenol terbesar. Flavonoid merupakan metabolit sekunder kandungan khas tumbuhan hijau dan terdapat pada semua bagian tumbuhan terutama pada bagian daun.¹

Flavonoid juga adalah senyawa metabolit sekunder yang mengandung C15 terdiri atas dua inti fenolat dimana inti tersebut yang dihubungkan dengan tiga satuan karbon.⁵ Senyawa flavonoid aktif dalam menangkal radikal bebas ditentukan dengan adanya gugus fungsi –OH (hidroksi). Senyawa flavonoid yang bersifat antioksidan diantaranya yaitu katekin, flavon, flavanon, flavonol, kalkon, dan isoflavon .⁶

Flavonoid juga merupakan senyawa polar sebab memiliki sejumlah gugus hidroksil yang tidak tersubstitusi. Pelarut polar yakni seperti etanol metanol, etil asetat, atau campuran dari pelarut tersebut dapat digunakan untuk mengekstraksi flavonoid dari jaringan tumbuhan. Pengambilan bahan aktif dari suatu tanaman dapat dilakukan dengan cara isolasi senyawa.¹ Tahapan isolasi terdiri dari ekstraksi, skrining fitokimia, fraksinasi, pemisahan dan pemurnian, dan identifikasi isolasi.⁷

Metode

Metode yang digunakan yakni suatu tinjauan literatur terhadap teori- teori yang relevan. Sumber – sumber tinjauan literatur meliputi studi pencarian sistematis, informasi jurnal

berupa proquest, ebsco, elsheever, serta google cendekia.

Hasil

Hasil review berdasarkan tinjauan literature pada tumbuhan yang ada di Indonesia terkait metode isolasi senyawa flavonoid. Terdapat beberapa tumbuhan yang diidentifikasi yaitu:

Isolasi Daun Nangka

Daun nangka yang diekstraksi menghasilkan 31,20 gram ekstrak kental etanol dari 500 gram serbuk kering daun nangka tua. Selanjutnya, skrining fitokimia yang telah dilakukan menunjukkan hasil positif terhadap senyawa flavonoid. Proses fraksinasi pada daun nangka didapatkan 8 fraksi, dimana terdapat 2 fraksi menunjukkan hasil murni yaitu fraksi FA dan Fraksi FH dengan menunjukkan 1 noda. Kemudian Identifikasi isolate pada daun nangka dengan menggunakan analisis spektrofotometri FTIR dan UV-Vis. Pada Hasil spektrum inframerah dari fraksi A menunjukkan bahwa pada isolat FA mengandung beberapa gugus fungsi, diantaranya dapat dilihat pada Tabel 1.

Sedangkan hasil spektrum inframerah dari fraksi H menunjukkan bahwa isolat FH mengandung beberapa gugus fungsi, hal ini dapat dilihat pada Tabel 2.

Bilangan Gelombang (cm-1)		Bentuk Pita	Kemungkinan Gugus Fungsi
Isolat	Pustaka		
3461,63	3550-3200	Melebar	OH
3111,30	3150-3050	Tajam	CH aromatic
2852,72; 2922,16	2950-2800	Tajam	CH alifatik
1726,65	1850-1730	Tajam	C=O
1571,98' 1608,63	1650-1400	Tajam	C=C aromatik

Tabel 1. Data bilangan gelombang dan kemungkinan gugus fungsi fraksi A

Tabel 2. Data bilangan gelombang dan kemungkinan gugus fungsi fraksi H

Bilangan Gelombang (cm-1)		Bentuk Pita	Kemungkinan Gugus Fungsi
Isolat	Pustaka		
2550,24	3550-3200	Melebar	OH
3060,62	3150-3050	Tajam	CH aromatic
2899,11	2950-2800	Tajam	CH alifatik
1737,00	1850-1730	Tajam	C=O
1456,26	1650-1400	Tajam	C=C aromatik
1456,26	1475-1300	Tajam	CH alifatik
1062,78; 1267,23	1300-1000	Tajam	C-O alkohol
887,26	900-700	Tajam	CH aromatic

Hasil analisis spektrofotometri UV- Vis pada fraksi A menunjukkan terdapat dua pita yang ada pada fraksi A dengan ciri khas dari senyawa flavonoid.⁸

Isolasi Daun Sembukan

Daun sembukan menghasilkan 84,92 g ekstrak pekat etanol yang telah diekstraksi. Lalu untuk hasil partisi 70 g ekstrak pekat etanol didapatkan 6,89 g n-heksan; 4,24 g kloroform; 0,34 g etil asetat; 3,12 g n-butanol;

serta 26,85 g air. Kemudian dilakukan skrining fitokimia yang menunjukkan bahwa ekstrak yang mengandung flavonoid adalah ekstrak dengan pelarut etil asetat, n-butanol, dan air. Selanjutnya, proses fraksinasi dengan KLT preparatif menghasilkan 5 fraksi dengan fraksi F2 dan F4 dalam daun sembukan positif mengandung flavonoid. Pada uji kemurniannya hanya menghasilkan 1 noda yang diidentifikasi menggunakan spektrofotometer FTIR dan UV-Vis menghasilkan isolat berupa bentuk pita melebar menunjukkan adanya gugus C-O eter.⁶

Isolasi Daun Kumak

Ekstraksi daun kumak diperoleh ekstrak kental etanol sebanyak 140,80 g dengan hasil positif mengandung flavonoid pada fraksi etil asetat. Kemudian difraksinasi senyawa flavonoid dengan kromatografi kertas preparatif (KKt). Hasil dari kromatografi kertas preparatif dapat dilihat pada Tabel 3.

Tabel 3. Hasil Pemisahan Isolasi Daun Kumak

Isolat	Harga Rf	Sinar lampu UV 366 nm
P1	0,11	Fluoresensi hijau
P2	0,70	Fluoresensi ungu
P3	0,78	Fluoresensi biru
P4	0,83	Fluoresensi biru lemah

Hasil isolasi yang dapat dikatakan murni atau tunggal yaitu pada isolat P4 karena menghasilkan satu noda dengan $R_f=0,83$. Selanjutnya, isolat diidentifikasi menggunakan spektrofotometri UV-Vis menghasilkan dua pita.⁹

Isolasi Batang Tumbuhan Senggani

Batang tumbuhan senggani yang diperoleh dari ekstraksi yaitu sebanyak 27,52 g ekstrak kental methanol. Kemudian difraksinasi yang mana dari fraksi n- heksan diperoleh sebanyak 3,99 g. Fraksi etil asetat diperoleh sebanyak 6,71 g dan fraksi methanol diperoleh sebanyak 10,91 g. Dari ketiga fraksi tersebut, pada skrining fitokimia menunjukkan hanya fraksi etil asetat yang positif flavonoid ditandai dengan adanya perubahan warna pada sampel menjadi warna kuning.

Hasil dari pola pemisahan, sebanyak 10 fraksi gabungan (1-10). Seluruh fraksi dilakukan kembali KLT. Sebesar 0,0643g diperoleh dari fraksi 6. Karena senyawa yang diperoleh belum murni dari hasil KLT gabungan dari fraksi KKG sehingga dilakukan tahap KLT preparatif, yang mana pada fraksi 4 menunjukkan positif senyawa flavonoid. Hasil dari KLT yang menunjukkan bahwa terdapat noda dengan disertai pengotor dan tailing, membuat senyawa belum dapat

dikatakan murni. Sehingga perlu dilakukan analisis isolate menggunakan analisis H-NMR.¹⁰

Isolasi Daun Jambu Biji

Ekstraksi dari daun jambu biji sebanyak 128,49 g diperoleh ekstrak kental etanol yang berwarna coklat. Dari hasil yang diperoleh, menunjukkan bahwa ekstrak etanol positif flavonoid terhadap pereaksi NaOH 10%. Dengan adanya perubahan warna yang khas untuk senyawa flavonoid, diperoleh ekstrak kloroform, n-butanol, dan air positif mengandung flavonoid. Didapatkan 73 eluat dari hasil pemisahan, kemudian apabila terdapat kesamaan pola noda pada eluat maka eluat digabungkan sehingga diperoleh 5 fraksi yaitu A, B, C, D, dan E. Hasil pemurnian terhadap fraksi C menghasilkan noda tunggal. Kemudian hasil dari spektrofotometri FTIR yaitu terdapat gugus -OH terikat pada bilangan gelombang 3367,20 cm⁻¹ dan terdapat ulur gugus C-O alcohol yang muncul pada serapan 1252,78 cm⁻¹, 1161,55 cm⁻¹, 1115,86 cm⁻¹. Sementara terdapat dua pita serapan hasil dari spektrofotometri UV-Vis.¹¹

Pembahasan

Pada artikel ini dibahas metode yang tepat untuk mengisolasi senyawa flavonoid dengan melihat beberapa tumbuhan yaitu:

Isolasi Daun Nangka

1. Ekstraksi

500 gram serbuk daun nangka tua yang telah dikeringkan dilakukan maserasi dengan etanol 96% sebanyak 2000 mL. Lalu ekstrak yang diperoleh diuapkan dengan *rotary vacuum evaporator* dan ditimbang hasilnya. Hasil yang diperoleh dilanjutkan ketahap berikutnya.

2. Skrining fitokimia

Ekstrak metanol daun nangka dimasukkan kedalam 2 tabung reaksi. Tabung I ditetesi NaOH 10% jika terbentuk larutan warna biru violet maka positif mengandung flavonoid. Sedangkan tabung II ditambah serbuk Mg dan HCl pekat, jika terbentuk larutan warna jingga maka positif mengandung flavonoid. Sehingga ekstrak tersebut menunjukkan hasil positif terhadap senyawa flavonoid.

3. Fraksinasi

Ekstrak yang positif mengandung flavonoid dilakukan pemisahan dengan menggunakan kromatografi kolom. Pelarut yang digunakan dalam kromatografi kolom adalah n-heksan:etilasetat:n-butanol (8:2:1)

yang diperoleh berdasarkan uji kromatografi lapis tipis (KLT). Sebanyak 2,03 g sampel dipisahkan dengan KLT serta eluat ditampung di dalam botol vial setiap 3 mL. Proses kromatografi diberhentikan setelah semua metabolit diperkirakan telah terelusi. Hasil proses ini didapatkan 8 fraksi.

4. Pemisahan dan Pemurnian

Masing – masing eluat kemudian dianalisis dengan KLT untuk diuji kemurniannya. Pelarut yang digunakan yaitu n-butanol : asam asetat:air (4:5:1); n-heksan : n-butanol (6:4); n-butanol:air:kloroform (6:1:2); n- butanol : etil asetat (8:2); n-heksan:kloroform:n-butanol (8:2:1) dan n-heksan:kloroform:n-butanol (8:2:1). Hasil yang menunjukkan murni yaitu fraksi FA dan FH dengan menunjukkan 1 noda.

5. Identifikasi Isolat

Identifikasi senyawa hasil isolasi pada fraksi A dan fraksi H dilakukan dengan menggunakan analisis sebagai berikut:

a) Analisis spektrofotometri FTIR

Hasil spektrum inframerah dari fraksi A menunjukkan bahwa pada isolat FA mengandung beberapa gugus fungsi.

b) Analisis spektrofotometri UV-Vis

Hasil analisis spektrofotometri UV- Vis pada fraksi A menunjukkan terdapat dua

pita yang ada pada fraksi A dengan ciri khas dari senyawa flavonoid yakni serapan pada pita I dengan panjang gelombang 323,40 nm dan serapan pita II dengan panjang gelombang 285,60 nm. Hal ini menunjukkan bahwa senyawa flavonoid yang diisolasi pada fraksi A dari daun nangka diduga golongan flavanon atau dihidroflavonol dengan penambahan pereaksi geser $AlCl_3/HCl$ dan $NaOH$. Hal tersebut dapat dibuktikan dengan adanya gugus OH pada atom C-3 dan C-7. Sedangkan hasil analisis spektrofotometri UV-Vis pada fraksi H menunjukkan terdapat dua pita yang ada pada fraksi H dengan ciri khas dari senyawa flavonoid, yakni serapan pada panjang gelombang 345,20 nm untuk pita I dan serapan pada panjang gelombang 280,60 nm untuk pita II. Hal ini menunjukkan bahwa senyawa flavonoid yang diisolasi dari daun nangka diduga golongan flavon atau flavonol (3-OH tersubstitusi).⁸

Isolasi Daun Sembukan

1. Ekstraksi

1200 g daun sembukan diekstraksi dengan metode maserasi. Daun sembukan yang telah berbentuk serbuk halus direndam dengan 10 L etanol 96%. Lalu hasil maserasi dipekatkan dengan menggunakan

rotary vacuum evaporator. Kemudian hasil ekstrak yang didapatkan dilarutkan kembali dengan etanol:air (7:3). Selanjutnya pelarut etanol diuapkan, sehingga yang tertinggal adalah ekstrak air. Ekstrak air kemudian dipisahkan dengan berbagai pelarut, seperti n-heksan, kloroform, etil asetat, dan n-butanol.

2. Skrining fitokimia

Skrining Flavonoid dilakukan dengan beberapa pereaksi:

1) Dengan NaOH 10% : Sampel ditambahkan beberapa tetes NaOH 10%. Reaksi akan menunjukkan positif apabila ada perubahan warna yang spesifik.

2) Uji Wilstatter : Sampel dicampur dengan serbuk Mg kemudian ditetesi HCl pekat. Reaksi akan menunjukkan positif apabila ada perubahan warna yang spesifik.

3) Uji Bate Smith-Matcalfe: Sampel ditetesi H₂SO₄ pekat, kemudian dipanaskan 5 menit. Reaksi akan menunjukkan positif apabila ada perubahan warna yang spesifik. Hasil pengujian menunjukkan bahwa ketiga ekstrak tersebut mengandung flavonoid karena ketiganya menunjukkan perubahan warna saat diuji.

3. Fraksinasi

Ekstrak yang positif flavonoid

selanjutnya difraksinasi dengan metode KLT preparatif. Pengembang yang digunakan berdasarkan uji KLT yaitu (BAA) (4:1:5) dan fase diam silika gel GF254. Noda pada plat dapat dilihat dengan lampu UV 254 nm dan 366 nm. Hasil dari fraksinasi dengan KLT preparatif menghasilkan 5 fraksi dengan fraksi F2 dan F4 dalam daun sembuk positif mengandung flavonoid. Fraksi 2 dianalisis lebih lanjut sebab jumlahnya mencukupi untuk dilakukan pemurnian.

4. Pemisahan dan Pemurnian

Hasil uji kemurniannya menggunakan KLT menghasilkan 1 noda dengan pengembang n-butanol : asam asetat glasial : aquades (BAA) (4:1:5), n-butanol : etanol : aquades (BEA) (4:1:2,2), dan kloroform : asam asetat glasial : aquades (KAA) (30:15:2).

5. Identifikasi Isolat

Isolat yang positif flavonoid relatif murni dilakukan identifikasi dengan spektrofotometer FTIR dan UV-Vis. Caranya yaitu dengan sedikit isolat ditambahkan dengan serbuk KBr. Selanjutnya digerus dan dimasukkan ke dalam sel, lalu siap diidentifikasi dengan FTIR. Identifikasi dengan UV-Vis yaitu

isolat diencerkan dengan etanol p.a. Isolat yang telah larut dalam metanol ditambahkan pereaksi geser seperti NaOH, $AlCl_3$, $AlCl_3+HCl$, $NaOAc$, H_3BO_3+HCl , lalu diukur panjang gelombangnya. Hasil identifikasi isolat berupa bentuk pita melebar menunjukkan adanya gugus C-O eter sehingga isolat diduga terdapat gugus-gugus fungsi seperti OH, C-H alifatik, C-H aromatik, C=C aromatik, C-O alkohol, C=O dan C-O eter yang mana gugus fungsi ini merupakan gugus fungsi yang dimiliki senyawa flavonoid.⁶

Isolasi Daun Kumak

1. Ekstraksi

Sebanyak 1 kg serbuk daun kumak diekstraksi dengan etanol 80% sebanyak 10 liter secara maserasi. Perendaman awal selama 6 jam dan diaduk sesekali, lalu didiamkan selama 18 jam. Maserasi dilakukan 2x24 jam. Ekstrak kemudian dipekatkan dengan rotary vacuum evaporator dan dikeringkan dengan freeze dryer sehingga diperoleh ekstrak kental etanol.

2. Fraksinasi

Fraksinasi dilakukan dengan metode partisi (ekstraksi cair-cair), ekstrak kental etanol sebanyak 90 g dilarutkan dalam etanol 96%

dan ditambahkan air suling sebanyak 40 mL. Setelah itu, 100 mL n-heksan ditambahkan, dilanjutkan penambahan 100 mL etil asetat. Dihasilkan fraksi n-heksan, fraksi etil asetat dan fraksi air.

3. Skrining

Skrining dilakukan dengan pereaksi LB dan $FeCl_3$, dimana terhadap masing-masing fraksi diperoleh hasil positif mengandung flavonoid pada fraksi etil asetat.

4. Pemisahan dan Permurnian

Sebelum uji kemurnian dilakukan isolasi senyawa flavonoid dengan kromatografi kertas preparatif (KKt), fase diam yang digunakan yaitu Kertas Whatman Nomor. 1 dan fase gerak yang digunakan yaitu BAA (Butanol: Asam asetat: Air= 4: 1: 5). Setelah itu dilakukan uji kemurnian dilakukan dengan KKt satu arah dan dua arah. Dengan fase diam kertas Whatman No.1 dan fase gerak BAA (asam asetat 5%, asam asetat 15% dan HCl 1%). Dari keempat isolat, pada KKt satu arah menghasilkan satu bercak yaitu fraksi 4. Selanjutnya, pada KKt dua arah diperoleh satu bercak dilihat dari hasil isolasi pada isolat P4 yang dapat dikatakan murni atau tunggal karena menghasilkan satu noda dengan $R_f=0,83$.

6. Identifikasi Isolat

Identifikasi isolat menggunakan spektrofotometri UV-Vis menghasilkan dua pita. Pada pita I memberikan panjang gelombang maksimum 336,2 nm dan pita II 217,2 nm. Berdasarkan hasil tersebut, diduga daun kumak mengandung senyawa flavonoid golongan flavonol.⁹

Isolasi Batang Tumbuhan Senggani

1. Ekstraksi

Sebanyak 1,6 kg serbuk batang tumbuhan senggani diekstraksi selama 3x24 jam dengan metode maserasi menggunakan pelarut metanol. Kemudian ekstrak dipekatkan dengan rotary vacuum evaporator, sehingga diperoleh ekstrak kental methanol.

2. Fraksinasi

Ekstrak kental metanol sebanyak 27,52 g dilanjutkan pada tahap fraksinasi metode partisi (ekstraksi cair-cair). Dilarutkan ekstrak kental metanol dengan pelarut metanol, partisi dilakukan berurutan sesuai kepolaran pelarut yaitu dengan pelarut n-heksan (non polar), etil asetat (semi polar) dan metanol (polar). Fraksi n-heksan diperoleh berwarna hijau tua. Fraksi etil asetat diperoleh berwarna coklat orange dan fraksi methanol diperoleh sebanyak berwarna coklat tua.

3. Skrining

Plat tetes dibagi ke dalam dua bagian yaitu bagian I sebagai kontrol dan bagian II sebagai perlakuan (Serbuk Mg + HCl pekat), lalu diteteskan masing – masing ekstrak kasar, fraksi n-heksana, etil asetat dan metanol pada dua bagian plat tersebut. Hasil menunjukkan hanya fraksi etil asetat yang positif flavonoid ditandai dengan adanya perubahan warna pada sampel menjadi warna kuning.

4. Pemisahan dan Pemurnian

Pemisahan dan pemurnian dilakukan dengan berbagai cara, sebagai berikut :

1) Kromatografi Cair Vacum (KCV)

Pada proses KCV, fase diam yang digunakan yaitu 60-70 mesh dan fase gerak yang digunakan yaitu n-heksan 100%, n-heksana:etil asetat (8:2, 6:4, 1:1, 3:7, 1:9), etil asetat 100%, etil asetat:metanol (9:1, 8:2, 7:3), dan metanol 100%, setiap masing – masing eluen yang digunakan dilakukan proses elusi dengan pengulangan sebanyak dua kali dan secara bergradien. Sebanyak 6,71 g fraksi etil asetat diimpreg dengan silika gel 60-70 mesh. Kemudian kolom diisi dengan penyangga yaitu eluen n-heksan 100% dan fase diamnya. Hasil dari pola pemisahan, sebanyak 10 fraksi

gabungan (1-10). Seluruh fraksi dilakukan kembali KLT dengan eluen n-heksana:etil asetat (6:4). Sebesar 0,0643g diperoleh dari fraksi 6 yang mengandung senyawa target namun kompleksitasnya rendah, maka untuk fraksi 6 diteruskan pada tahap KKG.

2) Kromatografi Kolom Gravitasi (KKG) Pada proses KKG, fase diam yang digunakan yaitu silika gel 200- 400 mesh dan fase gerak yang digunakan yaitu n-heksana:etil asetat (9:1, 8:2, 7:3, 6:4, 5:5, 4:6, 3:7, 2:8, 1:9), etil asetat 100% dan metanol 100%. Proses elusi dilakukan secara bergradien. Hasil dari pola pemisahan, dilakukan penggabungan terhadap beberapa fraksi yang memiliki noda dan nilai Rf relatif sama. Sebanyak 10 fraksi diperoleh yang mana fraksi- fraksi tersebut dilakukan KLT kembali dengan eluen n-heksana:etil asetat (7:3). Diperoleh senyawa belum murni dari hasil KLT gabungan dari fraksi KKG sehingga dilakukan tahap KLT preparatif.

3) Kromatografi Lapis Tipis Preparatif Untuk proses KLT preparatif fraksi yang digunakan yaitu fraksi 4. Alasannya yaitu fraksi 4 memiliki senyawa yang tidak terlalu kompleks dan massa 0,0127 g yang lebih besar dari fraksi yang lain. Sebelum

ditotolkan. Sampel pada fraksi 4 dilarutkan terlebih dahulu, penotolan dilakukan pada plat KLT 20x5cm yang telah dioven. Kemudian dielusi dengan fase gerak n-heksana:etil asetat (6:4). Sebesar 1,6 mg diperoleh dari hasil KLT preparatif. Pada fraksi 4 menunjukkan hasil dari skrining fitokimia yaitu hanya positif senyawa flavonoid, maka selanjutnya dilakukan uji kemurnian.

Fraksi 4 hasil dari isolasi kemudian dilakukan uji kemurnian. Uji kemurnian menggunakan KLT dengan 3 variasi eluen yaitu n- heksana:diklorometana (4:6), n-heksana:etil asetat (6:4) dan diklorometana:etil asetat (1:1). Diperoleh hasil dari KLT yang menunjukkan bahwa terdapat noda dengan disertai pengotor dan tailing, membuat senyawa belum dapat dikatakan murni. Sehingga isolate diidentifikasi dengan analisis spektrum H-NMR.

5. Identifikasi isolat

Hasil dari analisis spectrum H-NMR menunjukkan bahwa fraksi 4 mengandung senyawa flavonoid golongan aglikon, berdasarkan dari pergeseran 6-8 ppm yang merupakan kumpulan aromatik dari aglikon flavonoid.¹⁰

Isolasi Daun Jambu Biji

1. Ekstraksi

Serbuk daun jambu biji sebanyak 1000 g diekstraksi dengan metode maserasi bertingkat. Pelarut awal yang digunakan n-heksana teknis dan yang kedua etanol 70%, dan dilakukan 3x24 jam. Pertama, sebanyak 1000 g serbuk diekstraksi dengan pelarut n-heksan sebanyak 4500 mL, dan 103,40 g diperoleh ekstrak kental n-heksan yang berwarna hijau pekat. Kedua, dengan jumlah yang sama diekstraksi dengan pelarut etanol 70% sebanyak 6000 mL, dan 128,49 g diperoleh ekstrak kental etanol yang berwarna coklat.

2. Skrining

Uji fitokimia dilakukan dengan pereaksi uji yaitu uji Wilstatter, Bate Smith-Matcalfe dan NaOH 10%. Dari hasil yang diperoleh, menunjukkan bahwa ekstrak etanol positif flavonoid terhadap pereaksi NaOH 10% dan uji Bate-Smith Metcalfe dengan memberikan warna yang khas flavonoid pada masing-masing pereaksi. Sedangkan, ekstrak n- heksana menunjukkan hasil yang negatif flavonoid.

3. Fraksinasi

Fraksinasi menggunakan metode partisi (ekstraksi cair – cair). Sebanyak 80 g

ekstrak kental etanol dipartisi menggunakan pelarut n- heksana, kloroform dan n-butanol. Masing-masing ekstrak diuapkan, sehingga dihasilkan sebanyak 1,01 g ekstrak pekat n- heksana, 1,95 g ekstrak pekat kloroform, 3,77 g ekstrak pekat n- butanol dan ekstrak air 10,34 g. Kemudian dilakukan kembali uji fitokimia terhadap ke-3 ekstrak.

Dengan adanya perubahan warna yang khas untuk senyawa flavonoid, diperoleh ekstrak kloroform, n-butanol, dan air positif mengandung flavonoid. Dari hasil tersebut yang memiliki hasil paling positif terhadap senyawa flavonoid yaitu ekstrak n-butanol.

4. Pemisahan dan Pemurnian

Ekstrak n-butanol daun jambu biji dilakukan pemisahan dengan fase gerak dari campuran n-heksana : etil asetat : n-butanol (8:2:1) menggunakan kromatografi kolom. Didapatkan 73 eluat dari hasil pemisahan, kemudian apabila terdapat kesamaan pola noda pada eluat maka eluat digabungkan sehingga diperoleh 5 fraksi yaitu A, B, C, D, dan E. Fraksi C menunjukkan positif flavonoid dengan hasil yang dominan, karena positif terhadap ketiga pereaksi uji fitokimia dan intensitas warna yang dimiliki

lebih kuat. Lalu untuk metode yang digunakan pada uji kemurnian yaitu KLT dengan beberapa campuran fase gerak yaitu Kloroform : etil asetat : asam asetat (2:7:1), n- heksana : n-butanol (6:4), Etil asetat : n-butanol (2:8), n-heksana : kloroform (3:7). Hasil pemurnian terhadap fraksi C menghasilkan noda tunggal yang mengindikasikan bahwa fraksi C relatif murni.

5. Identifikasi Isolat

Identifikasi isolate pada fraksi C dilakukan dengan spektrofotometri FTIR dan spektrofotometri UV-Vis.

1) Spektrofotometri FTIR

Pada spektrofotometri FTIR yaitu terdapat gugus fungsi yang menjadi karakteristik flavonoid yaitu vibrasi ulur gugus –OH terikat pada bilangan gelombang 3367,20 cm^{-1} dan terdapat ulur gugus C-O alcohol yang muncul pada serapan 1252,78 cm^{-1} , 1161,55 cm^{-1} , 1115,86 cm^{-1} .

2) Spektrofotometri UV-Vis

Terdapat dua pita serapan hasil dari spektrofotometri UV-Vis, dimana untuk pita I memiliki panjang gelombang 347,30 nm dan pada pita II memiliki panjang gelombang 278,50 nm. Kedua pita tersebut merupakan rentang serapan senyawa flavonoid

golongan flavon.¹¹

Simpulan

Berdasarkan jurnal yang telah direview terhadap 5 tanaman yaitu daun daun nangka, daun sembukan, daun kumak, batang tumbuhan senggani dan daun jambu biji didapatkan metode yang dapat mengisolasi senyawa flavonoid pada tumbuhan di Indonesia yaitu:

1. Ekstraksi senyawa flavonoid digunakan metode maserasi dengan bantuan alat rotary vacuum evaporator dan menggunakan pelarut etanol, methanol serta n-heksan.
2. Skrining fitokimia dilakukan dengan menggunakan berbagai pereaksi uji yaitu pereaksi Wilstater, Pereaksi Bate Smite-Metcalfe, NaOH 10%, FeCl₃ dan Lieberman Buschard.
3. Fraksinasi digunakan dua cara yaitu ekstraksi cair – cair dan kromatografi kolom.
4. Pemisahan dan pemurnian menggunakan metode kromatografi kertas preparatif (KKt), kromatografi cair vacum (KCV) dan kromatografi kolom gravitasi (KKG), KLT preparatif dan kromatografi kolom.
5. Identifikasi isolat dengan menggunakan metode analisis spektrum H-NMR,

spektrofotometri UV-Vis dan spektrofotometri FTIR.

Ucapan Terimakasih

Penulis mengucapkan terimakasih atas partisipasi dan bantuannya kepada masyarakat Karawang Barat dan LPPM Universitas Singaperbangsa Karawang.

Pendanaan

Penelitian ini merupakan penelitian mandiri dan tidak didanai dari hibah manapun.

Konflik Kepentingan

Penulis menyatakan tidak terdapat potensi konflik kepentingan dengan penelitian, kepenulisan (*authorship*), dan atau publikasi artikel ini.

Daftar Pustaka

1. Kusnadi K, Devi ET. Isolasi dan identifikasi senyawa flavonoid pada ekstrak daun seledri (*Apium graveolens L.*) dengan metode refluks. Pancaksati Science Education Journal. 2017;7(2):56-67.
2. Setiawan H. Keanekaragaman Tumbuhan di Indonesia. Situs Ilmu Hutan [Diunduh 30 April 2021]. Tersedia online pada: <http://ilmuhutan.com/keanekaragaman-tumbuhan-di-indonesia/>
3. Kusbiantoro D, Purwaningrum Y. Pemanfaatan kandungan metabolit sekunder pada tanaman kunyit dalam mendukung peningkatan pendapatan masyarakat. Jurnal Kultivasi. 2018;17(1):544-549.
4. Baud GS, Sangi MS, Koleangan HSJ. Analisis senyawa metabolit sekunder dan uji toksisitas ekstrak etanol batang tanaman patah tulang (*Euphorbia tirucalli L.*) dengan metode Brine Shrimp Lethality Test (BSLT). Jurnal Ilmiah Sains. 2014;14(2):107-112.
5. Sianturi P, Lenny S, Marpaung L. Isolasi senyawa flavonoida dari kulit batang tumbuhan balik angin (*Macaranga recurvate Gage*). Jurnal Saintia Kimia. 2013;1(2):1-6.
6. Ekawati MA, Suirta IW, Santi SR. Isolasi dan identifikasi senyawa flavonoid pada daun semburan (*Paederia foetida L*) serta uji aktivitasnya sebagai antioksidan. Jurnal Kimia. 2012;11(1):43-48.
7. Mukhriani. Ekstraksi, pemisahan senyawa, dan identifikasi senyawa aktif. Jurnal Kesehatan. 2014;7(2):361-367.
8. Darmawati AAK, Bawa IGAG, Suirta IW. Isolasi dan identifikasi senyawa golongan flavonoid pada daun nangka (*Artocarpus heterophyllus Lmk*) dan aktivitas antibakteri terhadap bakteri *Staphylococcus aureus*. Jurnal Kimia. 2015;9(2):203-210.
9. Hepni. Isolasi dan identifikasi senyawa flavonoid dalam daun kumak (*Lactuca indica L.*). Jurnal Dunia Farmasi. 2019;4(1):17-22.
10. Aisyah, Rudiyansyah, Destiarti L. Isolasi dan karakterisasi senyawa

flavonoid dari fraksi etil asetat batang tumbuhan senggani (*Melastoma malabathricum L.*). Jurnal Kimia Khatulistiwa. 2019;8(2):61-66.

11. Maulana EA, Asih IARA, Arsa M. Isolasi dan uji aktivitas antioksidan senyawa flavonoid dari ekstrak daun jambu biji putih (*Psidium guajava Linn*). Jurnal Kimia. 2016;10(1):161-168.