

# ISOLASI FLAVONOID DARI EKSTRAK METANOL *Drymaria cordata* Willd SEBAGAI BAHAN PEMBELAJARAN FITOKIMIA

Lusia Oktora Ruma Kumala Sari

**Abstract.** *Due to develop the potentiation of Drymaria cordata Willd. as a medicine from natural product, an experiment was done to isolate the flavonoid from this plant. Flavonoid isolated by extraction with methanol, followed with fractionation using ethyl acetat and ethanol. Examination of ethanol fraction by thin layer chromatography with stationary phase silica gel GF<sub>254</sub> and mobile phase 15 % acetic acid showed phenolic compound on detection with FeCl<sub>3</sub> and gave yellow colour with amonia that identify flavonoid compound. Purification has done using column chromatography and paper chromatography. The structure of two isolated compounds was identified by ultraviolet spectrophotometry. This experiment can be used as laboratory practice or studied material on Phytochemistry*

*Key words : Drymaria cordata Willd., flavonoid, isolation*

## PENDAHULUAN

Fitokimia merupakan bidang ilmu yang mempelajari metode analisis tumbuhan dan identifikasi komponen senyawa kimia dalam tumbuhan, ekstraksi, pemisahan serta identifikasi dan penentuan struktur senyawa kimia dalam tumbuhan. Untuk dapat memahami proses ekstraksi dan isolasi senyawa kimia dalam tumbuhan maka perlu dilakukan praktek di laboratorium.

*Drymaria cordata* Willd. telah dikenal dalam pengobatan tradisional sebagai katartika, obat demam, dan obat bisul.<sup>12,23</sup> Tanaman ini juga diketahui mempunyai daya antitussive.<sup>17</sup> Penelitian tentang kandungan kimia *Drymaria cordata* Willd. pernah dilaporkan oleh Yuan pada tahun 1987 dan diketahui mengandung flavonoid.<sup>25</sup> Dalam buku Inventaris Tanaman Obat Indonesia disebutkan *Drymaria cordata* Willd. mengandung alkaloid dan polifenol.<sup>23</sup> Tumbuhan ini juga mengandung peptida siklik drymarins A dan drymarins B.<sup>4</sup>

Beberapa turunan flavonoid diperkirakan memiliki daya provitamin P (=permeabilitas) antara lain rutin yang berkhasiat mengurangi fragilitas pembuluh-pembuluh kapiler dan permeabilitas untuk eritrosit. Golongan isoflavon seperti 7,4' dihidroksi isoflavon (daedzein) dan 5,7,4' trihidroksi isoflavon (genistein) menunjukkan sifat estrogenik lemah.<sup>11</sup> Oleh karena itu kandungan kimia dari *Drymaria cordata* Willd.

perlu diekstraksi dan diisolasi terutama senyawa flavonoid yang kemungkinan mempunyai peran dalam aktivitasnya. Proses ekstraksi dan isolasi flavonoid dari ekstrak metanol *Drymaria cordata* Willd. ini dapat menjadi model praktikum atau bahan pembelajaran dalam mata kuliah Fitokimia.

## **METODE PENELITIAN**

### **A. Bahan dan Alat**

Penelitian ini menggunakan bahan serbuk kering herba *Drymaria cordata* Willd, metanol, etil asetat, etanol, Sephadex LH-20, silika gel GF 254 Aluminium percoated (E.Merck), heksana, etil asetat, t-butanol, asam asetat, FeCl<sub>3</sub>, kertas Whatman No. 3 (E. Merck), t-butanol, Kertas Toyo No.51 (Toyo Roshi Kaisha, LTD), n-butanol, NaOH 2 M, Natrium asetat (NaOAc), Asam borat (H<sub>3</sub>BO<sub>3</sub>), Aluminium klorida (AlCl<sub>3</sub>), dan Asam klorida (HCl).

Alat-alat yang digunakan antara lain adalah corong Buchner, Vakum rotavapor, vortex, sentrifuge, Kolom kromatografi, Bejana kromatografi, pipa kapiler, lampu UV, *Sinterred glass*, dan Spektrofotometer ultraviolet (Milton-Roy Spectronic 3000 Array).

### **B. Jalannya Penelitian**

Penyarian bahan dilakukan secara maserasi terhadap serbuk kering *Drymaria cordata* Willd dengan metanol teknis 600 ml selama 6 jam. Maserasi dilakukan sebanyak tiga kali, lalu ekstrak metanol dikeringkan. Ekstrak metanol di tambah 50 ml etil asetat lalu divortex. Endapan tidak larut etil asetat dipisahkan dengan sentrifugasi. Endapan tak larut etil asetat ditambah 50 ml etanol lalu divortex, endapan tak larut etanol dipisahkan dengan sentrifugasi.

Fraksi etil asetat diperiksa secara kromatografi lapis tipis dengan fase diam silika gel GF 254 dan fase gerak heksan-etil asetat (2:1 v/v). Fraksi etanol dan endapan tak larut etanol diperiksa secara kromatografi lapis tipis dengan fase diam silika gel GF 254 dan fase gerak asam asetat 15 %. Deteksi kromatogram dilakukan dengan sinar UV 254 nm, 366 nm, uap amonia, dan pereaksi semprot FeCl<sub>3</sub>.

Fraksi etanol dilarutkan dalam metanol lalu ditempatkan dengan hati-hati diatas permukaan fase diam (Sephadex LH-20). Elusi terhadap fraksi etanol dilakukan dengan menggunakan fase gerak metanol.

Fraksi nomor 1, 7, 13, 19, dan seterusnya diperiksa secara kromatografi lapis tipis dengan fase diam silika gel GF<sub>254</sub> dan fase gerak t-butanol –asam asetat-air (6:1:1  $\nu/\nu$ ). Deteksi terhadap kromatogram dilakukan di bawah sinar UV 366 nm sebelum dan sesudah diuapi amonia. Fraksi yang mengandung flavonoid disatukan lalu dipekatkan dengan diangin-anginkan.

Fraksi mengandung flavonoid dilarutkan dalam metanol lalu ditotolkan membentuk garis pada kertas Whatman No.3 lalu dikembangkan dengan fase gerak t-butanol-asam asetat-air (6:1:1  $\nu/\nu$ ). Pengembangan dilakukan 3 x 18 cm. Kromatogram berupa garis berfluoresensi kuat digunting, diekstraksi dengan metanol lalu disaring dengan *sinterred glass*.

Isolat ditotolkan pada kertas lalu dielusi dengan fase gerak BAW (4:1:5  $\nu/\nu$  fase atas), etanol-air (1:1), dan asam asetat 30%. Deteksi kromatogram dilakukan dibawah sinar UV 366 nm kemudian diuapi amonia lalu diperiksa lagi dibawah sinar UV 366 nm.

Tiap-tiap isolat flavonoid yang sudah murni secara kromatografi dilarutkan dalam metanol secukupnya dan dilakukan pencatatan spektrum melalui tahapan sebagai berikut:

- (1). Isolat flavonoid dalam metanol dimasukkan dalam kuvet sampel dan ke dalam kuvet pembanding ditambahkan metanol. Pencatatan spektra dilakukan pada panjang gelombang 200-500 nm.
- (2). Spektrum NaOH direkam segera setelah penambahan 3 tetes larutan NaOH 2N. Untuk memeriksa apakah ada penguraian spektrum NaOH diperiksa lagi setelah 5 menit, kemudian cuplikan dibuang dan kuvet yang telah dicuci diisi dengan larutan isolat persediaan.
- (3). Spektrum AlCl<sub>3</sub> direkam setelah penambahan 6 tetes larutan AlCl<sub>3</sub> pada isolat flavonoid, selanjutnya rekam spektrum AlCl<sub>3</sub> /HCl setelah penambahan 3 tetes HCl, kemudian dibuang.
- (4). Spektrum NaOAc direkam dengan cara serbuk NaOAc dimasukkan dalam kuvet berisi 2-3 ml isolat flavonoid sedemikian rupa sampai terdapat kira-kira 2 mm lapisan NaOAc pada dasar kuvet lalu digojog. Pencatatan spektra dilakukan setelah 2

menit penambahan NaOAc. Pada tahap ini dapat diperiksa apakah cuplikan terurai dengan berjalannya waktu.

(5). Spektrum NaOAc/H<sub>3</sub>BO<sub>3</sub> dikerjakan dengan cara tergantung ada tidaknya dekomposisi flavonoid pada penambahan NaOH setelah 5 menit (cara (1)). Jika tidak terjadi dekomposisi dikerjakan dengan cara i, bila terjadi dekomposisi dikerjakan dengan cara ii.

Cara i. Serbuk H<sub>3</sub>BO<sub>3</sub> ditambahkan pada kuvet yang berisi larutan isolat flavonoid dan NaOAc (dari tahap 4) sehingga diperoleh larutan jenuh kemudian direkam. Cara ii. Lima tetesan larutan H<sub>3</sub>BO<sub>3</sub> dimasukkan ke kuvet berisi 2 ml isolat flavonoid, larutan dijenuhkan secepatnya dengan serbuk kasar NaOAc lalu direkam. Pencatatan spektra pada kecepatan 200 nm per menit.

Isolat yang diperoleh diidentifikasi berdasarkan data kromatografi, bentuk spektrum flavonoid dalam metanol, panjang gelombang pita serapan, dan perubahan spektrum yang disebabkan pergeseran. Pendekatan struktur dilakukan menggunakan acuan buku-buku standar untuk flavonoid yaitu karangan Mabry (1970), Markham (1988), dan Geissman (1962).

## **HASIL PENELITIAN DAN PEMBAHASAN**

Fraksinasi dengan etil asetat menghasilkan fraksi etil asetat seberat 8,00 g, sedangkan fraksi etanol yang diperoleh sebesar 5,91 g. Endapan tak larut etanol seberat 7,05 g. Fraksi etil asetat, fraksi etanol, dan endapan tak larut etanol masing-masing dianalisa secara kromatografi lapis tipis.

Kromatogram dari fraksi etil asetat tidak menunjukkan perubahan warna setelah diuapi amonia, hal ini menunjukkan bahwa fraksi etil asetat tidak mengandung flavonoid. Kromatogram fraksi etanol menunjukkan peningkatan intensitas warna kuning setelah diuapi amonia, ini menunjukkan bahwa fraksi etanol mengandung flavonoid, ini dipertegas dengan hasil penyemprotan FeCl<sub>3</sub> yang memberikan warna ungu tua yang menunjukkan adanya senyawa fenol. Oleh karena hanya fraksi etanol yang diketahui mengandung flavonoid maka fraksi etanol ini yang digunakan dalam perlakuan selanjutnya.

Fraksi etanol dipisahkan dengan kromatografi kolom menggunakan fase diam Sephadex LH-20 dan fase gerak metanol. Komponen-komponen fase etanol terpisah

berdasarkan bobot molekulnya. Komponen dengan bobot molekul kecil akan tertahan di pori-pori fase diam sehingga tertahan lebih lama di dalam kolom, sedangkan komponen sampel yang terlalu besar untuk masuk ke dalam pori akan segera terelusi keluar. Metode pemisahan ini merupakan salah satu penerapan *Size-exclusion Chromatography*.

Fraksi-fraksi hasil kromatografi kolom diperiksa dengan kromatografi lapis tipis dengan fase diam silika gel GF<sub>254</sub> dan fase gerak t-butanol-asam asetat-air (6:1:1 v/v). Deteksi kromatogram dengan sinar UV 366 nm sebelum dan sesudah diuapi amonia menunjukkan bahwa fraksi 13 sampai dengan fraksi 31 mengandung flavonoid. Fraksi 13-31 menunjukkan kromatogram yang sama, oleh karena itu fraksi-fraksi tersebut disatukan. Nilai utama kromatografi lapis tipis pada penelitian flavonoid ialah sebagai cara analisis cepat yang memerlukan bahan sangat sedikit

Proses isolasi senyawa flavonoid dilakukan secara kromatografi kertas preparatif. Penotolan dilakukan dalam bentuk garis yang memanjang atau pita pada kertas Whatman No.3. Fase gerak yang digunakan adalah t-butanol-asam asetat-air (6:1:1 v/v) dan dilakukan pengembangan 3x 18 cm. Alasan penggunaan kromatografi kertas adalah warna alami dari flavonoid di bawah sinar tampak maupun sinar ultraviolet membuat flavonoid mudah dikenali di kertas.

Deteksi kromatogram dilakukan dibawah sinar UV 366 nm. Kromatogram berupa pita-pita yang telah terpisah. Dua pita dengan fluoresensi biru masing-masing dipotong kemudian diekstraksi dengan metanol, lalu disaring dengan *sinterred glass* untuk memisahkan kertas dari isolat. Selanjutnya hasil ekstraksi ini disebut isolat I, dan II.

Uji kemurnian untuk isolat I dan II digunakan fase gerak BAW (4:1:5 v/v fase atas ), asam asetat 30 %, dan etanol-air (1:1 v/v). Pada pengembangan dengan fase gerak BAW (4:1:5 v/v fase atas ), isolat I dan II memberikan Rf 0,45 dan 0,47. Pengembangan dengan fase gerak asam asetat 30 % memberikan Rf 0,84 dan 0,81. Pengembangan dengan fase gerak etanol-air (1:1 v/v) memberikan Rf 0,85 untuk isolat I dan Rf 0,80 untuk isolat II. Warna yang ditunjukkan oleh kromatogram isolat I, dan II sebelum dan sesudah diuapi amonia ditunjukkan oleh tabel di bawah ini.

Data warna kromatogram dan penafsirannya

Senyawa	UV 366 nm Sebelum diuapi	UV 366 nm Setelah diuapi	Jenis flavonoid yang mungkin

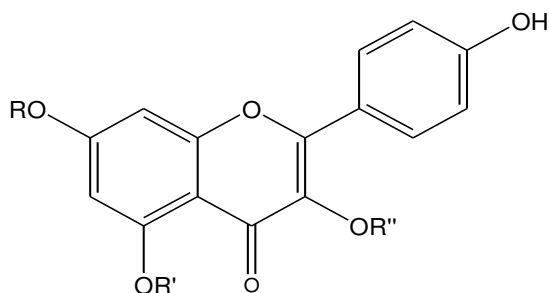
	amonia	amonia	
Isolat I	Fluoresensi biru muda	Fluoresensi hijau-biru	-Flavon atau flavanon yang tidak mengandung 5-OH -Flavonol tanpa 5-OH bebas tapi tersulih pada 3-OH
Isolat II	Fluoresensi biru muda	Fluoresensi biru muda	Isoflavon yang tidak mengandung 5-OH bebas

Pada analisis spektroskopi ultraviolet terhadap isolat I di peroleh data sebagai berikut :

Data spektra UV isolat I

Pereaksi	Puncak I(nm)	Puncak II(nm)	Pergeseran		Penafsiran
			Puncak I	Puncak II	
MeOH	338	265	-	-	Flavon atau flavonol dengan 3-OH ter-substitusi
NaOH	388	265	+ 50 nm	-	4' -OH bebas
NaOAc	338	265	-	-	tidak ada 7-OH bebas
NaOAc/ H <sub>3</sub> BO <sub>3</sub>	338	265	-	-	tidak ada o-dihidroksi pada cincin B maupun cincin A
AlCl <sub>3</sub>	338	265	-	-	tidak ada 5-OH
AlCl <sub>3</sub> /HCl	338	265	-	-	tidak ada o-dihidroksi pada cincin B

Berdasarkan analisis warna kromatogram dan analisis spektroskopi ultraviolet, maka disarankan struktur parsial isolat I adalah turunan 3,5,7,4'-tetrahidroksi flavon dimana atom H pada C-3, C-5, dan C-7 dalam keadaan terglisosilasi.



Struktur parsial Isolat I, suatu turunan 3,5,7,4'-tetrahidroksi flavon

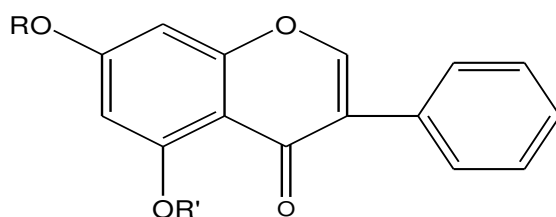
R, R', R'' : gula

Pada analisis spektroskopi ultraviolet terhadap isolat II di peroleh data sebagai berikut :

Data Spektra UV isolat II

Peraksi	Puncak I(nm)	Puncak II(nm)	Pergeseran		Penafsiran
			Puncak I	Puncak II	
MeOH	330 <sup>sh</sup>	267.5	-	-	Isoflavon
NaOH	330 <sup>sh</sup>	267,5	-	-	Tidak ada OH pada cincin A
NaOAc	330 <sup>sh</sup>	267,5	-	-	Tidak ada 7-OH
NaOAc/ H <sub>3</sub> BO <sub>3</sub>	330 <sup>sh</sup>	267,5	-	-	Tidak ada o-dihidroksi pada cincin B maupun cincin A
AlCl <sub>3</sub>	330 <sup>sh</sup>	267,5	-	-	Tidak ada 5-OH
AlCl <sub>3</sub> /HCl	330 <sup>sh</sup>	267,5	-	-	Tidak ada o-dihidroksi cincin B

Berdasarkan analisis warna kromatogram dan spektroskopi ultraviolet, maka disarankan struktur parsial untuk isolat II adalah turunan 5,7-dihidroksi flavon dengan atom H pada C-5 dan C-7 terglisosilasi.



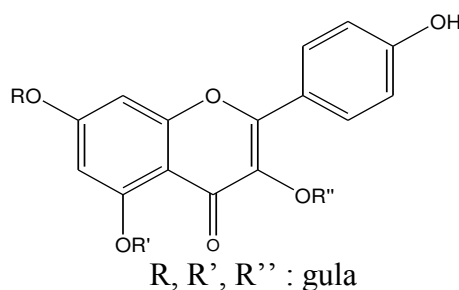
Struktur parsial isolat II, suatu turunan 5,7-dihidroksiisoflavon

R, R' : gula

## KESIMPULAN

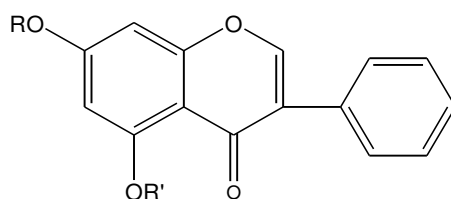
Pada isolasi dan identifikasi senyawa flavonoid dari ekstrak metanol *Drymaria cordata* Willd. dalam penelitian ini diperoleh senyawa-senyawa sebagai berikut :

1. Golongan flavon atau flavonol yaitu turunan 3,5,7,4'-tetrahidroksi flavon, dalam hal ini atom H pada C-3, C-5, dan C-7 dalam keadaan terglisosilasi.



R, R', R'' : gula

2. Golongan isoflavon yaitu turunan 5,7-dihidroksiisoflavon dengan atom H pada C-5 dan C-7 terglisosilasi.



R, R' : gula

3. Proses ekstraksi dan isolasi Flavonoid dari Ekstrak Metanol *Drymaria cordata* Willd. dapat digunakan sebagai bahan ajar dalam mata kuliah Fitokimia.



## DAFTAR PUSTAKA

- Achmad, S.A., E.H.Hakim., L.Makmur., 1990, Flavonoid dan Phyto Medica, Kegunaan dan Prospek, *Phyto Medica*, ISSN.085-176X, Vol 1, No.2, Yayasan Pengembangan Obat Bahan Alam Phyto Medica, Jakarta,120-127
- Anonim, 1986, *Medicinal Herb Index in Indonesia*, PT.Eesai Indonesia, 32
- Braun, R.D., 1987, *Introduction of Instrumental Analisis*, 1<sup>st</sup> prit, Mac Graw-Hill Book Company, New York, 879-881
- Dig, Z., Zou, J., Tan, N., Teng, R., *Two New Cyclic Peptides from Drymaria diandra*, *Planta Med* 2000 May; 66(4):386-8, <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?CMD=Text&DB=PubMed>
- Farnsworth, N.R., 1966, Biological and Phytochemical Screening of Plants, *Jour. of Pharm. Sci.*, Vol. 55, No.3, 225-276
- Geissman, T.A., 1962, *The Chemistry of Flavonoid Compounds*, The Mac Millan Company, New York, 1-5, 41-60, 70-103
- Goodwin, T.M., 1962, *Chemistry and Biochemistry of Flavonoid Compounds*, The Mac Millan Company, New York, 7-9, 71
- Hagerman, A.E., 1998, *Sephadex LH 20*, <http://www.muohio.edu/~hagermae/purif/sephlh20.html>.
- Harborne, J.B., 1967, *Comparative Biochemistry of the Flavonoids*, Academic Press, London, 135, 145
- Harborne, J.B., and Mabry, T.J., 1975, *The Flavonoids*, Chapman and Hall, London, 101-102
- Harborne, J.B., 1987, *Metode Fitokimia, Penuntun Cara Modern Menganalisis Tumbuhan*, diterjemahkan oleh Kosasih Padmawinata dan Imam Sudiro, Edisi II,ITB, Bandung, 9-10, 20, 70-72, 94
- Heyne, K., 1987, *Tumbuhan Berguna Indonesia*, Jilid II, Cetakan ke-1, Terjemahan, Litbang Departemen Kehutanan, Yayasan Sarana Wana Jaya, Jakarta, 749
- Kang, S.S., Y.Y. Kang, M.W. Lee., 1991, Flavonoids from *Epimedium koreanum*, *Jour. of Nat. Prod.*, Vol 54, No.2, 542-546
- Mabry, A.J., Markham, K.R., Thomas, M.B., 1970, *The Systematic Identification of Flavonoids*, Springer, Verlag, Berlin, 11-55, 165-171
- Macek, K., 1972, *Pharmaceutical Applications of Thin Layer and Paper Chromatography*, Elsevier Publishing Company, Amsterdam, 32-37

- Markham, K.R., 1988, *Cara Mengidentifikasi Flavonoid*, (Terjemahan), Penerbit ITB, Bandung, 1-53
- Mukherjee, P.K., Saha K., Battacharya S., Giri S.N., Pal M., Saha B.P., 1997, *Studies on Antitussive Activity of Drymaria cordata Willd. (Caryophyllaceae)*, Department of Pharmaceutical Technology, Jadavpur University, Calcuta, India, <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?CMD=Text&DB=PubMed>
- Robinson, T., 1995, *Kandungan Organik Tumbuhan Tinggi*, diterjemahkan oleh Kosasih Padmawinata, Penerbit ITB, Bandung, 208-213.
- Roth, H.J., dan Blaschke, G., 1988, *Analisis Farmasi*, diterjemahkan oleh Sarjono Kisman dan Slamet Ibrahim, Edisi kedua, Gadjah Mada University Press, Yogyakarta, 419
- Seikel, M.K., *Chromatographic Methods of Separation, Isolation and Identification of Flavonoid Compounds*, In Geissman, T.A., (Ed), *The Chemistry of Flavonoid Compounds*, The Mac Millan Company, New York, 34-64
- Skoog, D.A., and West, D.M., 1980, *Principles of Instrumental Analysis*, 2<sup>nd</sup> Edition, Saunders College, Philadelphia, 702-705
- Stahl, E., 1985, *Analisis Obat Secara Kromatografi dan Mikroskopi*, diterjemahkan oleh Padmawinata K., Soediro, Penerbit ITB, Bandung, 3-17
- Syamsuhidayat, S.S. dan Hutapea, J.R., 1997, *Inventaris Tanaman Obat Indonesia*, Departemen Kesehatan dan Pengembangan Kesehatan, Jakarta, 59-60
- Willard, H.H., Merrit, L.L.Jr, Dean, J.A., Settle, F.A.Jr, 1981, *Instrumental Methods of Analysis*, 6<sup>th</sup> Edition, Wadsworth Publishing Company, Belmont, California, 553-557
- Yuan, A.X., 1987, *Chemical Constituent of Drymaria cordata*, *Chung Yao Tung Pao* Jan; 12 (1) : 36-7, <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?CMD=Text&DB=PubMed>