

Isolasi senyawa flavonoid dari ekstrak etanol kelopak bunga rosella (*hibiscus sabdariffa linn*) menggunakan metode sonikasi

Fitra Amanda

Program Studi Kimia, Universitas Islam Negeri Maulana Malik Ibrahim Malang

e-mail: fitraamanda17@gmail.com

Kata Kunci:

rosella; flavonoid; sonikasi; hidrolisis; fitokimia

Keywords:

rosella; flavonoids; sonication; hydrolysis; phytochemicals

ABSTRAK

Rosella (*Hibiscus sabdariffa L.*) merupakan tanaman yang tergolong famili Malcaveae dan dapat tumbuh di wilayah tropis misalnya di Indonesia. Kelopak bunga rosella memiliki kandungan senyawa metabolit sekunder flavonoid seperti antosianin. Tujuan dari penelitian ini adalah untuk mengisolasi, uji fitokimia, dan karakterisasi senyawa flavonoid dalam kelopak bunga rosella. Isolasi dilakukan menggunakan metode sonikasi 42 kHz selama 15 menit dengan pelarut etanol 96% dengan berat rendemen sebesar 39,117% dan berat hidrolat hasil hidrolisis menggunakan HCl 2N sebesar 42,117%. Hasil hidrolat dipartisi dengan air dan kloroform dengan perbandingan 1:1, kemudian dilakukan uji fitokimia flavonoid diperoleh perubahan warna larutan menjadi merah kecokelatan yang menandakan positif mengandung flavonoid. Selanjutnya, isolasi senyawa menggunakan KLT Preparatif dan diamati dengan sinar UV pada λ 245 nm dan λ 366 nm. Hasil yang diperoleh menunjukkan bahwa pada λ 245 nm diperoleh warna hijau dengan Rf 0,72 dan pada λ 366 nm diperoleh warna ungu dengan Rf 0,86. Identifikasi d UV-Vis diperoleh λ _{maks} pada 268,9 nm dengan nilai absorbansi sebesar 0,182. Hasil FT-IR menunjukkan adanya serapan khas gugus C=C stretching pada bilangan gelombang 1644,930 cm⁻¹ dan stretching gugus C-OH pada bilangan gelombang 1045,9 cm⁻¹.

ABSTRACT

Rosella (*Hibiscus sabdariffa L.*) is a plant belonging to the Malcaveae family and can grow in tropical areas such as Indonesia. Rosella flower petals contain flavonoid secondary metabolite compounds such as anthocyanins. The purpose of this study was to isolate, test, and characterise flavonoid compounds in rosella petals. Isolation was carried out using the sonication method at 42 kHz for 15 minutes with 96% ethanol solvent with a yield weight of 39.117% and the weight of hydrolyzate from hydrolysis using 2N HCl of 42.117%. The hydrolyzate was partitioned with water and chloroform in a ratio of 1:1, and then a flavonoid phytochemical test was carried out to obtain a change in the colour of the solution to red-brown, which indicates that it is positive for flavonoids. Furthermore, the isolation of compounds using preparative KLT was observed with UV light at λ 245 nm and λ 366 nm. The results obtained showed that at λ 245 nm, a green colour was obtained with Rf 0.72, and at λ 366 nm, a purple colour was obtained with Rf 0.86. Identification with a UV-Vis spectrophotometer obtained a maximum at λ 268.9 nm with an absorbance value of 0.182. FT-IR results showed a typical absorption of the C=C stretching group at wave number 1644.930 cm⁻¹ and the C-OH stretching group at wave number 1045.9 cm⁻¹.



This is an open access article under the CC BY-NC-SA license.

Copyright © 2023 by Author. Published by Universitas Islam Negeri Maulana Malik Ibrahim Malang.

Pendahuluan

Rosella (*Hibiscus sabdariffa* Linn) merupakan salah satu tumbuhan yang termasuk dalam family *Malvaceae* dan dapat tumbuh di wilayah tropis (seperti Indonesia). Penelitian sebelumnya melaporkan bahwa bunga rosella memiliki kandungan gossipetin, bibiscin, antosianin hibiscus, glukosida, dan asam protocatechuic *hibiscus* (Halimatul et al., 2007). Kelopak bunga rosella sering digunakan sebagai obat tradisional, seperti dalam gangguan pencernaan, batuk, penurunan tekanan darah, dan perangsang gerak peristaltik usus (Suzery et al., 2010). Kelopak bunga rosella mengandung senyawa metabolit sekunder flavonoid (Mardiah et al., 2010). Senyawa flavonoid diduga mampu berperan sebagai antioksidan kuat (Suradji et al., 2016). Selain itu flavonoid juga mempunyai peranan penting dalam kesehatan, di antaranya aterosklerosis, menurunkan risiko serangan kardiovaskuler, dan tekanan darah (Jawad et al., 2013).

Flavonoid merupakan senyawa fenolik yang terdapat di alam dengan potensi sebagai antioksidan dan kemampuan bioaktifitas sebagai obat. Flavonoid tergolong senyawa polar yang memiliki beberapa gugus hidroksil sehingga dapat larut dalam pelarut-pelarut polar seperti air, metanol, etanol, butanol, aseton, dan dimetilformamida (Arifin & Ibrahim, 2018). Flavonoid merupakan metabolit sekunder polifenol yang sering dijumpai pada tanaman yang memiliki manfaat sebagai antivirus, anti inflamasi, antikanker dan antioksidan (Panche et al., 2016). Oleh karena banyaknya manfaat dari flavonoid dalam bunga rosella, maka perlu dilakukan isolasi dan karakterisasi senyawa flavonoid yang terdapat dalam bunga rosella (*Hibiscus sabdariffa* Linn).

Beberapa cara yang dapat dilakukan dalam mengisolasi flavonoid dari bunga rosella, salah satunya dengan metode sonikasi. Metode sonikasi merupakan salah satu metode ekstraksi yang memanfaatkan gelombang ultrasonik. Ultrasonik adalah energi yang berasal dari gelombang suara yang memiliki frekuensi di atas kemampuan deteksi telinga manusia, yaitu di atas 20 kHz hingga 500 kHz (Thangavadivel et al., 2008; Thompson & Doraiswamy, 1999). Metode ini digunakan untuk mendapatkan kandungan antioksidan yang lebih banyak dalam waktu yang lebih singkat. Dengan bantuan ultrasonik proses ekstraksi senyawa pada tumbuhan dengan pelarut organik dapat berlangsung lebih singkat. Biasanya, proses ekstraksi bahan alam dilakukan menggunakan metode maserasi. Namun penggunaan metode maserasi menghasilkan rendemen yang lebih rendah dan berjalan lambat sehingga kurang efisien (Sholihah, 2017). Penentuan kadar flavonoid dari kelopak bunga rosella menggunakan metode sonikasi telah dilakukan oleh (Djaeni et al., 2017) dan dihasilkan %yield sebesar 44,856% sedangkan penelitian yang dilakukan oleh (Suradji et al., 2016) yakni menentukan kadar flavonoid dari bunga rosella menggunakan metode maserasi diperoleh %rendemen sebesar 12,703%. Hal ini menunjukkan bahwa metode sonikasi lebih efisien dibandingkan dengan maserasi. Oleh karena itu dalam penelitian digunakan metode ekstraksi sonikasi untuk mengisolasi senyawa flavonoid yang terdapat dalam bunga rosella. Berdasarkan penjelasan di atas, maka akan dilakukan isolasi senyawa flavonoid dari kelopak bunga rosella (*Hibiscus sabdariffa* L.) menggunakan kromatografi lapis tipis preparatif. Hasil

isolat flavonoid selanjutnya akan diidentifikasi menggunakan beberapa alat instrumen seperti spektrofotometer UV-Vis dan FT-IR.

Bahan dan Metode

1. Bahan

Bahan-bahan yang digunakan meliputi kelopak bunga rosella (*Hibiscus sabdariffa* L.), larutan HCl 2M, metanol, akuades, kloroform, logam Mg, etanol 96%, dan CDCl_3 .

2. Preparasi Sampel

Kelopak bunga rosella (*Hibiscus sabdariffa* Linn) disiapkan dan dibersihkan dengan air yang mengalir. Berikutnya, diangin-anginkan dalam suhu ruang untuk proses pengeringan. Kelopak bunga rosella kering kemudian dihaluskan dengan blender, lalu bubuknya discreening dengan ayakan 90 mesh. Bubuk kelopak bunga rosella disimpan pada temperatur ruang dan di letakkan pada ruangan gelap sebelum digunakan.

3. Ekstraksi Menggunakan Metode Sonikasi

Sampel rosella halus ditimbang sebesar 50 gram, lalu dimasukkan ke dalam gelas beker 250 mL. Kemudian ditambahkan metanol sebanyak 300 mL. Selanjutnya ditutup menggunakan alumunium foil. Setelah itu dilakukan ultrasonikasi pada campuran dengan setting 15 menit pada suhu 40°C. Campuran yang sudah diekstraksi kemudian disaring dengan corong Buchner untuk diambil filtrat. Filtrat yang didapat kemudian dipisahkan dari pelarutnya menggunakan rotary evaporator pada suhu 60°C hingga didapat ekstrak kasar berbentuk pasta. Ekstrak kasar yang didapat kemudian dipindah ke dalam gelas beker 100 ml dan dibiarkan di dalam lemari asam agar metanol yang masih tersisa menguap.

4. Hidrolisis dan Partisi

Ekstrak kasar yang diperoleh dalam gelas beker 100 mL ditambahkan HCl 2N untuk dihidrolisis. Kemudian dijenuhkan dengan NaHCO_3 . Hidrolisat yang diperoleh dimasukkan ke dalam corong pisah kemudian dimasukkan pelarut kloroform dan air dengan perbandingan 1:1 sebanyak 25 mL. Selanjutnya ditimbang ekstrak pekat yang diperoleh dan dihitung hasil rendemennya.

5. Uji Fitokimia Flavonoid

Ekstrak rosella yang telah dihidrolisis ditimbang sebanyak 0,1 g dan dimasukkan dalam tabung reaksi. Selanjutnya dilarutkan dengan etanol 70% sebanyak 1-3 mL. Kemudian larutan diberi 0,1 g logam Mg dan ditetes HCl pekat sebanyak 2 tetes. Hasil positif bila larutan menghasilkan warna merah atau jingga yang mengindikasikan terdapat senyawa golongan flavonoid.

6. Pemisahan dan Pemurnian dengan KLT Preparatif

Pemisahan yang dilakukan menggunakan metode KLT menggunakan plat silika GF254 ukuran 10×20 cm sebagai media (fasa diam). Ekstrak pekat dari sampel dilarutkan pada etanol 80%, lalu ditotolkan panjang plat pada jarak 1 cm dari garis dan 1 m dari kedua garis tepi. Setelah itu, dikeringkan plat yang telah ditotol larutan sampel menggunakan

hair dyer. Dielusi menggunakan larutan etanol : kloroform dengan perbandingan (4:1) sehingga akan terbentuk noda berdasarkan Rf tersebut. Selanjutnya, plat hasil elusi dikeringkan dan diamati menggunakan sinar UV pada λ 254 nm dan λ 366 nm.

7. Karakterisasi Senyawa Flavonoid Menggunakan Spektrofotometer UV-Vis

Filtrat hasil monitoring menggunakan KLTP diencerkan menggunakan methanol, kemudian absorbansinya dianalisis pada λ 200-800 nm. Setelah itu, pergeseran puncak serapan yang terjadi diamati dalam spektrofotometer UV-Vis.

8. Karakterisasi Senyawa Flavonoid Menggunakan Spektrofotometer FT-IR

Gugus fungsi pada senyawa isolat dikarakterisasi dengan spektrofotometer FT-IR. Filtrat hasil monitoring menggunakan KLTP dicampur KBr, lalu digerus dalam mortar agate. Kemudian campuran sampel tersebut dibentuk pellet. Setelah itu, pelet diletakkan pada *cell holder* yang terletak dalam instrumen FT-IR dan dibuat spektrum FT-IR pada rentang bilangan gelombang 4000 – 400 cm^{-1} .

Pembahasan

Preparasi Sampel

Proses preparasi sampel bertujuan untuk meminimalisir adanya pengotor sehingga tidak mengganggu proses analisis dengan cara mengeliminasi komponen-komponen dari selain analit sehingga diperoleh analit yang bebas kontaminan dan lebih murni. Dalam penelitian ini sampelnya berupa kelopak bunga rosella (*Hibiscus Sabdariffa* Linn). Sampel ini diduga mengandung senyawa metabolit sekunder dari golongan flavonoid. Berdasarkan penelitian sebelumnya kelopak bunga rosella (*Hibiscus Sabdariffa* Linn) mengandung zat-zat aktif meliputi gossypetin, antosianin, dan glukosida hibisci (Malinda & Syakdani, 2020).

Tahap preparasi sampel diawali dengan perlakuan yaitu dicuci sampel bunga rosella menggunakan air bersih. Proses pencucian dilakukan untuk membersihkan sampel bunga rosella dari kotoran yang menempel seperti tanah dan debu. Selanjutnya, sampel bunga rosella dipotong kecil-kecil yang berfungsi untuk meratakan proses pengeringan sampel. Tujuan proses pengeringan sampel yaitu untuk mengurangi kadar air dalam sampel dan meminimalisir adanya kerusakan akibat degradasi mikroorganisme. Pengeringan sampel bunga rosella dengan cara diangin-anginkan supaya tidak merusak kandungan senyawa metabolit sekunder dalam sampel. Proses ini mengakibatkan terjadinya degradasi warna dari merah menjadi merah kecoklatan akibat hilangnya beberapa pigmen warna akibat pengeringan. Metode pengeringan angin atau tanpa sinar matahari berfungsi untuk mengurangi kadar air sampel, sehingga perkembangan enzim dan mikroorganisme berhenti, serta memudahkan proses penghalusan sampel menjadi serbuk (Manoi, 2015). Sampel yang telah dikeringkan lalu dihaluskan menggunakan blender yang berfungsi untuk mendapatkan serbuk sampel bunga rosella dengan ukuran kecil dan halus. Kemudian sampel yang sudah kering dihaluskan yang berfungsi untuk menghomogenkan dan memperluas ukuran partikel agar dapat memaksimalkan sampel pada saat proses ekstraksi, yang mana reaksi tersebut akan berjalan semakin cepat (Fasya et al., 2020). Kemudian serbuk sampel yang sudah halus diayak menggunakan ayakan 90 mesh yang bertujuan untuk memperoleh

serbuk halus dengan ukuran seragam. Sebelum digunakan serbuk bunga rosella hasil preparasi disimpan pada temperatur ruang agar tidak dalam kondisi lembab (Masrihanah, 2020).

Ekstraksi Menggunakan Metode Sonikasi

Proses ekstraksi sampel dilakukan menggunakan metode sonikasi, dimana sonikasi merupakan suatu metode ekstraksi dengan bantuan gelombang ultrasonik. Proses ekstraksi sendiri bertujuan untuk mengekstrak senyawa-senyawa aktif dalam sampel. Ekstraksi kelopak bunga rosella merah (*Hibiscus sabdariffa* Linn) dengan metode sonikasi dilakukan untuk memperoleh ekstrak kasar flavonoid yang terkandung dalam sampel. Ekstrak yang diperoleh dari proses sonikasi berwarna merah. Sedangkan ekstrak yang diperoleh dari hasil pemekatan berwarna merah tua dengan tekstur kental dan lengket dengan bau khas bunga rosella.

Selanjutnya, ekstrak yang diperoleh disaring menggunakan corong Buchner yang bertujuan untuk memisahkan filtrat dengan residu. Filtrat yang diperoleh dari proses penyaringan berwarna merah. Kemudian filtrat dikentalkan menggunakan rotary evaporator yang bertujuan untuk memisahkan filtrat dengan pelarut dengan menguapkan pelarutnya dengan alat tersebut agar diperoleh ekstrak pekat sampel (Fasya et al., 2020). Adapun gambar dari ekstrak kasar bunga rosella sebagai berikut:

Gambar 2.1 Hasil ekstrasi rosella menggunakan sonikasi



Gambar 1. Hasil ekstraksi menggunakan metode sonikasi yaitu a) sebelum dipekatan dan b) setelah dipekatan menggunakan rotary evaporator

Setelah itu, ekstrak pekat bunga rosella (*Hibiscus sabdariffa* Linn) ditimbang dan dihitung rendemennya. Berdasarkan hasil perhitungan diperoleh seperti yang tertera pada tabel 1 berikut:

Tabel 1. Hasil ekstraksi kelopak bunga rosella (*Hibiscus sabdariffa* Linn)

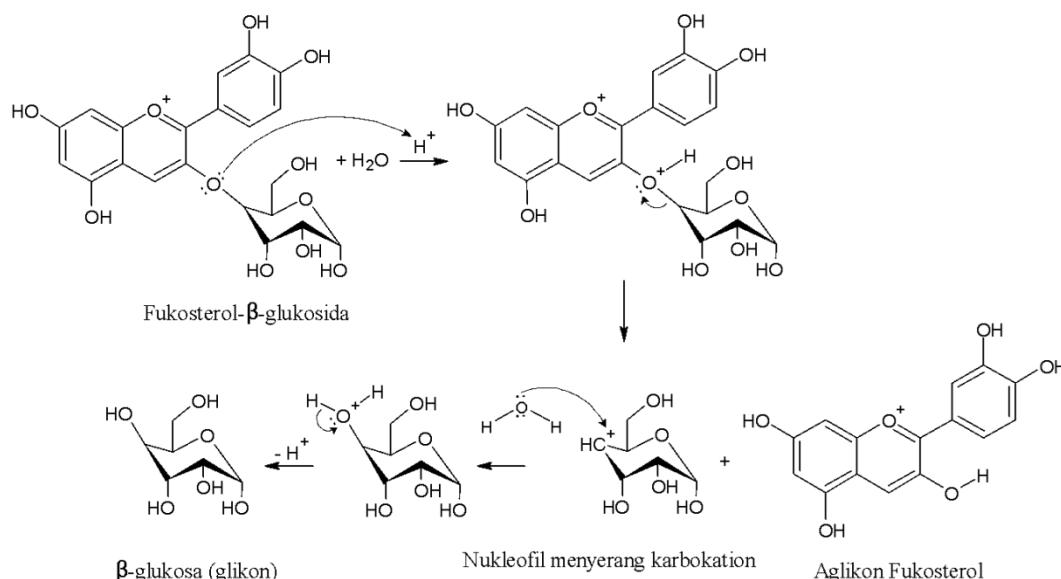
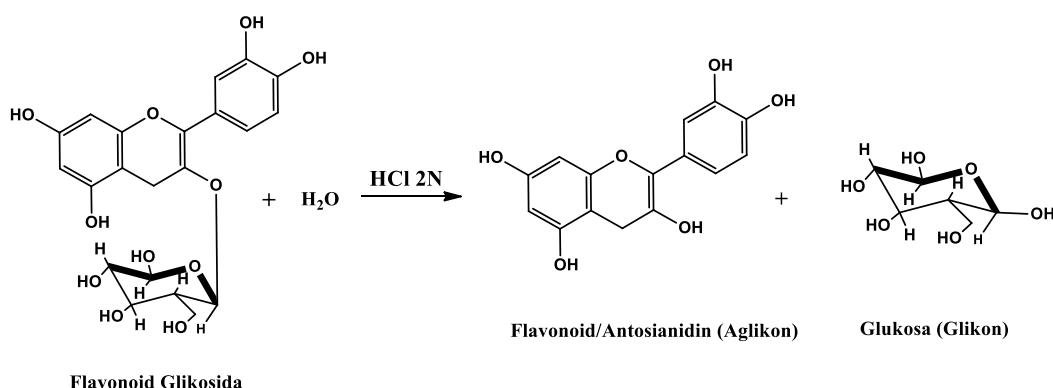
Pelarut Etanol 96%	Warna Ekstrak	Berat Sampel (g)	Berat Ekstrak Pekat (g)	% Rendemen
300 mL	Merah Tua	30	11,91333	39,711

Berdasarkan hasil yang ditunjukkan dalam tabel di atas, % rendemen yang dihasilkan hampir mendekati hasil penelitian yang dilakukan oleh (Djaeni et al., 2017) yang mendapatkan hasil % rendemen sebesar 44,86% dari ekstraksi kelopak bunga rosella (*Hibiscus sabdariffa* Linn) menggunakan metode sonikasi dengan variasi perbandingan bahan : pelarut (1:13) dan waktu ekstraksi selama 60 menit. Adanya perbedaan jumlah % rendemen disebabkan oleh beberapa faktor. Menurut (Sari et al., 2018) peningkatan suhu juga memperbesar hasil rendemen. Namun, jika suhu terlalu tinggi dapat menurunkan hasil rendemen karena senyawa flavonoid memiliki batas suhu 50°C. Selain itu, adanya perbedaan jenis pelarut yang digunakan. Penggunaan pelarut air menghasilkan rendemen yang lebih tinggi karena memiliki sifat yang lebih polar dibandingkan dengan etanol, sehingga senyawa golongan flavonoid lebih banyak larut dalam air. Selain itu, faktor lama waktu ekstraksi juga memengaruhi hasil rendemen. Semakin lama waktu ekstraksi maka semakin tinggi rendemen yang diperoleh karena semakin lama waktu kontak antara bahan dengan pelarut (Djaeni et al., 2017).

Hidrolisis dan Partisi

Metabolit sekunder hasil ekstrak flavonoid kelopak bunga rosella (*Hibiscus sabdariffa* Linn) masih terikat oleh gugus gula, maka diperlukan pemutusan ikatan glikosida yang mengikat gula (glikon) dengan metabolit sekunder (aglikon) dengan cara hidrolisis. Hasil produk dari hidrolisis ini disebut hidrosilat. Kemudian hidrosilat tersebut dipisahkan dengan partisi dengan fungsi untuk melarutkan senyawa metabolit sekunder tersebut yang didasarkan pada prinsip *like dissolve like* terhadap pelarut yang digunakan dalam proses tersebut (Fasya et al., 2018).

Tahap hidrolisis dilakukan menggunakan HCl 2N. Penambahan HCl 2N digunakan untuk mempercepat hidrolisis flavonoid menjadi aglikon yaitu dengan menghidrolisis O-glikosil. Kemudian glikosil akan tergantikan oleh H⁺ dari asam karena bersifat elektrofilik. Reaksi hidrolisis dengan HCl pekat akan menghasilkan senyawa kompleks yang berwarna merah, kuning, sampai jingga (Robinson, 1995). Pemilihan HCl karena asam ini merupakan asam kuat sehingga dapat melepas H⁺ dengan mudah. Selain itu, HCl lebih menguntungkan daripada asam kuat lainnya seperti H₂SO₄ karena sifat HCl yang lebih reaktif. Adapun mekanisme reaksi yang terjadi pada saat penambahan HCl 2N ke dalam ekstrak pekat bunga rosella (*Hibiscus Sabdariffa* Linn) sebagai berikut:

Gambar 2.2 Mekanisme reaksi hidrolisis flavonoid**Gambar 2.** Mekanisme reaksi hidrolisis flavonoid dan HCl (Laila, 2014).**Gambar 2.3** Reaksi hidrolisis flavonoid dengan HCl**Gambar 3.** Persamaan reaksi hidrolisis ekstrak pekat bunga rosella dengan penambahan HCl 2N (Marliana et al., 2005)

Penambahan asam kuat berfungsi dalam meningkatkan laju reaksinya. Katalis asam mengakibatkan terjadinya penurunan pH akibat semakin banyak jumlah proton yang terionisasi dalam air. Kemudian, pengadukan pada ekstrak pekat bertujuan agar homogen sempurna sehingga akan memaksimalkan terjadinya pemutusan ikatan glikosida. Selanjutnya dijenuhkan dengan NaHCO_3 . Fungsi perlakuan ini adalah pada saat penambahan asam pada reaksi hidrolisis dapat mengakibatkan terbentuknya suasana asam pada larutan sehingga diperlukan adanya penetralan dengan larutan natrium bikarbonat (NaHCO_3) (Wahyudi et al., 2011). Selain itu, penetralan bertujuan untuk menghentikan reaksi supaya ikatan glikosida antara aglikon dan glikon tidak terbentuk kembali. Penetralan pada larutan dilakukan untuk menghentikan reaksi hidrolisis yang bersifat reversible (Fasya et al., 2018). Kemudian setelah penambahan NaHCO_3 dilakukan pengadukan menggunakan *magnetic stirrer* selama 1 jam hingga pH netral. Tujuannya adalah untuk memaksimalkan proses penetralan dan meminimalisir terjadinya reaksi

hidrolisis yang reversible. Hasil reaksi antara HCl dan NaHCO₃ pada proses penetralan didapatkan gelembung busa yang merupakan gas CO₂. Gelembung tersebut tidak akan muncul lagi ketika komponen zat aktif netral kembali. Adapun reaksi penetralan menggunakan NaHCO₃ sebagai berikut:

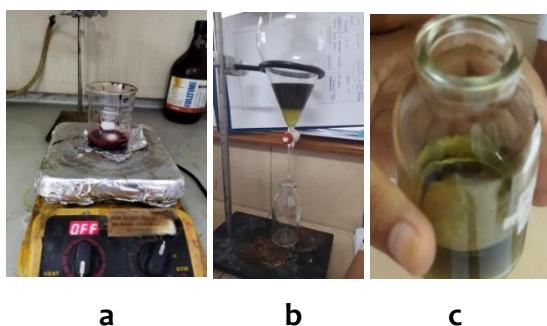
Gambar 2.4 reaksi penetralan menggunakan NaHCO₃



Gambar 4. Reaksi asam klorida dan natrium bikarbonat (Mardiyah, 2012)

Selanjutnya, proses partisi dilakukan dengan menambahkan pelarut kloroform dan air dengan perbandingan (1:1) sebanyak 3 kali. Tujuan partisi adalah untuk menghasilkan senyawa yang lebih spesifik berdasarkan prinsip *like dissolve like*. Penggunaan pelarut kloroform yaitu untuk melarutkan komponen nonpolar dalam sampel sehingga didapatkan senyawa flavonoid yang terpisah dari komponen nonpolar dalam sampel. Sedangkan fungsi dari penggunaan air sebagai pelarut adalah untuk melarutkan senyawa flavonoid yang bersifat polar. Selanjutnya campuran larutan dikocok selama 15 menit untuk proses pemisahan yang diharapkan komponen dalam sampel akan terdistribusi berdasarkan kelarutannya pada pelarut. Setelah itu didiamkan hingga terbentuk dua lapisan. Hasil proses partisi membentuk dua lapisan yaitu fasa organik (lapisan bawah) dan fasa air (lapisan atas). Komponen gula (glikon) akan terdistribusi pada fasa organik, sedangkan komponen metabolit sekunder (aglikon) akan terdistribusi pada fasa air (Fasya et al., 2018). Setelah diperoleh fasa air yang mengandung senyawa flavonoid, kemudian diambil dan ditimbang untuk mengetahui massa ekstrak hasil partisi. Berdasarkan hasil perhitungan diperoleh massa ekstrak hasil partisi sebesar 42,117%.

Gambar 5. Hasil hidrolisis dan partisi



Gambar 5. Hasil hidrolisis dan partisi: a) proses hidrolisis, b) proses partisi, dan c) hasil partisi fasa organik

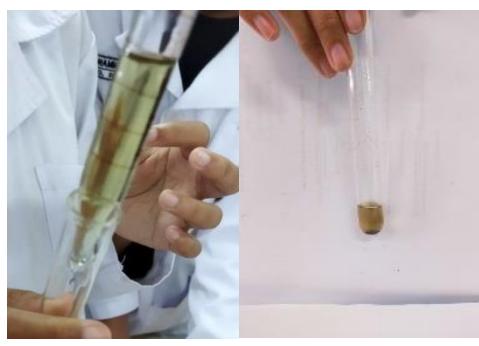
Uji Fitokimia Flavonoid

Uji fitokimia pada ekstrak kelopak bunga rosella (*Hibiscus sabdariffa* Linn) merupakan uji kualitatif yang bertujuan untuk mengatahui kandungan senyawa metabolit sekunder yang terkandung dalam sampel. Uji fitokimia flavonoid dilakukan pada ekstrak yang telah dimurnikan. Uji ini dilakukan untuk melihat perubahan yang terjadi ketika suatu sampel yang diduga mengandung senyawa aktif tertentu direaksikan dengan suatu reagen. Secara umum perubahan yang dapat diamati yaitu perubahan warna larutan (Sari et al., 2018).

Penelitian kali ini menggunakan metode Wilstater dalam uji fitokimia senyawa flavonoid. Hal ini disebabkan flavonoid tergolongan sebagai senyawa polifenol yang mana strukturnya memiliki banyak gugus -OH karena turunan dari 2-fenilbenzopira atau anti aromatik flavan. Pengujian flavonoid menggunakan metode Wilstater dilakukan dengan menambahkan serbuk Mg dan HCl pekat pada sampel. Penambahan HCl pekat bertujuan untuk menghidrolisis flavonoid menjadi aglikonnya, yaitu dengan cara menghidrolisis O-glikosil. Glikosil akan tergantikan oleh H^+ dari asam karena bersifat elektrofilik. Logam Mg dan HCl akan mereduksi dan menghasilkan senyawa kompleks yang berwarna kuning, orange, atau merah (Ikalinus et al., 2015).

Tahapan uji fitokimia dalam percobaan kali ini yaitu dengan menambahkan etanol sebanyak 3 mL ke dalam sampel ekstrak flavonoid dari kelopak bunga rosella (*Hibiscus sabdariffa* Linn). Fungsi etanol disini adalah untuk menunjukkan terbentuknya lapisan amil alkohol. Kemudian ditambah 0,1 g serbuk Mg dan 2 tetes HCl pekat, lalu dimasukkan ke dalam larutan sampel. Tujuan penambahan logam Mg dan HCl pekat adalah untuk mereduksi inti benzopiron yang terdapat dalam struktur flavonoid sehingga terjadi perubahan warna menjadi merah. Hasil uji fitokimia flavonoid pada praktikum ini menghasilkan perubahan warna larutan dari hijau kekuningan menjadi jingga kemerahan (jingga). Adapun hasil dari uji fitokimia flavonoid dalam percobaan kali ini sebagai berikut:

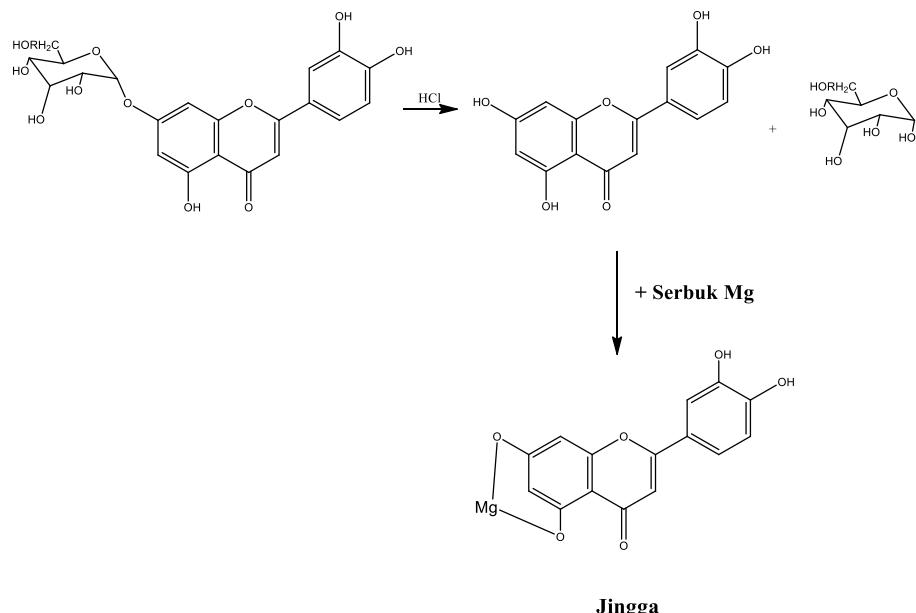
Gambar 2.6 Hasil uji fitokimia flavonoid



Gambar 6. Hasil uji fitokimia flavonoid menggunakan metode Wilstater.

Adapun reaksi yang terjadi dalam uji fitokimia flavonoid dengan Mg dan HCl:

Gambar 2.7 uji fitokimia flavonoid dengan Mg dan HCl



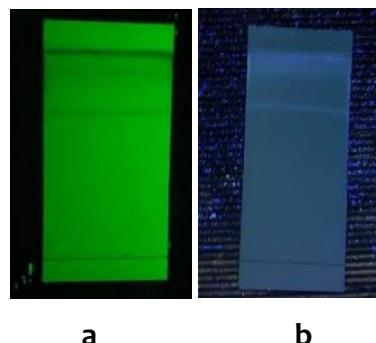
Jingga

Gambar 7. Reaksi uji fitokimia flavonoid dengan Mg dan HCl (Marliana et al., 2005)

Monitoring dengan Kromatografi Lapis Tipis Preparatif (KLTP)

Kromatografi Lapis Tipis Preparatif merupakan salah satu metode identifikasi kandungan senyawa flavonoid dalam sampel. Metode ini digunakan untuk pemisahan dan pemurnian senyawa analit yang terdapat dalam sampel. Prinsip kerja dari metode ini adalah yaitu mengelusi suatu campuran menggunakan dua jenis pelarut yang memiliki beda kepolaran. Identifikasi senyawa yang terpisah pada lapisan tipis digunakan reaksi penampak noda atau dideteksi menggunakan lampu UV dengan $\lambda 254$ atau $\lambda 356$ nm pada senyawa yang dapat menyerap warna (Atun, 2014).

Penelitian ini menggunakan eluen etanol dan kloroform dengan perbandingan 4:1. Penggunaannya pada proses elusi karena kedua larutan tersebut memiliki sifat kepolaran yang berbeda sehingga dapat digunakan untuk memisahkan senyawa dalam ekstrak sampel berdasarkan kelarutannya pada fase gerak. Etanol digunakan dengan perbandingan yang lebih besar karena sifatnya yang lebih polar dibandingkan dengan kloroform, sehingga diharapkan mampu mengelusi senyawa flavonoid yang bersifat polar untuk bermigrasi pada fasa diam (plat KLT). Selanjutnya, hasil elusi diamati di bawah sinar UV pada $\lambda 254$ nm dan $\lambda 366$ nm untuk mengetahui bercak atau noda yang muncul agar dapat ditentukan nilai R_f dari hasil pemisahan. Hasil dari pengamatan pada $\lambda 254$ nm menghasilkan warna hijau dan pada $\lambda 366$ nm menghasilkan warna ungu. Selain itu dari hasil pengamatan diperoleh dua spot pada plat dengan nilai R_f 1 sebesar 0,72 dan R_f 2 sebesar 0,86. Berikut merupakan hasil monitoring senyawa flavonoid menggunakan KLTP seperti pada gambar di bawah:

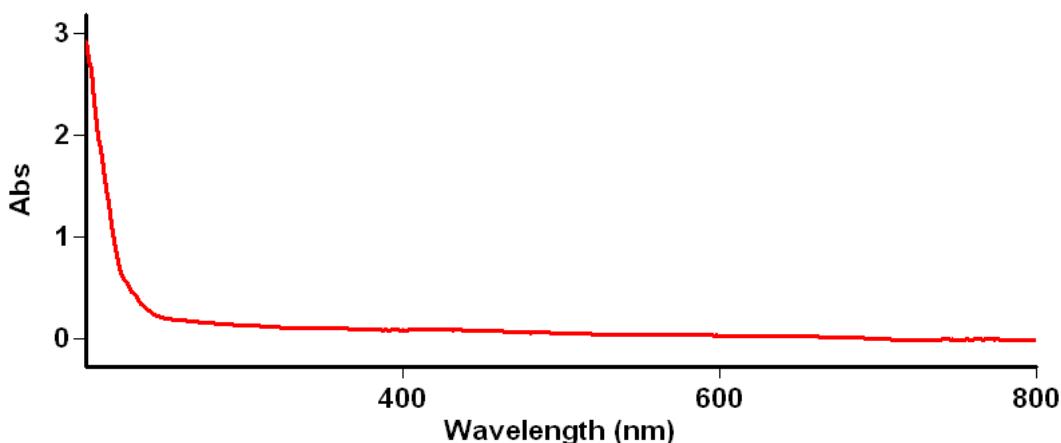
Gambar 2.8 Hasil monitoring KLTP**Gambar 8.** Hasil monitoring menggunakan KLTP (a) pada $\lambda 254$ nm dan (b) pada $\lambda 366$ nm**Tabel 2.** Hasil monitoring senyawa flavonoid menggunakan KLTP

No	Rf	Warna Noda $\lambda 254$ nm	Warna Noda $\lambda 366$ nm	Dugaan Senyawa
1.	0,72	Ungu	Hijau	Antosianidin (Sianidin)
2	0,86	Ungu	Hijau	Antosianidin (Sianidin)

Adapun penelitian yang dilakukan oleh Latifah (2015) yang mengidentifikasi golongan flavonoid pada ekstrak rimpang kencur dan hasil yang diperoleh dari pemisahan menggunakan KLT berupa spot biru dengan Rf 0,83 yang diasumsikan senyawa flavonol. Meskipun nilai Rf yang dihasilkan oleh penelitian ini memiliki selisih 0,143 dengan nilai Rf standar, menurut (Indrayani et al., 2017) hasil dinyatakan spesifik dengan standar apabila nilai Rf sampel dan standar memiliki selisih $<0,2$.

Identifikasi Menggunakan Spektrofotometer UV-Vis

Identifikasi dengan spektrofotometer UV-Vis dilakukan dengan tujuan untuk mengetahui panjang gelombang maksimum yang dimiliki oleh senyawa flavonoid pada isolat kelopak bunga rosella (*Hibiscus sabdariffa* Linn). Pada percobaan kali ini dilakukan identifikasi dengan rentang panjang gelombang dengan rentang 200-800 nm. Sebelum itu, larutan sampel disiapkan dengan cara melarutkan noda bercak hasil KLTP ke dalam pelarut organik sebanyak 10 mL. Kemudian, larutan diidentifikasi menggunakan spektrofotometer UV-Vis. Adapun spektra yang dihasilkan dari identifikasi senyawa flavonoid menggunakan spektrofotometer UV-Vis sebagai berikut:

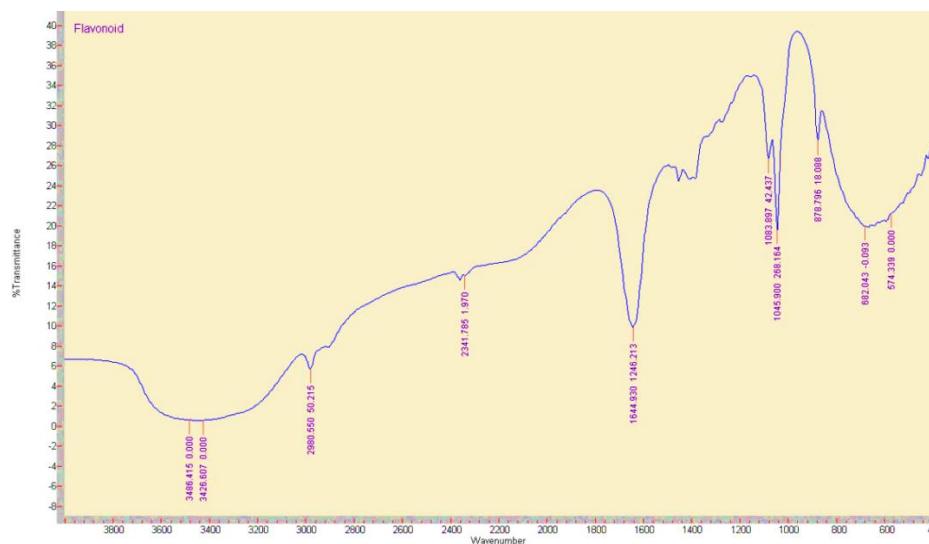
Gambar 2.9 Karakterisasi menggunakan UV-Vis**Gambar 9.** Hasil identifikasi flavonoid menggunakan spektrofotometer UV-Vis.

Berdasarkan hasil spektra di atas, senyawa flavonoid hasil isolasi dari kelopak bunga rosella (*Hibiscus sabdariffa* Linn) menghasilkan serapan pada panjang gelombang maksimum 268,9 nm dengan nilai absorbansi sebesar 0,182. Hasil ini telah sesuai dengan penelitian yang dilakukan oleh Khowas (2021) bahwa nilai maksimum panjang serapan pada senyawa diduga flavonoid adalah 269,0 nm. Selanjutnya penelitian yang dilakukan oleh Anggistia et al. (2016), mengidentifikasi senyawa flavonoid golongan antosianin hasil isolasi dari kelopak bunga rosella yang menghasilkan 3 puncak utama dengan λ 284 nm, λ 341 nm, dan λ 532 nm (Anggistia et al., 2016).

Adanya serapan pada λ 289,6 nm pada isolat senyawa flavonoid dalam percobaan ini menunjukkan adanya transisi elektronik dari $n \rightarrow \pi^*$ yang terjadi pada senyawa analit. Berdasarkan penelitian Ningrum et al. (2017) pada panjang gelombang tersebut menunjukkan absorpsi oleh cincin benzoil yang memiliki gugus kromofor atau gugus yang memiliki ikatan ganda terkonjugasi yang sensitif terhadap rangsangan cahaya (Ningrum et al., 2017). Menurut Aditya dkk. (2017) puncak serapan pada panjang gelombang tersebut mewakili senyawa golongan flavonoid jenis antosianidin yang memiliki gugus orto-hidroksi.

Identifikasi Menggunakan Spektrofotometer FT-IR

Karakterisasi menggunakan FT-IR bertujuan untuk mengetahui gugus fungsi senyawa isolat flavonoid dari kelopak bunga rosella (*Hibiscus sabdariffa* Linn) sehingga dapat diprediksi struktur dari senyawa isolat. Prinsip dasar dari spektrofotometer FT-IR adalah berdasarkan pada radiasi elektromagnetik dalam rentang *infrared* yang berinteraksi dengan senyawa atau sampel yang akan diidentifikasi. Adapun spektra hasil karakterisasi isolat flavonoid dari ekstrak kelopak bunga rosella sebagai berikut:

Gambar 2.10 Karakterisasi Menggunakan FT-IR**Gambar 10.** Hasil identifikasi isolat flavonoid menggunakan spektrofotometer FT-IR.**Tabel 3.** Hasil serapan gugus fungsi menggunakan spektrofotometer FT-IR

Bilangan Gelombang (cm ⁻¹)		Jenis Vibrasi
Hasil Penelitian	Range Pustaka	
3486,415	3500 - 3200 ¹ ; 3100 - 3500 ²	O-H stretch
2980,550	2990 - 2850 ¹ ; 2848 - 2919 ²	C-H <i>asymmetric and symmetrical</i> stretching
1644,930	1680 - 1630 ¹	C=C stretch
1083,897	1300 - 1000 ¹	C-C stretch
1045,900	1200 - 1015 ¹ ; 1031 ²	C-OH stretch
878,796	709 - 879 ³	C-H aromatic stretch

Sumber: (1) (Melhuish, 1984); (Paraíso et al., 2020); dan (3) (Inggrid et al., 2018)

Berdasarkan hasil spektra pada percobaan ini, isolat flavonoid menunjukkan serapan pada daerah bilangan gelombang 3486,415 cm⁻¹ dengan serapan yang melebar yang mengindikasikan adanya vibrasi stretching pada gugus –OH dan membentuk ikatan hidrogen antarmolekul. Kemudian bilangan gelombang 2980,550 cm⁻¹ menunjukkan stretching gugus C-H alifatik. Prediksi bahwa telah diperoleh senyawa target dalam sampel diperkuat dengan adanya serapan pada 1644,930 cm⁻¹ yang mewakili stretching C=C pada gugus aromatik. Selain itu terdapat gugus C-OH yang mengalami stretching pada bilangan gelombang 1045,900 cm⁻¹. Hasil tersebut mendukung adanya senyawa aktif flavonoid berupa antosianidin pada sampel isolat flavonoid kelopak bunga rosella. Penelitian yang dilakukan Inggrid et al., (2018) yang mengidentifikasi ekstrak flavonoid bunga rosella menggunakan FTIR diperoleh adanya serapan gugus fenol pada puncak 3302,13 cm⁻¹, serapan gugus C=O stretching keton pada 1735,93 cm⁻¹, gugus O-H alkohol pada serapan 1381,03 cm⁻¹, dan gugus C-H alkana (metil) pada 1327,03 cm⁻¹. Gugus C-O-C stretching eter terbaca pada 1087,85 cm⁻¹. Gugus C-O stretching alkohol pada puncak serapan 1049,26 cm⁻¹. Sedangkan pada daerah separan 879,54 dan 709,80 cm⁻¹ menandakan adanya gugus C-H aromatik. Berdasarkan hasil spektrum FTIR di atas

diperoleh kesimpulan bahwa dalam ekstrak bunga rosella menandakan adanya senyawa flavonoid dari golongan antosianin (Inggrid et al., 2018).

Kesimpulan dan Saran

Kandungan senyawa flavonoid dari bunga rosella merah (*Hibiscus sabdariffa* Linn) dapat diekstraksi menggunakan metode sonikasi dan dihasilkan rendemen sebesar 39,711%. Ekstrak pekat yang diperoleh dihidrolisis untuk memisahkan senyawa glikon dan aglikon dari flavonoid glikosida dan dipartisi sehingga diperoleh rendemen partisi sebesar 42,177%. Ekstrak hasil partisi kemudian diisolasi menggunakan metode KLT Preparatif dan diamati dengan sinar UV pada λ 254 nm dan λ 366 nm, sehingga dihasilkan warna hijau dan ungu dengan R_f 0,72 dan 0,86. Selanjutnya, uji fitokimia ekstrak bunga rosella (*Hibiscus sabdariffa* Linn) dilakukan dengan penambahan serbuk Mg dan HCl pekat sehingga diperoleh hasil positif yang ditunjukkan dengan perubahan warna larutan menjadi jingga kemerahan. Identifikasi senyawa flavonoid dilakukan menggunakan UV-Vis dan diperoleh λ_{maks} pada 268,9 nm dengan nilai absorbansi sebesar 0,182. Hasil identifikasi menggunakan FT-IR menandakan adanya serapan khas gugus C=C yang mengalami stretching pada bilangan gelombang 1644,930 cm^{-1} dan gugus C-OH stretching pada bilangan gelombang 1045,900 cm^{-1} .

Saran yang dapat diberikan untuk penelitian ini yaitu diperlukan penambahan AlCl_3 pada saat identifikasi dengan spektrofotometer Uv-Vis yang berfungsi untuk melihat adanya pergeseran batokromik yang menandakan adanya gugus orto-hidroksi sehingga dapat diketahui lebih spesifik senyawa yang dianalisis. Selain itu, untuk penelitian selanjutnya perlu dilakukan identifikasi menggunakan spektrofotometer $^1\text{H-NMR}$ dan GC-MS supaya dapat ditentukan struktur yang tepat dari isolat senyawa flavonoid dari kelopak bunga rosella (*Hibiscus sabdariffa* Linn) berdasarkan pada kemurnian senyawa dan pola fragmentasinya.

Daftar Pustaka

- Anggistica, M. D., Widiyandari, H., & Anam, K. (2016). Identifikasi dan Kuantifikasi Antosianin dari Fraksi Bunga Rosela (*Hibiscus Sabdariffa L*) dan Pemanfaatannya sebagai Zat Warna Dye-Sensitized Solar Cell (DSSC). *Jurnal Kimia Sains Dan Aplikasi*, 19(2), 50–57. <https://doi.org/10.14710/jksa.19.2.50-57>
- Arifin, B., & Ibrahim, S. (2018). Struktur, Bioaktivitas Dan Antioksidan Flavonoid. *Jurnal Zarah*, 6(1), 21–29. <https://doi.org/10.31629/zarah.v6i1.313>
- Atun, S. (2014). Metode Isolasi dan Identifikasi Struktural Senyawa Organik Bahan Alam. *Jurnal Konservasi Cagar Budaya*, 8(2), 53–61.
<https://doi.org/10.33374/jurnalkonservasicagarbudaya.v8i2.132>
- Djaeni, M., Ariani, N., Hidayat, R., & Utari, F. D. (2017). Ekstraksi Antosianin dari Kelopak Bunga Rosella (*Hibiscus sabdariffa L.*) Berbantuan Ultrasonik: Tinjauan Aktivitas Antioksidan Ultrasonic Aided Anthocyanin Extraction of *Hibiscus sabdariffa L.* Flower Petal: Antioxidant Activity. *Jurnal Aplikasi Teknologi Pangan*, 6(3), 71.
<https://doi.org/10.17728/jatp.236>
- Fasya, A. G., Dinasti, A. R., Shofiyah, M., Rahmawati, L. M., Millati, N., Safitri, D. A.,

- Handoko, S., Hanapi, A., & Ningsih, R. (2018). Ekstraksi, Hidrolisis dan Partisi Metabolit Sekunder dari Mikroalga Chlorella sp. *Alchemy*, 5(1), 5. <https://doi.org/10.18860/al.v5i1.3686>
- Fasya, A. G., Purwantoro, B., Ulya, L. H., & Ahmad, M. (2020). Aktivitas Antioksidan Isolat Steroid Hasil Kromatografi Lapis Tipis dari Fraksi n-Heksana *Hydrilla verticillata*. *Alchemy*, 8(1), 23–34. <https://doi.org/10.18860/al.v8i1.9936>
- Halimatul, S. M. N., Amin, I., Mohd-Esa, N., Nawalyah, A. G., & Siti Muskinah, M. (2007). Protein quality of roselle (*Hibiscus sabdariffa L.*) seeds. *International Food Research Journal*, 14(2), 131–140.
- Ikalinus, R., Widyastuti, S., & Eka Setiasih, N. (2015). Skrining Fitokimia Ekstrak Etanol Kulit Batang Kelor (*Moringa Oleifera*). *Indonesia Medicus Veterinus*, 4(1), 77.
- Indrayani, N. K. E., Setiawan, D., & Subhaktiyasa, P. G. (2017). Identification of Rhodamine B on the Sale Cake ku In market Agung Village Peninjoan Denpasar. *Bali Medika Jurnal*, 4(2), 73–83. <https://doi.org/10.36376/bmj.v4i2.6>
- Inggrid, M., Hartanto, Y., & Widjaja, J. F. (2018). Dwicahyani, U., Isrul, M., & Noviyanti, W. O. N. (2019). Formulasi Sediaan Lipstik Ekstrak Kulit Buah Ruruhi (*Syzygium policephalum Merr*) Sebagai Pewarna. *Jurnal Mandala Pharmacon Indonesia*, 5(02), 91–103. [https://doi.org/10.35311/jmipi.v5i02.48Karakterist. Jurnal Rekayasa Hijau, 2\(3\), 283–289](https://doi.org/10.35311/jmipi.v5i02.48Karakterist. Jurnal Rekayasa Hijau, 2(3), 283–289).
- Jawad, M., Schoop, R., Suter, A., Klein, P., & Eccles, R. (2013). Perfil de eficacia y seguridad de *Echinacea purpurea* en la prevención de episodios de resfriado común: Estudio clínico aleatorizado, doble ciego y controlado con placebo. *Revista de Fitoterapia*, 13(2), 125–135. <https://doi.org/10.1002/jsfa>
- Khwas, A. D. F. (2021). Uji Aktivitas Antioksidan Dan Fitokimia Daun Beluntas (*Pluchea indica L.*) Hasil Ekstraksi Ultrasonik Dengan Variasi Pelarut. *Skripsi*. Malang: Jurusan Kimia Fakultas Sains dan Teknologi UIN Malang.
- Laila, N. (2014). Uji Aktivitas Antioksidan dan Fitokimia Fraksi Etil Asetat, Kloroform, dan n-Heksana Ekstrak Metanol Alga Coklat. *Skripsi Tidak Diterbitkan*. Malang: Jurusan Kimia Fakultas Sains dan Teknologi UIN Malang.
- Malinda, O., & Syakdani, A. (2020). Review Artikel Potensi Antioksidan Dalam Kelopak Bunga Rosella (*Hibiscus sabdariffa L.*) Sebagai Anti-aging Potensial Of Antioxidant In Flower Classroom Rosella (*Hibiscus sabdariffa L.*) As Anti-aging. *Jurnal Kinetika*, 11(03), 60–65. <https://jurnal.polsri.ac.id/index.php/kimia/index60>
- Manoi, F. (2015). Effect Fineness Extraction of Materials and Old Quality Extract (*Sonchus arvensis L.*). *Jurnal Penelitian Pertanian Terapan*, 15(2), 156–161.
- Mardiah, Amalia, L. dam, & Sulaeman, A. (2010). Ekstraksi Kulit Batang Rosella (*Hibiscus sabdariffa L.*) Sebagai Pewarna Merah Alami. *Jurnal Pertanian*, 1(1), 1–8.
- Mardiyah, U. (2012). Ekstraksi Uji Aktivitas Antioksidan Terhadap 1,1-Difenil-2-2-Pikrilhidrazil (DPPH) dan Identifikasi Golongan Senyawa Aktif Alga Merah *Eucheumaspinosum* dari Perairan Banyuwangi. *Skripsi*. Malang: Jurusan Kimia Fakultas Sains dan Teknologi UIN Malang.
- Marliana, S. D., Suryanti, V., & Suyono. (2005). Skrining Fitokimia dan Analisis Kromatografi Lapis Tipis Komponen Kimia Buah Labu Siam (*Sechium edule Jacq. Swartz.*) dalam Ekstrak Etanol The phytochemical screenings and thin layer chromatography analysis of. *Biofarmasi*, 3(1), 26–31.

- Melhuish, W. H. (1984). Molecular Luminescence Spectroscopy - Vi. In *Pure and Applied Chemistry* (Vol. 56, Issue 2).
- Ningrum, D. W., Kusrini, D., & Fachriyah, E. (2017). Uji Aktivitas Antioksidan Senyawa Flavonoid dari Ekstrak Etanol Daun Johar (*Senna siamea Lamk*). *Jurnal Kimia Sains Dan Aplikasi*, 20(3), 123–129. <https://doi.org/10.14710/jksa.20.3.123-129>
- Panche, A. N., Diwan, A. D., & Chandra, S. R. (2016). Flavonoids: An overview. *Journal of Nutritional Science*, 5. <https://doi.org/10.1017/jns.2016.41>
- Paraíso, C. M., dos Santos, S. S., Ogawa, C. Y. L., Sato, F., dos Santos, O. A. A., & Madruga, G. S. (2020). *Hibiscus Sabdariffa L. extract: Characterization (FTIR-ATR), storage stability and food application*. *Emirates Journal of Food and Agriculture*, 32(1), 55–61. <https://doi.org/10.9755/EJFA.2020.V32.I1.2059>
- Robinson, T. (1995). *Kandungan Organik Tumbuhan Tinggi Edisi VI*. (K. Padmawinata, Trans.) Bandung.
- Sari, F., Aryantini, D., Lukman, & Wiayu, D. (2018). Kadar Senyawa Flavonoid Total Ekstrak Terpurifikasi Kelopak Rosella (*Hibiscus Sabdariffa L.*) Dan Aktivitas Antihiperlikemi. *Prosidingonline.iik.Ac.Id*, 123–128. <https://prosidingonline.iik.ac.id/index.php/sintesis/article/view/43>
- Sholihah, M. (2017). Aplikasi gelombang ultrasonik untuk meningkatkan rendemen ekstraksi dan efektivitas antioksidan kulit manggis. *Jurnal Keteknikhan Pertanian*, 5, 161–168.
- Suradji, S. I., Najib, A., & Ahmad, A. R. (2016). Studi Komparasi Kadar Flavonoid Total Pada Bunga Rosella Merah (*Hibiscus Sabdariffa L.*) Asal Kabupaten Luwu Utara Provinsi Sulawesi Selatan Dan Kabupaten Kediri Provinsi Jawa Timur. *Jurnal Fitofarmaka Indonesia*, 3(2), 175–181. <https://doi.org/10.33096/jffi.v3i2.219>
- Suzery, M., Lestari, S., & Cahyono, B. (2010). Penentuan Total Antosianin dari Kelopak Bunga Rosela (*Hibiscus sabdariffa L*) dengan Metode Maserasi dan Sokhletasi. *Jurnal Sains & Matematika (JSM)*, 18(1), 1–6.
- Thangavadivel, K., Lesniewski, P. J., Megharaj, M., Smart, R. S. C., & Naidu, R. (2008). *Influence Of Sono Chemical Reactor Shape On Acoustic Pressure Distribution Under Applied 20 kHz Ultrasound Field : A Modelling Study*. December, 33–36.
- Thompson, L. H., & Doraiswamy, L. K. (1999). Sonochemistry: Science and engineering. *Industrial and Engineering Chemistry Research*, 38(4), 1215–1249. <https://doi.org/10.1021/ie9804172>
- Wahyudi, J., Wibowo, W. A., Rais, Y. A., & Kusumawardani, A. (2011). Pengaruh Suhu Terhadap Kadar Glukosa Terbentuk dan Konstanta Kecepatan Reaksi pada Hidrolisa Kulit Pisang. *Prosiding Seminar Nasional Teknik Kimia “Kejuangan,” 1958*, B09-1–5.