

BUKTI KORESPONDENSI

ARTIKEL NASIONAL TERAKREDITASI

Judul Artikel : **Analisis Flavonoid pada Fraksi Hasil Hidrolisat Ekstrak Daun Cordia sebestena L.**
Jurnal : Indonesian Journal of Pharmaceutical Science and Technology
Penulis : **Ni Putu Ermi Hikmawanti***, Endang Hanani, Rini Mardiyanti

No.	Perihal	Tanggal
1.	Bukti <i>submit</i> dan artikel yang di- <i>submit</i>	25 Maret 2022
2.	Bukti hasil <i>review</i> dan file komentar <i>reviewer</i>	10 Agustus 2022
3.	Bukti hasil revisi dan artikel yang direvisi	24 Desember 2022, 22 Januari 2023, 3 Desember 2023, 18 Januari 2024
4.	Bukti naskah diterima	15 Maret 2023
5.	Bukti artikel proses <i>galley proof</i> dan artikel yang dikoreksi <i>galley proof</i>	1 Februari 2024
6.	Bukti artikel telah terbit <i>online</i> pada website Jurnal	1 Februari 2024

**1. Bukti *submit* dan artikel yang di-*submit*
(25 Maret 2022)**

60

Compose

Mail

Chat

Meet

Labels

Inbox

Starred

Snoozed

Sent

Drafts

More

60

[ijpst] Pernyataan Naskah

External Inbox x

P

Sandra Megantara <jurnal@unpad.ac.id>
to me

 [Translate to English](#)

X

Ermi Ni Putu Ermi Hikmawanti:

Terima kasih untuk menyerahkan manuskrip, "Analisis Flavonoid pada Fraksi Hasil Hidrolisat Ekstrak Daun Cordia sebestena L." untuk Indonesian Journal of Pharmaceutical Science and Technology. Dengan sistem manajemen jurnal online yang kami gunakan, Anda akan bisa melacak kemajuan naskah dalam proses editorial dengan login ke web site jurnal:

URL Manuskrip: <http://jurnal.unpad.ac.id/ijpst/author/submission/38849>
Nama pengguna Penulis: ermi_hikmawanti

Jika Anda mempunyai pertanyaan, silakan hubungi saya. Terima kasih untuk mempertimbangkan jurnal ini sebagai tempat untuk karya Anda.

Sandra Megantara
Indonesian Journal of Pharmaceutical Science and Technology

Indonesian Journal of Pharmaceutical Science and Technology
<http://jurnal.unpad.ac.id/ijpst>

Reply

Forward

Analysis of Flavonoids on Fraction from Hydrolysate of *Cordia Sebestena* L. Leaves Extract

Ni Putu Ermi Hikmawanti*, Endang Hanani, dan Rini Mardiyanti

Program Studi Farmasi, Fakultas Farmasi dan Sains, Universitas Muhammadiyah Prof. DR. HAMKA, Jl. Delima II/IV Klender, Jakarta Timur, DKI Jakarta 13460, Indonesia

Abstract

Cordia sebestena L. (Boraginaceae) or Cordia is an ornamental plant that contains flavonoids. This study aimed to analyze the flavonoids in the hydrolyzed fraction of the 70% ethanol extract of Cordia leaves. The study was divided into 7 stages, namely (1) maceration using 70% ethanol, (2) acid hydrolysis of the ethanol extract, (3) fractionation of hydrolysate with ethyl acetate, (4) determination of total flavonoid content, (5) antiradical activity assay against 2,2'-diphenyl-1-picrylhydrazyl (DPPH), (6) separation of flavonoids using thin layer chromatography (TLC), and (7) identification of flavonoids using UV-Visible Spectrophotometry and Infrared Spectroscopy. The results showed the total flavonoid content of the ethyl acetate fraction was 8.20 mgQE/g with an IC₅₀ value of 296.91 g/mL against DPPH radicals. The TLC chromatogram showed the presence of one spot of the compound in the ethyl acetate fraction with an R_f value of 0.855. The results of the UV-Vis spectrum on these spots obtained absorption at 340 nm (band I) and 240 nm (band II). While the infrared spectrum shows a signal at 3363 cm⁻¹ (OH stretching), 1727 cm⁻¹ (C=O), 1459 cm⁻¹ (aromatic ring) and 1060 cm⁻¹ strong (C-O). Thus, it can be concluded that the ethyl acetate hydrolysate fraction of Cordia leaf ethanol extract contains flavonoid compounds similar to the chalcone group.

Keywords: acid hydrolysis, Boraginaceae, *Cordia sebestena* L., ethyl acetate fraction, flavonoids

Analisis Flavonoid pada Fraksi Hasil Hidrolisat Ekstrak Daun *Cordia sebestena* L.

Abstrak

Cordia sebestena L. (Boraginaceae) atau Cordia merupakan tanaman hias dengan kandungan flavonoid. Penelitian ini bertujuan menganalisis senyawa flavonoid pada fraksi hasil hidrolisat ekstrak etanol 70% daun Cordia. Penelitian terbagi menjadi 7 tahapan, yaitu (1) maserasi daun menggunakan etanol 70%, (2) hidrolisis asam pada ekstrak dengan HCl 2N pada 95 °C selama 2 jam, (3) fraksinasi hidrolisat dengan etil asetat, (4) penentuan kadar flavonoid total dengan kolorimetri, (5) pengujian aktivitas antiradikal terhadap 2,2'-difenil-1-pikrilhidrazil (DPPH), (6) pemisahan flavonoid menggunakan kromatografi lapis tipis (KLT), dan (7) identifikasi flavonoid menggunakan spektrofotometri UV-Vis dan infra merah. Hasil menunjukkan kadar flavonoid total fraksi etil asetat sebesar 8,20 mgQE/g dengan nilai IC₅₀ terhadap radikal DPPH sebesar 296,91 µg/mL. Kromatogram KLT menunjukkan keberadaan satu bercak senyawa pada fraksi etil asetat dengan nilai R_f adalah 0,855. Hasil spektrum UV-Vis pada bercak tersebut diperoleh serapan pada 340 nm (pita I) dan 240 nm (pita II). Sedangkan spektrum infra merah menunjukkan adanya sinyal pada 3363 cm⁻¹ (O-H ulur),

1727 cm^{-1} (C=O), 1459 cm^{-1} (cincin aromatik) dan 1060 cm^{-1} kuat (C–O). Dengan demikian, dapat disimpulkan bahwa fraksi etil asetat hidrolisat ekstrak etanol daun *Cordia* mengandung senyawa flavonoid yang mirip dengan kelompok kalkon.

Kata kunci: *Boraginaceae*, *Cordia sebestena* L., flavonoid, fraksi etil asetat, hidrolisis asam

1. Pendahuluan

Cordia sebestena L. (Boraginaceae) atau *Cordia* merupakan suatu tanaman hias. Daun *Cordia* mengandung senyawa alkaloid, flavonoid, fenol, saponin, steroid/triterpenoid, dan tannin (1). Daun *Cordia* juga mengandung senyawa volatil sebesar 0,05% (2). Daun *Cordia* memiliki beragam aktivitas farmakologi, antara lain antibakteri (3), analgetik, antiinflamasi (4), antioksidan (5), dan lain sebagainya. Studi mengenai toksisitas subakut dari ekstrak etil asetat daun *Cordia* menunjukkan bahwa ekstrak tersebut tidak toksik terhadap hati (3). Sebelumnya, telah diisolasi kandungan flavonoid hesperetin dari bunga *Cordia* dengan khasiat antibakteri dan antikanker terhadap kanker serviks *in vitro* (6). Namun, studi mengenai flavonoid dari daun *Cordia* belum banyak dieksplorasi.

Flavonoid merupakan kelompok fenolik dengan struktur inti C-15 ($\text{C}_6\text{-C}_3\text{-C}_6$). Flavonoid merupakan kelas metabolit sekunder dari bahan alam sebagai nutrasetikal yang paling banyak digunakan pada pengobatan, makanan, suplemen dan lainnya. Meskipun studi mengenai isolasi maupun sintesisnya telah banyak, para peneliti masih tertarik meneliti flavonoid dan turunannya. Umumnya, flavonoid dapat diekstraksi dari pelarut air, etanol, metanol, *n*-butanol, aseton, etil asetat, kloroform dan lainnya. Pelarut polar digunakan untuk memperoleh flavonoid bentuk glikosida, sedangkan pelarut non-polar untuk ekstraksi bentuk aglikonnya (7). Untuk memperoleh bentuk aglikon flavonoid umumnya dilakukan proses hidrolisis terhadap glikosida flavonoid dengan cara asam, basa, maupun enzimatis. Hidrolisis asam merupakan teknik sederhana, cepat dan ekonomis untuk mengubah suatu glikosida menjadi aglikon (8). Teknik ini sering kali dilakukan menggunakan HCl 2 N-metanol atau HCl 2M (9). Hidrolisis glikosida flavonoid dari beberapa sampel sayuran dilaporkan baik dilakukan dengan metode hidrolisis asam menggunakan HCl 1,2 M dalam 50% metanol-air pada suhu 80 °C selama 2 jam dengan penambahan asam askorbat sebagai pencegah oksidasi (10).

Flavonoid merupakan suatu antioksidan yang secara alami ditemukan dalam bahan alam terutama tumbuhan (11). Selain itu, flavonoid juga berperan sebagai suatu nutrasetikal dengan khasiat antimikroba, antibakteri, antifungi, antivirus, antiulcer, hepatoprotektif, antiinflamasi, efek kardioprotektif, antineoplasma, dan lainnya (12). Pentingnya flavonoid dalam penemuan dan pengembangan obat baru yang berasal dari tanaman menjadi alasan dilakukannya penelitian ini. Penelitian ini bertujuan melakukan analisis senyawa flavonoid pada fraksi etil asetat hasil hidrolisat ekstrak etanol 70% daun *Cordia* sekaligus menetapkan kadar dan menentukan aktivitas antiradikalnya.

2. Metode

2.1. Alat

Alat-alat yang digunakan pada penelitian ini meliputi alat-alat gelas yang umum digunakan di laboratorium, toples maserasi, ayakan no. mesh 40, timbangan analitik (Ohaus), mikropipet (Eppendorf), *vacuum rotary evaporator* (Eyela N-1100, Cina), oven (Mettler UN-55), chamber (Camag), kotak UV (Camag), ultrasonik (Branson 5510), spektrofotometer UV-Vis (UV-1601 Series, Shimadzu, Japan), dan spektrometer FTIR (Agilent Cary 630, USA).

2.2. Bahan

Etanol 70%, etil asetat, metanol, kloroform pada tingkat analitik (Merck, Jerman) digunakan sebagai pelarut. Bahan lain yang digunakan antara lain plat KLT GF₂₅₄ (Merck, Jerman), DPPH, AlCl_3

10%, kalium asetat, kuersetin (Sigma-Aldrich Co., USA), HCl 2N, Na₂SO₄, asam formiat, dan aquades.

2.3. Prosedur

Ekstraksi

Daun Cordia diperoleh dari pekarangan rumah warga di sekitar Jakarta Timur. Sebelumnya, tanaman telah dideterminasi di Lembaga Ilmu Pengetahuan Indonesia (*Indonesian Institute of Sciences*), Pusat Penelitian Biologi (*Research Center for Biology*), *Cibinong Sciences Center*, Cibinong. Sampel daun segar sebanyak 2,5 kg dibuat simplisia menggunakan oven pada 50 °C. Simplisia kemudian dihaluskan dengan blender elektrik dan diayak dengan ayakan no. mesh 40. Serbuk simplisia disimpan dalam wadah kering tertutup rapat (13).

Serbuk simplisia 850 g diekstraksi dengan maserasi dengan pelarut etanol 70% (dengan rasio bahan–pelarut 1:6) selama 18 jam sambil sesekali diaduk. Ampas yang telah dipisahkan dari filtrat kemudian diremaserasi sampai pemeriksaan terhadap kandungan flavonoid didalamnya memberikan hasil negatif. Filtrat dikumpulkan dan diuapkan pelarutnya menggunakan *vacuum rotary evaporator* pada suhu 50 °C dan dilanjutkan dengan penangas air hingga diperoleh ekstrak kental (13). Ekstrak dihitung persentase rendemen dan dilakukan penapisan fitokimia sederhana mengikuti prosedur pada Hanani (2015) (14). Skema prosedur ekstraksi dapat dilihat pada Gambar 1.

Hidrolisis Ekstrak

Ekstrak etanol sebanyak 15,0715 g dicampurkan dengan 240 mL HCl 2N-metanol (dengan rasio bahan–pelarut 1:16) di dalam labu alas bulat. Campuran dipanaskan pada 95 °C selama 2 jam. Setelah dingin, campuran disaring dan dipekatkan di atas penangas air pada 60 °C hingga diperoleh hidrolisat kental (9,15).

Fraaksinasi dari hasil hidrolisat

Hidrolisat sebanyak 6,4585 g dilarutkan dalam 20 mL metanol dan 20 ml aquadest, dan kemudian dimasukkan ke dalam corong pisah. Selanjutnya, campuran difraaksinasi menggunakan etil asetat sebanyak 40 mL. Setelah dikocok perlahan dan didiamkan sesaat, fase air (lapisan bawah) dan fase etil asetat (lapisan atas) masing-masing dipisahkan dan dikumpulkan. Fraksi etil asetat disaring menggunakan Na₂SO₄ untuk menghilangkan air dan selanjutnya dipekatkan di atas penangas air dengan suhu 40 °C hingga kental (15).

Penetapan kadar flavonoid total fraksi

Penetapan kadar flavonoid total dengan metode kolorimetri yang mengacu pada prosedur Chang et al., (2002) (16) dengan sedikit modifikasi. Kuersetin digunakan untuk membuat kurva kalibrasi. Kuersetin (1000 µg/mL) dalam metanol kemudian diencerkan hingga diperoleh larutan seri konsentrasi 26, 44, 62, 80 dan 98 µg/mL. Masing-masing larutan (0,5 mL) secara terpisah direaksikan dengan metanol (1,5 mL), AlCl₃ 10% (0,1 mL), kalium asetat 1 M (0,1 mL) dan aquades (2,8 mL). Setelah inkubasi 30 menit pada suhu kamar, campuran diukur absorbansinya pada 440 nm menggunakan Spektrofotometer UV-Vis. Selanjutnya dibuat grafik hubungan absorbansi yang diperoleh terhadap konsentrasi kuersetin yang digunakan untuk menghasilkan persamaan garis linear $y = bx \pm a$. Persamaan ini selanjutnya digunakan untuk menetapkan konsentrasi flavonoid dalam larutan uji. Selanjutnya, prosedur mereaksikan yang sama dilakukan pada larutan uji fraksi etil asetat 6000 µg/mL (0,5 mL) dalam metanol untuk menentukan kadar flavonoid total pada fraksi tersebut. Pengujian dilakukan triplo.

Penentuan aktivitas antiradikal fraksi

Penentuan aktivitas antiradikal dilakukan terhadap DPPH dengan kuersetin sebagai pembanding mengikuti prosedur Batool et al., (2019) (17) dengan sedikit modifikasi. Larutan DPPH disiapkan dengan konsentrasi 0,2 mM. Larutan uji fraksi etil asetat disiapkan dengan seri konsentrasi yaitu 50, 150, 250, 350, dan 450 µg/mL. Sedangkan, seri konsentrasi kuersetin sebagai pembanding adalah 2, 4, 6, 8, dan 10 µg/mL. Selanjutnya larutan uji fraksi etil asetat maupun kuersetin masing-masing secara terpisah sebanyak 1 mL dicampurkan dengan 4 mL DPPH dan diinkubasi selama 30 menit pada suhu ruang dalam kondisi gelap. Absorbansi diukur pada 515 nm menggunakan Spektrofotometer UV-Vis. Kuersetin digunakan sebagai pembanding. Pengujian dilakukan triplo. Kapasitas antiradikal dihitung berdasarkan persentase inhibisi terhadap radikal DPPH yang dihitung dengan cara: absorbansi DPPH yang telah dikurangi dengan absorbansi sampel dibagi dengan absorbansi DPPH dikali 100%. Persentase inhibisi terhadap DPPH kemudian dibuat kurva terhadap konsentrasi masing-masing sampel untuk memperoleh persamaan garis linear $y = bx \pm a$. Persamaan ini kemudian digunakan untuk menghitung konsentrasi sampel yang mampu menghambat 50% radikal DPPH (*inhibition concentration* 50, IC₅₀) yang dinyatakan dalam µg/mL.

Pemisahan dengan KLT preparatif

Sebelumnya, konfirmasi keberadaan flavonoid pada fraksi etil asetat dilakukan pada plat KLT GF254 dengan fase gerak kloroform:etil asetat:metanol (3:2:2,5) dengan penambahan sedikit asam formiat. Pereaksi semprot sitroborat digunakan untuk melihat golongan senyawa. Pemisahan flavonoid pada fraksi etil asetat selanjutnya dilakukan pada plat KLT preparatif menggunakan fase gerak yang sama. Bercak diamati di bawah sinar UV 254 dan 366 nm tanpa disemprot sitroborat.

Analisis senyawa flavonoid

Bercak yang diperoleh dari hasil KLT preparatif dikerok dan dilarutkan dalam metanol dengan bantuan ultrasonik selama 15 menit. Filtrat disaring dengan kapas dan kertas saring. Filtrat kemudian diidentifikasi menggunakan spektrofotometer UV-Vis dan FTIR.

3. Hasil

Hasil identifikasi kualitatif menunjukkan kandungan kimia ekstrak etanol 70% daun *Cordia* antara lain alkaloid, fenolik, flavonoid, tanin, dan saponin. Hasil ekstraksi dan fraksinasi hidrolisat dapat dilihat pada Tabel 1. Hasil penentuan kadar flavonoid total dari fraksi etil asetat, menunjukkan bahwa flavonoid pada fraksi etil asetat sebesar 8,20 mgQE/g. Selanjutnya, pengujian aktivitas antiradikal dilakukan terhadap DPPH menggunakan spektrofotometer UV-Vis. Nilai IC₅₀ kuersetin adalah 7,028 µg/mL, sedangkan IC₅₀ fraksi etil asetat adalah 296,91 µg/mL.

Gambar 2 menunjukkan pola KLT fraksi etil asetat untuk konfirmasi keberadaan golongan senyawa flavonoid sebelum dilakukan KLT preparatif. Terdapat 4 bercak yang terdeteksi pada UV 254 nm, sedangkan pada 366 nm setelah disemprot sitroborat hanya ditemukan 1 bercak dominan yang disimpulkan bahwa bercak tersebut merupakan suatu flavonoid. Gambar 3 menunjukkan pola kromatogram dari KLT preparatif yang kemudian dianalisis menggunakan spektrofotometer UV-Vis dan FTIR.

Hasil spektrum UV-Vis pada bercak 1 (Gambar 4) diperoleh serapan pada 340 nm (pita I) dan 240 nm (pita II). Sedangkan spektrum infra merah (Gambar 5) menunjukkan adanya sinyal pada 3363 cm⁻¹ melebar (O–H ulur), 1727 cm⁻¹ (C=O), 1459 cm⁻¹ tajam dengan intensitas lemah (cincin aromatik) dan 1060 cm⁻¹ kuat (C–O).

4. Pembahasan

Hasil identifikasi kualitatif ekstrak etanol daun *Cordia* pada penelitian ini sesuai dengan penelitian Hanani *et al.*, (2019) (1) yang menyatakan bahwa ekstrak daun *Cordia* mengandung senyawa alkaloid, flavonoid, fenolik, saponin, dan saponin. Etanol memiliki kemampuan menarik senyawa tanin, polifenol, flavonoid, terpenoid, steroid dan alkaloid (18). Polaritas etanol berkaitan dengan keberadaan gugus OH pada strukturnya (19). Kandungan flavonoid terdeteksi lebih tinggi dalam etanol yang bercampur dengan air pada konsentrasi 70% dibanding etanol absolut (18). Umumnya, flavonoid pada tumbuhan berada pada bentuk glikosidanya dibandingkan bentuk aglikon. Dengan demikian, prosedur ekstraksi flavonoid dapat dilakukan dengan menggunakan teknik hidrolisis (14).

Hidrolisis dilakukan untuk melepaskan gula pada glikosida dengan cara asam, basa maupun enzimatis. Hidrolisis asam pada glikosida flavonoid dapat dilakukan dengan memanaskan campuran bahan dengan 2 N HCl-metanol (9). Beberapa peneliti ada yang menambahkan asam askorbat di dalam prosedur tersebut untuk mencegah terjadinya oksidasi. Proses hidrolisis dapat dilakukan selama 2 jam pada suhu 80 °C atau lebih (20). Bentuk aglikon selanjutnya dapat diekstraksi dengan pelarut semipolar yaitu etil asetat. Berdasarkan hasil pada Tabel 1 menunjukkan rendemen dari fraksi etil asetat dari hidrolisat. Fraksi ini mengandung senyawa aglikon dan sedikit glikosida. Kemampuan ini didasarkan pada polaritas yang cukup besar karena adanya elektron π dan elektron pasangan bebas pada O (19).

Pengujian spektrofotometri yang didasarkan pada pembentukan kompleks aluminium adalah prosedur yang sering digunakan dalam penentuan kadar flavonoid. Sampel ini direaksikan dengan $AlCl_3$ dan memungkinkan pengukuran flavonoid totalnya setelah 2-60 menit dalam kisaran 404-430 nm (21). Prinsipnya, $AlCl_3$ akan membentuk kompleks stabil dengan gugus keto C-4 dan C-3 atau C-5 hidroksil dari struktur flavonoid (flavon dan flavonol) setelah penambahan asam. Selain itu, $AlCl_3$ juga membentuk kompleks labil dengan gugus ortohidroksil pada cincin A atau B dari flavonoid (16). Reaksi kompleks flavonoid dengan $AlCl_3$ dapat dilihat pada Gambar 6.

Antiradikal merupakan kemampuan senyawa kimia untuk bereaksi dengan radikal bebas (22). Senyawa bahan alam dengan aktivitas antiradikal umumnya dari kelompok fenolik. Kelompok fenolik (termasuk flavonoid) memiliki struktur kimia yang mendukung proses peredaman radikal bebas. Pada flavonoid, ada beberapa faktor yang menentukan kapasitas antiradikalnya antara lain: (1) gugus orto-dihidroksi pada cincin B yang mampu mendonor elektron dan memberikan stabilitas yang tinggi pada bentuk radikal dan berpartisipasi dalam delokalisasi elektron, (2) ikatan rangkap 2,3 dengan suatu gugus 4-oxo pada cincin C yang bertanggung jawab terhadap delokalisasi cincin B, (3) gugus 3- dan 5- hidroksil dengan gugus 4-oxo pada cincin A dan C yang penting dalam menangkal radikal, (4) gugus 3-hidroksil pada aktivitas antioksidan (23). Pada studi ini, nilai IC_{50} fraksi etil asetat masih rendah dibandingkan dengan kuersetin sebagai pembanding terhadap peredaman radikal DPPH. Huyut *et al.*, (2017) melaporkan bahwa senyawa antioksidan baik fenolik maupun flavonoid memberikan respon aktivitas antioksidan dan antiradikal berbeda (terkait mekanismenya) tergantung dari jenis ujinya. Hal ini berkaitan dengan fakta bahwa tiap uji memiliki perbedaan spesifisitas pelarut, reagen, dan kondisi pH. Selain itu, sifat hidrofobik/hidrofilik substansi, ukuran molekul, dan jumlah (kuantitas) serta jenis dari gugus fungsi fenolik dan flavonoid yang diujikan juga ikut berperan pada hasil ujinya (24). Dengan demikian, diperlukan pengujian dengan metode selain DPPH pada fraksi etil asetat untuk membuktikan hal ini.

Pemisahan dengan KLT masih menjadi metode yang paling banyak digunakan untuk pemisahan disebabkan karena metode ini sederhana, praktis, dan ekonomis serta prosedur kerja yang mudah. Hasil kromatogram KLT menunjukkan keberadaan senyawa flavonoid setelah disemprot dengan sitroborat. Sitroborat merupakan reagen yang terdiri dari asam borat dan asam sitrat dalam

etanol. Reagen ini bereaksi dengan flavonoid dengan hasil positif berwarna kuning terang pada UV 366 nm (14). Umumnya reaksi terjadi pada flavonoid dengan gugus metoksi atau ortho-hidroksi (25).

Prosedur pendekatan klarifikasi struktur senyawa dapat menggunakan spektroskopi. Spektroskopi UV-Visible dapat digunakan untuk menganalisis kualitatif kelas senyawa tertentu. Spektroskopi inframerah, misalnya *Fourier Transform Infrared Spectroscopy* (FTIR) merupakan metode dengan resolusi tinggi yang digunakan untuk mengidentifikasi kandungan kimia dengan cepat secara non-destruktif (26). Spektroskopi serapan ultraviolet (UV) dari flavonoid memiliki dua serapan maksimal sekitar 300–350 dan 240–285 nm masing-masing sesuai dengan pita I dan II dari cincin A dan B. Sebagian besar flavon, isoflavon dan kalkon terhidroksilasi memberikan serapan maksimum pada 3300–3600 cm^{-1} karena adanya gugus OH. Selain itu, gugus karbonil ($\text{C}=\text{O}$) flavonoid diamati sekitar 1680 cm^{-1} . Selain itu, serapan tajam dan intensitas tinggi teramati pada 1600 dan 1500 cm^{-1} karena adanya ikatan rangkap pada cincin aromatik (7). Dengan demikian, dapat disimpulkan bahwa fraksi etil asetat hidrolisat ekstrak etanol daun *Cordia* mengandung senyawa flavonoid mirip dengan kelompok kalkon. Kalkon merupakan flavonoid yang menyerap pada daerah UV. Spektrum UV kalkon mengandung dua pita serapan. Pita I sering tampak pada 340–390 nm, meskipun terkadang sedikit perubahan atau puncak sering terjadi pada 300–320 nm. Pita II tampak pada 220–270 nm (27). Secara farmakologi, kalkon memiliki khasiat yang luas seperti antidiabetes, antikanker, antiinflamasi, antimikroba, antioksidan, antiparasit, psikoaktif dan neuroprotektif (28).

5. Kesimpulan

Fraksi etil asetat hasil hidrolisat ekstrak etanol 70% daun *Cordia* mengandung senyawa flavonoid yang mirip dengan kelompok kalkon berdasarkan analisis spektrum UV dan inframerah. Studi lebih lanjut dalam pemisahan dan pemurnian senyawa ini masih perlu dilakukan kedepannya dengan teknik kromatografi lain dan analisisnya menggunakan spektroskopi lain seperti spektroskopi massa dan NMR yang mendukung pada penentuan struktur dari flavonoid.

Daftar Pustaka

1. Hanani E, Soewandi SHW, Hayati, Revita N. Pharmacognostical and preliminary phytochemical evaluation of *Cordia sebestena* L. *Pharmacogn J.* 2019;11(5):1100–5.
2. Adeosun CB, Bamigbade O I., Osho A, Atolani O. Volatile Composition of the Leaf, Flower and Fruit of *Cordia sebestena* (L.). *J Essent Oil-Bearing Plants.* 2015;18(4):976–81.
3. Osho A, Otuechere CA, Adeosun CB, Oluwagbemi T, Atolani O. Phytochemical, sub-acute toxicity, and antibacterial evaluation of *Cordia sebestena* leaf extracts. *J Basic Clin Physiol Pharmacol.* 2015;27(2):163–70.
4. Sunaryo H, Siska S, Hanani E, Anindita RS, Yanti N, Lisa. Evaluation of analgesic and anti-inflammatory activities of ethanolic extract of *Cordia sebestena* L. *Eur Pharm J.* 2020;66(2):26–31.
5. Hikmawanti NPE, Hanani E, Sapitri Y, Ningrum W. Total Phenolic Content and Antioxidant Activity of Different Extracts of *Cordia sebestena* L. Leaves. *Pharmacogn J.* 2020;12(6):1311–6.
6. Prakash S, Elavarasan N, Subashini K, Kanaga S, Dhandapani R, Sivanandam M, et al. Isolation of hesperetin - A flavonoid from *Cordia sebestena* flower extract through antioxidant assay guided method and its antibacterial, anticancer effect on cervical cancer via in vitro and in silico molecular docking studies. *J Mol Struct* [Internet]. 2020;1207:127751. Available from:

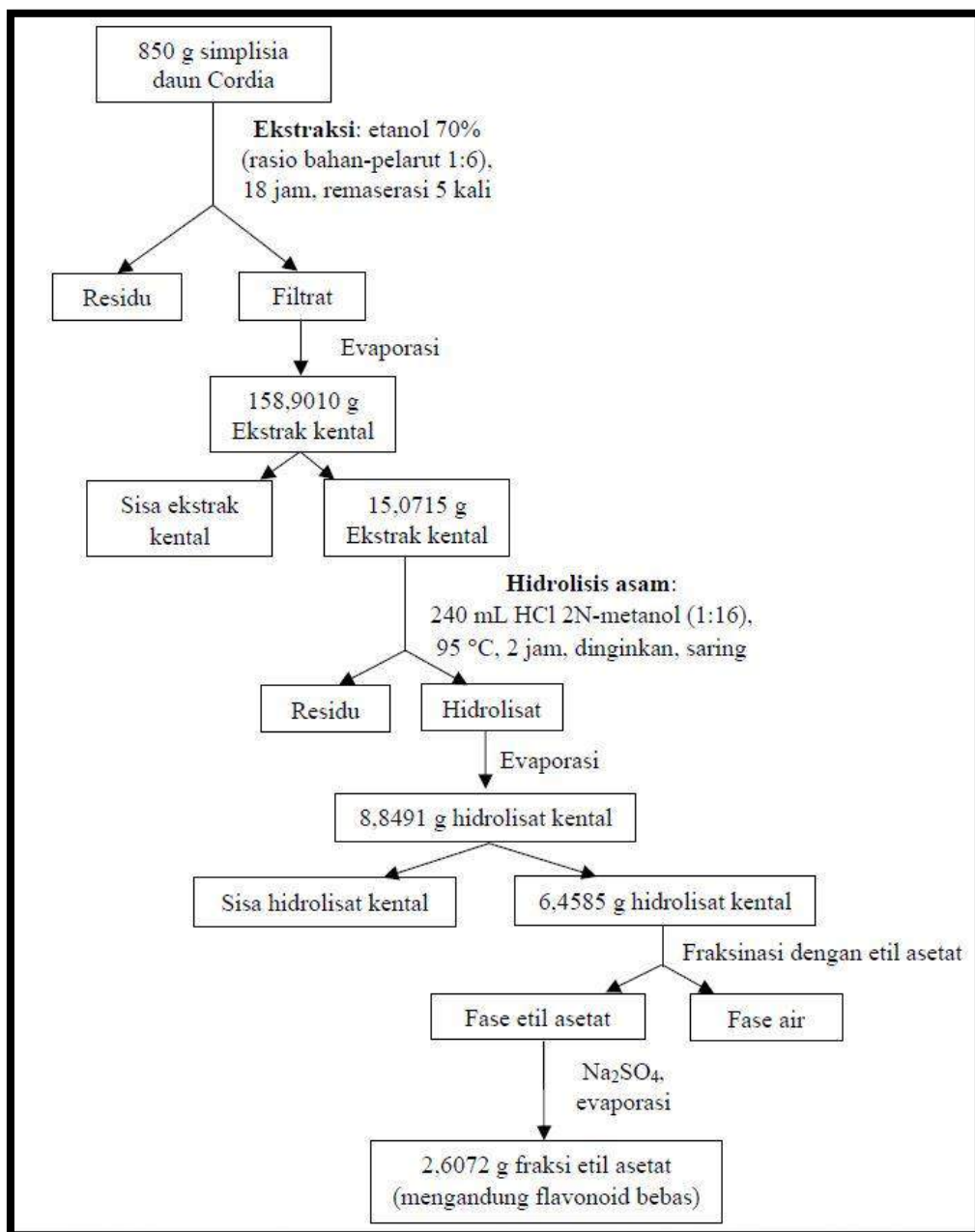
<https://doi.org/10.1016/j.molstruc.2020.127751>

7. Awouafack MD, Tane P, Morita H. Isolation and Structure Characterization of Flavonoids. In: Flavonoids - From Biosynthesis to Human Health. *Intech*; 2017. p. 45–59.
8. Bian Y, Zhang Y, Zhou Y, Li GH, Feng XS. Progress in the Pretreatment and Analysis of Flavonoids: An Update since 2013. *Sep Purif Rev* [Internet]. 2022;51(1):11–37. Available from: <https://doi.org/10.1080/15422119.2020.1801469>
9. Stalikas CD. Extraction, separation, and detection methods for phenolic acids and flavonoids. *J Sep Sci*. 2007;30(18):3268–95.
10. Nuutila AM, Kammiovirta K, Oksman-Caldentey KM. Comparison of methods for the hydrolysis of flavonoids and phenolic acids from onion and spinach for HPLC analysis. *Food Chem*. 2002;76(4):519–25.
11. Heim KE, Tagliaferro AR, Bobilya DJ. Flavonoid antioxidants: Chemistry, metabolism and structure-activity relationships. *J Nutr Biochem*. 2002;13(10):572–84.
12. Tapas AR, Sakarkar DM, Kakde RB. Flavonoids as Nutraceuticals: A Review. *Trop J Pharm Res*. 2008;7(3):1089–99.
13. Kementerian Kesehatan RI. *Farmakope Herbal Indonesia* (FHI). 2nd ed. Jakarta: Kementerian Kesehatan RI; 2017.
14. Hanani E. *Analisis Fitokimia*. Jakarta: Buku Kedokteran EGC; 2015. 34–45 p.
15. Irianti T, Murti YB, Kanistri DN, Pratiwi DR, Kuswandi, Kusumaningtyas RA. DPPH Radical Scavenging Activity of Aqueous Fraction from Ethanolic Extract of Talok Fruit (*Muntingia calabura* L.). *Tradit Med J*. 2016;21(1):38–47.
16. Chang C-C, Yang M-H, Wen H-M, Chern J-C. Estimation of total flavonoid content in propolis by two complementary colometric methods. *J Food Drug Anal*. 2002;10(3):178–82.
17. Batool R, Khan MR, Sajid M, Ali S, Zahra Z. Estimation of phytochemical constituents and in vitro antioxidant potencies of *Brachychiton populneus* (Schott & Endl.) R. Br. *BMC Chem*. 2019;13(32):1–15.
18. Tiwari, Prashant; Kumar, Bimlesh; Kaur, Mandeep; Kaur, Gurpreet; Kaur H. Phytochemical screening and Extraction: A Review. *Int Pharm Sci*. 2011;1(1):98–106.
19. Houghton PJ, Raman A. *Laboratory Handbook for the Fractionation of Natural Extracts*. 1st ed. Laboratory Handbook for the Fractionation of Natural Extracts. Springer-Science+Business Media, B.V.; 1998. 14–16, 24–31, 39–52 p.
20. Khoddami A, Wilkes MA, Roberts TH. Techniques for analysis of plant phenolic compounds. *Molecules*. 2013;18(2):2328–75.
21. Pękal A, Pyrzynska K. Evaluation of Aluminium Complexation Reaction for Flavonoid Content Assay. *Food Anal Methods*. 2014;7(9):1776–82.
22. Tirzitis G, Bartosz G. Determination of antiradical and antioxidant activity: basic principles and new insights. *Acta Biochim Pol*. 2010;57(1):139–42.
23. Dai J, Mumper RJ. Plant phenolics: Extraction, analysis and their antioxidant and anticancer properties. *Molecules*. 2010;15:7313–52.
24. Huyut Z, Beydemir F., Gülçin E. Antioxidant and Antiradical Properties of Selected Flavonoids

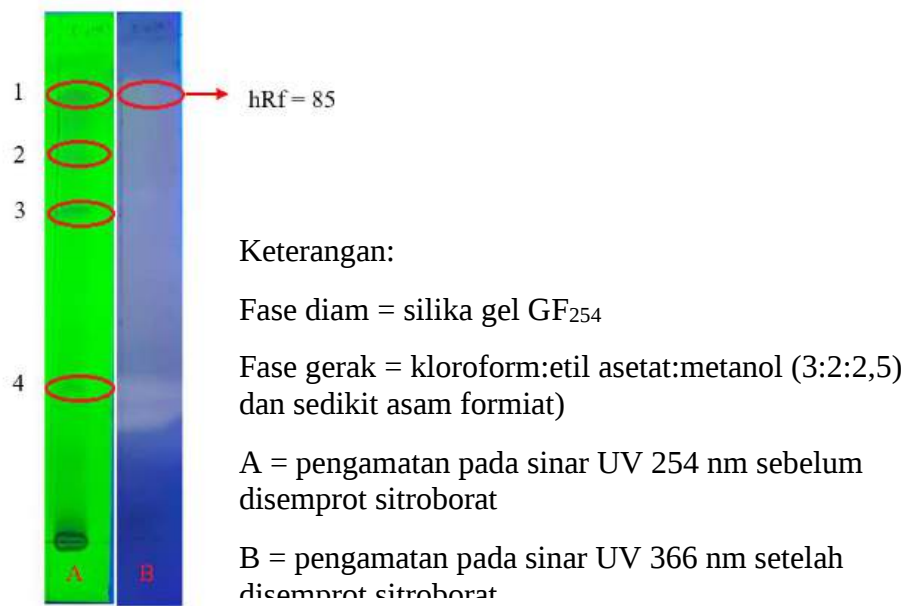
and Phenolic Compounds. *Biochem Res Int*. 2017;2017:1–10.

25. Sharma B, Agrawal SC, Gupta KC. Colour reactions of chalcones and their mechanism (A review). *Orient J Chem*. 2008;24(1):289–94.
26. Altemimi A, Lakhssassi N, Baharlouei A, Watson DG, Lightfoot DA. Phytochemicals: Extraction, Isolation, and Identification of Bioactive Compounds from Plant Extracts. *Plants*. 2017;6(42).
27. Aksöz BE, Ertan R. Spectral properties of chalcones II. *Fabad J Pharm Sci*. 2012;37(4):205–16.
28. Salehi B, Quispe C, Chamkhi I, El Omari N, Balahbib A, Sharifi-Rad J, et al. Pharmacological Properties of Chalcones: A Review of Preclinical Including Molecular Mechanisms and Clinical Evidence. *Front Pharmacol*. 2021;11(January).
29. Hikmawanti NPE, Hayati, Andriyani Y. Kadar Flavonoid Total pada Ekstrak Hidro-etanolik Daun *Sauropus androgynus* (L.) Merr dari Tiga Daerah dengan Ketinggian yang Berbeda. *J Jamu Indones*. 2021;6(2):61–7.

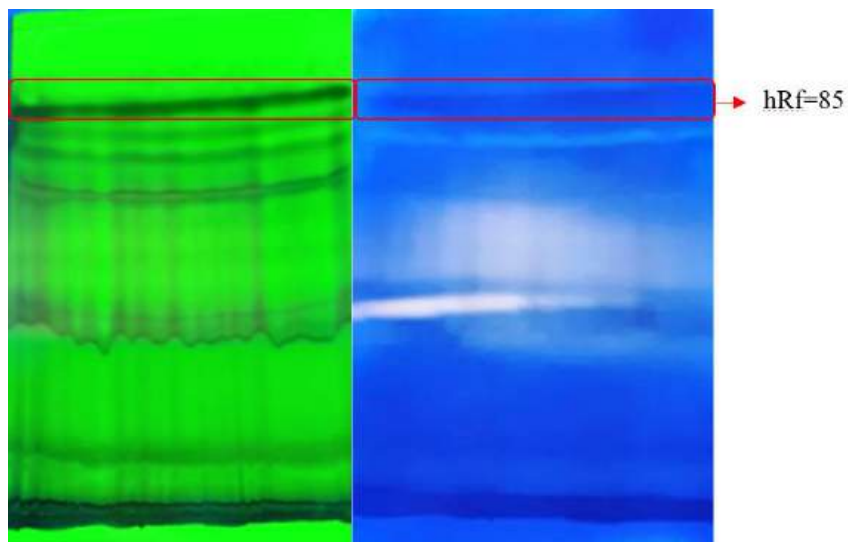
GAMBAR & TABEL



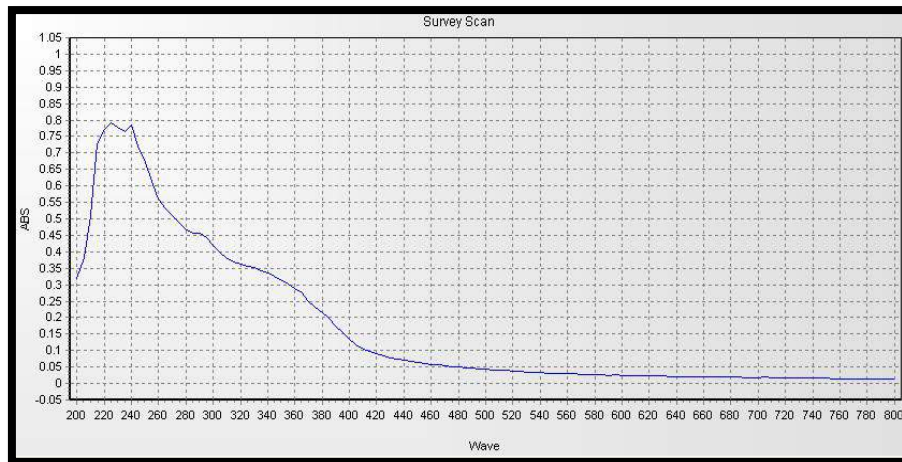
Gambar 1 Skema prosedur pemisahan



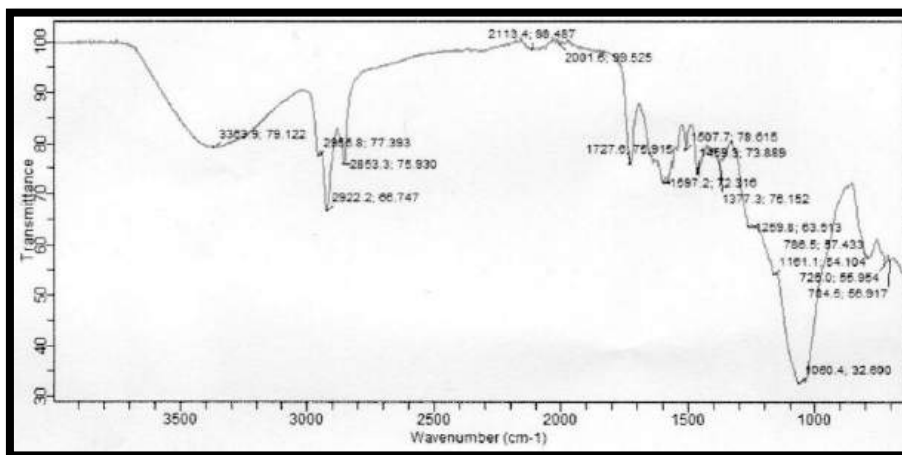
Gambar 2 Pola kromatogram KLT pada fraksi etil asetat



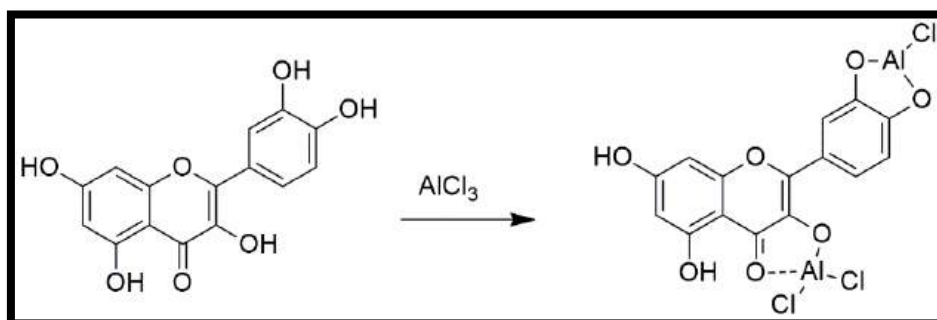
Gambar 3 Pola kromatogram KLT preparatif pada fraksi etil asetat pada sinar UV 254 nm (kiri) dan pada sinar UV 365 nm (kanan)



Gambar 4 Spektrum UV bercak 1



Gambar 5 Spektrum inframerah bercak 1



Gambar 6 Reaksi kompleks flavonoid dengan AlCl₃ (29)

Tabel 1 Hasil ekstraksi dan fraksinasi

Sampel	Bobot (g)	Rendemen (%)
Ekstrak etanol 70%*	158,90	18,69
Hidrolisat**	8,8491	58,71
Fraksi etil asetat***	2,6072	40,37

*Keterangan: * dari 850 g serbuk simplisia; ** dari 15,0715 g ekstrak; *** dari 6,4585 g hidrolisat.*

**2. Bukti hasil *review* dan file komentar *reviewer*
(10 Agustus 2022)**

- 60
- Compose
- Mail
- Inbox
- Starred
- Snoozed
- Sent
- Drafts
- More

Labels

[ijpst] Keputusan Editor External Inbox x



Prof. apt. Muchtaridi Muchtaridi, Ph.D. <muchtaridi@unpad.ac.id>
to me

[Translate to English](#)

Ermi Ni Putu Ermi Hikmawanti:

Kami telah mengambil keputusan mengenai naskah Anda untuk Indonesian Journal of Pharmaceutical Science and Technology, "Analisis Flavonoid pada Fraksi Hasil Hidrolisat Ekstrak Daun Cordia sebestena L.".

Keputusan kami adalah :

Mohon perbaikan artikel disubmit ulang ke akun Bapak/Ibu di jurnal.unpad.ac.id/ijpst. Terima Kasih atas kepercayaan Bapak/Ibu mempublikasikan hasil penelitian di Jurnal IJPST
Prof. apt. Muchtaridi Muchtaridi, Ph.D.
Ketua Editor

Department of Pharmaceutical Analysis and Medicinal Chemistry Faculty of
Pharmacy Universitas Padjadjaran
Jl. Raya Jatinangor KM 21.5 Bandung-Sumedang, 45363, Ph. 022-8428888
ext.3210
HP / Telepon 087827707157
muchtaridi@unpad.ac.id

Reviewer A:
Mohon cek Turnitin

Reviewer B:

komentar yang berkaitan dengan review artikel sudah ditulis di artikel,

.....

Analysis of Flavonoids on Fraction from Hydrolysate of *Cordia Sebestena* L. Leaves Extract

Ni Putu Ermi Hikmawanti*, Endang Hanani, dan Rini Mardiyanti

Program Studi Farmasi, Fakultas Farmasi dan Sains, Universitas Muhammadiyah Prof. DR. HAMKA, Jl. Delima II/IV Klender, Jakarta Timur, DKI Jakarta 13460, Indonesia

Abstract

Cordia sebestena L. (Boraginaceae) or Cordia is an ornamental plant that contains flavonoids. This study aimed to analyze the flavonoids in the hydrolyzed fraction of the 70% ethanol extract of Cordia leaves. The study was divided into 7 stages, namely (1) maceration using 70% ethanol, (2) acid hydrolysis of the ethanol extract, (3) fractionation of hydrolysate with ethyl acetate, (4) determination of total flavonoid content, (5) antiradical activity assay against 2,2'-diphenyl-1-picrylhydrazyl (DPPH), (6) separation of flavonoids using thin layer chromatography (TLC), and (7) identification of flavonoids using UV-Visible Spectrophotometry and Infrared Spectroscopy. The results showed the total flavonoid content of the ethyl acetate fraction was 8.20 mgQE/g with an IC₅₀ value of 296.91 g/mL against DPPH radicals. The TLC chromatogram showed the presence of one spot of the compound in the ethyl acetate fraction with an R_f value of 85.5. The results of the UV-Vis spectrum on these spots obtained absorption at 340 nm (band I) and 240 nm (band II). While the infrared spectrum shows a signal at 3363 cm⁻¹ (OH stretching), 1727 cm⁻¹ (C=O), 1459 cm⁻¹ (aromatic ring) and 1060 cm⁻¹ strong (C-O). Thus, it can be concluded that the ethyl acetate hydrolysate fraction of Cordia leaf ethanol extract contains flavonoid compounds similar to the chalcone group (diperlukan analisis lebih lanjut untuk dapat menentukan kerangka golongan flavonoid ini adalah calkon, karena calkon memiliki karbonil terkonjugasi dengan ikatan rangkap maka nilai serapan FTIR nya tidak akan melebihi 1700 cm⁻¹ jadi diperlukan minimal data 1H NMR untuk bias memiliki simpulan kerangka utama senyawa tersebut, atau menggunakan data FTIR pembandingan senyawa calkon yang telah diketahui sebelumnya)

Keywords: acid hydrolysis, Boraginaceae, *Cordia sebestena* L., ethyl acetate fraction, flavonoids

Analisis Flavonoid pada Fraksi Hasil Hidrolisat Ekstrak Daun *Cordia sebestena* L.

Abstrak

Cordia sebestena L. (Boraginaceae) atau Cordia merupakan tanaman hias dengan kandungan flavonoid. Penelitian ini bertujuan menganalisis senyawa flavonoid pada fraksi hasil hidrolisat ekstrak etanol 70% daun Cordia. Penelitian terbagi menjadi 7 tahapan, yaitu (1) maserasi daun menggunakan etanol 70%, (2) hidrolisis asam pada ekstrak dengan HCl 2N pada 95 °C selama 2 jam, (3) fraksinasi hidrolisat dengan etil asetat, (4) penentuan kadar flavonoid total dengan kolorimetri, (5) pengujian aktivitas antiradikal terhadap 2,2'-difenil-1-pikrilhidrazil (DPPH), (6) pemisahan flavonoid menggunakan kromatografi lapis tipis (KLT), dan (7) identifikasi flavonoid menggunakan spektrofotometri UV-Vis dan infra merah. Hasil menunjukkan kadar flavonoid total fraksi etil asetat

sebesar 8,20 mgQE/g dengan nilai IC₅₀ terhadap radikal DPPH sebesar 296,91 µg/mL. Kromatogram KLT menunjukkan keberadaan satu bercak senyawa pada fraksi etil asetat dengan nilai R_f adalah 85,5. Hasil spektrum UV-Vis pada bercak tersebut diperoleh serapan pada 340 nm (pita I) dan 240 nm (pita II). Sedangkan spektrum infra merah menunjukkan adanya sinyal pada 3363 cm⁻¹ (O–H ulur), 1727 cm⁻¹ (C=O), 1459 cm⁻¹ (cincin aromatik) dan 1060 cm⁻¹ kuat (C–O). Dengan demikian, dapat disimpulkan bahwa fraksi etil asetat hidrolisat ekstrak etanol daun *Cordia* mengandung senyawa flavonoid yang mirip dengan kelompok kalkon.

Kata kunci: *Boraginaceae*, *Cordia sebestena* L., flavonoid, fraksi etil asetat, hidrolisis asam

1. Pendahuluan

Cordia sebestena L. (Boraginaceae) atau *Cordia* merupakan suatu tanaman hias. Daun *Cordia* mengandung senyawa alkaloid, flavonoid, fenol, saponin, steroid/triterpenoid, dan tannin (1). Daun *Cordia* juga mengandung senyawa volatil sebesar 0,05% (2). Daun *Cordia* memiliki beragam aktivitas farmakologi, antara lain antibakteri (3), analgetik, antiinflamasi (4), antioksidan (5), dan lain sebagainya. Studi mengenai toksisitas subakut dari ekstrak etil asetat daun *Cordia* menunjukkan bahwa ekstrak tersebut tidak toksik terhadap hati (3). Sebelumnya, telah diisolasi kandungan flavonoid hesperetin dari bunga *Cordia* dengan khasiat antibakteri dan antikanker terhadap kanker serviks *in vitro* (6). Namun, studi mengenai flavonoid dari daun *Cordia* belum banyak dieksplorasi. (banyak sumber senyawa flavonoid yang lazim dikenal sebagai tanaman obat, apakah alasan mendasar dari menggunakan tanaman hias sebagai sumber senyawa flavonoid? Hal tersebut perlu diungkapkan lebih jelas pada bagian pendahuluan)

Flavonoid merupakan kelompok fenolik dengan struktur inti C-15 (C₆-C₃-C₆). Flavonoid merupakan kelas metabolit sekunder dari bahan alam sebagai nutrasetikal yang paling banyak digunakan pada pengobatan, makanan, suplemen dan lainnya. Meskipun studi mengenai isolasi maupun sintesisnya telah banyak, para peneliti masih tertarik meneliti flavonoid dan turunannya. Umumnya, flavonoid dapat diekstraksi dari pelarut air, etanol, metanol, *n*-butanol, aseton, etil asetat, kloroform dan lainnya. Pelarut polar digunakan untuk memperoleh flavonoid bentuk glikosida, sedangkan pelarut non-polar untuk ekstraksi bentuk aglikonnya (7). Untuk memperoleh bentuk aglikon flavonoid umumnya dilakukan proses hidrolisis terhadap glikosida flavonoid dengan cara asam, basa, maupun enzimatis. Hidrolisis asam merupakan teknik sederhana, cepat dan ekonomis untuk mengubah suatu glikosida menjadi aglikon (8). Teknik ini sering kali dilakukan menggunakan HCl 2 N-metanol atau HCl 2M (9). Hidrolisis glikosida flavonoid dari beberapa sampel sayuran dilaporkan baik dilakukan dengan metode hidrolisis asam menggunakan HCl 1,2 M dalam 50% metanol-air pada suhu 80 °C selama 2 jam dengan penambahan asam askorbat sebagai pencegah oksidasi (10).

Flavonoid merupakan suatu antioksidan yang secara alami ditemukan dalam bahan alam terutama tumbuhan (11). Selain itu, flavonoid juga berperan sebagai suatu nutrasetikal dengan khasiat antimikroba, antibakteri, antifungi, antivirus, antiulcer, hepatoprotektif, antiinflamasi, efek kardioprotektif, antineoplasma, dan lainnya (12). Pentingnya flavonoid dalam penemuan dan pengembangan obat baru yang berasal dari tanaman menjadi alasan dilakukannya penelitian ini. Penelitian ini bertujuan melakukan analisis senyawa flavonoid pada fraksi etil asetat hasil hidrolisat ekstrak etanol 70% daun *Cordia* sekaligus menetapkan kadar dan menentukan aktivitas antiradikalnya.

2. Metode

2.1. Alat

Alat-alat yang digunakan pada penelitian ini meliputi alat-alat gelas yang umum digunakan di laboratorium, toples maserasi, ayakan no. mesh 40, timbangan analitik (Ohaus), mikropipet (Eppendorf), *vacuum rotary evaporator* (Eyela N-1100, Cina), oven (Mettler UN-55), chamber

(Camag), kotak UV (Camag), ultrasonik (Branson 5510), spektrofotometer UV-Vis (UV-1601 Series, Shimadzu, Japan), dan spektrometer FTIR (Agilent Cary 630, USA).

2.2. Bahan

Etanol 70%, etil asetat, metanol, kloroform pada tingkat analitik (Merck, Jerman) digunakan sebagai pelarut. Bahan lain yang digunakan antara lain plat KLT GF₂₅₄ (Merck, Jerman), DPPH, AlCl₃ 10%, kalium asetat, kuersetin (Sigma-Aldrich Co., USA), HCl 2N, Na₂SO₄, asam formiat, dan aquades.

2.3. Prosedur

Ekstraksi

Daun Cordia diperoleh dari pekarangan rumah warga di sekitar Jakarta Timur. Sebelumnya, tanaman telah dideterminasi di Lembaga Ilmu Pengetahuan Indonesia (*Indonesian Institute of Sciences*), Pusat Penelitian Biologi (*Research Center for Biology*), Cibinong Sciences Center, Cibinong. Sampel daun segar sebanyak 2,5 kg dibuat simplisia menggunakan oven pada 50 °C. Simplisia kemudian dihaluskan dengan blender elektrik dan diayak dengan ayakan no. mesh 40. Serbuk simplisia disimpan dalam wadah kering tertutup rapat (13).

Serbuk simplisia 850 g diekstraksi dengan maserasi dengan pelarut etanol 70% (dengan rasio bahan–pelarut 1:6) selama 18 jam sambil sesekali diaduk. Ampas yang telah dipisahkan dari filtrat kemudian diremaserasi sampai pemeriksaan terhadap kandungan flavonoid didalamnya memberikan hasil negatif. Filtrat dikumpulkan dan diuapkan pelarutnya menggunakan *vacuum rotary evaporator* pada suhu 50 °C dan dilanjutkan dengan penangas air hingga diperoleh ekstrak kental (13). Ekstrak dihitung persentase rendemen dan dilakukan penapisan fitokimia sederhana mengikuti prosedur pada Hanani (2015) (14). Skema prosedur ekstraksi dapat dilihat pada Gambar 1.

Hidrolisis Ekstrak

Ekstrak etanol sebanyak 15,0745 g dicampurkan dengan 240 mL HCl 2N-metanol (dengan rasio bahan–pelarut 1:16) di dalam labu alas bulat. Campuran dipanaskan pada 95 °C selama 2 jam. Setelah dingin, campuran disaring dan dipekatkan di atas penangas air pada 60 °C hingga diperoleh hidrolisat kental (9,15).

Fraksinasi dari hasil hidrolisat

Hidrolisat sebanyak 6,4585 g dilarutkan dalam 20 mL metanol dan 20 mL aquadest, dan kemudian dimasukkan ke dalam corong pisah. Selanjutnya, campuran difraksinasi menggunakan etil asetat sebanyak 40 mL. Setelah dikocok perlahan dan didiamkan sesaat, fase air (lapisan bawah) dan fase etil asetat (lapisan atas) masing-masing dipisahkan dan dikumpulkan. Fraksi etil asetat disaring menggunakan Na₂SO₄ untuk menghilangkan air dan selanjutnya dipekatkan di atas penangas air dengan suhu 40 °C hingga kental (15).

Penetapan kadar flavonoid total fraksi

Penetapan kadar flavonoid total dengan metode kolorimetri yang mengacu pada prosedur Chang et al., (2002) (16) dengan sedikit modifikasi. Kuersetin digunakan untuk membuat kurva kalibrasi. Kuersetin (1000 µg/mL) dalam metanol kemudian diencerkan hingga diperoleh larutan seri konsentrasi 26, 44, 62, 80 dan 98 µg/mL. Masing-masing larutan (0,5 mL) secara terpisah direaksikan dengan metanol (1,5 mL), AlCl₃ 10% (0,1 mL), kalium asetat 1 M (0,1 mL) dan aquades (2,8 mL). Setelah inkubasi 30 menit pada suhu kamar, campuran diukur absorbansinya pada 440 nm menggunakan Spektrofotometer UV-Vis. Selanjutnya dibuat grafik hubungan absorbansi yang

diperoleh terhadap konsentrasi kuersetin yang digunakan untuk menghasilkan persamaan garis linear $y=bx\pm a$. Persamaan ini selanjutnya digunakan untuk menetapkan konsentrasi flavonoid dalam larutan uji. Selanjutnya, prosedur mereaksikan yang sama dilakukan pada larutan uji fraksi etil asetat 6000 $\mu\text{g/mL}$ (0,5 mL) dalam metanol untuk menentukan kadar flavonoid total pada fraksi tersebut. Pengujian dilakukan triplo.

Penentuan aktivitas antiradikal bebas fraksi

Penentuan aktivitas antiradikal dilakukan terhadap DPPH dengan kuersetin sebagai pembanding mengikuti prosedur Batool et al., (2019) (17) dengan sedikit modifikasi. Larutan DPPH disiapkan dengan konsentrasi 0,2 mM. Larutan uji fraksi etil asetat disiapkan dengan seri konsentrasi yaitu 50, 150, 250, 350, dan 450 $\mu\text{g/mL}$. Sedangkan, seri konsentrasi kuersetin sebagai pembanding adalah 2, 4, 6, 8, dan 10 $\mu\text{g/mL}$. Selanjutnya larutan uji fraksi etil asetat maupun kuersetin masing-masing secara terpisah sebanyak 1 mL dicampurkan dengan 4 mL DPPH dan diinkubasi selama 30 menit pada suhu ruang dalam kondisi gelap. Absorbansi diukur pada 515 nm menggunakan Spektrofotometer UV-Vis. Kuersetin digunakan sebagai pembanding. Pengujian dilakukan triplo. Kapasitas antiradikal dihitung berdasarkan persentase inhibisi terhadap radikal DPPH yang dihitung dengan cara: absorbansi DPPH yang telah dikurangi dengan absorbansi sampel dibagi dengan absorbansi DPPH dikali 100%. Persentase inhibisi terhadap DPPH kemudian dibuat kurva terhadap konsentrasi masing-masing sampel untuk memperoleh persamaan garis linear $y=bx\pm a$. Persamaan ini kemudian digunakan untuk menghitung konsentrasi sampel yang mampu menghambat 50% radikal DPPH (*inhibition concentration* 50, IC_{50}) yang dinyatakan dalam $\mu\text{g/mL}$.

Pemisahan dengan KLT preparatif

Sebelumnya, konfirmasi keberadaan flavonoid pada fraksi etil asetat dilakukan pada plat KLT GF254 dengan fase gerak kloroform:etil asetat:metanol (3:2:2,5) dengan penambahan sedikit asam formiat. Pereaksi semprot sitroborat digunakan untuk melihat golongan senyawa. Pemisahan flavonoid pada fraksi etil asetat selanjutnya dilakukan pada plat KLT preparatif menggunakan fase gerak yang sama. Bercak diamati di bawah sinar UV 254 dan 366 nm tanpa disemprot sitroborat.

Analisis senyawa flavonoid

Bercak yang diperoleh dari hasil KLT preparatif dikerok dan dilarutkan dalam metanol dengan bantuan ultrasonik selama 15 menit. Filtrat disaring dengan kapas dan kertas saring. Filtrat kemudian diidentifikasi menggunakan spektrofotometer UV-Vis dan FTIR.

3. Hasil

Hasil identifikasi kualitatif menunjukkan kandungan kimia ekstrak etanol 70% daun Cordia antara lain alkaloid, fenolik, flavonoid, tanin, dan saponin. Hasil ekstraksi dan fraksinasi hidrolisat dapat dilihat pada Tabel 1. Hasil penentuan kadar flavonoid total dari fraksi etil asetat, menunjukkan bahwa flavonoid pada fraksi etil asetat sebesar 8,20 mgQE/g. Selanjutnya, pengujian aktivitas antiradikal dilakukan terhadap DPPH menggunakan spektrofotometer UV-Vis. Nilai IC_{50} kuersetin adalah 7,028 $\mu\text{g/mL}$, sedangkan IC_{50} fraksi etil asetat adalah 296,91 $\mu\text{g/mL}$.

Gambar 2 menunjukkan pola KLT fraksi etil asetat untuk konfirmasi keberadaan golongan senyawa flavonoid sebelum dilakukan KLT preparatif. Terdapat 4 bercak yang terdeteksi pada UV 254 nm, sedangkan pada 366 nm setelah disemprot sitroborat hanya ditemukan 1 bercak dominan yang disimpulkan bahwa bercak tersebut merupakan suatu flavonoid. Gambar 3 menunjukkan pola

kromatogram dari KLT preparatif yang kemudian dianalisis menggunakan spektrofotometer UV-Vis dan FTIR.

Hasil spektrum UV-Vis pada bercak 1 (Gambar 4) diperoleh serapan pada 340 nm (pita I) dan 240 nm (pita II). Sedangkan spektrum infra merah (Gambar 5) menunjukkan adanya sinyal pada 3363 cm^{-1} melebar (O–H ulur), 1727 cm^{-1} (C=O), 1459 cm^{-1} tajam dengan intensitas lemah (cincin aromatik) dan 1060 cm^{-1} kuat (C–O). **lengkapi dengan gambar KLT yang menunjukkan bahwa isolate telah murni yang ditunjukkan dengan shanya terdapat satu spot pada beberapa eluen dengan nilai RF yang berbeda.**

4. Pembahasan

Hasil identifikasi kualitatif ekstrak etanol daun Cordia pada penelitian ini sesuai dengan penelitian Hanani *et al.*, (2019) (1) yang menyatakan bahwa ekstrak daun Cordia mengandung senyawa alkaloid, flavonoid, fenolik, saponin, dan saponin. Etanol memiliki kemampuan menarik senyawa tanin, polifenol, flavonoid, terpenoid, steroid dan alkaloid (18). Polaritas etanol berkaitan dengan keberadaan gugus OH pada strukturnya (19). Kandungan flavonoid terdeteksi lebih tinggi dalam etanol yang bercampur dengan air pada konsentrasi 70% dibanding etanol absolut (18). Umumnya, flavonoid pada tumbuhan berada pada bentuk glikosidanya dibandingkan bentuk aglikon. Dengan demikian, prosedur ekstraksi flavonoid dapat dilakukan dengan menggunakan teknik hidrolisis (14).

Hidrolisis dilakukan untuk melepaskan gula pada glikosida dengan cara asam, basa maupun enzimatis. Hidrolisis asam pada glikosida flavonoid dapat dilakukan dengan memanaskan campuran bahan dengan 2 N HCl-metanol (9). Beberapa peneliti ada yang menambahkan asam askorbat di dalam prosedur tersebut untuk mencegah terjadinya oksidasi. Proses hidrolisis dapat dilakukan selama 2 jam pada suhu 80 °C atau lebih (20). Bentuk aglikon selanjutnya dapat diekstraksi dengan pelarut semipolar yaitu etil asetat. Berdasarkan hasil pada Tabel 1 menunjukkan rendemen dari fraksi etil asetat dari hidrolisat. Fraksi ini mengandung senyawa aglikon dan sedikit glikosida. Kemampuan ini didasarkan pada polaritas yang cukup besar karena adanya elektron π dan elektron pasangan bebas pada O (19).

Pengujian spektrofotometri yang didasarkan pada pembentukan kompleks aluminium adalah prosedur yang sering digunakan dalam penentuan kadar flavonoid. Sampel ini direaksikan dengan AlCl_3 dan memungkinkan pengukuran flavonoid totalnya setelah 2-60 menit dalam kisaran 404-430 nm (21). Prinsipnya, AlCl_3 akan membentuk kompleks stabil dengan gugus keto C-4 dan C-3 atau C-5 hidroksil dari struktur flavonoid (flavon dan flavonol) setelah penambahan asam. Selain itu, AlCl_3 juga membentuk kompleks labil dengan gugus ortohidroksil pada cincin A atau B dari flavonoid (16). Reaksi kompleks flavonoid dengan AlCl_3 dapat dilihat pada Gambar 6.

Antiradikal merupakan kemampuan senyawa kimia untuk bereaksi dengan radikal bebas (22). Senyawa bahan alam dengan aktivitas antiradikal umumnya dari kelompok fenolik. Kelompok fenolik (termasuk flavonoid) memiliki struktur kimia yang mendukung proses peredaman radikal bebas. Pada flavonoid, ada beberapa faktor yang menentukan kapasitas antiradikalnya antara lain: (1) gugus ortodihidroksi pada cincin B yang mampu mendonor elektron dan memberikan stabilitas yang tinggi pada bentuk radikal dan berpartisipasi dalam delokalisasi elektron, (2) ikatan rangkap 2,3 dengan suatu gugus 4-oxo pada cincin C yang bertanggung jawab terhadap delokalisasi cincin B, (3) gugus 3- dan 5- hidroksil dengan gugus 4-oxo pada cincin A dan C yang penting dalam menangkal radikal, (4) gugus 3-hidroksil pada aktivitas antioksidan (23). Pada studi ini, nilai IC_{50} fraksi etil asetat masih rendah dibandingkan dengan kuersetin sebagai pembanding terhadap peredaman radikal DPPH. Huyut *et al.*, (2017) melaporkan bahwa senyawa antioksidan baik fenolik maupun flavonoid memberikan respon aktivitas antioksidan dan antiradikal berbeda (terkait mekanismenya) tergantung dari jenis ujinya. Hal

ini berkaitan dengan fakta bahwa tiap uji memiliki perbedaan spesifisitas pelarut, reagen, dan kondisi pH. Selain itu, sifat hidrofobik/hidrofilik substansi, ukuran molekul, dan jumlah (kuantitas) serta jenis dari gugus fungsi fenolik dan flavonoid yang diujikan juga ikut berperan pada hasil ujinya (24). Dengan demikian, diperlukan pengujian dengan metode selain DPPH pada fraksi etil asetat untuk membuktikan hal ini.

Pemisahan dengan KLT masih menjadi metode yang paling banyak digunakan untuk pemisahan disebabkan karena metode ini sederhana, praktis, dan ekonomis serta prosedur kerja yang mudah. Hasil kromatogram KLT menunjukkan keberadaan senyawa flavonoid setelah disemprot dengan sitroborat. Sitroborat merupakan reagen yang terdiri dari asam borat dan asam sitrat dalam etanol. Reagen ini bereaksi dengan flavonoid dengan hasil positif berwarna kuning terang pada UV 366 nm (14). Umumnya reaksi terjadi pada flavonoid dengan gugus metoksi atau ortho-hidroksi (25).

Prosedur pendekatan klarifikasi struktur senyawa dapat menggunakan spektroskopi. Spektroskopi UV-Visible dapat digunakan untuk menganalisis kualitatif kelas senyawa tertentu. Spektroskopi inframerah, misalnya *Fourier Transform Infrared Spectroscopy* (FTIR) merupakan metode dengan resolusi tinggi yang digunakan untuk mengidentifikasi kandungan kimia dengan cepat secara non-destruktif (26). Spektroskopi serapan ultraviolet (UV) dari flavonoid memiliki dua serapan maksimal sekitar 300–350 dan 240–285 nm masing-masing sesuai dengan pita I dan II dari cincin A dan B. Sebagian besar flavon, isoflavon dan kalkon terhidroksilasi memberikan serapan maksimum pada 3300–3600 cm^{-1} karena adanya gugus OH. Selain itu, gugus karbonil ($\text{C}=\text{O}$) flavonoid diamati sekitar 1680 cm^{-1} . Selain itu, serapan tajam dan intensitas tinggi teramati pada 1600 dan 1500 cm^{-1} karena adanya ikatan rangkap pada cincin aromatik (7). Dengan demikian, dapat disimpulkan bahwa fraksi etil asetat hidrolisat ekstrak etanol daun *Cordia* mengandung senyawa flavonoid mirip dengan kelompok kalkon. Kalkon merupakan flavonoid yang menyerap pada daerah UV. Spektrum UV kalkon mengandung dua pita serapan. Pita I sering tampak pada 340–390 nm, meskipun terkadang sedikit perubahan atau puncak sering terjadi pada 300–320 nm. Pita II tampak pada 220–270 nm (27). Secara farmakologi, kalkon memiliki khasiat yang luas seperti antidiabetes, antikanker, antiinflamasi, antimikroba, antioksidan, antiparasit, psikoaktif dan neuroprotektif (28).

5. Kesimpulan

Fraksi etil asetat hasil hidrolisat ekstrak etanol 70% daun *Cordia* mengandung senyawa flavonoid yang mirip dengan kelompok kalkon berdasarkan analisis spektrum UV dan inframerah. Studi lebih lanjut dalam pemisahan dan pemurnian senyawa ini masih perlu dilakukan kedepannya dengan teknik kromatografi lain dan analisisnya menggunakan spektroskopi lain seperti spektroskopi massa dan NMR yang mendukung pada penentuan struktur dari flavonoid.

Daftar Pustaka

1. Hanani E, Soewandi SHW, Hayati, Revita N. Pharmacognostical and preliminary phytochemical evaluation of *Cordia sebestena* L. *Pharmacogn J.* 2019;11(5):1100–5.
2. Adeosun CB, Bamigbade O l., Osho A, Atolani O. Volatile Composition of the Leaf, Flower and Fruit of *Cordia sebestena* (L.). *J Essent Oil-Bearing Plants.* 2015;18(4):976–81.
3. Osho A, Otuechere CA, Adeosun CB, Oluwagbemi T, Atolani O. Phytochemical, sub-acute toxicity, and antibacterial evaluation of *Cordia sebestena* leaf extracts. *J Basic Clin Physiol Pharmacol.* 2015;27(2):163–70.
4. Sunaryo H, Siska S, Hanani E, Anindita RS, Yanti N, Lisa. Evaluation of analgesic and anti-

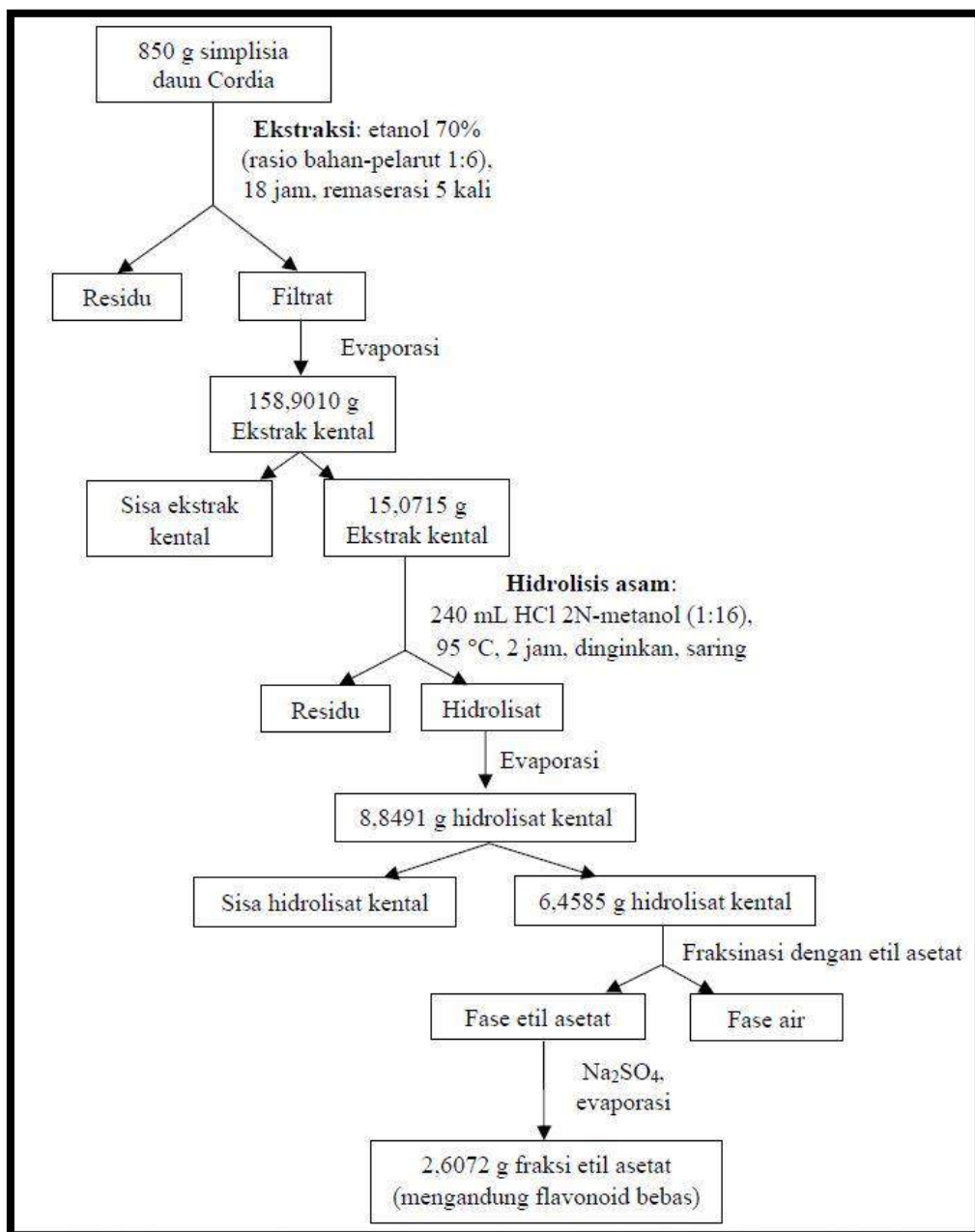
inflammatory activities of ethanolic extract of *Cordia sebestena* L. *Eur Pharm J*. 2020;66(2):26–31.

5. Hikmawanti NPE, Hanani E, Sapitri Y, Ningrum W. Total Phenolic Content and Antioxidant Activity of Different Extracts of *Cordia sebestena* L. Leaves. *Pharmacogn J*. 2020;12(6):1311–6.
6. Prakash S, Elavarasan N, Subashini K, Kanaga S, Dhandapani R, Sivanandam M, et al. Isolation of hesperetin - A flavonoid from *Cordia sebestena* flower extract through antioxidant assay guided method and its antibacterial, anticancer effect on cervical cancer via in vitro and in silico molecular docking studies. *J Mol Struct* [Internet]. 2020;1207:127751. Available from: <https://doi.org/10.1016/j.molstruc.2020.127751>
7. Awouafack MD, Tane P, Morita H. Isolation and Structure Characterization of Flavonoids. In: *Flavonoids - From Biosynthesis to Human Health*. Intech; 2017. p. 45–59.
8. Bian Y, Zhang Y, Zhou Y, Li GH, Feng XS. Progress in the Pretreatment and Analysis of Flavonoids: An Update since 2013. *Sep Purif Rev* [Internet]. 2022;51(1):11–37. Available from: <https://doi.org/10.1080/15422119.2020.1801469>
9. Stalikas CD. Extraction, separation, and detection methods for phenolic acids and flavonoids. *J Sep Sci*. 2007;30(18):3268–95.
10. Nuutila AM, Kammiovirta K, Oksman-Caldentey KM. Comparison of methods for the hydrolysis of flavonoids and phenolic acids from onion and spinach for HPLC analysis. *Food Chem*. 2002;76(4):519–25.
11. Heim KE, Tagliaferro AR, Bobilya DJ. Flavonoid antioxidants: Chemistry, metabolism and structure-activity relationships. *J Nutr Biochem*. 2002;13(10):572–84.
12. Tapas AR, Sakarkar DM, Kakde RB. Flavonoids as Nutraceuticals: A Review. *Trop J Pharm Res*. 2008;7(3):1089–99.
13. Kementerian Kesehatan RI. *Farmakope Herbal Indonesia* (FHI). 2nd ed. Jakarta: Kementerian Kesehatan RI; 2017.
14. Hanani E. *Analisis Fitokimia*. Jakarta: Buku Kedokteran EGC; 2015. 34–45 p.
15. Irianti T, Murti YB, Kanistri DN, Pratiwi DR, Kuswandi, Kusumaningtyas RA. DPPH Radical Scavenging Activity of Aqueous Fraction from Ethanolic Extract of Talok Fruit (*Muntingia calabura* L.). *Tradit Med J*. 2016;21(1):38–47.
16. Chang C-C, Yang M-H, Wen H-M, Chern J-C. Estimation of total flavonoid content in propolis by two complementary colometric methods. *J Food Drug Anal*. 2002;10(3):178–82.
17. Batool R, Khan MR, Sajid M, Ali S, Zahra Z. Estimation of phytochemical constituents and in vitro antioxidant potencies of *Brachychiton populneus* (Schott & Endl.) R. Br. *BMC Chem*. 2019;13(32):1–15.
18. Tiwari, Prashant; Kumar, Bimlesh; Kaur, Mandeep; Kaur, Gurpreet; Kaur H. Phytochemical screening and Extraction: A Review. *Int Pharm Sci*. 2011;1(1):98–106.
19. Houghton PJ, Raman A. *Laboratory Handbook for the Fractionation of Natural Extracts*. 1st ed. Laboratory Handbook for the Fractionation of Natural Extracts. Springer-Science+Business Media, B.V.; 1998. 14–16, 24–31, 39–52 p.
20. Khoddami A, Wilkes MA, Roberts TH. Techniques for analysis of plant phenolic compounds.

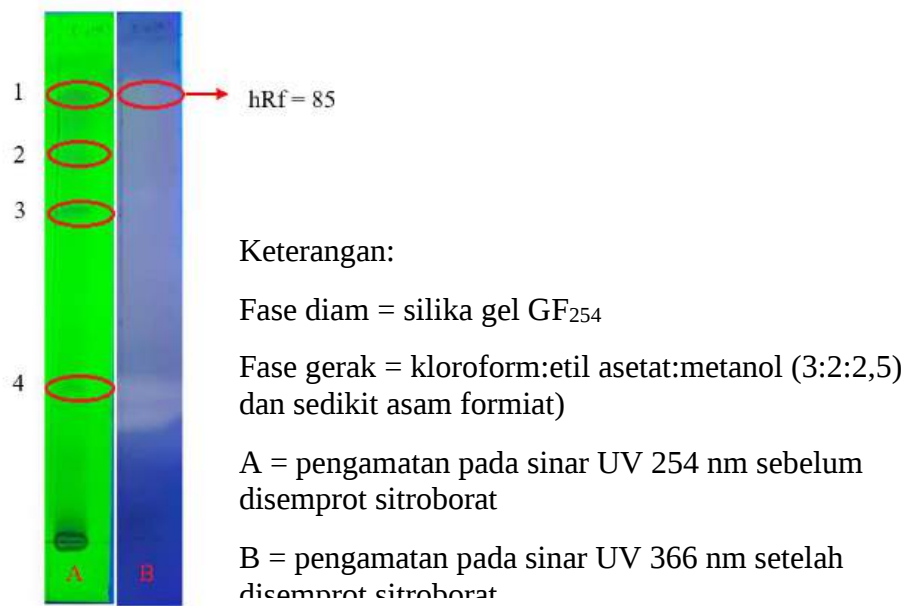
Molecules. 2013;18(2):2328–75.

21. Pękal A, Pyrzynska K. Evaluation of Aluminium Complexation Reaction for Flavonoid Content Assay. *Food Anal Methods*. 2014;7(9):1776–82.
22. Tirzitis G, Bartosz G. Determination of antiradical and antioxidant activity: basic principles and new insights. *Acta Biochim Pol*. 2010;57(1):139–42.
23. Dai J, Mumper RJ. Plant phenolics: Extraction, analysis and their antioxidant and anticancer properties. *Molecules*. 2010;15:7313–52.
24. Huyut Z, Beydemir F., Gülçin E. Antioxidant and Antiradical Properties of Selected Flavonoids and Phenolic Compounds. *Biochem Res Int*. 2017;2017:1–10.
25. Sharma B, Agrawal SC, Gupta KC. Colour reactions of chalcones and their mechanism (A review). *Orient J Chem*. 2008;24(1):289–94.
26. Altemimi A, Lakhssassi N, Baharlouei A, Watson DG, Lightfoot DA. Phytochemicals: Extraction, Isolation, and Identification of Bioactive Compounds from Plant Extracts. *Plants*. 2017;6(42).
27. Aksöz BE, Ertan R. Spectral properties of chalcones II. *Fabad J Pharm Sci*. 2012;37(4):205–16.
28. Salehi B, Quispe C, Chamkhi I, El Omari N, Balahbib A, Sharifi-Rad J, et al. Pharmacological Properties of Chalcones: A Review of Preclinical Including Molecular Mechanisms and Clinical Evidence. *Front Pharmacol*. 2021;11(January).
29. Hikmawanti NPE, Hayati, Andriyani Y. Kadar Flavonoid Total pada Ekstrak Hidro-etanolik Daun Sauropus androgynus (L.) Merr dari Tiga Daerah dengan Ketinggian yang Berbeda. *J Jamu Indones*. 2021;6(2):61–7.

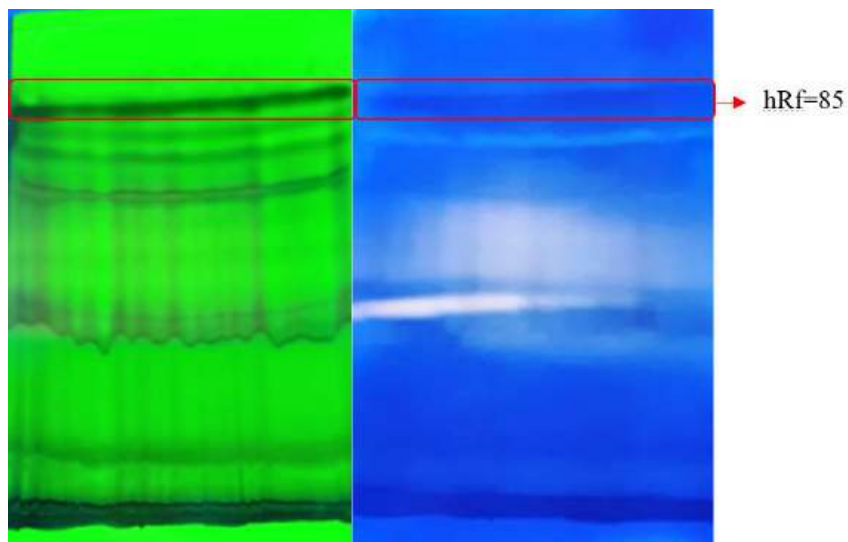
GAMBAR & TABEL



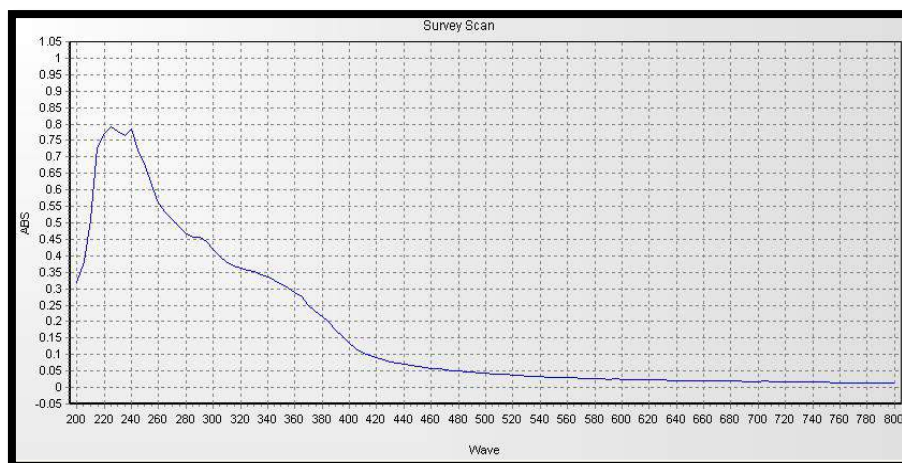
Gambar 1 Skema prosedur pemisahan



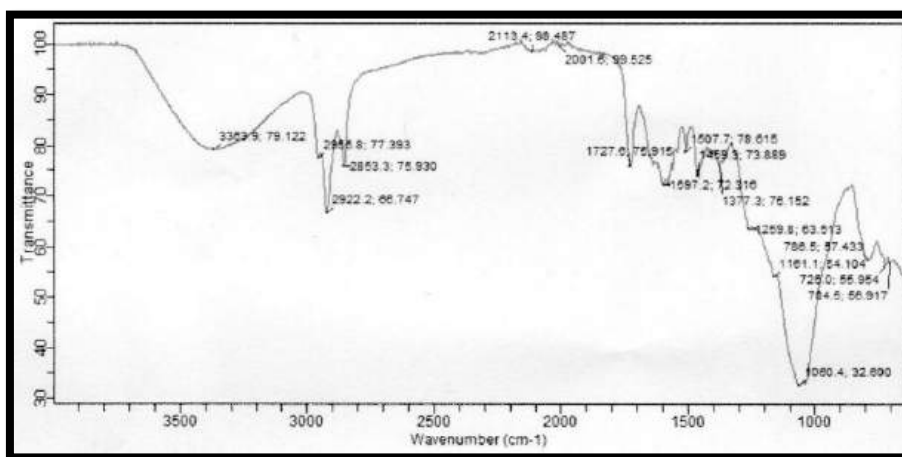
Gambar 2 Pola kromatogram KLT pada fraksi etil asetat



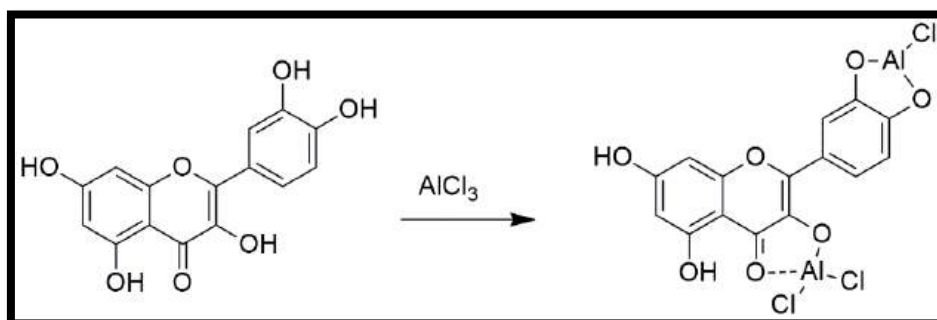
Gambar 3 Pola kromatogram KLT preparatif pada fraksi etil asetat pada sinar UV 254 nm (kiri) dan pada sinar UV 365 nm (kanan)



Gambar 4 Spektrum UV bercak 1



Gambar 5 Spektrum inframerah bercak 1



Gambar 6 Reaksi kompleks flavonoid dengan AlCl_3 (29)

Tabel 1 Hasil ekstraksi dan fraksinasi

Sampel	Bobot (g)	Rendemen (%)
Ekstrak etanol 70%*	158,90	18,69
Hidrolisat**	8,8491	58,71
Fraksi etil asetat***	2,6072	40,37

*Keterangan: * dari 850 g serbuk simplisia; ** dari 15,0715 g ekstrak; *** dari 6,4585 g hidrolisat.*



Analysis of Flavonoids on Fraction from Hydrolysate of *Cordia Sebestena* L. Leaves Extract

Ni Putu Ermi Hikmawanti*, Endang Hanani, dan Rini Mardiyanti

Program Studi Farmasi, Fakultas Farmasi dan Sains, Universitas Muhammadiyah Prof. DR.

HAMKA, Jl. Delima II/IV Klender, Jakarta Timur, DKI Jakarta 13460, Indonesia

Abstract

Cordia sebestena L. (Boraginaceae) or Cordia is an ornamental plant that contains flavonoids. This study aimed to analyze the flavonoids in the hydrolyzed fraction of the 70% ethanol extract of Cordia leaves. The study was divided into 7 stages, namely (1) maceration using 70% ethanol, (2) acid hydrolysis of the ethanol extract, (3) fractionation of hydrolysate with ethyl acetate, (4) determination of total flavonoid content, (5) antiradical activity assay against 2,2'-diphenyl-1-picrylhydrazyl (DPPH), (6) separation of flavonoids using thin layer chromatography (TLC), and (7) identification of flavonoids using UV-Visible Spectrophotometry and Infrared Spectroscopy. The results showed the total flavonoid content of the ethyl acetate fraction was 8.20 mgQE/g with an IC_{50} value of 296.91 g/mL against DPPH radicals. The TLC chromatogram showed the presence of one spot of the compound in the ethyl acetate fraction with an R_f value of 85.5. The results of the UV-Vis spectrum on these spots obtained absorption at 340 nm (band I) and 240 nm (band II). While the infrared spectrum shows a signal at 3363 cm^{-1} (OH stretching), 1727 cm^{-1} (C=O), 1459 cm^{-1} (aromatic ring) and 1060 cm^{-1} strong (C-O). Thus, it can be concluded that the ethyl acetate hydrolysate fraction of Cordia leaf ethanol extract contains flavonoid compounds similar to the chalcone group.

Keywords: acid hydrolysis, Boraginaceae, *Cordia sebestena* L., ethyl acetate fraction, flavonoids

Analisis Flavonoid pada Fraksi Hasil Hidrolisat Ekstrak Daun *Cordia sebestena* L.

Abstrak

Cordia sebestena L. (Boraginaceae) atau Cordia merupakan tanaman hias dengan kandungan flavonoid. Penelitian ini bertujuan menganalisis senyawa flavonoid pada fraksi hasil hidrolisat ekstrak etanol 70% daun Cordia. Penelitian terbagi menjadi 7 tahapan, yaitu (1) maserasi daun menggunakan etanol 70%, (2) hidrolisis asam pada ekstrak dengan HCl 2N pada $95\text{ }^{\circ}\text{C}$ selama 2 jam, (3) fraksinasi hidrolisat dengan etil asetat, (4) penentuan kadar flavonoid total dengan kolorimetri, (5) pengujian aktivitas antiradikal terhadap 2,2'-difenil-1-pikrilhidrazil (DPPH), (6) pemisahan flavonoid menggunakan kromatografi lapis tipis (KLT), dan (7) identifikasi flavonoid menggunakan spektrofotometri UV-Vis dan infra merah. Hasil menunjukkan kadar flavonoid total fraksi etil asetat sebesar 8,20 mgQE/g dengan nilai IC_{50} terhadap radikal DPPH sebesar 296,91 $\mu\text{g/mL}$. Kromatogram KLT menunjukkan keberadaan satu bercak senyawa pada fraksi etil asetat dengan nilai R_f adalah 85,5. Hasil spektrum UV-Vis pada bercak tersebut diperoleh serapan pada 340 nm (pita I) dan 240 nm (pita II). Sedangkan spektrum infra merah menunjukkan adanya sinyal pada 3363 cm^{-1} (O-H ulur),

Commented [A1]: Perlu dijelaskan kaitan dengan judul

Commented [A2]: 2'

Commented [A3]: menunjukkan

1727 cm^{-1} (C=O), 1459 cm^{-1} (cincin aromatik) dan 1060 cm^{-1} kuat (C–O). Dengan demikian, dapat disimpulkan bahwa fraksi etil asetat hidrolisat ekstrak etanol daun Cordia mengandung senyawa flavonoid yang mirip dengan kelompok kalkon.

Kata kunci: *Boraginaceae*, *Cordia sebestena* L., flavonoid, fraksi etil asetat, hidrolisis asam

1. Pendahuluan

Cordia sebestena L. (Boraginaceae) atau Cordia merupakan suatu tanaman hias. Daun Cordia mengandung senyawa alkaloid, flavonoid, fenol, saponin, steroid/triterpenoid, dan tannin (1). Daun Cordia juga mengandung senyawa volatil sebesar 0,05% (2). Daun cordia memiliki beragam aktivitas farmakologi, antara lain antibakteri (3), analgetik, antiinflamasi (4), antioksidan (5), dan lain sebagainya. Studi mengenai toksisitas subakut dari ekstrak etil asetat daun Cordia menunjukkan bahwa ekstrak tersebut tidak toksik terhadap hati (3). Sebelumnya, telah diisolasi kandungan flavonoid hesperetin dari bunga Cordia dengan khasiat antibakteri dan antikanker terhadap kanker serviks *in vitro* (6). Namun, studi mengenai flavonoid dari daun Cordia belum banyak dieksplorasi.

Flavonoid merupakan kelompok fenolik dengan struktur inti C-15 ($\text{C}_6\text{-C}_3\text{-C}_6$). Flavonoid merupakan kelas metabolit sekunder dari bahan alam sebagai nutrasetikal yang paling banyak digunakan pada pengobatan, makanan, suplemen dan lainnya. Meskipun studi mengenai isolasi maupun sintesisnya telah banyak, para peneliti masih tertarik meneliti flavonoid dan turunannya. Umumnya, flavonoid dapat diekstraksi dari pelarut air, etanol, metanol, *n*-butanol, aseton, etil asetat, kloroform dan lainnya. Pelarut polar digunakan untuk memperoleh flavonoid bentuk glikosida, sedangkan pelarut non-polar untuk ekstraksi bentuk aglikonnya (7). Untuk memperoleh bentuk aglikon flavonoid umumnya dilakukan proses hidrolisis terhadap glikosida flavonoid dengan cara asam, basa, maupun enzimatis. Hidrolisis asam merupakan teknik sederhana, cepat dan ekonomis untuk mengubah suatu glikosida menjadi aglikon (8). Teknik ini sering kali dilakukan menggunakan HCl 2 N-metanol atau HCl 2M (9). Hidrolisis glikosida flavonoid dari beberapa sampel sayuran dilaporkan baik dilakukan dengan metode hidrolisis asam menggunakan HCl 1,2 M dalam 50% metanol-air pada suhu 80 °C selama 2 jam dengan penambahan asam askorbat sebagai pencegah oksidasi (10).

Flavonoid merupakan suatu antioksidan yang secara alami ditemukan dalam bahan alam terutama tumbuhan (11). Selain itu, flavonoid juga berperan sebagai suatu nutrasetikal dengan khasiat antimikroba, antibakteri, antifungi, antivirus, antiulcer, hepatoprotektif, antiinflamasi, efek kardioprotektif, antineoplasma, dan lainnya (12). Pentingnya flavonoid dalam penemuan dan pengembangan obat baru yang berasal dari tanaman menjadi alasan dilakukannya penelitian ini. Penelitian ini bertujuan melakukan analisis senyawa flavonoid pada fraksi etil asetat hasil hidrolisat ekstrak etanol 70% daun Cordia sekaligus menetapkan kadar dan menentukan aktivitas antiradikalnya.

2. Metode

2.1. Alat

Alat-alat yang digunakan pada penelitian ini meliputi alat-alat gelas yang umum digunakan di laboratorium, toples maserasi, ayakan no. mesh 40, timbangan analitik (Ohaus), mikropipet (Eppendorf), *vacuum rotary evaporator* (Eyela N-1100, Cina), oven (Mettler UN-55), chamber (Camag), kotak UV (Camag), ultrasonik (Branson 5510), spektrofotometer UV-Vis (UV-1601 Series, Shimadzu, Japan), dan spektrometer FTIR (Agilent Cary 630, USA).

2.2. Bahan

Etanol 70%, etil asetat, metanol, kloroform pada tingkat analitik (Merck, Jerman) digunakan sebagai pelarut. Bahan lain yang digunakan antara lain plat KLT GF₂₅₄ (Merck, Jerman), DPPH, AlCl_3

10%, kalium asetat, kuersetin (Sigma-Aldrich Co., USA), HCl 2N, Na₂SO₄, asam formiat, dan aquades.

2.3. Prosedur Ekstraksi

Daun Cordia diperoleh dari pekarangan rumah warga di sekitar Jakarta Timur. Sebelumnya, tanaman telah dideterminasi di Lembaga Ilmu Pengetahuan Indonesia (*Indonesian Institute of Sciences*), Pusat Penelitian Biologi (*Research Center for Biologi*), *Cibinong Sciences Center*, Cibinong. Sampel daun segar sebanyak 2,5 kg dibuat simplisia menggunakan oven pada 50 °C. Simplisia kemudian dihaluskan dengan blender elektrik dan diayak dengan ayakan no. mesh 40. Serbuk simplisia disimpan dalam wadah kering tertutup rapat (13).

Serbuk simplisia (850, g) diekstraksi dengan maserasi dengan pelarut etanol 70% (dengan rasio bahan–pelarut 1:6) selama 18 jam sambil sesekali diaduk. Ampas yang telah dipisahkan dari filtrat kemudian diremaserasi sampai pemeriksaan terhadap kandungan flavonoid didalamnya memberikan hasil negatif. Filtrat dikumpulkan dan diuapkan pelarutnya menggunakan *vacuum rotary evaporator* pada suhu 50 °C dan dilanjutkan dengan penangas air hingga diperoleh ekstrak kental (13). Ekstrak dihitung persentase rendemen dan dilakukan penapisan fitokimia sederhana mengikuti prosedur pada Hanani (2015) (14). Skema prosedur ekstraksi dapat dilihat pada Gambar 1.

Hidrolisis Ekstrak

Ekstrak etanol sebanyak 15,0715 g dicampurkan dengan 240 mL HCl 2N-metanol (dengan rasio bahan–pelarut 1:16) di dalam labu alas bulat. Campuran dipanaskan pada 95 °C selama 2 jam. Setelah dingin, campuran disaring dan dipekatkan di atas penangas air pada 60 °C hingga diperoleh hidrolisat kental (9,15).

Fraksinasi dari hasil hidrolisat

Hidrolisat sebanyak 6,4585 g dilarutkan dalam 20 mL metanol dan 20 ml aquadest, dan kemudian dimasukkan ke dalam corong pisah. Selanjutnya, campuran difraksinasi menggunakan etil asetat sebanyak 40 mL. Setelah dikocok perlahan dan didiamkan sesaat, fase air (lapisan bawah) dan fase etil asetat (lapisan atas) masing-masing dipisahkan dan dikumpulkan. Fraksi etil asetat disaring menggunakan Na₂SO₄ untuk menghilangkan air dan selanjutnya dipekatkan di atas penangas air dengan suhu 40 °C hingga kental (15).

Penetapan kadar flavonoid total fraksi

Penetapan kadar flavonoid total dengan metode kolorimetri yang mengacu pada prosedur Chang et al., (2002) (16) dengan sedikit modifikasi. Kuersetin digunakan untuk membuat kurva kalibrasi. Kuersetin (1000 µg/mL) dalam metanol kemudian diencerkan hingga diperoleh larutan seri konsentrasi 26, 44, 62, 80 dan 98 µg/mL. Masing-masing larutan (0,5 mL) secara terpisah direaksikan dengan metanol (1,5 mL), AlCl₃ 10% (0,1 mL), kalium asetat 1 M (0,1 mL) dan aquades (2,8 mL). Setelah inkubasi 30 menit pada suhu kamar, campuran diukur absorbansinya pada 440 nm menggunakan Spektrofotometer UV-Vis. Selanjutnya dibuat grafik hubungan absorbansi yang diperoleh terhadap konsentrasi kuersetin yang digunakan untuk menghasilkan persamaan garis linear $y = bx \pm a$. Persamaan ini selanjutnya digunakan untuk menetapkan konsentrasi flavonoid dalam larutan uji. Selanjutnya, prosedur mereaksikan yang sama dilakukan pada larutan uji fraksi etil asetat 6000 µg/mL (0,5 mL) dalam metanol untuk menentukan kadar flavonoid total pada fraksi tersebut. Pengujian dilakukan triplo.

Penentuan aktivitas antiradikal fraksi

Penentuan aktivitas antiradikal dilakukan terhadap DPPH dengan kuersetin sebagai pembanding mengikuti prosedur Batool et al., (2019) (17) dengan sedikit modifikasi. Larutan DPPH disiapkan dengan konsentrasi 0,2 mM. Larutan uji fraksi etil asetat disiapkan dengan seri konsentrasi yaitu 50, 150, 250, 350, dan 450 µg/mL. Sedangkan, seri konsentrasi kuersetin sebagai pembanding adalah 2, 4, 6, 8, dan 10 µg/mL. Selanjutnya larutan uji fraksi etil asetat maupun kuersetin masing-masing secara terpisah sebanyak 1 mL dicampurkan dengan 4 mL DPPH dan diinkubasi selama 30 menit pada suhu ruang dalam kondisi gelap. Absorbansi diukur pada 515 nm menggunakan Spektrofotometer UV-Vis. Kuersetin digunakan sebagai pembanding. Pengujian dilakukan triplo. Kapasitas antiradikal dihitung berdasarkan persentase inhibisi terhadap radikal DPPH yang dihitung dengan cara: absorbansi DPPH yang telah dikurangi dengan absorbansi sampel dibagi dengan absorbansi DPPH dikali 100%. Persentase inhibisi terhadap DPPH kemudian dibuat kurva terhadap konsentrasi masing-masing sampel untuk memperoleh persamaan garis linear $y = bx \pm a$. Persamaan ini kemudian digunakan untuk menghitung konsentrasi sampel yang mampu menghambat 50% radikal DPPH (*inhibition concentration* 50, IC₅₀) yang dinyatakan dalam µg/mL.

Pemisahan dengan KLT preparatif

Sebelumnya, konfirmasi keberadaan flavonoid pada fraksi etil asetat dilakukan pada plat KLT GF254 dengan fase gerak kloroform:etil asetat:metanol (3:2:2,5) dengan penambahan sedikit asam formiat. Pereaksi semprot sitroborat digunakan untuk melihat golongan senyawa. Pemisahan flavonoid pada fraksi etil asetat selanjutnya dilakukan pada plat KLT preparatif menggunakan fase gerak yang sama. Bercak diamati di bawah sinar UV 254 dan 366 nm tanpa disemprot sitroborat.

Analisis senyawa flavonoid

Bercak yang diperoleh dari hasil KLT preparatif dikerok dan dilarutkan dalam metanol dengan bantuan ultrasonik selama 15 menit. Filtrat disaring dengan kapas dan kertas saring. Filtrat kemudian diidentifikasi menggunakan spektrofotometer UV-Vis dan FTIR.

3. Hasil

Hasil identifikasi kualitatif menunjukkan kandungan kimia ekstrak etanol 70% daun Cordia antara lain alkaloid, fenolik, flavonoid, tanin, dan saponin. Hasil ekstraksi dan fraksinasi hidrolisat dapat dilihat pada Tabel 1. Hasil penentuan kadar flavonoid total dari fraksi etil asetat, menunjukkan bahwa flavonoid pada fraksi etil asetat sebesar 8,20 mgQE/g. Selanjutnya, pengujian aktivitas antiradikal dilakukan terhadap DPPH menggunakan spektrofotometer UV-Vis. Nilai IC₅₀ kuersetin adalah 7,028 µg/mL, sedangkan IC₅₀ fraksi etil asetat adalah 296,91 µg/mL. Hal ini menunjukkan....

Gambar 2 menunjukkan pola KLT fraksi etil asetat untuk konfirmasi keberadaan golongan senyawa flavonoid sebelum dilakukan KLT preparatif. Terdapat 4 bercak yang terdeteksi pada UV 254 nm, sedangkan pada 366 nm setelah disemprot sitroborat hanya ditemukan 1 bercak dominan yang disimpulkan bahwa bercak tersebut merupakan suatu flavonoid (Dapus?). Gambar 3 menunjukkan pola kromatogram dari KLT preparatif yang kemudian dianalisis menggunakan spektrofotometer UV-Vis dan FTIR.

Hasil spektrum UV-Vis pada bercak 1 (Gambar 4) diperoleh serapan pada 340 nm (pita I) dan 240 nm (pita II). Sedangkan spektrum infra merah (Gambar 5) menunjukkan adanya sinyal pada 3363 cm⁻¹ melebar (O–H ulur), 1727 cm⁻¹ (C=O), 1459 cm⁻¹ tajam dengan intensitas lemah (cincin aromatik) dan 1060 cm⁻¹ kuat (C–O).

Commented [A4]: menunjukkan....

Commented [A5]: menunjukkan

Commented [A6]: menunjukkan

Commented [A7]: apakah ada serapan finger print yang khas untuk aromatik?

4. Pembahasan

Hasil identifikasi kualitatif ekstrak etanol daun Cordia pada penelitian ini sesuai dengan penelitian Hanani *et al.*, (2019) (1) yang menyatakan bahwa ekstrak daun Cordia mengandung senyawa alkaloid, flavonoid, fenolik, **saponin, dan saponin**. Etanol memiliki kemampuan menarik senyawa tanin, polifenol, flavonoid, terpenoid, steroid dan alkaloid (18). Polaritas etanol berkaitan dengan keberadaan gugus OH pada strukturnya (19). Kandungan flavonoid terdeteksi lebih tinggi dalam etanol yang bercampur dengan air pada konsentrasi 70% dibanding etanol absolut (18). Umumnya, flavonoid pada tumbuhan berada pada bentuk glikosidanya dibandingkan bentuk aglikon. Dengan demikian, prosedur ekstraksi flavonoid dapat dilakukan dengan menggunakan teknik hidrolisis (14).

Hidrolisis dilakukan untuk melepaskan gula pada glikosida dengan cara asam, basa maupun enzimatis. Hidrolisis asam pada glikosida flavonoid dapat dilakukan dengan memanaskan campuran bahan dengan 2 N HCl-metanol (9). Beberapa peneliti ada yang menambahkan asam askorbat di dalam prosedur tersebut untuk mencegah terjadinya oksidasi. Proses hidrolisis dapat dilakukan selama 2 jam pada suhu 80 °C atau lebih (20). Bentuk aglikon selanjutnya dapat diekstraksi dengan pelarut semipolar yaitu etil asetat. Berdasarkan hasil pada Tabel 1 **menunjukkan** rendemen dari fraksi etil asetat dari hidrolisis. Fraksi ini mengandung senyawa aglikon dan sedikit glikosida. Kemampuan ini didasarkan pada polaritas yang cukup besar karena adanya elektron π dan elektron pasangan bebas pada O (19).

Pengujian spektrofotometri yang didasarkan pada pembentukan kompleks aluminium adalah prosedur yang sering digunakan dalam penentuan kadar flavonoid. Sampel ini direaksikan dengan $AlCl_3$ dan memungkinkan pengukuran flavonoid totalnya setelah 2-60 menit dalam kisaran 404-430 nm (21). Prinsipnya, $AlCl_3$ akan membentuk kompleks stabil dengan gugus keto C-4 dan C-3 atau C-5 hidroksil dari struktur flavonoid (flavon dan flavonol) setelah penambahan asam. Selain itu, $AlCl_3$ juga membentuk kompleks labil dengan gugus ortohidroksil pada cincin A atau B dari flavonoid (16). Reaksi kompleks flavonoid dengan $AlCl_3$ dapat dilihat pada Gambar 6.

Antiradikal merupakan kemampuan senyawa kimia untuk bereaksi dengan radikal bebas (22). Senyawa bahan alam dengan aktivitas antiradikal umumnya dari kelompok fenolik. Kelompok fenolik (termasuk flavonoid) memiliki struktur kimia yang mendukung proses peredaman radikal bebas. Pada flavonoid, ada beberapa faktor yang menentukan kapasitas antiradikalnya antara lain: (1) gugus orto-dihidroksi pada cincin B yang mampu mendonor elektron dan memberikan stabilitas yang tinggi pada bentuk radikal dan berpartisipasi dalam delokalisasi elektron, (2) ikatan rangkap 2,3 dengan suatu gugus 4-oxo pada cincin C yang bertanggung jawab terhadap delokalisasi cincin B, (3) gugus 3- dan 5- hidroksil dengan gugus **4-oxo** pada cincin A dan C yang penting dalam menangkal radikal, (4) gugus 3-hidroksil pada aktivitas antioksidan (23). Pada studi ini, nilai IC_{50} fraksi etil asetat masih rendah dibandingkan dengan kuersetin sebagai pembanding terhadap peredaman radikal DPPH. **Huyut et al., (2017)** melaporkan bahwa senyawa antioksidan baik fenolik maupun flavonoid memberikan respon aktivitas antioksidan dan antiradikal berbeda (terkait mekanismenya) tergantung dari jenis ujinya. Hal ini berkaitan dengan fakta bahwa tiap uji memiliki perbedaan spesifisitas pelarut, reagen, dan kondisi pH. Selain itu, sifat hidrofobik/hidrofilik substansi, ukuran molekul, dan jumlah (kuantitas) serta jenis dari gugus fungsi fenolik dan flavonoid yang diujikan juga ikut berperan pada hasil ujinya (24). Dengan demikian, diperlukan pengujian dengan metode selain DPPH pada fraksi etil asetat untuk membuktikan hal ini.

Pemisahan dengan KLT masih menjadi metode yang paling banyak digunakan untuk pemisahan disebabkan karena metode ini sederhana, praktis, dan ekonomis serta prosedur kerja yang mudah. Hasil kromatogram KLT menunjukkan keberadaan senyawa flavonoid setelah disemprot dengan sitroborat. Sitroborat merupakan reagen yang terdiri **dari** asam borat dan asam sitrat dalam

Commented [A8]: menunjukkan

Commented [A9]: 4-okso

Commented [A10]: Nomor Dapus?

Commented [A11]: atas

etanol. Reagen ini bereaksi dengan flavonoid dengan hasil positif berwarna kuning terang pada UV 366 nm (14). Umumnya **reaksi terjadi** pada flavonoid dengan gugus metoksi atau ortho-hidroksi (25).

Prosedur pendekatan klarifikasi struktur senyawa dapat menggunakan spektroskopi. Spektroskopi UV-Visible dapat digunakan untuk menganalisis kualitatif kelas senyawa tertentu. Spektroskopi inframerah, misalnya *Fourier Transform Infrared Spectroscopy* (FTIR) merupakan metode dengan resolusi tinggi yang digunakan untuk mengidentifikasi kandungan kimia dengan cepat secara non-destruktif (26). Spektroskopi serapan ultraviolet (UV) dari flavonoid memiliki dua serapan maksimal sekitar 300–350 dan 240–285 nm masing-masing sesuai dengan pita I dan II dari cincin A dan B. Sebagian besar flavon, isoflavon dan kalkon terhidroksilasi memberikan serapan maksimum pada 3300–3600 cm^{-1} karena adanya gugus OH. Selain itu, **gugus karbonil (C=O) flavonoid diamati sekitar 1680 cm^{-1}** . Selain itu, serapan tajam dan intensitas tinggi teramati pada 1600 dan 1500 cm^{-1} karena adanya ikatan rangkap pada cincin aromatik (7). Dengan demikian, dapat disimpulkan bahwa fraksi etil asetat hidrolisat ekstrak etanol daun *Cordia* mengandung senyawa flavonoid mirip dengan kelompok kalkon. ~~Kalkon merupakan flavonoid yang menyerap pada daerah UV.~~ Spektrum UV kalkon mengandung **dua pita serapan**. Pita I sering tampak pada 340–390 nm, meskipun terkadang sedikit perubahan atau puncak sering terjadi pada 300–320 nm. Pita II tampak pada 220–270 nm (27). Secara farmakologi, kalkon memiliki khasiat yang luas seperti antidiabetes, antikanker, antiinflamasi, antimikroba, antioksidan, antiparasit, psikoaktif dan neuroprotektif (28).

Commented [A12]: Reaksi apa...?

Commented [A13]: Yang ditunjukkan pada Pita I dengan serapan.....

5. Kesimpulan maksud dari pengujian DPPH untuk apa?

Fraksi etil asetat hasil hidrolisat ekstrak etanol 70% daun *Cordia* mengandung senyawa flavonoid yang mirip dengan kelompok kalkon berdasarkan analisis spektrum **UV-vis** dan inframerah. Studi lebih lanjut dalam pemisahan dan pemurnian senyawa ini masih perlu dilakukan kedepannya dengan teknik kromatografi lain dan **analisisnya** menggunakan spektroskopi lain seperti spektroskopi massa dan NMR yang mendukung pada penentuan struktur dari flavonoid. **maksud dari pengujian DPPH untuk apa?**

Commented [A14]: Untuk menentukan struktur molekul senyawa murni menggunakan metode spektroskopi massa dan NMR.....

Daftar Pustaka

1. Hanani E, Soewandi SHW, Hayati, Revita N. Pharmacognostical and preliminary phytochemical evaluation of *Cordia sebestena* L. *Pharmacogn J.* 2019;11(5):1100–5.
2. Adeosun CB, Bamigbade O I., Osho A, Atolani O. Volatile Composition of the Leaf, Flower and Fruit of *Cordia sebestena* (L.). *J Essent Oil-Bearing Plants.* 2015;18(4):976–81.
3. Osho A, Otuechere CA, Adeosun CB, Oluwagbemi T, Atolani O. Phytochemical, sub-acute toxicity, and antibacterial evaluation of *Cordia sebestena* leaf extracts. *J Basic Clin Physiol Pharmacol.* 2015;27(2):163–70.
4. Sunaryo H, Siska S, Hanani E, Anindita RS, Yanti N, Lisa. Evaluation of analgesic and anti-inflammatory activities of ethanolic extract of *Cordia sebestena* L. *Eur Pharm J.* 2020;66(2):26–31.
5. Hikmawanti NPE, Hanani E, Sapitri Y, Ningrum W. Total Phenolic Content and Antioxidant Activity of Different Extracts of *Cordia sebestena* L. Leaves. *Pharmacogn J.* 2020;12(6):1311–6.
6. Prakash S, Elavarasan N, Subashini K, Kanaga S, Dhandapani R, Sivanandam M, et al. Isolation of hesperetin - A flavonoid from *Cordia sebestena* flower extract through antioxidant assay

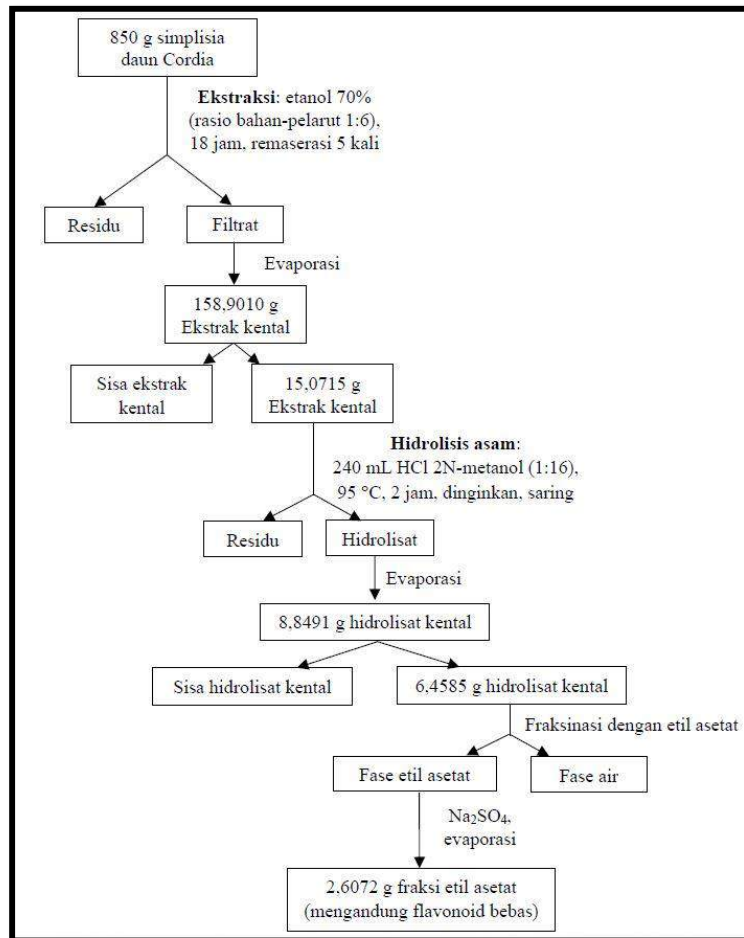
guided method and its antibacterial, anticancer effect on cervical cancer via in vitro and in silico molecular docking studies. *J Mol Struct* [Internet]. 2020;1207:127751. Available from: <https://doi.org/10.1016/j.molstruc.2020.127751>

7. Awouafack MD, Tane P, Morita H. Isolation and Structure Characterization of Flavonoids. In: *Flavonoids - From Biosynthesis to Human Health*. Intech; 2017. p. 45–59.
8. Bian Y, Zhang Y, Zhou Y, Li GH, Feng XS. Progress in the Pretreatment and Analysis of Flavonoids: An Update since 2013. *Sep Purif Rev* [Internet]. 2022;51(1):11–37. Available from: <https://doi.org/10.1080/15422119.2020.1801469>
9. Stalikas CD. Extraction, separation, and detection methods for phenolic acids and flavonoids. *J Sep Sci*. 2007;30(18):3268–95.
10. Nuutila AM, Kammiovirta K, Oksman-Caldentey KM. Comparison of methods for the hydrolysis of flavonoids and phenolic acids from onion and spinach for HPLC analysis. *Food Chem*. 2002;76(4):519–25.
11. Heim KE, Tagliaferro AR, Bobilya DJ. Flavonoid antioxidants: Chemistry, metabolism and structure-activity relationships. *J Nutr Biochem*. 2002;13(10):572–84.
12. Tapas AR, Sakarkar DM, Kakde RB. Flavonoids as Nutraceuticals: A Review. *Trop J Pharm Res*. 2008;7(3):1089–99.
13. Kementerian Kesehatan RI. *Farmakope Herbal Indonesia* (FHI). 2nd ed. Jakarta: Kementerian Kesehatan RI; 2017.
14. Hanani E. *Analisis Fitokimia*. Jakarta: Buku Kedokteran EGC; 2015. 34–45 p.
15. Irianti T, Murti YB, Kanistri DN, Pratiwi DR, Kuswandi, Kusumaningtyas RA. DPPH Radical Scavenging Activity of Aqueous Fraction from Ethanolic Extract of Talok Fruit (*Muntingia calabura* L.). *Tradit Med J*. 2016;21(1):38–47.
16. Chang C-C, Yang M-H, Wen H-M, Chern J-C. Estimation of total flavonoid content in propolis by two complementary colometric methods. *J Food Drug Anal*. 2002;10(3):178–82.
17. Batool R, Khan MR, Sajid M, Ali S, Zahra Z. Estimation of phytochemical constituents and in vitro antioxidant potencies of *Brachychiton populneus* (Schott & Endl.) R. Br. *BMC Chem*. 2019;13(32):1–15.
18. Tiwari, Prashant; Kumar, Bimlesh; Kaur, Mandeep; Kaur, Gurpreet; Kaur H. Phytochemical screening and Extraction: A Review. *Int Pharm Sci*. 2011;1(1):98–106.
19. Houghton PJ, Raman A. *Laboratory Handbook for the Fractionation of Natural Extracts*. 1st ed. Laboratory Handbook for the Fractionation of Natural Extracts. Springer-Science+Business Media, B.V.; 1998. 14–16, 24–31, 39–52 p.
20. Khoddami A, Wilkes MA, Roberts TH. Techniques for analysis of plant phenolic compounds. *Molecules*. 2013;18(2):2328–75.
21. Pękal A, Pyrzynska K. Evaluation of Aluminium Complexation Reaction for Flavonoid Content Assay. *Food Anal Methods*. 2014;7(9):1776–82.
22. Tırzitis G, Bartosz G. Determination of antiradical and antioxidant activity: basic principles and new insights. *Acta Biochim Pol*. 2010;57(1):139–42.
23. Dai J, Mumper RJ. Plant phenolics: Extraction, analysis and their antioxidant and anticancer

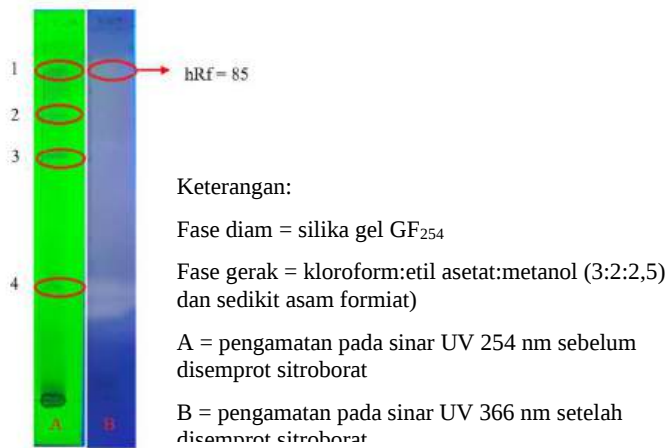
properties. *Molecules*. 2010;15:7313–52.

24. Huyut Z, Beydemir F., Gülçin E. Antioxidant and Antiradical Properties of Selected Flavonoids and Phenolic Compounds. *Biochem Res Int*. 2017;2017:1–10.
25. Sharma B, Agrawal SC, Gupta KC. Colour reactions of chalcones and their mechanism (A review). *Orient J Chem*. 2008;24(1):289–94.
26. Altemimi A, Lakhssassi N, Baharlouei A, Watson DG, Lightfoot DA. Phytochemicals: Extraction, Isolation, and Identification of Bioactive Compounds from Plant Extracts. *Plants*. 2017;6(42).
27. Aksöz BE, Ertan R. Spectral properties of chalcones II. *Fabad J Pharm Sci*. 2012;37(4):205–16.
28. Salehi B, Quispe C, Chamkhi I, El Omari N, Balahbib A, Sharifi-Rad J, et al. Pharmacological Properties of Chalcones: A Review of Preclinical Including Molecular Mechanisms and Clinical Evidence. *Front Pharmacol*. 2021;11(January).
29. Hikmawanti NPE, Hayati, Andriyani Y. Kadar Flavonoid Total pada Ekstrak Hidro-etanolik Daun *Sauropus androgynus* (L.) Merr dari Tiga Daerah dengan Ketinggian yang Berbeda. *J Jamu Indones*. 2021;6(2):61–7.

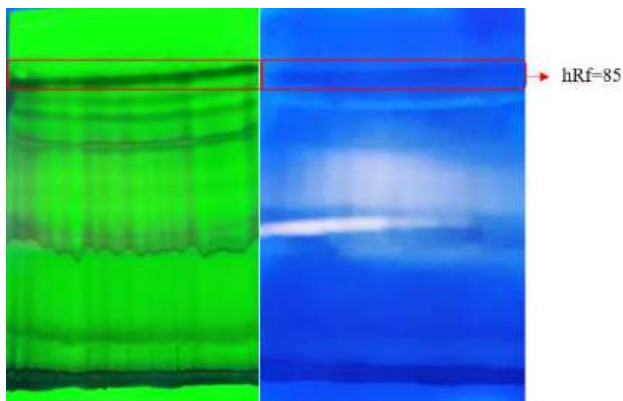
GAMBAR & TABEL



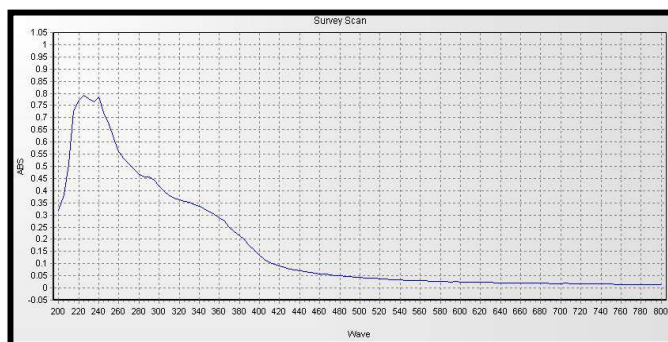
Gambar 1 Skema prosedur pemisahan



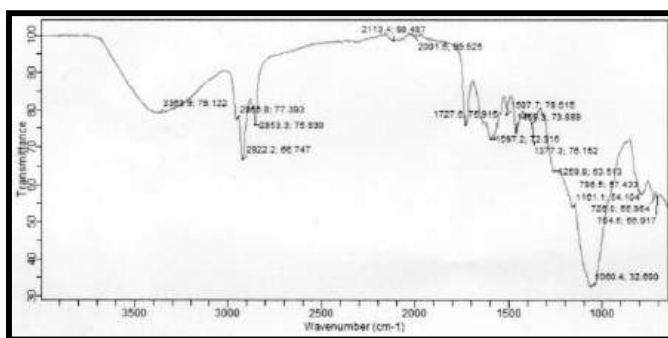
Gambar 2 Pola kromatogram KLT pada fraksi etil asetat



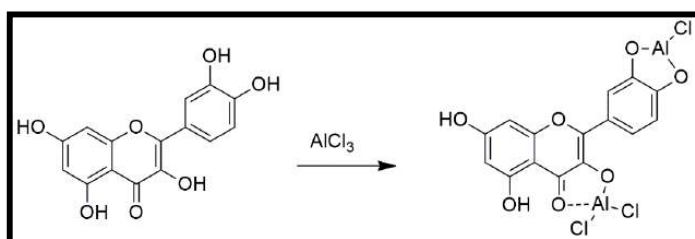
Gambar 3 Pola kromatogram KLT preparatif pada fraksi etil asetat pada sinar UV 254 nm (kiri) dan pada sinar UV 365 nm (kanan)



Gambar 4 Spektrum UV bercak 1



Gambar 5 Spektrum inframerah bercak 1



Gambar 6 Reaksi kompleks flavonoid dengan AlCl_3 (29)

Tabel 1 Hasil ekstraksi dan fraksinasi

Sampel	Bobot (g)	Rendemen (%)
Ekstrak etanol 70%*	158,90	18,69
Hidrolisat**	8,8491	58,71
Fraksi etil asetat***	2,6072	40,37

Keterangan: *dari 850 g serbuk simplisia; **dari 15,0715 g ekstrak; ***dari 6,4585 g hidrolisat.

- 3. Bukti hasil revisi dan artikel yang direvisi
(24 Desember 2022, 22 Januari 2023, 3
Desember 2023, 18 Januari 2024)**

RINGKASAN **TINJAUAN** PENGEDITAN

Naskah

Penulis Ni Putu Ermi Hikmawanti, Endang Hanani, Rini Mardiyanti 
Judul Analisis Flavonoid pada Fraksi Hasil Hidrolisat Ekstrak Daun Cordia sebestena L.
Bagian Artikel Penelitian
Editor Unang Supratman, M.Si. 
Muchtaridi, Ph.D. 

Peer Review

Tahapan 1

Versi Review [38849-140102-1-RV.DOCX](#) 2022-03-25
Dimulai 2022-05-10
Terakhir Dimodifikasi 2022-08-26
File yang diunggah Reviewer A [38849-151148-1-RV.DOCX](#) 2022-08-10
Reviewer B [38849-143437-1-RV.DOCX](#) 2022-05-22

Keputusan Editor

Keputusan Terima Langganan 2023-03-15
Beritahu Editor  Rekam Email Editor/Penulis  2023-07-14
Versi Editor Tidak Ada
Versi Penulis [38849-162821-1-ED.DOCX](#) 2022-12-24 [HAPUS](#)
[38849-162821-2-ED.DOCX](#) 2023-01-22 [HAPUS](#)
[38849-162821-3-ED.DOCX](#) 2023-12-03 [HAPUS](#)
[38849-162821-4-ED.DOCX](#) 2024-01-18 [HAPUS](#)

Unggah Versi Penulis Version No file chosen

[Switch to English](#)

[Back to Top](#)

[View My Stats](#)

Penerbit Universitas Padjadjaran



Jurnal ini terindeks di :



Creative Commons Attribution :



Analysis of Flavonoids on Fraction from Hydrolysate of *Cordia Sebestena* L. Leaves Extract

Ni Putu Ermi Hikmawanti*, Endang Hanani, dan Rini Mardiyanti

Program Studi Farmasi, Fakultas Farmasi dan Sains, Universitas Muhammadiyah Prof. DR.

HAMKA, Jl. Delima II/IV Klender, Jakarta Timur, DKI Jakarta 13460, Indonesia

Abstract

Cordia sebestena L. (Boraginaceae) or Cordia is an ornamental plant that contains flavonoids. Flavonoids are one of the natural compounds that play a role in free radical scavenging activity. This study aimed to analyze the flavonoids in the hydrolyzed fraction of the 70% ethanol extract of Cordia leaves. The study was divided into 7 stages, namely (1) maceration using 70% ethanol, (2) acid hydrolysis of the ethanol extract, (3) fractionation of hydrolysate with ethyl acetate, (4) determination of total flavonoid content, (5) antiradical activity assay against 2,2'-diphenyl-1-picrylhydrazyl (DPPH), (6) separation of flavonoids using thin layer chromatography (TLC), and (7) identification of flavonoids using UV-Visible Spectrophotometry and Infrared Spectroscopy. The results showed the total flavonoid content of the ethyl acetate fraction was 8.20 mgQE/g with an IC₅₀ value of 296.91 g/mL against DPPH radicals. The TLC chromatogram showed the presence of one spot of the compound in the ethyl acetate fraction with an R_f value of 0.85. The results of the UV-Vis spectrum on these spots obtained absorption at 340 nm (band I) and 240 nm (band II). While the infrared spectrum shows a signal at 3363 cm⁻¹ (OH stretching), 1727 cm⁻¹ (C=O), 1459 cm⁻¹ (aromatic ring) and 1060 cm⁻¹ strong (C-O). Thus, it can be concluded that the ethyl acetate hydrolysate fraction of Cordia leaf ethanol extract contains flavonoid compounds similar to the chalcone group. However, further analysis is needed to ensure that this flavonoid compound is a chalcone.

Keywords: acid hydrolysis, Boraginaceae, *Cordia sebestena* L., ethyl acetate fraction, flavonoids

Analisis Flavonoid pada Fraksi Hasil Hidrolisat Ekstrak Daun *Cordia sebestena* L.

Abstrak

Cordia sebestena L. (Boraginaceae) atau Cordia merupakan tanaman hias dengan kandungan flavonoid. Flavonoid merupakan salah satu senyawa alam yang berperan dalam aktivitas peredaman radikal bebas. Penelitian ini bertujuan menganalisis senyawa flavonoid pada fraksi hasil hidrolisat ekstrak etanol 70% daun Cordia. Penelitian terbagi menjadi 7 tahapan, yaitu (1) maserasi daun menggunakan etanol 70%, (2) hidrolisis asam pada ekstrak dengan HCl 2N pada 95 °C selama 2 jam, (3) fraksinasi hidrolisat dengan etil asetat, (4) penentuan kadar flavonoid total dengan kolorimetri, (5) pengujian aktivitas antiradikal terhadap 2,2'-difenil-1-pikrilhidrazil (DPPH), (6) pemisahan flavonoid menggunakan kromatografi lapis tipis (KLT), dan (7) identifikasi flavonoid menggunakan spektrofotometri UV-Vis dan infra merah. Hasil menunjukkan kadar flavonoid total fraksi etil asetat sebesar 8,20 mgQE/g dengan nilai IC₅₀ terhadap radikal DPPH sebesar 296,91 µg/mL. Kromatogram

KLT menunjukkan keberadaan satu bercak senyawa pada fraksi etil asetat dengan nilai R_f adalah 85,5. Hasil spektrum UV-Vis pada bercak tersebut diperoleh serapan pada 340 nm (pita I) dan 240 nm (pita II). Sedangkan spektrum infra merah menunjukkan adanya sinyal pada 3363 cm^{-1} (O–H ulur), 1727 cm^{-1} (C=O), 1459 cm^{-1} (cincin aromatik) dan 1060 cm^{-1} kuat (C–O). Dengan demikian, dapat disimpulkan bahwa fraksi etil asetat hidrolisat ekstrak etanol daun *Cordia* mengandung senyawa flavonoid yang mirip dengan kelompok kalkon. Namun demikian, diperlukan analisis lebih lanjut untuk memastikan bahwa senyawa flavonoid ini merupakan khalkon.

Kata kunci: *Boraginaceae*, *Cordia sebestena* L., flavonoid, fraksi etil asetat, hidrolisis asam

1. Pendahuluan

Banyak tanaman hias berbunga merupakan sumber alami senyawa bioaktif yang bermanfaat untuk kesehatan manusia, terutama sebagai antioksidan. Meskipun demikian, ketertarikan pemanfaatan tanaman ini sebagai sumber makanan dan obat masih rendah. Padahal beberapa studi melaporkan bahwa tanaman hias memiliki potensi sebagai sumber flavonoid (terutama antosianin) sebagai antioksidan dan antiinflamasi (1). *Cordia sebestena* L. (Boraginaceae) atau *Cordia* merupakan suatu tanaman hias. Daun *Cordia* mengandung senyawa alkaloid, flavonoid, fenol, saponin, steroid/triterpenoid, dan tannin (2). Daun *Cordia* juga mengandung senyawa volatil sebesar 0,05% (3). Daun *Cordia* memiliki beragam aktivitas farmakologi, antara lain antibakteri (4), analgetik, antiinflamasi (5), antioksidan (6), dan lain sebagainya. Studi mengenai toksisitas subakut dari ekstrak etil asetat daun *Cordia* menunjukkan bahwa ekstrak tersebut tidak toksik terhadap hati (4). Sebelumnya, telah diisolasi kandungan flavonoid hesperetin dari bunga *Cordia* dengan khasiat antibakteri dan antikanker terhadap kanker serviks *in vitro* (7). Namun, studi mengenai flavonoid dari daun *Cordia* belum banyak dieksplorasi.

Flavonoid merupakan kelompok fenolik dengan struktur inti C-15 ($C_6-C_3-C_6$). Flavonoid merupakan kelas metabolit sekunder dari bahan alam sebagai nutrasetikal yang paling banyak digunakan pada pengobatan, makanan, suplemen dan lainnya. Meskipun studi mengenai isolasi maupun sintesisnya telah banyak, para peneliti masih tertarik meneliti flavonoid dan turunannya. Umumnya, flavonoid dapat diekstraksi dari pelarut air, etanol, metanol, *n*-butanol, aseton, etil asetat, kloroform dan lainnya. Pelarut polar digunakan untuk memperoleh flavonoid bentuk glikosida, sedangkan pelarut non-polar untuk ekstraksi bentuk aglikonnya (8). Untuk memperoleh bentuk aglikon flavonoid umumnya dilakukan proses hidrolisis terhadap glikosida flavonoid dengan cara asam, basa, maupun enzimatis. Hidrolisis asam merupakan teknik sederhana, cepat dan ekonomis untuk mengubah suatu glikosida menjadi aglikon (9). Teknik ini sering kali dilakukan menggunakan HCl 2 N-metanol atau HCl 2 M (10). Hidrolisis glikosida flavonoid dari beberapa sampel sayuran dilaporkan baik dilakukan dengan metode hidrolisis asam menggunakan HCl 1,2 M dalam 50% metanol-air pada suhu $80\text{ }^{\circ}\text{C}$ selama 2 jam dengan penambahan asam askorbat sebagai pencegah oksidasi (11).

Flavonoid merupakan suatu antioksidan yang secara alami ditemukan dalam bahan alam terutama tumbuhan (12). Selain itu, flavonoid juga berperan sebagai suatu nutrasetikal dengan khasiat antimikroba, antibakteri, antifungi, antivirus, antiulcer, hepatoprotektif, antiinflamasi, efek kardioprotektif, antineoplasma, dan lainnya (13). Pentingnya flavonoid dalam penemuan dan pengembangan obat baru yang berasal dari tanaman menjadi alasan dilakukannya penelitian ini. Penelitian ini bertujuan melakukan analisis senyawa flavonoid pada fraksi etil asetat hasil hidrolisat ekstrak etanol 70% daun *Cordia* sekaligus menetapkan kadar dan menentukan aktivitas antiradikalnya.

2. Metode

2.1. Alat

Alat-alat yang digunakan pada penelitian ini meliputi alat-alat gelas yang umum digunakan di laboratorium, toples maserasi, ayakan no. mesh 40, timbangan analitik (Ohaus), mikropipet (Eppendorf), *vacuum rotary evaporator* (Eyela N-1100, Cina), oven (Mettler UN-55), chamber (Camag), kotak UV (Camag), ultrasonik (Branson 5510), spektrofotometer UV-Vis (UV-1601 Series, Shimadzu, Japan), dan spektrometer FTIR (Agilent Cary 630, USA).

2.2. Bahan

Etanol 70%, etil asetat, metanol, kloroform pada tingkat analitik (Merck, Jerman) digunakan sebagai pelarut. Bahan lain yang digunakan antara lain plat KLT GF₂₅₄ (Merck, Jerman), DPPH, AlCl₃ 10%, kalium asetat, kuersetin (Sigma-Aldrich Co., USA), HCl 2N, Na₂SO₄, asam formiat, dan aquades.

2.3. Prosedur

Ekstraksi

Daun *Cordia* diperoleh dari pekarangan rumah warga di sekitar Jakarta Timur. Sebelumnya, tanaman telah dideterminasi di Lembaga Ilmu Pengetahuan Indonesia (*Indonesian Institute of Sciences*), Pusat Penelitian Biologi (*Research Center for Biologi*), *Cibinong Sciences Center*, Cibinong. Sampel daun segar sebanyak 2,5 kg dibuat simplisia menggunakan oven pada 50 °C. Simplisia kemudian dihaluskan dengan blender elektrik dan diayak dengan ayakan no. mesh 40. Serbuk simplisia disimpan dalam wadah kering tertutup rapat (14).

Serbuk simplisia 850 g diekstraksi dengan maserasi dengan pelarut etanol 70% (dengan rasio bahan–pelarut 1:6) selama 18 jam sambil sesekali diaduk. Ampas yang telah dipisahkan dari filtrat kemudian diremaserasi sampai pemeriksaan terhadap kandungan flavonoid didalamnya memberikan hasil negatif. Filtrat dikumpulkan dan diuapkan pelarutnya menggunakan *vacuum rotary evaporator* pada suhu 50 °C dan dilanjutkan dengan penangas air hingga diperoleh ekstrak kental (14). Ekstrak dihitung persentase rendemen dan dilakukan penapisan fitokimia sederhana mengikuti prosedur pada Hanani (2015) (15). Skema prosedur ekstraksi dapat dilihat pada Gambar 1.

Hidrolisis Ekstrak

Ekstrak etanol sebanyak 15,0715 g dicampurkan dengan 240 mL HCl 2N-metanol (dengan rasio bahan–pelarut 1:16) di dalam labu alas bulat. Campuran dipanaskan pada 95 °C selama 2 jam. Setelah dingin, campuran disaring dan dipekatkan di atas penangas air pada 60 °C hingga diperoleh hidrolisat kental (10,16).

Fraksinasi dari hasil hidrolisat

Hidrolisat sebanyak 6,45 g dilarutkan dalam 20 mL metanol dan 20 ml aquadest, dan kemudian dimasukkan ke dalam corong pisah. Selanjutnya, campuran difraksinasi menggunakan etil asetat sebanyak 40 mL. Setelah dikocok perlahan dan didiamkan sesaat, fase air (lapisan bawah) dan fase etil asetat (lapisan atas) masing-masing dipisahkan dan dikumpulkan. Fraksi etil asetat disaring menggunakan Na₂SO₄ untuk menghilangkan air dan selanjutnya dipekatkan di atas penangas air dengan suhu 40 °C hingga kental (16).

Penetapan kadar flavonoid total fraksi

Penetapan kadar flavonoid total dengan metode kolorimetri yang mengacu pada prosedur Chang et al., (2002) (17) dengan sedikit modifikasi. Kuersetin digunakan untuk membuat kurva kalibrasi. Kuersetin (1000 µg/mL) dalam metanol kemudian diencerkan hingga diperoleh larutan seri konsentrasi 26, 44, 62, 80 dan 98 µg/mL. Masing-masing larutan (0,5 mL) secara terpisah direaksikan

dengan metanol (1,5 mL), AlCl_3 10% (0,1 mL), kalium asetat 1 M (0,1 mL) dan aquades (2,8 mL). Setelah inkubasi 30 menit pada suhu kamar, campuran diukur absorbansinya pada 440 nm menggunakan Spektrofotometer UV-Vis. Selanjutnya dibuat grafik hubungan absorbansi yang diperoleh terhadap konsentrasi kuersetin yang digunakan untuk menghasilkan persamaan garis linear $y=bx+a$. Persamaan ini selanjutnya digunakan untuk menetapkan konsentrasi flavonoid dalam larutan uji. Selanjutnya, prosedur mereaksikan yang sama dilakukan pada larutan uji fraksi etil asetat 6000 $\mu\text{g/mL}$ (0,5 mL) dalam metanol untuk menentukan kadar flavonoid total pada fraksi tersebut. Pengujian dilakukan triplo.

Penentuan aktivitas antiradikal bebas fraksi

Penentuan aktivitas antiradikal dilakukan terhadap DPPH dengan kuersetin sebagai pembanding mengikuti prosedur Batool et al., (2019) (18) dengan sedikit modifikasi. Larutan DPPH disiapkan dengan konsentrasi 0,2 mM. Larutan uji fraksi etil asetat disiapkan dengan seri konsentrasi yaitu 50, 150, 250, 350, dan 450 $\mu\text{g/mL}$. Sedangkan, seri konsentrasi kuersetin sebagai pembanding adalah 2, 4, 6, 8, dan 10 $\mu\text{g/mL}$. Selanjutnya larutan uji fraksi etil asetat maupun kuersetin masing-masing secara terpisah sebanyak 1 mL dicampurkan dengan 4 mL DPPH dan diinkubasi selama 30 menit pada suhu ruang dalam kondisi gelap. Absorbansi diukur pada 515 nm menggunakan Spektrofotometer UV-Vis. Kuersetin digunakan sebagai pembanding. Pengujian dilakukan triplo. Kapasitas antiradikal dihitung berdasarkan persentase inhibisi terhadap radikal DPPH yang dihitung dengan cara: absorbansi DPPH yang telah dikurangi dengan absorbansi sampel dibagi dengan absorbansi DPPH dikali 100%. Persentase inhibisi terhadap DPPH kemudian dibuat kurva terhadap konsentrasi masing-masing sampel untuk memperoleh persamaan garis linear $y=bx+a$. Persamaan ini kemudian digunakan untuk menghitung konsentrasi sampel yang mampu menghambat 50% radikal DPPH (*inhibition concentration* 50, IC_{50}) yang dinyatakan dalam $\mu\text{g/mL}$.

Pemisahan dengan KLT preparatif

Sebelumnya, konfirmasi keberadaan flavonoid pada fraksi etil asetat dilakukan pada plat KLT GF254 dengan fase gerak kloroform:etil asetat:metanol (3:2:2,5) dengan penambahan sedikit asam formiat. Pereaksi semprot sitroborat digunakan untuk melihat golongan senyawa. Pemisahan flavonoid pada fraksi etil asetat selanjutnya dilakukan pada plat KLT preparatif menggunakan fase gerak yang sama. Bercak diamati di bawah sinar UV 254 dan 366 nm tanpa disemprot sitroborat. Bercak dihitung nilai R_f -nya dengan cara membagi jarak rambat bercak (cm) dengan jarak rambat eluen (cm) dikali 100.

Analisis senyawa flavonoid

Bercak yang diperoleh dari hasil KLT preparatif dikerok dan dilarutkan dalam metanol dengan bantuan ultrasonik selama 15 menit. Filtrat disaring dengan kapas dan kertas saring. Filtrat kemudian diidentifikasi menggunakan spektrofotometer UV-Vis dan FTIR.

3. Hasil

Hasil identifikasi kualitatif menunjukkan kandungan kimia ekstrak etanol 70% daun *Cordia* antara lain alkaloid, fenolik, flavonoid, tanin, dan saponin. Hasil ekstraksi dan fraksinasi hidrolisat dapat dilihat pada Tabel 1. Hasil penentuan kadar flavonoid total dari fraksi etil asetat, menunjukkan bahwa flavonoid pada fraksi etil asetat sebesar 8,20 mgQE/g. Selanjutnya, pengujian aktivitas antiradikal dilakukan terhadap DPPH menggunakan spektrofotometer UV-Vis. Nilai IC_{50} kuersetin adalah 7,028 $\mu\text{g/mL}$, sedangkan IC_{50} fraksi etil asetat adalah 296,91 $\mu\text{g/mL}$. Hal ini menunjukkan

bahwa fraksi etil asetat memiliki aktivitas antiradikal yang belum sebanding dengan kuersetin sebagai standar.

Gambar 2 menunjukkan pola KLT fraksi etil asetat untuk konfirmasi keberadaan golongan senyawa flavonoid sebelum dilakukan KLT preparatif. Terdapat 4 bercak yang terdeteksi pada UV 254 nm, sedangkan pada 366 nm setelah disemprot sitroborat hanya ditemukan 1 bercak dominan yang disimpulkan bahwa bercak tersebut merupakan suatu flavonoid. Gambar 3 menunjukkan pola kromatogram dari KLT preparatif yang kemudian dianalisis menggunakan spektrofotometer UV-Vis dan FTIR.

Hasil spektrum UV-Vis pada bercak 1 (Gambar 4) diperoleh serapan pada 340 nm (pita I) dan 240 nm (pita II). Sedangkan spektrum infra merah (Gambar 5) menunjukkan adanya sinyal pada 3363 cm⁻¹ melebar (O–H ulur), 1727 cm⁻¹ (C=O), 1459 cm⁻¹ tajam dengan intensitas lemah dan 1060 cm⁻¹ kuat (C–O).

4. Pembahasan

Hasil identifikasi kualitatif ekstrak etanol daun *Cordia* pada penelitian ini sesuai dengan penelitian Hanani *et al.*, (2019) (2) yang menyatakan bahwa ekstrak daun *Cordia* mengandung senyawa alkaloid, flavonoid, fenolik, dan saponin. Etanol memiliki kemampuan menarik senyawa tanin, polifenol, flavonoid, terpenoid, steroid dan alkaloid (19). Polaritas etanol berkaitan dengan keberadaan gugus OH pada strukturnya (20). Kandungan flavonoid terdeteksi lebih tinggi dalam etanol yang bercampur dengan air pada konsentrasi 70% dibanding etanol absolut (19). Umumnya, flavonoid pada tumbuhan berada pada bentuk glikosidanya dibandingkan bentuk aglikon. Dengan demikian, prosedur ekstraksi flavonoid dapat dilakukan dengan menggunakan teknik hidrolisis (15).

Hidrolisis dilakukan untuk melepaskan gula pada glikosida dengan cara asam, basa maupun enzimatis. Hidrolisis asam pada glikosida flavonoid dapat dilakukan dengan memanaskan campuran bahan dengan 2 N HCl-metanol (10). Beberapa peneliti ada yang menambahkan asam askorbat di dalam prosedur tersebut untuk mencegah terjadinya oksidasi. Proses hidrolisis dapat dilakukan selama 2 jam pada suhu 80 °C atau lebih (21). Bentuk aglikon selanjutnya dapat diekstraksi dengan pelarut semipolar yaitu etil asetat. Berdasarkan hasil pada Tabel 1 menunjukkan rendemen dari fraksi etil asetat dari hidrolisat. Fraksi ini mengandung senyawa aglikon dan sedikit glikosida. Kemampuan ini didasarkan pada polaritas yang cukup besar karena adanya elektron π dan elektron pasangan bebas pada O (20).

Pengujian spektrofotometri yang didasarkan pada pembentukan kompleks aluminium adalah prosedur yang sering digunakan dalam penentuan kadar flavonoid. Sampel ini direaksikan dengan AlCl₃ dan memungkinkan pengukuran flavonoid totalnya setelah 2-60 menit dalam kisaran 404-430 nm (22). Prinsipnya, AlCl₃ akan membentuk kompleks stabil dengan gugus keto C-4 dan C-3 atau C-5 hidroksil dari struktur flavonoid (flavon dan flavonol) setelah penambahan asam. Selain itu, AlCl₃ juga membentuk kompleks labil dengan gugus orthohidroksil pada cincin A atau B dari flavonoid (17). Reaksi kompleks flavonoid dengan AlCl₃ dapat dilihat pada Gambar 6.

Antiradikal merupakan kemampuan senyawa kimia untuk bereaksi dengan radikal bebas (23). Senyawa bahan alam dengan aktivitas antiradikal umumnya dari kelompok fenolik. Kelompok fenolik (termasuk flavonoid) memiliki struktur kimia yang mendukung proses peredaman radikal bebas. Pada flavonoid, ada beberapa faktor yang menentukan kapasitas antiradikalnya antara lain: (1) gugus orthodihidroksi pada cincin B yang mampu mendonor elektron dan memberikan stabilitas yang tinggi pada bentuk radikal dan berpartisipasi dalam delokalisasi elektron, (2) ikatan rangkap 2,3 dengan suatu gugus 4-oxo pada cincin C yang bertanggung jawab terhadap delokalisasi cincin B, (3) gugus 3- dan 5- hidroksil dengan gugus 4-oxo pada cincin A dan C yang penting dalam menangkal radikal, (4)

Commented [NPEH1]: Masukan reviewer: lengkapi dengan gambar KLT yang menunjukkan bahwa isolate telah murni yang ditunjukkan dengan shanya terdapat satu spot pada beberapa eluen dengan nilai RF yang berbeda.

Commented [NPEH2R1]: Bagian ini tidak dapat kami penuhi karena datanya sudah tidak ada.

gugus 3-hidroksil pada aktivitas antioksidan (24). Pada studi ini, nilai IC_{50} fraksi etil asetat masih rendah dibandingkan dengan kuersetin sebagai pembanding terhadap peredaman radikal DPPH. Huyut et al., (2017) melaporkan bahwa senyawa antioksidan baik fenolik maupun flavonoid memberikan respon aktivitas antioksidan dan antiradikal berbeda (terkait mekanismenya) tergantung dari jenis ujinya. Hal ini berkaitan dengan fakta bahwa tiap uji memiliki perbedaan spesifisitas pelarut, reagen, dan kondisi pH. Selain itu, sifat hidrofobik/hidrofilik substansi, ukuran molekul, dan jumlah (kuantitas) serta jenis dari gugus fungsi fenolik dan flavonoid yang diujikan juga ikut berperan pada hasil ujinya (25). Dengan demikian, diperlukan pengujian dengan metode selain DPPH pada fraksi etil asetat untuk membuktikan hal ini.

Pemisahan dengan KLT masih menjadi metode yang paling banyak digunakan untuk pemisahan disebabkan karena metode ini sederhana, praktis, dan ekonomis serta prosedur kerja yang mudah. Hasil kromatogram KLT menunjukkan keberadaan senyawa flavonoid setelah disemprot dengan sitroborat. Sitroborat merupakan reagen yang terdiri atas asam borat dan asam sitrat dalam etanol. Reagen ini bereaksi dengan flavonoid dengan hasil positif berwarna kuning terang pada UV 366 nm (15). Reaksi ini menunjukkan keberadaan dari flavonoid dengan gugus ortho-hidroksi (26).

Prosedur pendekatan klarifikasi struktur senyawa dapat menggunakan spektroskopi. Spektroskopi UV-Visible dapat digunakan untuk menganalisis kualitatif kelas senyawa tertentu. Spektroskopi inframerah, misalnya *Fourier Transform Infrared Spectroscopy* (FTIR) merupakan metode dengan resolusi tinggi yang digunakan untuk mengidentifikasi kandungan kimia dengan cepat secara non-destruktif (27). Spektroskopi serapan ultraviolet (UV) dari flavonoid memiliki dua serapan maksimal sekitar 300–350 dan 240–285 nm masing-masing sesuai dengan pita I dan II dari cincin A dan B. Sebagian besar flavon, isoflavon dan kalkon terhidroksilasi memberikan serapan maksimum pada 3300–3600 cm^{-1} karena adanya gugus OH. Selain itu, gugus karbonil (C=O) flavonoid diamati sekitar 1680 cm^{-1} . Selain itu, serapan tajam dan intensitas tinggi teramati pada 1600 dan 1500 cm^{-1} karena adanya ikatan rangkap pada cincin aromatik (8). Dengan demikian, dapat disimpulkan bahwa fraksi etil asetat hidrolisis ekstrak etanol daun *Cordia* mengandung senyawa flavonoid mirip dengan kelompok kalkon. Spektrum UV kalkon mengandung dua pita serapan yang ditunjukkan pada Pita I (340 nm) dengan serapan sebesar 0,785 dan pita II (240 nm) dengan serapan sebesar 0,456. Pita I sering tampak pada 340–390 nm, meskipun terkadang sedikit perubahan atau puncak sering terjadi pada 300–320 nm. Pita II tampak pada 220–270 nm (28). Secara farmakologi, kalkon memiliki khasiat yang luas seperti antidiabetes, antikanker, antiinflamasi, antimikroba, antioksidan, antiparasit, psikoaktif dan neuroprotektif (29).

5. Kesimpulan

Fraksi etil asetat hasil hidrolisis ekstrak etanol 70% daun *Cordia* mengandung senyawa flavonoid yang mirip dengan kelompok kalkon berdasarkan analisis spektrum UV-Vis dan inframerah. Studi lebih lanjut dalam pemisahan dan pemurnian senyawa ini masih perlu dilakukan kedepannya dengan teknik kromatografi lain dan untuk menentukan struktur molekul senyawa murni perlu menggunakan metode spektroskopi massa dan NMR yang mendukung pada penentuan struktur dari flavonoid.

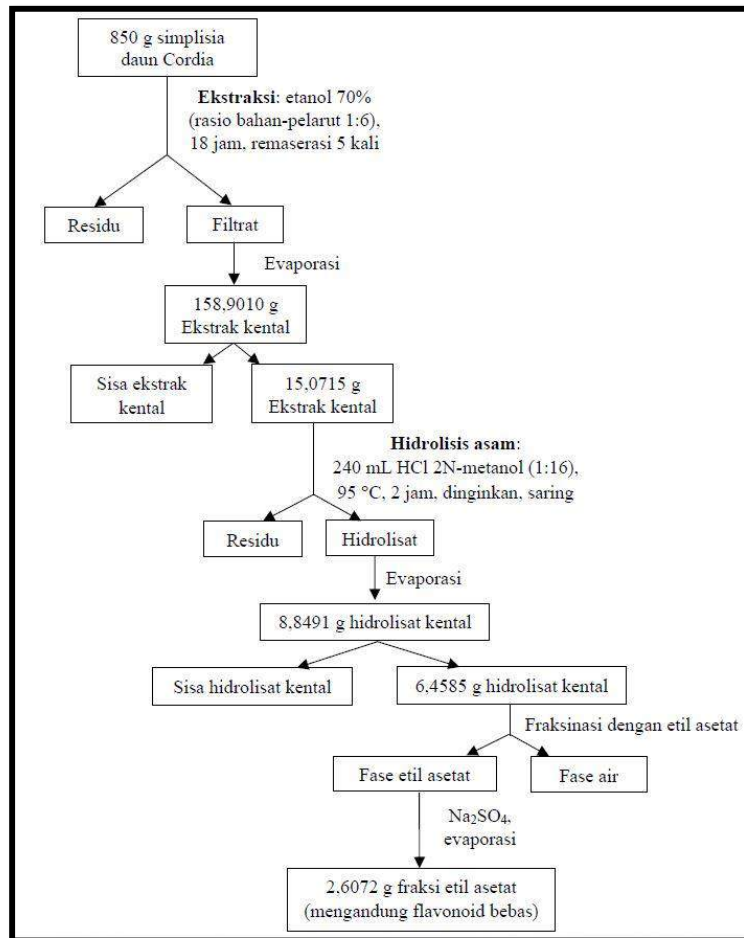
Daftar Pustaka

1. Lysiak GP. Ornamental Flowers Grown in Human Surroundings as a Source of Anthocyanins with High Anti-Inflammatory Properties. *Foods*. 2022;11(948).
2. Hanani E, Soewandi SHW, Hayati, Revita N. Pharmacognostical and preliminary phytochemical evaluation of *Cordia sebestena* L. *Pharmacogn J*. 2019;11(5):1100–5.

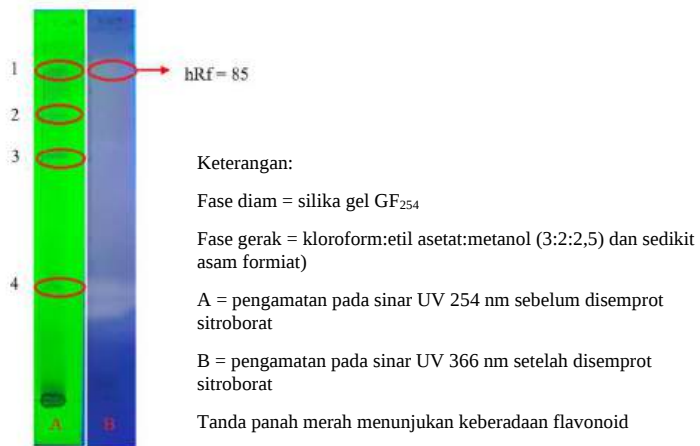
3. Adeosun CB, Bamigbade O I., Osho A, Atolani O. Volatile Composition of the Leaf, Flower and Fruit of *Cordia sebestena* (L.). *J Essent Oil-Bearing Plants*. 2015;18(4):976–81.
4. Osho A, Otuechere CA, Adeosun CB, Oluwagbemi T, Atolani O. Phytochemical, sub-acute toxicity, and antibacterial evaluation of *Cordia sebestena* leaf extracts. *J Basic Clin Physiol Pharmacol*. 2015;27(2):163–70.
5. Sunaryo H, Siska S, Hanani E, Anindita RS, Yanti N, Lisa. Evaluation of analgesic and anti-inflammatory activities of ethanolic extract of *Cordia sebestena* L. *Eur Pharm J*. 2020;66(2):26–31.
6. Hikmawanti NPE, Hanani E, Sapitri Y, Ningrum W. Total Phenolic Content and Antioxidant Activity of Different Extracts of *Cordia sebestena* L. Leaves. *Pharmacogn J*. 2020;12(6):1311–6.
7. Prakash S, Elavarasan N, Subashini K, Kanaga S, Dhandapani R, Sivanandam M, et al. Isolation of hesperetin - A flavonoid from *Cordia sebestena* flower extract through antioxidant assay guided method and its antibacterial, anticancer effect on cervical cancer via in vitro and in silico molecular docking studies. *J Mol Struct [Internet]*. 2020;1207:127751. Available from: <https://doi.org/10.1016/j.molstruc.2020.127751>
8. Awouafack MD, Tane P, Morita H. Isolation and Structure Characterization of Flavonoids. In: *Flavonoids - From Biosynthesis to Human Health*. Intech; 2017. p. 45–59.
9. Bian Y, Zhang Y, Zhou Y, Li GH, Feng XS. Progress in the Pretreatment and Analysis of Flavonoids: An Update since 2013. *Sep Purif Rev [Internet]*. 2022;51(1):11–37. Available from: <https://doi.org/10.1080/15422119.2020.1801469>
10. Stalikas CD. Extraction, separation, and detection methods for phenolic acids and flavonoids. *J Sep Sci*. 2007;30(18):3268–95.
11. Nuutila AM, Kammiovirta K, Oksman-Caldentey KM. Comparison of methods for the hydrolysis of flavonoids and phenolic acids from onion and spinach for HPLC analysis. *Food Chem*. 2002;76(4):519–25.
12. Heim KE, Tagliaferro AR, Bobilya DJ. Flavonoid antioxidants: Chemistry, metabolism and structure-activity relationships. *J Nutr Biochem*. 2002;13(10):572–84.
13. Tapas AR, Sakarkar DM, Kakde RB. Flavonoids as Nutraceuticals: A Review. *Trop J Pharm Res*. 2008;7(3):1089–99.
14. Kementerian Kesehatan RI. *Farmakope Herbal Indonesia (FHI)*. 2nd ed. Jakarta: Kementerian Kesehatan RI; 2017.
15. Hanani E. *Analisis Fitokimia*. Jakarta: Buku Kedokteran EGC; 2015. 34–45 p.
16. Irianti T, Murti YB, Kanistri DN, Pratiwi DR, Kuswandi, Kusumaningtyas RA. DPPH Radical Scavenging Activity of Aqueous Fraction from Ethanolic Extract of Talok Fruit (*Muntingia calabura* L.). *Tradit Med J*. 2016;21(1):38–47.
17. Chang C-C, Yang M-H, Wen H-M, Chern J-C. Estimation of total flavonoid content in propolis by two complementary colometric methods. *J Food Drug Anal*. 2002;10(3):178–82.
18. Batool R, Khan MR, Sajid M, Ali S, Zahra Z. Estimation of phytochemical constituents and in vitro antioxidant potencies of *Brachychiton populneus* (Schott & Endl.) R. Br. *BMC Chem*. 2019;13(32):1–15.

19. Tiwari P, Kumar B, Kaur M, Kaur G, Kaur H. Phytochemical screening and Extraction: A Review. *Int Pharm Sci.* 2011;1(1):98–106.
20. Houghton PJ, Raman A. Laboratory Handbook for the Fractionation of Natural Extracts. 1st ed. Laboratory Handbook for the Fractionation of Natural Extracts. Springer-Science+Business Media, B.V.; 1998. 14–16, 24–31, 39–52 p.
21. Khoddami A, Wilkes MA, Roberts TH. Techniques for analysis of plant phenolic compounds. *Molecules.* 2013;18(2):2328–75.
22. Pękal A, Pyrzynska K. Evaluation of Aluminium Complexation Reaction for Flavonoid Content Assay. *Food Anal Methods.* 2014;7(9):1776–82.
23. Tirzitis G, Bartosz G. Determination of antiradical and antioxidant activity: basic principles and new insights. *Acta Biochim Pol.* 2010;57(1):139–42.
24. Dai J, Mumper RJ. Plant phenolics: Extraction, analysis and their antioxidant and anticancer properties. *Molecules.* 2010;15:7313–52.
25. Huyut Z, Beydemir F., Gülçin E. Antioxidant and Antiradical Properties of Selected Flavonoids and Phenolic Compounds. *Biochem Res Int.* 2017;2017:1–10.
26. Sharma B, Agrawal SC, Gupta KC. Colour reactions of chalcones and their mechanism (A review). *Orient J Chem.* 2008;24(1):289–94.
27. Altemimi A, Lakhssassi N, Baharlouei A, Watson DG, Lightfoot DA. Phytochemicals: Extraction, Isolation, and Identification of Bioactive Compounds from Plant Extracts. *Plants.* 2017;6(42).
28. Aksöz BE, Ertan R. Spectral properties of chalcones II. *Fabad J Pharm Sci.* 2012;37(4):205–16.
29. Salehi B, Quispe C, Chamkhi I, El Omari N, Balahbib A, Sharifi-Rad J, et al. Pharmacological Properties of Chalcones: A Review of Preclinical Including Molecular Mechanisms and Clinical Evidence. *Front Pharmacol.* 2021;11(January).
30. Hikmawanti NPE, Hayati, Andriyani Y. Kadar Flavonoid Total pada Ekstrak Hidro-etanolik Daun *Sauropus androgynus* (L.) Merr dari Tiga Daerah dengan Ketinggian yang Berbeda. *J Jamu Indones.* 2021;6(2):61–7.

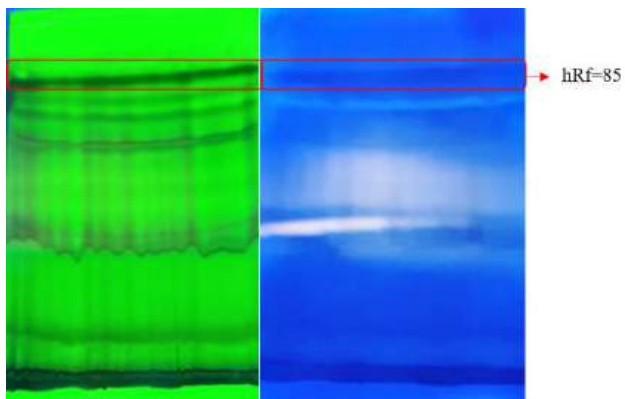
GAMBAR & TABEL



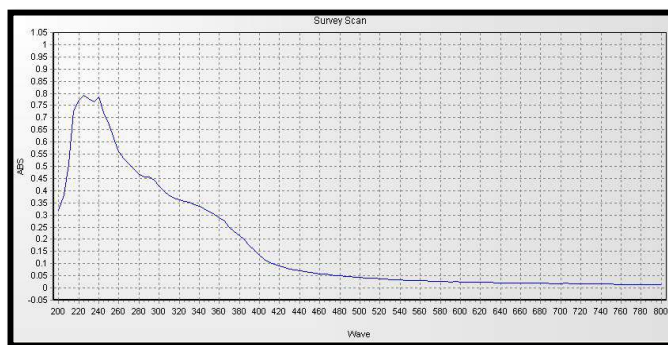
Gambar 1 Skema prosedur pemisahan



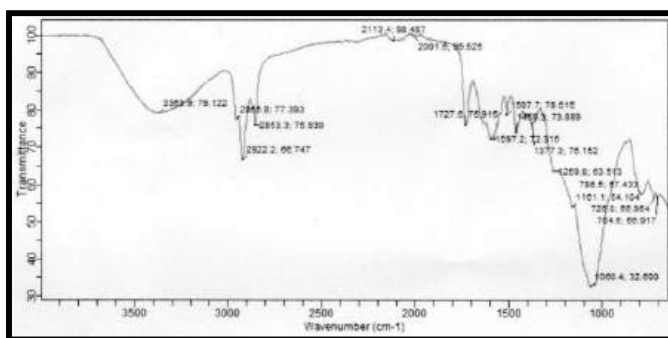
Gambar 2 Pola kromatogram KLT pada fraksi etil asetat



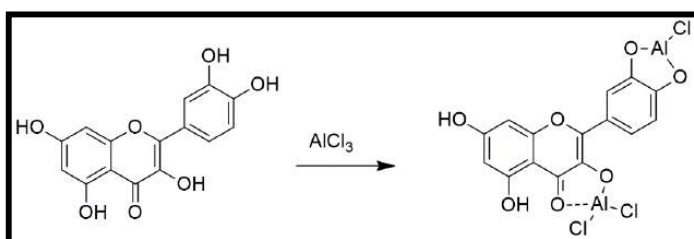
Gambar 3 Pola kromatogram KLT preparatif pada fraksi etil asetat pada sinar UV 254 nm (kiri) dan pada sinar UV 365 nm (kanan)



Gambar 4 Spektrum UV bercak 1



Gambar 5 Spektrum inframerah bercak 1



Gambar 6 Reaksi kompleks flavonoid dengan AlCl_3 (30)

Tabel 1 Hasil ekstraksi dan fraksinasi

Sampel	Bobot (g)	Rendemen (%)
Ekstrak etanol 70%*	158,90	18,69
Hidrolisat**	8,8491	58,71
Fraksi etil asetat***	2,6072	40,37

Keterangan: *dari 850 g serbuk simplisia; **dari 15,0715 g ekstrak; ***dari 6,4585 g hidrolisat.



Analysis of Flavonoids on Fraction from Hydrolysate of *Cordia Sebestena* L. Leaves Extract

Ni Putu Ermi Hikmawanti*, Endang Hanani, dan Rini Mardiyanti

Program Studi Farmasi, Fakultas Farmasi dan Sains, Universitas Muhammadiyah Prof. DR. HAMKA, Jl. Delima II/IV Klender, Jakarta Timur, DKI Jakarta 13460, Indonesia

Abstract

Cordia sebestena L. contains flavonoids, that play a role in free radical scavenging activity. This study aimed to analyze the flavonoids in the hydrolyzed fraction of the 70% ethanol extract of Cordia leaves. The study was divided into 7 stages: (1) maceration using 70% ethanol, (2) acid hydrolysis of the ethanol extract, (3) fractionation of hydrolysate with ethyl acetate, (4) determination of total flavonoid content, (5) antiradical activity assay against 2,2'-diphenyl-1-picrylhydrazyl (DPPH), (6) thin layer chromatography (TLC) analysis, and (7) identification of flavonoid using UV-Visible Spectrophotometry and Infrared Spectroscopy. The total flavonoid content of the ethyl acetate fraction was 8.20 mgQE/g with an IC₅₀ value of 296.91 g/mL against DPPH radicals. There is one spot of flavonoids in the ethyl acetate fraction (hRf = 85.5). The UV-Vis spectrum on these spots obtained absorption at 340 nm (band I) and 240 nm (band II). The infrared spectrum shows a signal at 3363 cm⁻¹ (O–H stretching), 1727 cm⁻¹ (C=O), and 1060 cm⁻¹ strong (C–O). The ethyl acetate hydrolysate fraction of Cordia leaf contains flavonoid similar to the chalcone group. Further analysis is needed using ¹H NMR or FTIR data from a known chalcone as a standard to confirm the flavonoid.

Key words: acid hydrolysis, Boraginaceae, *Cordia*, ethyl acetate fraction, flavonoids

Analisis Flavonoid pada Fraksi Hasil Hidrolisis Ekstrak Daun *Cordia sebestena* L.

Abstrak

Cordia sebestena L. mengandung flavonoid yang berperan dalam aktivitas peredaman radikal bebas. Penelitian ini bertujuan menganalisis senyawa flavonoid pada fraksi hasil hidrolisis ekstrak etanol 70% daun Cordia. Penelitian terbagi menjadi 7 tahapan, yaitu (1) maserasi daun menggunakan etanol 70%, (2) hidrolisis asam pada ekstrak dengan HCl 2N pada 95 °C selama 2 jam, (3) fraksinasi hidrolisat dengan etil asetat, (4) penentuan kadar flavonoid total dengan kolorimetri, (5) pengujian aktivitas antiradikal terhadap 2,2'-difenil-1-pikrilhidrazil (DPPH), (6) pemisahan menggunakan kromatografi lapis tipis (KLT), dan (7) identifikasi flavonoid menggunakan spektrofotometri UV-Vis dan infra merah. Kadar flavonoid total fraksi etil asetat sebesar 8,20 mgQE/g dengan nilai IC₅₀ terhadap radikal DPPH sebesar 296,91 µg/mL. Ada satu bercak flavonoid pada fraksi etil asetat (hRf = 85,5). Hasil spektrum UV-Vis pada bercak tersebut diperoleh serapan pada 340 nm (pita I) dan 240 nm (pita II). Spektrum infra merah menunjukkan adanya sinyal pada 3363 cm⁻¹ (O–H ulur), 1727 cm⁻¹ (C=O), dan 1060 cm⁻¹ kuat (C–O). Fraksi etil asetat hidrolisat ekstrak etanol daun Cordia mengandung senyawa flavonoid yang mirip dengan kelompok kalkon. Namun, diperlukan analisis lebih lanjut untuk memastikan bahwa flavonoid ini merupakan khalkon menggunakan data ¹H NMR atau FTIR dari senyawa khalkon yang telah diketahui.

Kata kunci: Boraginaceae, *Cordia*, flavonoid, fraksi etil asetat, hidrolisis asam

Korespondensi: Ni Putu Ermi Hikmawanti (ermy0907@uhamka.ac.id)

Info artikel : Submit (tanggal), Revisi (tanggal)

Diterima (tanggal), Terbit (tanggal)

Pendahuluan

Banyak tanaman hias berbunga merupakan sumber alami senyawa bioaktif yang bermanfaat untuk kesehatan manusia, terutama sebagai antioksidan. Meskipun demikian, ketertarikan pemanfaatan tanaman ini sebagai sumber makanan dan obat masih rendah. Padahal beberapa studi melaporkan bahwa tanaman hias memiliki potensi sebagai sumber flavonoid (terutama antosianin) sebagai antioksidan dan antiinflamasi (1). *Cordia sebestena* L. (Boraginaceae) atau *Cordia* merupakan suatu tanaman hias. Daun *Cordia* mengandung senyawa fenolik, flavonoid, saponin, alkaloid, steroid/triterpenoid, dan tannin (2). Daun *Cordia* juga mengandung senyawa volatil sebesar 0,05% (3). Daun *Cordia* memiliki beragam aktivitas farmakologi, antara lain antibakteri (4), analgetik, antiinflamasi (5), antioksidan (6), dan lain sebagainya. Studi mengenai toksisitas subakut dari ekstrak etil asetat daun *Cordia* menunjukkan bahwa ekstrak tersebut tidak toksik terhadap hati (4). Sebelumnya, telah diisolasi kandungan flavonoid hesperetin dari bunga *Cordia* dengan khasiat antibakteri dan antikanker terhadap kanker serviks *in vitro* (7). Namun, studi mengenai flavonoid dari daun *Cordia* belum banyak dieksplorasi.

Flavonoid merupakan kelompok fenolik dengan struktur inti C-15 (C₆-C₃-C₆) (8). Flavonoid merupakan kelas metabolit sekunder dari bahan alam sebagai nutrasetikal yang paling banyak digunakan pada pengobatan, makanan, suplemen dan lainnya (9). Meskipun studi mengenai isolasi maupun sintesisnya telah banyak, para peneliti masih tertarik meneliti flavonoid dan turunannya (10). Umumnya, flavonoid dapat diekstraksi dari pelarut air, etanol, metanol, *n*-butanol, aseton, etil asetat, kloroform dan lainnya (11). Pelarut polar digunakan untuk memperoleh flavonoid bentuk glikosida, sedangkan pelarut non-polar untuk ekstraksi bentuk aglikonnya (8). Untuk memperoleh bentuk aglikon flavonoid umumnya dilakukan proses hidrolisis terhadap glikosida flavonoid dengan cara asam, basa, maupun enzimatis. Hidrolisis asam merupakan teknik sederhana, cepat dan ekonomis untuk mengubah suatu glikosida menjadi aglikon (12). Teknik ini sering kali dilakukan menggunakan HCl 2 N-metanol atau HCl 2M (13). Hidrolisis glikosida flavonoid dari

beberapa sampel sayuran dilaporkan baik dilakukan dengan metode hidrolisis asam menggunakan HCl 1,2 M dalam 50% metanol-air dengan penambahan asam askorbat sebagai pencegah oksidasi pada 80 °C selama 120 menit (14).

Flavonoid merupakan suatu antioksidan yang secara alami ditemukan dalam bahan alam terutama tumbuhan (15,16). Selain itu, flavonoid juga berperan sebagai suatu nutrasetikal dengan khasiat antimikroba, antibakteri, antifungi, antivirus, antiulcer, hepatoprotektif, antiinflamasi, efek kardioprotektif, antineoplasma, dan lainnya (17). Banyaknya penemuan dan pengembangan obat baru dari flavonoid yang berasal dari tanaman menjadi alasan dilakukannya penelitian ini. Penelitian ini bertujuan melakukan analisis senyawa flavonoid pada fraksi etil asetat hasil hidrolisis ekstrak etanol 70% daun *Cordia* sekaligus menentukan aktivitas antiradikalnya.

Metode

Alat

Alat-alat yang digunakan pada penelitian ini meliputi toples maserasi, ayakan no. mesh 40, timbangan analitik (Ohaus), mikropipet (Eppendorf), *vacuum rotary evaporator* (Eyela N-1100, Cina), oven (Mettler UN-55), chamber (Camag), kotak UV (Camag), ultrasonik (Branson 5510), spektrofotometer UV-Vis (UV-1601 Series, Shimadzu, Japan), dan spektrometer FTIR (Agilent Cary 630, USA).

Bahan

Etanol 70%, etil asetat, metanol, kloroform pada tingkat analitik (Merck, Jerman) digunakan sebagai pelarut. Bahan lain yang digunakan antara lain plat KLT GF₂₅₄ (Merck, Jerman), DPPH, AlCl₃ 10%, kalium asetat, kuersetin (Sigma-Aldrich Co., USA), HCl 2N, Na₂SO₄, asam formiat, dan aquades.

Ekstraksi

Daun *Cordia* diperoleh dari pekarangan rumah warga di sekitar Jakarta Timur. Sebelumnya, tanaman telah dideterminasi di Lembaga Ilmu Pengetahuan Indonesia (*Indonesian Institute of Sciences*), Pusat Penelitian Biologi (*Research Center for Biology*),

Cibinong Sciences Center, Cibinong. Sampel daun segar (2,5 kg) dibuat simplisia menggunakan oven pada 50 °C. Blender elektrik digunakan untuk menghaluskan simplisia menjadi serbuk untuk selanjutnya diayak dengan ayakan no. mesh 40. Serbuk kemudian disimpan dalam wadah kering tertutup rapat (18).

Serbuk simplisia (850 g) diekstraksi menggunakan metode maserasi dengan pelarut etanol 70% (dengan rasio bahan–pelarut 1:6) selama 18 jam sambil sesekali diaduk. Ampas yang telah dipisahkan dari filtrat kemudian diremaserasi sampai pemeriksaan terhadap kandungan flavonoid didalamnya memberikan hasil negatif. Filtrat diuapkan pelarutnya menggunakan *vacuum rotary evaporator* pada 50 °C. Evaporasi dilanjutkan dengan penangas air pada 50 °C hingga diperoleh ekstrak kental (18). Ekstrak dihitung persentase rendemen dan dilakukan penapisan fitokimia sederhana mengikuti prosedur pada Hanani (2015) (19). Skema prosedur ekstraksi dapat dilihat pada Gambar 1.

Hidrolisis Ekstrak

Ekstrak etanol sebanyak 15,0715 g dicampurkan dengan 240 mL HCl 2N-metanol (dengan rasio bahan–pelarut 1:16) di dalam labu alas bulat. Campuran dipanaskan pada 95 °C selama 2 jam. Setelah dingin, campuran disaring dan dipekatkan di atas penangas air pada 60 °C hingga diperoleh hidrolisat kental (13,20).

Fraksinasi dari hasil hidrolisat

Hidrolisat sebanyak 6,45 g dilarutkan dalam 20 mL metanol dan 20 ml aquadest, dan kemudian dimasukkan ke dalam corong pisah. Selanjutnya, campuran difraksinasi menggunakan etil asetat sebanyak 40 mL. Setelah dikocok perlahan dan didiamkan sesaat, fase air (lapisan bawah) dan fase etil asetat (lapisan atas) masing-masing dipisahkan dan dikumpulkan. Fraksi etil asetat disaring menggunakan Na₂SO₄. Fraksi tersebut dipekatkan di atas penangas air dengan suhu 40 °C (20).

Penetapan kadar flavonoid total fraksi

Penetapan kadar flavonoid total dengan metode kolorimetri (21,22). Kuersetin digunakan untuk membuat kurva kalibrasi. Kuersetin (1000 µg/mL) dalam metanol kemudian diencerkan hingga diperoleh larutan seri konsentrasi 26, 44, 62, 80 dan

98 µg/mL. Fraksi etil asetat disiapkan dalam metanol (1000 µg/mL). Larutan uji (0,5 mL) secara terpisah dicampur dengan metanol (1,5 mL), AlCl₃ 10% (0,1 mL), kalium asetat 1 M (0,1 mL) dan aquades (2,8 mL), kemudian dihomogenkan. Setelah 30 menit diinkubasi pada suhu kamar, campuran tersebut diukur absorbansinya pada 440 nm menggunakan Spektrofotometer UV-Vis. Selanjutnya grafik hubungan absorbansi terhadap konsentrasi standar kuersetin digunakan untuk memperoleh persamaan garis linear ($y=bx\pm a$). Persamaan ini selanjutnya digunakan untuk menetapkan konsentrasi flavonoid dalam larutan uji. Selanjutnya, prosedur mereaksikan yang sama dilakukan pada larutan uji fraksi etil asetat 6000 µg/mL (0,5 mL) dalam metanol untuk menentukan kadar flavonoid total pada fraksi tersebut. Pengujian dilakukan triplo.

Penentuan aktivitas antiradikal bebas fraksi

Penentuan aktivitas antiradikal dilakukan terhadap DPPH dengan kuersetin sebagai pembanding mengikuti prosedur Batool et al., (2019) (23) dengan sedikit modifikasi. Larutan DPPH disiapkan dalam metanol dengan konsentrasi 0,2 mM. Larutan fraksi etil asetat disiapkan dengan seri konsentrasi yaitu 50, 150, 250, 350, dan 450 µg/mL. Sedangkan, seri konsentrasi kuersetin sebagai pembanding adalah 2, 4, 6, 8, dan 10 µg/mL. Selanjutnya larutan uji sebanyak 1 mL (baik fraksi etil asetat maupun kuersetin) masing-masing secara terpisah dicampurkan dengan 4 mL DPPH. Campuran diinkubasi pada suhu ruang selama 30 menit dalam kondisi gelap. Absorbansi diukur pada 515 nm menggunakan Spektrofotometer UV-Vis. Pengujian dilakukan triplo. Kapasitas antiradikal dihitung berdasarkan persentase inhibisi terhadap radikal DPPH yang dihitung dengan cara: (absorbansi DPPH – absorbansi sampel) dibagi dengan absorbansi DPPH dikali 100%. Kemudian kurva persentase inhibisi DPPH terhadap konsentrasi masing-masing sampel digunakan untuk memperoleh persamaan garis linear ($y=bx\pm a$). Persamaan tersebut selanjutnya digunakan untuk menghitung konsentrasi sampel yang

mampu menghambat 50% radikal DPPH (*inhibition concentration* 50, IC₅₀) yang dinyatakan dalam µg/mL.

Pemisahan dengan KLT preparatif

Sebelumnya, konfirmasi keberadaan flavonoid dalam fraksi etil asetat dilakukan pada plat KLT GF254. Fase gerak yang digunakan adalah kloroform:etil asetat:metanol (3:2:2,5) dengan penambahan sedikit asam formiat. Pereaksi semprot sitroborat digunakan untuk mendeteksi golongan senyawa flavonoid. Pemisahan flavonoid pada fraksi etil asetat selanjutnya dilakukan pada plat KLT preparatif menggunakan fase gerak yang sama. Visualisasi bercak dipantau pada sinar UV 254 dan 366 nm tanpa disemprot sitroborat. Bercak dihitung nilai *R_f*-nya dengan cara membagi jarak rambat bercak (cm) dengan jarak rambat eluen (cm) dikali 100.

Analisis senyawa flavonoid

Bercak yang diperoleh dari hasil KLT preparatif dikerok dan dilarutkan dalam metanol dengan bantuan ultrasonik selama 15 menit. Filtrat disaring dengan kapas dan kertas saring. Filtrat kemudian diidentifikasi menggunakan spektrofotometer UV-Vis maupun FTIR.

Hasil

Hasil identifikasi kualitatif menunjukkan bahwa ekstrak etanol 70% daun *Cordia* terdeteksi senyawa alkaloid, fenolik, flavonoid, tanin, dan saponin. Hasil ekstraksi dan fraksinasi hidrolisat disajikan pada Tabel 1. Kadar flavonoid total fraksi etil asetat diperoleh sebesar 8,20 mgQE/g. Selanjutnya, pengujian aktivitas antiradikal dilakukan terhadap DPPH menggunakan spektrofotometer UV-Vis. Nilai IC₅₀ kuersetin adalah 7,028 µg/mL, sedangkan IC₅₀ fraksi etil asetat adalah 296,91 µg/mL. Hal ini menunjukkan bahwa fraksi etil asetat memiliki aktivitas antiradikal namun belum sebanding dengan kuersetin sebagai standar/pembandingan.

Gambar 2 menunjukkan pola KLT fraksi etil asetat untuk konfirmasi keberadaan golongan senyawa flavonoid sebelum dilakukan KLT preparatif. Terdapat 4 bercak yang terdeteksi pada sinar 254 nm (sebelum disemprot sitroborat), sedangkan pada 366 nm (setelah disemprot sitroborat) hanya ditemukan 1 bercak dominan berwarna kuning yang

disimpulkan bahwa bercak tersebut merupakan suatu flavonoid (19). Gambar 3 menunjukkan pola kromatogram dari KLT preparatif. Bercak yang tampak kemudian dianalisis lebih lanjut menggunakan spektrofotometer UV-Vis dan FTIR.

Hasil spektrum UV-Vis pada bercak 1 (Gambar 4) diperoleh serapan pada 340 nm (pita I) dan 240 nm (pita II). Sedangkan spektrum infra merah (Gambar 5) menunjukkan adanya sinyal pada 3363 cm⁻¹ melebar (O–H ulur), 1727 cm⁻¹ (C=O), 1459 cm⁻¹ tajam dengan intensitas lemah dan 1060 cm⁻¹ kuat (C–O).

Pembahasan

Hasil identifikasi kualitatif ekstrak etanol daun *Cordia* pada penelitian ini sesuai dengan penelitian Hanani *et al.*, (2019) (2). Etanol memiliki kemampuan menarik senyawa polifenol, flavonoid, tanin, terpenoid, steroid, dan alkaloid (24). Polaritas etanol berkaitan dengan keberadaan gugus OH pada strukturnya (25). Kandungan flavonoid terdeteksi lebih tinggi dalam etanol yang bercampur dengan air pada konsentrasi 70% dibanding etanol absolut (24). Umumnya, flavonoid pada tumbuhan berada pada bentuk glikosidanya dibandingkan bentuk aglikon. Dengan demikian, prosedur ekstraksi flavonoid dapat dilakukan dengan menggunakan teknik hidrolisis (19).

Hidrolisis dilakukan untuk melepaskan gula pada glikosida dengan cara asam, basa maupun enzimatis. Hidrolisis asam pada glikosida flavonoid dapat dilakukan dengan memanaskan campuran bahan dengan 2 N HCl-metanol (13). Beberapa peneliti ada yang menambahkan asam askorbat di dalam prosedur tersebut untuk mencegah terjadinya oksidasi. Proses hidrolisis dapat dilakukan selama 2 jam pada suhu 80 °C atau lebih (26). Bentuk aglikon selanjutnya dapat diekstraksi dengan pelarut semipolar yaitu etil asetat. Berdasarkan hasil rendemen dari fraksi etil asetat dari hidrolisat pada Tabel 1, menunjukkan bahwa fraksi ini mengandung sebagian besar senyawa aglikon dan sedikit glikosida. Kemampuan ini didasarkan pada

polaritas etil asetat yang cukup besar karena adanya elektron π dan elektron pasangan bebas pada O (25).

Pengujian spektrofotometri yang didasarkan pada pembentukan kompleks aluminium adalah prosedur yang sering digunakan dalam penentuan kadar flavonoid. Sampel ini direaksikan dengan $AlCl_3$ dan memungkinkan pengukuran flavonoid totalnya setelah 2-60 menit dalam kisaran 404-430 nm (27). Prinsipnya, kompleks stabil dari $AlCl_3$ dengan gugus keto C-4 dan C-3 atau C-5 hidroksil dari struktur flavonoid (flavon dan flavonol) dapat terbentuk setelah penambahan asam. Selain itu, $AlCl_3$ juga membentuk kompleks stabil dengan gugus ortohidroksil pada cincin A atau B dari flavonoid (21).

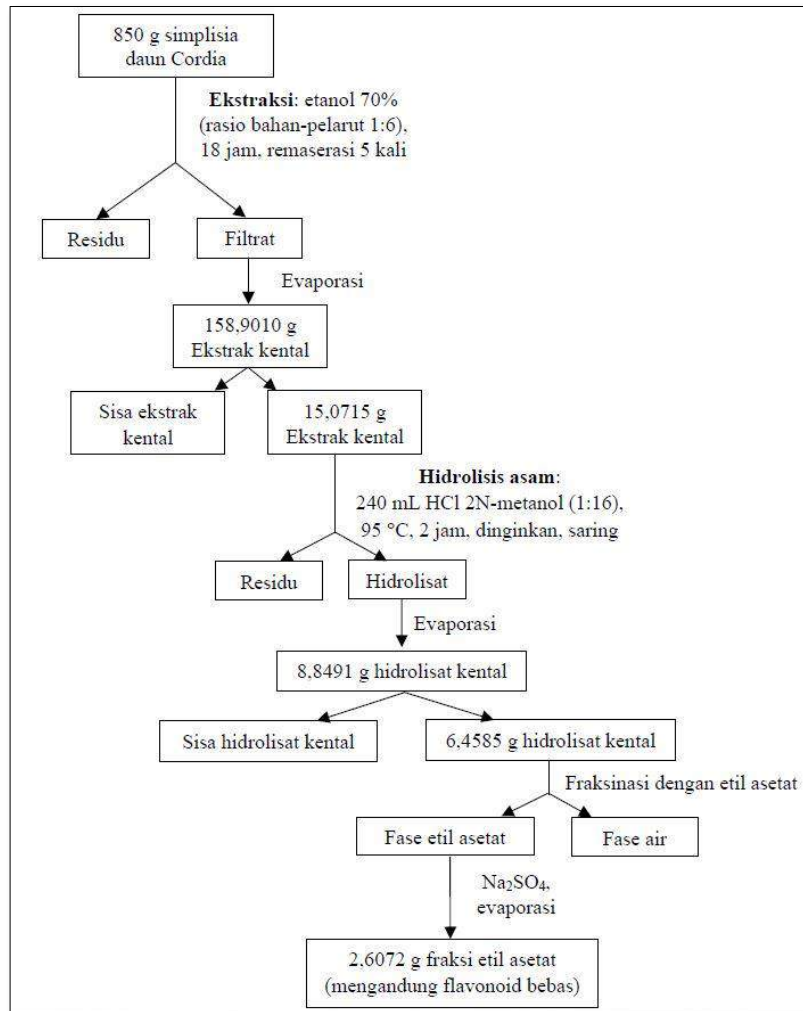
Antiradikal merupakan kemampuan senyawa kimia untuk bereaksi dengan radikal bebas (28). Senyawa bahan alam dengan aktivitas antiradikal umumnya dari kelompok fenolik. Kelompok fenolik (termasuk flavonoid) memiliki struktur kimia yang mendukung proses peredaman radikal bebas. Pada flavonoid, ada beberapa faktor yang menentukan kapasitas antiradikalnya antara lain: (1) adanya gugus orto-dihidroksi pada cincin B mampu menyumbang elektron dan berpartisipasi dalam delokalisasi elektron, (2) adanya ikatan rangkap 2,3 dengan gugus 4-okso pada cincin C bertanggung jawab pada delokalisasi cincin B, (3) adanya gugus 3- dan 5-hidroksil dengan gugus 4-okso pada cincin A dan C ikut berperan dalam menangkal radikal, (4) adanya gugus 3-hidroksil (29). Hasil dari studi ini, nilai IC_{50} fraksi etil asetat masih rendah dibandingkan dengan kuersetin sebagai pembanding terhadap peredaman radikal DPPH. Senyawa antioksidan baik fenolik maupun flavonoid memberikan respon aktivitas antioksidan dan antiradikal berbeda (terkait mekanismenya) tergantung dari jenis ujinya. Hal ini berkaitan dengan fakta bahwa tiap uji memiliki perbedaan spesifisitas pelarut, reagen, dan kondisi pH. Selain itu, sifat hidrofobik/hidrofilik substansi, ukuran molekul, dan jumlah (kuantitas) serta jenis dari gugus fungsi fenolik dan flavonoid yang diujikan juga ikut berperan pada hasil ujinya (9). Dengan demikian, diperlukan pengujian

dengan metode selain DPPH pada fraksi etil asetat untuk membuktikan hal ini.

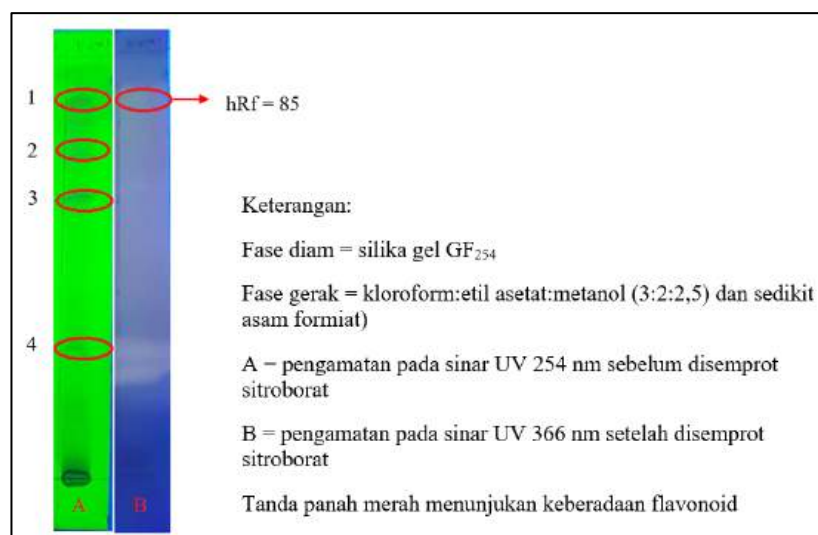
Pemisahan dengan KLT masih menjadi metode yang paling banyak digunakan untuk pemisahan disebabkan karena metode ini sederhana, praktis, dan ekonomis serta prosedur kerja yang mudah. Hasil kromatogram KLT menunjukkan keberadaan senyawa flavonoid setelah disemprot dengan sitroborat. Sitroborat merupakan reagen yang terdiri atas asam borat dan asam sitrat dalam etanol. Reagen ini bereaksi dengan flavonoid dengan gugus ortho-hidroksi (30) dengan hasil positif berwarna kuning terang pada UV 366 nm (19).

Prosedur pendekatan klarifikasi struktur senyawa dapat menggunakan spektroskopi. Spektroskopi UV-Visible dapat digunakan untuk menganalisis kualitatif kelas senyawa tertentu. Spektroskopi inframerah, misalnya *Fourier Transform Infrared Spectroscopy* (FTIR) merupakan metode dengan resolusi tinggi yang digunakan untuk mengidentifikasi kandungan kimia dengan cepat secara non-destruktif (31).

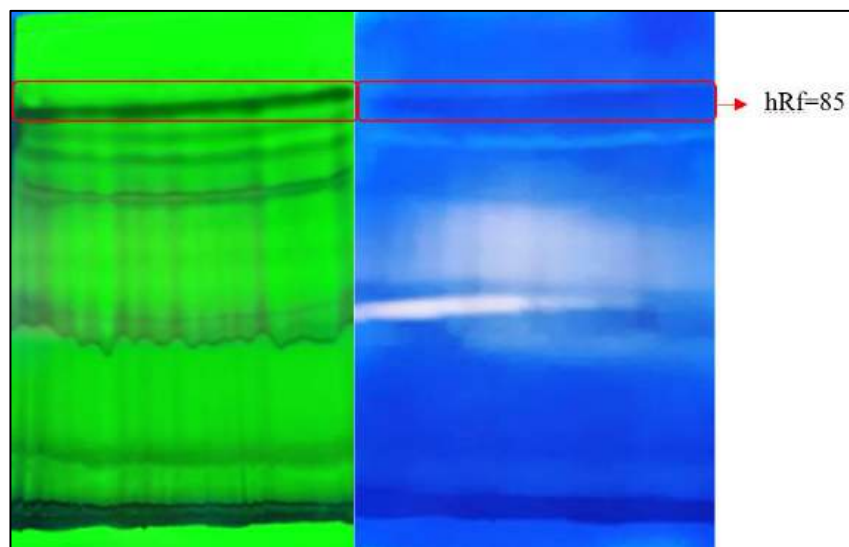
Spektroskopi serapan ultraviolet (UV) dari flavonoid memiliki dua serapan maksimal sekitar 300–350 dan 240–285 nm masing-masing sesuai dengan pita I dan II dari cincin A dan B. Sebagian besar flavon, isoflavon dan kalkon terhidroksilasi memberikan serapan maksimum pada 3300-3600 cm^{-1} karena adanya gugus OH (8). Gugus karbonil ($C=O$) flavonoid diamati sekitar 1727 cm^{-1} . Serapan tajam dan intensitas tinggi teramati pada 1600 dan 1500 cm^{-1} karena adanya ikatan rangkap pada cincin aromatik (8,32). Dengan demikian, dapat disimpulkan bahwa fraksi etil asetat hidrolisat ekstrak etanol daun *Cordia* mengandung senyawa flavonoid mirip dengan kelompok kalkon. Spektrum UV kalkon mengandung dua pita serapan yang ditunjukkan pada Pita I (340 nm) dengan serapan sebesar 0,785 dan pita II (240 nm) dengan serapan sebesar 0,456. Pita I sering tampak pada 340-390 nm, meskipun terkadang sedikit perubahan atau puncak sering terjadi pada 300-320 nm.



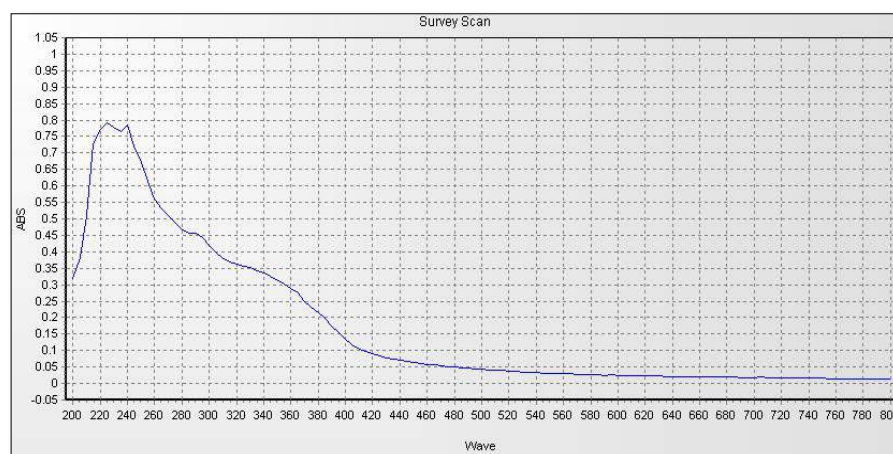
Gambar 1 Skema prosedur pemisahan



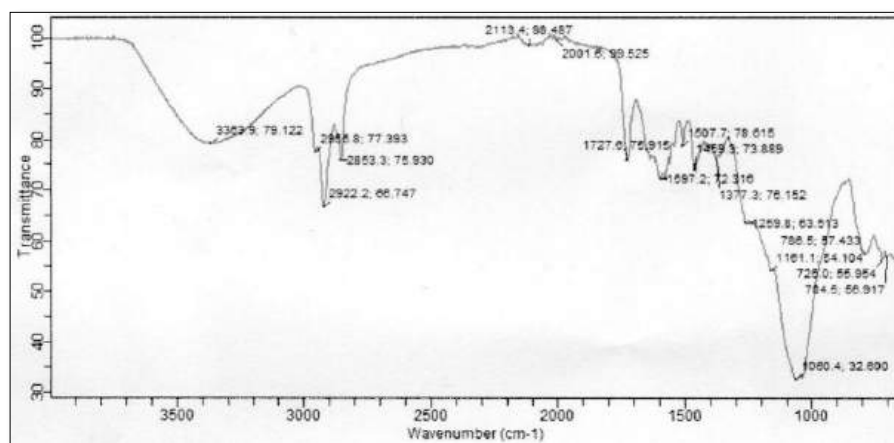
Gambar 2 Pola kromatogram KLT pada fraksi etil asetat



Gambar 3 Pola kromatogram KLT preparatif pada fraksi etil asetat pada sinar UV 254 nm (kiri) dan pada sinar UV 365 nm (kanan)



Gambar 4 Spektrum UV bercak 1



Gambar 5 Spektrum inframerah bercak 1

Tabel 1 Hasil ekstraksi dan fraksinasi

Sampel	Bobot (g)	Rendemen (%)
Ekstrak etanol 70%*	158,90	18,69
Hidrolisat**	8,8491	58,71
Fraksi etil asetat***	2,6072	40,37

Keterangan: * dari 850 g serbuk simplisia; ** dari 15,0715 g ekstrak; *** dari 6,4585 g hidrolisat.

Pita II tampak pada 220-270 nm (33). Secara farmakologi, kalkon memiliki khasiat yang luas seperti antidiabetes, antikanker, antiinflamasi, antimikroba, antioksidan, antiparasit, psikoaktif dan neuroprotektif (34).

Kesimpulan

Frakasi etil asetat hasil hidrolisat ekstrak etanol 70% daun *Cordia* mengandung senyawa flavonoid yang memiliki aktivitas antiradikal DPPH. Flavonoid yang ditemukan memiliki kemiripan dengan kelompok kalkon berdasarkan analisis spektrum UV-sinar tampak dan inframerah. Studi lebih lanjut dalam pemisahan dan pemurnian senyawa ini masih perlu dilakukan kedepannya dengan teknik kromatografi lain dan untuk menentukan struktur molekul senyawa murni perlu menggunakan metode spektroskopi massa dan NMR yang mendukung pada penentuan struktur dari flavonoid.

Daftar Pustaka

1. Łysiak GP. Ornamental Flowers Grown in Human Surroundings as a Source of Anthocyanins with High Anti-Inflammatory Properties. *Foods*. 2022;11(948).
2. Hanani E, Soewandi SHW, Hayati, Revita N. Pharmacognostical and preliminary phytochemical evaluation of *Cordia sebestena* L. *Pharmacogn J*. 2019;11(5):1100–5.
3. Adeosun CB, Bamigbade OI., Osho A, Atolani O. Volatile Composition of the Leaf, Flower and Fruit of *Cordia sebestena* (L.). *J Essent Oil-Bearing Plants*. 2015;18(4):976–81.
4. Osho A, Otuechere CA, Adeosun CB, Oluwagbemi T, Atolani O. Phytochemical, sub-acute toxicity, and antibacterial evaluation of *Cordia sebestena* leaf extracts. *J Basic Clin Physiol Pharmacol*. 2015;27(2):163–70.
5. Sunaryo H, Siska S, Hanani E, Anindita RS, Yanti N, Lisa. Evaluation of analgesic and anti-inflammatory activities of ethanolic extract of *Cordia sebestena* L. *Eur Pharm J*. 2020;66(2):26–31.
6. Hikmawanti NPE, Hanani E, Sapitri Y, Ningrum W. Total Phenolic Content and Antioxidant Activity of Different Extracts of *Cordia sebestena* L. Leaves. *Pharmacogn J*. 2020;12(6):1311–6.
7. Prakash S, Elavarasan N, Subashini K, Kanaga S, Dhandapani R, Sivanandam M, et al. Isolation of hesperetin - A flavonoid from *Cordia sebestena* flower extract through antioxidant assay guided method and its antibacterial, anticancer effect on cervical cancer via in vitro and in silico molecular docking studies. *J Mol Struct*. 2020;1207:127751.
8. Awouafack MD, Tane P, Morita H. Isolation and Structure Characterization of Flavonoids. In: *Flavonoids - From Biosynthesis to Human Health*. Intech; 2017. p. 45–59.
9. Huyut Z, Beydemir F., Gülçin E. Antioxidant and Antiradical Properties of Selected Flavonoids and Phenolic Compounds. *Biochem Res Int*. 2017;2017:1–10.
10. Arifin B, Ibrahim S. Struktur, Bioaktivitas Dan Antioksidan Flavonoid. *J Zarah*. 2018;6(1):21–9.
11. Alara OR, Abdurahman NH, Ukaegbu CI. Extraction of phenolic compounds: A review. *Curr Res Food Sci*. 2021;4(March):200–14.
12. Bian Y, Zhang Y, Zhou Y, Li GH, Feng XS. Progress in the Pretreatment and Analysis of Flavonoids: An Update since 2013. *Sep Purif Rev*. 2022;51(1):11–37.
13. Stalikas CD. Extraction, separation, and detection methods for phenolic acids and flavonoids. *J Sep Sci*. 2007;30(18):3268–95.
14. Nuutila AM, Kammiovirta K, Oksman-Caldentey KM. Comparison of methods for the hydrolysis of flavonoids and phenolic acids from onion and spinach for HPLC analysis. *Food Chem*. 2002;76(4):519–25.
15. Heim KE, Tagliaferro AR, Bobilya DJ. Flavonoid antioxidants: Chemistry, metabolism and structure-activity relationships. *J Nutr Biochem*. 2002;13(10):572–84.
16. Alam MN, Bristi NJNJ, Rafiquzzaman M. Review on in vivo and in vitro methods evaluation of antioxidant activity. *Saudi Pharm J*. 2013;21(2):143–52.

17. Tapas AR, Sakarkar DM, Kakde RB. Flavonoids as Nutraceuticals: A Review. *Trop J Pharm Res.* 2008;7(3):1089–99.
18. Kementerian Kesehatan RI. *Farmakope Herbal Indonesia (FHI)*. 2nd ed. Jakarta: Kementerian Kesehatan RI; 2008.
19. Hanani E. *Analisis Fitokimia*. Jakarta: Buku Kedokteran EGC; 2015. 34–45 p.
20. Irianti T, Murti YB, Kanistri DN, Pratiwi DR, Kuswandi, Kusumaningtyas RA. DPPH Radical Scavenging Activity of Aqueous Fraction from Ethanolic Extract of Talok Fruit (*Muntingia calabura* L.). *Tradit Med J.* 2016;21(1):38–47.
21. Chang CC-C, MH Yang, Wen HM, Chern JC, Yang M-H, Wen H-M, et al. Estimation of total flavonoid content in propolis by two complementary colometric methods. *J Food Drug Anal.* 2002;10(3):178–82.
22. Hikmawanti NPE, Fatmawati S, Asri AW. The Effect of Ethanol Concentrations as The Extraction Solvent on Antioxidant Activity of Katuk (*Sauropus androgynus* (L.) Merr.) Leaves Extracts. *IOP Conf Ser Earth Environ Sci.* 2021;755(1):012060.
23. Batool R, Khan MR, Sajid M, Ali S, Zahra Z. Estimation of phytochemical constituents and in vitro antioxidant potencies of *Brachychiton populneus* (Schott & Endl.) R. Br. *BMC Chem.* 2019;13(32):1–15.
24. Tiwari P, Kumar B, Kaur M, Kaur G, Kaur H. Phytochemical screening and Extraction: A Review. *Int Pharm Sci.* 2011;1(1):98–106.
25. Houghton PJ, Raman A. *Laboratory Handbook for the Fractionation of Natural Extracts*. 1st ed. Laboratory Handbook for the Fractionation of Natural Extracts. Springer-Science+Business Media, B.V.; 1998. 14–16, 24–31, 39–52 p.
26. Khoddami A, Wilkes MA, Roberts TH, Khoddami A, Wilkes MA, Roberts TH. Techniques for analysis of plant phenolic compounds. *Molecules.* 2013;18(2):2328–75.
27. Pękal A, Pyrzynska K. Evaluation of Aluminium Complexation Reaction for Flavonoid Content Assay. *Food Anal Methods.* 2014;7(9):1776–82.
28. Tirzitis G, Bartosz G. Determination of antiradical and antioxidant activity: basic principles and new insights. *Acta Biochim Pol.* 2010;57(1):139–42.
29. Dai J, Mumper RJ. Plant phenolics: Extraction, analysis and their antioxidant and anticancer properties. *Molecules.* 2010;15:7313–52.
30. Sharma B, Agrawal SC, Gupta KC. Colour reactions of chalcones and their mechanism (A review). *Orient J Chem.* 2008;24(1):289–94.
31. Altemimi A, Lakhssassi N, Baharlouei A, Watson DG, Lightfoot DA. *Phytochemicals: Extraction, Isolation, and Identification of Bioactive Compounds from Plant Extracts*. Plants. 2017;6(42).
32. Pavia DL, Lampman GM, Kriz GS, Vyvyan JR. *Introduction to Spectroscopy*. Fourth Edi. Canada: Brooks/Cole; 2001. 15–104 p.
33. Aksöz BE, Ertan R. Spectral properties of chalcones II. *Fabad J Pharm Sci.* 2012;37(4):205–16.
34. Salehi B, Quispe C, Chamkhi I, El Omari N, Balahbib A, Sharifi-Rad J, et al. *Pharmacological Properties of Chalcones: A Review of Preclinical Including Molecular Mechanisms and Clinical Evidence*. *Front Pharmacol.* 2021;11(January).



Analysis of Flavonoids on Fraction from Hydrolysate of *Cordia Sebestena* L. Leaves Extract

Ni Putu Ermi Hikmawanti*, Endang Hanani, dan Rini Mardiyanti

Program Studi Farmasi, Fakultas Farmasi dan Sains, Universitas Muhammadiyah Prof. DR.

HAMKA, Jl. Delima II/IV Klender, Jakarta Timur, DKI Jakarta 13460, Indonesia

Abstract

Cordia sebestena L. (Boraginaceae) or Cordia is an ornamental plant that contains flavonoids. This compound is one of the natural compounds that play a role in free radical scavenging activity. This study aimed to analyze the flavonoids in the hydrolyzed fraction of the 70% ethanol extract of Cordia leaves. The study was divided into 7 stages, namely (1) maceration using 70% ethanol, (2) acid hydrolysis of the ethanol extract, (3) fractionation of hydrolysate with ethyl acetate, (4) determination of total flavonoid content, (5) antiradical activity assay against 2,2'-diphenyl-1-picrylhydrazyl (DPPH), (6) thin layer chromatography (TLC) for separation of flavonoids, and (7) identification of flavonoids using UV-Visible Spectrophotometry and Infrared Spectroscopy. The results showed the total flavonoid content of the ethyl acetate fraction was 8.20 mgQE/g with an IC₅₀ value of 296.91 g/mL against DPPH radicals. The TLC chromatogram showed the presence of one spot of the compound in the ethyl acetate fraction with an R_f value of 85.5. The results of the UV-Vis spectrum on these spots obtained absorption at 340 nm (band I) and 240 nm (band II). While the infrared spectrum shows a signal at 3363 cm⁻¹ (O-H stretching), 1727 cm⁻¹ (C=O), and 1060 cm⁻¹ strong (C-O). Thus, it can be concluded that the ethyl acetate hydrolysate fraction of Cordia leaf ethanol extract contains flavonoid compounds similar to the chalcone group. However, further analysis is needed using ¹H NMR or FTIR data from a known chalcone compound as a standard to confirm that the flavonoid compound is a chalcone.

Keywords: acid hydrolysis, Boraginaceae, *Cordia sebestena* L., ethyl acetate fraction, flavonoids

Analisis Flavonoid pada Fraksi Hasil Hidrolisat Ekstrak Daun *Cordia sebestena* L.

Abstrak

Cordia sebestena L. (Boraginaceae) atau Cordia merupakan tanaman hias dengan kandungan flavonoid. Senyawa ini merupakan salah satu metabolit tanaman yang berperan dalam aktivitas peredaman radikal bebas. Penelitian ini bertujuan menganalisis senyawa flavonoid pada fraksi hasil hidrolisat ekstrak etanol 70% daun Cordia. Penelitian terbagi menjadi 7 tahapan, yaitu (1) maserasi daun menggunakan etanol 70%, (2) hidrolisis asam pada ekstrak dengan HCl 2N pada 95 °C selama 2 jam, (3) fraksinasi hidrolisat dengan etil asetat, (4) penentuan kadar flavonoid total dengan kolorimetri, (5) pengujian aktivitas antiradikal terhadap 2,2'-difenil-1-pikrilhidrazil (DPPH), (6) pemisahan flavonoid menggunakan kromatografi lapis tipis (KLT), dan (7) identifikasi flavonoid menggunakan spektrofotometri UV-Vis dan infra merah. Hasil menunjukkan kadar flavonoid total fraksi etil asetat

Commented [NPEH1]: Komentar reviewer: Perlu dijelaskan kaitan dengan judul

Commented [NPEH2R1]: Sudah ditambahkan pada kalimat yg di highlight kuning

sebesar 8,20 mgQE/g dengan nilai IC₅₀ terhadap radikal DPPH sebesar 296,91 µg/mL. Kromatogram KLT menunjukkan keberadaan satu bercak senyawa pada fraksi etil asetat dengan nilai R_f adalah 85,5. Hasil spektrum UV-Vis pada bercak tersebut diperoleh serapan pada 340 nm (pita I) dan 240 nm (pita II). Sedangkan spektrum infra merah **menunjukkan** adanya sinyal pada 3363 cm⁻¹ (O–H ulur), 1727 cm⁻¹ (C=O), dan 1060 cm⁻¹ kuat (C–O). Dengan demikian, dapat disimpulkan bahwa fraksi etil asetat hidrolisat ekstrak etanol daun Cordia mengandung senyawa flavonoid yang mirip dengan kelompok kalkon. Namun demikian, diperlukan analisis lebih lanjut untuk memastikan bahwa senyawa flavonoid ini merupakan khalkon. **Namun, diperlukan analisis lebih lanjut menggunakan data ¹H NMR atau FTIR dari senyawa khalkon yang telah diketahui untuk memastikan bahwa flavonoid yang diperoleh adalah khalkon.**

Kata kunci: *Boraginaceae*, *Cordia sebestena* L., flavonoid, fraksi etil asetat, hidrolisis asam

1. Pendahuluan

Banyak tanaman hias **berbunga merupakan sumber alami senyawa bioaktif yang bermanfaat untuk kesehatan manusia, terutama sebagai antioksidan.** Meskipun demikian, ketertarikan pemanfaatan tanaman ini sebagai sumber makanan dan obat masih rendah. Padahal beberapa studi melaporkan bahwa tanaman hias memiliki potensi sebagai sumber flavonoid (terutama antosianin) sebagai antioksidan dan antiinflamasi (1). *Cordia sebestena* L. (Boraginaceae) atau Cordia merupakan suatu tanaman hias. Daun Cordia mengandung senyawa **fenolik, flavonoid, saponin, alkaloid, steroid/triterpenoid, dan tannin** (2). Daun Cordia juga mengandung senyawa volatil sebesar 0,05% (3). Daun cordia memiliki beragam aktivitas farmakologi, antara lain antibakteri (4), analgetik, antiinflamasi (5), antioksidan (6), dan lain sebagainya. Studi mengenai toksisitas subakut dari ekstrak etil asetat daun Cordia menunjukkan bahwa ekstrak tersebut tidak toksik terhadap hati (4). Sebelumnya, telah diisolasi kandungan flavonoid hesperetin dari bunga Cordia dengan khasiat antibakteri dan antikanker terhadap kanker serviks *in vitro* (7). Namun, studi mengenai flavonoid dari daun Cordia belum banyak dieksplorasi.

Flavonoid merupakan kelompok fenolik dengan struktur inti C-15 (C₆-C₃-C₆). Flavonoid merupakan kelas metabolit sekunder dari bahan alam sebagai nutrasetikal yang paling banyak digunakan pada pengobatan, makanan, suplemen dan lainnya. Meskipun studi mengenai isolasi maupun sintesisnya telah banyak, para peneliti masih tertarik meneliti flavonoid dan turunannya. Umumnya, flavonoid dapat diekstraksi dari pelarut air, etanol, metanol, *n*-butanol, aseton, etil asetat, kloroform dan lainnya. Pelarut polar digunakan untuk memperoleh flavonoid bentuk glikosida, sedangkan pelarut non-polar untuk ekstraksi bentuk aglikonnya (8). Untuk memperoleh bentuk aglikon flavonoid umumnya dilakukan proses hidrolisis terhadap glikosida flavonoid dengan cara asam, basa, maupun enzimatis. Hidrolisis asam merupakan teknik sederhana, cepat dan ekonomis untuk mengubah suatu glikosida menjadi aglikon (9). Teknik ini sering kali dilakukan menggunakan HCl 2 N-metanol atau HCl 2M (10). Hidrolisis glikosida flavonoid dari beberapa sampel sayuran dilaporkan baik dilakukan dengan metode hidrolisis asam menggunakan HCl 1,2 M dalam 50% metanol-air dengan penambahan asam askorbat sebagai pencegah oksidasi pada 80 °C selama 120 menit (11).

Flavonoid merupakan suatu antioksidan yang secara alami ditemukan dalam bahan alam terutama tumbuhan (12). Selain itu, flavonoid juga berperan sebagai suatu nutrasetikal dengan khasiat antimikroba, antibakteri, antifungi, antivirus, antiulcer, hepatoprotektif, antiinflamasi, efek kardioprotektif, antineoplasma, dan lainnya (13). Banyaknya penemuan dan pengembangan obat baru dari flavonoid yang berasal dari tanaman menjadi alasan dilakukannya penelitian ini. Penelitian ini bertujuan melakukan analisis senyawa flavonoid pada fraksi etil asetat hasil hidrolisat ekstrak etanol 70% daun Cordia sekaligus menentukan aktivitas antiradikalnya.

Commented [NPEH3]: Komentar reviewr: (banyak sumber senyawa flavonoid yang lazim dikenal sebagai tanaman obat, apakah alasan mendasar dari menggunakan tanaman hias sebagai sumber senyawa flavonoid? Hal tersebut perlu diungkapkan lebih jelas pada bagian pendahuluan)

Commented [NPEH4R3]: Sudah ditambahkan

2. Metode

2.1. Alat

Alat-alat yang digunakan pada penelitian ini meliputi toples maserasi, ayakan no. mesh 40, timbangan analitik (Ohaus), mikropipet (Eppendorf), *vacuum rotary evaporator* (Eyela N-1100, Cina), oven (Mettler UN-55), chamber (Camag), kotak UV (Camag), ultrasonik (Branson 5510), spektrofotometer UV-Vis (UV-1601 Series, Shimadzu, Japan), dan spektrometer FTIR (Agilent Cary 630, USA).

2.2. Bahan

Etanol 70%, etil asetat, metanol, kloroform pada tingkat analitik (Merck, Jerman) digunakan sebagai pelarut. Bahan lain yang digunakan antara lain plat KLT GF₂₅₄ (Merck, Jerman), DPPH, AlCl₃ 10%, kalium asetat, kuersetin (Sigma-Aldrich Co., USA), HCl 2N, Na₂SO₄, asam formiat, dan aquades.

2.3. Prosedur

Ekstraksi

Daun Cordia diperoleh dari pekarangan rumah warga di sekitar Jakarta Timur. Sebelumnya, tanaman telah dideterminasi di Lembaga Ilmu Pengetahuan Indonesia (*Indonesian Institute of Sciences*), Pusat Penelitian Biologi (*Research Center for Biology*), *Cibinong Sciences Center*, Cibinong. Sampel daun segar (2,5 kg) dibuat simplisia menggunakan oven pada 50 °C. Blender elektrik digunakan untuk menghaluskan simplisia menjadi serbuk untuk selanjutnya diayak dengan ayakan no. mesh 40. Serbuk kemudian disimpan dalam wadah kering tertutup rapat (14).

Serbuk simplisia (850 g) diekstraksi menggunakan metode maserasi dengan pelarut etanol 70% (dengan rasio bahan–pelarut 1:6) selama 18 jam sambil sesekali diaduk. Ampas yang telah dipisahkan dari filtrat kemudian diremaserasi sampai pemeriksaan terhadap kandungan flavonoid didalamnya memberikan hasil negatif. Filtrat diuapkan pelarutnya menggunakan *vacuum rotary evaporator* pada 50 °C. Evaporasi dilanjutkan dengan penangas air pada 50 °C hingga diperoleh ekstrak kental (14). Ekstrak dihitung persentase rendemen dan dilakukan penapisan fitokimia sederhana mengikuti prosedur pada Hanani (2015) (15). Skema prosedur ekstraksi dapat dilihat pada Gambar 1.

Hidrolisis Ekstrak

Ekstrak etanol sebanyak 15,0715 g dicampurkan dengan 240 mL HCl 2N-metanol (dengan rasio bahan–pelarut 1:16) di dalam labu alas bulat. Campuran dipanaskan pada 95 °C selama 2 jam. Setelah dingin, campuran disaring dan dipekatkan di atas penangas air pada 60 °C hingga diperoleh hidrolisat kental (10,16).

Fraksinasi dari hasil hidrolisat

Hidrolisat sebanyak 6,45 g dilarutkan dalam 20 mL metanol dan 20 ml aquadest, dan kemudian dimasukkan ke dalam corong pisah. Selanjutnya, campuran difraksinasi menggunakan etil asetat sebanyak 40 mL. Setelah dikocok perlahan dan didiamkan sesaat, fase air (lapisan bawah) dan fase etil asetat (lapisan atas) masing-masing dipisahkan dan dikumpulkan. Fraksi etil asetat disaring menggunakan Na₂SO₄. Fraksi tersebut dipekatkan di atas penangas air dengan suhu 40 °C (16).

Penetapan kadar flavonoid total fraksi

Penetapan kadar flavonoid total dengan metode kolorimetri (17). Kuersetin digunakan untuk membuat kurva kalibrasi. Kuersetin (1000 µg/mL) dalam metanol kemudian diencerkan hingga diperoleh larutan seri konsentrasi 26, 44, 62, 80 dan 98 µg/mL. Fraksi etil asetat disiapkan dalam

metanol (1000 µg/mL). Larutan uji (0,5 mL) secara terpisah dicampur dengan metanol (1,5 mL), AlCl₃ 10% (0,1 mL), kalium asetat 1 M (0,1 mL) dan aquades (2,8 mL), kemudian dihomogenkan. Setelah 30 menit diinkubasi pada suhu kamar, campuran tersebut diukur absorbansinya pada 440 nm menggunakan Spektrofotometer UV-Vis. Selanjutnya grafik hubungan absorbansi terhadap konsentrasi standar kuersetin digunakan untuk memperoleh persamaan garis linear ($y=bx\pm a$). Persamaan ini selanjutnya digunakan untuk menetapkan konsentrasi flavonoid dalam larutan uji. Selanjutnya, prosedur mereaksikan yang sama dilakukan pada larutan uji fraksi etil asetat 6000 µg/mL (0,5 mL) dalam metanol untuk menentukan kadar flavonoid total pada fraksi tersebut. Pengujian dilakukan triplo.

Penentuan aktivitas antiradikal bebas fraksi

Penentuan aktivitas antiradikal dilakukan terhadap DPPH dengan kuersetin sebagai pembanding mengikuti prosedur Batool et al., (2019) (18) dengan sedikit modifikasi. Larutan DPPH disiapkan dalam metanol dengan konsentrasi 0,2 mM. Larutan fraksi etil asetat disiapkan dengan seri konsentrasi yaitu 50, 150, 250, 350, dan 450 µg/mL. Sedangkan, seri konsentrasi kuersetin sebagai pembanding adalah 2, 4, 6, 8, dan 10 µg/mL. Selanjutnya larutan uji sebanyak 1 mL (baik fraksi etil asetat maupun kuersetin) masing-masing secara terpisah dicampurkan dengan 4 mL DPPH. Campuran diinkubasi pada suhu ruang selama 30 menit dalam kondisi gelap. Absorbansi diukur pada 515 nm menggunakan Spektrofotometer UV-Vis. Pengujian dilakukan triplo. Kapasitas antiradikal dihitung berdasarkan persentase inhibisi terhadap radikal DPPH yang dihitung dengan cara: (absorbansi DPPH – absorbansi sampel) dibagi dengan absorbansi DPPH dikali 100%. Kemudian kurva persentase inhibisi DPPH terhadap konsentrasi masing-masing sampel digunakan untuk memperoleh persamaan garis linear ($y=bx\pm a$). Persamaan tersebut selanjutnya digunakan untuk menghitung konsentrasi sampel yang mampu menghambat 50% radikal DPPH (*inhibition concentration* 50, IC₅₀) yang dinyatakan dalam µg/mL.

Pemisahan dengan KLT preparatif

Sebelumnya, konfirmasi keberadaan flavonoid dalam fraksi etil asetat dilakukan pada plat KLT GF254. Fase gerak yang digunakan adalah kloroform:etil asetat:metanol (3:2:2,5) dengan penambahan sedikit asam formiat. Pereaksi semprot sitroborat digunakan untuk mendeteksi golongan senyawa flavonoid. Pemisahan flavonoid pada fraksi etil asetat selanjutnya dilakukan pada plat KLT preparatif menggunakan fase gerak yang sama. Visualisasi bercak dipantau pada sinar UV 254 dan 366 nm tanpa disemprot sitroborat. Bercak dihitung nilai R_f -nya dengan cara membagi jarak rambat bercak (cm) dengan jarak rambat eluen (cm) dikali 100.

Analisis senyawa flavonoid

Bercak yang diperoleh dari hasil KLT preparatif dikerok dan dilarutkan dalam metanol dengan bantuan ultrasonik selama 15 menit. Filtrat disaring dengan kapas dan kertas saring. Filtrat kemudian diidentifikasi menggunakan spektrofotometer UV-Vis maupun FTIR.

3. Hasil

Hasil identifikasi kualitatif menunjukkan bahwa ekstrak etanol 70% daun Cordia terdeteksi senyawa alkaloid, fenolik, flavonoid, tanin, dan saponin. Hasil ekstraksi dan fraksinasi hidrolisat disajikan pada Tabel 1. Kadar flavonoid total fraksi etil asetat diperoleh sebesar 8,20 mgQE/g. Selanjutnya, pengujian aktivitas antiradikal dilakukan terhadap DPPH menggunakan spektrofotometer UV-Vis. Nilai IC₅₀ kuersetin adalah 7,028 µg/mL, sedangkan IC₅₀ fraksi etil asetat adalah 296,91

µg/mL. Hal ini menunjukkan bahwa fraksi etil asetat memiliki aktivitas antiradikal namun belum sebanding dengan kuersetin sebagai standar/pembanding.

Gambar 2 menunjukkan pola KLT fraksi etil asetat untuk konfirmasi keberadaan golongan senyawa flavonoid sebelum dilakukan KLT preparatif. Terdapat 4 bercak yang terdeteksi pada sinar 254 nm (sebelum disemprot sitroborat), sedangkan pada 366 nm (setelah disemprot sitroborat) hanya ditemukan 1 bercak dominan berwarna kuning yang disimpulkan bahwa bercak tersebut merupakan suatu flavonoid (15). Gambar 3 menunjukkan pola kromatogram dari KLT preparatif. Bercak yang tampak kemudian dianalisis lebih lanjut menggunakan spektrofotometer UV-Vis dan FTIR.

Hasil spektrum UV-Vis pada bercak 1 (Gambar 4) diperoleh serapan pada 340 nm (pita I) dan 240 nm (pita II). Sedangkan spektrum infra merah (Gambar 5) menunjukkan adanya sinyal pada 3363 cm⁻¹ melebar (O–H ulur), 1727 cm⁻¹ (C=O), 1459 cm⁻¹ tajam dengan intensitas lemah dan 1060 cm⁻¹ kuat (C–O).

4. Pembahasan

Hasil identifikasi kualitatif ekstrak etanol daun Cordia pada penelitian ini sesuai dengan penelitian Hanani *et al.*, (2019) (2). Etanol memiliki kemampuan menarik senyawa polifenol, flavonoid, tanin, terpenoid, steroid, dan alkaloid (19). Polaritas etanol berkaitan dengan keberadaan gugus OH pada strukturnya (20). Kandungan flavonoid terdeteksi lebih tinggi dalam etanol yang bercampur dengan air pada konsentrasi 70% dibanding etanol absolut (19). Umumnya, flavonoid pada tumbuhan berada pada bentuk glikosidanya dibandingkan bentuk aglikon. Dengan demikian, prosedur ekstraksi flavonoid dapat dilakukan dengan menggunakan teknik hidrolisis (15).

Hidrolisis dilakukan untuk melepaskan gula pada glikosida dengan cara asam, basa maupun enzimatis. Hidrolisis asam pada glikosida flavonoid dapat dilakukan dengan memanaskan campuran bahan dengan 2 N HCl-metanol (10). Beberapa peneliti ada yang menambahkan asam askorbat di dalam prosedur tersebut untuk mencegah terjadinya oksidasi. Proses hidrolisis dapat dilakukan selama 2 jam pada suhu 80 °C atau lebih (21). Bentuk aglikon selanjutnya dapat diekstraksi dengan pelarut semipolar yaitu etil asetat. Berdasarkan hasil rendemen dari fraksi etil asetat dari hidrolisat pada Tabel 1, menunjukkan bahwa fraksi ini mengandung sebagian besar senyawa aglikon dan sedikit glikosida. Kemampuan ini didasarkan pada polaritas etil asetat yang cukup besar karena adanya elektron π dan elektron pasangan bebas pada O (20).

Pengujian spektrofotometri yang didasarkan pada pembentukan kompleks aluminium adalah prosedur yang sering digunakan dalam penentuan kadar flavonoid. Sampel ini direaksikan dengan AlCl₃ dan memungkinkan pengukuran flavonoid totalnya setelah 2-60 menit dalam kisaran 404-430 nm (22). Prinsipnya, kompleks stabil dari AlCl₃ dengan gugus keto C-4 dan C-3 atau C-5 hidroksil dari struktur flavonoid (flavon dan flavonol) dapat terbentuk setelah penambahan asam. Selain itu, AlCl₃ juga membentuk kompleks stabil dengan gugus ortohidroksil pada cincin A atau B dari flavonoid (17). Reaksi kompleks flavonoid dengan AlCl₃ dapat dilihat pada Gambar 6.

Antiradikal merupakan kemampuan senyawa kimia untuk bereaksi dengan radikal bebas (23). Senyawa bahan alam dengan aktivitas antiradikal umumnya dari kelompok fenolik. Kelompok fenolik (termasuk flavonoid) memiliki struktur kimia yang mendukung proses peredaman radikal bebas. Pada flavonoid, ada beberapa faktor yang menentukan kapasitas antiradikalnya antara lain: (1) adanya gugus orto-dihidroksi pada cincin B mampu menyumbang elektron dan berpartisipasi dalam delokalisasi elektron, (2) adanya ikatan rangkap 2,3 dengan gugus 4-okso pada cincin C bertanggung jawab pada delokalisasi cincin B, (3) adanya gugus 3- dan 5-hidroksil dengan gugus 4-okso pada cincin A dan C ikut berperan dalam menangkal radikal, (4) adanya gugus 3-hidroksil (24). Hasil dari studi ini, nilai IC₅₀ fraksi etil asetat masih rendah dibandingkan dengan kuersetin sebagai pembanding terhadap

Commented [NPEH5]: Masukan reviewer: lengkapi dengan gambar KLT yang menunjukkan bahwa isolate telah murni yang ditunjukkan dengan shanya terdapat satu spot pada beberapa eluen dengan nilai RF yang berbeda.

Commented [NPEH6R5]: Bagian ini tidak dapat kami penuhi karena datanya sudah tidak ada.

peredaman radikal DPPH. Senyawa antioksidan baik fenolik maupun flavonoid memberikan respon aktivitas antioksidan dan antiradikal berbeda (terkait mekanismenya) tergantung dari jenis ujinya. Hal ini berkaitan dengan fakta bahwa tiap uji memiliki perbedaan spesifisitas pelarut, reagen, dan kondisi pH. Selain itu, sifat hidrofobik/hidrofilik substansi, ukuran molekul, dan jumlah (kuantitas) serta jenis dari gugus fungsi fenolik dan flavonoid yang diujikan juga ikut berperan pada hasil ujinya (25). Dengan demikian, diperlukan pengujian dengan metode selain DPPH pada fraksi etil asetat untuk membuktikan hal ini.

Pemisahan dengan KLT masih menjadi metode yang paling banyak digunakan untuk pemisahan disebabkan karena metode ini sederhana, praktis, dan ekonomis serta prosedur kerja yang mudah. Hasil kromatogram KLT menunjukkan keberadaan senyawa flavonoid setelah disemprot dengan sitroborat. Sitroborat merupakan reagen yang terdiri atas asam borat dan asam sitrat dalam etanol. Reagen ini bereaksi dengan flavonoid dengan gugus ortho-hidroksi (26) dengan hasil positif berwarna kuning terang pada UV 366 nm (15).

Prosedur pendekatan klarifikasi struktur senyawa dapat menggunakan spektroskopi. Spektroskopi UV-Visible dapat digunakan untuk menganalisis kualitatif kelas senyawa tertentu. Spektroskopi inframerah, misalnya *Fourier Transform Infrared Spectroscopy* (FTIR) merupakan metode dengan resolusi tinggi yang digunakan untuk mengidentifikasi kandungan kimia dengan cepat secara non-destruktif (27). Spektroskopi serapan ultraviolet (UV) dari flavonoid memiliki dua serapan maksimal sekitar 300–350 dan 240–285 nm masing-masing sesuai dengan pita I dan II dari cincin A dan B. Sebagian besar flavon, isoflavon dan kalkon terhidroksilasi memberikan serapan maksimum pada 3300–3600 cm^{-1} karena adanya gugus OH (8). Gugus karbonil (C=O) flavonoid diamati sekitar 1727 cm^{-1} . Serapan tajam dan intensitas tinggi teramati pada 1600 dan 1500 cm^{-1} karena adanya ikatan rangkap pada cincin aromatik (8,28). Dengan demikian, dapat disimpulkan bahwa fraksi etil asetat hidrolisat ekstrak etanol daun *Cordia* mengandung senyawa flavonoid mirip dengan kelompok kalkon. Spektrum UV kalkon mengandung dua pita serapan yang ditunjukkan pada Pita I (340 nm) dengan serapan sebesar 0,785 dan pita II (240 nm) dengan serapan sebesar 0,456. Pita I sering tampak pada 340–390 nm, meskipun terkadang sedikit perubahan atau puncak sering terjadi pada 300–320 nm. Pita II tampak pada 220–270 nm (29). Secara farmakologi, kalkon memiliki khasiat yang luas seperti antidiabetes, antikanker, antiinflamasi, antimikroba, antioksidan, antiparasit, psikoaktif dan neuroprotektif (30).

5. Kesimpulan

Fraksi etil asetat hasil hidrolisat ekstrak etanol 70% daun *Cordia* mengandung senyawa flavonoid yang memiliki aktivitas antiradikal DPPH. Flavonoid yang ditemukan memiliki kemiripan dengan kelompok kalkon berdasarkan analisis spektrum UV-sinar tampak dan inframerah. Studi lebih lanjut dalam pemisahan dan pemurnian senyawa ini masih perlu dilakukan kedepannya dengan teknik kromatografi lain dan untuk menentukan struktur molekul senyawa murni perlu menggunakan metode spektroskopi massa dan NMR yang mendukung pada penentuan struktur dari flavonoid.

Daftar Pustaka

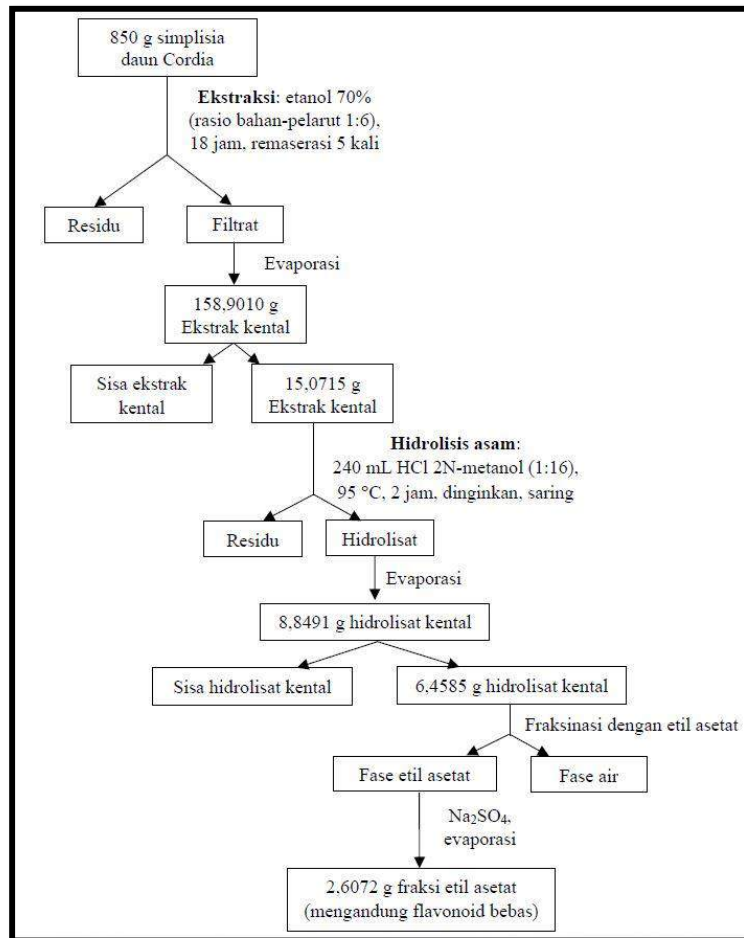
1. Łysiak GP. Ornamental Flowers Grown in Human Surroundings as a Source of Anthocyanins with High Anti-Inflammatory Properties. *Foods*. 2022;11(948).
2. Hanani E, Soewandi SHW, Hayati, Revita N. Pharmacognostical and preliminary phytochemical evaluation of *Cordia sebestena* L. *Pharmacogn J*. 2019;11(5):1100–5.
3. Adeosun CB, Bamigbade O I., Osho A, Atolani O. Volatile Composition of the Leaf, Flower

and Fruit of *Cordia sebestena* (L.). *J Essent Oil-Bearing Plants*. 2015;18(4):976–81.

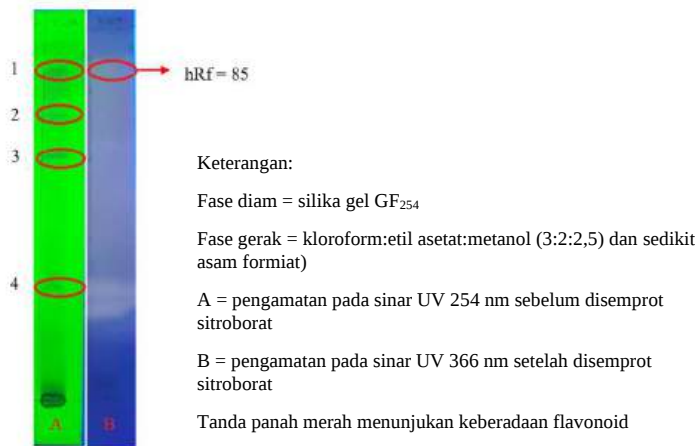
4. Osho A, Otuechere CA, Adeosun CB, Oluwagbemi T, Atolani O. Phytochemical, sub-acute toxicity, and antibacterial evaluation of *Cordia sebestena* leaf extracts. *J Basic Clin Physiol Pharmacol*. 2015;27(2):163–70.
5. Sunaryo H, Siska S, Hanani E, Anindita RS, Yanti N, Lisa. Evaluation of analgesic and anti-inflammatory activities of ethanolic extract of *Cordia sebestena* L. *Eur Pharm J*. 2020;66(2):26–31.
6. Hikmawanti NPE, Hanani E, Sapitri Y, Ningrum W. Total Phenolic Content and Antioxidant Activity of Different Extracts of *Cordia sebestena* L. Leaves. *Pharmacogn J*. 2020;12(6):1311–6.
7. Prakash S, Elavarasan N, Subashini K, Kanaga S, Dhandapani R, Sivanandam M, et al. Isolation of hesperetin - A flavonoid from *Cordia sebestena* flower extract through antioxidant assay guided method and its antibacterial, anticancer effect on cervical cancer via in vitro and in silico molecular docking studies. *J Mol Struct [Internet]*. 2020;1207:127751. Available from: <https://doi.org/10.1016/j.molstruc.2020.127751>
8. Awouafack MD, Tane P, Morita H. Isolation and Structure Characterization of Flavonoids. In: *Flavonoids - From Biosynthesis to Human Health*. Intech; 2017. p. 45–59.
9. Bian Y, Zhang Y, Zhou Y, Li GH, Feng XS. Progress in the Pretreatment and Analysis of Flavonoids: An Update since 2013. *Sep Purif Rev [Internet]*. 2022;51(1):11–37. Available from: <https://doi.org/10.1080/15422119.2020.1801469>
10. Stalikas CD. Extraction, separation, and detection methods for phenolic acids and flavonoids. *J Sep Sci*. 2007;30(18):3268–95.
11. Nuutila AM, Kammiovirta K, Oksman-Caldentey KM. Comparison of methods for the hydrolysis of flavonoids and phenolic acids from onion and spinach for HPLC analysis. *Food Chem*. 2002;76(4):519–25.
12. Heim KE, Tagliaferro AR, Bobilya DJ. Flavonoid antioxidants: Chemistry, metabolism and structure-activity relationships. *J Nutr Biochem*. 2002;13(10):572–84.
13. Tapas AR, Sakarkar DM, Kakde RB. Flavonoids as Nutraceuticals: A Review. *Trop J Pharm Res*. 2008;7(3):1089–99.
14. Kementerian Kesehatan RI. *Farmakope Herbal Indonesia (FHI)*. 2nd ed. Jakarta: Kementerian Kesehatan RI; 2008.
15. Hanani E. *Analisis Fitokimia*. Jakarta: Buku Kedokteran EGC; 2015. 34–45 p.
16. Irianti T, Murti YB, Kanistri DN, Pratiwi DR, Kuswandi, Kusumaningtyas RA. DPPH Radical Scavenging Activity of Aqueous Fraction from Ethanolic Extract of Talok Fruit (*Muntingia calabura* L.). *Tradit Med J*. 2016;21(1):38–47.
17. Chang CC-C, MH Yang, Wen HM, Chern JC, Yang M-H, Wen H-M, et al. Estimation of total flavonoid content in propolis by two complementary colometric methods. *J Food Drug Anal*. 2002;10(3):178–82.
18. Batool R, Khan MR, Sajid M, Ali S, Zahra Z. Estimation of phytochemical constituents and in vitro antioxidant potencies of *Brachychiton populneus* (Schott & Endl.) R. Br. *BMC Chem*. 2019;13(32):1–15.

19. Tiwari P, Kumar B, Kaur M, Kaur G, Kaur H. Phytochemical screening and Extraction: A Review. *Int Pharm Sci.* 2011;1(1):98–106.
20. Houghton PJ, Raman A. *Laboratory Handbook for the Fractionation of Natural Extracts.* 1st ed. Laboratory Handbook for the Fractionation of Natural Extracts. Springer-Science+Business Media, B.V.; 1998. 14–16, 24–31, 39–52 p.
21. Khoddami A, Wilkes MA, Roberts TH, Khoddami A, Wilkes MA, Roberts TH. Techniques for analysis of plant phenolic compounds. *Molecules.* 2013;18(2):2328–75.
22. Pękal A, Pyrzynska K. Evaluation of Aluminium Complexation Reaction for Flavonoid Content Assay. *Food Anal Methods.* 2014;7(9):1776–82.
23. Tırzitis G, Bartosz G. Determination of antiradical and antioxidant activity: basic principles and new insights. *Acta Biochim Pol.* 2010;57(1):139–42.
24. Dai J, Mumper RJ. Plant phenolics: Extraction, analysis and their antioxidant and anticancer properties. *Molecules.* 2010;15:7313–52.
25. Huyut Z, Beydemir F., Gülçin E. Antioxidant and Antiradical Properties of Selected Flavonoids and Phenolic Compounds. *Biochem Res Int.* 2017;2017:1–10.
26. Sharma B, Agrawal SC, Gupta KC. Colour reactions of chalcones and their mechanism (A review). *Orient J Chem.* 2008;24(1):289–94.
27. Altemimi A, Lakhssassi N, Baharlouei A, Watson DG, Lightfoot DA. *Phytochemicals: Extraction, Isolation, and Identification of Bioactive Compounds from Plant Extracts.* Plants. 2017;6(42).
28. Pavia DL, Lampman GM, Kriz GS, Vyvyan JR. *Introduction to Spectroscopy.* Fourth Edi. Canada: Brooks/Cole; 2001. 15–104 p.
29. Aksöz BE, Ertan R. Spectral properties of chalcones II. *Fabad J Pharm Sci.* 2012;37(4):205–16.
30. Salehi B, Quispe C, Chamkhi I, El Omari N, Balahbib A, Sharifi-Rad J, et al. Pharmacological Properties of Chalcones: A Review of Preclinical Including Molecular Mechanisms and Clinical Evidence. *Front Pharmacol.* 2021;11(January).
31. Hikmawanti NPE, Hayati, Andriyani Y. Kadar Flavonoid Total pada Ekstrak Hidro-etanolik Daun *Sauropus androgynus* (L.) Merr dari Tiga Daerah dengan Ketinggian yang Berbeda. *J Jamu Indones.* 2021;6(2):61–7.

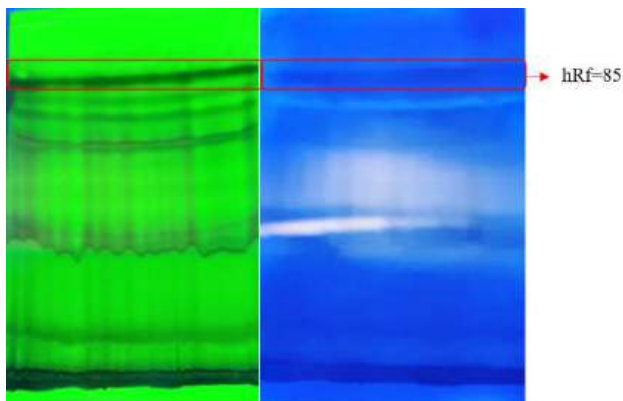
GAMBAR & TABEL



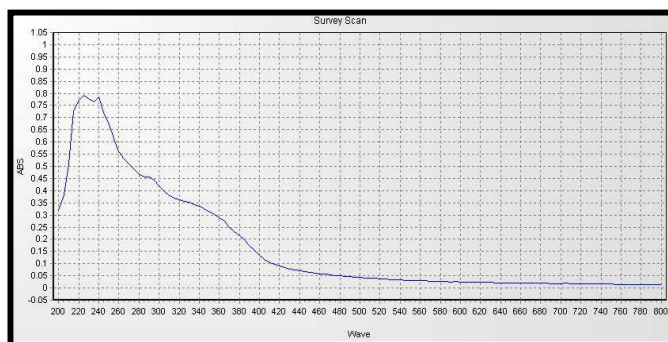
Gambar 1 Skema prosedur pemisahan



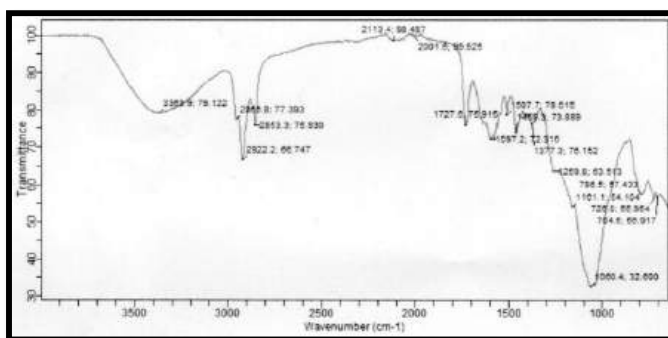
Gambar 2 Pola kromatogram KLT pada fraksi etil asetat



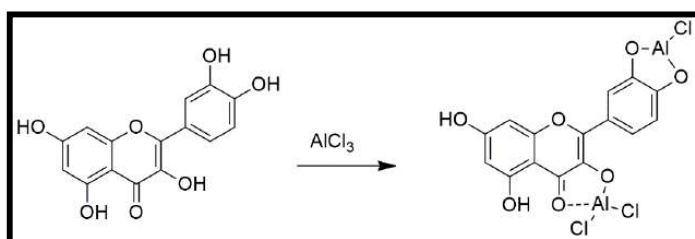
Gambar 3 Pola kromatogram KLT preparatif pada fraksi etil asetat pada sinar UV 254 nm (kiri) dan pada sinar UV 365 nm (kanan)



Gambar 4 Spektrum UV bercak 1



Gambar 5 Spektrum inframerah bercak 1



Gambar 6 Reaksi kompleks flavonoid dengan AlCl_3 (31)

Tabel 1 Hasil ekstraksi dan fraksinasi

Sampel	Bobot (g)	Rendemen (%)
Ekstrak etanol 70%*	158,90	18,69
Hidrolisat**	8,8491	58,71
Fraksi etil asetat***	2,6072	40,37

Keterangan: *dari 850 g serbuk simplisia; **dari 15,0715 g ekstrak; ***dari 6,4585 g hidrolisat.



Analysis of Flavonoids on Fraction from Hydrolysate of *Cordia Sebestena* L. Leaves Extract

Ni Putu Ermi Hikmawanti*, Endang Hanani, dan Rini Mardiyanti

Program Studi Farmasi, Fakultas Farmasi dan Sains, Universitas Muhammadiyah Prof. DR. HAMKA, Jl. Delima II/IV Klender, Jakarta Timur, DKI Jakarta 13460, Indonesia

Abstract

Cordia sebestena L. contains flavonoids, that play a role in free radical scavenging activity. This study aimed to analyze the flavonoids in the hydrolyzed fraction of the 70% ethanol extract of Cordia leaves. The study was divided into 7 stages: (1) maceration using 70% ethanol, (2) acid hydrolysis of the ethanol extract, (3) fractionation of hydrolysate with ethyl acetate, (4) determination of total flavonoid content, (5) antiradical activity assay against 2,2'-diphenyl-1-picrylhydrazyl (DPPH), (6) thin layer chromatography (TLC) analysis, and (7) identification of flavonoid using UV-Visible Spectrophotometry and Infrared Spectroscopy. The total flavonoid content of the ethyl acetate fraction was 8.20 mgQE/g with an IC₅₀ value of 296.91 g/mL against DPPH radicals. There is one spot of flavonoids in the ethyl acetate fraction (hRf = 85.5). The UV-Vis spectrum on these spots obtained absorption at 340 nm (band I) and 240 nm (band II). The infrared spectrum shows a signal at 3363 cm⁻¹ (O–H stretching), 1727 cm⁻¹ (C=O), and 1060 cm⁻¹ strong (C–O). The ethyl acetate hydrolysate fraction of Cordia leaf contains flavonoid similar to the chalcone group. Further analysis is needed using ¹H NMR or FTIR data from a known chalcone as a standard to confirm the flavonoid.

Key words: acid hydrolysis, Boraginaceae, *Cordia*, ethyl acetate fraction, flavonoids

Analisis Flavonoid pada Fraksi Hasil Hidrolisis Ekstrak Daun *Cordia sebestena* L.

Abstrak

Cordia sebestena L. mengandung flavonoid yang berperan dalam aktivitas peredaman radikal bebas. Penelitian ini bertujuan menganalisis senyawa flavonoid pada fraksi hasil hidrolisis ekstrak etanol 70% daun Cordia. Penelitian terbagi menjadi 7 tahapan, yaitu (1) maserasi daun menggunakan etanol 70%, (2) hidrolisis asam pada ekstrak dengan HCl 2N pada 95 °C selama 2 jam, (3) fraksinasi hidrolisat dengan etil asetat, (4) penentuan kadar flavonoid total dengan kolorimetri, (5) pengujian aktivitas antiradikal terhadap 2,2'-difenil-1-pikrilhidrazil (DPPH), (6) pemisahan menggunakan kromatografi lapis tipis (KLT), dan (7) identifikasi flavonoid menggunakan spektrofotometri UV-Vis dan infra merah. Kadar flavonoid total fraksi etil asetat sebesar 8,20 mgQE/g dengan nilai IC₅₀ terhadap radikal DPPH sebesar 296,91 µg/mL. Ada satu bercak flavonoid pada fraksi etil asetat (hRf = 85,5). Hasil spektrum UV-Vis pada bercak tersebut diperoleh serapan pada 340 nm (pita I) dan 240 nm (pita II). Spektrum infra merah menunjukkan adanya sinyal pada 3363 cm⁻¹ (O–H ulur), 1727 cm⁻¹ (C=O), dan 1060 cm⁻¹ kuat (C–O). Fraksi etil asetat hidrolisat ekstrak etanol daun Cordia mengandung senyawa flavonoid yang mirip dengan kelompok kalkon. Namun, diperlukan analisis lebih lanjut untuk memastikan bahwa flavonoid ini merupakan khalkon menggunakan data ¹H NMR atau FTIR dari senyawa khalkon yang telah diketahui.

Kata kunci: Boraginaceae, *Cordia*, flavonoid, fraksi etil asetat, hidrolisis asam

Korespondensi: Ni Putu Ermi Hikmawanti (ermy0907@uhamka.ac.id)

Info artikel : Submit (tanggal), Revisi (tanggal)

Diterima (tanggal), Terbit (tanggal)

Pendahuluan

Banyak tanaman hias berbunga merupakan sumber alami senyawa bioaktif yang bermanfaat untuk kesehatan manusia, terutama sebagai antioksidan. Meskipun demikian, ketertarikan pemanfaatan tanaman ini sebagai sumber makanan dan obat masih rendah. Padahal beberapa studi melaporkan bahwa tanaman hias memiliki potensi sebagai sumber flavonoid (terutama antosianin) sebagai antioksidan dan antiinflamasi (1). *Cordia sebestena* L. (Boraginaceae) atau *Cordia* merupakan suatu tanaman hias. Daun *Cordia* mengandung senyawa fenolik, flavonoid, saponin, alkaloid, steroid/triterpenoid, dan tannin (2). Daun *Cordia* juga mengandung senyawa volatil sebesar 0,05% (3). Daun *Cordia* memiliki beragam aktivitas farmakologi, antara lain antibakteri (4), analgetik, antiinflamasi (5), antioksidan (6), dan lain sebagainya. Studi mengenai toksisitas subakut dari ekstrak etil asetat daun *Cordia* menunjukkan bahwa ekstrak tersebut tidak toksik terhadap hati (4). Sebelumnya, telah diisolasi kandungan flavonoid hesperetin dari bunga *Cordia* dengan khasiat antibakteri dan antikanker terhadap kanker serviks *in vitro* (7). Namun, studi mengenai flavonoid dari daun *Cordia* belum banyak dieksplorasi.

Flavonoid merupakan kelompok fenolik dengan struktur inti C-15 (C₆-C₃-C₆) (8). Flavonoid merupakan kelas metabolit sekunder dari bahan alam sebagai nutrasetikal yang paling banyak digunakan pada pengobatan, makanan, suplemen dan lainnya (9). Meskipun studi mengenai isolasi maupun sintesisnya telah banyak, para peneliti masih tertarik meneliti flavonoid dan turunannya (10). Umumnya, flavonoid dapat diekstraksi dari pelarut air, etanol, metanol, *n*-butanol, aseton, etil asetat, kloroform dan lainnya (11). Pelarut polar digunakan untuk memperoleh flavonoid bentuk glikosida, sedangkan pelarut non-polar untuk ekstraksi bentuk aglikonnya (8). Untuk memperoleh bentuk aglikon flavonoid umumnya dilakukan proses hidrolisis terhadap glikosida flavonoid dengan cara asam, basa, maupun enzimatis. Hidrolisis asam merupakan teknik sederhana, cepat dan ekonomis untuk mengubah suatu glikosida menjadi aglikon (12). Teknik ini sering kali dilakukan menggunakan HCl 2 N-metanol atau HCl 2M (12). Hidrolisis glikosida flavonoid dari

beberapa sampel sayuran dilaporkan baik dilakukan dengan metode hidrolisis asam menggunakan HCl 1,2 M dalam 50% metanol-air dengan penambahan asam askorbat sebagai pencegah oksidasi pada 80 °C selama 120 menit (13).

Flavonoid merupakan suatu antioksidan yang secara alami ditemukan dalam bahan alam terutama tumbuhan (10). Selain itu, flavonoid juga berperan sebagai suatu nutrasetikal dengan khasiat antimikroba, antibakteri, antifungi, antivirus, antiulcer, hepatoprotektif, antiinflamasi, efek kardioprotektif, antineoplasma, dan lainnya (14). Banyaknya penemuan dan pengembangan obat baru dari flavonoid yang berasal dari tanaman menjadi alasan dilakukannya penelitian ini. Penelitian ini bertujuan melakukan analisis senyawa flavonoid pada fraksi etil asetat hasil hidrolisis ekstrak etanol 70% daun *Cordia* sekaligus menentukan aktivitas antiradikalnya.

Metode

Alat

Alat-alat yang digunakan pada penelitian ini meliputi toples maserasi, ayakan no. mesh 40, timbangan analitik (Ohaus), mikropipet (Eppendorf), *vacuum rotary evaporator* (Eyela N-1100, Cina), oven (Mettler UN-55), chamber (Camag), kotak UV (Camag), ultrasonik (Branson 5510), spektrofotometer UV-Vis (UV-1601 Series, Shimadzu, Japan), dan spektrometer FTIR (Agilent Cary 630, USA).

Bahan

Etanol 70%, etil asetat, metanol, kloroform pada tingkat analitik (Merck, Jerman) digunakan sebagai pelarut. Bahan lain yang digunakan antara lain plat KLT GF₂₅₄ (Merck, Jerman), DPPH, AlCl₃ 10%, kalium asetat, kuersetin (Sigma-Aldrich Co., USA), HCl 2N, Na₂SO₄, asam formiat, dan aquades.

Ekstraksi

Daun *Cordia* diperoleh dari pekarangan rumah warga di sekitar Jakarta Timur. Sebelumnya, tanaman telah dideterminasi di Lembaga Ilmu Pengetahuan Indonesia (*Indonesian Institute of Sciences*), Pusat Penelitian Biologi (*Research Center for Biology*),

Cibinong Sciences Center, Cibinong. Sampel daun segar (2,5 kg) dibuat simplisia menggunakan oven pada 50 °C. Blender elektrik digunakan untuk menghaluskan simplisia menjadi serbuk untuk selanjutnya diayak dengan ayakan no. mesh 40. Serbuk kemudian disimpan dalam wadah kering tertutup rapat (15).

Serbuk simplisia (850 g) diekstraksi menggunakan metode maserasi dengan pelarut etanol 70% (dengan rasio bahan–pelarut 1:6) selama 18 jam sambil sesekali diaduk. Ampas yang telah dipisahkan dari filtrat kemudian diremaserasi sampai pemeriksaan terhadap kandungan flavonoid didalamnya memberikan hasil negatif. Filtrat diuapkan pelarutnya menggunakan *vacuum rotary evaporator* pada 50 °C. Evaporasi dilanjutkan dengan penangas air pada 50 °C hingga diperoleh ekstrak kental (15). Ekstrak dihitung persentase rendemen dan dilakukan penapisan fitokimia sederhana mengikuti prosedur pada Hanani (2015) (16). Skema prosedur ekstraksi dapat dilihat pada **Gambar 1**.

Hidrolisis Ekstrak

Ekstrak etanol sebanyak 15,0715 g dicampurkan dengan 240 mL HCl 2N-metanol (dengan rasio bahan–pelarut 1:16) di dalam labu alas bulat. Campuran dipanaskan pada 95 °C selama 2 jam. Setelah dingin, campuran disaring dan dipekatkan di atas penangas air pada 60 °C hingga diperoleh hidrolisat kental (17).

Fraksinasi dari hasil hidrolisat

Hidrolisat sebanyak 6,45 g dilarutkan dalam 20 mL metanol dan 20 ml aquadest, dan kemudian dimasukkan ke dalam corong pisah. Selanjutnya, campuran difraksinasi menggunakan etil asetat sebanyak 40 mL. Setelah dikocok perlahan dan didiamkan sesaat, fase air (lapisan bawah) dan fase etil asetat (lapisan atas) masing-masing dipisahkan dan dikumpulkan. Fraksi etil asetat disaring menggunakan Na₂SO₄. Fraksi tersebut dipekatkan di atas penangas air dengan suhu 40 °C (17).

Penetapan kadar flavonoid total fraksi

Penetapan kadar flavonoid total dengan metode kolorimetri (18). Kuersetin digunakan untuk membuat kurva kalibrasi. Kuersetin (1000 µg/mL) dalam metanol kemudian diencerkan hingga diperoleh larutan seri konsentrasi 26, 44, 62, 80 dan

98 µg/mL. Fraksi etil asetat disiapkan dalam metanol (1000 µg/mL). Larutan uji (0,5 mL) secara terpisah dicampur dengan metanol (1,5 mL), AlCl₃ 10% (0,1 mL), kalium asetat 1 M (0,1 mL) dan aquades (2,8 mL), kemudian dihomogenkan. Setelah 30 menit diinkubasi pada suhu kamar, campuran tersebut diukur absorbansinya pada 440 nm menggunakan Spektrofotometer UV-Vis. Selanjutnya grafik hubungan absorbansi terhadap konsentrasi standar kuersetin digunakan untuk memperoleh persamaan garis linear ($y=bx\pm a$). Persamaan ini selanjutnya digunakan untuk menetapkan konsentrasi flavonoid dalam larutan uji. Selanjutnya, prosedur mereaksikan yang sama dilakukan pada larutan uji fraksi etil asetat 6000 µg/mL (0,5 mL) dalam metanol untuk menentukan kadar flavonoid total pada fraksi tersebut. Pengujian dilakukan triplo.

Penentuan aktivitas antiradikal bebas fraksi

Penentuan aktivitas antiradikal dilakukan terhadap DPPH dengan kuersetin sebagai pembanding mengikuti prosedur Batool et al., (2019) (19) dengan sedikit modifikasi. Larutan DPPH disiapkan dalam metanol dengan konsentrasi 0,2 mM. Larutan fraksi etil asetat disiapkan dengan seri konsentrasi yaitu 50, 150, 250, 350, dan 450 µg/mL. Sedangkan, seri konsentrasi kuersetin sebagai pembanding adalah 2, 4, 6, 8, dan 10 µg/mL. Selanjutnya larutan uji sebanyak 1 mL (baik fraksi etil asetat maupun kuersetin) masing-masing secara terpisah dicampurkan dengan 4 mL DPPH. Campuran diinkubasi pada suhu ruang selama 30 menit dalam kondisi gelap. Absorbansi diukur pada 515 nm menggunakan Spektrofotometer UV-Vis. Pengujian dilakukan triplo. Kapasitas antiradikal dihitung berdasarkan persentase inhibisi terhadap radikal DPPH yang dihitung dengan cara: (absorbansi DPPH – absorbansi sampel) dibagi dengan absorbansi DPPH dikali 100%. Kemudian kurva persentase inhibisi DPPH terhadap konsentrasi masing-masing sampel digunakan untuk memperoleh persamaan garis linear ($y=bx\pm a$). Persamaan tersebut selanjutnya digunakan untuk menghitung konsentrasi sampel yang

mampu menghambat 50% radikal DPPH (*inhibition concentration* 50, IC₅₀) yang dinyatakan dalam µg/mL.

Pemisahan dengan KLT preparatif

Sebelumnya, konfirmasi keberadaan flavonoid dalam fraksi etil asetat dilakukan pada plat KLT GF254. Fase gerak yang digunakan adalah kloroform:etil asetat:metanol (3:2:2,5) dengan penambahan sedikit asam formiat. Pereaksi semprot sitroborat digunakan untuk mendeteksi golongan senyawa flavonoid. Pemisahan flavonoid pada fraksi etil asetat selanjutnya dilakukan pada plat KLT preparatif menggunakan fase gerak yang sama. Visualisasi bercak dipantau pada sinar UV 254 dan 366 nm tanpa disemprot sitroborat. Bercak dihitung nilai R_f-nya dengan cara membagi jarak rambat bercak (cm) dengan jarak rambat eluen (cm) dikali 100.

Analisis senyawa flavonoid

Bercak yang diperoleh dari hasil KLT preparatif dikerok dan dilarutkan dalam metanol dengan bantuan ultrasonik selama 15 menit. Filtrat disaring dengan kapas dan kertas saring. Filtrat kemudian diidentifikasi menggunakan spektrofotometer UV-Vis maupun FTIR.

Hasil

Hasil identifikasi kualitatif menunjukkan bahwa ekstrak etanol 70% daun Cordia terdeteksi senyawa alkaloid, fenolik, flavonoid, tanin, dan saponin. Hasil ekstraksi dan fraksinasi hidrolisat disajikan pada **Tabel 1**. Kadar flavonoid total fraksi etil asetat diperoleh sebesar 8,20 mgQE/g. Selanjutnya, pengujian aktivitas antiradikal dilakukan terhadap DPPH menggunakan spektrofotometer UV-Vis. Nilai IC₅₀ kuersetin adalah 7,028 µg/mL, sedangkan IC₅₀ fraksi etil asetat adalah 296,91 µg/mL. Hal ini menunjukkan bahwa fraksi etil asetat memiliki aktivitas antiradikal namun belum sebanding dengan kuersetin sebagai standar/pembandingan.

Gambar 2 menunjukkan pola KLT fraksi etil asetat untuk konfirmasi keberadaan golongan senyawa flavonoid sebelum dilakukan KLT preparatif. Terdapat 4 bercak yang terdeteksi pada sinar 254 nm (sebelum disemprot sitroborat), sedangkan pada 366 nm (setelah disemprot sitroborat) hanya ditemukan 1 bercak dominan berwarna kuning yang

disimpulkan bahwa bercak tersebut merupakan suatu flavonoid (16). **Gambar 3** menunjukkan pola kromatogram dari KLT preparatif. Bercak yang tampak kemudian dianalisis lebih lanjut menggunakan spektrofotometer UV-Vis dan FTIR.

Hasil spektrum UV-Vis pada bercak 1 (**Gambar 4**) diperoleh serapan pada 340 nm (pita I) dan 240 nm (pita II). Sedangkan spektrum infra merah (**Gambar 5**) menunjukkan adanya sinyal pada 3363 cm⁻¹ melebar (O–H ulur), 1727 cm⁻¹ (C=O), 1459 cm⁻¹ tajam dengan intensitas lemah dan 1060 cm⁻¹ kuat (C–O).

Pembahasan

Hasil identifikasi kualitatif ekstrak etanol daun Cordia pada penelitian ini sesuai dengan penelitian Hanani *et al.*, (2019) (2). Etanol memiliki kemampuan menarik senyawa polifenol, flavonoid, tanin, terpenoid, steroid, dan alkaloid. Polaritas etanol berkaitan dengan keberadaan gugus OH pada strukturnya (20,21). Kandungan flavonoid terdeteksi lebih tinggi dalam etanol yang bercampur dengan air pada konsentrasi 70% dibanding etanol absolut (21,22). Umumnya, flavonoid pada tumbuhan berada pada bentuk glikosidanya dibandingkan bentuk aglikon. Dengan demikian, prosedur ekstraksi flavonoid dapat dilakukan dengan menggunakan teknik hidrolisis (12,16).

Hidrolisis dilakukan untuk melepaskan gula pada glikosida dengan cara asam, basa maupun enzimatis. Hidrolisis asam pada glikosida flavonoid dapat dilakukan dengan memanaskan campuran bahan dengan 2 N HCl-metanol (12). Beberapa peneliti ada yang menambahkan asam askorbat di dalam prosedur tersebut untuk mencegah terjadinya oksidasi. Proses hidrolisis dapat dilakukan selama 2 jam pada suhu 80 °C atau lebih (12,16). Bentuk aglikon selanjutnya dapat diekstraksi dengan pelarut semipolar yaitu etil asetat (16). Berdasarkan hasil rendemen dari fraksi etil asetat dari hidrolisat pada **Tabel 1**, menunjukkan bahwa fraksi ini mengandung sebagian besar senyawa aglikon dan sedikit glikosida. Kemampuan ini didasarkan

pada polaritas etil asetat yang cukup besar karena adanya elektron π dan elektron pasangan bebas pada O (20).

Pengujian spektrofotometri yang didasarkan pada pembentukan kompleks aluminium adalah prosedur yang sering digunakan dalam penentuan kadar flavonoid. Sampel ini direaksikan dengan AlCl_3 dan memungkinkan pengukuran flavonoid totalnya setelah 2-60 menit dalam kisaran 404-430 nm (23). Prinsipnya, kompleks stabil dari AlCl_3 dengan gugus keto C-4 dan C-3 atau C-5 hidroksil dari struktur flavonoid (flavon dan flavonol) dapat terbentuk setelah penambahan asam. Selain itu, AlCl_3 juga membentuk kompleks stabil dengan gugus ortohidroksil pada cincin A atau B dari flavonoid (23).

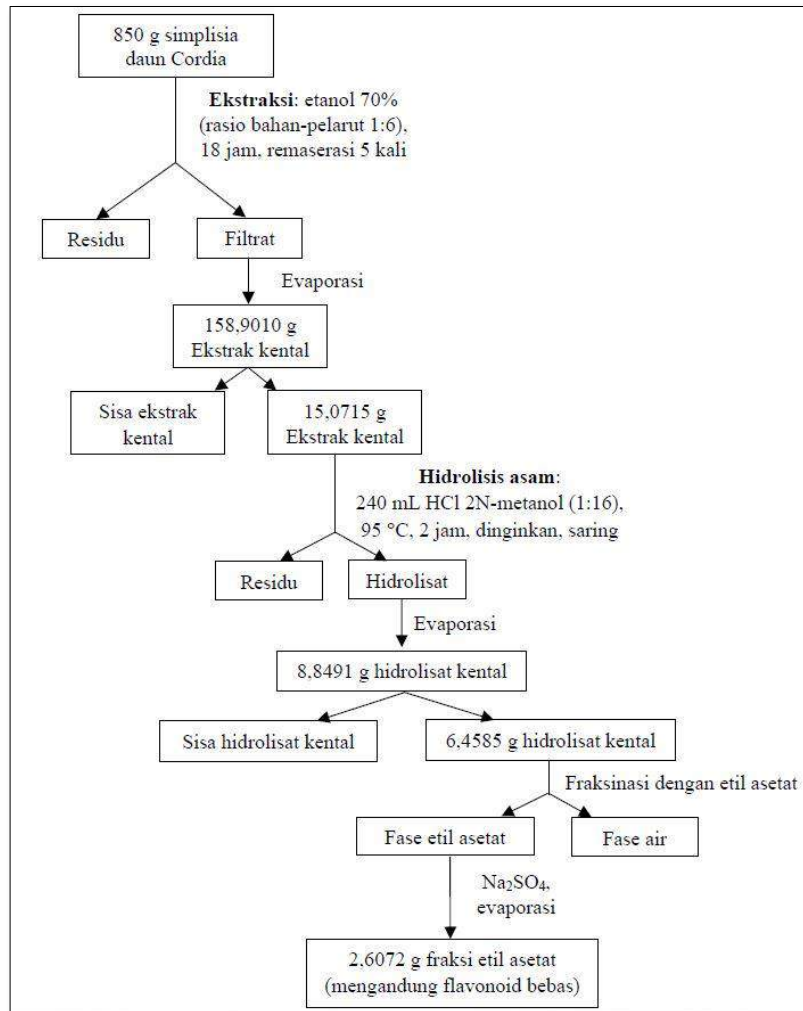
Antiradikal merupakan kemampuan senyawa kimia untuk bereaksi dengan radikal bebas (9). Senyawa bahan alam dengan aktivitas antiradikal umumnya dari kelompok fenolik. Kelompok fenolik (termasuk flavonoid) memiliki struktur kimia yang mendukung proses peredaman radikal bebas (9). Pada flavonoid, ada beberapa faktor yang menentukan kapasitas antiradikalnya antara lain: (1) adanya gugus orto-dihidroksi pada cincin B mampu menyumbang elektron dan berpartisipasi dalam delokalisasi elektron, (2) adanya ikatan rangkap 2,3 dengan gugus 4-okso pada cincin C bertanggung jawab pada delokalisasi cincin B, (3) adanya gugus 3- dan 5-hidroksil dengan gugus 4-okso pada cincin A dan C ikut berperan dalam menangkal radikal, (4) adanya gugus 3-hidroksil (9,24). Hasil dari studi ini, nilai IC_{50} fraksi etil asetat masih rendah dibandingkan dengan kuersetin sebagai pembanding terhadap peredaman radikal DPPH. Senyawa antioksidan baik fenolik maupun flavonoid memberikan respon aktivitas antioksidan dan antiradikal berbeda (terkait mekanismenya) tergantung dari jenis ujinya (25). Hal ini berkaitan dengan fakta bahwa tiap uji memiliki perbedaan spesifisitas pelarut, reagen, dan kondisi pH. Selain itu, sifat hidrofobik/hidrofilik substansi, ukuran molekul, dan jumlah (kuantitas) serta jenis dari gugus fungsi fenolik dan flavonoid yang diujikan juga ikut berperan pada hasil ujinya (9). Dengan demikian, diperlukan pengujian

dengan metode selain DPPH pada fraksi etil asetat untuk membuktikan hal ini.

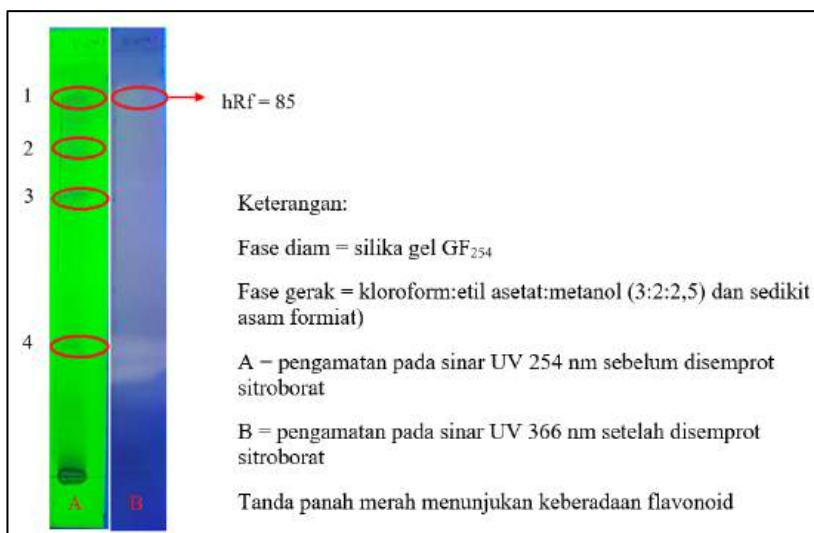
Pemisahan dengan KLT masih menjadi metode yang paling banyak digunakan untuk pemisahan disebabkan karena metode ini sederhana, praktis, dan ekonomis serta prosedur kerja yang mudah (26). Hasil kromatogram KLT menunjukkan keberadaan senyawa flavonoid setelah disemprot dengan sitroborat. Sitroborat merupakan reagen yang terdiri atas asam borat dan asam sitrat dalam etanol. Reagen ini bereaksi dengan flavonoid dengan gugus ortho-hidroksi (27) dengan hasil positif berwarna kuning terang pada UV 366 nm (16).

Prosedur pendekatan klarifikasi struktur senyawa dapat menggunakan spektroskopi. Spektroskopi UV-Visible dapat digunakan untuk menganalisis kualitatif kelas senyawa tertentu. Spektroskopi inframerah, misalnya *Fourier Transform Infrared Spectroscopy* (FTIR) merupakan metode dengan resolusi tinggi yang digunakan untuk mengidentifikasi kandungan kimia dengan cepat secara non-destruktif (21,28).

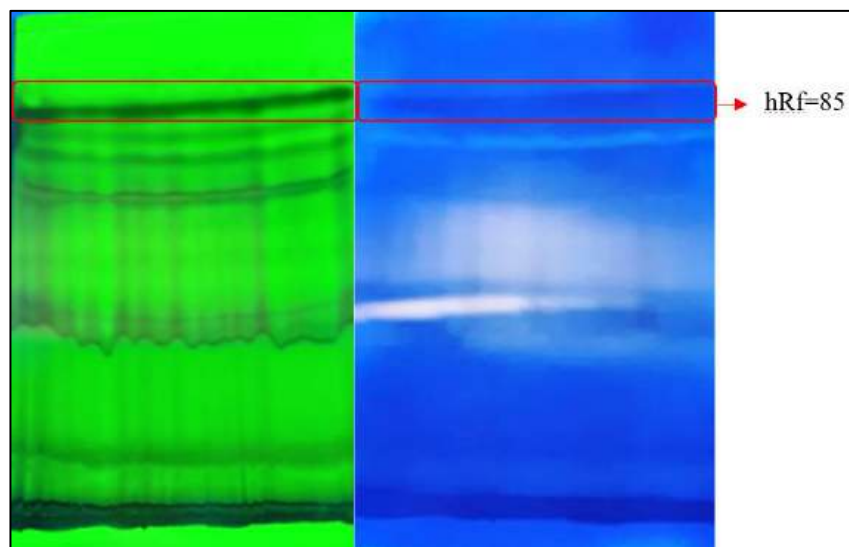
Spektroskopi serapan ultraviolet (UV) dari flavonoid memiliki dua serapan maksimal sekitar 300–350 dan 240–285 nm masing-masing sesuai dengan pita I dan II dari cincin A dan B. Sebagian besar flavon, isoflavon dan kalkon terhidroksilasi memberikan serapan maksimum pada 3300-3600 cm^{-1} karena adanya gugus OH (8). Gugus karbonil ($\text{C}=\text{O}$) flavonoid diamati sekitar 1727 cm^{-1} . Serapan tajam dan intensitas tinggi teramati pada 1600 dan 1500 cm^{-1} karena adanya ikatan rangkap pada cincin aromatik (8,29). Dengan demikian, dapat disimpulkan bahwa fraksi etil asetat hidrolisat ekstrak etanol daun *Cordia* mengandung senyawa flavonoid mirip dengan kelompok kalkon. Spektrum UV kalkon mengandung dua pita serapan yang ditunjukkan pada Pita I (340 nm) dengan serapan sebesar 0,785 dan pita II (240 nm) dengan serapan sebesar 0,456. Pita I sering tampak pada 340-390 nm, meskipun terkadang sedikit perubahan atau puncak sering terjadi pada 300-320 nm.



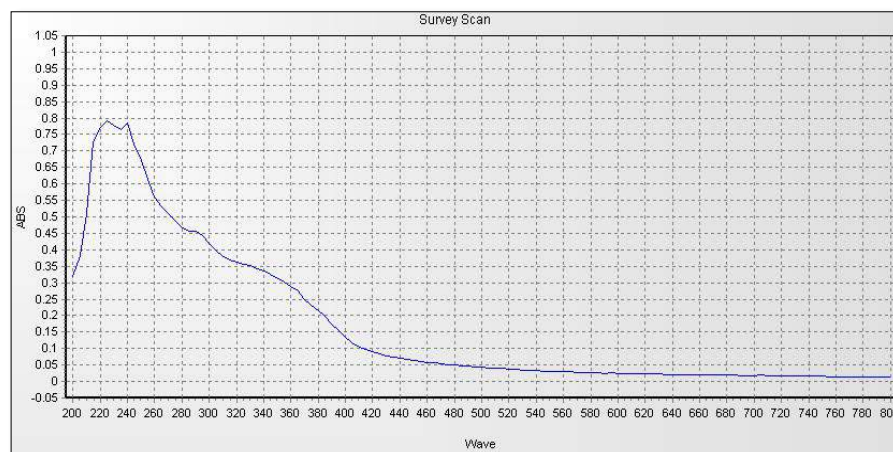
Gambar 1 Skema prosedur pemisahan



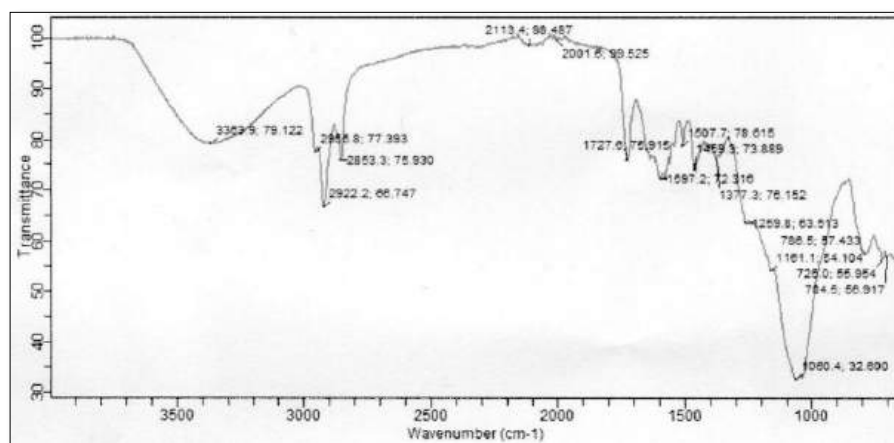
Gambar 2 Pola kromatogram KLT pada fraksi etil asetat



Gambar 3 Pola kromatogram KLT preparatif pada fraksi etil asetat pada sinar UV 254 nm (kiri) dan pada sinar UV 365 nm (kanan)



Gambar 4 Spektrum UV bercak 1



Gambar 5 Spektrum inframerah bercak 1

Tabel 1 Hasil ekstraksi dan fraksinasi

Sampel	Bobot (g)	Rendemen (%)
Ekstrak etanol 70%*	158,90	18,69
Hidrolisat**	8,8491	58,71
Fraksi etil asetat***	2,6072	40,37

Keterangan: * dari 850 g serbuk simplisia; ** dari 15,0715 g ekstrak; *** dari 6,4585 g hidrolisat.

Pita II tampak pada 220-270 nm (30). Secara farmakologi, kalkon memiliki khasiat yang luas seperti antidiabetes, antikanker, antiinflamasi, antimikroba, antioksidan, antiparasit, psikoaktif dan neuroprotektif (31).

Kesimpulan

Fraksi etil asetat hasil hidrolisat ekstrak etanol 70% daun *Cordia* mengandung senyawa flavonoid yang memiliki aktivitas antiradikal DPPH. Flavonoid yang ditemukan memiliki kemiripan dengan kelompok kalkon berdasarkan analisis spektrum UV-sinar tampak dan inframerah. Studi lebih lanjut dalam pemisahan dan pemurnian senyawa ini masih perlu dilakukan kedepannya dengan teknik kromatografi lain dan untuk menentukan struktur molekul senyawa murni perlu menggunakan metode spektroskopi massa dan NMR yang mendukung pada penentuan struktur dari flavonoid.

Daftar Pustaka

1. Łysiak GP. Ornamental Flowers Grown in Human Surroundings as a Source of Anthocyanins with High Anti-Inflammatory Properties. *Foods*. 2022;11(948).
2. Hanani E, Soewandi SHW, Hayati, Revita N. Pharmacognostical and preliminary phytochemical evaluation of *Cordia sebestena* L. *Pharmacogn J*. 2019;11(5):1100–5.
3. Adeosun CB, Bamigbade OI., Osho A, Atolani O. Volatile Composition of the Leaf, Flower and Fruit of *Cordia sebestena* (L.). *J Essent Oil-Bearing Plants*. 2015;18(4):976–81.
4. Osho A, Otuechere CA, Adeosun CB, Oluwagbemi T, Atolani O. Phytochemical, sub-acute toxicity, and antibacterial evaluation of *Cordia sebestena* leaf extracts. *J Basic Clin Physiol Pharmacol*. 2015;27(2):163–70.
5. Sunaryo H, Siska S, Hanani E, Anindita RS, Yanti N, Lisa. Evaluation of analgesic and anti-inflammatory activities of ethanolic extract of *Cordia sebestena* L. *Eur Pharm J*. 2020;66(2):26–31.
6. Hikmawanti NPE, Hanani E, Sapitri Y, Ningrum W. Total Phenolic Content and Antioxidant Activity of Different Extracts of *Cordia sebestena* L. Leaves. *Pharmacogn J*. 2020;12(6):1311–6.
7. Prakash S, Elavarasan N, Subashini K, Kanaga S, Dhandapani R, Sivanandam M, et al. Isolation of hesperetin - A flavonoid from *Cordia sebestena* flower extract through antioxidant assay guided method and its antibacterial, anticancer effect on cervical cancer via in vitro and in silico molecular docking studies. *J Mol Struct*. 2020;1207:127751.
8. Awouafack MD, Tane P, Morita H. Isolation and Structure Characterization of Flavonoids. In: *Flavonoids - From Biosynthesis to Human Health*. Intech; 2017. p. 45–59.
9. Huyut Z, Beydemir F., Gülçin E. Antioxidant and Antiradical Properties of Selected Flavonoids and Phenolic Compounds. *Biochem Res Int*. 2017;2017:1–10.
10. Arifin B, Ibrahim S. Struktur, Bioaktivitas Dan Antioksidan Flavonoid. *J Zarah*. 2018;6(1):21–9.
11. Alara OR, Abdurahman NH, Ukaegbu CI. Extraction of phenolic compounds: A review. *Curr Res Food Sci*. 2021;4(March):200–14.
12. Bian Y, Zhang Y, Zhou Y, Li GH, Feng XS. Progress in the Pretreatment and Analysis of Flavonoids: An Update since 2013. *Sep Purif Rev*. 2022;51(1):11–37.
13. Nuutila AM, Kammiovirta K, Oksman-Caldentey KM. Comparison of methods for the hydrolysis of flavonoids and phenolic acids from onion and spinach for HPLC analysis. *Food Chem*. 2002;76(4):519–25.
14. Janabi AHW, Kamboh AA, Saeed M, Xiaoyu L, BiBi J, Majeed F, et al. Flavonoid-rich foods (FRF): A promising nutraceutical approach against lifespan-shortening diseases. *Iran J Basic Med Sci*. 2020;23(2):140–53.
15. Kementerian Kesehatan RI. *Farmakope Herbal Indonesia Edisi II*. 2nd ed. Jakarta: Kementerian Kesehatan RI; 2017. 51–55 p.
16. Hanani E. *Analisis Fitokimia*. Jakarta: Buku Kedokteran EGC; 2015. 34–45 p.

17. Irianti T, Murti YB, Kanistri DN, Pratiwi DR, Kuswandi, Kusumaningtyas RA. DPPH Radical Scavenging Activity of Aqueous Fraction from Ethanolic Extract of Talok Fruit (*Muntingia calabura* L.). *Tradit Med J*. 2016;21(1):38–47.
18. Hikmawanti NPE, Fatmawati S, Asri AW. The Effect of Ethanol Concentrations as The Extraction Solvent on Antioxidant Activity of Katuk (*Sauropus androgynus* (L.) Merr.) Leaves Extracts. *IOP Conf Ser Earth Environ Sci*. 2021;755(1):012060.
19. Batool R, Khan MR, Sajid M, Ali S, Zahra Z. Estimation of phytochemical constituents and in vitro antioxidant potencies of *Brachychiton populneus* (Schott & Endl.) R. Br. *BMC Chem*. 2019;13(32):1–15.
20. Houghton PJ, Raman A. Laboratory Handbook for the Fractionation of Natural Extracts. 1st ed. Laboratory Handbook for the Fractionation of Natural Extracts. Springer-Science+Business Media, B.V.; 1998. 14–16, 24–31, 39–52 p.
21. Altemimi A, Lakhssassi N, Baharlouei A, Watson DG, Lightfoot DA. Phytochemicals: Extraction, Isolation, and Identification of Bioactive Compounds from Plant Extracts. *Plants*. 2017;6(42).
22. Zhang Q-W, Lin L-G, Ye W-C. Techniques for extraction and isolation of natural products: A comprehensive review. *Chin Med*. 2018;13(20).
23. Pękal A, Pyrzynska K. Evaluation of Aluminium Complexation Reaction for Flavonoid Content Assay. *Food Anal Methods*. 2014;7(9):1776–82.
24. Gulcin İ. Antioxidants and antioxidant methods: an updated overview. *Arch Toxicol*. 2020;94(3):651–715.
25. Sadeer NB, Montesano D, Albrizio S, Zengin G, Mahomoodally MF. The versatility of antioxidant assays in food science and safety—chemistry, applications, strengths, and limitations. *Antioxidants*. 2020;9(8):1–39.
26. Muyumba NW, Mutombo SC, Sheridan H, Nachtergaeel A, Duez P. Quality control of herbal drugs and preparations: The methods of analysis, their relevance and applications. *Talanta Open*. 2021;4:100070.
27. Sharma B, Agrawal SC, Gupta KC. Colour reactions of chalcones and their mechanism (A review). *Orient J Chem*. 2008;24(1):289–94.
28. Ingle KP, Deshmukh AG, Padole DA, Dudhare MS, Moharil MP, Khelurkar VC. Phytochemicals: Extraction methods, identification and detection of bioactive compounds from plant extracts. *J Pharmacogn Phytochem*. 2017;6(1):32–6.
29. Pavia DL, Lampman GM, Kriz GS, Vyvyan JR. Introduction to Spectroscopy. Fourth Edi. Canada: Brooks/Cole; 2001. 15–104 p.
30. Aksöz BE, Ertan R. Spectral properties of chalcones II. *Fabad J Pharm Sci*. 2012;37(4):205–16.
31. Salehi B, Quispe C, Chamkhi I, El Omari N, Balahbib A, Sharifi-Rad J, et al. Pharmacological Properties of Chalcones: A Review of Preclinical Including Molecular Mechanisms and Clinical Evidence. *Front Pharmacol*. 2021;11(January).

4. Bukti artikel diterima (15 Maret 2023)



Ni Putu Ermi Hikmawanti <ermy0907@uhamka.ac.id>

[ijpst] Keputusan Editor

3 messages

Prof. apt. Muchtaridi, Ph.D. <muchtaridi@unpad.ac.id>
To: Ermi Ni Putu Ermi Hikmawanti <ermy0907@uhamka.ac.id>

Fri, Jul 14, 2023 at 10:32 PM

Ermi Ni Putu Ermi Hikmawanti:

Kami telah mengambil keputusan mengenai naskah Anda untuk Indonesian Journal of Pharmaceutical Science and Technology, "Analisis Flavonoid pada Fraksi Hasil Hidrolisat Ekstrak Daun Cordia sebestena L.". Setelah melalui pertimbangan hasil ulasan dari para ekspertise di bidangnya, maka:

Keputusan kami adalah: Artikel anda diterima untuk diterbitkan pada tahun {2024}, Vol {11} no. {1}.

Oleh karena itu, untuk proses selanjutnya kami akan melanjutkan untuk copy editing. Berdasarkan kebijakan baru bahwa artikel yang terbit di atas tahun 2023, artikel yang diterima dan siap diterbitkan maka dimintakan biaya pengelolaan sebesar Rp. 1.000.000,,-. Mohon diberi keterangan no. Manuskrip. Untuk Para Reviewer IJPST kami berikan potongan 20 % sebagai rasa terima kasih atas bantuan kesediaan dan kerja kerasnya. Mohon agar dana tersebut ditransfer ke BNI a.n Rimadani Pratiwi 2021343495. Mohon dikirimkan bukti ke email IJPST dan cc ke muchtaridi@unpad.ac.id dengan menyertakan no manuskrip.

Terima kasih atas kepercayaan para penulis untuk menerbitkan karya ilmiahnya pada kami.

Prof. apt. Muchtaridi, Ph.D.
Fakultas Farmasi Universitas Padjadjaran
HP / Telepon 087827707157
muchtaridi@unpad.ac.id

Indonesian Journal of Pharmaceutical Science and Technology
<http://jurnal.unpad.ac.id/ijpst>

Ni Putu Ermi Hikmawanti <ermy0907@uhamka.ac.id>
To: "Prof. apt. Muchtaridi, Ph.D." <muchtaridi@unpad.ac.id>

Sat, Jul 15, 2023 at 6:45 AM

Dear Editor IJPST,

berikut kami kirimkan bukti bayar manuscript #38849 atas nama author: Ni Putu Ermi Hikmawanti. Terimakasih.

Salam,
Ermi

[Quoted text hidden]



Bukti bayar manuscript #38849.png
106K

3/6/25, 12:23 PM

Universitas Muhammadiyah Prof. Dr. Hamka Mail - [ijpst] Keputusan Editor

Ni Putu Ermi Hikmawanti <ermy0907@uhamka.ac.id>

Fri, Nov 10, 2023 at 2:03 PM

To: "Prof. apt. Muchtaridi, Ph.D." <muchtaridi@unpad.ac.id>

Dear Editor,

apakah sudah ada informasi naskah galley proofnya? Terimakasih.

Salam,
Ermi

[Quoted text hidden]

**5. Bukti artikel proses *galley proof* dan artikel
yang dikoreksi *galley proof*
(1 Februari 2024)**



Ni Putu Ermi Hikmawanti <ermy0907@uhamka.ac.id>

[ijpst] Permintaan Proofreading (Penulis)

2 messages

IJPST Editor <ijpst.farmasi@unpad.ac.id>

Thu, Feb 1, 2024 at 10:30 AM

To: Ermi Ni Putu Ermi Hikmawanti <ermy0907@uhamka.ac.id>

Ermi Ni Putu Ermi Hikmawanti:

Naskah Anda "Analisis Flavonoid pada Fraksi Hasil Hidrolisat Ekstrak Daun Cordia sebestena L." untuk Indonesian Journal of Pharmaceutical Science and Technology sekarang perlu di-proofread dengan mengikuti langkah-langkah berikut ini.

1. Klik di URL Penyerahan berikut ini.
2. Login ke jurnal dan lihat INSTRUKSI PROOFING .
3. Klik di LIHAT PROOF di Layout dan galley proof di satu atau lebih format yang digunakan.
4. Masukkan koreksi (tipografi dan format) dalam koreksi proofreading.
5. Simpan dan kirimkan email tentang koreksi ke Editor Layout dan Proofreader.
6. Kirim email LENGKAP kepada editor.

URL Penyerahan:

<https://jurnal.unpad.ac.id/ijpst/author/submissionEditing/38849>

Nama pengguna Penulis: ermi_hikmawanti

IJPST Editor

Fakultas Farmasi Unpad

ijpst.farmasi@unpad.ac.id

Indonesian Journal of Pharmaceutical Science and Technology<http://jurnal.unpad.ac.id/ijpst>

Ni Putu Ermi Hikmawanti <ermy0907@uhamka.ac.id>

Thu, Feb 1, 2024 at 10:52 AM

To: IJPST Editor <ijpst.farmasi@unpad.ac.id>

Dear Editor,

Berikut terlampir naskah proofread yang telah kami koreksi. Ada beberapa bagian yang mohon bantuannya untuk diperbaiki. Terimakasih.

Salam

[Quoted text hidden]

--

Ni Putu Ermi Hikmawanti, M.Farm.

Office:

Department of Pharmaceutical Biology

Faculty of Pharmacy and Sciences

Universitas Muhammadiyah Prof. DR. HAMKA

Jl. Delima II/IV Klender, East Jakarta, Indonesia

Post code 13460

Phone: +62 852 5087 4147

Email: ermy0907@uhamka.ac.id**38849-203464-1-PB-koreksi.pdf**

1425K



Analysis of Flavonoids on Fraction from Hydrolysate of *Cordia Sebestena* L. Leaves Extract

Ni P. E. Hikmawanti^{1*}, Endang Hanani¹, dan Rini Mardiyanti¹

¹Program Studi Farmasi, Fakultas Farmasi dan Sains, Universitas Muhammadiyah Prof. DR. HAMKA, Jl. Delima II/IV
Klender, Jakarta Timur, DKI Jakarta 13460, Indonesia

Submitted 25 March 2022; Revised 22 January 2023; Accepted 15 March 2023; Published 01 February 2024

*Corresponding author: ermy0907@uhamka.ac.id

Abstract

Cordia sebestena L. contains flavonoids, that play a role in free radical scavenging activity. This study aimed to analyze the flavonoids in the hydrolyzed fraction of the 70% ethanol extract of Cordia leaves. The study was divided into 7 stages: (1) maceration using 70% ethanol, (2) acid hydrolysis of the ethanol extract, (3) fractionation of hydrolysate with ethyl acetate, (4) determination of total flavonoid content, (5) antiradical activity assay against 2,2'-diphenyl-1-picrylhydrazyl (DPPH), (6) thin layer chromatography (TLC) analysis, and (7) identification of flavonoid using UV-Visible Spectrophotometry and Infrared Spectroscopy. The total flavonoid content of the ethyl acetate fraction was 8.20 mgQE/g with an IC₅₀ value of 296.91 g/mL against DPPH radicals. There is one spot of flavonoids in the ethyl acetate fraction (hRf = 85.5). The UV-Vis spectrum on the spot obtained absorption at 340 nm (band I) and 240 nm (band II). The infrared spectrum shows a signal at 3363 cm⁻¹ (O-H stretching), 1727 cm⁻¹ (C=O), and 1060 cm⁻¹ strong (C-O). The ethyl acetate hydrolysate fraction of Cordia leaf contains flavonoid similar to the chalcone group. Further analysis is needed using ¹H NMR or FTIR data from a known chalcone as a standard to confirm the flavonoid.

Keywords: Acid hydrolysis; Boraginaceae; Cordia; Ethyl acetate fraction; Flavonoids

Analisis Flavonoid pada Fraksi Hasil Hidrolisat Ekstrak Daun *Cordia sebestena* L.

Abstrak

Cordia sebestena L. mengandung flavonoid yang berperan dalam aktivitas peredaman radikal bebas. Penelitian ini bertujuan menganalisis senyawa flavonoid pada fraksi hasil hidrolisat ekstrak etanol 70% daun Cordia. Penelitian terbagi menjadi 7 tahapan, yaitu (1) maserasi daun menggunakan etanol 70%, (2) hidrolisis asam pada ekstrak, (3) fraksinasi hidrolisat dengan etil asetat, (4) penentuan kadar flavonoid total dengan kolorimetri, (5) pengujian aktivitas antiradikal terhadap 2,2'-difenil-1-pikrilhidrazil (DPPH), (6) pemisahan menggunakan kromatografi lapis tipis (KLT), dan (7) identifikasi flavonoid menggunakan spektrofotometri UV-Vis dan infra merah. Kadar flavonoid total fraksi etil asetat sebesar 8,20 mgQE/g dengan nilai IC₅₀ terhadap radikal DPPH sebesar 296,91 µg/mL. Ada satu bercak flavonoid pada fraksi etil asetat (hRf = 85,5). Hasil spektrum UV-Vis pada bercak tersebut diperoleh serapan pada 340 nm (pita I) dan 240 nm (pita II). Spektrum infra merah menunjukkan adanya sinyal pada 3363 cm⁻¹ (O-H ulur), 1727 cm⁻¹ (C=O), dan 1060 cm⁻¹ kuat (C-O). Fraksi etil asetat hidrolisat ekstrak etanol daun Cordia mengandung senyawa flavonoid yang mirip dengan kelompok kalkon. Namun, diperlukan analisis lebih lanjut untuk memastikan bahwa flavonoid ini merupakan khalkon menggunakan data ¹H NMR atau FTIR dari senyawa khalkon yang telah diketahui.

Kata Kunci: Hidrolisis asam; Boraginaceae; Cordia; Fraksi etil asetat; Flavonoid,

1. Pendahuluan

Banyak tanaman hias berbunga merupakan sumber alami senyawa bioaktif yang bermanfaat untuk kesehatan manusia, terutama sebagai antioksidan. Meskipun demikian, ketertarikan pemanfaatan tanaman ini sebagai sumber makanan dan obat masih rendah. Padahal beberapa studi melaporkan bahwa tanaman hias memiliki potensi sebagai sumber flavonoid (terutama antosianin) sebagai antioksidan dan antiinflamasi.¹ *Cordia sebestena* L. (Boraginaceae) atau *Cordia* merupakan suatu tanaman hias. Daun *Cordia* mengandung senyawa fenolik, flavonoid, saponin, alkaloid, steroid/triterpenoid, dan tannin.² Daun *Cordia* juga mengandung senyawa volatil sebesar 0,05%.³ Daun *Cordia* memiliki beragam aktivitas farmakologi, antara lain antibakteri,⁴ analgetik, antiinflamasi,⁵ antioksidan,⁶ dan lain sebagainya. Studi mengenai toksisitas subakut dari ekstrak etil asetat daun *Cordia* menunjukkan bahwa ekstrak tersebut tidak toksik terhadap hati.⁴ Sebelumnya, telah diisolasi kandungan flavonoid hesperetin dari bunga *Cordia* dengan khasiat antibakteri dan antikanker terhadap kanker serviks *in vitro*.⁷ Namun, studi mengenai flavonoid dari daun *Cordia* belum banyak dieksplorasi.

Flavonoid merupakan kelompok fenolik dengan struktur inti C-15 (C6-C3-C6).⁸ Flavonoid merupakan kelas metabolit sekunder dari bahan alam sebagai nutrasetikal yang paling banyak digunakan pada pengobatan, makanan, suplemen dan lainnya.⁹ Meskipun studi mengenai isolasi maupun sintesisnya telah banyak, para peneliti masih tertarik meneliti flavonoid dan turunannya.¹⁰ Umumnya, flavonoid dapat diekstraksi dari pelarut air, etanol, metanol, n-butanol, aseton, etil asetat, kloroform dan lainnya.¹¹ Pelarut polar digunakan untuk memperoleh flavonoid bentuk glikosida, sedangkan pelarut non-polar untuk ekstraksi bentuk aglikonnya.⁸ Untuk memperoleh bentuk aglikon flavonoid umumnya dilakukan proses hidrolisis terhadap glikosida flavonoid dengan cara asam, basa, maupun enzimatis. Hidrolisis asam merupakan teknik sederhana, cepat dan ekonomis untuk mengubah suatu

glikosida menjadi aglikon.¹² Teknik ini sering kali dilakukan menggunakan HCl 2 N-metanol atau HCl 2M.¹² Hidrolisis glikosida flavonoid dari beberapa sampel sayuran dilaporkan baik dilakukan dengan metode hidrolisis asam menggunakan HCl 1,2 M dalam 50% metanol-air dengan penambahan asam askorbat sebagai pencegah oksidasi pada 80 °C selama 120 menit.¹³

Flavonoid merupakan suatu antioksidan yang secara alami ditemukan dalam bahan alam terutama tumbuhan.¹⁰ Selain itu, flavonoid juga berperan sebagai suatu nutrasetikal dengan khasiat antimikroba, antibakteri, antifungi, antivirus, antiulcer, hepatoprotektif, antiinflamasi, efek kardioprotektif, antineoplasma, dan lainnya.¹⁴ Banyaknya penemuan dan pengembangan obat baru dari flavonoid yang berasal dari tanaman menjadi alasan dilakukannya penelitian ini. Penelitian ini bertujuan melakukan analisis senyawa flavonoid pada fraksi etil asetat hasil hidrolisis ekstrak etanol 70% daun *Cordia* sekaligus menentukan aktivitas antiradikalnya.

2. Metode

2.1. Alat

Alat-alat yang digunakan pada penelitian ini meliputi toples maserasi, ayakan no. mesh 40, timbangan analitik (Ohaus), mikropipet (Eppendorf), *vacuum rotary evaporator* (Eyela N-1100, Cina), oven (Mettler UN-55), chamber (Camag), kotak UV (Camag), ultrasonik (Branson 5510), spektrofotometer UV-Vis (UV-1601 Series, Shimadzu, Japan), dan spektrometer FTIR (Agilent Cary 630, USA).

2.2. Bahan

Etanol 70%, etil asetat, metanol, kloroform pada tingkat analitik (Merck, Jerman) digunakan sebagai pelarut. Bahan lain yang digunakan antara lain plat KLT GF₂₅₄ (Merck, Jerman), DPPH, AlCl₃ 10%, kalium asetat, kuersetin (Sigma-Aldrich Co., USA), HCl 2N, Na₂SO₄, asam formiat, dan aquades.

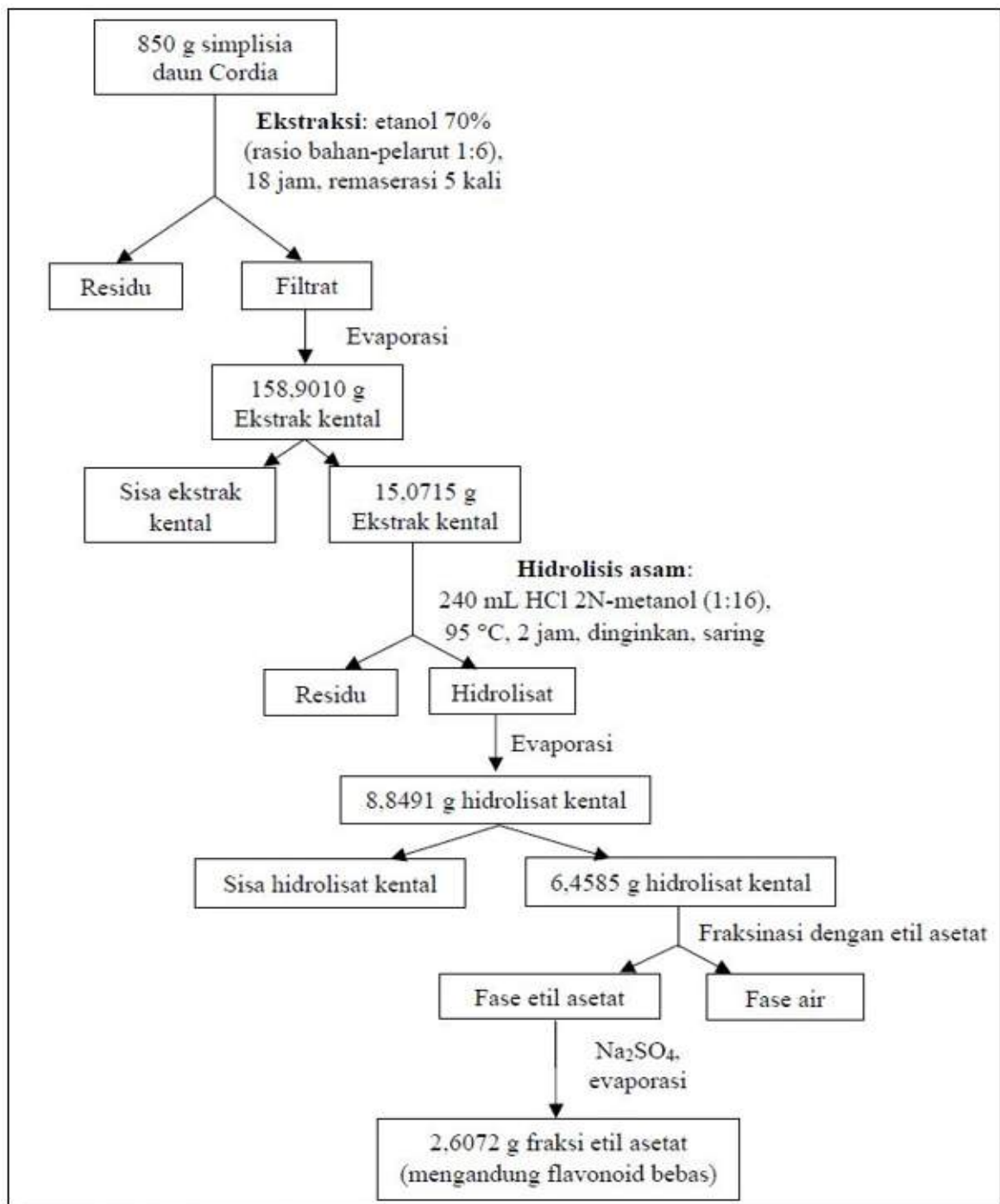
2.3. Metode

2.3.1. Ekstraksi

Daun Cordia diperoleh dari pekarangan rumah warga di sekitar Jakarta Timur. Sebelumnya, tanaman telah dideterminasi di Lembaga Ilmu Pengetahuan Indonesia (*Indonesian Institute of Sciences*), Pusat Penelitian Biologi (*Research Center for Biology*), *Cibinong Sciences Center*, Cibinong. Sampel daun segar (2,5 kg) dibuat simplisia menggunakan oven pada 50 °C. Blender elektrik digunakan untuk menghaluskan simplisia menjadi serbuk untuk selanjutnya

diayak dengan ayakan no. mesh 40. Serbuk kemudian disimpan dalam wadah kering tertutup rapat.¹⁵

Serbuk simplisia (850 g) diekstraksi menggunakan metode maserasi dengan pelarut etanol 70% (dengan rasio bahan-pelarut 1:6) selama 18 jam sambil sesekali diaduk. Ampas yang telah dipisahkan dari filtrat kemudian diremaserasi sampai pemeriksaan terhadap kandungan flavonoid didalamnya memberikan hasil negatif. Filtrat diuapkan pelarutnya menggunakan *vacuum*



Gambar 1. Skema prosedur pemisahan

rotary evaporator pada 50 °C. Evaporasi dilanjutkan dengan penangas air pada 50 °C hingga diperoleh ekstrak kental.¹⁵ Ekstrak dihitung persentase rendemen dan dilakukan penapisan fitokimia sederhana mengikuti prosedur pada Hanani (2015).¹⁶ Skema prosedur ekstraksi dapat dilihat pada Gambar 1.

2.3.2. Hidrolisis Ekstrak

Ekstrak etanol sebanyak 15,0715 g dicampurkan dengan 240 mL HCl 2N-metanol (dengan rasio bahan-pelarut 1:16) di dalam labu alas bulat. Campuran dipanaskan pada 95 °C selama 2 jam. Setelah dingin, campuran disaring dan dipekatkan di atas penangas air pada 60 °C hingga diperoleh hidrolisat kental.¹⁷

2.3.3. Fraksinasi dari hasil hidrolisat

Hidrolisat sebanyak 6,45 g dilarutkan dalam 20 mL metanol dan 20 mL aquadest, dan kemudian dimasukkan ke dalam corong pisah. Selanjutnya, campuran difraksinasi menggunakan etil asetat sebanyak 40 mL. Setelah dikocok perlahan dan didiamkan sesaat, fase air (lapisan bawah) dan fase etil asetat (lapisan atas) masing-masing dipisahkan dan dikumpulkan. Fraksi etil asetat disaring menggunakan Na₂SO₄. Fraksi tersebut dipekatkan di atas penangas air dengan suhu 40 °C.¹⁷

2.3.4. Penetapan kadar flavonoid total fraksi

Penetapan kadar flavonoid total dengan metode kolorimetri.¹⁸ Kuersetin digunakan untuk membuat kurva kalibrasi. Kuersetin (1000 µg/mL) dalam metanol kemudian diencerkan hingga diperoleh larutan seri konsentrasi 26, 44, 62, 80, dan 98 µg/mL. Fraksi etil asetat disiapkan dalam metanol (1000 µg/mL). Larutan uji (0,5 mL) secara terpisah dicampur dengan metanol (1,5 mL), AlCl₃ 10% (0,1 mL), kalium asetat 1 M (0,1 mL) dan aquades (2,8 mL), kemudian dihomogenkan. Setelah 30 menit diinkubasi pada suhu kamar, campuran tersebut diukur absorbansinya pada 440 nm menggunakan Spektrofotometer UV-Vis. Selanjutnya grafik hubungan absorbansi terhadap konsentrasi

standar kuersetin digunakan untuk memperoleh persamaan garis linear ($y = bx \pm a$). Persamaan ini selanjutnya digunakan untuk menetapkan konsentrasi flavonoid dalam larutan uji. Selanjutnya, prosedur mereaksikan yang sama dilakukan pada larutan uji fraksi etil asetat 6000 µg/mL (0,5 mL) dalam metanol untuk menentukan kadar flavonoid total pada fraksi tersebut. Pengujian dilakukan triplo.

2.3.5. Penentuan aktivitas antiradikal bebas fraksi

Penentuan aktivitas antiradikal dilakukan terhadap DPPH dengan kuersetin sebagai pembanding mengikuti prosedur Batool et al., (2019)¹⁹ dengan sedikit modifikasi. Larutan DPPH disiapkan dalam metanol dengan konsentrasi 0,2 mM. Larutan fraksi etil asetat disiapkan dengan seri konsentrasi yaitu 50, 150, 250, 350, dan 450 µg/mL. Sedangkan, seri konsentrasi kuersetin sebagai pembanding adalah 2, 4, 6, 8, dan 10 µg/mL. Selanjutnya larutan uji sebanyak 1 mL (baik fraksi etil asetat maupun kuersetin) masing-masing secara terpisah dicampurkan dengan 4 mL DPPH. Campuran diinkubasi pada suhu ruang selama 30 menit dalam kondisi gelap. Absorbansi diukur pada 515 nm menggunakan Spektrofotometer UV-Vis. Pengujian dilakukan triplo. Kapasitas antiradikal dihitung berdasarkan persentase inhibisi terhadap radikal DPPH yang dihitung dengan cara: (absorbansi DPPH - absorbansi sampel) dibagi dengan absorbansi DPPH dikali 100%. Kemudian kurva persentase inhibisi DPPH terhadap konsentrasi masing-masing sampel digunakan untuk memperoleh persamaan garis linear ($y = bx \pm a$). Persamaan tersebut selanjutnya digunakan untuk menghitung konsentrasi sampel yang mampu menghambat 50% radikal DPPH (inhibition concentration 50, IC₅₀) yang dinyatakan dalam µg/mL.

2.3.6. Pemisahan dengan KLT preparatif

Sebelumnya, konfirmasi keberadaan flavonoid dalam fraksi etil asetat dilakukan pada plat KLT GF₂₅₄. Fase gerak yang digunakan adalah kloroform:etil asetat:metanol (3:2:2,5)

dengan penambahan sedikit asam formiat. Pereaksi semprot sitroborat digunakan untuk mendeteksi golongan senyawa flavonoid. Pemisahan flavonoid pada fraksi etil asetat selanjutnya dilakukan pada plat KLT preparatif menggunakan fase gerak yang sama. Visualisasi bercak dipantau pada sinar UV 254 dan 366 nm tanpa disemprot sitroborat. Bercak dihitung nilai R_f -nya dengan cara membagi jarak rambat bercak (cm) dengan jarak rambat eluen (cm) dikali 100.

2.3.7. Analisis senyawa flavonoid

Bercak yang diperoleh dari hasil KLT preparatif dikerok dan dilarutkan dalam metanol dengan bantuan ultrasonik selama 15 menit. Filtrat disaring dengan kapas dan kertas saring. Filtrat kemudian diidentifikasi menggunakan spektrofotometer UV-Vis maupun FTIR.

3. Hasil

Hasil identifikasi kualitatif menunjukkan bahwa ekstrak etanol 70% daun Cordia terdeteksi senyawa alkaloid, fenolik, flavonoid, tanin, dan saponin. Hasil ekstraksi dan fraksinasi hidrolisat disajikan pada Tabel 1. Kadar flavonoid total fraksi etil asetat diperoleh sebesar 8,20 mgQE/g. Selanjutnya, pengujian aktivitas antiradikal dilakukan terhadap DPPH menggunakan spektrofotometer UV-Vis. Nilai IC_{50} kuersetin adalah 7,028 μ g/mL, sedangkan IC_{50} fraksi etil asetat adalah 296,91 μ g/mL. Hal ini menunjukkan bahwa fraksi etil asetat memiliki aktivitas antiradikal namun belum sebanding dengan kuersetin sebagai standar/pembanding.

Gambar 2 menunjukkan pola KLT fraksi etil asetat untuk konfirmasi keberadaan

golongan senyawa flavonoid sebelum dilakukan KLT preparatif. Terdapat 4 bercak yang terdeteksi pada sinar 254 nm (sebelum disemprot sitroborat), sedangkan pada 366 nm (setelah disemprot sitroborat) hanya ditemukan 1 bercak dominan berwarna kuning yang disimpulkan bahwa bercak tersebut merupakan suatu flavonoid.¹⁶ Gambar 3 menunjukkan pola kromatogram dari KLT preparatif. Bercak yang tampak kemudian dianalisis lebih lanjut menggunakan spektrofotometer UV-Vis dan FTIR.

Hasil spektrum UV-Vis pada bercak 1 (Gambar 4) diperoleh serapan pada 340 nm (pita I) dan 240 nm (pita II). Sedangkan spektrum infra merah (Gambar 5) menunjukkan adanya sinyal pada 3363 cm^{-1} melebar (O–H ulur), 1727 cm^{-1} (C=O), 1459 cm^{-1} tajam dengan intensitas lemah dan 1060 cm^{-1} kuat (C–O).

4. Pembahasan

Hasil identifikasi kualitatif ekstrak etanol daun Cordia pada penelitian ini sesuai dengan penelitian Hanani et al., (2019).² Etanol memiliki kemampuan menarik senyawa polifenol, flavonoid, tanin, terpenoid, steroid, dan alkaloid. Polaritas etanol berkaitan dengan keberadaan gugus OH pada strukturnya.^{20,21} Kandungan flavonoid terdeteksi lebih tinggi dalam etanol yang bercampur dengan air pada konsentrasi 70% dibanding etanol absolut.^{21,22} Umumnya, flavonoid pada tumbuhan berada pada bentuk glikosidanya dibandingkan bentuk aglikon. Dengan demikian, prosedur ekstraksi flavonoid dapat dilakukan dengan menggunakan teknik hidrolisis.^{12,16}

Hidrolisis dilakukan untuk melepaskan gula pada glikosida dengan cara asam, basa maupun enzimatis. Hidrolisis asam pada glikosida flavonoid dapat dilakukan dengan

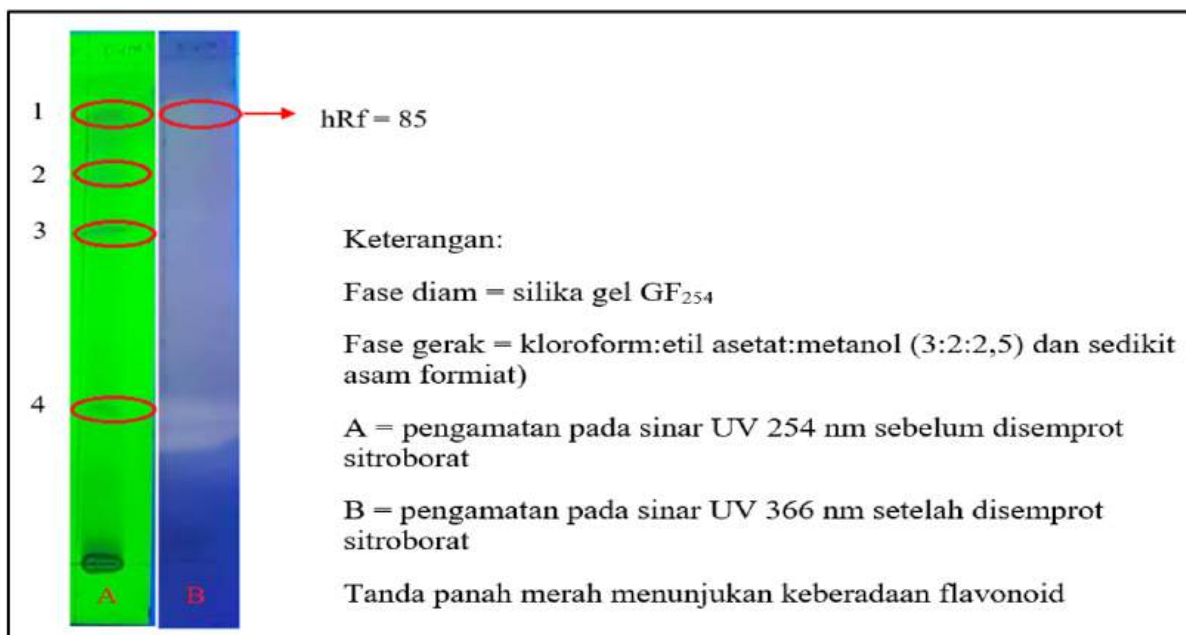
Tabel 1. Hasil ekstraksi dan fraksinasi

Sampel	Bobot (g)	Rendemen (%)
Ekstrak etanol 70%*	158,90	18,69
Hidrolisat**	8,8491	58,71
Fraksi etil asetat***	2,6072	40,37

*Dari 850 g serbuk simplisia

**Dari 15,0715 g ekstrak

***Dari 6,4585 g hidrolisat

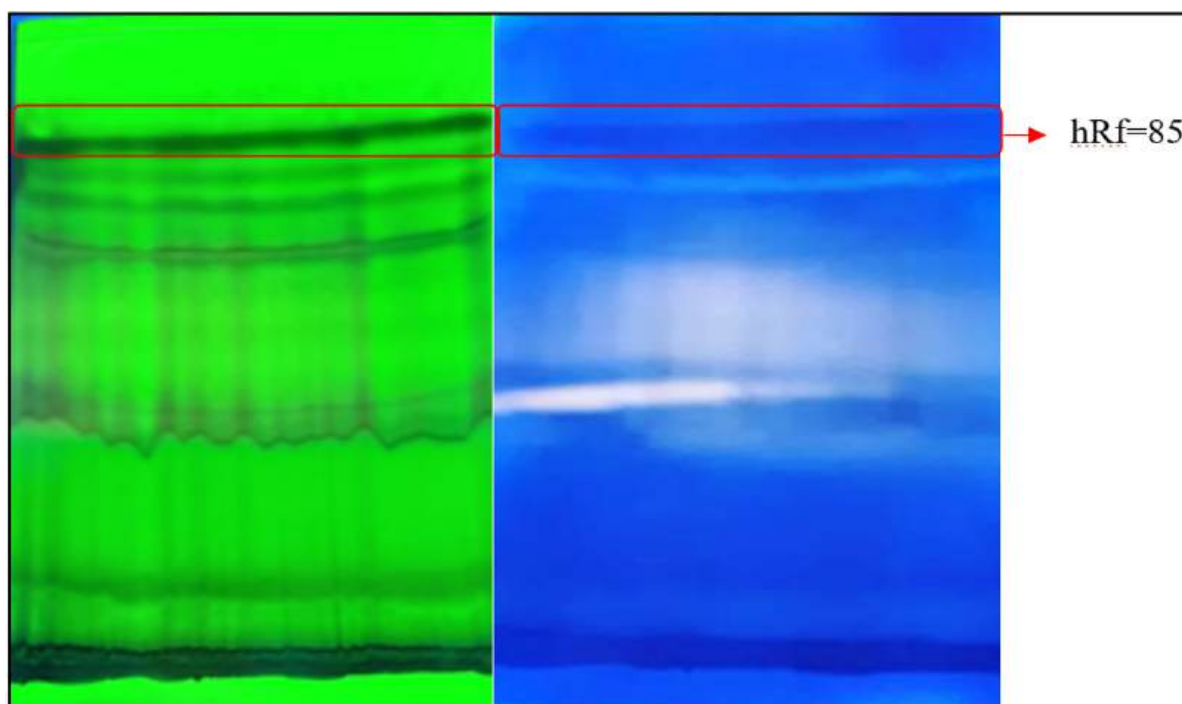


Gambar 2. Pola kromatogram KLT pada fraksi etil asetat

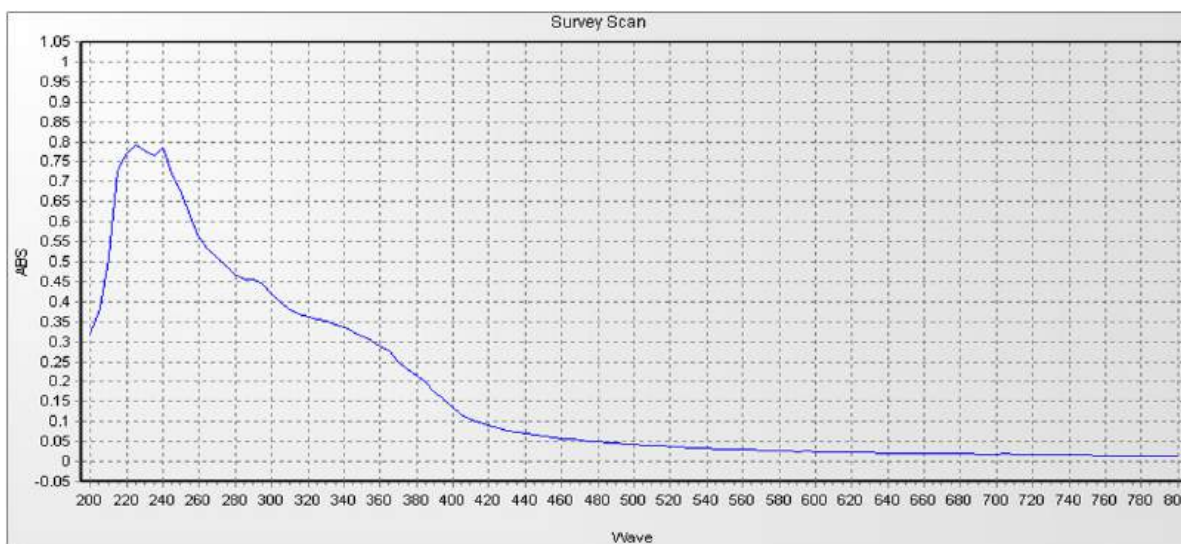
memanaskan campuran bahan dengan 2 N HCl-metanol.¹² Beberapa peneliti ada yang menambahkan asam askorbat di dalam prosedur tersebut untuk mencegah terjadinya oksidasi. Proses hidrolisis dapat dilakukan selama 2 jam pada suhu 80 °C atau lebih.^{12,16} Bentuk aglikon selanjutnya dapat diekstraksi dengan pelarut semipolar yaitu etil asetat.¹⁶ Berdasarkan hasil rendemen dari fraksi etil asetat dari hidrolisat pada Tabel 1,

menunjukkan bahwa fraksi ini mengandung sebagian besar senyawa aglikon dan sedikit glikosida. Kemampuan ini didasarkan pada polaritas etil asetat yang cukup besar karena adanya elektron π dan elektron pasangan bebas pada O.²⁰

Pengujian spektrofotometri yang didasarkan pada pembentukan kompleks aluminium adalah prosedur yang sering digunakan dalam penentuan kadar flavonoid.



Gambar 3. Pola kromatogram KLT preparatif pada fraksi etil asetat pada sinar UV 254 nm (kiri) dan pada sinar UV 365 nm (kanan)

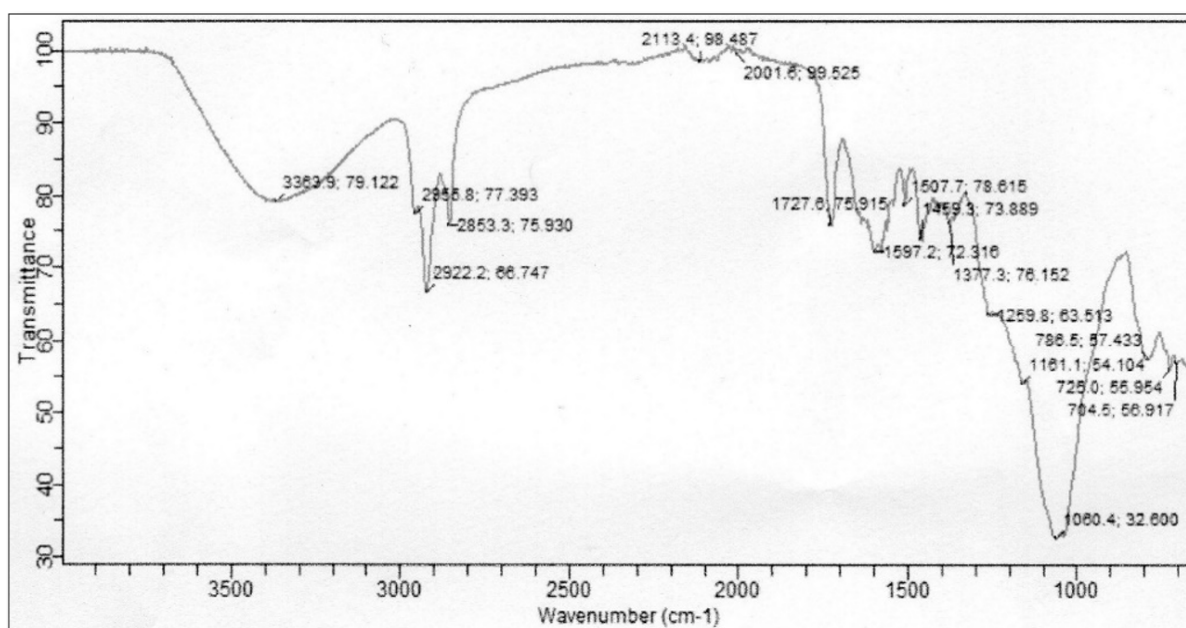


Gambar 4. Spektrum UV bercak 1

Sampel ini direaksikan dengan AlCl_3 dan memungkinkan pengukuran flavonoid totalnya setelah 2-60 menit dalam kisaran 404-430 nm.²³ Prinsipnya, kompleks stabil dari AlCl_3 dengan gugus keto C-4 dan C-3 atau C-5 hidroksil dari struktur flavonoid (flavon dan flavonol) dapat terbentuk setelah penambahan asam. Selain itu, AlCl_3 juga membentuk kompleks stabil dengan gugus ortohidroksil pada cincin A atau B dari flavonoid.²³

Antiradikal merupakan kemampuan senyawa kimia untuk bereaksi dengan radikal bebas.⁹ Senyawa bahan alam dengan aktivitas antiradikal umumnya dari kelompok fenolik. Kelompok fenolik (termasuk

flavonoid) memiliki struktur kimia yang mendukung proses peredaman radikal bebas.⁹ Pada flavonoid, ada beberapa faktor yang menentukan kapasitas antiradikalnya antara lain: (1) adanya gugus orto-dihidroksi pada cincin B mampu menyumbang elektron dan berpartisipasi dalam delokalisasi elektron, (2) adanya ikatan rangkap 2,3 dengan gugus 4-okso pada cincin C bertanggung jawab pada delokalisasi cincin B, (3) adanya gugus 3- dan 5-hidroksil dengan gugus 4-okso pada cincin A dan C ikut berperan dalam menangkalkan radikal, (4) adanya gugus 3-hidroksil^{9,24} Hasil dari studi ini, nilai IC_{50} fraksi etil asetat masih rendah dibandingkan dengan kuersetin sebagai pembanding terhadap peredaman



Gambar 5. Spektrum inframerah bercak 1

radikal DPPH. Senyawa antioksidan baik fenolik maupun flavonoid memberikan respon aktivitas antioksidan dan antiradikal berbeda (terkait mekanismenya) tergantung dari jenis ujinya.²⁵ Hal ini berkaitan dengan fakta bahwa tiap uji memiliki perbedaan spesifisitas pelarut, reagen, dan kondisi pH. Selain itu, sifat hidrofobik/hidrofilik substansi, ukuran molekul, dan jumlah (kuantitas) serta jenis dari gugus fungsi fenolik dan flavonoid yang diujikan juga ikut berperan pada hasil ujinya.⁹ Dengan demikian, diperlukan pengujian dengan metode selain DPPH pada fraksi etil asetat untuk membuktikan hal ini.

Pemisahan dengan KLT masih menjadi metode yang paling banyak digunakan untuk pemisahan disebabkan karena metode ini sederhana, praktis, dan ekonomis serta prosedur kerja yang mudah.²⁶ Hasil kromatogram KLT menunjukkan keberadaan senyawa flavonoid setelah disemprot dengan sitroborat. Sitroborat merupakan reagen yang terdiri atas asam borat dan asam sitrat dalam etanol. Reagen ini bereaksi dengan flavonoid dengan gugus ortho-hidroksi²⁷ dengan hasil positif berwarna kuning terang pada UV 366 nm.¹⁶

Prosedur pendekatan klarifikasi struktur senyawa dapat menggunakan spektroskopi. Spektroskopi UV-Visible dapat digunakan untuk menganalisis kualitatif kelas senyawa tertentu. Spektroskopi inframerah, misalnya *Fourier Transform Infrared Spectroscopy* (FTIR) merupakan metode dengan resolusi tinggi yang digunakan untuk mengidentifikasi kandungan kimia dengan cepat secara non-destruktif.^{21,28}

Spektroskopi serapan ultraviolet (UV) dari flavonoid memiliki dua serapan maksimal sekitar 300–350 dan 240–285 nm masing-masing sesuai dengan pita I dan II dari cincin A dan B. Sebagian besar flavon, isoflavon dan kalkon terhidroksilasi memberikan serapan maksimum pada 3300–3600 cm⁻¹ karena adanya gugus OH.⁸ Gugus karbonil (C=O) flavonoid diamati sekitar 1727 cm⁻¹. Serapan tajam dan intensitas tinggi teramati pada 1600 dan 1500 cm⁻¹ karena adanya ikatan rangkap pada cincin aromatik.^{8,29} Dengan demikian, dapat disimpulkan bahwa fraksi etil asetat hidrolisat

ekstrak etanol daun *Cordia* mengandung senyawa flavonoid mirip dengan kelompok kalkon. Spektrum UV kalkon mengandung dua pita serapan yang ditunjukkan pada Pita I (340 nm) dengan serapan sebesar 0,785 dan pita II (240 nm) dengan serapan sebesar 0,456. Pita I sering tampak pada 340–390 nm, meskipun terkadang sedikit perubahan atau puncak sering terjadi pada 300–320 nm. Pita II tampak pada 220–270 nm.³⁰ Secara farmakologi, kalkon memiliki khasiat yang luas seperti antidiabetes, antikanker, antiinflamasi, antimikroba, antioksidan, antiparasit, psikoaktif dan neuroprotektif.³¹

5. Kesimpulan

Fraksi etil asetat hasil hidrolisat ekstrak etanol 70% daun *Cordia* mengandung senyawa flavonoid yang memiliki aktivitas antiradikal DPPH. Flavonoid yang ditemukan memiliki kemiripan dengan kelompok kalkon berdasarkan analisis spektrum UV-sinar tampak dan inframerah. Studi lebih lanjut dalam pemisahan dan pemurnian senyawa ini masih perlu dilakukan kedepannya dengan teknik kromatografi lain dan untuk menentukan struktur molekul senyawa murni perlu menggunakan metode spektroskopi massa dan NMR yang mendukung pada penentuan struktur dari flavonoid.

Referensi

1. Łysiak GP. Ornamental Flowers Grown in Human Surroundings as a Source of Anthocyanins with High Anti-Inflammatory Properties. *Foods*. 2022;11(948).
2. Hanani E, Soewandi SHW, Hayati, Revita N. Pharmacognostical and preliminary phytochemical evaluation of *Cordia sebestena* L. *Pharmacogn J*. 2019;11(5):1100–5.
3. Adeosun CB, Bamigbade O I., Osho A, Atolani O. Volatile Composition of the Leaf, Flower and Fruit of *Cordia sebestena* (L.). *J Essent Oil-Bearing Plants*. 2015;18(4):976–81.
4. Osho A, Otuechere CA, Adeosun CB, Oluwagbemi T, Atolani O.

- Phytochemical, sub-acute toxicity, and antibacterial evaluation of *Cordia sebestena* leaf extracts. *J Basic Clin Physiol Pharmacol*. 2015;27(2):163–70.
5. Sunaryo H, Siska S, Hanani E, Anindita RS, Yanti N, Lisa. Evaluation of analgesic and anti-inflammatory activities of ethanolic extract of *Cordia sebestena* L. *Eur Pharm J*. 2020;66(2):26–31.
 6. Hikmawanti NPE, Hanani E, Sapitri Y, Ningrum W. Total Phenolic Content and Antioxidant Activity of Different Extracts of *Cordia sebestena* L. Leaves. *Pharmacogn J*. 2020;12(6):1311–6.
 7. Prakash S, Elavarasan N, Subashini K, Kanaga S, Dhandapani R, Sivanandam M, et al. Isolation of hesperetin - A flavonoid from *Cordia sebestena* flower extract through antioxidant assay guided method and its antibacterial, anticancer effect on cervical cancer via in vitro and in silico molecular docking studies. *J Mol Struct*. 2020;1207:127751.
 8. Awouafack MD, Tane P, Morita H. Isolation and Structure Characterization of Flavonoids. In: *Flavonoids - From Biosynthesis to Human Health*. Intech; 2017. p. 45–59.
 9. Huyut Z, Beydemir F., Gülçin E. Antioxidant and Antiradical Properties of Selected Flavonoids and Phenolic Compounds. *Biochem Res Int*. 2017;2017:1–10.
 10. Arifin B, Ibrahim S. Struktur, Bioaktivitas Dan Antioksidan Flavonoid. *J Zarah*. 2018;6(1):21–9.
 11. Alara OR, Abdurahman NH, Ukaegbu CI. Extraction of phenolic compounds: A review. *Curr Res Food Sci*. 2021;4(March):200–14.
 12. Bian Y, Zhang Y, Zhou Y, Li GH, Feng XS. Progress in the Pretreatment and Analysis of Flavonoids: An Update since 2013. *Sep Purif Rev*. 2022;51(1):11–37.
 13. Nuutila AM, Kammiovirta K, Oksman-Caldentey KM. Comparison of methods for the hydrolysis of flavonoids and phenolic acids from onion and spinach for HPLC analysis. *Food Chem*. 2002;76(4):519–25.
 14. Janabi AHW, Kamboh AA, Saeed M, Xiaoyu L, BiBi J, Majeed F, et al. Flavonoid-rich foods (FRF): A promising nutraceutical approach against lifespan-shortening diseases. *Iran J Basic Med Sci*. 2020;23(2):140–53.
 15. Kementerian Kesehatan RI. *Farmakope Herbal Indonesia Edisi II*. 2nd ed. Jakarta: Kementerian Kesehatan RI; 2017. 51–55 p.
 16. Hanani E. *Analisis Fitokimia*. Jakarta: Buku Kedokteran EGC; 2015. 34–45 p.
 17. Irianti T, Murti YB, Kanistri DN, Pratiwi DR, Kuswandi, Kusumaningtyas RA. DPPH Radical Scavenging Activity of Aqueous Fraction from Ethanolic Extract of Talok Fruit (*Muntingia calabura* L.). *Tradit Med J*. 2016;21(1):38–47.
 18. Hikmawanti NPE, Fatmawati S, Asri AW. The Effect of Ethanol Concentrations as The Extraction Solvent on Antioxidant Activity of Katuk (*Sauropus androgynus* (L.) Merr.) Leaves Extracts. *IOP Conf Ser Earth Environ Sci*. 2021;755(1):012060.
 19. Batool R, Khan MR, Sajid M, Ali S, Zahra Z. Estimation of phytochemical constituents and in vitro antioxidant potencies of *Brachychiton populneus* (Schott & Endl.) R. Br. *BMC Chem*. 2019;13(32):1–15.
 20. Houghton PJ, Raman A. *Laboratory Handbook for the Fractionation of Natural Extracts*. 1st ed. Laboratory Handbook for the Fractionation of Natural Extracts. Springer-Science+Business Media, B.V.; 1998. 14–16, 24–31, 39–52 p.
 21. Altemimi A, Lakhssassi N, Baharlouei A, Watson DG, Lightfoot DA. *Phytochemicals: Extraction, Isolation, and Identification of Bioactive Compounds from Plant Extracts*. *Plants*. 2017;6(42).
 22. Zhang Q-W, Lin L-G, Ye W-C. Techniques for extraction and isolation of natural products: A comprehensive review. *Chin Med*. 2018;13(20).
 23. Pękal A, Pyrzynska K. Evaluation of Aluminium Complexation Reaction for Flavonoid Content Assay. *Food Anal Methods*. 2014;7(9):1776–82.
 24. Gulcin İ. Antioxidants and antioxidant

- methods: an updated overview. *Arch Toxicol.* 2020;94(3):651–715.
25. Gulcin İ. Antioxidants and antioxidant methods: an updated overview. *Arch Toxicol.* 2020;94(3):651–715.
26. Sadeer NB, Montesano D, Albrizio S, Zengin G, Mahomoodally MF. The versatility of antioxidant assays in food science and safety—chemistry, applications, strengths, and limitations. *Antioxidants.* 2020;9(8):1–39.
27. Muyumba NW, Mutombo SC, Sheridan H, Nachtergaeel A, Duez P. Quality control of herbal drugs and preparations: The methods of analysis, their relevance and applications. *Talanta Open.* 2021;4:100070.
28. Sharma B, Agrawal SC, Gupta KC. Colour reactions of chalcones and their mechanism (A review). *Orient J Chem.* 2008;24(1):289–94.
29. Ingle KP, Deshmukh AG, Padole DA, Dudhare MS, Moharil MP, Khelurkar VC. Phytochemicals: Extraction methods, identification and detection of bioactive compounds from plant extracts. *J Pharmacogn Phytochem.* 2017;6(1):32–6.
30. PaviaDL, Lampman GM, Kriz GS, Vyvyan JR. Introduction to Spectroscopy. Fourth Edi. Canada: Brooks/Cole; 2001. 15–104p.
31. Aksöz BE, Ertan R. Spectral properties of chalcones II. *Fabad J Pharm Sci.* 2012;37(4):205–16.
32. Salehi B, Quispe C, Chamkhi I, El Omari N, Balahbib A, Sharifi-Rad J, et al. Pharmacological Properties of Chalcones: A Review of Preclinical Including Molecular Mechanisms and Clinical Evidence. *Front Pharmacol.* 2021;11(January).



Analysis of Flavonoids on Fraction from Hydrolysate of *Cordia Sebestena* L. Leaves Extract

Ni P. E. Hikmawanti^{1*}, Endang Hanani¹, dan Rini Mardiyanti¹

¹Program Studi Farmasi, Fakultas Farmasi dan Sains, Universitas Muhammadiyah Prof. DR. HAMKA, Jl. Delima II/IV
Klender, Jakarta Timur, DKI Jakarta 13460, Indonesia

Submitted 25 March 2022; Revised 22 January 2023; Accepted 15 March 2023; Published 01 February 2024

*Corresponding author: ermy0907@uhamka.ac.id

Abstract

Cordia sebestena L. contains flavonoids, that play a role in free radical scavenging activity. This study aimed to analyze the flavonoids in the hydrolyzed fraction of the 70% ethanol extract of *Cordia* leaves. The study was divided into 7 stages: (1) maceration using 70% ethanol, (2) acid hydrolysis of the ethanol extract, (3) fractionation of hydrolysate with ethyl acetate, (4) determination of total flavonoid content, (5) antiradical activity assay against 2,2'-diphenyl-1-picrylhydrazyl (DPPH), (6) thin layer chromatography (TLC) analysis, and (7) identification of flavonoid using UV-Visible Spectrophotometry and Infrared Spectroscopy. The total flavonoid content of the ethyl acetate fraction was 8.20 mgQE/g with an IC₅₀ value of 296.91 g/mL against DPPH radicals. There is one spot of flavonoids in the ethyl acetate fraction (hRf = 85.5). The UV-Vis spectrum on these spots obtained absorption at 340 nm (band I) and 240 nm (band II). The infrared spectrum shows a signal at 3363 cm⁻¹ (O-H stretching), 1727 cm⁻¹ (C=O), and 1060 cm⁻¹ strong (C-O). The ethyl acetate hydrolysate fraction of *Cordia* leaf contains flavonoid similar to the chalcone group. Further analysis is needed using ¹H NMR or FTIR data from a known chalcone as a standard to confirm the flavonoid.

Keywords: Acid hydrolysis; Boraginaceae; *Cordia*; Ethyl acetate fraction; Flavonoids

Analisis Flavonoid pada Fraksi Hasil Hidrolisat Ekstrak Daun *Cordia sebestena* L.

Abstrak

Cordia sebestena L. mengandung flavonoid yang berperan dalam aktivitas peredaman radikal bebas. Penelitian ini bertujuan menganalisis senyawa flavonoid pada fraksi hasil hidrolisat ekstrak etanol 70% daun *Cordia*. Penelitian terbagi menjadi 7 tahapan, yaitu (1) maserasi daun menggunakan etanol 70%, (2) hidrolisis asam pada ekstrak, (3) fraksinasi hidrolisat dengan etil asetat, (4) penentuan kadar flavonoid total dengan kolorimetri, (5) pengujian aktivitas antiradikal terhadap 2,2'-difenil-1-pikrilhidrazil (DPPH), (6) pemisahan menggunakan kromatografi lapis tipis (KLT), dan (7) identifikasi flavonoid menggunakan spektrofotometri UV-Vis dan infra merah. Kadar flavonoid total fraksi etil asetat sebesar 8,20 mgQE/g dengan nilai IC₅₀ terhadap radikal DPPH sebesar 296,91 µg/mL. Ada satu bercak flavonoid pada fraksi etil asetat (hRf = 85,5). Hasil spektrum UV-Vis pada bercak tersebut diperoleh serapan pada 340 nm (pita I) dan 240 nm (pita II). Spektrum infra merah menunjukkan adanya sinyal pada 3363 cm⁻¹ (O-H ulur), 1727 cm⁻¹ (C=O), dan 1060 cm⁻¹ kuat (C-O). Fraksi etil asetat hidrolisat ekstrak etanol daun *Cordia* mengandung senyawa flavonoid yang mirip dengan kelompok kalkon. Namun, diperlukan analisis lebih lanjut untuk memastikan bahwa flavonoid ini merupakan khalkon menggunakan data ¹H NMR atau FTIR dari senyawa khalkon yang telah diketahui.

Kata Kunci: Hidrolisis asam; Boraginaceae; *Cordia*; Fraksi etil asetat; Flavonoid;

1. Pendahuluan

Banyak tanaman hias berbunga merupakan sumber alami senyawa bioaktif yang bermanfaat untuk kesehatan manusia, terutama sebagai antioksidan. Meskipun demikian, ketertarikan pemanfaatan tanaman ini sebagai sumber makanan dan obat masih rendah. Padahal beberapa studi melaporkan bahwa tanaman hias memiliki potensi sebagai sumber flavonoid (terutama antosianin) sebagai antioksidan dan antiinflamasi.¹ *Cordia sebestena* L. (Boraginaceae) atau *Cordia* merupakan suatu tanaman hias. Daun *Cordia* mengandung senyawa fenolik, flavonoid, saponin, alkaloid, steroid/triterpenoid, dan tannin.² Daun *Cordia* juga mengandung senyawa volatil sebesar 0,05%.³ Daun *Cordia* memiliki beragam aktivitas farmakologi, antara lain antibakteri,⁴ analgetik, antiinflamasi,⁵ antioksidan,⁶ dan lain sebagainya. Studi mengenai toksisitas subakut dari ekstrak etil asetat daun *Cordia* menunjukkan bahwa ekstrak tersebut tidak toksik terhadap hati.⁴ Sebelumnya, telah diisolasi kandungan flavonoid hesperetin dari bunga *Cordia* dengan khasiat antibakteri dan antikanker terhadap kanker serviks *in vitro*.⁷ Namun, studi mengenai flavonoid dari daun *Cordia* belum banyak dieksplorasi.

Flavonoid merupakan kelompok fenolik dengan struktur inti C-15 (C6-C3-C6).⁸ Flavonoid merupakan kelas metabolit sekunder dari bahan alam sebagai nutrasetikal yang paling banyak digunakan pada pengobatan, makanan, suplemen dan lainnya.⁹ Meskipun studi mengenai isolasi maupun sintesisnya telah banyak, para peneliti masih tertarik meneliti flavonoid dan turunannya.¹⁰ Umumnya, flavonoid dapat diekstraksi dari pelarut air, etanol, metanol, n-butanol, aseton, etil asetat, kloroform dan lainnya.¹¹ Pelarut polar digunakan untuk memperoleh flavonoid bentuk glikosida, sedangkan pelarut non-polar untuk ekstraksi bentuk aglikonnya.⁸ Untuk memperoleh bentuk aglikon flavonoid umumnya dilakukan proses hidrolisis terhadap glikosida flavonoid dengan cara asam, basa, maupun enzimatis. Hidrolisis asam merupakan teknik sederhana, cepat dan ekonomis untuk mengubah suatu

glikosida menjadi aglikon.¹² Teknik ini sering kali dilakukan menggunakan HCl 2 N-metanol atau HCl 2M.¹² Hidrolisis glikosida flavonoid dari beberapa sampel sayuran dilaporkan baik dilakukan dengan metode hidrolisis asam menggunakan HCl 1,2 M dalam 50% metanol-air dengan penambahan asam askorbat sebagai pencegah oksidasi pada 80 °C selama 120 menit.¹³

Flavonoid merupakan suatu antioksidan yang secara alami ditemukan dalam bahan alam terutama tumbuhan.¹⁰ Selain itu, flavonoid juga berperan sebagai suatu nutrasetikal dengan khasiat antimikroba, antibakteri, antifungi, antivirus, antiulcer, hepatoprotektif, antiinflamasi, efek kardioprotektif, antineoplasma, dan lainnya.¹⁴ Banyaknya penemuan dan pengembangan obat baru dari flavonoid yang berasal dari tanaman menjadi alasan dilakukannya penelitian ini. Penelitian ini bertujuan melakukan analisis senyawa flavonoid pada fraksi etil asetat hasil hidrolisis ekstrak etanol 70% daun *Cordia* sekaligus menentukan aktivitas antiradikalnya.

2. Metode

2.1. Alat

Alat-alat yang digunakan pada penelitian ini meliputi toples maserasi, ayakan no. mesh 40, timbangan analitik (Ohaus), mikropipet (Eppendorf), *vacuum rotary evaporator* (Eyela N-1100, Cina), oven (Mettler UN-55), chamber (Camag), kotak UV (Camag), ultrasonik (Branson 5510), spektrofotometer UV-Vis (UV-1601 Series, Shimadzu, Japan), dan spektrometer FTIR (Agilent Cary 630, USA).

2.2. Bahan

Etanol 70%, etil asetat, metanol, kloroform pada tingkat analitik (Merck, Jerman) digunakan sebagai pelarut. Bahan lain yang digunakan antara lain plat KLT GF₂₅₄ (Merck, Jerman), DPPH, AlCl₃ 10%, kalium asetat, kuersetin (Sigma-Aldrich Co., USA), HCl 2N, Na₂SO₄, asam formiat, dan aquades.

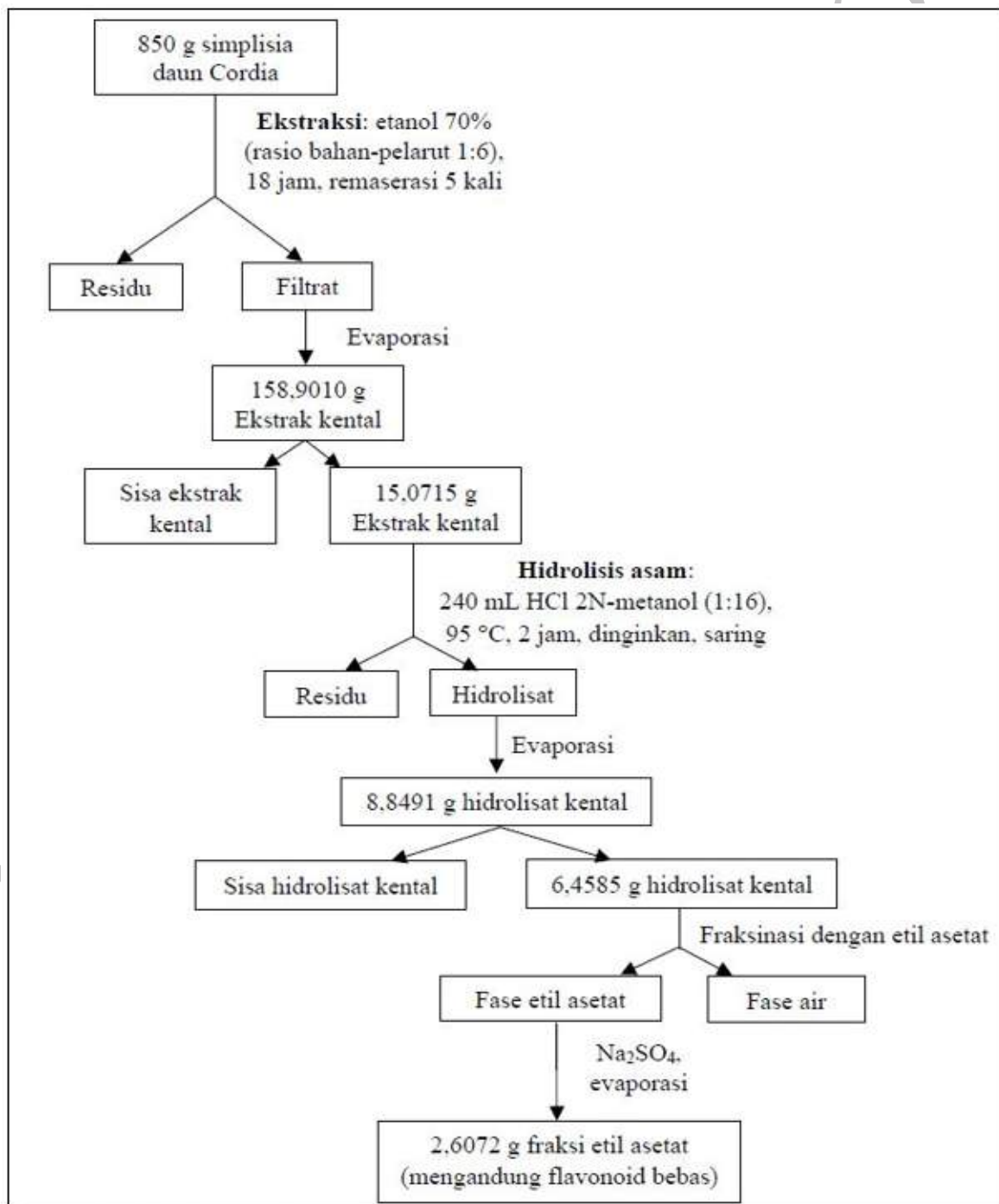
2.3. Metode

2.3.1. Ekstraksi

Daun Cordia diperoleh dari pekarangan rumah warga di sekitar Jakarta Timur. Sebelumnya, tanaman telah dideterminasi di Lembaga Ilmu Pengetahuan Indonesia (*Indonesian Institute of Sciences*), Pusat Penelitian Biologi (*Research Center for Biology*), *Cibinong Sciences Center*, Cibinong. Sampel daun segar (2,5 kg) dibuat simplisia menggunakan oven pada 50 °C. Blender elektrik digunakan untuk menghaluskan simplisia menjadi serbuk untuk selanjutnya

diayak dengan ayakan no. mesh 40. Serbuk kemudian disimpan dalam wadah kering tertutup rapat.¹⁵

Serbuk simplisia (850 g) diekstraksi menggunakan metode maserasi dengan pelarut etanol 70% (dengan rasio bahan-pelarut 1:6) selama 18 jam sambil sesekali diaduk. Ampas yang telah dipisahkan dari filtrat kemudian diremaserasi sampai pemeriksaan terhadap kandungan flavonoid didalamnya memberikan hasil negatif. Filtrat diuapkan pelarutnya menggunakan vacuum



Gambar 1. Skema prosedur pemisahan

rotary evaporator pada 50 °C. Evaporasi dilanjutkan dengan penangas air pada 50 °C hingga diperoleh ekstrak kental.¹⁵ Ekstrak dihitung persentase rendemen dan dilakukan penapisan fitokimia sederhana mengikuti prosedur pada Hanani (2015).¹⁶ Skema prosedur ekstraksi dapat dilihat pada Gambar 1.

2.3.2. Hidrolisis Ekstrak

Ekstrak etanol sebanyak 15,0715 g dicampurkan dengan 240 mL HCl 2N-metanol (dengan rasio bahan-pelarut 1:16) di dalam labu alas bulat. Campuran dipanaskan pada 95 °C selama 2 jam. Setelah dingin, campuran disaring dan dipekatkan di atas penangas air pada 60 °C hingga diperoleh hidrolisat kental.¹⁷

2.3.3. Fraksinasi dari hasil hidrolisat

Hidrolisat sebanyak 6,45 g dilarutkan dalam 20 mL metanol dan 20 mL aquadest, dan kemudian dimasukkan ke dalam corong pisah. Selanjutnya, campuran difraksinasi menggunakan etil asetat sebanyak 40 mL. Setelah dikocok perlahan dan didiamkan sesaat, fase air (lapisan bawah) dan fase etil asetat (lapisan atas) masing-masing dipisahkan dan dikumpulkan. Fraksi etil asetat disaring menggunakan Na₂SO₄. Fraksi tersebut dipekatkan di atas penangas air dengan suhu 40 °C.¹⁷

2.3.4. Penetapan kadar flavonoid total fraksi

Penetapan kadar flavonoid total dengan metode kolorimetri.¹⁸ Kuersetin digunakan untuk membuat kurva kalibrasi. Kuersetin (1000 µg/mL) dalam metanol kemudian diencerkan hingga diperoleh larutan seri konsentrasi 26, 44, 62, 80, dan 98 µg/mL. Fraksi etil asetat disiapkan dalam metanol (1000 µg/mL). Larutan uji (0,5 mL) secara terpisah dicampur dengan metanol (1,5 mL), AlCl₃ 10% (0,1 mL), kalium asetat 1 M (0,1 mL) dan aquades (2,8 mL), kemudian dihomogenkan. Setelah 30 menit diinkubasi pada suhu kamar, campuran tersebut diukur absorbansinya pada 440 nm menggunakan Spektrofotometer UV-Vis. Selanjutnya grafik hubungan absorbansi terhadap konsentrasi

standar kuersetin digunakan untuk memperoleh persamaan garis linear ($y = bx \pm a$). Persamaan ini selanjutnya digunakan untuk menetapkan konsentrasi flavonoid dalam larutan uji. Selanjutnya, prosedur mereaksikan yang sama dilakukan pada larutan uji fraksi etil asetat 6000 µg/mL (0,5 mL) dalam metanol untuk menentukan kadar flavonoid total pada fraksi tersebut. Pengujian dilakukan triplo.

2.3.5. Penentuan aktivitas antiradikal bebas fraksi

Penentuan aktivitas antiradikal dilakukan terhadap DPPH dengan kuersetin sebagai pembanding mengikuti prosedur Batool et al., (2019)¹⁹ dengan sedikit modifikasi. Larutan DPPH disiapkan dalam metanol dengan konsentrasi 0,2 mM. Larutan fraksi etil asetat disiapkan dengan seri konsentrasi yaitu 50, 150, 250, 350, dan 450 µg/mL. Sedangkan, seri konsentrasi kuersetin sebagai pembanding adalah 2, 4, 6, 8, dan 10 µg/mL. Selanjutnya larutan uji sebanyak 1 mL (baik fraksi etil asetat maupun kuersetin) masing-masing secara terpisah dicampurkan dengan 4 mL DPPH. Campuran diinkubasi pada suhu ruang selama 30 menit dalam kondisi gelap. Absorbansi diukur pada 515 nm menggunakan Spektrofotometer UV-Vis. Pengujian dilakukan triplo. Kapasitas antiradikal dihitung berdasarkan persentase inhibisi terhadap radikal DPPH yang dihitung dengan cara: (absorbansi DPPH - absorbansi sampel) dibagi dengan absorbansi DPPH dikali 100%. Kemudian kurva persentase inhibisi DPPH terhadap konsentrasi masing-masing sampel digunakan untuk memperoleh persamaan garis linear ($y = bx \pm a$). Persamaan tersebut selanjutnya digunakan untuk menghitung konsentrasi sampel yang mampu menghambat 50% radikal DPPH (inhibition concentration 50, IC₅₀) yang dinyatakan dalam µg/mL.

2.3.6. Pemisahan dengan KLT preparatif

Sebelumnya, konfirmasi keberadaan flavonoid dalam fraksi etil asetat dilakukan pada plat KLT GF₂₅₄. Fase gerak yang digunakan adalah kloroform:etil asetat:metanol (3:2:2,5)

dengan penambahan sedikit asam formiat. Pereaksi semprot sitroborat digunakan untuk mendeteksi golongan senyawa flavonoid. Pemisahan flavonoid pada fraksi etil asetat selanjutnya dilakukan pada plat KLT preparatif menggunakan fase gerak yang sama. Visualisasi bercak dipantau pada sinar UV 254 dan 366 nm tanpa disemprot sitroborat. Bercak dihitung nilai R_f -nya dengan cara membagi jarak rambat bercak (cm) dengan jarak rambat eluen (cm) dikali 100.

2.3.7. Analisis senyawa flavonoid

Bercak yang diperoleh dari hasil KLT preparatif dikerok dan dilarutkan dalam metanol dengan bantuan ultrasonik selama 15 menit. Filtrat disaring dengan kapas dan kertas saring. Filtrat kemudian diidentifikasi menggunakan spektrofotometer UV-Vis maupun FTIR.

3. Hasil

Hasil identifikasi kualitatif menunjukkan bahwa ekstrak etanol 70% daun Cordia terdeteksi senyawa alkaloid, fenolik, flavonoid, tanin, dan saponin. Hasil ekstraksi dan fraksinasi hidrolisat disajikan pada Tabel 1. Kadar flavonoid total fraksi etil asetat diperoleh sebesar 8,20 mgQE/g. Selanjutnya, pengujian aktivitas antiradikal dilakukan terhadap DPPH menggunakan spektrofotometer UV-Vis. Nilai IC_{50} kuersetin adalah 7,028 μ g/mL, sedangkan IC_{50} fraksi etil asetat adalah 296,91 μ g/mL. Hal ini menunjukkan bahwa fraksi etil asetat memiliki aktivitas antiradikal namun belum sebanding dengan kuersetin sebagai standar/pembanding.

Gambar 2 menunjukkan pola KLT fraksi etil asetat untuk konfirmasi keberadaan

golongan senyawa flavonoid sebelum dilakukan KLT preparatif. Terdapat 4 bercak yang terdeteksi pada sinar 254 nm (sebelum disemprot sitroborat), sedangkan pada 366 nm (setelah disemprot sitroborat) hanya ditemukan 1 bercak dominan berwarna kuning yang disimpulkan bahwa bercak tersebut merupakan suatu flavonoid.¹⁶ Gambar 3 menunjukkan pola kromatogram dari KLT preparatif. Bercak yang tampak kemudian dianalisis lebih lanjut menggunakan spektrofotometer UV-Vis dan FTIR.

Hasil spektrum UV-Vis pada bercak 1 (Gambar 4) diperoleh serapan pada 340 nm (pita I) dan 240 nm (pita II). Sedangkan spektrum infra merah (Gambar 5) menunjukkan adanya sinyal pada 3363 cm^{-1} melebar (O–H ulur), 1727 cm^{-1} (C=O), 1459 cm^{-1} tajam dengan intensitas lemah dan 1060 cm^{-1} kuat (C–O).

4. Pembahasan

Hasil identifikasi kualitatif ekstrak etanol daun Cordia pada penelitian ini sesuai dengan penelitian Hanani et al., (2019).² Etanol memiliki kemampuan menarik senyawa polifenol, flavonoid, tanin, terpenoid, steroid, dan alkaloid. Polaritas etanol berkaitan dengan keberadaan gugus OH pada strukturnya.^{20,21} Kandungan flavonoid terdeteksi lebih tinggi dalam etanol yang bercampur dengan air pada konsentrasi 70% dibanding etanol absolut.^{21,22} Umumnya, flavonoid pada tumbuhan berada pada bentuk glikosidanya dibandingkan bentuk aglikon. Dengan demikian, prosedur ekstraksi flavonoid dapat dilakukan dengan menggunakan teknik hidrolisis.^{12,16}

Hidrolisis dilakukan untuk melepaskan gula pada glikosida dengan cara asam, basa maupun enzimatis. Hidrolisis asam pada glikosida flavonoid dapat dilakukan dengan

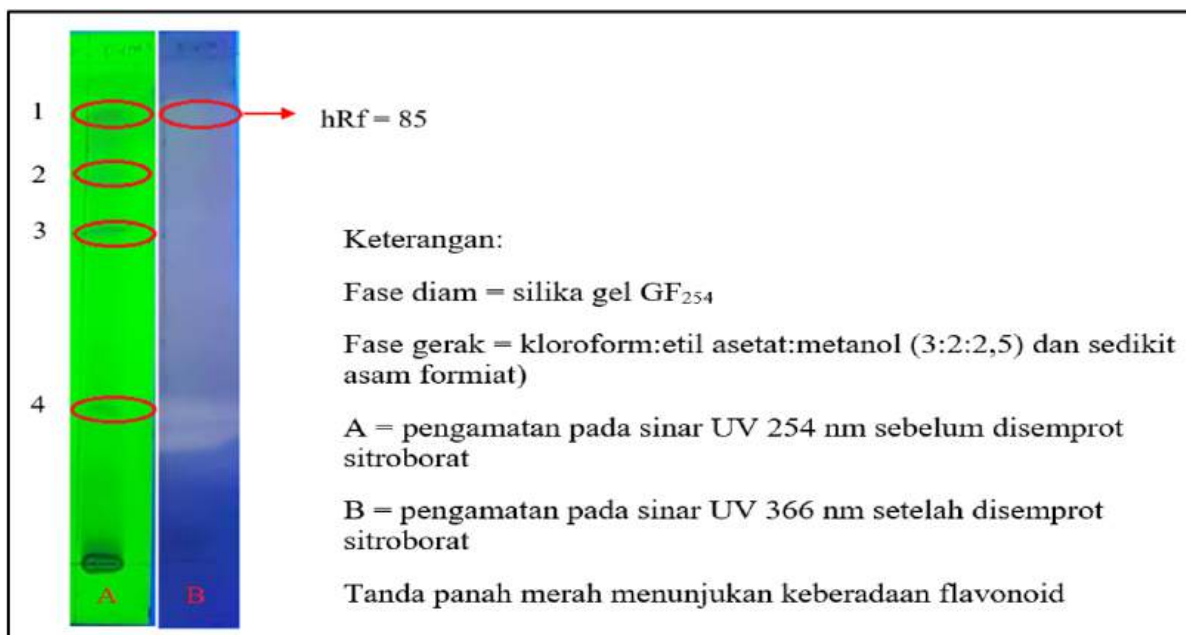
Tabel 1. Hasil ekstraksi dan fraksinasi

Sampel	Bobot (g)	Rendemen (%)
Ekstrak etanol 70%*	158,90	18,69
Hidrolisat**	8,8491	58,71
Fraksi etil asetat***	2,6072	40,37

*Dari 850 g serbuk simplisia

**Dari 15,0715 g ekstrak

***Dari 6,4585 g hidrolisat

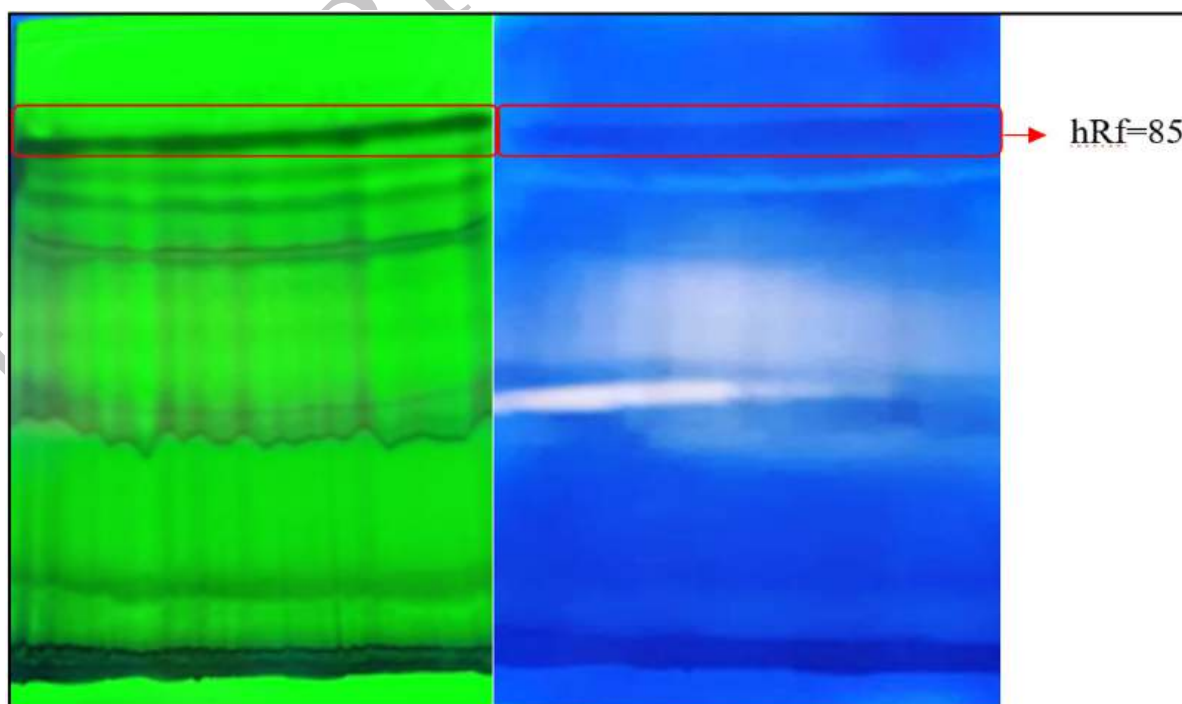


Gambar 2. Pola kromatogram KLT pada fraksi etil asetat

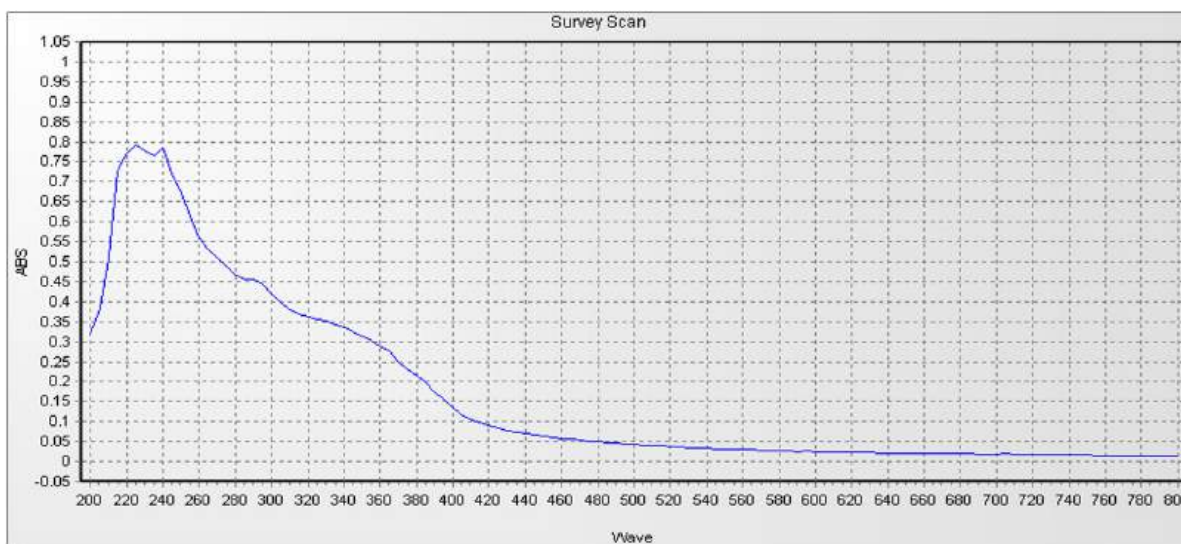
memanaskan campuran bahan dengan 2 N HCl-metanol.¹² Beberapa peneliti ada yang menambahkan asam askorbat di dalam prosedur tersebut untuk mencegah terjadinya oksidasi. Proses hidrolisis dapat dilakukan selama 2 jam pada suhu 80 °C atau lebih.^{12,16} Bentuk aglikon selanjutnya dapat diekstraksi dengan pelarut semipolar yaitu etil asetat.¹⁶ Berdasarkan hasil rendemen dari fraksi etil asetat dari hidrolisat pada Tabel 1,

menunjukkan bahwa fraksi ini mengandung sebagian besar senyawa aglikon dan sedikit glikosida. Kemampuan ini didasarkan pada polaritas etil asetat yang cukup besar karena adanya elektron π dan elektron pasangan bebas pada O.²⁰

Pengujian spektrofotometri yang didasarkan pada pembentukan kompleks aluminium adalah prosedur yang sering digunakan dalam penentuan kadar flavonoid.



Gambar 3. Pola kromatogram KLT preparatif pada fraksi etil asetat pada sinar UV 254 nm (kiri) dan pada sinar UV 365 nm (kanan)

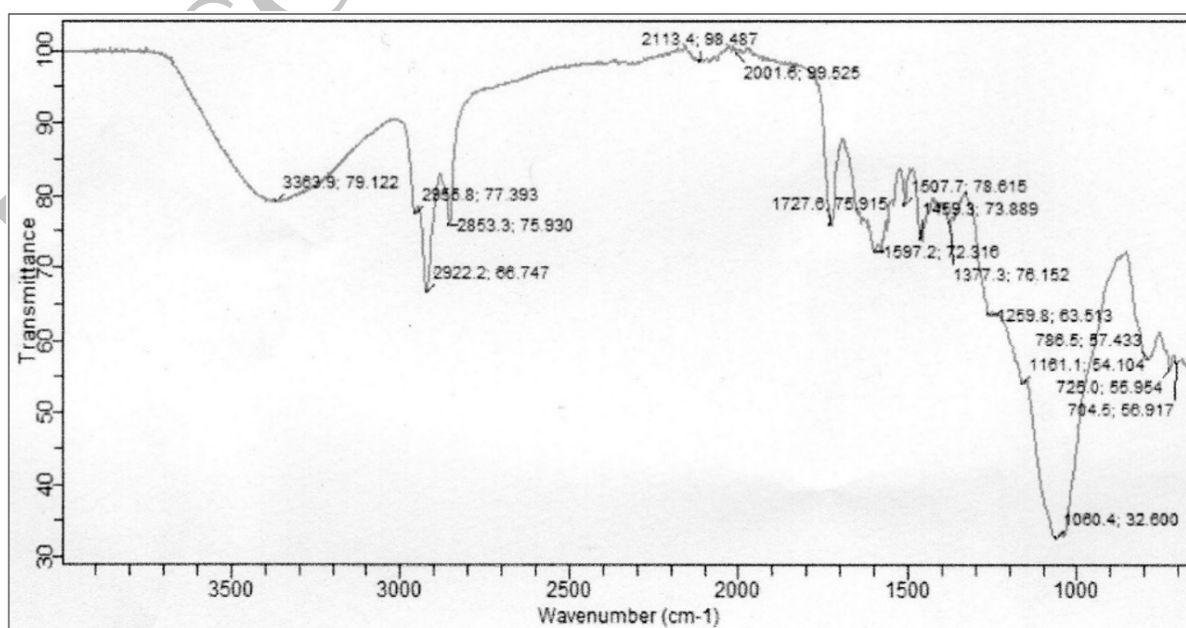


Gambar 4. Spektrum UV bercak 1

Sampel ini direaksikan dengan AlCl_3 dan memungkinkan pengukuran flavonoid totalnya setelah 2-60 menit dalam kisaran 404-430 nm.²³ Prinsipnya, kompleks stabil dari AlCl_3 dengan gugus keto C-4 dan C-3 atau C-5 hidroksil dari struktur flavonoid (flavon dan flavonol) dapat terbentuk setelah penambahan asam. Selain itu, AlCl_3 juga membentuk kompleks stabil dengan gugus ortohidroksil pada cincin A atau B dari flavonoid.²³

Antiradikal merupakan kemampuan senyawa kimia untuk bereaksi dengan radikal bebas.⁹ Senyawa bahan alam dengan aktivitas antiradikal umumnya dari kelompok fenolik. Kelompok fenolik (termasuk

flavonoid) memiliki struktur kimia yang mendukung proses peredaman radikal bebas.⁹ Pada flavonoid, ada beberapa faktor yang menentukan kapasitas antiradikalnya antara lain: (1) adanya gugus orto-dihidroksi pada cincin B mampu menyumbang elektron dan berpartisipasi dalam delokalisasi elektron, (2) adanya ikatan rangkap 2,3 dengan gugus 4-okso pada cincin C bertanggung jawab pada delokalisasi cincin B, (3) adanya gugus 3- dan 5-hidroksil dengan gugus 4-okso pada cincin A dan C ikut berperan dalam menangkalkan radikal, (4) adanya gugus 3-hidroksil^{9,24} Hasil dari studi ini, nilai IC_{50} fraksi etil asetat masih rendah dibandingkan dengan kuersetin sebagai pembanding terhadap peredaman



Gambar 5. Spektrum inframerah bercak 1

radikal DPPH. Senyawa antioksidan baik fenolik maupun flavonoid memberikan respon aktivitas antioksidan dan antiradikal berbeda (terkait mekanismenya) tergantung dari jenis ujinya.²⁵ Hal ini berkaitan dengan fakta bahwa tiap uji memiliki perbedaan spesifisitas pelarut, reagen, dan kondisi pH. Selain itu, sifat hidrofobik/hidrofilik substansi, ukuran molekul, dan jumlah (kuantitas) serta jenis dari gugus fungsi fenolik dan flavonoid yang diujikan juga ikut berperan pada hasil ujinya.⁹ Dengan demikian, diperlukan pengujian dengan metode selain DPPH pada fraksi etil asetat untuk membuktikan hal ini.

Pemisahan dengan KLT masih menjadi metode yang paling banyak digunakan untuk pemisahan disebabkan karena metode ini sederhana, praktis, dan ekonomis serta prosedur kerja yang mudah.²⁶ Hasil kromatogram KLT menunjukkan keberadaan senyawa flavonoid setelah disemprot dengan sitroborat. Sitroborat merupakan reagen yang terdiri atas asam borat dan asam sitrat dalam etanol. Reagen ini bereaksi dengan flavonoid dengan gugus ortho-hidroksi²⁷ dengan hasil positif berwarna kuning terang pada UV 366 nm.¹⁶

Prosedur pendekatan klarifikasi struktur senyawa dapat menggunakan spektroskopi. Spektroskopi UV-Visible dapat digunakan untuk menganalisis kualitatif kelas senyawa tertentu. Spektroskopi inframerah, misalnya *Fourier Transform Infrared Spectroscopy* (FTIR) merupakan metode dengan resolusi tinggi yang digunakan untuk mengidentifikasi kandungan kimia dengan cepat secara non-destruktif.^{21,28}

Spektroskopi serapan ultraviolet (UV) dari flavonoid memiliki dua serapan maksimal sekitar 300–350 dan 240–285 nm masing-masing sesuai dengan pita I dan II dari cincin A dan B. Sebagian besar flavon, isoflavon dan kalkon terhidroksilasi memberikan serapan maksimum pada 3300–3600 cm⁻¹ karena adanya gugus OH.⁸ Gugus karbonil (C=O) flavonoid diamati sekitar 1727 cm⁻¹. Serapan tajam dan intensitas tinggi teramati pada 1600 dan 1500 cm⁻¹ karena adanya ikatan rangkap pada cincin aromatik.^{8,29} Dengan demikian, dapat disimpulkan bahwa

fraksi etil asetat hidrolisat ekstrak etanol daun *Cordia* mengandung senyawa flavonoid mirip dengan kelompok kalkon. Spektrum UV kalkon mengandung dua pita serapan yang ditunjukkan pada Pita I (340 nm) dengan serapan sebesar 0,785 dan pita II (240 nm) dengan serapan sebesar 0,456. Pita I sering tampak pada 340–390 nm, meskipun terkadang sedikit perubahan atau puncak sering terjadi pada 300–320 nm.

Pita II tampak pada 220–270 nm³⁰. Secara farmakologi, kalkon memiliki khasiat yang luas seperti antidiabetes, antikanker, antiinflamasi, antimikroba, antioksidan, antiparasit, psikoaktif dan neuroprotektif.³¹

5. Conclusion

Fraksi etil asetat hasil hidrolisat ekstrak etanol 70% daun *Cordia* mengandung senyawa flavonoid yang memiliki aktivitas antiradikal DPPH. Flavonoid yang ditemukan memiliki kemiripan dengan kelompok kalkon berdasarkan analisis spektrum UV-sinar tampak dan inframerah. Studi lebih lanjut dalam pemisahan dan pemurnian senyawa ini masih perlu dilakukan kedepannya dengan teknik kromatografi lain dan untuk menentukan struktur molekul senyawa murni perlu menggunakan metode spektroskopi massa dan NMR yang mendukung pada penentuan struktur dari flavonoid.

Referensi

1. Łysiak GP. Ornamental Flowers Grown in Human Surroundings as a Source of Anthocyanins with High Anti-Inflammatory Properties. *Foods*. 2022;11(948).
2. Hanani E, Soewandi SHW, Hayati, Revita N. Pharmacognostical and preliminary phytochemical evaluation of *Cordia sebestena* L. *Pharmacogn J*. 2019;11(5):1100–5.
3. Adeosun CB, Bamigbade O I., Osho A, Atolani O. Volatile Composition of the Leaf, Flower and Fruit of *Cordia sebestena* (L.). *J Essent Oil-Bearing Plants*. 2015;18(4):976–81.
4. Osho A, Otuechere CA, Adeosun CB, Oluwagbemi T, Atolani O.

- Phytochemical, sub-acute toxicity, and antibacterial evaluation of *Cordia sebestena* leaf extracts. *J Basic Clin Physiol Pharmacol*. 2015;27(2):163–70.
5. Sunaryo H, Siska S, Hanani E, Anindita RS, Yanti N, Lisa. Evaluation of analgesic and anti-inflammatory activities of ethanolic extract of *Cordia sebestena* L. *Eur Pharm J*. 2020;66(2):26–31.
 6. Hikmawanti NPE, Hanani E, Sapitri Y, Ningrum W. Total Phenolic Content and Antioxidant Activity of Different Extracts of *Cordia sebestena* L. Leaves. *Pharmacogn J*. 2020;12(6):1311–6.
 7. Prakash S, Elavarasan N, Subashini K, Kanaga S, Dhandapani R, Sivanandam M, et al. Isolation of hesperetin - A flavonoid from *Cordia sebestena* flower extract through antioxidant assay guided method and its antibacterial, anticancer effect on cervical cancer via in vitro and in silico molecular docking studies. *J Mol Struct*. 2020;1207:127751.
 8. Awouafack MD, Tane P, Morita H. Isolation and Structure Characterization of Flavonoids. In: *Flavonoids - From Biosynthesis to Human Health*. Intech; 2017. p. 45–59.
 9. Huyut Z, Beydemir F., Gülçin E. Antioxidant and Antiradical Properties of Selected Flavonoids and Phenolic Compounds. *Biochem Res Int*. 2017;2017:1–10.
 10. Arifin B, Ibrahim S. Struktur, Bioaktivitas Dan Antioksidan Flavonoid. *J Zarah*. 2018;6(1):21–9.
 11. Alara OR, Abdurahman NH, Ukaegbu CI. Extraction of phenolic compounds: A review. *Curr Res Food Sci*. 2021;4(March):200–14.
 12. Bian Y, Zhang Y, Zhou Y, Li GH, Feng XS. Progress in the Pretreatment and Analysis of Flavonoids: An Update since 2013. *Sep Purif Rev*. 2022;51(1):11–37.
 13. Nuutila AM, Kammiovirta K, Oksman-Caldentey KM. Comparison of methods for the hydrolysis of flavonoids and phenolic acids from onion and spinach for HPLC analysis. *Food Chem*. 2002;76(4):519–25.
 14. Janabi AHW, Kamboh AA, Saeed M, Xiaoyu L, BiBi J, Majeed F, et al. Flavonoid-rich foods (FRF): A promising nutraceutical approach against lifespan-shortening diseases. *Iran J Basic Med Sci*. 2020;23(2):140–53.
 15. Kementerian Kesehatan RI. *Farmakope Herbal Indonesia Edisi II*. 2nd ed. Jakarta: Kementerian Kesehatan RI; 2017. 51–55 p.
 16. Hanani E. *Analisis Fitokimia*. Jakarta: Buku Kedokteran EGC; 2015. 34–45 p.
 17. Irianti T, Murti YB, Kanistri DN, Pratiwi DR, Kuswandi, Kusumaningtyas RA. DPPH Radical Scavenging Activity of Aqueous Fraction from Ethanolic Extract of Talok Fruit (*Muntingia calabura* L.). *Tradit Med J*. 2016;21(1):38–47.
 18. Hikmawanti NPE, Fatmawati S, Asri AW. The Effect of Ethanol Concentrations as The Extraction Solvent on Antioxidant Activity of Katuk (*Sauropus androgynus* (L.) Merr.) Leaves Extracts. *IOP Conf Ser Earth Environ Sci*. 2021;755(1):012060.
 19. Batool R, Khan MR, Sajid M, Ali S, Zahra Z. Estimation of phytochemical constituents and in vitro antioxidant potencies of *Brachychiton populneus* (Schott & Endl.) R. Br. *BMC Chem*. 2019;13(32):1–15.
 20. Houghton PJ, Raman A. *Laboratory Handbook for the Fractionation of Natural Extracts*. 1st ed. Laboratory Handbook for the Fractionation of Natural Extracts. Springer-Science+Business Media, B.V.; 1998. 14–16, 24–31, 39–52 p.
 21. Altemimi A, Lakhssassi N, Baharlouei A, Watson DG, Lightfoot DA. *Phytochemicals: Extraction, Isolation, and Identification of Bioactive Compounds from Plant Extracts*. *Plants*. 2017;6(42).
 22. Zhang Q-W, Lin L-G, Ye W-C. Techniques for extraction and isolation of natural products: A comprehensive review. *Chin Med*. 2018;13(20).
 23. Pękal A, Pyrzynska K. Evaluation of Aluminium Complexation Reaction for Flavonoid Content Assay. *Food Anal Methods*. 2014;7(9):1776–82.
 24. Gulcin İ. Antioxidants and antioxidant

- methods: an updated overview. *Arch Toxicol.* 2020;94(3):651–715.
25. Gulcin İ. Antioxidants and antioxidant methods: an updated overview. *Arch Toxicol.* 2020;94(3):651–715.
26. Sadeer NB, Montesano D, Albrizio S, Zengin G, Mahomoodally MF. The versatility of antioxidant assays in food science and safety—chemistry, applications, strengths, and limitations. *Antioxidants.* 2020;9(8):1–39.
27. Muyumba NW, Mutombo SC, Sheridan H, Nachtergaeel A, Duez P. Quality control of herbal drugs and preparations: The methods of analysis, their relevance and applications. *Talanta Open.* 2021;4:100070.
28. Sharma B, Agrawal SC, Gupta KC. Colour reactions of chalcones and their mechanism (A review). *Orient J Chem.* 2008;24(1):289–94.
29. Ingle KP, Deshmukh AG, Padole DA, Dudhare MS, Moharil MP, Khelurkar VC. Phytochemicals: Extraction methods, identification and detection of bioactive compounds from plant extracts. *J Pharmacogn Phytochem.* 2017;6(1):32–6.
30. Pavia DL, Lampman GM, Kriz GS, Vyvyan JR. Introduction to Spectroscopy. Fourth Edi. Canada: Brooks/Cole; 2001. 15–104p.
31. Aksöz BE, Ertan R. Spectral properties of chalcones II. *Fabad J Pharm Sci.* 2012;37(4):205–16.
32. Salehi B, Quispe C, Chamkhi I, El Omari N, Balahbib A, Sharifi-Rad J, et al. Pharmacological Properties of Chalcones: A Review of Preclinical Including Molecular Mechanisms and Clinical Evidence. *Front Pharmacol.* 2021;11(January).

**6. Bukti artikel telah terbit *online* pada website
Jurnal
(1 Februari 2024)**

Analisis Flavonoid pada Fraksi Hasil Hidrolisat Ekstrak Daun Cordia sebestena L.

Ni Putu Ermi Hikmawanti, Endang Hanani, Rini Mardiyanti

Sari

Cordia sebestena L. (Boraginaceae) atau Cordia merupakan tanaman hias dengan kandungan flavonoid. Penelitian ini bertujuan menganalisis senyawa flavonoid pada fraksi hasil hidrolisat ekstrak etanol 70% daun Cordia. Penelitian terbagi menjadi 7 tahapan, yaitu (1) maserasi daun menggunakan etanol 70%, (2) hidrolisis asam pada ekstrak dengan HCl 2N pada 95 °C selama 2 jam, (3) fraksinasi hidrolisat dengan etil asetat, (4) penentuan kadar flavonoid total dengan kolorimetri, (5) pengujian aktivitas antiradikal terhadap 2,2'-difenil-1-pikrilhidrazil (DPPH), (6) pemisahan flavonoid menggunakan kromatografi lapis tipis (KLT), dan (7) identifikasi flavonoid menggunakan spektrofotometri UV-Vis dan infra merah. Hasil menunjukkan kadar flavonoid total fraksi etil asetat sebesar 8,20 mgQE/g dengan nilai IC₅₀ terhadap radikal DPPH sebesar 296,91 µg/mL. Kromatogram KLT menunjukkan keberadaan satu bercak senyawa pada fraksi etil asetat dengan nilai R_f adalah 85,5. Hasil spektrum UV-Vis pada bercak tersebut diperoleh serapan pada 340 nm (pita I) dan 240 nm (pita II). Sedangkan spektrum infra merah menunjukkan adanya sinyal pada 3363 cm⁻¹ (O-H ulur), 1727 cm⁻¹ (C=O), 1459 cm⁻¹ (cincin aromatik) dan 1060 cm⁻¹ kuat (C-O). Dengan demikian, dapat disimpulkan bahwa fraksi etil asetat hidrolisat ekstrak etanol daun Cordia mengandung senyawa flavonoid yang mirip dengan kelompok kalkon.

Teks Lengkap:

[PDF](#)

Referensi

- Hanani E, Soewandi SHW, Hayati, Revita N. Pharmacognostical and preliminary phytochemical evaluation of Cordia sebestena L. Pharmacogn J. 2019;11(5):1100–5.
- Adeosun CB, Bamigbade O I., Osho A, Atolani O. Volatile Composition of the Leaf, Flower and Fruit of Cordia sebestena (L.). J Essent Oil-Bearing Plants. 2015;18(4):976–81.
- Osho A, Otuechere CA, Adeosun CB, Oluwagbemi T, Atolani O. Phytochemical, sub-acute toxicity, and antibacterial evaluation of Cordia sebestena leaf extracts. J Basic Clin Physiol Pharmacol. 2015;27(2):163–70.
- Sunaryo H, Siska S, Hanani E, Anindita RS, Yanti N, Lisa. Evaluation of analgesic and anti-inflammatory activities of ethanolic extract of Cordia sebestena L. Eur Pharm J. 2020;66(2):26–31.
- Hikmawanti NPE, Hanani E, Sapitri Y, Ningrum W. Total Phenolic Content and Antioxidant Activity of Different Extracts of Cordia sebestena L. Leaves. Pharmacogn J. 2020;12(6):1311–6.
- Prakash S, Elavarasan N, Subashini K, Kanaga S, Dhandapani R, Sivanandam M, et al. Isolation of hesperetin - A flavonoid from Cordia sebestena flower extract through antioxidant assay guided method and its antibacterial, anticancer effect on cervical cancer via in vitro and in silico molecular docking studies. J Mol Struct [Internet]. 2020;1207:127751. Available from: <https://doi.org/10.1016/j.molstruc.2020.127751>
- Awouafack MD, Tane P, Morita H. Isolation and Structure Characterization of Flavonoids. In: Flavonoids - From Biosynthesis to Human Health. Intech; 2017. p. 45–59.
- Bian Y, Zhang Y, Zhou Y, Li GH, Feng XS. Progress in the Pretreatment and Analysis of Flavonoids: An Update since 2013. Sep Purif Rev [Internet]. 2022;51(1):11–37. Available from: <https://doi.org/10.1080/15422119.2020.1801469>
- Stalikas CD. Extraction, separation, and detection methods for phenolic acids and flavonoids. J Sep Sci. 2007;30(18):3268–95.
- Nuutila AM, Kammiovirta K, Oksman-Caldentey KM. Comparison of methods for the hydrolysis of flavonoids and phenolic acids from onion and spinach for HPLC analysis. Food Chem. 2002;76(4):519–25.
- Heim KE, Tagliaferro AR, Bobilya DJ. Flavonoid antioxidants: Chemistry, metabolism and structure-activity relationships. J Nutr Biochem. 2002;13(10):572–84.
- Tapas AR, Sakarkar DM, Kakde RB. Flavonoids as Nutraceuticals: A Review. Trop J Pharm Res. 2008;7(3):1089–99.
- Kementerian Kesehatan RI. Farmakope Herbal Indonesia (FHI). 2nd ed. Jakarta: Kementerian Kesehatan RI; 2017.
- Hanani E. Analisis Fitokimia. Jakarta: Buku Kedokteran EGC; 2015. 34–45 p.
- Irianti T, Murti YB, Kanistri DN, Pratiwi DR, Kuswandi, Kusumaningtyas RA. DPPH Radical Scavenging Activity of Aqueous Fraction from Ethanolic Extract of Talok Fruit (Muntingia calabura L.). Tradit Med J. 2016;21(1):38–47.
- Chang C-C, Yang M-H, Wen H-M, Chern J-C. Estimation of total flavonoid content in propolis by two complementary colometric methods. J Food Drug Anal. 2002;10(3):178–82.

Batool R, Khan MR, Sajid M, Ali S, Zahra Z. Estimation of phytochemical constituents and in vitro antioxidant potencies of *Brachychiton populneus* (Schott & Endl.) R. Br. BMC Chem. 2019;13(32):1–15.

Tiwari, Prashant; Kumar, Bimlesh; Kaur, Mandeep; Kaur, Gurpreet; Kaur H. Phytochemical screening and Extraction: A Review. Int Pharm Sci. 2011;1(1):98–106.

Houghton PJ, Raman A. Laboratory Handbook for the Fractionation of Natural Extracts. 1st ed. Laboratory Handbook for the Fractionation of Natural Extracts. Springer-Science+Business Media, B.V.; 1998. 14–16, 24–31, 39–52 p.

Khoddami A, Wilkes MA, Roberts TH. Techniques for analysis of plant phenolic compounds. Molecules. 2013;18(2):2328–75.

Pełal A, Pyrzynska K. Evaluation of Aluminium Complexation Reaction for Flavonoid Content Assay. Food Anal Methods. 2014;7(9):1776–82.

Tirzitis G, Bartosz G. Determination of antiradical and antioxidant activity: basic principles and new insights. Acta Biochim Pol. 2010;57(1):139–42.

Dai J, Mumper RJ. Plant phenolics: Extraction, analysis and their antioxidant and anticancer properties. Molecules. 2010;15:7313–52.

Huyut Z, Beydemir F, Gülçin E. Antioxidant and Antiradical Properties of Selected Flavonoids and Phenolic Compounds. Biochem Res Int. 2017;2017:1–10.

Sharma B, Agrawal SC, Gupta KC. Colour reactions of chalcones and their mechanism (A review). Orient J Chem. 2008;24(1):289–94.

Altemimi A, Lakhssassi N, Baharlouei A, Watson DG, Lightfoot DA. Phytochemicals: Extraction, Isolation, and Identification of Bioactive Compounds from Plant Extracts. Plants. 2017;6(42).

Aksöz BE, Ertan R. Spectral properties of chalcones II. Fabad J Pharm Sci. 2012;37(4):205–16.

Salehi B, Quispe C, Chamkhi I, El Omari N, Balahbib A, Sharifi-Rad J, et al. Pharmacological Properties of Chalcones: A Review of Preclinical Including Molecular Mechanisms and Clinical Evidence. Front Pharmacol. 2021;11(January).

Hikmawanti NPE, Hayati, Andriyani Y. Kadar Flavonoid Total pada Ekstrak Hidro-etanolik Daun *Sauropus androgynus* (L.) Merr dari Tiga Daerah dengan Ketinggian yang Berbeda. J Jamu Indones. 2021;6(2):61–7.

DOI: <https://doi.org/10.24198/ijpst.v11i1.38849>

Refbacks

- Saat ini tidak ada refbacks.

[Switch to English](#)

[Back to Top](#)

[View My Stats](#)

Penerbit Universitas Padjadjaran



Jurnal ini terindeks di :



Creative Commons Attribution :



Indonesian Journal of Pharmaceutical Science and Technology by [Universitas Padjadjaran](#) is licensed under a [Creative Commons Attribution-NonCommercial 4.0 International License](#).

Based on a work at <http://jurnal.unpad.ac.id/ijpst/>



Analysis of Flavonoids on Fraction from Hydrolysate of *Cordia Sebestena* L. Leaves Extract

Ni P. E. Hikmawanti^{1*}, Endang Hanani¹, dan Rini Mardiyanti¹

¹Program Studi Farmasi, Fakultas Farmasi dan Sains, Universitas Muhammadiyah Prof. DR. HAMKA, Jl. Delima II/IV
Klender, Jakarta Timur, DKI Jakarta 13460, Indonesia

Submitted 25 March 2022; Revised 22 January 2023; Accepted 15 March 2023; Published 01 February 2024

*Corresponding author: ermy0907@uhamka.ac.id

Abstract

Cordia sebestena L. contains flavonoids, that play a role in free radical scavenging activity. This study aimed to analyze the flavonoids in the hydrolyzed fraction of the 70% ethanol extract of Cordia leaves. The study was divided into 7 stages: (1) maceration using 70% ethanol, (2) acid hydrolysis of the ethanol extract, (3) fractionation of hydrolysate with ethyl acetate, (4) determination of total flavonoid content, (5) antiradical activity assay against 2,2'-diphenyl-1-picrylhydrazyl (DPPH), (6) thin layer chromatography (TLC) analysis, and (7) identification of flavonoid using UV-Visible Spectrophotometry and Infrared Spectroscopy. The total flavonoid content of the ethyl acetate fraction was 8.20 mgQE/g with an IC₅₀ value of 296.91 g/mL against DPPH radicals. There is one spot of flavonoids in the ethyl acetate fraction (hRf = 85.5). The UV-Vis spectrum on the spot obtained absorption at 340 nm (band I) and 240 nm (band II). The infrared spectrum shows a signal at 3363 cm⁻¹ (O-H stretching), 1727 cm⁻¹ (C=O), and 1060 cm⁻¹ strong (C-O). The ethyl acetate hydrolysate fraction of Cordia leaf contains flavonoid similar to the chalcone group. Further analysis is needed using ¹H NMR or FTIR data from a known chalcone as a standard to confirm the flavonoid.

Keywords: Acid hydrolysis; Boraginaceae; Cordia; Ethyl acetate fraction; Flavonoids

Analisis Flavonoid pada Fraksi Hasil Hidrolisat Ekstrak Daun *Cordia sebestena* L.

Abstrak

Cordia sebestena L. mengandung flavonoid yang berperan dalam aktivitas peredaman radikal bebas. Penelitian ini bertujuan menganalisis senyawa flavonoid pada fraksi hasil hidrolisat ekstrak etanol 70% daun Cordia. Penelitian terbagi menjadi 7 tahapan, yaitu (1) maserasi daun menggunakan etanol 70%, (2) hidrolisis asam pada ekstrak, (3) fraksinasi hidrolisat dengan etil asetat, (4) penentuan kadar flavonoid total dengan kolorimetri, (5) pengujian aktivitas antiradikal terhadap 2,2'-difenil-1-pikrilhidrazil (DPPH), (6) pemisahan menggunakan kromatografi lapis tipis (KLT), dan (7) identifikasi flavonoid menggunakan spektrofotometri UV-Vis dan infra merah. Kadar flavonoid total fraksi etil asetat sebesar 8,20 mgQE/g dengan nilai IC₅₀ terhadap radikal DPPH sebesar 296,91 µg/mL. Ada satu bercak flavonoid pada fraksi etil asetat (hRf = 85,5). Hasil spektrum UV-Vis pada bercak tersebut diperoleh serapan pada 340 nm (pita I) dan 240 nm (pita II). Spektrum infra merah menunjukkan adanya sinyal pada 3363 cm⁻¹ (O-H ulur), 1727 cm⁻¹ (C=O), dan 1060 cm⁻¹ kuat (C-O). Fraksi etil asetat hidrolisat ekstrak etanol daun Cordia mengandung senyawa flavonoid yang mirip dengan kelompok kalkon. Namun, diperlukan analisis lebih lanjut untuk memastikan bahwa flavonoid ini merupakan khalkon menggunakan data ¹H NMR atau FTIR dari senyawa khalkon yang telah diketahui.

Kata Kunci: Hidrolisis asam; Boraginaceae; Cordia; Fraksi etil asetat; Flavonoid,

1. Pendahuluan

Banyak tanaman hias berbunga merupakan sumber alami senyawa bioaktif yang bermanfaat untuk kesehatan manusia, terutama sebagai antioksidan. Meskipun demikian, ketertarikan pemanfaatan tanaman ini sebagai sumber makanan dan obat masih rendah. Padahal beberapa studi melaporkan bahwa tanaman hias memiliki potensi sebagai sumber flavonoid (terutama antosianin) sebagai antioksidan dan antiinflamasi.¹ *Cordia sebestena* L. (Boraginaceae) atau *Cordia* merupakan suatu tanaman hias. Daun *Cordia* mengandung senyawa fenolik, flavonoid, saponin, alkaloid, steroid/triterpenoid, dan tannin.² Daun *Cordia* juga mengandung senyawa volatil sebesar 0,05%.³ Daun *Cordia* memiliki beragam aktivitas farmakologi, antara lain antibakteri,⁴ analgetik, antiinflamasi,⁵ antioksidan,⁶ dan lain sebagainya. Studi mengenai toksisitas subakut dari ekstrak etil asetat daun *Cordia* menunjukkan bahwa ekstrak tersebut tidak toksik terhadap hati.⁴ Sebelumnya, telah diisolasi kandungan flavonoid hesperetin dari bunga *Cordia* dengan khasiat antibakteri dan antikanker terhadap kanker serviks *in vitro*.⁷ Namun, studi mengenai flavonoid dari daun *Cordia* belum banyak dieksplorasi.

Flavonoid merupakan kelompok fenolik dengan struktur inti C-15 (C6-C3-C6).⁸ Flavonoid merupakan kelas metabolit sekunder dari bahan alam sebagai nutrasetikal yang paling banyak digunakan pada pengobatan, makanan, suplemen dan lainnya.⁹ Meskipun studi mengenai isolasi maupun sintesisnya telah banyak, para peneliti masih tertarik meneliti flavonoid dan turunannya.¹⁰ Umumnya, flavonoid dapat diekstraksi dari pelarut air, etanol, metanol, n-butanol, aseton, etil asetat, kloroform dan lainnya.¹¹ Pelarut polar digunakan untuk memperoleh flavonoid bentuk glikosida, sedangkan pelarut non-polar untuk ekstraksi bentuk aglikonnya.⁸ Untuk memperoleh bentuk aglikon flavonoid umumnya dilakukan proses hidrolisis terhadap glikosida flavonoid dengan cara asam, basa, maupun enzimatis. Hidrolisis asam merupakan teknik sederhana, cepat dan ekonomis untuk mengubah suatu

glikosida menjadi aglikon.¹² Teknik ini sering kali dilakukan menggunakan HCl 2 N-metanol atau HCl 2M.¹² Hidrolisis glikosida flavonoid dari beberapa sampel sayuran dilaporkan baik dilakukan dengan metode hidrolisis asam menggunakan HCl 1,2 M dalam 50% metanol-air dengan penambahan asam askorbat sebagai pencegah oksidasi pada 80 °C selama 120 menit.¹³

Flavonoid merupakan suatu antioksidan yang secara alami ditemukan dalam bahan alam terutama tumbuhan.¹⁰ Selain itu, flavonoid juga berperan sebagai suatu nutrasetikal dengan khasiat antimikroba, antibakteri, antifungi, antivirus, antiulcer, hepatoprotektif, antiinflamasi, efek kardioprotektif, antineoplasma, dan lainnya.¹⁴ Banyaknya penemuan dan pengembangan obat baru dari flavonoid yang berasal dari tanaman menjadi alasan dilakukannya penelitian ini. Penelitian ini bertujuan melakukan analisis senyawa flavonoid pada fraksi etil asetat hasil hidrolisis ekstrak etanol 70% daun *Cordia* sekaligus menentukan aktivitas antiradikalnya.

2. Metode

2.1. Alat

Alat-alat yang digunakan pada penelitian ini meliputi toples maserasi, ayakan no. mesh 40, timbangan analitik (Ohaus), mikropipet (Eppendorf), *vacuum rotary evaporator* (Eyela N-1100, Cina), oven (Mettler UN-55), chamber (Camag), kotak UV (Camag), ultrasonik (Branson 5510), spektrofotometer UV-Vis (UV-1601 Series, Shimadzu, Japan), dan spektrometer FTIR (Agilent Cary 630, USA).

2.2. Bahan

Etanol 70%, etil asetat, metanol, kloroform pada tingkat analitik (Merck, Jerman) digunakan sebagai pelarut. Bahan lain yang digunakan antara lain plat KLT GF₂₅₄ (Merck, Jerman), DPPH, AlCl₃ 10%, kalium asetat, kuersetin (Sigma-Aldrich Co., USA), HCl 2N, Na₂SO₄, asam formiat, dan aquades.

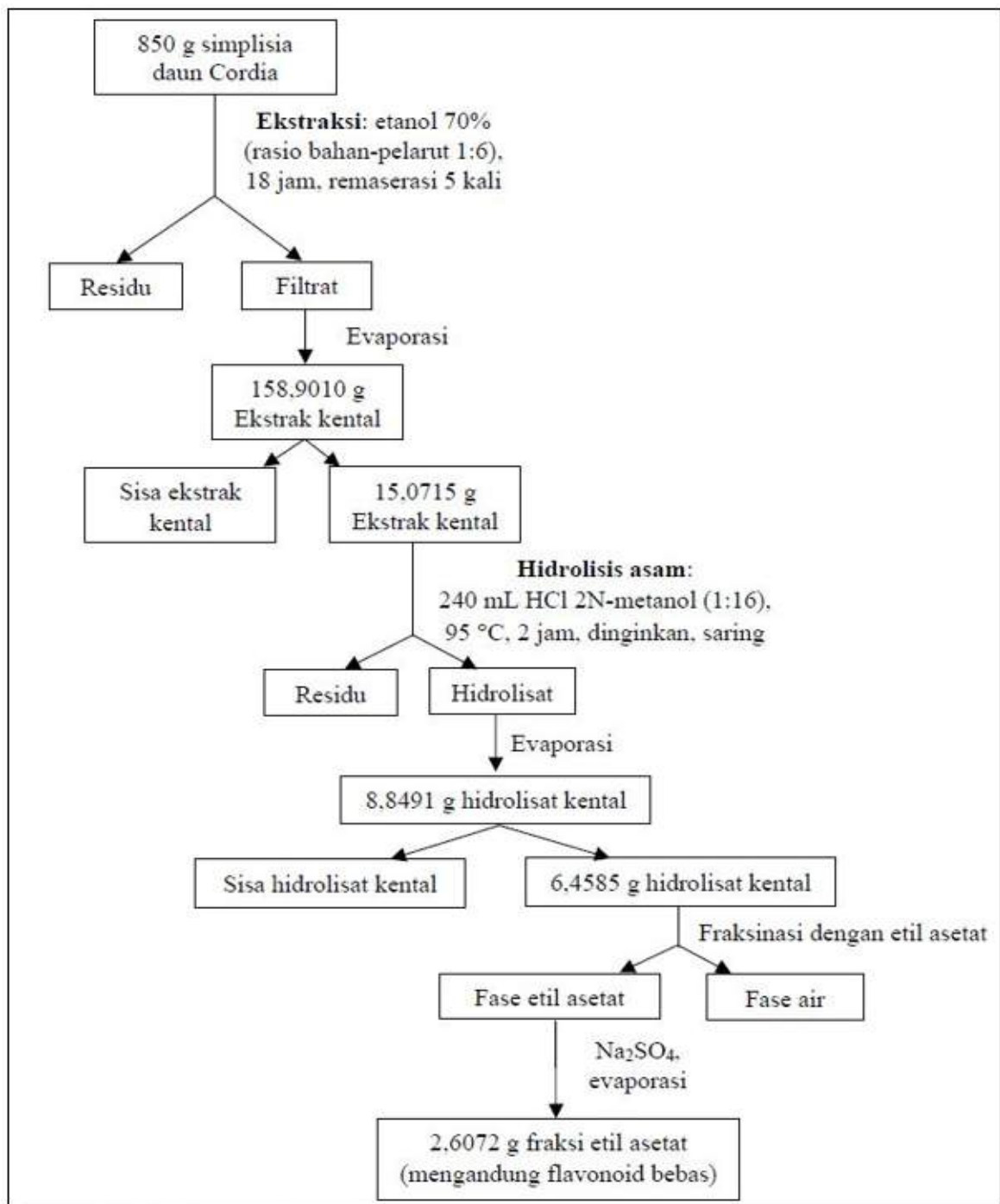
2.3. Metode

2.3.1. Ekstraksi

Daun *Cordia* diperoleh dari pekarangan rumah warga di sekitar Jakarta Timur. Sebelumnya, tanaman telah dideterminasi di Lembaga Ilmu Pengetahuan Indonesia (*Indonesian Institute of Sciences*), Pusat Penelitian Biologi (*Research Center for Biology*), *Cibinong Sciences Center*, Cibinong. Sampel daun segar (2,5 kg) dibuat simplisia menggunakan oven pada 50 °C. Blender elektrik digunakan untuk menghaluskan simplisia menjadi serbuk untuk selanjutnya

diayak dengan ayakan no. mesh 40. Serbuk kemudian disimpan dalam wadah kering tertutup rapat.¹⁵

Serbuk simplisia (850 g) diekstraksi menggunakan metode maserasi dengan pelarut etanol 70% (dengan rasio bahan-pelarut 1:6) selama 18 jam sambil sesekali diaduk. Ampas yang telah dipisahkan dari filtrat kemudian diremaserasi sampai pemeriksaan terhadap kandungan flavonoid didalamnya memberikan hasil negatif. Filtrat diuapkan pelarutnya menggunakan *vacuum*



Gambar 1. Skema prosedur pemisahan

rotary evaporator pada 50 °C. Evaporasi dilanjutkan dengan penangas air pada 50 °C hingga diperoleh ekstrak kental.¹⁵ Ekstrak dihitung persentase rendemen dan dilakukan penapisan fitokimia sederhana mengikuti prosedur pada Hanani (2015).¹⁶ Skema prosedur ekstraksi dapat dilihat pada Gambar 1.

2.3.2. Hidrolisis Ekstrak

Ekstrak etanol sebanyak 15,0715 g dicampurkan dengan 240 mL HCl 2N-metanol (dengan rasio bahan-pelarut 1:16) di dalam labu alas bulat. Campuran dipanaskan pada 95 °C selama 2 jam. Setelah dingin, campuran disaring dan dipekatkan di atas penangas air pada 60 °C hingga diperoleh hidrolisat kental.¹⁷

2.3.3. Fraksinasi dari hasil hidrolisat

Hidrolisat sebanyak 6,45 g dilarutkan dalam 20 mL metanol dan 20 mL aquadest, dan kemudian dimasukkan ke dalam corong pisah. Selanjutnya, campuran difraksinasi menggunakan etil asetat sebanyak 40 mL. Setelah dikocok perlahan dan didiamkan sesaat, fase air (lapisan bawah) dan fase etil asetat (lapisan atas) masing-masing dipisahkan dan dikumpulkan. Fraksi etil asetat disaring menggunakan Na₂SO₄. Fraksi tersebut dipekatkan di atas penangas air dengan suhu 40 °C.¹⁷

2.3.4. Penetapan kadar flavonoid total fraksi

Penetapan kadar flavonoid total dengan metode kolorimetri.¹⁸ Kuersetin digunakan untuk membuat kurva kalibrasi. Kuersetin (1000 µg/mL) dalam metanol kemudian diencerkan hingga diperoleh larutan seri konsentrasi 26, 44, 62, 80, dan 98 µg/mL. Fraksi etil asetat disiapkan dalam metanol (1000 µg/mL). Larutan uji (0,5 mL) secara terpisah dicampur dengan metanol (1,5 mL), AlCl₃ 10% (0,1 mL), kalium asetat 1 M (0,1 mL) dan aquades (2,8 mL), kemudian dihomogenkan. Setelah 30 menit diinkubasi pada suhu kamar, campuran tersebut diukur absorbansinya pada 440 nm menggunakan Spektrofotometer UV-Vis. Selanjutnya grafik hubungan absorbansi terhadap konsentrasi

standar kuersetin digunakan untuk memperoleh persamaan garis linear ($y = bx \pm a$). Persamaan ini selanjutnya digunakan untuk menetapkan konsentrasi flavonoid dalam larutan uji. Selanjutnya, prosedur mereaksikan yang sama dilakukan pada larutan uji fraksi etil asetat 6000 µg/mL (0,5 mL) dalam metanol untuk menentukan kadar flavonoid total pada fraksi tersebut. Pengujian dilakukan triplo.

2.3.5. Penentuan aktivitas antiradikal bebas fraksi

Penentuan aktivitas antiradikal dilakukan terhadap DPPH dengan kuersetin sebagai pembanding mengikuti prosedur Batool et al., (2019)¹⁹ dengan sedikit modifikasi. Larutan DPPH disiapkan dalam metanol dengan konsentrasi 0,2 mM. Larutan fraksi etil asetat disiapkan dengan seri konsentrasi yaitu 50, 150, 250, 350, dan 450 µg/mL. Sedangkan, seri konsentrasi kuersetin sebagai pembanding adalah 2, 4, 6, 8, dan 10 µg/mL. Selanjutnya larutan uji sebanyak 1 mL (baik fraksi etil asetat maupun kuersetin) masing-masing secara terpisah dicampurkan dengan 4 mL DPPH. Campuran diinkubasi pada suhu ruang selama 30 menit dalam kondisi gelap. Absorbansi diukur pada 515 nm menggunakan Spektrofotometer UV-Vis. Pengujian dilakukan triplo. Kapasitas antiradikal dihitung berdasarkan persentase inhibisi terhadap radikal DPPH yang dihitung dengan cara: (absorbansi DPPH - absorbansi sampel) dibagi dengan absorbansi DPPH dikali 100%. Kemudian kurva persentase inhibisi DPPH terhadap konsentrasi masing-masing sampel digunakan untuk memperoleh persamaan garis linear ($y = bx \pm a$). Persamaan tersebut selanjutnya digunakan untuk menghitung konsentrasi sampel yang mampu menghambat 50% radikal DPPH (inhibition concentration 50, IC₅₀) yang dinyatakan dalam µg/mL.

2.3.6. Pemisahan dengan KLT preparatif

Sebelumnya, konfirmasi keberadaan flavonoid dalam fraksi etil asetat dilakukan pada plat KLT GF₂₅₄. Fase gerak yang digunakan adalah kloroform:etil asetat:metanol (3:2:2,5)

dengan penambahan sedikit asam formiat. Pereaksi semprot sitroborat digunakan untuk mendeteksi golongan senyawa flavonoid. Pemisahan flavonoid pada fraksi etil asetat selanjutnya dilakukan pada plat KLT preparatif menggunakan fase gerak yang sama. Visualisasi bercak dipantau pada sinar UV 254 dan 366 nm tanpa disemprot sitroborat. Bercak dihitung nilai R_f -nya dengan cara membagi jarak rambat bercak (cm) dengan jarak rambat eluen (cm) dikali 100.

2.3.7. Analisis senyawa flavonoid

Bercak yang diperoleh dari hasil KLT preparatif dikerok dan dilarutkan dalam metanol dengan bantuan ultrasonik selama 15 menit. Filtrat disaring dengan kapas dan kertas saring. Filtrat kemudian diidentifikasi menggunakan spektrofotometer UV-Vis maupun FTIR.

3. Hasil

Hasil identifikasi kualitatif menunjukkan bahwa ekstrak etanol 70% daun Cordia terdeteksi senyawa alkaloid, fenolik, flavonoid, tanin, dan saponin. Hasil ekstraksi dan fraksinasi hidrolisat disajikan pada Tabel 1. Kadar flavonoid total fraksi etil asetat diperoleh sebesar 8,20 mgQE/g. Selanjutnya, pengujian aktivitas antiradikal dilakukan terhadap DPPH menggunakan spektrofotometer UV-Vis. Nilai IC_{50} kuersetin adalah 7,028 μ g/mL, sedangkan IC_{50} fraksi etil asetat adalah 296,91 μ g/mL. Hal ini menunjukkan bahwa fraksi etil asetat memiliki aktivitas antiradikal namun belum sebanding dengan kuersetin sebagai standar/pembanding.

Gambar 2 menunjukkan pola KLT fraksi etil asetat untuk konfirmasi keberadaan

golongan senyawa flavonoid sebelum dilakukan KLT preparatif. Terdapat 4 bercak yang terdeteksi pada sinar 254 nm (sebelum disemprot sitroborat), sedangkan pada 366 nm (setelah disemprot sitroborat) hanya ditemukan 1 bercak dominan berwarna kuning yang disimpulkan bahwa bercak tersebut merupakan suatu flavonoid.¹⁶ Gambar 3 menunjukkan pola kromatogram dari KLT preparatif. Bercak yang tampak kemudian dianalisis lebih lanjut menggunakan spektrofotometer UV-Vis dan FTIR.

Hasil spektrum UV-Vis pada bercak 1 (Gambar 4) diperoleh serapan pada 340 nm (pita I) dan 240 nm (pita II). Sedangkan spektrum infra merah (Gambar 5) menunjukkan adanya sinyal pada 3363 cm^{-1} melebar (O–H ulur), 1727 cm^{-1} (C=O), 1459 cm^{-1} tajam dengan intensitas lemah dan 1060 cm^{-1} kuat (C–O).

4. Pembahasan

Hasil identifikasi kualitatif ekstrak etanol daun Cordia pada penelitian ini sesuai dengan penelitian Hanani et al., (2019).² Etanol memiliki kemampuan menarik senyawa polifenol, flavonoid, tanin, terpenoid, steroid, dan alkaloid. Polaritas etanol berkaitan dengan keberadaan gugus OH pada strukturnya.^{20,21} Kandungan flavonoid terdeteksi lebih tinggi dalam etanol yang bercampur dengan air pada konsentrasi 70% dibanding etanol absolut.^{21,22} Umumnya, flavonoid pada tumbuhan berada pada bentuk glikosidanya dibandingkan bentuk aglikon. Dengan demikian, prosedur ekstraksi flavonoid dapat dilakukan dengan menggunakan teknik hidrolisis.^{12,16}

Hidrolisis dilakukan untuk melepaskan gula pada glikosida dengan cara asam, basa maupun enzimatis. Hidrolisis asam pada glikosida flavonoid dapat dilakukan dengan

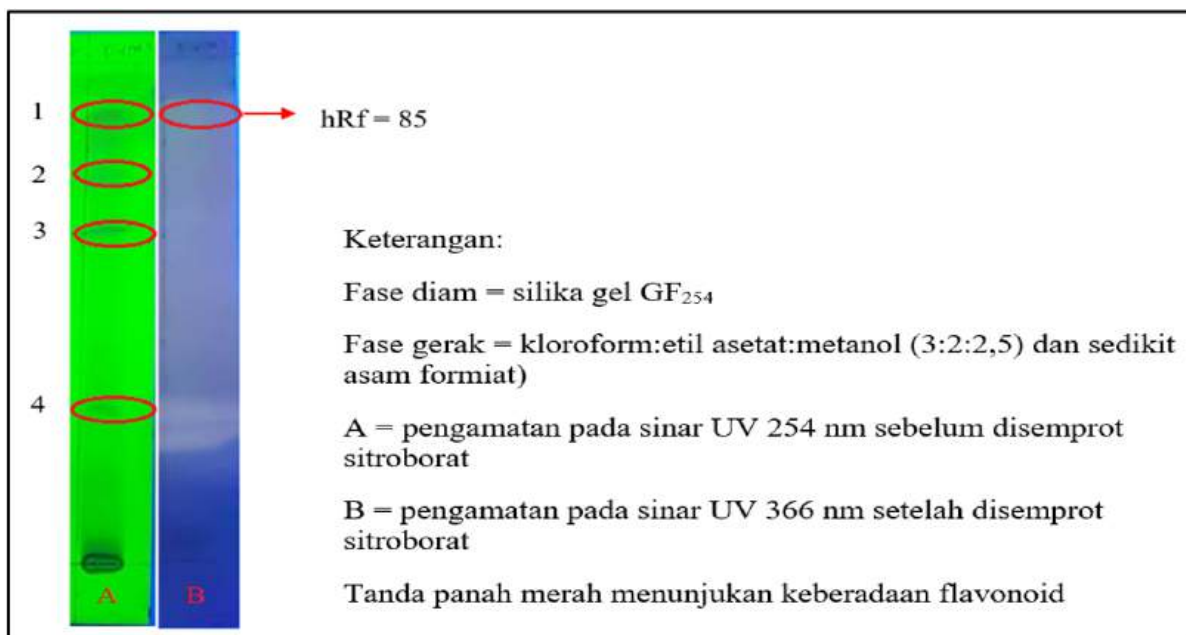
Tabel 1. Hasil ekstraksi dan fraksinasi

Sampel	Bobot (g)	Rendemen (%)
Ekstrak etanol 70%*	158,90	18,69
Hidrolisat**	8,8491	58,71
Fraksi etil asetat***	2,6072	40,37

*Dari 850 g serbuk simplisia

**Dari 15,0715 g ekstrak

***Dari 6,4585 g hidrolisat

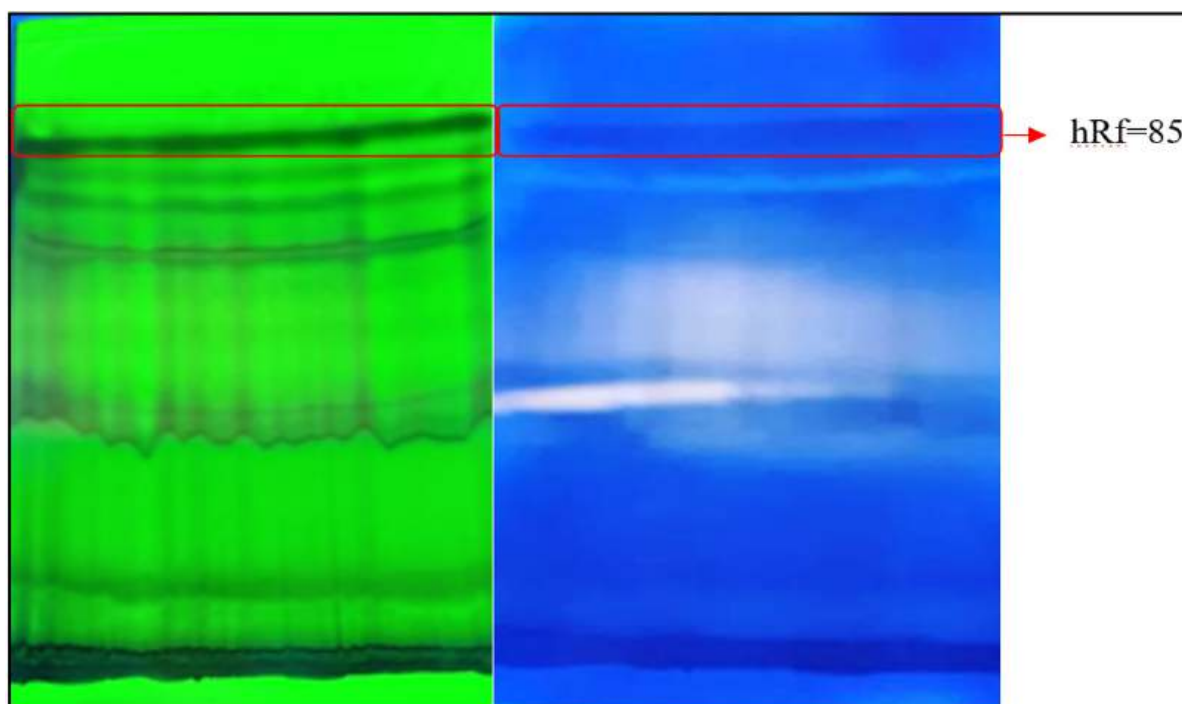


Gambar 2. Pola kromatogram KLT pada fraksi etil asetat

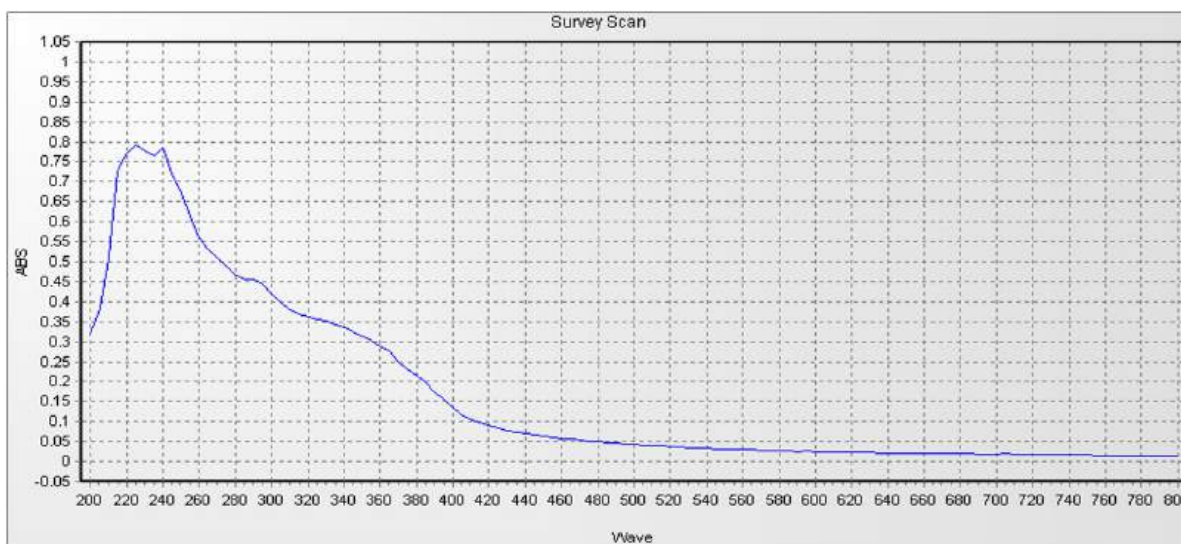
memanaskan campuran bahan dengan 2 N HCl-metanol.¹² Beberapa peneliti ada yang menambahkan asam askorbat di dalam prosedur tersebut untuk mencegah terjadinya oksidasi. Proses hidrolisis dapat dilakukan selama 2 jam pada suhu 80 °C atau lebih.^{12,16} Bentuk aglikon selanjutnya dapat diekstraksi dengan pelarut semipolar yaitu etil asetat.¹⁶ Berdasarkan hasil rendemen dari fraksi etil asetat dari hidrolisat pada Tabel 1,

menunjukkan bahwa fraksi ini mengandung sebagian besar senyawa aglikon dan sedikit glikosida. Kemampuan ini didasarkan pada polaritas etil asetat yang cukup besar karena adanya elektron π dan elektron pasangan bebas pada O.²⁰

Pengujian spektrofotometri yang didasarkan pada pembentukan kompleks aluminium adalah prosedur yang sering digunakan dalam penentuan kadar flavonoid.



Gambar 3. Pola kromatogram KLT preparatif pada fraksi etil asetat pada sinar UV 254 nm (kiri) dan pada sinar UV 365 nm (kanan)

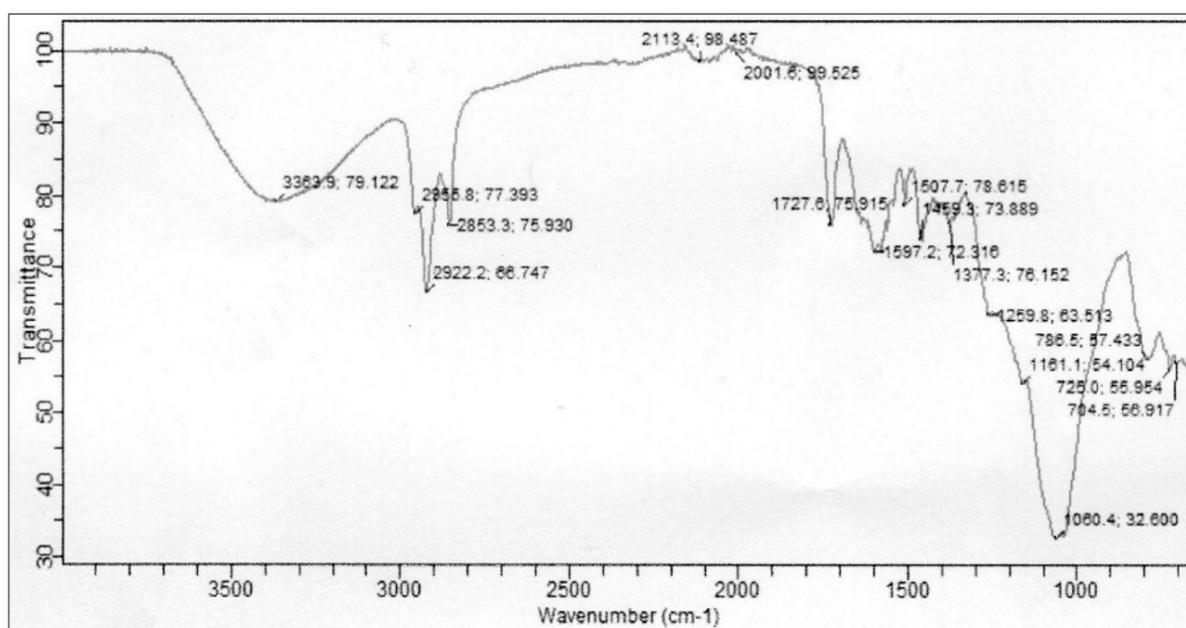


Gambar 4. Spektrum UV bercak 1

Sampel ini direaksikan dengan AlCl_3 dan memungkinkan pengukuran flavonoid totalnya setelah 2-60 menit dalam kisaran 404-430 nm.²³ Prinsipnya, kompleks stabil dari AlCl_3 dengan gugus keto C-4 dan C-3 atau C-5 hidroksil dari struktur flavonoid (flavon dan flavonol) dapat terbentuk setelah penambahan asam. Selain itu, AlCl_3 juga membentuk kompleks stabil dengan gugus ortohidroksil pada cincin A atau B dari flavonoid.²³

Antiradikal merupakan kemampuan senyawa kimia untuk bereaksi dengan radikal bebas.⁹ Senyawa bahan alam dengan aktivitas antiradikal umumnya dari kelompok fenolik. Kelompok fenolik (termasuk

flavonoid) memiliki struktur kimia yang mendukung proses peredaman radikal bebas.⁹ Pada flavonoid, ada beberapa faktor yang menentukan kapasitas antiradikalnya antara lain: (1) adanya gugus orto-dihidroksi pada cincin B mampu menyumbang elektron dan berpartisipasi dalam delokalisasi elektron, (2) adanya ikatan rangkap 2,3 dengan gugus 4-okso pada cincin C bertanggung jawab pada delokalisasi cincin B, (3) adanya gugus 3- dan 5-hidroksil dengan gugus 4-okso pada cincin A dan C ikut berperan dalam menangkalkan radikal, (4) adanya gugus 3-hidroksil.^{9,24} Hasil dari studi ini, nilai IC_{50} fraksi etil asetat masih rendah dibandingkan dengan kuersetin sebagai pembanding terhadap peredaman



Gambar 5. Spektrum inframerah bercak 1

radikal DPPH. Senyawa antioksidan baik fenolik maupun flavonoid memberikan respon aktivitas antioksidan dan antiradikal berbeda (terkait mekanismenya) tergantung dari jenis ujinya.²⁵ Hal ini berkaitan dengan fakta bahwa tiap uji memiliki perbedaan spesifisitas pelarut, reagen, dan kondisi pH. Selain itu, sifat hidrofobik/hidrofilik substansi, ukuran molekul, dan jumlah (kuantitas) serta jenis dari gugus fungsi fenolik dan flavonoid yang diujikan juga ikut berperan pada hasil ujinya.⁹ Dengan demikian, diperlukan pengujian dengan metode selain DPPH pada fraksi etil asetat untuk membuktikan hal ini.

Pemisahan dengan KLT masih menjadi metode yang paling banyak digunakan untuk pemisahan disebabkan karena metode ini sederhana, praktis, dan ekonomis serta prosedur kerja yang mudah.²⁶ Hasil kromatogram KLT menunjukkan keberadaan senyawa flavonoid setelah disemprot dengan sitroborat. Sitroborat merupakan reagen yang terdiri atas asam borat dan asam sitrat dalam etanol. Reagen ini bereaksi dengan flavonoid dengan gugus ortho-hidroksi²⁷ dengan hasil positif berwarna kuning terang pada UV 366 nm.¹⁶

Prosedur pendekatan klarifikasi struktur senyawa dapat menggunakan spektroskopi. Spektroskopi UV-Visible dapat digunakan untuk menganalisis kualitatif kelas senyawa tertentu. Spektroskopi inframerah, misalnya *Fourier Transform Infrared Spectroscopy* (FTIR) merupakan metode dengan resolusi tinggi yang digunakan untuk mengidentifikasi kandungan kimia dengan cepat secara non-destruktif.^{21,28}

Spektroskopi serapan ultraviolet (UV) dari flavonoid memiliki dua serapan maksimal sekitar 300–350 dan 240–285 nm masing-masing sesuai dengan pita I dan II dari cincin A dan B. Sebagian besar flavon, isoflavon dan kalkon terhidroksilasi memberikan serapan maksimum pada 3300–3600 cm⁻¹ karena adanya gugus OH.⁸ Gugus karbonil (C=O) flavonoid diamati sekitar 1727 cm⁻¹. Serapan tajam dan intensitas tinggi teramati pada 1600 dan 1500 cm⁻¹ karena adanya ikatan rangkap pada cincin aromatik.^{8,29} Dengan demikian, dapat disimpulkan bahwa fraksi etil asetat hidrolisat

ekstrak etanol daun *Cordia* mengandung senyawa flavonoid mirip dengan kelompok kalkon. Spektrum UV kalkon mengandung dua pita serapan yang ditunjukkan pada Pita I (340 nm) dengan serapan sebesar 0,785 dan pita II (240 nm) dengan serapan sebesar 0,456. Pita I sering tampak pada 340–390 nm, meskipun terkadang sedikit perubahan atau puncak sering terjadi pada 300–320 nm. Pita II tampak pada 220–270 nm.³⁰ Secara farmakologi, kalkon memiliki khasiat yang luas seperti antidiabetes, antikanker, antiinflamasi, antimikroba, antioksidan, antiparasit, psikoaktif dan neuroprotektif.³¹

5. Kesimpulan

Fraksi etil asetat hasil hidrolisat ekstrak etanol 70% daun *Cordia* mengandung senyawa flavonoid yang memiliki aktivitas antiradikal DPPH. Flavonoid yang ditemukan memiliki kemiripan dengan kelompok kalkon berdasarkan analisis spektrum UV-sinar tampak dan inframerah. Studi lebih lanjut dalam pemisahan dan pemurnian senyawa ini masih perlu dilakukan kedepannya dengan teknik kromatografi lain dan untuk menentukan struktur molekul senyawa murni perlu menggunakan metode spektroskopi massa dan NMR yang mendukung pada penentuan struktur dari flavonoid.

Referensi

1. Łysiak GP. Ornamental Flowers Grown in Human Surroundings as a Source of Anthocyanins with High Anti-Inflammatory Properties. *Foods*. 2022;11(948).
2. Hanani E, Soewandi SHW, Hayati, Revita N. Pharmacognostical and preliminary phytochemical evaluation of *Cordia sebestena* L. *Pharmacogn J*. 2019;11(5):1100–5.
3. Adeosun CB, Bamigbade O I., Osho A, Atolani O. Volatile Composition of the Leaf, Flower and Fruit of *Cordia sebestena* (L.). *J Essent Oil-Bearing Plants*. 2015;18(4):976–81.
4. Osho A, Otuechere CA, Adeosun CB, Oluwagbemi T, Atolani O.

- Phytochemical, sub-acute toxicity, and antibacterial evaluation of *Cordia sebestena* leaf extracts. *J Basic Clin Physiol Pharmacol*. 2015;27(2):163–70.
5. Sunaryo H, Siska S, Hanani E, Anindita RS, Yanti N, Lisa. Evaluation of analgesic and anti-inflammatory activities of ethanolic extract of *Cordia sebestena* L. *Eur Pharm J*. 2020;66(2):26–31.
 6. Hikmawanti NPE, Hanani E, Sapitri Y, Ningrum W. Total Phenolic Content and Antioxidant Activity of Different Extracts of *Cordia sebestena* L. Leaves. *Pharmacogn J*. 2020;12(6):1311–6.
 7. Prakash S, Elavarasan N, Subashini K, Kanaga S, Dhandapani R, Sivanandam M, et al. Isolation of hesperetin - A flavonoid from *Cordia sebestena* flower extract through antioxidant assay guided method and its antibacterial, anticancer effect on cervical cancer via in vitro and in silico molecular docking studies. *J Mol Struct*. 2020;1207:127751.
 8. Awouafack MD, Tane P, Morita H. Isolation and Structure Characterization of Flavonoids. In: *Flavonoids - From Biosynthesis to Human Health*. Intech; 2017. p. 45–59.
 9. Huyut Z, Beydemir F., Gülçin E. Antioxidant and Antiradical Properties of Selected Flavonoids and Phenolic Compounds. *Biochem Res Int*. 2017;2017:1–10.
 10. Arifin B, Ibrahim S. Struktur, Bioaktivitas Dan Antioksidan Flavonoid. *J Zarah*. 2018;6(1):21–9.
 11. Alara OR, Abdurahman NH, Ukaegbu CI. Extraction of phenolic compounds: A review. *Curr Res Food Sci*. 2021;4(March):200–14.
 12. Bian Y, Zhang Y, Zhou Y, Li GH, Feng XS. Progress in the Pretreatment and Analysis of Flavonoids: An Update since 2013. *Sep Purif Rev*. 2022;51(1):11–37.
 13. Nuutila AM, Kammiovirta K, Oksman-Caldentey KM. Comparison of methods for the hydrolysis of flavonoids and phenolic acids from onion and spinach for HPLC analysis. *Food Chem*. 2002;76(4):519–25.
 14. Janabi AHW, Kamboh AA, Saeed M, Xiaoyu L, BiBi J, Majeed F, et al. Flavonoid-rich foods (FRF): A promising nutraceutical approach against lifespan-shortening diseases. *Iran J Basic Med Sci*. 2020;23(2):140–53.
 15. Kementerian Kesehatan RI. *Farmakope Herbal Indonesia Edisi II*. 2nd ed. Jakarta: Kementerian Kesehatan RI; 2017. 51–55 p.
 16. Hanani E. *Analisis Fitokimia*. Jakarta: Buku Kedokteran EGC; 2015. 34–45 p.
 17. Irianti T, Murti YB, Kanistri DN, Pratiwi DR, Kuswandi, Kusumaningtyas RA. DPPH Radical Scavenging Activity of Aqueous Fraction from Ethanolic Extract of Talok Fruit (*Muntingia calabura* L.). *Tradit Med J*. 2016;21(1):38–47.
 18. Hikmawanti NPE, Fatmawati S, Asri AW. The Effect of Ethanol Concentrations as The Extraction Solvent on Antioxidant Activity of Katuk (*Sauropus androgynus* (L.) Merr.) Leaves Extracts. *IOP Conf Ser Earth Environ Sci*. 2021;755(1):012060.
 19. Batool R, Khan MR, Sajid M, Ali S, Zahra Z. Estimation of phytochemical constituents and in vitro antioxidant potencies of *Brachychiton populneus* (Schott & Endl.) R. Br. *BMC Chem*. 2019;13(32):1–15.
 20. Houghton PJ, Raman A. *Laboratory Handbook for the Fractionation of Natural Extracts*. 1st ed. Laboratory Handbook for the Fractionation of Natural Extracts. Springer-Science+Business Media, B.V.; 1998. 14–16, 24–31, 39–52 p.
 21. Altemimi A, Lakhssassi N, Baharlouei A, Watson DG, Lightfoot DA. *Phytochemicals: Extraction, Isolation, and Identification of Bioactive Compounds from Plant Extracts*. *Plants*. 2017;6(42).
 22. Zhang Q-W, Lin L-G, Ye W-C. Techniques for extraction and isolation of natural products: A comprehensive review. *Chin Med*. 2018;13(20).
 23. Pękal A, Pyrzynska K. Evaluation of Aluminium Complexation Reaction for Flavonoid Content Assay. *Food Anal Methods*. 2014;7(9):1776–82.
 24. Gulcin İ. Antioxidants and antioxidant

- methods: an updated overview. *Arch Toxicol.* 2020;94(3):651–715.
25. Gulcin İ. Antioxidants and antioxidant methods: an updated overview. *Arch Toxicol.* 2020;94(3):651–715.
26. Sadeer NB, Montesano D, Albrizio S, Zengin G, Mahomoodally MF. The versatility of antioxidant assays in food science and safety—chemistry, applications, strengths, and limitations. *Antioxidants.* 2020;9(8):1–39.
27. Muyumba NW, Mutombo SC, Sheridan H, Nachtergaeel A, Duez P. Quality control of herbal drugs and preparations: The methods of analysis, their relevance and applications. *Talanta Open.* 2021;4:100070.
28. Sharma B, Agrawal SC, Gupta KC. Colour reactions of chalcones and their mechanism (A review). *Orient J Chem.* 2008;24(1):289–94.
29. Ingle KP, Deshmukh AG, Padole DA, Dudhare MS, Moharil MP, Khelurkar VC. Phytochemicals: Extraction methods, identification and detection of bioactive compounds from plant extracts. *J Pharmacogn Phytochem.* 2017;6(1):32–6.
30. PaviaDL, LampmanGM, KrizGS, Vyvyan JR. Introduction to Spectroscopy. Fourth Edi. Canada: Brooks/Cole; 2001. 15–104p.
31. Aksöz BE, Ertan R. Spectral properties of chalcones II. *Fabad J Pharm Sci.* 2012;37(4):205–16.
32. Salehi B, Quispe C, Chamkhi I, El Omari N, Balahbib A, Sharifi-Rad J, et al. Pharmacological Properties of Chalcones: A Review of Preclinical Including Molecular Mechanisms and Clinical Evidence. *Front Pharmacol.* 2021;11(January).