

Isolasi dan Karakterisasi Flavonoid dari Daun Belimbing (*Averrhoa carambola* Linn.L)

Rido Ardianto¹, Yustini Ma'aruf², Sri Benti Etika³

Jurusan Kimia, Universitas Negeri Padang

Jln. Prof. Dr. Hamka Air Tawar Padang - Sumatera Barat - Indonesia

¹rido.ardy@gmail.com, ²yustini@fmipa.unp.ac.id, ³bentietika@yahoo.com

Abstract — Research of isolation and characterization of flavonoids from the leaves of star fruit (*Averrhoa carambola* Linn.L) has been done. A 393 g of condensed methanol extracts obtained from 5 kg of fresh leaves starfruit. The methanol extract of hot water added, further fractionated successively with n-hexane and ethyl acetate, resulting in a 4000 ml n-hexane fraction and 5000 ml of ethyl acetate. The flavonoid phytochemical test from the fractionation showed negative fraction of n-hexane, ethyl acetate fraction and water fraction flavonoid positive. Results separation by column chromatography ethyl acetate fraction concentrated extract produced 6 fractions, namely fraction A, B, C, D, E and F. Characterization using UV light gives a brown before chromatograms steamed green ammonia and gives a dark brown color after steamed with ammonia. Based on the existing literature is suspected in fraction B contained flavones glycosides, biflavonil or unusual *tersulih* flavons.

Keywords — flavonoids, star fruit, ethyl acetat, column chromatography

I. PENDAHULUAN

Indonesia merupakan salah satu negara yang kaya akan keanekaragaman hayati dan sangat potensial dalam mengembangkan obat herbal yang berbasis pada tumbuhan. Keanekaragaman hayati dapat juga dipandang sebagai keanekaragaman kimiawi yang mampu menghasilkan bahan-bahan kimia baik untuk kebutuhan manusia maupun untuk organisme lain seperti untuk obat-obatan, insektisida, kosmetika dan sebagai bahan dasar sintesis senyawa organik yang lebih bermanfaat^[1].

Flavonoid adalah golongan fenol alam yang tersebar luas dalam tumbuhan yang terdapat pada tumbuhan angiospermae, gymnospermae, dan pteridopita. Flavonoid ini memberikan efek fisiologis dan farmakologis terhadap makhluk hidup. Pada tumbuhan, flavonoid berfungsi sebagai zat warna, pengatur tumbuh, penangkal serangan penyakit dan sebagai penanda (markers) dalam mengklasifikasi tumbuhan^[2].

Salah satu tumbuhan yang mengandung flavonoid dan dapat dimanfaatkan sebagai obat adalah tanaman belimbing (*Averrhoa carambola*). Tanaman belimbing ditanam sebagai pohon buah, kadang tumbuh liar dan ditemukan dari dataran rendah sampai 500 m di atas permukaan laut (dpl). Buah belimbing sangat bermanfaat. Selain itu, pada bunga, daun, dan akarnya diyakini memiliki khasiat untuk obat anti malaria, maag, bisul, rematik dan lain-lain. Akar belimbing manis juga berkhasiat untuk menyembuhkan sakit kepala dan nyeri

persendian. Sedangkan daunnya dapat digunakan untuk mengatasi radang lambung, radang kulit bernanah, dan bisul^[3]. Dari penelusuran informasi di internet atau perpustakaan UNP dan UNAND yang telah dilakukan, belum ada ditemukan laporan tentang penelitian terhadap senyawa metabolit sekunder dari daun belimbing.

Uji pendahuluan terhadap daun belimbing yang diambil dari Kelurahan Piai Tengah Kecamatan Pauh Kota Padang, ternyata positif mengandung flavonoid dan saponin. Berdasarkan uraian di atas maka penulis tertarik untuk melakukan isolasi dan karakterisasi flavonoid dari daun belimbing.

TABEL I
DAFTAR FREKUENSI SERAPAN INFRAMERAH BEBERAPA GUGUS FUNGSI

Gugus fungsi	Frekuensi cm ⁻¹
C=C - Alkena	1680-1600
- Aromatik	1600-1475
C=C	2250-2100
C=O - Aldehid	1740-1720
- Keton	1725-1705
- Asam karboksilat	1725-1700
- Ester	1750-1730
- Anhidrida	1810-1760
C-O - Eter	1300-1000
O-H - Alkohol	3000-3700

II. METODE PENELITIAN

A. Alat dan Bahan

1. Alat

Corresponding Author :

Yustini Ma'aruf, Department of Chemistry, Faculty of Mathematics and Natural Sciences, Padang State University, Padang, West Sumatera, Indonesia.



yustini@fmipa.unp.ac.id

Alat: satu set alat destilasi, rotary evaporator, corong pisah, peralatan gelas, corong, lumpang porselen, pipet tetes, kolom kromatografi, kertas saring, plat kromatografi, pipa kapiler, bejana kromatografi, lampu UV, *Gallenkamp melting point apparatus*, spektrofotometer IR, spektrofotometer UV.

2. Bahan

Bahan: daun belimbing sebanyak 5 kg. metanol, asam asetat, etil asetat, n-butanol, natrium bikarbonat, natrium klorida, n-heksana, natrium sulfat anhidrat, asam sulfat, pereaksi Mayer, peraksi *Wagner*, pereaksi *Dragendorf*, silika gel, aquades, air suling, plat KLT.

B. Prosedur Penelitian

1. Uji Pendahuluan Kandungan Kimia^[4]

a. Identifikasi Alkaloid: Metode *Culvenor-Fitzgerald*

Kira-kira 4 gram sampel daun segar dirajang dan digerus halus dalam lumpang dengan bantuan pasir halus, lalu ditambahkan kloroform sedikit, digerus lagi sampai membentuk pasta. Ditambahkan 10 ml amoniak-kloroform 0,05 N dan digerus kering. Campuran disaring kedalam sebuah tabung reaksi yang kering. Ditambahkan 5 ml larutan asam sulfat 2 N dan dikocok kuat, larutan didiamkan sampai membentuk dua lapisan. Dengan menggunakan pipet yang telah diberi kapas pada ujungnya untuk menyaring, diambil lapisan asam sulfat dan dimasukkan kedalam tabung reaksi kecil (lapisan kloroform disimpan untuk menguji terpenoid). Filtrat diuji dengan pereaksi Mayer, *Wagner* dan *Dragendorf*, namun tidak terbentuknya endapan putih atau keruh dengan pereaksi Mayer, tidak terbentuk endapan coklat dengan pereaksi *Wagner*, tidak terbentuk endapan orange dengan pereaksi *Dragendorf* ini menunjukkan sampel tidak mengandung alkaloid, sampel menunjukkan warna hijau.

b. Identifikasi Flavonoid: *Shinoda tes/ Sianidin tes*

Kira-kira 0,5 gram sampel yang telah dirajang halus diekstrak dengan metanol dan dipanaskan selama 5 menit dalam tabung reaksi. Ekstraknya ditambahkan beberapa tetes asam klorida pekat dan sedikit serbuk magnesium. Terjadi perubahan warna menjadi kuning menunjukkan sampel mengandung flavonoid.

c. Identifikasi Steroid dan Terpenoid: Metode *Lieberman-Burchard*

Beberapa tetes lapisan kloroform pada uji alkaloid ditempatkan pada plat tetes, tambahkan 5 tetes anhidrida asetat dan biarkan mengering. Kemudian ditambahkan 3 tetes asam sulfat pekat. Tidak timbul warna merah jingga menandakan uji negatif terhadap terpenoid, dan tidak berwarna biru menunjukkan uji negatif terhadap steroid. sampel menunjukkan warna hijau.

d. Identifikasi Saponin: Uji Busa

Untuk mengidentifikasi saponin ini sebaiknya digunakan sampel yang telah kering, karena tes yang digunakan tes

pembentukan busa. Bila sampel segar/basah dididihkan dengan air suling kemungkinan cairan sel membentuk busa bila dikocok.

Caranya: Sampel kering dirajang halus, dimasukkan kedalam tabung reaksi dan ditambahkan air suling, dididihkan selama 2 – 3 menit, dinginkan, kemudian setelah dingin dikocok kuat-kuat, adanya busa yang stabil selama 5 menit berarti sampel mengandung saponin.

2. Isolasi Flavonoid

a. Ekstraksi

Sampel daun segar yang telah dibersihkan sebanyak 5 kg dirajang halus, dimaserasi dengan metanol sampai ampas menunjukkan hasil negatif terhadap uji *Shinoda tes*. Maserasi dilakukan 2 kali karena hasil uji telah menunjukkan negatif. Ekstrak metanol disaring dan diuapkan dengan *rotary evaporator* sehingga diperoleh ekstrak kental methanol sebanyak 393 gram. ditambahkan 300 ml air panas ke dalam 300 gram ekstrak kental tersebut dan kemudian disaring sehingga didapat ekstrak berair.

b. Fraksinasi

Ekstrak berair difraksinasi beberapa kali dengan n-heksana menggunakan corong pisah, n-heksana yang digunakan sebanyak 4000 ml. Fraksi berair yang diduga mengandung flavonoid difraksinasi beberapa kali dengan etil asetat, sampai lapisan etil asetat memberikan tes negatif dengan *shinoda tes*. Saturan fraksi etil asetat didapatkan fraksi etil asetat sebanyak 5000 ml, selanjutnya diuapkan dengan *rotary evaporator*, sampai diperoleh fraksi etil asetat kental sebanyak 14 gram.

c. Pemisahan dan Pemurnian Fraksi Etil Asetat

Fraksi etil asetat dimonitor dengan kromatografi lapis tipis (KLT) dengan eluen etil asetat : methanol (10:0, 9:1, 8:2, 7:3, 6:4, 5:5, 4:6, 1:9, 10:0). Proses pemisahan komponen selanjutnya dilakukan dengan kromatografi kolom dan sebagai adsorben digunakan silika gel (70 – 230 mesh) dan eluen etil asetat : metanol (10:0, 9:1, 8:2, 7:3, 6:4, 5:5, 4:6). Sebelum digunakan, kolom terlebih dahulu dibersihkan, dibilas dengan metanol dan keringkan. Kolom yang telah bersih dan kering dijepit dengan klem dengan posisi vertikal. Kemudian diberi *glasswool* pada dasar kolom, dimana *glasswool* harus terendam dengan n-heksana yang tingginya kira-kira 10 cm. Selanjutnya silika gel dibuat slurry dengan n-heksana, dengan hati-hati dimasukkan kedalam kolom. Kemasan dibiarkan turun dan pelarut yang berlebih dikeluarkan melalui kran dan dibiarkan semalam. Selanjutnya 5 gram ekstrak pekat etil asetat dimasukkan kedalam kolom diatas kemasan silika dan dilusi dengan eluen. Adapun perbandingan dan volume eluen dapat dilihat pada tabel 2.

TABEL II
PERBANDINGAN DAN VOLUME ELUEN UNTUK
KROMATOGRAFI KOLOM

No	Eluen	Perbandingan	Volume (ml)
1	Etil asetat : metanol	9 : 1	30
2	Etil asetat : metanol	8 : 2	50
3	Etil asetat : metanol	7 : 3	200
4	Etil asetat : metanol	6 : 4	250
5	Etil asetat : metanol	5 : 5	200
6	Etil asetat : metanol	4 : 6	290

3. Uji Kemurnian

a. Kromatografi Lapis Tipis (KLT)

Untuk uji kemurnian senyawa hasil isolasi digunakan kromatografi lapis tipis. KLT dilakukan dengan menotolkan larutan hasil isolasi dengan menggunakan pipa kapiler pada plat KLT dengan jarak 1 – 2 cm dari batas bawah plat. Setelah kering, plat dimasukkan kedalam bejana tertutup yang telah dijenuhkan lebih dahulu dengan uap eluen. Kemudian dielusi sampai naik kira-kira 0.5 – 1 cm dari batas atas plat^[5]. Lalu plat dikeringkan pada suhu kamar. Noda pada kromatogram dapat diamati langsung atau dengan menggunakan lampu UV pada panjang gelombang 245 – 366 nm, atau pereaksi semprot penimbul warna yaitu uap NH₃ (untuk noda yang tidak tampak). Senyawa yang murni akan terlihat jika noda yang dihasilkan sudah tunggal, sedangkan noda yang tidak tunggal menunjukkan senyawa yang diisolasi belum murni^[6].

b. Penentuan Titik Leleh

Titik leleh ditentukan dengan alat gallenkamp melting point apparatus. Zat padat amorf yang akan diuji kemurniaannya dimasukkan kedalam pipa kapiler yang tertutup salah satu ujungnya setinggi kira-kira 1 mm, selanjutnya dimasukkan kedalam *gallenkamp melting point apparatus* naikan suhu 5°C per menit.

4. Karakterisasi Senyawa Hasil Isolasi

Karakterisasi yang dilakukan meliputi pemeriksaan kimia dengan pereaksi warna, kromatografi kertas dua arah dengan eluen pertama butanol : asam asetat : air (BAA) (4 : 1 : 5) dan eluen kedua asam asetat 15%, penentuan titik leleh, dan data spektrum direkam dengan spektrofotometer ultraviolet dan inframerah.

a. Reaksi warna

Senyawa hasil isolasi dikerjakan dengan pereaksi warna yaitu: larutan NaOH 10%, H₂SO₄ pekat, dan Mg-HCl. Sedikit sampel yang diperoleh dilarutkan dalam metanol, larutan dibagi tiga bagian. Bagian pertama ditambahkan sedikit NaOH 10% timbul warna coklat pekat, bagian kedua ditambahkan H₂SO₄ pekat timbul warna coklat kehitaman, dan bagian ketiga ditambahkan pereaksi Mg-HCl timbul warna merah muda.

b. Kromatogram Kertas Dua Arah (KKt-2A)

Pada kromatografi kertas dua arah (KKt-2A) digunakan kertas Whatman 3 MM (46 x 47 cm). Sampel ditotolkan dengan menggunakan pipa kapiler pada kertas disuatu titik kira-kira 8 cm dari tepi kertas dan 3 cm dari lipatan. Kertas Kromatografi dimasukkan kedalam bejana yang telah berisi pengembang BAA (4 : 1 : 5). Dielusi sampai pengembang bergerak keatas. Setelah larutan pengembang sampai pada garis batas, kertas diangkat dari bejana kromatografi dan dikeringkan dalam lemari asam. Noda yang diperoleh dideteksi dengan menggunakan lampu UV366 nm. Kemudian posisi kertas diputar 90° dari posisi awal dan dicelupkan ke bejana lain yang berisi larutan pengembang asam asetat 15%. Dielusi sampai pengembang bergerak sampai batas yang telah ditentukan, lalu kertas diangkat dan dikeringkan. Noda yang diperoleh dideteksi dengan menggunakan lampu UV 366 nm, kemudian diuapi dengan uap amoniak. Kemudian warna yang dihasilkan ditandai dengan pensil dan dihitung *Rf*-nya^[7].

c. Spektroskopi Inframerah

Spektrum inframerah diukur dengan spektrofotometer inframerah yang merekam secara otomatis dalam bentuk padat. Plat dari sampel ± 1 mg dan KBr 10 – 100 mg, diaduk sampai homogen, kemudian dilakukan penekanan sehingga membentuk plat tipis, lalu diukur. Dari hasil pengukuran tersebut didapat puncak-puncak serapan spesifik^[8].

d. Spektroskopi Ultraviolet

Sedikit flavonoid hasil isolasi dilarutkan kedalam metanol p.a kemudian direkam dengan spektrofotometer UV-Vis secaman S 1000 yang telah distandarkan dengan metanol p.a. Spektrum selanjutnya direkam dengan menambahkan pereaksi geser (NaOH, AlCl₃, AlCl₃/HCl, NaOAc, dan NaOAc/H₃BO₃). Spektrum diukur pada panjang gelombang 200 – 500 nm.

Tahapan kerja penggunaan pereaksi geser^[7].

1. Setelah diukur spektrum cuplikan dalam MeOH (spektrum 'MeOH'), tambahkan 3 tetes NaOH ke dalam kuvet, dicampur, lalu direkam spektrum 'NaOMe'. Untuk memeriksa apakah ada penguraian, spektrum 'NaOMe' direkam lagi setelah kira-kira 5 menit. Kemudian cuplikan dibuang dan kuvet yang telah dicuci diisi lagi dengan larutan flavonoid persediaan.
2. Enam tetes pereaksi AlCl₃ ditambahkan kedalam larutan flavonoid, dicampur, lalu diukur spektrum 'AlCl₃'. Selanjutnya ditambahkan 3 tetes HCl, dicampur, dan diukur spektrum 'AlCl₃/HCl'. Cuplikan dibuang dan kuvet yang telah dicuci diisi lagi dengan larutan flavonoid persediaan.
3. Tambahkan serbuk NaOAc kedalam larutan flavonoid persediaan dalam kuvet sedemikian rupa sehingga terdapat kira-kira 2 mm lapisan NaOAc pada dasar kuvet. Campuran harus dikocok baik-baik sebelum spektrum 'NaOAc' diukur. Pada tahap ini dapat diperiksa apakah cuplikan terurai dengan berjalannya waktu. Lalu spektrum 'NaOAc/H₃BO₃' diukur setelah

ditambahkan H_3BO_3 dan dicampur (dengan perbandingan 2 : 1).

III. HASIL DAN PEMBAHASAN

A. Hasil

1. Uji Pendahuluan

Hasil uji pendahuluan terhadap kandungan metabolit sekunder dari daun belimbing (*Averrhoa carambola* Linn.L) dapat dilihat di Tabel 3.

TABEL III
HASIL UJI KANDUNGAN METABOLIT SEKUNDER PADA DAUN BELIMBING (*AVERRHOA CARAMBOLA* LINN.L)

No.	Kandungan kimia	Pereaksi	Hasil
1.	Alkaloid	Mayer, Wagner & Dragendorf	-
2.	Flavonoid	Mg-HCl	+
3.	Steroid	Lieberman-Burchard	-
4.	Terpenoid	Lieberman-Burchard	-
5.	Saponin	Air	+

Ket : (+) Terdeteksi
(-) Tak terdeteksi

Dari Tabel 3 di atas dapat diketahui bahwa daun belimbing (*Averrhoa carambola* Linn.L) mengandung flavonoid dan saponin.

2. Isolasi

Dari 5 kg daun belimbing segar yang dimaserasi dengan metanol diperoleh ekstrak pekat metanol sebanyak 393 g. Penambahan air panas bersuhu $45^{\circ}C$ sebanyak 300 ml ke dalam ekstrak pekat menghasilkan ekstrak berair sebanyak 600 ml. Ekstrak berair difraksinasi dengan n-heksana menghasilkan fraksi n-heksana sebanyak 4000 ml dan fraksi berair sebanyak 600 ml. Fraksi n-heksana diuji kandungan flavonoidnya dengan Mg-HCl menunjukkan hasil negatif, sedangkan fraksi berair positif terhadap Mg-HCl. Fraksi berair difraksinasi dengan etil asetat menghasilkan fraksi etil asetat sebanyak 5000 ml dan fraksi berair 500 ml. Hasil uji fraksi etil asetat dan fraksi berair tersebut positif terhadap Mg-HCl. Selanjutnya fraksi etil asetat dipekatkan dan didapatkan fraksi etil asetat pekat sebanyak 14 g. Dari 6 g fraksi etil asetat pekat yang dikromatografi kolom didapatkan 5 fraksi, yaitu fraksi A (1 - 5), fraksi B (6 - 20), fraksi C (21 - 35), fraksi D (39 - 56), fraksi E (57 - 72) dan fraksi F (72 - 91). Dari semua eluat yang didapatkan tidak ada yang membentuk amorf/serbuk flavonoid.

3. Karakterisasi

Karakterisasi hasil kromatografi kolom dapat dilakukan dengan menggunakan lampu/sinar UV, pereaksi warna, kromatografi kertas 2 arah, UV-Vis dan FTIR. Dengan menggunakan lampu/sinar UV didapatkan data seperti pada Tabel 4 dan dengan menggunakan pereaksi warna didapatkan data seperti pada Tabel 5.

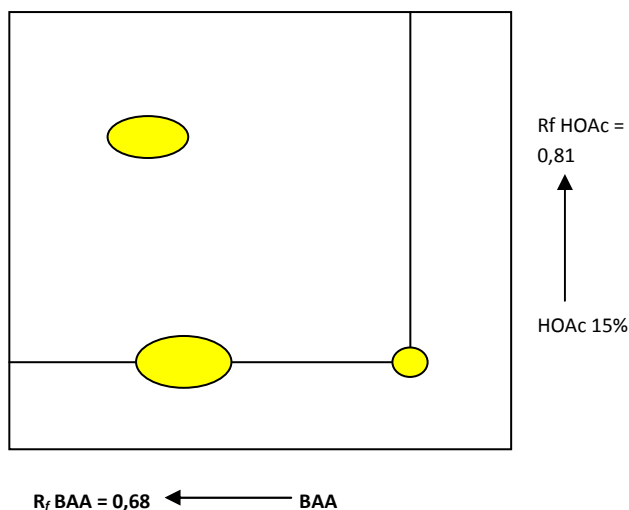
TABEL IV
WARNA KROMATOGRAM ELUAT DENGAN SINAR/LAMPU UV

Fraksi	Warna	Warna dengan sinar/lampu UV	
		Sebelum diuapi amonia	Setelah diuapi amonia
B	Kuning kecoklatan	Coklat	Hijau coklat tua
C	Kuning kecoklatan	Coklat	Coklat tua
D	Kuning kecoklatan	Coklat	Coklat tua
E	Kuning kecoklatan	Coklat	Coklat tua

TABEL V
WARNA ELUAT DENGAN PEREAKSI WARNA

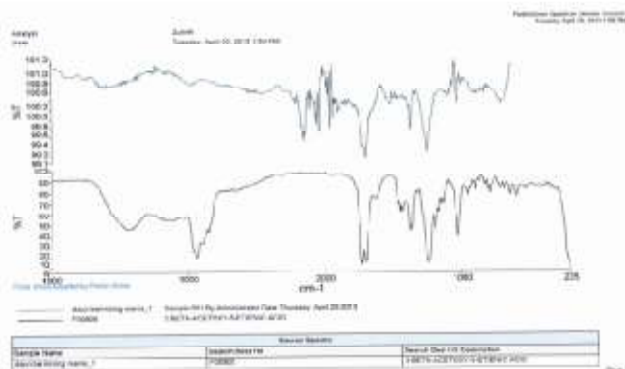
Fraksi	Mg-HCl	NaOH	H_2SO_4
B	Coklat pink	Coklat pekat	Coklat hitam
C	Coklat pink	Coklat pekat	Coklat hitam
D	Coklat pink	Coklat pekat	Coklat hitam
E	Coklat pink	Coklat pekat	Coklat hitam

Karakterisasi dengan kromatografi kertas 2 arah menunjukkan noda sampel yang ditotol berpindah setelah dicelupkan pada larutan BAA dengan $R_f = 0,68$ begitupun setelah diputar 90 dicelupkan pada larutan asam asetat 15% noda berpindah dengan $R_f = 0,81$. Noda tidak dapat terlihat secara kasat mata. Setelah disinari lampu UV terlihat bahwa noda berada pada bagian Dihidroflavonol 3-O-Monoglik, kromatogram dapat dilihat gambar 1.



Gambar 1. Kromatogram KKt 2A

Karakterisasi dengan UV-Vis menunjukkan spektrum yang tidak beraturan sehingga tidak bisa dilanjutkan penggunaan pereaksi geser, dan karakterisasi dengan FTIR juga tidak terlihat gugus fungsi OH yang terdapat pada sampel, data dapat dilihat pada gambar 2.



Gambar 2. Spektrum FTIR

B. Pembahasan

Daun Belimbing sebelum dimaserasi dirajang halus tujuannya untuk memperluas bidang permukaan sampel sehingga kontak antara sampel dan pelarut semakin luas serta mempermudah pelarut masuk kedalam sel, sehingga proses penarikan senyawa yang ada dalam sampel ke pelarut yang digunakan lebih mudah. Pada penelitian ini dipilih maserasi untuk mengekstrak senyawa yang ada dalam daun belimbing karena jumlah sampel yang banyak. Sifat zat yang akan diekstrak belum diketahui apakah tahan panas atau tidak. Selain itu akan didukung oleh kesederhanaan pengerjaannya. Dengan demikian, sampel akan menjadi lunak dan pelarut akan masuk kedalam sel, selama perendaman sampel sekaligus dikocok untuk mempercepat proses pelarutan senyawa yang akan diisolasi. Pelarut yang digunakan dalam maserasi adalah metanol, karena metanol dapat melarutkan senyawa polar dan nonpolar. Metanol titik didihnya rendah yaitu 65°C sehingga mudah menguap.

Ekstrak hasil maserasi dipekatkan dengan rotari evaporator tujuannya adalah untuk menurunkan tekanan uap pelarut, sehingga pelarut akan mendidih pada temperatur yang lebih rendah dari titik didih yang sebenarnya, komponen-komponen yang ada dalam sampel terhindar dari proses termolisis. Setelah diperoleh ekstrak kental metanol maka ekstrak ditambahkan air panas 45°C , ini bertujuan untuk mempermudah pemisahan pada fraksinasi selanjutnya. Kemudian fraksi berair ini difraksinasi dengan n-heksana supaya senyawa yang non polar tertarik kedalam fraksi n-heksana seperti: lemak, steroid, terpenoid, klorofil, xantofil, dll. Senyawa flavonoid yang terdapat dalam fraksi air diduga terdiri dari senyawa flavonoid semipolar seperti: aglikon flavonoid, dan senyawa polar seperti: flavonoid glikosida. Oleh karena itu, dilakukan fraksinasi dengan etil asetat untuk memisahkan flavonoid polar dan non polar. Flavonoid semi polar akan terdistribusi kedalam fraksi etil asetat, sedangkan flavonoid polar akan tetap tinggal didalam air. Fraksinasi etil asetat difraksinasi beberapa kali hingga uji negatif dengan sianidin tes. Fraksi etil asetat ini diuapkan dengan rotary evaporator tujuannya untuk menguapkan pelarut yang terdapat dalam fraksi etil asetat, sehingga menghasilkan flavonoid kasar. Flavonoid kasar dimonitor dengan KLT tujuannya

untuk menentukan pelarut yang cocok untuk kromatografi kolom. Proses pemisahan selanjutnya menggunakan kromatografi kolom dengan fasa diam yang digunakan silika gel dan fasa geraknya etil asetat : metanol, eluat yang keluar dari kolom ditampung dengan vial-vial, dan dibiarkan menguap hingga terbentuk Kristal. fraksi berair tidak dilanjutkan karena hasil kromatografi kolom fraksi berair sulit dikeringkan pada suhu kamar.

Kromatografi kolom yang pertama menggunakan 6 g sampel dari fraksi pekat etil asetat. Kemudian eluat dalam beberapa botol vial di uji dengan pereaksi FeCl_3 , hasilnya terbentuk noda hitam pekat. Ini menunjukkan bahwa eluat tersebut positif mengandung flavonoid, karena itu tetap dilakukan proses pencucian. Namun hasilnya tetap tidak didapatkan serbuk/amorf flavonoid.

Selanjutnya dilakukan pengerjaan kromatografi kolom yang kedua dengan kembali menggunakan fraksi etil asetat pekat yang sama. Diduga terjadi kesalahan saat penggunaan pelarut atau kurang teliti dalam pengerjaan kromatografi kolom, kemudian sebanyak 10 g dari fraksi pekat etil asetat tersebut dikromatografi kolom dengan menggunakan eluen etil asetat : metanol. Hasilnya juga tidak didapatkan serbuk/amorf, eluat yang terbentuk tidak bisa kering.

Karakterisasi hasil kromatografi kolom dengan menggunakan lampu/sinar UV, terlihat bahwa warna kromatogram sebelum diuapi amonia berwarna coklat dan setelah diuapi amonia (NH_3) berwarna hijau coklat tua. Menurut Harbone[8] perubahan warna yang demikian menunjukkan dalam tumbuhan tersebut terdapat flavon glikosida atau biflavonil atau flavon yang tersulih tak biasa.

Karakterisasi hasil kromatografi kolom dengan pereaksi warna memberikan data seperti pada Tabel 3, terlihat bahwa eluat direaksikan dengan Mg-HCl memberikan warna coklat pink, dengan NaOH memberikan warna coklat pekat dan dengan H_2SO_4 Memberikan warna coklat kehitaman. Perubahan warna eluat dengan pereaksi warna tidak sesuai dengan warna flavonoid dengan beberapa pereaksi yang terdapat dalam Tabel 1. Hal ini mungkin disebabkan oleh eluat yang diuji belum murni, karena itu dengan menggunakan pereaksi warna tidak dapat disimpulkan termasuk ke dalam golongan mana eluat tersebut.

Karakterisasi dengan kromatografi kertas 2 arah menggunakan pengembang BAA dan HOAC 15% menunjukan adanya perpindahan noda, setelah dilihat dengan sinar UV terlihat perpindahan noda berwarna kuning, noda tersebut ditandai dengan pensil dan dicocokkan dengan kromatogram flavonoid pada gambar 8. didapatkan dugaan noda tersebut terletak pada Dihidroflavonol 3-O- monoglik.

Karakterisasi dengan menggunakan FTIR dan UV-Vis tetap dilakukan dengan harapan flavonoid yg terdapat pada sampel bisa terdeteksi oleh instrumen, namun dari pengukuran dengan FTIR menunjukan bahwa di dalam sampel masih terdapat banyak pengotor terlihat dari spektrum yang tidak beraturan dan hanya terlihat gugus C=O pada frekwensi 1810 – 1760 dan gugus C-O pada frekwensi 1300 – 1000, sedangkan dengan UV-Vis pun hanya terlihat spektrum yang rapat diduga spektrum ini adalah pengotor.

IV. PENUTUP

Berdasarkan hasil penelitian yang telah dilakukan maka dapat disimpulkan bahwa:

1. Isolasi 5 kg sampel menghasilkan 393 g ekstrak pekat metanol, dan 14 g ekstrak pekat fraksi etil asetat yang digunakan untuk kromatografi kolom.
2. Karakterisasi dengan menggunakan sinar/lampu UV menunjukkan dalam daun belimbing (*Averrhoa carambola* Linn.L) terdapat flavon glikosida atau biflavonil atau flavon yang tersulih tak biasa.

REFERENSI

- [1] Dorly. 2005. *Makalah Pengantar Falsafah Sains*. Bogor: Institut Pertanian Bogor.
- [2] Bakhtiar, A. 1992. *Diktat Kuliah Flavonoid*. Padang: Universitas Andalas.
- [3] Nature Indonesia Singapore. 2008. *Rediscoveri Family Oxalidaceae : Averrhoa carambola*. Singapore.
- [4] Theresia, S.K. 1988. *Kimia dan Lingkungan*. Padang: Jurusan Kimia FMIPA Universitas Andalas.
- [5] Manjang, Y. 1985. *Kimia Analisis Organik*. Proyek Peningkatan Perguruan Tinggi. Padang: Universitas Andalas.
- [6] Gritter, R.J. 1991. *Pengantar Kromatografi*. Edisi Kedua. Bandung: Institut Teknologi Bandung.
- [7] Markham, K.R. 1988. *Cara Mengidentifikasi Flavonoid*. Bandung: Institut Teknologi Bandung.
- [8] Harborne, J.B. 1987. *Metode Fitokimia*, terjemahan Kosasih Padmawinata dan Iwang Soediro, Edisi kedua. Bandung: Penerbit ITB.