

Metode Cepat Identifikasi Flavonoid dari Daun *Ocimum sanctum* L. (Selasih)

Diah Dhianawaty, Ramdan Panigoro, Samsudin Surialaga, Pricilla Purushothman
Departemen Biokimia Fakultas Kedokteran Universitas Padjadjaran Bandung

Abstrak

Manfaat suatu tumbuhan sebagai obat herbal diperoleh dari kandungan kimianya, misalnya flavonoid. Flavonoid bermanfaat untuk kesehatan tubuh manusia. Oleh karena itu, kandungan flavonoid dapat dijadikan sebagai acuan manfaat suatu tanaman dan dibutuhkan metode identifikasi flavonoid yang cepat. Tujuan penelitian untuk memperoleh metode cepat kandungan flavonoid dalam *Ocimum sanctum*. Telah dilakukan penelitian ekstraksi, isolasi, dan identifikasi flavonoid daun *Ocimum sanctum* di laboratorium Kimia Medik Fakultas Kedokteran Universitas Padjadjaran pada tahun 2005. Flavonoid diekstraksi sinambung dengan etanol 95%, diisolasi dengan kromatografi kertas/lapis tipis selulose dan asam asetat 2%, kemudian dilanjutkan dengan pengembang: n-butanol–asam asetat–air, kloroform–asam asetat–air, *forestall*, asam asetat 5%, 15%, 35%, dan 50%. Flavonoid diidentifikasi dengan pereaksi geser dan sinar ultraviolet. Hasil isolasi dengan asam asetat 2% dan 35% berturut-turut memberikan dua bercak flavonoid, sebagai flavon, FOAc-1 mempunyai Rf=0,69 dan FOAc-2 mempunyai Rf=0,57. Pengembang lainnya memberikan satu bercak flavonoid. Simpulan, isolasi dengan asam asetat 2% dan 35% berturut-turut serta identifikasi dengan pereaksi geser dan sinar ultraviolet merupakan metode yang cepat untuk identifikasi kandungan flavonoid dalam *Ocimum sanctum*. [MKB. 2012;44(1):32–7].

Kata kunci: Flavonoid, identifikasi flavonoid, *Ocimum sanctum*

Rapid Identification Method of Flavonoid from *Ocimum sanctum* L. (Selasih) Leaves

Abstract

A plant's effectiveness as a herbal drug comes from its chemical content such as flavonoids. Flavonoids are useful for human body health. Therefore flavonoids content can be used as a marker from the usefulness of a plant, and rapid identification method of flavonoid is needed. The objective of the research was to get a rapid method of flavonoid content identification from *Ocimum sanctum*. The extraction, isolation and identification of flavonoids from *Ocimum sanctum* leaves has been done at Medical Chemistry laboratory Faculty of Medicine Universitas Padjadjaran in 2005. Flavonoids were extracted continually by 95% ethanol, were isolated with paper chromatography/cellulose TLC and 2% acetic acid, then continued with elucidation reagents: n-butanol–acetic acid–water, chloroform–acetic acid–water, *forestall*, 5%, 15%, 35% and 50% acetic acids. Flavonoids were identified with diagnostic reagents and ultraviolet light. Isolation with 2% and 35% acetic acids respectively gave two spots of flavonoids as flavon, FOAc-1 had Rf=0.69 and FOAc-2 had Rf=0.57. The other elucidation reagents gave one spot of flavonoid. In conclusion, isolation with 2% and 35% acetic acids respectively and identification with diagnostic reagent and ultraviolet light is a rapid method for identification of flavonoids content in *Ocimum sanctum*. [MKB. 2012;44(1):32–7].

Key words: Flavonoid, identification of flavonoid, *Ocimum sanctum*

Korespondensi: Diah Dhianawaty D., dr., M.Si, Departemen Biokimia Fakultas Kedokteran Universitas Padjadjaran Bandung, jalan Raya Bandung Sumedang km 21, telepon (022) 7794560, *mobile* 08122366990, *e-mail* diahdhianawaty@yahoo.com

Pendahuluan

Manfaat suatu tumbuhan sebagai obat herbal, diperoleh dari kandungan kimianya, seperti fenol, flavonoid, alkaloid, dan triterpenoid/steroid.^{1,2} Selama ini yang dikenal dari *Ocimum sanctum* yaitu buahnya yang merupakan campuran dalam minuman sirup. *Ocimum sanctum* mengandung minyak atsiri (1%, yaitu estragol, *linalool*, eugenol, *methyl chavicol* dan sejumlah kecil *cinnamate methyl*, *cineole*, dan terpen), saponin, flavonoid (apigenin, luteolin, orientin, *vicenin*), tanin, dan asam-asam fenolat.^{1,2}

Flavonoid mempunyai banyak efek yang baik terhadap kesehatan tubuh manusia. Para peneliti menemukan flavonoid yang bermanfaat sebagai antioksidan; berperan sebagai molekul *messenger* dalam interaksi antar sel; antiinflamasi dengan memutus efek jalur metabolisme asam arakidonat, mempengaruhi produksi prostaglandin dan pelepasan histamin, mempunyai aktivitas *scavenging*, antitumor dengan memutus aktivitas promoter tumor, dan antivirus diperkirakan memutus sintesis asam nukleat.^{3,4}

Kandungan flavonoid dalam daun *Ocimum sanctum* telah dikembangkan penggunaannya menjadi tumbuhan obat. Devi dkk.⁵ menemukan orientin dan *vicenin* yang melindungi mencit dari pengaruh radiasi, mekanismenya didasarkan pada aktivitas antioksidan yang melindungi lipid dari oksidasi. Orientin dan *vicenin*, dua isolat flavonoid dari daun *Ocimum scantum* yang larut dalam air, menunjukkan perlindungan terhadap radiasi dan aberasi kromosom signifikan secara *in vivo*.⁶ Siddique dan Afzal⁷ menemukan ekstrak *Ocimum sanctum* dapat melawan efek *genotoxic* yang diinduksi oleh *cyproterone acetate* dalam kultur sel mamalia. Banyak lagi efek farmakologi *Ocimum sanctum* yang telah ditemukan, antara lain efek antiinflamasi, analgesik dan antipiretik, antidiabetika, serta antilipidemia.⁸ Banyak efek yang ditimbulkan berasal dari kandungan flavonoidnya, oleh karena itu kandungan flavonoid dalam *Ocimum sanctum* menjadi penting untuk diketahui dan dibutuhkan metode isolasi serta identifikasi flavonoid yang cepat.

Flavonoid merupakan salah satu golongan fenol alam yang terbesar. Sebenarnya, flavonoid terdapat dalam semua tumbuhan hijau sehingga pastilah ditemukan pula pada setiap telaah ekstrak tumbuhan hijau.

Dalam tumbuhan, aglikon flavonoid (yaitu flavonoid tanpa gula terikat) terdapat dalam berbagai bentuk struktur. Semuanya mengandung 15 atom karbon dalam inti dasarnya yang tersusun dalam konfigurasi C6-C3-C6, yaitu dua cincin aromatik yang dihubungkan oleh satuan tiga karbon yang dapat atau tidak dapat membentuk cincin ketiga.

Banyak metode yang dapat digunakan untuk mengisolasi dan mengidentifikasi flavonoid. Kromatografi kertas atau kromatografi lapis tipis selulosa merupakan kromatografi yang paling umum dan berguna untuk flavonoid. Kromatogram kertas atau kromatogram selulosa dikembangkan dengan bermacam pengembang yang berguna untuk menganalisis flavonoid, antara lain:^{9,10} 1) BAA: n-butanol–asam asetat–air (4:1:5); 2) KAA: kloroform–asam asetat–air (30:15:2); 3) forestal [asam asetat–air–asam klorida (30:10:3)]; 4) Asam format [asam format–air–asam klorida (5:3:2)]; 5) BEA: n-butanol–etanol–air (4:1:2,2); 6) benzen–asam asetat–air (125:72:3); 7) Asam asetat 5%, 15%, dan 50%; serta 8) asam klorida 1% dan lainnya. Pada identifikasi flavonoid yang pertama dijadikan acuan dengan menafsirkan warna bercak dari segi struktur flavonoid dengan penampak bercak amoniak dan sinar ultraviolet, untuk selanjutnya diidentifikasi dilanjutkan dengan mengukur absorbansinya dengan pereaksi geser dan spektrofotometer ultraviolet-sinar tampak.^{9,10} Dari bermacam pengembang tersebut pada tahun 2005 diteliti pengembang yang efektif untuk flavonoid *Ocimum sanctum* di laboratorium Kimia Medik Fakultas Kedokteran Universitas Padjadjaran. Tujuan penelitian untuk memperoleh metode yang cepat untuk mengidentifikasi kandungan flavonoid dalam *Ocimum sanctum*.

Metode

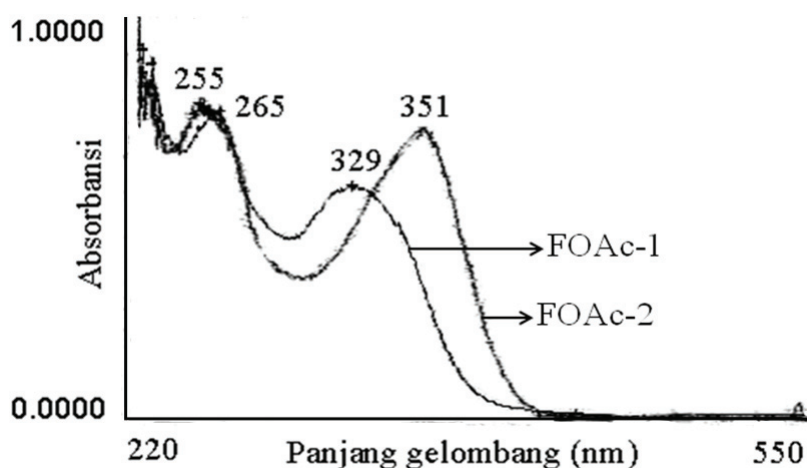
Bahan yang dipakai daun *Ocimum sanctum* dari Bandung, pereaksi (Merck©) berupa 95% etanol, n-butanol, asam asetat, kloroform, asam klorida dan aluminium klorida, metanol, natrium hidroksida, natrium asetat, asam borat, serta asam klorida. Alat yang digunakan kertas Whatman No. 1 dan No. 3, pelat TLC selulosa, *soxhlet*, penampak bercak ultraviolet-sinar tampak dengan panjang gelombang 254 nm dan 366 nm (Desaga-CabUvis), spektrofotometer ultraviolet-sinar tampak (DU 650i Beckman). Penghitungan statistik tidak dilakukan karena pada penelitian ini yang dicari yaitu metode cepat untuk mengidentifikasi kandungan flavonoid daun *Ocimum sanctum*. Pencarian dan pemisahan flavonoid dilakukan dengan mengekstraksi sinambung daun *Ocimum sanctum* dalam 95% etanol dan *soxhlet*. Ekstrak dipekatkan dengan evaporator. Flavonoid di dalam ekstrak diisolasi dengan kertas Whatman No. 1, No. 3, TLC selulosa, dan bermacam pereaksi pengelusi, kemudian flavonoid diidentifikasi dengan 5% aluminium klorida dan sinar ultraviolet pada panjang gelombang 254 nm dan 366 nm. Langkah awal flavonoid dalam ekstrak diisolasi dengan 2% asam asetat, kemudian flavonoid diisolasi

kembali dengan bermacam pereaksi pengelusi: 1) n-butanol–asam asetat–air (4:1:5); 2) kloroform–asam asetat–air (30:15:2); 3) forestal [asam asetat–air–asam klorida (30:10:3)]; serta 4) asam asetat 5%, 15%, 35%, dan 50%. Flavonoid dalam metanol (MeOH) diidentifikasi dengan sinar ultraviolet pada panjang gelombang 220–550 nm dan pereaksi geser: natrium metanolat (NaOMe), natrium asetat (NaOAc), campuran natrium asetat dan asam borat (NaOAc/H₃BO₃), alumunium klorida (AlCl₃), serta campuran alumunium klorida dan asam klorida (AlCl₃/HCl).^{9,10}

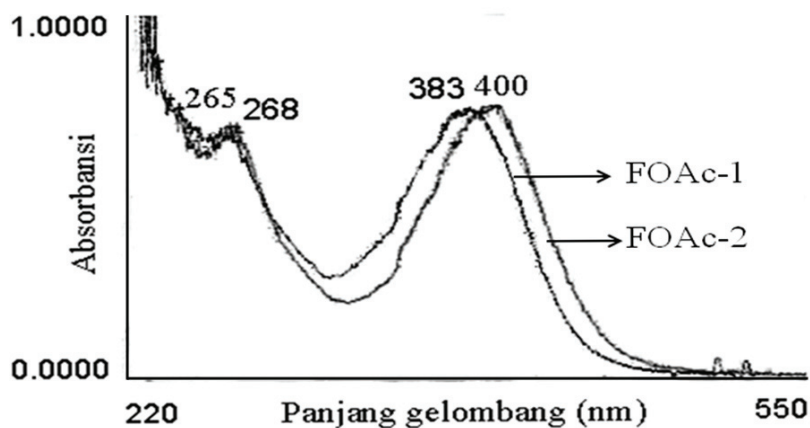
Hasil

Pertama kali flavonoid diisolasi dari ekstrak etanol pekat dengan 2% asam asetat, diperoleh satu bercak yang memberikan warna violet gelap pada sinar ultraviolet dengan panjang gelombang

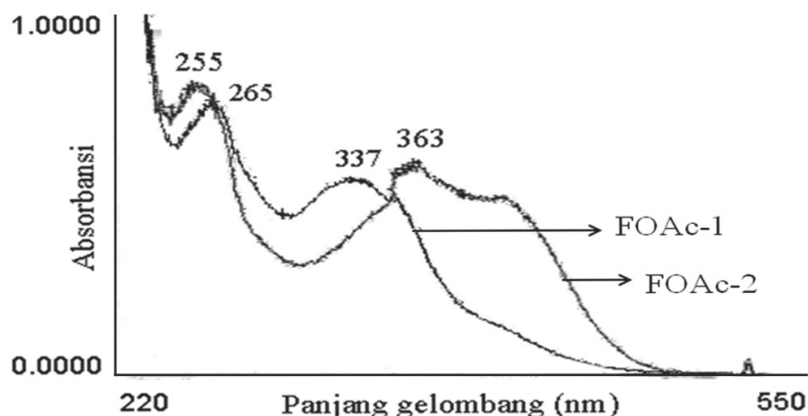
366 nm dan dengan pereaksi alumunium klorida 5% dalam metanol, dan di bawah sinar ultraviolet pada panjang gelombang 366 nm memberikan warna kuning. Flavonoid tersebut diisolasi sekali lagi dengan bermacam pereaksi pengelusi, dengan penampak bercak larutan AlCl₃ dalam metanol dan sinar ultraviolet pada panjang gelombang 366 nm, diperoleh: 1) n-butanol–asam asetat–air (4:1:5), hasilnya satu bercak flavonoid; 2) kloroform–asam asetat–air (30:15:2), hasilnya satu bercak flavonoid; 3) Forestal [asam asetat–air–asam klorida (30:10:3)], hasilnya satu bercak flavonoid, dan 4) 35% asam asetat, hasilnya dua bercak. Kedua isolat flavonoid diberi nama FOAc-1 dan FOAc-2. Masing-masing isolat diukur absorbansinya dalam metanol pada panjang gelombang 220 sampai 550 nm dengan spektrometer ultraviolet. Isolat FOAc-1 memberikan puncak absorbansi pita I: 329 nm dan pita II: 265 nm. Isolat FOAc-2 memberikan



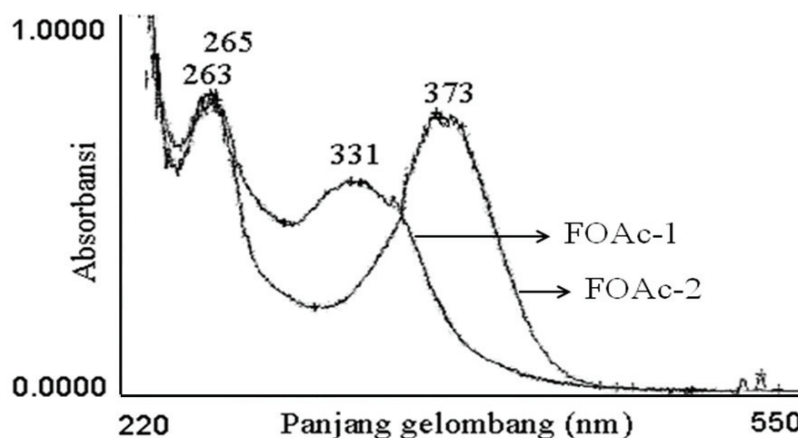
Gambar 1 Spektrum Ultraviolet Isolat FOAc-1 dan FOAc-2 dalam Metanol



Gambar 2 Spektrum Ultraviolet Isolat FOAc-1 dan FOAc-2 dalam Metanol dengan Pereaksi Geser NaOMe



Gambar 3 Spektrum Ultraviolet Isolat FOAc-1 dan FOAc-2 dalam Metanol dengan Pereaksi Geser NaOAc



Gambar 4 Spektrum Ultraviolet Isolat FOAc-1 dan FOAc-2 dalam Metanol dengan Pereaksi Geser NaOAc/H₃BO₃

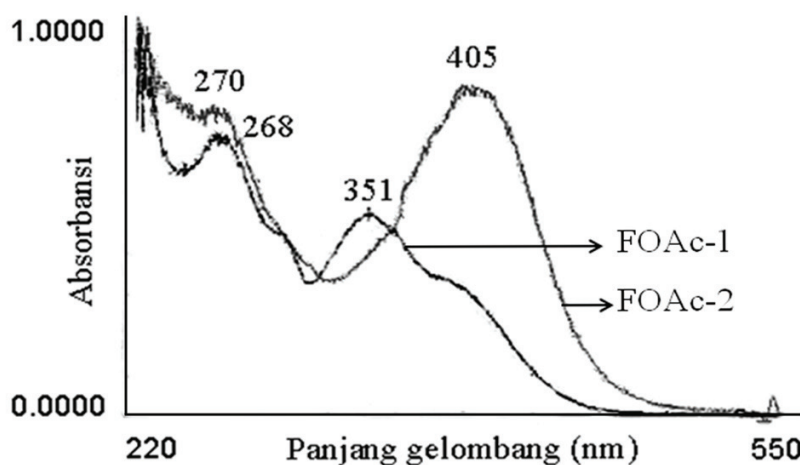
puncak absorbansi pita I: 351 nm dan pita II: 255 nm.

Pengukuran absorbansi ultraviolet-sinar tampak dilanjutkan dengan pengukuran geser absorbansinya dengan pereaksi geser: natrium metanolat (NaOMe), natrium asetat (NaOAc), campuran natrium asetat dan asam borat (NaOAc/H₃BO₃), aluminium klorida (AlCl₃), serta campuran aluminium klorida dan asam klorida (AlCl₃/HCl). Data puncak absorbansi isolat FOAc-1: UV (MeOH) λ_{\max} (A) 265 nm (0,74); 329 nm (0,57) (Gambar 1). UV (NaOMe) λ_{\max} (A) 268 nm (0,67); 383 nm (0,74) (Gambar 2). UV (NaOAc) λ_{\max} (A) 265 nm (0,73); 337 nm (0,53) (Gambar 3). UV (NaOAc/H₃BO₃) λ_{\max} (A) 265 nm (0,76); 331 nm (0,56) (Gambar 4). UV (AlCl₃) λ_{\max} (A) 268 nm (0,67); 351 nm (0,51) (Gambar 5). UV (AlCl₃/HCl) λ_{\max} (A) 265 nm (0,69); 339 nm (0,53) (Gambar 6). Data puncak absorbansi isolat FOAc-2: UV (MeOH) λ_{\max} (A)

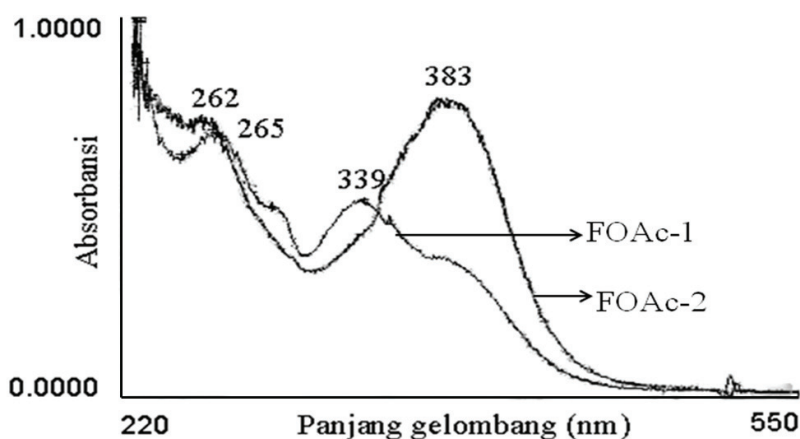
255 nm (0,81); 351 nm (0,77) (Gambar 1). UV (NaOMe) λ_{\max} (A) 265 nm (0,69); 400 nm (0,75) (Gambar 2). UV (NaOAc) λ_{\max} (A) 255 nm (0,84); 363 nm (0,61) (Gambar 3). UV (NaOAc/H₃BO₃) λ_{\max} (A) 263 nm (0,76); 373 nm (0,69) (Gambar 4). UV (AlCl₃) λ_{\max} (A) 270 nm (0,78); 405 nm (0,82) (Gambar 5). UV (AlCl₃/HCl) λ_{\max} (A) 262 nm (0,73); 383 nm (0,78) (Gambar 6).

Pembahasan

Dari hasil isolasi dengan asam asetat 2% yang dilanjutkan dengan 4 macam pengembang, dari 3 macam pengembang 1) n-butanol–asam asetat–air (4:1:5), 2) Kloroform–asam asetat–air (30:15:2), dan 3) Forestal [asam asetat–air–asam klorida (30:10:3)], diperoleh satu bercak flavonoid. Pengembang ke-4, asam asetat 35% diperoleh dua bercak flavonoid yang disebut



Gambar 5 Spektrum Ultraviolet Isolat FOAc-1 dan FOAc-2 dalam Metanol dengan Pereaksi Geser AlCl_3



Gambar 6 Spektrum Ultraviolet Isolat FOAc-1 dan FOAc-2 dalam Metanol dengan Pereaksi Geser AlCl_3/HCl

FOAc-1 dan FOAc-2.

Identifikasi dua bercak flavonoid hasil pengembangan dengan asam asetat 35%, dengan sinar ultraviolet pada panjang gelombang 220–550 nm dan pereaksi geser flavonoid, diperoleh data puncak absorbansi FOAc-1, pita I: 329 nm, pita II: 265 nm, puncak absorbansi FOAc-2, pita I: 351 nm, pita II: 255 nm. Pola puncak absorbansi kedua isolat diperkirakan mengikuti pola puncak absorbansi flavonoid, yaitu sebagai berikut, pita I: 310–350 adalah absorbansi cincin sinamoiil, pita II: 250–280 adalah absorbansi cincin benzoil. Dari perubahan warna violet gelap pada sinar ultraviolet dengan panjang gelombang 366 nm dan dengan pereaksi aluminium klorida 5% dalam metanol, dan pola puncak absorbansinya, kedua isolat diperkirakan golongan flavon.

Data spektrum ultraviolet isolat FOAc-1: 1) Dalam metanol (Gambar 1) pita I: 329 nm dan

pita II: 265 nm. 2) Dalam natrium metanolat (Gambar 2) pita I: 383 nm dan pita II: 268 nm, terjadi geseran batokromik 54 nm pada pita I, dan absorbansi stabil, diduga ada gugus 4'-OH bebas. 3) Dalam natrium asetat (Gambar 3) pita I: 337 nm dan pita II: 265 nm, tidak terjadi geseran batokromik pada pita II, diduga tidak ada gugus 7-OH bebas. 4) Dalam natrium asetat–asam borat (Gambar 4) pita I: 331 nm dan pita II: 265 nm, terjadi geseran batokromik 4 nm pada pita I, diduga tidak ada *o*-diOH pada cincin-B. 5) Dengan aluminium klorida (Gambar 5) pita I: 351 nm dan pita II: 268 nm, terjadi geseran batokromik 22 nm pada pita I, diduga ada gugus 5-OH bebas. 6) Dalam aluminium klorida–asam hidroklorida (Gambar 6) pita I: 339 nm dan pita II: 265 nm, terjadi geseran batokromik 10 nm pada pita I, diduga tidak ada *o*-diOH pada cincin-B.

Data spektrum ultraviolet isolat FOAc-2: 1)

dalam metanol (Gambar 1) pita I: 351 nm dan pita II: 255 nm, 2) dalam natrium metanolat (Gambar 2) pita I: 400 nm and pita II: 265 nm, terjadi geseran batokromik 49 nm pada pita I dan absorbansi stabil, diduga ada gugus 4'-OH bebas, 3) dalam natrium asetat (Gambar 3) pita I: 363 nm dan pita II: 255 nm, tidak terjadi geseran batokromik pada pita II, diduga tidak ada 7-OH bebas, 4) dalam natrium asetat– asam borat (Gambar 4) pita I: 373 nm dan pita II: 263 nm, terjadi geseran batokromik 22 nm pada pita I, diduga ada *o*-diOH pada cincin-B, 5) dalam aluminium klorida (Gambar 5) pita I: 405 nm dan pita II: 270 nm, terjadi geseran batokromik 54 nm pada pita I, diduga ada gugus 5-OH bebas, 6) dalam aluminium klorida–asam hidroklorida (Gambar 6) pita I: 383 nm dan pita II: 262 nm, terjadi geseran batokromik 32 nm pada pita I, diduga ada gugus *o*-diOH pada cincin-B.

Dari uraian di atas, FOAc-1 flavon dengan Rf=0,69; pita I: 329 nm dan pita II: 265 nm; terdapatnya gugus 4'-OH bebas dan gugus 5-OH bebas. FOAc-2 flavon dengan Rf=0,57; pita I: 351 nm dan pita II: 255 nm; terdapatnya gugus 4'-OH bebas, gugus 5-OH bebas dan *o*-diOH pada cincin-B.

Dari perolehan flavonoid seperti tersebut di atas, untuk tiga macam pengembang yang hanya memberikan satu bercak flavonoid, masih diperlukan pengembangan lebih lanjut supaya memperoleh hasil pengembangan yang lebih baik. Untuk pengembang asam asetat 35% diperoleh hasil yang lebih baik, berdasarkan analisis karakteristik spektrum ultravioletnya kedua bercak merupakan flavon.

Dengan demikian, dapat disimpulkan metode identifikasi flavonoid dari *Ocimum sanctum* dengan asam asetat 2% dan 35% berturut-turut lebih cepat daripada ketiga pengembang lainnya.

Daftar Pustaka

1. Hutapea JR, Djumidi, Sutjipto, Sugiarto S, Soerahso, Sihotang, dkk. Dalam: Darwanto, penyunting. Inventaris tanaman obat Indonesia, *Ocimum sanctum* L. (Selasih). Volume ke-1. Jilid ke-2. Jakarta: Departemen Kesehatan; 2001. hlm. 247–8.
2. Dalimartha S. Dalam: Dahlianti R, penyunting. Atlas tumbuhan obat Indonesia. Jilid ke-5. Jakarta: Pustaka Bunda; 2008. hlm. 156–8.
3. Annadana S. Medicinal Herb Tulsi (*Ocimum sanctum*); Medicinal plants [Online serial] 15-06-2006. [diunduh 29 Agustus 2010]. Tersedia dari: <http://www.AgricultureInformation.com.mht>.
4. *Ocimum Sanctum*; Section tanaman obat - Galeri tanaman obat [diunduh 12 Desember 2008]. Tersedia dari: <http://www.Tanaman-obat.com>.
5. Devi UP, Ganasoundari A, Vrinda B, Srinivasan KK, Unnikrishnan MK. Radiation protection by the *ocimum* flavonoids orientin and vicenin: mechanisms of action. Radiat Res [Online serial] 2000 Oct. [diunduh 29 Agustus 2010]. Tersedia dari: <http://www.PubMed.gov>.
6. Vrinda B, Uma DP. Radiation protection of human lymphocyte chromosomes in vitro by orientin and vicenin. Mutat Res [Online serial] 2001 Nov 15;498(1–2):39–46. [diunduh 29 November 2010]. Tersedia dari: <http://www.PubMed.gov>.
7. Siddique YH, Afzal M. *Ocimum sanctum* L. extract can against genotoxic effect that was induced by cyproterone acetate in culture mammalian cells. Internet J Pharmacol [Online serial] 2008;6(1). [diunduh 10 Agustus 2010]. Tersedia dari: ISPUB.com.
8. Mondal S, Mirdha BR, Mahapatra SC. The science behind sacredness of Tulsi (*Ocimum sanctum* Linn.). Indian J Physiol Pharmacol. 2009;53(4):291–306.
9. [Dhianawaty DD, Padmawinata K, Soediro I, Soemardji AA. Isolasi, karakterisasi dan uji aktivitas antikalkuli luteolin 7-*O*-glukosida dari daun *Sonchus arvensis* L. pada tikus dengan metode matrix-asam glikolat. Bionatura. 2003;5(3):196–202.
10. Dhianawaty DD, Padmawinata K, Soediro I, Soemardji AA. Isolasi, karakterisasi dan uji aktivitas antikalkuli apigenin 7-*O*-glukosida dari daun *Sonchus arvensis* L. pada tikus dengan metode matrix-asam glikolat. Jurnal Bahan Alam Indonesia. 2004;3(1):162–4.