



Identifikasi dan Karakterisasi Golongan Senyawa Metabolit Sekunder Bioaktif pada Ekstrak Kulit Batang Kamboja Bali (*Plumeria rubra* L.) Berdasarkan Analisis Kromatografi dan Spektrofotometri Uv-Vis

Putri^{1*}, Suci Rahmadani², Ashaja Syamsi³, Aqilah Salsabilah Rusli⁴, Andryani Astuti Anwar⁵, Fani Agusni Mansur⁶

¹⁻⁶ Program Studi Farmasi, Fakultas Kedokteran dan Ilmu Kesehatan, Universitas Muhammadiyah Makassar

Email: putrihl027@gmail.com^{1*}, sucirahmadnii@gmail.com², ashajasyamsi324@gmail.com³, aqilahsalsabilah130@gmail.com⁴, andrianiastutianwar@gmail.com⁵, faniagusnim@gmail.com⁶

*Penulis Korespondensi: putrihl027@gmail.com

Abstract. Bali frangipani (*Plumeria rubra* L.) is a medicinal plant traditionally used in Indonesia and is known to contain various bioactive secondary metabolites. This study aimed to identify and characterize the secondary metabolite compounds present in the ethanol extract of Bali frangipani stem bark through phytochemical screening, fractionation, chromatographic separation, and determination of total flavonoid content. The research employed an experimental laboratory design with a descriptive qualitative approach. Stem bark was extracted by reflux using 96% ethanol, followed by liquid-liquid fractionation, column chromatography, thin-layer chromatography (TLC), preparative TLC, and two-dimensional TLC. Phytochemical screening confirmed the presence of alkaloids and saponins, whereas flavonoids, tannins, and steroids/triterpenoids were not detected in the crude extract. Column chromatography of the ethyl acetate fraction yielded 28 fractions that were combined into five sub-fractions. TLC analysis identified three major spots, and the flavonoid-like compound was successfully isolated as isolate A, exhibiting yellow-green fluorescence under UV 366 nm with an R_f value of 0.30–0.34. Two-dimensional TLC demonstrated a single spot, indicating satisfactory purity. Total flavonoid content, determined using the AlCl₃ colorimetric method with quercetin as the reference standard, was 4.883 mg QE/g extract (4.883%), indicating a relatively low flavonoid level according to the Indonesian Herbal Pharmacopoeia. These findings contribute to understanding the phytochemical profile of Bali frangipani stem bark and support its potential application in pharmaceutical and natural product research.

Keywords: Phytochemical Screening; *Plumeria Rubra* L.; Secondary Metabolites; Thin Layer Chromatography; UV-Vis Spectrophotometry.

Abstrak. Frangipani Bali (*Plumeria rubra* L.) adalah tanaman obat yang secara tradisional digunakan di Indonesia dan dikenal mengandung berbagai metabolit sekunder bioaktif. Penelitian ini bertujuan untuk mengidentifikasi dan mengkarakterisasi senyawa metabolit sekunder yang terdapat dalam ekstrak etanol kulit batang Frangipani Bali melalui skrining fitokimia, fraksinasi, pemisahan kromatografi, dan penentuan kandungan flavonoid total. Penelitian ini menggunakan desain laboratorium eksperimental dengan pendekatan kualitatif deskriptif. Kulit batang diekstraksi dengan refluks menggunakan etanol 96%, diikuti dengan fraksinasi cair-cair, kromatografi kolom, kromatografi lapis tipis (TLC), TLC preparatif, dan TLC dua dimensi. Skrining fitokimia mengkonfirmasi keberadaan alkaloid dan saponin, sedangkan flavonoid, tanin, dan steroid/triterpenoid tidak terdeteksi dalam ekstrak kasar. Kromatografi kolom fraksi etil asetat menghasilkan 28 fraksi yang digabungkan menjadi lima sub-fraksi. Analisis TLC mengidentifikasi tiga bercak utama, dan senyawa mirip flavonoid berhasil diisolasi sebagai isolat A, yang menunjukkan fluoresensi kuning kehijauan di bawah UV 366 nm dengan nilai R_f 0,30–0,34. TLC dua dimensi menunjukkan satu bercak tunggal, yang mengindikasikan kemurnian yang memuaskan. Kandungan flavonoid total, yang ditentukan menggunakan metode kolorimetri AlCl₃ dengan kuersetin sebagai standar referensi, adalah 4,883 mg QE/g ekstrak (4,883%), menunjukkan kadar flavonoid yang relatif rendah menurut Farmakope Herbal Indonesia. Temuan ini berkontribusi pada pemahaman profil fitokimia kulit batang frangipani Bali dan mendukung potensi aplikasinya dalam penelitian farmasi dan produk alami.

Kata kunci: Kromatografi Lapis Tipis; Metabolit Sekunder; *Plumeria Rubra* L.; Skrining Fitokimia; Spektrofotometri UV-Vis.

1. LATAR BELAKANG

Indonesia merupakan salah satu negara dengan keragaman obat yang besar di dunia. Kawasan hutan hujan tropis tropika Indonesia memiliki keanekaragaman hayati tertinggi kedua di dunia, setelah Brazil. Tumbuhan diseluruh dunia mencapai 40.000 spesies, 30.000 diantaranya terdapat di Indonesia dan 940 jenis diantaranya memiliki khasiat sebagai obat dan telah digunakan dalam pengobatan tradisional oleh berbagai suku bangsa Indonesia secara turun-temurun. Tumbuhan obat tersebut berjumlah sekitar 90% dari total jumlah tumbuhan obat yang terdapat di Kawasan Asia (Pratiwi et al., 2023).

Tanaman kamboja merupakan obat alternatif, seluruh bagian tanaman kamboja dapat digunakan dalam pengobatan tradisional. Batang dan daun kamboja merupakan bagian yang paling sering digunakan karena mengandung flavonoid dan alkaloid. Tanaman obat dapat ditanam baik secara monokultur maupun campuran (Fikayuniar et al., 2024).

Flavonoid merupakan salah satu senyawa yang dapat diperoleh dari alam yang telah digunakan secara luas oleh masyarakat. Flavonoid merupakan senyawa metabolit sekunder yang memiliki struktur inti C6-C3-C6 yaitu dua cincin aromatik yang terhubung dengan dua atom C, biasanya dengan ikatan atom O yang berupa ikatan oksigen heterosiklik. Flavonoid merupakan salah satu golongan metabolit sekunder yang dihasilkan oleh tanaman yang termaksud dalam kelompok besar polifenol, senyawa ini terdapat pada semua bagian tanaman termasuk daun (Jannah, 2024). Klasifikasi dan morfologi tanaman (Julianto, 2016).

Kerajaan : Plantae
Divisi : Magnoliophyta
Kelas : Magnoliopsida
Ordo : Gentianales
Famili : Apocynaceae
Genus : *Plumeria*
Spesies : *Plumeria rubra* L



Gambar 1. Kamboja bali

Secara morfologi, *Plumeria rubra* memiliki struktur vegetatif berupa batang berkayu dengan kandungan lateks yang khas dari famili Apocynaceae. Daunnya berbentuk lonjong hingga lanset dengan susunan spiral di ujung cabang, yang berperan dalam optimalisasi penyerapan cahaya. Struktur generatifnya berupa bunga majemuk dengan simetri radial yang terdiri dari lima mahkota, lima kelopak, serta organ reproduksi berupa benang sari dan putik yang terintegrasi dalam satu struktur kompleks. Morfologi bunga ini berperan penting dalam mekanisme penyerbukan yang selektif terhadap jenis penyerbuk tertentu (Hendriawan et al., 2022).

Beberapa penelitian melaporkan bahwa bagian kulit batang, daun, dan getah *Plumeria rubra* L. mengandung metabolit sekunder golongan alkaloid, flavonoid, saponin, tanin, dan senyawa fenolik, serta senyawa khas seperti plumierid, asam plumerat, lupeol, dan fulvoplumierin yang dilaporkan memiliki aktivitas antibakteri terhadap *Mycobacterium tuberculosis* (Dalimartha, 1999). Kandungan tersebut mendasari berbagai aktivitas farmakologis yang telah dilaporkan, antara lain aktivitas antibakteri, antijamur, antioksidan, analgesik, antispasmodik, dan hipoglikemik. Kulit batang kamboja secara khusus dilaporkan mengandung flavonoid, alkaloid, dan polifenol dalam jumlah yang cukup signifikan, sehingga berpotensi sebagai sumber senyawa bioaktif yang perlu dikaji lebih lanjut (Gilman, E. F., & Watson, 1994).

Pereaksi $AlCl_3$ digunakan dengan metode kolorimetri untuk mengukur jumlah molekul flavonoid. Pita serapan UV dan sinar tampak adalah cara terbaik untuk mengetahui struktur flavonoid. Pada rentang UV-Vis, terdapat pita serapan yang kuat pada sistem aromatik terkonjugasi flavonoid. Menggunakan quercetin sebagai acuan, jumlah senyawa flavonoid diukur sebagai QE (quercetin equivalent)

Beberapa penelitian terdahulu telah melaporkan kandungan metabolit sekunder pada berbagai bagian tanaman *Plumeria rubra* L. Kandungan flavonoid, alkaloid, dan polifenol dilaporkan terdapat pada akar, daun, dan kulit batang kamboja, sedangkan getahnya dilaporkan mengandung damar dan asam plumerat yang bersifat pahit. Senyawa fulvoplumierin yang diisolasi dari tumbuhan ini dilaporkan memiliki aktivitas antibakteri terhadap *Mycobacterium tuberculosis*. Namun demikian, penelitian yang secara khusus mengombinasikan skrining fitokimia dengan teknik KLT bertingkat (KLT analitik, KLTP, dan KLT dua dimensi) serta karakterisasi spektrofotometri UV-Vis pada ekstrak kulit batang kamboja Bali masih jarang dilaporkan, sehingga penelitian ini diharapkan dapat melengkapi data ilmiah yang telah ada.

Berdasarkan uraian di atas, penelitian ini dirancang untuk mengidentifikasi dan mengarakterisasi metabolit sekunder pada ekstrak kulit batang kamboja Bali (*Plumeria rubra* L.) melalui pendekatan bertahap, yaitu skrining fitokimia, KLT, KLTP, KLT dua dimensi, dan spektrofotometri UV-Vis. Diharapkan hasil penelitian ini dapat memberikan informasi ilmiah mengenai profil metabolit sekunder kulit batang kamboja Bali serta membuka peluang pemanfaatannya lebih lanjut dalam bidang farmasi dan pengembangan produk bahan alam.

2. METODE PENELITIAN

Jenis Penelitian

Penelitian ini merupakan penelitian eksperimental laboratorium yang bersifat deskriptif kualitatif, meliputi pengolahan simplisia, ekstraksi, skrining fitokimia, pemisahan dengan kromatografi kolom, identifikasi dengan kromatografi lapis tipis (KLT), isolasi dengan kromatografi lapis tipis preparatif (KLTP), uji kemurnian dengan KLT dua dimensi, serta karakterisasi menggunakan spektrofotometri UV-Vis.

Alat dan Bahan

Alat yang digunakan dalam penelitian ini meliputi batang pengaduk, batu didih, botol coklat, botol semprot, botol vial, bunsen, cawan porselin, chamber KLT, corong, corong pisah, desikator, gelas arloji, gelas kimia, gelas ukur, gunting, kaki tiga, kawat kasa, kertas saring, klem, labu alas datar, lampu UV 254 nm dan 366 nm, lempeng KLT silika gel GF60, lempeng KLT preparatif, oven, penggaris, pensil, pipa kapiler, pipet tetes, rak tabung reaksi, rotary evaporator, spektrofotometer UV-Vis, statif, sudip, tabung reaksi, timbangan analitik, dan water bath.

Bahan yang digunakan dalam penelitian ini meliputi kulit batang kamboja Bali (*Plumeria rubra* L.), etanol 96%, n-heksan, etil asetat, metanol, kloroform, aquadest, asam klorida (HCl) 2N, asam sulfat pekat (H₂SO₄), asam asetat anhidrat, aluminium klorida (AlCl₃) 5%, besi (III) klorida (FeCl₃) 1%, pereaksi Mayer, pereaksi Dragendorff, pereaksi Wagner, pereaksi Liebermann-Burchard, serbuk magnesium, gelatin 1%, NaCl 10%, silika gel GF60, kertas saring dan aluminium foil.

Prosedur Penelitian

Pengumpulan dan Pengolahan Sampel

Sampel yang digunakan adalah kulit batang kamboja Bali (*Plumeria rubra* L.) yang diperoleh dari desa kupa kabupaten barru. Sampel yang telah dikumpulkan disortasi basah untuk memisahkan dari pengotor, dicuci bersih dengan air mengalir, kemudian dirajang kecil-kecil untuk memperluas permukaan kontak dan mempercepat proses pengeringan. Sampel selanjutnya dikeringkan dengan cara diangin-anginkan terhindar dari sinar matahari langsung hingga diperoleh simplisia kering, kemudian dihaluskan menjadi serbuk simplisia.

Ekstraksi

Proses ekstraksi sampel kulit batang kamboja (*Plumeria rubra* L.), dengan metode refluks yaitu, di timbang sampel kulit batang kamboja (*Plumeria rubra* L.), sebanyak 50 gram dan di masukkan ke dalam labu alas bulat bersama dengan batu didih lalu di tambahkan etanol 96% sebanyak 500 ml dan di olesi faseline pada mulut labu, kemudian di rekatkan labu alas

bulat pada alat refluks, setelah itu di panaskan. di tambahkan pelarut secara berulang hingga simplisia terendam kembali lalu di kumpulkan hasil ekstrak lalu di saring kembali menggunakan kertas saring kemudian di uapakan ekstrak dan di timbang hasil ekstrak kental.

Skrining Fitokimia

Skrining fitokimia dilakukan untuk mengidentifikasi golongan senyawa alkaloid, flavonoid, tanin, saponin, dan steroid/triterpenoid pada ekstrak etanol kulit batang kamboja Bali: a.) Alkaloid: ekstrak dilarutkan dengan HCl 2N, kemudian filtrat dibagi tiga bagian dan diuji dengan pereaksi Mayer (terbentuk endapan putih hingga kekuningan menunjukkan hasil positif), pereaksi Dragendorff (terbentuk endapan jingga menunjukkan hasil positif), dan pereaksi Wagner (terbentuk endapan cokelat kemerahan menunjukkan hasil positif);b.) Flavonoid: dilakukan uji Shinoda, yaitu ekstrak ditambahkan serbuk magnesium dan HCl pekat; terbentuknya warna merah, jingga, atau kuning menunjukkan hasil positif;c.) Tanin: ekstrak ditambahkan larutan FeCl_3 1%; terbentuknya warna biru kehitaman atau hijau kehitaman menunjukkan adanya tanin;d.) Saponin: ekstrak dikocok dengan air panas selama beberapa menit; terbentuknya buih stabil setinggi 1–10 cm yang tidak hilang setelah penambahan HCl 2N menunjukkan hasil positif;e.) Steroid/Triterpenoid: dilakukan uji Liebermann-Burchard, yaitu ekstrak ditambahkan asam asetat anhidrat dan H_2SO_4 pekat melalui dinding tabung; terbentuknya warna hijau-biru menunjukkan adanya steroid, sedangkan warna merah-ungu menunjukkan adanya triterpenoid.

Fraksinasi

Ekstrak kental etanol kulit batang kamboja Bali difraksinasi menggunakan metode ekstraksi cair-cair (partisi) dengan bantuan corong pisah untuk memisahkan komponen berdasarkan tingkat kepolarannya sebelum dilakukan identifikasi lebih lanjut dengan KLT. Ekstrak kental terlebih dahulu dilarutkan dengan sedikit campuran etanol-air, kemudian dimasukkan ke dalam corong pisah dan dipartisi secara berturut-turut menggunakan pelarut dengan kepolaran meningkat, dimulai dari n-heksan, dilanjutkan dengan etil asetat. Pada setiap tahap partisi, campuran dikocok kuat dalam corong pisah sambil sesekali membuka kran untuk membuang tekanan gas, kemudian didiamkan hingga terbentuk dua lapisan yang terpisah sempurna (lapisan pelarut organik dan lapisan air).

Lapisan pelarut organik (n-heksan) dipisahkan dari lapisan air melalui kran corong pisah, kemudian proses pengocokan dan pemisahan diulangi beberapa kali dengan pelarut segar hingga lapisan organik yang diperoleh relatif jernih. Masing-masing fraksi pelarut (fraksi n-heksan, fraksi etil asetat, dan fraksi sisa air) yang terkumpul selanjutnya dipekatkan menggunakan rotary evaporator hingga diperoleh fraksi kental, kemudian ditimbang untuk

menentukan bobot dan rendemen masing-masing fraksi terhadap bobot ekstrak awal yang difraksinasi. Fraksi dengan hasil skrining fitokimia dan profil KLT yang menunjukkan kandungan senyawa target paling dominan (misalnya fraksi etil asetat untuk golongan flavonoid) selanjutnya dipilih sebagai sampel pada tahap pemisahan lebih lanjut menggunakan kromatografi kolom.

Kromatografi Kolom

Fraksi terpilih hasil fraksinasi dengan corong pisah selanjutnya dipisahkan lebih lanjut menggunakan kromatografi kolom terbuka (gravitasi) untuk memperoleh sub-fraksi dengan profil komponen yang lebih sederhana. Kolom kaca disiapkan dengan mengisi bagian dasar menggunakan sedikit kapas dan kertas saring, kemudian silika gel sebagai fase diam dibuat bubur (slurry) menggunakan eluen n-heksan dan dimasukkan ke dalam kolom secara perlahan sambil diketuk-ketuk agar terpadatkan merata dan bebas dari gelembung udara atau retakan. Fraksi kental yang telah dipreadsorpsi pada sejumlah kecil silika gel (dikeringkan hingga berbentuk serbuk) dimasukkan secara hati-hati ke bagian atas permukaan kolom, kemudian ditambahkan lapisan silika gel tipis di atasnya untuk melindungi permukaan sampel.

Elusi dilakukan menggunakan sistem eluen n-heksan : etil asetat dengan perbandingan 6:4 yang dialirkan secara kontinu memanfaatkan gaya gravitasi dengan kecepatan alir yang dijaga konstan. Eluat yang keluar dari kolom ditampung ke dalam vial-vial dengan volume yang relatif sama untuk setiap sub-fraksi. Setiap sub-fraksi yang diperoleh kemudian dipantau profil pemisahannya menggunakan KLT dengan fase gerak yang sama (n-heksan : etil asetat, 6:4) dan diamati di bawah lampu UV 254 nm dan 366 nm. Sub-fraksi gabungan dengan profil KLT paling sederhana dan noda paling dominan selanjutnya dipilih sebagai target untuk tahap pemurnian menggunakan KLT preparatif.

Kromatografi Lapis Tipis (KLT)

Identifikasi awal profil senyawa dilakukan menggunakan KLT dengan fase diam silika gel GF60 dan fase gerak berupa campuran n-heksan : etil asetat dengan perbandingan (6:4). Lempeng KLT diaktifkan terlebih dahulu di dalam oven pada suhu 100–110°C selama ± 10 menit. Ekstrak ditotolkan pada jarak tertentu dari tepi bawah lempeng, kemudian dielusi dalam chamber yang telah dijenuhkan dengan uap eluen. Setelah eluen mencapai batas elusi, lempeng diangkat dan dikeringkan, kemudian diamati di bawah lampu UV 254 nm dan 366 nm. Nilai Rf (Retention factor) masing-masing noda dihitung dengan rumus:

$$Rf = \frac{\text{jarak yang ditempuh analit}}{\text{jarak yang ditempuh eluen}}$$

Kromatografi Lapis Tipis Preparatif (KLTP)

Noda yang menunjukkan hasil positif dan terpisah baik pada KLT analitik selanjutnya diisolasi menggunakan KLT preparatif. Ekstrak ditotolkan secara memanjang (pita) pada lempeng KLT preparatif berlapis silika gel, kemudian dielusi menggunakan sistem eluen terbaik hasil optimasi KLT analitik. Pita/noda target yang teramati di bawah sinar UV 254/366 nm dikerok dari lempeng, kemudian dilarutkan dan disaring menggunakan pelarut yang sesuai untuk memperoleh isolat semi-murni yang selanjutnya digunakan pada tahap karakterisasi berikutnya.

Kromatografi Lapis Tipis Dua Dimensi (KLT 2D)

Uji kemurnian isolat hasil KLTP dilakukan dengan KLT dua dimensi. Isolat ditotolkan pada satu sudut lempeng KLT berbentuk bujur sangkar, kemudian dielusi pada arah pertama menggunakan sistem eluen pertama. Lempeng dikeringkan, diputar 90°, lalu dielusi kembali pada arah kedua menggunakan sistem eluen kedua yang berbeda kepolarannya. Isolat dikatakan relatif murni apabila hanya menghasilkan satu noda tunggal setelah pengembangan dua arah tersebut.

Penetapan Kadar Flavonoid Total dengan Spektrofotometri UV-Vis

Penetapan kadar flavonoid total dilakukan menggunakan metode kolorimetri AlCl_3 dengan kuersetin sebagai baku pembandingan, mengacu pada prosedur berikut:

- 1) Larutan Blanko: dipipet 1 ml asam asetat dan 1 ml AlCl_3 , dimasukkan ke dalam labu ukur 10 ml, kemudian dicukupkan volumenya dengan etanol P.A, hingga tanda batas.
- 2) Larutan Baku Induk Kuersetin: ditimbang 10 mg serbuk kuersetin, dilarutkan dengan etanol P.A, dalam labu ukur 10 ml hingga tanda batas, sehingga diperoleh larutan induk dengan konsentrasi 1.000 ppm.

Pembuatan Kurva Baku Kuersetin: dari larutan induk 1.000 ppm dibuat seri larutan baku dengan konsentrasi 2, 4, 6, 8, dan 10 ppm melalui pengenceran bertingkat menggunakan rumus $V_1.N_1 = V_2.N_2$. Sebagai contoh, untuk membuat larutan baku 2 ppm sebanyak 5 ml, volume larutan induk yang dipipet dihitung sebagai berikut:

$$V_1 = \frac{(C_2 \times V_2)}{C_1} = \frac{(2 \text{ ppm} \times 5 \text{ ml})}{1000} = 0,01 \text{ ml} = 10 \mu\text{L}$$

Volume tersebut kemudian dipipet ke dalam labu ukur 5 ml, ditambahkan 1 ml AlCl_3 dan 1 ml asam asetat, lalu dicukupkan dengan etanol P.A, hingga tanda batas. Prosedur yang sama diulang untuk konsentrasi 4, 6, 8, dan 10 ppm dengan volume pemipetan larutan induk masing-masing sebesar 20, 30, 40, dan 50 μL . Larutan didiamkan selama waktu inkubasi tertentu (operating time) agar reaksi pembentukan kompleks AlCl_3 -flavonoid sempurna,

kemudian absorbansinya diukur menggunakan spektrofotometer UV-Vis pada panjang gelombang serapan maksimum yang telah ditentukan sebelumnya. Data konsentrasi (x) dan absorbansi (y) yang diperoleh selanjutnya diplot untuk memperoleh persamaan regresi linear ($y = bx + a$) beserta nilai koefisien korelasinya (R^2).

Larutan Sampel (Penetapan Kadar Flavonoid): ditimbang 0,5 g ekstrak/sampel, dimasukkan ke dalam labu ukur 5 ml, ditambahkan 1 ml $AlCl_3$ dan 1 ml asam asetat, kemudian dicukupkan dengan etanol P.A hingga tanda batas. Larutan diinkubasi dengan waktu yang sama seperti larutan baku, kemudian absorbansinya diukur pada panjang gelombang yang sama menggunakan spektrofotometer UV-Vis. Kadar flavonoid total dalam sampel dihitung dengan memasukkan nilai absorbansi sampel ke dalam persamaan regresi linear kurva baku kuersetin, kemudian dinyatakan dalam satuan mg ekuivalen kuersetin per gram sampel (mg QE/g).

3. HASIL DAN PEMBAHASAN

Ekstraksi

Ekstraksi simplisia kulit batang kamboja Bali dengan metode maserasi menggunakan pelarut etanol 96% menghasilkan data sebagai berikut:

Tabel 1. Hasil ekstrak kulit batang kamboja Bali.

Nama Sampel		Metode Ekstraksi	Pelarut	Bobot Simplisia	Bobot Ekstrak Kental	Rendemen (%)
Kulit kamboja	batang Bali (<i>Plumeria rubra</i> L.)	Refluks	Etanol 96%	350 g	21,567 g	6,162 %

Ekstraksi 350 g serbuk simplisia kulit batang kamboja Bali dengan metode maserasi menggunakan etanol 96% menghasilkan ekstrak kental sebanyak 21,567 g dengan nilai rendemen sebesar 6,162 %. Nilai rendemen tersebut tidak memenuhi kriteria rendemen ekstrak yang baik menurut literatur (Dirjen POM, 2017), yaitu di atas 10%, sehingga menunjukkan bahwa etanol 96% tidak cukup efektif menarik senyawa metabolit sekunder yang bersifat polar hingga semipolar, seperti flavonoid, tanin, dan alkaloid, yang diduga banyak terkandung dalam kulit batang kamboja Bali.

Fraksinasi

Fraksinasi ekstrak kental etanol kulit batang kamboja Bali menggunakan metode partisi cair-cair dengan corong pisah dan pelarut bertingkat kepolaran (n-heksan, etil asetat, dan air) menghasilkan fraksi dengan data sebagai berikut:

Tabel 2. Hasil fraksinasi ekstrak kulit batang kamboja Bali dengan corong pisah

Kode Fraksi	Pelarut Partisi	Bobot Fraksi (g)	Rendemen (%)	Warna Fraksi
FH	n-Heksan	5,765	115,3%	Kuning muda
FE	Etil asetat	3,574	71,48%	Kuning kecokelatan

Fraksi n-heksan (FH) menunjukkan hasil positif paling kuat terhadap uji Shinoda (flavonoid) dibandingkan fraksi etil asetat (FE), sehingga fraksi n-heksan dipilih sebagai sampel untuk tahap pemisahan lebih lanjut menggunakan kromatografi kolom. Fraksi n-heksan yang bersifat nonpolar diduga banyak mengandung lemak, pigmen, dan senyawa nonpolar lain, sedangkan fraksi air yang bersifat polar diduga banyak mengandung senyawa gula, tanin terhidrolisis, dan senyawa polar lainnya.

Skrining Fitokimia

Tabel 3. Skrining fitokimia ekstrak kulit kamboja bali

Senyawa	Pereaksi	Parameter Positif	Hasil	Keterangan
Alkaloid	Mayer	Endapan putih/kekuningan	Terbentuk endapan putih	(+)
	Dragendorff	Endapan jingga	Terbentuk endapan jingga	(+)
	Wagner	Endapan kemerahan cokelat	Tidak terbentuk endapan	(-)
Flavonoid	Shinoda	Warna merah/jingga/kuning	Tidak terbentuk warna jingga	(-)
Tanin	FeCl ₃	Warna biru/hijau kehitaman	Tidak terbentuk warna hijau kehitaman	(-)
Saponin	Air panas	Buih stabil 1–10 cm	Terbentuk buih setinggi 2 cm	(+)
Steroid/Triterpenoid	Liebermann-Burchard	Warna hijau-biru/merah-ungu	Tidak terjadi perubahan warna	(-)

Hasil skrining fitokimia menunjukkan bahwa ekstrak etanol kulit batang kamboja Bali memberikan hasil positif terhadap Alkaloid dan saponin, sedangkan flavonoid, tanin serta steroid/triterpenoid menunjukkan hasil negatif. Hasil positif alkaloid ditandai dengan terbentuknya endapan putih pada uji wagner dan dragendorff, sedangkan hasil positif saponin ditandai dengan terbentuknya buih stabil akibat sifat aktif permukaan (surfaktan) dari gugus glikosida yang dimiliki saponin. Tidak terdeteksinya Flavanoid dan steroid/triterpenoid mengindikasikan bahwa golongan senyawa tersebut tidak terkandung dalam ekstrak, atau berada dalam kadar yang sangat rendah sehingga tidak memberikan reaksi positif terhadap pereaksi yang digunakan. Hasil ini secara umum sejalan dengan data literatur yang melaporkan bahwa kulit batang kamboja (*Plumeria rubra* L.) banyak mengandung flavonoid, alkaloid, dan polifenol, meskipun proporsi masing-masing golongan senyawa dapat berbeda tergantung lokasi tumbuh, metode ekstraksi, dan pelarut yang digunakan.

Kromatografi Kolom

Fraksi etil asetat (FE) hasil fraksinasi dengan corong pisah selanjutnya dipisahkan menggunakan kromatografi kolom dengan sistem eluen n-heksan : etil asetat (6:4), menghasilkan lima kelompok sub-fraksi utama (F1-F5) berdasarkan kemiripan profil noda pada KLT pemantauan, dengan data sebagai berikut:

Tabel 4. Hasil pemisahan fraksi etil asetat dengan kromatografi kolom (eluen n-heksan : etil asetat, 6:4)

Kode Sub-fraksi	Warna	Perbandingan
F1	Hijau pekat	Etanol 40 ml
F2	Orange pekat	Etanol 8:2 Etil asetat
F3	Orange kekuningan	Etanol 6:4 Etil asetat
F4	Jingga kecokelatan	Etanol 6:4 Etil asetat
F5	Putih keruh	Etanol 5:5 Etil asetat

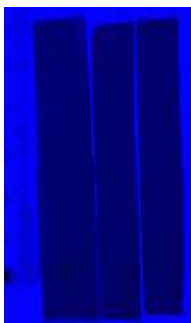
Proses fraksinasi ekstrak kulit batang kamboja bali (*Plumeria rubra* L.) dilakukan menggunakan metode kromatografi kolom dengan fase diam silika gel dan fase gerak etanol–etil asetat yang dielusi secara bertahap berdasarkan tingkat kepolarannya. Hasil elusi menghasilkan 28 fraksi (vial) dengan variasi warna, yaitu hijau, oranye pekat, oranye pucat, putih keruh, hingga putih jernih. Perbedaan warna pada setiap fraksi menunjukkan bahwa komponen senyawa berhasil dipisahkan berdasarkan perbedaan afinitas terhadap fase diam dan fase gerak. Fraksi berwarna hijau diduga masih mengandung pigmen seperti klorofil, sedangkan fraksi berwarna oranye mengindikasikan adanya senyawa metabolit lain dengan tingkat kepolaran yang berbeda. Perubahan warna menjadi putih keruh hingga putih jernih pada fraksi akhir menunjukkan berkurangnya senyawa berwarna dan meningkatnya kemurnian fraksi. Selanjutnya, setiap fraksi dianalisis menggunakan kromatografi lapis tipis (KLT) untuk membandingkan pola noda dan nilai R_f sehingga fraksi dengan karakteristik yang sama dapat digabungkan untuk analisis lebih lanjut.

Kromatografi Lapis Tipis (KLT)

Analisis KLT ekstrak etanol kulit batang kamboja Bali menggunakan fase diam silika gel GF254 dan fase gerak n-heksan : etil asetat (7:3) menghasilkan profil noda sebagai berikut:



Gambar 2. Hasil Pemisahan Komponen Senyawa Dengan KLT Pada Sinar UV 254 nm (Doc Pribadi, 2026).



Gambar 3. Hasil Pemisahan Komponen Senyawa Dengan KLT Pada Sinar UV 366 nm (Doc Pribadi, 2026).

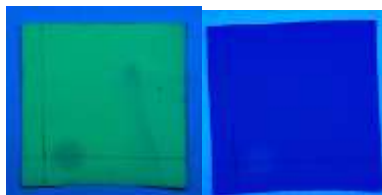
Tabel 5. Hasil kromatografi lapis Tipis ekstrak kulit kamboja bali.

Noda	Warna di UV 366 nm	Warna di UV 254 nm	Nilai Rf
1	Berfluoresensi padam (bercak gelap)	Kuning kehijauan	0,3 cm
2	Berfluoresensi padam (bercak gelap)	Biru muda	0,12 cm
3	Tidak tampak	Jingga kecokelatan	0,1 cm

Ketiga noda yang teramati memiliki nilai Rf berkisar antara 0,32 hingga 0,74, yang keseluruhannya berada dalam rentang Rf ideal (0,20-0,80) menurut kriteria umum KLT. Hal ini menunjukkan bahwa sistem eluen n-heksan : etil asetat (7:3) cukup sesuai untuk memisahkan komponen ekstrak etanol kulit batang kamboja Bali.

Kromatografi Lapis Tipis Preparatif (KLTP)

Berdasarkan hasil KLT analitik, noda 1 (diduga flavonoid) dipilih sebagai target isolasi karena menunjukkan pemisahan yang paling jelas dan intensitas bercak yang cukup tinggi. Isolasi dilakukan menggunakan KLT preparatif dengan sistem eluen yang sama (n-heksan : etil asetat, 7:3).



Gambar 4. Hasil Pengamatan Pita Senyawa Dengan KLTP Pada Sinar UV 254 & 366 nm (Doc Pribadi, 2026).

Tabel 6. Hasil kromatografi lapis Tipis Preparatif (KLTP) ekstrak kulit kamboja bali

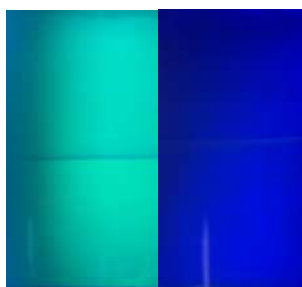
Kode Isolat	Posisi/Rf Pita	Warna Pita (UV 366 nm)	Bobot Isolat
Isolat A (KLTP-1)	0,30-0,34	Kuning kehijauan	12,4 mg

Pita dengan Rf 0,30-0,34 yang berpendar kuning kehijauan di bawah sinar UV 366 nm dikerok dari lempeng KLT preparatif, kemudian dilarutkan dengan metanol p.a. dan disaring

untuk memisahkan serbuk silika gel dari filtrat. Filtrat diuapkan hingga diperoleh isolat semi-murni berupa serbuk/residu berwarna kuning kecokelatan sebanyak 12,4 mg. Isolat inilah yang selanjutnya diuji kemurniannya menggunakan KLT dua dimensi.

Kromatografi Lapis Tipis Dua Dimensi (KLT 2D)

Uji kemurnian isolat A dilakukan menggunakan dua sistem eluen berbeda, yaitu eluen I (n-heksan : etil asetat, 7:3) pada arah pertama dan eluen II (n-heksan : etil asetat, 7:3) pada arah kedua yang tegak lurus terhadap arah pertama.



Gambar 5. Hasil Pengamatan KLT 2 Dimensi Pada Sinar UV 254 & 366 nm (Doc Pribadi, 2026).

Tabel 7. Hasil kromatografi lapis Tipis Dua Dimensi (KLT 2D) ekstrak kulit kamboja bali

Arah Pengembangan	Sistem Eluen	Jumlah Noda
Arah I	n-heksan : etil asetat (7:3)	1 (tunggal)
Arah II	n-heksan : etil asetat (7:3)	1 (tunggal)

Hasil analisis KLT dua dimensi menunjukkan bahwa ekstrak kulit batang *Plumeria rubra* L. menghasilkan beberapa bercak yang terpisah setelah pengembangan menggunakan sistem fase gerak dengan perbandingan 7:3. Terbentuknya bercak pada posisi yang berbeda mengindikasikan adanya beberapa komponen metabolit sekunder dengan karakteristik kepolaran yang berbeda. Pemisahan pada dua dimensi memberikan resolusi yang lebih baik dibandingkan KLT satu dimensi karena memungkinkan senyawa yang belum terpisah pada pengembangan pertama mengalami pemisahan lebih lanjut pada pengembangan kedua. Berdasarkan hasil pengamatan di bawah sinar UV, bercak yang terbentuk menunjukkan bahwa sistem eluen yang digunakan mampu memisahkan komponen penyusun ekstrak, meskipun masih terdapat bercak dengan intensitas yang relatif rendah. Hal tersebut dapat dipengaruhi oleh konsentrasi sampel, interaksi antara fase diam silika gel dengan fase gerak, serta perbedaan afinitas masing-masing senyawa terhadap sistem elusi yang digunakan

Penetapan Kadar Flavonoid Total dengan Spektrofotometri UV-Vis

Penetapan kadar flavonoid total pada ekstrak etanol kulit batang kamboja Bali dilakukan menggunakan metode kolorimetri $AlCl_3$ dengan kuersetin sebagai baku pembanding. Larutan baku kuersetin dibuat dalam lima seri konsentrasi (2, 4, 6, 8, dan 10 ppm)

dan diukur absorbansinya pada panjang gelombang serapan maksimum, diperoleh data sebagai berikut:

Tabel 8. Data Standar Kuersetin untuk Pembuatan Kurva Kalibrasi

Konsentrasi Kuersetin (ppm)	Volume Larutan Induk Dipipet (μL)	Absorbansi
2	10	0,160
4	20	0,305
6	30	0,437
8	40	0,577
10	50	0,687

Data konsentrasi dan absorbansi larutan baku kuersetin tersebut selanjutnya diregresikan secara linear, menghasilkan persamaan garis regresi sebagai berikut:

$$y = 0,06903x + 0,01587 \quad (R^2 = 0,997)$$

Nilai koefisien korelasi (R^2) sebesar 0,997 menunjukkan hubungan linear yang sangat baik antara konsentrasi kuersetin dan absorbansi, sehingga persamaan regresi tersebut layak digunakan sebagai dasar perhitungan kadar flavonoid total pada sampel. Larutan sampel yang dibuat dari 0,5 g ekstrak etanol kulit batang kamboja Bali dalam labu ukur 5 ml diukur absorbansinya pada panjang gelombang yang sama, dengan hasil sebagai berikut:

Tabel 9. Hasil Perhitungan Kadar Flavonoid Total Sampel Menggunakan Standar Kuersetin

Replikasi	Absorbansi Sampel	Konsentrasi (ppm) berdasarkan Kurva Baku	Kadar Flavonoid Total (mg QE/g)	% kadar Flavonoid
1	0,353	100.000 ppm	4,883 mg QE/g	4,883 %%

Konsentrasi flavonoid dalam sampel ditentukan menggunakan persamaan regresi linear dari kurva kalibrasi larutan standar kuersetin, yaitu $y = 0,06903x + 0,01587$, dengan nilai b sebagai intersep dan a sebagai slope kurva baku. Absorbansi sampel kulit batang kamboja Bali yang terbaca pada instrumen sebesar 0,353 pada panjang gelombang 421,0 nm kemudian disubstitusikan ke dalam persamaan tersebut, menghasilkan nilai konsentrasi sebesar 4,883 mg/L atau setara dengan 4,883%. Berdasarkan farmakope herbal Indonesia kandungan flavonoid pada tanaman berkisar antara 1-10 %. Berdasarkan hasil yang diperoleh menunjukkan bahwa ekstrak kulit batang kamboja (*Plumeria rubra* L) memiliki kandungan flavonoid yang rendah. Hal ini masuk akal secara fitokimia, mengingat bagian batang atau kulit kayu umumnya memiliki kandungan flavonoid yang lebih rendah dibandingkan daun, yang merupakan organ fotosintesis utama tempat flavonoid banyak disintesis sebagai pelindung terhadap radiasi UV. Sebagai rujukan tambahan, kategori kadar fenolik total yang lazim digunakan sebagai pembanding kasar mengelompokkan kadar lebih dari 70 mg GAE/g sebagai tinggi, 10 hingga 70 mg GAE/g sebagai sedang, dan kurang dari 10 mg GAE/g sebagai rendah. Berdasarkan pembagian ini, nilai kulit batang kamboja Bali termasuk dalam kategori rendah, meskipun tetap menunjukkan adanya kandungan flavonoid yang terukur secara kuantitatif dan

berpotensi memberikan kontribusi terhadap aktivitas antioksidan ekstrak (Ayu Anatarisa, et al 2026).

4. KESIMPULAN

Berdasarkan hasil penelitian yang telah dilakukan, dapat disimpulkan bahwa ekstrak etanol kulit batang kamboja Bali (*Plumeria rubra* L.) mengandung golongan senyawa alkaloid dan saponin, sedangkan flavonoid, tanin, dan steroid/triterpenoid tidak terdeteksi secara kualitatif melalui uji skrining fitokimia. Pemisahan dengan kromatografi kolom dan kromatografi lapis tipis (KLT) berhasil memisahkan komponen-komponen ekstrak berdasarkan tingkat kepolarannya, dan salah satu noda yang diduga senyawa golongan flavonoid berhasil diisolasi melalui KLT preparatif (KLTP) menjadi isolat A sebanyak 12,4 mg. Uji kemurnian dengan KLT dua dimensi menunjukkan noda tunggal pada kedua arah pengembangan, yang mengindikasikan bahwa isolat A relatif murni. Hasil penetapan kadar flavonoid total secara spektrofotometri UV-Vis menunjukkan kadar sebesar 4,883% (4,883 mg QE/g), yang termasuk kategori rendah menurut Farmakope Herbal Indonesia. Rendahnya kadar flavonoid ini sesuai dengan karakteristik fitokimia tanaman, mengingat bagian batang/kulit kayu umumnya mengandung flavonoid lebih rendah dibandingkan daun.

UCAPAN TERIMA KASIH

Penulis mengucapkan terima kasih kepada seluruh pihak yang telah membantu dan mendukung pelaksanaan penelitian ini, khususnya dosen pengampu dan asisten laboratorium atas bimbingan, arahan, serta fasilitas yang diberikan, serta kepada seluruh rekan satu kelompok atas kerja sama dan dukungan selama proses penelitian hingga penulisan artikel ini dapat diselesaikan dengan baik.

DAFTAR PUSTAKA

Ayu Anatarisa, Syawal Abdurrahman, Firhani Anggriani Syafrie, Putri Mega Wijayanti, Fitriani W. Alani, W. I. F. (2026). Penentuan Kadar Flavonoid Total Dan Uji Aktivitas Antioksidan Ekstrak Etanol Kulit Batang Gayam (*Inocarpus fagiferus* Fosb .) Dengan Metode CUPRAC (Cupric Ion Reducing Antioxidant Capacity) Determination of Total Flavonoid Content and Antioxidant Activ. *Jurnal Pharmacia Mandala Waluya*, 5(3).

Dalimartha, S. (1999). *Atlas Tumbuhan Obat Indonesia*. Trubus Agriwidya.

- Dirjen. (2017). *FARMAKOPE HERBAL INDONESIA*. Kementerian Kesehatan Republik Indonesia.
- Fikayuniar, L., Rahma², A. D., Wahyuni³, A., Shafira⁴, K., Ilham⁵, R. N., Wulandari⁶, S. A., & Yulianti Khasanah⁷. (2024). Kandungan Flavonoid Pada Ekstrak Bunga Kamboja (*Plumeria* Sp) Dengan Metode Skrining Fitokimia : Review Artikel. *Jurnal Ilmiah Wahana Pendidikan*, 2(16), 306–312.
- Gilman, E. F., & Watson, D. G. (1994). *Fact Sheet ST-491: Plumeria rubra*. Frangipani. Environmental Horticulture, University of Florida.
- Hendriawan, Febriani², S., & Slamet Mardiyanto Rahayu³. (2022). IOLOGI REPRODUKSI TUMBUHAN KAMBOJA (*Plumeria rubra*). *Nusadaya Journal of Multidiciplinary Studies*, 1(1), 16–22.
- Jannah, M. (2024). Review Artikel: Kadar Flavonoid Ekstrak Etanol Daun Dari Beberapa Jenis Tanaman. *Makassar Natural Product Journal (MNPJ)*, 2(1), 23–32. <https://doi.org/10.33096/mnpj.v2i1.142>
- Julianto. (2016). *Minyak Atsiri Bunga Indonesia*. PENERBIT DEEPUBLISH.
- Lata et al., 2020. (2020). TEKNIK APLIKASI SAMPEL PADA PENGUJIAN KUANTITATIF KROMATOGRAFI LAPIS TIPIS: TINJAUAN TERHADAP AREA DAN FAKTOR RETENSI. *Media Farmasi*, 10(2), 71–76.
- Pratiwi, S. A., Februyani, N., Basith, A., Program,), Fakultas, S. F., Kesehatan, I., Nahdlatul, U., Sunan, U., Bojonegoro, G., Yani, A., 10, N., Bojonegoro, K., Timur, J., & Bojonegoro, K. (2023). Skrining dan Uji Penggolongan Fitokimia dengan Metode KLT pada Ekstrak Etanol Kemangi (*Ocimum basilicum* L) dan Sereh Dapur (*Cymbopogon ciratus*). *Pharmacy Medical Journal*, 6(2), 2023.