



Identifikasi Metabolit Sekunder Ekstrak Etanol Belimbing Wuluh (*Averrhoa bilimbi* L.)

Fhadlyatul Khusna¹, Dhini Andriani², Fitrinaya³, Rifdah⁴, A. Ilmi Alfiana⁵,
Purnamasari⁶, Friska Adelia Putri⁷

¹⁻⁷Program Farmasi, Universitas Muhammadiyah Makassar

*Email Korespondensi: fhadlyatulkhusna14@gmail.com

Abstract. Belimbing wuluh (*Averrhoa bilimbi* L.) is a medicinal plant known to contain various secondary metabolites, particularly flavonoids, which possess potential biological activities. This study aimed to isolate flavonoid compounds from the ethanol extract of belimbing wuluh fruit and determine the total flavonoid content. The research was conducted through sample preparation, ethanol extraction by maceration, solvent evaporation, liquid-liquid fractionation using n-hexane, ethyl acetate, and water, followed by phytochemical separation using column chromatography, preparative thin-layer chromatography, and two-dimensional thin-layer chromatography. The isolated fraction was further analyzed, and the total flavonoid content was determined using UV-Visible spectrophotometry with quercetin as the reference standard. The extraction process produced an extract yield of 22.70%, while solvent evaporation resulted in a concentrated extract with a yield of 8.8%. Fractionation indicated that the polar fraction was obtained in the highest proportion. Column chromatography generated 50 fractions with different color characteristics, indicating successful separation of compounds based on polarity. Thin-layer chromatography showed an R_f value of 0.4 in the ethyl acetate mobile phase, while preparative and two-dimensional thin-layer chromatography produced a single dominant band, suggesting a relatively pure isolate. The UV-Visible analysis showed excellent linearity and revealed a total flavonoid content of 230.76 mg QE/g or 23.08%, exceeding the minimum quality standard. These findings demonstrate that belimbing wuluh fruit is a promising natural source of flavonoids and has potential for further pharmaceutical and phytochemical development.

Keywords: *Averrhoa bilimbi* L.; Flavonoids; Isolation; Thin-Layer Chromatography; UV-Visible Spectrophotometry.

Abstrak. Belimbing wuluh (*Averrhoa bilimbi* L.) merupakan tanaman obat yang mengandung berbagai metabolit sekunder, terutama flavonoid, yang berpotensi memberikan aktivitas biologis. Penelitian ini bertujuan mengisolasi senyawa flavonoid dari ekstrak etanol buah belimbing wuluh serta menetapkan kadar flavonoid totalnya. Penelitian dilakukan melalui preparasi sampel, ekstraksi secara maserasi menggunakan etanol, penguapan pelarut, fraksinasi cair-cair menggunakan n-heksana, etil asetat, dan air, kemudian dilanjutkan dengan pemisahan menggunakan kromatografi kolom, kromatografi lapis tipis preparatif, dan kromatografi lapis tipis dua dimensi. Isolat yang diperoleh selanjutnya dianalisis, sedangkan kadar flavonoid total ditetapkan menggunakan spektrofotometri UV-Vis dengan kuersetin sebagai baku pembanding. Hasil penelitian menunjukkan bahwa ekstraksi menghasilkan rendemen sebesar 22,70%, sedangkan proses penguapan pelarut menghasilkan ekstrak kental dengan rendemen 8,8%. Fraksinasi menunjukkan fraksi polar diperoleh dalam jumlah paling tinggi. Kromatografi kolom menghasilkan 50 fraksi dengan variasi warna eluat yang menunjukkan keberhasilan pemisahan berdasarkan kepolaran. Kromatografi lapis tipis menghasilkan nilai R_f 0,4 pada fase gerak etil asetat, sedangkan KLT preparatif dan KLT dua dimensi menunjukkan satu pita atau noda dominan yang mengindikasikan isolat memiliki tingkat kemurnian yang baik. Penetapan kadar flavonoid total menunjukkan nilai sebesar 230,76 mg QE/g atau 23,08% yang telah memenuhi persyaratan mutu. Hasil penelitian ini menunjukkan bahwa buah belimbing wuluh berpotensi sebagai sumber senyawa flavonoid untuk pengembangan bahan baku alami di bidang farmasi.

Kata kunci: *Averrhoa bilimbi* L.; Flavonoid; Isolasi; Kromatografi Lapis Tipis; Spektrofotometri UV-Vis.

1. LATAR BELAKANG

Belimbing wuluh (*Averrhoa bilimbi* L.) merupakan tanaman tropis yang banyak ditemukan di Indonesia dan termasuk dalam famili Oxalidaceae. Buah belimbing wuluh dikenal memiliki rasa asam yang kuat sehingga secara tradisional dimanfaatkan sebagai bahan pangan maupun obat herbal untuk menyembuhkan batuk, rejan, gusi berdarah, sariawan,

jerawat, panu, dan tekanan darah tinggi, serta memperbaiki fungsi pencernaan (Nurlela & Harfika, 2019). Secara etnofarmakologi, tanaman ini juga telah lama dikenal luas sebagai agen antihipertensi, antidiabetes, dan antimikroba pada berbagai kajian pustaka internasional (Garg et al., 2022), dan khasiat penurun tekanan darahnya turut dikonfirmasi secara eksperimental pada model hewan hipertensi (Rafida et al., 2021). Khasiat tersebut diduga berkaitan dengan kandungan saponin, flavonoid, dan vitamin C di dalamnya, yang berpotensi memberikan aktivitas antihipertensi, antihiperlipidemia, dan antihiperglikemia (Nurlela & Harfika, 2019).

Berbagai penelitian terdahulu telah mengonfirmasi potensi belimbing wuluh sebagai sumber flavonoid alami. Kadar flavonoid dan fenolik total pada daun belimbing wuluh dilaporkan bervariasi secara signifikan bergantung pada jenis dan konsentrasi pelarut ekstraksi yang digunakan (Rahardhian et al., 2019), sementara ekstrak buah dan cuka buahnya juga terbukti memiliki kandungan flavonoid yang berkontribusi terhadap aktivitas antioksidan dan penghambatan tirosinase (Thummajitsakul & Silprasit, 2023). Bagian lain dari tanaman ini, yaitu ranting *Averrhoa bilimbi*, juga terbukti mengandung senyawa fenolik dan flavonoid dengan aktivitas antioksidan yang kuat berdasarkan isolasi bioaktif menggunakan pendekatan kromatografi bertingkat (Duong et al., 2024). Selain itu, ekstrak belimbing wuluh dilaporkan memiliki aktivitas antibakteri, antioksidan (Iwansyah et al., 2021), hingga sitotoksik terhadap sel kanker (Utami et al., 2023), yang semakin memperkuat urgensi eksplorasi kandungan metabolit sekundernya secara lebih mendalam. Untuk memperoleh senyawa target dari simplisia tumbuhan, tahapan ekstraksi diperlukan sebagai metode pemisahan komponen dari campurannya menggunakan pelarut yang sesuai (Hujjatusnaini, 2021), dilanjutkan dengan fraksinasi bertingkat menggunakan pelarut yang berbeda kepolaran agar senyawa metabolit sekunder dapat tertarik secara maksimal oleh pelarut yang paling sesuai (Putri, 2022). Keberadaan golongan senyawa metabolit sekunder dalam ekstrak maupun fraksi selanjutnya dapat dikonfirmasi melalui skrining fitokimia, yang keberhasilannya sangat ditentukan oleh ketepatan pemilihan pelarut dan metode ekstraksi (Aristyawan, 2024), serta dikonfirmasi lebih lanjut menggunakan kromatografi lapis tipis (KLT) sebagai metode kromatografi cair yang terdiri atas fase diam dan fase gerak (eluen) (Hendrarti et al., 2026).

Meskipun demikian, sebagian besar penelitian terdahulu mengenai belimbing wuluh masih terbatas pada analisis kadar flavonoid total secara kuantitatif atau skrining fitokimia sederhana, dan lebih banyak difokuskan pada bagian daun dibandingkan buah. Tahapan pemisahan lanjut untuk memperoleh isolat flavonoid yang relatif murni, misalnya melalui kombinasi kromatografi kolom, KLT preparatif, dan KLT dua dimensi sebagai konfirmasi kemurnian, memang telah diterapkan pada berbagai tanaman lain, seperti pada isolasi senyawa

flavonoid daun kesum (*Polygonum minus Huds.*) (Inayah et al., 2024), namun masih jarang dilaporkan secara khusus pada buah belimbing wuluh. Padahal, tahapan isolasi tersebut penting dilakukan untuk memastikan bahwa golongan senyawa yang teridentifikasi benar-benar berasal dari fraksi yang relatif murni, sehingga data kadar flavonoid total yang diperoleh dapat merepresentasikan potensi senyawa bioaktif secara lebih akurat. Kesenjangan inilah yang mendasari urgensi dan kebaruan penelitian ini, yaitu melakukan identifikasi metabolit sekunder buah belimbing wuluh secara bertahap dan lebih komprehensif, mulai dari ekstraksi, fraksinasi, skrining fitokimia, hingga pemisahan dan pemurnian senyawa flavonoid menggunakan kromatografi kolom, KLT preparatif, dan KLT dua dimensi, yang dilanjutkan dengan penetapan kadar flavonoid total secara kuantitatif menggunakan spektrofotometri UV-Vis.

Berdasarkan uraian tersebut, penelitian ini bertujuan untuk mengisolasi senyawa flavonoid dari ekstrak etanol buah belimbing wuluh (*Averrhoa bilimbi L.*) serta menetapkan kadar flavonoid totalnya menggunakan spektrofotometri UV-Vis. Hasil penelitian ini diharapkan dapat memberikan gambaran awal mengenai jenis dan kadar senyawa fitokimia yang terkandung dalam buah belimbing wuluh, sekaligus menambah pemahaman praktis mengenai penerapan metode fitokimia dalam analisis bahan alam serta mendukung pengembangan buah belimbing wuluh sebagai sumber bahan baku alami di bidang farmasi.

2. KAJIAN TEORITIS

Belimbing wuluh (*Averrhoa bilimbi L.*) merupakan tanaman famili Oxalidaceae yang banyak dibudidayakan di wilayah tropis, termasuk Indonesia, dan secara tradisional dimanfaatkan sebagai obat herbal karena kandungan senyawa fenolik dan flavonoidnya. Berbagai penelitian melaporkan bahwa ekstrak daun maupun buah belimbing wuluh memiliki aktivitas antioksidan, antibakteri, hingga sitotoksik terhadap sel kanker, yang diduga berkaitan erat dengan kandungan flavonoid totalnya (Iwansyah et al., 2021); (Utami et al., 2023). Kadar flavonoid dan fenolik total pada tanaman ini juga dilaporkan bervariasi tergantung pada bagian tanaman, jenis pelarut, serta konsentrasi pelarut yang digunakan dalam proses ekstraksi ((Rahardhian et al., 2019) (Thummajitsakul & Silprasit, 2023). Variasi tersebut menjadi dasar pentingnya optimasi metode ekstraksi dan pemisahan senyawa pada penelitian identifikasi metabolit sekunder belimbing wuluh.

Metabolit sekunder merupakan senyawa kimia hasil metabolisme tumbuhan yang tidak berperan langsung dalam proses pertumbuhan dan perkembangan, tetapi berfungsi sebagai mekanisme pertahanan terhadap herbivora, patogen, maupun tekanan lingkungan, serta memiliki berbagai aktivitas biologis yang bermanfaat, seperti alkaloid, flavonoid, tanin,

saponin, steroid, dan triterpenoid ((Hujjatusnaini, 2021); (Aristyawan, 2024). Jenis dan kadar metabolit sekunder yang terkandung dalam suatu simplisia dipengaruhi oleh faktor genetik, kondisi lingkungan tumbuh, umur panen, serta metode ekstraksi yang diterapkan, sehingga pemilihan metode yang tepat menjadi faktor penting dalam upaya penarikan senyawa target secara maksimal.

Flavonoid adalah kelompok senyawa polifenol turunan 2-fenil-benzo- γ -piron yang tersebar luas pada tumbuhan tingkat tinggi. Berdasarkan pola substitusi pada struktur intinya, flavonoid diklasifikasikan menjadi beberapa golongan, antara lain flavon, flavonol, flavanon, flavanol, kalkon, dan antosianin (Alfaridz, 2018). Perbedaan struktur tersebut menyebabkan variasi aktivitas farmakologi flavonoid, di antaranya sebagai antioksidan, antiinflamasi, antibakteri, antidiabetes, dan antikanker (Khoirunnisa, 2019). Secara umum, flavonoid bersifat polar hingga semipolar karena adanya gugus hidroksil bebas maupun ikatan glikosida pada strukturnya, sehingga karakter kepolaran ini menjadi dasar pertimbangan dalam pemilihan pelarut ekstraksi, sistem pelarut fraksinasi, maupun eluen yang digunakan pada tahap pemisahan kromatografi.

Ekstraksi merupakan proses penarikan senyawa metabolit sekunder dari matriks tumbuhan menggunakan pelarut yang dipilih berdasarkan kepolaran senyawa target (Hujjatusnaini, 2021). Metode refluks umum digunakan apabila diperlukan bantuan pemanasan agar penetrasi pelarut ke dalam sel tumbuhan berlangsung lebih optimal sehingga penyarian senyawa aktif menjadi lebih maksimal. Setelah ekstrak diperoleh, tahap fraksinasi cair-cair bertingkat dilakukan untuk mengelompokkan senyawa berdasarkan tingkat kepolarannya, menggunakan rangkaian pelarut dari nonpolar (n-heksana), semipolar (etil asetat), hingga polar (air) (Putri, 2022). Tahapan ini bertujuan menyederhanakan kompleksitas komposisi ekstrak sehingga proses pemisahan dan identifikasi senyawa pada tahap kromatografi selanjutnya dapat berlangsung lebih efektif.

Skrining fitokimia adalah metode analisis kualitatif awal yang digunakan untuk mengetahui golongan senyawa metabolit sekunder yang terkandung dalam suatu ekstrak tumbuhan, berdasarkan reaksi warna atau pembentukan endapan spesifik dengan pereaksi tertentu, seperti pereaksi Mayer dan Dragendorff untuk alkaloid, $AlCl_3$ untuk flavonoid, $FeCl_3$ untuk tanin, serta uji busa untuk saponin (Aristyawan, 2024). Ketepatan hasil skrining fitokimia sangat dipengaruhi oleh pemilihan pelarut dan metode ekstraksi, karena pelarut yang sesuai akan menarik sebagian besar golongan senyawa target sehingga hasil uji dapat mencerminkan kandungan kimia sesungguhnya dalam simplisia.

Kromatografi lapis tipis (KLT) merupakan teknik kromatografi planar dengan fase diam berupa lempeng silika gel dan fase gerak (eluen) yang dipilih berdasarkan kepolaran senyawa target. Pemisahan komponen diamati melalui nilai faktor retensi (R_f), yaitu perbandingan jarak migrasi noda terhadap jarak tempuh eluen, yang digunakan sebagai parameter identifikasi awal golongan senyawa (Pratiwi, 2023). Kromatografi kolom merupakan teknik pemisahan berskala preparatif yang menerapkan prinsip serupa dengan KLT, namun menggunakan kolom berisi fase diam sehingga senyawa dapat dipisahkan dan ditampung sebagai fraksi-fraksi berdasarkan perbedaan afinitas terhadap fase gerak. Fraksi-fraksi dengan pola bercak KLT yang serupa selanjutnya digabungkan dan dimurnikan lebih lanjut menggunakan KLT preparatif, yang memungkinkan pemisahan pita senyawa dalam jumlah lebih besar. Kemurnian isolat hasil KLT preparatif kemudian dikonfirmasi menggunakan KLT dua dimensi, yaitu pengembangan lempeng pada dua arah elusi yang saling tegak lurus; apabila hanya terbentuk satu noda tunggal pada kedua arah pengembangan, isolat dapat dinyatakan memiliki tingkat kemurnian yang relatif baik (Male et al., 2025).

Penetapan kadar flavonoid total secara kuantitatif umumnya dilakukan menggunakan metode kolorimetri dengan pereaksi $AlCl_3$, yang membentuk kompleks berwarna stabil dengan gugus hidroksil pada struktur flavonoid sehingga intensitas warnanya dapat diukur pada panjang gelombang maksimum menggunakan spektrofotometer UV-Vis (Chang et al., 2002). Kuersetin umum digunakan sebagai baku pembanding karena memiliki struktur flavonol dengan gugus hidroksil bebas yang reaktif terhadap $AlCl_3$, sehingga kadar flavonoid total suatu sampel dinyatakan dalam satuan miligram ekuivalen kuersetin per gram ekstrak (mg QE/g). Nilai kadar flavonoid total yang diperoleh selanjutnya dapat dibandingkan dengan standar mutu yang berlaku, misalnya Farmakope Herbal Indonesia, untuk menilai kesesuaian mutu bahan baku alam yang dianalisis (Indonesia., 2022).

Berdasarkan uraian teori di atas, ekstrak etanol buah belimbing wuluh diduga mengandung senyawa flavonoid dalam jumlah yang dapat dipisahkan melalui kombinasi tahapan ekstraksi, fraksinasi bertingkat, skrining fitokimia, dan teknik kromatografi (KLT, kromatografi kolom, KLT preparatif, dan KLT dua dimensi), serta memiliki kadar flavonoid total yang memenuhi standar mutu yang dipersyaratkan dalam Farmakope Herbal Indonesia.tanya.

3. METODE PENELITIAN

Penelitian ini merupakan penelitian eksperimental laboratorium yang bertujuan mengidentifikasi dan menetapkan kadar senyawa metabolit sekunder pada buah belimbing wuluh

(*Averrhoa bilimbi* L.), melalui tahapan preparasi sampel, ekstraksi, fraksinasi, skrining fitokimia, serta pemisahan dan identifikasi senyawa menggunakan berbagai teknik kromatografi dan spektrofotometri UV-Vis.

Alat dan Bahan

Alat yang digunakan meliputi peralatan gelas standar laboratorium kimia bahan alam (gelas kimia, corong pisah, refluks, chamber dan lempeng KLT, lampu UV 254/366 nm, rotary evaporator, sentrifuga, spektrofotometer UV-Vis, dan lain-lain), serta timbangan analitik. Bahan yang digunakan meliputi simplisia buah belimbing wuluh (*Averrhoa bilimbi* L.), etanol 96% dan etanol PA, n-heksan, etil asetat, kloroform, metanol, pereaksi identifikasi golongan senyawa (Mayer, Dragendorff, Wagner, FeCl_3 , gelatin, timbal asetat, Liebermann–Burchard), AlCl_3 , serta larutan standar kuersetin.

Preparasi Sampel

Sampel buah belimbing wuluh diperoleh melalui teknik *purposive sampling*, kemudian disortasi basah, dicuci, dirajang, dan dikeringkan pada suhu ruang hingga diperoleh simplisia kering yang selanjutnya disortasi kering dan disimpan dalam wadah tertutup.

Ekstraksi

Simplisia diekstraksi menggunakan metode refluks dengan pelarut etanol 96%, mengacu pada prosedur ekstraksi baku.

Penguapan Pelarut

Filtrat hasil ekstraksi ditampung dalam nanpan kaca, kemudian diuapkan secara alami dengan cara diangin-anginkan pada suhu ruang selama 7 hari hingga diperoleh ekstrak kental..

Fraksinasi

Ekstrak kental difraksinasi secara partisi cair–cair bertingkat menggunakan pelarut n-heksan dan etil asetat berdasarkan tingkat kepolaran, mengikuti prosedur standar fraksinasi cair–cair.

Skrining Fitokimia Ekstrak

Dilakukan uji kualitatif terhadap golongan senyawa alkaloid, flavonoid, tanin, saponin, serta steroid dan triterpenoid menggunakan pereaksi warna spesifik, mengacu pada metode skrining fitokimia baku.

Kromatografi Kolom

Fraksi terpilih dipisahkan lebih lanjut menggunakan kromatografi kolom dengan fase diam silika gel dan elusi bertingkat berdasarkan sistem pelarut yang ditentukan, mengikuti prinsip kromatografi kolom baku. Fraksi dengan pola bercak KLT yang serupa digabungkan untuk proses pemurnian selanjutnya.

Kromatografi Lapis Tipis (KLT)

Analisis Kromatografi Lapis Tipis (KLT) dilakukan menggunakan lempeng silika gel GF254 dengan fase gerak campuran n-heksan:etil asetat (6:4). Sampel hasil kromatografi kolom dielusi dalam chamber yang telah dijenuhkan, kemudian diamati di bawah sinar UV 254 nm dan 366 nm. Nilai R_f dihitung untuk mengevaluasi pemisahan, dan fraksi dengan hasil terbaik dipilih untuk tahap Kromatografi Lapis Tipis Preparatif (KLTP).

Kromatografi Lapis Tipis Preparatif (KLTP)

Fraksi hasil kromatografi kolom dimurnikan menggunakan KLT preparatif pada lempeng silika gel 60 PF₂₅₄. Pita hasil pemisahan diamati di bawah sinar UV, dikerok, dilarutkan, disentrifugasi, dan diuapkan hingga diperoleh isolat.

Kromatografi Lapis Tipis Dua Dimensi (KLT 2D)

Kemurnian isolat hasil KLTP diverifikasi menggunakan KLT dua dimensi pada lempeng silika gel 60 F₂₅₄ dengan dua sistem elusi yang berbeda arah (90°), kemudian diamati di bawah sinar UV 254 dan 366 nm untuk mengevaluasi jumlah noda dan nilai R_f.

Spektrofotometri UV-Vis (Penetapan Kadar Flavonoid Total)

Kadar flavonoid total ditentukan secara kuantitatif menggunakan metode spektrofotometri UV-Vis dengan kuersetin sebagai standar, mengacu pada metode kolorimetri AlCl₃ baku. Kurva baku dibuat dari larutan kuersetin konsentrasi 2–10 ppm, dan absorbansi sampel maupun standar diukur pada panjang gelombang maksimum 421,0 nm. Kadar flavonoid total dinyatakan sebagai mg ekuivalen kuersetin per gram sampel (mg QE/g), dihitung berdasarkan persamaan regresi linear kurva baku.

Analisis Data

Data hasil skrining fitokimia dianalisis secara deskriptif berdasarkan perubahan warna/endapan yang terbentuk. Data KLT dianalisis dengan menghitung nilai R_f untuk mengidentifikasi golongan senyawa dalam ekstrak dan fraksi. Data absorbansi hasil spektrofotometri dianalisis menggunakan persamaan regresi linear kurva baku kuersetin untuk menentukan kadar flavonoid total, dinyatakan dalam mg QE/g ekstrak.

4. HASIL DAN PEMBAHASAN**Ekstraksi**

Hasil penelitian yang telah dilakukan dalam pengujian metabolit sekunder pada ekstrak etanol belimbing wuluh (*Averrhoa bilimbi* L.) ditunjukkan pada Tabel 1. Hasil ekstraksi yang didapatkan pada sampel belimbing wuluh (*Averrhoa bilimbi*) yaitu diperoleh % rendemen sebesar 22,70%. Menurut Kemenkes RI, standar rendemen yang baik adalah lebih dari 10%,

sehingga hasil yang didapatkan memenuhi syarat. Tingginya nilai rendemen ini disebabkan oleh penggunaan pelarut etanol yang bersifat universal, sehingga mampu menarik komponen metabolit sekunder secara optimal dari simplisia belimbing wuluh. Selain itu, perbandingan antara jumlah pelarut dan berat sampel yang sesuai, serta durasi waktu ekstraksi yang cukup, memungkinkan terjadinya penetrasi pelarut ke dalam sel tumbuhan secara maksimal, sehingga zat aktif yang terlarut menjadi lebih banyak.

Tabel 1. Hasil Ekstraksi Buah Belimbing Wuluh (*Averrhoa Bilimbi* L.) dengan Metode Refluks

Berat awal simplisia	Pelarut awal	Berat akhir ekstrak kental	% Rendamen
250 gram	2500 ml	54,774 gram	22,70%

Penguapan Pelarut

Proses penguapan pelarut terhadap ekstrak buah belimbing wuluh (*Averrhoa bilimbi* L.) menghasilkan ekstrak kental berwarna coklat dengan massa sebesar 22,00 g yang diperoleh dari 250 g simplisia, sehingga menghasilkan rendemen sebesar 8,8%. Rendemen yang diperoleh menunjukkan bahwa proses ekstraksi dan penguapan berlangsung dengan baik serta masih berada dalam kisaran rendemen ekstrak tanaman yang umum dilaporkan, yaitu sekitar 5–20%. Ekstrak yang dihasilkan memiliki konsistensi kental dan selanjutnya digunakan sebagai sampel pada tahap pemisahan menggunakan kromatografi kolom, KLT preparatif, dan KLT dua dimensi.

Fraksinasi

Berdasarkan pada Tabel 2, hasil fraksinasi cair–cair ekstrak belimbing wuluh (*Averrhoa bilimbi*) menunjukkan bahwa dari bobot awal sampel 1 g diperoleh fraksi aquadest 1,2 ml dengan rendemen 12% (polar), fraksi n-heksan seberat 0,92 g dengan rendemen 0,92% (nonpolar), dan fraksi etil asetat seberat 0,87 g dengan rendemen 0,87% (semipolar). Berdasarkan literatur (Male et al., 2025), persentase fraksi n-heksana (6,22%), fraksi etil asetat (6,47%), dan fraksi air (49,2%) menunjukkan hasil yang didapatkan sejalan dengan literatur, di mana pelarut polar mendapatkan persentase yang paling tinggi.

Tabel 2. Hasil Fraksinasi Metode Cair-Cair Buah Belimbing Wuluh (*Averrhoa bilimbi* L.)

Berat awal simplisia	Pelarut yang digunakan		
	Aquadest	Etil Asetat	N- heksan
1 gram	1,2 ml	0,87 gram	0,92 gram

Kromatografi Kolom

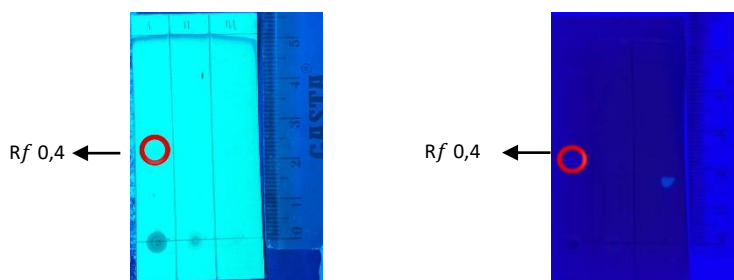
Proses kromatografi kolom terhadap ekstrak buah belimbing wuluh (*Averrhoa bilimbi* L.) menghasilkan 50 fraksi yang ditampung secara bertahap. Hasil pemisahan menunjukkan adanya perubahan warna eluat pada setiap fraksi. Fraksi awal (vial 1–19) menghasilkan eluat berwarna bening, kemudian berubah menjadi cokelat pekat pada vial 20–26, cokelat keruh pada vial 27–39, dan kekuningan pada vial 40–50. Perbedaan warna eluat menunjukkan bahwa komponen senyawa dalam ekstrak berhasil dipisahkan berdasarkan tingkat kepolarannya. Fraksi-fraksi yang memiliki pola bercak KLT yang sama selanjutnya digabungkan untuk proses pemurnian berikutnya.



Gambar 1. Hasil 3 warna Kromatografi kolom

Kromatografi Lapis Tipis

Hasil Kromatografi Lapis Tipis (KLT) menunjukkan bahwa hanya fraksi 1 yang menghasilkan satu noda berwarna ungu dengan nilai R_f sebesar 0,4 pada pengamatan di bawah sinar UV 254 nm dan 366 nm, sedangkan fraksi 2 dan fraksi 3 tidak menunjukkan adanya noda. Nilai R_f sebesar 0,4 berada dalam rentang optimal (0,2–0,8), sehingga menunjukkan bahwa pemisahan berlangsung dengan baik. Munculnya satu noda mengindikasikan bahwa fraksi 1 didominasi oleh satu komponen utama sehingga dipilih untuk dilanjutkan ke tahap Kromatografi Lapis Tipis Preparatif (KLTP). Tidak terbentuknya noda pada fraksi 2 dan 3 diduga disebabkan oleh konsentrasi senyawa yang rendah atau senyawa tidak terdeteksi pada panjang gelombang UV yang digunakan.



Gambar 2. Hasil KLT sinar UV 254 dan UV 366

Kromatografi Lapis Tipis Preparatif (KLT Preparatif)

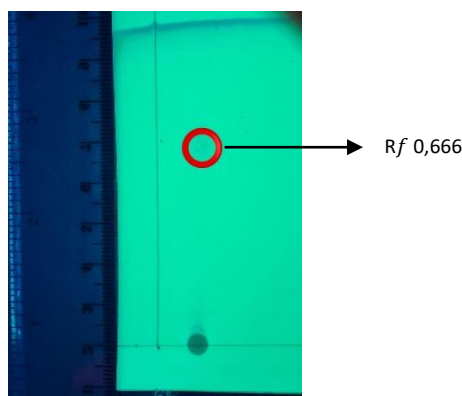
Fraksi gabungan hasil kromatografi kolom dipisahkan lebih lanjut menggunakan KLT preparatif. Hasil pemisahan menunjukkan terbentuknya satu pita utama pada lempeng preparatif. Pita yang terbentuk tampak cukup jelas meskipun sedikit bergelombang. Pita tersebut kemudian dikerok, dilarutkan menggunakan metanol, disentrifugasi, dan diuapkan hingga diperoleh isolat yang digunakan untuk tahap analisis selanjutnya.



Gambar 3. Hasil KLTP sinar UV 366.

Kromatografi Lapis Tipis Dua Dimensi (KLT 2-D)

Hasil analisis menggunakan kromatografi lapis tipis dua dimensi menunjukkan terbentuknya satu noda pada pengembangan pertama menggunakan fase gerak n-heksana : etil asetat, dengan nilai R_f sebesar 0,666 yang tampak jelas di bawah sinar UV 254 nm. Setelah lempeng diputar 90° dan dilakukan pengembangan pada arah kedua, tidak terbentuk noda baru maupun pemisahan lanjutan. Hasil tersebut menunjukkan bahwa isolat tidak mengalami pemisahan lebih lanjut pada sistem fase gerak yang digunakan, yang mengindikasikan tingkat kemurnian isolat cukup baik pada kondisi eluen tersebut.



Gambar 4. Hasil KLT-2D sinar UV 254

Penetapan Kadar Flavonoid Total (Spektrofotometri UV-Vis)

Hasil pengukuran menunjukkan bahwa kurva baku kuersetin memiliki persamaan regresi $y = 0,0671x + 0,0201$ dengan koefisien korelasi $r = 0,9958$, yang menunjukkan linearitas sangat baik. Sampel memiliki nilai absorbansi sebesar 0,175 dengan konsentrasi kuersetin ekuivalen 2,3076 mg/L, sehingga diperoleh kadar flavonoid total sebesar 230,76 mg QE/g atau 23,08%. Berdasarkan Farmakope Herbal Indonesia Edisi II Suplemen I (Indonesia., 2022), kadar flavonoid total buah belimbing wuluh tidak kurang dari 0,90%, sehingga hasil yang diperoleh telah memenuhi persyaratan tersebut.

5. KESIMPULAN DAN SARAN

Hasil penelitian ini menunjukkan bahwa ekstrak etanol buah belimbing wuluh (*Averrhoa bilimbi* L.) mengandung senyawa flavonoid yang dapat diisolasi melalui rangkaian tahapan ekstraksi, fraksinasi, dan pemisahan kromatografi secara bertingkat. Ekstraksi secara refluks menggunakan etanol 96% menghasilkan rendemen sebesar 22,70%, jauh melampaui standar minimum yang ditetapkan Kementerian Kesehatan RI ($>10\%$), yang mengindikasikan efektivitas etanol sebagai pelarut universal dalam menyari komponen metabolit sekunder dari simplisia. Tahap fraksinasi cair-cair mengonfirmasi dominasi senyawa bersifat polar, sejalan dengan karakteristik flavonoid yang umumnya memiliki gugus hidroksil bebas maupun ikatan glikosida. Pemisahan lebih lanjut melalui kromatografi kolom, kromatografi lapis tipis, kromatografi lapis tipis preparatif, dan kromatografi lapis tipis dua dimensi secara konsisten menghasilkan pita maupun noda tunggal, yang membuktikan bahwa isolat yang diperoleh memiliki tingkat kemurnian relatif tinggi. Penetapan kadar flavonoid total secara spektrofotometri UV-Vis menghasilkan kurva baku kuersetin dengan linearitas sangat baik ($r = 0,9958$) serta kadar flavonoid total sebesar 230,76 mg QE/g atau 23,08%, nilai yang jauh melampaui persyaratan mutu minimum menurut Farmakope Herbal Indonesia Edisi II Suplemen I ($\geq 0,90\%$). Temuan ini secara keseluruhan menegaskan bahwa buah belimbing wuluh merupakan sumber flavonoid alami yang potensial dan berpeluang besar untuk dikembangkan lebih lanjut sebagai bahan baku fitofarmaka.

Meskipun demikian, penelitian ini memiliki sejumlah keterbatasan yang perlu menjadi perhatian dalam interpretasi hasil. Identifikasi golongan senyawa isolat masih bertumpu pada karakteristik kromatografi berupa nilai R_f dan pola noda, tanpa didukung data spektroskopi lanjutan seperti FTIR, LC-MS, maupun NMR, sehingga struktur kimia spesifik senyawa flavonoid yang berhasil diisolasi belum dapat dipastikan secara definitif. Konfirmasi kemurnian isolat melalui KLT dua dimensi juga baru dilakukan menggunakan satu sistem fase gerak, sehingga kemungkinan keberadaan senyawa dengan kepolaran serupa yang belum terpisahkan sempurna tidak dapat sepenuhnya dikesampingkan. Berdasarkan hal tersebut, penelitian selanjutnya disarankan untuk melakukan karakterisasi struktur molekul isolat secara lebih komprehensif menggunakan teknik spektroskopi lanjutan, memperluas variasi sistem eluen pada konfirmasi kemurnian, serta melengkapi kajian dengan uji aktivitas biologis, seperti aktivitas antioksidan atau antihiperglikemia, guna memperkuat bukti ilmiah mengenai potensi farmakologis senyawa flavonoid dari buah belimbing wuluh secara lebih menyeluruh.

UCAPAN TERIMA KASIH

Penulis mengucapkan terima kasih kepada Laboratorium Fitokimia dan Laboratorium Penelitian atas fasilitas dan sarana laboratorium yang telah disediakan selama pelaksanaan penelitian ini. Ucapan terima kasih yang tulus juga disampaikan kepada Dosen Penanggung Jawab Praktikum atas bimbingan, arahan, serta ilmu yang diberikan selama proses penelitian berlangsung. Penulis turut mengucapkan terima kasih kepada Koordinator Asisten Dosen dan Asisten Dosen yang telah memberikan pendampingan teknis, bantuan praktis, serta dukungan selama seluruh tahapan penelitian di laboratorium. Tidak lupa, penulis juga mengucapkan terima kasih kepada seluruh pihak yang telah membantu, baik secara langsung maupun tidak langsung, dalam kelancaran penelitian dan penyusunan naskah ini.

DAFTAR REFERENSI

- Alfaridz, F. (2018). Review jurnal: Klasifikasi dan aktivitas farmakologi dari senyawa aktif flavonoid. *Farmaka*, 16(3), 1–19.
- Aristyawan, A. D. (2024). Skrining fitokimia ekstrak etanol jamur kuping hitam (*Auricularia nigricans*) dengan metode soxletasi. *Jurnal Farmasi Sains Dan Obat Tradisional (JFSOT)*, 114–123.
- Chang, C. C., Yang, M. H., Wen, H. M., & Chern, J. C. (2002). Estimation of total flavonoid content in propolis by two complementary colorimetric methods. *Journal of Food and Drug Analysis*, 10(3), 178–182.
- Duong, T.-H., Tran, T.-M.-D., To, P.-M., Phan, N.-H.-N., Nguyen, T.-P., Le, H. T., & Sichaem, J. (2024). Potential antioxidant compounds from the spores of *Dicranopteris linearis* and the branches of *Averrhoa bilimbi*. *Antioxidants*, 13(11). <https://doi.org/10.3390/antiox13111319>
- Garg, M., Chaudhary, S. K., Kumari, S., & Goyal, A. (2022). Phytochemical, biological and traditional claims on *Averrhoa bilimbi*: An overview. *Indian Journal of Pharmaceutical Sciences*, 84(3), 532–542. <https://doi.org/10.36468/pharmaceutical-sciences.947>
- Hendrarti, W., Wahyuddin, N., Usman, D. A. P., Marlinda, W., Usman, S., Ajeng, D., Pratiwi, Y., Amody, Z., Safithri, F., & Prasetyo, Y. C. (2026). *Farmakokinetik dan Farmakodinamik*. CV Eureka Media Aksara.

- Hujjatusnaini, N. (2021). *Ekstraksi*. Institut Agama Islam Negeri Palangkaraya.
- Inayah, I., Saepudin, S., & Ramdhani, H. M. (2024). Identifikasi struktur senyawa flavonoid dari daun kesum (*Polygonum minus* Huds.) menggunakan metode pereaksi geser. *JIFI (Jurnal Ilmiah Farmasi Imelda)*, 8(1), 57–68.
- Indonesia., K. K. R. (2022). *Farmakope Herbal Indonesia (Edisi II, Suplemen I)*. Kementerian Kesehatan Republik Indonesia.
- Iwansyah, A. C., Desnilasari, D., Agustina, W., Pramesti, D., Indriati, A., Mayasti, N. K. I., Andriana, Y., & Kormin, F. B. (2021). Evaluation on the physicochemical properties and mineral contents of *Averrhoa bilimbi* L. leaves dried extract and its antioxidant and antibacterial capacities. *Food Science and Technology*, 41, 987–992. <https://doi.org/10.1590/fst.14620>
- Khoirunnisa, D. (2019). Peran flavonoid pada berbagai aktivitas farmakologi. *Farmaka*, 17(2), 131–145. <https://doi.org/10.24198/jf.v17i2.21922>
- Male, C. F. A., Rahayu, M. P., & Wulandari, D. (2025). Uji aktivitas antibakteri fraksi dan ekstrak buah belimbing wuluh (*Averrhoa bilimbi* L.) terhadap pertumbuhan bakteri *Staphylococcus aureus*. *Jurnal Farmamedika (Pharmamedica Journal)*, 10(2), 294–302. <https://doi.org/10.47219/ath.v10i2.229>
- Nurlela, L., & Harfika, M. (2019). *Buku ajar belimbing wuluh untuk meringankan ISPA*. Indomedia Pustaka.
- Pratiwi, S. A. (2023). Skrining dan uji penggolongan fitokimia dengan metode KLT pada ekstrak etanol kemangi (*Ocimum basilicum* L.) dan sereh dapur (*Cymbopogon citratus*). *Pharmacy Medical Journal*, 6(2).
- Putri, F. E. (2022). Identifikasi senyawa metabolit sekunder pada rumput laut cokelat (*Sargassum plagyophyllum*) dengan metode fraksinasi. *Jurnal Teknologi Dan Industri Pertanian Indonesia (JTIP)*, 15(1).
- Rafida, M., Safitri, A. H., & Tyagita, N. (2021). Effect of *Averrhoa bilimbi* fruit extract on blood pressure and mean arterial pressure of NaCl-induced hypertensive rats. *Bangladesh Journal of Medical Science*, 20(3), 631–636. <https://doi.org/10.3329/bjms.v20i3.52806>

- Rahardhian, M. R. R., Murti, B. T., Wigati, D., Suharsanti, R., & Putri, C. N. (2019). Solvent concentration effect on total flavonoid and total phenolic contents of *Averrhoa bilimbi* leaf extract. *Pharmaciana*, 9(1), 137–144. <https://doi.org/10.12928/pharmaciana.v9i1.11444>
- Thummajitsakul, S., & Silprasit, K. (2023). Kinetics of tyrosinase inhibition, antioxidant activity, total flavonoid content and analysis of *Averrhoa bilimbi* L. extracts and its fruit vinegar using FTIR and multivariate methods. *Trends in Sciences*, 20(2). <https://doi.org/10.48048/tis.2023.3641>
- Utami, W., Saragih, E. B., & Andini, M. (2023). Potential cytotoxic activity of belimbing wuluh (*Averrhoa bilimbi* L.) on cancer cells. *Lansau: Jurnal Ilmu Kefarmasian*, 1(2), 140–152. <https://doi.org/10.33772/lansau.v1i2.18>