

BAB IV

HASIL DAN PEMBAHASAN

A. Hasil

1. Determinasi tanaman

Dilakukan identifikasi tanaman yang bertujuan untuk mendapatkan kebenaran tanaman yang akan diuji agar terhindar dari kesalahan pengumpulan bahan ataupun tercampurnya tanaman yang diteliti dengan tanaman lain. Determinasi tanaman dilakukan di Laboratorium Sistematika Tumbuhan, Fakultas Biologi, Universitas Gadjah Mada Yogyakarta. Penyerahan tanaman untuk diidentifikasi yaitu pada tanggal 3 April 2023 dengan nomor SK 0307/S.Tb./IV/2023 (**Lampiran 1**). Hasil dari identifikasi sampel yang akan diuji dalam penelitian yaitu sebagai berikut:

Filum	: Tracheophyta
Kelas	: Magnoliopsida
Ordo	: Fabales
Familia	: Fabaceae
Genus	: <i>Clitoria</i>
Spesies	: <i>Clitoria ternatea</i> L.
Nama lokal	: Kembang telang

2. Preparasi sampel

Sampel bunga telang (*Clitoria ternatea* L.) yang digunakan pada penelitian diambil dari daerah perkebunan di Desa Sirat RT 03, Palihan, Sidomulyo, Kecamatan Bambanglipuro, Kabupaten Bantul pada bulan April 2023. Bunga telang dipetik pada pagi hari pada pukul 06.00-08.00 WIB sehingga terkumpul sebanyak \pm 8 kg. Kemudian, dilakukan sortasi kering dengan memisahkan tangkai hingga kelopak bunga dari mahkota bunganya karena yang digunakan pada penelitian ini adalah warna ungu kebiruan dari mahkota bunga telang.

Dilakukan pengeringan sampel dengan di oven selama 2 hari pada suhu 50°C, hal tersebut dilakukan agar kadar air yang terkandung pada simplisia

berkurang dan tidak mudah ditumbuhi mikroba atau mikroorganisme lain. Sampel yang sudah kering kemudian dihaluskan agar menjadi serbuk dengan bantuan *grinder*. Menurut Noviantari *et al.* (2017) alasan dibuat serbuk bertujuan untuk meningkatkan luas permukaan sampel sehingga memperbesar terjadinya kontak antara partikel serbuk dengan pelarut yang nantinya dapat menghasilkan rendemen ekstrak paling tinggi. Hal ini dikarenakan permukaan kontak serbuk simplisia yang luas dengan pelarut. Kemudian, serbuk diayak menggunakan ayakan 40 mesh. Tujuan dari pengayakan adalah agar sampel dalam bentuk serbuk memiliki ukuran yang seragam (Syamsunarto & Yohanes, 2018). Didapatkan serbuk bunga telang sebesar 139,18 gram.

3. Ekstraksi sampel

Pada penelitian ini, ekstrak kental ditimbang dan didapatkan hasil % rendemen pada tiap variasi waktu yang ditunjukkan pada **Tabel 5**. Rendemen ekstrak yang didapatkan dihitung sebagai persentase perbandingan bobot ekstrak yang dihasilkan terhadap bobot serbuk bunga telang yang digunakan saat diekstraksi. Berdasarkan hasil tersebut, menunjukkan bahwa ekstrak kental bunga telang memenuhi syarat Farmakope Herbal Indonesia menurut jurnal milik Badriyah & Fariyah (2022) yaitu tidak kurang dari 10%.

Tabel 5. %Rendemen Ekstrak Variasi Waktu

Waktu ekstraksi (menit)	Berat simplisia (g)	Berat wadah + ekstrak (g)	Berat wadah kosong (g)	Berat ekstrak (g)	Rendemen (%)
15	150	19,319	16,868	2,451	16,340
30	150	22,337	17,461	4,876	32,501
45	150	22,113	18,470	3,643	24,288
60	150	22,349	17,579	4,770	31,801
75	150	21,055	16,641	4,414	29,426
90	150	22,526	16,644	5,882	39,213

4. Kromatografi Lapis Tipis (KLT)

a. Identifikasi flavonoid

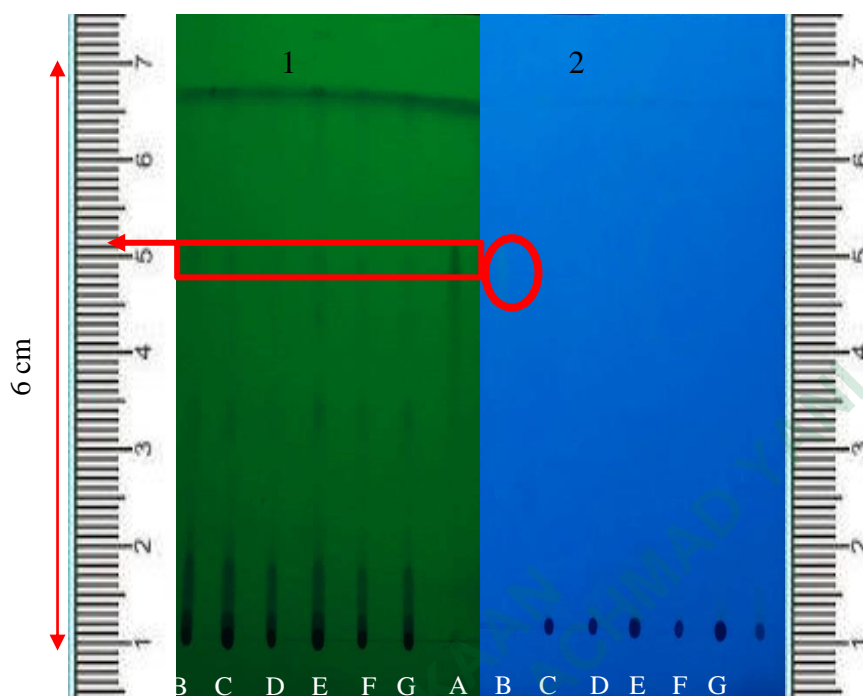
Dilakukan analisis secara kualitatif pada bunga telang dengan menggunakan metode Kromatografi Lapis Tipis (KLT). Adanya analisis

kualitatif dengan KLT bertujuan untuk mengidentifikasi senyawa penanda yang terkandung pada sampel variasi waktu bunga telang. Hal yang harus tersedia pada uji dengan KLT antara lain fase diam, fase gerak, serta *chamber*. Fase diam yang digunakan pada penelitian ini adalah plat silika GF254 sedangkan untuk fase gerak dilakukan tahap optimasi jenis fase gerak. Chamber pada uji KLT digunakan untuk tempat berlangsungnya elusi atau penjenuhan. Pada optimasi fase gerak yang dilakukan dapat dilihat pada **Tabel 6**.

Tabel 6. Hasil Optimasi Fase Gerak Pada KLT Uji Senyawa Flavonoid

No.	Fase gerak	Hasil
1.	n-butanol: asam asetat: air (4: 1: 5)	tidak terjadi elusi
2.	n-heksan: etil asetat (3: 7)	tidak terjadi elusi
3.	n-heksan: etil asetat: metanol: air (6,5: 2,5: 1: 0,5)	standar terlihat tetapi tailing sedangkan sampel tidak terlihat
4.	etanol: etil asetat: kloroform (1,5: 2: 8,5)	terelusi dan terjadi pemisahan yang baik
5.	n-heksan: etil asetat: metanol (1: 8: 1)	terelusi dengan baik tetapi standar terlalu tebal

Didapatkan hasil uji KLT sampel variasi waktu dengan optimasi fase gerak yang digunakan adalah etanol: etil asetat: kloroform (1,5: 2: 8,5 v/v/v) dengan konsentrasi standar kuersetin yang digunakan adalah 1000 ppm. Hasil uji KLT dengan fase gerak etanol: etil asetat: kloroform (1,5: 2: 8,5 v/v/v) untuk identifikasi senyawa flavonoid terhadap variasi waktu ekstraksi dapat dilihat pada **Gambar 8**.



Gambar 8. Profil KLT Variasi Waktu Ekstrak Bunga Telang

Keterangan: 1. Deteksi dengan UV 254 nm; 2. Deteksi dengan UV 365 nm.

(A) Kuersetin; (B) Ekstrak menit ke 15; (C) Ekstrak menit ke 30; (D) Ekstrak menit ke 45; (E) Ekstrak menit ke 60; (F) Ekstrak menit ke 75; (G) Ekstrak menit ke 90. Fase diam = silika GF 254; Fase gerak = etanol: etil asetat: kloroform (1,5: 2: 8,5 v/v/v).

Berdasarkan hasil pada **Gambar 8**, terlihat secara visual terdapat bercak noda yang sejajar antara sampel dengan standar (pembanding). Deteksi senyawa ditandai dengan bercak atau noda dan didapatkan nilai Rf (*Retardation factor*) yang dapat diamati pada sinar tampak UV 254 nm. Berikut adalah hasil perhitungan Rf dari bercak noda KLT yang tertera pada **Tabel 7**.

Tabel 7. Hasil Elusi Pada KLT Uji Senyawa Flavonoid

Sampel (menit)	Nilai Rf	
	Sampel	Standar Kuersetin
15	0,683	0,683
30	0,683	
45	0,683	
60	0,683	
75	0,683	
90	0,683	

Hasil pengamatan di bawah sinar UV 254 nm menunjukkan bahwa bercak atau noda terlihat tipis dan samar berwarna ungu menandakan warna

dari sampel variasi waktu dan standar kuersetin. Kemudian, hasil plat saat diamati di bawah sinar UV 365 nm noda yang terlihat dan berpendar warna kuning hanya standar kuersetin sedangkan pada sampel tidak terlihat. Bercak sampel yang terlihat di plat dan sejajar dengan standar kuersetin (pembanding) diduga mengandung adanya senyawa flavonoid.

b. Identifikasi fenolik total

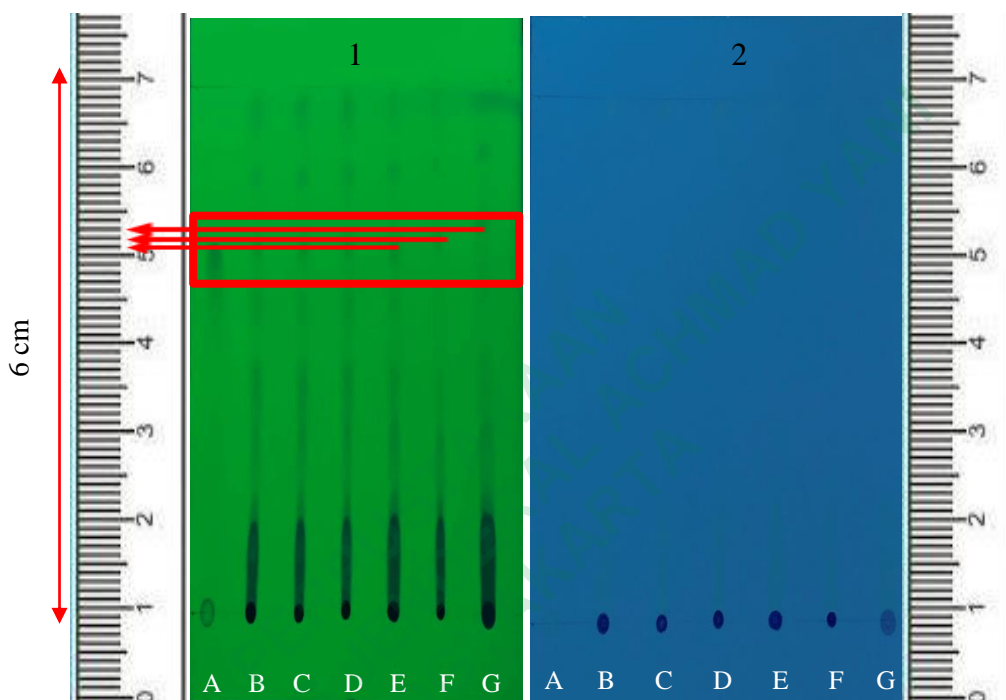
Pada identifikasi ada tidaknya kandungan senyawa fenolik dapat dilakukan uji KLT. Pada optimasi fase gerak yang dilakukan dapat dilihat pada **Tabel 8**.

Tabel 8. Hasil Optimasi Fase Gerak Pada KLT Uji Senyawa Fenolik

No.	Fase gerak	Hasil
1.	n-heksan: etil asetat: metanol (1: 8: 1)	tidak terjadi elusi
2.	n-heksan: etil asetat: etanol (1: 8: 1) (2: 7: 2)	terelusi dan terjadi pemisahan yang baik standar dan sampel terelusi tailing tebal
3.	n-heksan: etil asetat (7: 3)	standar tidak terelusi tetapi sampel terelusi dengan tailing tebal
4.	n-butanol: asam asetat: air (4: 1: 5) (3: 1: 1)	standar terelusi dengan baik tetapi sampel terelusi acak dan tailing tebal terelusi acak
5.	kloroform: etil asetat (7: 3)	tidak terjadi elusi

Didapatkan hasil uji KLT sampel variasi waktu dengan optimasi fase gerak yang digunakan adalah n-heksan: etil asetat: etanol (1: 8: 1 v/v/v) dengan asam galat sebagai pebanding sampel berkonsentrasi 5000 ppm. Setelah itu, larutan disaring dengan kertas saring untuk didapatkan filtrat jernih agar tidak mempengaruhi penotolan pada plat KLT. Plat KLT terlebih dahulu diaktivasi menggunakan oven pada suhu 100°C selama 45 menit untuk menghilangkan pelarut sisa pencucian, mencegah kontaminasi, dan mengaktifkan gugus silanol dan siloksan dari plat (Dewi *et al.*, 2018). Setelah plat aktif, standar ditotolkan 1 kali sedangkan pada larutan sampel ditotolkan sebanyak 10 kali. Penotolan dilakukan dengan *white tip*. Setelah

itu plat dimasukkan dalam *chamber* yang telah jenuh dan ditutup rapat. Ditunggu ± 35 menit hingga plat KLT terelusi sampai tanda batas atas. Hasil uji KLT dengan fase gerak n-heksan: etil asetat: etanol (1: 8: 1 v/v/v) untuk identifikasi senyawa fenolik terhadap variasi waktu ekstraksi dapat dilihat pada **Gambar 9**.



Gambar 9. Profil KLT Variasi Waktu Ekstrak Bunga Telang

Keterangan: 1. Deteksi dengan UV 254 nm; 2. Deteksi dengan UV 365 nm. (A) Asam galat; (B) Ekstrak menit ke 15; (C) Ekstrak menit ke 30; (D) Ekstrak menit ke 45; (E) Ekstrak menit ke 60; (F) Ekstrak menit ke 75; (G) Ekstrak menit ke 90. Fase diam = silika GF 254; Fase gerak = n-heksan: etil asetat: etanol (1: 8: 1 v/v/v).

Berdasarkan hasil pada **Gambar 9**, terlihat secara visual terdapat bercak noda yang sejajar antara sampel dengan standar (pembanding). Deteksi senyawa ditandai dengan bercak atau noda dan didapatkan nilai Rf yang dapat diamati pada sinar tampak UV 254 nm. Berikut adalah hasil perhitungan Rf dari bercak noda KLT yang tertera pada **Tabel 9**.

Tabel 9. Hasil Elusi Pada KLT Uji Senyawa Fenolik

Sampel (menit)	Nilai Rf	
	Sampel	Standar Asam Galat
15	0,683	
30	0,683	0,683
45	0,683	

Sampel (menit)	Nilai Rf	
	Sampel	Standar Asam Galat
60	0,683	
75	0,7	
90	0,716	

Hasil pengamatan di bawah sinar UV 254 nm menunjukkan bahwa bercak atau noda terlihat tipis dan samar berwarna ungu menandakan warna dari sampel variasi waktu sedangkan noda yang terlihat pekat dan jelas menandakan bercak dari standar asam galat. Sedangkan pengamatan di bawah sinar UV 365 nm noda tidak terlihat pada standar maupun sampel. Bercak sampel yang terlihat di plat dan sejajar dengan standar asam galat (pembanding) diduga mengandung adanya senyawa fenolik.

5. Penetapan kadar total flavonoid

a. Penentuan panjang gelombang maksimum kuersetin

Penetapan kadar senyawa diawali dengan menemukan panjang gelombang maksimum. Hal tersebut dikarenakan menurut Kresnadipayana & Lestari (2017) nilai serapan sampel yang diuji harus berada pada panjang gelombang maksimum atau puncak sehingga didapatkan nilai serapan yang maksimal. Selain itu, faktor dari keadaan preparasi sampel yang berbeda, maka perlu dilakukan penetapan panjang gelombang maksimum pada penelitian ini. *Scanning* dilakukan dengan mereaksikan standar kuersetin 50 ppm sebanyak 0,5 mL dengan 0,5 mL $AlCl_3$ 2% serta 4 mL asam asetat 5%. Setelah itu panjang gelombang dapat diamati dengan spektrofotometr UV-Vis pada rentang 375-450 nm. Hasil pengukuran panjang gelombang maksimum dari penelitian ini adalah 415 nm dimana hasil tersebut sama dengan penelitian sebelumnya milik Ipani *et al.* (2016).

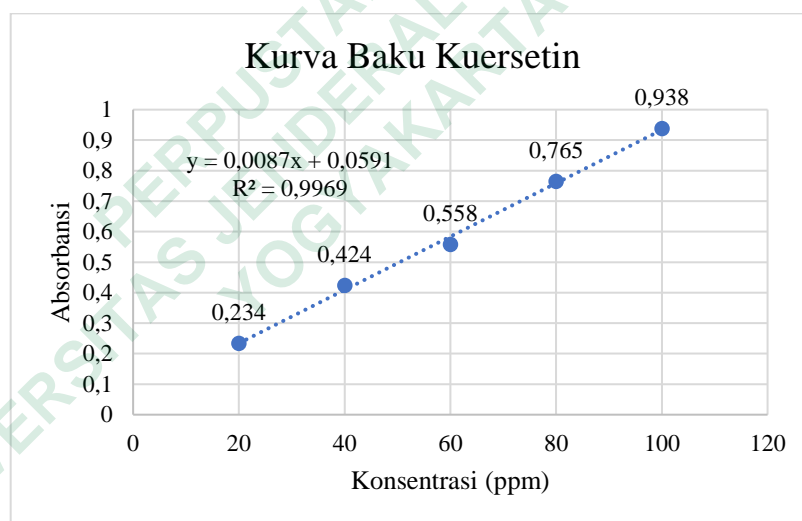
b. Penentuan *Operating Time* kuersetin

Dilanjutkan dengan menentukan waktu optimalnya absorbansi larutan uji untuk tetap stabil. Berdasarkan jurnal milik Suharyanto & Prima (2020) tujuan dilakukannya *operating time* adalah untuk mengetahui waktu optimal antara kuersetin dengan $AlCl_3$ agar dapat bereaksi membentuk

kompleks yang sempurna. *Operating time* dilakukan dengan membuat larutan antara kuersetin dengan AlCl_3 dengan mereaksikan standar kuersetin 50 ppm sebanyak 0,5 mL; 0,5 ml AlCl_3 2% dan 4 mL asam asetat 5%. Reaksi tersebut di *operating time* pada panjang gelombang 415 nm selama 60 menit. Pada penelitian ini, didapatkan waktu yang optimal untuk larutan tetap stabil yaitu pada waktu ke 30 menit.

c. Penentuan kurva baku kuersetin

Penentuan kurva baku pada standar kuersetin bertujuan untuk mendapatkan persamaan regresi linear untuk mengukur suatu kadar dari nilai absorbansi yang didapatkan pada spektrofotometer UV-Vis. Perhitungan persamaan regresi linear didapatkan dari hubungan antara konsentrasi kuersetin (ppm) dengan absorbansinya. Hasil kurva baku kuersetin dapat diamati pada **Gambar 10**.



Gambar 10. Grafik Kurva Baku Kuersetin

Berdasarkan pada kurva baku kuersetin yang dibuat, didapatkan persamaan regresi linear antara konsentrasi vs absorbansi yaitu $y = 0,0087x + 0,0591$ dan nilai r sebesar 0,998. Dari persamaan regresi tersebut, maka dapat dikatakan linear karena nilai r mendekati 1 ($r \leq 1$). Persamaan regresi dari kurva baku kuersetin dapat dilanjutkan untuk menentukan kandungan flavonoid yang terdapat pada sampel variasi waktu.

d. Penentuan kadar total flavonoid

Dilakukan penentuan kadar total flavonoid dengan instrumen spektrofotometer UV-Vis yang bertujuan untuk mendapatkan kadar flavonoid yang terkandung pada sampel variasi waktu. Penelitian yang dilakukan untuk menentukan kadar senyawa flavonoid menggunakan metode kolorimetri. Metode kolorimetri menggunakan larutan AlCl_3 yang direaksikan dengan standar kuersetin sebagai pembandingnya. Menurut Sari & Ayuhecaria (2017) digunakan standar kuersetin karena kuersetin merupakan flavonoid golongan flavonol yang memiliki gugus keto pada atom C-4 dan juga gugus hidroksil pada atom C-3 dan C-5 yang bertetangga. Dengan adanya metode kolorimetri maka didapatkan senyawa flavonoid pada sampel variasi waktu.

Perlakuan untuk menentukan kadar flavonoid diukur serapannya pada panjang gelombang 415 nm dengan spektrofotometer UV-Vis. Hasil penentuan kadar flavonoid yang terkandung dalam sampel variasi waktu dapat dilihat pada **Tabel 10**.

Tabel 10. Hasil Perhitungan Penetapan Kadar Total Flavonoid

Sampel (menit)	Kadar Flavonoid (\bar{x} Flavonoid total (mg QE/gram) \pm SEM)
15	11,461 \pm 0,020
30	13,829 \pm 0,020
45	13,338 \pm 0,007
60	16,150 \pm 0,053
75	15,560 \pm 0,060
90	10,127 \pm 0,007

6. Penetapan Kadar Total Fenolik

a. Penentuan panjang gelombang maksimum asam galat

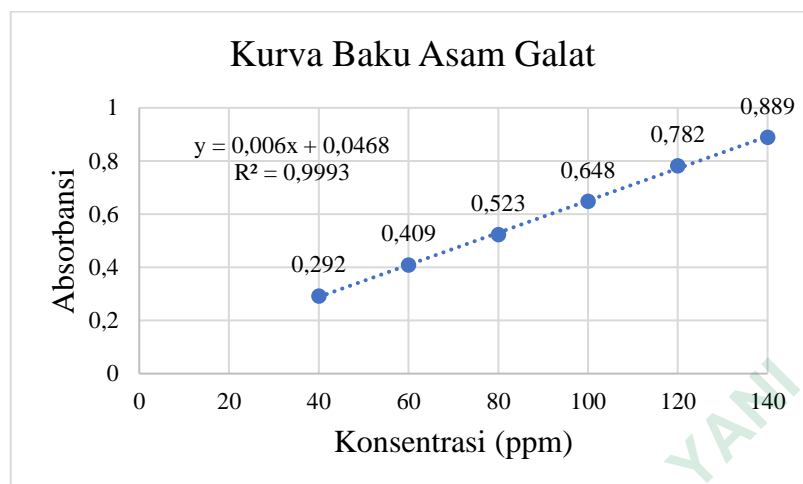
Diukur panjang gelombang maksimum dari standar asam galat dengan konsentrasi 80 ppm lalu di *scanning* panjang gelombangnya pada rentang 600-800 nm dengan spektrofotometer UV-Vis. Didapatkan panjang gelombang maksimum pada penelitian ini yaitu 760 nm. Hasil tersebut sama dalam literatur jurnal karya Kusumaningsih *et al.* (2015).

b. Penentuan *Operating Time* asam galat

Operating time (OT) dilakukan pada penelitian ini untuk mengetahui waktu pengukuran suatu senyawa yang dicari tetap stabil setelah direaksikan. Untuk mendapatkan OT maka standar asam galat konsentrasi 80 ppm ditambahkan dengan 0,25 mL Folin Ciocalteu; 0,5 mL natrium karbonat 35%; dan akuades hingga tanda batas 5 mL labu takar. Penentuan OT dilakukan pada menit ke 0 hingga 60 dengan spektrofotometer UV-Vis. Hasil dari penentuan OT, didapatkan reaksi stabil dari menit ke 47 hingga akhir sehingga waktu tersebut menjadi waktu inkubasi reaksi sampel variasi waktu sebelum dibaca nilai absorbansinya.

c. Penentuan kurva baku asam galat

Pada penelitian ini dibuat kurva baku standar asam galat dengan seri konsentrasi 40, 60, 80, 100, 120, dan 140 ppm dari induk 1000 ppm dengan menggunakan pelarut akuades. Setiap seri kadar diambil sebanyak 0,25 mL lalu ditambahkan dengan pereaksinya yaitu 0,25 mL Folin Ciocalteu; 0,5 mL natrium karbonat (Na_2CO_3) 35% dan ditambahkan akuades hingga tanda batas 5 mL labu takar. Larutan divortex lalu diinkubasi selama 47 menit dalam suhu ruang dan terlindung dari sinar matahari langsung. Setelah diinkubasi, dilanjutkan dengan pembacaan absorbansi pada panjang gelombang 760 nm. Hasil dari kurva baku asam galat yang telah dilakukan dapat dilihat pada **Gambar 11**.



Gambar 11. Grafik Kurva Baku Asam Galat

Dari kurva baku asam galat yang dibuat, didapatkan persamaan regresi linear hubungan antara konsentrasi vs absorbansi yaitu $y = 0,006x + 0,0468$ dan nilai r sebesar 0,999. Dari persamaan regresi tersebut, maka dapat dikatakan kurva baku linear karena nilai r mendekati 1 ($r \leq 1$). Dari persamaan regresi kurva baku asam galat dapat dilanjutkan untuk menentukan kandungan fenolik total yang terdapat pada sampel variasi waktu 15, 30, 45, 60, 75, dan 90 menit.

d. Penentuan kadar total fenolik

Dilakukan penentuan kadar total fenolik dengan menggunakan instrumen spektrofotometer UV-Vis. Penelitian yang dilakukan untuk menentukan kadar senyawa fenolik menggunakan metode kolorimetri seperti pada penentuan kadar total flavonoid. Metode kolorimetri untuk menentukan senyawa fenolik yaitu menggunakan reagen Folin Ciocalteu dan Na_2CO_3 yang direaksikan dengan standar asam galat sebagai pembandingnya. Dengan adanya metode kolorimetri maka didapatkan senyawa fenolik pada sampel variasi waktu. Menurut Rahayu & Inanda (2015) digunakan pembanding asam galat karena asam galat merupakan salah satu antioksidan alami dan stabil serta relatif murah dibandingkan standar lainnya. Selain itu, asam galat termasuk dalam senyawa fenolik dan memiliki aktivitas antioksidan yang kuat.

Penelitian untuk menentukan kadar senyawa fenolik pada sampel variasi waktu dilakukan dengan menimbang sebanyak 25 mg ad 10 mL akuades. Dari induk sampel tersebut, dipipet sebanyak 0,25 mL lalu dimasukkan ke dalam tabung reaksi. Reaksi dilakukan dengan menambahkan 0,25 mL reagen Folin Ciocalteu; 0,5 mL natrium karbonat 35% dan 4 mL akuades. Dihomogenkan dan didiamkan selama *operating time* pada suhu kamar. Perlakuan diukur serapannya pada panjang gelombang 760 nm dengan spektrofotometer UV-Vis. Hasil penentuan kadar fenolik yang terkandung dalam sampel variasi waktu dapat dilihat pada **Tabel 11**.

Tabel 11. Hasil Perhitungan Penetapan Kadar Total Fenolik

Sampel (menit)	Kadar Fenolik (\bar{x} Phenolic Total (mg GAE/gram) \pm SEM)
15	38,831 \pm 0,044
30	42,364 \pm 0,022
45	47,253 \pm 0,269
60	41,72 \pm 0,038
75	45,942 \pm 0,211
90	37,875 \pm 0,058

7. Analisis statistik

Data yang telah didapatkan dan diolah kemudian dilanjutkan untuk dianalisis dengan menggunakan bantuan *software* SPSS. SPSS digunakan untuk mengetahui apakah data yang didapatkan terdistribusi normal atau tidak. Pada uji homogenitas dilakukan dengan uji Levene's sedangkan untuk uji normalitas digunakan uji Shapiro-Wilk. Digunakan uji keduanya karena data yang didapatkan kurang dari 50. Didapatkan hasil analisis kadar total flavonoid sampel variasi waktu didapatkan bahwa hasil dari penetapan kadar total flavonoid tidak homogen dan tidak semua sampel terdistribusi normal yang ditandai dengan adanya nilai signifikansi $<0,05$ (**Tabel 12**). Setelah data dinyatakan tidak berdistribusi normal maka analisis dilanjutkan dengan alternatif uji Kruskal Wallis untuk mengetahui ada tidaknya perbedaan yang signifikan. Diperoleh nilai signifikansi dari uji Kruskal

Wallis yaitu 0,05 sehingga terdapat perbedaan yang signifikan antar sampel. Kemudian, di uji *Pairwise Comparison* dan didapatkan adanya perbedaan yang signifikan pada sampel menit ke 90 dengan 60.

Tabel 12. Hasil Uji Statistik Kadar Total Flavonoid

Sampel (menit)	Kadar Total Flavonoid			
	Homogenitas	Normalitas	Kruskal Wallis	Pairwise Comparison
15		0,637***		
30		0,637***		
45	0,019*	0,000**	0,005****	0,005****
60		0,000**		
75		0,637***		
90		0,000**		

Keterangan: Sig. <0,05: data tidak homogen*, Sig <0,05: data tidak terdistribusi normal**, Sig. >0,05: data terdistribusi normal***, Sig <0,05: terdapat perbedaan yang signifikan****

Hasil analisis pada penentuan kadar fenolik total didapatkan bahwa data tidak homogen dan beberapa data tidak terdistribusi normal karena nilai signifikansi yang tidak memenuhi syarat yaitu <0,05 (**Tabel 13**). Dengan begitu, data dilanjutkan dengan uji non parametrik menggunakan Kruskal Wallis dan diperoleh nilai signifikansi 0,005 lalu dilanjutkan dengan mengetahui ada tidaknya perbedaan yang signifikan. Didapatkan bahwa sampel variasi ekstrak terdapat perbedaan yang signifikan pada waktu menit ke 90 dengan 45.

Tabel 13. Hasil Uji Statistik Kadar Total Fenolik

Sampel (menit)	Kadar Total Fenolik			
	Homogenitas	Normalitas	Kruskal Wallis	Pairwise Comparison
15		0,000**		
30		0,000**		
45	0,002*	0,273***	0,005****	0,005****
60		0,992***		
75		0,172***		
90		0,640***		

Keterangan: Sig. <0,05: data tidak homogen*, Sig <0,05: data tidak terdistribusi normal**, Sig. >0,05: data terdistribusi normal***, Sig <0,05: terdapat perbedaan yang signifikan****

B. Pembahasan

Pada penelitian ini dilakukan ekstraksi sampel bunga telang dengan metode UAE. Metode ini memiliki prinsip yaitu dimana ketika gelombang suara melewati media maka akan memecah partikel dan terjadi ruang kosong dalam media yang kemudian meningkatkan penetrasi pelarut dan menghancurkan dinding sel serbuk sampel sehingga dapat terjadi pemisahan senyawa (Ananingsih *et al.*, 2020). Pelarut yang lebih volatil sering digunakan dalam proses sonikasi salah satunya adalah etanol karena pelarut ini mempunyai tekanan uap yang tinggi yang dapat memudahkan terbentuknya gelembung. Uap pelarut etanol akan mengisi gelembung sehingga energi yang diperlukan untuk terbentuknya kavitas lebih kecil. Pelarut ekstraksi yang digunakan pada penelitian ini adalah etanol 70%. Etanol 70% teknis digunakan karena etanol 70% diketahui mempunyai daya penetrasi yang baik pada sisi hidrofил dan lipofil, sehingga dapat menembus membran sel, masuk ke dalam sel dan berinteraksi dengan metabolit di dalam sel (Andriani & Murtisiwi, 2020). Dengan begitu, etanol 70% mampu menyari senyawa-senyawa yang terkandung dalam bunga telang yaitu flavonoid dan fenolik.

Berdasarkan hasil dari tahap ekstraksi didapatkan rendemen ekstrak variasi 90 menit lebih tinggi dari ekstrak lain yaitu sebesar 39,213%. Akan tetapi dalam penelitian ini rendemen yang didapatkan tidak linier. Hal ini salah satunya dikarenakan viskositas dan kadar air masing-masing ekstrak yang berbeda-beda dimana tingkat kekentalan (viskositas) dan kadar air akan mempengaruhi bobot dari ekstrak tersebut. Dalam penelitian Ibrahim *et al.*, (2015) dihasilkan rendemen ekstrak dipengaruhi oleh suhu dan waktu ekstraksi yang digunakan. Pada suhu dan waktu ekstraksi kurang dari batas optimum akan menyebabkan komponen bioaktif tidak terekstrak dengan maksimal karena proses difusi tidak berlangsung secara optimal sehingga komponen bioaktif masih banyak yang tertinggal di dalam bahan. Sehingga, peningkatan suhu dan waktu dalam proses ekstraksi perlu diperhatikan karena memberikan pengaruh yang signifikan. Suhu dan waktu ekstraksi yang tepat dapat menghasilkan ekstrak dengan rendemen yang tinggi. Adapun, bentuk fisik kekentalan ekstrak dapat memberikan pengaruh juga terhadap hasil rendemen

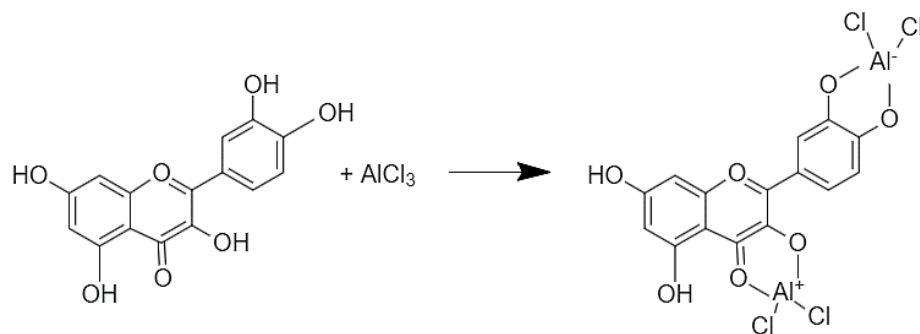
karena suhu lingkungannya yang tidak stabil sehingga kekentalan tiap sampel tidak terkontrol sesuai keinginan yang mengakibatkan rendemen ekstrak berbeda-beda. Setelah didapatkan ekstrak kental dilanjutkan analisa kualitatif untuk membuktikan adanya senyawa yang diteliti pada bunga telang.

Analisis kualitatif yang digunakan pada penelitian ini yaitu dengan KLT sebagai pendahuluan untuk mengetahui ada atau tidaknya senyawa flavonoid dan fenolik pada sampel ekstrak variasi waktu. Setelah dilakukan beberapa optimasi fase gerak, didapatkan hasil identifikasi yang menunjukkan adanya kandungan senyawa flavonoid yang ditandai dengan adanya bercak berwarna kuning jingga yang sangat mencolok pada standar kuersetin dan noda yang sejajar pada semua sampel. Sedangkan pada plat untuk uji fenolik, hasil profil KLT menunjukkan adanya noda samar yang sejajar pada standar asam galat dengan noda pekat. Hal ini berkaitan dengan prinsip dari KLT yaitu pemisahan senyawa berdasarkan pada polaritas senyawa terhadap fase gerak dan fase diamnya. Eluen yang digunakan sebagai fase gerak cenderung bersifat nonpolar dibandingkan fase diam yang digunakan yaitu plat GF254 yang bersifat polar. Perbedaan polaritas tersebut menyebabkan sampel dan standar terelusi yang ditandai dengan adanya hasil bercak (noda). Karena sifat senyawa flavonoid dan fenolik adalah polar maka bercak berada di tengah plat yang diketahui nilai R_f sampel dan standar sekitar 0,683 pada kedua senyawa tersebut. Sampel yang mengandung senyawa flavonoid dan fenolik ditandai dengan hasil bercak sejajar dengan standar kuersetin pada uji flavonoid dan asam galat pada uji fenolik dengan memiliki nilai R_f yang mirip.

Hasil pengamatan di bawah sinar UV 254 nm menunjukkan bahwa bercak atau noda berfluoresensi yang menandakan warna dari sampel variasi waktu dan standar mengandung senyawa flavonoid dan fenolik. Fluoresensi yang tampak merupakan hasil emisi cahaya yang dipancarkan oleh komponen tersebut ketika elektron tereksitasi dari tingkat dasar ke tingkat energi yang lebih tinggi dan kemudian kembali semula dengan melepaskan energi. Kemudian, hasil plat saat diamati di bawah sinar UV 365 nm noda yang terlihat dan berpendar warna kuning hanya standar kuersetin sedangkan pada sampel tidak terlihat. Hal tersebut dikarenakan pengamatan UV 365 nm pada kuersetin berpendar karena adanya

interaksi antara sinar UV dengan gugus kromofor yang terikat oleh aoksokrom pada bercak noda (Karima *et al.*, 2019). Sedangkan, pada bercak noda sampel tidak berpendar bukan berarti tidak adanya senyawa (reaksi negatif palsu) hal tersebut biasanya jenis senyawa turunan terpen atau senyawa ikatan rangkap yang sedikit, sehingga menyebabkan bercak tidak berpendar dengan jelas. Dari hasil uji KLT terbukti bahwa masing-masing ekstrak bunga telang mengandung kedua senyawa yaitu flavonoid dan fenolik. Sehingga, dapat dilanjutkan analisis terhadap penetapan kadar untuk mengetahui berapa besar kadar senyawa flavonoid dan fenolik yang terkandung dalam bunga telang.

Dilakukan analisis kuantitatif dengan menentukan kadar total flavonoid pada masing-masing ekstrak. Penentuan total flavonoid pada ekstrak variasi waktu dianalisis menggunakan metode kolorimetri AlCl_3 . Prinsip dari metode kolorimetri AlCl_3 yaitu reaksi kompleksasi antara senyawa flavonoid dengan reagen AlCl_3 membentuk senyawa kompleks aluminium (Al-Flavonoid) seperti pada **Gambar 12**, berupa larutan warna kuning sehingga dapat diukur dengan spektrofotometer visibel. Kompleks khelat ini terbentuk pada gugus keto dan gugus hidroksil dari flavonoid. Adapun penambahan asam asetat (CH_3COONa) yaitu untuk Penetapan kadar flavonoid dilakukan dengan penambahan aluminium klorida (AlCl_3) 2% yang bertujuan untuk memberikan efek batokromik yaitu pergeseran ke arah panjang gelombang yang lebih tinggi sehingga mengubah panjang gelombang larutan untuk masuk kedalam rentang panjang gelombang UV-Vis yaitu 375-450 nm (Azizah *et al.*, 2020). Warna yang lebih intens akan terbentuk seiring terjadinya efek batokromik. Setelah itu dilakukan penambahan asam asetat 5%. Berdasarkan jurnal milik Haresmita & Pradani (2022) reaksi dengan asam asetat berfungsi untuk menstabilkan reaksi serta menghasilkan pergeseran dan intensitas puncak absorbansi yang lebih kuat. Kemudian larutan didiamkan selama 30 menit agar reaksi antara larutan dengan pereaksi-pereaksi yang ditambahkan dapat berlangsung sempurna dan stabil.



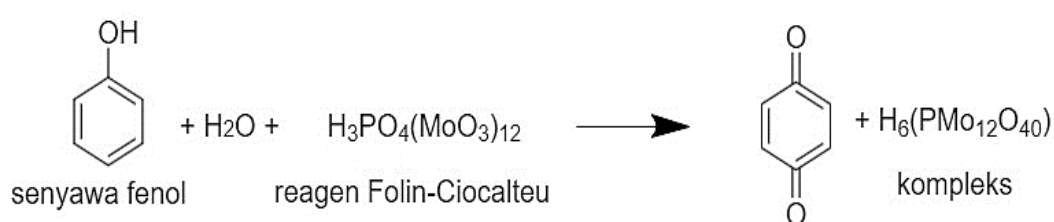
Gambar 12. Pembentukan Senyawa Kompleks Flavonoid-AlCl₃

Penentuan total flavonoid hasil ekstraksi dikalibrasi terhadap standar kuersetin dan dinyatakan sebagai mg *Quercetin Equivalent* (mg QE)/g. Alasan digunakan standar kuersetin adalah salah satu flavonol terbaik dan mewakili subklas flavonol yang menunjukkan nutrisi dan sifat farmasinya. Berdasarkan hasil pembuatan kurva baku larutan standar kuersetin didapatkan regresi linier $y = 0,0087x + 0,0591$ dengan nilai $r = 0,998$. Nilai r yang diperoleh mendekati angka 1 menunjukkan bahwa persamaan regresi tersebut adalah linier, sehingga dapat dikatakan bahwa absorbansi dan konsentrasi memiliki korelasi yang sangat kuat. Dengan begitu, kurva baku kuersetin menunjukkan bahwa konsentrasi berbanding lurus dengan nilai absorbansi, semakin besar konsentrasi larutan baku standar kuersetin maka semakin tinggi pula nilai absorbansi yang dihasilkan. Total flavonoid pada ekstrak bunga telang metode UAE dengan variasi waktu ekstraksi memiliki kisaran antara 10,127 – 16,150 mg QE/g yang tercantum dalam **Tabel 10**. Hasil pengukuran kadar flavonoid pada ekstrak variasi waktu dengan panjang gelombang 415 nm diukur menggunakan Spektrofotometer UV-Vis.

Hasil yang didapatkan menunjukkan bahwa kadar total flavonoid tertinggi diperoleh batas optimumnya pada suhu 45°C selama ekstraksi 60 menit yaitu sebesar 16,150 mg QE/g sedangkan total flavonoid terendah diperoleh pada perlakuan ekstraksi selama 90 menit yaitu sebesar 10,127 mg QE/g. Sehingga, pada ekstraksi yang melebihi batas optimum justru menurunkan kadar total flavonoid pada ekstrak bunga telang. Hal tersebut dapat dikatakan bahwa secara kerja alat sonikator terjadi kontak atau adanya gaya bersentuhan antara bahan dengan pelarut

yang semakin besar sehingga hasilnya akan bertambah hingga titik jenuh larutan yang mengakibatkan senyawa yang terkandung mengalami hidrolisis (Ervinda Sari, 2020). Hal tersebut dibuktikan dengan metode *Pairwise Comparison* dan diketahui adanya perbedaan yang signifikan pada ekstrak menit ke 90 dengan 60 yaitu 0,009 ($\alpha < 0,05$). Dengan begitu, penelitian yang telah dilakukan menunjukkan bahwa faktor waktu ekstraksi memberikan pengaruh nyata ($\alpha = 0,05$) terhadap total flavonoid ekstrak bunga telang.

Penetapan kadar senyawa fenolik total secara kuantitatif dilakukan menggunakan metode Folin Ciocalteu. Prinsip dari metode Folin Ciocalteu yaitu reagen Folin Ciocalteu mengoksidasi senyawa fenolat (garam alkali) atau gugus fenolik-hidroksi mereduksi asam heteropoli (fosfomolibdat-fosfotungstat) seperti **Gambar 13** dalam suasana basa dengan penambahan Na_2CO_3 yang membentuk larutan berwarna biru sehingga dapat diukur dengan menggunakan spektrofotometri visibel (Alfian & Susanti, 2012). Standar pembanding sampel yang digunakan adalah asam galat yang merupakan salah satu fenolik alami. Asam galat direaksikan dengan reagen Folin Ciocalteu menghasilkan warna kuning yang menandakan bahwa larutan mengandung senyawa fenolik. Kemudian, adanya penambahan natrium karbonat membentuk senyawa kompleks berwarna biru. Warna biru yang dihasilkan menjadi lebih pekat seiring dengan peningkatan konsentrasi senyawa fenolik. Hal tersebut dipengaruhi oleh sifat senyawa fenolik yang lebih mudah larut dalam air karena memiliki kecenderungan berada dalam kondisi berikatan dengan gula sebagai glikosida (Dhurhanian & Novianto, 2018). Pelarut yang digunakan dalam penetapan kadar senyawa fenolik total yaitu dengan pelarut akuades. Hal tersebut karena kelarutan senyawa fenol cenderung mudah larut dalam air karena berikatan dengan gula sebagai glikosida dan umumnya terdapat dalam vakuola sel.



Gambar 13. Pembentukan Senyawa Kompleks Fenolik-Reagen Folin Ciocalteu

Penentuan total fenolik hasil ekstraksi dikalibrasi terhadap standar asam galat dan dinyatakan sebagai mg *Gallic Acid* (GAE)/g. Berdasarkan hasil pembuatan kurva baku larutan standar asam galat didapatkan regresi linier $y = 0,006x + 0,0468$ dengan nilai $r = 0,999$. Nilai r yang diperoleh mendekati angka 1 menunjukkan bahwa persamaan regresi tersebut adalah linier. Dengan begitu, kurva baku kuersetin menunjukkan bahwa konsentrasi berbanding lurus dengan nilai absorbansi, semakin besar konsentrasi larutan baku asam galat maka semakin tinggi pula nilai absorbansi yang dihasilkan. Total fenolik pada ekstrak bunga telang metode *Ultrasound Assisted Extraction* (UAE) dengan variasi waktu ekstraksi memiliki kisaran antara 37,875 – 47,253 mg GAE/g yang tercantum dalam **Tabel 11**. Hasil pengukuran kadar fenolik pada ekstrak variasi waktu dengan panjang gelombang 760 nm diukur menggunakan Spektrofotometer UV-Vis.

Diperoleh kadar total fenolik mencapai batas optimumnya pada suhu 45°C dengan waktu ekstraksi selama 45 menit yaitu sebesar 47,253 mg GAE/g sedangkan total fenolik terendah diperoleh pada perlakuan waktu ekstraksi 90 menit yaitu sebesar 37,875 mg GAE/g. Berdasarkan hasil tersebut menunjukkan bahwa perlakuan yang melebihi batas optimum cenderung menurunkan total fenol ekstrak karena terjadinya oksidasi senyawa. Pada masing-masing ekstrak perlu diketahui perbedaan signifikan yang diuji dengan metode *Pairwise Comparison* dan diketahui adanya perbedaan yang signifikan pada ekstrak menit ke 90 dengan 45 yaitu 0,009 ($\alpha < 0,05$). Dengan begitu, penelitian yang telah dilakukan menunjukkan bahwa faktor waktu ekstraksi memberikan pengaruh nyata ($\alpha = 0,05$) terhadap total fenolik ekstrak bunga telang.

Berdasarkan hasil kadar flavonoid dan fenolik yang diperoleh secara maksimal didapatkan dari waktu ekstraksi yang berbeda, yaitu 60 menit untuk flavonoid dan 45 menit untuk fenolik. Akan tetapi, apabila dibandingkan waktu ekstraksi antara 45 menit dengan 60 menit pada flavonoid didapatkan pengaruh yang tidak berbeda signifikan. Sama halnya dengan waktu ekstraksi 45 menit dengan 60 menit pada senyawa fenolik total. Hasil ekstraksi kedua senyawa yang tidak berbeda signifikan maka dapat dikatakan bahwa waktu yang baik untuk mendapatkan senyawa flavonoid dan fenolik tertinggi adalah pada waktu ekstraksi

45 hingga 60 menit. Sedangkan pada waktu ekstraksi 90 menit didapatkan penurunan kadar senyawa. Hal tersebut dapat dikatakan bahawa semakin lama ekstraksi maka ekstrak dari bunga telang tidak menghasilkan kadar flavonoid dan fenolik total yang semakin baik.

PERPUSTAKAAN
UNIVERSITAS JENDERAL ACHMAD YANI
YOGYAKARTA