BAB IV
HASIL DAN PEMBAHASAN

A. Hasil

1. Pengambilan dan Determinasi Sampel

   Sampel (daun, batang, dan akar) Kirinyuh (*C. odorata* L.) diambil di daerah Dusun Kersan, Desa Triwidadi, Kecamatan Pajangan, Kabupaten Bantul, Yogyakarta pada awal bulan Mei 2022 dengan ketinggian wilayah mencapai ± 100 mdpl (meter di atas permukaan laut). Determinasi dilakukan di Laboratorium Pembelajaran Biologi Fakultas Sains dan Teknologi Terapan Universitas Ahmad Dahlan dengan nomor surat keterangan 162/Lab.Bio/B/IV/2022. Determinasi bertujuan untuk memastikan nama ilmiah tumbuhan yang akan digunakan dalam penelitian sesuai (Depkes RI, 2000) yang telah tertera pada (Lampiran 2).

2. Penyiapan Sampel dan Pembuatan Ekstrak

   Sampel (daun, batang, dan akar) Kirinyuh (*C. odorata* L.) dilakukan sortasi basah sebanyak ± 1,5 kg agar kotoran yang menempel pada sampel menjadi lebih bersih menggunakan air mengalir, dirajang, dan dikeringkan. Proses pengeringan dilakukan selama 7 hari (tiap 5 jam/hari) menggunakan teknik yang berbeda-beda untuk masing-masing bagian sampel. Pada bagian daun dilakukan dengan cara diangin-anginkan agar senyawa bioaktif yang terkandung tidak ikut terurai karena sifat daun yang mudah menguap dan cepat kering, sedangkan untuk bagian batang dan akar karena bentuk teksturnya yang keras, maka dibutuhkan sinar matahari langsung agar proses pengeringan berjalan maksimal. Dilanjutkan proses pengovenan pada suhu 50℃ selama 5 hari sesuai dengan petunjuk FHI (Kemenkes RI, 2017) yakni suhu tidak lebih dari 60℃. Proses pengeringan sampel bertujuan untuk mengurangi air yang terkandung di dalam sampel, adapun indikator yang digunakan untuk melihat apakah sampel telah siap untuk diserbuk yaitu daun yang dapat diremas, batang dan akar yang dapat dipatahkan. Kandungan air yang sedikit dapat menghentikan reaksi enzimatik dalam penurunan mutu simplisia. Reaksi

UNIVERSITAS JENDERAL ACHMAD YANI YOGYAKARTA PERPUSTAKAAN

enzimatik tidak berlangsung apabila kandungan air dalam simplisia ≤ 10% (Depkes RI, 1985). Setelah kering, sampel dihaluskan menjadi serbuk menggunakan alat *herb grinder* dan diayak pada ayakan nomor 40 *mesh* untuk bagian atas dan 60 *mesh* untuk bagian bawah, agar memperluas permukaan serbuk sehingga memudahkan pelarut dalam melakukan proses penarikan metabolit aktif yang terkandung di dalam sampel.

Hasil serbuk sampel (daun, batang, dan akar) yang telah diayak antara 40 *mesh* dan 60 *mesh* akan diekstraksi menggunakan metode maserasi. Sampel ditimbang masing-masing bagian sebanyak 250 g dan ditambahkan pelarut etanol 70% (1:8) hingga merendam seluruh bagian sampel selama 4 hari sambil sesekali diaduk. Setelah beberapa hari, hasil maserasi disaring menggunakan corong yang telah dilapisi kain hingga didapatkan residu dan filtrat. Untuk menarik sisa senyawa bioaktif yang masih tersisa di dalam residu hasil maserasi sebelumnya, maka dilakukan proses remaserasi. Proses remaserasi dilakukan selama 2 hari dengan menambahkan sisa pelarut etanol 70% ke dalam toples kaca yang telah ditambahkan residu sebelumnya sambil sesekali diaduk dan disaring untuk mendapatkan filtrat.

Hasil filtrat maserasi dan remaserasi masing-masing sampel yang telah diperoleh, kemudian digabungkan dalam satu toples kaca. Disaring kembali menggunakan corong *buchner* yang telah dilapisi kertas saring guna untuk mendapatkan filtrat murni. Setelah itu, dilanjutkan proses pengentalan menggunakan kompor listrik yang telah diatur pada rentang suhu 50-60°C sambil sesekali diaduk menggunakan sendok kayu, agar pelarut etanol 70% mudah menguap secara sempurna dan meminimalisir adanya kerusakan senyawa bioaktif yang tidak tahan panas. Setelah proses pengentalan selesai, dilakukan uji kontrol kualitas ekstrak sampel.

3. Kontrol Kualitas Ekstrak

   a. Perhitungan Rendemen

   Rendemen merupakan suatu perbandingan antara ekstrak yang didapatkan dengan simplisia awal. Pada penelitian ini, didapatkan berat ekstrak kental sampel (daun, batang, dan akar) Kirinyuh (*C. odorata* L.) dari hasil proses

PERPUSTAKAAN UNIVERSITAS JENDERAL ACHMAD YANI YOGYAKARTA

penimbangan serbuk simplisia awal masing-masing sebanyak 250 g. Hasil rendemen yang diperoleh, dapat dilihat pada (Tabel 2):

Tabel 1. Hasil Perhitungan Rendemen

No	Bagian Kirinyuh	Berat Simplisia Awal (g)	Berat ekstrak sampel (g)	% Rendemen ekstrak sampel
1.	Daun	250	41.07	16.42
2.	Batang	250	8.64	3.45
3.	Akar	250	14.43	5.77

Hasil nilai persen rendemen, menunjukkan bahwa ekstrak kental Kirinyuh (*C odorata* L.) secara berturut-turut yaitu daun sebesar 16.42% sudah memenuhi syarat, sedangkan akar sebesar 5.77% dan batang sebesar 3.45% tidak memenuhi syarat. Hal ini dikarenakan nilai persen rendemen kurang dari 12%, sedangkan nilai persen rendemen yang baik adalah lebih dari 12% (Kemenkes RI, 2017). Berdasarkan nilai rendemen yang diperoleh, menunjukkan bahwa senyawa bioaktif yang terkandung di dalam ekstrak kental Kirinyuh (*C odorata* L.) pada bagian daun lebih banyak terekstrak dibandingkan pada bagian batang dan akar.

b. Uji Organoleptik

Uji organoleptik adalah suatu pengujian untuk mendeskripsikan warna, bentuk, bau, dan rasa yang terdapat dalam ekstrak kental etanol sampel (daun, batang, akar) dengan menggunakan alat indera. Uji tersebut bertujuan agar bisa mengenal secara objektif sifat dan ciri khas awal tanaman Kirinyuh (*C. odorata* L.), bila dibuat dalam bentuk ekstrak (Depkes RI, 2000). Uji organoleptik, juga dimaksudkan untuk mengetahui ekstrak tersebut memenuhi standar dan persyaratan yang telah ditetapkan.

Adapun referensi yang digunakan pada pengujian organoleptik bersifat umum, karena belum adanya referensi resmi tersendiri dari daun, batang dan akar Kirinyuh (*C. odorata* L.) pada penelitian sebelumnya. Hasil pada (Tabel 3), menunjukkan bahwa uji organoleptik ekstrak sampel memiliki ciri-ciri bau khas, bentuk kental, rasa asam kelat. Pada bagian daun menunjukkan warna hitam kecoklatan, sedangkan bagian batang dan akar berwarna kecoklatan.

UNIVERSITAS JENDERAL ACHMAD YANI YOGYAKARTA PERPUSTAKAAN

Tabel 2. Hasil Uji Organoleptik

No	Bagian Kirinyuh	Uji organoleptik	Hasil	Literatur (Sutomo *et al*., 2010)
1.	Daun	Bau	Khas	Khas
		Bentuk	Kental	Kental
		Warna	Hitam kecoklatan	Hijau
		Rasa	Asam kelat	Sepat, Kelat
2.	Batang	Bau	Khas	Khas
		Bentuk	Kental	Kental
		Warna	Kecoklatan	Coklat kehijauan
		Rasa	Asam kelat	Pahit
3.	Akar	Bau	Khas	Khas
		Bentuk	Kental	Kental
		Warna	Kecoklatan	Coklat tua
		Rasa	Asam kelat	Pahit

Karakteristik organoleptik berkaitan erat dengan deskripsi morfologi yang biasanya meliputi ciri-ciri bentuk, warna, bau dan rasa. Umumnya spesies dari famili yang sama akan memiliki beberapa kemiripan secara morfologi sehingga dapat mengidentifikasikan tumbuhan secara akurat. Deskripsi secara morfologi dan organoleptik sangat diperlukan sebagai identifikasi awal terhadap tanaman dan sangat berguna dalam pengambilan sampel di lapangan (Sutomo *et al*., 2010).

c. Penetapan bobot jenis

Penetapan bobot jenis bertujuan untuk mengamati perbandingan bobot suatu zat terhadap bobot zat baku dengan volume dan suhu yang sama (Ansel *et al*., 2010). Bobot jenis dapat memberikan batasan tentang besarnya massa per satuan volume yang merupakan parameter khusus ekstrak cair sampai ekstrak pekat yang masih dapat dituang (Depkes RI, 2000).

Pada penelitian ini, ditimbang piknometer ukuran 25 mL kosong dan telah dikalibrasi. Setelah itu, dimasukkan ekstrak cair dan air ke dalam piknometer, lalu diatur hingga suhu ± 20ºC. Bila suhu piknometer yang diisi telah tepat pada suhu 25ºC, ditimbang ekstrak cair dan air. Dihitung dengan cara mengurangkan bobot piknometer kosong dari bobot piknometer yang telah diisi. Diperoleh bobot jenis ekstrak dengan bobot air dalam piknometer pada

UNIVERSITAS JENDERAL ACHMAD YANI YOGYAKARTA PERPUSTAKAAN

suhu 25ºC. Adapun hasil uji yang sudah dilakukan, dapat dilihat pada (Tabel 4):

Tabel 3. Hasil Penetapan Bobot Jenis

No	Bagian Kirinyuh	Piknometer ekstrak (W_2) dalam g/mL	Piknometer akuades (W_1) dalam g/mL	Piknometer kosong (W_0) dalam g/mL	Bobot jenis (ρ)
1.	Daun	54,898	57,449	32,185	0,899
2.	Batang	54,889			0,898
3.	Akar	54,873			0,898

Berdasarkan perhitungan bobot jenis didapatkan hasil terbesar secara berturut-turut yaitu daun 0,899 g/mL, sedangkan batang dan akar sebesar 0,898 g/mL. Dari hasil yang diperoleh, bobot jenis ekstrak sampel < 1 atau lebih kecil daripada bobot air. Bobot jenis menjelaskan banyaknya komponen yang terkandung dalam zat tersebut serta menunjukkan fraksi berat komponennya. Semakin besar nilai bobot jenis maka komponen yang terkandung di dalam zat tersebut semakin banyak dengan berat molekul yang tinggi (Widyasanti *et al*., 2018).

Nilai bobot jenis suatu bahan dipengaruhi oleh bahan penyusun dan sifat fisiknya. Perubahan densitas dapat terjadi apabila suatu bahan dilarutkan ke dalam air dan membentuk suatu larutan. Beberapa bahan seperti gula dan garam dapat meningkatkan densitas, tetapi ada juga bahan seperti lemak dan etanol yang dapat menurunkan densitas (Laksana *et al*., 2017).

4. Skrining fitokimia

Skrining fitokimia dimaksudkan untuk mengidentifikasi adanya suatu kandungan senyawa metabolit sekunder secara kualitatif pada ekstrak masing-masing bagian sampel. Analisis kandungan senyawa yang akan diuji dalam sampel tersebut adalah alkaloid, fenolik, flavonoid, tanin, dan saponin dengan cara yang berbeda-beda. Hasil skrining fitokimia yang diperoleh, dapat dilihat pada (Tabel 5):

UNIVERSITAS JENDERAL ACHMAD YANI YOGYAKARTA PERPUSTAKAAN

Tabel 4. Hasil Skrining Fitokimia

No	Skrining fitokimia		Kategori kekuatan hasil uji skrining fitokimia			Keterangan literatur (Ugwoke *et al*., 2017)
			Daun (A)	Batang (B)	Akar (C)	
1.	Alkaloid	Dragendorff	(++)	(++)	(++)	Positif muncul warna jingga
		Mayer	(++)	(++)	(++)	Positif muncul endapan putih atau kuning kekeruhan
		Wagner	(++)	(++)	(++)	Positif muncul endapan kecoklatan
2.	Fenolik	$FeCl_3$ 5%	(++)	(+)	(++)	Positif warna hijau kehitaman
3.	Flavonoid	Mg + HCl pekat	(++)	(++)	(++)	Positif muncul warna jingga atau merah bata
4.	Saponin	Air + HCl 2N	(++)	(+)	(+)	Positif muncul buih
5.	Tanin	$FeCl_3$ 1%	(++)	(+)	(++)	Positif tanin katekol muncul warna hijau kehitaman

Keterangan:
Kuat : + +, **Lemah** : +

Pada uji alkaloid, ekstrak sampel (daun, batang, dan akar) dimasukkan ke dalam tabung reaksi dan ditambahkan HCl 2N agar membantu menangkap senyawa metabolit alkaloid. Alkaloid bersifat basa sehingga dengan penambahan HCl yang bersifat asam akan membentuk garam dan tidak mudah terhidrolisis. Pemanasan *waterbath* bertujuan agar membantu pemecahan alkaloid yang tidak dalam bentuk ikatan garamnya dan mempercepat terjadinya ikatan kompleks dengan HCl. Setelah itu, dilakukan penambahan 3 jenis reagen pereaksi yaitu Dragendorff ditandai endapan jingga, Mayer ditandai endapan putih atau kuning kekeruhan dan Wagner ditandai endapan kecoklatan (Muthmainnah, 2017). Endapan dihasilkan karena terjadinya suatu proses pembentukan ikatan kompleks antara alkaloid yang memiliki pasangan elektron bebas pada atom N dengan ion K^+ dalam pereaksi alkaloid (Oktavia & Sutoyo, 2021). Hasil positif menunjukkan bahwa daun, batang, dan akar

UNIVERSITAS JENDERAL ACHMAD YANI YOGYAKARTA PERPUSTAKAAN

termasuk ke dalam kategori kuat setelah penambahan 3 jenis reagen pereaksi untuk pengujian kandungan alkaloid.

Pada uji fenolik dan tanin, ekstrak sampel (daun, batang, dan akar) ditambahkan larutan $FeCl_3$ yang bertujuan agar terjadinya proses reaksi ikatan kompleks antara metabolit aktif dengan ion Fe^{3+}. Munculnya warna biru tua atau hijau kehitaman menandakan adanya senyawa metabolit tersebut (Sa'adah, 2010). Hasil positif menunjukkan bahwa daun dan akar termasuk kedalam kategori kuat, sedangkan batang kategori lemah untuk pengujian kandungan fenolik dan tanin.

Pada uji flavonoid, ekstrak sampel (daun, batang, dan akar) ditambahkan serbuk magnesium dan larutan HCl pekat yang akan bereaksi membentuk suatu gelembung-gelembung gas H_2 (Tiwari *et al*., 2011). Polihidroksi dari flavonoid akan direduksi oleh magnesium dan HCl dalam larutan etanol sehingga membentuk garam benzopirilium berwarna merah, kuning, atau disebut garam flavilium (Sastrohamidjojo, 2007). Hasil positif menunjukkan bahwa daun, batang, dan akar termasuk kedalam kategori kuat untuk pengujian flavonoid.

Pada uji saponin, ekstrak sampel (daun, batang, dan akar) ditambahkan akuades panas dan digojog selama 10 detik agar mempercepat terjadinya reaksi. Munculnya buih 1-2 cm dalam waktu ± 10 menit menandakan bahwa terdapat kandungan senyawa saponin dan ditambahkan larutan HCl 2N agar buih tersebut cenderung lebih stabil. Hal ini dikarenakan adanya kandungan glikosida yang mampu membentuk suatu buih dalam air yang terhidrolisis menjadi glukosa dan senyawa lainnya (Marliana *et al*., 2005). Hasil positif menunjukkan bahwa daun kedalam kategori kuat, sedangkan batang dan akar termasuk kategori lemah untuk pengujian kandungan saponin.

5. Kromatografi Lapis Tipis (KLT)

Hasil skrining fitokimia yang telah dilakukan sebelumnya, menunjukkan bahwa ekstrak sampel (daun, batang, akar) mengandung senyawa flavonoid. Untuk memperkuat adanya kandungan metabolit tersebut, maka perlu dilakukan analisis uji kualitatif KLT dengan menggunakan kuersetin sebagai pembanding. Proses uji dimulai dengan membuat ekstrak masing-masing

UNIVERSITAS JENDERAL ACHMAD YANI YOGYAKARTA PERPUSTAKAAN

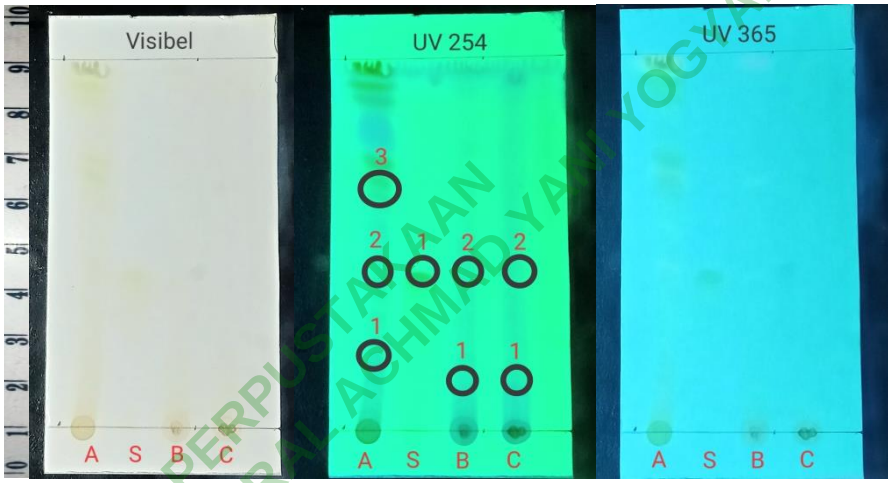
sampel sebanyak 4% dan pembanding kuersetin sebanyak 0,1%. masing-masing bagian ditotolkan menggunakan *white tip* pada plat silika gel GF254 sebagai fase diam yang telah dioptimasi menggunakan oven pada suhu 100℃ selama 30 menit agar mengurangi kandungan air. Penotolan sampel dilakukan sebanyak 3 kali secara bertahap agar tidak terlalu pekat karena akan mengganggu pemisahan metabolit aktif yang ditandai dengan bercak yang berekor (*tailing)*. Plat ditandai garis batas atas dan bawah masing-masing 1 cm agar memudahkan penotolan dan pengamatan elusi. Dilanjutkan dengan memasukkan ke dalam bejana fase gerak yang telah jenuh untuk menyeimbangkan tekanan uap dari fase gerak yang akan digunakan sehingga pemisahan senyawa bioaktif berjalan dengan baik (Kusmardiyani & Nawawi, 1992).

Pada penelitian ini dilakukan optimasi fase gerak, beberapa fase gerak hasil penelitian sebelumnya akan menjadi referensi dalam pengujian KLT guna mengetahui tingkat kepolaran yang cocok dalam memisahkan senyawa flavonoid. Berdasarkan hasil optimasi fase gerak (Tabel 6), pada perbandingan klorofom dan etil asetat (15:1) menunjukkan hasil sampel (daun, batang, akar) terelusi dengan baik, sedangkan kuersetin terhambat di pembatas garis bawah plat, dikarenakan sifat dari masing-masing pelarut yang non polar sedangkan plat silika GF254 cenderung lebih polar. Kemudian, pada perbandingan metanol dan klorofom (9:1) menunjukkan hasil sampel (daun, batang, akar) dan kuersetin terelusi dengan kurang baik, dikarenakan bercak sampel tidak terlihat jelas dan penggunaan perbandingan kepolaran pelarut yang masih belum tepat. Selanjutnya, pada perbandingan metanol, klorofom, dan n-heksan menunjukkan hasil yang efektif dalam memisahkan senyawa bioaktif flavonoid secara optimal. Namun, masih sedikit samar-samar dikarenakan kurangnya homogenitas antara senyawa bioaktif dan pelarut. Hasil tersebut dapat di lihat secara kualitatif pada (Gambar 14) yaitu terjadi pemisahan yang ditandai dengan munculnya bercak yang sama antara daun, batang, akar, dan kuersetin.

UNIVERSITAS JENDERAL ACHMAD YANI YOGYAKARTA PERPUSTAKAAN

Tabel 5. Hasil Optimasi Fase Gerak Uji Kromatografi Lapis Tipis

No	Fase gerak		Hasil
1.	Klorofom : Etil Asetat (15 : 1)	Daun Batang Akar	Masing-masing bagian sampel terelusi dengan baik sedangkan kuersetin terhambat di pembatas garis bawah plat.
2.	Metanol : Klorofom (9 : 1)	Daun Batang Akar	Masing-masing bagian sampel dan kuersetin terelusi dengan kurang baik.
3.	Metanol : Klorofom : n-Heksan (1 : 9 : 1)	Daun Batang Akar	Terjadi pemisahan senyawa bioaktif flavonoid yang ditandai dengan bercak masing-masing sampel yang sejajar dengan bercak kuersetin



Keterangan:
A : Daun
B : Batang
C : Akar
S : Kuersetin

Gambar 1. Hasil Setelah di Sinari Visibel, UV 254 nm, dan UV 365 nm

Deteksi bercak diamati di bawah lampu sinar tampak, UV 254 nm, dan 365 nm yang telah disemprot larutan $AlCl_3$ 1% sebagai penampak bercak. Hal ini dikarenakan adanya pembentukan ikatan kompleks antara gugus hidroksil dengan logam Al (Anggistia *et al.*, 2016). Pengamatan lampu pada UV λ 254 nm menunjukkan plat akan berflouresensi sedangkan sampel berwarna gelap karena adanya interaksi antara sinar UV dengan indikator fluoresensi yang terdapat pada plat KLT. Sedangkan pada λ 365 nm memberikan keadaan yang sebaliknya yaitu bercak akan flouresensi dan plat berwarna gelap karena adanya daya interaksi antara sinar UV dengan gugus kromofor yang terikat oleh auksokrom pada bercak (Forestryana & Arnida, 2020).

UNIVERSITAS JENDERAL ACHMAD YANI YOGYAKARTA PERPUSTAKAAN

Uji identifikasi KLT, umumnya menggunakan nilai Rf (*Retardation Factor*) dalam penentuan pemisahan senyawa bioaktif dengan persamaan jarak elusi yang ditempuh oleh sampel per jarak elusi yang ditempuh oleh pelarut. Nilai maksimum Rf adalah 1 menandakan nilai analit bermigrasi dengan kecepatan sama dengan fase gerak. Nilai minimum Rf adalah 0 menandakan nilai analit tertahan pada posisi titik awal di permukaan fase diam (Gandjar & Rohman, 2007). Nilai Rf yang diperoleh hanya berlaku untuk kombinasi pelarut tertentu dan penyerap yang digunakan (Gandjar & Rohman, 2007). Adapun nilai Rf pada pengukuran bercak dapat dilihat pada (Tabel 7):

Tabel 6. Hasil Perhitungan Nilai Rf

Sampel	Nilai Rf				
	Ekstrak sampel			Standar Kuersetin	Standar literatur yang baik (Rohman, 2009)
	Daun	Batang	Akar		
Bercak 1	0,212	0,187	0,187		
Bercak 2	0,437	0,437	0,437	0,437	0,2-0,8
Bercak 3	0,75				

Berdasarkan hasil uji KLT, nilai Rf menunjukkan bahwa terdapat kandungan senyawa bioaktif flavonoid pada ekstrak sampel (daun, batang, dan akar) yang ditandai dengan adanya bercak ke-2 yang sama dengan nilai pembanding kuersetin yaitu sebesar 0,437. Nilai Rf telah memenuhi ketentuan nilai posisi bercak, karena setiap zat terlarut pada plat kromatografi lapis tipis yang baik yaitu berkisar 0,2-0,8 (Rohman, 2009).

6. Analisis Kuantitatif Total Fenolik

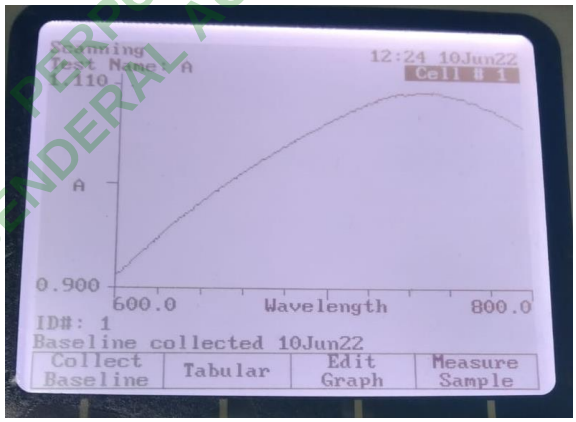
   a. Penetapan λ Optimum Asam Galat

Penetapan λ Optimum bertujuan untuk menentukan panjang gelombang di mana terjadi suatu eksitasi elektronik ikatan kompleks antara asam galat dengan Folin-Ciocalteu dalam memberikan nilai absorbansi maksimum. Penetapan λ optimum termasuk salah satu faktor penting dalam analisis kimia menggunakan metode spektrofotometri UV-Vis. Pengukuran pada panjang gelombang maksimum akan memberikan perubahan absorbansi yang paling besar untuk setiap satuan kadarnya, sehingga bila dilakukan suatu pengukuran

UNIVERSITAS JENDERAL ACHMAD YANI YOGYAKARTA PERPUSTAKAAN

secara berulang atau replikasi akan mengurangi terjadinya kesalahan (Suharyanto & Prima, 2020).

Penetapan λ Optimum dilakukan dengan mengambil larutan asam galat konsentrasi 500 ppm, ditambahkan 0,1 mL Folin-Ciocalteu dan diinkubasi selama ± 4-8 menit. Setelah itu, ditambahkan 1 mL Na_2CO_3 7% dan diencerkan menggunakan *Water For Injection* sebatas 5 mL. Proses *scanning* panjang gelombang asam galat di lakukan pada rentang 600 nm-800 nm. Hasil menunjukkan bahwa nilai panjang gelombang maksimum adalah 738 nm yang dapat dilihat pada (Gambar 15). Nilai tersebut hampir sesuai dengan pengukuran peneliti sebelumnya yaitu mendekati 744,8 nm (Ahmad *et al*., 2015). Perbedaan panjang gelombang maksimum ini, bisa disebabkan antara lain jenis pelarut, pH larutan, konsentrasi tinggi, dan zat-zat pengganggu lainnya (Gandjar & Rohman, 2007). Namun, hasil tersebut masih sesuai dengan teori yang mengatakan bahwa rentang panjang gelombang maksimum asam galat yaitu 600-850 nm (Pratiwi, 2020).



Gambar 2. Kurva λ Optimum Asam Galat

b. Penentuan *Operating Time* (OT) Asam Galat

Penentuan *operating time* dilakukan untuk mengetahui waktu pengukuran yang stabil. Pengukuran pada *Operating Time* bertujuan agar reaksi antara gugus hidroksi senyawa fenolik dan reagen Folin-Ciocalteu dapat berjalan maksimal. Keadaan reaksi yang optimum ditunjukan dengan nilai absorbansi yang relatif stabil. Pada saat terjadi reaksi, absorbansi senyawa yang berwarna akan terus meningkat hingga pada waktu tertentu hingga diperoleh absorbansi

UNIVERSITAS JENDERAL ACHMAD YANI YOGYAKARTA PERPUSTAKAAN

yang stabil. Namun, apabila semakin lama waktu pengukuran, maka akan ada kemungkinan senyawa berwarna tersebut bisa mengalami kerusakan sehingga menyebabkan intensitas warna dan absorbansi menurun (Gandjar dan Rohman, 2007).

Pada penentuan *operating time*, diambil larutan asam galat konsentrasi 500 ppm dan direaksikan dengan reagen Folin-Ciocalteu dalam suasana basa. Pengukuran absorbansi dilakukan pada panjang gelombang maksimum 738 nm dan dilakukan pembacaan nilai absorbansi setiap 5 menit selama 2 jam. Hasil menunjukkan bahwa *operating time* pada penelitian ini adalah 1 jam 35 menit yang dapat dilihat pada (Lampiran 5.c), nilai absorbansi diamati yang stabil atau selisih nilai absorbansi dengan lainnya relatif dekat.

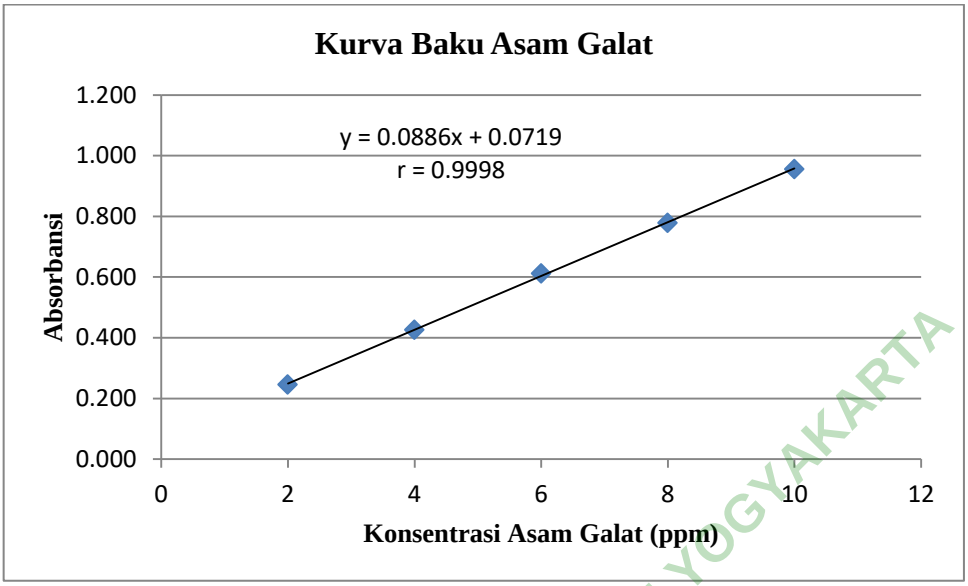
c. Pembuatan Kurva Baku Asam Galat

Membuat seri kadar konsentrasi larutan baku 100 ppm, 200 ppm, 300 ppm, 400 ppm, dan 500 ppm dengan menambahkan metanol *p.a* sebatas 10 mL. Masing-masing seri konsentrasi larutan baku diambil 0,1 mL untuk membuat seri konsentrasi (2 ppm, 4 ppm, 6 ppm, 8 ppm, dan 10 ppm), dilarutkan 0,1 mL Folin-Ciocalteu dan ditunggu selama 4-8 menit pada suhu kamar agar terjadi reaksi kimia. Dilarutkan 1 mL Na_2CO_3 7% dan ditambahkan *Water For Injection* sebatas 5 mL, di inkubasi selama *operating time* 1 jam 35 menit. Diukur serapan pada λ optimum 738 nm dengan menggunakan blanko metanol *p.a*. Hal ini bertujuan untuk mengetahui nilai regresi kurva kalibrasi yang akan digunakan dalam menghitung jumlah kadar sampel. Diperoleh hasil kurva baku asam galat adalah sebagai berikut:

Tabel 7. Hasil Pengukuran Kurva Baku Asam Galat

Konsentrasi (ppm)	Replikasi Absorbansi			
	1	2	3	Rata-Rata ± %CV
2	0,230	0,259	0,249	0,246 ± 5,988
4	0,414	0,408	0,455	0,426 ± 6,009
6	0,616	0,617	0,603	0,612 ± 1,276
8	0,784	0,777	0,774	0,778 ± 0,659
10	0,944	0,990	0,933	0,956 ± 3,164

UNIVERSITAS JENDERAL ACHMAD YANI YOGYAKARTA PERPUSTAKAAN



Gambar 3. Kurva Baku Konsentrasi Asam Galat Terhadap Absorbansi

Berdasarkan pengukuran kurva baku pada (Gambar 16), didapatkan hasil regresi konsentrasi rata-rata larutan baku asam galat (x) dengan absorbansi (y) adalah y = 0,0886x + 0,0719. Nilai koefisien korelasi (r) sebesar 0,9998 menunjukkan bahwa hubungan antara konsentrasi dengan absorbansi yang dihasilkan linier atau mendekati 1. Peningkatan nilai absorbansi berbanding lurus dengan peningkatan konsentrasi dan sesuai dengan kriteria penerimaan koefisien kolerasi (r) yang telah memenuhi syarat (Pratiwi, 2020). Pengukuran ini berdasarkan hukum Lambert-Beer yang menunjukkan hubungan antara peningkatan kadar analit terhadap kenaikan absorbansi (Mukhriani *et al.*, 2019).

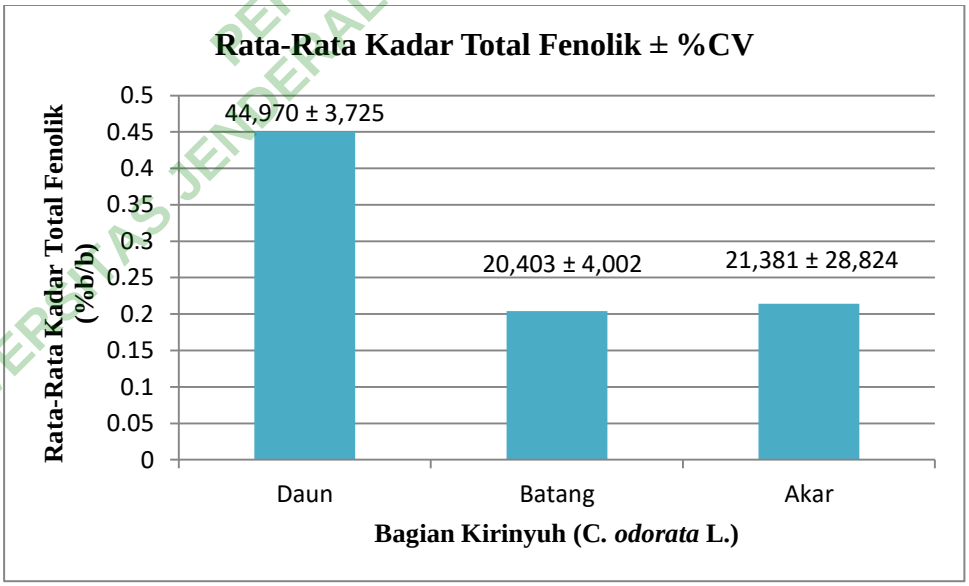
d. Penentuan Kadar Total Fenolik Sampel

Penetapan kadar total fenolik dilakukan dengan menggunakan reagen Folin-Ciocalteu. Pengukuran nilai absorbansi ekstrak etanol sampel (daun, batang, akar) dilakukan setelah penambahan pereaksi 0,1 mL Folin Ciocalteu, 0,1 mL Na_2CO_3 7%, dan diencerkan dengan *Water For Injection* sebatas 5 mL. Setelah itu, diinkubasi selama *operating time* 1 jam 35 menit dan diukur pada panjang gelombang 738 nm. Prinsip kerjanya adalah senyawa fenolik akan bereaksi dengan Folin-Ciocalteau hanya dalam suasana basa maka ditambahkan larutan Na_2CO_3 agar terjadi disosiasi proton pada senyawa fenolik menjadi ion fenolat.

UNIVERSITAS JENDERAL ACHMAD YANI YOGYAKARTA PERPUSTAKAAN

Ion fenolat akan mereduksi asam heteropoli (fosfomolibdat-fosfotungstat) pada pereaksi Folin-Ciocalteau menjadi suatu ikatan kompleks molibdenum-tungsten (Apsari & Susanti, 2011). Semakin besar konsentrasi senyawa fenolik maka ion fenolat yang terbentuk akan semakin bertambah, sehingga banyaknya ion fenolat yang mereduksi fosfomolibdat-fosfotungstat dapat mengubah warna kuning menjadi biru semakin pekat, hal ini menyebabkan absorbansi yang terukur pun akan semakin besar (Fayakun, 2019).

Masing-masing sampel uji diukur sebanyak tiga kali pengulangan agar data yang didapatkan akurat yang telah tertera pada (Lampiran 5.d). Nilai hasil absorbansi sampel yang didapatkan kemudian disubstitusikan ke dalam persamaan regresi asam galat yaitu y = 0,0886x + 0,0719 dengan nilai korelasi (r) sebesar 0,9998 sehingga dapat dihitung kadar total fenolik. Hasil menunjukkan bahwa nilai penetapan kadar total fenolik ekstrak Kirinyuh (*C. odorata* L.) terbesar secara berurut adalah daun 44,970 ± 3,725 %b/b, akar 21,381 ± 28,824 %b/b, dan batang 20,403 ± 4,002 %b/b sebagai nilai EAG yang telah tertera pada (Gambar 17).



Gambar 4. Grafik Perbandingan Rata-Rata Kadar Total Fenolik Masing-Masing Bagian Kirinyuh (*C. odorata* L.)

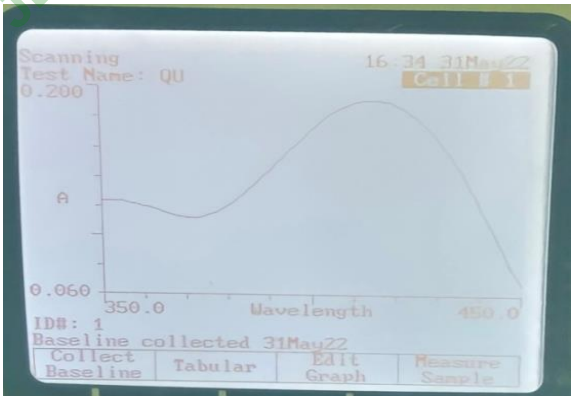
UNIVERSITAS JENDERAL ACHMAD YANI YOGYAKARTA PERPUSTAKAAN

7. Analisis Kuantitatif Total Flavonoid

a. Penetapan λ Optimum Kuersetin

Penetapan λ Optimum bertujuan untuk menentukan panjang gelombang di mana terjadi suatu eksitasi elektronik ikatan kompleks antara kuersetin dengan $AlCl_3$ dalam memberikan nilai absorbansi maksimum. Penetapan λ optimum termasuk salah satu faktor penting dalam analisis kimia menggunakan metode spektrofotometri UV-Vis. Pengukuran pada panjang gelombang maksimum akan memberikan perubahan absorbansi yang paling besar untuk setiap satuan kadarnya, sehingga bila dilakukan suatu pengukuran secara berulang atau replikasi akan mengurangi terjadinya kesalahan (Suharyanto & Prima, 2020).

Penetapan λ Optimum dilakukan dengan mengambil larutan kuersetin konsentrasi 100 ppm, ditambahkan 1 mL $AlCl_3$ 10% dan 8 mL CH_3COOH 5% ke dalam tabung reaksi. Proses *scanning* panjang gelombang kuersetin di lakukan pada rentang 350 nm-450 nm. Hasil menunjukkan bahwa nilai panjang gelombang maksimum adalah 415 nm yang dapat dilihat pada (Gambar 18). Nilai tersebut sesuai dengan pengukuran peneliti sebelumnya yaitu 415 nm (Ipandi *et al*., 2016). Hasil tersebut juga sesuai dengan teori yang mengatakan bahwa rentang panjang gelombang maksimum kuersetin yaitu 400-450 nm (Azizah *et al*., 2014).



Gambar 5. Kurva λ Optimum Kuersetin

b. Penentuan *Operating Time* (OT) Kuersetin

Penentuan *operating time* (OT) bertujuan untuk mengukur hasil reaksi atau pembentukan warna. *Operating time* adalah waktu yang dibutuhkan senyawa untuk bereaksi dengan senyawa lainnya hingga terbentuklah suatu produk yang

UNIVERSITAS JENDERAL ACHMAD YANI YOGYAKARTA PERPUSTAKAAN

stabil. Pada penelitian ini senyawa yang akan diukur absorbansinya yaitu senyawa kompleks antara kuersetin dengan $AlCl_3$. Senyawa kompleks ini membutuhkan waktu agar reaksi yang diperoleh stabil. Oleh sebab itu, maka diperlukan penentuan *operating time* pada saat absorbansi membentuk ikatan kompleks kuersetin dengan $AlCl_3$ yang stabil. Apabila pengukuran dilakukan setelah *operating time*, maka kemungkinan ikatan kompleks antara kuersetin dan $AlCl_3$ menjadi rusak (Indrayani, 2008).

Pada penentuan *operating time*, diambil larutan kuersetin 100 ppm, kemudian ditambahkan $AlCl_3$ dan CH_3COOH 5% pada tabung reaksi. Pengukuran absorbansi dilakukan pada panjang gelombang maksimum 415 nm dan dilakukan pembacaan nilai absorbansi setiap 5 menit selama 1 jam. Hasil menunjukkan bahwa *operating time* pada penelitian ini adalah 35 menit yang dapat dilihat pada (Lampiran 6.c), nilai absorbansi diamati yang stabil atau selisih nilai absorbansi dengan lainnya relatif dekat.

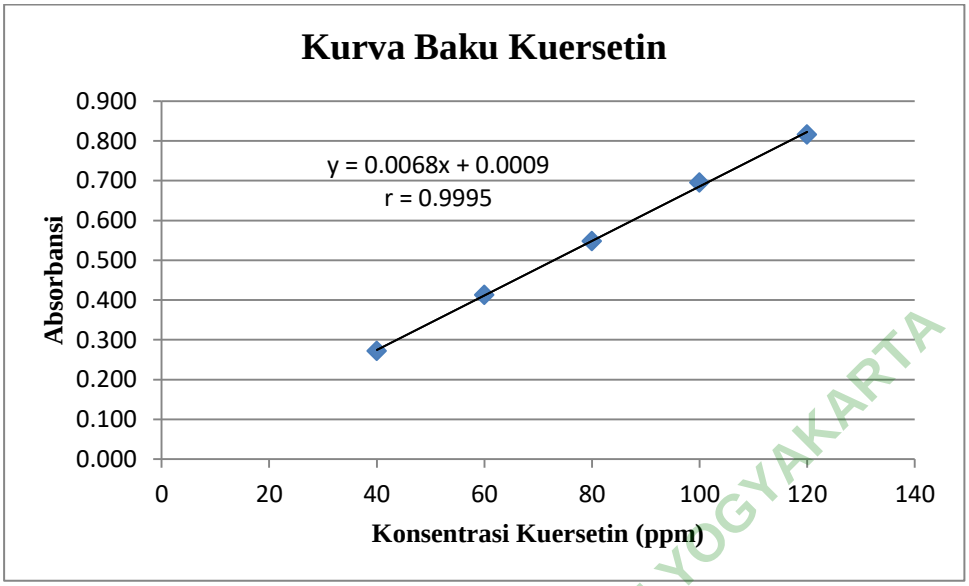
c. Pembuatan Kurva Baku Kuersetin

Membuat seri kadar konsentrasi larutan baku 40 ppm, 60 ppm, 80 ppm, 100 ppm, dan 120 ppm dengan menambahkan etanol *p.a* sebatas 10 mL. Masing-masing seri konsentrasi larutan baku diambil 1 mL, dilarutkan 1 mL $AlCl_3$ 10% dan 8 mL CH_3COOH 5%, lalu diinkubasi selama *operating time* 35 menit. Diukur serapan pada λ optimum 415 nm dengan menggunakan blanko etanol *p.a*. Hal ini bertujuan untuk mengetahui nilai regresi kurva kalibrasi yang akan digunakan dalam menghitung jumlah kadar sampel. Diperoleh hasil kurva baku kuersetin adalah sebagai berikut:

Tabel 8. Hasil Pengukuran Kurva Baku Kuersetin

Konsentrasi (ppm)	Replikasi Absorbansi			
	1	2	3	Rata-Rata ± %CV
40	0,269	0,268	0,279	0,272 ± 2,236
60	0,417	0,410	0,411	0,413 ± 0,917
80	0,600	0,532	0,512	0548 ± 8,418
100	0,695	0,696	0,695	0,695 ± 0,083
120	0,815	0,816	0,815	0,815 ± 0,071

UNIVERSITAS JENDERAL ACHMAD YANI YOGYAKARTA PERPUSTAKAAN



Gambar 6. Kurva Baku Konsentrasi Kuersetin Terhadap Absorbansi

Berdasarkan pengukuran kurva baku pada (Gambar 19), didapatkan hasil regresi konsentrasi rata-rata larutan baku kuersetin (x) dengan absorbansi (y) adalah y = 0,00068x + 0,0009. Nilai koefesien korelasi (r) sebesar 0,9995 menunjukkan bahwa hubungan antara konsentrasi dengan absorbansi yang dihasilkan linier atau mendekati 1. Peningkatan nilai absorbansi berbanding lurus dengan peningkatan konsentrasi dan sesuai dengan kriteria penerimaan koefisien kolerasi (r) yang telah memenuhi syarat (Pratiwi, 2020). Pengukuran ini berdasarkan hukum Lambert-Beer yang menunjukkan hubungan antara peningkatan kadar analit terhadap kenaikan absorbansi (Mukhriani *et al*., 2019).

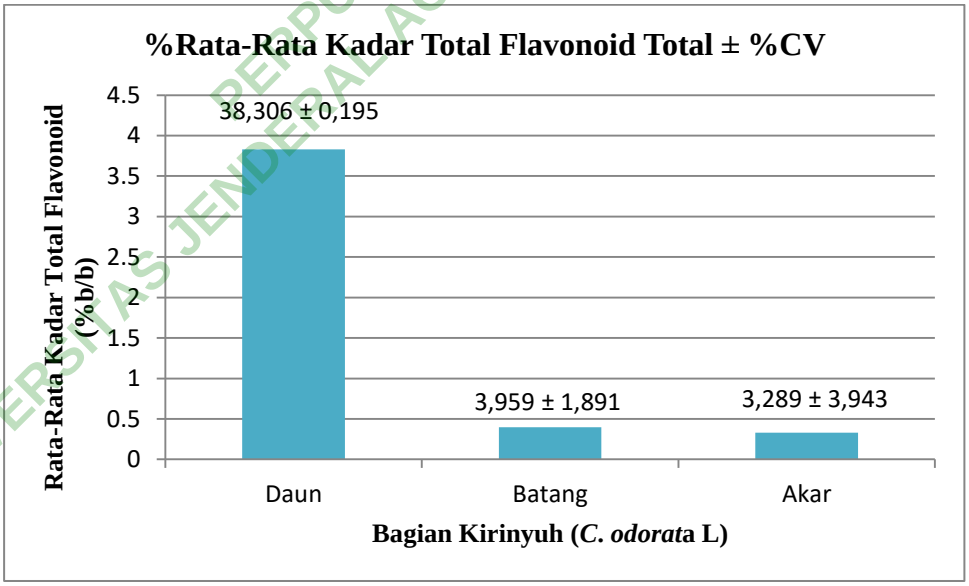
d. Penentuan Kadar Total Flavonoid Sampel

Pada penetuan kadar total flavonoid, diambil ekstrak etanol sampel (daun, batang, akar) dan ditambahkan 1 mL $AlCl_3$ 10% yang berfungsi sebagai pembentuk ikatan kompleks antara gugus hidroksil dan keton yang berdekatan maupun yang tidak berdekatan, sehingga terjadi pergeseran panjang gelombang ke arah visibel (tampak) yang ditandai warna kuning. Untuk mempertahankan posisi panjang gelombang agar tetap didaerah visibel (tampak) maka ditambahkan 8 mL CH_3COOH 5% (Lindawati & Ma'ruf, 2020).

UNIVERSITAS JENDERAL ACHMAD YANI YOGYAKARTA PERPUSTAKAAN

Warna kuning larutan disebabkan karena terbentuknya ikatan kompleks asam yang stabil dengan gugus keton pada C-4 atau gugus hidroksil pada C-3 atau C-5 dari flavon dan flavonol (Chang *et al*., 2002). Bila nilai absorbansi dengan kadar flavonoid memiliki hubungan yang linear artinya semakin tinggi absorbansi yang terukur maka kadar flavonoid yang terkandung di dalamnya juga semakin tinggi (Neldawati *et al*., 2013).

Masing-masing sampel uji diukur sebanyak tiga kali pengulangan agar data yang didapatkan akurat yang telah tertera pada (Lampiran 6.d). Nilai hasil absorbansi sampel yang didapatkan kemudian disubstitusikan ke dalam persamaan regresi kuersetin yaitu y = 0,00068x + 0,0009 dengan nilai korelasi (r) sebesar 0,9995 sehingga dapat dihitung kadar total flavonoid. Hasil menunjukkan bahwa nilai penetapan kadar total flavonoid ekstrak Kirinyuh (*C. odorata* L.) terbesar secara berurut adalah daun 38,306 ± 0,195 %b/b, batang 3,959 ± 1,891 %b/b, dan akar 3,289 ± 3,943 %b/b sebagai nilai EK yang telah tertera pada (Gambar 20).



Gambar 7. Grafik Perbandingan Rata-Rata Kadar Total Flavonoid Masing-Masing Bagian Kirinyuh (*C. odorata* L.)

UNIVERSITAS JENDERAL ACHMAD YANI YOGYAKARTA PERPUSTAKAAN

8. Analisis data

Data perhitungan kadar total fenolik dan flavonoid yang didapatkan dari masing-masing bagian Kirinyuh (*C. odorata* L.) akan dianalisis statistik uji *Repeated Measures* ANOVA menggunakan SPSS Versi 24. Uji analisis tersebut bertujuan untuk mengetahui adanya perbedaan secara signifikan dari berbagai hasil pengukuran yang telah dilakukan secara berulang-berulang dalam suatu variabel penelitian baik 3 sampel ataupun lebih yang saling berpasangan (Arifin, 2007). Oleh sebab itu, dikarenakan peneliti menggunakan 3 bagian sampel dalam satu tumbuhan Kirinyuh (*C. odorata* L.), maka dilakukan uji *Repeated Measures* ANOVA yang merupakan bagian dari uji parametrik. Syarat dari uji tersebut yaitu nilai standarisasi residual untuk semua pengukuran (variabel) harus berdistribusi normal. Namun, bila nilai tidak berdistribusi normal signifikan < 0,05, maka alternatifnya menggunakan uji non parametrik *Friedman*. Variabel bebas menggunakan data berskala kategori (nonmetrik) dan variabel terikat menggunakan data berskala interval atau rasio (metrik). Data penelitian dapat diasumsikan sebagai varians homogen atau sama yang ditandai dengan nilai signifikan > 0,05 pada nilai *Mauchly's Test of Sphericity*. Namun, syarat tersebut tidak harus mutlak karena bisa menggunakan alternatif nilai *Greenhouse Geisser*. Pada penelitian ini, variabel bebas adalah bagian Kirinyuh (*C. odorata* L.) dan variabel terikat adalah data pengukuran kadar, baik fenolik maupun flavonoid. Untuk uji normalitas peneliti menggunakan uji *Shapiro-Wilk* karena umumnya menggunakan sampel kurang dari 50 data, sedangkan uji *Kolmogrov-Smirnov* menggunakan sampel lebih dari 50 data (A'dadiyyah, 2021).

a. Fenolik

Tabel 9. Hasil Analisis Kadar Total Fenolik Menggunakan *Repeated Measures* ANOVA

No	Bagian Kirinyuh	Distribusi Data *Shapiro-Wilk*	Uji Homogenitas			Signifikansi	
			Mauchly's test of Sphericity	*Sphericity Assumed*	*Greenhouse-Geisser*		
1.	Daun	0,573 > 0,05 N				2	0,002*
						3	0,097*

UNIVERSITAS JENDERAL ACHMAD YANI YOGYAKARTA PERPUSTAKAAN

2.	Batang	0,122 > 0,05 N	0,034 < 0,05 TH	0,003 < 0,05	0,027 < 0,05^	1	0,002
						3	1,000
3.	Akar	0,713 > 0,05 N				1	0,097
						2	1,000

Keterangan :
N : Normalitas
H : Homogen
TH : Tidak Homogen
^ : Nilai Penentuan H_0 dan H_a
*** : Nilai Sig. (< 0,05)**

Berdasarkan hasil pada (Tabel 10), nilai distribusi data dengan teknik *Shapiro-Wilk* menunjukkan bahwa masing-masing bagian sampel terdistribusi secara normal. Karena nilai signifikan untuk semua variabel *Standarized Residual* > 0,05 sehingga analisis data untuk penelitian ini bisa dilanjutkan dengan metode uji *Repeated Measures* ANOVA. Pada uji *Mauchly's test of Sphericity* nilai 0,034 < 0,05, maka bisa disimpulkan bahwa data tidak memenuhi asumsi homogen varians atau sama. Namun, masih bisa dilakukan dengan menggunakan uji alternatif dengan mengacu pada nilai *Greenhouse-Geisser* dalam menentukan hipotesis penelitian. Nilai H_0 menandakan tidak ada perbedaan rata-rata kadar fenolik dan H_a menandakan ada perbedaan rata-rata kadar fenolik pada masing-masing bagian sampel. Hasil menunjukkan bahwa nilai *Greenhouse-Geisser* 0,027 < 0,05, maka H_0 ditolak dan H_a diterima karena terdapat perbedaan rata-rata kadar total fenolik yang signifikan dari masing-masing bagian sampel. kemudian, dilanjutkan dengan uji perbandingan *Pairwise* yang dapat memberikan gambaran besar nilai kadar total fenolik untuk masing-masing bagian sampel. Pada nomor 1 ke 2 terdapat perbedaan rata-rata kadar total fenolik 24,567 %b/b dan tingginya kadar berbeda signifikan karena nilai 0,002 < 0,05, nomor 1 ke 3 terjadi perbedaan rata-rata kadar total fenolik 23,589% dan tingginya kadar tidak berbeda signifikan karena nilai 0,097 > 0,05, nomor 2 ke 3 terjadi perbedaan rata-rata kadar total fenolik 0,978% dan tingginya kadar tidak berbeda signifikan karena nilai 1,000 > 0,05 yang tertera pada (Lampiran 7.1). Dapat disimpulkan bahwa

UNIVERSITAS JENDERAL ACHMAD YANI YOGYAKARTA PERPUSTAKAAN

perbedaan rata-rata nilai kadar total fenolik daun terhadap batang (2) sebesar 24,567 %b/b dan akar (3) sebesar 23,589 %b/b sebagai nilai EAG.

b. Flavonoid

Tabel 10. Hasil Analisis Kadar Total Flavonoid Menggunakan *Repeated Measures* ANOVA

No	Bagian Kirinyuh	Distribusi Data *Shapiro-Wilk*	Uji Homogenitas			Signifikansi	
			Mauchly's test of Sphericity	*Sphericity Assumed*	*Greenhouse-Geisser*		
1.	Daun	0,637 > 0,05 N				2	Sig. 0,000*
						3	Sig. 0,000*
2.	Batang	0,537 > 0,05 N	0,492 > 0,05 H	0,000 < 0,05^	0,000 < 0,05	1	Sig. 0,000
						3	Sig. 0,084
3.	Akar	0,363 > 0,05 N				1	Sig. 0,000
						2	Sig. 0,084

Keterangan :
N : Normalitas
H : Homogen
TH : Tidak Homogen
^ : Nilai Penentuan H_0 dan H_a
*** : Nilai Sig. (< 0,05)**

Berdasarkan hasil pada (Tabel 11), nilai distribusi data dengan teknik *Shapiro-Wilk* menunjukkan bahwa masing-masing bagian sampel terdistribusi secara normal. Karena nilai signifikan untuk semua variabel *Standarized Residual* > 0,05 sehingga analisis data untuk penelitian ini bisa dilanjutkan dengan metode uji *Repeated Measures* ANOVA. Pada uji *Mauchly's test of Sphericity* nilai 0,492 > 0,05, maka bisa disimpulkan bahwa data memenuhi asumsi homogen varians atau sama. Oleh karena itu, bisa menggunakan nilai *Sphericity Assumed* dalam menentukan hipotesis penelitian. Nilai H_0 menandakan tidak ada perbedaan rata-rata kadar total flavonoid dan H_a menandakan ada perbedaan rata-rata kadar total flavonoid pada masing-masing bagian sampel. Hasil menunjukkan bahwa nilai *Sphericity Assumed* 0,000 < 0,05, maka H_0 ditolak dan H_a diterima karena terdapat perbedaan rata-rata kadar total fenolik yang signifikan dari masing-masing bagian sampel.

UNIVERSITAS JENDERAL ACHMAD YANI YOGYAKARTA PERPUSTAKAAN

kemudian, dilanjutkan dengan uji perbandingan *Pairwise* yang dapat memberikan gambaran besar nilai kadar untuk masing-masing bagian sampel. Pada nomor 1 ke 2 terdapat perbedaan rata-rata kadar total flavonoid 34,346% dan tingginya kadar berbeda signifikan karena nilai 0,000 < 0,05, nomor 1 ke 3 terjadi perbedaan rata-rata kadar total flavonoid 35,016% dan tingginya kadar berbeda signifikan karena nilai 0,000 < 0,05, nomor 2 ke 3 terjadi perbedaan rata-rata kadar total flavonoid 0,670% dan tingginya kadar tidak berbeda signifikan karena nilai 0,084 > 0,05 yang tertera pada (Lampiran 7.2). Dapat disimpulkan bahwa perbedaan rata-rata nilai kadar total flavonoid daun terhadap batang (2) sebesar 34,346 %b/b dan akar (3) sebesar 35,016 %b/b sebagai nilai EK.

B. Pembahasan

Kirinyuh (*C. odorata* L.) adalah tanaman gulma yang masih banyak hidup dialam baik didaerah tropis maupun subtropis. Diambil di daerah Kecamatan pajangan, Kabupaten Bantul, Yogyakarta. Wilayah tersebut berada pada ketinggian ± 100 mdpl, sesuai dengan teori yang digunakan yaitu Kirinyuh (*C. odorata* L.) banyak ditemukan didataran rendah dengan ketinggian sekitar 0-500 mdpl (Prawiradiputra, 2007). Memiliki khasiat sebagai obat tradisional dalam mengobati luka, obat batuk, obat malaria, obat sakit kepala, antidiare, antimikroba, diuretik, antispasmodik, antihipertensi, dan antiinflamasi (Vital & Rivera, 2009).

Pada penelitian ini, Kirinyuh (*C. odorata* L.) dilakukan pengujian menggunakan metode eksperimental agar mengetahui perbandingan kadar total fenolik dan flavonoid yang terkandung pada daun, batang, dan akar. Kirinyuh (*C. odorata* L.) diambil didaerah sekitar persawahan Dusun Kersan yang bebas dari peptisida guna meminimalisir adanya interaksi senyawa kimia berbahaya dengan senyawa bioaktif. Metode ekstraksi yang digunakan pada penelitian ini adalah maserasi karena mudah, sederhana, dan tanpa melalui proses pemanasan agar mencegah kemungkinan rusaknya komponen senyawa kimia yang terkandung dalam sampel (Mukhriani, 2014).

UNIVERSITAS JENDERAL ACHMAD YANI YOGYAKARTA PERPUSTAKAAN

Proses penyarian maserasi dilakukan dengan cara merendam serbuk simplisia kedalam cairan penyari. Setelah itu, cairan penyari akan menembus dinding sel dan masuk kedalam rongga sel yang mengandung zat aktif. Larutan zat aktif yang ada di dalam sel akan didesak keluar oleh penyari karena adanya perbedaan konsentrasi. Peristiwa tersebut terjadi secara berulang hingga terjadi keseimbangan konsentrasi larutan antara di luar sel dan didalam sel (Tjahjani *et al*., 2021). Semakin lama waktu yang digunakan dalam proses penyarian maserasi maka akan meningkatkan hasil rendemen, karena banyaknya pelarut yang akan terserap ke dalam simplisia. Namun, apabila pelarut masuk ke dalam waktu fase jenuh, maka pelarut tidak akan mampu menarik senyawa bioaktif meskipun proses maserasi diperpanjang (Yulianti *et al*., 2014). Adapun pelarut penyari yang digunakan adalah etanol 70% yang memiliki kemampuan dalam menyari suatu senyawa pada rentang polaritas yang lebar mulai dari senyawa polar sampai non polar, tidak toksik dibandingkan dengan pelarut organik lain seperti metanol, tidak mudah ditumbuhi mikroba dan relatif murah (Widjaya, 2012).

Hasil nilai persen rendemen, menunjukkan bahwa ekstrak kental Kirinyuh (*C. odorata* L.) secara berturut-turut yaitu daun sebesar 16,42% sudah memenuhi syarat, sedangkan akar sebesar 5,77% dan batang sebesar 3,45% tidak memenuhi syarat yang baik karena kurang dari 12% (Kemenkes RI, 2017). Hasil tersebut, disebabkan oleh kurangnya pelarut etanol 70% yang digunakan pada saat proses maserasi, sehingga tidak membasahi secara menyeluruh bagian sampel akibatnya kandungan senyawa bioaktif yang ada juga tidak ikut tertarik. Namun, hasil rendemen ekstrak kental Kirinyuh (*C. odorata* L.) yang diperoleh masih cukup digunakan dalam beberapa pengujian. Beberapa faktor lain seperti waktu, suhu, ukuran partikel, jenis pelarut, dan cara pengadukan sampel pada proses ekstraksi juga dapat mempengaruhi besar kecilnya suatu rendemen (Febrina *et al*., 2015).

Ekstrak kental etanol (daun, batang, akar) Kirinyuh (*C. odorata* L.) dilakukan uji kualitatif skrining fitokimia untuk mengidentifikasi adanya senyawa metabolit sekunder yang terkandung dalam sampel tersebut. Diperoleh hasil bahwa sampel (daun, batang, akar) mengandung senyawa bioaktif seperti alkaloid, fenolik, flavonoid, saponin, dan tanin yang dikategori berdasarkan kekuatan. Pada uji

UNIVERSITAS JENDERAL ACHMAD YANI YOGYAKARTA PERPUSTAKAAN

bagian daun didapatkan senyawa bioaktif seperti alkaloid, fenolik, flavonoid, saponin, dan tanin yang kuat. Pada uji bagian batang didapatkan senyawa bioaktif seperti alkaloid dan flavonoid yang kuat sedangkan senyawa lainnya lemah. Pada uji bagian akar didapatkan senyawa bioaktif seperti alkaloid, fenolik, flavonoid, dan tanin yang kuat sedangkan senyawa lainnya lemah. Hasil tersebut telah menunjukkan kesesuaian dengan teori (Ugwoke *et al*., 2017). Perbedaan kandungan senyawa kimia, disebabkan karena adanya perbedaan biosintesis metabolit pada tiap bagian tanaman. Hal ini menunjukkan bahwa kandungan senyawa fitokimia ekstrak kental bagian daun lebih banyak, dibandingkan batang dan akar Kirinyuh (*C. odorata* L.). Beberapa faktor lain seperti pengaruh internal (gen tanaman) dan eksternal (suhu, kelembaban, cahaya, pH, unsur hara yang terkandung dalam tanah), juga dapat mempengaruhi kandungan senyawa bioaktif pada tanaman tersebut walaupun dari famili dan spesies yang sama (Sholekah, 2017).

Untuk memperkuat adanya senyawa flavonoid pada masing-masing bagian sampel, maka peneliti melakukan uji kromatografi lapis tipis. Metode KLT mulai dikembangkan pada tahun 1939 oleh Ismail Off dan Schraiber. Prinsip kerjanya adalah adsorben dilapiskan pada lempeng kaca yang bertindak sebagai fase diam. Fase gerak akan bermigrasi disepanjang fase diam dan terbentuklah elusi. Metode ini sederhana, kecepatan pemisahan tinggi dan mudah diperoleh kembali senyawa-senyawa yang terpisahkan (Khopkar, 2003). Nilai Rf digunakan sebagai acuan adanya senyawa metabolit tersebut. Umumnya nilai Rf tidak sama, baik laboratorium satu maupun laboratorium lainnya. Bahkan pada waktu 3 analisis yang berbeda dalam laboratorium yang sama, sehingga perlu penggunaan Rf relatif yaitu nilai Rf noda senyawa sampel dibandingkan noda senyawa lain yaitu standar dalam plat yang sama (Wulandari, 2011). Hasil menunjukkan terdapat kesamaan Rf antara sampel (daun, batang, akar) dengan standar pembanding kuersetin pada bercak 2 sebesar 0,437 dan termasuk kedalam kategori yang baik yaitu rentang 0,2-0,8 (Gandjar & Rohman, 2007). Namun, bercak sedikit samar-samar dikarenakan konsentrasi dan kandungan metabolit tidak tercampur secara homogen pada saat melakukan penotolan sehingga perlunya penentuan

UNIVERSITAS JENDERAL ACHMAD YANI YOGYAKARTA PERPUSTAKAAN

perbandingan konsentrasi pelarut dengan ekstrak yang lebih tepat. Faktor-faktor yang menyebabkan nilai Rf bervariasi meliputi dimensi dan jenis ruang, sifat dan ukuran plat, arah aliran fase gerak, volume dan komposisi fase gerak, kondisi kesetimbangan, kelembaban, dan metode persiapan sampel KLT sebelumnya (Wulandari, 2011).

Penetapan kadar total fenolik dilakukan dengan reagen Folin-Ciocalteau, karena senyawa fenolik dapat bereaksi dengan Folin-Ciocalteau membentuk suatu larutan yang dapat diukur absorbansi menggunakan metode spektrofotometri UV-Vis. Adapun larutan pembanding yang akan digunakan adalah asam galat, karena termasuk salah satu fenolik alami dan stabil. Asam galat direaksikan dengan reagen Folin-Ciocalteau akan menghasilkan warna kuning yang menandakan bahwa sampel atau pembanding mengandung senyawa fenolik. Reaksi tersebut akan berjalan maksimal apabila berada pada suasana basa maka perlu ditambahkan larutan Na_2CO_3. Selama reaksi berlangsung, gugus hidroksil pada senyawa fenolik akan bereaksi dengan reagen Folin-Ciocalteau membentuk suatu ikatan kompleks molibdenum-tungsten berwarna biru. Semakin pekat warna biru menandakan bahwa konsentrasi senyawa fenolik semakin banyak, sehingga ion fenolat yang akan mereduksi asam heteropoli (fosfomolibdat-fosfotungstat) menjadi kompleks molibdenum-tungsten semakin meningkat (Sari & Ayuchecaria, 2017). Pereaksi Folin-Ciocalteu mudah terurai pada suasana basa sehingga harus menggunakan lebih banyak agar hasil yang diharapkan maksimal. Namun, dapat berisiko menyebabkan larutan berubah menjadi endapan keruh yang dapat mempengaruhi pengukuran. Pada saat penambahan Folin-Ciocalteu ke dalam sampel atau pembanding, sebisa mungkin untuk didiamkan selama ± 4-8 menit agar reaksi yang diperoleh tercapai.

Penetapan kadar total flavonoid dilakukan dengan reagen $AlCl_3$, karena senyawa flavonoid dapat bereaksi dengan $AlCl_3$ membentuk suatu larutan yang dapat diukur absorbansi menggunakan metode spektrofotometri UV-Vis. Pemilihan kuersetin sebagai larutan pembanding karena merupakan senyawa yang paling luas penyebarannya dan banyak terdapat pada tumbuhan (Noer *et al*., 2018; Widyasari *et al*., 2019). Kandungan kuersetin dan glikosidanya berada dalam

UNIVERSITAS JENDERAL ACHMAD YANI YOGYAKARTA PERPUSTAKAAN

senyawa flavonoid berjumlah sekitar 60-75% (Suharyanto & Hayati, 2021). Prinsip kerjanya yaitu terjadi suatu pembentukan ikatan kompleks antara $AlCl_3$ dengan gugus keton pada atom C-4 dan gugus hidroksi pada atom C-3 atau C-5 yang bertetangga dari golongan flavon dan flavonol, ditandai dengan sampel atau pembanding yang apabila ditambahkan larutan $AlCl_3$ akan terjadi perubahan larutan berwarna kuning (Azizah *et al*., 2014). Untuk mempertahankan posisi panjang gelombang agar tetap didaerah visibel (tampak) maka ditambahkan CH_3COOH yang berfungsi dalam mendeteksi adanya gugus 7-hidroksil (Azizah *et al*., 2014; Lindawati & Ma'ruf, 2020).

Hasil penetapan kadar total fenolik dan flavonoid pada Kirinyuh (*C. odorata* L.), menunjukkan bahwa nilai yang paling besar adalah daun sebesar 44,970 ± 3,725 %b/b dan 38,306 ± 0,195 %b/b. Sedangkan batang 20,403 ± 4,002 %b/b dan 3,959 ± 1,891 %b/b, dan akar 21,381 ± 28,824 %b/b dan 3,289 ± 3,943 %b/b yang dinyatakan sebagai nilai asam galat (EAG) dan kuersetin (EK). Kadar total fenolik dan flavonoid yang diperoleh, dapat dikategorikan sebagai nilai yang baik untuk bagian daun dan kurang baik untuk bagian batang dan akar karena kecilnya nilai kadar yang dihasilkan. Semakin tinggi nilai kadar maka kandungan senyawa bioaktif di dalam tanaman semakin banyak. Perbedaan bagian sampel (daun, batang, akar) pada Kirinyuh (*C. odorata* L.) dapat menyebabkan perbedaan kadar total fenolik dan flavonoid yang diperoleh dan ada kemungkinan metabolit sekunder pada tiap bagian sampel juga berbeda. Senyawa tersebut akan terkumpul pada berbagai tahap pertumbuhan dan tingkat pengumpulannya juga berbeda. Senyawa yang terkumpul pada bagian tanaman di dalam tanah akan berbeda jumlah dengan yang terkumpul pada bagian tanaman yang tumbuh di atas tanah (Maslakhah *et al*., 2019). Hasil kadar ekstrak kental etanol yang tinggi pada daun bisa jadi dipengaruhi oleh adanya klorofil yang ikut terekstrak. Klorofil merupakan suatu komponen yang keberadaanya cukup besar pada daun dan etanol merupakan salah satu pelarut terbaik yang dapat mengekstrak klorofil (Putu Sri Dia *et al*., 2015).

Berdasarkan hasil pengukuran dan perhitungan, menunjukkan bahwa nilai kadar total fenolik lebih besar dibandingkan dengan flavonoid. Hal ini

UNIVERSITAS JENDERAL ACHMAD YANI YOGYAKARTA PERPUSTAKAAN

menunjukkan bahwa terdapat ketidaksesuaian dengan peneliti sebelumnya yang menggunakan pelarut akuades dalam melakukan proses pengekstrasian (Etejere *et al*., 2017). Namun, hasil tersebut sudah sesuai yang diharapkan peneliti saat ini karena pada dasarnya fenolik merupakan suatu senyawa pusat yang bersifat polar dan memiliki beberapa turunan golongan senyawa bioaktif salah satunya yaitu flavonoid. Banyaknya kadar konsentrasi sampel yang akan digunakan dalam penelitian ini, dapat mempengaruhi nilai hasil pengukuran absorbansi. Perbedaan kadar senyawa metabolit aktif yang diperoleh dari sampel (daun, batang, akar) tumbuhan Kirinyuh (*C. odorata* L.), dikarenakan beberapa hal diantaranya yaitu lingkungan yang berdampak terhadap produktivitas dan mutu tanaman. Kondisi lingkungan yang dimaksud yaitu jenis tanah, kesuburan tanah, ketersediaan air, ketinggian tempat, curah hujan, suhu udara, dan intensitas cahaya matahari pada tempat tumbuh tanaman (Muhammad *et al*., 2017). Nilai absorbansi yang baik yaitu berkisar $0{,}2 \leq A \leq 0{,}8$, maka dinamakan dengan daerah berlakunya hukum Lambert-Beer (Suhartati, 2017). Data tersebut telah dihitung secara statistik parametrik uji *Repeated Measures* ANOVA menggunakan SPSS versi 24. Hasil menunjukkan terdapat perbedaan rata-rata pada nilai kadar total fenolik dan flavonoid untuk masing-masing bagian Kirinyuh (*C.odorata* L.).

UNIVERSITAS JENDERAL ACHMAD YANI YOGYAKARTA PERPUSTAKAAN