

## BAB IV HASIL DAN PEMBAHASAN

### A. Hasil

#### 1. Determinasi Tanaman

Identifikasi terhadap keaslian sampel yang akan digunakan dalam penelitian, dengan tujuan agar dapat menghindari terjadinya kesalahan dalam pengambilan sampel. Determinasi tanaman dilakukan di Laboratorium Sistematika Tumbuhan, Fakultas Biologi, Universitas Gadjah Mada, Yogyakarta pada tanggal 5 Maret 2021 dengan nomor pendaftaran 014979/S.Tb./III/2021. Hasil dari identifikasi tanaman yang digunakan dalam penelitian yaitu sebagai berikut (dapat dilihat pada lampiran 3):

Kingdom : Plantae  
Divisio : Tracheophyta  
Class : Magnoliopsida  
Ordo : Myrtales  
Familia : Myrtaceae  
Genus : *Syzygium*  
Species : *Syzygium aromaticum* (L.) Merrill & Perry  
Sinonim : *Caryophyllus aromaticus* L., *Eugenia aromatica* (L.) Baill.  
*Eugenia caryophyllata* Thunb., *Eugenia caryophyllata*  
(Spreng.) Bullock & S. G. Harrison  
Nama Daerah : Cengkeh

#### 2. Pembuatan simplisia

Sampel dalam penelitian ini yaitu digunakan simplisia bunga cengkeh. Bunga cengkeh yang digunakan diperoleh dari Desa Candilopo, Banyubiru, Dukun, Magelang, Jawa Tengah pada bulan Februari 2021. Pembuatan simplisia dilakukan dengan beberapa langkah yaitu simplisia bunga Cengkeh sebanyak  $\pm 1$  kg dikeringkan di bawah sinar matahari sebelum dihaluskan.

Pengeringan dilakukan sepenuhnya bertujuan untuk menghilangkan kadar air yang ada di bunga cengkeh tersebut agar simplisia tidak busuk atau berjamur dan zat yang berkhasiat tidak berubah karena adanya fermentasi. Simplisia kering yang diperoleh kemudian diserbuk dengan alat penyerbuk dan kemudian diayak dengan ayakan mesh nomor 200. Proses penyerbukan simplisia kering bertujuan untuk memperkecil ukuran simplisianya sehingga memudahkan proses penarikan senyawa aktif oleh pelarut dari dalam jaringan tumbuhan. Proses penyarian akan lebih mudah dan efektif apabila dalam bentuk serbuk karena luas kontak antara permukaan jaringan sel dengan pelarut akan lebih besar. Dari hasil penyerbukan atau penghalusan simplisia kering diperoleh serbuk simplisia sebanyak  $\pm 500$  gram.

Hasil serbuk bunga cengkeh kemudian dilanjutkan proses penyarian atau ekstraksi. Ekstrak etanol bunga cengkeh pada penelitian ini dibuat dengan metode maserasi menggunakan pelarut etanol 70%. Mekanisme metode maserasi itu sendiri ialah suatu proses difusi pelarut ke dalam dinding sel tumbuhan untuk mengekstrak senyawa yang ada di dalam tumbuhan tersebut, dengan kata lain cairan penyari akan menembus dinding sel tumbuhan dan akan masuk ke rongga sel yang mengandung zat aktif, sehingga zat aktif tersebut akan larut dan karena adanya perbedaan konsentrasi antara larutan zat aktif yang berada di dalam sel dengan yang berada di luar sel maka larutan zat aktifnya akan didesak keluar sel.

Maserasi dilakukan dengan langkah awal yaitu serbuk bunga cengkeh ditimbang sebanyak 250 gram, kemudian direndam dalam bejana maserasi dalam etanol 70% sebanyak 5 liter. Proses maserasi dilakukan sebanyak 2 kali atau remaserasi dengan tujuan untuk menarik senyawa aktif secara keseluruhan sehingga dapat diperoleh ekstrak yang lebih banyak. Maserasi pertama dilakukan selama 3 hari dengan pelarut etanol 70% sebanyak 2,5 liter dan kemudian remaserasi dilakukan dengan waktu dan jumlah pelarut yang sama.

Pada saat proses maserasi, dilakukan pengadukan beberapa kali untuk mempercepat terjadinya keadaan setimbang dan tidak cepat jenuh sehingga proses transfer senyawa dari serbuk oleh pelarut menjadi lebih optimal.

Pemilihan pelarut etanol sebagai pelarut terkait dengan sifat etanol yang mempunyai sifat tidak beracun, netral, mudah menarik keluar senyawa aktif dalam sel dan etanol memiliki sifat yang dapat bercampur dengan air pada berbagai perbandingan. Titik didih etanol relatif rendah sehingga mudah dan cepat saat dilakukan penguapan (Departemen Kesehatan Republik Indonesia, 2000). Dari hasil filtrat maserasi kemudian dilakukan penyaringan menggunakan alat vakum buchner agar serbuk yang masih ada dalam maserat dapat mengendap atau tersaring dan terpisah dari filtratnya. Selanjutnya hasil filtrat yang telah diperoleh dari hasil penyaringan kemudian diuapkan atau dipekatkan menggunakan wajan yang diletakkan diatas penangas air hingga diperoleh ekstrak kental. Pada saat proses pemekatan selalu dilakukan pengecekan atau pengukuran suhu dan dipastikan suhu harus di bawah 70°C agar sampel tidak rusak.



Gambar 11. Ekstrak kental bunga cengkeh (EEBC)

Pada penelitian ini, ekstrak kental bunga cengkeh yang diperoleh sebanyak 124,62 gram. Rendemen ekstrak kental yang diperoleh dapat dihitung sebagai presentase perbandingan berat ekstrak kental yang diperoleh terhadap berat serbuk yang digunakan dalam proses maserasi. Rendemen ekstrak kental bunga cengkeh sebesar 49,848 %. Hasil rendemen ekstrak bunga cengkeh yang diperoleh sudah memenuhi nilai yang dipersyaratkan dalam Farmakope Herbal Indonesia (FHI) tahun 2008 yaitu tidak kurang dari 10% (Departemen Kesehatan Republik Indonesia, 2008).

Tabel 4. Hasil Rendemen Ekstrak Etanol Bunga Cengkeh (EEBC)

| Berat Simplisia<br>(gram) | Berat Ekstrak<br>(gram) | Hasil<br>Rendemen (%) |
|---------------------------|-------------------------|-----------------------|
| 250 gram                  | 124,620 gram            | 49,848 %              |

### 3. Fraksinasi

Metode fraksinasi yang dilakukan dalam penelitian ini menggunakan ekstraksi cair-cair (ECC) dengan tujuan untuk mengisolasi kelompok utama dari kandungan senyawa yang diinginkan berdasarkan tingkat kepolarannya. Prinsip dasar dari metode ini ialah melibatkan kontak fisik antara larutan dengan pelarut (*solvent*) lain yang sifatnya tidak saling bercampur atau tidak saling melarut (*immisible*) dengan pelarut asalnya, dan biasanya mempunyai densitas yang berbeda sehingga akan terbentuk dua fase atau lapisan setelah beberapa saat penambahan pelarut (Mirwan & Wicakso, 2008).



Gambar 12. Hasil fraksi 3 pelarut (fraksi air, etil asetat dan n-heksan)

Pada penelitian ini fraksinasi dilakukan menggunakan tiga pelarut yang sesuai dengan tingkat kepolarannya yaitu n-heksan yang bersifat non-polar dengan nilai polaritas ( $P'$ ) 0,1; etil asetat bersifat semipolar ( $P'$  4,4) dan air bersifat polar ( $P'$  10,2). Sebanyak 5 gram ekstrak kental dilarutkan dalam 50 mL air panas dengan suhu 60°C. Kemudian dimasukkan ke dalam corong pisah dan ditambahkan 25 mL n-heksan, corong pisah ditutup kemudian dikocok

perlahan selama 5 menit sambil sesekali dibuka tutupnya untuk mengeluarkan gas yang terdapat didalam corong lalu dibiarkan hingga terjadi pemisahan. Kedua lapisan yang didapatkan kemudian dipisahkan ke dalam wadah yang berbeda. Lapisan air dimasukkan kembali ke dalam corong pisah kemudian ditambahkan lagi n-heksan dengan jumlah yang sama dan dilakukan seperti langkah yang diatas hingga tiga kali. Fraksi n-heksan kemudian ditampung dalam satu wadah. Bagian air dimasukkan kembali kedalam corong pisah, kemudian difraksinasi menggunakan etil asetat dengan cara yang sama seperti fraksinasi dengan n-heksan. Fraksi etil asetat dan air ditampung ke dalam wadah yang berbeda. Ketiga fraksi selanjutnya dipekatkan lagi dan dihitung rendemennya. Hasil rendemen dari ketiga fraksi dapat dilihat pada tabel 5. Hasil rendemen yang diperoleh memiliki kualitas yang baik, karena semakin tinggi hasil rendemen ekstrak maka semakin sedikit zat pengotor yang terdapat dalam ekstrak atau fraksi.

Tabel 5. Hasil Rendemen 3 Fraksi Pelarut

| Sampel             | Fraksi Kental<br>(gram) | Hitungan % Rendemen terhadap: |              |
|--------------------|-------------------------|-------------------------------|--------------|
|                    |                         | Simplisia Kering              | Ekstrak Awal |
| Fraksi Air         | 7,200                   | 2,880 %                       | 5,778 %      |
| Fraksi Etil Asetat | 1,683                   | 0,673 %                       | 1,350 %      |
| Fraksi n-Heksan    | 2,007                   | 0,803 %                       | 1,610 %      |

#### 4. Analisis Kualitatif

##### a. Uji Organoleptik

Uji Organoleptik sepenuhnya bertujuan untuk memberikan gambaran awal atau pengenalan awal ekstrak yang sederhana secara objektif. Prinsipnya yaitu dilakukan dengan menggunakan alat indera manusia yang terdiri dari indera pengelihatan, indera perasa indera penciuman, dan indera peraba, yang kemudian akan didiskripsikan dalam beberapa aspek yaitu warna, bau, rasa, dan tekstur. Hasil dari uji organoleptik dapat dilihat pada tabel di bawah ini:

Tabel 6. Hasil Uji Organoleptik

| Parameter | Ekstrak Etanol Bunga Cengkeh | Fraksi Air          | Fraksi Etil Asetat  | Fraksi n-Heksan     |
|-----------|------------------------------|---------------------|---------------------|---------------------|
| Warna     | Coklat kehijauan             | Coklat              | Kuning kecoklatan   | Kuning kehijauan    |
| Bau       | Khas                         | Khas                | Khas                | Khas                |
| Tekstur   | Kental                       | Kental sedikit cair | Kental sedikit cair | Kental sedikit cair |
| Rasa      | Pahit                        | Pahit               | Pahit               | Pahit               |

## b. Skrining Fitokimia

Hasil skrining fitokimia atau uji pendahuluan dari ekstrak etanol bunga cengkeh dan fraksi 3 pelarut (Air, Etil asetat, dan n-Heksan) didapatkan hasil bahwa ekstrak etanol bunga cengkeh mengandung flavonoid, saponin, alkaloid, tannin dan terpenoid, sedangkan hasil dari fraksi n-heksan diketahui tidak mengandung flavonoid dan pada fraksi etil asetat tidak mengandung saponin.

Tabel 7. Hasil Skrining Fitokimia

| Golongan       | Ekstrak | Fraksi |             |          |
|----------------|---------|--------|-------------|----------|
|                |         | Air    | Etil Asetat | n-Heksan |
| Alkaloid       |         |        |             |          |
| a. Mayer       | +       | +      | +           | +        |
| b. Wagner      | +       | +      | +           | +        |
| c. Dragendroff | +       | +      | +           | +        |
| Flavonoid      | +       | +      | +           | -        |
| Saponin        | +       | +      | -           | +        |
| Terpenoid      | +       | +      | +           | +        |
| Tanin          | +       | +      | +           | +        |

Keterangan:

(-) = Tidak mengandung golongan senyawa uji

(+) = mengandung golongan senyawa uji

Pada pengujian alkaloid menggunakan 3 pereaksi yaitu pereaksi mayer, wagner, dan dragendroff. Pada penambahan pereaksi mayer hasil positif apabila membentuk endapan putih atau kuning. Pada penambahan pereaksi wagner hasil positif apabila terbentuk endapan coklat. Sedangkan

pada penambahan pereaksi Dragendrof hasil positif apabila terbentuk endapan jingga. Hasil dari sampel ekstrak etanol dan fraksi bunga cengkeh menandakan bahwa hasil keseluruhan + (positif) sehingga dapat disimpulkan bahwa baik ekstrak etanol bunga cengkeh dan 3 fraksi pelarut (Air, Etil asetat, dan n-Heksan) mengandung alkaloid.

Pada pengujian flavonoid dengan penambahan magnesium dan asam sulfat pekat apabila timbul warna orange, merah atau kuning, berarti positif flavonoid (golongan flavon, kalkon dan auron). Penambahan magnesium dan asam sulfat pekat berfungsi untuk memecah ikatan glikosida dengan cara mereduksi atau memotong ikatan tersebut. Dari hasil pengujian hasil positif (+) terlihat pada ekstrak etanol bunga cengkeh, fraksi air dan fraksi etil asetat, sedangkan hasil negatif (-) terlihat pada fraksi n-heksan karena hasil warnanya tidak sesuai dengan literatur.

Pada pengujian saponin menggunakan penambahan air terbentuknya busa atau timbul buih maka menunjukkan adanya glikosida yang memiliki kemampuan membentuk busa dalam air yang terhidrolisis menjadi glukosa dan senyawa lainnya. Dari hasil pengujian didapatkan hasil positif pada sampel ekstrak etanol bunga cengkeh dan fraksi air, sedangkan pada fraksi etil asetat dan n-Heksan hasilnya negatif (-).

Pada pengujian terpenoid dan steroid menggunakan penambahan eter, asam sulfat anhidrat dan asam sulfat pekat, apabila hasil yang diperoleh timbul warna kuning, orange atau merah berarti golongan terpenoid. Tetapi apabila timbul warna hijau berarti golongan steroid. Dari hasil pengujian dari ekstrak etanol bunga cengkeh, fraksi air, etil asetat dan n-Heksan didapatkan hasil perubahan warna orange, merah atau kuning sehingga dapat disimpulkan bahwa sampel tersebut mengandung terpenoid.

Pada pengujian tanin dengan penambahan  $\text{FeCl}_3$  akan timbul perubahan warna yaitu menjadi biru atau hijau kehitaman. Penambahan  $\text{FeCl}_3$  dapat bereaksi dengan salah satu gugus hidroksil pada senyawa tanin, ion  $\text{Fe}^{3+}$  akan bereaksi dengan tanin membentuk kompleks (Latifah, 2015). Dari hasil pengujian pada setiap sampel didapatkan hasil positif (+), pada

ekstrak etanol bunga cengkeh mengandung tanin pirogalol karena berwarna biru kehitaman, sedangkan pada fraksi air, etil asetat dan n-Heksan mengandung tanin katekol karena berwarna hijau kehitaman.

c. Kromatografi Lapis Tipis (KLT)

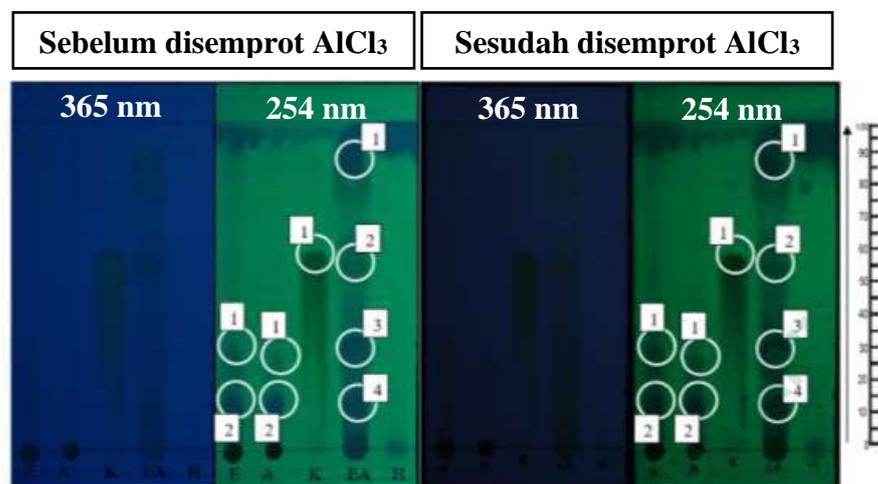
Pada penelitian ini dilakukan analisis secara kualitatif yang ditujukan untuk mengetahui senyawa flavonoid dari ekstrak etanol bunga cengkeh dan 3 fraksi pelarut (fraksi air, fraksi etil asetat, dan fraksi n-heksan). Metode yang digunakan adalah kromatografi lapis tipis (KLT), karena metode ini termasuk metode yang mudah digunakan, sederhana, tidak membutuhkan alat yang khusus, proses cepat, dan tidak terlalu mahal biayanya dibutuhkan.

KLT dilakukan secara kualitatif dengan tujuan untuk mengetahui ada tidaknya senyawa penanda dalam sampel. Pada penelitian ini, senyawa penanda yang diidentifikasi yaitu flavonoid dengan ditandai bercak warna kuning kehijauan. Perbandingan yang digunakan yaitu kuersetin. Konsentrasi sampel yang digunakan sebesar 200 mg dalam 1 ml etanol 96%. Keempat sampel dan standar kuersetin ditotolkan pada lempeng KLT silika gel F254 dengan volume yang ditotolkan sebanyak 1000  $\mu$ L. Fase diam yang digunakan dalam penelitian ini yaitu TLC silika gel 60 F264. Silika gel sebelum digunakan perlu diaktifkan terlebih dahulu dengan cara dipanaskan dengan oven pada suhu 110 C selama 30 menit. Fase gerak yang digunakan pada sistem KLT dalam penelitian ini yaitu yang dapat memberikan penampakan senyawa kuersetin dari ekstrak etanol bunga cengkeh dengan deteksi UV 254 nm dan 365 nm yang terpisah sempurna dengan komponen lain. Sebelumnya sudah dilakukan optimasi KLT dengan beberapa fase gerak lain, sebagai berikut:

Tabel 8. Optimasi Beberapa Fase Gerak pada Kromatografi Lapis Tipis.

| No | Fase Gerak  | Hasil  |
|----|---|--|
| 1. | Etil Asetat: n-Heksan (9: 1)                            | Terjadinya bercak berekor, tidak terlihatnya kenaikan pada sampel dan terjadi penyebaran spot sampel serta pembanding.   |
| 2. | Etil Asetat: n-Heksan (7: 3)                            | Terjadi kenaikan pada sampel ekstrak dan fraksi etil asetat, sedangkan pada fraksi air dan n-heksan tidak naik. Namun tidak terlihat bercak dari setiap sampel.  |
| 3. | Etil Asetat: n-Heksan: Asam Asetat Glasial (6: 3:1)     | Terjadinya bercak berekor pada sampel sedangkan pembanding kuersetin tidak berekor namun bercak melebar.   |
| 4. | Etil Asetat: n-Heksan: Asam Asetat Glasial (6,5: 3:0,1) | Terjadinya bercak berekor pada sampel sedangkan pembanding kuersetin tidak berekor namun bercak melebar.   |
| 5. | Toluene: Etil Asetat (9:1)                              | Tidak terjadi kenaikan baik pada sampel dan pembanding (kuersetin).  |
| 6. | Kloroform: Metanol (9:1)                                | Diperoleh bercak pada pembanding dibagian atas sedangkan pada sampel sudah naik namun bercak sedikit berekor.  |
| 7. | Kloroform: Metanol: Asam Asetat Glasial (8,5: 1: 0,5)   | Bercak kuersetin sedikit dibagian atas dan sudah tidak berekor bercaknya. Sampel ekstrak, fraksi air dan etil asetat sudah terlihat naik dan terdapat beberapa bercak sedangkan pada fraksi n-heksan tidak terlihat adanya kenaikan. |
| 8. | Kloroform: Metanol: Asam Asetat Glasial (9: 1: 0,5)     | Bercak kuersetin tidak terlalu tinggi dan tidak berekor dan pada sampel ekstrak, fraksi air dan etil asetat sudah naik, tidak berekor dan terlihat beberapa bercak sedangkan pada fraksi n-heksan masih tidak terlihat kenaikan.     |

Berdasarkan hasil optimasi penentuan fase gerak; digunakan kombinasi fase gerak kloroform: metanol: asam asetat glasial (9: 1: 0,5 v/v/v) merupakan fase gerak yang paling optimal dalam memisahkan komponen senyawa kuersetin dalam ekstrak etanol bunga cengkeh. Hasil identifikasi senyawa flavonoid terhadap ekstrak etanol bunga cengkeh dan 3 fraksi pelarut dapat dilihat pada Gambar 13. Menurut literatur hasil dari KLT dikatakan positif mengandung flavonoid apabila terdapat bercak berwarna kuning kehijauan (Harborne JB., 1987).



Keterangan:

- E : Ekstrak etanol bunga cengkeh (EEBC)
- A : Fraksi Air
- K : Kuersetin (Pembanding)
- EA : Fraksi Etil Asetat
- H : Fraksi n-Heksan
- 1,2,3,4 : Titik bercak senyawa flavonoid atau *Spot*

Gambar 13. Hasil KLT untuk analisis kualitatif senyawa flavonoid.

Dari hasil identifikasi secara kualitatif senyawa flavonoid pada sampel ekstrak etanol bunga cengkeh dan 3 fraksi pelarut dengan pereaksi semprot AlCl<sub>3</sub>. Perbandingan hasil dari sebelum disemprot pereaksi AlCl<sub>3</sub> bercak terlihat namun masih belum terlihat intensif, sedangkan setelah disemprot pereaksi AlCl<sub>3</sub> hasil bercak terlihat lebih jelas, tajam dan lebih intensif, untuk lebih jelasnya dapat dilihat pada Gambar 13. Hasilnya positif mengandung flavonoid ditandai dengan adanya bercak warna kuning kehijauan pada sampel fraksi etil asetat dan pembanding (kuersetin), terlihat samar-samar pada sampel ekstrak etanol bunga cengkeh dan fraksi air, sedangkan tidak terlihat sama sekali pada fraksi n-Heksan. Bercak warna kuning yang terdeteksi pada sampel diduga merupakan senyawa flavonoid jenis flavonol dan flavon (Harborne JB., 1987). Flavonoid menghasilkan peredaman fluoresensi pada sinar UV 365 nm dan menunjukkan fluoresensi kuning, hijau atau biru (Santosa & Haresmita, 2015).

Hasil perhitungan nilai Rf (faktor retardasi) dan harga hRf atau angka Rf dikalikan dengan 100 (faktor h) dapat dilihat pada table berikut:

Tabel 9. Hasil Nilai Rf dan hRf Sampel.

| Sampel                              | Noda atau Spot | Rf    | hRf (Rf x 100 Faktor h) |
|-------------------------------------|----------------|-------|-------------------------|
| Ekstrak Etanol Bunga Cengkeh (EEBC) | 1              | 0,325 | 32,5                    |
|                                     | 2              | 0,188 | 18,8                    |
| Fraksi Air                          | 1              | 0,288 | 28,8                    |
|                                     | 2              | 0,175 | 17,5                    |
| Fraksi Etil Asetat                  | 1              | 0,938 | 93,8                    |
|                                     | 2              | 0,563 | 56,3                    |
|                                     | 3              | 0,325 | 32,5                    |
|                                     | 4              | 0,163 | 16,3                    |
| Fraksi n-Heksan                     | -              | -     | -                       |
| Kuersetin                           | 1              | 0,613 | 61,3                    |

## 5. Analisis Kuantitatif Kandungan Flavonoid Total

### a. Penentuan Panjang Gelombang Maksimum Kuersetin

Penentuan panjang gelombang maksimum dilakukan dengan tujuan untuk menentukan panjang gelombang yang digunakan untuk proses pengukuran dari kompleks antara kuersetin dengan aluminium klorida yang memberikan absorbansi optimum. Faktor penting yang ada dalam analisis kimia dengan metode spektrofotometri adalah penetapan panjang gelombang maksimum. Pada pengukuran panjang gelombang maksimum akan memberikan perubahan nilai absorbansi paling besar untuk setiap satuan kadar. Selain itu, hasil kurva baku dari nilai absorbansi pada rentang panjang gelombang maksimum relatif datar sehingga apabila akan dilakukan pengukuran ulang atau replikasi itu akan meminimalkan terjadinya kesalahan pengukuran.

Pada penelitian ini diperoleh nilai panjang gelombang maksimum sebesar 430 nm artinya nilai absorbansi dari kompleks antara kuersetin dengan aluminium klorida terbaca secara maksimum pada panjang gelombang tersebut. Reaksi kuersetin dan  $\text{AlCl}_3$  dapat terjadi karena senyawa kuersetin sendiri memiliki gugus keto pada posisi atom C nomor

4 dan adanya gugus hidroksil (-OH) pada posisi atom C nomor 3 yang akan terbentuk suatu kompleks ketika adanya penambahan senyawa aluminium klorida ( $\text{AlCl}_3$ ). Prinsip dari penetapan kadar flavonoid dengan penambahan  $\text{AlCl}_3$  adalah terjadinya suatu kompleks antara aluminium klorida dengan gugus keto pada posisi atom C nomor 4 dan gugus hidroksil pada posisi atom C nomor 3 atau 5 yang berdampingan dari golongan flavon dan flavonol (Azizah *et al.*, 2014).

Hal tersebut sama dengan penelitian yang dilakukan oleh (Wardatun *et al.*, 2016) yang memperoleh panjang gelombang maksimum kuersetin berada pada nilai 430 nm, dan mendekati hasil pada penelitian yang dilakukan oleh (Kumalasari *et al.*, 2018) dengan nilai panjang gelombang maksimum kuersetin sebesar 420 nm. Namun semua hasil tersebut merupakan hasil yang sudah sesuai dengan teori yang mengatakan bahwa nilai panjang gelombang maksimum kuersetin yaitu dalam rentang 400-500 nm (Sukmawati *et al.*, 2018).

b. Penentuan *Operating Time* Kuersetin

*Operating time* dilakukan untuk mengukur pembentukan warna dari hasil reaksi. Proses untuk memperoleh waktu yang dibutuhkan suatu senyawa untuk bereaksi dengan senyawa lain hingga terbentuknya senyawa yang stabil adalah *operating time*. Kestabilan dari senyawa dapat dapat diketahui dari hasil nilai absorbansi mulai dari saat direaksikan hingga tercapai nilai absorbansi yang stabil.

Senyawa yang akan diukur pada penelitian ini yaitu senyawa kompleks antara kuersetin dengan aluminium klorida ( $\text{AlCl}_3$ ). Senyawa kompleks yang terbentuk ini membutuhkan waktu untuk bereaksi dengan senyawa hingga terbentuk warna yang stabil. Oleh karena itu diperlukan penentuan *operating time* untuk memperoleh rentang waktu pada saat absorbansi kompleks antara kuersetin dengan aluminium klorida ( $\text{AlCl}_3$ ) yang telah stabil. Apabila pada saat proses pengukuran dilakukan melewati waktu *operating time*, maka kemungkinan yang terjadi bahwa senyawa

kompleks antara kuersetin dan alumunium klorida ( $\text{AlCl}_3$ ) sudah rusak atau tidak stabil (Indrayani, 2008).

Penentuan *operating time* kuersetin dengan menggunakan larutan standar dengan konsentrasi 100 ppm kemudian diukur pada spektrofotometri pada panjang gelombang maksimum (430 nm) dengan interval pengukuran setiap 2 menit hingga diperoleh absorbansi yang stabil. Hasil *operating time* diperoleh nilai absorbansi yang stabil pada menit ke 10 dengan nilai absorbansi sebesar 0,861 (lampiran 12).

c. Penentuan Kurva Baku Kuersetin

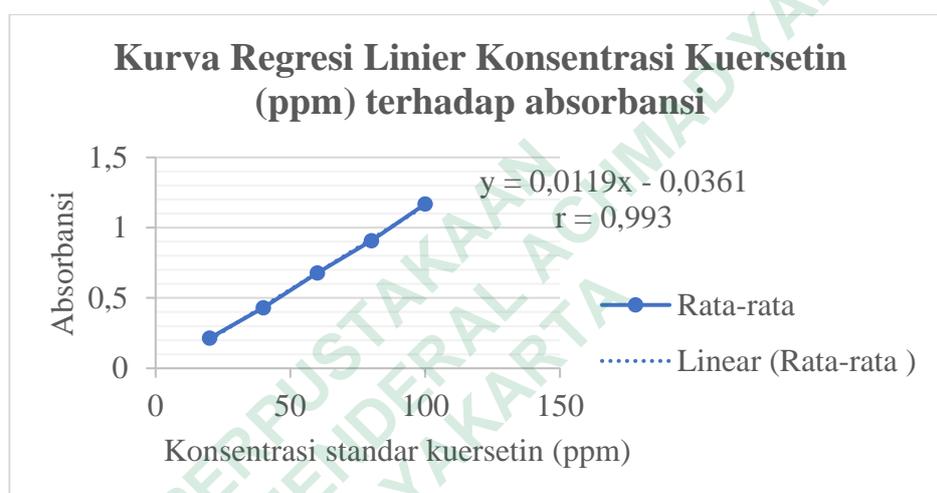
Kurva baku standar merupakan standar dari sampel yang digunakan dalam penelitian ini dan biasanya digunakan sebagai acuan untuk sampel yang digunakan dalam penelitian. Pembuatan kurva baku standar bertujuan untuk mengetahui hubungan antara konsentrasi larutan dengan nilai absorbansinya sehingga konsentrasi sampel dapat diketahui. Nilai  $r$  yang mendekati satu menunjukkan bahwa terdapat korelasi yang baik antara kadar kuersetin dan absorbansi (Indrayani, 2008).

Penentuan kurva baku pada penelitian ini menggunakan kuersetin dengan konsentrasi 20, 40, 60, 80 dan 100 ppm kemudian masing-masing seri kadar diambil 1 mL dan direaksikan 1 mL alumunium klorida ( $\text{AlCl}_3$ ) 10% dan 8 mL asam asetat 5% dengan didiamkan selama 10 menit. Hasil dari absorbansi kurva baku kuersetin dengan menggunakan spektrofotometri dengan panjang gelombang 430 nm adalah sebagai berikut:

Tabel 10. Hasil Absorbansi Kurva Baku Kuersetin

| Konsentrasi Standar Kuersetin | Purata Nilai Absorbansi $\pm$ SD (Standar Deviasi) |
|-------------------------------|--|
| 20                            | 0,214 $\pm$ 0,014                                  |
| 40                            | 0,430 $\pm$ 0,032                                  |
| 60                            | 0,678 $\pm$ 0,008                                  |
| 80                            | 0,908 $\pm$ 0,065                                  |
| 100                           | 1,168 $\pm$ 0,068                                  |

Data dikumpulkan melalui pengukuran nilai absorbansi dari rangkaian larutan standar. Menurut (Neldawati *et al.*, 2013) nilai absorbansi pada kadar flavonoid mempunyai hubungan yang linier artinya semakin tinggi nilai absorbansi maka semakin tinggi pula kadar flavonoid yang terkandung didalamnya. Data absorbansi larutan standar tersebut diperoleh hubungan antara konsentrasi kuersetin (mg/L) dengan absorbansi sampel.



Gambar 14. Kurva Baku Konsentrasi Kuersetin terhadap absorbansi

Nilai koefisien korelasi ( $r$ ) menunjukkan adanya hubungan linieritas antara kedua variabel. Pada penelitian ini diperoleh nilai  $r$  sebesar 0,993, yang dapat dikatakan linier atau baik karena hasilnya mendekati satu. Dari hasil kurva baku juga diperoleh persamaan regresi yaitu  $y = 0,0119x - 0,0361$  yang akan digunakan untuk menghitung nilai kadar flavonoid total dari sampel uji.

#### d. Penetapan Kadar Flavonoid Total

Penetapan kadar flavonoid total dapat dilakukan dengan metode spektrofotometri. Pada penetapan kadar flavonoid total, dari ke 4 sampel penelitian meliputi: ekstrak etanol bunga cengkeh, fraksi air, fraksi etil asetat dan fraksi n-heksan, direaksikan dengan 1 mL aluminium klorida ( $AlCl_3$ ) 10% dan 8 mL asam asetat 5% hingga timbul warna kuning.

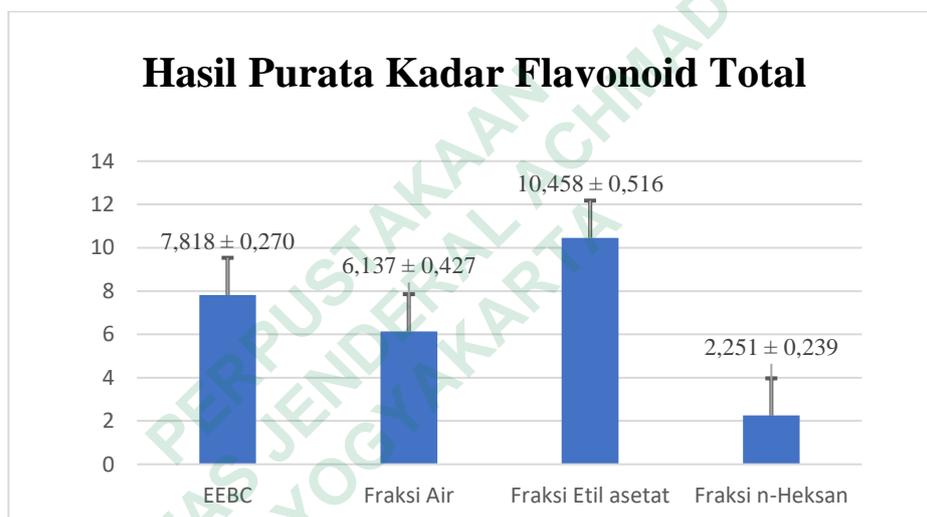
Larutan berwarna kuning diperoleh dari terbentuknya kompleks asam yang stabil dengan adanya gugus keton pada posisi atom C nomor 3 atau gugus hidorksil pada posisi atom C nomor 3 atau 5 dari golongan flavon dan flavonol yang dapat dilihat pada Gambar 7 (Azizah *et al.*, 2014).

Menurut (Dirjen POM, 2014) nilai rentang absorbansi dari kadar flavonoid total berkisar antara 0,2-0,8. Nilai absorbansi dari ekstrak etanol bunga cengkeh (EEBC), fraksi air, fraksi etil asetat dan fraksi n-heksan berturut-turut adalah 0,243; 0,183; 0,337; dan 0,044. Dari hasil yang diperoleh dari ekstrak etanol bunga cengkeh (EEBC), fraksi air, fraksi etil asetat dan fraksi n-heksan mengandung kadar flavonoid, namun hasil yang masuk range nilai absorbansi yaitu ekstrak etanol bunga cengkeh dan fraksi etil asetat sedangkan pada fraksi air dan fraksi n-heksan tidak memasuki range nilai absorbansi.

Tabel 11. Nilai Absorbansi Sampel.

| Sampel                              | Replikasi | Absorbansi | Purata |
|-------------------------------------|-----------|------------|--------|
| Ekstrak Etanol Bunga Cengkeh (EEBC) | 1         | 0,229      | 0,243  |
|                                     | 2         | 0,246      |        |
|                                     | 3         | 0,246      |        |
|                                     | 4         | 0,251      |        |
| Fraksi Air                          | 1         | 0,161      | 0,183  |
|                                     | 2         | 0,195      |        |
|                                     | 3         | 0,191      |        |
|                                     | 4         | 0,185      |        |
| Fraksi Etil Asetat                  | 1         | 0,333      | 0,337  |
|                                     | 2         | 0,350      |        |
|                                     | 3         | 0,353      |        |
|                                     | 4         | 0,313      |        |
| Fraksi n-Heksan                     | 1         | 0,033      | 0,044  |
|                                     | 2         | 0,053      |        |
|                                     | 3         | 0,048      |        |
|                                     | 4         | 0,043      |        |

Untuk menghitung kadar total flavonoid, dimasukkan nilai absorbansi sampel yang telah didapatkan dimasukkan kedalam persamaan garis linear  $y = 0,0119x - 0,0361$  dengan koefisien korelasi korelasi ( $r$ ) 0,993, kemudian dimasukkan pada rumus penentuan kadar flavonoid total yaitu kadar terhitung (mg/mL) dikali volume (mL) dibagi berat sampel (gram). Sehingga diperoleh kadar flavonoid total dari ekstrak etanol bunga cengkeh (EEBC), fraksi air, fraksi etil asetat dan fraksi n-heksan sebagai berikut:



Gambar 15. Grafik Nilai Purata Kadar Flavonoid Total

## 6. Analisis Data

Seluruh data kadar flavonoid total pada sampel dianalisis secara statistik dengan menggunakan bantuan *software* dari SPSS versi 25 dengan uji *One-Way ANOVA*. Pada penelitian ini uji normalitas dilakukan dengan *Shapiro-Wilk* karena jumlah data yang didapatkan kurang dari 50, menurut literatur dari (Razali & Wah, 2011) menyampaikan jika sampel yang digunakan kurang dari 50 agar menghasilkan hasil yang akurat maka disarankan menggunakan uji *Shapiro-Wilk*. Hasil yang diperoleh nilai signifikansi dari ekstrak etanol bunga cengkeh (EEBC), fraksi air, fraksi etil asetat dan fraksi n-heksan berturut-turut sebesar 0,149; 0,611; 0,792 dan 0,209. ( $P > 0,05$ ) sehingga dapat dikatakan

bahwa data terdistribusi normal. Uji berikutnya yang dilakukan adalah uji homogenitas menggunakan uji *levene* ragam data atau statistik. Hasil uji homogenitas dikatakan homogen apabila nilai *levene statistic*  $> 0,05$  atau nilai sig.  $> 0,05$ . Dari hasil data Tabel 10 dikatakan homogen karena diperoleh nilai *levene statistic* sebesar 0,256 dan nilai sig. 0,856, dengan demikian dapat dilanjutkan uji ANOVA karena syarat sudah terpenuhi.

Data yang didapatkan dari hasil analisis menggunakan uji *One Way ANOVA* bertujuan untuk mengetahui ada tidaknya perbedaan yang signifikan antara sifat pelarut pada ekstrak etanol dan fraksi bunga cengkeh dengan kadar total flavonoid. Hipotesis awal ( $H_0$ ) yang digunakan dalam pengujian ini adalah tidak terdapat pengaruh yang signifikan antara sifat pelarut pada ekstrak etanol dan fraksi bunga cengkeh dengan kadar total flavonoid. Hipotesis alternatif ( $H_1$ ) yang digunakan adalah adanya pengaruh yang signifikan antara sifat pelarut pada ekstrak etanol dan fraksi bunga cengkeh dengan kadar total flavonoid. Dasar pengambilan keputusan berdasarkan hipotesis yang diajukan adalah dengan menggunakan nilai signifikansi (*p-value*), di mana jika probabilitas atau signifikansi  $> 0,05$ ; maka  $H_0$  diterima,  $H_1$  ditolak, sedangkan apabila probabilitas atau signifikansi  $< 0,05$ ; maka  $H_0$  ditolak,  $H_1$  diterima.

Hasil analisis uji *One-Way ANOVA* tersebut diperoleh nilai signifikansi atau Sig. 0,000 maka  $H_0$  ditolak dan  $H_1$  diterima artinya adanya pengaruh yang signifikan antara sifat pelarut pada ekstrak etanol dan fraksi bunga cengkeh dengan kadar total flavonoid, dan dapat dikatakan bahwa terdapat perbedaan yang bermakna (signifikan). Uji lanjutan yang dilakukan dengan *Post Hoc Test* (Uji t setelah anova) menggunakan uji *Tukey test*, untuk membandingkan kelompok manakah yang berbeda atau pengaruh yang berbeda antara sifat pelarut pada ekstrak etanol dan fraksi bunga cengkeh terhadap kadar total flavonoid.

Tabel 12. Hasil Uji Statistik Data Kadar Flavonoid Total.

| Kelompok                     | Distribusi data | Uji Homogenitas varian | One Way ANOVA    | Post Hoc Test |
|------------------------------|-----------------|------------------------|------------------|---------------|
| Ekstrak etanol bunga cengkeh | N<br>(p: 0,149) | H<br>(p: 0,356)        | BB<br>(p: 0,000) | 2,250*        |
| Fraksi Air                   | N<br>(p: 0,236) |                        |                  | 6,137*        |
| Fraksi etil asetat           | N<br>(p: 0,451) |                        |                  | 7,818*        |
| Fraksi n-heksan              | N<br>(p: 0,850) |                        |                  | 10,458*       |

Keterangan:

N : Data normal

H : Varians data homogen

BB : Semua kelompok berbeda bermakna

(\*) : Terdapat perbedaan yang signifikan antar kelompok

Hasil yang didapatkan adalah adanya pengaruh yang signifikan antara sifat pelarut pada ekstrak etanol dan fraksi bunga cengkeh dengan kadar total flavonoid, maka dilakukan uji lanjutan untuk mengetahui apakah adanya perbedaan yang lebih spesifik antara sifat pelarut pada ekstrak etanol dan fraksi bunga cengkeh dengan kadar total flavonoid. Metode yang digunakan adalah *Post Hoc Test* sebagai uji pembandingan ganda (*Multiple Comparison*) menggunakan uji *Tukey*. Ringkasan uji *Tukey* dapat dilihat pada lampiran 15.

Hasil uji *post hoc test* apabila diperoleh nilai yang berada pada kolom subset yang berbeda maka setiap perlakuan diartikan memiliki efek yang berbeda atau berbeda bermakna (signifikan), sedangkan jika hasil yang didapatkan pada kolom *subset* yang sama maka artinya dua kelompok perlakuan tersebut memiliki efek yang sama. Dapat dilihat pada Lampiran 15 dibagian uji *Post Hoc Test* terlihat bahwa dari setiap sampel terletak pada kolom *subset* yang berbeda sehingga dapat dikatakan bahwa memiliki efek yang berbeda atau artinya berbeda bermakna (signifikan).

## B. Pembahasan

Pada penelitian ini, diperoleh kadar flavonoid total secara berurutan adalah ekstrak etanol bunga cengkeh (EEBC)  $7,818\% \pm 0,270$ ; fraksi etil asetat  $10,458\% \pm 0,516$ ; fraksi air  $6,137\% \pm 0,427$ ; dan fraksi n-heksan  $2,251\% \pm 0,239$ . Dari hasil tersebut yang menggunakan pelarut etil asetat menunjukkan hasil yang lebih besar daripada pelarut lainnya, karena secara teori senyawa flavonoid yang akan bereaksi dengan  $AlCl_3$  adalah flavonoid yang terhidrolisis dengan sifat semipolar (Manik *et al.*, 2014). Prinsip dari penetapan kadar flavonoid dengan penambahan aluunium klorida ( $AlCl_3$ ) atau aluminium klorida adalah terjadinya pembentukan kompleks stabil tahan asam dengan adanya gugus hidroksil (-OH) pada posisi atom C nomor 5 atau 3 dan gugus keto pada posisi atom C nomor 4 (Chang *et al.*, 2002). Senyawa yang digunakan sebagai standar pada penelitian ini adalah kuersetin, karena pada penelitian penetapan kadar flavonoid daun cengkeh yang dilakukan oleh (Wahyulianingsih *et al.*, 2010) mengatakan bahwa untuk analisis flavonoid menggunakan metode spektrofotometri UV-Vis yang dihitung sebagai rutin menghasilkan parameter yang baik. Digunakan rutin karena kebanyakan flavonoid paling sering ditemukan dalam bentuk glikosida seperti kuersetin 3-rutinosida. Menurut literatur senyawa kuersetin ialah senyawa flavonoid golongan flavonol yang memiliki gugus keto pada atom C nomor 4 dan juga gugus hidroksil pada atom C nomor 3 dan 5 yang bertetangga dari senyawa flavonoid yaitu golongan flavon dan flavonon (Azizah *et al.*, 2014).

Hal ini sesuai dengan penelitian yang dilakukan oleh (Ramadhani *et al.*, 2020) yang menyatakan bahwa fraksi etil asetat daun cengkeh (*Syzygium aromaticum*) merupakan fraksi yang paling berpotensi sebagai aktivitas antibakteri. Aktivitas antibakteri berperan penting dengan adanya kandungan flavonoid, karena kandungan flavonoid total yang lebih besar akan mempunyai efek aktivitas antibakteri yang lebih besar menurut hasil penelitian dari (Manik *et al.*, 2014). Prinsipnya senyawa polar akan larut dalam senyawa yang bersifat sama yaitu polar. Hal ini yang menyebabkan pelarut etil asetat yang bersifat semipolar lebih efektif menarik senyawa flavonoid yang bersifat semipolar. Pelarut polar (etanol dan air), semipolar (etil asetat), dan non polar (n-heksan) memiliki tingkat kepolaran yang

berbeda sehingga akan dapat melarutkan senyawa yang bersifat sama (Winahayu *et al.*, 2018). Senyawa flavonoid terbagi menjadi beberapa kelompok atau golongan, setiap kelompok atau golongan flavonoid memiliki tingkat kepolaran yang berbeda, biasanya bergantung dari jumlah dan posisi gugus hidroksil (-OH) dari setiap kelompok flavonoid sehingga hal tersebut akan mempengaruhi kelarutan flavonoid pada pelarut (Verdiana *et al.*, 2018).

Disisi lain menurut (Tensiska *et al.*, 2001) dalam penelitian (Dia *et al.*, 2015) berpendapat bahwa pelarut etil asetat lebih banyak mengandung senyawa isoflavon baik dalam bentuk nonpolar (aglikon) maupun isoflavon (glikon). Etil asetat merupakan senyawa yang bersifat semipolar dengan rumus  $\text{CH}_3\text{CH}_2\text{OC}(\text{O})\text{CH}_3$  sehingga diperkirakan dapat menarik senyawa kimia yang bersifat polar maupun nonpolar (Snyder *et al.*, 1997). Menurut (Harborne JB., 1987) dalam penelitian (Mangkasa *et al.*, 2018), etil asetat dapat melarutkan senyawa semipolar pada dinding sel seperti aglikon flavonoid. Aglikon flavonoid di dalam tumbuhan adalah polifenol (contoh: fenol). Fenol memiliki ciri yaitu cincin aromatik yang memiliki satu atau lebih gugus hidroksil (-OH).

Analisis kualitatif terhadap kandungan kuersetin pada ekstrak etanol bunga cengkeh (EEBC) dan 3 fraksi pelarut (Fraksi air, etil asetat dan n-heksan) menunjukkan adanya kandungan flavonoid yang paling optimal adalah pada fraksi etil asetat dari ekstrak etanol bunga cengkeh, diperoleh nilai  $R_f$  yang sebanding dengan standar kuersetin dan dapat dilihat terjadi pemisahan yang terputus putus pada jarak tempuh senyawa sehingga diperoleh beberapa bercak atau *spot*.

Hasil pengamatan pada Gambar 13 dapat dilihat bahwa diperoleh beberapa bercak atau noda dari setiap sampel yang menggunakan *eluen* atau fase gerak kloroform: metanol: asam asetat glasial (9: 1: 0,5 v/v/v) dengan pereaksi penyemprot  $\text{AlCl}_3$  dan dideteksi dibawah UV 254 nm dan 365 nm. Penggunaan pereaksi  $\text{AlCl}_3$  bertujuan untuk menampakkan bercak senyawa flavonoid yang lebih jelas atau intensif ditandai dengan diperolehnya bercak atau noda dengan warna kuning kehijauan, hal ini terjadi karena adanya pembentukan senyawa kompleks (Asmorowati & Lindawati, 2019). Pada ekstrak etanol bunga cengkeh (EEBC) terdapat 2 bercak, fraksi air 2 bercak, fraksi etil asetat 4 bercak dan fraksi etil asetat

tidak terdapat bercak atau noda. sedangkan pada senyawa pembanding kuersetin didapatkan 1 noda yang jelas.

Menurut (Lipsy, 2010) menyatakan bahwa nilai Rf dari sampel dapat dijadikan sebagai bukti dari hasil identifikasi suatu senyawa. Senyawa dengan nilai Rf yang sama atau mirip dengan standar kuersetin maka menunjukkan bahwa senyawa tersebut memiliki karakteristik yang sama. Nilai Rf dari kuersetin pada penelitian ini diperoleh sebesar 0,613. Dari keempat sampel yang memiliki Rf sama atau mirip dengan standar kuersetin adalah fraksi etil asetat sebesar 0,563 dan ekstrak etanol bunga cengkeh sebesar 0,325 yang berarti mendekati nilai Rf kuersetin, hal tersebut mengindikasikan bahwa fraksi etil asetat dan ekstrak etanol bunga cengkeh (EEBC) mengandung flavonoid yang lebih besar daripada fraksi air dan n-heksan.

Secara teori, n-heksan merupakan pelarut yang bersifat nonpolar dengan nilai polaritas ( $P'$ ) sebesar 0,1 dan hanya dapat mengekstrak senyawa kimia seperti minyak yang mudah menguap (*volatile*), lilin, dan lipid, sedangkan senyawa flavonoid yang dapat bereaksi dengan aluminium klorida ( $AlCl_3$ ) yaitu flavonoid terhidrolisis yang bersifat semipolar (Manik *et al.*, 2014). Senyawa flavonoid ada yang berupa aglikon dan glikosida. Aglikon flavonoid merupakan senyawa flavonoid tanpa adanya ikatan gula, yang terbagi dalam beberapa golongan dengan struktur dasar seperti flavon, flavonol, dan isoflavone. Menurut penelitian (Widiyanto, 2007) menyatakan bahwa senyawa aglikon yang sifatnya kurang polar dan biasanya cenderung lebih mudah larut dalam pelarut organik seperti eter, etil asetat dan kloroform. Sedangkan glikosida flavonoid merupakan flavonoid dimana aglikon berikatan dengan satu atau lebih gugus gula. Flavonoid glikosida terbagi menjadi 2 kelompok yaitu flavonoid-O-glikosida dan flavonoid-C-glikosida. Adanya ikatan gula pada senyawa flavonoid cenderung cukup larut dalam pelarut polar seperti metanol, air, aseton, etanol, dan butanol.

Pada penetapan kadar flavonoid dengan penambahan aluminium klorida ( $AlCl_3$ ) terjadinya kompleks antara aluminium klorida ( $AlCl_3$ ) dengan gugus keto dan gugus hidroksi (-OH) yang bertetangga dari golongan flavon dan flavonol (Azizah *et al.*, 2014). Senyawa flavon dan flavonol merupakan golongan aglikon flavonoid yang mudah larut dalam pelarut kurang polar atau bersifat semipolar

seperti etil asetat dan kloroform. Dari hasil penelitian fraksi etil asetat yang memperoleh kadar flavonoid yang paling tinggi daripada pelarut yang lainnya. Etil asetat merupakan suatu pelarut yang dapat melarutkan komponen lain yang bersifat polar ataupun nonpolar dan mampu melarutkan senyawa semipolar pada dinding sel seperti aglikon flavonoid. Berdasarkan hal tersebut dapat diiduga bahwa fraksi etil asetat dari ekstrak etanol bunga cengkeh (EEBC) terkandung senyawa flavonoid dari golongan flavon dan flavonol, yang termasuk golongan aglikon flavonoid dengan sifat yang kurang polar.

Hasil penelitian ini memberikan gambaran bahwa sifat pelarut dari ekstrak etanol bunga cengkeh (EEBC) dan 3 fraksi pelarut (fraksi air yang bersifat polar, fraksi etil asetat yang bersifat semipolar dan n-heksan yang bersifat nonpolar) dari ekstrak etanol bunga cengkeh dapat mempengaruhi hasil kadar flavonoid total. Perlu dilakukan penelusuran lebih lanjut untuk mengetahui efektifitas dari masing-masing sampel baik pada ekstrak ataupun fraksi dan dipastikan kembali bagaimana potensi dari senyawa flavonoid dari ekstrak etanol bunga cengkeh dan 3 fraksi pelarut lainnya serta perlu dilakukan identifikasi lebih kuat terkait setiap bercak atau *spot* KLT yang terbentuk dengan metode densitometer.