

BAB IV Hasil dan Pembahasan

A. Hasil

1. Determinasi Tanaman

Determinasi tanaman dilakukan di Laboratorium Pembelajaran Biologi, Fakultas Sains dan Teknologi Universitas Ahmad Dahlan Yogyakarta dengan nomor 263/Lab.Bio/B/IV/2025. Hasil determinasi pada **Lampiran 2** daun menyatakan bahwa daun yang digunakan dalam penelitian yaitu daun kelengkeng (*Dimocarpus longan L.*)

2. Persiapan Sampel

Sampel daun kelengkeng yang digunakan pada penelitian ini dapat dilihat pada **Tabel 2**.

Tabel 2. Hasil Sampel Daun Kelengkeng

Berat Daun Segar (kg)	Berat Daun Kering (kg)	Berat Serbuk (kg)
5,7	3,5	2,7

3. Ekstraksi Sampel

Sebuk daun kelengkeng diekstraksi dengan pelarut etanol 96% menggunakan sonikator dengan perbedaan suhu 40°C, 50°C, dan 60°C, dengan rasio 1:10 dan disonikasi selama 20 menit. Masing-masing suhu sebanyak 3 *batch* kemudian filtrat yang dihasilkan dihitung nilai randemennya. Hasil randemen dapat dilihat pada **Tabel 3 dan Lampiran 5**.

Tabel 3. Hasil Rendemen Ekstrak Daun Kelengkeng

Suhu	% Rendemen Ekstrak	Farmakope Herbal Indonesia (2017)
40°C	8,11	>10 %
50°C	7,94	
60°C	7,01	

4. Uji organoleptik

Uji organoleptik yaitu warna, bentuk, dan bau. Hasil pengamatan ini dapat dideskripsikan berdasarkan **Tabel 4**.

Tabel 4. Pengamatan Organoleptik

Parameter	Suhu 40°C	Suhu 50°C	Suhu 60°C	Trisnaputri, (2023)
Bentuk	Kental	Kental	Kental	Kental
Aroma	Khas	Khas	Khas	Khas
Warna	Hijau Pekat Kehitaman	Hijau Pekat Kehitaman	Hijau Pekat Kehitaman	Hijau Pekat

5. Uji kadar air ekstrak

Hasil uji kadar air ekstrak daun kelengkeng dengan variasi suhu 40°C, 50°C dan 60°C dapat dilihat pada **Tabel 5 dan Lampiran 7**.

Tabel 5. Kadar Air Ekstrak Daun Kelengkeng

Suhu	Kadar air Ekstrak	Syarat Kadar Air FHI (2017)
40°C	3.56	<10%
50°C	5.88	
60°C	4.01	

6. Penapisan fitokimia

Hasil pengujian fitokimia ekstrak daun kelengkeng dengan perbedaan suhu 40°C, 50°C, dan 60°C dapat dilihat pada **Tabel 6 dan Lampiran 6**.

Tabel 6. Penapisan Fitokimia Ekstrak Daun Kelengkeng

Identifikasi	Sampel			Sampel Daun kelengkeng Teoritis (Rusli, 2022)
	Suhu 40°C	Suhu 50°C	Suhu 60°C	
Alkaloid	Wagner	-	-	-
	Mayer	-	-	-
	dragendroff	-	-	-
Flavonoid	++	+++	+	+++
Saponin	+++	+++	+++	+++
Tanin	+++	+++	+++	+++
Steroid	+++	+++	+++	+++

Keterangan : (+) positif: mengandung golongan senyawa
(-) negatif: tidak mengandung golongan senyawa

7. Uji Kromatografi Lapis Tipis (KLT)

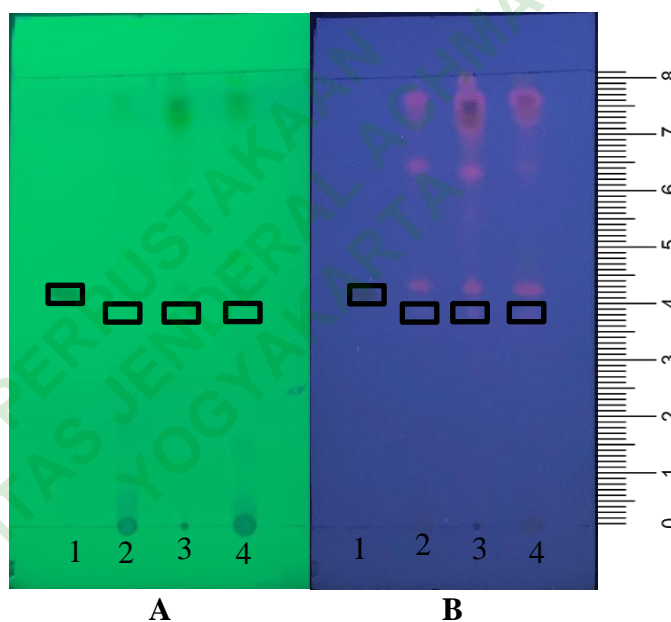
Uji KLT sebagai identifikasi keberadaan senyawa flavonoid dalam daun kelengkeng. Pada optimasi fase gerak yang dilakukan dapat dilihat pada **Tabel 7**.

Tabel 7. Hasil Optimasi Fase Gerak Pada KLT Uji Senyawa Flavonoid

Percobaan	Fase gerak	Hasil
1.	Toluen : etil asetat : akuades 5:4:1	Tidak terelusi dengan baik
2.	Toluen : etil asetat : asam format 5:4:1	Terelusi dan terjadi pemisahan yang baik pada standar dan sampel.

Fase gerak (eluen) yang digunakan pada penelitian ini terdiri dari campuran toluen, etil asetat, dan asam format dengan perbandingan 5:4:1 (v/v/v), berdasarkan **Tabel 7** fase gerak tersebut adalah fase gerak yang paling optimal karena baik sampel maupun standar dapat terelusi dengan baik serta hasil pemisahan yang jelas sehingga mudah diidentifikasi. Fase diam yang digunakan adalah *silika gel 60 F₂₅₄*.

Hasil pemisahan dilihat dari sinar UV pada dua panjang gelombang berbeda, yaitu 254 nm dan 365 nm. Bercak yang terlihat pada **Gambar 9** selanjutnya dihitung nilai *R_f* yang dapat dilihat pada **Tabel 8** dan **Lampiran 8**.



Gambar 9. KLT Ekstrak Daun Kelengkeng (*Dimocarpus longan* L.)

Keterangan: A. Deteksi dengan sinar UV 365 nm B. Deteksi dengan sinar UV 254 nm.
(1) Kuesetin; (2) Ekstrak Etanol 96% suhu 40°C; (3) ekstrak Etanol 96% suhu 50°C, (4) Ekstrak Etanol 96% suhu 60°C. Fase diam = silika gel F₂₅₄ ; fase gerak = Toluene : etil asetat : Asam Format (5:4:1).

Tabel 8. Nilai *R_f* Standar Dan Ekstrak Daun Kelengkeng

Standar Kuesetin	Ekstrak Daun Kelengkeng			Salamah (2015)
	40°C	50°C	60°C	
0,54	0,5	0,5	0,5	0,44

8. Penetapan Kadar Flavonoid

a. Penentuan panjang gelombang maksimum kuersetin

Scanning panjang gelombang kuersetin menggunakan konsentrasi 80 ppm pada rentang panjang gelombang 350-450 nm, sehingga diperoleh panjang gelombang maksimum pada 415 nm (**Lampiran 9**).

b. Penentuan *operating time* (OT)

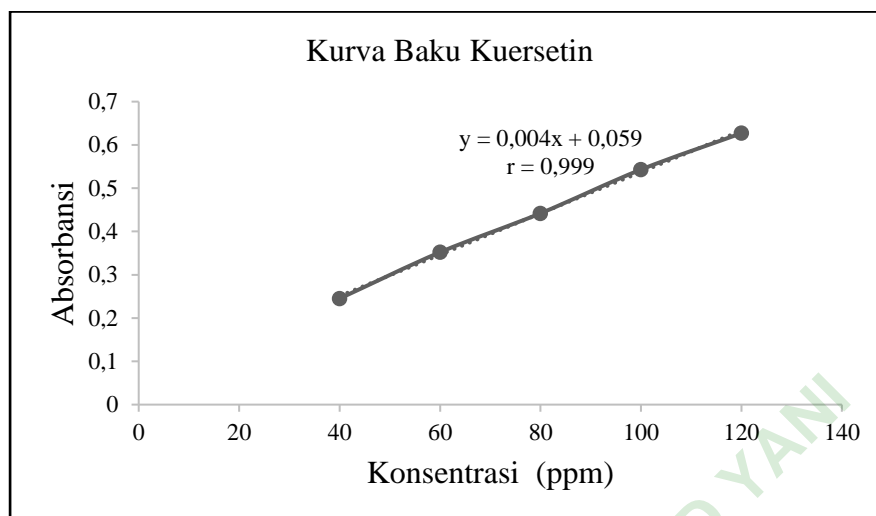
Operating time pada larutan pembanding kuersetin ditentukan menggunakan konsentrasi 80 ppm dengan panjang gelombang 415 nm. *Operating time* dilakukan selama 45 menit dengan jarak pengukuran setiap 1 menit. Hasil *operating time* yang stabil dimulai pada menit ke-33 hingga menit ke-41 sehingga waktu inkubasi yang digunakan untuk penelitian yakni 33 menit (**Lampiran 9**).

c. Kurva baku kuersetin

Kurva baku kuersetin ditentukan dengan mengukur absorbansi seri konsentrasi standar, yaitu 40, 60, 80, 100, dan 120 ppm pada panjang gelombang 415 nm dengan blangko metanol *p.a.* Hasil kurva kalibrasi kuersetin dapat dilihat pada tabel **Tabel 9** dan **Gambar 10**.

Tabel 9. Absorbansi Kurva Baku kuersetin

Konsentrasi (ppm)	Absorbansi Kuersetin (Rata-rata \pm SD)
40	0.245 \pm 0.001
60	0.352 \pm 0.002
80	0.442 \pm 0.002
100	0.543 \pm 0.007
120	0.627 \pm 0.054



Gambar 10. Kurva Baku Kuersetin

d. Penentuan Kadar Flavonoid Total

Berdasarkan kurva kalibrasi pada **Gambar 9**, hubungan linier antara konsentrasi standar kuersetin dan absorbansi yang tercatat dijelaskan oleh persamaan $y = 0,0047x + 0,0598$, dengan nilai koefisien korelasi (r) sebesar 0,9992. Persamaan ini digunakan untuk menghitung jumlah total senyawa flavonoid dalam ekstrak daun kelengkeng dengan variasi suhu 40°C, 50°C dan 60°C. Hasil kadar flavonoid total yang diperoleh dalam ekstrak daun kelengkeng dapat dilihat pada **Tabel 10 dan Lampiran 10**.

Tabel 10. Kadar Flavonoid Total Ekstrak Daun Kelengkeng

Suhu	Replikasi	Kadar Flavonoid Total (mg QE/g ekstrak)	Kadar Flavonoid Total (Rata-Rata ± SD (mg QE/g ekstrak))
40°C	1	91,5	92 ± 1,323
	2	93,5	
	3	91	
50°C	1	122	118,75 ± 3,132
	2	118,5	
	3	115,75	
60°	1	66,25	66 ± 1,639
	2	67,5	
	3	64,25	

e. Analisis Data Kadar Flavonoid Total

Analisis data pada penelitian ini menggunakan *software* SPSS. Hasil uji homogenitas, uji normalitas dan uji *One Way* ANOVA dapat dilihat pada **Tabel**

11 dan Lampiran 12.

Tabel 11. Uji Normalitas, Uji Homogenitas dan Uji *One Way* ANOVA

Suhu	Uji Normalitas	Uji Homogenitas	Uji <i>One Way</i> ANOVA
40°C	0,314 ^a		
50°C	0,240 ^a	0,363 ^b	0,000 ^c
60°C	0,227 ^a		

Keterangan: ^(a) Data terdistribusi normal ($p > 0,05$)

^(b) Data antar kelompok homogen ($p > 0,05$)

^(c) Terdapat perbedaan signifikan ($p < 0,05$)

9. Penetapan kadar fenolik

a. Penentuan Panjang gelombang maksimum asam galat

Scanning dilakukan dengan menggunakan larutan pembanding asam galat pada konsentrasi 300 ppm. Dilakukan pemindaian pada rentang panjang gelombang 600-800 nm dan hasilnya menunjukkan bahwa panjang gelombang serapan maksimum asam berada galat pada 764 nm, dapat dilihat pada **Lampiran 9**.

b. Penentuan *operating time* (OT)

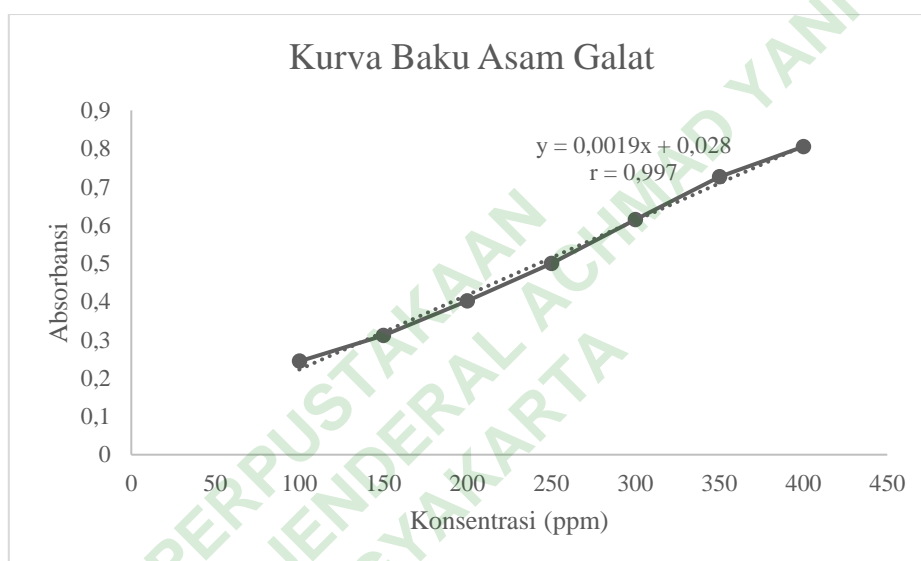
Operating time dapat dilihat berdasarkan nilai absorbansi yang stabil pada panjang gelombang yang telah ditentukan sebelumnya dengan menggunakan larutan stok 300 ppm. *Operating time* ditentukan selama 2 jam, dengan interval pengukuran setiap 1 menit. Hasil *operating time* dimulai pada 1 jam 38 hingga 1 jam 48 sehingga waktu inkubasi yang digunakan untuk penelitian yakni 1 jam 38 menit (**Lampiran 9**).

c. Kurva baku asam galat

Kurva baku asam galat dengan menggunakan serangkaian konsentrasi standart, yakni 100, 150, 200, 250, 300, 350 dan 400 ppm yang diukur pada Panjang gelombang 764 nm. Blangko yang digunakan adalah metanol *p.a*. Hasil kurva baku asam galat dapat dilihat pada **Tabel 12** dan **Gambar 11** berikut:

Tabel 12. Absorbansi Kurva Baku Asam Galat

Konsentrasi (ppm)	Absorbansi Asam Galat (Rata-Rata ± SD)
100	0,244 ± 0,003
150	0,311 ± 0,006
200	0,402 ± 0,008
250	0,500 ± 0,007
300	0,614 ± 0,008
350	0,726 ± 0,005
400	0,802 ± 0,005

**Gambar 11. Kurva Baku Asam Galat**

d. Penentuan Kadar Fenolik Total

Berdasarkan kurva kalibrasi pada **Gambar 11**, hubungan linier antara konsentrasi standar asam galat dan absorbansi yang tercatat dijelaskan oleh persamaan $y = 0,0019x + 0,028$, dengan nilai koefisien korelasi (r) yang diperoleh adalah 0,997. Persamaan ini digunakan untuk menghitung jumlah total senyawa fenolik dalam ekstrak daun kelengkeng dengan variasi suhu 40°C, 50°C, dan 60°C. Hasil kadar fenolik total yang diperoleh dalam ekstrak etanol daun kelengkeng dapat dilihat pada **Tabel 13**.

Tabel 13. Kadar Fenolik Total Ekstrak Daun Kelengkeng

Suhu	Replikasi	Kadar Fenolik Total (mg GAE/g ekstrak)	Kadar Fenolik Total (Rata-Rata ± SD (mg GAE/g ekstrak))
40°C	1	102,27	102,01 ± 0,402
	2	102,10	
	3	101,58	

Suhu	Replikasi	Kadar Fenolik Total (mg GAE/g ekstrak)	Kadar Fenolik Total (Rata-Rata ± SD (mg GAE/g ekstrak))
50°C	1	141,58	141,84± 0,696
	2	141,31	
	3	142,63	
60°C	1	80	80,79±0.949
	2	80,56	
	3	80,84	

e. Analisis Data Kadar Fenolik Total

Analisis data pada penelitian ini menggunakan *software* SPSS. Hasil uji homogenitas, uji normalitas dan uji *One Way* ANOVA dapat dilihat pada **Tabel 14** dan **Lampiran 12**

Tabel 14. Uji Normalitas, Uji Homogenitas dan Uji *One Way* ANOVA

Suhu	Uji Normalitas	Uji Homogenitas	Uji <i>One Way</i> ANOVA
40°C	0,637 ^a	0,434 ^b	0,000 ^c
50°C	0,363 ^a		
60°C	0,807 ^a		

Keterangan: ^(a) Data terdistribusi normal ($p > 0,05$)

^(b) Data antar kelompok homogen ($p > 0,05$)

^(c) Terdapat perbedaan signifikan ($p < 0,05$)

B. Pembahasan

Penelitian ini bertujuan untuk mengetahui pengaruh variasi suhu ekstraksi dengan menggunakan *Ultrasound-Assisted Extraction* (UAE) terhadap kadar fenolik dan flavonoid total dari daun kelengkeng (*Dimocarpus longan* L.). Daun kelengkeng yang digunakan pada penelitian ini diperoleh dan dipetik langsung dari Kebun Kelengkeng PWR (Wisata Petik Buah) di Ringroad Barat, Cibuk Kidul, Margoluwih, Kecamatan Sayegan, Kabupaten Sleman, Daerah Istimewa Yogyakarta. Daun kelengkeng dipanen pada pagi hari mulai pukul 07:00-10:00 WIB, untuk mendapatkan daun yang masih segar dengan tingkat zat aktif yang tinggi karena belum mengalami fotosintesis sehingga senyawa yang ditarik lebih optimal (Aulianshah *et al.*, 2024). Kriteria daun yang dipetik yaitu daun yang berwarna hijau tua pekat atau hijau tua sedikit kehitaman yang masih segar (Trisnaputri *et al.*, 2023). Daun kelengkeng kemudian disortasi basah untuk memastikan bahwa daun yang dipanen bersih dan bebas dari debu dan kotoran yang menempel pada permukaan daun, serta memisahkan bagian tanaman yang tidak digunakan seperti daun yang

rusak atau yang sudah menguning. Kemudian daun dikering anginkan untuk mengurangi kadar air setelah sortasi basah. Daun kelengkeng kemudian di oven pada suhu 50°C selama 3 hari, atau dengan parameter daun kelengkeng sudah berubah warna coklat dan hancur saat diremah (Utami *et al.*, 2015). Simplisia yang sudah dikeringkan kemudian diserbuk menggunakan *grinder* untuk memperkecil ukuran partikel dan dilakukan pengayakan dengan ayakan mesh 40 hingga diperoleh partikel yang lebih halus sehingga memudahkan sampel kontak dengan pelarut. Luas permukaan simplisia yang seragam dapat memudahkan sampel kontak dengan pelarut dan memberikan peluang yang lebih besar untuk mengekstraksi senyawa (Nurkhasanah *et al.*, 2024).

Proses ekstraksi pada penelitian ini mengacu pada prosedur yang dilakukan oleh Fikry *et al.*, (2024) dengan modifikasi pada pelarut dan waktu ekstraksi. Berdasarkan penelitian Kartika *et al.*, (2024) metode UAE merupakan metode yang paling optimal untuk ekstraksi senyawa metabolit sekunder dibandingkan metode konvensional maserasi. Hal ini dikarenakan pada metode UAE menggunakan gelombang ultrasonik yang memecah partikel dan menghancurkan dinding sel, meningkatkan penetrasi pelarut sehingga memudahkan pemisahan senyawa (Ananingsih *et al.*, 2020). Etanol 96% dipilih sebagai pelarut bersifat semi-polar yang efektif melarutkan senyawa fenolik dan flavonoid yang bersifat polar, maupun non polar mengekstrak senyawa bioaktif lebih optimal dibandingkan pelarut yang terlalu polar atau nonpolar (Pujiastuti & El'Zeba, 2021). Selain itu didukung oleh penelitian Ardiany & Sa'ad, (2024) yang menyatakan bahwa etanol 96% efektif dalam mengekstrak senyawa flavonoid pada sampel daun kelengkeng.

Pada penelitian ini menggunakan variasi suhu ekstraksi dengan metode UAE. Suhu memiliki peran yang penting dalam proses ekstraksi untuk memastikan ekstraksi berlangsung secara efisien, sehingga menjaga kestabilan senyawa aktif dan mengoptimalkan ekstraksi. Suhu yang terlalu rendah dapat menyebabkan ekstraksi kurang maksimal, hal ini disebabkan karena pada suhu rendah sampel belum melakukan kontak secara optimal dengan pelarut. Molekul pelarut tidak cukup berenergi untuk menembus dinding sel sampel, sehingga senyawa tidak sepenuhnya larut (Leksono *et al.*, 2017). Akibatnya, proses pelepasan senyawa aktif dari sampel

ke dalam pelarut kurang maksimal (Sekarsari *et al.*, 2019). Sedangkan suhu yang terlalu tinggi dapat menyebabkan degradasi atau kerusakan senyawa bioaktif seperti flavonoid dan fenolik (Susiloningrum & Sari, 2023). Pemilihan suhu ekstraksi 40°C, 50°C dan 60°C didasarkan pada hasil penelitian Fikry *et al.*, (2024) menyatakan bahwa variasi suhu ekstraksi (40°C, 50°C dan 60°C) berpengaruh terhadap kadar fenolik dan flavonoid biji kelengkeng. Pemilihan waktu ekstraksi didasarkan pada penelitian Rusli *et al.*, (2022) yang menyatakan waktu 20 menit efektif untuk mengekstraksi senyawa flavonoid dari daun kelengkeng dengan metode MAE. Hal ini didukung juga oleh penelitian Sekarsari *et al.*, (2019) yang menyatakan bahwa waktu ekstraksi 20 menit menghasilkan kadar flavonoid total tertinggi pada sampel daun jambu biji.

Proses pengentalan ekstrak menggunakan suhu yang sama pada proses ekstraksi. Hal ini bertujuan untuk mengontrol pengaruh suhu ekstraksi terhadap kadar fenolik dan flavonoid total. Setelah didapatkan ekstrak kental, lalu dihitung nilai rendemen. Nilai rendemen adalah jumlah ekstrak yang didapat dari proses ekstraksi tanaman dan dinyatakan dalam bentuk persen (%). Semakin tinggi persen rendemen maka semakin banyak senyawa aktif yang terdapat pada sampel. (Tutik *et al.*, 2022). Dikatakan memenuhi syarat jika nilai rendemen lebih dari 10% (FHI., 2017). Nilai persen rendemen yang diperoleh pada suhu 40°C sebesar 8,11% yang memiliki selisih tidak jauh pada suhu 50°C sebesar 7,94%. Hal ini dikarenakan pada proses pengambilan hasil ekstrak setelah penguapan tidak dilakukan secara maksimal. Dimana pada sampel suhu 40°C hasil ekstraksi semua diambil dan hampir tidak ada sisa pada wadah penguapan, sedangkan pada suhu 50°C hasil ekstraksi tidak diambil secara maksimal, sehingga masih meninggalkan banyak sisa pada wadah penguapan. Sedangkan nilai % rendemen pada suhu 60°C memiliki nilai yang lebih kecil yakni sebesar 7,08%. Nilai % rendemen pada penelitian ini tidak memenuhi syarat karena suhu yang terlalu tinggi menyebabkan penurunan rendemen akibat degradasi, sehingga senyawa aktif banyak yang hilang (Susiloningrum & Sari, 2023). Selain itu, waktu ekstraksi juga mempengaruhi nilai rendemen. Durasi ekstraksi yang singkat menyebabkan kontak antara sampel dengan pelarut menjadi kurang optimal. Saat pelarut dikenai gelombang ultrasonik dalam durasi singkat, hanya sedikit sel yang

pecah. Akibatnya jumlah senyawa yang terekstraksi dari matriks sel oleh pelarut pun terbatas, namun massa ekstrak tetap tinggi karena hampir tidak ada pelarut yang menguap (Kristina *et al.*, 2022). Selain itu, tidak adanya remaserasi, juga berpengaruh terhadap nilai % rendemen karena memungkinkan masih tersisa senyawa aktif yang belum terambil selama proses ekstraksi (Pujiastuti & El'Zeba, 2021) . Kemudian dilakukan penetapan kadar air menggunakan *Moisture Balance*. Penetapan kadar air bertujuan mencegah reaksi hidrolisis atau penguraian oleh enzim yang dapat mengubah spesifikasi bahan, menurunkan kualitas produk, serta mencegah pertumbuhan bakteri dan jamur (Susiloningrum & Sari, 2023). Berdasarkan **Tabel 5** kadar air ekstrak daun kelengkeng yang diperoleh pada suhu 40°C lebih rendah dibandingkan suhu 50°C dan 60°C, sedangkan pada suhu 50°C lebih tinggi dibandingkan suhu 60°C namun dari ketiga yang diperoleh masih memenuhi syarat kadar air yang telah ditetapkan yaitu <10% (Kemenkes 2017).

Hasil pengamatan organoleptik pada ekstrak daun kelengkeng pada penelitian memiliki karakteristik yang serupa dengan penelitian yang dilakukan oleh Trisnaputri *et al.*, (2023), yakni kental, memiliki aroma yang khas dan berwarna hijau pekat kehitaman. Tahap selanjutnya dilakukan skrining fitokimia yang bertujuan untuk memberikan gambaran tentang golongan senyawa yang terkandung dalam tanaman yang sedang diteliti (Susanti *et al.*, 2016). Pada penelitian ini, skrining fitokimia ekstrak daun kelengkeng melibatkan pengujian terhadap beberapa jenis senyawa utama diantaranya alkaloid, tanin, flavonoid, steroid dan saponin. Berdasarkan hasil uji skrining fitokimia **Tabel 6** dan **Lampiran 7** ekstrak ini mengandung senyawa flavonoid, saponin, tanin dan steroid, penemuan ini sejalan dengan yang dilakukan oleh (Rusli *et al.*, 2022). Uji terhadap senyawa alkaloid menunjukkan hasil negatif karena tidak terbentuk endapan ketika ditambahkan pereaksi *mayer*, *wagner* dan *dragendroff*. Jika senyawa alkaloid tidak terdeteksi dalam penelitian ini, kemungkinan besar disebabkan oleh pembentukan kompleks kalium alkaloid yang tidak mencapai batas kejenuhan, sehingga tidak membentuk endapan. Selain itu, kandungan alkaloid yang rendah dalam ekstrak dapat menyebabkan senyawa tersebut tidak terekstraksi dengan sempurna selama proses ekstraksi (Minarno, 2015).

Berdasarkan **Tabel 6** dan reaksi yang ditunjukkan pada **Gambar 12**, pada uji flavonoid dengan penambahan HCl pekat dan serbuk Mg menunjukkan adanya warna jingga karena setelah direduksi dengan HCL pekat dan serbuk Mg, yang menghasilkan kompleks senyawa yang menandakan positif senyawa flavonoid golongan flavon yang ditandai adanya perubahan warna jingga (Ardiany & Sa'ad, 2024). Pada penelitian ini memiliki perbedaan warna hasil, antara ekstrak suhu 40°C, 50°C dan 60°C. Suhu 50°C memiliki intensitas warna yang lebih pekat dibandingkan dengan suhu 40°C dan 60°C (**Lampiran 7**). Hal ini mengidentifikasi bahwa suhu berpengaruh terhadap hasil intensitas warna yang terbentuk, memungkinkan bahwa kandungan flavonoid pada suhu 50°C lebih tinggi dibandingkan suhu 40°C dan 60°C karena pada suhu 50°C memiliki intensitas warna lebih pekat.

Uji saponin menunjukkan hasil positif karena terbentuknya busa stabil pada masing-masing suhu. Secara kimiawi, saponin memiliki gugus hidrofilik (menyukai air) dan gugus hidrofobik (menyukai udara). Ketika larutan yang mengandung saponin dikocok, gugus hidrofilik berikatan dengan air sedangkan gugus hidrofobik berikatan dengan udara, membentuk struktur seperti misel yang menyebabkan terbentuknya busa stabil (Soetjipto *et al.*, 2019).

Pada pengujian tanin menggunakan larutan FeCl₃ 3%, ekstrak yang diekstraksi dengan suhu 40°C, 50°C dan 60°C menunjukkan hasil positif ditandai dengan perubahan warna menjadi biru kehitaman hingga hitam pekat. Perubahan warna ini mengidentifikasikan adanya tanin terhidrolisis. Warna biru kehitaman merupakan kompleks yang khas terbentuk antara ion Fe³⁺ dengan tanin hidrolisis seperti gallotanin atau ellagitannin (Hersila *et al.*, 2023). Ketika ekstrak yang mengandung tanin ditambahkan larutan FeCl₃ 3%, terjadi reaksi pembentukan kompleks antara ion Fe³⁺ dengan gugus hidroksil (OH) fenolik yang banyak terdapat pada struktur tanin. Interaksi ini membentuk senyawa kompleks berwarna gelap, berupa warna biru kehitaman sampai hitam pekat, yang merupakan tanda positif keberadaan tannin (Hersila *et al.*, 2023).

Uji steroid pada penelitian ini menggunakan metode *Lieberman-buchard* untuk mendeteksi steroid melibatkan pelarut ekstrak dalam kloroform, lalu penambahan reagen *lieberman-buchard* yang menghasilkan perubahan warna yang khas sebagai

indikasi keberadaan steroid (Nurcholis *et al.*, 2022). Pada Fitokimia meliputi uji saponin, uji tanin dan uji steroid, variasi suhu tidak mempengaruhi hasil intensitas warna. Sedangkan pada hasil uji flavonoid suhu mempengaruhi intensitas warna yang dihasilkan.

Analisis kualitatif senyawa flavonoid ekstrak daun kelengkeng dilakukan dengan metode KLT. Metode Kromatografi Lapis Tipis adalah Teknik mengidentifikasi senyawa kimia yang ada dalam sampel. Pada KLT senyawa yang diidentifikasi berdasarkan nilai R_f dan pola bercak. Pada pengujian ini dilakukan optimasi untuk mendapatkan fase gerak yang baik dalam mengelusi senyawa flavonoid. Kedua jenis campuran fase gerak pada **Tabel 7** dalam penelitian ini dipilih berdasarkan proses optimasi yakni campuran fase gerak yang terdiri dari toluen, etil asetat dan asam format dengan perbandingan 5:4:1 (v/v/v). Tujuannya adalah untuk memisahkan komponen-komponen dalam campuran berdasarkan polaritasnya, dimana toluen bersifat non polar, etil asetat bersifat semi polar dan asam format bersifat polar (Salamah & Widyasari, 2015). *Silika gel* 60F₂₅₄ digunakan sebagai fase diam yang memiliki sifat polar. Sebelum digunakan *Silika gel* 60F₂₅₄ dipanaskan dalam oven pada suhu 105°C selama 10 menit untuk mengurangi kelembapan dari plat, sehingga proses absorpsi pada fase diam dapat berlangsung secara maksimal. Berdasarkan **Gambar 9**, menunjukkan hasil yang didapatkan berupa bercak warna kuning kecoklatan pada standar kuersetin dan warna kuning kehijauan pudar pada ekstrak daun kelengkeng dengan variasi suhu 40°C, 50°C dan 60°C, akan tampak sebagai bercak gelap akibat peredaman fluoresensi ketika diamati di bawah sinar UV 254 nm, Sementara itu, warna kuning tersebut baru muncul sebagai fluoresensi yang jelas dan bercahaya saat pengamatan dilakukan di bawah sinar UV 366 nm (Yumita, 2023), Bercak kuning kehijauan yang teridentifikasi, memungkinkan adanya senyawa flavonoid. Berdasarkan penelitian Salamah & Widyasari (2015) menyatakan bahwa bercak yang berwarna kuning kecokelatan yang dilihat pada sinar UV 254 nm setelah proses pemisahan KLT dan sejajar dengan kuersetin merupakan indikasi positif terhadap keberadaan flavonoid, Sedangkan bercak yang muncul pada (**Gambar 9**) setelah bercak kuersetin, menandakan adanya senyawa lain yang berinteraksi dengan sinar UV, seperti senyawa fenolik atau senyawa volatil lainnya

yang ada dalam sampel daun kelengkeng. Kehadiran bercak ungu ini menunjukkan bahwa sampel tidak hanya mengandung flavonoid, tetapi juga berbagai metabolit sekunder lain yang dapat memberikan warna fluoresensi berbeda saat diperiksa dengan sinar UV 366. Selain itu, bercak ungu pada KLT di bawah UV 366 nm juga menunjukkan adanya kemungkinan noda dari senyawa volatil atau sejumlah senyawa lain yang mudah menguap dan bereaksi saat terkena sinar UV, sehingga tercipta warna fluoresensi ungu (Yumita, 2023).

Hasil pengamatan KLT, menunjukkan bahwa ekstrak daun kelengkeng suhu 40°C, 50°C dan 60°C mengandung senyawa flavonoid. Berdasarkan **Tabel 8**, nilai *R_f* sampel dari variasi suhu 40°C, 50°C dan 60°C ekstrak daun kelengkeng hampir sejajar dengan *R_f* standar kuersetin yakni 0,54, sedangkan nilai *R_f* kuersetin sebesar 0,5. Berdasarkan nilai *R_f* sampel pada penelitian ini dikatakan positif mengandung kuersetin karena selisih antara nilai *R_f* sampel dengan nilai *R_f* kuersetin sebagai pembanding yaitu $\leq 0,05$. Nilai *R_f* yang diperoleh berbeda dengan penelitian yang dilakukan Salamah & Widyasari, (2015) hal ini dipengaruhi oleh beberapa faktor seperti metode ekstraksi yang digunakan, teknik pelaksanaan, jenis dan kualitas plat kromatografi, meskipun menggunakan sampel dan standar yang sama.

Pada penelitian ini, pengamatan senyawa flavonoid pada KLT dilakukan menggunakan lampu UV pada panjang gelombang 254 nm dan 366 nm pada (**Gambar 9**). Hasilnya menunjukkan bahwa pada UV 254 nm bercak flavonoid tampak sebagai daerah gelap pada latar terang, sedangkan pada UV 366 nm bercak memberikan fluoresensi berwarna kuning kehijauan. Temuan ini sesuai dengan teori yang dilaporkan Karima (2019), yang menjelaskan bahwa perbedaan tampilan bercak disebabkan oleh mekanisme penyerapan dan fluoresensi senyawa flavonoid pada kedua panjang gelombang tersebut.

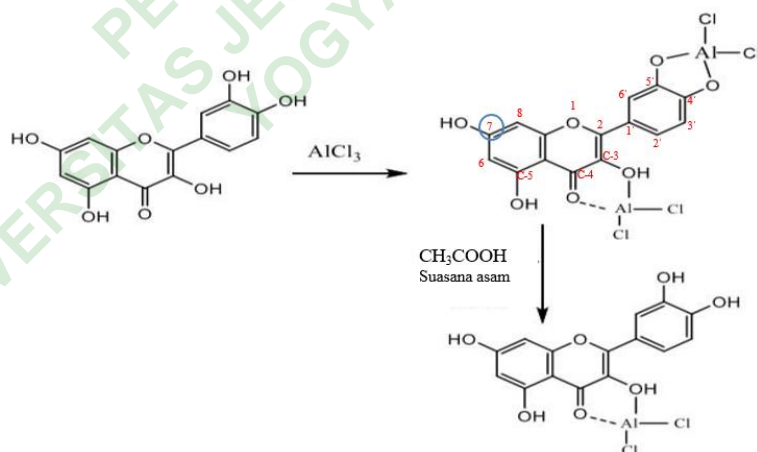
Pada penelitian ini, dilakukan uji kuantitatif berupa penetapan kadar fenolik dan flavonoid total pada ekstrak daun kelengkeng yang merujuk pada prosedur (Nurhasanah *et al.*, 2024) yaitu dengan menggunakan metode *Follin Ciocalteu* untuk penetapan kadar fenolik total dan metode kolorimetri untuk penetapan kadar flavonoid total. Metode *Follin Ciocalteu* adalah metode yang paling banyak digunakan dalam menentukan kandungan senyawa fenolik total dalam tanaman

dengan pertimbangan bahwa metode ini lebih sederhana pengerjaannya. Reagen *Follin Ciocalteu* digunakan karena senyawa fenolik total dapat bereaksi dengan *Follin Ciocalteu*. Reagen *Follin-Ciocalteu* mengandung dua komponen utama, yaitu asam fosfomolibdat dan asam fosfotungstat, yang sebagai oksidator dalam reaksi penentuan senyawa fenolik dalam sampel (Nofita *et al.*, 2020). Prinsip metode *Follin-Ciocalteu* yaitu senyawa fenolik akan mengalami oksidasi oleh reagen *Follin-ciocalteu*, sehingga terbentuk larutan yang berwarna biru. Warna biru ini timbul karena senyawa fenolik berinteraksi dengan reagen tersebut sehingga dapat diukur menggunakan spektrofotometer (Ulfa *et al.*, 2024).

Pada penelitian ini digunakan standar asam galat sebagai pembanding karena termasuk dalam fenolik alami yang bersifat stabil dan memiliki reaktivitas tinggi terhadap reagen *Follin Ciocalteu*, sehingga menghasilkan data yang konsisten. Reaksi senyawa fenolik dilakukan dalam suasana basa supaya terjadi disosiasi proton menjadi ion fenolat, sehingga gugus hidroksilnya menjadi lebih reaktif dan mudah berinteraksi dengan reagen *Follin-ciocalteu*. Larutan basa yang digunakan dalam penetapan kadar fenolik yaitu larutan natrium karbonat (Na_2CO_3) (Furi *et al.*, 2024). Saat asam galat direaksikan dengan *Follin Ciocalteu* ditunggu selama 4-8 menit agar menghasilkan warna kuning yang menandakan bahwa sampel mengandung fenolik reaksi tersebut ditunggu selama 4 menit agar campuran tersebut bereaksi secara optimal (Ramadhan *et al.*, 2021). Setelah itu ditambahkan dengan larutan Na_2CO_3 sebagai pemberi suasana basa. Selama reaksi berlangsung, gugus hidroksil pada senyawa fenolik akan bereaksi dengan reagen *Follin Ciocalteu* yang membentuk kompleks molybdenum-tungsten yang berwarna biru. Warna biru ini kemudian dapat dideteksi dan diukur dengan spektrofotometri UV-Vis. Peningkatan intensitas warna biru yang terbentuk selama reaksi berlangsung mengindikasikan jumlah ion fenolat yang ada dalam larutan. Konsentrasi senyawa fenolik yang lebih tinggi dalam sampel menghasilkan lebih banyak pembentukan ion fenolat. Ion fenolat bertindak dengan mereduksi fosfomolibdat-fosfotungstat menjadi kompleks molybdenum-tungsten sehingga akan semakin pekat warna biru yang dihasilkan (Ulfa *et al.*, 2017). Kemudian campuran larutan dibaca absorbansi pada panjang gelombang 764 nm. Pemilihan panjang gelombang tersebut menunjukkan tingkat serapan yang tinggi.

Pengukuran *operating time* dilakukan untuk mengetahui waktu yang stabil yaitu ketika sampel bereaksi sempurna dan membentuk senyawa kompleks dengan reagen (Asmorowati & Lindawati, 2019). Hasil *operating time* diperoleh pada waktu 1 jam 38 menit karena waktu tersebut menunjukkan absorbansi yang stabil. Berdasarkan penelitian Nurhasanah *et al.*, (2024). Hasil absorbansi kadar fenolik total dibaca pada panjang gelombang 760 nm dengan hasil *operating time* di dapatkan pada waktu 1 jam 44 menit. Hasil penelitian diperoleh panjang gelombang yang tidak terlalu jauh dengan penelitian sebelumnya. Menurut penelitian Az-zahro, (2023) rentang panjang gelombang maksimum asam galat pada umumnya yaitu berkisar 750-765 nm.

Penentuan kadar flavonoid total dilakukan dengan metode kolorimetri yang memiliki prinsip pengukuran berdasarkan pembentukan warna. Prinsip metode aluminium klorida dengan terjadinya pembentukan kompleks antara aluminium klorida dengan gugus keto pada atom C-4 dan gugus hidroksil pada atom C-3 atau C-5 yang membentuk kompleks senyawa yang stabil dan berwarna kuning dan diukur intensitasnya menggunakan spektrofotometer (Rusli *et al.*, 2022), yang dapat dilihat pada **Gambar 12**.



Gambar 12. Reaksi Flavonoid dengan AlCl_3 (Ramadhan *et al.*, 2021)

Standar kuersetin digunakan untuk penentuan kadar flavonoid total karena kuersetin termasuk senyawa flavonoid dalam golongan flavonol (Candra *et al.*, 2021). Selain itu, kuersetin juga terdapat dalam tanaman daun kelengkeng (Salamah, *et al.*, 2017). Kandungan kadar flavonoid total ditetapkan berdasarkan reaksi kolorimetri yaitu setelah sampel ekstrak daun kelengkeng direaksikan dengan AlCl_3

dalam suasana asam. Larutan asam yang digunakan yakni asam asetat. Penambahan AlCl_3 dalam sampel untuk mendeteksi 7-hidroksil dan membentuk senyawa kompleks antara AlCl_3 dengan kuersetin yang ditandai dengan perubahan larutan lebih kuning, sehingga terjadi pergeseran panjang gelombang ke daerah visible (tampak). Fungsi asam asetat untuk memberikan suasana asam dan menyebabkan C-4 keto dan 3 atau 5 OH tetap stabil dengan membentuk kompleks bersama AlCl_3 , sehingga pergeseran panjang gelombang yang lebih panjang (batokromik) (Tommy *et al.*, 2022). Kemudian campuran larutan dibaca absorbansi pada panjang gelombang 415 nm. Hasil *operating time* diperoleh pada menit ke-33 karena waktu tersebut menunjukkan absorbansi yang stabil. Berdasarkan penelitian Nurhasanah *et al.*, (2024). Hasil absorbansi kadar flavonoid total dibaca pada panjang gelombang 416 nm dengan hasil *operating time* di dapatkan pada menit ke-28. Hasil penelitian diperoleh panjang gelombang yang tidak terlalu jauh dengan penelitian sebelumnya. Menurut penelitian Aminah *et al.*, (2017) rentang panjang gelombang maksimum kuersetin pada umumnya yaitu berkisar 400-450 nm.

Penetapan kadar fenolik pada ekstrak daun kelengkeng dengan perbedaan suhu ekstraksi 40°C, 50°C, dan 60°C dengan menggunakan rumus TPC sedangkan flavonoid total menggunakan rumus TFC. Pada penetapan kadar diawali dengan mengukur absorbansi standar asam galat dan kuersetin terlebih dahulu untuk mencari kurva baku yang akan digunakan untuk menghitung kadar fenolik dan flavonoid total ekstrak daun kelengkeng dengan perbedaan suhu ekstraksi. Dilanjutkan dengan mengukur absorbansi sampel untuk mencari kadar fenolik dan flavonoid total ekstrak daun kelengkeng. Pengukuran absorbansi ini dilakukan sebanyak 3 kali replikasi dengan tujuan untuk meminimalkan terjadinya kesalahan pengukuran serta memastikan keakuratan dan konsistensi data yang diperoleh (Yumita, 2023). Berdasarkan **Tabel 10 dan Tabel 11** diperoleh rata-rata kadar fenolik total ekstrak daun kelengkeng pada suhu ekstraksi 40°C, 50°C, dan 60°C, yakni 102,36±0,402; 141,58±0,696 dan 80,79±0,949 mgGAE/g ekstrak. Kadar flavonoid total ekstrak daun kelengkeng pada suhu ekstraksi 40°C, 50°C, dan 60°C, yakni 92±1,323; 118±3,132 dan 66±1,639 mgQE/g ekstrak.

Data kadar fenolik dan flavonoid total ekstrak daun kelengkeng dengan suhu ekstraksi 40°C, 50°C, dan 60°C diuji normalitas menggunakan *Shapiro-Wilk* dan homogenitas menggunakan *Levene's Test* karena jumlah data kurang dari 50. Hasil uji menunjukkan data terdistribusi normal dan homogen dengan nilai ($p > 0,05$), sehingga analisis dilanjutkan dengan uji *One Way ANOVA*. Hasil uji *One Way ANOVA* menunjukkan perbedaan signifikan antara kelompok variasi suhu 40°C, 50°C, dan 60°C dengan nilai sig ($p < 0,05$), baik dari data kadar flavonoid total maupun data kadar fenolik total. Variasi suhu ekstraksi berpengaruh signifikan terhadap kadar fenolik dan flavonoid total. Hasil uji *Post Hoc Tukey* pada **Lampiran 12**, menunjukkan bahwa suhu 50°C menghasilkan kadar fenolik dan flavonoid total tertinggi dibandingkan suhu 40°C maupun 60°C. Suhu 40°C memberikan hasil lebih rendah dari 50°C, tetapi masih lebih tinggi dibandingkan 60°C. Hal ini menunjukkan bahwa suhu rendah proses ekstraksi berlangsung kurang optimal yang disebabkan karena pada suhu rendah sampel belum melakukan kontak secara optimal dengan pelarut. Molekul pelarut tidak cukup berenergi untuk menembus dinding sel sampel, sehingga senyawa tidak sepenuhnya larut, karena suhu memiliki peran yang penting dalam proses ekstraksi untuk memastikan ekstraksi berlangsung secara efisien, sehingga menjaga kestabilan senyawa aktif dan mengoptimalkan ekstraksi (Leksono *et al.*, 2017), sehingga menyebabkan kadar fenolik dan flavonoid yang diperoleh relative rendah, sementara itu suhu yang terlalu tinggi dapat menyebabkan penurunan kadar fenolik dan flavonoid total yang diduga akibat terjadi degradasi terhadap senyawa flavonoid dan fenolik sehingga nilai kadar yang diperoleh lebih rendah (Ningsih *et al.*, 2020). Kesimpulannya, variasi suhu ekstraksi menggunakan metode *Ultrasound-Assisted Extraction* (UAE) berpengaruh signifikan terhadap kadar fenolik dan flavonoid total ekstrak daun kelengkeng.

Berdasarkan hasil penelitian, Kadar fenolik dan flavonoid total ekstrak daun kelengkeng dengan suhu ekstraksi 50°C lebih tinggi dibanding suhu 40°C dan 60°C, menunjukkan suhu 50°C adalah kondisi optimal untuk mengekstrak senyawa tersebut. Pada suhu 40°C, kadar fenolik dan flavonoid total relatif lebih rendah dibandingkan suhu 50°C karena proses pelepasan senyawa bioaktif belum optimal, yang disebabkan karena pada suhu rendah sampel belum melakukan kontak secara

optimal dengan pelarut. Molekul pelarut tidak cukup berenergi untuk menembus dinding sel sampel, sehingga senyawa tidak sepenuhnya larut, sedangkan pada suhu 50°C terjadi peningkatan signifikan dan merupakan kondisi optimum yang mampu meningkatkan proses difusi pelarut serta merusak dinding sel sehingga kandungan fenolik dan flavonoid terekstrak secara maksimal. Namun, pada suhu 60°C kadar fenolik dan flavonoid menurun kembali, yang diduga akibat terjadi degradasi senyawa fenolik dan flavonoid akibat paparan panas berlebih, sehingga suhu 50°C ditetapkan sebagai suhu ekstraksi paling efektif (Fikry *et al.*, 2024). Hasil yang diperoleh dalam penelitian ini sejalan dengan penelitian sebelumnya yang dilakukan oleh Hilma *et al.*, (2021) yang memperoleh kadar fenolik total lebih tinggi dibandingkan kadar flavonoid total. Hal ini dikarenakan senyawa fenolik memiliki turunan senyawa lainnya seperti tanin, flavonoid, melanin, lignin, fenil propanoid, kumarin dan senyawa lainnya sehingga diperoleh nilai kadar fenolik total yang lebih besar dibandingkan dengan nilai kadar flavonoid total (Tahir *et al.*, 2017). Selain itu, pereaksi *Follin ciocalteu* tidak hanya spesifik bereaksi dengan senyawa fenolik, tetapi juga bereaksi dengan senyawa lain yang memiliki gugus pereduksi, seperti gugus anediol pada asam askorbat, gugus keton pada gula pereduksi, dan gugus amina pada amin aromatik, yang mungkin terdapat dalam ekstrak tanaman, sehingga dapat memberikan nilai yang tinggi pada kadar fenolik (Levita *et al.*, 2020). Kandungan fenolik dan flavonoid yang tinggi pada daun kelengkeng menunjukkan potensinya sebagai antioksidan yang dapat menangkal radikal bebas dan bermanfaat untuk kesehatan, termasuk mencegah penuaan kulit (Trisnaputri *et al.*, 2023).