

**SKRINING DAN ANALISIS KLT-DENSITOMETRI UNTUK
PENETAPAN KADAR FLAVONOID TOTAL PADA
FRAKSI ETIL ASETAT DAUN AFRIKA
(*Vernonia amygdalina*)**

SKRIPSI



**Oleh :
Fanisa Ayu Agustin
NIM. 18040035**

**PROGRAM STUDI SARJANA FARMASI
FAKULTAS ILMU KESEHATAN
UNIVERSITAS dr. SOEBANDI
JEMBER
2022**

**SKRINING DAN ANALISIS KLT-DENSITOMETRI UNTUK
PENETAPAN KADAR FLAVONOID TOTAL PADA
FRAKSI ETIL ASETAT DAUN AFRIKA
(*Vernonia amygdalina*)**

SKRIPSI

Untuk memenuhi persyaratan
memperoleh gelar Sarjana Farmasi (S.Farm)



**Oleh :
Fanisa Ayu Agustin
NIM. 18040035**

**PROGRAM STUDI SARJANA FARMASI
FAKULTAS ILMU KESEHATAN
UNIVERSITAS dr. SOEBANDI
JEMBER
2022**

HALAMAN PERSETUJUAN

Skripsi ini telah diperiksa oleh pembimbing dan telah disetujui untuk mengikuti
seminar hasil pada Program Studi Program Sarjana Farmasi

Universitas dr. Soebandi

Jember, 29 Agustus 2022

Pembimbing Utama



Dr. apt. Ayik Rosita Puspaningtyas, M. Farm
NIDN. 0001028102

Pembimbing Anggota



apt. Lindawati Setyaningrum, M. Farm
NIDN. 0703068903

HALAMAN PENGESAHAN

Skripsi yang berjudul *Skrining Dan Analisis KLT-Densitometri Untuk Penetapan Kadar Flavonoid Total Pada Fraksi Etil Asetat Daun Afrika (Vernonia Amygdalina)* telah diuji dan disahkan oleh Dekan Fakultas Ilmu Kesehatan pada :

Hari : Kamis

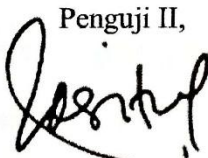
Tanggal : 01 September 2022

Tempat : Program Studi Sarjana Farmasi Universitas dr. Soebandi

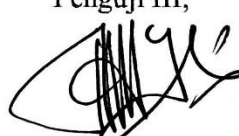
Tim Penguji
Ketua Penguji,


Dra. Ratna Suparwati, M. Kes
NIDN. 0707125301

Penguji II,


Dr. apt. Ayik Rosita P., M. Farm
NIDN. 0001028102

Penguji III,


apt. Lindawati S., M. Farm
NIDN. 0703068903

Mengesahkan,
Dekan Fakultas Ilmu Kesehatan,
Universitas dr. Soebandi,


Hella Melody Parsina, S. Kep.,Ns.,M.Kep
NIDN. 0706109104

LEMBAR PERNYATAAN ORISINALITAS

Yang bertandatangan di bawah ini :

Nama : Fanisa Ayu Agustin

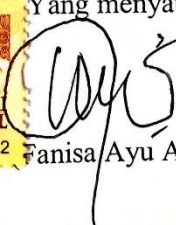
NIM : 18040035

Program Studi : Sarjana Farmasi

Menyatakan dengan sesungguhnya bahwa skripsi yang berjudul "*Skrining dan analisis KLT-Densitometri untuk penetapan kadar flavonoid total pada fraksi etil asetat daun afrika (Vernonia amygdalina)*" merupakan karya saya sendiri dan tulisan ini benar – benar merupakan hasil karya saya sendiri dan bukan merupakan pengambil alihan tulisan atau hasil tulisan orang lain.

Apabila di kemudian hari terbukti atau dapat dibuktikan bahwa sebagian atau keseluruhan skripsi tugas akhir ini adalah karya orang lain atau ditemukan adanya pelanggaran terhadap etika keilmuan dalam skripsi tugas akhir ini, maka saya bersedia menerima sanksi atas perbuatan tersebut. Demikian pernyataan ini saya buat dengan sebenar – benarnya.

Jember, 01 September 2022

Yang menyatakan,

Fanisa Ayu Agustin)



SKRIPSI

SKRINING DAN ANALISIS KLT-DENSITOMETRI UNTUK PENETAPAN KADAR FLAVONOID TOTAL PADA FRAKSI ETIL ASETAT DAUN AFRIKA (*Vernonia amygdalina*)

Oleh:

Fanisa Ayu Agustin

NIM. 18040035

Pembimbing

Dosen Pembimbing Utama : Dr. apt. Ayik Rosita Puspaningtyas., M. Farm

Dosen Pembimbing Anggota : apt. Lindawati Setyaningrum., M. Farm

LEMBAR PERSEMBAHAN

Bismillahirrahmanirrahim....

Puji syukur alhamdulillah senantiasa saya panjatkan kepada Allah SWT atas karunia-Nya yang begitu besar dilimpahnya rahmat dan ridho-nya yang senantiasa selalu memberikan kemudahan, kelancaran, petunjuk, dan keyakinan yang luar biasa kepada saya, sehingga saya dapat menyelesaikan penyusunan skripsi ini tepat pada waktunya.

Skripsi ini saya persembahkan untuk:

1. Kedua orangtua saya (Ayah Saiful dan Mama Sulistiningsih), nenek saya (Hj. Hasaniyah), kakak saya (Anisa) yang telah memberikan segenap kasih sayang, cinta, waktu, semangat, biaya, dan doa-doanya untuk membesarkan saya, sehingga saya sampai pada titik ini dan menyandang gelar S.Farm.
2. Terima kasih kepada semua Dosen dan keluarga Universitas dr. Soebandi Jember yang telah memberikan ilmu pengetahuan, dan memberikan banyak motivasi selama saya duduk di bangku perkuliahan. Semoga Allah SWT membalas semua kebaikan ibu dan bapak dosen.
3. Terima kasih juga kepada kerabat dan orang yang saya cintai paman, bibi, kakak dan adik – adik : Bude Sri, Om Noval, Mbak Kiki, Tante Ulfa, Tante Firda, Om Farid, Om Anas Dan Kerabat lainnya khususnya Tante Herfin yang telah membantu saya dalam berdiskusi menyusun skripsi serta mempersiapkan pengambilan dan pengolahan sampel yang akan saya teliti, memberikan semangat, dukungan, serta doa-doa baik yang telah diberikan

kepada saya dalam proses-proses untuk meraih gelar sarjana farmasi yang telah saya nantikan dan saya banggakan.

4. Terima kasih kepada kakak tingkat Reza Diar Milanda yang telah membantu saya dalam berdiskusi menyusun skripsi dan membantu saya mengaplikasikan instrumen KLT- Densitometri dengan sangat baik, memberikan semangat, dukungan, serta doa-doa baik yang telah diberikan kepada saya dalam proses penyusunan skripsi ini.
5. Terima kasih juga kepada sahabat saya Bella, Tiara, Yendy, Vera teman satu kos barokah, teman seperbimbingan dan juga angkatan 18 khusus nya 18A farmasi teman seperjuanganku, yang telah memberikan semangat, dukungan, serta ide-ide hingga saya mampu memperjuangkan proses-proses untuk meraih gelar sarjana farmasi yang telah dinantikan dan dibanggakan. Perjuangan kita belum selesai sampai disini, Mari kita lanjutkan dengan membuktikan bahwa kita mampu menjadi Farmasi yang profesional dan bisa mengharumkan nama kampus Universitas dr. Soebandi.

MOTTO

“Jadilah tokoh seperti di flim kartun, di jepit, di gilas, bangkit lagi”

(Fanisa Ayu Agustin)

“Hasbunallah wa ni'mal wakil, ni'mal maula wa ni'man nasir”

*“Cukuplah Allah sebagai penolong kami, dan Allah adalah sebaik-baik
pelindung”*

(Qs. Ali Imron: 173)

ABSTRAK

Ayu Agustin, Fanisa* Rosita Puspaningtyas, Ayik** Setyaningrum, Lindawati***.2022. **Skrining Dan Analisis KLT-Densitometri Untuk Penetapan Kadar Flavonoid Total Pada Fraksi Etil Asetat Daun Afrika (*Vernonia Amygdalina*)**. Skripsi. Program Studi Sarjana Farmasi Universitas dr. Soebandi.

Daun afrika (*Vernonia amygdalina*) merupakan tanaman yang dimanfaatkan sebagai antidiabetes, antimalarial, antikanker, mencegah penyakit jantung dan penurunan kolesterol yang memiliki kandungan senyawa kimia, salah satunya yaitu senyawa flavonoid. Tujuan penelitian ini yaitu untuk mengetahui skrining fitokimia dan penetapan kadar flavonoid total pada fraksi etil asetat daun afrika (*Vernonia amygdalina*). Desain penelitian ini adalah *true experimental laboratories*. Pada penelitian ini dilakukan identifikasi flavonoid, optimasi fase gerak, optimasi panjang gelombang, optimasi konsentrasi dan penetapan kadar. Hasil uji skrining adalah positif mengandung flavonoid, alkaloid, steroid, saponin dan menunjukkan negatif pada tanin. Uji penetapan menggunakan fase gerak toluene : etil asetat : asam asetat glasial (6:4:0,5) v/v/v. Konsentrasi yang diperoleh 100; 200; 300; 400; 500 ppm dan panjang gelombang maksimum 384 nm. Koefisien korelasi antara luas area vs konsentrasi sebesar (r) 0,977 dengan persamaan regresi $y = 6,973 \times 10^{-5} \cdot X + 2,95 \times 10^{-4}$. RSD adalah 6,5 %. Penetapan kadar flavonoid total yang didapatkan $3,82138 \pm 0,250119$ mg/QE/g dan % kadar diperoleh 15,285%. Pada uji skrining fraksi etil asetat daun afrika positif mengandung flavonoid dan kadar flavonoid total dalam fraksi etil asetat daun afrika setiap 25 mg mengandung flavonoid $3,82138 \pm 0,25011$ mg/QE/g dan % kadar 15,285%.

Kata Kunci: Daun Afrika, *Flavonoid*, KLT-Densitometri

*Peneliti

**Pembimbing 1

***Pembimbing 2

ABSTRACT

Ayu Agustin, Fanisa* Rosita Puspaningtyas, Ayik** Setyaningrum, Lindawati***. 2022. **TLC-Densitometry Screening and Analysis for Determination of Total Flavonoid Levels in the Ethyl Acetate Fraction of African Leaf (*Vernonia Amygdalina*)**. Essay. Pharmacy Undergraduate Study Program, University of dr. Soebandi.

African leaf (*Vernonia amygdalina*) is a plant that is used as an antidiabetic, antimalarial, anticancer, preventing heart disease and lowering cholesterol which contains chemical compounds, one of which is flavonoid compounds. The purpose of in this research the phytochemical screening and determination of total flavonoid levels in the ethyl acetate fraction of African leaves (*Vernonia amygdalina*).The design of this research is true experimental laboratories. In this research, identification of flavonoids, optimization of mobile phase, optimization of wavelength, optimization of concentration and determining flavonoid total content.The results screening test are positively for flavonoids, alkaloids, steroids, saponins and negative for tannins. Determination test using mobile phase toluene : ethyl acetate : glacial acetic acid (6:4:0,5) v/v/v. the concentration is 100; 200; 300; 400; 500 ppm and a maximum wavelength of 384 nm. The correlation coefficient between area vs concentration is (r) 0.977 with the regression equation is $y = 6.973 \times 10^{-5} \cdot X + 2.95 \times 10^{-4}$. RSD is 6.5%. Determination of total flavonoid levels are 3.82138 ± 0.250119 mg/QE/g and % content is 15.285%. In the test of the ethyl acetate fraction of African leaves is positively for flavonoids and the total flavonoid content in the ethyl acetate fraction of African leaves every 25 mg contained flavonoids is 3.82138 ± 0.25011 mg/QE/g and % content is 15.285%.

Keywords: African leaves, Flavonoids, TLC-Densitometry

*Author

**Advisor 1

***Advisor 2

KATA PENGANTAR

Alhamdulillah segala puji dan syukur bagi Allah SWT yang telah melimpahkan rahmat serta hidayah-Nya sehingga penyusunan Proposal Skripsi ini dapat terselesaikan. Proposal Skripsi ini disusun untuk memenuhi persyaratan memperoleh gelar Sarjana Farmasi di Program Studi Farmasi Fakultas Ilmu Kesehatan Universitas dr. Soebandi dengan judul “Skrining Dan Analisis KLT-Densitometri Untuk Penetapan Kadar Flavonoid Total Pada Fraksi Etil Asetat Daun Afrika (*Vernonia Amygdalina*)”.

Selama proses penyusunan penulis dibantu dan dibimbing oleh berbagai pihak, oleh karena itu penulis mengucapkan terima kasih kepada :

1. Drs. Said Mardijanto, S. Kep., MM, Rektor Universitas dr. Soebandi
2. Hella Meldy Tursina, S. Kep., Ns., M. Kep, Dekan Fakultas Ilmu Kesehatan Universitas dr. Soebandi
3. apt. Dhina Ayu Susanti, S. Farm.,M. Kes, Ketua Program Studi Sarjana Farmasi Universitas dr. Soebandi
4. Dr. apt. Ayik Rosita Puspaningtyas, M. Farm, Pembimbing Utama
5. apt. Lindawati Setyaningrum, M.Farm, Pembimbing Anggota
6. Dra. Ratna Suparwati, M.Kes, Ketua Penguji

Penulis tentu menyadari bahwa Proposal Skripsi ini masih jauh dari kata sempurna. Penulis mengharapkan kritik serta saran dari semua pihak demi kesempurnaan Proposal Skripsi ini.

Semoga Proposal Skripsi ini dapat bermanfaat. Akhir kata penulis mengucapkan terima kasih.

Jember,.....2022

Penulis

DAFTAR ISI

	Halaman
HALAMAN SAMPUL	i
HALAMAN JUDUL	ii
HALAMAN PERSETUJUAN	iii
HALAMAN PENGESAHAN	iv
LEMBAR PERNYATAAN ORISINALITAS	v
HALAMAN PEMBIMBING SKRIPSI	vi
LEMBAR PERSEMBAHAN	vii
MOTTO	ix
ABSTRAK	x
ABSTRACT	xi
KATA PENGANTAR	xii
DAFTAR ISI	xiii
DAFTAR TABEL	xvi
DAFTAR GAMBAR	xvii
DAFTAR LAMPIRAN	xviii
DAFTAR SINGKATAN	xix
BAB I PENDAHULUAN	1
1.1 Latar Belakang	1
1.2 Rumusan Masalah	4
1.3 Tujuan	4
1.3.1 Tujuan Umum	4
1.3.2 Tujuan Khusus	4
1.4 Manfaat Penelitian	5
1.4.1 Secara Teoritis	5
1.4.2 Secara Praktis	5
1.5 Keaslian Penelitian	5
BAB II TINJAUAN PUSTAKA	7
2.1 Daun Afrika	7

2.1.1 Tanaman Daun Afrika	7
2.1.2 Kandungan Senyawa Tanaman Daun Afrika	10
2.1.3 Khasiat Tanaman Daun Afrika	11
2.2 Ekstraksi	12
2.2.1 Pengertian Ekstraksi	12
2.2.2 Tujuan Ekstraksi	13
2.2.3 Jenis - Jenis Ekstraksi	14
2.2.4 Tinjauan Ekstraksi Fraksinasi	18
2.2.5 Tinjauan Pelarut Pada Ekstraksi	21
2.3 Skrining Fitokimia	24
2.3.1 Flavonoid	25
2.3.2 Alkaloid	31
2.3.3 Terpenoid/ Steroid	32
2.3.4 Saponin	33
2.3.5 Tanin	33
2.4 Tinjauan Kromatografi Lapis Tipis (KLT)	34
2.4.1 Kromatografi Lapis Tipis (KLT)	34
2.4.2 Tujuan Kromatografi Lapis Tipis (KLT)	39
2.4.3 Metode Optimasi	39
2.4.4 Sistem Kromatografi Lapis Tipis (KLT)	41
2.5 Densitometri	42
BAB III KERANGKA KONSEP	47
3.1 Kerangka Konsep	47
3.2 Hipotesis Penelitian	48
BAB IV METODE PENELITIAN	49
4.1 Design Penelitian	49
4.2 Populasi Dan Sampel	49
4.2.1 Populasi	49
4.2.2 Sampel	49
4.3 Determinasi Tanaman	50
4.4 Variabel Penelitian	50

4.4.1 Variabel Bebas	50
4.4.2 Varabel Terikat	51
4.4.3 Variabel Terkendali	51
4.5 Lokasi Dan Waktu Penelitian	51
4.6 Definisi Operasional	52
4.7 Teknik Dan Instrumen Pengumpulan Data	55
4.7.1 Pengolahan Simplisia Dan Pembuatan Ekstraksi	55
4.7.2 Skrining Fitokimia	57
4.7.3 Penetapan Kadar Flavonoid Menggunakan KLT-Densitometri	59
BAB V HASIL PENELITIAN	64
5.1 Data Umum	64
5.1.1 Determinasi Tanaman Daun Afrika (<i>Vernonia Amygdalina</i>)	64
5.1.2 Ekstraksi Maserasi	64
5.1.3 Ekstraksi Fraksinasi	64
5.2 Data Khusus	65
5.2.1 Skrining Uji Fitokimia	65
5.2.2 Optimasi Kondisi Analisis Kadar Flavonoid Total	66
5.2.3 Penetapan Kadar Flavonoid Total	70
BAB VI PEMBAHASAN	72
6.1 Teknik Dan Instrumen Pengumpulan Data	72
6.1.1 Determinasi Tanaman Daun Afrika (<i>Vernonia Amygdalina</i>)	72
6.1.2 Pengambilan Dan Pengolahan Tanaman Daun Afrika	72
6.2 Skrining Identifikasi Uji Fitokimia Daun Afrika	75
6.2.1 Flavonoid	75
6.2.2 Alkaloid	76
6.2.3 Terpenoid Dan Steroid	78
6.2.4 Saponin	79
6.2.5 Tanin	79
6.3 Optimasi Kondisi Analisis Flavonoid Total	80
6.3.1 Optimasi Penentuan Fase Gerak	81
6.3.2 Optimasi Panjang Gelombang	83

6.3.3 Optimasi Konsentrasi	86
6.4 Penetapan Kadar Flavonoid Total	87
BAB VII KESIMPULAN	92
7.1 Kesimpulan	92
7.2 Saran	92
DAFTAR PUSTAKA	94

DAFTAR TABEL

	Halaman
1.1 Keaslian Penelitian	5
2.1 Jenis Dan Kegunaan Pelarut Pada Proses Ekstraksi	22
2.2 Klasifikasi Sifat Khas Golongan Senyawa Flavonoid	27
4.1 Definisi Operasional Variabel	52
5.1 Hasil Perhitungan Maserasi Ekstrak Metanol Daun Afrika	64
5.2 Hasil Perhitungan Fraksinasi Fraksi Daun Afrika	64
5.3 Hasil Skrining Uji Fitokimia Daun Afrika	65
5.4 Data Hasil Nilai (N) dan (HETP)	66
5.5 Data Kolerasi Spektrum	69
5.6 Data Nilai Luas Area dan Nilai R_f	70
5.7 Hasil Perhitungan Kadar Flavonoid	71
6.1 Kondisi Jenis Tanah Di Wilayah Kabupaten Sumenep	90

DAFTAR GAMBAR

	Halaman
2.1 Tanaman Daun Afrika (<i>Vernonia amygdalina</i>)	7
2.2 Struktur Senyawa Flavanoid	29
2.3 Struktur Senyawa Alkaloid	32
2.4 Skema Sistem Optik Densitometri	35
3.1 Kerangka Konsep	47
5.1 Fase Gerak Kloroform : Metanol (9:1) v/v	66
5.2 Fase Gerak Etil Asetat : Metanol : Aquadest (10;2,5:0,5) v/v/v	67
5.3 Fase Gerak Toluene : Etil Asetat : Asam Asetat Glasial (6:4:0,5) v/v/v	67
5.4 Fase Gerak Toluene : Etil Asetat : Asam Asetat Glasial (6:4:0,5) v/v/v	68
5.5 Panjang Gelombang Maksimum (384 nm)	69
5.6 Kurva Baku Kuersetin	70
6.1 Reaksi Flavonoid Dengan H_2SO_4	75
6.2 Reaksi Alkaloid Dan Pereaksi Mayer	76
6.3 Reaksi Alkaloid Dan Peraksi Wagner	77
6.4 Reaksi Hidrolisis Bismut	77
6.5 Reaksi Alkaloid Dan Dragendorff	78
6.6 Reaksi Steroid	79
6.7 Reaksi Saponin	79

DAFTAR LAMPIRAN

	Halaman
Lampiran 1. Jadwal Penyusunan Naskah Skripsi	104
Lampiran 2. Determinasi Tanaman Daun Afrika	105
Lampiran 3. Dokumentasi Sertifikat Kuersetin	106
Lampiran 4. Dokumentasi Persiapan Sampel dan Proses Ekstraksi	107
Lampiran 5. Dokumentasi Perhitungan Maserasi	108
Lampiran 6. Dokumentasi Perhitungan Fraksinasi	108
Lampiran 7. Skrining Uji Fitokimia	109
Lampiran 8. Penelitian Dengan Instrumen KLT-Densitometri	110
Lampiran 9. Nilai Luas Area Dan Nilai R_f	111
Lampiran 10. Perhitungan Optimasi Konsentrasi Kurva Baku	111
Lampiran 11. Perhitungan Penetapan Kadar Flavonoid	112
Lampiran 12. Perhitungan R_s , N dan HETP	116
Lampiran 13. Data Hasil R_s , N dan HETP	118
Lampiran 14. Dokumentasi Kurva Baku Kuersetin	118
Lampiran 15. Dokumentasi Panjang Gelombang Maksimum	119
Lampiran 16. Data Konsentrasi Spektrum	119

DAFTAR SINGKATAN

A	: Aromatik
AlCl_3	: Aluminium Clorida
AOAC	: Association of Official Analytical Chemist
B	: Benzene
BPN	: Badan Pertanahan Nasional
C	: Carbon
$^{\circ}\text{C}$	: Deraja Celcius
cm	: Centimeter
CCL_4	: Carbon Tetraklorida
CV	: Koefisien Variasi
DepKes	: Departemen Kesehatan
FeCl_3	: Feri Klorida
HCl	: Hidrogen Clorida
HETP	: Height Equivalent A Theoretical
HPLC	: High Performance Liquid Chromatography
H_2SO_4	: Asam Sulfat
IR	: Infrared
KLT	: Kromatografi Lapis Tipis
MAE	: Microwave Assisted Ectraction
mg	: Miligram
mm	: Milimeter

mL	: Mililiter
μ L	: Mikroliter
N	: Normalitas
N	: Number
N ₂	: Dinitrogen
NMR	: Nuclear Magnetic Resonance
nm	: Nanometer
ng	: Nanogram
O	: Oksigen
PEB	: Pasangan Elektron Bebas
Ppm	: Parts Per Million
REM	: Radiasi Elektromagnetik
R_f	: Retardation faktor
Rs	: Resolusi
RSD	: Relatif Standart Deviasi
SGE	: Supercritical Gas Ectraction
SD	: Standart Deviasi
TLC	: Thin Layer Chromatography
UV	: Ultraviolet
Vis	: Visible

BAB I PENDAHULUAN

1.1 Latar Belakang

Suatu pengembangan pada penelitian metode analisis, perlu dilakukan optimasi untuk menghasilkan kondisi yang ideal. Suatu metode analisis yang telah dioptimasi dengan berbagai variabel yang akan ditentukan dan disesuaikan dengan kriteria yang diharapkan dan untuk memastikan bahwa metode analisis sesuai dengan tujuannya (Ariyanti., 2021). Optimasi kondisi analisis bertujuan untuk mendapatkan hasil yang maksimal dengan tingkat sensitivitas yang tinggi untuk memperoleh kondisi optimum pada suatu proses yang menghasilkan nilai terbaik dari kriteria kerja (Arikalang., 2018).

Optimasi kondisi analisis dilakukan dengan cara melakukan penentuan fase gerak, menentukan panjang gelombang maksimum dan menentukan konsentrasi (Nurhayati., 2020). Dari beberapa penelitian belum ada pengembangan penelitian mengenai analisis penetapan kadar flavonoid total pada daun afrika dengan metode KLT-Densitometri. Penelitian senyawa flavonoid total pada daun afrika (*Vernonia amygdalina*) menggunakan metode KLT-Densitometri karena metode ini memiliki prinsip kerja yaitu suatu metode analisis instrumental yang didasarkan interaksi radiasi elektromagnetik dengan analisis berupa bercak pada KLT (Estika, 2017).

Pelaksanaan metode KLT-Densitometri lebih mudah serta peralatan yang digunakan lebih sederhana. Memberikan fleksibilitas yang lebih besar dalam hal memilih fase gerak. Mempunyai berbagai macam teknik untuk optimasi

pemisahan, proses kromatografi memungkinkan terjadinya pemisahan sampel secara serentak (Wulandari., 2013).

Daun afrika salah satu tanaman yang akan diteliti ini merupakan tanaman yang sering dimanfaatkan sebagai obat. Di Indonesia secara empiris bagian daun tanaman ini digunakan sebagai obat antidiabetes, obat antimalaria dan obat antikanker (Febrianti, 2017), mencegah penyakit jantung, menurunkan kolesterol, mencegah stroke, gangguan pencernaan dan penurunan berat badan (Sukmawati et al., 2017) Gout, analgesik (Koten & Handiwibowo, 2018). Senyawa kimia yang terkandung dalam daun afrika adalah fenol, flavonoid, saponin, kumarin, asam fenolat, lignin, terpen, dan luteolin, tannin, dan terpenoid/steroid (Koten & Handiwibowo, 2018).

Ekstraksi yang digunakan pada penelitian ini yaitu ekstraksi fraksinasi yang dapat ditujukan untuk mendapatkan fraksi (bagian) tertentu dari suatu ekstrak, dimana bagian itulah yang merupakan fraksi aktif, dan perlu dipisahkan dari fraksi lainnya yang kurang aktif. Tujuan fraksinasi yaitu mendapatkan ekstrak yang lebih murni. Dengan fraksinasi maka proses pemisahan senyawanya menjadi lebih mudah (Nugroho, 2017).

Identifikasi kandungan senyawa yang dilakukan pada tanaman daun afrika (*Vernonia amygdalina*) berupa skrining fitokimia. Identifikasi skrining fitokimia bertujuan untuk menganalisis kandungan bioaktif yang digunakan untuk pengobatan. Pendekatan secara skrining fitokimia pada hakikatnya adalah untuk analisis secara kualitatif dari kandungan senyawa kimia yang terdapat di dalam tumbuhan atau bagian tumbuhan (akar, batang, daun, bunga dan biji). Terutama

kandungan metabolit sekunder berupa senyawa bioaktif seperti alkaloid , antrakuinon, flavonoid, glikosida jantung, kumarin, saponin, polifenol dan minyak atsiri (Marjoni, 2016).

Identifikasi senyawa pada pengembangan penelitian kali ini berupa senyawa flavonoid dengan cara penambahan asam sulfat pekat (H_2SO_4) dalam uji flavonoid pada metode Lieberman Buchard. Penambahan asam sulfat pekat (H_2SO_4) ini bertujuan untuk pembentukan senyawa flavonoid yang ditunjukkan perubahan warna hijau kehitaman (Kurang & Adang, 2018). Senyawa flavonoid merupakan salah satu senyawa golongan fenol alam terbesar yang terdapat dalam semua tumbuhan hijau (Aminah., 2017).

Flavonoid mempunyai kerangka dasar 1 atom karbon yang terdiri dari 2 cincin benzen (C_6) terikat pada suatu rantai propana (C_3) sehingga membentuk suatu susunan ($\text{C}_6\text{-C}_3\text{-C}_6$) (Latifah, 2015). Salah satu golongan senyawa polifenol ini diketahui memiliki sifat sebagai penangkap radikal bebas, penghambat enzim hidrolisis, oksidatif, dan juga bekerja sebagai antiinflamasi (Aminah., 2017).

Pembanding yang digunakan untuk analisis flavonoid total yaitu menggunakan kuersetin (Angelina et al., 2015). Penggunaan kuersetin sebagai pembanding karena merupakan flavonoid golongan flavonol yang mempunyai gugus keto pada C-4 dan memiliki gugus hidroksi pada atom C-3 atau C-5 sehingga dapat membentuk kompleks warna dengan AlCl_3 (Asmoro Bangun, 2021).

Berdasarkan pemaparan diatas dikembangkan suatu penelitian untuk mengidentifikasi dan menganalisis senyawa flavonoid dari fraksi etil asetat daun

afrika dengan menggunakan metode KLT-Densitometri yang dilakukan optimasi penentuan fase gerak, panjang gelombang dan konsentrasi untuk memperoleh kondisi yang optimum.

1.2 Rumusan Masalah

Berdasarkan latar belakang pada penelitian diatas, maka dirumuskan masalah sebagai berikut :

- a. Bagaimana identifikasi fitokimia dari fraksi etil asetat daun afrika (*Vernonia amygdalina*) ?
- b. Bagaimana optimasi kondisi analisis KLT-Densitometri ?
- c. Berapakah kadar flavonoid total fraksi etil asetat daun afrika (*Vernonia amygdalina*) menggunakan KLT-Densitometri ?

1.3 Tujuan

1.3.1 Tujuan Umum

Untuk mengetahui skrining dan optimasi kondisi analisis KLT Densitometri untuk penetapan kadar flavonoid total pada fraksi etil asetat daun afrika (*Vernonia amygdalina*).

1.3.2 Tujuan Khusus

- a. Untuk mengidentifikasi skrining fitokimia dari fraksi etil asetat daun afrika (*Vernonia amygdalina*).
- b. Untuk menentukan optimasi kondisi analisis KLT-Densitometri untuk penetapan kadar flavonoid total pada fraksi etil asetat daun afrika (*Vernonia amygdalina*)

- c. Untuk menghitung berapakah kadar flavonoid total fraksi etil asetat daun afrika (*Vernonia amygdalina*) menggunakan KLT-Densitometri.

1.4 Manfaat Penelitian

1.4.1 Secara Teoritis

Penelitian ini diharapkan dapat memberikan informasi bagi ilmu pengetahuan mengenai optimasi kondisi Analisis KLT Densitometri untuk penetapan kadar flavonoid total pada Fraksi Etil Asetat Daun Afrika (*Vernonia amygdalina*).

1.4.2 Secara Praktis

Penelitian diharapkan dapat digunakan sebagai informasi bagi industri farmasi dan masyarakat mengenai optimasi kondisi Analisis KLT Densitometri untuk penetapan kadar flavonoid total pada Fraksi Etil Asetat Ekstrak Daun Afrika (*Vernonia amygdalina*).

1.5 Keaslian Penelitian

Tabel 1.1 Keaslian Penelitian

Nama, Tahun	Persamaan	Perbedaan
(Meidiawati et al., 2018)	KLT- Densitometri, Daun Afrika	a. Metode kolorometri aluminium klorida b. Metode ekstraksi maserasi c. Menggunakan pelarut etanol 70%
(Solikhah, 2021)	Daun Afrika	a. Menggunakan pelarut etanol 70% b. Metode ekstraksi maserasi c. Metode spektrofotometri UV-Vis

Sumber : (Meidiawati et al., 2018) dan (Solikhah, 2021)

BAB II TINJAUAN PUSTAKA

2.1 Daun Afrika

2.1.1 Tanaman Daun Afrika



Sumber : (Henri, 2018)

Gambar 2.1 Tanaman Daun Afrika (*Vernonia amygdalina*)

Klasifikasi tumbuhan daun Afrika:

Kingdom : Plantae
Divisi : Angiospermae
Class : Dicotyledoneae
Ordo : Asterales
Family : Asteraceae, Compositae
Genus : Vernonia
Spesies : *Vernonia amygdalina*

(Saidu., 2020) (Ogbuagu., 2019)

Daun Afrika (*Vernonia amygdalina*) merupakan tumbuhan semak dengan tinggi 2–5 meter yang memiliki warna daun hijau bentuk daun berupa petiolate dengan diameter 6 mm yang tumbuh di beberapa negara Afrika, khususnya, Nigeria, Kamerun, dan Zimbabwe. Di Nigeria, daun afrika memiliki berbagai nama dalam bahasa yang berbeda karena itu tanaman ini juga disebut multi-etnis.

Daun afrika sering disebut sebagai "daun pahit" dalam bahasa Inggris, bahasa, "Ewuro" dalam bahasa Yoruba, "Shuwaka" atau "Chusadoki" dalam bahasa Hausa, "Olubu" atau "Onugbu" dalam bahasa Igbo, "Etidot" dalam Efik, Ijaw Ibibio dan "Oriwo" dalam Edo. Daun afrika memiliki rasa khas pahit, namun rasa pahit pada daun afrika dapat diredakan dengan merebus atau dengan peras dalam air bersih. Untuk batang dan akar divestasi dari kulit dan digunakan sebagai tongkat kunyah di Nigeria. Daun ini juga dapat digunakan untuk Sayur- sayuran yaitu masakan berkuah seperti sop. Namun, daun afrika ini juga pernah dilaporkan bahwa dikonsumsi oleh kambing dan lainnya hewan di beberapa bagian Nigeria (Ogbuagu., 2019).

Terdapat pula penelitian mengenai tumbuhan daun afrika (*Vernonia amygdalina*) yang menyatakan bahwa tumbuhan daun afrika ini biasanya dibudidayakan dengan penanaman batang karena tumbuhan ini tidak dapat menghasilkan biji. Tumbuhan daun afrika ini juga merupakan tanaman perdu yang lunak dan abadi dengan tinggi sekitar 2 sampai 10 m dengan diameter batang mencapai 40 cm. Awalnya tumbuhan ini mempunyai kulit batang puber padat setelah tanaman ini menjadi dewasa kulit batang kayu berubah dari warna abu-abu menjadi coklat. Daunnya berbentuk petiolate yang tersusun secara bergantian. Daun afrika umumnya dikenal sebagai daun pahit karena rasa pahit daunnya. Dan merupakan tumbuhan semak yang umumnya ditemukan di Afrika tropis yang kemudian tumbuhan ini di kembang biakkan. Tanaman daun afrika ini juga dapat ditemukan di beberapa wilayah Asia, termasuk Malaysia. Daun afrika juga dapat

dikonsumsi sebagai sayuran berdaun hijau di seluruh Afrika Barat dan Tengah sebagai sumber nutrisi dan khasiat obatnya (Jayaweera., 2021).

Genus pada daun afrika sendiri yaitu *Vernonia* yang memiliki sekitar seribu spesies dan anggotanya banyak digunakan sebagai makanan dan obat-obatan. Daun afrika secara ilmiah diklasifikasikan ke dalam kingdom Plantae yang merupakan angiosperma dari ordo Asterales. Daun afrika juga memiliki keluarga Asteraceae dengan genus *Vernonia*. Keluarga Asteraceae terdiri dari herba, semak, atau, lebih jarang, pohon. Spesies *Vernonia* dapat dengan mudah beradaptasi dengan habitatnya sesuai dengan lingkungan yang berbeda. Di hutan, daun afrika dapat ditemukan di sebelah sumber air tetapi juga di tepi hutan, hutan, padang rumput hingga ketinggian 2800 m dan dengan curah hujan tahunan rata-rata 750-2000 mm. Genus pada daun afrika yaitu *Vernonia* adalah genus terbesar dengan sekitar 1000 spesies semak, di mana *Vernonia amygdalina* adalah yang paling menonjol (Jayaweera., 2021).

Menurut (Mwanauta, 2014) Daun afrika (*Vernonia amygdalina*) yang juga dikenal dengan daun pahit karena memiliki rasa yang pahit yang merupakan bagian dari famili Asteraceae. Batang tegak yang dimiliki oleh daun afrika berukuran sekitar 1-3 meter, berbentuk bulat dengan batang berkayu, termasuk daun majemuk dengan panjang 15-25 cm, lebar 5-8 cm, tebal 7-10 mm serta memiliki daun berwarna hijau tua (Putri, 2019).

a. Batang

Batang tanaman daun Afrika mempunyai anatomi yang tidak jauh berbeda dengan kelompok semak lainnya. Bagian ini mempunyai ukuran kecil dan dapat

tumbuh hingga ketinggian antara 7 sampai 10 meter. Pertumbuhan batang tegak lurus ke atas dan strukturnya tidak begitu kuat.

Warna kulit batang daun Afrika adalah abu-abu dan sedikit kecokelatan. Tumbuhan ini mempunyai percabangan yang cukup banyak, akan tetapi cabangnya tidak begitu mencolok karena selain tidak terlalu panjang, kondisinya juga rapuh. Batang daun Afrika sebenarnya merupakan batang berkayu dengan penampang berbentuk bulat. Saat usia tanaman sudah tua maka warna batangnya akan berubah menjadi cokelat kotor. Sedangkan jenis akar tanaman yang dimiliki oleh daun pahit ini ialah akar tunggang (Solikhah, 2021).

b. Daun

Daun Afrika memiliki daun dengan sistem pertulangan menyirip. Bagian ini berbentuk agak lonjong dengan ukuran panjang sekitar 10 sampai 15 cm dan lebarnya antara 4 sampai 5 cm. Pertulangan daunnya terlihat jelas dan tulang yang berada di tengah mempunyai warna agak kemerah-merahan. Tekstur daun tanaman ini cukup lembut baik pada bagian atas ataupun bawahnya. Bagian ujung dan dekat pangkal daun berbentuk meruncing. Sedangkan, tepi daun dan keseluruhan daunnya mempunyai tekstur bergerigi berwarna hijau. Daun afrika yang sudah berusia tua mempunyai warna hijau pekat dengan permukaan daun kasar. Warna cabang daun Afrika berwarna hijau dan sedikit berwarna cokelat ketika telah tua (Solikhah, 2021).

2.1.2 Kandungan Senyawa Tanaman Daun Afrika

Tumbuhan Afrika (*Vernonia amygdalina*) mempunyai sinonim *Gymnanthemum amygdalinum* di Indonesia yang dikenal dengan nama daun

Afrika. Tanaman daun Afrika mempunyai kandungan nutrisi dan senyawa kimia, beberapa kandungan tanaman daun afrika yaitu, protein 19,2%, serat 19,2%, karbohidrat 68,4%, lemak 4,7%, asam askorbat 166,5 mg/100g, karotenoid 30 mg/100g, kalsium 0,97g/100g, besi 7,5 mg/100 gram. Untuk senyawa kimia yang terkandung di dalam daun Afrika yaitu berupa flavonoid, alkaloid, saponin, terpenoid, tanin, glikosida, alkaloid indole, antrakuinon dan luteolin (Sukmawati., 2017).

Menurut (Sani dkk., 2012) Beberapa Senyawa yang terkandung dalam Tanaman Afrika meliputi: antrakuinon (+++), tanin terlarut (++), tanin terkondensasi (+), flavonoid (+), alkaloid (+++), alkaloid indol (+), alkaloid steroid (+++), saponin (+++), glikosida (++), dan terpenoid (+++) (Meidiawati., 2018).

Dalam penelitian Tonukari et al., juga menunjukkan bahwa daun afrika mengandung banyak senyawa fitokimia diantaranya saponins, sesquiterpenes, lactones, flavonoids dan steroid glucosides (Putri, 2019). Berdasarkan skrining fitokimia pada penelitian yang dilakukan di Uganda menyatakan bahwa Daun Afrika positif mengandung beberapa senyawa alkaloid, saponin, tannin, seskueterpen lakton, triterpenoid, asam amino, flavonoid, terpenoid, and kardiotonik (Febrianti., 2017).

2.1.3 Khasiat Tanaman Daun Afrika

Tanaman yang sering digunakan sebagai obat adalah Daun Afrika (*Vernonia amygdalina*). Di Indonesia secara empiris pada bagian daun tanaman ini

dimanfaatkan untuk obat pada penyakit antidiabetes, obat antimalaria dan obat antikanker (Febrianti., 2017).

Terdapat beberapa penelitian sebelumnya yang memanfaatkan ekstrak daun afrika karena daun afrika memiliki beberapa hasil yang menunjukkan secara signifikan mengenai aktivitasnya yang dapat menurunkan kadar gula darah, kolesterol serta antioksidan (Putri, 2019). Daun afrika memiliki banyak manfaat dalam pengobatan tradisional dilihat dari penelitian sebelumnya, daun afrika ini memiliki efek sebagai aktivitas seperti antiparasit, antimalaria, antihelmentik, antivirus, antikanker, antikoagulan dan antithrombik, analgesik dan antipiretik, antiinflamasi, antioksidan, antidiabetik, dan antioksidan (Ni Ketut Esati, 2021).

2.2 Ekstraksi

2.2.1 Pengertian Ekstraksi

Ekstraksi dapat disebut juga penyarian yang merupakan proses pemisahan senyawa dari matriks atau simplisia dengan menggunakan pelarut yang sesuai. Ekstraksi mempunyai peranan sangat penting dalam analisis fitokimia karena sejak tahap awal sampai tahap akhir menggunakan proses ekstraksi termasuk fraksinasi dan pemurnian. Terdapat beberapa istilah yang banyak digunakan dalam ekstraksi, antara lain ekstraktan (yaitu, pelarut yang digunakan untuk ekstraksi), rafinat (yaitu, larutan senyawa atau bahan yang akan diekstraksi), dan linarut (yaitu, senyawa atau zat yang diinginkan terlarut dalam rafinat) (Hanani, 2020).

Metode ekstraksi yang digunakan tergantung pada jenis, sifat fisik dan sifat kimia serta kandungan senyawa yang akan di ekstraksi. Pelarut yang digunakan

tergantung pada polaritas senyawa yang akan disari, mulai dari yang bersifat non polar hingga polar, sering disebut sebagai ekstraksi bertingkat. Pelarut yang digunakan untuk ekstraksi dimulai dengan heksana, petroleum eter, lalu selanjutnya kloroform atau diklometana, yang diikuti dengan alkohol, metanol, dan terakhir, apabila diperlukan, digunakan air (Hanani, 2020).

Pada proses ekstraksi simplisia dikumpulkan dan dibersihkan dari pengotor dengan cara pemilahan (pemisahan simplisia lain yang tidak digunakan) dan selanjutnya dilakukan pencucian atau disebut dengan sortasi basah. Untuk melakukan ekstraksi terhadap simplisia sebaiknya digunakan simplisia yang segar (Hanani, 2020).

Pada cara pengeringan simplisia sangat diperhatikan karena pada proses ini ditakutkan dapat terjadi perubahan metabolit baik secara kualitatif ataupun kuantitatif. Pengeringan dilakukan secepat – cepatnya di karenakan pengaruh sinar matahari yang suhunya tidak terlalu tinggi. Salah satu contoh pengeringan yang sering dilakukan adalah dengan aliran udara. Sebelum simplisia diekstraksi, simplisia kering dapat disimpan dalam wadah tertutup rapat dan tidak terlalu lama, untuk mencegah adanya hama atau kutu yang dapat menyebabkan rusaknya kandungan kimia pada simplisia. Untuk proses pengecilan ukuran diperlukan agar proses ekstraksi berjalan dengan cepat (Hanani, 2020)

2.2.2 Tujuan Ekstraksi

Tujuan ekstraksi yaitu untuk menarik dan memisahkan senyawa dari campuran suatu simplisia. Terdapat beberapa cara proses ekstraksi yang telah diketahui, yang pada masing masing metode ekstraksi memiliki kelebihan dan

kekurangannya. Pemilihan metode dilakukan tergantung pada sifat senyawa, pelarut yang digunakan dan alat yang tersedia. Terdapat struktur dalam setiap senyawa, suhu dan tekanan yang dapat harus diperhatikan dalam melakukan proses ekstraksi. Salah satu pelarut yang paling banyak dipakai yaitu alkohol yang digunakan untuk penyarian secara total. Terdapat beberapa metode ekstraksi yang umum digunakan antara lain maserasi, perkolasi, refluks, soxhletasi, infusa, dekok, destilasi, lawan arah (*countercurrent*), ultrasonik, gelombang mikro (*microwave assisted extraction*, MAE), dan ekstraksi gas superkritis (*supercritical gas extraction*, SGE) (Hanani, 2020).

2.2.3 Jenis – Jenis Ekstraksi

a. Berdasarkan bentuk substansi dalam campuran

1. Ekstraksi padat-cair

Ekstraksi padat- cair merupakan proses ekstraksi yang paling banyak ditemukan untuk mengisolasi suatu substansi yang terkandung di dalam suatu bahan alam. Proses ini menggunakan substansi yang berbentuk padat dalam campurannya dan memerlukan kontak yang sangat lama antar pelarut dan zat padat. Pada proses ekstraksi kesempurnaan ditentukan oleh sifat bahan alam dan sifat dari bahan yang akan diekstraksi.

2. Ekstraksi cair – cair

Ekstraksi dilakukan apabila substansi yang akan diekstraksi berbentuk cairan didalam campurannya (Marjoni, 2016).

b. Berdasarkan penggunaan panas

1. Ekstraksi secara dingin

Metode ekstraksi dingin bertujuan untuk mengekstrak senyawa-senyawa yang terdapat pada simplisia, yang tidak tahan terhadap panas dan bersifat thermolabil. Ekstraksi dingin dapat dilakukan dengan cara berikut ini, yaitu :

a) Maserasi

Maserasi merupakan ekstraksi sederhana dengan cara merendam simplisia dalam satu atau campuran pelarut dalam waktu tertentu pada temperatur kamar dan dapat terlindung dari cahaya.

b) Perkolasi

Perkolasi merupakan proses penyarian zat aktif dengan cara mengalirkan pelarut secara kontinu pada simplisia selama waktu tertentu.

2. Ekstraksi secara panas

Metode pada digunakan pada senyawa-senyawa yang terkandung dalam simplisia yang sudah dipastikan tahan dengan panas. Metode ekstraksi yang memerlukan panas, yaitu :

a) Seduhan

Merupakan proses penyarian paling sederhana dengan cara merendam simplisia pada air panas selama waktu tertentu (5-10 menit).

b) Coque (Penggodokan)

Merupakan proses penyarian dengan cara menggodok simplisia menggunakan api langsung dan hasilnya langsung digunakan sebagai obat baik keseluruhan termasuk ampasnya dan hasil godokan tanpa ampas.

c) Infusa

Merupakan sediaan cair dengan proses penyarian simplisia nabati dengan air pada suhu 90°C selama 15 menit.

d) Digestasi

Merupakan proses penyarian dengan digesti menggunakan pemanasan rendah pada suhu 30 – 40°C. Metode ini hampir sama dengan proses ekstraksi maserasi dan biasanya digunakan untuk simplisia yang tersari pada suhu biasa.

e) Dekokta

Proses penyarian hampir sama dengan infusa namun perbedaannya terletak pada waktu pemanasan yaitu 30 menit dengan suhu mencapai 90°C. Namun, metode ini jarang digunakan karena pada proses penyarian kurang sempurna dan juga tidak dapat digunakan untuk mengekstraksi senyawa yang bersifat termolabil.

f) Refluks

Merupakan proses ekstraksi dengan pelarut pada titik didih pelarut selama waktu dan jumlah pelarut tertentu dengan adanya pendingin balik (kondensor). Umumnya dilakukan 3 – 5 kali pengulangan pada residu pertama, hingga termasuk proses ekstraksi yang cukup sempurna.

g) Sokletasi

Proses ini merupakan proses ekstraksi panas dengan menggunakan alat khusus berupa ekstraktor soxlet. Suhu yang digunakan lebih rendah dibandingkan dengan suhu pada metode refluks (Marjoni, 2016).

c. Berdasarkan proses pelaksanaan

1. Ekstraksi berkesinambungan (Continuous Extraction)

Proses ekstraksi yang menggunakan pelarut yang sama dan dipakai berulang-ulang sampai proses ekstraksi selesai.

2. Ekstraksi bertahap (Bath Extraction)

Merupakan ekstraksi yang setiap tahap prosesnya menggunakan pelarut yang baru sampai proses selesai (Marjoni, 2016).

d. Berdasarkan metode ekstraksi

1. Ekstraksi tunggal

Merupakan proses ekstraksi dengan cara mencampurkan bahan yang akan diekstrak sebanyak satu kali dengan pelarut. Kekurangan dari proses ekstraksi ini yaitu rendahnya rendemen yang dihasilkan.

2. Ekstraksi multi tahap (bertingkat)

Merupakan suatu proses ekstraksi dengan cara mencampurkan bahan yang akan diekstrak oleh beberapa kali dengan menggunakan pelarut yang baru dengan jumlah yang sama banyak (Marjoni, 2016).

2.2.4 Tinjauan Ekstraksi Fraksinasi (Cair – Cair)

a. Pengertian Fraksinasi

Pada umumnya ekstraksi yang digunakan pada pemisahan yaitu ekstraksi fraksinasi (cair -cair). Ekstraksi fraksinasi merupakan suatu proses pemisahan dilaboratorium yang dilakukan pada pemisahan golongan senyawa berdasarkan polaritas. Alat yang digunakan cukup sederhana yaitu dengan menggunakan corong pisah dan waktu yang diperlukan cukup singkat. Pada proses pemisahan menggunakan 2 pelarut yang tidak tercampur, contohnya air (polar) dan heksana atau kloroform (nonpolar) senyawa organik polar sebagian besar terdapat dalam lapisan air sedangkan senyawa organik nonpolar berada dalam lapisan heksana dan kloroform. Ekstraksi fraksinasi (cair- cair) ini akan lebih efektif jika larutan penyari dibagi menjadi beberapa bagian dan ekstraksi dilakukan secara berulang kali dengan menggunakan pelarut yang jumlahnya sama banyak (Hanani, 2020).

Adapun terdapat beberapa pelarut yang digunakan pada proses ekstraksi ini yaitu etil asetat, butanol, diklorometan/kloroform dan heksana yang lazim digunakan pada tahap fraksinasi dengan metode partisi cair – cair dan ada pula dengan metode endap tuang (cair, padat). Pada skrining yang telah dilakukan menunjukkan salah satu sampel aktifitas poten maka dari itu dilakukan pengerjaan isolasi. Pada proses isolasi bertujuan untuk merekomendasikan bahwa bobot bahan simplisia yang digunakan sebaiknya minimal 1 kg agar peluang memperoleh senyawa aktif farmakologis secara kualitatif ataupun kuantitatif lebih tinggi (Saifudin, 2014).

Pada fraksinasi kasar dengan partisi ekstrak yang diperoleh masih kasar dan sangat kompleks isinya. Maka dari itu perlu dilakukan fraksinasi cair –cair atau partisi. Biasanya untuk ekstrak metanol atau etanol 70% dilarutkan kedalam air hingga tepat larut. Kemudian untuk dipartisi bertingkat dimulai dengan butanol, etil asetat, kloroform/diklorometana dan heksana. Untuk semua pelarut organik yang digunakan akan berada di fase atas kecuali kloroform yang berada di bawah air (Saifudin, 2014).

Untuk masing- masing fraksi kental harus diperoleh setidaknya 10 gram agar bisa dilakukan tahap fraksinasi lanjutan. Selain itu semua fraksi partisi tersebut juga harus segera diuji kembali aktifitasnya. Selanjutnya, untuk mendapatkan ekstrak kental atau ekstrak kering maka dilakukan pemisahan kasar dari ekstrak berdasarkan tingkat polaritas nya yakni di mulai dari non polar, semi polar dan polar. Biasanya fraksinasi dilakukan untuk pelarut ekstrak polar seperti : air, metanol dan etanol 70% (Saifudin, 2014).

1. Proses Pengentalan /Pengeringan Ektrak

Umumnya pengentalan dan pengeringan dilakukan dengan beberapa metode berikut, yaitu :

- a) Diuapkan di atas *water bath* (penguapan) : baik untuk sistem terbuka maupun untuk sistem tertutup. Untuk sistem tertutup dilakukan untuk mencegah solven meracuni kemana – mana.
- b) Diuapkan dengan *rataroy evaporator*. Digunakan untuk semua pelarut organik dan tidak cocok untuk bahan berair karena air membutuhkan waktu

penguapan yang cukup lama. Untuk saat ini beredar *multirotarory evaporator*. Lebih efisien karena enam sampel dikeringkan bersamaan.

- c) Liofilisasi (*freeze dryer*) digunakan untuk bahan yang berair dan tidak untuk pelarut organik.
- d) Dialiri dengan gas N₂ : digunakan untuk bahan yang termolabil, harga mahal dan jumlah rendemen kecil (Saifudin, 2014).

Untuk hasil fraksinasi yang mengandung air (karena fase gerak menggunakan kombinasi air) merupakan masalah tersendiri karena membutuhkan waktu yang cukup lama. Namun, jika tidak tersedia *multirotarory* yang kuat, maka pemekatan dapat menggunakan *rotatory evaporator* dengan suhu water bath 50°C. dengan pengisian volume 1/3 bagian untuk mencegah terjadinya buih yang mudah tersedot ke atas,. Untuk beberapa peneliti menambahkan propanol pada labu untuk mempercepat penguapan (Saifudin, 2014).

Untuk penguapan pelarut organik perlu dihindari dengan penggunaan *waterbath* yang tidak tertutup karena untuk menghindari materialnya menjadi toksik. Maka harus dilakukan modifikasi agar cairan pelarut tidak menguap bebas (Saifudin, 2014).

Untuk penggunaan suhu yang terlalu tinggi akan beresiko terjadinya degradasi konstituen di dalamnya. Maka suhu yang direkomendasikan untuk pengentalan yaitu dibawah 60°C. Untuk penggunaan *freeze dryer* hanya ditujukan untuk material berair dan tidak direkomendasikan untuk material yang mengandung pelarut organik. untuk penggunaan gas N₂ digunakan dengan cara dialirkan pada material yang mengandung pelarut organik. Cara ini hanya efisien

untuk jumlah bahan yang tidak stabil panas. Untuk pengeringan dengan cara liofilisasi dan pengaliran N₂ akan memperoleh material dalam bentuk serbuk (Saifudin, 2014).

2.2.5 Tinjauan Pelarut Pada Ekstraksi

Pelarut merupakan zat yang berada pada larutan dalam jumlah yang besar, sedangkan zat lainnya dianggap sebagai zat terlarut. Pelarut yang digunakan pada proses ekstraksi harusnya merupakan pelarut terbaik untuk zat aktif yang terdapat pada sampel dan simplisia. Sehingga zat aktif dapat dipisahkan dari simplisia dan senyawa lainnya yang terdapat pada simplisia. Hasil akhir yang diperoleh dari ekstraksi adalah didapatkannya ekstrak yang hanya mengandung sebagian besar dari zat aktif yang diinginkan (Marjoni, 2016).

Pelarut yang digunakan dalam proses ekstraksi ini memiliki beberapa sifat penting. Di antara sifat – sifat penting pelarut yaitu :

- a. Kemampuan melarutkan (*solubility*)
- b. Kecepatan menguap
- c. Trayek didih.
- d. Berat jenis (*spesific gravity*)
- e. *Flaspoint*

Pada pelarut sifat polaritas antar golongan metabolit sekunder yaitu untuk mengisolasi dan memurnikan metabolit sekunder yang harus dipahami benar mengenai sifat dasar molekul metabolit sekunder. Kebanyakan metabolit sekunder bersifat semipolar sehingga larut dalam pelarut organik. Untuk pelarut metanol dan asetonitril merupakan golongan pelarut yang paling polar, sedangkan untuk

pelarut non polar yaitu heksana, benzana, petroleum dan eter. Umumnya metabolit yang larut dalam metanol adalah senyawa glikosida yang mengikat satu atau lebih molekul gula heksosa/ pentosa. Adapun kebanyakan golongan terpenoid bersifat non polar sehingga dapat larut dalam pelarut non polar dan semi polar. Namun, untuk monoterpen dan sekuiterpen masih mampu larut dalam metanol (Saifudin, 2014).

Untuk melakukan pemisahan awal pada senyawa alami dari matriks nabati dan hewan akan melibatkan pemisahan kasar dilanjutkan dengan pemisahan halus. Pemisahan kasar melibatkan beberapa metode, diantaranya (Saifudin, 2014). :

- a. Ekstraksi
- b. Fraksinasi partisi cair – cair
- c. Fraksinasi cair – padat

Sedangkan pemisahan halus melibatkan metode, antara lain :

- a. Kromatografi kolom fase normal
- b. Kromatografi kolom fase terbalik
- c. Kromatografi eksklusi/permeasi

Jenis dan kegunaan pelarut yang lazim digunakan pada beberapa proses ekstraksi, fraksinasi, fase gerak kromatografi, antara lain (Saifudin, 2014) :

Tabel 2.1 Jenis Dan Kegunaan Pelarut Pada Proses Ekstraksi

Solven	Konstanta Dielektrik	Penggunaan
Heksana	2,02	Digunakan untuk mengekstraksi lemak, digunakan untuk partisi paling awal terhadap larutan air dan heksana. Heksana tidak tercampur dengan metanol.
CCl ₄	2,24	Bersifat beracun, tidak digunakan untuk ekstraksi atau pemisahan.

Benzana	2,28	Bersifat karsinogenik. Digunakan untuk pemisahan isomer – isomer yang memiliki cicin benzen, untuk tahap pemurnian.
Toluen	2,38	Pada fase gerak KLT dicampurkan dengan metanol kadar rendah. Analisis KLT senyawa bercincin benzena.
Trietil amina	2,43	Mempunyai sifat basa lemah. Dapat dicampur (1-5%) dalam kloroform-kloroform dan heksana juga etil asetat untuk menganalisis KLT beberapa alkaloid.
Kloroform	4,81	Untuk partisi terhadap air. Dicampur metanol kadar rendah (5-20%) untuk fase gerak KLT fase normal. Selalu larut dengan metanol berapa pun kadarnya. Cukup toksik. Dalam bentuk terdeuteronasi pelarut yang bersih untuk kebanyakan senyawa semi polar – non polar.
Eter (dimetil eter)	5,0	Toksik dan anestetik. Jika terpaksa digunakan dengan rasio 1-4 terhadap heksana yang digunakan sebagai fase gerak untuk pemurnian dan pemisahan dengan KLT.
Etil asetat	6,02	Digunakan untuk partisi cair- cair dengan air. Dilakukan setelah heksana. Dapat dicampur dengan kloroform atau diklorometana untuk kromatografi kolom senyawa-senyawa non polar. Dapat dilakukan sebelum campuran heksana etil asetat.
Asam asetat	6,15	Untuk sedikit mengasamkan fase gerak pada KLT pemisahan halus.
Diklorometana	8,93	Digunakan untuk partisi cair- cair menggantikan kloroform . dicampur metanol kadar rendah (5-20%) untuk fase gerak KLT fase normal.
n-butanol	17,8	Untuk partisi terhadap air setelah etil asetat . kadang dicampur dengan sedikit asam asetat atau asam jenuh lain dan dijenuhkan dengan air untuk analisis KLT glikosida. Ditutup rapat karena baunya dapat mengganggu

		pernafasan.
n-propanol	20,1	Untuk partisi cair- cair dengan air jika perlu lebih haus ketika fraksi air setelah diaprtisi dengan n-butanol
Aseton	20,7	Digunakan untuk ekstraksi senyawa semi polar. Juga terkadang dicoba dengan sedikit metanol untuk KLT. Untuk bentuk terdeutronasi sebagai pelarut semi polar NMR.
Etanol	25,3	Digunakan sebagai pelarut di awal ekstraksi simplisia baik sendiri maupun dicampur dengan air kadar.
Metanol	33	Merupakan pelarut utama yang digunakan untuk ekstraksi simplisia. Campuran dengan aseton atau asetonitril pada fase gerak dan fase terbalik. Rasio yang sangat kecil terhadap kloroform dan pada diklorometana untuk fase terbalik dan HPLC.
Asetonitril	36,6	Dalam bentuk campuran dengan air untuk fase gerak KLT fase terbalik dan HPLC
DMSO	47,2	Pelarut yang digunakan untuk bioassay. Dalam bentuk terdeutronasi sebagai pelarut NMR
Air	80	Untuk pengekstraksi polar dalam membuat infusa, dekokta dan dalam bentuk terdeutronsni sebagai pelarut NMR.

Sumber : (Saifudin, 2014)

2.3 Skrining Fitokimia

Fitokimia adalah ilmu yang mempelajari sifat dan interaksi senyawa-senyawa kimia metabolit sekunder dalam tumbuhan. Keberadaan metabolit sekunder ini sangat penting bagi tumbuhan untuk mempertahankan dirinya dari makhluk hidup lainnya. Manfaat lainnya yaitu untuk mengundang kehadiran serangga untuk membantu penyerbukan dan lain-lain. Metabolit sekunder juga memiliki manfaat bagi makhluk hidup lainnya (Julianto, 2019).

Fitokimia merupakan ilmu yang mengarah pada suatu zat kimia yang ada pada tumbuhan untuk dapat mengetahui zat kimia metabolit sekunder dari tiap tanaman. Dalam perkembangannya dengan pengetahuan fitokimia banyak zat kimia yang didapat dan dapat pula menjelaskan mengenai hubungan filogenetika dari marga-marga suatu tumbuhan yang ada di seluruh dunia. Dengan adanya pembelajaran ilmu fitokimia maka akan berkembang pula kemotaksonomi yang dapat dikatakan sebagai sosiologi tumbuhan yang menjelaskan mengenai hubungan antarmarga tumbuhan. Dengan mempelajari mengenai ilmu fitokimia pula kita dapat menjelaskan mengenai metabolit sekunder dan menjelaskan mengenai bahan tumbuhan (Endarini, 2016).

Skrining fitokimia dilakukan untuk menganalisis kandungan bioaktif yang digunakan untuk pengobatan. Pendekatan secara skrining fitokimia pada hakikatnya adalah analisis secara kualitatif dari kandungan senyawa kimia yang terdapat di dalam tumbuhan atau bagian tumbuhan (akar, batang, daun, bunga dan biji). Terutama kandungan metabolit sekunder berupa senyawa bioaktif seperti alkaloid, antrakuinon, flavonoid, glikosida jantung, kumarin, saponin, polifenol dan minyak atsiri (Marjoni, 2016).

2.3.1 Flavonoid

a. Struktur Kimia dan Klasifikasi Senyawa Flavonoid

Flavonoid merupakan senyawa metabolit sekunder yang memiliki struktur inti $C_6-C_3-C_6$ berupa dua cincin aromatik yang dihubungkan dengan 3 atom C, apabila senyawa ini berikatan dengan atom O maka akan menjadi ikatan heterosiklik, senyawa ini juga disebut dengan senyawa polifenol karena

mengandung dua hingga lebih gugus hidroksil, memiliki sifat agak asam yang dapat larut dalam basa. Pada umumnya flavonoid ditemukan berikatan dengan gula membentuk glikosida yang lebih mudah larut dalam sebuah pelarut polar berupa metanol, etanol, butanol, etil asetat. Warna dari bentuk glikosida lebih pucat daripada bentuk aglikon. Pada bentuk aglikon memiliki sifat kurang polar dan cenderung lebih mudah larut dalam pelarut kloroform dan eter. Cincin aromatik dalam flavonoid disebut cincin A dan B dan untuk pemberian nomor atom karbon pada cincin B menggunakan angka “beraksen” (Hanani, 2020).

Senyawa flavonoid khususnya bentuk glikosida akan mengalami dekomposisi oleh enzim apabila masih dalam bentuk segar dan tidak dikeringkan. Pada proses mengekstraksi perlu diperhatikan mengenai polaritas dan tujuan yang dikehendaki. Terdapat beberapa senyawa flavonoid yang mempunyai sifat kurang polar (isoflavon, flavanon, flavon, termetilasi, dan flavonol) yang dapat diekstraksi dengan menggunakan pelarut yang mempunyai polaritas rendah, seperti kloroform dan eter. Beberapa tumbuhan yang mengandung senyawa flavonoid biasanya dalam bentuk glikosida baik sebagai flavonoid O-glikosida dan C-glikosida (Hanani, 2020).

Senyawa flavonoid O-glikosida adalah flavonoid yang memiliki satu hingga lebih gugus hidroksilnya yang berikatan dengan satu hingga dua gula dengan ikatan hemiasetat yang lebih mudah terurai dengan adanya asam. Ikatan ini menyebabkan senyawa flavonoid menjadi kurang reaktif juga muda larut dalam pelarut polar etanol, metanol dan air. Untuk semua gugus hidroksi pada struktur flavonoid dapat berikatan dengan gula. Namun, terdapat beberapa posisi yang

mempunyai peluang lebih besar yaitu pada posisi C-3 dan C-7. Jenis gula paling umum yang terikat yaitu glukosa yang berupa mono, di, dan trisakarida. Sedangkan untuk senyawa flavonoid C-glikosida adalah flavonoid yang memiliki gula terikat langsung pada atom karbon yaitu pada inti benzen. Ikatan ini dapat terjadi pada C-6 dan C-8 dan jenis gula yang terikat lebih terbatas (Hanani, 2020).

Flavonoid terdapat pada seluruh bagian tanaman, termasuk pada bagian buah, tepung, sari juga pada akar. Untuk kegunaan flavonoid pada tumbuhan antara lain untuk menarik serangga yang dapat membantu proses penyerbukan, untuk menarik perhatian binatang yang dapat membantu penyebaran biji dan diduga pula senyawa flavon pada flavonoid dapat bekerja seperti auksin dalam menstimulir perkecambahan biji gandum. Sedangkan manfaat yang diberikan pada manusia antara lain, pada dosis kecil pada salah satu senyawa flavonoid yaitu flavon dapat bekerja sebagai stimulasi pada jantung, sedangkan untuk hesperidin dapat mempengaruhi pembuluh darah kapiler dan untuk senyawa flavon dapat juga terhidroksilasi yang bekerja sebagai diuretik dan sebagai antioksidan pada lemak (Marjoni, 2016).

Flavonoid dapat diklasifikasikan menjadi beberapa senyawa antara lain, flavon, flavonol, flavanon, flavanonol, iso flavon, kalkon, dihidrokalkon, auron, antosianidin, katekin dan flavan-3,4-diol. Terdapat pula penjelasan mengenai sifat khas pada beberapa golongan senyawa flavonoid diatas (Marjoni, 2016).

Tabel 2.2 Klasifikasi Sifat Khas Golongan Senyawa Flavonoid

Golongan Flavonoid	Terdapat di alam	Sifat Khas
Antosianin	Zat berwarna merah tua., merah, biru kehijauan dan	Larut dalam air maksimal 515 – 545 nm.

	biru pada bunga, daun dan jaringan lain	
Flavonol	Merupakan co pigmen pada bunga, tersebar luas pada daun berwarna kuning.	Sesudah dihidrolisis oleh asam, bercak berwarna terang dengan sinar UV pada kromatogram, maksimal, 350 – 386 nm.
Flavon	Seperti flavonol	Sesudah dihidrolisis oleh asam bercak berwarna coklat pada kromatogram. Maksimal 370 – 410 nm.
Calcon	Zat berwarna kuning pada bunga, kadang terdapat pada jaringan lain.	Memberikan warna merah dengan amonia. Maksimal 370 – 410 nm.
Iso Flavon	Sering terdapat dalam akar hanya terdapat dalam familia Leguminosae, tidak berwarna.	Tidak ada reaksi yang khas.

Sumber : (Marjoni, 2016)

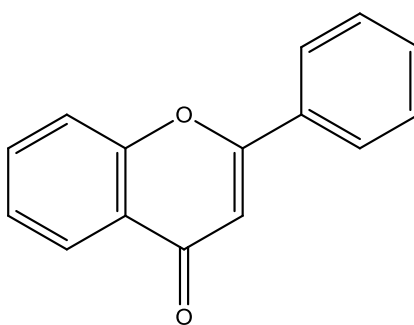
Untuk biosintesis flavonoid dapat diperoleh dengan cara mereaksikan fragmen C6-C3 turunan asam sikimat seperti asam p-hidroksisinamat dengan enam atom karbon. Untuk skema biosintesis pada flavonoid dari turunan asam sikimat, meliputi : asam sikimat → asam p-fenat → asam p-hidroksifenil piruvat → asam p idroksifenillaktat → asam p-hidroksisinamat → flavonon. Pada proses hidroksilasi pada cincin A dan B terjadi setelah pembentukan cincin sempurna (Marjoni, 2016).

b. Sifat Fisik Flavonoid

Menurut . (Tiang-Yang dkk, 2018) Senyawa flavonoid merupakan senyawa polifenol yang mempunyai 15 atom karbon yang tersusun dalam konfigurasi C6-C3-C6, artinya kerangka karbonnya terdiri atas dua gugus C6 (cincin benzena

tersubstitusi) disambungkan oleh rantai alifatik tiga karbon (Arifin & Ibrahim, 2018).

Menurut (Hui Cao, 2015) Flavonoid ditemukan pada tanaman, yang berkontribusi memproduksi pigmen berwarna kuning, merah, oranye, biru, dan warna ungu dari buah, bunga, dan daun. Flavonoid termasuk dalam famili polifenol yang larut dalam air (Arifin & Ibrahim, 2018).



Sumber : (Alfaridz & Amalia, 2018)

Gambar 2.2 Struktur Senyawa Flavanoid

Flavonoid yaitu kelompok dengan berat molekul rendah berbasis inti 2-fenil-kromon. Merupakan biosintesis dari turunan asam asetat/ fenilalanin dengan menggunakan jalur asam shikimat. Flavonoid diklasifikasikan dengan tingkat oksidasi, annularitas cincin C, dan sambungan posisi cincin B (Arifin & Ibrahim, 2018).

Flavon dan flavonol mengandung senyawa dengan jumlah terbesar. Kategori 2-benzoyl-pyrone mewakili sebagian kecil flavonoid. Quercetin golongan flavonol misalnya, telah dipelajari paling banyak biasanya. Flavanon dan flavanonol memiliki ikatan jenuh C, dan sering ditemukan dengan flavon dan flavonol pada tanaman. Isoflavon, seperti daidzein, adalah senyawa 3-fenil-kromon. Sebagai prekursor utama biosintesis flavonoid, kalcon adalah isomer

pembuka cincin C dari dihydroflavon, bertanggung jawab untuk tampilan warna tanaman. Struktur flavonoid, auronas adalah cincin C beranggota 5 turunan benzofuran. Anthocyanidin adalah kelompok yang penting pigmen chromen untuk karakteristik warna tanaman, ada dalam bentuk ion. Flavanol adalah produk reduksi dari dihydroflavonols, terutama dengan flavan-3-ol yang terdistribusi pada kerajaan tumbuhan, juga dikenal sebagai katekin. Namun, masih ada flavonoid lain tanpa kerangka C6-C3-C6, misalnya, biflavon, kromon, furan dan xanthon. Glikosida, dengan kategori penghubung yang berbeda, yang mendominasi bentuk flavonoid yang ada. Pilihan sisi glikosilasi dikaitkan dengan struktur aglycones C2 = C3 (Arifin & Ibrahim, 2018).

Beberapa subkelas flavonoid antara lain flavanols, flavanon, flavon, isoflavon, anthocyanidins, dan flavonol. Subkelas dalam flavonoid didasarkan oleh sifat-sifat struktural. Flavanol ditemukan dalam anggur merah dan anggur merah (ex-catechins), flavanon ditemukan pada makanan sitrus (ex-narigenin), flavon (exapigenin) ditemukan dalam bumbu berdaun hijau, isoflavon ditemukan pada makanan kedelai. Hampir semua makanan senyawa flavonol ditemukan. Terutama pada senyawa katekin dari flavonoid banyak ditemukan pada teh hijau dan hitam dan anggur merah, sedangkan antosianin ditemukan pada stroberi dan buah beri lainnya, anggur dan teh (Arifin & Ibrahim, 2018).

Ekstrak sampel yang terdapat senyawa flavonoid, setelah dilakukan penambahan H_2SO_4 terbentuk garam flavilium berwarna hijau kehitaman dengan metode Lieberman Burchard yang menghasilkan senyawa kalcon (Kurang & Adang, 2018). Pada penambahan logam Mg dan HCl akan terbentuk garam

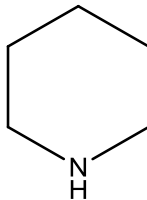
flavilium berwarna merah atau jingga. Penambahan HCl pekat dalam uji flavonoid pada metode Wilstater. Di maksudkan untuk menghidrolisis flavonoid menjadi aglikonnya, yaitu denganmenghidrolisis O-glikosil. Glikosil akan tergantikan oleh H^+ dari asam karena sifatnya yang elektrofilik (Latifah, 2015).

Glikosida berupa gula yang biasa dijumpai yaitu glukosa, galaktosa dan ramnosa. Reduksi dengan Mg dan HCl pekat ini menghasilkan senyawa kompleks yang berwarna merah atau jingga pada flavonol, flavanon, flavanonol dan xanton (Mariana, 2013). Flavonoid memiliki kemampuan sebagai antioksidan yang mampu mentransfer sebuah elektron atau sebuah atom hidrogen ke senyawa radikal bebas dengan menghentikan tahap awal reaksi. Oleh karena itu, flavonoid dapat menghambat peroksidasi lipid, menekan kerusakan jaringan oleh radikal bebas dan menghambat beberapa enzim (Latifah, 2015).

2.3.2 Alkaloid

Alkaloid adalah suatu golongan senyawa organik yang banyak ditemukan di alam. Hampir seluruh senyawa alkaloid berasal dari tumbuh-tumbuhan dan tersebar luas dalam berbagai jenis tumbuhan. Semua alkaloid mengandung paling sedikit satu atom nitrogen yang biasanya bersifat basa dan dalam sebagian besar atom nitrogen ini merupakan bagian dari cincin heterosiklik. Penggolongan alkaloid dilakukan berdasarkan sistem cincinnya, misalnya piridina, piperidina, indol, isokuinolina, dan tropana. Senyawa ini biasanya terdapat dalam tumbuhan sebagai garam berbagai senyawa organik dan sering ditangani di laboratorium

sebagai garam dengan asam hidroklorida dan asam sulfat. Struktur dasar senyawa alkaloid (Latifah, 2015), sebagai berikut :



Sumber : (Latifah, 2015)

Gambar 2.3 Struktur Senyawa Alkaloid

Ekstrak yang positif alkaloid akan membentuk endapan jingga dengan reagen Dragendorff dan membentuk endapan putih dengan reagen Meyer. Endapan yang terbentuk karena adanya pembentukan senyawa kompleks antara ion logam dari reagen dengan senyawa alkaloid. Prinsip uji alkaloid pada dasarnya adalah pengendapan alkaloid dengan logam-logam berat. Pereaksi Dragendorff digunakan untuk mendeteksi adanya alkaloid dikarenakan pereaksi ini mengandung bismut yang merupakan logam berat atom tinggi. Alkaloid adalah senyawa yang tersusun dari atom nitrogen yang Pasangan Elektron Bebas (PEB) yang dapat digunakan untuk membentuk ikatan kovalen koordinat dengan ion logam (Latifah, 2015).

2.3.3 Terpenoid/ Steroid

Steroid atau sterol adalah triterpenoid yang mempunyai bentuk dasar siklopentana perhidrofenantren yang biasanya larut dalam pelarut yang kurang polar. Semua sterol diduga hanya pada binatang, namun sekarang telah diketahui bahwa sterol juga terdapat dalam tumbuhan (fitosterol). Triterpenoid adalah senyawa yang kerangka karbonnya berasal dari 6 satuan isoprena dan secara

biosintesis diturunkan dari hidrokarbon C_{30} asiklik yaitu skualena. Senyawa ini berstruktur siklik yang kebanyakan berupa alkohol, aldehida, atau asam karboksilat (Latifah, 2015).

Senyawa ini paling umum ditemukan pada tumbuhan berbiji, bebas dan sebagai glikosida. Triterpenoid yang paling penting dan paling tersebar luas adalah triterpenoid pentasiklik. Triterpenoid tertentu dikenal karena rasanya, terutama kepahitannya. Senyawa triterpenoid/steroid dapat mengalami dehidrasi dengan penambahan asam kuat dan membentuk garam yang memberikan sejumlah reaksi warna (Latifah, 2015).

2.3.4 Saponin

Saponin merupakan senyawa glikosida kompleks dengan berat molekul tinggi yang dihasilkan terutama oleh tanaman, hewan laut tingkat rendah dan beberapa bakteri. Saponin larut dalam air tetapi tidak larut dalam eter. Sifat yang khas dari saponin antara lain berasa pahit, berbusa dalam air dan beracun bagi binatang berdarah dingin (Latifah, 2015). Pada uji saponin positif bila ditambahkan dengan aquades panas akan terbentuk busa/buih selama 15 menit. Timbulnya busa menunjukkan adanya glikosida yang mempunyai kemampuan membentuk buih dalam air yang terhidrolisis menjadi glukosa dan senyawa lainnya (Latifah, 2015).

2.3.5 Tanin

Tanin merupakan zat organik yang sangat kompleks dan terdiri dari senyawa fenolik. Tanin terdiri dari sekelompok zat – zat kompleks yang terdapat secara meluas dalam dunia tumbuh–tumbuhan, antara lain terdapat pada bagian

kulit kayu, batang, daun dan buah–buahan. Ada beberapa jenis tumbuhan yang mengandung senyawa tanin antara lain : tanaman pinang, tanaman akasia, gabus, bakau, pinus, pepaya dan gambir (Latifah, 2015).

Tanin apabila direaksikan dengan FeCl_3 akan membentuk warna hijau. Terjadinya pembentukan warna hijau ini karena terbentuknya senyawa kompleks antara logam Fe dan tanin. Senyawa kompleks terbentuk karena adanya ikatan kovalen koordinasi antara ion atau atom logam dengan atom nonlogam (Latifah, 2015).

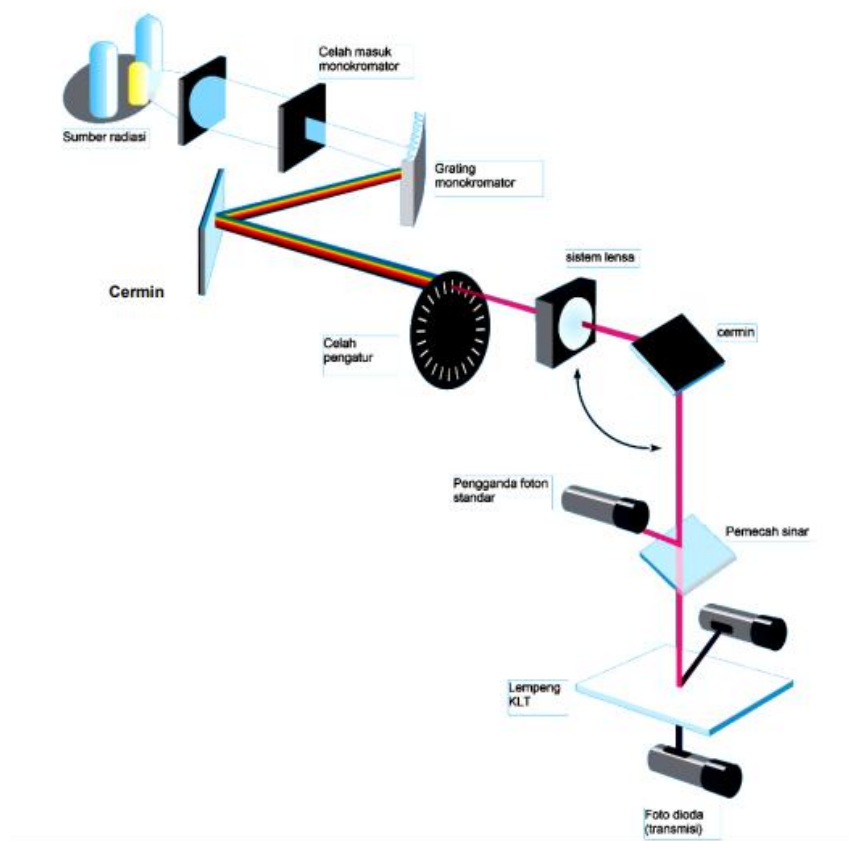
2.4 Tinjauan Kromatografi Lapis Tipis (KLT)

2.4.1 Kromatografi Lapis Tipis (KLT)

KLT merupakan metode kromatografi paling sederhana yang banyak digunakan. Peralatan dan bahan yang diperlukan untuk pelaksanaan pemisahan dan analisis sampel dengan menggunakan metode KLT cukup sederhana yaitu hanya dengan menggunakan sebuah bejana tertutup (chamber) yang didalamnya berisi pelarut dan lempeng KLT. Dengan adanya optimasi metode dan penggunaan instrumen komersial yang tersedia, pada saat dilakukannya pemisahan akan efisien dan kuantifikasi dapat mencapai akurat (L. Wulandari, 2011).

Pada pelaksanaan analisis dengan menggunakan KLT yaitu diawali dengan menotolkan alikuot kecil suatu sampel pada salah satu ujung fase diam (lempeng KLT) untuk membentuk zona awal. Kemudian sampel dikeringkan. Pada ujung fase diam yang terdapat zona awal dicelupkan ke dalam fase gerak (pelarut

tunggal ataupun campuran dua sampai empat pelarut murni) di dalam chamber (L. Wulandari, 2011).



Gambar 2.4 Skema sistem optik Densitometer (CAMAG)

Jika fase diam dan fase gerak dipilih dengan benar maka campuran komponen-komponen sampel akan bermigrasi dengan kecepatan yang berbeda selama pergerakan fase gerak melalui fase diam. Hal ini disebut dengan pengembangan kromatogram. Ketika fase gerak telah bergerak sampai jarak yang diinginkan maka fase diam diambil. Untuk fase gerak yang terjebak dalam lempeng dikeringkan, dan zona yang dihasilkan dideteksi secara langsung visual (Vis) di bawah sinar ultraviolet (UV) baik dengan atau tanpa suatu penambahan pereaksi penampak noda yang cocok (L. Wulandari, 2011).

Perbedaan migrasi adalah suatu hasil dari perbedaan tingkat afinitas pada masing-masing komponen dalam fase diam dan fase gerak. Untuk berbagai mekanisme pemisahan yang terlibat dalam penentuan kecepatan migrasi. Pada kecepatan migrasi komponen sampel tergantung pada sifat fisika kimia dari fase diam, fase gerak dan komponen sampel. Kemudian, untuk retensi dan selektivitas kromatografi juga ditentukan oleh interaksi antara fase diam, fase gerak dan komponen sampel yang berupa ikatan hidrogen, pasangan elektron donor atau pasangan elektron-akseptor (transfer large), ikatan ion-ion, ikatan ion-dipol, dan ikatan van der Waals (L. Wulandari, 2011).

Pada pengambilan sampel, pengawetan, dan pemurnian sampel akan menjadi masalah umum pada KLT dan metode kromatografi lainnya. KLT juga dapat mengatasi sampel yang terkontaminasi, untuk seluruh kromatogram dapat dievaluasi dan dapat mempersingkat proses perlakuan sampel sehingga dapat menghemat waktu dan biaya. Kehadiran pengotor atau partikel yang terjerap dalam sorben fase diam tidak menjadi masalah, karena lempeng hanya digunakan sekali (habis pakai) (L. Wulandari, 2011).

Untuk deteksi senyawa menjadi mudah ketika senyawa secara alami dapat berwarna atau berfluoresensi atau menyerap sinar UV. Namun, untuk perlakuan penambahan pereaksi penampak noda dengan penyemprotan atau pencelupan terkadang diperlukan dan untuk dapat menghasilkan turunan senyawa yang berwarna atau berfluoresensi. Umumnya senyawa aromatik terkonjugasi dan beberapa senyawa tak jenuh dapat menyerap sinar UV. Senyawa-senyawa ini dapat dianalisis dengan KLT dengan fase diam yang diimpregnasi indikator

fluoresensi dan deteksi dapat dilakukan hanya dengan pemeriksaan di bawah sinar UV 254 nm (L. Wulandari, 2011).

Pada metode KLT ini, identifikasi awal suatu senyawa didasarkan pada perbandingan nilai R_f yang dibandingkan dengan R_f standar. Nilai R_f biasanya tidak sama dari laboratorium ke laboratorium. Bahkan pada waktu analisis yang berbeda dalam laboratorium yang sama perlu dipertimbangkan penggunaan R_f relatif yaitu nilai R_f yang terdapat pada suatu noda senyawa dibandingkan dengan noda senyawa lain dalam lempeng yang sama. Faktor-faktor yang menyebabkan nilai R_f bervariasi meliputi dimensi, jenis ruang, sifat, ukuran lempeng, arah aliran fase gerak, volume, komposisi fase gerak, kondisi kesetimbangan, kelembaban, dan metode persiapan sampel KLT sebelumnya (L. Wulandari, 2011).

Faktor retardasi (*Retardation faktor*= R_f) merupakan parameter yang digunakan untuk menggambarkan migrasi senyawa dalam KLT. Nilai R_f merupakan parameter yang menyatakan posisi noda pada fase diam setelah dielusi. Penentuan harga R_f analit, yaitu dengan membandingkan jarak migrasi noda analit dengan jarak migrasi fase gerak/eluen (Wulandari, 2011).

$$R_f : \quad \frac{\text{Jarak migrasi noda analit}}{\text{Jarak migrasi fase gerak / eluen}}$$

$$\text{Jarak migrasi fase gerak / eluen}$$

Konfirmasi identifikasi dapat diperoleh dengan mengerok noda dalam lempeng kemudian analit dalam lempeng dielusi dan dideteksi dengan spektrometri inframerah (IR), spektrometri Nuclear magnetic resonance (NMR), spektrometri massa, atau metode spektrometri lainnya, jika senyawa hasil elusi

cukup tersedia. Metode identifikasi ini juga dapat digunakan untuk menandai zona langsung pada lapisan (in situ) (L. Wulandari, 2011).

Nilai R_f merupakan suatu perilaku senyawa individu dalam KLT yang dicirikan oleh besaran yang dikenal sebagai R_f dan dapat disebut dengan pecahan desimal. R_f dihitung dengan membagi jarak tempuh senyawa dari posisi semula dengan jarak tempuh pelarut dari posisi semula (depan pelarut) (L. Wulandari, 2011).

$$R_f : \frac{\text{Jarak yang ditempuh zat terlarut}}{\text{Jarak yang ditempuh oleh fase gerak}}$$

Jarak yang ditempuh oleh fase gerak

Angka R_f berjangka antara 0,00 dan 1,00 dan hanya dapat ditentukan dua desimal (Umullia, 2017). Nilai R_f sendiri merupakan konstanta untuk setiap komponen yang hanya dalam kondisi percobaan yang identic. Nilai R_f berkisar antara 0 hingga 1 dan nilai R_f terbaik antara 0,2- 0,8 untuk deteksi UV dan 0,2- 0,9 untuk deteksi visibel serta 20-80 untuk R_f relatif pada deteksi UV. Pada R_f kurang 0,2 belum terjadi kesetimbangan antara komponen senyawa dengan fase diam dan fase gerak sehingga bentuk noda biasanya kurang simetris (L. Wulandari, 2011).

Sedangkan pada R_f diatas 0,8 noda analit akan diganggu oleh absorbansi pengotor lempeng fase diam yang teramati pada visualisasi dengan lampu UV. Sedangkan pada deteksi visibel R_f dapat lebih tinggi dari deteksi UV, hal ini disebabkan pengotor fase diam tidak bereaksi dengan penampak noda sehingga noda yang berada pada R_f 0,2 – 0,9 masih dapat diamati dengan baik. Dengan mengontrol kondisi pengembangan seperti kejenuhan chamber, komposisi

campuran pelarut yang konstan, temperatur konstan dan lain-lain akan didapat nilai R_f yang reproduibel (L. Wulandari, 2011).

2.4.2 Tujuan Penggunaan Kromatografi Lapis Tipis (KLT)

Tujuan penggunaan Kromatografi lapis tipis, yaitu :

- a. Digunakan untuk dapat mencapai hasil kualitatif, kuantitatif dan preparasi.
- b. Digunakan untuk sistem pelarut yang akan dipakai dalam kromatografi kolom.

Pada penggunaan Kromatografi Lapis Tipis, fase diam pada metode ini yang digunakan yaitu zat padat yang disebut absorben (penyerap) dan untuk fase gerak yang digunakan merupakan zat cair yang disebut dengan larutan pengembang (Marjoni, 2016).

2.4.3 Metode Optimasi

Pada pengembangan metode analisis, perlu dilakukan optimasi metode analisis untuk menghasilkan kondisi yang ideal. Setelah suatu metode analisis dioptimasi dan berbagai variabel yang akan ditentukan telah disesuaikan dengan kriteria atau parameter yang diharapkan, metode analisis selanjutnya divalidasi untuk memastikan bahwa metode analisis sesuai dengan tujuannya (Arikalang, Sudewi dan Rorong, 2018). Berikut beberapa parameter yang dapat digunakan untuk menentukan optimasi sistem KLT :

- a. Log P merupakan nilai koefisien partisi. Pemisahan berdasarkan polaritas dibutuhkan nilai koefisien partisi. Nilai koefisien partisi pada analit digunakan untuk menentukan afinitas analit terhadap fase diam dan fase gerak (L. Wulandari, 2011).

- b. Nilai K merupakan kecepatan migrasi pelarut melewati lempeng silika gel, yang berhubungan dengan lamanya waktu pengembangan KLT. Semakin besar nilai K semakin cepat waktu pengembangan KLT (L. Wulandari, 2011).
- c. Retardasi Faktor (Rf) merupakan nilai dari jarak perpindahan senyawa dari titik penotolan dibagi dengan jarak perpindahan fase gerak/ pelarut (L. Wulandari, 2011).
- d. Resolusi (Rs) merupakan ukuran pemisahan dari dua puncak yang berdekatan dapat diukur dengan persamaan (L. Wulandari, 2011):

$$Rs = \frac{(Z2 - Z1)}{0,5 \times (W1 + W2)}$$

Z1: spot senyawa 1

Z2: spot senyawa 2

W1: diameter spot senyawa 1

W2: diameter spot senyawa 2

Nilai resolusi ≥ 1.5 dapat menunjukkan pemisahan dua puncak yang baik.

- e. Effisiensi (N) adalah keruncingan puncak dibandingkan panjang waktu dari senyawa kontak dengan fase diam. Dalam analisis menggunakan KLT Densitometri diperlukan puncak yang simetris (L. Wulandari, 2011).
- f. Nilai HETP (*height equivalent of teoritical plate*) atau JSTP (Jarak Setara Pelat Teori) merupakan panjang jarak tempuh eluen yang dibutuhkan sampai terjadinya satu kali kesetimbangan dalam fase gerak dan fase diam (L. Wulandari, 2011).

- g. Nilai Standar deviasi (SD) merupakan nilai statistik yang dimanfaatkan untuk menentukan bagaimana sebaran data dalam sampel, serta seberapa dekat titik data individu ke mean atau rata-rata nilai sampel (Swarjana, 2022).
- h. Standar deviasi relatif (RSD) merupakan ukuran ketepatan relatif dan umumnya dinyatakan dalam persen. RSD merupakan digunakan untuk melihat tingkat ketelitian suatu metode (Heri Sismoro, 2013).

2.4.4 Sistem Kromatografi Lapis Tipis (KLT)

a. Fase diam

Fase diam adalah lapisan tipis yang terdiri dari bahan padat yang dilapiskan pada permukaan penyangga datar dengan bantuan bahan pengikat. Terdapat beberapa bahan yang digunakan sebagai fase diam dalam kromatografi lapis tipis diantara silika gel, alumina, kieselguhr dan selulosa. Fase diam harus mengandung air sekecil mungkin, karena air akan menempati semua titik penyerapan sehingga tidak akan ada senyawa yang melekat. Sebelum digunakan, plat KLT sebaiknya diaktifkan terlebih dahulu dengan cara pemanasan pada suhu 110°C selama 30 menit (Marjoni, 2016).

Fase diam yang digunakan merupakan fase diam dengan sistem fase normal. Fase normal adalah suatu sistem kromatografi yang menggunakan fase diam yang bersifat lebih polar dibanding fase gerak (Rosamah, 2014). Fase diam yang digunakan adalah silika gel F₂₅₄ yang bersifat polar dan berfosforesensi pada UV 254 nm. F pada F₂₅₄ berarti fosforesensi, menunjukkan adanya indikator fosforesensi anorganik sehingga pada panjang gelombang 254 nm fase diam ini

akan berfosforesensi. Fase diam berupa silika gel 60 F₂₅₄ mempunyai makna yaitu plat memiliki ukuran pori – pori 60Å dan simbol F₂₅₄ menunjukkan bahwa plat dapat berfluorosensi dibawah sinar ultraviolet pada panjang gelombang 254 nm (L. Wulandari, 2011).

b. Fase gerak

Fase gerak terdiri dari satu hingga beberapa pelarut dan apabila diperlukan dapat menggunakan sistem pelarut campur. Maka, untuk memisahkan senyawa-senyawa organik, biasanya selalu digunakan pelarut campuran untuk dapat memperoleh sistem pengembangan yang cocok sehingga hasil pemisahan senyawa menjadi lebih baik (Marjoni, 2016). Pada pemilihan eluen fase gerak yang digunakan untuk optimasi fase gerak mempunyai nilai *theoretical plate number* (N) paling besar, nilai *height equivalent a theoretical plate* (HETP) paling kecil, nilai resolusi (Rs) > 1,5 dan dapat menghasilkan puncak kromatogram yang simetris (L. Wulandari, 2011).

2.5 Densitometri

Densitometri adalah metode analisis instrumental untuk menentukan analit secara kualitatif maupun kuantitatif berdasarkan interaksi radiasi elektromagnetik (REM) dengan noda analit pada fase diam KLT. Metode ini biasa disebut metode KLT-Densitometri. Metode lainnya yang umum digunakan adalah KLT-Densitometri, di mana parameter kuantitatif yang digunakan adalah tinggi puncak kurva densitometri dan area di bawah puncak kurva densitometri (L. Wulandari, 2011).

Mode densitometer ada dua yaitu mode reflektan (remisi) dan transmitan. Mode reflektan bisa digunakan pada rentang spektral UV/Vis, fluoresensi dan peredaman fluoresensi. Spektral visual (400-800 nm) menggunakan lampu halogen dan tungsten, sedangkan pada spektral UV (190-400 nm) menggunakan lampu deuterium dan xenon. Untuk spektral fluoresensi digunakan lampu merkuri (L. Wulandari, 2011).

Untuk menentukan kualitatif analit KLT-Densitometri dilakukan dengan cara membandingkan nilai R_f analit dan standart. Noda analit yang memiliki R_f sama dengan standar diidentifikasi kemurnian analitnya dengan cara membandingkan spektrum densitometri analit dan standart. Sedangkan untuk menentukan kuantitatif analit dilakukan dengan cara membandingkan luas area noda analit dengan luas area noda standart pada fase diam yang diketahui konsentrasinya atau menghitung densitas noda analit dan membandingkannya dengan densitas noda standart (L. Wulandari, 2011).

Apabila pada fase diam tidak ada noda, maka cahaya yang jatuh akan dipantulkan kembali. Namun, jika cahaya tersebut dijatuhkan pada plat yang terdapat noda dari suatu senyawa, maka sebagian cahaya akan diserap dan intensitas yang dipantulkan akan berbeda dengan intensitas cahaya yang datang. Sumber radiasi yang digunakan dapat dipilih yaitu sinar UV (lampu deuterium), sinar VIS (lampu tungsten) dan sinar fluoresensi (lampu merkuri). (L. Wulandari, 2011).

Sinar yang dipancarkan berupa sinar polikromatik masuk melewati celah monokromator. Dalam monokromator sinar didispersikan menjadi sinar

monokromatik dengan teknik grating. Sinar monokromatik dengan panjang gelombang terpilih keluar melalui celah keluar monokromator. Sinar monokromatik dengan panjang gelombang terpilih dipantulkan melalui cermin sehingga mengenai objek (lempeng KLT). Sinar yang datang dapat direfleksikan maupun diteruskan. Sinar yang direfleksikan atau diteruskan ditangkap oleh pengganda foton (photomultiplier) berfungsi menggandakan sinar yang datang sehingga dihasilkan elektron yang terbaca oleh sistem komputer sebagai data output (L. Wulandari, 2011).

Interaksi radiasi elektromagnetik (REM) adalah intensitas cahaya yang mengenai molekul senyawa dalam noda. Interaksi radiasi elektromagnetik dengan noda pada fase diam KLT menentukan intensitas cahaya yang diabsorpsi, ditransmisi, dipantulkan (refleksi) oleh noda analit dari intensitas REM semula. Metode langsung untuk analisa kuantitatif yang sederhana berupa perbandingan visual intensitas noda jumlah sampel dengan noda standar yang dikembangkan secara bersamaan. Metode ini biasa disebut metode ekstraksi noda meliputi tahapan pengeringan lempeng, penandaan noda analit, memotong bagian lempeng yang mengandung analit, mengumpulkan sorben, ekstraksi analit dari sorben, dan pengukuran dengan dibandingkan standar secara mikroanalitikal, seperti absorpsi larutan atau spektrofotometri fluoresensi (L. Wulandari, 2011).

Metode kuantifikasi ekstraksi noda biasanya memakan waktu lama, dan sering tidak akurat. Hal ini disebabkan sulitnya menentukan penempatan lingkaran noda secara tepat, hilangnya sorben selama pemotongan dan pengumpulan, ekstraksi kurang reproduibel dan tidak sempurna dari sorben.

Maka dari itu metode yang umum digunakan adalah KLT-Densitometri dengan parameter kuantitatif yang digunakan adalah tinggi puncak kurva densitometri dan area di bawah puncak kurva densitometri (L. Wulandari, 2011).

Pada mode densitometer ada dua mode di antaranya, mode reflektan (remisi) dan transmitan. Mode reflektan bisa digunakan pada rentang spektral UV-Vis, fluoresensi dan peredaman fluoresensi. Spektral visual (400-800 nm) menggunakan lampu halogen dan tungsten, sedangkan pada spektral UV (190-400 nm) menggunakan lampu deuterium dan xenon. Untuk spektral fluoresensi digunakan lampu merkuri (L. Wulandari, 2011).

Metode Densitometri memiliki kelebihan yaitu spesifikasi yang tinggi, hasil yang didapatkan dapat dipercaya, dapat dilakukan dengan mudah serta cepat, fase gerak yang dipilih dapat menghasilkan fleksibilitas besar, optimasi pemisahan dapat dilakukan dengan beragam teknik. Dengan metode KLT-Densitometri akan divalidasi sehingga memperoleh hasil yang dapat dipertanggungjawabkan cukup valid jika semua factor telah terpenuhi (L. Wulandari, 2011).

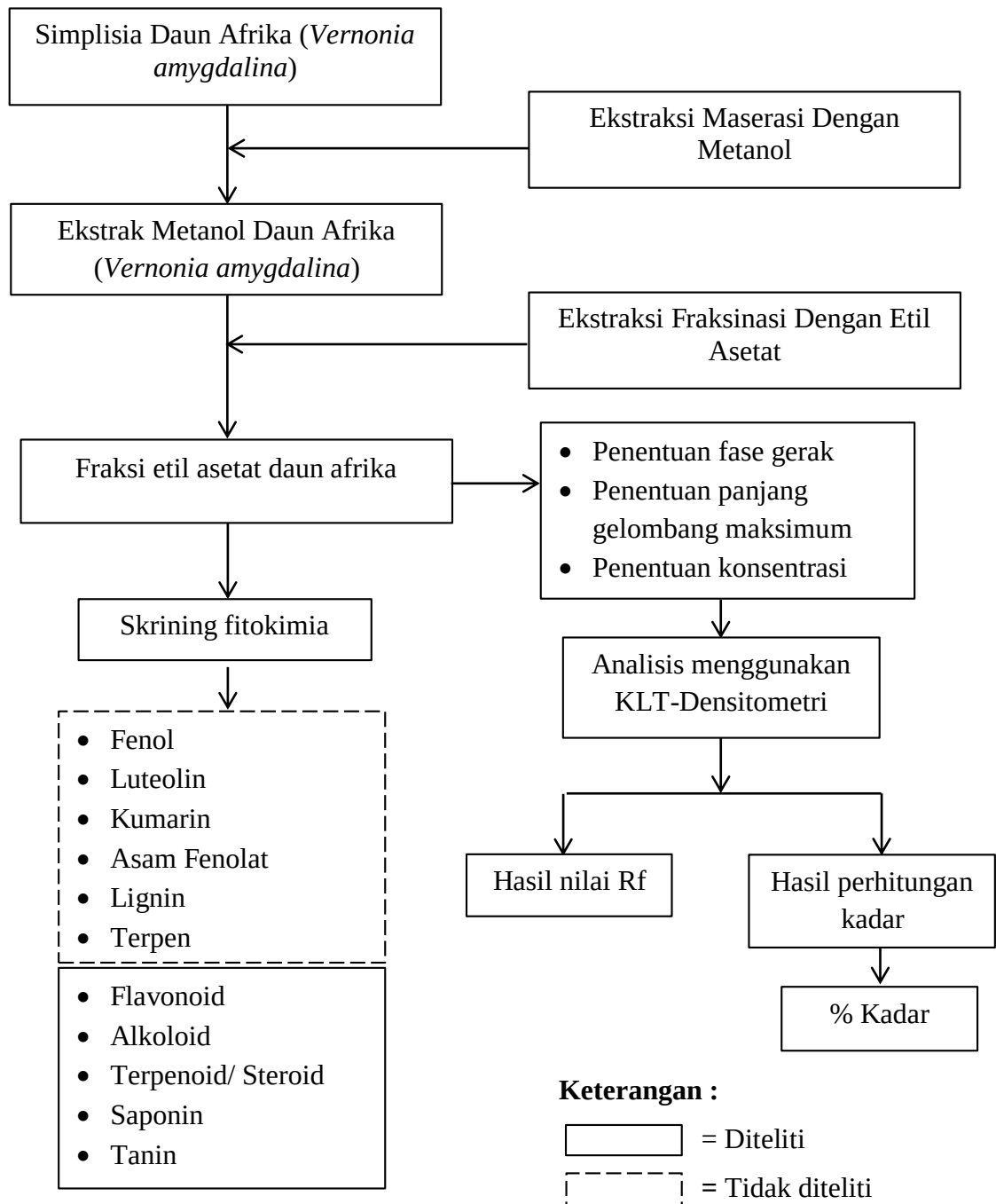
Data yang didapat dari analisis instrumen densitometer disubstitusikan ke dalam persamaan regresi linier $y = bx + a$ yang digunakan untuk membandingkan kurva kalibrasi dan hasil yang didapat dinyatakan dalam %b/b. Dimana x adalah kadar senyawa kimia pada sampel dan y adalah luas area yang diperoleh dari analisis dengan instrumen CAMAG TLC *Scanner 4* densitometri. Kurva kalibrasi dari 5 titik menghasilkan garis linear daerah uji. Nilai regresi yang didapat kemudian digunakan untuk perhitungan kadar senyawa kimia pada sampel.

Pengujian penetapan kadar ini menggunakan instrument CAMAG TLC *Scanner* 4 sebagai densitometer untuk melakukan analisis (L. Wulandari, 2011).

Hasil kurva baku digunakan untuk mendapatkan persamaan regresi linier yang selanjutnya digunakan untuk menghitung kadar senyawa kimia pada sampel. Pada pengujian dilakukan pengujian kualitatif dan kuantitatif menggunakan *TLC densitometry scanner* 4. Prinsip instrumen *TLC densitometry scanner* 4 mempunyai kerapatan kromatogram senyawa uji yang dipisahkan diukur dan dibandingkan dengan kerapatan kromatogram senyawa standar yang dielusi bersama-sama (L. Wulandari, 2011).

BAB III KERANGKA KONSEP

3.1 Kerangka Konsep



Gambar 3.1 Kerangka Konsep

3.2 Hipotesis Penelitian

Hipotesis merupakan jawaban sementara terhadap masalah yang menjadi objek dalam penelitian. Berdasarkan kerangka konseptual diatas, maka yang menjadi hipotesis adalah :

H1 : Terdapat kadar flavonoid total pada fraksi etil asetat daun afrika (*Vernonia amygdalina*) pada analisis penetapan yang menggunakan KLT- Densitometri.

BAB IV METODE PENELITIAN

4.1 Design Penelitian

Design penelitian adalah suatu tahapan rencana kerja yang harus dilalui atau dibuat oleh seorang peneliti agar penelitian yang akan dilakukan dapat terlaksana sesuai dengan tujuan yang akan dicapai (Mulyadi, 2012). Jenis penelitian yang dilakukan adalah penelitian True Experimental Laboratories yang merupakan penelitian yang dilakukan di laboratorium.

4.2 Populasi dan Sampel

4.2.1 Populasi

Sugiyono (2018:130) mengartikan populasi sebagai wilayah generalisasi yang terdiri atas obyek/subyek yang mempunyai kualitas dan karakteristik tertentu yang ditetapkan oleh peneliti untuk dipelajari dan kemudian ditarik kesimpulannya (Imron, 2019).

Populasi pada penelitian ini adalah seluruh tanaman daun Afrika (*Vernonia amygdalina*) yang berwarna hijau pekat dengan permukaan daun kasar. warna cabang daun Afrika berwarna hijau dan sedikit berwarna cokelat ketika telah tua. Tanaman daun Afrika ini diperoleh dari sekitar daerah Sumenep, Madura (Solikhah, 2021).

4.2.2 Sampel

Sugiyono (2018:131) mengemukakan bahwa sampel adalah bagian dari jumlah dan karakteristik yang dimiliki oleh populasi tersebut (Imron, 2019).

Sampel yang digunakan dalam penelitian ini berupa simplisia dengan potongan kecil (cacahan) dari daun Afrika (*Vernonia amygdalina*) berusia tua,

segar berwarna hijau pekat dengan permukaan daun kasar. warna cabang daun Afrika berwarna hijau dan sedikit berwarna coklat ketika telah tua. Sampel daun Afrika yang digunakan untuk penelitian ini telah melalui proses pengolahan simplisia yang diperoleh dari daerah Sumenep, Madura. Jumlah simplisia yang disiapkan sekitar kurang lebih 1 kg simplisia daun afrika (Solikhah, 2021).

4.3 Determinasi Tanaman Daun Afrika (*Vernonia amygdalina*)

Determinasi adalah membandingkan suatu tumbuhan dengan satu tumbuhan lain yang sudah dikenal sebelumnya (dicocokkan atau dipersamakan), sehingga dapat menghindari kesalahan dalam pengumpulan bahan yang akan diteliti (Suroso, 2016).

Determinasi tumbuhan yaitu dilakukan di Laboratorium Politeknik Negeri Jember dengan membawa semua bagian dari tanaman daun afrika (*Vernonia amygdalina*). Determinasi ini bertujuan untuk mengetahui dan memastikan bahwa tanaman yang digunakan benar – benar spesies dari *Vernonia amygdalina* dari famili asteraceae (Suroso, 2016).

4.4 Variabel Penelitian

4.4.1 Variabel Bebas

Variabel ini sering disebut variabel stimulus, prediktor, antecedent. Dalam bahasa indonesia disebut sebagai variabel bebas. Variabel bebas merupakan variabel yang mempengaruhi atau yang menjadi sebab perubahannya atau timbulnya variabel dependen (terikat). Variabel ini biasa disebut juga variabel eksogen (Ridha, 2017).

Variabel bebas pada penelitian ini adalah optimasi kondisi analisis menggunakan KLT- densitometri dan fraksi etil asetat daun afrika.

4.4.2 Variabel Terikat

Variabel dependen disebut juga variabel output, kriteria, konsekuen. Dalam bahasa Indonesia disebut variabel terikat. Variabel terikat merupakan variabel yang dipengaruhi atau yang menjadi akibat, karena adanya variabel bebas. Variabel terikat juga disebut variabel endogen (Ridha, 2017). Variabel terikat pada penelitian ini adalah penetapan kadar flavonoid total.

4.4.3 Variabel Terkendali

Variabel control (Terkendali) adalah variabel yang dikendalikan atau dibuat konstan sehingga hubungan variabel independen terhadap dependen tidak dipengaruhi oleh faktor luar yang tidak diteliti. Variabel kontrol sering digunakan, bila akan melakukan penelitian yang bersifat membandingkan, melalui penelitian eksperimen (Ridha, 2017).

Variabel terkendali pada penelitian ini adalah determinasi tanaman daun afrika (*Vernonia amygdalina*), metode ekstraksi serbuk simplisia daun afrika (*Vernonia amygdalina*) dan identifikasi skrining uji fitokimia.

4.5 Lokasi dan Waktu Penelitian

Lokasi penelitian dilaksanakan dalam Laboratorium Biologi Farmasi Universitas dr. Soebandi Jember untuk melaksanakan proses ekstraksi atau pengolahan sampel daun afrika (*Vernonia amygdalina*) dan dilanjutkan menggunakan Laboratorium Kimia Farmasi Universitas dr Soebandi Jember. Untuk waktu penelitian akan dilakukan mulai bulan Januari – Agustus 2022.

4.6 Definisi Operasional

Menurut (Sugiyono, 2014:96) definisi operasional adalah suatu atribut atau sifat atau nilai dari obyek atau kegiatan yang memiliki variasi tertentu yang ditetapkan oleh peneliti untuk dipelajari dan kemudian ditarik kesimpulannya (Lestari., 2016).

Tabel 4.1 Definisi Operasional Variabel

Variabel	Pengertian	Cara Ukur	Alat Ukur	Skala	Hasil
Optimasi kondisi analisis menggunakan KLT-Densitometri	Analisis yang memiliki kepekaan tinggi untuk menganalisis senyawa yang dideteksi dengan memperhatikan teknik penotolan pada suatu ekstrak. volume ekstrak yang ditotolkan dalam jumlah yang sama.	a. Penentuan fase gerak menggunakan toluene : etil asetat : asam glasial (6:4:0,5) v/v/v b. Penentuan panjang gelombang 250-450 nm menggunakan KLT-Densitometri c. Penentuan konsentrasi 100, 200, 300, 400, dan 500 ppm	KLT-Densitometri, Gelas Ukur dan Pipet Ukur	Ratio	Satuan hasil ukur optimasi dinyatakan dalam ppm.
Fraksinasi etil asetat daun afrika	Fraksinasi adalah metode ekstraksi yang bertujuan untuk mendapatkan ekstrak yang lebih murni dan merupakan metode pemisahan pada	Hasil maserasi ekstrak metanol daun afrika kental disuspensi dengan metanol : air (1:1). Selanjutnya, di gunakan pelarut etil asetat : n-heksan (8:2)	Pelarut	Ratio	Nilai % rendemen ekstrak kental

	senyawa metabolik tunggal dan dapat pula menghilangkan senyawa-senyawa lain yang mengotori atau mengganggu.	dengan ditambahkan n-heksana ke dalam corong pisah dan dilakukan fraksinasi yang diperoleh fraksi n-heksana dan fraksi larut air. Kemudian, fraksi larut air ditambahkan etil asetat dan dilakukan fraksinasi kembali yang diperoleh hasil fraksi etil asetat daun afrika.				
Penetapan kadar flavonoid total	Salah satu metode pemisahan yang lebih simple dan mampu menghasilkan pemisahan yang akurat untuk senyawa-senyawa yang tidak volatil dengan konsentrasi sangat kecil.	Larutan standar Kuersetin dan sampel Flavonoid ditotolkan pada lempeng KLT yang sama yaitu berukuran 9 x 10 cm dengan batasan atas dan bawah sepanjang 1 cm dan dibuat totolan jarak antar totolan sepanjang 1 cm. Alat penotol yang digunakan yaitu mikropipet dengan ukuran 1 µl. Larutan	KLT-Densitometri	Rasio	Nilai % RSD (Standart Deviasi Relatif) yang diperoleh dari nilai SD (Standart Deviasi) yang di bagi dengan % kadar rata – rata sampel.	

standart dan sampel ditotolkan 4 μl pada lempeng KLT yang telah diaktivasi dan dilakukan replikasi totolan sebanyak 5 kali pada standart dengan konsentrasi berbeda dan 3 kali replikasi pada sampel Kemudian lempeng KLT tersebut dielusi pada <i>chamber</i> yang telah dijenuhkan hingga jarak 75 mm. Lempeng diangin-anginkan kemudian dideteksi dengan densitometer pada panjang gelombang maksimal yang diperoleh.					
Identifikasi skrinning fitokimia terhadap Daun Afrika	Proses ekstrak daun afrika (ekstrak + pelarut) yang ditambahkan dengan pereaksi tertentu untuk	Fraksi etil asetat daun afrika ditambahkan dengan pereaksi tertentu kemudian lihat perubahan yang	Larutan pereaksi atau reagen	Nominal	Reaksi warna dan tinggi buih.

melihat terjadi pada
perubahan yang larutan.
terjadi pada
larutan tersebut.

4.7 Teknik dan Instrumen Pengumpulan Data

4.7.1 Pengolahan Simplisia dan Pembuatan Ekstraksi

a. Pengambilan Sampel

Pengambilan sampel diperoleh dari daerah sekitar di Kecamatan Kota, Kabupaten Sumenep, Madura. Sampel yang digunakan adalah bagian Daun Afrika, pengambilan sampel dengan cara memetik daun afrika yang sudah tua dan masih segar berwarna hijau pekat. Daun afrika yang berusia tua di petik 5 helai daun dari pucuk berwarna hijau pekat yang diambil pada saat fotosintesis (Pukul 10.00 - 12.00) agar diperoleh zat yang maksimal (Kapitan, 2018).

b. Pengolahan Sampel

Pada umumnya pembuatan simplisia melalui tahapan di antaranya, pengumpulan simplisia, sortasi basah, pencucian, perajangan, pengeringan, sortasi kering, pengepakan dan penyimpanan (DepKes RI, 1985) (Guswandi, 2014).

Pada penelitian ini pengolahan sampel daun afrika (*Vernonia Amygdalina*) meliputi proses sortir basah. Kemudian dilanjut pencucian menggunakan tisu dapur (berbahan seperti kain flanel) dengan cara diusap dengan sedikit air pada setiap daun hingga bersih. Selanjutnya, di lakukan pengeringan sampel dengan cara di angin-anginkan setelah itu proses pengeringan berlanjut dengan menggunakan pengeringan alami yaitu pengeringan dengan sinar matahari langsung yang diatasnya di bentangkan paranit agar cahaya matahari tersaring dan

tidak langsung terpapar pada daun. Pengeringan dilakukan untuk menghilangkan kadar air dalam bahan untuk memperlancar proses analisis dan menambah daya awet bahan tersebut selanjutnya dilakukan proses ekstraksi. Setelah itu di lanjut dengan sortasi kering dilakukan proses pengecilan simplisia menjadi potongan kecil (cacahan) menggunakan blender, pengecilan ukuran simplisia akan dapat mempercepat proses ekstraksi. Terakhir, dilakukan pengepakan dan penyimpanan. Selama penyimpanan ada kemungkinan terjadi kerusakan pada simplisia. Oleh karena itu, dipilih wadah yang bersifat tidak beracun dan tidak bereaksi dengan bahan yang dikemas. Hal ini bertujuan agar tidak menyebabkan terjadinya reaksi serta penyimpangan warna, bau, rasa, dan sebagainya pada simplisia (Parfati., 2018).

1. Maserasi

Metode yang peneliti gunakan yaitu ekstraksi maserasi dengan beberapa modifikasi pada bagian perbandingan simplisia dan pelarut serta pada proses pemekatan ekstrak daun afrika (*Vernonia amygdalina*). Sampel daun afrika (*Vernonia amygdalina*) yang sebelumnya telah diserbukkan. Kemudian, ditimbang sebanyak 100 gram. Selanjutnya, sampel di tempatkan dalam toples kaca, maserasi kemudian ditambahkan 1 liter metanol hingga semua sampel terendam keseluruhan setelah itu di tutup rapat. Dibiarkan selama 3x24 jam terlindung dari cahaya, sambil sesekali diaduk agar proses ekstraksi berjalan maksimal. Kemudian, di saring dan dipisahkan ampas dan filtratnya. Seluruh filtrat yang diperoleh digabungkan kemudian diuapkan dengan penangas air sederhana (*Water bath*) pada suhu $\leq 60^{\circ}\text{C}$ sesuai dengan titik didih metanol

sehingga diperoleh ekstrak kental metanol daun afrika (A. R. Wulandari et al., 2021)

2. Fraksinasi

Selanjutnya peneliti mengekstraksi kembali ekstrak kental hasil maserasi dengan metode ekstraksi fraksinasi dengan beberapa modifikasi. Fraksinasi dilakukan dengan mensuspensikan ekstrak kental menggunakan pelarut methanol : air (1:1). Partisi hasil suspensi selanjutnya ditambahkan pelarut etil asetat : n-heksan (8:2). Tambahkan n-heksana ke dalam corong pisah dan difraksinasi yang memperoleh fraksi larut air dan fraksi n-heksana. Hasil fraksi larut air kemudian ditambahkan ke etil asetat, selanjutnya di fraksinasi kembali hingga menghasilkan fraksi etil asetat. Terakhir, mengentalkan hasil fraksinasi dengan penangas air sederhana (*Water bath*) pada suhu $\leq 60^{\circ}\text{C}$ sesuai dengan titik didih metanol sehingga diperoleh ekstrak kental tiap fraksi (Najihudin et al., 2017).

4.7.2 Skrining Fitokimia

Pada identifikasi uji kandungan fitokimia dilakukan pembuatan larutan induk, kemudian diambil beberapa mL dari larutan induk yang telah dibuat. Pembuatan larutan induk pada uji untuk skrining fitokimia dilakukan dengan melarutkan 200 mg fraksi etil asetat daun afrika (*Vernonia amygdalina*) dalam 20 mL metanol (Susanti et al., 2015).

a. Identifikasi Flavonoid

Di ambil 1 mL larutan fraksi daun afrika. Kemudian dimasukkan kedalam tabung reaksi ditambahkan metanol 4 mL. Selanjutnya, dilakukan pemanasan di penangas air, filtrat yang didapat dari pemanasan di tambahkan H_2SO_4 . Jika

terbentuk warna hijau kehitaman berarti positif flavonoid (Kurang & Adang, 2018).

b. Identifikasi Alkaloid

Di ambil 2 mL larutan fraksi daun afrika. Kemudian, diuapkan diatas cawan porselin hingga diperoleh residu. Residu kemudian dilarutkan dengan 5 mL HCL 2N. Larutan yang didapat kemudian di bagi ke dalam 3 tabung reaksi. Tabung pertama ditambahkan dengan asam encer yang berfungsi sebagai blanko. Tabung kedua ditambahkan 3 tetes pereaksi mayer dengan menunjukkan adanya endapan putih. Tabung ketiga ditambahkan 3 tetes pereaksi wagner terbentuknya endapan coklat dan tabung ketiga ditambahkan pereaksi dragendorff sebanyak 3 tetes terbentuk endapan muda sampai kuning dan jingga (Susanti et al., 2015).

c. Identifikasi Terpenoid dan Steroid

Di ambil 2 mL larutan fraksi daun afrika. Kemudian, dimasukkan dalam tabung reaksi. Selanjutnya, ditambahkan dengan 2 mL etil asetat dan dikocok. Lapisan etil asetat diambil lalu ditetesi pada gelas arloji yang kemudian ditetaskan, dibiarkan sampai kering. Setelah kering, ditambahkan 2 tetes asam asetat anhidrat dan 1 tetes asam sulfat pekat. Apabila terbentuk warna merah atau kuning berarti positif terpenoid. Apabila terbentuk warna hijau berarti positif steroid (Muthmainnah B, 2017).

d. Identifikasi Saponin

Di ambil 1 mL larutan fraksi daun afrika lalu dimasukkan kedalam tabung reaksi ditambahkan 10 mL air panas, didinginkan. Kemudian, dikocok kuat-kuat selama 10 detik positif mengandung saponin jika terbentuk buih setinggi 1-10 cm

tidak kurang 10 menit dan pada penambahan 1 tetes HCl 2 N, buih tidak hilang (Kurang & Adang, 2018).

e. Identifikasi Tanin

Di ambil 1 mL larutan fraksi daun afrika lalu dimasukkan kedalam tabung reaksi ditambahkan 10 mL air panas. Kemudian, dididihkan selama 5 menit dan filtrat yang dihasilkan ditambahkan FeCl_3 3-4 tetes, jika berwarna hijau biru (hijau-hitam) berarti positif adanya tanin katekol sedangkan jika berwarna biru hitam berarti positif adanya tanin pirogalol (Muthmainnah B, 2017).

4.7.3 Penetapan Kadar Flavonoid menggunakan KLT-Densitometri

a. Optimasi Flavonoid Menggunakan KLT-Densitometri

1. Penentuan Fase Gerak

Penentuan Fase gerak yang digunakan untuk optimasi fase gerak yang didasarkan pada penelitian sebelumnya :

- a) Fase gerak Toluene : Etil asetat: Asam format, (5: 4 : 0,2) v/v/v. Menurut (Fatmawati, 2019).
- b) Fase gerak Kloroform : Metanol (9:1) v/v. Menurut (Pramesti., 2021).
- c) Fase gerak yang terdiri dari campuran Etil asetat : Metanol: Aquadest dengan perbandingan (10; 2,5: 0,5) v/v/v. Menurut (Arifa Mustika, 2015).
- d) Fase gerak Toluene : Etil Asetat : Asam Asetat glasial (6:4:0,5) v/v/v (Maulana, 2018).

2. Penentuan panjang gelombang

Optimasi panjang gelombang dilakukan dengan *scanning* noda analit pada *Camag TLC Scanner* (Densitometri) dan *software* program vision CATS. Penilaian panjang gelombang maksimal dilakukan pada area panjang gelombang antara 250 - 450 nm. Penilaian panjang gelombang optimum dipilih berdasarkan panjang gelombang yang memiliki intensitas spektrum yang paling tinggi (Aminah., 2017).

3. Penentuan Konsentrasi

Optimasi konsentrasi uji dilakukan pemilihan konsentrasi uji 100, 200, 300, 400, dan 500 ppm. Pemilihan ini didasarkan pada hasil optimasi yang menunjukkan perkiraan kandungan flavonoid pada daun Afrika (*Vernonia amygdalina*). Dengan tujuan untuk mempermudah preparasi sampel, konsentrasi uji yang digunakan untuk optimasi adalah tingkat konsentrasi yang terbilang tinggi (Ariel Stanley, 2018).

b. Aktivasi Lempeng KLT Silika Gel F₂₅₄

Pada aktivasi lempeng KLT yaitu Lempeng silika gel 60 F₂₅₄ dengan ukuran 20 x 20 cm yang telah disiapkan. Lempeng tersebut kemudian dipotong dengan ukuran 9 x 10 cm. Kemudian, lempeng KLT dicuci dengan menggunakan metanol. Lempeng KLT diaktivasi dengan pemanasan di oven pada suhu 120 °C selama kurang lebih 30 menit (L. Wulandari, 2011)

c. Penjenuhan Chamber

Fase gerak yang akan digunakan Toluene : Etil Asetat : Asam Asetat glasial (6:4:0,5) v/v/v. dituang kedalam dasar bejana/chamber. Kemudian, dicelupkan

pada kertas saring pada fase gerak. Bejana ditutup, lalu fase gerak dibiarkan menguap hingga membasahi kertas saring selama kurang lebih 1 jam atau bila fase gerak telah mencapai tujuh perdelapan tinggi kertas saring (FI V, 2014).

d. Pembuatan Larutan Baku Kuersetin

Baku Kuersetin ditimbang seksama kurang lebih 25 mg. Kemudian, dilarutkan dengan metanol hingga batas tanda di dalam labu takar 25 mL sehingga didapat konsentrasi larutan stok Kuersetin 1000 ppm (Ariel Stanley, 2018).

e. Pembuatan Larutan Standart Kuersetin

Larutan seri kuersetin dibuat dengan mengambil masing-masing 100, 200, 300, 400, dan 500 ppm (Ariel Stanley, 2018).

f. Pembuatan Larutan Sampel

Di timbang 25 mg fraksi etil asetat daun afrika, masukkan labu ukur 5 mL kemudian dilarutkan dengan sedikit metanol. Gunakan ultrasonik hingga homogen. Selanjutnya di tambahkan larutan metanol ad tanda batas (Lakukan 3 Replikasi) (Farmakope Herbal Indonesia Edisi II, 2017).

g. Penentuan Nilai R_f

Faktor retardasi (*Retardation faktor*= R_f) merupakan parameter yang digunakan untuk menggambarkan migrasi senyawa dalam KLT. Nilai R_f merupakan parameter yang menyatakan posisi noda pada fase diam setelah dielusi. Penentuan harga R_f analit, yaitu dengan membandingkan jarak migrasi noda analit dengan jarak migrasi fase gerak/eluen.

$$R_f : \quad \frac{\text{Jarak migrasi noda analit}}{\text{Jarak migrasi fase gerak / eluen}}$$

Jarak migrasi fase gerak / eluen

Angka R_f berjangka antara 0,00 dan 1,00. Hanya dapat ditentukan dua desimal (Apriyola et al., 2020). Nilai R_f sendiri merupakan konstanta untuk setiap komponen yang hanya dalam kondisi percobaan yang identic. Nilai R_f berkisar antara 0 hingga 1 dan nilai R_f terbaik antara 0,2- 0,8 untuk deteksi UV dan 0,2- 0,9 untuk deteksi visibel serta 20-80 untuk R_f relatif pada deteksi UV (L. Wulandari, 2011).

h. Penentuan Kurva Baku

Larutan seri standart kuersetin konsentrasi 100, 200, 300, 400, 500 ppm dan 3 replikasi larutan sampel di ditotol menggunakan mikropipet ukuran 1 μL sebanyak 4 μL pada lempeng KLT yang telah diaktivasi pada suhu 120°C selama $\pm$ 30 menit. Penotolan pada lempeng silika gel 60 F₂₅₄ KLT yang sama yaitu berukuran 20 x 20 cm yang kemudian dipotong 9 x 10 cm. Penotolan dilakukan pada lempeng KLT yang sebelumnya di beri batasan atas dan bawah sepanjang 1 cm dan untuk jarak antar totolan sepanjang 1 cm. (Ariel Stanley, 2018).

i. Analisis Hasil KLT-Densitometri

Setelah dilakukan penotolan pada lempeng KLT. Kemudian, lempeng KLT tersebut dielusi hingga jarak 75 mm pada chamber yang telah dijenuhkan dengan fase gerak (kloroform : metanol). Selanjutnya, plat diangkat, diangin-anginkan dan dikeringkan untuk di uji dengan menggunakan densitometer pada λ_{maks} kuersetin dan dibaca serapan panjang gelombang maksimal yang telah didapatkan sebelumnya. Analisis data hasil densitometri berupa densitogram yang memiliki luas area dan harga R_f berbeda-beda. Hasil densitogram dirata-rata untuk 3 replikasi tiap sampel. Rata-rata luas area tiap sampel selanjutnya dimasukkan ke

dalam persamaan kurva kalibrasi daerah linier $y = bx + a$ hubungan antara konsentrasi dengan respon. sehingga dapat diketahui massa flavonoid yang didapatkan pada masing – masing sampel (Ariel Stanley, 2018) (Saputri, 2014). Kandungan flavonoid total dinyatakan sebagai jumlah gram kuersetin ekuivalen tiap gram ekstrak yang, meliputi (Syarifuddin., 2019):

Rumus kadar total flavonoid :

$$X = \left[\frac{Y - a}{b} \right] \times FP$$

$$\text{Kadar Flavonoid} = \frac{\text{Massa Flavonoid}}{\text{Sampel}}$$

Keterangan :

Y = Absorbansi

X = Konsentrasi analit

a = Konstanta

b = Koefisien regresi

FP = Faktor Pengenceran

BAB V HASIL PENELITIAN

5.1 Data Umum

5.1.1 Determinasi Tanaman Daun Afrika (*Vernonia amygdalina*)

Hasil determinasi yang dilakukan di Politeknik Jember menyatakan bahwa benar tanaman yang digunakan adalah bagian daun dari tanaman afrika (*Vernonia amygdalina*) dan hasil dapat di lihat pada lampiran 2.

5.1.2 Ekstraksi Maserasi

Pada ekstraksi maserasi ini telah didapatkan hasil nilai ekstraksi maserasi yang dapat dilihat pada Tabel 5.1 :

Tabel 5.1 Hasil Perhitungan Maserasi Ekstrak Metanol Daun Afrika

Hasil ekstrak kering	Hasil penimbangan
Berat serbuk awal (g)	100
Berat vial kosong (g)	11,66
Berat vial + ekstrak kering (g)	23,90
Berat ekstrak kering(g)	12,24
% Rendemen	12,24%

5.1.3 Ekstraksi Fraksinasi

Pada ekstraksi Fraksinasi ini telah didapatkan hasil nilai ekstraksi maserasi yang dapat dilihat pada Tabel 5.2 :

Tabel 5.2 Hasil Perhitungan Fraksinasi Fraksi Daun Afrika

Hasil ekstrak kering	Hasil penimbangan
Berat serbuk awal (g)	12,24
Berat vial kosong (g)	14.01
Berat vial + ekstrak kering (g)	17.27

Berat ekstrak kering(g)	3,26
% Rendemen	26,63%

5.2 Data Khusus

5.2.1 Skrining Uji Fitokimia

Hasil dari skrining uji fitokimia yang telah di teliti yaitu sebagai berikut ini, dapat di lihat pada Tabel 5.3 :

Tabel 5.3 Hasil Skrining Uji Fitokimia Daun Afrika

No	Identifikasi yang dilakukan	Terdapat (+)/ Tidak terdapat (-)	Nama Pereaksi	Perubahan yang terjadi
1.	Identifikasi flavonoid	(+)	Pereksi Lieberman Burchard (H ₂ SO ₄)	Hijau Kehitaman
2.	Identifikasi alkaloid	(+)	HCl 2N dipanaskan, dibagi 3, ditambah : Pereaksi Mayer	Endapan berwarna Putih
			Pereaksi Wagner	Endapan Berwarna Coklat
			Pereaksi Dragendrof	Endapan Berwarna Jingga
3.	Identifikasi terpenoid dan steroid	(+) Steroid	Etil asetat + Asam asetat anhidrat + Asam sulfat pekat	Berwarna Hijau
4.	Identifikasi saponin	(+)	HCl 2N dikocok 20 detik	Terbentuk buih dalam 20 menit

5. Identifikasi tanin	(-)	10 mL air + FeCl ₃	Tidak ada perubahan warna
-----------------------	-----	-------------------------------	---------------------------

5.2.2 Optimasi Kondisi Analisis Kadar Flavonoid Total

a. Penentuan Fase Gerak

Data perhitungan *Number (N)* dan *Height Equivalent of Theoretical Of Plate (HETP)* yang didapat :

Tabel 5.4 Data *Number (N)* dan *Height Equivalent Of Theoretical Plate (HETP)*

Nama	Resolusi (Rs)	Number (N)	Height Equivalent Of Theoretical Plate (HETP)
Q1 100 ppm	0,722	77,096	1,16
Q2 200 ppm	0,337	26,370	3,41
Q3 300 ppm	0,436	15,155	5,93
Q4 400 ppm	0,570	8,198	10,97
Q5 500 ppm	0,580	8,251	10,90
F1 5000 ppm	0,0676	45,016	1,99
F2 5000 ppm	0,502	45,008	1,99
F3 5000 ppm	0,162	41,283	2,18
Rata - Rata	0,401	33,297	4,78

Hasil beberapa optimasi fase gerak yang dilakukan sebanyak 4 kali dengan beberapa campuran berbeda, diantaranya :

1. Fase Gerak Toluene : Etil asetat : Asam Format (5 : 4 : 0,2)



Gambar 5.1 Fase gerak Toluene : Etil Asetat : Asam Format (5 : 4 : 0,2) v/v/v

Hasil fase gerak pertama menggunakan Toluene : Etil Asetat : Asam Format (5 : 4 : 0,2) v/v/v. Dapat dilihat pada Gambar 5.1 (Fatmawati, 2019).

2. Fase Gerak Kloroform : Metanol (9 : 1) v/v



Gambar 5.2 Fase gerak Kloroform : Metanol (9 : 1) v/v

Hasil optimasi fase gerak yang kedua yaitu menggunakan pelarut Kloroform : Metanol (9 : 1) v/v. Dapat dilihat pada Gambar 5.2 (Pramesiti et al., 2021)

3. Fase Gerak Etil asetat : Metanol : Aquadest (10 : 2,5 : 0,5) v/v/v



Gambar 5.3 Fase gerak Etil asetat : Metanol : Aquadest (10 : 2,5 : 0,5) v/v/v

Pada optimasi fase gerak yang ketiga yaitu menggunakan pelarut Etil asetat : Metanol : Aquadest (10 : 2,5 : 0,5) v/v/v. Dapat dilihat pada Gambar 5.3 (Arifa Mustika, 2015)

4. Fase Gerak Etil asetat : Metanol : Aquadest (10 : 2,5 : 0,5) v/v/v

Pada penelitian ini hasil fase gerak yang diperoleh yaitu menggunakan Toluene; Etil asetat: Asam asetat glasial (6 : 4 : 0,5) v/v/v. Dapat dilihat dari Gambar 5.4



Gambar 5.4 Fase gerak Toluene; Etil asetat: Asam asetat glasial (6:4:0,5) v/v/v

Hasil yang di peroleh sesuai dengan rentang yang diharapkan standart dan sampel memisah secara seksama hingga pertengahan lempeng dan tidak melebihi batas garis. Standart dan sampel memisah dengan baik dan pemisahan yang terjadi tidak terlalu dekat dengan batas bawah pada tempat penotolan dan tidak terlalu jauh hingga batas atas. Dapat dilihat pada Gambar 5.4.

Keterangan :

Fase gerak : Toluene : Etil Asetat : Asam Asetat Glasial (6;4;0,5) v/v/v

Fase diam : Silika gel F₂₅₄

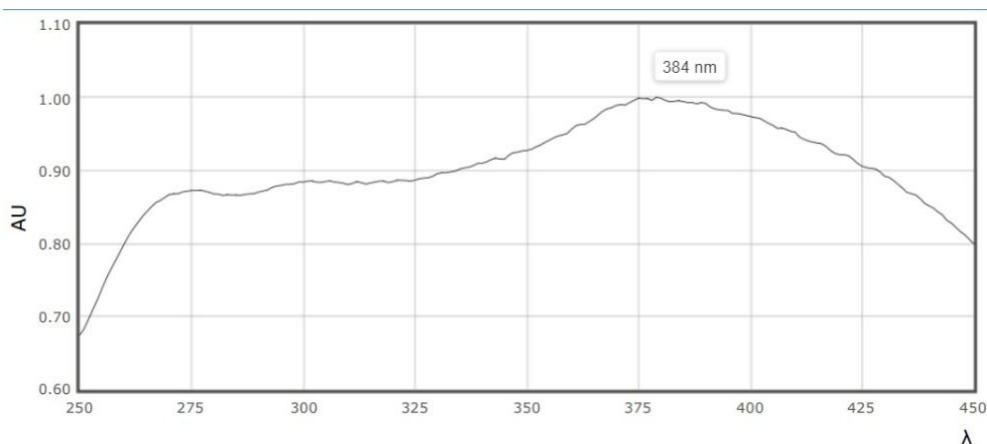
Bercak standar : Standar 1, 2, 3, 4 dan 5 (kiri ke kanan)

Bercak sampel : Sampel 6, 7 dan 8 (kiri ke kanan)

Deteksi : UV 254 nm

b. Penentuan Panjang Gelombang

Pada penelitian ini hasil pengamatan spektrum yang dilakukan dengan pembacaan panjang gelombang pengukuran spektrum dalam rentang 250 – 450 nm. diperoleh panjang maksimum 384 nm yang dapat kita lihat pada Gambar 5.5



Gambar 5.5 Panjang Gelombang Maksimum (384 nm)

Panjang gelombang yang terpilih dikarenakan perbandingan panjang gelombang (x) dan luas area (y) memberikan puncak tertinggi yaitu pada panjang gelombang 384 nm. Maka panjang gelombang maksimum yang digunakan adalah 384 nm. Hasil rata – rata kolerasi yaitu 0,98110225. Data yang didapat dari analisis spektrum yang telah dilakukan, diantaranya dapat dilihat di Tabel 5.5 :

Tabel 5.5 Data Kolerasi Spektrum

Substance name	Track	R _F	r(s,m)	r(e,m)	Ref. spectrum	Correlation
Kuersetin	1	0.306	0.000000	0.000000	Tr. 2, Rf 0.323, Sub. Kuersetin	0.969112
Kuersetin	2	0.323	0.000000	0.000000	Tr. 1, Rf 0.306, Sub. Kuersetin	0.969112
Kuersetin	3	0.330	0.000000	0.000000	Tr. 2, Rf 0.323, Sub. Kuersetin	0.930110
Kuersetin	4	0.333	0.000000	0.000000	Tr. 5, Rf 0.335, Sub. Kuersetin	0.992362
Kuersetin	5	0.335	0.000000	0.000000	Tr. 4, Rf 0.333, Sub. Kuersetin	0.992362
Kuersetin	6	0.339	0.000000	0.000000	Tr. 7, Rf 0.339, Sub. Kuersetin	0.998717
Kuersetin	7	0.339	0.000000	0.000000	Tr. 6, Rf 0.339, Sub. Kuersetin	0.998717
Kuersetin	8	0.347	0.000000	0.000000	Tr. 6, Rf 0.339, Sub. Kuersetin	0.998326

c. Penentuan Konsentrasi

Pada penelitian ini hasil optimasi konsentrasi yang diperoleh menggunakan konsentrasi yaitu 100, 200, 300, 400 dan 500 ppm dengan penotolan 4 µl dan

konsentrasi 3 replikasi sampel yaitu 5000 ppm, 5000 ppm, 5000 ppm. Konsentrasi yang dipilih bertujuan agar didapat R_f yang sesuai dan rentang antara konsentrasi tidak terlalu dekat pada standart.

5.2.3 Penetapan Kadar Flavonoid Total

a. Hasil Nilai R_f

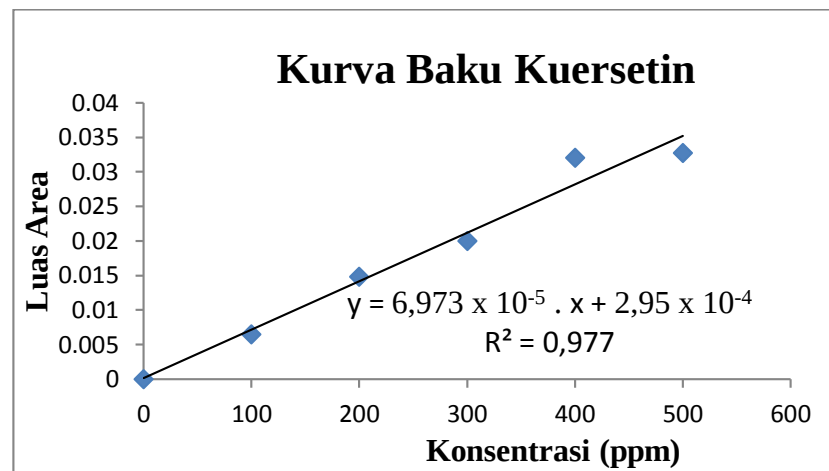
Pada penelitian ini 5 seri standar dan 3 sampel tersebut dieluasi menggunakan fase gerak toluene : etil asetat : asam asetat glasial (6:4:0,5) v/v/v dan fase diam silika gel F₂₅₄. Hasil yang diperoleh berdasarkan pengukuran nilai R_f tersebut, dapat dilihat pada Tabel 5.6 :

Tabel 5.6 Data Nilai Luas Area dan Nilai R_f

Vial ID	Luas Area	R_f
Standar 1 (100 ppm)	0,00649	0,306
Standar 2 (200 ppm)	0,01482	0,324
Standar 3 (300 ppm)	0,01998	0,330
Standar 4 (400 ppm)	0,03203	0,333
Standar 5 (500 ppm)	0,03275	0,335
Sampel 1 (5000 ppm)	0,00636	0,339
Sampel 2 (5000ppm)	0,00739	0,340
Sampel 3 (5000 ppm)	0,00712	0,344

b. Hasil Kurva Baku

Pada penelitian ini digunakan sebanyak 5 seri standar dengan konsentrasi yang berbeda-beda, yaitu 100 ppm, 200 ppm, 300 ppm, 400 ppm dan 500 ppm. Berdasarkan pengukuran tersebut, didapatkan hasil regresi linier yang dapat dilihat pada Gambar 5.6 :



Gambar 5.6 Kurva Baku Kuersetin

c. Hasil Penetapan Kadar Flavonoid

Pada penelitian ini didapatkan hasil nilai kadar flavonoid pada fraksi etil asetat daun afrika. Berdasarkan pengukuran tersebut, dapat dilihat pada Tabel 5.7 berikut ini :

Tabel 5.7 Hasil Perhitungan Kadar Flvonoid Total

Konsentrasi	Absorbansi	x	Kadar Flavonoid Total	$\bar{x}$ Kadar Flavonoid	SD	RSD
Rep 1	0,00636	$8,6978 \times 10^4$	3,47912	3,82138 mg/g	0,25011	6,5 %
Rep 2	0,00739	$10,1749 \times 10^4$	4,06996			
Rep 3	0,00712	$9,7877 \times 10^4$	3,91508			
$\bar{x}$ Kadar Flavonoid $\pm$ SD				3,82138 $\pm$ 0,25011		
$\bar{x}$ % Kadar Flavonoid				15,285 %		

BAB VI PEMBAHASAN

6.1 Teknik Dan Instrumen Pengumpulan Data

6.1.1 Determinasi Tanaman Daun Afrika (*Vernonia amygdalina*)

Determinasi tanaman pada daun afrika bertujuan untuk mengetahui suku dan jenis dari daun afrika (*Vernonia amygdalina*). Determinasi tanaman merupakan tahap awal yang dilakukan sebelum menuju tahap lebih lanjut pada proses penelitian. Determinasi tanaman merupakan proses dalam menentukan nama/jenis tumbuhan secara spesifik (Fikri, 2016). Hasil determinasi daun afrika (*Vernonia amygdalina*) yang dilakukan di Politeknik Jember menyatakan bahwa benar tanaman yang digunakan adalah bagian daun dari tanaman afrika (*Vernonia amygdalina*). Hasil determinasi dapat di lihat pada lampiran 2.

6.1.2 Pengambilan Dan Pengolahan Daun Afrika

Sampel tanaman daun afrika diperoleh di Kecamatan Kota, Kabupaten Sumenep, Madura. Bagian yang digunakan yaitu daun berusia tua dengan warna hijau pekat. Pengambilan daun afrika yaitu 5 helai daun dari pucuk di karena kandungan kadar senyawa metabolit sekunder pada daun afrika yang berusia tua lebih tinggi dari pada kandungan kadar senyawa kimia metabolit sekunder daun afrika yang berusia muda (Asante et al., 2017). Pengolahan simplisia daun afrika diperoleh potongan kecil berupa cacahan yang kemudian di simpan atau di kemasan ke dalam wadah standing pouch (Guswandi, 2014).

Rendemen merupakan perbandingan antara hasil banyaknya metabolit yang didapatkan setelah proses ekstraksi dengan berat sampel yang digunakan. Rendemen dikatakan baik jika nilainya lebih dari 10%. Oleh karena itu rendemen

ekstrak kasar yang didapatkan dinyatakan baik karena hasil rendemen >10% (Wardaningrum, 2019). Nilai rendemen yang diperoleh dapat dipengaruhi oleh beberapa faktor, diantaranya jenis pelarut, konsentrasi pelarut, ukuran partikel simplisia, dan lamanya waktu ekstraksi. Keberhasilan pemisahan bergantung pada perbedaan kelarutan komponen yang akan dipisahkan dalam pelarut (Sineke et al., 2016).

Pemilihan pelarut untuk proses maserasi akan memberikan efektifitas yang tinggi melalui cara memerhatikan kelarutan senyawa bahan alam pelarut tersebut. Penelitian ini memilih pelarut metanol karena pelarut tersebut dapat mengisolasi lebih banyak jumlah metabolit sekunder seperti (senyawa fenolik, flavonoid dan tanin) dalam daun afrika dibandingkan dengan etanol. Selain itu juga, metanol mempunyai titik didih yang relatif rendah sehingga mudah menguap dan cicin C pada metanol lebih pendek, sehingga lebih polar daripada etanol, sehingga cocok untuk senyawa flavonoid yang juga memiliki sifat polar dengan prinsip *like dissolven like* yaitu suatu pelarut yang cenderung melarutkan senyawa yang mempunyai tingkat kepolaran yang sama. (Obenu, 2019).

Senyawa polar akan larut dalam pelarut polar, begitu pula sebaliknya. Selain jenis pelarut, ukuran sampel juga mempengaruhi jumlah rendemen. Semakin kecil luas permukaan sampel akan semakin memperluas kontak dan meningkatkan interaksi dengan pelarut. Semakin halus bahan yang digunakan semakin tinggi rendemen yang dihasilkan. Perbesaran luasan permukaan bertujuan untuk mempercepat pelarutan, mempercepat reaksi kimia, dan mempertinggi kemampuan penyerapan (Sineke et al., 2016).

Fraksinasi ini bertujuan untuk memisahkan senyawa berdasarkan perbedaan kepolaran dalam suatu tanaman sehingga jumlah dan jenisnya menjadi fraksi berbeda. Hasil rendemen fraksinasi yang diperoleh sebesar 26,36%. Fraksinasi merupakan teknik pemisahan ekstrak hasil maserasi yang telah diuapkan sehingga diperoleh fraksi kental. Fraksinasi ini menggunakan berbagai pelarut dengan kepolaran yang berbeda-beda, sehingga masing-masing pelarut mengandung senyawa dengan kepolaran yang berbeda pula (Akhsanita, 2012).

Pelarut yang digunakan pada proses fraksinasi yaitu n-Heksana dan Etil asetat. Ekstraksi fraksinasi dilakukan hingga 2 tahap agar mendapatkan fraksi yang murni dan diharapkan selektivitas serta dapat menarik komponen bahan aktif sesuai dengan kepolarannya. Pemilihan pelarut n-Heksana karena memiliki sifat non polar yang bertujuan untuk mengekstrak lemak dan terpena. Sedangkan, pada pemilihan pelarut etil asetat yang memiliki sifat semi polar bertujuan untuk mengisolasi senyawa semi polar (Zirconia et al., 2015).

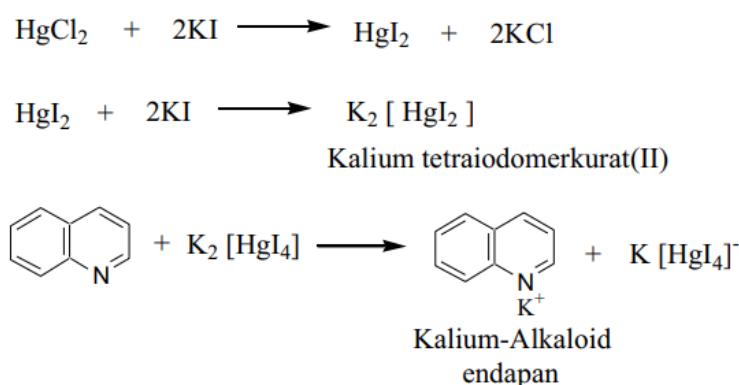
Menurut peneliti, rendemen yang diperoleh dari hasil ekstraksi maserasi 12,24% dan ekstraksi fraksinasi 26,36% dinyatakan baik sesuai dengan syarat nilai pada literatur yang ada yaitu >10%. Hal ini dikarenakan pada proses pengambilan, pengolahan hingga penyimpanan dilakukan dengan. Karena, ada banyak faktor penting yang harus diperhatikan seperti waktu ekstraksi, pengadukan pada proses maserasi, pelarut yang digunakan, ukuran sampel dan penyimpanan pada tempat kering, tidak lembab serta tidak terkena matahari secara langsung.

flavonoid yang pertama kali terbentuk dalam biosintesis semua varian flavonoid melalui jalur prazat dari alur siklomat dan alur asetat malonat (Puspa et al., 2017).

6.2.2 Alkaloid

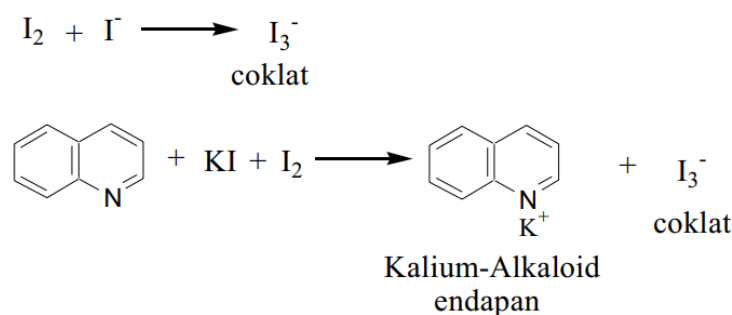
Hasil uji senyawa alkaloid dengan pereaksi Mayer dinyatakan positif ditandai dengan terbentuknya endapan putih. Di perkirakan endapan tersebut adalah kompleks kalium-alkaloid. Pada pembuatan pereaksi Mayer, larutan merkuri(II) klorida ditambah kalium iodida akan bereaksi membentuk endapan merah merkuri(II) iodida. Jika kalium iodida yang ditambahkan berlebih maka akan terbentuk kalium tetraiodomerkurat(II) (Nova, 2016).

Alkaloid mengandung atom nitrogen yang mempunyai pasangan elektron bebas sehingga dapat digunakan untuk membentuk ikatan kovalen koordinat dengan ion logam. Pada uji alkaloid dengan pereaksi Mayer, diperkirakan nitrogen pada alkaloid akan bereaksi dengan ion logam K^+ dari kalium tetraiodomerkurat(II) membentuk kompleks kalium-alkaloid yang mengendap. Perkiraan reaksi yang terjadi pada uji Mayer ditunjukkan pada Gambar 6.2 (Nova, 2016).



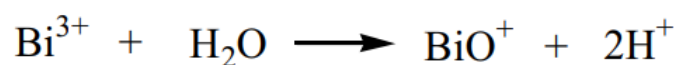
Gambar 6.2 Reaksi Alkaloid Dan Pereaksi Mayer (Nova, 2016).

Hasil uji senyawa alkaloid dengan pereaksi Wagner dinyatakan positif ditandai dengan terbentuknya endapan coklat muda sampai kuning. Diperkirakan endapan tersebut adalah kalium-alkaloid. Pada pembuatan pereaksi Wagner, iodin bereaksi dengan ion I⁻ dari kalium iodida menghasilkan ion I₃⁻ yang berwarna coklat. Pada uji Wagner, ion logam K⁺ akan membentuk ikatan kovalen koordinat dengan nitrogen pada alkaloid membentuk kompleks kalium-alkaloid yang mengendap. Reaksi yang terjadi pada uji Wagner ditunjukkan pada Gambar 6.3 (Nova, 2016).



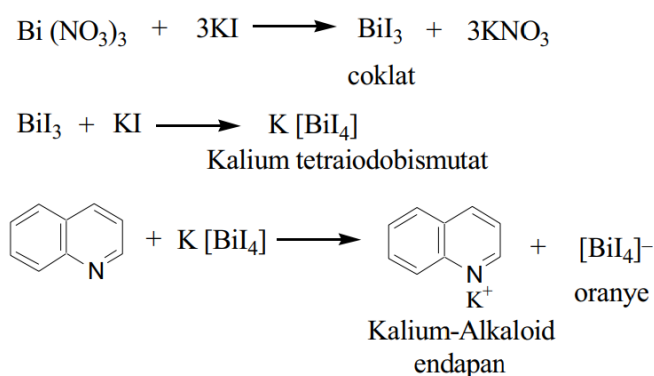
Gambar 6.3 Reaksi Alkaloid Dan Pereaksi Wagner (Nova, 2016).

Hasil uji senyawa alkaloid dengan pereaksi Dragendorff dinyatakan positif ditandai dengan terbentuknya endapan jingga muda sampai kuning. Endapan tersebut adalah kalium alkaloid. Pada pembuatan pereaksi Dragendorff, bismut nitrat dilarutkan dalam HCl agar tidak terjadi reaksi hidrolisis karena garam-garam bismut mudah terhidrolisis membentuk ion bismutil (BiO⁺), yang ditunjukkan dengan Gambar 6.4 (Nova, 2016).



Gambar 6.4 Reaksi Hidrolisis Bismut (Nova, 2016).

Reaksi hidrolisis bismut Agar ion Bi^{3+} tetap berada dalam larutan, maka larutan itu ditambah asam sehingga kesetimbangan akan bergeser ke arah kiri. Selanjutnya ion Bi^{3+} dari bismut nitrat bereaksi dengan kalium iodida membentuk endapan hitam Bismut(III) iodida yang kemudian melarut dalam kalium iodida berlebih membentuk kalium tetraiodobismutat. Pada uji alkaloid dengan pereaksi Dragendorff, nitrogen digunakan untuk membentuk ikatan kovalen koordinat dengan K^+ yang merupakan ion logam. Reaksi pada uji Dragendorff ditunjukkan pada Gambar 6.5 (Nova, 2016).

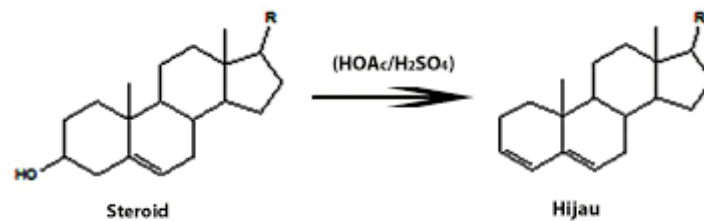


Gambar 6.5 Reaksi Alkaloid Dan Pereaksi Dragendorff (Nova, 2016).

6.2.3 Terpenoid Dan Steroid

Hasil pengujian senyawa terpenoid dan steroid dinyatakan positif mengandung steroid dengan menunjukkan perubahan warna hijau saat ditambahkan etil asetat yang dikocok yang diteteskan pada gelas arloji dibiarkan kering, kemudian ditetesi asam asetat anhidrat dan asam sulfat pekat (Muthmainnah B, 2017). Warna hijau yang muncul karena kemampuan steroid yang ada pada ekstrak terjadi suatu reaksi dengan asam sulfat pekat dalam pelarut asam asetat anhidrat. Perubahan warna disebabkan adanya oksidasi pada golongan

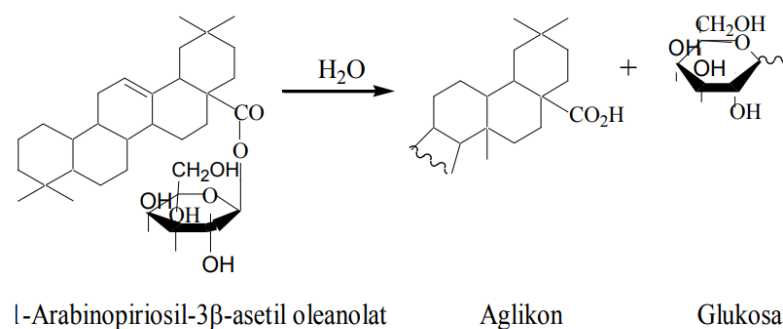
senyawa steroid melalui pembentukan ikatan rangkap terkonjugasi. Reaksi steroid dapat ditunjukkan pada Gambar 6.6 .



Gambar 6.6 Reaksi Steroid (Nova, 2016).

6.2.4 Saponin

Hasil pengujian saponin di nyatakan positif dengan menunjukkan adanya buih dalam waktu 20 menit (Kurang & Adang, 2018). Timbulnya busa menunjukkan adanya glikosida yang mempunyai kemampuan membentuk buih dalam air yang terhidrolisis menjadi glukosa dan senyawa lainnya. Reaksi pembentukan busa pada uji saponin ditunjukkan pada Gambar 6.7 (Waty, 2016).



Gambar 6.7 Reaksi Saponin (Waty, 2016).

6.2.5 Tanin

Hasil pengujian senyawa tanin yang menunjukkan negatif karena tidak ada perubahan warna pada pengujian tanin saat ditetaskan dengan FeCl₃ (Muthmainnah B, 2017). Hal ini diperkirakan karena senyawa tanin tidak

terhidrolisis dengan senyawa FeCl_3 sehingga tidak mengalami perubahan warna (Waty, 2016).

Menurut peneliti, Hasil uji fitokimia menunjukkan bahwa daun afrika memiliki kandungan senyawa flavonoid, hal ini ditunjukkan dengan terjadinya perubahan warna menjadi hijau kehitaman dan terbentuknya senyawa kalkon yang merupakan senyawa aglikon flavonoid yang pertama kali terbentuk dalam biosintesis semua varian flavonoid melalui jalur prazat dari alur siklamat dan alur asetat malonat. Adapun hasil uji skrining ini tidak hanya mengandung senyawa flavonoid. Daun afrika ini juga mengandung senyawa kimia alkaloid, steroid, saponin. Namun, dinyatakan tidak mengandung tanin karena tidak adanya perubahan warna saat pengujian dilakukan.

6.3 Optimasi Kondisi Analisis Flavonoid Total

Permukaan silika gel terdiri atas gugus Si-O-Si dan Si-OH (silanol). Adanya silanol ini dapat membentuk interaksi hidrogen dengan analit. Selain dengan analit, gugus silanol juga dapat membentuk interaksi hidrogen dengan air yang membuat silika gel terdeaktivasi sehingga sebelum digunakan, silika gel perlu dipanaskan pada suhu 120°C selama 30 menit. Aktivasi yang dilakukan bertujuan untuk menghilangkan pelarut sisa pencucian, menghilangkan kelembaban serta kemungkinan kandungan air pada plat silika dan untuk mengaktifkan kembali permukaan silika gel sehingga gugus silanol dapat berinteraksi dengan analit dan mengurangi (Ediningtyas, 2021).

Dari pemaparan diatas, dilakukan beberapa rangkaian optimasi pada analisis penelitian ini, diantaranya :

6.3.1 Optimasi Penentuan Fase Gerak

Optimasi penentuan fase gerak bertujuan untuk mendapatkan perbandingan komposisi volume eluen terbaik agar diperoleh hasil pemisahan yang maksimal. Hasil optimasi fase gerak yang didapatkan yaitu menggunakan Toluene : Etil Asetat : Asam Asetat Glasial (6:4:0,5) v/v/v. Pemisahan antara standart dan sampel tidak melampaui batas atas dan tidak terlalu dekat dengan titik awal penotolan (Maulana, 2018).

Pemilihan fase diam silika F₂₅₄ 60 di karenakan mempunyai pengaruh paling kecil pada tingkat migrasi. Hal ini juga menentukan pemilihan campuran fase gerak. Optimasi eluen diawali dengan menentukan sifat fisika kimia analit yang akan dianalisis dan jenis sorben fase diam yang digunakan. sorben dengan prinsip pemisahan berdasarkan muatan ion diperlukan data tentang jenis dan intensitas muatan ion analit dalam pemilihan komposisi eluen. Pada sorben dengan prinsip pemisahan berdasarkan polaritas dibutuhkan nilai koefisien partisi (P atau log P) dan tetapan dissosiasi (pKa) analit dalam penentuan eluen (L. Wulandari, 2011).

Nilai K merupakan kecepatan migrasi pelarut melewati lempeng silika gel, yang berhubungan dengan lamanya waktu pengembangan KLT. Semakin besar nilai K semakin cepat waktu pengembangan KLT. Nilai log P menunjukkan polaritas pelarut yang berhubungan dengan afinitas analit dengan pelarut. Analit yang bersifat polar akan memiliki afinitas tinggi terhadap pelarut polar dan afinitasnya rendah terhadap pelarut non polar. Sebaliknya analit yang bersifat non

polar akan memiliki afinitas tinggi terhadap pelarut non polar dan afinitasnya rendah terhadap pelarut polar (L. Wulandari, 2011).

Fase gerak toluene mempunyai indeks polaritas 2,52 dan kecepatan migrasi 11,0. Toluene ini dinyatakan mempunyai sifat non polar. Semakin banyak jumlah toluena yang ada dalam fase gerak, maka kelarutan kuersetin dalam fase gerak akan semakin kecil yang akan berakibat faktor retardasi (R_f) akan semakin kecil. Kelarutan kuersetin akan lebih tinggi. Maka, retardasi (R_f) akan semakin naik dengan seiring penambahan etil asetat. Etil asetat digunakan sebagai fase gerak karena mempunyai sifat semi polar dan mempunyai indeks polaritas 0,29 dan kecepatan migrasi 12,1 (L. Wulandari, 2011).

Campuran fase gerak toluena dan etil asetat (6:4) dapat meningkatkan nilai resolusi puncak densitogram kuersetin terhadap puncak di sekitarnya. Namun, pada penelitian ini resolusi pemisahan antara standart kuersetin dan sampel fraksi etil asetat masih tidak memasuki rentang retardasi (R_f). Maka, dilakukan penambahan asam asetat glasial yang bersifat polar. Namun, dalam komposisi paling kecil yaitu 0,5 mL, karena akan menyebabkan peningkatan resolusi. Hal ini dapat mempengaruhi kelarutan dan nilai retendensi (R_f) pada standart kuersetin maupun sampel fraksi etil asetat daun afrika (L. Wulandari, 2011).

Perbandingan komposisi pada fase gerak yang digunakan sangat mempengaruhi hasil pemisahan. Standart kuersetin bersifat polar dan sampel fraksi etil asetat daun afrika memiliki sifat semi polar yang akan lebih cenderung berinteraksi dengan fase gerak semipolar, oleh karena itu perbandingan komposisi

eluen yang dipilih tidak hanya bersifat polar dan nonpolar tetapi juga menggunakan komposisi eluen semipolar (L. Wulandari et al., 2013).

Menurut peneliti, hasil optimasi yang sesuai pada standart kuersetin dan sampel fraksi etil asetat daun afrika dengan rentang pemisahan baik yaitu menggunakan fase gerak Toluene : Etil Asetat : Asam Asetat Glisial (6:4:0,5) v/v/v. Hal ini dikarenakan fase gerak yang digunakan dapat memisah secara baik dan seksama hingga pertengahan lempeng dan tidak terlalu dekat dengan batas garis bawah pada awal penotolan dan tidak pula terlalu dekat serta tidak memisah terlalu jauh pada batas atas. Pemisahan antara standart dan sampel yang di analisis dapat memisah dengan baik.

Hasil berdasarkan parameter pada pemilihan fase gerak yang baik yaitu, nilai koefisien partisi ($\log P$) dan kecepatan migrasi (K) dinyatakan baik dan komposisi pada campuran setiap fase gerak dapat setara. Sehingga, proses eluasi yang terjadi dinyatakan baik.. Sedangkan, Nilai Resolusi yang didapat tidak sesuai yaitu 0,401 sedangkan nilai resolusi berdasarkan literatur yaitu $> 1,5$. Nilai *number* (N) dinyatakan sesuai karena nilai rata- rata yang diperoleh paling besar yaitu 33,297. Untuk nilai *height equivalent a theoretical plate* (HETP) dinyatakan sesuai karena nilai yang diperoleh paling kecil yaitu 4,78. Adapun rata – rata nilai retardasi (R_f) yang didapat yaitu 0,331 sesuai pada rentang nilai retardasi (R_f) berdasarkan literatur yang ada yaitu dalam rentang 0,2 – 0,8.

6.3.2 Optimasi Panjang Gelombang

Hasil optimasi panjang gelombang maksimum yang diperoleh yaitu 384 nm dalam rentang analisis spektrum 250 – 450 nm. Hasil yang diperoleh sesuai

karena menunjukkan puncak yang terlihat jelas pada analisis panjang gelombang. Optimasi panjang gelombang maksimum bertujuan agar dapat memberikan kepekaan sampel.

Detektor yang digunakan pada optimasi panjang gelombang ini yaitu deuterium. Deuterium merupakan spektral UV yang dapat berflouoresensi pada rentang spektrum (190-400 nm). Sehingga rentang yang digunakan pada optimasi ini yaitu 250-450 nm (L. Wulandari, 2011). Analisis kandungan flavonoid dalam fraksi etil asetat daun afrika mengandung sistem aromatik terkonjugasi yang menunjukkan pita serapan kuat pada daerah spektrum sehingga terjadi pergeseran pada panjang gelombang (Koirewoa et al., 2012).

Serapan spektrum panjang gelombang flavonoid yaitu antara 350-385 nm. Dari hasil spektrum yang tampak terdapat dua pita pada isolat. Pita pertama mempunyai panjang gelombang 384 nm dan pita kedua mempunyai panjang gelombang 300 nm. Jika dibandingkan dengan pembading rutin flavonoid yaitu standart kuesertin hasil yang didapat mempunyai rentang separan yang sama. Pita pertama di antara rentang spektrum panjang gelombang 350-385 nm yaitu 384 nm dan pita kedua pada panjang gelombang 250-325 nm yaitu 300 nm (Koirewoa et al., 2012).

Optimasi panjang gelombang ini dilakukan dengan memperhatikan adanya sistem karbonil yang berkonjugasi dengan cincin aromatik pada suatu flavonoid. Hal ini yang menyebabkan senyawa flavonoid dapat menyerap cahaya pada panjang gelombang tertentu di daerah ultraviolet (UV). Pada optimasi panjang

sangat menentukan hasil analisis karena pada panjang gelombang maksimum memiliki kepekaan maksimal. (Ihsan et al., 2019).

Hasil rata – rata koresi yang didapat dari analisis spektrum yaitu 0,98110225. Analisis korelasi adalah metode statistika yang digunakan untuk menentukan suatu besaran yang menyatakan bagaimana kuat hubungan suatu variabel dengan variable lain. Semakin nyata hubungan linier (garis lurus), maka semakin kuat atau tinggi derajat hubungan garis lurus antara kedua variabel atau lebih. Koefisien korelasi adalah ukuran yang dipakai untuk mengetahui derajat hubungan antara variabel-variabel (Safitri, W, 2014).

Nilai koefisien korelasi berada di antara $-1 < 0 < 1$ yaitu apabila nilai kolerasi mendekati kurang dari angka -1 maka dinyatakan negatif sempurna, artinya taraf signifikansi dari pengaruh variabel X terhadap variabel Y yang diperoleh tidak baik dan sangat lemah. Apabila nilai kolerasi mendekati angka satu 1 maka nilai korelasi dinyatakan positif sempurna, artinya taraf signifikansi dari pengaruh variabel X terhadap variabel Y yang diperoleh sangat baik dan sangat kuat (Safitri, W, 2014)

Menurut peneliti, hasil *scanning* panjang gelombang maksimum yang diperoleh adalah 384 nm. Pengujian optimasi panjang gelombang tersebut dinyatakan sesuai karena pergeseran pada daerah spektrum tersebut menunjukkan serapan yang kuat dan puncak panjang gelombang terlihat jelas. Berdasarkan rentang panjang gelombang flavonoid sesuai literatur yang ada hasil optimasi panjang gelombang fraksi etil asetat dinyatakan positif mengandung senyawa flavonoid. Hasil nilai kolerasi yang diperoleh yaitu 0,98110225 dinyatakan

hubungan antara variabel sangat baik dan kuat karena hasil yang diperoleh mendekati angka 1.

6.3.3 Optimasi Konsentrasi

Optimasi konsentrasi bertujuan untuk mendapatkan hasil optimasi yang menunjukkan perkiraan kandungan quersetin dan sampel fraksi etil asetat daun afrika yang terbilang kecil. Hasil optimasi konsentrasi yang diperoleh yaitu 5 seri konsentrasi standart yaitu 100 ppm, 200 ppm, 300 ppm, 400 ppm, 500 ppm dan 3 replikasi konsentrasi sampel yang digunakan yaitu 5000 ppm, 5000 ppm, 5000 ppm.

Konsentrasi uji yang baik adalah dinyatakan dengan parameter konsentrasi yang mempunyai nilai N paling besar. Apabila number (N) yang dihasilkan semakin besar maka pemisahan yang terjadi akan semakin baik pula. Kemudian, memiliki *height equivalent a theoritical plate* (HETP) paling kecil. Apabila nilai *height equivalent a theoritical plate* (HETP) semakin kecil maka efisiensi suatu plat akan semakin baik dan pemisahan yang terjadi akan semakin baik. (Naufalia, 2021). Dapat dilihat pada Tabel 5.4.

Menurut peneliti, pada hasil konsentrasi yang diperoleh yaitu 5 seri konsentrasi standart kuersetin 100 ppm, 200 ppm, 300 ppm, 400 ppm, 500 ppm dan 3 replikasi konsentrasi sampel fraksi etil asetat daun afrika yaitu 5000 ppm, 5000 ppm, 5000 ppm dinyatakan sesuai karena pada konsentrasi ini rentang antara konsentrasi tidak terlalu dekat dan bercak pada plat terlihat jelas. Hasil rata-rata parameter nilai *number* (N) dinyatakan sesuai karena nilai rata-rata yang diperoleh paling besar yaitu 33,297. Untuk nilai *height equivalent a theoritical*

plate (HETP) dinyatakan sesuai karena nilai yang diperoleh paling kecil yaitu 4,78.

6.4 Penetapan Kadar Flavonoid Total

Penetapan kadar bertujuan untuk melihat kadar senyawa flavonoid total yang ada pada fraksi etil asetat daun afrika dengan metode KLT- Densitometri.

Hasil persamaan regresi linier yang didapat pada penelitian ini yaitu $y = 6,973 \times 10^{-5} \cdot x + 2,95 \times 10^{-4}$. Pada perhitungan regresi linier yang diperoleh yaitu 0,977.

Hasil kadar flavonoid total fraksi etil asetat daun afrika dalam 25 mg yang didapatkan yaitu 3,82138 mg/QE/g. Pada hasil % kadar flavonoid total yang diperoleh 15,285 %. Untuk hasil SD yang didapatkan yaitu 0,25011 dan nilai RSD yang didapatkan yaitu 6,5% (Kiranawati, 2021).

Hasil standar deviasi (SD) digunakan untuk membandingkan ketepatan suatu hasil. Semakin kecil nilai SD dari serangkaian pengukuran semakin tepat metode yang digunakan. Hasil nilai keseksamaan (RSD) yang baik dinyatakan dengan semakin kecil analit, semakin besar nilai RSD yang didapat. Salah satu parameter presisi yaitu keterulangan (*repeatability*) yang merupakan ketepatan yang ditentukan pada laboratorium yang sama oleh satu analis serta menggunakan peralatan dan dilakukan pada hari yang sama. Berdasarkan Association of Official Analytical Chemist (AOAC) nilai %RSD pada presisi repeability (keterulangan) konsentrasi analisis yang baik adalah $\leq 5,3\%$ (AOAC, 2013).

Menurut peneliti, hasil kadar flavonoid total fraksi etil asetat daun afrika yang diperoleh yaitu sebanyak 15,285% dalam 25 mg fraksi etil asetat daun afrika. Hal ini dinyatakan pada penelitian ini kadar senyawa flavonoid yang

terkandung lebih tinggi dari pada penelitian yang dilakukan oleh (Solikhah, 2021) yaitu dalam 40 mg ekstrak etanol 70% daun afrika mengandung kadar flavonoid sebesar 22,1% dengan metode perlakuan daun di angin anginkan dan 30,76% kadar flavonoid dengan metode pengeringan panas matahari. Penelitian yang dilakukan oleh (Meidiawati et al., 2018) yaitu dalam 1 gram ekstrak etanol 70% daun afrika mengandung kadar flavonoid 1,27% dinyatakan masih lebih tinggi kadar yang diperoleh pada penelitian ini.

Hasil nilai regresi yang didapat dari persamaan baku memenuhi syarat karena mendekati 1 yaitu 0,977. Hasil perhitungan simpangan baku (SD) dari data yang diperoleh sebanyak 3 kali pengulangan dari sampel fraksi etil asetat daun afrika sebesar 0,25011. Sedangkan, hasil nilai simpangan baku relatif (RSD) sebesar 6,5% dinyatakan tidak memenuhi syarat karena nilai presisi keterulangan (repeability) yang baik yaitu $\leq 5,3\%$. Hal ini dapat disebabkan oleh penotolan yang dilakukan pada penelitian ini secara manual dengan menggunakan mikropipet, sehingga penotolan yang dilakukan kurang maksimal.

Berkurangnya fraksi etil asetat daun afrika pada saat penimbangan yang dilakukan karena fraksi yang tertinggal pada wadah (beaker glass) yang digunakan untuk tempat menimbang fraksi dan homogenitas yang kurang saat melarutkan fraksi. Kemudian, dapat pula di pengaruhi oleh ukuran lempeng yang digunakan pada penotolan terlalu dekat sehingga eluasi yang terjadi kurang baik.

Pengaruh kondisi lingkungan interval waktu yang pendek dan dilakukan secara seksama. Kemungkinan juga dapat dipengaruhi oleh cahaya matahari yang masuk dalam ruangan dapat mempengaruhi kadar yang terkandung dalam fraksi

etil asetat daun afrika. Karena, flavonoid merupakan senyawa yang sensitif terhadap cahaya dan panas sehingga dapat terjadi degradasi dan menguap membentuk senyawa baru.

Adapun beberapa faktor yang mempengaruhi perbedaan kadar flavonoid yaitu dipengaruhi oleh tinggi tempat, kondisi tanah, dan cuaca yang mengakibatkan perbedaan kadar kandungan kimia yang ada pada daun afrika. Tanaman daun afrika ini yang secara alami tumbuh di sepanjang sungai, danau, pinggiran hutan serta pegunungan hingga 2800 m diatas permukaan laut (Solikhah, 2021).

Daun afrika juga tumbuh di wilayah yang memiliki curah hujan tahunan 750-2000 mm. Daun Afrika dapat tumbuh pada tempat yang mempunyai sinar matahari yang penuh dan memiliki lingkungan yang lembab. Tanaman Daun Afrika tumbuh pada semua jenis tanah, tetapi daun Afrika lebih tumbuh subur dan berkembang pada tanah yang kaya humus. Hal ini juga dapat mempengaruhi kandungan senyawa yang ada pada tanaman daun afrika (Solikhah, 2021).

Menurut (Siswanto, 2012), kondisi tanah akan sangat mempengaruhi kandungan kimia yang dihasilkan dalam suatu tanaman karena pada tanah terdapat kandung unsur hara yang penting untuk proses pembentukan kandungan senyawa kimia pada tumbuhan (Budiarto, 2020). Adapun pada penelitian ini pengambilan sampel dilakukan di kota Sumenep yang tumbuh didaerah sepanjang sungai. keadaan tanah di Kabupaten Sumenep terdiri dari beberapa jenis tanah antara lain sebagai berikut :

Tabel 6.1 Kondisi Jenis Tanah di wilayah Kabupaten Sumenep

No.	Kecamatan	Jenis Tanah
1.	Saronggi dan Batang-batang	Aluvial Hodromortif
2.	Kota Sumenep dan sebagian kecil terdapat di kecamatan Saronggi.	Tanah Alluvial Kelabu Kekuningan
3.	Guluk-guluk dan sebagian kecil terdapat di Kecamatan Lenteng.	Litosol
4.	Bluo, Sasonggi dan sebagiannkecil terdapat di Kecamatan Talango	Asosiasi Litosol dan Mediteran
5.	Giligenting dan sebagian kecil terdapat di kecamatan Gapura	Regusol Coklat Kekuningan
6.	Pragaan, Gading, Guluk-guluk, dan sebagian kecil terdapat di kecamatan Saronggi dan Ambunten.	komplek Brows Forest Litosol dan mediteran
7.	Gading dan sebagian kecil terdapat di kecamatan Kalianget.	Grumosol Kelabu
8.	Batu Putih dan sebagian kecil terdapat di kecamatan Gapura.	Komplek Mediteran Grumosol, Regusol, dan Litosol

Sumber : BPN Kabupaten Sumenep (Budiarto, 2020)

Perbedaan dalam bentuk lahan dan kondisi iklim mengakibatkan adanya tiga zone tanah geografis. Setiap zone mempunyai jenis pola-pola tanah yang spesifik. Zone- zone tersebut menghubungkan lebih kurang tiga bentang alam utama, yaitu:

- Bentuk lahan bergunung : Tanah andosol, regosol
- Bentuk lahan berbukit : Tanah litosol
- Bentuk lahan dataran sungai : Tanah aluvial, regosol dan grumosol

Jenis tanah yang sebagian terdapat di kota sumenep pada bentuk lahan daratan sungai yaitu jenis tanah aluvial. Tanah tersebut merupakan jenis tanah yang tergolong sebagai tanah muda yang terbentuk dari endapan halus di aliran sungai. Jenis tanah ini dapat dimanfaatkan sebagai lahan pertanian karena kandungan unsur hara yang relatif tinggi. Tanah aluvial memiliki struktur tanah yang pejal dan tergolong liat atau liat berpasir. Karena itu, jenis tanah aluvial banyak ditemukan di sekitaran daerah sungai, danau, dataran rendah, ataupun cekungan yang memungkinkan terjadinya endapan (Budiarto, 2020).

BAB VII KESIMPULAN

7.1 Kesimpulan

Dari penelitian ini, dapat ditulis beberapa kesimpulan sebagai berikut :

- a. Skrining fitokimia daun afrika dinyatakan positif mengandung senyawa kimia flavonoid, alkaloid, steroid, saponin. Sedangkan pada pengujian tanin menyatakan negatif, tidak mengandung senyawa kimi tanin .
- b. Optimasi fase gerak yang diperoleh Toluene : Etil asetat : Asam asetat glasial (6:4:0,5) v/v/v. Optimasi panjang gelombang yang diperoleh 384 nm. Optimasi konsentrasi yang digunakan yaitu 5 seri larutan standar yaitu 100, 200, 300, 400, 500 ppm. Nilai *R_f* yang diperoleh dinyatakan memenuhi syarat.
- c. Kadar flavonoid total dalam fraksi etil asetat daun afrika yang diperoleh yaitu dalam setiap 25 mg mengandung 3,82138 mg/QE/g dan % kadar rata-rata 15,285%. Nilai regresi linier (*r*) yang diperoleh dinyatakan memenuhi syarat rentang berdasarkan literatur. Nilai SD dan RSD yang di peroleh dinyatakan tidak memenuhi syarat.

7.2 Saran

Penelitian ini disarankan dapat digunakan sebagai informasi bagi industri farmasi dan masyarakat mengenai optimasi kondisi Analisis KLT Densitometri untuk penetapan kadar flavonoid total pada fraksi etil asetat ekstrak daun

afrika (*Vernonia amygdalina*). Perlu ada penelitian lebih lanjut mengenai validasi metode analisis KLT-Densitometri terkait dengan analisis dan penetapan kadar senyawa kimia lain yang terkandung di dalam tanaman daun afrika. Perlu adanya penelitian lebih lanjut pada bagian lain dari tanaman daun afrika. Serta, perlu adanya buku atau jurnal mengenai KLT-Densitometri sebagai tambahan referensi yang bisa didapatkan di perpustakaan Universitas dr. Soebandi.

DAFTAR PUSTAKA

- Akhsanita, M. (2012). Uji Sitotoksik Ekstrak, Fraksi, dan Sub-Fraksi Daun Jati (*Tectonagrandis*Linn. f.) dengan Metode Brineshrimp Lethality Bioassay. *Universitas Andalas*, 1–52.
- Alfaridz, F., & Amalia, R. (2018). Klasifikasi dan Aktivitas Farmakologi dari Senyawa Aktif Flavonoid. *Farmaka*, 16(3), 1–9.
- Aminah, A., Tomayahu, N., & Abidin, Z. (2017). Penetapan Kadar Flavonoid Total Ekstrak Kulit Buah Alpukat (*Persea americana* Mill.) Dengan Metode Spektrofotometri UV-VIS. *Jurnal Fitofarmaka Indonesia*, 4(2), 226–230. <https://doi.org/10.33096/jffi.v4i2.265>
- Angelina, M., Amelia, P., Irsyad, M., Meilawati, L., & Hanafi, M. (2015). Karakteristik Ekstrak Etanol Herba Ketumpangan Air (*Peperomia pellucida* L . Kunth). *Biopropal Industri*, 6(2), 53–61.
- AOAC. (2013). Collaborative International Pesticides Analytical Council (CIPAC). Guidelines on method validation to be performed in support of analytical methods for agrochemical formulations. *Jurnal Sains Dan Seni Its*, 4(2), 1–17.
- Apriyola, N., Nurulita, Y., Riau, M. U., Riau, M. U., Science, N., & Riau, U. (2020). *Secondary Metabolite Characteristics of Heterotrophic Bacteria Production As Antimicrobial*. 3(2), 147–157.
- Ariel Stanley. (2018). *Validasi Metode Thin-Layer Chromatography (Tlc) - Densitometri Pada Penetapan Kadar Kafein Dalam Validasi Metode Thin-Layer Chromatography (Tlc) -Densitometri Pada Penetapan Kadar*. 83.
- Arifa Mustika, R. Indrawati. (2015). Standarisasi Ekstrak Etanol *Centella asiatica* dengan Identifikasi Kandungan Asiaticoside, Asiatic acid dan Madecasic acid. *Allergy, Asthma, and Clinical Immunology*, 01(03), 91.

<https://doi.org/10.2310/7480.2005.00018>

Arifin, B., & Ibrahim, S. (2018). Struktur, Bioaktivitas Dan Antioksidan Flavonoid. *Jurnal Zarah*, 6(1), 21–29. <https://doi.org/10.31629/zarah.v6i1.313>

Arikalang, T. G., Sudewi, S., & Rorong, J. A. (2018). Penentuan Kandungan Total Fenolik Pada Ekstrak Daun GEDI Hijau (*Abelmoschus manihot* L .) Yang Diukur Dengan Spektrofotometri UV-VIS. *Jurnal Ilmiah Farmasi* –, 7(3), 14–21.

Ariyanti, Kesbi, F. G., Tari, A. R., Siagian, G., Jamilatun, S., Barroso, F. G., Sánchez-Muros, M. J., Rincón, M. Á., Rodriguez-Rodriguez, M., Fabrikov, D., Morote, E., Guil-Guerrero, J. L., Henry, M., Gasco, L., Piccolo, G., Fountoulaki, E., Omasaki, S. K., Janssen, K., Besson, M., ... A.F. Falah, M. (2021). Optimasi Metode Analisis Kromatografi Lapis Tipis Densitometri Pada Penetapan Kadar 1,8-Sineol Dalam Minyak Kayu Putih. *Jurnal Aplikasi Teknologi Pangan*, 4(1), 1–2. http://www.ejurnal.its.ac.id/index.php/sains_seni/article/view/10544%0Ahttps://scholar.google.com/scholar?hl=en&as_sdt=0%2C5&q=tawuran+antar+pe+lajar&btnG=%0Ahttps://doi.org/10.1016/j.jfca.2019.103237

Asante, D. B., Effah-Yeboah, E., Barnes, P., Abban, H. A., Ameyaw, E. O., Boampong, J. N., Ofori, E. G., & Dadzie, J. B. (2017). Antidiabetic Effect of Young and Old Ethanolic Leaf Extracts of *Vernonia amygdalina*: A Comparative Study. *Journal of Diabetes Research*, 2017, 5618548. <https://doi.org/10.1155/2017/5618548>

Asmoro Bangun, P. P. (2021). Analisis kadar total flavonoid pada daun dan biji pepaya (*carica papaya* l.) Menggunakan metode spektrofotometer Uv-Vis. *Jurnal Ilmiah Farmasi Attamru*, 2(1), 1–5. <https://doi.org/10.31102/attamru.v2i1.1263>

- Budiarto, A. N. (2020). *Pengaruh Jenis Tanah Sebagai Media Tanam Terhadap Pertumbuhan dan Hasil Tanaman Okra (Abelmoschus Esculentus L .)*.
- Dewi, A. A. R. F., Muntholib, & Subandi. (2020). In vitro and in silico Analysis of Pomegranate (Punica granatum L.) Fruit Powder as Pancreatic Lipase and α -Amylase Inhibitor. *Journal of Physics: Conference Series*, 1665(1). <https://doi.org/10.1088/1742-6596/1665/1/012004>
- Ediningtyas, V. V. D. (2021). Optimasi Metode Kromatografi Lapis Tipis (KLT)-Densitometri Pada Penetapan Kadar Metil Salisilat Dan Eugenol Dalam Sediaan Krim “X.” *Repository.Usd.Ac.Id*, 1–85. https://repository.usd.ac.id/25510/2/084114001_Full%5B1%5D.pdf
- Endarini, L. H. (2016). *Farmakognosi Dan Farmakologi*.
- Estika, D. (2017). *Validasi Metode Analisis..., Denilla Estika, Fakultas Farmasi UMP, 2017*.
- Fatmawati, A. dan N. P. A. (2019). Penetapan Kadar Flavonoid Total Ekstrak Etanol Daun Kelor (Moringa Oleifera Lam) Dengan Metode Kromatografi Lapis Tipis Densitometri. *Proceedings of the Conference Maternal Healthcare and Pharmacy*, 1(1), 1–7. <http://fikes.almaata.ac.id/wp-content/uploads/2019/07/Annisa-FatmawatiNurwani-Purnama-Aji.pdf>
- Febrianti, P., Prabowo, W. C., & Rijai, L. (2017). *Aktivitas Antioksidan Dan tabir Surya Ekstrak Daun Afrika (Vernonia amygdalina Del.)*. April, 23–24. <https://doi.org/10.25026/mpc.v5i1.237>
- Fikri, G. (2016). *Uji Aktivitas Sediaan Gel Ekstrak Daun Sirih Hijau (Piper betle L) Sebagai Kandidat Kosmetik Antiacne*. 15(2), 1–23.
- Guswandi, H. R. R. W. (2014). Pengaruh Cara Pengeringan Dengan Oven, Kering Angin dan Cahaya Matahari Langsung Terhadap Mutu Simplisia Herba Sambiloto. *Jurnal Farmasi Higea*, 6(2), 126–133.

- Hanani, E. (2020). *Analisis Fitokimia*. April. <https://doi.org/10.13140/RG.2.2.26342.98886>
- Henri. (2018). Tanaman Daun Afrika. *Angewandte Chemie International Edition*, 6(11), 951–952., 3–13.
- Heri Sismoro, H. (2013). Multi Attribute Decision Making – Penggunaan Metode Saw Dan Wpm Dalam Pemilihan Proposal Umkm. *Data Manajemen Dan Teknologi Informasi (DASI)*, 14(1), 29. <https://ojs.amikom.ac.id/index.php/dasi/article/view/151>
- Ihsan, B. R. P., Rahmani, P. A., & Shalas, A. F. (2019). Validation Method of a TLC-Densitometry for Determination of Quercetin in Extract and Herbal Products of Leaves Guava (*Psidium guajava* L .). *Pharmaceutical Journal of Indonesia*, 5(1), 45–51.
- Imron, I. (2019). Analisa Pengaruh Kualitas Produk Terhadap Kepuasan Konsumen Menggunakan Metode Kuantitatif Pada CV. Meubele Berkah Tangerang. *Indonesian Journal on Software Engineering (IJSE)*, 5(1), 19–28. <https://doi.org/10.31294/ijse.v5i1.5861>
- Indonesia, K. K. R. E. I. (2017). Formularies. *Pocket Handbook of Nonhuman Primate Clinical Medicine*, 213–218. <https://doi.org/10.1201/b12934-13>
- Jayaweera, U., Akowuah, G. A., Ling, C. Y., Kumar, P. V., & Herapathdeniya, S. (2021). Diabetes and vernonia amygdalina delile (Asteraceae). *Biointerface Research in Applied Chemistry*, 12(4), 4496–4517. <https://doi.org/10.33263/BRIAC124.44964517>
- Julianto, T. S. (2019). Fitokimia Tinjauan Metabolit Sekunder dan Skrining Fitokimia. In *Journal of Chemical Information and Modeling* (Vol. 53, Issue 9).
- Kapitan, H. P. (2018). *Uji Aktivitas Antioksidan Fraksi Etil Asetat Ekstrak Etanol*

Daun Afrika (Vernonia amygdalina Del) Dengan Metode DPPH (1,1-Diphenyl-2-Picrylhydrazyl).

- Kiranawati, S. (2021). Plagiat Merupakan Tindakan Tidak Terpuji Plagiat Merupakan Tindakan Tidak Terpuji. *Repository.Usd.Ac.Id*, 1–85. https://repository.usd.ac.id/25510/2/084114001_Full%5B1%5D.pdf
- Koirewoa, Y. A., Fatimawali, & Wiyono, W. I. (2012). Isolasi Dan Identifikasi Senyawa Flavonoid Dalam Daun Beluntas (Pluchea Indica L.) Isolation And Identification Flavonoid Compounds In Beluntas Leaf (Pluchea Indica L.). *Jurnal Farmasi*, 47–52.
- Koten, V. N., & Handiwibowo, G. F. (2018). Perbandingan Kadar Fenolik Total Ekstrak Daun Afrika (Vernonia Amygdalina Del .) Dari Flores Dan Malang. *Artikel Ilmiah*, 1(1), 1–10.
- Kurang, R. Y., & Adang, B. (2018). Skrining Fitokimia Dan Uji Aktivitas Antioksidan Daun Sirsak (Annona Muricata L) Dengan Metode 1,1-Difenil-2-Pikrylhidrazyl (Dpph). *Partner*, 23(1), 567. <https://doi.org/10.35726/jp.v23i1.299>
- Latifah. (2015). *Identifikasi Golongan Senyawa Flavonoid Dan Uji Aktivitas Antioksidan Pada Ekstrak Rimpang Kencur Kaempferia galanga L. Dengan Metode DPPH (1,1-Difenil-2-PikrilHidrakzin)*. 151, 10–17. <https://doi.org/10.1145/3132847.3132886>
- Lestari, P. A., Sisilia, K., & Telkom, U. (2016). *Analisis Atribut Tolerance for Ambiguity Dan Risk Tolerance Pada Kepribadian Kewirausahaan Mahasiswa S1 Administrasi Bisnis Telkom University the Analysis of Attributes of Tolerance for Ambiguity and Risk Tolerance on the Entrepreneurship Personality of T*. 3(1), 551–556.
- Marjoni, M. R. (2016). Dasar - Dasar Fitokimia Untuk Diploma III Farmasi. *Pharmaciana*, 4(2), 193–200.

<https://doi.org/10.12928/pharmaciana.v4i2.1578>

- Maulana, M. (2018). Profil Kromatografi Lapis Tipis (KLT) Ekstrak Daun Bidara Arab (*Ziziphus spina cristi. L*) Berdasarkan Variasi Pelarut. *Biomass Chem Eng*, 3(2), تفتق
<http://journal.stainkudus.ac.id/index.php/equilibrium/article/view/1268/1127>
<http://publicacoes.cardiol.br/portal/ijcs/portugues/2018/v3103/pdf/3103009.pdf>
http://www.scielo.org.co/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0121-75772018000200067&lng=en&tlng=
- Meidiawati, C., Zuhri, U. M., Keban, S. A., & Winarti, W. (2018). Penetapan Kadar Flavonoid Total dan Uji Toksisitas Akut Ekstrak Daun Afrika (*Vernonia amygdalina Del.*) pada Mencit Jantan DDY. *Jurnal Ilmiah Ibnu Sina*, 3(2), 294–303.
- Mulyadi, M. (2012). Riset Desain Dalam Metodologi Penelitian. *Studi Komunikasi Dan Media*, 16(1), 71–80.
- Muthmainnah B. (2017). Skrining Fitokimia Metabolit Sekunder Dari Ekstrak Etanol Buah Delima (*Punica granatum L.*) Dengan Metode Uji Warna. *Media Farmasi Poltekkes Makassar*, 6(2), 5–9.
- Najihudin, A., Chaerunisaa, A., & Subarnas, A. (2017). Aktivitas Antioksidan Ekstrak Dan Fraksi Kulit Batang Trengguli (*Cassia fistula L*) Dengan Metode DPPH. *Indonesian Journal of Pharmaceutical Science and Technology*, 4(2), 70. <https://doi.org/10.15416/ijpst.v4i2.12354>
- Naufalia, A. N. (2021). Validasi Metode Dan Penetapan Kadar Daidzein Edamame (*Glycine max*) Terfermentasi Oleh *Rhizopus oligosporus* Dengan KLT-Densitometri. In *Digital Repository Universitas Jember* (Issue September 2019).
- Ni Ketut Esati*, I Putu Budiarta, Kadek uwi Cahyadi, G. A. D. L. (2021). *Isolasi Dan Identifikasi Senyawa Flavonoid Fraksi Etil Asetat Ekstrak Daun Afrika*

(*Vernonia amygdalina Del.*). 6(2), 350–360.

Nova, C. (2016). *Skrining Fitokimia Dan Uji Aktivitas Antioksidan Ekstrak Metanol Daun Sirih Lengkuas (Piper aduncum L.)*. June.

Nugroho, A. (2017). Buku Ajar: Teknologi Bahan Alam. In *Lambung Mangkurat University Press* (Issue January 2017).

Nurhayati, R., Primaharinastiti, R., & Yuwono, M. (2020). Optimasi Metode dan Uji Stabilitas pada Penetapan Kadar Filantin dalam Ekstrak *Phyllanthus niruri* Menggunakan KLT-Densitometri. *Jurnal Farmasi Dan Ilmu Kefarmasian Indonesia*, 7(2), 74. <https://doi.org/10.20473/jfiki.v7i22020.74-79>

Obenu, N. M. (2019). Ekstraksi dan Identifikasi Komposisi Metabolit Fraksi Diklorometana dan Aquades Ekstrak Metanol Daun Sirsak (*Annona muricata* Linn). *Jurnal Saintek Lahan Kering*, 2(1), 17–19. <https://doi.org/10.32938/slk.v2i1.717>

Ogbuagu, E. O., Airaodion, A. I., Ogbuagu, U., & Airaodion, E. O. (2019). Effect of Methanolic Extract of *Vernonia amygdalina* Leaves on Glycemic and Lipidaemic Indexes of Wistar Rats. *Asian Journal of Research in Medical and Pharmaceutical Sciences*, 7(3), 1–14. <https://doi.org/10.9734/ajrimps/2019/v7i330122>

Parfati, N., Rani, K. C., & Jayani, N. I. E. (2018). Modul Penyiapan Simplisia Kelor. *Fakultas Farmasi Universitas Surabaya*, 1–24.

Pramesti, N. K. A., Putri, N. P. V. G., Dewi, I. A. M. L., Moreira, M. V., & Antarini, L. R. (2021). Identifikasi dan Penetapan Kadar Alkaloid Kinin Ekstrak Kulit Batang Kina (*Cinchona succirubra*) secara KLT Spektrofotodensitometri. *Jurnal Ilmiah Medicamento*, 7(2), 118–128. <https://doi.org/10.36733/medicamento.v7i2.1510>

- Puspa, O. E., Syahbanu, I., & Wibowo, M. A. (2017). Uji Fitokimia Dan Toksisitas Minyak Atsiri Daun Pala (*Myristica fragans* Houtt) Dari Pulau Lemukutan. *Jurnal Kimia Khatulistiwa*, 6(2), 1–6.
- Putri, Y. A. (2019). Potensi Daun Afrika (*Vernonia amygdalina*) sebagai Antidiabetik. *Jiksh*, 10(2), 336–339. <https://doi.org/10.35816/jiskh.v10i2.183>
- Ridha, N. (2017). Proses Penelitian, Masalah, Variabel, dan Paradigma Penelitian. *Jurnal Hikmah*, 14(1), 62–70. <http://jurnalhikmah.staisumatera-medan.ac.id/index.php/hikmah/article/download/10/13>
- Rosamah, E. (2014). Kromatografi Lapis Tipis Metode Sederhana Dalam Analisis Kimia Tumbuhan Berkayu. *Paper Knowledge . Toward a Media History of Documents*, 5(2), 40–51. <https://repository.unmul.ac.id/bitstream/handle/123456789/6733/3>.
Kromatografi lapis tipis %3B metode sederhana dalam analisis kimia tumbuhan berkayu.pdf?sequence=1&isAllowed=y
- Safitri, W, R. (2014). Analisis Korelasi Pearson Dalam Menentukan Hubungan Antara Kejadian Demam Berdarah Dengue Dengan Kepadatan Penduduk Di Kota Surabaya Pada Tahun 2012 - 2014. *Jurnal Kesehatan Masyarakat*, 1(3), 1–9.
- Saidu, H., Ahmad, H. I., Olanrewaju, S. A., & Mahmoud, A. B. (2020). Antibacterial Effect of Bitter Leave (*Vernonia amygdalina*) on *Klebsiella pneumoniae*. *Journal of Biochemistry*, 8(2), 16–20.
- Saputri, N. D. (2014). Analisis Kadar Flavonoid Pada Benalu Kopi (*Dendrophthoe pentandra* (L.) Miq.) menggunakan Teknik Kromatografi Lapis Tipis-Densitometri. *Digital Repository Universitas Jember*, 100. [http://repository.unej.ac.id/bitstream/handle/123456789/75992/Dian Pratiwi - 132310101064 -1.pdf?sequence=1](http://repository.unej.ac.id/bitstream/handle/123456789/75992/Dian%20Pratiwi%20-%20Analisis%20Kadar%20Flavonoid%20Pada%20Benalu%20Kopi%20(Dendrophthoe%20pentandra%20(L.)%20Miq.)%20menggunakan%20Teknik%20Kromatografi%20Lapis%20Tipis-Densitometri.pdf?sequence=1)
- Sineke, F. U., Suryanto, E., & Sudewi, S. (2016). Penentuan Kandungan Fenolik

- Dan Sun Protection Factor (SPF) Dari Ekstrak Etanol Dari Bebebrapa Tongkol Jagung (*Zea mays* L.). *Pharmacon*, 5(1), 275–283.
- Siswanto. (2012). *Pengembangan Tembakau Unggulan di Sumenep*. http://eprints.upnjatim.ac.id/2400/1/Monograph_Tembakau.pdf
- Solikhah, T. (2021). *Uji Kuantitatif Flavonoid Ekstrak Etanol Daun Afrika (Vernonia amygdalina del.)*.
- Sukmawati, S., Hadi, H., & Aminah, A. (2017). Potensi Senyawa Flavonoid Daun Afrika (*Vernonia amygdalina Del.*) Asal Ternate Sebagai Antioksidan. *Jurnal Ilmiah As-Syifaa*, 9(2), 195–200. <https://doi.org/10.33096/jifa.v9i2.278>
- Suroso, S. K. T. (2016). *Uji Sitotoksitas Ekstrak Etil Asetat Daun Sorgum (Sorghum bicolor L.) Terhadap Sel Kanker Payudara (T47D)*. July, 1–23.
- Susanti, N. M. P., Budiman, I. N. ., & Warditiani, N. K. (2015). Skrining Fitokimia Ekstrak Etanol 90 % Daun Katuk (*Sauropus androgynus* (L .) Merr .). *Repository Universitas Udayana*, 83–86.
- Swarjana, I. K. (2022). Konsep Pengetahuan Sikap, Prilaku, Persepsi, Stres, Kecemasan, Nyeri, Dukungan Sosial, Kepatuhan, Motivasi, Kepuasan, Pandemi Covid-19, Akses Layanan Kesehatan. *Andi*, 4, 3–12.
- Syarifuddin, A., Sulistyani, N., & Kintoko. (2019). *Jurnal Farmasi Sains dan Praktis Teraktif (Isolat Kp13) Dari Bakteri Rizosfer Kayu Putih (Melaleuca leucadendron L .) Profile Of TLC-Bioautography And Densitometry Of Active Fractions Of Active Fractions (Isolate KP13) FROM RIZOSPHERE OF WHITE WOOD (. 1, 27–33*.
- Wardaningrum, R. Y. (2019). *Perbandingan Aktivitas Antioksidan Ekstrak Etanol Terpurifikasi Ubi Jalar Ungu (Ipomoea batatas .L) Dengan Vitamin E*. 2, 1–13.

- Waty, F. (2016). *Aktivitas Antibakteri Ekstrak Daun Nammam (Cynometra cauliflora L.) TERHADAP Staphylococcus epidermidis DAN Pseudomonas aeruginosa*. 1–23.
- Wulandari, A. R., Sunnah, I., & Dianingati, R. S. (2021). Optimasi Pelarut terhadap Parameter Spesifik Ekstrak Kitolod (*Isotoma longiflora*). *Generics: Journal of Research in Pharmacy*, 1(1), 10–15.
- Wulandari, L. (2011). Kromatografi Lapis Tipis. In *Taman Kampus Presindo*.
- Wulandari, L., Retnaningtyas, Y., & Mustafidah, D. (2013). Development and Method Validation Densitometry Thin Layer and Ephedrinehydrochloride In Tablet. *Jkti*, 15(1), 15–21.
- Zirconia, A., Kurniasih, N., & Amalia, V. (2015). I Dentifikasi S Enyawa F Lavonoid D Ari D Aun K Embang. *Al Kimiya*, 2(1), 9–18.

LAMPIRAN

Lampiran 1. Jadwal Penyusunan Naskah Skripsi

No	Kegiatan	Nov	Feb	Jan	Apr	Mei	Jun	Jul	Ags	Sep
1.	Penyusunan proposal skripsi									
	a. Bimbingan									
	b. Revisi									
	c. Fiksasi									
2.	Seminar proposal skripsi									
3.	Tahap penyiapan bahan									
4.	Tahap pelaksanaan penelitian									
5.	Tahap penyusunan hasil skripsi									
	a. Bimbingan dan revisi									
6.	Seminar hasil skripsi									

Lampiran 2. Determinasi Tanaman Daun Afrika

Kode Dokumen : FR-AUK-064
 Revisi : 0



KEMENTERIAN PENDIDIKAN, KEBUDAYAAN,
 RISET DAN TEKNOLOGI
 POLITEKNIK NEGERI JEMBER
 UPT. PENGEMBANGAN PERTANIAN TERPADU
Jalan Mastrip Kotak Pos 164 Jember - 68101 Telp. (0331) 333532 - 333534 Fax. (0331) 333531
 E-mail : Polije@polije.ac.id Web Site : <http://www.Polije.ac.id>

SURAT KETERANGAN IDENTIFIKASI TANAMAN

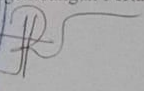
No: 061/PL17.8/PG/2022

Menindaklanjuti surat dari Dekan Universitas dr. Soebandi Program Studi Sarjana Farmasi No: 445/FIKES.UDS/U/II/2022 perihal Permohonan Identifikasi Tanaman dan berdasarkan hasil pengamatan pada spesimen tumbuhan yang dikirimkan ke UPT. Pengembangan Pertanian Terpadu, Politeknik Negeri Jember oleh:

Nama : Fanisa Ayu Agustin
 NIM : 18040035
 Jur. Fak/PT : Prodi Sarjana Farmasi/ Universitas dr. Soebandi

maka dapat disampaikan hasilnya bahwa spesimen tersebut di bawah ini (terlampir) adalah:
Kingdom: Regnum: Plantae; Devisio: Spermatophyta; Sub Devisio: Magnoliophyta; Kelas: Magnoliopsida; Sub Kelas: Asteridae; Ordo: Asterales; Famili: Asteraceae; Genus: Vernonia; Spesies: Vernonia amygdalina, Del

Demikian surat keterangan ini dibuat untuk digunakan sebagaimana mestinya.


 Jember, 11 April 2022
 Kepala UPT. Pengembangan Pertanian Terpadu

 Ir. Budi Prasetyo, S.Pt, MP, IPM
 NIP. 197106212001121001

Lampiran 3. Dokumetasi Sertifikat Kuersetin

SIGMA-ALDRICH®
sigma-aldrich.com

3050 Spruce Street, Saint Louis, MO 63103, USA

 Website: www.sigmaaldrich.com

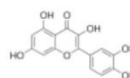
 Email USA: techserv@sial.com

 Outside USA: eurtechserv@sial.com

Certificate of Analysis

 Product Name:
 Quercetin - ≥95% (HPLC), solid

Product Number:	Q4951
Batch Number:	SLCC9071
Brand:	SIGMA
CAS Number:	117-39-5
Formula:	C15H10O7
Formula Weight:	302.24 g/mol
Quality Release Date:	25 JUN 2019



Test	Specification	Result
Appearance (Color)	Conforms	Conforms
Yellow		
Appearance (Form)	Powder	Powder
1H NMR Spectrum	Conforms to Structure	Conforms
Loss on Drying	≤ 4 %	1 %
Purity (HPLC)	≥ 95 %	99 %

 Carolyn Baird, Supervisor
 Quality Assurance
 St. Louis, Missouri US

Sigma-Aldrich warrants, that at the time of the quality release or subsequent retest date this product conformed to the information contained in this publication. The current Specification sheet may be available at Sigma-Aldrich.com. For further inquiries, please contact Technical Service. Purchaser must determine the suitability of the product for its particular use. See reverse side of invoice or packing slip for additional terms and conditions of sale.

Lampiran 4. Dokumentasi Persiapan Sampel dan Proses Ekstraksi

Gambar	Keterangan
	Tahapan persiapan sampel daun afrika yang akan digunakan.
	Simplisia daun afrika yang sudah siap pakai
	Proses ekstraksi maserasi
	Hasil ekstrak kental setelah proses ekstraksi maserasi
	Proses ekstraksi fraksinasi

	Hasil fraksi kental setelah proses ekstraksi fraksinasi
---	--

Lampiran 5. Dokumentasi Perhitungan Ekstraksi Maserasi

Hasil ekstrak kering	Hasil penimbangan
Berat serbuk awal (g)	100
Berat vial kosong (g)	11,66
Berat vial + ekstrak kering (g)	23,90
Berat ekstrak kering(g)	12,24
% Rendemen	12,24%

Lampiran 6. Dokumentasi Perhitungan Ekstraksi Fraksinasi

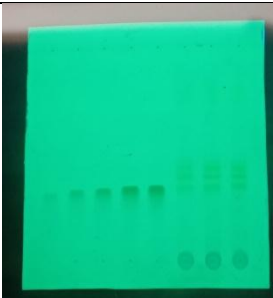
Hasil ekstrak kering	Hasil penimbangan
Berat serbuk awal (g)	12,24
Berat vial kosong (g)	14.01
Berat vial + ekstrak kering (g)	17.27
Berat ekstrak kering(g)	3,26
% Rendemen	26,63%

Lampiran 7. Dokumentasi Skrining Uji Fitokimia

No	Identifikasi yang dilakukan	Terdapat (+)/ Tidak terdapat (-)	Gambar	Perubahan yang terjadi
1.	Identifikasi flavonoid	(+)		Hijau Kehitaman
2.	Identifikasi alkaloid	(+)		Endapan berwarna Putih
				Endapan Berwarna Coklat
				Endapan Berwarna Jingga
3.	Identifikasi terpenoid dan steroid	(+) Steroid		Berwarna Hijau

4.	Identifikasi saponin	(+)		Terbentuk buih dalam 20 menit
5.	Identifikasi tanin	(-)		Tidak ada perubahan warna

Lampiran 8. Dokumentasi Penelitian Dengan Instrumen KLT- Densitometri

Gambar	Keterangan
	Penjenuhan chamber
	Hasil penotolan pada plat KLT (5 seri standart, 3 replikasi sampel)
	Instrumen densitometer yang di gunakan yaitu CAMAG TLC Scanner 4 dengan <i>software</i> visionCATS.

Lampiran 9. Nilai Luas Area dan Nilai *R_f*

Vial ID	Luas Area	<i>R_f</i>
Standar 1 (100 ppm)	0,00649	0,306
Standar 2 (200 ppm)	0,01482	0,324
Standar 3 (300 ppm)	0,01998	0,330
Standar 4 (400 ppm)	0,03203	0,333
Standar 5 (500 ppm)	0,03275	0,335
Sampel 1 (5000 ppm)	0,00636	0,339
Sampel 2 (5000ppm)	0,00739	0,340
Sampel 3 (5000 ppm)	0,00712	0,344

Lampiran 10. Perhitungan Optimasi Konsentrasi Kurva Baku**1. Larutan Induk**

$$\frac{25 \text{ mg}}{25 \text{ mL}} \times 1000 \text{ mg/L} = 1000 \text{ ppm}$$

2. Larutan Standar

Digunakan rumus pengenceran $\Rightarrow V_1 \times M_1 = V_2 \times M_2$

a) 100 ppm, 5 mL = 0,5 mL

b) 200 ppm, 5 mL = 1 mL

c) 300 ppm, 5 mL = 1,5 mL

d) 400 ppm, 5 mL = 2 mL

e) 500 ppm, 5 mL = 2,5 mL

3. Larutan Sampel

$$a) \frac{25 \text{ mg}}{5 \text{ mL}} \times 1000 \text{ mg/L} = 5000 \text{ ppm}$$

$$b) \frac{25 \text{ mg}}{5 \text{ mL}} \times 1000 \text{ mg/L} = 5000 \text{ ppm}$$

$$c) \frac{25 \text{ mg}}{5 \text{ mL}} \times 1000 \text{ mg/L} = 5000 \text{ ppm}$$

4. Perhitungan persamaan regresi yang didapat

$$a = 2,95 \times 10^{-4}$$

$$b = 6,973 \times 10^{-5}$$

$$r = 0,977$$

$$y = 6,973 \times 10^{-5} \cdot X + 2,95 \times 10^{-4}$$

Lampiran 11. Perhitungan Penetapan Kadar Flavonoid Total

1. Sampel 1

$$y_1 = 0,00636 \text{ ng} = 63,6 \times 10^{-4} \text{ ng}$$

$$y = 6,973 \times 10^{-5} \cdot X + 2,95 \times 10^{-4}$$

$$63,6 \times 10^{-4} = 6,973 \times 10^{-5} \cdot X + 2,95 \times 10^{-4}$$

$$X = \frac{y - a}{b} \times \text{FP}$$

$$X = \frac{63,6 \times 10^{-4} - 2,95 \times 10^{-4}}{6,973 \times 10^{-5}} \times 1$$

$$= \frac{60,65 \times 10^{-4}}{6,973 \times 10^{-5}} \times 1$$

$$= 8,6978 \times 10^4 \text{ ng}$$

Kadar Flavonoid

$$\frac{\text{Massa Flavonoid}}{\text{Sampel}} = \frac{8,6978 \times 10^{-4} \text{ ng}}{25 \text{ mg}}$$

$$= 3.479,12 \text{ ng/mg}$$

$$= \frac{3.479,12 \text{ ng/mg}}{\frac{1000.000}{1000}}$$

$$= 3,47912 \text{ mg/g}$$

$$\text{Kadar ppm} = \frac{3,47912 \text{ mg/g}}{5 \text{ mL}} \times 1000 \text{ ppm} = 695,824 \text{ ppm}$$

$$\% \text{Recovery} = \frac{695,824 \text{ ppm}}{5000 \text{ ppm}} \times 100\% = 13,916 \%$$

2. Sampel 2

$$y_2 = 0,00739 \text{ ng} = 73,9 \times 10^{-4} \text{ ng}$$

$$y = 6,973 \times 10^{-5} \cdot X + 2,95 \times 10^{-4}$$

$$73,9 \times 10^{-4} \text{ ng} = 6,973 \times 10^{-5} \cdot X + 2,95 \times 10^{-4}$$

$$X = \frac{y - a}{b} \times \text{FP}$$

$$X = \frac{73,9 \times 10^{-4} - 2,95 \times 10^{-4}}{6,973 \times 10^{-5}} \times 1$$

$$= \frac{70,95 \times 10^{-4}}{6,973 \times 10^{-5}} \times 1$$

$$= 10,1749 \times 10^{-4} \text{ ng}$$

Kadar Flavonoid

$$\frac{\text{Massa Flavonoid}}{\text{Sampel}} = \frac{10,1749 \times 10^4 \text{ ng}}{25 \text{ mg}}$$

$$= 4.069,96 \text{ ng/mg}$$

$$= \frac{4.069,96 \text{ ng/mg}}{\frac{1000.000}{1000}}$$

$$= 4,06996 \text{ mg/g}$$

$$\text{Kadar ppm} = \frac{4,06996 \text{ mg/g}}{5 \text{ mL}} \times 1000 \text{ ppm} = 813,992 \text{ ppm}$$

$$\% \text{Recovery} = \frac{813,992 \text{ ppm}}{5000 \text{ ppm}} \times 100\% = 16,279 \%$$

3. Sampel 3

$$y_3 = 0,00712 \text{ ng} = 71,2 \times 10^{-4} \text{ ng}$$

$$y = 6,973 \times 10^{-5} \cdot X + 2,95 \times 10^{-4}$$

$$71,2 \times 10^{-4} = 6,973 \times 10^{-5} \cdot X + 2,95 \times 10^{-4}$$

$$X = \frac{y - a}{b} \times \text{FP}$$

$$X = \frac{71,2 \times 10^{-4} - 2,95 \times 10^{-4}}{6,973 \times 10^{-5}} \times 1$$

$$= \frac{68,25 \times 10^{-4}}{6,973 \times 10^{-5}} \times 1$$

$$= 9,7877 \times 10^4 \text{ ng}$$

Kadar Flavonoid

$$\frac{\text{Massa Flavonoid}}{\text{Sampel}} = \frac{9,7877 \times 10^4 \text{ ng}}{25 \text{ mg}}$$

$$= 3.915,08 \text{ ng/mg}$$

$$= \frac{3.915,08 \text{ ng/mg}}{\frac{1000.000}{1000}}$$

$$= 3,91508 \text{ mg/g}$$

$$\text{Kadar ppm} = \frac{3,91508 \text{ mg/g}}{5 \text{ mL}} \times 1000 \text{ ppm} = 783,016 \text{ ppm}$$

$$\% \text{Recovery} = \frac{783,016 \text{ ppm}}{5000 \text{ ppm}} \times 100\% = 15,660 \%$$

$$\text{Kadar flavonoid rata-rata} = \frac{3,47912 + 4,06996 + 3,91508}{3}$$

$$= \frac{11,46416}{3} = 3,82138 \text{ mg/g}$$

$$\% \text{ Kadar rata - rata} = \frac{13,916\% + 16,279\% + 15,660\%}{3}$$

$$= \frac{45,855\%}{3} = 15,285 \%$$

$$\text{SD} = \frac{\sqrt{(3,47912 - 3,82138)^2 + (4,06996 - 3,82138)^2 + (3,91508 - 3,82138)^2}}{3}$$

$$= \frac{\sqrt{(0,11714)^2 + (0,06179)^2 + (0,00877)^2}}{3}$$

$$= \sqrt{\frac{0,18770969}{3}} = \sqrt{0,06256}$$

$$= 0,25011$$

$$\text{RSD} = \frac{0,25011}{3,82138} \times 100\% = 6,5 \%$$

Lampiran 12. Perhitungan Resolusi (Rs) Number (N) dan *Height Equivalent of Theoretical Of Plate* (HETP).

$$\text{Rs} = \left(\frac{2x (Tr_1 - Tr_2)}{W_1 + W_2} \right)$$

$$\text{RsQ1} = \left(\frac{2x (0,306 - 0,266)}{0,0904 + 0,1394} \right) = \frac{0,166}{0,2298} = 0,722$$

$$\text{RsQ2} = \left(\frac{2x (0,318 - 0,235)}{0,0609 + 0,2477} \right) = \frac{0,104}{0,3086} = 0,337$$

$$\text{RsQ3} = \left(\frac{2x (0,324 - 0,236)}{0,0746 + 0,3329} \right) = \frac{0,178}{0,4075} = 0,436$$

$$\text{RsQ4} = \left(\frac{2x (0,333 - 0,188)}{0,0428 + 0,4652} \right) = \frac{0,290}{0,5080} = 0,570$$

$$\text{RsQ5} = \left(\frac{2x (0,334 - 0,188)}{0,0375 + 0,4651} \right) = \frac{0,292}{0,5026} = 0,580$$

$$\text{RsF1} = \left(\frac{2x (0,339 - 0,282)}{0,0070 + 0,1746} \right) = \frac{0,114}{0,1816} = 0,0676$$

$$\text{RsF2} = \left(\frac{2x (0,340 - 0,287)}{0,0092 + 0,2017} \right) = \frac{0,106}{0,2109} = 0,502$$

$$\text{RsF3} = \left(\frac{2x (0,346 - 0,306)}{0,0276 + 0,2154} \right) = \frac{0,080}{0,4914} = 0,162$$

$$N = 4^2 \left(\frac{Tr}{W} \right)^2$$

$$\text{NQ1} = 4^2 \left(\frac{0,306}{0,1394} \right)^2 = 16 \times 4,818 = 77,096$$

$$\text{NQ2} = 4^2 \left(\frac{0,318}{0,2477} \right)^2 = 16 \times 1,648 = 26,370$$

$$\text{NQ3} = 4^2 \left(\frac{0,324}{0,3329} \right)^2 = 16 \times 0,947 = 15,155$$

$$\text{NQ4} = 4^2 \left(\frac{0,333}{0,4652} \right)^2 = 16 \times 0,512 = 8,198$$

$$\text{NQ5} = 4^2 \left(\frac{0,334}{0,4651} \right)^2 = 16 \times 0,515 = 8,251$$

$$\text{NF1} = 4^2 \left(\frac{0,339}{0,1746} \right)^2 = 16 \times 3,769 = 45,016$$

$$\text{NF2} = 4^2 \left(\frac{0,340}{0,2027} \right)^2 = 16 \times 2,813 = 45,008$$

$$\text{NF3} = 4^2 \left(\frac{0,346}{0,2154} \right)^2 = 16 \times 2,580 = 41,283$$

$\text{HETP} = \text{H} = \frac{\underline{\text{L}}}{\text{N}}$
--

$$\text{HQ1} = \frac{90}{77,096} = 1,16$$

$$\text{H Q2} = \frac{90}{26,370} = 3,41$$

$$\text{H Q3} = \frac{90}{15,155} = 5,93$$

$$\text{HQ4} = \frac{90}{8,198} = 10,97$$

$$\text{HQ5} = \frac{90}{8,251} = 10,90$$

$$\text{HF1} = \frac{90}{45,016} = 1,99$$

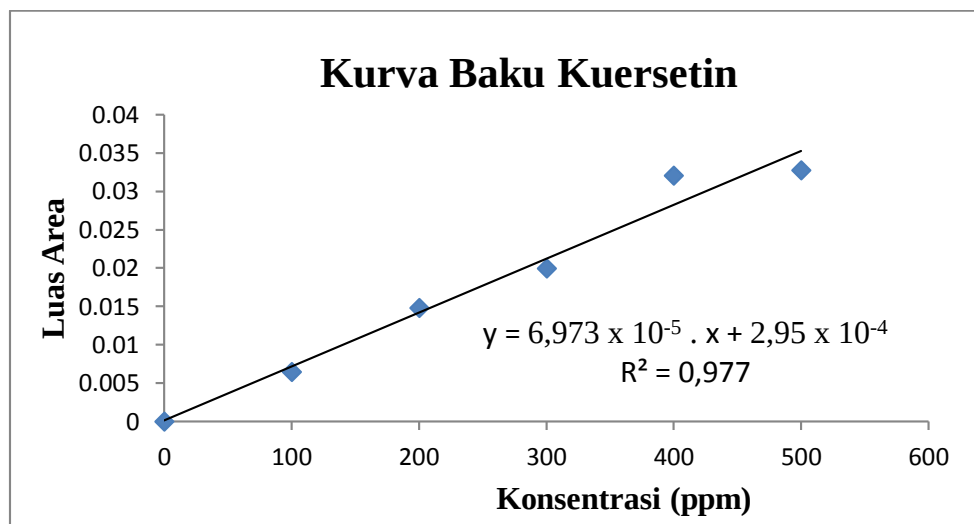
$$\text{HF2} = \frac{90}{45,008} = 1,99$$

$$HF3 = \frac{90}{41,283} = 2,18$$

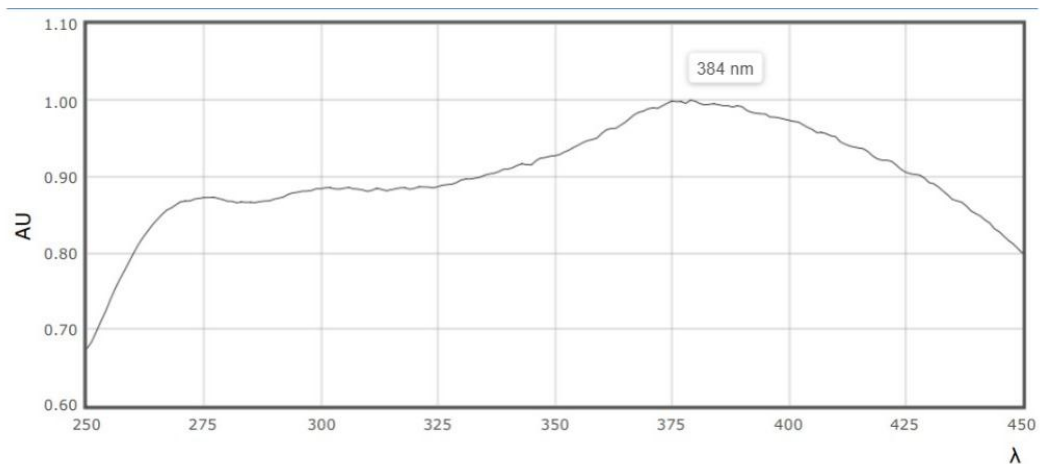
Lampiran 13. Data Hasil Rs, N dan HETP

Nama	Resolusi (Rs)	Number (N)	Height Equivalent Of Theoretical Plate (HETP)
Q1 100 ppm	0,722	77,096	1,16
Q2 200 ppm	0,337	26,370	3,41
Q3 300 ppm	0,436	15,155	5,93
Q4 400 ppm	0,570	8,198	10,97
Q5 500 ppm	0,580	8,251	10,90
F1 5000 ppm	0,0676	45,016	1,99
F2 5000 ppm	0,502	45,008	1,99
F3 5000 ppm	0,162	41,283	2,18
Rata - Rata	0,401	33,297	4,78

Lampiran 14. Dokumentasi Kurva Baku Kuersetin



Lampiran 15. Dokumentasi Panjang Gelombang Maksimum Kuersetin 384 nm



Lampiran 16. Data Kolerasi Spektrum

Substance name	Track	R_F	$r(s,m)$	$r(e,m)$	Ref. spectrum	Correlation
Kuersetin	1	0.306	0.000000	0.000000	Tr. 2, Rf 0.323, Sub. Kuersetin	0.969112
Kuersetin	2	0.323	0.000000	0.000000	Tr. 1, Rf 0.306, Sub. Kuersetin	0.969112
Kuersetin	3	0.330	0.000000	0.000000	Tr. 2, Rf 0.323, Sub. Kuersetin	0.930110
Kuersetin	4	0.333	0.000000	0.000000	Tr. 5, Rf 0.335, Sub. Kuersetin	0.992362
Kuersetin	5	0.335	0.000000	0.000000	Tr. 4, Rf 0.333, Sub. Kuersetin	0.992362
Kuersetin	6	0.339	0.000000	0.000000	Tr. 7, Rf 0.339, Sub. Kuersetin	0.998717
Kuersetin	7	0.339	0.000000	0.000000	Tr. 6, Rf 0.339, Sub. Kuersetin	0.998717
Kuersetin	8	0.347	0.000000	0.000000	Tr. 6, Rf 0.339, Sub. Kuersetin	0.998326