



**ANALISIS KADAR FLAVONOID PADA BENALU KOPI
(*Dendrophthoe pentandra* (L.) Miq.) MENGGUNAKAN
TEKNIK KROMATOGRAFI LAPIS
TIPIS-DENSITOMETRI**

SKRIPSI

Oleh

**Nora Dwi Saputri
121810301021**

**JURUSAN KIMIA
FAKULTAS MATEMATIKA DAN ILMU PENGETAHUAN ALAM
UNIVERSITAS JEMBER
2016**



**ANALISIS KADAR FLAVONOID PADA BENALU KOPI
(*Dendrophthoe pentandra* (L.) Miq.) MENGGUNAKAN
TEKNIK KROMATOGRAFI LAPIS
TIPIS–DENSITOMETRI**

SKRIPSI

diajukan guna melengkapi dan memenuhi salah satu syarat
untuk menyelesaikan Program Studi Kimia (S1)
dan mencapai gelar Sarjana Sains

Oleh
Nora Dwi Saputri
NIM 121810301021

**JURUSAN KIMIA
FAKULTAS MATEMATIKA DAN ILMU PENGETAHUAN ALAM
UNIVERSITAS JEMBER
2016**

PERSEMBAHAN

Skripsi yang berjudul “Analisis Kadar Flavonoid Pada Benalu Kopi (*Dendrophthoe Pentandra* (L.) Miq.) Menggunakan Teknik Kromatografi Lapis Tipis–Densitometri” saya persembahkan kepada:

1. Ibunda Suminah dan Ayahanda Khoiri tercinta, terimakasih atas doa, kasih sayang, dan motivasi yang tiada henti;
2. Guru-guruku di TK Dharma Wanita II, SDN Andongsari VI, SMPN 1 Ambulu, SMAN Ambulu, dan dosen-dosen di Jurusan Kimia FMIPA Universitas Jember yang telah memberikan ilmu serta bimbingan dengan penuh kesabaran;
3. Almamater tercinta Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam Universitas Jember.

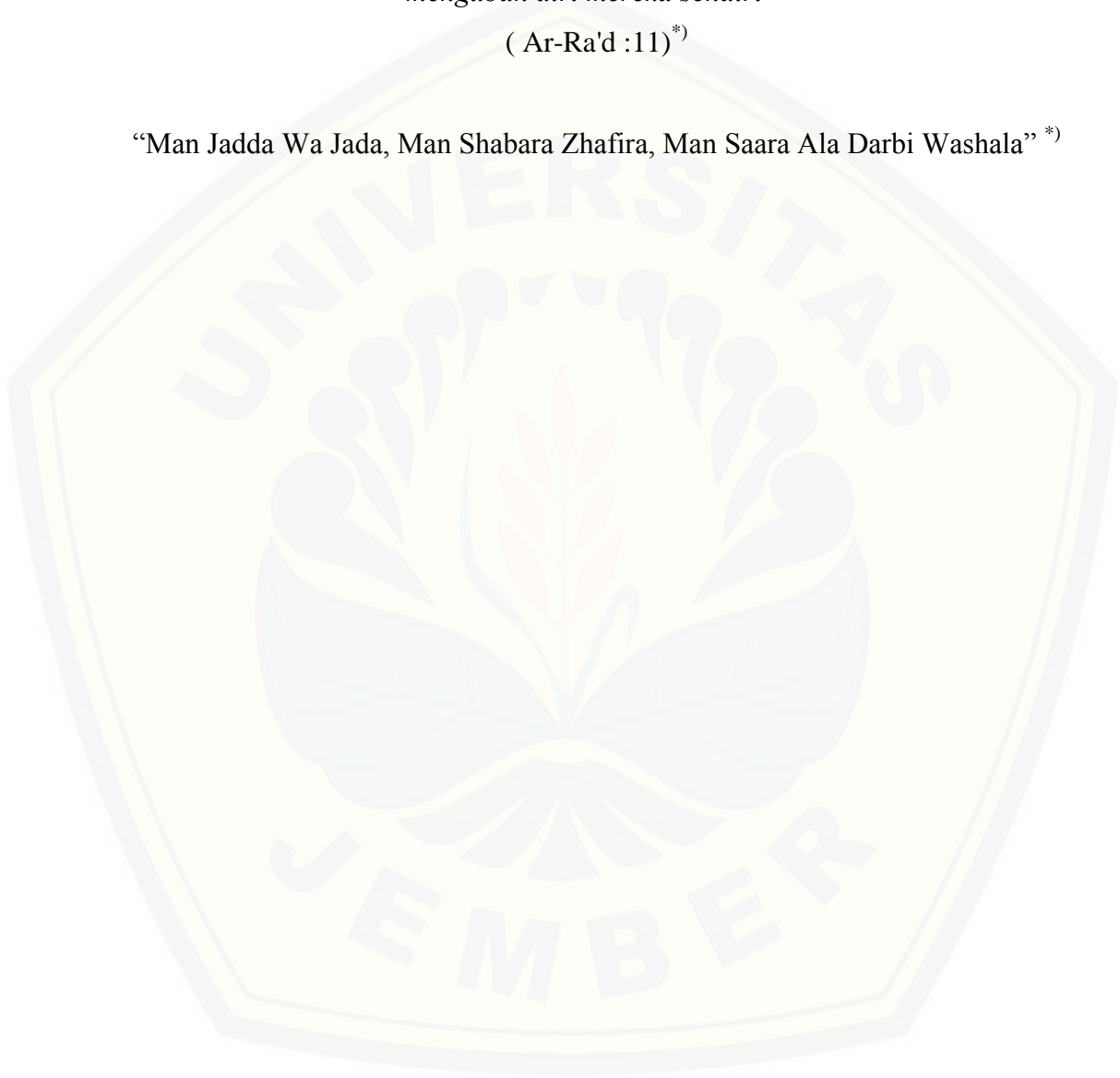
MOTO

.... إِنَّ اللَّهَ لَا يُغَيِّرُ مَا بِقَوْمٍ حَتَّىٰ يُغَيِّرُوا مَا بِأَنفُسِهِمْ....

“*Sesungguhnya Allah tidak akan mengubah (Nasib) suatu kaum sampai mereka mengubah diri mereka sendiri “*

(Ar-Ra'd :11)*)

“*Man Jadda Wa Jada, Man Shabara Zhafira, Man Saara Ala Darbi Washala” **)



*) Tohaputra, Ahmad. 1999. *Al Qur'an dan Terjemahnya (Revisi Terbaru)*
Departemen Agama RI. Semarang: CV Asy Syi'fa.

*) Ahmad Fuadi. 2009. *Negeri 5 Menara*. Jakarta: Gramedia.

PERNYATAAN

Saya yang bertanda tangan di bawah ini:

nama : Nora Dwi Saputri

NIM : 121810301021

menyatakan dengan sesungguhnya bahwa karya ilmiah yang berjudul “Analisis Kadar Flavonoid Pada Benalu Kopi (*Dendrophthoe Pentandra* (L.) Miq.) Menggunakan Teknik Kromatografi Lapis Tipis–Densitometri” adalah benar-benar hasil karya sendiri, kecuali kutipan yang sudah saya sebutkan sumbernya, belum pernah diajukan pada institusi manapun, dan bukan karya jiplakan. Saya bertanggung jawab atas keabsahan dan kebenaran isinya sesuai dengan sikap ilmiah yang harus dijunjung tinggi.

Demikian pernyataan ini saya buat dengan sebenarnya, tanpa ada tekanan dan paksaan dari pihak manapun serta bersedia mendapat sanksi akademik jika ternyata dikemudian hari pernyataan ini tidak benar.

Jember, 22 November 2016

Yang menyatakan,

Nora Dwi Saputri

NIM 121810301021

SKRIPSI

**ANALISIS KADAR FLAVONOID PADA BENALU KOPI
(*Dendrophthoe pentandra* (L.) Miq.) MENGGUNAKAN
TEKNIK KROMATOGRAFI LAPIS
TIPIS-DENSITOMETRI**

Oleh

Nora Dwi Saputri

NIM 121810301021

Pembimbing

Dosen Pembimbing Utama : Yeni Maulidah Muflihah, S.Si., M.Si.

Dosen Pembimbing Anggota : I Nyoman Adi Winata, S.Si., M.Si.

PENGESAHAN

Skripsi berjudul "Analisis Kadar Flavonoid Pada Benalu Kopi (*Dendrophthoe Pentandra* (L.) Miq.) Menggunakan Teknik Kromatografi Lapis Tipis-Densitometri" karya Nora Dwi Saputri telah diuji dan disahkan pada :

hari, tanggal : **JUM'AT 16 DEC 2016**

tempat : Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam Universitas Jember.

Tim Penguji

Ketua,



Yeni Maulidah Muflihah, S.Si., M.Si.
NIP. 198008302006042002

Anggota I,



I Nyoman Adi Winata, S.Si., M.Si.
NIP. 197105011998021002

Anggota II,



Asnawati, S.Si., M.Si.
NIP. 196808141999032001

Anggota III,



Ika Oktavianawati, S.Si., M.Sc.
NIP. 198010012003122001

Mengesahkan
Dekan Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam
Universitas Jember



Drs. Sujito., Ph.D

NIP. 196102041987111001

RINGKASAN

Analisis Kadar Flavonoid Pada Benalu Kopi (*Dendrophthoe Pentandra* (L.) Miq.) Menggunakan Teknik Kromatografi Lapis Tipis–Densitometri; Nora Dwi Saputri, 121810301021; 2016; 53 halaman; Jurusan Kimia Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam Universitas Jember.

Flavonoid merupakan senyawa metabolit sekunder dari golongan fenolik yang banyak ditemukan pada tanaman, salah satunya benalu kopi. Analisis flavonoid pada benalu dapat dilakukan menggunakan berbagai macam metode salah satunya kromatografi. Metode kromatografi yang biasa digunakan yaitu Kromatografi Cair Tingkat Tinggi (KCKT), Kromatografi Gas(KG), dan Kromatografi Lapis Tipis (KLT). Penelitian ini menggunakan metode Kromatografi Lapis Tipis dengan detektor densitometer (KLT–Densitometri).

Metode Kromatografi Lapis Tipis–Densitometri merupakan salah satu metode analisis kadar flavonoid pada daun benalu kopi yang dapat digunakan untuk analisis kualitatif dan kuantitatif dalam jangka waktu yang relatif singkat serta lebih mudah diaplikasikan dibandingkan metode KG dan KCKT. Komposisi eluen merupakan salah satu faktor yang mempengaruhi keberhasilan proses pemisahan dalam metode KLT, sehingga perlu dilakukan optimasi komposisi eluen. Optimasi eluen dilakukan dengan menotolkan masing-masing sampel dan larutan standar flavonoid (kuersetin) sebanyak 40 μL pada plat KLT Gel F₂₅₄ yang sudah diaktivasi. Plat KLT selanjutnya dielusi menggunakan campuran metanol : kloroform dengan perbandingan volume 1:1 ; 4:1 ; 3:2 ; 2:3 ; 1:4 dalam bejana berukuran 10x10x5 cm yang telah dijenuhkan sebelumnya pada suhu ruang. Hasil pemisahan KLT selanjutnya dianalisis menggunakan densitometer pada panjang gelombang maksimum kuersetin yakni 369 nm. Plat KLT kemudian diberi pereaksi semprot AlCl₃ 5% untuk analisis kualitatif. Eluen metanol : kloroform (4:1) merupakan eluen yang menghasilkan pemisahan paling baik karena jumlah puncak yang dihasilkan oleh data densitogram lebih banyak dari komposisi eluen yang lain yaitu sebanyak 7 puncak serta nilai standar deviasi paling kecil yaitu 0.001.

Validasi metode analisis Kromatografi Lapis Tipis–Densitometri perlu dilakukan untuk mengetahui atau memastikan bahwa metode analisis yang telah dilakukan sudah sesuai untuk diterapkan sebagai metode analisis kadar flavonoid pada daun benalu kopi. Berdasarkan hasil pengujian terhadap parameter-parameter validasi yang meliputi linieritas, LOD (*limit of detection*), LOQ (*limit of quantitation*), keseksamaan (*precision*), dan kecermatan (*accuracy*).

Metode KLT–Densitometri untuk penentuan kadar flavonoid pada daun benalu dikatakan valid karena memenuhi persyaratan uji validitas yaitu uji linier dengan nilai $r = 0,998$; LOD dan LOQ dengan nilai 182.5 ng dan 608.3 ng; presisi dengan nilai 2.5-5.1 %; dan akurasi dengan nilai 86.14-102.46 %. Kadar flavonoid yang diperoleh dari sampel daun benalu kopi dalam bentuk serbuk yang memiliki kadar air 8.7% sebesar $1.404 \times 10^{-2} \pm 0.0007$ mg/g.

PRAKATA

Puji syukur kehadirat Allah SWT atas segala rahmat dan hidayah-Nya sehingga penulis dapat menyelesaikan skripsi yang berjudul “Analisis Kadar Flavonoid Pada Benalu Kopi (*Dendrophthoe Pentandra* (L.) Miq.) Menggunakan Teknik Kromatografi Lapis Tipis–Densitometri”. Skripsi ini disusun untuk memenuhi salah satu syarat menyelesaikan pendidikan strata satu (S1) pada Jurusan Kimia Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam Universitas Jember.

Penyusunan skripsi ini tidak lepas dari bantuan berbagai pihak. Oleh karena itu, penulis menyampaikan ucapan terimakasih kepada:

1. Drs. Sujito, Ph.D selaku Dekan Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam Universitas Jember;
2. Dr. Bambang Piluharto, S.Si., M.Si., selaku ketua Jurusan Kimia Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam Universitas Jember;
3. Ibu Yeni Maulidah Muflihah, S.Si., M.Si., selaku Dosen Pembimbing Utama dan Bapak I Nyoman Adi Winata, S.Si., M.Si., selaku Dosen Pembimbing Anggota yang telah memberikan bimbingan, motivasi, dan perhatian dalam penyelesaian studi di Jurusan Kimia serta penyelesaian skripsi;
4. Asnawati, S.Si., M.Si., selaku dosen Penguji I, dan Ika Oktavianawati, S.Si., M.Sc., selaku dosen penguji II yang telah memberikan masukan-masukan dan perbaikan dalam penyusunan skripsi;
5. Ibu Ika Oktavianawati, S.Si., M.Sc., selaku Dosen Pembimbing Akademik yang telah memberikan bimbingan dan motivasi dalam penyelesaian studi di Jurusan Kimia Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam Universitas Jember;
6. Teknisi-teknisi laboratorium Jurusan Kimia Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam Universitas Jember yang telah membantu selesainya penelitian;
7. Kakak dan adikku tercinta Siswahyudi, Rina Susanti, dan Rendi Azrielka yang telah memberikan motivasi dan selalu menemani dalam suka dan duka;

8. Mas Yefi Faganata yang selalu memberikan semangat dan dukungan dalam penyelesaian skripsi ini;
9. Keluarga Mosta yang menjadi teman berbagi cerita khususnya RM, Ira Septa, Uni dan Reza Enita yang selalu ada saat suka dan duka;
10. Sahabat-sahabatku Ardian, Iphon, Gepsta, Benny, Ratna, Agung, Tamam, Agus, Ardine, Dihliz, Rizal dan Tommy yang telah memberikan saran, motivasi dan semangat sehingga skripsi dan studi di Jurusan Kimia terselesaikan dengan baik, *for all of you I will miss you forever*;
11. Teman-teman seperjuangan keluarga besar Lanthanida 2012 tanpa terkecuali yang telah menjadi teman berbagi ilmu dan pengalaman selama ini, semoga kelak kita bermanfaat bagi orang lain, *see you on top guys*;
12. Keluarga HIMAKI dan UKM SPORA atas pengalaman berorganisasi dan memberikan arti “Mahasiswa yang Sesungguhnya”;
13. Semua pihak yang tidak dapat disebutkan satu persatu.

Penulis juga menerima segala kritik dan saran dari semua pihak demi kesempurnaan skripsi ini. Akhirnya penulis berharap, semoga skripsi ini dapat bermanfaat.

Jember, 22 November 2016

Penulis

DAFTAR ISI

	Halaman
HALAMAN JUDUL	ii
HALAMAN PERSEMBAHAN	iii
HALAMAN MOTO	iv
HALAMAN PERNYATAAN.....	v
HALAMAN PEMBIMBING	vi
HALAMAN PENGESAHAN.....	vii
RINGKASAN	viii
PRAKATA	ix
DAFTAR ISI.....	xi
DAFTAR TABEL	xiv
DAFTAR GAMBAR.....	xv
DAFTAR LAMPIRAN	xvi
BAB 1. PENDAHULUAN	1
1.1 Latar Belakang.....	1
1.2 Rumusan Masalah	3
1.3 Tujuan Penelitian.....	4
1.4 Manfaat Penelitian.....	4
1.5 Batasan Masalah	5
BAB 2. TINJAUAN PUSTAKA.....	6
2.1 Benalu Kopi	6
2.2 Flavonoid	8
2.3 Ekstraksi	13
2.4 Kromatografi Lapis Tipis.....	15
2.4.1 Fase Diam	16
2.4.2 Fase Gerak (eluen)	17
2.4.3 Elusi	18
2.4.4 Analisa Kualitatif	19

2.5 Densitometri	19
2.6 Validasi Metode.....	21
2.6.1 Linieritas	21
2.6.2 Batas Deteksi dan Batas Kuantisasi (LOD dan LOQ).....	22
2.6.3 Kecermatan (<i>Accuracy</i>)	23
2.6.4 Keseksamaan (<i>Precision</i>)	23
BAB 3. METODE PENELITIAN.....	25
3.1 Waktu dan Tempat Penelitian.....	25
3.2 Alat dan Bahan.....	25
3.2.1 Alat.....	25
3.2.2 Bahan	25
3.3 Diagram Alir Penelitian	26
3.4 Prosedur Penelitian.....	27
3.4.1 Persiapan Sampel	27
a. Preparasi Sampel	27
b. Penentuan Kadar Air	27
c. Eksrak Metanol Daun Benalu Kopi.....	27
d. Uji Kualitatif Flavonoid	27
e. Pembuatan Larutan Standar Kuersetin	28
3.4.2 Scanning Panjang Gelombang Maksimum.....	28
3.4.3 Aktivasi Plat KLT Silika Gel F ₂₅₄	28
3.4.4 Optimasi Eluen	28
3.4.5 Validasi Metode	29
a. Linieritas	29
b. Batas Deteksi dan Batas Kuantitasi.....	29
c. Kecermatan (<i>Accuracy</i>)	30
d. Keseksamaan (<i>Precision</i>).....	31
3.4.6 Analisis Senyawa Flavonoid pada Benalu Kopi.....	31
BAB 4. HASIL DAN PEMBAHASAN.....	33
4.1 Kadar Air Sampel Benalu Kopi.....	33
4.2 Ekstrak Flavonoid dari Benalu Kopi	34

4.3 Uji Kualitatif.....	35
4.4 Panjang Gelombang Maksimum Kuersetin	38
4.5 Eluen Optimum Pemisahan dengan KLT	39
4.6 Validitas Metode KLT-Densitometri	40
4.6.1 Linieritas	40
4.6.2 Batas Deteksi dan Batas Kuantitasi	41
4.6.3 Keseksamaan (<i>Precision</i>)	42
4.6.4 Kecermatan (<i>Accuracy</i>)	43
4.7 Kadar Flavonoid dalam BenaluKopi	45
BAB 5. PENUTUP.....	47
5.1 Kesimpulan.....	47
5.2 Saran	47
DAFTAR PUSTAKA	48
LAMPIRAN.....	54

DAFTAR TABEL

	Halaman
2.1 Reaksi warna dari berbagai jenis flavonoid	12
2.2 Sifat-sifat dasar beberapa adsorben untuk KLT.....	16
2.3 Urutan kepolaran eluen, elusi senyawa, dan kekuatan adsorben	18
4.1 Hasil uji flavonoid ekstrak metanol benalu kopi.....	36
4.2 Data hasil optimasi eluen KLT untuk larutan standar kuersetin	39
4.3 Data hasil perhitungan batas deteksi dan batas kuantitasi	42
4.4 Data perhitungan presisi larutan standar kuersetin	43
4.5 Data perhitungan persen perolehan kembali	44
4.6 Data densitogram setelah disemprot $AlCl_3$ 5%	46
4.7 Data penetapan kadar flavonoid pada daun benalu kopi.....	46

DAFTAR GAMBAR

	Halaman
2.1 <i>Dendrophthoe pentandra</i> (L.) Miq.	6
2.2 Struktur umum flavonoid	8
2.3 Struktur senyawa rutin dan isovitexin.....	9
2.4 Jenis-jenis flavonoid.....	11
2.5 Proses elusi pada plat KLT	18
2.6 Instrumen densitometri.....	20
3.1 Diagram alir	26
4.1 Sampel daun benalu kopi	33
4.2 Ekstrak metanol daun benalu kopi	35
4.3 Reaksi flavonoid dengan NaOH.....	37
4.4 Reaksi flavonoid dengan AlCl ₃	37
4.5 Reaksi flavonoid dengan HCl-Mg	37
4.6 Grafik <i>scanning</i> panjang gelombang maksimum kuersetin	38
4.7 Kurva penentuan daerah linier pada panjang gelombang 369 nm	41

DAFTAR LAMPIRAN

	Halaman
3.1 Pembuatan Larutan Standar Kuersetin.....	54
4.1 Data Penentuan Panjang Gelombang Maksimum (<i>Scanning</i>)	56
4.2 Data Kadar Air Serbuk Daun Benalu Kopi (<i>Dendrophthoe pentandra</i> (L.) Miq.).....	60
4.3 Data Optimasi Komposisi Eluen	61
4.3.1 Pemindaian Densitometer Optimasi Komposisi Eluen Metanol- kloroform pada Panjang Gelombang 369 nm.....	61
4.3.2 Hasil Perhitungan Rf dan Standar Deviasi Noda pada KLT	68
4.3.3 Kromatogram Hasil Analisis Menggunakan KLT	68
4.4 Data Validasi Metode.....	69
4.4.1 Linieritas	69
4.4.2 LOD dan LOQ	72
4.4.3 Keseksamaan (<i>Precision</i>).....	73
4.4.4 Kecermatan (<i>Accuracy</i>).....	76
4.5 Data Penentuan Kadar Flavonoid pada Daun Benalu Kopi.....	80
4.5.1 Densitogram dan Data Pemindaian dengan Densitometer pada Panjang Gelombang 369 nm	81
4.5.2 Data Perhitungan Kadar Flavonoid.....	81
4.6 Data Penentuan Nilai Faktor Retardasi (Rf) Hasil Uji Kualitatif Menggunakan Reagen Semprot AlCl ₃ 5% pada Noda Hasil KLT.....	83
4.7 Gambar Hasil Ekstraksi	84
4.8 Gambar Uji Kualitatif	85
4.9 Gambar Kromatogram Validasi Metode dan Penentuan Kadar.....	87

BAB 1. PENDAHULUAN

1.1 Latar Belakang

Benalu merupakan tumbuhan parasit yang termasuk dalam suku *Loranthaceae* (Barlow, 1967). Tumbuhan parasit ini biasanya menempel pada cabang maupun bagian ranting dari pepohonan. Tanaman benalu ini dikenal sangat merugikan karena dapat merusak inangnya. Tanaman benalu juga memiliki peranan penting sebagai obat salah satunya benalu yang menempel pada kopi (Pitojo, 1996; Fajriah, 2007; Sunaryo *et al.*, 2006).

Benalu kopi (*Dendrophthoe pentandra*) telah banyak dimanfaatkan sebagai obat tradisional anti kanker, anti alergi, anti tumor, obat flu, batuk, diare, luka, rematik, dan penyakit degeneratif lainnya (Hutapea, 1999; Pitojo, 1996; Ishizu *et al.*, 2002). Bagian benalu yang banyak dimanfaatkan sebagai obat adalah bagian daunnya. Kandungan kimia yang terdapat pada daun benalu antara lain flavonoid, tanin, alkaloid, terpenoid, dan saponin yang memiliki aktivitas antibakteri serta antioksidan (Artanti *et al.*, 2003; Davehat *et al.*, 2002). Menurut BPOM RI (2010), kandungan metabolit sekunder pada benalu kopi antara lain asam lemak: asam oleat, asam linoleat, asam linolenat, asam oktadeka-8-10-dioat, asam (Z)-oktade-12-ena-8-10-dioat dan asam oktadeka-8-10-12-trioat; kuersitrin, kuersetin, rutin, ikarisid B2, avikulin, (+)-katekin, (-)-epikatekin, (-)-epikatekin-3-O-galat dan (-) epigalokatekin-3-O-galat. Kandungan senyawa metabolit sekunder pada setiap jenis benalu berbeda-beda tergantung dari inangnya. Hal ini dikarenakan perolehan nutrisi dan mineral serta senyawa defensif dari inang tersebut, selain itu dapat juga dipengaruhi oleh usia sampel, dan faktor lingkungan (Adler, 2002; Erlyani, 2012).

Flavonoid merupakan senyawa metabolit sekunder di alam yang dapat dengan mudah ditemukan. Flavonoid dapat memberikan warna merah, ungu, biru dan kuning pada tumbuhan. Golongan flavonoid yang memberikan warna merah sampai biru pada tanaman seperti duwet, rosella, dan ubi ungu adalah antosianin (Achmad, 1986; Markham, 1988). Flavonoid juga dapat dimanfaatkan sebagai antioksidan maupun antibakteri karena adanya kuersetin (Pelczar dan Chan,

1998). Beberapa penelitian tentang aktivitas antibakteri maupun antioksidan pada tanaman benalu jenis *Dendrophthoe pentandra* (L.) Miq. yang tumbuh pada inang berbeda seperti lobi-lobi, cengkeh, teh, kedondong, srikaya maupun jambu air sudah banyak dilakukan (Fajriah *et al.*, 2007; Fitrilia *et al.*, 2015; Artanti *et al.*, 2012; Anita *et al.*, 2014).

Analisis flavonoid pada benalu dapat dilakukan menggunakan berbagai macam metode salah satunya kromatografi. Metode kromatografi yang biasa digunakan yaitu Kromatografi Cair Tingkat Tinggi (KCKT), *Chromatography Gas* (GC), dan Kromatografi Lapis Tipis (KLT). Penelitian flavonoid pada tanaman benalu menggunakan Kromatografi Cair Tingkat Tinggi (KCKT) yang dilakukan oleh Simanjuntak *et al.*, (2004) diperoleh hasil kromatogram yang menunjukkan bahwa senyawa isolat memiliki waktu retensi yang hampir sama dengan baku pembanding yaitu katekin. Analisis kuersitrin pada benalu *Dendrophthoe pentandra* (L.) Miq. menggunakan *Chromatography Gas-Mass Spectrometry* (GC-MS) (Fajriah *et al.*, 2007) menunjukkan bahwa ada senyawa lain selain kuersitrin yaitu neophytadine dengan berat molekul 278. Metode lain yang dapat digunakan adalah kromatografi lapis tipis densitometri yang lebih sederhana dibandingkan dengan kromatografi gas maupun kromatografi cair tingkat tinggi yang memerlukan waktu analisis lebih lama dan preparasi ekstraksi sampel dengan bahan kimia dalam jumlah banyak (Sherma, 2005; Gritter *et al.*, 2007).

Penelitian tentang senyawa flavonoid yang terdapat pada benalu kopi (*Dendrophthoe pentandra* (L.) Miq.) menggunakan KLT densitometri belum banyak dilaporkan. Uji fitokimia terhadap sampel ekstrak etanol benalu kopi yang dilakukan oleh Dillasamola *et al.* (2015) menunjukkan adanya alkaloid, flavonoid, steroid, dan saponin. Uji fitokimia juga dilakukan pada ekstrak metanol daun benalu kakao yang membuktikan adanya golongan senyawa flavonoid, fenolik, terpenoid dan saponin (Siahaan, 2015). Selain itu uji kromatografi lapis tipis pada ekstrak daun benalu mindi dengan menggunakan fasa gerak butanol : asam esetat : air (4:1:5 v/v) menunjukkan adanya flavonoid jenis flavon atau flavanol (Sasmito *et al.*, 2001). Uji kromatografi lapis tipis pada ekstrak daun benalu teh (*S. Atropurpurea* BL. Dans) menggunakan fase gerak metanol : kloroform (4:1)

menunjukkan kandungan flavonoid dengan nilai R_f 0,69 dan nilai R_f kuersetin standar yaitu 0,68, sehingga pada benalu teh jenis ini diindikasikan mengandung flavonoid jenis kuersetin (Priyanto, 2014).

Metode KLT densitometri dipilih karena memiliki beberapa kelebihan diantaranya spesifitas tinggi, dapat dipercaya, pengerjaan relatif cepat, polaritas pelarut atau pelarut campuran dapat diubah dalam waktu yang singkat dan jumlah pelarut yang digunakan lebih sedikit (Taouschstone & Dobbins, dalam Martyanti, 2010). Kelebihan lain ialah proses deteksi KLT bersifat statis sedangkan KCKT bersifat dinamis, sehingga untuk menganalisa beberapa sampel dapat dilakukan secara simultan (pada waktu bersamaan) dengan menggunakan fase gerak dalam jumlah kecil (Wulandari *et al.*, 2013). Oleh karena itu metode kromatografi lapis tipis densitometri ini diharapkan dapat digunakan untuk penentuan kadar flavonoid pada benalu kopi karena biaya pengoperasian relatif murah sebab menggunakan fase gerak yang sedikit dan waktu analisis yang relatif singkat serta lebih ramah lingkungan (Yungsoiet *al.*, 2008).

Validasi metode sangat dibutuhkan dalam suatu penelitian untuk mengetahui dan memastikan bahwa metode analisis yang telah dilakukan sudah sesuai dengan tujuan penggunaannya. Parameter validasi metode terdiri dari linieritas, batas deteksi dan batas kuantitasi (LOD dan LOQ), kecermatan (akurasi), serta keseksamaan (presisi). Hasil dari parameter tersebut akan memberikan data yang memiliki nilai akurasi dan presisi tinggi sehingga data yang diperoleh tersebut dapat dipertanggungjawabkan (Ermer dan Miller, 2005).

1.2 Rumusan Masalah

Berdasarkan latar belakang yang telah dijelaskan, maka dapat dibuat rumusan masalah sebagai berikut:

1. Bagaimana komposisi eluen (metanol:kloroform) yang menghasilkan pemisahan paling baik untuk analisis flavonoid pada daun benalu kopi (*Dendrophthoe pentandra* (L.) Miq.) menggunakan teknik pemisahan Kromatografi Lapis Tipis - Densitometri?

2. Bagaimana validitas metode Kromatografi Lapis Tipis–Densitometri untuk analisis kadar flavonoid pada daun benalu kopi (*Dendrophthoe pentandra* (L.) Miq.)?
3. Berapa kadar flavonoid pada daun benalu kopi (*Dendrophthoe pentandra* (L.) Miq.) menggunakan teknik pemisahan Kromatografi Lapis Tipis-Densitometri?

1.3 Tujuan Penelitian

Tujuan dalam penelitian ini adalah:

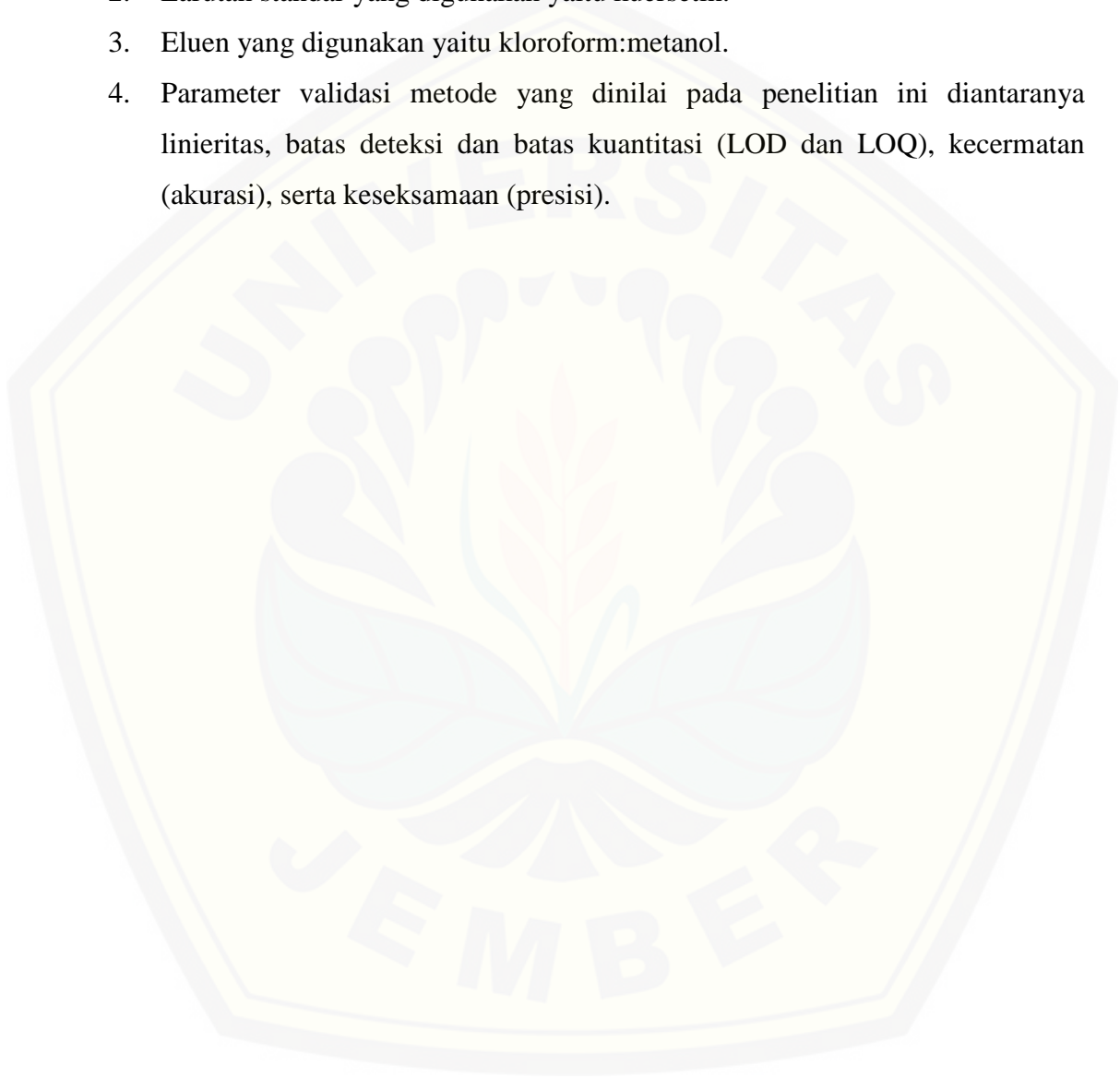
1. Mengetahui komposisi eluen (metanol:kloroform) yang menghasilkan pemisahan paling baik untuk analisis flavonoid pada daun benalu kopi (*Dendrophthoe pentandra* (L.) Miq.) menggunakan teknik pemisahan Kromatografi Lapis Tipis-Densitometri.
2. Mengetahui validitas metode Kromatografi Lapis Tipis–Densitometri untuk analisis kadar flavonoid pada daun benalu kopi (*Dendrophthoe pentandra* (L.) Miq.).
3. Mengetahui kadar flavonoid pada daun benalu kopi (*Dendrophthoe pentandra* (L.) Miq.) menggunakan teknik pemisahan Kromatografi Lapis Tipis-Densitometri.

1.4 Manfaat Penelitian

Hasil penelitian ini diharapkan dapat memberikan manfaat dan menambah wawasan bagi peneliti khususnya maupun kepada masyarakat tentang kandungan flavonoid dalam daun benalu kopi, serta dapat memberikan informasi mengenai kadar flavonoid pada daun benalu kopi (*Dendrophthoe pentandra* (L.) Miq.) menggunakan teknik Kromatografi Lapis Tipis–Densitometri yang merupakan salah satu alternatif teknik analisis.

1.5 Batasan Masalah

1. Sampel benalu yang digunakan adalah bagian daun (*Dendrophthoe pentandra* (L.) Miq.) diambil dari Perkebunan Warga Desa Sidomulyo Kecamatan Silo Kabupaten Jember.
2. Larutan standar yang digunakan yaitu kuersetin.
3. Eluen yang digunakan yaitu kloroform:metanol.
4. Parameter validasi metode yang dinilai pada penelitian ini diantaranya linieritas, batas deteksi dan batas kuantitasi (LOD dan LOQ), kecermatan (akurasi), serta keseksamaan (presisi).



BAB 2. TINJAUAN PUSTAKA

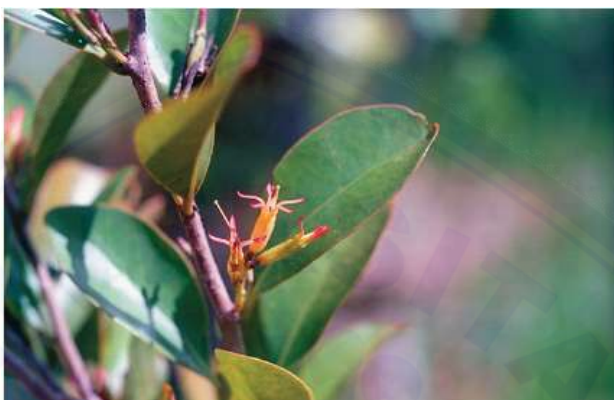
2.1 Benalu kopi

Benalu merupakan salah satu tanaman hemi-parasit yang banyak menempel pada cabang maupun ranting pohon dan perdu. Benalu dikenal sebagai tanaman yang merugikan bagi inangnya namun benalu juga dikenal sebagai salah satu tanaman obat yang digunakan dalam pengobatan tradisional di Indonesia maupun negara lain. Secara tradisional benalu dimanfaatkan sebagai obat batuk, diabetes, hipertensi, kanker, diuretik, cacar, maag, infeksi kulit dan setelah persalinan (Artantiet *al.*, 2012; Sunaryo,1998). Benalu memiliki sifat yang unik dimana benalu dengan spesies berbeda dapat tumbuh pada inang yang sama, begitu pula sebaliknya (Soejono,1995). Benalu yang menempel pada inang yang berbeda memiliki kandungan senyawa metabolit sekunder berbeda pula hal ini dikarenakan adanya interaksi antara benalu dengan inangnya.

Benalu dibagi menjadi dua suku berdasarkan morfologi bunga dan buahnya yaitu suku *Loranthaceae* dan *Viscaceae*. Suku *Loranthaceae* memiliki perhiasan bunga diklamid, biseksual dengan buah yang dilapisi oleh lapisan lekat yang terletak diluar pembuluh, sedangkan suku *Viscaceae* perhiasan bunganya monoklamid, uniseksual dengan buah yang dilapisi oleh lapisan lekat yang terletak didalam pembuluh (Uji dan Samiran, 2005). Suku *Loranthaceae* menurut Barlow (1997) terdiri dari 65 marga dan 950 jenis yang sebagian besar tumbuh di daerah tropis dan yang lain tumbuh di daerah yang memiliki sub tropis. Suku *Viscaceae* hanya terdiri dari 7 marga dengan 400 jenis yang mayoritas tumbuh di daerah tropis. Salah satu jenis suku *Loranthaceae* yang sering dijumpai dan dapat tumbuh diberbagai inang adalah *Dendrophthoe pentandra*.

Dendrophthoe pentandra umumnya dapat ditemukan di daerah hutan hujan atau hutan yang terbuka dan di perkebunan dataran rendah sampai ketinggian 500 mdpl. Tanaman ini memiliki ciri-ciri hemiparasit, bercabang banyak, perhiasan bunga diklamid (biseksual), dan berbiji satu dengan biji ditutupi oleh lapisan lengket. Penyebarannya mulai dari India sampai ke Indo-Cina. *Dendrophthoe*

pentadra berfungsi untuk luka pedih, bernanah (infeksi kulit) dan obat batuk. (Valkenburg, 2003 Uji *et al.*, 2007). Gambar 2.1 menunjukkan penampakan dari *Dendrophthoe pentandra* (L.) Miq hasil dari herbarium di Kebun Raya Eka Karya, Bali.



Gambar 2.1 *Dendrophthoe pentandra* (L.) Miq. (Sumber : Ujiet *al.*, 2007)

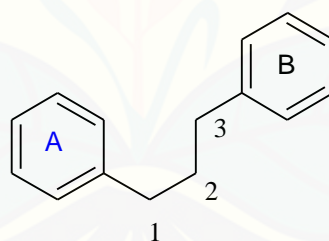
Benalu kopi (*Dendrophthoe pentandra* (L.) Miq. merupakan salah satu benalu yang dapat dimanfaatkan sebagai obat anti kanker terutama pada bagian daunnya. Kandungan kimia yang terdapat pada daun benalu antara lain flavonoid, tanin, alkaloid, terpenoid, dan saponin yang memiliki aktivitas anti bakteri serta antioksidan (Artanti *et al.*, 2003; Davehat *et al.*, 2002). Menurut BPOM RI (2010), kandungan metabolit sekunder pada benalu kopi antara lain asam lemak: asam oleat, asam linoleat, asam linolenat, asam oktadeka-8-10-dioat, asam (Z)-oktade-12-ena-8-10-dioat dan asam oktadeka-8-10-12-trioat; kuersitrin, kuersetin, rutin, ikarisid B2, avikulin, (+)-katekin, (-)-epikatekin, (-)-epikatekin-3-O-galat dan (-) epigalokatekin-3-O-galat. Kandungan senyawa metabolit sekunder pada setiap jenis benalu berbeda-beda tergantung dari inangnya. Hal ini dikarenakan perolehan nutrisi dan mineral serta senyawa defensif dari inang tersebut, selain itu dapat juga dipengaruhi oleh usia sampel, dan faktor lingkungan (Adler, 2002; Erlyani, 2012). Adapun klasifikasi ilmiah benalu kopi seperti berikut:

Kingdom : Plantae
Divisi : Mognoliophyta
Kelas : Mognoliopsida
Sub kelas : Rosidae

Ordo	: Santalales
Famili	: Loranthaceae
Genus	: Scurrula
Spesies	: <i>Dendrothoe pentandra</i> (L.) Miq. (Anitaet <i>al.</i> , 2014).

2.2 Flavonoid

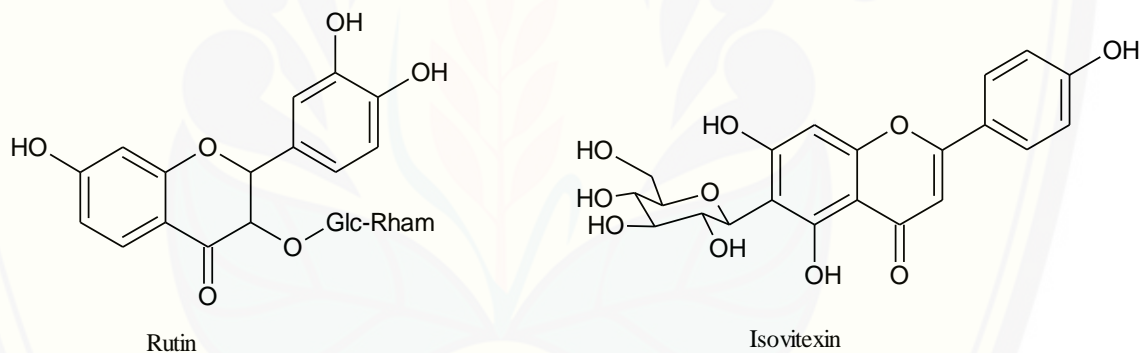
Flavonoid merupakan salah satu senyawa metabolit sekunder yang termasuk dalam kelompok senyawa fenol dan banyak ditemukan di alam. Senyawa ini umumnya digunakan sebagai zat warna merah ungu, biru dan sebagai zat warna kuning dalam tumbuh-tumbuhan. Flavonoid memiliki kerangka dasar 15 atom karbon yang terdiri dari dua cincin benzena yang dihubungkan menjadi satu oleh rantai propana berupa tiga atom karbon. Kerangka dasar flavonoid dikenal sebagai struktur $C_6-C_3-C_6$ yang dapat membentuk tiga jenis struktur senyawa flavonoid yakni senyawa 1,3-diarilpropana; 1,2-diarilpropana; dan 1,1-diarilpropana (Achmad, 1986; Markham, 1988). Struktur umum flavonoid ditunjukkan oleh Gambar 2.2 dibawah ini.



Gambar 2.2 Struktur umum flavonoid(Achmad, 1986)

Senyawa-senyawa flavonoid terdapat pada bagian tumbuhan diantaranya daun, akar, kulit, bunga maupun buah. Kebanyakan flavonoid berada di dalam tanaman hijau kecuali alga. Flavonoid merupakan senyawa berwarna kuning, dan berkontribusi terhadap warna kuning dari bunga-bunga dan buah-buahan, dimana mereka biasanya ditemukan dalam bentuk glikosida. Ada lebih dari 2000 glikosida dari flavon dan flavonol terisolasi sampai saat ini. Glikosida adalah senyawa yang terdiri dari dua gugus, yaitu gula (glikon) dan bukan gula (aglikon). Aglikon dari glikosida terdiri dari senyawa organik, misalnya triterpena, steroid, antrasena, flavonoid ataupun senyawa-senyawa yang mengandung gugus fenol,

alkohol, aldehyd, keton dan ester. Aglikon flavonoid sendiri merupakan flavonoid tanpa gula terikat yang ada dalam berbagai struktur, beberapa contoh aglikon flavonoid yaitu isoflavon, flavon, flavanon, dan flavon. Sedangkan gula atau glikon yang sering menempel pada glikosida adalah β -D-glukosa. Meskipun demikian ada juga beberapa gula jenis lain yang dijumpai menempel pada glikosida misalnya L-rhamnosa, D-fruktosa dan L-fruktosa serta L-arabinosa. Gugus gula glikosida dapat bergabung dengan aglikon dalam berbagai cara, yang paling umum melalui atom oksigen (O-glikosida). Namun jembatan atom ini juga dapat berupa karbon (C-glikosida), nitrogen (N-glikosida) atau atom sulfur (S-glikosida). Umumnya senyawa flavonoid pada tanaman ditemukan dalam bentuk O-glikosida dan C-glikosida seperti O-glikosida pada rutin, dan C-glikosida pada isovitexin. Struktur dari kedua senyawa tersebut ditunjukkan pada gambar 2.3 (Markham, 1998; Harbone, 1987; Sharker and Nahar, 2007).



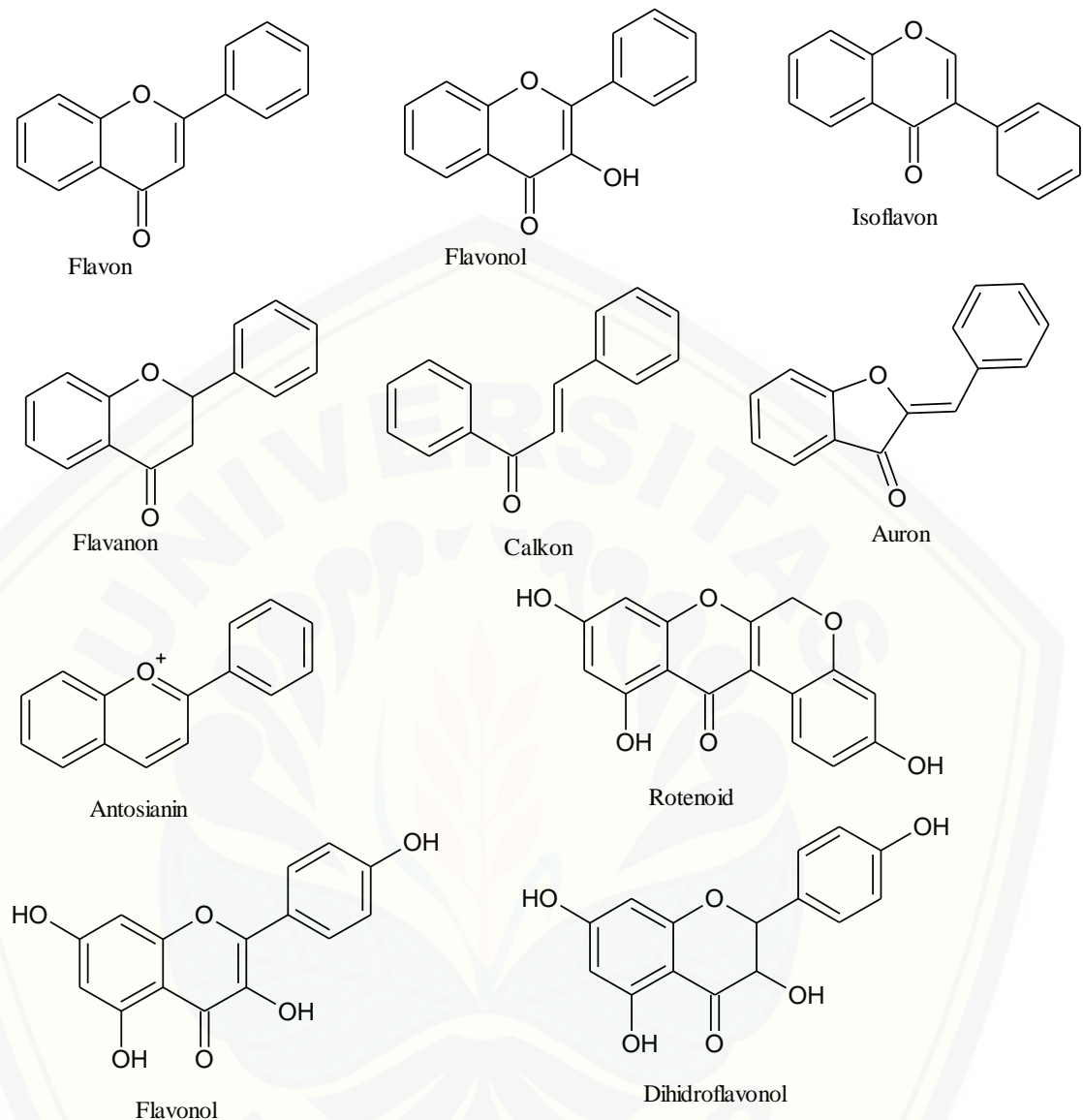
Gambar 2.3 Struktur senyawa rutindan isovitexin (Sharker and Nahar, 2007)

Senyawa flavonoid memiliki berbagai macam substituen (gugus samping) diantaranya metoksi ($-\text{OCH}_3$), isopren ($-\text{C-isopren}$), hidroksi ($-\text{OH}$), O-glikosida ($-\text{O-Glc}$), C-glikosida ($-\text{C-Glc}$). Berdasarkan gugus samping tersebut flavonoid dapat dibedakan menjadi flavonoid polar dan non polar. Flavonoid yang bersifat polar merupakan senyawa flavonoid yang memiliki gugus samping hidroksi ($-\text{OH}$), O-glikosida ($-\text{O-Glc}$), C-glikosida ($-\text{C-Glc}$). Adanya sejumlah gugus hidroksi yang tidak tersubstitusi menyebabkan flavonoid dapat larut dalam pelarut polar seperti etanol, metanol, etil asetat, aseton, dimetil sulfoksida. Oleh karenanya, pelarut tunggal atau campuran dari pelarut tersebut dapat digunakan untuk mengekstrak flavonoid dari jaringan tumbuhan. Disamping itu adanya

gugus glikosida yang terikat pada flavonoid menyebabkan flavonoid cenderung lebih mudah larut dalam air. Sedangkan flavonoid yang bersifat non polar memiliki gugus samping berupa metoksi (-OCH₃), isopren (-C-isopren). Flavonoid yang kurang polar seperti isoflavon, flavon, flavanon, dan flavon karena termetoksilasi cenderung lebih larut dalam pelarut seperti eter dan kloroform. Flavonoid bersifat non polar biasanya terdapat pada tumbuhan paku-pakuan karena flavonoidnya berupa polimetoksi sehingga hanya terdapat pada dinding sel. Kelarutan flavonoid antara lain :

1. Flavonoid polimetil atau polimetoksi larut dalam heksan, petroleum eter (PE), kloroform, eter, etil asetat, dan etanol. Contoh: sinersetin (nonpolar).
 2. Aglikon flavonoid polihidroksilarut dalam eter, etil asetat dan etanol; dan sedikit larut dalam air; tidak larut dalam heksan, PE dan kloroform. Contoh: kuersetin (semipolar).
 3. Glikosida flavonoid tidak larut dalam heksan, PE, kloroform, eter; sedikit larut dalam etil asetat dan etanol; serta sangat larut dalam air. Contoh: rutin.
- (Markham, 1998).

Flavonoid terdiri dari beberapa jenis, tergantung pada tingkat oksidasi dari rantai propan pada sistem 1,3-diarilpropan. Flavonoid memiliki tingkat oksidasi yang rendah sehingga senyawa ini dianggap sebagai senyawa induk dalam tatanama senyawa-senyawa turunan flavon. Kelas-kelas dalam golongan flavonoid dibedakan berdasarkan cincin heterosiklik-oksigen tambahan dan gugus hidroksil yang tersebar menurut pola yang berlainan (Robinson, 1995). Penggolongan flavonoid atas dasar perbedaan distribusi dari gugus hidroksil dan penambahan rantai oksigen ditunjukkan pada Gambar 2.4.



Gambar 2.4 Jenis-jenis flavonoid (Mabry, *et al.*, 1970)

Flavonol dan flavon merupakan jenis utama flavonoid yang tersebar luas dari semua pigmen tumbuhan kuning. Flavonol dan flavon yang terdapat dalam tanaman biasanya dalam bentuk O-glikosida. Perbedaan yang paling utama antara flavonol dan flavon yaitu pada flavonol terdapat gugus hidroksi pada C3. Kebanyakan dua senyawa tersebut terdapat pada bagian daun dan bagian luar dari tanaman yang berada dipermukaan tanah. Jenis flavonol dan flavon adalah jenis flavonoid yang paling banyak terdapat dalam tumbuhan dibandingkan dengan

jenis flavonoid yang lain, selain itu kedua senyawa ini memiliki kemampuan sebagai antioksidan. Jenis flavonol yang paling banyak dalam tumbuhan dan paling aktif dibandingkan golongan flavonol yang lain serta memiliki kemampuan sebagai antioksidan untuk mencegah kanker adalah kuersetin (Robinson, 1995).

Flavonoid dalam tumbuhan terdapat sebagai campuran yang terdiri dari berbagai macam golongan. Identifikasi flavonoid pada tumbuhan dapat dilakukan dengan cara uji pendahuluan atau uji skrining fitokimia yang dapat memberikan informasi tentang golongan senyawa yang terkandung dalam ekstrak (Kristanti *et al.*, 2008). Uji skrining fitokimia flavonoid dapat dilakukan dengan menambahkan pereaksi spesifik pada ekstrak yang nantinya akan menghasilkan warna tertentu. Pereaksi spesifik yang biasa digunakan dalam uji fitokimia flavonoid yaitu Mg-HCl pekat (Uji Sinoda), NaOH 10%, AlCl₃ dan H₂SO₄ pekat seperti yang telah dilakukan oleh Anita *et al.*, (2014) dan Bashir *et al.*, (2013). Adapun jenis pereaksi dan golongan flavonoid yang menghasilkan warna tertentu dapat dilihat pada Tabel 2.1:

Tabel 2.1 Reaksi warna dari berbagai jenis flavonoid

Golongan Flavonoid	Reaksi Warna				
	NaOH	H ₂ SO ₄ pekat	Mg-HCl	AlCl ₃	AlCl ₃ /UV ₃₆₆
Kalkon	Jingga, merah	Jingga, merah magenta	Tidak berwarna	Kuning orange	Fluoresensi orange, coklat, merah muda
Auron	Merah - ungu	Merah magenta	Tidak berwarna	Kuning lemah, orange	Fluoresensi hijau, hijau kuning, coklat lemah
Flavanon	Kuning / jingga (dingin) Merah / ungu (panas)	Jingga – merah tua	Merah magenta, ungu, biru	Tidak berwarna	Fluoresensi hijau, hijau kuning, coklat lemah
Flavon	Kuning	Kuning – jingga	Kuning	Kuning pucat	Fluoresensi hijau, kuning, coklat
Flavonol	Kuning – jingga	Kuning – jingga	Merah – magenta	Kuning	Fluoresensi kuning hijau
Isoflavon	Kuning	Kuning	Kuning	Tidak berwarna	Fluoresensi kuning

Sumber: Harborne (2006).

Uji fitokimia terhadap sampel ekstrak etanol benalu kopi yang dilakukan oleh Dillasamola *et al.* (2015) menunjukkan adanya alkaloid, flavonoid, steroid, dan saponin. Uji fitokimia juga dilakukan pada ekstrak metanol daun benalu kakao yang membuktikan adanya golongan senyawa flavonoid, fenolik, terpenoid dan saponin (Siahaan, 2015).

2.3 Ekstraksi

Pengambilan bahan aktif dalam suatu tumbuhan dapat dilakukan dengan cara ekstraksi. Ekstraksi merupakan suatu pemisahan komponen dari campurannya menggunakan pelarut tertentu. Hal yang harus diperhatikan dalam proses ekstraksi adalah pemilihan pelarut yang akan digunakan. Prinsip yang mendasari pemilihan pelarut dalam proses ekstraksi biasanya disesuaikan dengan kaidah “*like dissolve like*” yang berarti kepolaran senyawa yang diekstrak harus sama dengan kepolarannya pelarutnya. Adapun faktor yang mempengaruhi kandungan senyawa hasil ekstraksi suatu bahan tanaman yakni jenis dan konsentrasi pelarut, metode ekstraksi serta suhu yang mempengaruhi proses ekstraksi (Harvey, 2000).

Proses pemisahan secara ekstraksi terdiri dari beberapa tahapan diantaranya: penambahan massa pelarut tertentu untuk berinteraksi dengan sampel biasanya melalui proses difusi. Zat terlarut akan terpisah dari sampel dan larut ke dalam pelarut membentuk fase ekstrak, kemudian fase ekstrak dan sampel akan terpisah (Wilson *et al.*, 2000). Proses penyarian atau ekstraksi dilakukan secara berturut-turut dimulai dari pelarut non-polar seperti n-heksana lalu dengan pelarut semi polar seperti etil asetat atau dietil eter, kemudian menggunakan pelarut polar (metanol atau etanol). Hasil yang diperoleh berupa ekstrak kasar yang mengandung senyawa non polar, semi polar, dan senyawa polar (Hostettman *et al.*, 1997). Menurut Harborne (1996), ekstraksi menggunakan pelarut non polar biasanya diperlukan untuk menghilangkan lemak sebelum diekstraksi dengan pelarut yang sesuai sehingga ekstrak yang diperoleh bebas lemak.

Metode ekstraksi yang umum digunakan yakni maserasi. Cara ini sesuai untuk skala kecil maupun industri. Maserasi berasal dari kata “*macerare*” yang berarti melunakkan. Maserasi merupakan proses perendaman sampel menggunakan

pelarut organik pada suhu ruangan (Agoes, 2007). Proses ini memiliki kelebihan dalam isolasi senyawa bahan alam karena perendaman sampel tumbuhan akan terjadi pemecahan dinding dan membran sel akibat perbedaan tekanan di dalam dan di luar sel yang menyebabkan metabolit sekunder di dalam sitoplasma terlarut dalam pelarut organik dan ekstrak senyawa akan sempurna karena waktu perendaman dapat diatur. Pemilihan pelarut pada proses maserasi memiliki dampak yang signifikan karena akan memberikan efektivitas tinggi dengan memperhatikan kelarutan senyawa bahan alam pelarut tersebut (Darwis, 2000). Pemilihan jenis pelarut yang sesuai dipengaruhi oleh beberapa faktor diantaranya sebagai berikut:

- pembanding distribusi tinggi untuk gugus yang bersangkutan dan pembanding distribusi rendah untuk gugus pengotor
- kelarutan rendah dalam air
- kekentalan rendah dan tidak membentuk emulsi dengan air
- tidak mudah terbakar dan tidak bersifat racun
- mudah melepas kembali gugus yang terlarut di dalamnya untuk keperluan analisa lebih lanjut

(Prasetyo, 2010).

Metode ekstraksi yang telah dilakukan untuk memperoleh flavonoid secara komersial yaitu metode maserasi. Maserasi flavonoid dilakukan dengan menggunakan pelarut organik yang sesuai dengan tingkat kepolarannya. Tingkat polaritas suatu pelarut dipengaruhi oleh konstanta dielektriknya. Semakin meningkat konstanta dielektrik maka kepolaran suatu pelarut akan meningkat. Hal ini disebabkan oleh bertambahnya gugus fungsi dan menurunnya jumlah karbon pada pelarut tersebut (Gritter *et al.*, 1991).

Pelarut organik yang biasa digunakan untuk mengekstrak flavonoid dari jaringan tumbuhan yaitu metanol, etanol, etil asetat atau campuran dari pelarut tersebut (Markham, 1998; Artanti *et al.*, 2012; Priyanto *et al.*, 2004; Hasan *et al.*, 2006; Bashir *et al.*, 2013). Penelitian yang dilakukan oleh Suryanto dan Wehantaouw (2009) menunjukkan bahwa ekstrak metanol pada daun sukun (*Artocarpus altilis* F.) memiliki kandungan dominan dalam komponen fenolik,

flavonoid dan tanin terkondensasi dari pada ekstrak etanol dan ekstrak aseton. Selain itu ekstrak metanol juga menunjukkan aktivitas antiradikal bebas DPPH dan kandungan total antioksidan tertinggi dibanding ekstrak etanol dan aseton. Alasan ekstrak metanol dapat menarik lebih banyak senyawa metabolit sekunder dalam daun sukun karena metanol merupakan pelarut yang bersifat universal sehingga dapat melarutkan senyawa yang bersifat kurang polar sampai dengan polar.

2.4 Kromatografi Lapis Tipis

Teknik kromatografi lapis tipis telah digunakan sejak tahun 1938 oleh Ismailov dan Schraiber. Kromatografi lapis tipis merupakan suatu metode pemisahan komponen berdasarkan perbedaan adsorpsi atau partisi oleh fase diam dibawah gerakan pelarut (eluen) tunggal maupun campuran. Kelebihan penggunaan kromatografi lapis tipis dibandingkan dengan kromatografi kertas yaitu hasil pemisahan lebih sempurna, memiliki kepekaan yang lebih tinggi, dan dapat dilakukan dengan lebih cepat (Adnan, 1997).

Metode kromatografi lapis tipis menggunakan fase diam berupa serbuk halus yang dilapiskan secara merata pada penyangga berupa lempeng kaca, pelat polimer atau logam, dan lapisan yang cocok. Campuran yang akan dipisahkan berupa larutan dalam bentuk bercak atau pita yang ditotolkan pada pelat (fase diam) dan selanjutnya pelat diletakkan dalam bejana tertutup yang berisi larutan pengembang (eluen) yang cocok. Pemilihan eluen sangat dipengaruhi oleh macam dan polaritas zat-zat senyawa kimia yang dipisahkan. Pemisahan terjadi selama perambatan kapiler (pengembangan). Komponen yang memiliki afinitas lebih kecil dari fase diam atau memiliki afinitas lebih besar dari fase gerak (eluen) akan bergerak lebih cepat dari pada komponen yang memiliki sifat sebaliknya (Stahl, 1985; Gritter *et al.*, 1991).

Pendeteksian bercak hasil kromatografi dapat dilakukan dengan beberapa cara diantara dengan menggunakan sinar ultraviolet dan penyempotan dengan pereaksi tertentu. Pengamatan bercak menggunakan sinar ultraviolet digunakan untuk senyawa yang tidak berwarna karena beberapa senyawa organik dapat

bersinar (berfluoresensi) jika disinari dengan sinar ultraviolet pada panjang gelombang pendek (254 nm) atau gelombang panjang (366 nm). Hasil yang diperoleh apabila tidak dapat terdeteksi maka harus disemprot menggunakan pereaksi tertentu sehingga bercak tersebut tampak yaitu pertama tanpa pemanasan, kemudian dapat juga dengan pemanasan (Gritter et al., 1991; Stahl, 1985). Hasil kromatografi dipengaruhi oleh fase diam, fase gerak (eluen), dan teknik kerja. Teknik kerja meliputi atmosfer bejana, jenis pengembang, cara dan jumlah penotolan, pembuatan cuplikan, dan deteksi senyawa yang dipisahkan (Harborne, 1996).

2.4.1 Fase Diam

Kromatografi lapis merupakan kromatografi adsorpsi dan adsorben yang bertindak sebagai fase stasioner. Fase diam pada KLT dapat berupa fase polar maupun non polar. Empat macam adsorben yang umum digunakan ialah silika gel (asam silikat), alumina (*aluminium oxyde*), khieselguhr (*diatomeous earth*), dan selulosa. Silika gel salah satu jenis adsorben yang sering digunakan dibanding yang lain dan terdiri dari beberapa jenis dengan nama dagang bermacam-macam (Adnan, 1997). Tabel 2.2 menunjukkan sifat-sifat dasar adsorben yang biasa digunakan dalam kromatografi lapis tipis.

Tabel 2.2 Sifat-sifat dasar beberapa adsorben untuk KLT

Adsorben	Keasaman	Efek Pemisahan	Senyawa yang dapat Dipisahkan
Silika gel	Asam	Adsorbsi + partisi	Hampir semua zat
Alumina	Basa	Adsorbsi + partisi	Steroid, senyawa bersifat basa
Magnesium trisilikat	-	Adsorbsi	Karotenoid, tokoferol
Kalsium sulfat	-	Adsorbsi	Asam lemak, gliserida
Khieselguhr	Netral	Partisi	Gula, farmasetika

Sumber : Adnan, 1997.

Silika gel kadang-kadang ditambah senyawa fluoresensi agar saat dideteksi dengan sinar UV dapat berfluoresensi (berpendar) sehingga dikenal dengan silika gel GF₂₅₄ yang berarti silika gel berpendar pada panjang gelombang 254 nm. Silika gel dapat digunakan sebagai fase diam polar maupun non polar. Silika gel polar merupakan silika yang dibebaskan dari air, bersifat sedikit asam. Silika gel

(SiO) merupakan bahan lempeng bersifat polar dengan mekanisme pemisahan secara adsorpsi pada pengikatan hidrogen atau interaksi dipol dengan permukaan gugus silanol menggunakan fase gerak lipofil dan analit dipisahkan ke gugus berdasarkan polaritasnya (Fried dan Sherma, 2003). Silika gel untuk fase non polar terbuat dari silika yang dilapisi dengan senyawa non polar misalnya parafin, minyak atau lilin. Fase diam ini dapat menggunakan air sebagai eluen dan dapat memisahkan banyak senyawa namun elusinya sangat lambat (Sumarno, 2011).

2.4.2 Fase Gerak (Eluen)

Fase gerak pada kromatografi lapis tipis umumnya campuran 2 pelarut organik karena daya elusi campuran kedua pelarut dapat diatur dengan mudah sehingga pemisahan dapat terjadi secara optimal (Rohman, 2009). Pemilihan fase gerak dipilih atas dasar jenis lempeng dan campuran yang dipisahkan. Pemilihan fase gerak dapat dilihat pada literatur pustaka atau dengan pendekatan *trial and error* guna menemukan pelarut yang sesuai (Fried dan Sherma, 2003).

Eluen yang digunakan harus memiliki kemurnian sangat tinggi karena kromatografi lapis tipis adalah teknik pemisahan yang sensitif. Polaritas fase gerak mempengaruhi harga faktor retardasi (R_f) analit karena komponen kimia dalam fase gerak menentukan interaksi dan spesifitas sistem yang terbentuk. Daya elusi dari fase gerak (eluen) harus memberikan nilai R_f analit antara 0,2 - 0,7 untuk memaksimalkan pemisahan. Campuran pelarut dianjurkan untuk satu kali proses pengembangan karena susunan dari eluen dapat berubah akibat salah satu komponen menguap. Fase gerak yang biasa digunakan dalam KLT antara lain: n-heksan, klorotetrafluorida, benzen, kloroform, eter, etilasetat, piridin, aseton, etanol, metanol, dan air (Gritter *et al.*, 1991).

Pemilihan fase gerak (eluen) dalam metode kromatografi lapis tipis berpengaruh pada proses pemisahan. Pemisahan komponen non polar atau hidrofobik pada proses pemisahan adsorpsi digunakan pelarut pengembang yang bersifat non polar dan untuk sampel polar digunakan pelarut pengembang yang polar (Mulja & Suharman, 1995). Urutan kepolaran eluen, elusi senyawa, dan kekuatan adsorben dalam kromatografi ditunjukkan dalam Tabel 2.3:

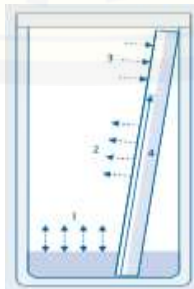
Tabel 2.3 Urutan kepolaran eluen, elusi senyawa, dan kekuatan adsorben

Urutan polaritas eluen	Urutan elusi senyawa	Urutan adsorben
n-heksana	Hidrokarbon tak jenuh	Selulosa
Petroleum eter	Alkena	Gula
Karbon tetraklorida	Hidrokarbon aromatik	Silika gel
Benzena	Eter	Firosil (Mg Silikat)
Kloroform	Aldehida, keton, eter	Aluminium oksida (Alumina)
Dietil eter	Alkohol	
Etil asetat	Asam karboksilat	
Aseton		
Metanol		
Air		

Sumber: Khopkar (1990).

2.4.3 Elusi

Elusi atau pengembangan merupakan salah satu penentu berhasil tidaknya proses pemisahan menggunakan KLT. Pengembangan lempeng KLT biasanya menggunakan cara menaik (*ascending*) dengan mencelupkan ujung bawah pelat/lempeng ke dalam fase gerak (eluen). Proses elusi diawali dengan wadah fase gerak (*chamber*) yang harus dijenuhkan dengan uap fase gerak agar menghasilkan reproduibilitas kromatografi dan pemisahan yang baik. Hal ini dapat segera tercapai dengan meletakkan kertas filter atau pelapis saturasi pada dinding ruangan dengan dasar kertas tercelup pada sistem pelarutnya. Pengembangan yang dilaksanakan dalam wadah tertutup tersebut diakhiri setelah ujung zat pelarut pada pelat telah mencapai kira-kira $\frac{3}{4}$ tinggi adsorben, atau kira-kira 10–15 cm pada pelat KLT. Pelat KLT kemudian diambil dan dikeringkan (Rohman, 2009; Adnan, 1997). Proses elusi ditunjukkan pada Gambar 2.5 dibawah ini.



Gambar 2.5 Proses elusi pada plat KLT (Camag, 2012)

2.4.4 Analisa Kualitatif

Menurut Stahl (dalam Rakhmawati, 2010), analisa kualitatif suatu analit zat dalam kromatografi lapis tipis dilakukan dengan cara membandingkan noda kromatogram analit hasil visualisasi secara fisika dengan noda zat standar atau pembanding (*reference standart*). Parameter analisis kualitatif kromatografi lapis tipis adalah harga Rf noda sampel. Harga Rf (*retardation factor*) menunjukkan jarak migrasi komponen analit terhadap jarak migrasi dari fase gerak pada kromatogram. Faktor retardasi (Rf) didefinisikan sebagai berikut:

$$Rf = \frac{\text{jarak migrasi komponen analit}}{\text{jarak migrasi fase gerak}}$$

(Rohman, 2009).

Menurut Rohman (2009), nilai maksimum Rf adalah 1 yang diperoleh ketika analit memiliki perbandingan distribusi (D) dan faktor retensi (k) sama dengan 0 yang berarti analit bermigrasi dengan kecepatan sama dengan kecepatan migrasi fase gerak. Nilai minimum Rf adalah 0 yang teramati apabila analit tertahan pada posisi awal penotolan dari permukaan fase diam (tidak bergerak sama sekali).

Analisis kualitatif dapat juga dilakukan dengan metode densitometer modern. Identifikasi dilakukan dengan membandingkan spektra sampel dan standar dalam lempeng yang sama. Penampakan noda yang sama bukan berarti menunjukkan bahwa komponen tersebut sama jika spektranya bukan merupakan karakteristik dari struktur total molekular (Fried dan Sherma, 2003).

2.5 Densitometri

Densitometri merupakan metode analisis instrumental berdasarkan interaksi radiasi elektromagnetik (REM) dengan analit yang merupakan bercak atau noda analit pada fase diam KLT. REM merupakan interaksi cahaya yang mengenai molekul senyawa dalam noda KLT. Interaksi radiasi elektromagnetik dengan noda pada KLT yang ditentukan diantaranya: menentukan intensitas cahaya yang diabsorpsi, ditransmisi, dipantulkan (refleksi) oleh pendar fluor atau pemadaman fluor dari radiasi semula. Densitometri dapat digunakan untuk analisa kualitatif maupun kuantitatif suatu zat atau campuran zat setelah dilakukan pemisahan

menggunakan KLT (Mulya dan Suharman, 1995). Instrumen densitometri terdiri atas perangkat optik, sumber cahaya, dan detektor. Instrumen densitometri ditampilkan pada Gambar 2.6 dibawah ini:



Gambar 2.6 Instrumen densitometri (Camag, 2012)

Analisa kualitatif dapat ditentukan dengan membandingkan nilai faktor retardasi (R_f) analit dengan nilai faktor retardasi standar dengan menggunakan KLT pada kondisi yang sama. Bercak analit yang memiliki R_f sama dengan standar diidentifikasi kemurnian analit dengan cara membandingkan spektrum pada tiga posisi bercak (awal, tengah, dan akhir bercak), sedangkan uji identitas dilakukan dengan membandingkan spektrum panjang gelombang analit dengan spektrum panjang gelombang standar. Analisa kuantitatif dapat dilakukan dengan cara membandingkan luas area noda atau bercak analit dengan standar pada fase diam yang sudah diketahui konsentrasinya (Wulandari, 2011).

Deteksi bercak hasil KLT secara densitometri dapat dilakukan dengan cara *men-scanning* bercak dengan sumber cahaya dalam bentuk celah atau slit yang dapat dipilih baik panjang gelombangnya maupun lebarnya. Sinar yang dipantulkan diukur dengan sensor cahaya (fotosensor). Perbedaan antara sinyal optik daerah yang tidak mengandung bercak dengan daerah yang mengandung bercak dihubungkan dengan banyak analit yang ada melalui kurva kalibrasi yang telah disiapkan dalam lempeng yang sama. Pengukuran densitometri dapat dibuat dengan absorbansi atau fluoresensi, akan tetapi pengukuran KLT kebanyakan dilakukan dengan cara fluoresensi. Kisaran UV rendah (di bawah 190 nm sampai 300 nm) merupakan daerah yang biasanya digunakan (Rohman, 2009).

Densitometri memiliki dua model yaitu model reflektan (remisi) dan model transmittan. Model reflektan dapat digunakan pada rentang spektral UV/Vis,

fluoresensi dan peredaman fluoresensi. Spektral visual menggunakan lampu halogen dan tungsten pada panjang gelombang 400-800 nm, sedangkan spektral UV menggunakan lampu deuterium dan xenon pada panjang gelombang 190-400 nm. Densitometri model reflektan biasanya digunakan untuk pengukuran absorpsi senyawa dalam spektra visual. Signal yang dihasilkan merupakan fungsi jumlah molekul pengabsorbsian dalam lempeng (Fried dan Sherma, 2003).

2.6 Validasi Metode

Tujuan utama yang harus dicapai dalam suatu kegiatan analisis kimia yaitu data pengujian yang dihasilkan memiliki nilai akurasi dan presisi tinggi atau dengan kata lain hasil uji tersebut sudah valid. Pengertian validasi berdasarkan ISO/IEC 17025 klausul 5.4.5.1 diartikan sebagai kegiatan konfirmasi melalui pengujian dan pengadaan bukti yang objektif bahwa persyaratan tertentu untuk suatu maksud khusus harus dipenuhi. Validasi metode menurut Harmita (2004) adalah suatu proses penilaian terhadap suatu metode analisis tertentu berdasarkan percobaan laboratorium yang bertujuan untuk membuktikan bahwa metode tersebut memenuhi persyaratan penggunaannya. Validasi metode dilakukan untuk mengurangi resiko penyimpangan yang mungkin timbul dan mengevaluasi kerja dari metode analisis yang digunakan. Parameter yang biasa dinilai dalam validasi metode diantaranya:

2.6.1 Linieritas

Linieritas menunjukkan kemampuan suatu metode analisis yang memberikan respon secara langsung atau dengan bantuan transformasi matematik yang baik, proporsional terhadap konsentrasi analit dalam sampel dan dalam rentang konsentrasi yang digunakan. Linieritas biasanya dinyatakan dalam istilah variasi sekitar arah garis regresi yang dihitung berdasarkan persamaan matematik data yang diperoleh dari hasil uji analit dalam sampel dengan berbagai konsentrasi analit. Penetapan linieritas dapat dilakukan dalam beberapa tahapan diantaranya: menyiapkan larutan analit minimal 5 konsentrasi yang berbeda atau lebih dengan rentang konsentrasi 50-150% atau 25-200% atau 80-120% dari konsentrasi analit dalam sampel (Indrayanto, 2003; Huber, 2007), membuat kurva kalibrasi untuk

memperoleh persamaan garis regresi linier, yaitu $y = a + bx$. Persamaan tersebut akan menghasilkan nilai koefisien korelasi (r) yang digunakan sebagai parameter untuk mengetahui hubungan linieritas suatu metode analisis. Hubungan linier yang ideal dicapai apabila nilai intersep (a) = 0, $r = +1$ atau -1 tergantung dari arah garis, dan nilai kemiringan atau slope (b) yang menunjukkan kepekaan analisis terutama instrumen yang digunakan (Harmita, 2004). Nilai koefisien korelasi yang memenuhi persyaratan adalah $\geq 0,9970$ (ICH 1995 diacu dalam Chan, 2004).

2.6.2 Batas Deteksi dan Batas Kuantitasi (LOD dan LOQ)

Batas deteksi (*Limit of Detection* atau LOD) menunjukkan konsentrasi terkecil dari suatu analit yang masih dapat terdeteksi oleh prosedur analisis dan memberikan respon yang signifikan dibandingkan dengan blanko. Batas kuantitasi (*Limit of Quantification* atau LOQ) merupakan jumlah terkecil suatu analit dalam sampel yang masih yang dapat ditetapkan secara kuantitatif dengan presisi dan akurasi yang baik. Nilai batas deteksi dan batas kuantitasi dihitung dari rerata kemiringan garis dan simpangan baku intersep dari persamaan regresi linier kurva baku yang dihasilkan. Batas deteksi dan batas kuantitasi dapat dihitung melalui persamaan:

$$\text{Batas deteksi (LOD)} = \frac{3 \times S_b}{SI}$$

$$\text{Batas kuantitasi (LOQ)} = \frac{10 \times S_b}{SI}$$

Keterangan :

S_b = simpangan baku respon analitik dari blanko

SI = arah garis linier dari kurva antara respon terhadap konsentrasi = kemiringan garis kurva standar (b pada persamaan garis $y = a + bx$)

(Harmita, 2004; Ermer dan Miller, 2005).

2.6.3 Kecermatan (Akurasi)

Menurut Harmita (2004), kecermatan menyatakan derajat kedekatan hasil analisis dari metode yang digunakan dengan kadar analit sebenarnya. Kecermatan ditunjukkan oleh persen perolehan kembali (*recovery*) dengan menambahkan larutan perbandingan kedalam sampel yang akan diperiksa. Akurasi dapat ditentukan dari pengulangan hasil analisis terhadap sampel yang sudah diketahui kadarnya. Perhitungan persen perolehan kembali dapat menggunakan persamaan sebagai berikut:

$$\% \text{ perolehan kembali} = \frac{m_f - m_a}{m_a^*}$$

Keterangan :

m_f = massa total flavonoid dalam sampel + larutan standar hasil pengukuran

m_a = massa flavonoid yang yang didapatkan

m_a^* = massa flavonoid yang ditambahkan

(Ermer dan Miller, 2005).

2.6.4 Keseksamaan (Presisi)

Keseksamaan atau yang biasa dikenal dengan presisi merupakan kedekatan hasil analisis antar setiap pengukuran individu ketika metode analisis diulang. Huber (2007) menyatakan bahwa presisi adalah derajat kesesuaian antara hasil uji individual serangkaian pengukuran yang diperoleh dari pengambilan sampel berulang pada sampel homogen yang sama dibawah kondisi yang ditentukan. Presisi diukur dengan menetapkan presentase simpangan baku (SD) dan simpangan baku relatif (SBR). Simpangan baku relatif (SBR) $\leq 5,3$ menyatakan kesesuaian satu respon dengan respon yang lainnya dari suatu sensor analit. Perhitungan simpangan baku dan simpangan baku relatif menggunakan persamaan seperti berikut:

$$SD = \sqrt{\frac{\sum (x - \bar{x})^2}{n - 1}}$$

$$\% \text{ SBR} = \frac{\text{SD}}{\bar{x}} \times 100\%$$

$$\text{Nilai presisi} = 100\% - \% \text{ SBR}$$

Keterangan :

$x = x_1, x_2, x_3, \dots, x_n$ hasil pengujian

\bar{x} = rata-rata pengukuran

n = jumlah pengukuran

(Ermer dan Miller, 2005).



BAB 3. METODOLOGI PENELITIAN

3.1 Waktu dan Tempat Penelitian

Penelitian ini dilaksanakan mulai bulan April sampai September tahun 2016. Penelitian bertempat di Laboratorium Kimia Organik Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam, Universitas Jember dan di Laboratorium Biologi Farmasi, Universitas Jember.

3.2 Alat dan Bahan

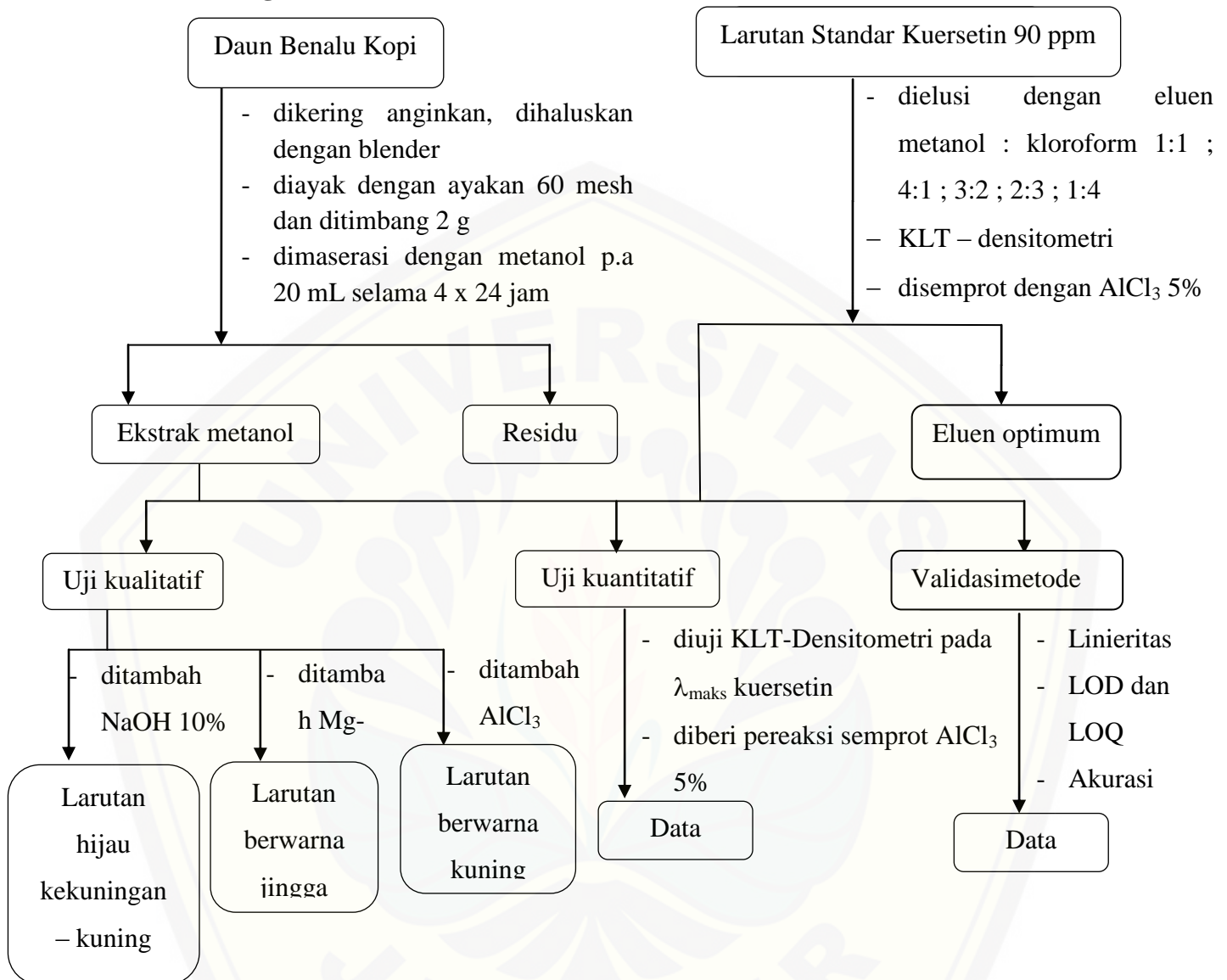
3.2.1 Alat

Alat-alat yang digunakan dalam penelitian ini yaitu: Scanner Densitometri Camag 3, bejana KLT ukuran (10x10x5) cm, blender, *hair dryer*, corong buchner, aluminium foil, neraca analitik, pipet mikro, alat-alat gelas, botol semprot, botol kecil, bola pipet, pipet tetes, lampu ultraviolet, oven, pisau *stainless steel*, batang pengaduk.

3.2.2 Bahan

Bahan-bahan yang digunakan dalam penelitian ini yaitu: daun benalu kopi (*Dendrophthoe pentandra* (L.) Miq.) diperoleh dari perkebunan warga di Desa Sidomulyo Kecamatan Silo Kabupaten Jember, larutan standar flavonoid (kuersetin), metanol p.a, aquades, kloroform p.a, etil asetat, AlCl_3 , NaOH, ayakan 60 mesh, kertas saring, plat KLT Silika Gel F₂₅₄.

3.3 Diagram Alir



Gambar 3.1 Diagram Alir Penelitian Analisis Flavonoid pada benalu kopi (*Dendrophthoe pentandra* (L.) Miq.) menggunakan Metode KLT Densitometri

3.4 Prosedur Penelitian

3.4.1 Persiapan Sampel

a. Preparasi Sampel

Sampel daun benalu kopi (*Dendrophthoe pentandra* (L.) Miq.) diperoleh dari pohon kopi di perkebunan warga Desa Sidomulyo, Kecamatan Silo, Kabupaten Jember, Jawa Timur. Daun benalu terlebih dahulu dipisahkan dari buah dan batangnya kemudian dibersihkan. Sampel dikeringanginkan dalam ruangan selama 10 hari tanpa terkena sinar matahari langsung. Sampel yang sudah kering dihaluskan menggunakan blender dan diayak menggunakan ayakan 60 mesh (Wongkar *et al.*, 2015).

b. Penentuan Kadar Air

Serbuk daun benalu kopi (*Dendrophthoe pentandra* (L.) Miq.) ditimbang sebanyak 1 gram kemudian di oven selama 3–5 jam pada suhu 105 °C. Sampel selanjutnya didinginkan dalam desikator selama 30 menit, lalu ditimbang. Perlakuan diatas dilakukan beberapa kali sampai diperoleh berat yang konstan. Kadar air dihitung menggunakan rumus:

$$\% \text{ Kadar air} = \frac{\text{berat awal} - \text{berat akhir}}{\text{berat awal}} \times 100\%$$

(Sumardji *et al.*, 1989).

c. Ekstraksi Flavonoid dari Daun Benalu Kopi (*Dendrophthoe pentandra* (L.) Miq.)

Serbuk daun benalu kopi (*Dendrophthoe pentandra* (L.) Miq.) sebanyak 2 gram dimaserasi menggunakan metanol (p.a) sebanyak 20 mL pada suhu ruang dan terlindung dari cahaya. Maserasi dilakukan selama 4x24 jam, setiap 1x24 jam ekstrak disaring menggunakan corong buchner dan residu dimaserasi dengan metanol (p.a) baru. Filtrat disatukan sehingga diperoleh filtrat metanol. Hasil filtrat merupakan ekstrak metanol yang digunakan untuk uji selanjutnya (Siahaan, 2015).

d. Uji Kualitatif Flavonoid

Ekstrak metanol daun benalu kopi (*Dendrophthoe pentandra* (L.) Miq.) sebanyak 3 mL masing-masing dimasukkan dalam 3 tabung reaksi. Tabung 1

ditambah 5–10 tetes NaOH 10% apabila terbentuk larutan berwarna hijau kekuningan–kuning kecoklatan maka positif mengandung flavonoid. Tabung 2 ditambah 10 tetes AlCl_3 apabila terbentuk warna kuning maka positif mengandung flavonoid. Tabung 3 ditambah HCl pekat dan serbuk Mg, apabila terbentuk warna jingga sampai merah maka positif mengandung flavonoid (Bashir *et al.*, 2013; Siahaan, 2015).

e. Pembuatan Larutan Standar Kursetin

Kursetin dengan konsentrasi 500 ppm dibuat dengan cara menimbang kursetin 25,0 mg dan dimasukkan ke dalam labu ukur 50 mL. Etil asetat ditambahkan 15 mL ke dalam labu ukur tersebut. Larutan tersebut di *shaker* selama 5 menit. Ditambahkan kembali etil asetat sampai tanda batas (Indrayani, 2008).

3.4.2 Scanning Panjang Gelombang Maksimum Menggunakan Spektrofotometer UV

Larutan standar flavonoid konsentrasi 100 ppm dibuat dengan cara mengencerkan larutan induk kursetin 250 ppm sebanyak 20 mL ke dalam labu ukur 50 mL dan ditambah etil asetat sampai tanda batas. Etil asetat juga disiapkan sebagai larutan blanko sebanyak 3 mL. Scanning dilakukan dengan menggunakan spektrofotometer UV-Vis pada rentang 280-400 nm dengan interval 1 nm.

3.4.3 Aktivasi Plat Silika Gel F₂₅₄

Plat KLT Silika Gel F₂₅₄ yang telah dipotong sesuai kebutuhan (9x10 cm) dielusi menggunakan eluen yang akan digunakan dan sudah dijenuhkan sampai terelusi penuh. Plat KLT kemudian diangkat dan dikeringkan dalam oven suhu 100 °C selama 10 menit.

3.4.4 Optimasi Eluen

Larutan standar flavonoid 90 ppm dan ekstrak metanol masing-masing ditotolkan sebanyak 40 μL (1 μL untuk sekali totalan) menggunakan pipet mikro pada plat KLT Silika Gel F₂₅₄ dengan titik totalan 1 cm dari tepi bawah, 1 cm dari samping kiri dan kanan plat KLT serta jarak antar totalan 1 cm. Penotolan

dilakukan secara bertahap pada plat dan dikeringkan menggunakan *hair dryer* untuk setiap penotolan. Plat KLT selanjutnya dielusi menggunakan campuran metanol : kloroform 12 mL dengan perbandingan volume 1:1 ; 4:1 ; 3:2 ; 2:3 ; 1:4 dalam bejana (*chamber*) berukuran 10x10x5 cm. Eluen didiamkan berjalan hingga 9 cm dari batas bawah plat. Plat KLT Silika Gel F₂₅₄ diangkat dan diangin-anginkan kemudian dianalisis menggunakan densitometri pada λ_{maks} kuersetin. Plat KLT selanjutnya diberi pereaksi semprot AlCl₃ 5% untuk analisis kualitatif. Optimasi diulang sebanyak 3 kali (triplo) untuk setiap variasi perbandingan volume eluen. Noda yang terbentuk diukur nilai faktor retardasinya dan dipilih nilai faktor retardasi (Rf) antara 0,2-0,8 (Ermer dan Miller, 2005), memiliki bentuk noda (spot) yang baik, serta nilai standar deviasi paling kecil. Eluen yang mempunyai pemisahan paling baik digunakan untuk analisis selanjutnya.

3.4.5 Validasi Metode

a. Linieritas

Larutan standar flavonoid dengan konsentrasi 40, 50, 60, 70, 80, 90, 100, 110, 120 dan 130 ppm disiapkan. Larutan tersebut masing-masing ditotolkan sebanyak 40 μ L (1 μ L untuk sekali totolan) pada plat KLT Silika Gel F₂₅₄ yang sudah diaktivasi. Plat dielusi menggunakan metanol : kloroform hasil optimasi dan dianalisis menggunakan densitometri pada λ_{maks} kuersetin. Plat KLT selanjutnya diberi pereaksi semprot AlCl₃ 5% untuk analisis kualitatif. Data yang diperoleh berupa luas area (AU) dan massa larutan standar flavonoid kemudian di plotkan ke dalam sebuah kurva penentuan daerah linier (*linier range*) sehingga diperoleh persamaan $y=bx+a$. Daerah linier kurva kalibrasi yang baik memiliki koefisien regresi 0,997 (Ermer dan Miller, 2005).

b. Batas Deteksi (*Limit of Detection, LOD*) dan Batas Kuantitasi(*Limit of Quantitation, LOQ*)

Batas deteksi dan batas kuantitasi ditentukan menggunakan metode statistik dari hasil kurva kalibrasi yang diperoleh dari pengukuran linieritas (Hermita, 2004). Rumus untuk perhitungannya sebagai berikut:

$$\text{Batas deteksi (LOD)} = \frac{3 \times S_b}{SI}$$

$$\text{Batas kuatitasi (LOQ)} = \frac{10 \times S_b}{SI}$$

Keterangan :

S_b = simpangan baku respon analitik dari blanko

SI = arah garis linier dari kurva antara respon terhadap konsentrasi = kemiringan garis kurva standar (b pada persamaan garis $y = a + bx$)

(Ermer dan Miller, 2005).

c. Kecermatan (*accuracy*)

Larutan standar flavonoid dengan konsentrasi 80, 90, dan 100 ppm disiapkan kemudian ditambahkan sebanyak 2 mL ke dalam 2 mL ekstrak sampel ke dalam 3 buah gelas piala yang berbeda. Ekstrak sampel sebanyak 40 μL (1 μL untuk sekali penotolan) ditotolkan pada plat Silika Gel F_{254} yang sudah diaktivasi. Langkah selanjutnya dilakukan analisis menggunakan metode KLT–Densitometri dengan eluen campuran metanol : kloroform yang dioptimasi pada λ_{maks} kuersetin sehingga diperoleh massa sampel dari pengukuran (m_f). Selanjutnya plat KLT diberi pereaksi semprot AlCl_3 5%. Pengukuran menggunakan metode KLT–Densitometri dengan eluen campuran metanol : kloroform hasil optimasi pada λ_{maks} kuersetin juga dilakukan pada 3 buah sampel ekstrak tanpa penambahan larutan standar sehingga diperoleh massa sampel sebenarnya (m_a). Kecermatan dapat ditetapkan dengan rumus sebagai berikut:

$$\% \text{ perolehan kembali} = \frac{m_f - m_a}{m_a^*} \times 100\%$$

keterangan:

m_f = massa total flavonoid salam sampel + larutan standar hasil pengukuran

m_a = massa flavonoid yang didapatkan

m_a^* = massa flavonoid yang ditambahkan

(Ermer dan Miller, 2005).

d. Keseksamaan (presisi)

Larutan standar flavonoid dengan konsentrasi 80, 90 dan 100 ppm diuji menggunakan KLT–Densitometri menggunakan eluen campuran metanol : kloroform hasil optimasi pada λ_{maks} kuersetin. Selanjutnya plat diberi pereaksi semprot AlCl_3 5%. Pengulangan dilakukan 6 kali untuk masing-masing konsentrasi larutan standar flavonoid. Keseksamaan diukur sebagai simpangan baku dan simpangan baku relatif dengan rumus dibawah ini:

$$SD = \sqrt{\frac{\sum (x - \bar{x})^2}{n - 1}}$$

$$\bar{x} = \frac{1}{n} \sum_{i=1}^n x_i$$

$$\%SBR = \frac{SD}{x} \times 100\%$$

$$\text{Nilai presisi} = 100\% - \%SBR$$

keterangan:

$x = x_1, x_2, x_3, \dots, x_n$ hasil pengujian

\bar{x} = nilai rata-rata

N = jumlah pengukuran (Ermer dan Miller, 2005).

3.4.6 Analisa Senyawa Flavonoid pada Benalu Kopi

Larutan standar flavonoid 90 ppm dan sampel masing-masing ditotolkan sebanyak 40 μL (1 μL untuk sekali penotolan) pada plat KLT Silika Gel F_{254} yang sudah diaktivasi. Penotolan dilakukan secara bertahap dan setiap penotolan dikeringkan menggunakan *hair dryer*. Penotolan dilakukan dengan jarak 1 cm dari bawah plat, 1 cm dari kanan dan kiri plat, serta jarak penotolan 1 cm. Langkah selanjutnya plat dielusi dengan eluen campuran metanol : kloroform yang sudah dioptimasi dalam bejana (*chamber*) dengan ukuran 10x10x5 cm. Eluen didiamkan hingga berjalan 9 cm dari batas bawah plat. Plat diangkat dan diangin-anginkan untuk selanjutnya di uji menggunakan densitometer pada λ_{maks} kuersetin. Selanjutnya dilakukan analisa kualitatif dengan cara plat KLT yang sudah

diidentifikasi menggunakan densitometri diberi pereaksi semprot AlCl_3 5 %. Analisis dilakukan sebanyak 3 kali ulangan.

Analisis data hasil densitometri berupa densitogram yang memiliki luas area dan harga R_f berbeda-beda. Hasil densitogram dirata-rata untuk 3 kali ulangan tiap sampel. Rata-rata luas area tiap sampel selanjutnya dimasukkan ke dalam persamaan kurva kalibrasi daerah linier, sehingga dapat diketahui massa flavonoid yang didapatkan dan kadar diazinon masing-masing sampel.



BAB 5. PENUTUP

5.1 Kesimpulan

Kesimpulan yang diperoleh dari penelitian ini adalah sebagai berikut:

1. Komposisi eluen (metanol:kloroform) yang menghasilkan pemisahan terbaik dalam analisis kadar flavonoid pada daun benalu kopi (*Dendrophthoe pentandra* (L.) Miq.) menggunakan metode KLT-Densitometri adalah metanol dan kloroform dengan perbandingan 4:1.
2. Metode KLT-Densitometri analisis kadar flavonoid pada daun benalu kopi (*Dendrophthoe pentandra* (L.) Miq.) dinyatakan valid berdasarkan hasil pengujian terhadap beberapa parameter yakni linieritas dengan nilai koefisien korelasi sebesar 0.998; nilai batas deteksi (LOD) dan batas kuantitasi (LOQ) masing-masing yaitu 182.5 ng dan 608.3 ng; presisi dengan nilai 2.5-5.1 % ; serta akurasi sebesar 86.14-102.46 %.
3. Kadar flavonoid pada daun benalu kopi (*Dendrophthoe pentandra* (L.) Miq.) menggunakan teknik pemisahan KLT-Densitometri sebesar $1.404 \times 10^{-2} \pm 0.0007$ mg/g sampel.

5.2 Saran

Saran yang dapat diberikan berdasarkan hasil penelitian ini adalah:

1. Sebaiknya dilakukan variasi eluen dengan komposisi eluen yang berbeda agar diperoleh pemisahan spot paling baik.
2. Perlu dilakukan penelitian lanjutan penetapan kadar dari senyawa metabolit sekunder yang lain pada daun benalu kopi.
3. Metode KLT-Densitometri perlu diterapkan untuk dan dikembangkan untuk analisis senyawa lain misalnya dari turunan flavonoid serta memvalidasinya.

DAFTAR PUSTAKA

- Achmad, S.A. 1986. *Kimia Organik Bahan Alam*. Jakarta: Universitas Terbuka.
- Adler, L.S. 2002. Host Effect On Herbivory And Pollination In A hemiparasitic Plant. *The Ecological Society of America*. 8(10): 2700-2710.
- Adnan, M. 1997. *Teknik Kromatografi untuk Analisis Bahan Makanan, Edisi Pertama*. Yogyakarta: Penerbit andi.
- Agoes, G. 2007. *Teknologi Bahan Alam*. Bandung: ITP Press.
- Anita, A., Khotimah, S., dan Yanti, A.H. 2014. Aktivitas Antibakteri Ekstrak Daun Benalu Jambu Air (*Dendrophthoe pentandra* (L.) Miq.) Terhadap Pertumbuhan Benalu Salmonella Typhy. *Jurnal Protobiont*, 3(2): 268-272.
- Artanti, N., Djamilah, Lotulung, P., Lisnowati, Minarti, Hanafi, M., Kardono, L.B.S., dan Darmawan, A. 2003. *Evaluasi Potensi Ekstrak Taxus Sumatrana dan Benalu sebagai Antikanker*. Serpong: Puslit Kimia.
- Artanti, N., Firmansyah, T., and Darmawan, A. 2012. Bioactivities Evaluation of Indonesian Mistletoe (*Dendrophthoe pentandra* (L.) Miq.) Leaves Extracts. *Journal of Applied Pharmaceutical Science*, 02(01): 24-27.
- Barlow, B.A. 1967. Loranthaceae. In: C Kalkman, DW Kirkup, HP Nootebom, PF Steven, WJJO de Wilde (Eds.) *Flora Malesiana*. Series I, Vol. 13. Rijksherbarium/Hortus Botanicus, The Netherlands, 209-401.
- Bashir, H.S., Mohammed, A.M., Magsoud, A.S., and Shaoub, A.M. 2013. Isolations of Three Flavonoids from *Withania somnifera* Leaves (*Solanaceae*) and their Antimicrobial Activities. *Journal of forest Product & Industries*, 2(5):39-45.
- CAMAG. 2012. *TLC Scanner 3 with WinCATS Software*. USA: CAMAG Scientific, Inc.
- Darwis, D. 2000. *Teknik Isolasi dan Karakterisasi senyawa Metabolit Sekunder*. Workshop Peningkatan Sumber Daya Manusia untuk Pemanfaatan Sumber Daya Alam Hayati dan Rekaya Bioteknologi. FMIPA Universitas Andalas Padang.
- Davehat, F.L., Tomasi, S., Fontanel, D., dan Boustie, J. 2002. Flavonols from *Scurrula ferrugines* Danser (Loranthaceae). *Z. Naturforsch.* 57c:1092-1095.
- Dillasamola, D., Dharma, S., dan Khaira., N.Q.A. 2015. Perbandingan Pengaruh Pemberian Ekstrak Etanol Defatting dan Ekstrak Etanol Daun Benalu Kopi

- Scrulla ferruginea* (Jack) Danser terhadap Kadar Glukosa Darah Mencit Putih Jantan. *Scientia*. 5(2):108-113.
- Departemen Kesehatan RI. 2000. *Parameter Standar Umum Ekstrak Tumbuhan Obat*. Jakarta: Direktorat Jendral Pengawasan Obat dan Makanan.
- Erlyani. 2002. *Identifikasi Kandungan Metabolit Sekunder dan Uji Antioksidan Ekstrak Metanol Tandan Bunga Jantan Enau (Arenga Pinnata Merr.)*. Jurnal Skripsi jurusan P.MIPA FKIP UNHALU. Halaman 1-2
- Ermer, J. & Miller, J.H. McB. 2005. *Method Validation in Pharmaceutical Analysis. A Guide to Best Practice*. The Federal Republic of Germany.
- Fajriah, S., Darmawan, A., Sundowo, A. dan Artanti, N. 2007. Isolasi Senyawa Antioksidan dan Ekstrak Etil asetat Daun Benalu *Dendrophthoe pentandra* L.Miq yang Tumbuh pada Inang Lobi-lobi. *Jurnal Kimia Indonesia*, 2(1):17-20.
- Fithria, A. 2015. "Analisis Residu Pestisida Diazinon Pada Sawi Hijau Menggunakan Teknik Kromatografi Lapis Tipis – Densitometri". Tidak Diterbitkan. Skripsi. Jember: Universitas Jember.
- Fitrilia, T., Bintang, M., dan Safithri, M. 2015. Phytochemical Screening and Antioxidant Activity of Clove Mistletoe Leaf Extracts (*Dendrophthoe pentandra* (L.) Miq. *IOSR Journal Of Pharmacy*, 5(8): 13-18
- Fried, B. & Sherma, J. 2003. *Handbook of Thin-Layer Chromatography, Ed III*. New York: Marcel Decker, Inc.
- Gustaviani, W., Gana, A., dan Sukrasno. *Kandungan Kuersetin pada Beberapa Jenis Benalu*. Skripsi. Bandung: ITB.
- Gritter, R.J., Bobbit, J.M., dan Schwarting, A.E. 1991. *Pengantar Kromatografi*. Bandung: Penerbit ITB.
- Harmita. 2004. Petunjuk Pelaksanaan Validasi Metode dan Cara Perhitungannya. *Majalah Ilmu Kefarmasian*, 1(3): 117-135.
- Harvey, D. 2000. *Modern Analytical Chemistry*. New York: McGraw Hill.
- Harborne, J.B. 1996. *Metode Fitokimia: Penentuan Cara Modern Menganalisa Tumbuhan*. (Edisi Kedua). Terjemahan oleh Kosasih Padmawinata dan Iwang Soediro. Bandung: ITB.
- Hasan, Ahmed, Mondal, Uddin, Masud, and Ishibashi. 2006. Antioxidant, antinociceptive activity and general toxicity study of *Dendrophthoe falcata* and isolation of quercitrin as the major component. *Oriental Pharmacy and Experimental Medicine*. 6(4): 355 – 360.

- Harborne, J.B. 2006. *Metode Fitokimia: Penentuan Cara Modern Menganalisa Tumbuhan*. Terjemahan oleh Kosasih Padmawinata dan Iwang Soediro. Bandung: ITB.
- Huber, L. 2007. Validation of Analyses Methods. Bagian II. *Buletin ISFI Jatim*, Vol.23, No.1. Surabaya: Airlangga University.
- Hutapea, J.R. 1990. *Inventaris Tanaman Obat Indonesia, Jilid II*. Jakarta: Departemen Kesehatan Republik Indonesia, Badan Penelitian dan Pengembangan Kesehatan.
- Hostettman, K., Marston, A., and Hostettman, M. 1997. *Preparative Chromathography Techniques Application in Natural Product Isolation*. Jerman: Springer.
- ICH. 2006. *Validation of Analytical Procedure*. London: European Medicines Agency.
- Indrayani, S. 2008. "Validasi Penetapan Kadar Kuersetin dalam Sediaan Krim Secara Kolorimetri dengan Pereaksi $AlCl_3$ ". Tidak diterbitkan. Skripsi. Yogyakarta: Fakultas Farmasi Universitas Sanata Dharma.
- Indrayanto, G. 1994. *Metode Validasi pada Analisis dengan Kromatografi*. Jakarta: Medika J. Kedokteran dan Farmasi.
- Ishizu, Winarno, Tsujno, Morita, and Shibuya. 2002. Indonesian Medical Plant. Xxiv. Stereochemical Structure of Perseitol-K Complex Isolated from the Leaves of *Scurulla fusca* (Loranthaceae). 50(4).489-492.
- Khopkar, S.M. 1990. *Konsep Dasar Kimia Analitik*. Jakarta: universitas Indonesia Press.
- Kunle., Folashade, O., Egharevba, O., Henry, A., and Ochugu, P. 2012. Standardization of herbal medicines - A review. *International Journal of Biodiversity and Conservation* Vol. 4(3), pp. 101-112. ISSN 2141-243X, p. 101-112.
- Luttge, U. 1997. *Physiological Ecology of Tropical Plants*. Springer Verlag. Berlin.
- Mabry, T.J., Markham, K.R., and Thomas, M.B. 1970. *The Systematic Identification of Flavonoids*. New York: Springer-Verlag New York, Inc.
- Markham, K.R. 1988. *Cara Mengidentifikasi Flavonoid*, Terjemahan Kosasih Padmawinata. Bandung: ITB.

- Martyanti, E.N. 2010. "Validasi Metode Analisis dan Penetapan Kadar Cetrizine Dihidroklorida dalam Tablet Secara KLT Densitometri". Tidak Dipublikasikan. Skripsi. Jember: Universitas Jember.
- Masyhud. 2010. *Lokakarya Nasional Tanaman Obat Indonesia (TOI)*. Jakarta: Badan Litbang Indonesia.
- Miryanti, A., Lanny, S., Kurniawan, B., dan Stephen, I. 2011. Ekstraksi Antioksidan dari Kulit Buah Manggis (*Garcinia manostana L.*). Bandung: Lembaga Penelitian dan Pengabdian Masyarakat Universitas Katolik Parahyangan.
- Mulja dan suharman. 1995. *Analisis Instrumental*. Surabaya: Universitas Airlangga Press.
- Nahar, L. and Sarker, S.D. 2007. *Chemistry for Pharmacy Student: General,Organik and Natural Product Chemistry*. England: John Wiley & Sons, Ltd.
- Pavia DL, Lampman GM, Kriz GS. 2001. *Introduction to Spectroscopy*. Third Edition. Singapore: Brooks/Cole.
- Pitojo, S. 1996. *Benalu Holtikultura: Pengendali dan Pemanfaatan*. Slawi: Trubus Agriwidya.
- Prasetyo, S.S. dan Prima, A.K. 2010. *Kurva Kesetimbangan Minyak Biji Teh – Normal Heksan dan Aplikasinya pada Ekstraksi Padat – Cair Multitahap*. Lembaga Penelitian dan Pengabdian Kepada Masyarakat. Bandung: Universitas Katolik Parahyangan.
- Priyanto, J.A., Sri, P., dan Isworo, R. 2014. Flavonoid Production Capability Test of Tea Mistletoe (*Scurrula atropurpurea BL.* Dans) Endophytic Bacteria Isolates. *Jurnal Sains dan Matematika*. 22 (4) : 89-96.
- Purnomo, B. 2000. "Uji Ketoksikan Akut Fraksi Etanol Daun Benalu (*Dendrophthoe Sp*) Pada Mencit Jantan dan Uji Kandungan Kimia". Tidak Diterbitkan. Skripsi. Yogyakarta: Fakultas Farmasi Universitas Gajah Mada.
- Pelczar, M.J. dan Chan, E.S. 2005. *Dasar-Dasar Mikrobiologi, jilid 1*. Alih bahasa oleh Ratna Sari Hadiotoemo. Jakarta: UI Press.
- Rohman, A. 2009. *Kromatografi untuk Analisis Obat Edisi Pertama*. Yogyakarta: Graha Ilmu.
- Robinson, T.1995. *Kandungan Organik Tumbuhan Tinggi*. Terjemahan oleh Kosasih Padmawinata. Bandung: ITB.

- Samin, A.A., Bialangi, N., dan Salimi, Y.K. 2013. Penentuan Kandungan Fenolik Total dan Aktivitas Antioksidan dari Rambut Jagung (*Zea Mays L*) yang Tumbuh Di Daerah Gorontalo. Gorontalo: Kimia FMIPA UNG
- Sasmito, Darsono, dan Zainul, K. 2001. Kemampuan Fraksi Ekstrak Air dan Etil Asetat Daun Benalu Mindi (*Dendrophthoe falcata* L.f Ettingsh) Melarutkan Batu Ginjal Kalsium In Vintro yang Diuji dengan Metode Aktivasi Neuron. *Majalah Farmasi Indonesia*, 12 (3), 120-127.
- Simanjuntak, P., Parwati, T., dan Lenny, L.E. 2004. Isolasi dan Identifikasi Senyawa Antioksidan dari Ekstrak Benalu Teh (*Scurrula oortina* (Korth) Danser). *Jurnal Ilmu Kefarmasian Indonesia*. 2(1): 19-24
- Sherma, J. 2005. Thin Layer Chromatography of Pesticide. *Acta Chromatography* No.15. Department of Chemistry, Lafayette College, Easton, PA 18042-1782, USA.
- Siahaan, C.E. 2015. “Uji Skrining Fitokimia, Aktivitas Antioksidan dan Antibakteri ekstrak Metanol, Etil Asetat dan n-Heksana daun Benalu Kakao (*Dendrophthoe pentandra* (L.) Miq.)”. Tidak diterbitkan. Skripsi. Medan: Departemen Kimia Universitas Sumatra Utara.
- Stahl, E. 1985. *Analisa Obat Secara Kromatografi dan Mikroskopi*. Bandung: Penerbit ITB.
- Sudarmadji, S., Haryono, B., dan Suhardi. 1989. *Prosedur Analisis untuk Bahan Makanan dan Pertanian*. Yogyakarta: Liberty.
- Sunaryo, 1998. Identifikasi Kerusakan-Kerusakan Tumbuhan Inang Oleh Parasit *Dendrophthoe pentandra* (L.) Miq.(Loranthaceae): Sebuah studi kasus di Tahura bengkulu. *Berita Biologi*, 4(2): 80-85.
- Soejono. 1995. *Inventarisasi Pohon Inang Benalu di Kebun Raya Purwodadi Pasuruan, Jawa Timur*. Makalah Seminar Nasional Tumbuhan Obat Indonesia IX. Universitas Gajah Mada Yogyakarta.
- Suryanto, E., dan Wehantouw, F. 2009. Aktivitas Penangkap Radikal Bebas dari Ekstrak Fenolik Daun Sukun (*Artocarpus altilis* F.). *chem. Prog.* 2(1):1-6
- Uji, T. dan Samiran. 2005. Keanekaragaman Jenis Benalu dan Tumbuhan Inangnya di Kebun Raya Purwodadi, Jawa Timur. *Laporan Teknik. Bidang Botani, Pusat Penelitian Biologi – LIPI*. Halaman: 269-277
- Uji, T., Sunaryo, dan Rachman, E. 2007. Keanekaragaman Jenis Benalu Parasit Pada Tanaman Koleksi di Kebun Raya Eka Karya, Bali. *Berk. Penel. Hayati*: 13(1-5).

- Valkenburg van J.L.C.H. 2003. *Dendrophthoe; Scrulla; Viscum*. In: R.H.M.J. Lemmens dan N. Bunyaphatsara (Eds.). *Medical and Poisonous Plants* 3. PROSEA. Backhuys Publisher, Leiden.
- Wulandari, L. 2011. *Kromatografi Lapis Tipis*. Jember: PT: Taman Kampus Presindo.
- Wulandari, L., Retnaningtyas, Y., dan Mustafidah, D. 2013. Pengembangan dan Validasi Metode Kromatografi Lapis Tipis Densitometri untuk Penetapan Kadar Teofilin dan Efedrin Hidroklorida Secara Simultan pada Sediaan Tablet. *JKTI*: 15(1) : 15-21.
- Wilson, Michael, Colin, and Edward. 2000. *Encyclopedia of Separation Science*. Washington DC: Academic Press.
- Wongkar, J.H., Max, R.J.R., and Jemmy, A. 2015. Uji Toksisitas Ekstrak Daun Benalu Langsung (*Dendrophthoe pentandra* (L.) Miq.) dengan Metode *Brine Shrimp Lethality Test* (BSLT) LC50. *Jurnal MIPA UNSRAT Online*. Vol. 4 (2): 157-160.
- Yuangsoi, B., Jiantasataporn, P., Areechon, N., and Tabthipwon, P. 2008. Validated TLC-densitometric Analysis for Determination of carotenoid in Fancy Carp (*Cyprinus carpio*) Serum and The Application for Pharmacokinetic. *In Songklanakarin J. Sci. Technol.*, 30 (6): 693-700.

Lampiran 3.1 Pembuatan Larutan Standar Kuersetin

1. Larutan Standar Kuersetin 500 ppm

Larutan standar kuersetin dengan konsentrasi 500 ppm dibuat dengan cara menimbang kuersetin 25,0 mg dan dimasukkan ke dalam labu ukur 50 mL. etil asetat ditambahkan 15 mL ke dalam labu ukur tersebut. Larutan di *shaker* selama 5 menit. Ditambahkan kembali etil asetat sampai tanda batas.

2. Larutan Standar Kuersetin 250 ppm

Larutan standar 500 ppm diambil sebanyak 25 mL menggunakan pipet volum 25 mL ke dalam labu ukur 50 mL dan diencerkan dengan etil asetat sampai tanda batas.

3. Larutan Standar Kuersetin 130 ppm

Larutan standar 250 ppm diambil sebanyak 5,2 mL menggunakan pipet mohr 10 mL ke dalam labu ukur 10 mL dan diencerkan dengan etil asetat sampai tanda batas.

4. Larutan Standar Kuersetin 120 ppm

Larutan standar 250 ppm diambil sebanyak 4,8 mL menggunakan pipet mohr 10 mL ke dalam labu ukur 10 mL dan diencerkan dengan etil asetat sampai tanda batas.

5. Larutan Standar Kuersetin 110 ppm

Larutan standar 250 ppm diambil sebanyak 4,4 mL menggunakan pipet mohr 10 mL ke dalam labu ukur 10 mL dan diencerkan dengan etil asetat sampai tanda batas.

6. Larutan Standar Kuersetin 100 ppm

Larutan standar 250 ppm diambil sebanyak 20 mL menggunakan pipet volum 20 mL ke dalam labu ukur 50 mL dan diencerkan dengan etil asetat sampai tanda batas.

7. Larutan Standar Kuersetin 90 ppm

Larutan standar 100 ppm diambil sebanyak 9 mL menggunakan pipet mohr 10 mL ke dalam labu ukur 10 mL dan diencerkan dengan etil asetat sampai tanda batas.

8. Larutan Standar Kuersetin 80 ppm

Larutan standar 100 ppm diambil sebanyak 8 mL menggunakan pipet mohr 10 mL ke dalam labu ukur 10 mL dan diencerkan dengan etil asetat sampai tanda batas.

9. Larutan Standar Kuersetin 70 ppm

Larutan standar 100 ppm diambil sebanyak 7 mL menggunakan pipet mohr 10 mL ke dalam labu ukur 10 mL dan diencerkan dengan etil asetat sampai tanda batas.

10. Larutan Standar Kuersetin 60 ppm

Larutan standar 100 ppm diambil sebanyak 6 mL menggunakan pipet mohr 10 mL ke dalam labu ukur 10 mL dan diencerkan dengan etil asetat sampai tanda batas.

11. Larutan Standar Kuersetin 50 ppm

Larutan standar 100 ppm diambil sebanyak 5 mL menggunakan pipet mohr 10 mL ke dalam labu ukur 10 mL dan diencerkan dengan etil asetat sampai tanda batas.

12. Larutan Standar Kuersetin 40 ppm

Larutan standar 100 ppm diambil sebanyak 4 mL menggunakan pipet mohr 10 mL ke dalam labu ukur 10 mL dan diencerkan dengan etil asetat sampai tanda batas.

13. Larutan AlCl_3 5%

Larutan alumunium klorida 5% dibuat dengan cara melarutkan 0,25 gram AlCl_3 ke dalam 5 mL metanol.

14. Larutan NaOH 10%

Larutan natrium hidroksida 10% dibuat dengan cara melarutkan 1 gram NaOH ke dalam 10 mL aquades.

Lampiran 4.1 Data Penentuan Panjang Gelombang Maksimum (*Scanning*)4.1.1 *Scanning* Panjang Gelombang 5 ppm

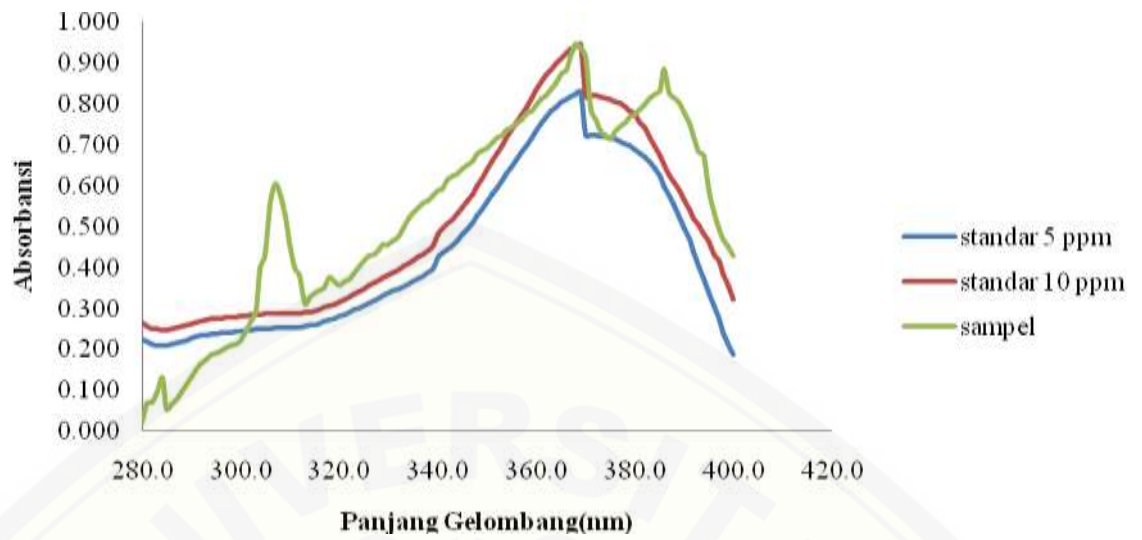
Panjang Gelombang	Absorbansi	Panjang Gelombang	Absorbansi	Panjang Gelombang	Absorbansi
280.0	0.226	321.0	0.285	362.0	0.768
281.0	0.218	322.0	0.290	363.0	0.782
282.0	0.212	323.0	0.296	364.0	0.793
283.0	0.210	324.0	0.302	365.0	0.804
284.0	0.210	325.0	0.308	366.0	0.811
285.0	0.211	326.0	0.314	367.0	0.819
286.0	0.213	327.0	0.320	368.0	0.825
287.0	0.215	328.0	0.326	369.0	0.831
288.0	0.219	329.0	0.332	370.0	0.724
289.0	0.223	330.0	0.337	371.0	0.723
290.0	0.227	331.0	0.343	372.0	0.723
291.0	0.230	332.0	0.348	373.0	0.721
292.0	0.233	333.0	0.354	374.0	0.719
293.0	0.235	334.0	0.360	375.0	0.717
294.0	0.237	335.0	0.366	376.0	0.713
295.0	0.238	336.0	0.373	377.0	0.709
296.0	0.240	337.0	0.380	378.0	0.703
297.0	0.241	338.0	0.389	379.0	0.697
298.0	0.242	339.0	0.397	380.0	0.689
299.0	0.243	340.0	0.425	381.0	0.680
300.0	0.245	341.0	0.435	382.0	0.669
301.0	0.246	342.0	0.445	383.0	0.656
302.0	0.248	343.0	0.455	384.0	0.641
303.0	0.249	344.0	0.468	385.0	0.622
304.0	0.250	345.0	0.481	386.0	0.600
305.0	0.251	346.0	0.496	387.0	0.577
306.0	0.251	347.0	0.510	388.0	0.551
307.0	0.252	348.0	0.525	389.0	0.524
308.0	0.252	349.0	0.542	390.0	0.496
309.0	0.252	350.0	0.562	391.0	0.468
310.0	0.253	351.0	0.579	392.0	0.437
311.0	0.253	352.0	0.595	393.0	0.404
312.0	0.254	353.0	0.612	394.0	0.372
313.0	0.256	354.0	0.630	395.0	0.339
314.0	0.258	355.0	0.646	396.0	0.308
315.0	0.261	356.0	0.663	397.0	0.275
316.0	0.264	357.0	0.681	398.0	0.241
317.0	0.268	358.0	0.698	399.0	0.212
318.0	0.271	359.0	0.717	400.0	0.188
319.0	0.275	360.0	0.734		
320.0	0.280	361.0	0.751		

4.1.1 Scanning Panjang Gelombang 10 ppm

Panjang Gelombang	Absorbansi	Panjang Gelombang	Absorbansi	Panjang Gelombang	Absorbansi
280.0	0.267	321.0	0.322	362.0	0.871
281.0	0.257	322.0	0.328	363.0	0.885
282.0	0.251	323.0	0.334	364.0	0.900
283.0	0.249	324.0	0.340	365.0	0.913
284.0	0.248	325.0	0.347	366.0	0.924
285.0	0.248	326.0	0.355	367.0	0.933
286.0	0.250	327.0	0.362	368.0	0.940
287.0	0.252	328.0	0.369	369.0	0.945
288.0	0.256	329.0	0.376	370.0	0.818
289.0	0.260	330.0	0.383	371.0	0.820
290.0	0.264	331.0	0.389	372.0	0.820
291.0	0.267	332.0	0.395	373.0	0.818
292.0	0.270	333.0	0.402	374.0	0.815
293.0	0.272	334.0	0.409	375.0	0.811
294.0	0.274	335.0	0.416	376.0	0.806
295.0	0.275	336.0	0.425	377.0	0.801
296.0	0.276	337.0	0.432	378.0	0.792
297.0	0.277	338.0	0.443	379.0	0.785
298.0	0.278	339.0	0.453	380.0	0.777
299.0	0.279	340.0	0.482	381.0	0.756
300.0	0.281	341.0	0.494	382.0	0.742
301.0	0.283	342.0	0.506	383.0	0.717
302.0	0.284	343.0	0.518	384.0	0.694
303.0	0.285	344.0	0.532	385.0	0.673
304.0	0.286	345.0	0.548	386.0	0.651
305.0	0.286	346.0	0.563	387.0	0.626
306.0	0.287	347.0	0.580	388.0	0.607
307.0	0.286	348.0	0.598	389.0	0.589
308.0	0.287	349.0	0.618	390.0	0.564
309.0	0.287	350.0	0.640	391.0	0.543
310.0	0.287	351.0	0.660	392.0	0.521
311.0	0.287	352.0	0.679	393.0	0.503
312.0	0.288	353.0	0.699	394.0	0.482
313.0	0.290	354.0	0.717	395.0	0.464
314.0	0.292	355.0	0.735	396.0	0.432
315.0	0.295	356.0	0.754	397.0	0.416
316.0	0.298	357.0	0.774	398.0	0.385
317.0	0.302	358.0	0.794	399.0	0.357
318.0	0.307	359.0	0.814	400.0	0.323
319.0	0.311	360.0	0.832		
320.0	0.316	361.0	0.852		

4.1.1 Scanning Panjang Gelombang Sampel

Panjang Gelombang	Absorbansi	Panjang Gelombang	Absorbansi	Panjang Gelombang	Absorbansi
280.0	0.021	321.0	0.365	362.0	0.822
281.0	0.067	322.0	0.371	363.0	0.837
282.0	0.071	323.0	0.386	364.0	0.842
283.0	0.095	324.0	0.401	365.0	0.854
284.0	0.131	325.0	0.417	366.0	0.863
285.0	0.055	326.0	0.429	367.0	0.875
286.0	0.065	327.0	0.433	368.0	0.946
287.0	0.078	328.0	0.445	369.0	0.937
288.0	0.095	329.0	0.456	370.0	0.916
289.0	0.114	330.0	0.457	371.0	0.785
290.0	0.134	331.0	0.466	372.0	0.763
291.0	0.151	332.0	0.476	373.0	0.736
292.0	0.164	333.0	0.499	374.0	0.722
293.0	0.176	334.0	0.521	375.0	0.715
294.0	0.186	335.0	0.532	376.0	0.734
295.0	0.190	336.0	0.544	377.0	0.747
296.0	0.196	337.0	0.557	378.0	0.756
297.0	0.202	338.0	0.564	379.0	0.769
298.0	0.208	339.0	0.575	380.0	0.773
299.0	0.214	340.0	0.588	381.0	0.787
300.0	0.221	341.0	0.592	382.0	0.798
301.0	0.243	342.0	0.614	383.0	0.814
302.0	0.268	343.0	0.622	384.0	0.825
303.0	0.295	344.0	0.631	385.0	0.834
304.0	0.397	345.0	0.643	386.0	0.884
305.0	0.433	346.0	0.652	387.0	0.828
306.0	0.557	347.0	0.661	388.0	0.815
307.0	0.603	348.0	0.678	389.0	0.801
308.0	0.576	349.0	0.685	390.0	0.776
309.0	0.524	350.0	0.692	391.0	0.751
310.0	0.459	351.0	0.705	392.0	0.722
311.0	0.401	352.0	0.719	393.0	0.684
312.0	0.377	353.0	0.724	394.0	0.674
313.0	0.313	354.0	0.737	395.0	0.587
314.0	0.327	355.0	0.742	396.0	0.537
315.0	0.339	356.0	0.751	397.0	0.494
316.0	0.343	357.0	0.762	398.0	0.471
317.0	0.352	358.0	0.777	399.0	0.450
318.0	0.375	359.0	0.784	400.0	0.429
319.0	0.367	360.0	0.796		
320.0	0.358	361.0	0.813		



Lampiran 4.2 Data Kadar Air Serbuk Daun Benalu Kopi (*Dendrophthoe pentandra* (L.) Miq.)

Ulangan	W _{Cawan Kering} (g)	W _{Sampel+Cawan} Setelah dioven (g)	W _{Akhir} (g)	W _{air}	Kadar air (%)
1	56.535	57.456	0.921	0.079	7.900
2	65.795	66.705	0.910	0.090	9.000
3	61.829	62.736	0.907	0.093	9.300
	\bar{X}		0.913	0.087	8.700

4.2.1 Perhitungan Kadar Air 1.000 gram Serbuk Daun Benalu Kopi (*Dendrophthoe pentandra* (L.) Miq.)

- Berat daun benalu kopi = 55.221 g
- Berat serbuk daun benalu kopi (simplisia) = 24.794 g

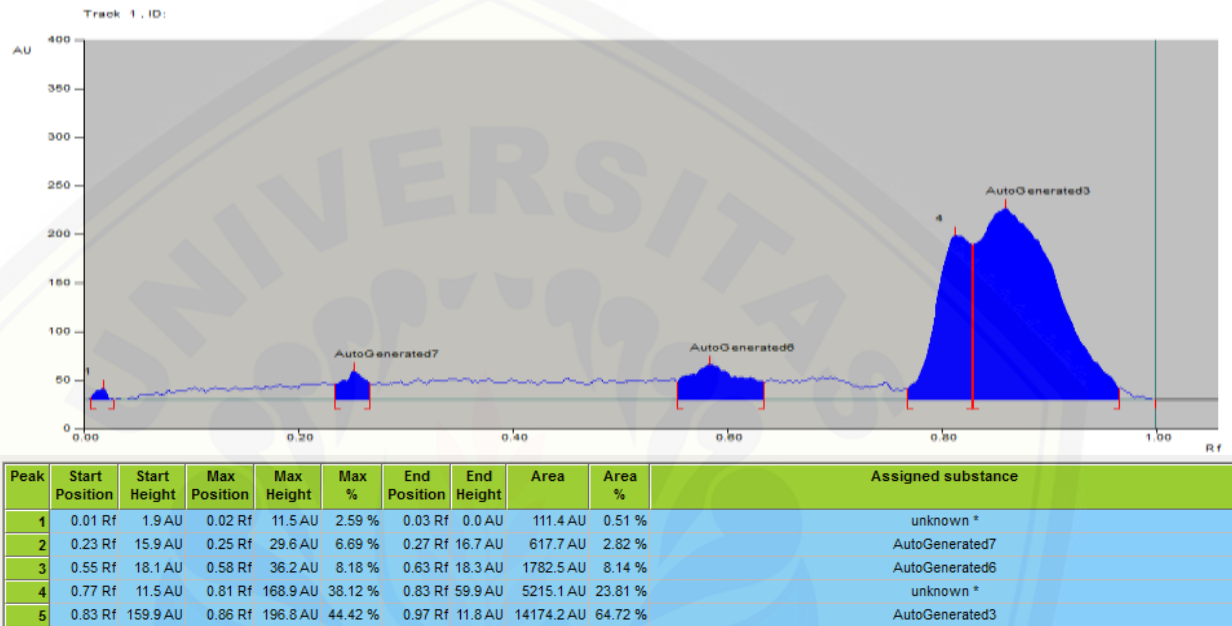
$$\begin{aligned}
 \text{Kadar}_{\text{air simplisia}} &= \frac{W_{\text{sampel}} - \bar{X}_{\text{massa akhir}}}{W_{\text{sampel}}} \times 100\% \\
 &= \frac{1.000 - 0.913}{1.000} \times 100\% \\
 &= 8.7\%
 \end{aligned}$$

Lampiran 4.3 Data Optimasi Komposisi Eluen

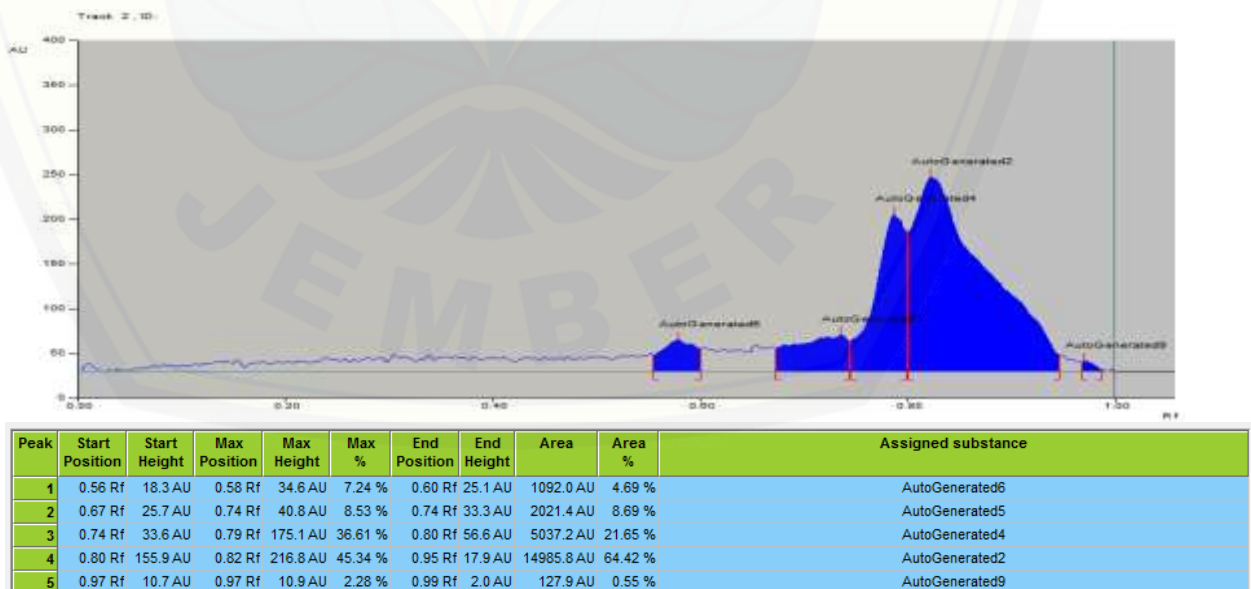
4.3.1 Pemindaian Densitometer Optimasi Komposisi Eluen Metanol-kloroform pada Panjang Gelombang 369 nm

a. Komposisi Eluen Metanol-kloroform (1:1)

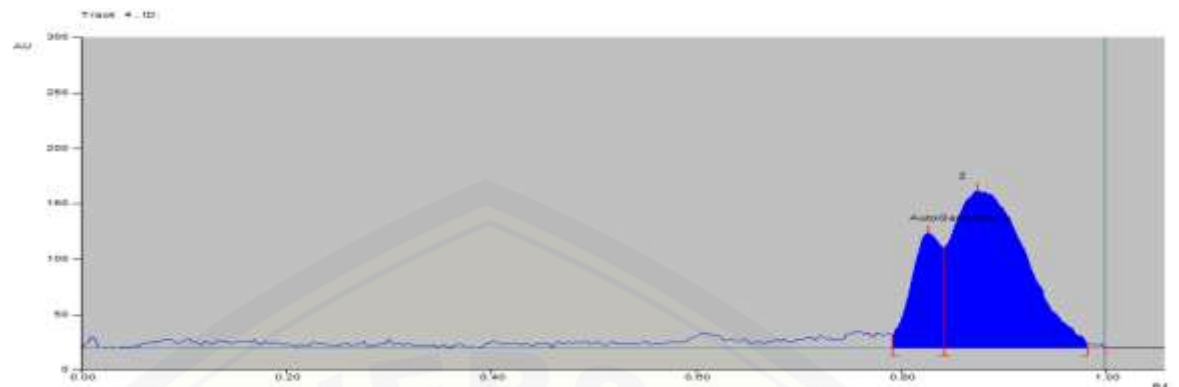
1) Densitogram dan Data (Pengulangan Pertama)



2) Densitogram dan Data (Pengulangan Kedua)

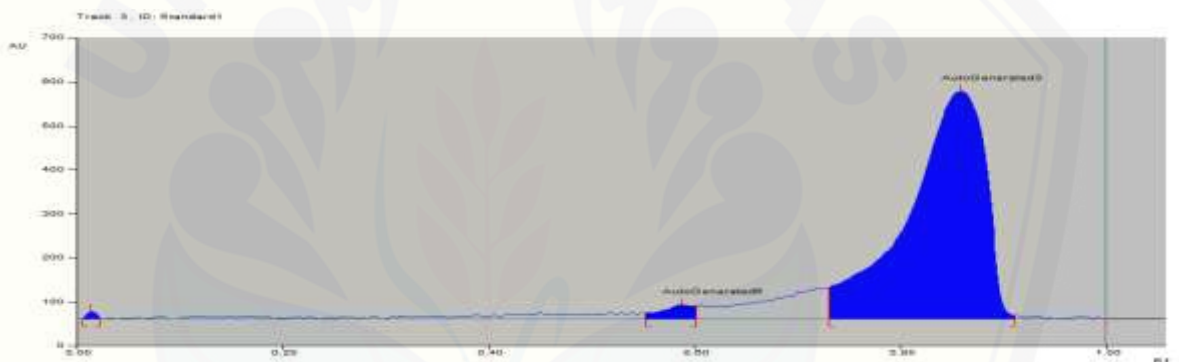


3) Densitogram dan Data (Pengulangan Ketiga)



Peak	Start Position	Start Height	Max Position	Max Height	Max %	End Position	End Height	Area	Area %	Assigned substance
1	0.79 Rf	11.8 AU	0.83 Rf	103.7 AU	42.24 %	0.84 Rf	90.3 AU	2973.2 AU	22.98 %	AutoGenerated3
2	0.84 Rf	90.6 AU	0.88 Rf	141.9 AU	57.76 %	0.98 Rf	3.7 AU	9964.8 AU	77.02 %	unknown *

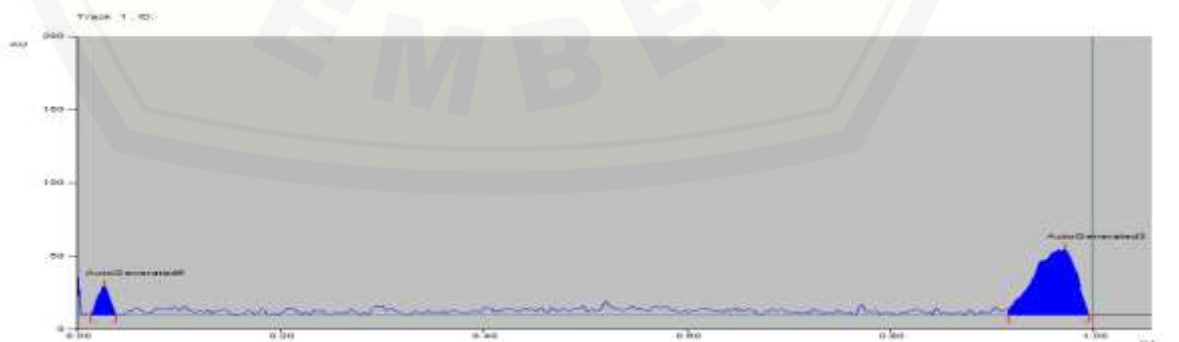
4) Densitogram dan Data (Standar)



Peak	Start Position	Start Height	Max Position	Max Height	Max %	End Position	End Height	Area	Area %	Assigned substance
1	0.00 Rf	0.1 AU	0.01 Rf	17.0 AU	3.02 %	0.02 Rf	1.5 AU	153.3 AU	0.39 %	unknown *
2	0.55 Rf	12.2 AU	0.59 Rf	31.1 AU	5.51 %	0.60 Rf	29.3 AU	982.9 AU	2.53 %	AutoGenerated6
3	0.73 Rf	70.9 AU	0.86 Rf	516.5 AU	91.47 %	0.91 Rf	7.6 AU	37681.9 AU	97.07 %	AutoGenerated3

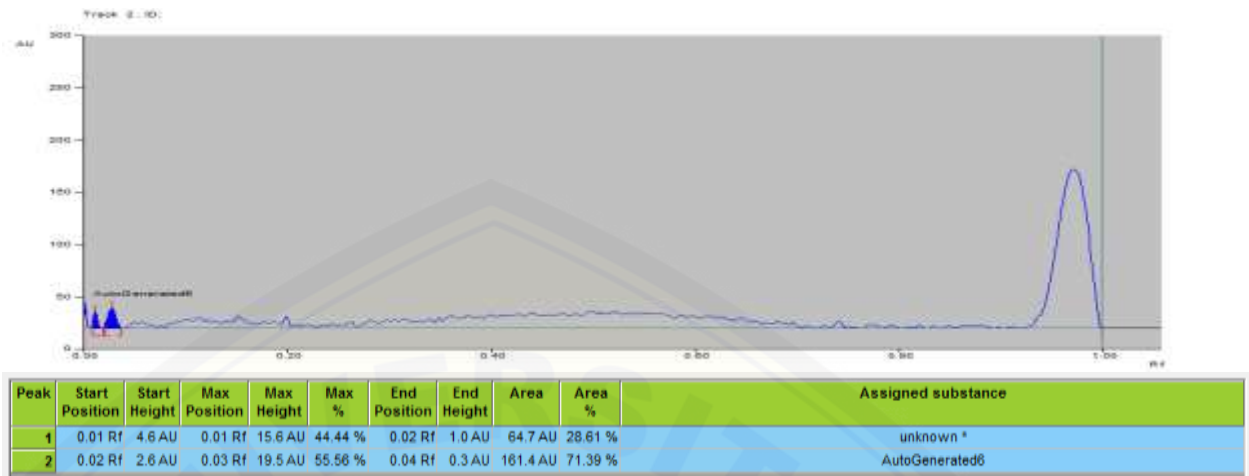
b. Komposisi Eluen Metanol-kloroform (1:4)

1) Densitogram dan Data (Pengulangan Pertama)

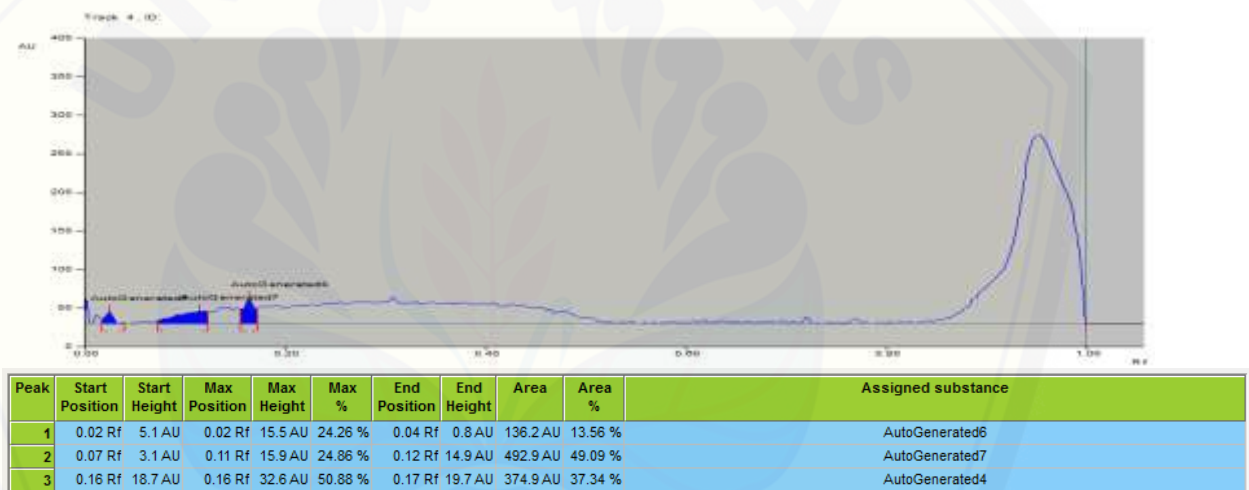


Peak	Start Position	Start Height	Max Position	Max Height	Max %	End Position	End Height	Area	Area %	Assigned substance
1	0.01 Rf	0.1 AU	0.03 Rf	19.7 AU	30.58 %	0.04 Rf	0.1 AU	237.0 AU	11.56 %	AutoGenerated6
2	0.92 Rf	4.3 AU	0.97 Rf	44.8 AU	69.42 %	1.00 Rf	0.1 AU	1813.5 AU	88.44 %	AutoGenerated3

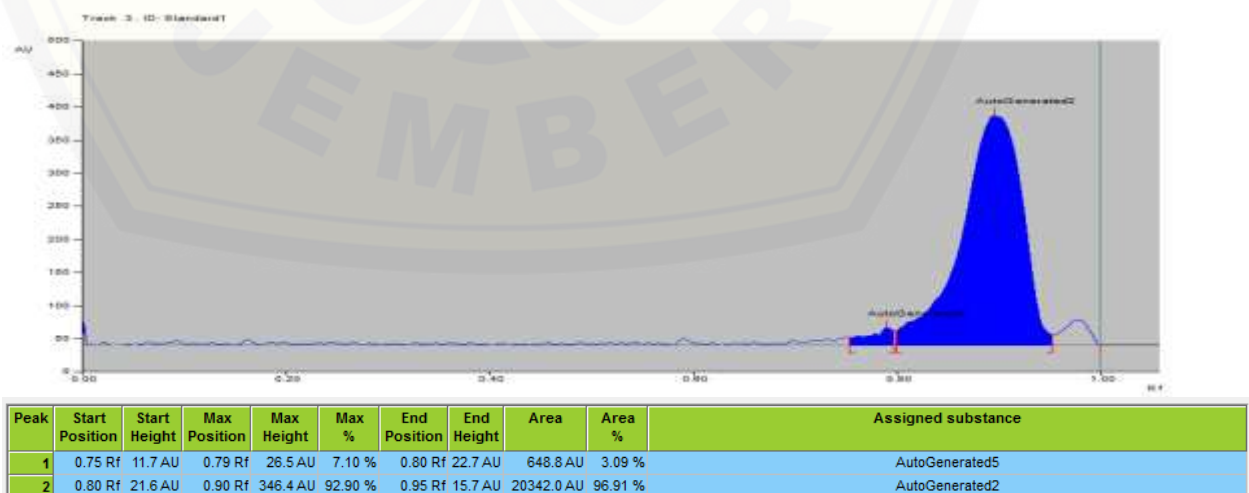
2) Densitogram dan Data (Pengulangan Kedua)



3) Densitogram dan Data (Pengulangan Ketiga)

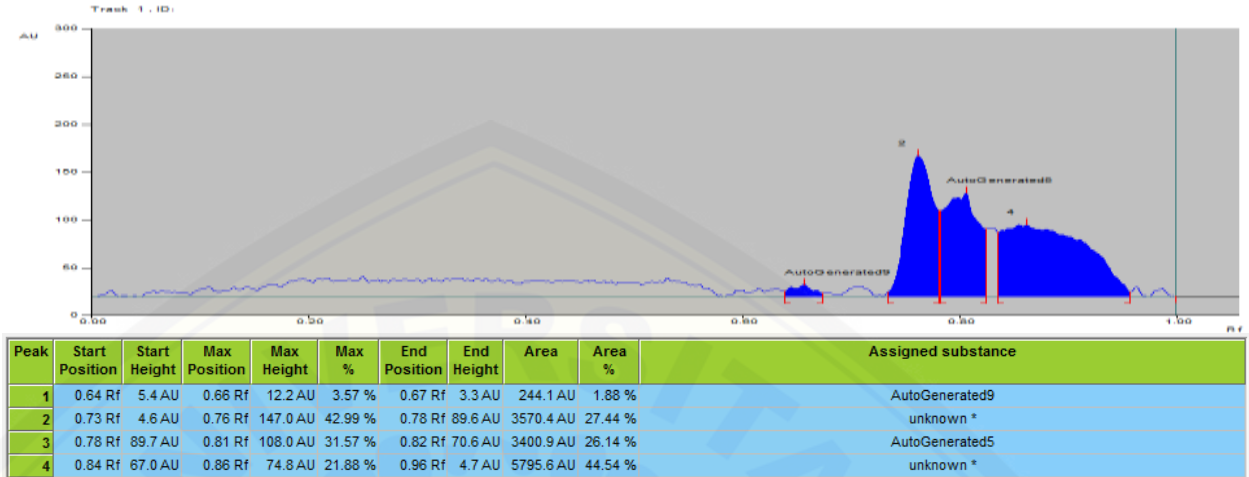


4) Densitogram dan Data (Standar)

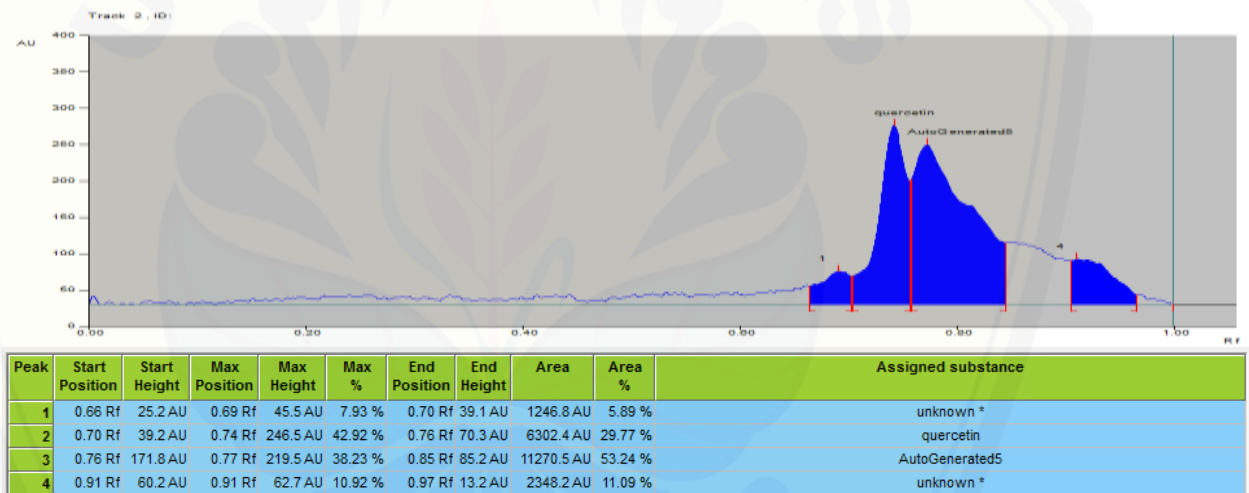


c. Komposisi Eluen Metanol-kloroform (2:3)

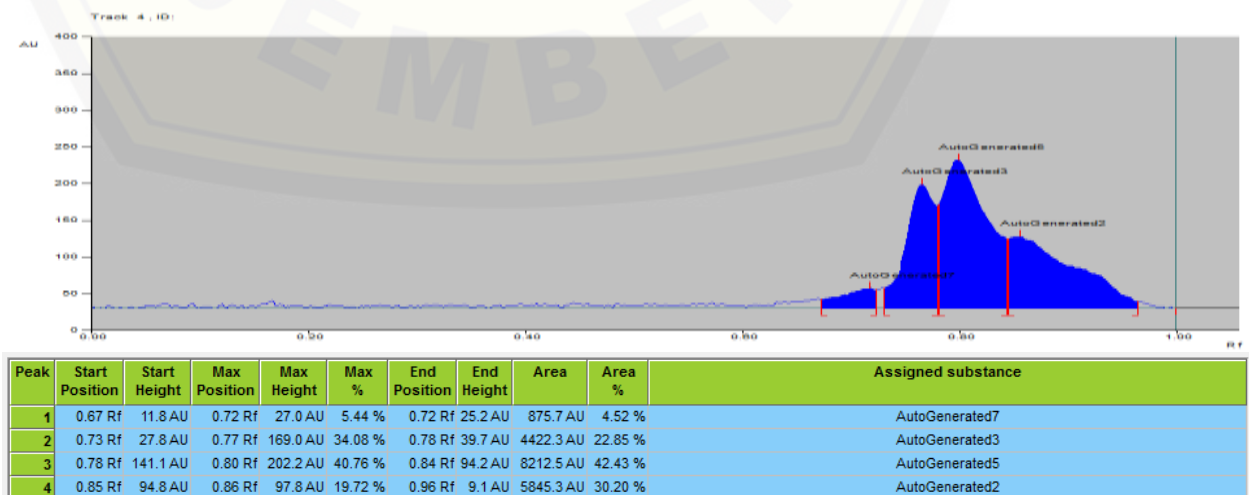
1) Densitogram dan Data (Pengulangan Pertama)



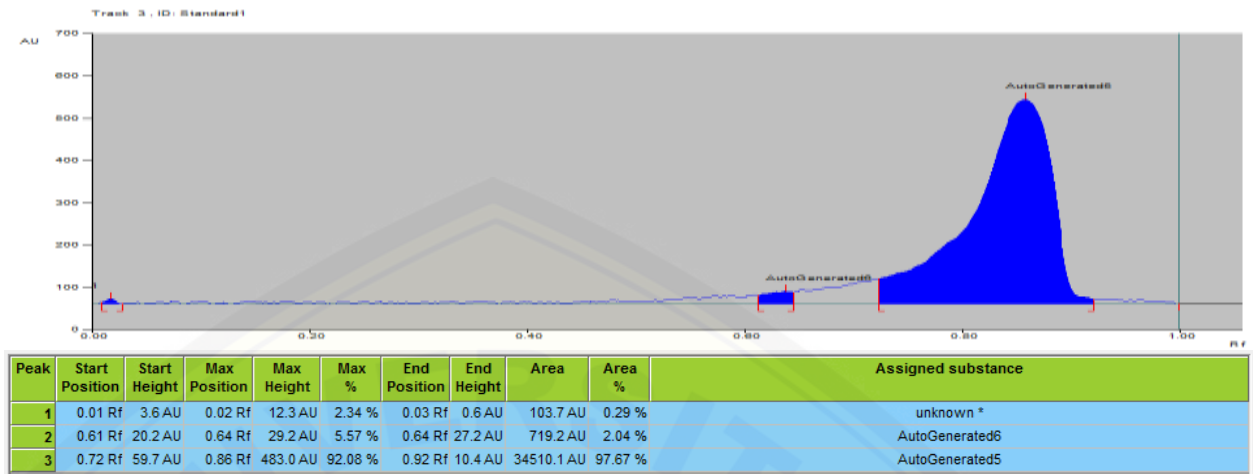
2) Densitogram dan Data (Pengulangan Kedua)



3) Densitogram dan Data (Pengulangan Ketiga)

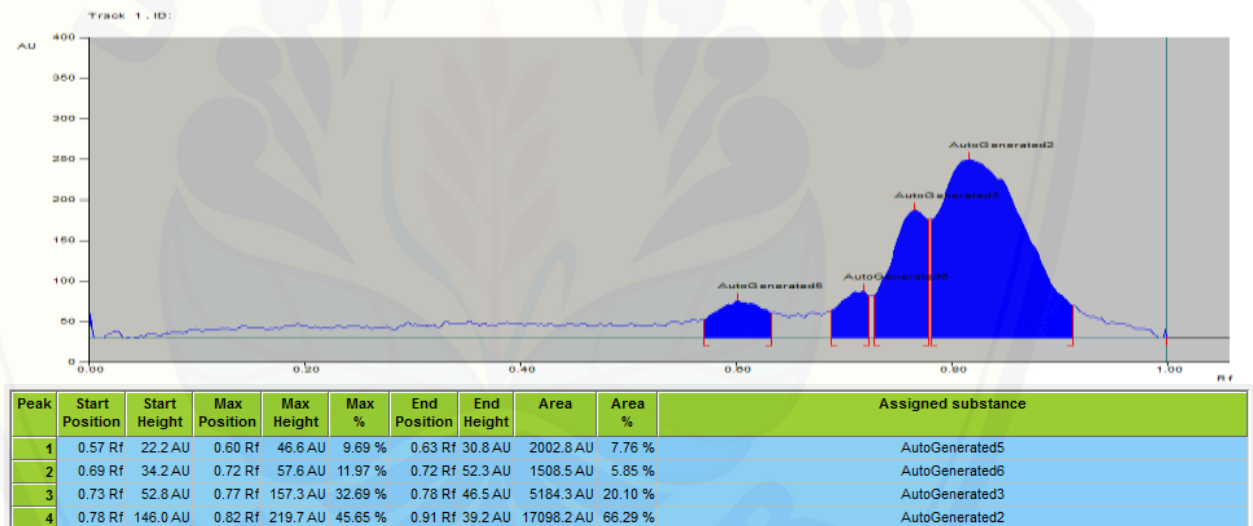


4) Densitogram dan Data (Standar)

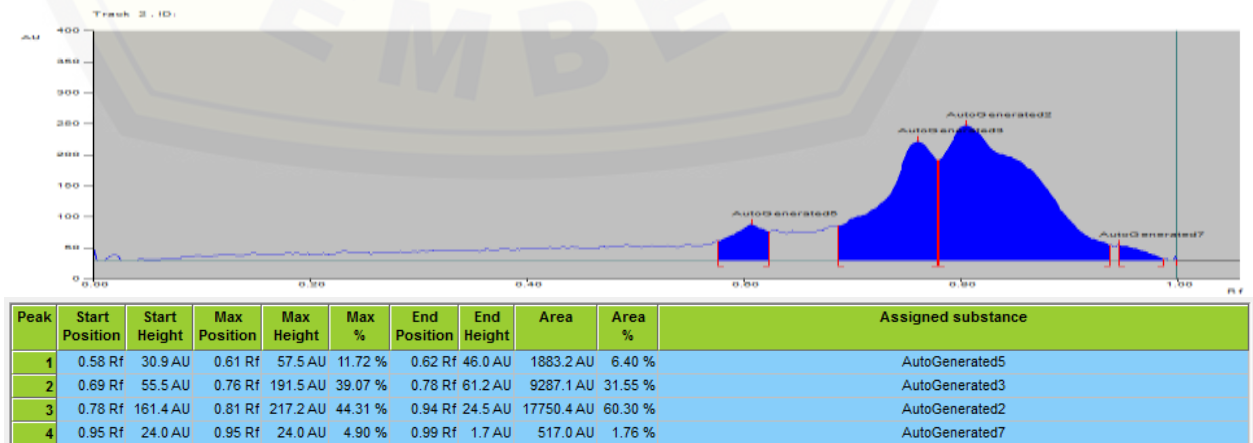


d. Komposisi Eluen Metanol-kloroform (3:2)

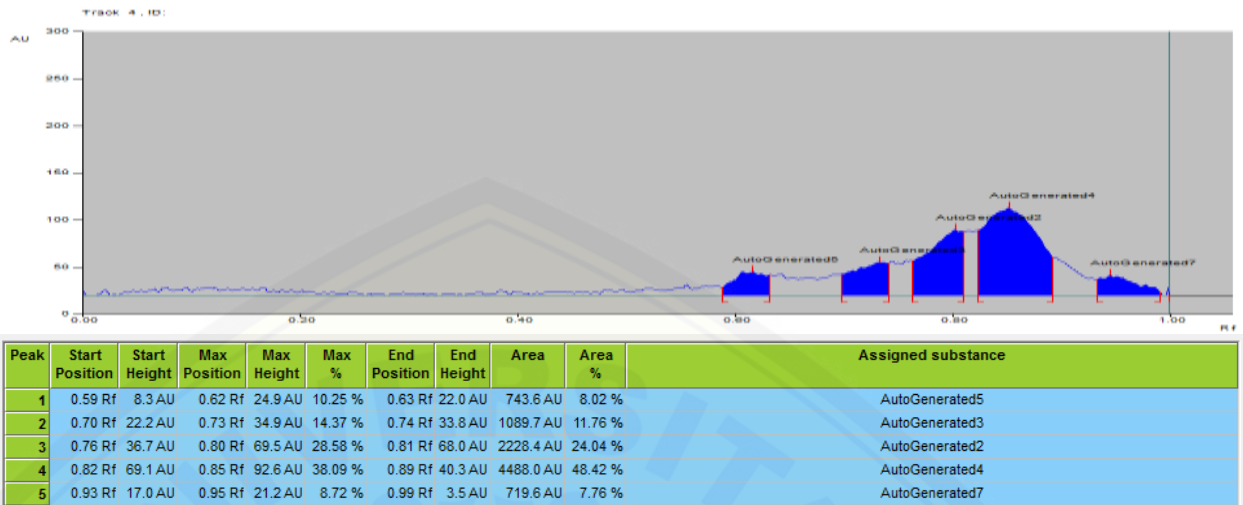
1) Densitogram dan Data (Pengulangan Pertama)



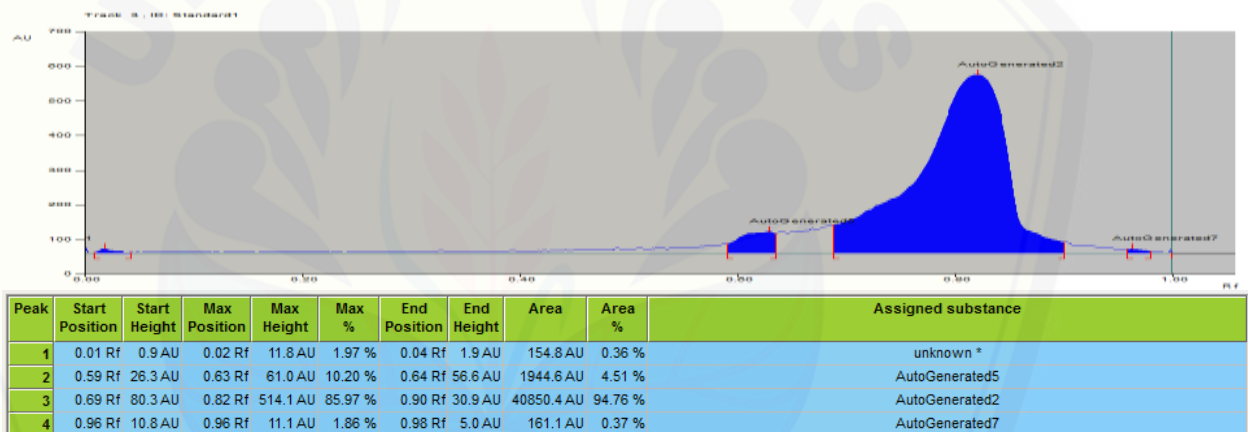
2) Densitogram dan Data (Pengulangan Kedua)



3) Densitogram dan Data (Pengulangan Ketiga)

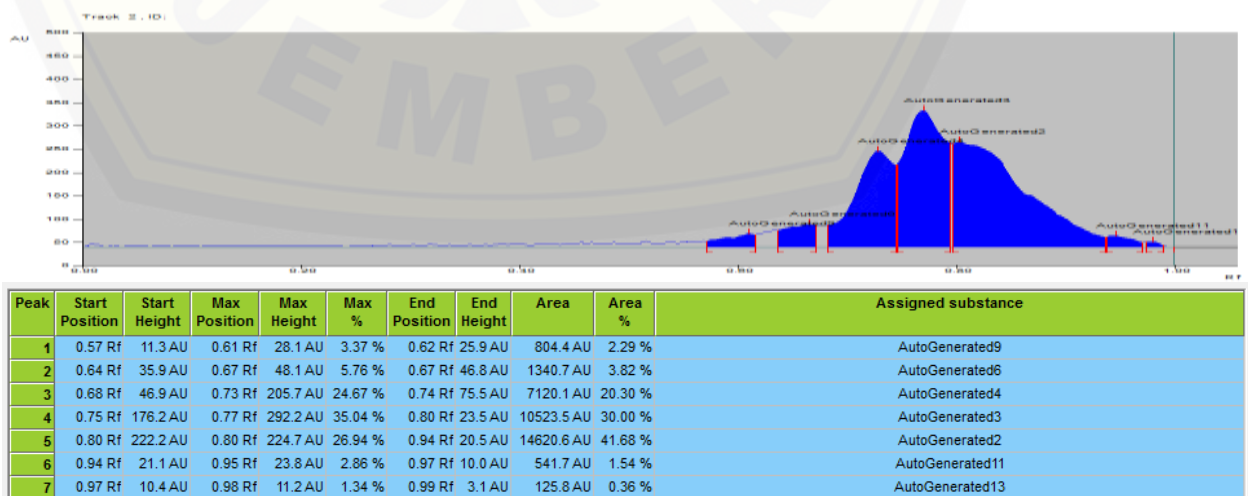


4) Densitogram dan Data (Standar)

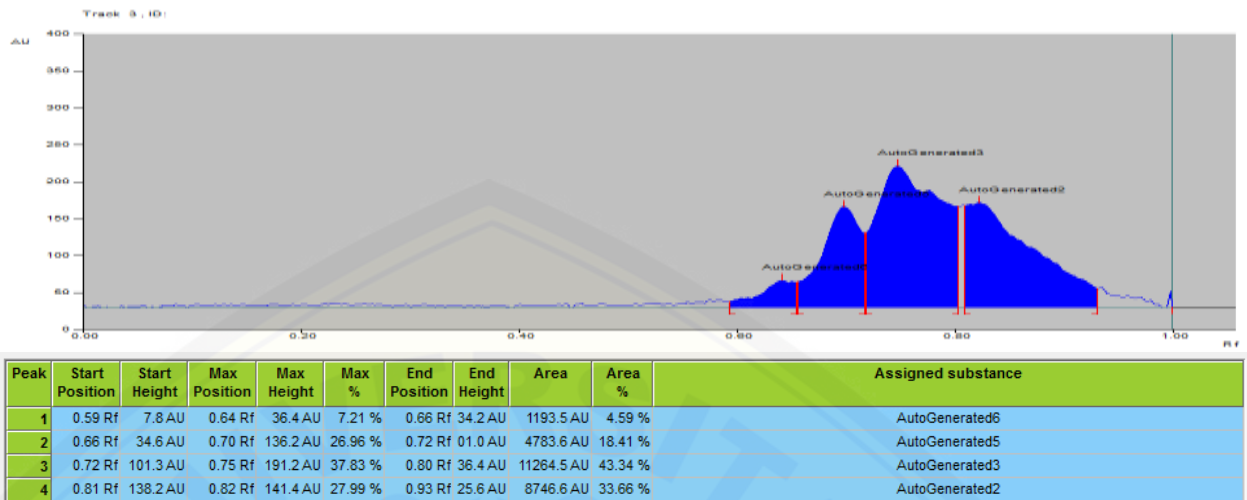


e. Komposisi Eluen Metanol-kloroform (4:1)

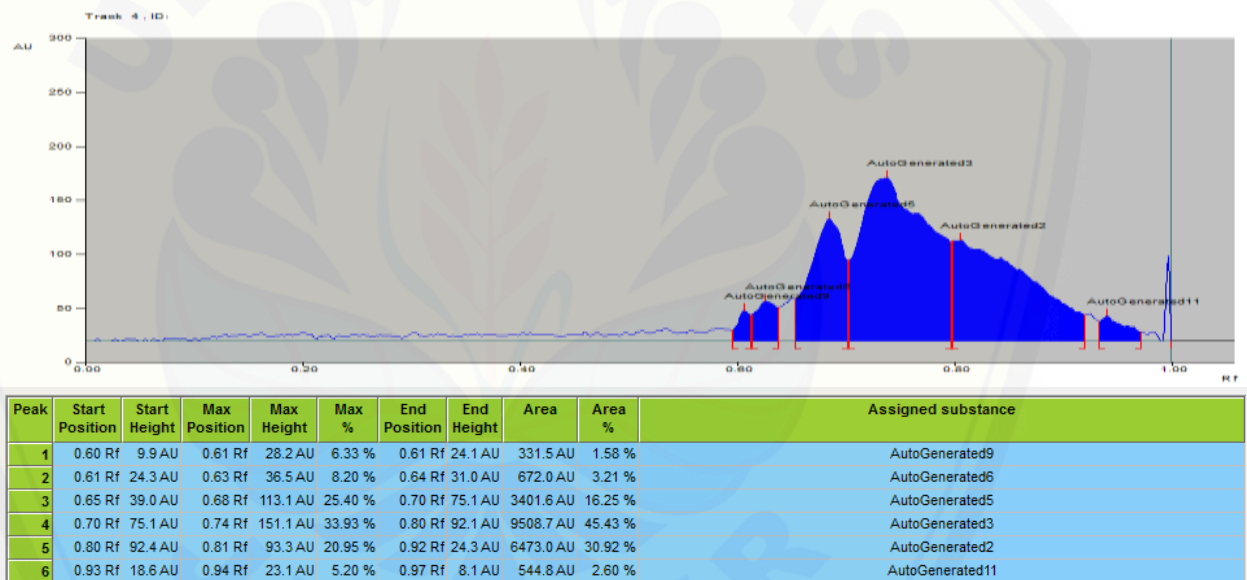
1) Densitogram dan Data (Pengulangan Pertama)



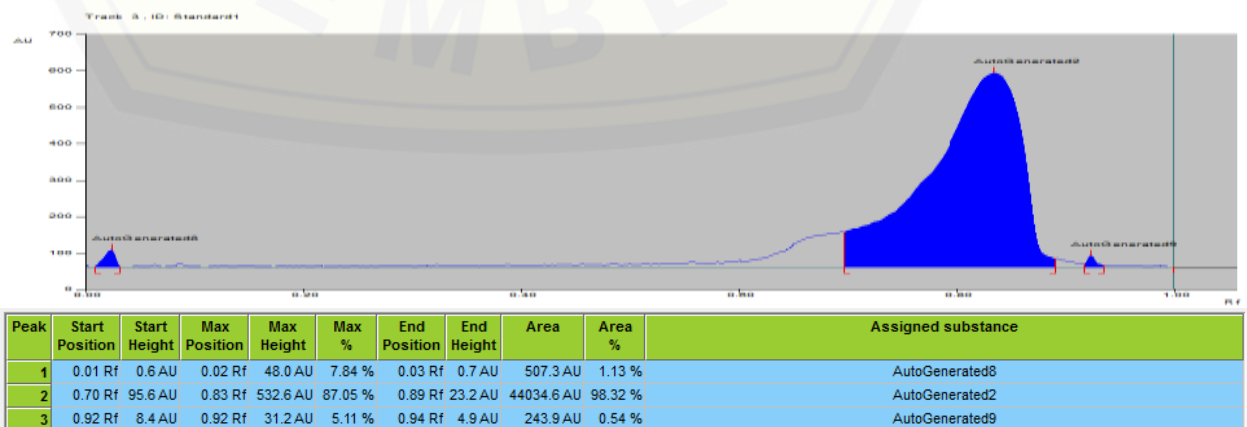
b) Densitogram dan Data (Pengulangan Kedua)



3) Densitogram dan Data (Pengulangan Ketiga)





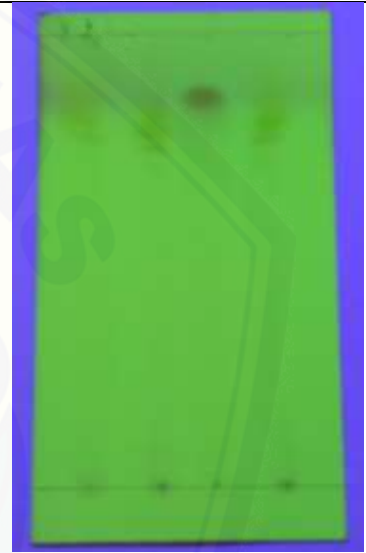


4) Densitogram dan Data (Standar)



4.3.2 Hasil Perhitungan Rf dan Standar Deviasi Noda pada KLT

Komposisi Eluen (Metanol:kloroform)	Rf Standar	Rf ₁	Rf ₂	Rf ₃	Rf rata- rata	Standar Deviasi	Jumlah peak
1:1	0.88	0.86	0.82	0.88	0.85	0.031	5
1:4	0.97	0.97	0.03	0.16	0.39	0.509	2
2:3	0.86	0.86	0.77	0.86	0.83	0.052	4
3:2	0.82	0.82	0.81	0.85	0.83	0.021	5
4:1*	0.83	0.80	0.82	0.81	0.81*	0.01*	7

4.3.3 Kromatogram Hasil Analisis Menggunakan KLT

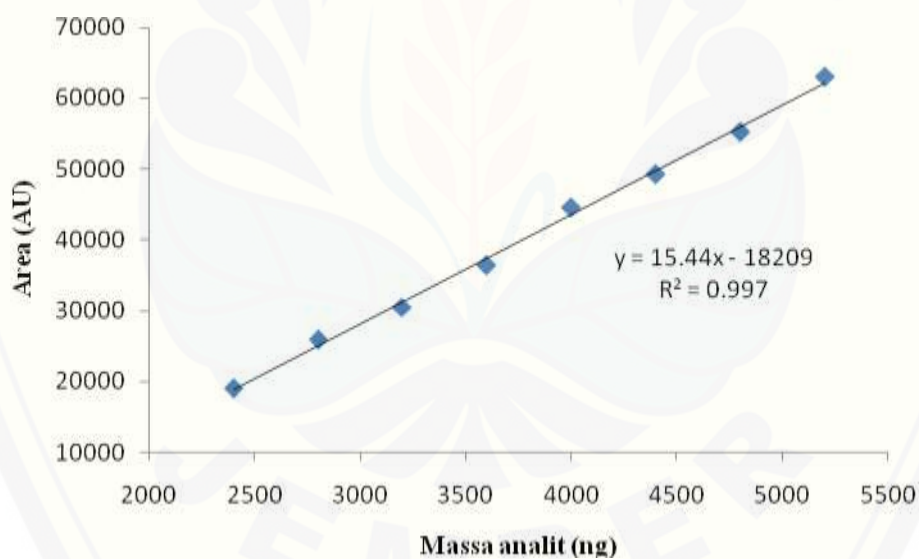
		
Metanol : Kloroform (1:1)	Metanol : Kloroform (1:4)	Metanol : Kloroform (2:3)
		
Metanol : Kloroform (3:2)	Metanol : Kloroform (4:1)	

Lampiran 4.4 Data Validasi Metode

4.4.1 Linieritas

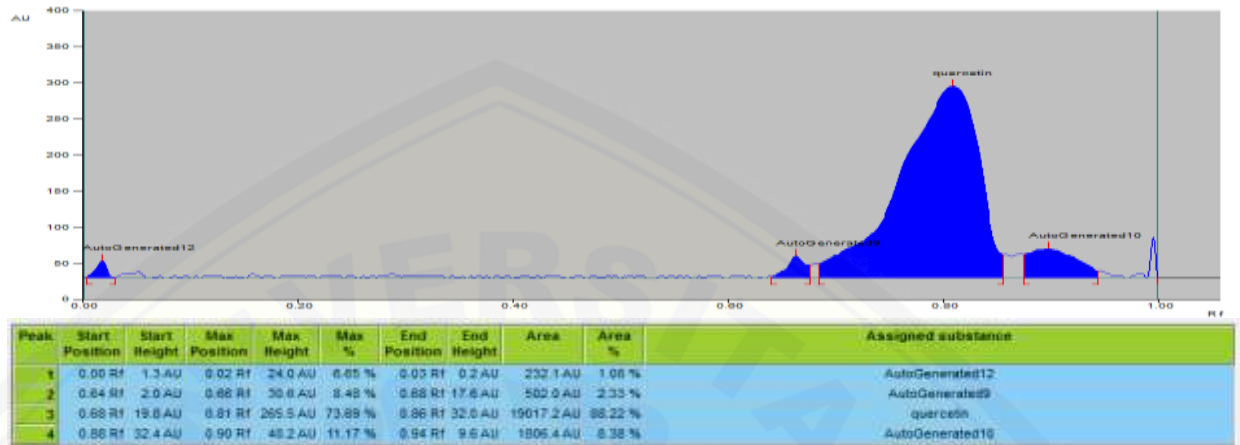
a. Hasil Pemindaian Densitometer Penentuan Daerah Linier pada Panjang Gelombang 369 nm

Konsentrasi Larutan Standar (ppm)	Rf	Massa (ng)	Area (AU)
60	0.81	2400	19010.1
70	0.80	2800	25227.2
80	0.80	3200	30493.1
90	0.82	3600	36411.3
100	0.82	4000	44549.8
110	0.81	4400	49257.1
120	0.81	4800	55202.5
130	0.82	5200	63023.6

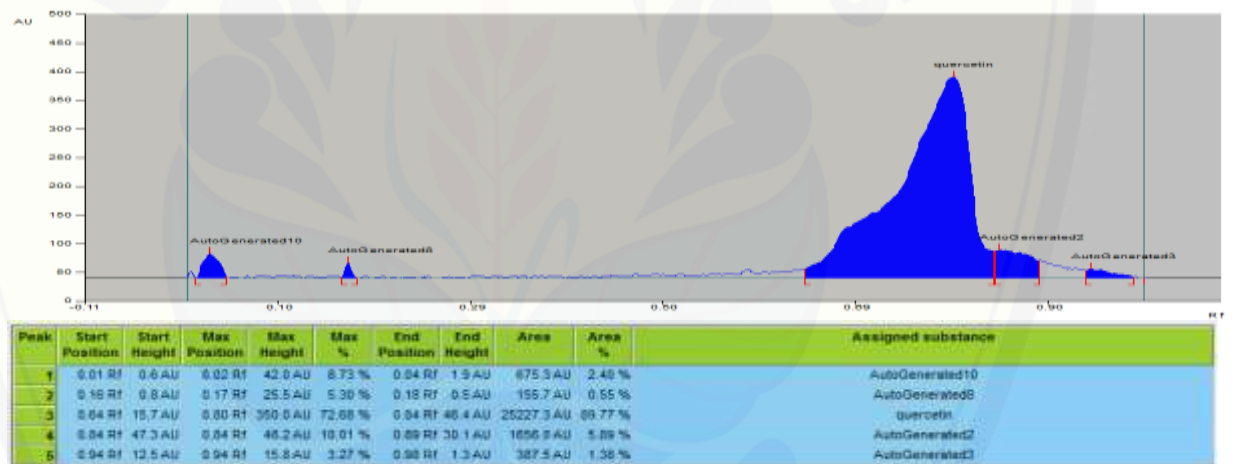


b. Densitogram dan Data Pemindaian dengan Densitometer pada Panjang Gelombang 369 nm

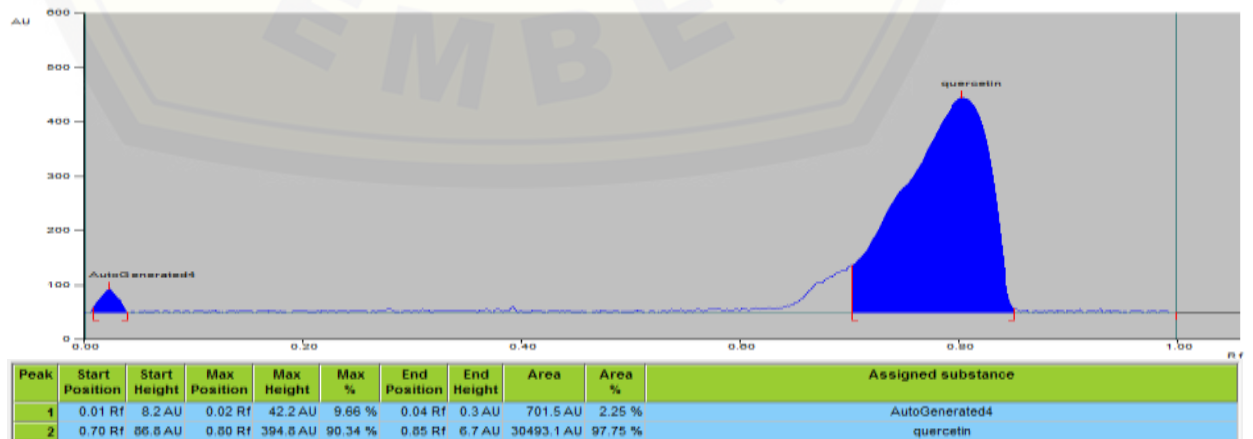
• **Track 3**



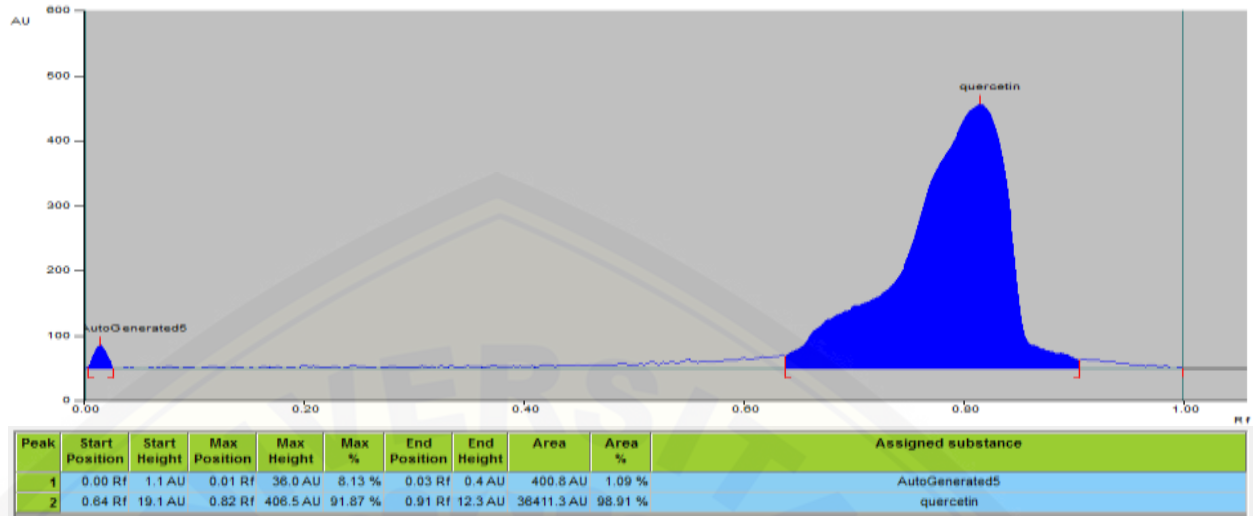
• **Track 4**



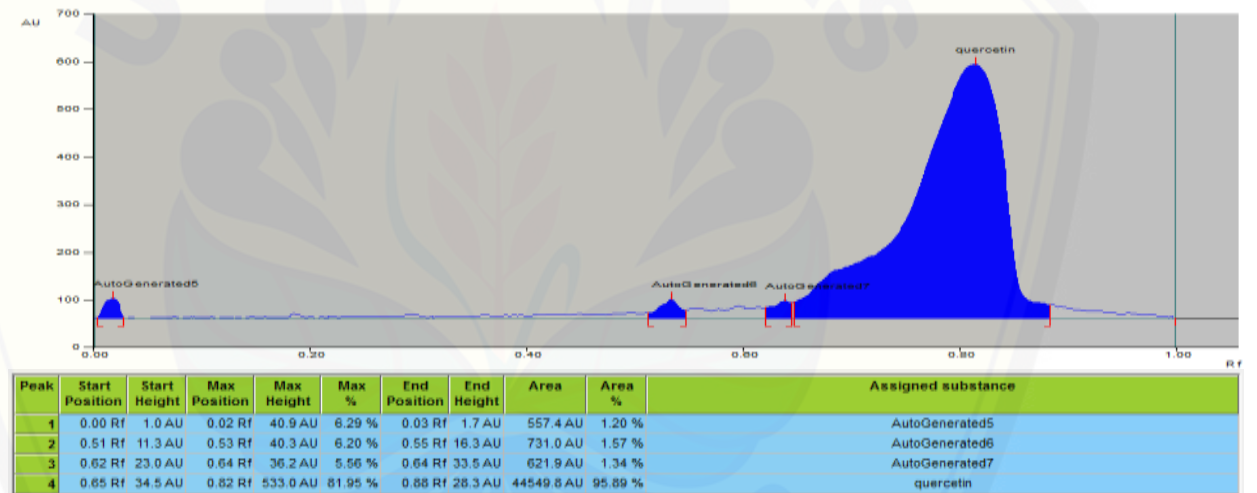
• **Track 5**



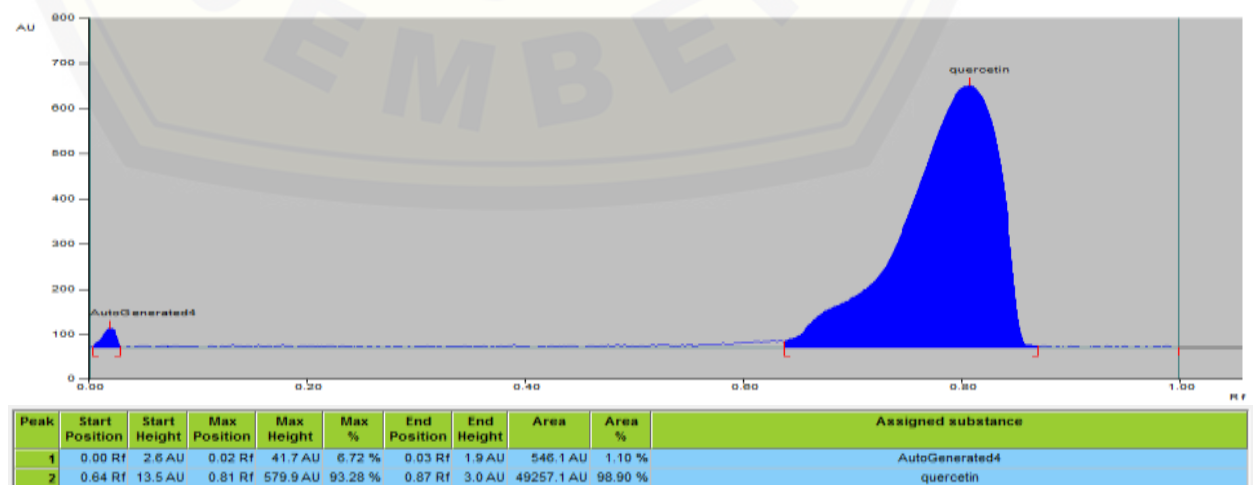
• Track 6



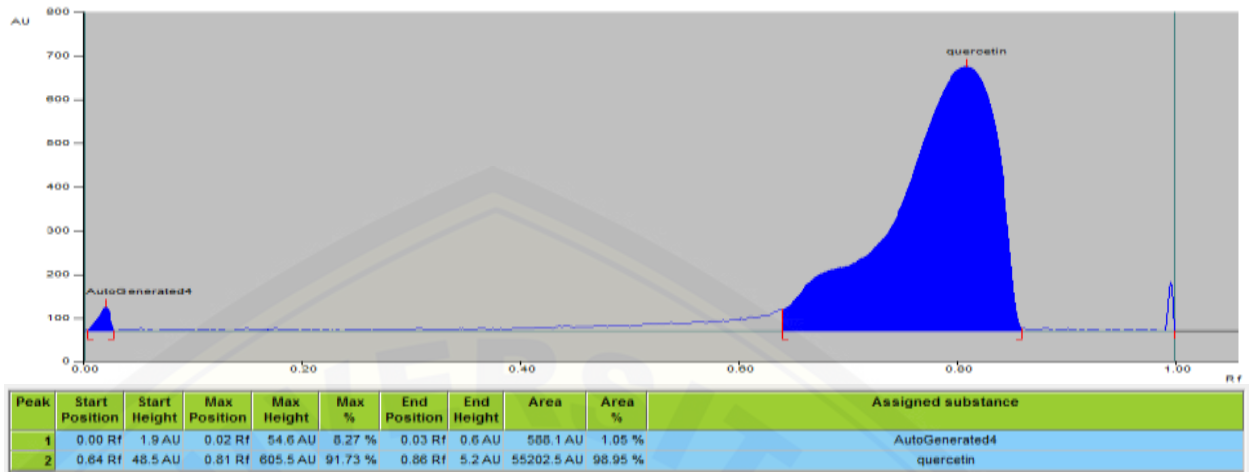
• Track 7



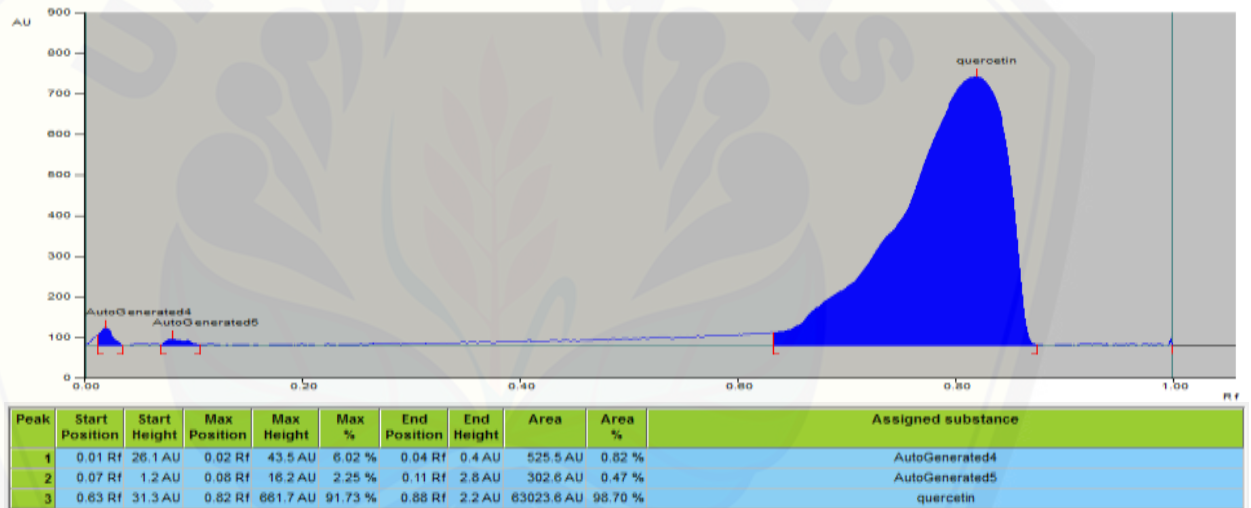
• Track 8



• Track 9



• Track 10



4.4.2 Batas Deteksi dan Batas Kuantitasi

No.	Massa analit (ng)	Area (AU)	Yi*	(Yi- Yi*) ²
1	2400	19010.1	18583	182414.41
2	2800	25227.2	24715	262348.84
3	3200	30493.1	30847	125245.21
4	3600	36411.3	36979	322283.29
5	4000	44549.8	43111	2070145.44
6	4400	49257.1	49243	198.81
7	4800	55202.5	55375	29756.25
8	5200	63023.6	61507	2300075.56
			Jumlah	5292467.81

Keterangan :

Massa analit (ng) = Konsentrasi analit standar $\frac{\text{ng}}{\mu\text{L}}$ \times volume penotolon (μL)

Y_i = Luas area yang dimasukkan ke dalam persamaan kurva kalibrasi

Y_i diperoleh dari persamaan regresi, misalnya untuk massa analit (x) = 2400 ng maka,

$$y = 15.44x - 18209 \rightarrow y = 15.44(2400) - 18209$$

$$y = 18583$$

$S_{\frac{y}{x}}$ = variasi variabel respon (y), diperoleh dari data - data yang dekat dengan garis regresi

$$S_{\frac{y}{x}} = \sqrt{\frac{\sum (Y_i - Y_i^*)^2}{N - 2}}$$

$$= \sqrt{\frac{5292467.81}{6}} = 939.19 \text{ AU}$$

$$\text{LOD} = \frac{3S_{\frac{y}{x}}}{b}$$

$$= \frac{3(939.19)}{15.44} = 182.49\text{ng}$$

$$\text{LOQ} = \frac{10S_{\frac{y}{x}}}{b}$$

$$= \frac{10(939.19)}{15.44} = 608.28\text{ng}$$

4.4.3 Keseksamaan (*Precision*)

- Data pemindaian dengan densitometer dan hasil perhitungan keseksamaan (presisi) larutan standar quersetin 80 ppm

Konsentrasi quercetin (ng)	Rf	Area (AU)	$x_i - \bar{x}$	$(x_i - \bar{x})^2$
3200	0.82	44805.5	-2665.1	7102758.0
3200	0.81	47417.9	-52.7	2777.3
3200	0.83	50439.8	2969.2	8816148.6
3200	0.81	50273.7	2803.1	7857369.6
3200	0.82	46354.8	-1115.8	1245009.6
3200	0.85	45531.9	-1938.7	3758557.7
Σ_{Area}		284823.6	$\Sigma(x_i - \bar{x})^2$	28782620.9

$$\bar{X} = \frac{284823.6}{6} = 47470.6$$

$$SD = \sqrt{\frac{\sum(x_i - \bar{x})^2}{n-1}} = \sqrt{\frac{28782620.9}{5}} = 2399.3$$

$$SBR = \sqrt{\frac{SD}{\bar{x}}} \times 100\% = \sqrt{\frac{2399.3}{47470.6}} \times 100\% = 5.1\%$$

$$\begin{aligned} \text{Nilai presisi sebenarnya} &= 100\% - \%SBR \\ &= 100\% - 5.1\% \\ &= 94.9\% \end{aligned}$$

$$\begin{aligned} \text{CV Horwitz (\%)} &= 0.67 \times 2^{1-0.5 \log C} \\ &= 0.67 \times 2^{1-0.5 \log 8E-05} \\ &= 5.5 \end{aligned}$$

Cv Hitung < Cv Horwitz

$$5.1 < 5.5$$

- Data pemindaian dengan densitometer dan hasil perhitungan keseksamaan (presisi) larutan standar quersetin 90 ppm

Konsentrasi quercetin (ng)	Rf	Area (AU)	$x_i - \bar{x}$	$(x_i - \bar{x})^2$
3600	0.82	44504.7	-396.2	156934.8
3600	0.82	44462.8	-438.1	191887.8
3600	0.81	47154.4	2253.6	5078487.6
3600	0.79	43470.0	-1430.9	2047331.7
3600	0.84	45367.8	467.0	218042.3
3600	0.81	44445.4	-455.5	207434.7
Σ_{Area}		269405.1	$\Sigma(x_i - \bar{x})^2$	7900119.0

$$\bar{X} = \frac{269405.1}{6} = 44900.9$$

$$SD = \sqrt{\frac{\sum(x_i - \bar{x})^2}{n-1}} = \sqrt{\frac{7900119.0}{5}} = 1257.0$$

$$SBR = \sqrt{\frac{SD}{\bar{x}}} \times 100\% = \sqrt{\frac{1257.0}{44900.9}} \times 100\% = 2.8\%$$

$$\begin{aligned} \text{Nilai presisi sebenarnya} &= 100\% - \%SBR \\ &= 100\% - 2.8\% \\ &= 97.2\% \end{aligned}$$

$$\begin{aligned} \text{CV Horwitz (\%)} &= 0.67 \times 2^{1-0.5\log C} \\ &= 0.67 \times 2^{1-0.5\log 9E-05} \\ &= 5.4 \end{aligned}$$

Cv Hitung < Cv Horwitz

$$2.8 < 5.4$$

- Data pemindaian dengan densitometer dan hasil perhitungan keseksamaan (presisi) larutan standar quersetin 100 ppm

Konsentrasi quercetin (ng)	Rf	Area (AU)	$x_i - \bar{x}$	$(x_i - \bar{x})^2$
4000	0.80	63654.1	242.2	58644.7
4000	0.79	60449.7	-2962.2	8774826.3
4000	0.81	63765.5	353.6	125009.4
4000	0.80	63013.0	-398.93	159147.8
4000	0.82	64738.3	1326.4	1759248.5
4000	0.82	64851.0	1439.1	2070912.9
Σ_{Area}		380471.6	$\Sigma(x_i - \bar{x})^2$	12947789.6

$$\bar{X} = \frac{380471.6}{6} = 63411.9$$

$$SD = \sqrt{\frac{\Sigma(x_i - \bar{x})^2}{n-1}} = \sqrt{\frac{12947789.6}{5}} = 1609.2$$

$$SBR = \sqrt{\frac{SD}{\bar{x}}} \times 100\% = \sqrt{\frac{1609.2}{63411.9}} \times 100\% = 2.5\%$$

$$\begin{aligned} \text{Nilai presisi sebenarnya} &= 100\% - \%SBR \\ &= 100\% - 2.5\% \\ &= 97.5\% \end{aligned}$$

$$\begin{aligned} \text{CV Horwitz (\%)} &= 0.67 \times 2^{1-0.5\log C} \\ &= 0.67 \times 2^{1-0.5\log 1E-04} \\ &= 5.4 \end{aligned}$$

Cv Hitung < Cv Horwitz

$$2.5 < 5.4$$

4.4.4 Kecermatan (*Accuracy*)

1. Larutan standar quersetin 80 ppm

a. Perhitungan massa quersetin 80 ppm yang ditambahkan ($m^* a$)

- Volume larutan standar yang ditambahkan = 2 mL
- Massa quersetin = $80 \frac{\text{ng}}{\mu\text{L}} \times 2000 \mu\text{L} = 160.000 \text{ ng}$

b. Data, densitogram dan perhitungan kadar volume sampel 1 yang ditambahkan = 2 mL

- Massa quersetin :
 $y = 15.44x - 18209$
 $36464.1 = 15.44x - 18209$
 $x = 3541.0 \text{ ng}$

- Konsentrasi quersetin :

$$\frac{3541.0 \text{ ng}}{40 \mu\text{L}} = 88.5 \text{ ng} / \mu\text{L}$$

- Massa quersetin yang didapatkan (m_a) :

$$88.5 \text{ ng} / \mu\text{L} \times 2000 \mu\text{L} = 177050.2 \text{ ng}$$

c. Data dan densitogram kadar + standar quersetin 80 ppm

- Volume total campuran = volume sampel 1 yang ditambahkan + volume larutan standar 80 ppm
 $= 2 \text{ mL} + 2 \text{ mL} = 4 \text{ mL}$

- Massa quersetin :
 $y = 15.44x - 18209$
 $34680.9 = 15.44x - 18209$
 $x = 3425.5 \text{ ng}$

- Konsentrasi quersetin :

$$\frac{3425.5 \text{ ng}}{40 \mu\text{L}} = 85.6 \text{ ng} / \mu\text{L}$$

- Massa total flavonoid dalam sampel + standar (mf) :

$$85.6 \frac{\text{ng}}{\mu\text{L}} \times 4000 \mu\text{L} = 342551.2 \text{ ng}$$

- d. Perhitungan perolehan kembali

$$\begin{aligned} \% \text{ Perolehan kembali} &= \frac{mf - m_a}{m_a^*} \times 100\% \\ &= \frac{342551.2 - 177050.2}{160000} \times 100\% = 103.44 \% \end{aligned}$$

2. Larutan standar quersetin 90 ppm

- a. Perhitungan massa quersetin 90 ppm yang ditambahkan (m_a^*)

- Volume larutan standar yang ditambahkan = 2 mL
- Massa quersetin = $90 \frac{\text{ng}}{\mu\text{L}} \times 2000 \mu\text{L} = 180.000 \text{ ng}$

- b. Data, densitogram dan perhitungan kadar volume sampel 1 yang ditambahkan = 2 mL

- Massa quersetin :

$$y = 15.44x - 18209$$

$$13837 = 15.44x - 18209$$

$$x = 2075.52 \text{ ng}$$

- Konsentrasi quersetin :

$$\frac{2075.52 \text{ ng}}{40 \mu\text{L}} = 51.9 \frac{\text{ng}}{\mu\text{L}}$$

- Massa quersetin yang didapatkan (m_a) :

$$51.9 \frac{\text{ng}}{\mu\text{L}} \times 2000 \mu\text{L} = 103775.9 \text{ ng}$$

- c. Data dan densitogram kadar + standar quersetin 90 ppm

- Volume total campuran = volume sampel 1 yang ditambahkan + volume larutan standar 90 ppm
= 2 mL + 2 mL = 4 mL

- Massa quersetin :

$$y = 15.44x - 18209$$

$$22312.6 = 15.44x - 18209$$

$$x = 2624.5 \text{ ng}$$

- Konsentrasi quersetin :

$$\frac{2624.5 \text{ ng}}{40 \mu\text{L}} = 65.6 \text{ ng}/\mu\text{L}$$

- Massa total flavonoid dalam sampel + standar (mf) :

$$65.6 \text{ ng}/\mu\text{L} \times 4000 \mu\text{L} = 262445.6 \text{ ng}$$

d. Perhitungan perolehan kembali

$$\begin{aligned} \% \text{ Perolehan kembali} &= \frac{mf - ma}{m_a^*} \times 100\% \\ &= \frac{262445.6 - 103775.9}{180000} \times 100\% = 88.15\% \end{aligned}$$

3. Larutan standar quersetin 100 ppm

a. Perhitungan massa quersetin 100 ppm yang ditambahkan ($m^* a$)

- Volume larutan standar yang ditambahkan = 2 mL
- Massa quersetin = $100 \frac{\text{ng}}{\mu\text{L}} \times 2000 \mu\text{L} = 200.000 \text{ ng}$

b. Data, densitogram dan perhitungan kadar volume sampel 1 yang ditambahkan = 2 mL

- Massa quersetin :

$$y = 15.44x - 18209$$

$$11759.5 = 15.44x - 18209$$

$$x = 1940.96 \text{ ng}$$

- Konsentrasi quersetin :

$$\frac{1940.96 \text{ ng}}{40 \mu\text{L}} = 48.5 \text{ ng}/\mu\text{L}$$

- Massa quersetin yang didapatkan (ma) :

$$48.5 \text{ ng}/\mu\text{L} \times 2000 \mu\text{L} = 97048.3 \text{ ng}$$

c. Data dan densitogram kadar + standar quersetin 100 ppm

- Volume total campuran = volume sampel 1 yang ditambahkan + volume larutan standar 100 ppm

$$= 2 \text{ mL} + 2 \text{ mL} = 4 \text{ mL}$$

- Massa quersetin :

$$y = 15.44x - 18209$$

$$27104.3 = 15.44x - 18209$$

$$x = 2934.8 \text{ ng}$$

- Konsentrasi quersetin :

$$\frac{2934.8 \text{ ng}}{40 \mu\text{L}} = 73.4 \text{ ng}/\mu\text{L}$$

- Massa total flavonoid dalam sampel + standar (mf) :

$$73.4 \text{ ng}/\mu\text{L} \times 4000 \mu\text{L} = 293479.9 \text{ ng}$$

d. Perhitungan perolehan kembali

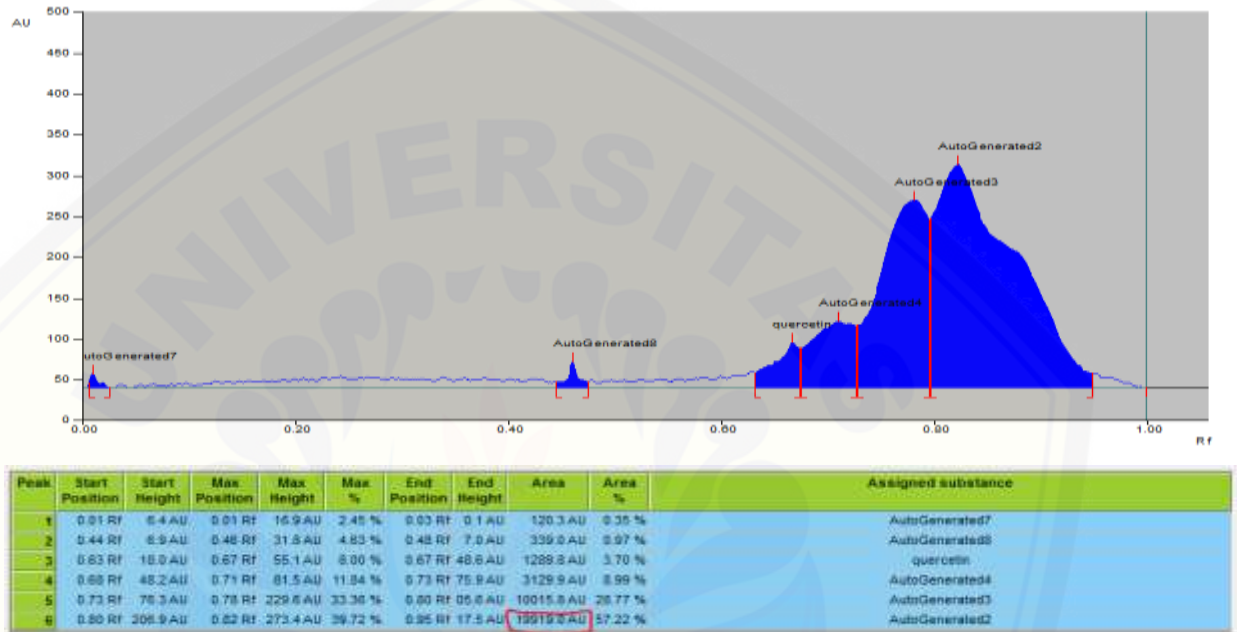
$$\begin{aligned} \% \text{ Perolehan kembali} &= \frac{m_f - m_a}{m_a^*} \times 100\% \\ &= \frac{293479.9 - 97048.3}{200000} \times 100\% = 98.22\% \end{aligned}$$

Ulangan Ke-	Konsentrasi Kuersetin	m_f (ng)	m_a (ng)	m_a^* (ng)	Recovery
1	80 ppm	342551.17	177050.19	160000	103.44±1.78236
2		328384.07	167741.26	160000	100.40±1.78236
3		335262.31	169602.66	160000	103.54±1.78236
Rata-rata		335399.18	171464.70	160000	102.46±1.78236
1	90 ppm	262445.59	103775.91	180000	88.15±1.74005
2		257092.62	103712.11	180000	85.21±1.74005
3		246390.54	93272.02	180000	85.07±1.74005
Rata-rata		255309.59	100253.34	180000	86.14±1.74005
1	100 ppm	293479.92	117005.51	200000	88.24±1.44224
2		290132.12	109027.53	200000	90.55±1.44224
3		278818.00	97048.25	200000	90.88±1.44224
Rata-rata		287476.68	97048.25	200000	89.89±1.44224

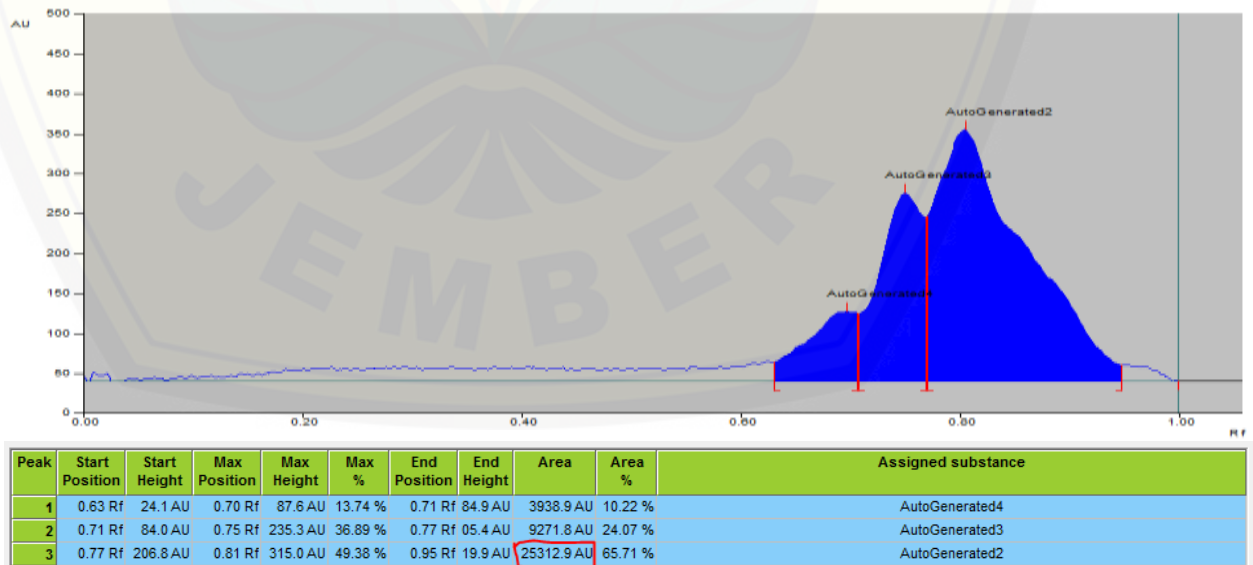
Lampiran 4.5 Data Penentuan Kadar Flavonoid pada Daun Benalu Kopi

4.5.1 Densitogram dan Data Pemindaian dengan Densitometer pada Panjang Gelombang 369 nm

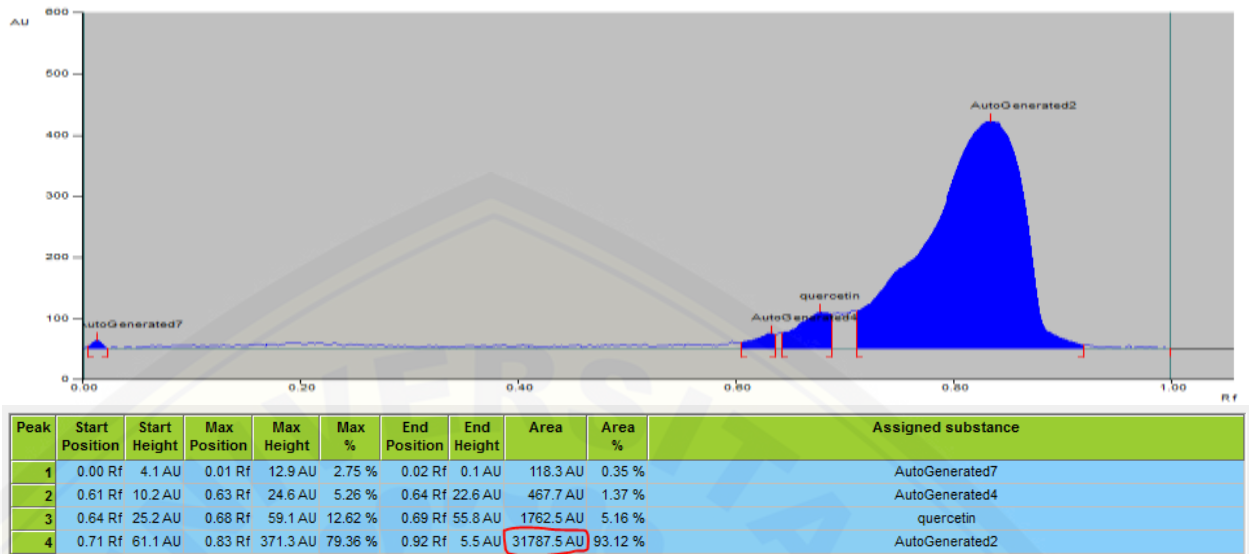
a. Pengulangan 1



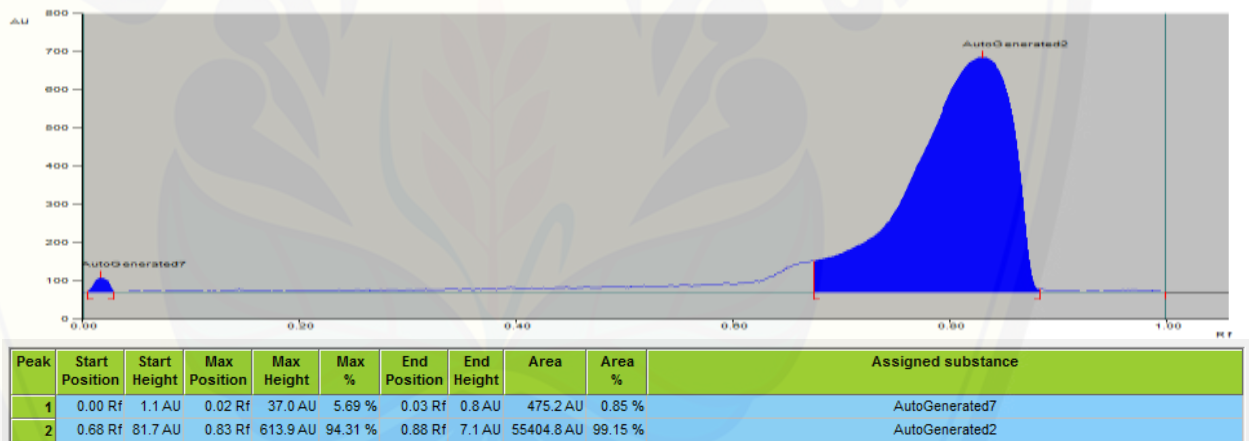
b. Pengulangan 2



c. Pengulangan 3



d. Larutan Standar



4.5.2 Data Perhitungan Kadar Flavonoid

Pengulangan	Max position (Rf)	Area (AU)	Rata-rata luas area (AU)	Massa flavonoid yang didapatkan (ng)	Kadar flavonoid (mg/g)
1	0.82	19919.0	25673.13	28421.07	$1.421 \times 10^{-2} \pm 0.0007$
	0.81	25312.9			
	0.83	31787.5			
2	0.82	24843.8	22779.73	26547.11	$1.327 \times 10^{-2} \pm 0.0007$
	0.84	20677.4			
	0.83	22818.0			
3	0.84	23195.3	26951.83	29249.24	$1.462 \times 10^{-2} \pm 0.0007$
	0.84	21128.9			
	0.84	36531.3			

$$y = 15.44x - 18209$$

1. Pengulangan 1

- Massa flavonoid hasil pengukuran

$$x = \left(\frac{y - a}{b} \right) \times \text{FP}$$

$$x = \left(\frac{25673.13 + 18209}{15.44} \right) \times 10 \text{ kali}$$

$$x = 28421.07 \text{ ng}$$

- Kadar flavonoid

$$\frac{\text{massa flavonoid}}{\text{sampel}} = \frac{28421.07 \text{ ng}}{2 \text{ g}} = \frac{28421.07 \times 10^{-6} \text{ mg}}{2 \text{ g}} = 0.01421 \text{ mg/g}$$

2. Pengulangan 2

- Massa flavonoid hasil pengukuran

$$x = \left(\frac{y - a}{b} \right) \times \text{FP}$$

$$x = \left(\frac{22779.73 + 18209}{15.44} \right) \times 10 \text{ kali}$$

$$x = 26547.11 \text{ ng}$$

- Kadar flavonoid

$$\frac{\text{massa flavonoid}}{\text{sampel}} = \frac{26547.11 \text{ ng}}{2 \text{ g}} = \frac{26547.11 \times 10^{-6} \text{ mg}}{2 \text{ g}} = 0.01327 \text{ mg/g}$$

3. Pengulangan 3

- Massa flavonoid hasil pengukuran

$$x = \left(\frac{y - a}{b} \right) \times \text{FP}$$

$$x = \left(\frac{26951.83 + 18209}{15.44} \right) \times 10 \text{ kali}$$

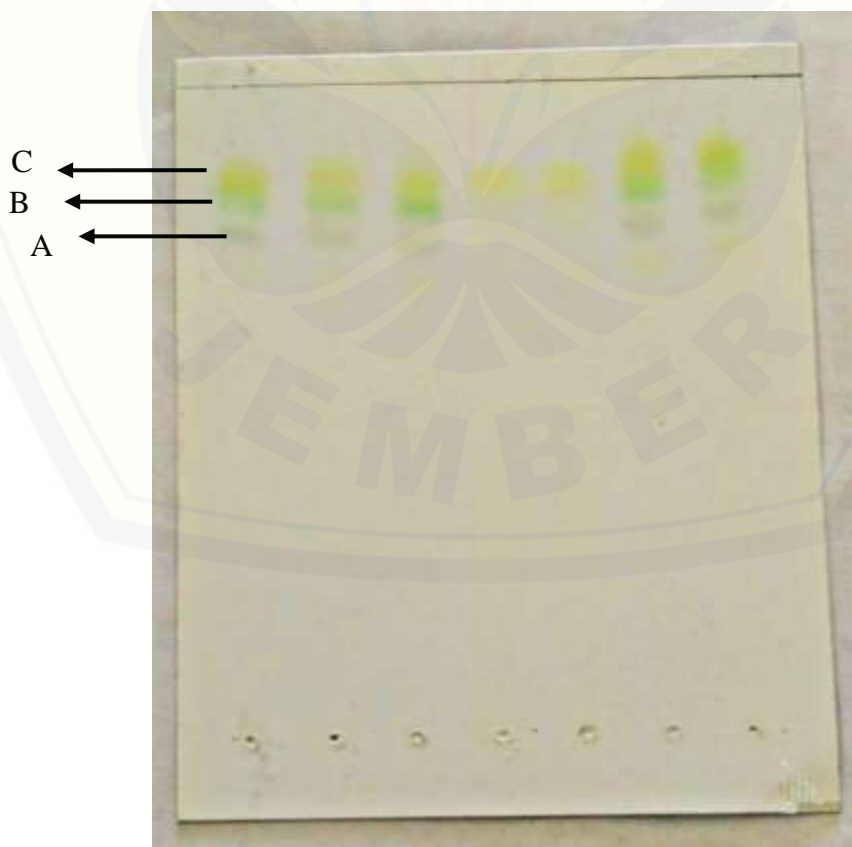
$$x = 29249.24 \text{ ng}$$

- Kadar flavonoid

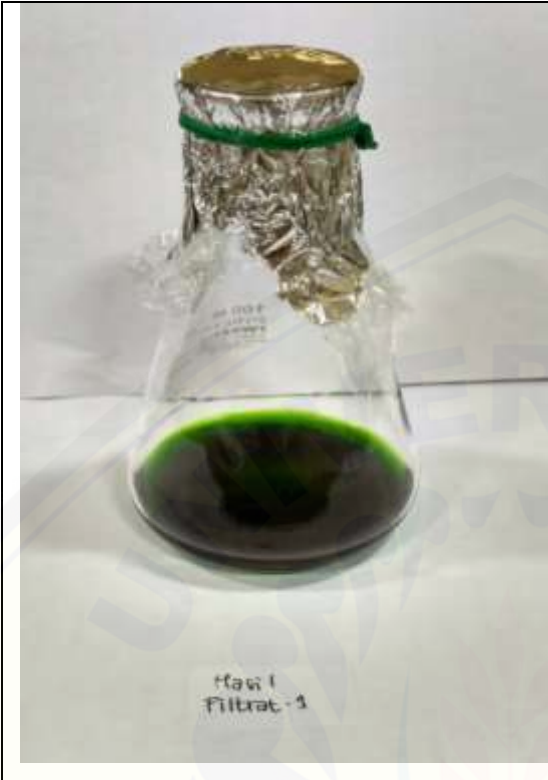
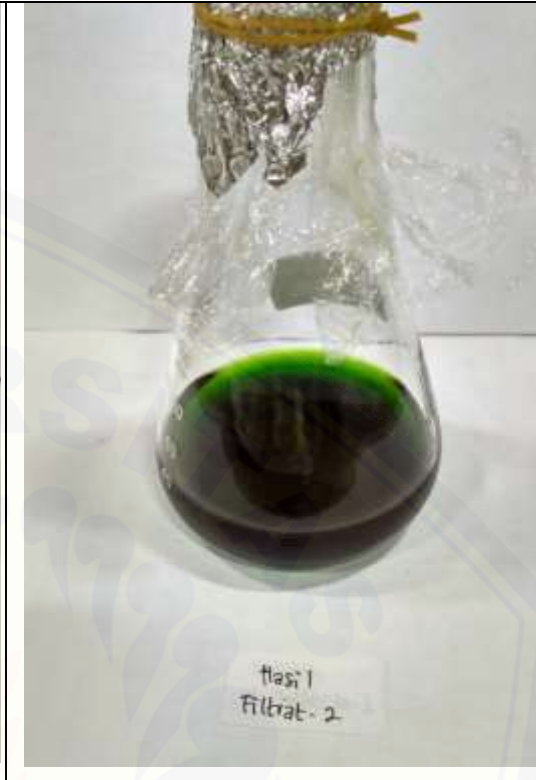

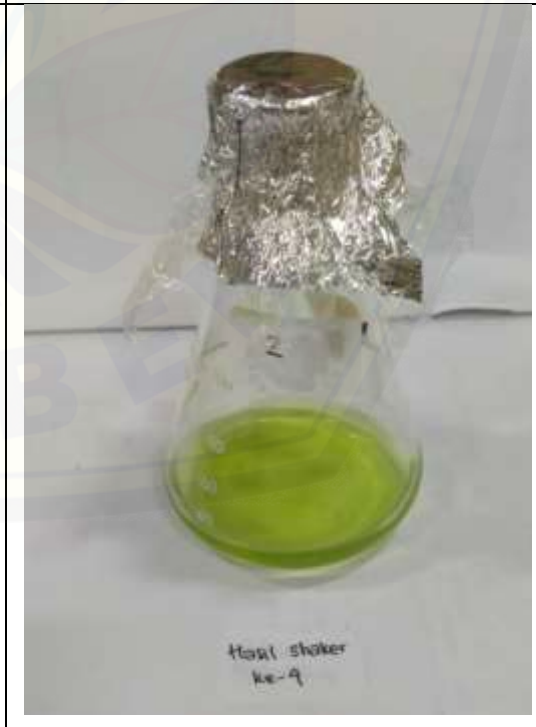
$$\frac{\text{massa flavonoid}}{\text{sampel}} = \frac{29249.24 \text{ ng}}{2 \text{ g}} = \frac{29249.24 \times 10^{-6} \text{ mg}}{2 \text{ g}} = 0.01462 \text{ mg/g}$$

Lampiran 4.6 Data Penentuan Nilai Faktor Retardasi (Rf) Hasil Uji Kualitatif Menggunakan Reagen Semprot AlCl_3 5% pada Noda Hasil KLT



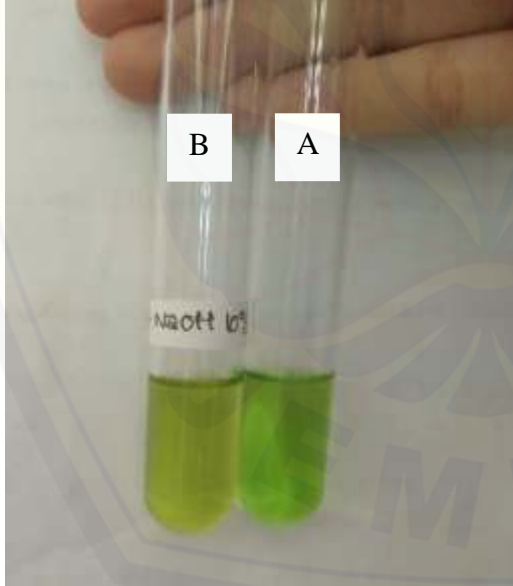
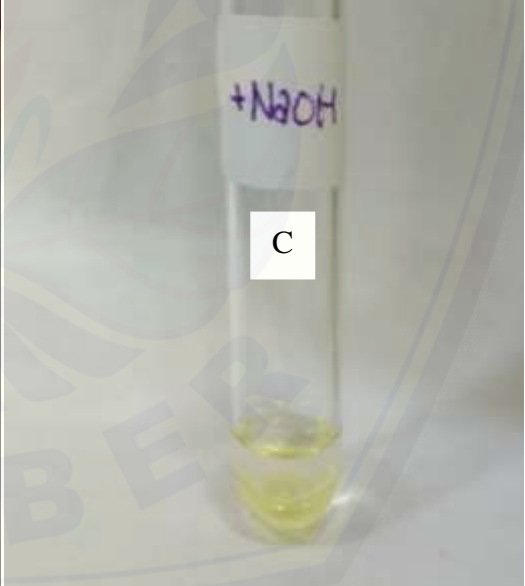
Pengulangan	Posisi Spot	Rf	+ AlCl_3 5%	Hasil (dugaan)
1	A	0.75	Hijau	- flavonoid
	B	0.81	Hijau	- flavonoid
	C	0.84	Kuning	+ flavonoid
2	A	0.73	Hijau	- flavonoid
	B	0.78	Hijau	- flavonoid
	C	0.84	Kuning	+ flavonoid
3	A	0.71	Hijau	- flavonoid
	B	0.73	Hijau	- flavonoid
	C	0.84	Kuning	+ flavonoid

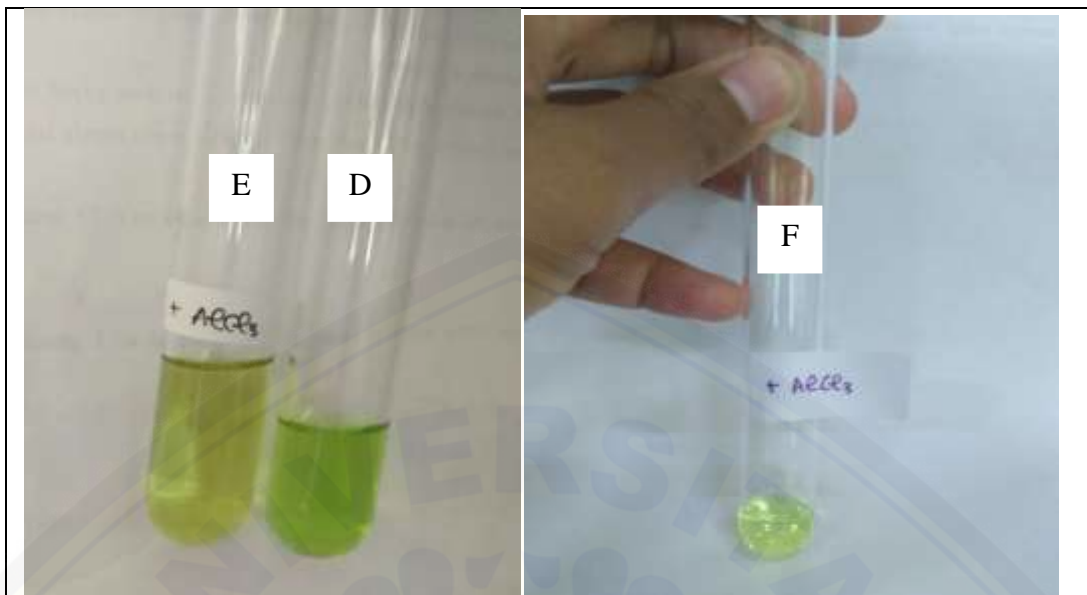


Lampiran 4.7 Gambar Hasil Ekstraksi

 <p>flasi 1 Filtrat-1</p>	 <p>flasi 1 Filtrat-2</p>
<p>Hasil ekstraksi hari-1</p>	<p>Hasil ekstraksi hari-2</p>
 <p>1 Hasil shaker ke-3</p>	 <p>2 Hasil shaker ke-4</p>
<p>Hasil ekstraksi hari-3</p>	<p>Hasil ekstraksi hari-4</p>

Lampiran 4.8 Gambar Uji Kualitatif

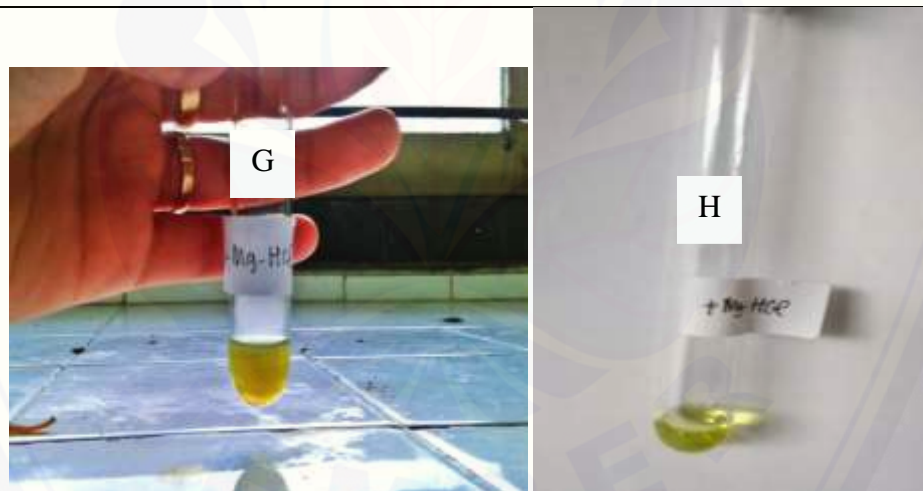
	
Sampel tanpa penambahan reagen	Larutan standar flavonoid (kuersetin) tanpa penambahan reagen
	
a = sampel tanpa penambahan reagen b = sampel setelah ditambah NaOH 10% c = larutan standar (kuersetin) setelah ditambah NaOH 10%	



d = sampel tanpa penambahan reagen

e = sampel setelah ditambah NaOH 10%

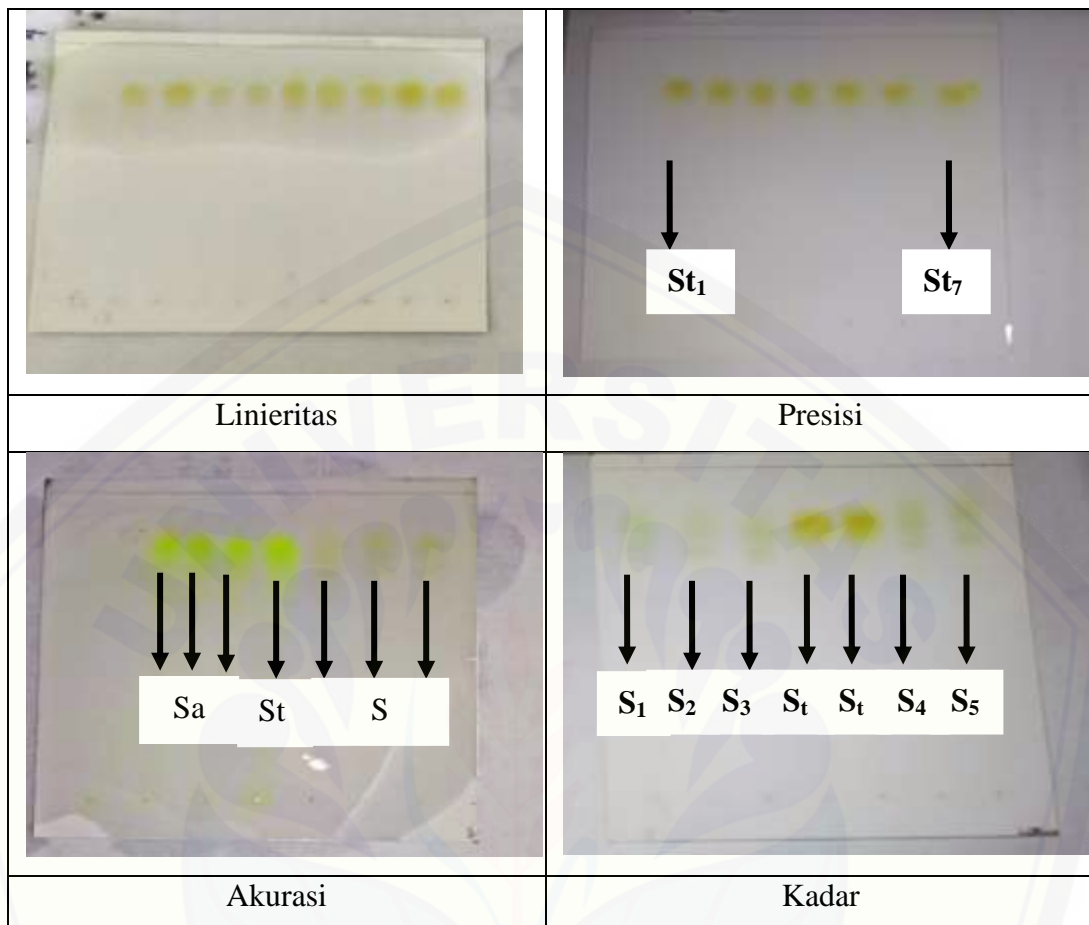
f = larutan standar (kuersetin) setelah ditambah NaOH 10%



G = sampel setelah ditambah Mg-HCl

H = larutan standar (kuersetin) setelah ditambah Mg-HCl

Lampiran 4.9 Gambar Kromatogram Validasi Metode dan Penentuan Kadar



Keterangan :

St : Standar kuersetin

S : Sampel

Sa: Standar kuersetin + sampel