

BAB II TINJAUAN PUSTAKA

A. Tanaman Nyamplung (*Calophyllum inophyllum* L)

1. Taksonomi Nyamplung (*Calophyllum inophyllum* L)

Menurut (Dweck, *et al* 2002) sistem klasifikasi tanaman nyamplung adalah sebagai berikut :

Kingdom	: <i>Plantae</i>
Sub Kingdom	: <i>Trachebronta</i>
Super Divisi	: <i>Spermatophyta</i>
Divisi	: <i>Magnoliophytta</i>
Kelas	: <i>Magnoliopsida</i>
Sub Kelas	: <i>Dillensidae</i>
Ordo/Bangsa	: <i>Theales</i>
Famili/Suku	: <i>Clusiaceae</i>
Genus/Marga	: <i>Calophyllium</i>
Spesies/Jenis	: <i>Calophyllium inophyllum</i> .L

2. Nama Lain

Nama Daerah :Nyamplung (Jawa, Sunda, Makassar) ; Samplong atau Camplong (Madura) ; Punaga (Minangkabau) ; Kanaga (Dayak atau Panaga) ; Punaga (Bali) ; Mantau (Bima) ; Pantar (Alor) ; Fitako (Ternate) (Hermita, 2015)

3. Morfologi

Calophyllum inophyllum L merupakan jenis pohon yang tidak mengenal musim (selalu hijau sepanjang tahun) yang masuk dalam keluarga *Clusiaciae* dan dapat tumbuh hingga mencapai ketinggian 8 – 20 meter (Ha, *et al* 2009).

Tumbuhan ini memiliki batang bulat yang berkayu berwarna coklat hingga putih kotor (Yunitasari, 2008). Batang pohon ini akan mengeluarkan semacam getah berwarna putih, ketika permukaannya disayat (Ha, *et al* 2009). Daunnya berwarna hijau dengan susunan karakteristik bersilang berhadapan bentuk bulat telur memanjang, bertepi rata dan memiliki tulang daun menyirip (Ling, *et al* 2009)

Bunga tumbuhan ini tergolong dalam bunga majemuk yang berbentuk tandan dan tumbuh diketiak daun dengan diameter 2 - 3 cm dan berbau harum (Yunitasari, 2008), sedangkan buahnya berbentuk bulat telur dengan sedikit lancip dibagian depannya berwarna hijau saat muda dan coklat saat tua (Ha, *et al* 2009).



Gambar 1. Tanaman Nyamplung

Dikutip dari: Pusat Penelitian dan Pengembangan Hasil Hutan (2008)

4. Kandungan Senyawa Kimia Daun Nyamplung

Kandungan kimia pada daun nyamplung secara garis besar dapat dikelompokkan menjadi empat kelompok derivat senyawa yang terdiri dari beberapa macam senyawa di dalamnya, yaitu : Derivat Xanthone yang terdiri dari : *2-hydroxyxanthone*, *4-hydroxyxanthone*, *1,5-hydroxyxanthone*, dan *i,7-hydroxyxanthone* (Kumar, *et al* 2017). Derivat Triterpenoid berupa : *Fridelin*, *squalene*, *canophyllic acid*, dan *canophyllol* (Ha, MH *et al* 2009). Derivat flavonoid : *Amentoflavone* dan *quercetin-3-O-a-L-rhamnosida* (Lim, *et al* 2012) dan yang terakhir adalah derivat kumarin terdiri dari : *(-)-12-methoxynophyllum A*, *(+)-12-methoxynophyllum H-1*, *(-)-12-methoxinophyllum H-2* (Li, *et al* 2016)

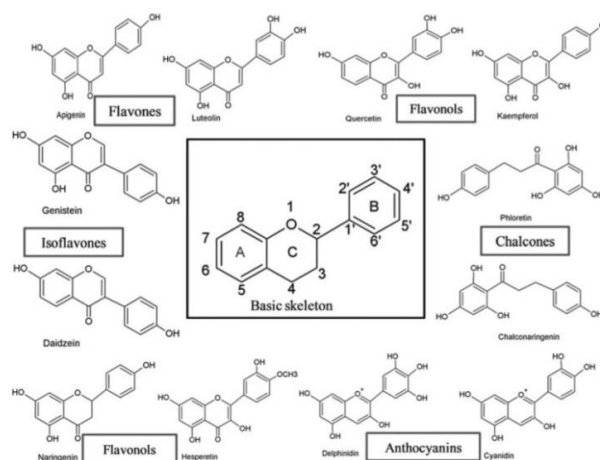
B. Senyawa Flavonoid

Senyawa flavonoid yang paling besar di alam. Senyawa ini merupakan senyawa pemberi zat warna pada tanaman (bunga, buah, dan daun) sehingga bagian – bagian tanaman dapat memiliki berbagai jenis warna seperti : merah, ungu, biru dan kuning (Ekawati, 2017).

Penemuan flavonoid terjadi pada tahun 1936 oleh Albert Szent-Gyorgi, salah seorang peneliti dari Hungaria yang sedang berusaha mengungkap sinergi antara vitamin C murni dan sebuah kofaktor yang belum teridentifikasi yang berasal dari kulit lemon. Kofaktor tersebut awalnya diidentifikasi sebagai “*citrin*” dan selanjutnya dimasukkan ke dalam golongan “vitamin P” (Anderson and Markham, 2015). Belakangan ini diketahui bahwa kofaktor ini adalah flavonoid (Rutin) (Mishra, 2013).

Struktur flavonoid didasarkan pada lima belas kerangka karbon yang terdiri dari dua cincin benzena (A dan B seperti yang ditunjukkan

pada Gambar 1) dihubungkan melalui cincin piran heterosiklik (C). Mereka dapat dibagi menjadi berbagai kelas seperti flavon (misalnya, flavon, apigenin, dan luteolin), flavonol (misalnya, kuersetin, kaempferol, myricetin, dan fisetin), flavanon (misalnya, flavanon, hesperetin, dan naringenin)(Iwashita, 2013). Variasi dalam sub kelas flavonoid dikaitkan dengan beberapa faktor seperti : tingkat ketidakjenuhan, letak dari cincin karbon C melekat dan berkaotan dengan cincin karbon B, tingkat oksidasi, pola glikolisasi dan subsitusi lain (Santos, *et al* 2017)



Gambar 2. Struktur Flavonoid

Dikutip dari : Panche, *et al* 2016

Flavonoid dapat diekstraksi dengan menggunakan metode konvensional maupun metode konvensional (modern). Metode konvensional merupakan metode yang menggunakan peralatan sederhana, membutuhkan pelarut yang cukup banyak, dan waktu ekstraksi yang relatif lama, seperti : maserasi, soklet, refluks, infusi, dan dekoksi. Metode konvensional merupakan metode yang lebih modern, ekologis, dan menggunakan peralatan yang lebih canggih sehingga waktu ekstraksi juga menjadi lebih singkat, selain itu keadaan (situasi) pada saat proses ekstraksi juga lebih dapat untuk dikontrol. Contoh dari metode konvensional adalah : PLE (*Pressurized Liquid Extraction*), HHPE (*High Hydrostatic Pressure Extraction*), *Supercritical Fluid*, MAE (*Microwave Assisted Extraction*) and UAE (*Ultrasonic Assisted Extraction*) (Oniszczuk, *et al* 2015)

C. Ekstraksi

Ekstraksi merupakan langkah pertama untuk memisahkan metabolit produk alami yang diinginkan dari bahan baku dengan

menggunakan pelarut yang selektif dan metode yang terstandart (Handa, 2008)

Ekstraksi berlangsung melalui beberapa tahapan yaitu : 1) Pelarut akan menembus ke dalam matriks padat (bahan yang akan diekstraksi), 2) zat terlarut larut dalam pelarut, 3) zat terlarut terdifusi keluar dari matriks padat, 4) zat yang terlarut yang diekstraksi dikumpulkan. Faktor – faktor yang mampu meningkatkan difusivitas dan kelarutan, serta dapat memudahkan proses ekstraksi diantaranya adalah : Sifat pelarut, ukuran partikel bahan baku, rasio pelarut, bahan baku, suhu ekstraksi dan durasi ekstraksi (Lin, *et al* 2014).

1. Ekstrak

Ekstrak adalah preparat pekat dengan konsistensi cair, padat, atau yang diperoleh dari penyarian simplisia, baik simplisia nabati maupun hewani dengan metode yang selektif dan terstandart (Honda, 2008)

Menurut Voigt (1994) ekstrak dikelompokkan berdasarkan konsistensi dan besarnya kandungan air yang dimiliki ekstrak tersebut, yaitu ; Ekstrak encer (*extractum tenue*). Jenis ekstrak ini konsistensinya seperti madu dan mudah untuk dituang. Ekstrak kental (*extractum spissum*). Jenis ini memiliki bentuk layaknya tanah liat ketika dingin, tidak dapat dituang dan memiliki kandungan yang cukup tinggi yaitu sebanyak 30%. Ekstrak kering (*extractum siccum*). Ekstrak yang satu ini memiliki bentuk kering dan kandungan air yang rendah, yaitu hanya sebesar 5%

2. Pelarut

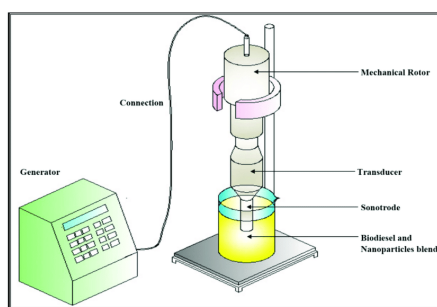
Pelarut adalah zat yang digunakan untuk melarutkan zat terlarut yang digunakan dalam formulasi zat terlarut ini dapat berupa padatan, cairan atau gas di alam. Jadi, pelarut digunakan untuk mendapatkan larutan setelah berinteraksi dengan zat yang terlarut. Kemampuan suatu pelarut untuk melarutkan zat tergantung pada beberapa hal, yaitu : bentuk molekul, ukuran molekul pelarut dan zat terlarut, sifat polar – non polar, konsentrasi pelarut, suhu, dan tekanan (Hirshfield, *et al* 2014)

Pelarut dapat dikategorikan sebagai organik atau anorganik dan dalam hal polaritas kimia terdapat pelarut polar ataupun non polar. Pelarut polar diantaranya adalah : Air, alkohol, dan bahan kimia lain yang mengandung gugus –OH seperti, asam asetat yang memiliki kemampuan untuk mendonorkan H⁺ dan membentuk ikatan hidrogen. Pelarut non polar merupakan suatu pelarut yang tidak larut dalam air

dan biasanya digunakan untuk melarutkan zat hidrofobik seperti minyak dan lemak. Kategori pelarut ini diantaranya termasuk : Benzena, karbon tetraklorida, dietil eter, heksana dan toluena (Bonvenre, 2014)

2.1 Etanol. Etanol (*Ethanol*) memiliki rumus molekul C_2H_6O dengan berat molekul 46,07. Pelarut ini termasuk dalam kategori pelarut polar yang tidak berwarna, memiliki bau yang khas, bersifat refraktif, mudah terbakar, mudah menguap. Etanol memiliki densitas sebesar 0,7893g/cu pada 20°C/ 20° C (O'Neil, 2013). Titik didih etanol adalah 78,24°C, sedangkan titik lelehnya adalah -114,14°C (Haynes, 2014)

3. Metode Ultrasonik



Gambar 3. Sonikator

Dikutip dari : Hussein, *et al* 2020

Metode ultrasonik merupakan suatu metode ekstraksi yang tergolong memiliki durasi kerja cepat. Metode ini bekerja dengan menggunakan gelombang ultrasound untuk menghasilkan pergerakan pelarut yang cepat, yang mengakibatkan terjadinya peningkatan kecepatan transfer massa, sehingga proses ekstraksi dapat dipersingkat. Metode ini juga jauh lebih ekonomis bila dibandingkan dengan ekstraksi canggih lainnya (Teng, *et al* 2016). Pernyataan tersebut sejalan dengan apa yang dikemukakan oleh (Boateng dan Lee, 2013), dimana dilaporkan bahwa *Ultrasounic Assisted Extraction* adalah tehnik yang sederhana, cepat, dan memerlukan energi yang relatif kecil.

Metode ekstraksi ini dapat dilakukan pada suhu operasi rendah, dimana dapat mencegah kerusakan termal pada bahan baku ekstrak dan mempertahankan sifat senyawa bioaktif dalam hal struktur dan molekulnya, sehingga metode ini terlihat sebagai pilihan ideal untuk industri minyak nabati (Tean, *et al* 2013)

Menurut Keil, (2007) terdapat empat mekanisme kerja dalam mengekstraksi senyawa, yaitu : 1) Adanya induksi pembangkitan *ultrasound* secara lokal dari kavitasi mikro pada sekeliling bahan yang akan diekstraksi, sehingga gelombang ultrasonik dapat terbentuk. Gelombang ultrasonik ini memicu terjadinya pemanasan pada bahan tersebut, jadi senyawa ekstrak dapat dilepaskan. 2) Terdapat dua efek berbeda yang dihasilkan dari proses tersebut, yaitu : perusakan dinding sel yang mengakibatkan tersebarnya senyawa yang ada di dalamnya serta pemanasan lokal pada larutannya mengakibatkan meningkat difusi ekstrak. 3) Peningkatan transfer massa antara permukaan padat dan cair terjadi pada saat energi kinetik tersalurkan pada seluruh bagian larutan bersamaan dengan munculnya gelombang kavitasi pada dinding atau permukaan bahan. 4) Efek mekanik yang terbentuk mengakibatkan terjadinya peningkatan penetrasi dari larutan menuju dinding membran sel, sehingga mengakibatkan terjadinya pelepasan komponen sel dan peningkatan transfer massa.

D. Kromatografi Lapis Tipis

Kromatografi adalah teknik analisa yang digunakan dalam penentuan kuantitatif kemurnian sebagian besar senyawa organik dan untuk meningkatkan jumlah bahan kimia reagen anorganik dan bahan standart untuk referensi, pemisahan komponen pada kromatografi dicapai ketika fase gerak dilewatkan fase diam. Proses pemisahan komponen terjadi pada saat terjadinya perbedaan afinitas dari berbagai zat pada fase – fase tersebut (Tyler dan James, 2017)

Kromatografi lapis tipis (KLT) adalah bentuk yang sangat sederhana dari kromatografi adalah padat- cair. Metode ini termasuk metode yang tercepat, termudah, dan yang paling sering diterapkan untuk menemukan kemurnian senyawa organik. Mekanisme kerjanya kurang lebih sama seperti kromatografi dalam bentuk cair lainnya yaitu, sampel berinteraksi dengan fase gerak cair dan fase diam untuk mempengaruhi partisi komponen berdasarkan afinitas terhadap fase padat dan cair (Walls, 2011)

Metode ini terdiri dari 2 fase kerja, yaitu : Fase diam, yang berfungsi penjerap dan penyangga lapisan zat cair dan fase gerak yang merupakan eluen terpilih untuk proses pemisahan senyawa yang dikehendaki.

Terdapat beberapa fase diam yang sering digunakan, diantaranya : Silika gel, aluminium oksida, kiselgur, sellulosa dan turunnya (Khopkar, 2010). Pemilihan fase gerak pada KLT didasarkan pada pertimbangan sifat pelarut itu sendiri, karena pada dasarnya kemampuan suatu pelarut untuk menggerakkan senyawa pada fase diam berhubungan dengan tingkat polaritas dari pelarut tersebut atau bisa disebut dengan kekuatan elusi (Atun, 2014). Fase gerak yang akan digunakan harus dijenuhkan terlebih dahulu, caranya dengan menutup rapat bejana yang telah diisi dengan eluen dan dilapisi dengan kertas saring pada bagian atasnya, jika larutan telah mencapai kertassaring maka pelarut telah jenuh (Rohman, 2016).

Kromatografi Lapis Tipis hanya membutuhkan sedikit sampel yang akan ditotolkan pada plat slika menggunakan bantuan pipa kapiler. Penotolan dilakukan dengan cara membuat ukuran bercak sempit dan melebar dengan pengeringan pada setiap penotolan (Asaka, et al 2013). Identifikasi senyawa yang telah terpisah pada dapat diidentifikasi lebih lanjut dengan cara deteksi lampu UV (254 atau 366 nm) untuk senyawa – senyawa yang dapat menyerap warna (Atun, 2014).

E. Spektrofotometer UV- Vis

Spektrofotometri Sinar Tampak (UV-Vis) merupakan satu dari sekian banyak metode analisis yang banyak digunakan dalam bidang kimia untuk mengetahui identitas senyawa (senyawa organik dan anorganik) baik secara kualitatif maupun kuantitatif. Metode ini biasanya digunakan untuk penelitian senyawa dalam jumlah kecil (Subodh, 2006)

Spektrofotometri UV-Vis mengidentifikasi senyawa dengan mengukur energi cahaya dari suatu sistem kimia pada panjang gelombang yang spesifik. Terdapat dua macam sinar pada spektrofotometri UV-Vis ini, yaitu : Sinar UV (*ultraviolet*) yang memiliki panjang gelombang 200 – 400 nm dan sinar visible (nampak) dengan panjang gelombang 400 – 750 nm (Baser dan Demirsi, 2007).

Metode ini digunakan untuk mengukur besarnya energi baik yang diabsorpsi maupun dipantulkan dengan cara menyerap sinar radiasi monokromatik yang melewati larutan yang mengandung suatu zat penjerap. Konsentrasi dari analit dalam larutan dapat ditentukan dengan cara mengukur nilai absorbansi T1 pada panjang gelombang spesifik dengan menggunakan hukum *Lambert – Beer* (Romadhani, 2016).

Hukum *Lambert* menyatakan bahwa : “Jumlah radiasi cahaya lambat (UV, IR, dan sebagainya) diserap ataupun ditransmisikan oleh suatu larutan adalah suatu fungsi eksponen dari konsentrasi zat dan tebal larutan. Hukum ini pada dasarnya merupakan suatu hukum yang menerangkan tentang dari cahaya yang diserap (A) dengan yang dihamburkan (T).

Berdasarkan hukum *Lambert-Beer* rumus yang digunakan untuk menghitung banyaknya cahaya yang dihamburkan adalah :

$$T = \frac{I_t}{I_0} \text{ atau } \%T = \frac{I_t}{I_0} \times 100\%$$

Absorbansi dengan rumus : $A = -\log T = -\log \frac{I_t}{I_0}$

Keterangan :

I_0 = Intensitas Cahaya Datang

I_t = Intensitas Cahaya Melewati Sampel

Rumus yang diturunkan dari hukum *Lambert-Beer* adalah :

$$A = a \cdot b \cdot c \text{ atau } A = \epsilon \cdot b \cdot c$$

Keterangan :

A = Absorbansi

b/l = Tebal Kuvet (umumnya 1 cm)

c = Konsentrasi Larutan Yang Diukur

ϵ = Tetapan Absorbtivitas Molar (jika larutan diukur dalam molar)

a = Tetapan Absorbtivitas (konsentrasi diukur dalam ppm) (Rohman, 2016)

Prinsip kerja untuk mengetahui konsentrasi zat dalam sampel secara kuantitatif adalah dengan cara meneruskan cahaya polikromatis yang berasal dari lampu deuterium melalui lensa menuju ke monokromator dan filter cahaya yang terdapat pada fotometer, sehingga monokromator dapat mengubah cahaya polikromatis tersebut menjadi cahaya monokromatis (Astuti, 2016)

Berkas – berkas cahaya tersebut, kemudian akan ditemukan akan dilewatkan pada sampel yang memiliki suatu kandungan zat pada konsentrasi tertentu yang mengakibatkan munculnya dua kemungkinan , yaitu : Adanya cahaya yang diserap (diabsorpsi) dan cahaya yang dilewati. Cahaya yang diterima akan dihitung oleh detektor yang selanjutnya akan digunakan untuk mengetahui banyaknya cahaya yang diserap oleh sampel, karena jumlah cahaya yang diserap tersebut akan sebanding dengan konsentrasi zat yang terkandung dalam sampel itu sendiri (Kurniawati, 2017)

Warna yang teramati pada spektrofotometri UV – Vis merupakan warna komplementer yang dapat diserap oleh suatu

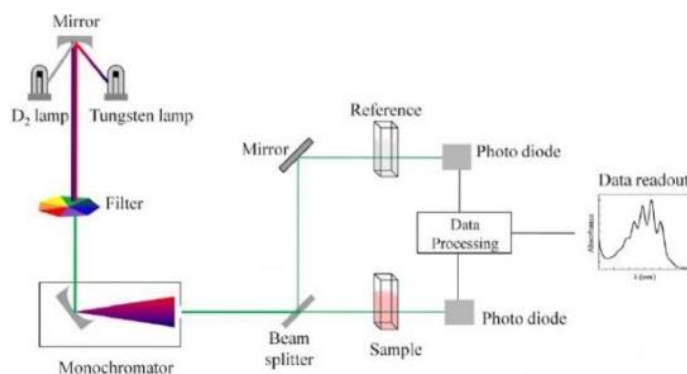
senyawa ataupun yang mengandung unsur tersebut. Cara untuk mengetahuinya adalah dengan melihat larutan berwarna yang memiliki serapan maksimum pada warna komplementer tertentu (Romadhani, 2016)

Tabel 1. Hubungan Antara Warna Pada Sinar UV dengan Panjang Gelombang *)

Panjang Gelombang	Warna	Warna Komplementer
400 nm – 435 nm	Ungu	Hijau kekuningan
435 nm – 480 nm	Biru	Kuning
480 nm – 490 nm	Biru kehijauan	Jingga
490 nm – 500 nm	Hijau kebiruan	Merah
500 nm – 560 nm	Hijau	Ungu kemerahan
560 nm – 580 nm	Hijau kekuningan	Ungu
595 nm – 610 nm	Jingga	Biru kehijauan
610 nm – 680 nm	Merah	Hijau kebiruan
680 nm – 700 nm	Ungu kemerahan	Hijau

*) dikutip dari Ramadhani, 2016

Komponen penyusun Spektrofotometri UV-Vis secara umum terdiri dari empat bagian alat seperti: sumber cahaya, monokromator, kuvet, detektor, dan recorder.



Gambar 4. Spektrofotometer UV-Vis

(dikutip dari : Kurniawati, 2017)

1. Sumber Cahaya

Spektrofotometer memiliki sumber dua macam sumber cahaya, yaitu : Lampu deuterium (lampu hidrogen) dan lampu wolfram. Lampu deuterium atau bisa disebut sebagai lampu hidrogen adalah lampu yang digunakan pada daerah UV (sumber cahaya UV). Sedangkan lampu wolfram adalah lampu pada daerah visible. Lampu wolfram memiliki kelebihan pada radiasi yang dibebaskan, karena sinar radiasi tersebut tidak bervariasi pada berbagai panjang gelombang (Yahya, 2013)

2. Monokrometer

Monokromator adalah suatu alat optik yang digunakan untuk mengukur spektrum cahaya. Mekanisme dari alat ini adalah, ketika cahaya masuk, cahaya tersebut akan difokuskan pada celah masuknya cahaya dan menuju ke kisi fraksi. Cara ini hanya akan mentransmisikan satu warna melalui celah hasil pada waktu tertentu, selanjutnya panjang gelombang spektra akan direkam ukurannya gelombang – gelombang (Deokar, et al 2016)

Monokromator tersusun atas empat bagian alat, yaitu : celah (*slit*) masuk – filter – Kisi difraksi/prisma kisi (*grating*) – celah (*slit*) keluar (Yahya, 2013)

2.1 Prisma. Berfungsi untuk memancarkan (mendispersikan) radiasi elektromagnetik yang ada, agar mampu mendapatkan resolusi yang baik dari radiasi polikromatis (Christian *et al*, 2014)

2.2 Grating (Kisi Difraksi). Bagian ini berfungsi untuk menyebarkan secara merata dispersi sinar yang ada dengan menggunakan pendispersi yang sama, sehingga kualitas dispersi akan menjadi lebih baik. Selain itu, alat ini juga dapat digunakan dalam seluruh jangkauan spektrum (Kumar, 2008)

2.3 Celah Optis. Celah optis digunakan sebagai pengarah atau penunjuk jalan bagi sinar monokromatis yang diharapkan dari sumber radiasi. Jika bagian ini berada pada posisi yang benar, maka radiasi yang datang akan dirotasikan melalui prisma, sehingga diperoleh panjang gelombang yang diharapkan (Christian, *et al* 2014)

2.4 Filter. Bagian ini berfungsi sebagai penyerap warna komplementer, jadi cahaya yang akan diteruskan merupakan cahaya berwarna yang sesuai dengan panjang gelombang yang dipilih (Darwish, 2014).

3. Kuvet

Kuvet merupakan alat yang digunakan sebagai wadah sampel yang dianalisis. Terdapat tiga jenis kuvet yang biasanya digunakan dalam penelitian, yaitu : Kuvet yang terbuat dari kuarsa (leburan silika) yang digunakan untuk analisis senyawa pada daerah pengukuran 190 – 1100 nm. Kuvet yang terbuat dari gelas yang digunakan pada daerah pengukuran 380-1100 nm. Terakhir adalah kuvet dari bahan plastik yang digunakan pada pengukuran 380-800 nm (Wuanas, 2011)

Cara pengisian sampel ke dalam kuvet cukup mudah, yaitu hanya dengan menyuntikkan ke dalam kuvet dan mengisinya hingga mencapai sekitar 80% kapasitas kuvet tersebut (Kehoe dan Penn, 2013)

4. Detektor

Detector pada spektrofotometer UV-Vis berfungsi untuk menangkap sinar yang ada untuk kemudian diubah menjadi sinyal listrik oleh amplifier dan akan ditampilkan dalam bentuk angka saat dalam rekorder pada layar komputer (Gandjar, 2007)

5. Recorder/Visual Display

Rekorder adalah suatu sistem baca (*reader*) yang berguna untuk memperagakan besarnya isyarat listrik, maksudnya disini adalah menyatakan dalam bentuk % transmittan maupun absorbansi (Gandjar, 2007)

Terdapat beberapa hal yang harus diperhatikan dalam melakukan analisis senyawa dengan menggunakan metode spektrofotometri UV-Vis, sehingga penelitian tersebut mampu mendapatkan hasil yang maksimal. Hal – hal tersebut meliputi : Pembentukan molekul, waktu operasional penelitian, pemilihan panjang gelombang, pembuatan kurva baku dan rentang absorbansi (Astuti, 2016)

F. Landasan Teori

Nyamplung (*Calophyllum inophyllum*. L) memiliki kandungan senyawa squalen (Lim, *et al* 2012). Flavonoid memiliki banyak fungsi penting bagi kesehatan yaitu : Sebagai kardioprotektor, dengan cara menurunkan kadar kolesterol, trigliserida dan asam lemak dalam plasma jaringan plasma jantung (Farvin, *et al* 2016), sebagai agen antioksidan (Hwang, *et al* 2009) dan juga berfungsi sebagai anti dislipidemia (Hien, *et al* 2017)

Daun nyamplung akan diekstraksi menggunakan metode UAE (*Ultrasonic-Assisted Extraction*), pemilihan metode ini didasarkan pada hasil penelitian dari Jovanovic, *et al* (2017) yang mengekstraksi flavonoid dari tanaman *Thymus serpyllum* L dengan menggunakan tiga metode ekstraksi yaitu maserasi, HAE dan UAE, Hasil dari penelitian tersebut menunjukkan bahwa UAE merupakan metode yang lebih efektif daripada maserasi dan HAE, karena memiliki nilai yang lebih tinggi dengan perolehan 14,3 mg CE/L, 12,4 mg CE/L dan 16,7 mg CE/L untuk maserasi, HAE dan UAE.

Pemilihan pelarut ini dilandasi oleh sebuah jurnal dari (Li H, *et al* 2009), yang menyatakan bahwa etanol merupakan salah satu pelarut polar yang cukup aman digunakan, dapat didaur ulang, harga yang cukup terjangkau dan memiliki sensitivitas tinggi terhadap senyawa flavonoid. Pernyataan ini sejalan dengan hasil penelitian dari Diem, *et al*(2014) yang mengungkapkan bahwa etanol lebih mampu menyari senyawa flavonoid total bila dibandingkan dengan metanol dan aseton dengan perbandingan 31,11 mg GAE/L, 15,42 mg GAE/L, dan 30,86 GAE/L, sehingga dalam penelitian ini etanol akan digunakan sebagai pelarut saat ekstraksi

Amplitudo merupakan salah satu faktor penting yang perlu dipertimbangkan ketika akan memulai proses ekstraksi dengan metode UAE. Sahin, *et al* (2018) melakukan penelitian mengenai hubungan antara amplitudo dengan kadar TPC dan TFC pada daun jeruk mandarin (*Citrus deliciosa Tenore*), dengan variasi amplitudo : 30, 50, dan 70%. Hasil yang diperoleh menyatakan bahwa adanya peningkatan senyawa seiring dengan peningkatan amplitudo, yaitu : 27,0495 mg GAE/L, 28, 8333mg GAE/L, dan 33,5418 mg GAE/L. (Menurut Wardiyati, (2004) besaran amplitudo sangat mempengaruhi hasil ekstraksi pada metode UAE, karena besarnya amplitudo berbanding lurus dengan besarnya intensitas gelombang akustasi. Peningkatan intensitas ini juga berbanding lurus dengan peningkatan suhu yang akan terjadi, karena dengan adanya peningkatan intensitas, maka akan menstimulasi terjadinya peningkatan gelembung yang menyebabkan meningkatnya aktivitas kavitasi dan getaran pada permukaan media cair dan meningkatkan suhu cairan tersebut (Jambrak, *et al* 2010). Pernyataan tersebut juga diungkapkan oleh Norissa, (2018) bahwa semakin tinggi amplitudo, maka akan semakin tinggi pula suhu yang ada, sementara suhu yang terlalu tinggi dapat merusak kandungan komponen senyawa yang akan diekstraksi (Margaretta *et al*, 2011). Alasan inilah yang membuat saya menggunakan perbedaan amplitudo (dengan variasi 20, 40, dan 60) sebagai variabel utama dalam penelitian ini.

Analisis pendahuluan flavonoid akan dilakukan menggunakan tiga jenis reaksi warna (shinoda test, uji NaOH, dan uji H₂SO₄), hasil positif ditunjukkan dengan adanya perubahan warna pada larutan ekstrak (merah sampai merah muda pada shinoda test, kuning pada NaOH, dan merah sampai coklat pada H₂SO₄). (Kusnaldi dan Devi,

2017). Selanjutnya akan diteruskan dengan analisa kromatografi lapis tipis (penotolon ekstrak pada plat) dengan fase gerak berupa campuran homogen metanol :n-heksan: eter (5 : 4 : 1). Penggunaan fase gerak ini didasarkan pada pernyataan Shewiyo, *et al* (2012) yang mengungkapkan bahwa adanya pencampuran antara dua pelarut yang memiliki polaritas berbeda lebih mampu untuk memberikan hasil pemisahan yang baik. Fase gerak yang akan digunakan, juga harus dijenuhkan terlebih dahulu, dengan tujuan untuk menyamaratakan tekanan uap dari fase gerak yang digunakan, sehingga proses pemisahan senyawa bisa berjalan dengan baik (Dewi, *et al* 2018). Kemudian, plat akan dibiarkan mengering dalam suhu ruang selama 5 menit, agar dapat dilakukan pengamatan dibawah sinar UV 254 (Subashini, *et al* 2015), sedangkan, untuk analisis kadar akan dilakukan dengan spektrofotometer UV-Vis.

G. Hipotesis

Berdasarkan landasan teori, maka dapat disusun suatu hipotesis dari penelitian ini yaitu:

1. Pertama, kadar flavonoid total yang didapatkan dari ekstrak etanol daun nyamplung diprediksi sekitar : 1289 mg QE/gram (Imelia dan Angie, 2017)
2. Kedua, terdapat hubungan linear antara kadar flavonoid dengan amplitudo ekstraksi, karena semakin tinggi temperatur semakin tinggi % kadar yang diperoleh (Sahin,*et al* 2018)