

BAB II

TINJAUAN PUSTAKA

2.1. Bunga Telang

Bunga telang (*Clitoria ternatea* L.) adalah tumbuhan merambat yang biasa ditemukan di pekarangan atau tepi hutan. Tumbuhan anggota suku polong-polongan ini berasal dari Asia tropis, namun sekarang telah menyebar ke seluruh daerah tropika. Sejak dulu tumbuhan ini ditanam di pekarangan sebagai tanaman hias. Bunga telang (*Clitoria ternatea* L.) termasuk dalam suku *Papilionaceae* atau *Fabaceae* (polong-polongan). Bunga ini memiliki nama yang beraneka ragam pada setiap daerah di Indonesia, seperti di daerah Sumatera disebut bunga biru, bunga kelentit, bunga telang, di Jawa disebut kembang teleng, menteleng, di Sulawesi disebut bunga talang, bunga temen raleng, dan di Maluku disebut bisi, seyamagulele (Wijayakusuma & Dalimartha, 2015). Adapun taksonomi tumbuhan telang dikutip dari Budiasih (2017) adalah sebagai berikut:

Kingdom	: Plantae
Divisi	: Tracheophyta
Infrodivisi	: Angiospermae
Kelas	: Magnoliopsida
Ordo	: Fabales
Familia	: Fabaceae
Genus	: <i>Clitoria</i> L
Spesies	: <i>Clitoria ternatea</i>

Bunga telang termasuk tumbuhan monokotil dan mempunyai bunga yang berwarna biru, putih dan coklat. Bunga telang merupakan bunga berkelamin dua (*hermaphroditus*) karena memiliki benang sari (alat kelamin jantan) dan putik (alat kelamin betina), sehingga sering disebut dengan bunga sempurna atau bunga lengkap (Cahyaningsih *et al.*, 2019). Daun bunga telang termasuk daun tidak lengkap karena tidak memiliki upih daun, hanya memiliki tangkai daun (*petiolus*) dan helai daun (*lamina*). Akar pada tumbuhan bunga telang termasuk akar tunggang dan warnanya putih kotor.

Bagian-bagian dari akar bunga telang yaitu leher akar (*Colum radisi*), batang akar atau akar utama (*Corpus radisi*), ujung akar (*Apeks radisi*), serabut akar (*Fibrila radicalis*). Biji bunga telang berbentuk seperti ginjal, pada saat masih muda berwarna hijau, setelah tua bijinya berwarna hitam (Wijayakusuma & Dalimartha, 2015). Kandungan kimia yang terdapat pada mahkota bunga telang dapat dilihat pada tabel 2.1.

Tabel 2. 1 Kadar Senyawa Aktif Bunga Telang

Senyawa	Konsentrasi
Flavonoid	20,07±0,
55	
Antosianin	5,40 ± 0,23
Flavonol glikosida	14,66±0,33
Kaempferol glikosida	12,71±0,46
Quersetin glikosida	1,92 ± 0,12
Mirisetin glikosida	0,04 ± 0,01

Sumber : Purwaniati *et al.*, (2020).



Gambar 2. 1 Bunga Telang (Budiasih, 2017)

Nama daerah bunga telang di Sumatera: Bunga biru, Bunga kelentit, bunga telang, Jawa: Kembang teleng, menteleng, Sulawesi: Bunga talang, bunga temanlereng, Maluku: Bisi, saya ma gulele (Nurfitriani, 2020).

Sejak dulu, selain dianggap sebagai tanaman hias tumbuhan ini dikenal secara tradisional sebagai obat untuk mata dan pewarna makanan yang memberikan warna biru. Dilihat dari tinjauan fitokimia, bunga telang memiliki sejumlah bahan aktif yang memiliki potensi farmakologi. Potensi farmakologi bunga telang antara lain adalah sebagai antioksidan, antibakteri, anti inflamasi dan analgesik, antiparasit dan antisida, antidiabetes, antikanker, antihistamin, immunomodulator, dan potensi berperan dalam susunan syaraf pusat, *Central Nervous System* (CNS) (Budiasih, 2017).

Kandungan fitokimia bunga telang yaitu tanin, flobatanin, karbohidrat, saponin, triterpenoid, fenolfavanoid, flavanol glikosida, protein, alkaloid, antrakuinon, antisianin, stigmasit 4-ena-3,6 dion, minyak volatil dan steroid. Komposisi asam lemak meliputi asam palmitat, stearat, oleat linoleat, dan linolenat. Biji bunga telang juga mengandung asam sinamat, finotin dan beta sitosterol (Budiasih, 2017).

Keberadaan bahan pengawet dan pewarna sering menimbulkan kekhawatiran bagi sebagian konsumen karena dapat menimbulkan dampak. Kandungan fitokimia bunga telang yaitu tanin, flobatanin, karbohidrat, saponin, triterpenoid, fenolmfavanoid, flavanol glikosida, protein, alkaloid, antrakuinon, antisianin, stigmasit 4-ena-3,6 dion, minyak volatil dan steroid. Komposisi asam lemak meliputi asam palmitat, stearat, oleat lonoleat, dan linolenat. Biji bunga telang juga mengandung asam sinamat, finotin dan beta sitosterol (Budiasih, 2017).

Warna biru dari bunga telang menunjukkan keberadaan dari antosianin. Ekstrak kasar dari bunga telang dapat digunakan sebagai alternatif pewarna untuk pewarnaan preparat sel darah hewan (Mastuti *et. al.*, 2013). Melihat manfaat, sifat dari bunga telang yang mudah tumbuh di Indonesia dan aman untuk dikonsumsi maka antosianin dari bunga telang berpotensi untuk dijadikan pewarna alami pada bahan pangan. Warna biru dari bunga telang telah dimanfaatkan sebagai pewarna biru pada ketan di Malaysia. Bunga telang juga dimakan sebagai sayuran di Kerala (India) dan di Filipina (Devina, 2018).

Antosianin merupakan pewarna yang paling penting dan tersebar luas dalam tumbuhan. Pigmen yang berwarna kuat dan larut dalam air ini adalah penyebab hampir semua warna merah jambu, merah marak, merah senduduk, ungu dan biru dalam daun, bunga, daun dan buah pada tumbuhan tinggi. Secara kimia semua antosianin merupakan turunan suatu struktur aromatik tunggal, yaitu: sianidin, dan semuanya terbentuk dari pigmen sianidin ini

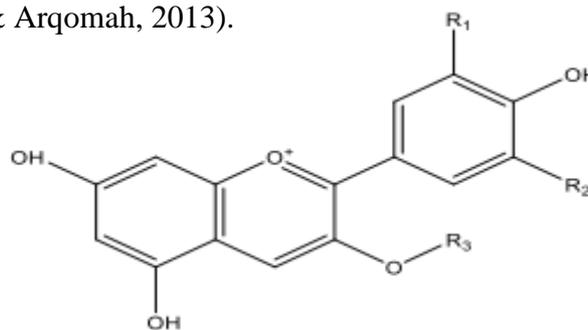
dengan penambahan atau pengurangan gugus hidroksil atau dengan metilasi atau glikosilasi (Kusrini *et al.*, 2017).

2.2. Antosianin Sebagai Indikasi Pewarna Alami

Terdapat enam antosianidin umum. Antosianidin ialah aglikon antosianin yang terbentuk bila antosianin dihidrolisis dengan asam. Antosianin yang paling umum sampai saat ini ialah sianidin yang berwarna merah lembayung. Warna jingga disebabkan oleh pelargonidin yang gugus hidroksilnya kurang satu dibandingkan sianidin, sedangkan warna merah senduduk, lembayung dan biru umumnya disebabkan oleh delphinidin yang gugus hidroksilnya lebih satu dibandingkan sianidin. Tiga jenis eter metil antosianidin juga sangat umum yaitu: peonidin yang merupakan turunan fsianidin, serta petunidin dan malvidin yang terbentuk dari delphinidin. Masing-masing antosianidin terdapat sebagai sederetan glikosida (yaitu sebagai antosianin) dengan berbagai gula yang terikat. Keragaman utama ialah sifat gulanya (sering kali glukosa, tetapi mungkin *galaktosa*, *ramnosa*, *xilosa* dan *arabinose*), jumlah satuan gula (*mono-*, *di-*, atau *triglikosida*), dan letak ikatan gula (biasanya pada *3-hidroksi* atau pada *3- dan 5-hidroksi*) (Priska *et al.*, 2018). Senyawa antosianin ditunjukkan dalam gambar 2.2.

Delphinidin, sianidin, dan pelargonidi, yang terakhir jauh lebih terbatas, dapat juga terbentuk didalam jaringan tumbuhan yang dihidrolisis asam. Sumber bahan untuk ketiga antosianidin tersebut ialah polimer yang ada, dan dari senyawa yang dulu dikenal sebagai leukoantosianidin dan

sekarang diberi nama proantosianidin atau flavon. Cara utama mendeteksi senyawa warna itu dalam tumbuhan didasarkan pada pembentukan antosianidin dengan cara diatas. Biasanya mereka terdapat dalam kayu atau dalam daun tumbuhan berkayu, tetapi sangat sering terdapat dalam bunga tumbuhan (Ali & Arqomah, 2013).



Gambar 2. 2 Struktur Senyawa Kimia Antosianin (Purwaniati *et al.*, 2020)

Antosianin adalah suatu kelas dari senyawa flavonoid, yang secara luas terbagi dalam polifenol tumbuhan. Flavonol, flavan-3-ol, flavon, flavanon, dan flavanonol adalah kelas dari flavonoid yang berbeda dalam oksidasi antosianin. Senyawa flavonoid tidak berwarna atau kuning pucat. Sifat fisika dan kimia dari antosianin dapat dilihat dari kelarutan antosianin yang larut dalam pelarut polar seperti metanol, aseton atau kloroform, aquades, air yang diasamkan dengan asam klorida atau asam format, asam sitrat, asam malat, atau asam tartarat. Antosianin stabil pada pH 3,5 dan suhu 50°C dan memiliki berat molekul 207,08 gram/mol, rumus molekul $C_{11}H_{15}O$, rentan terhadap cahaya dan mudah terdegradasi pada suhu di atas 70°C. Dilihat dari penampakannya, antosianin berwarna merah, merah sendudu, ungu hingga biru dengan panjang gelombang maksimum 515-700 nm (Cahyaningsih *et al.*, 2019) .

Antosianin merupakan struktur dengan cincin aromatik yang berisi komponen polar dan residu glikosil sehingga menghasilkan molekul polar. Antosianin bersifat polar sehingga lebih mudah larut dalam air dibanding dalam pelarut non-polar. Antosianin juga dapat larut dalam eter karena molekul antosianin dapat terionisasi dengan baik pada kondisi pelarut yang polar. Degradasi pigmen antosianin dapat diminimalisasi dengan pembekuan, seperti *freeze dried* atau *spray dried* (Nurfitriani, 2020).

Antosianin tidak stabil terhadap suasana netral atau basa, maka ekstraksi dilakukan menggunakan pelarut asam yang dapat merusak jaringan tanaman. Pelarut yang sering digunakan dalam proses ekstraksi antosianin yaitu etanol, metanol, isopropanol, aseton, dan *aquadest*. Pelarut tersebut dikombinasikan dengan asam seperti asam klorida, asam asetat, asam format, asam sitrat, asam askorbat atau dengan asam organik. Fungsi pelarut untuk ekstrak antosianin merupakan faktor yang menentukan kualitas dari suatu ekstraksi dan memiliki daya yang besar untuk melarutkan. Sedangkan penambahan asam berfungsi untuk lebih mengoptimalkan ekstraksi antosianin (Marpaung, 2020).

Penggunaan etanol dan metanol sebenarnya masih diragukan dalam pemakaian untuk produk pangan. Selain harganya mahal, pelarut ini juga dapat menimbulkan efek negatif pada produk pangan maupun pada kesehatan tubuh jika ada residu yang ditinggalkan. Pelarut jenis alkohol dapat digantikan dengan menggunakan *aquadest* (Cahyaningsih *et. al.*, 2019).

Aquadest dapat melarutkan pigmen antosianin lebih banyak

dibandingkan dengan pelarut lain karena antosianin bersifat larut dalam air. Penambahan asam dikombinasikan dengan pelarut bertujuan untuk mengoptimalkan pigmen yang diekstrak. Asam sitrat merupakan bahan alternatif yang mudah diperoleh dengan harga yang terjangkau. Asam sitrat ($C_6H_8O_7$) merupakan pelarut organik yang bersifat polar. Golongan asam ini jika di kombinasikan dengan air dapat melarutkan zat-zat yang dapat larut pada pelarut polar contohnya antosianin (Hanura *et. al.* 2021).

Warna dan stabilitas pigmen antosianin tergantung pada struktur molekul secara keseluruhan. Substitusi struktur antosianin A dan B akan berpengaruh pada warna. Pada kondisi asam warna antosianin ditentukan oleh banyaknya substitusi pada cincin B. Semakin banyak substitusi OH dapat menyebabkan warna semakin biru, sedangkan metoksilasi akan menyebabkan warnanya semakin merah (Zussiva *et. al.*2012). Faktor yang mempengaruhi stabilitas antosianin dapat dilihat pada tabel 2.2

Tabel 2. 2 Faktor Yang Dapat Mempengaruhi Kestabilan Antosianin

Faktor	Keterangan
pH	pH asam menyebabkan sebagian antosianin dalam kondisi paling berwarna
Suhu	Kenaikan suhu menyebabkan antosianin tidak berwarna
O ₂ dan H ₂ O ₂	Dapat mengoksidasi antosianin jadi tidak berwarna
Cahaya	Cahaya matahari dan lampu dapat mendegradasi antosianin menjadi tidak berwarna

Sumber: (Wahyuni, 2015)

2.3. Antosianin Sebagai Sumber Fungsional Antioksidan

Antosianin memberikan warna pada bunga, buah dan daun tumbuhan hijau, dan telah banyak digunakan sebagai pewarna alami pada berbagai produk pangan dan berbagai aplikasi lainnya. Warna diberikan oleh

antosianin berdasarkan susunan ikatan rangkap terkonjugasinya yang panjang, sehingga mampu menyerap cahaya pada rentang cahaya tampak. Sistem ikatan rangkap terkonjugasi ini juga yang mampu menjadikan antosianin sebagai antioksidan dengan mekanisme penangkapan radikal. Radikal bebas adalah atom atau senyawa yang mengandung satu atau lebih elektron yang tidak berpasangan. Senyawa paling berbahaya dalam radikal bebas adalah hidroksil (OH) sebab memiliki reaktivitas paling tinggi. Molekul tersebut sangat reaktif dalam mencari pasangan elektronnya. Jika sudah terbentuk dalam tubuh, maka akan terjadi reaksi berantai dan menghasilkan radikal bebas baru yang akhirnya membentuk suatu radikal bebas dalam jumlah yang banyak. Radikal bebas secara umum timbul akibat berbagai proses biokimiawi dalam tubuh, berupa hasil samping dari proses oksidasi yang berlangsung pada saat bernafas, metabolisme sel, olahraga yang berlebihan, peradangan atau saat tubuh terpapar polusi lingkungan seperti asap kendaraan, asap rokok, bahan pencemar dan radiasi matahari (Budiasih, 2017).

Antioksidan merupakan zat penghancur atau penangkal radikal bebas. Menjadi masalah adalah ketika radikal bebas dari luar masuk ke dalam tubuh. Sel dalam tubuh akan diganggu oleh keberadaan radikal bebas ini, sehingga terjadi mutasi sel yang radikal dan kelainan fungsinya. Mutasi sel menyebabkan timbulnya penyakit kanker, gangguan sel saraf, liver, gangguan pembuluh darah seperti jantung koroner, diabetes, katarak dan penyebab timbulnya proses penuaan dini juga memicu penyakit kronis lainnya (Djaeni *et*

al., 2017). Antosianin merupakan sub-tipe senyawa organik dari keluarga flavonoid, dan merupakan anggota kelompok senyawa yang lebih besar yaitu polifenol. Beberapa senyawa antosianin paling banyak ditemukan adalah pelargonidin, peonidin, sianidin, malvidin, petunidin, dan delphinidin (Sangadji *et al.*, 2017).

Fungsi antosianin sebagai antioksidan di dalam tubuh sehingga dapat mencegah terjadinya aterosklerosis, penyakit penyumbatan pembuluh darah. Antosianin bekerja menghambat proses aterogenesis dengan mengoksidasi lemak jahat dalam tubuh yaitu lipoprotein densitas rendah. Fungsi antosianin juga melindungi integritas sel endotel yang melapisi dinding pembuluh darah sehingga tidak terjadi kerusakan. Selain itu, antosianin juga merelaksasi pembuluh darah untuk mencegah aterosklerosis dan penyakit kardiovaskuler lainnya. Berbagai manfaat positif dari antosianin untuk kesehatan manusia adalah untuk melindungi lambung dari kerusakan, menghambat sel tumor, meningkatkan kemampuan penglihatan mata, serta berfungsi sebagai senyawa anti-inflamasi yang melindungi otak dari kerusakan. Selain itu, beberapa studi juga menyebutkan bahwa senyawa tersebut mampu mencegah obesitas dan diabetes, meningkatkan kemampuan memori otak dan mencegah penyakit neurologis, serta menangkal radikal bebas dalam tubuh (Kusrini *et. al.*, 2017).

2.4. Metode Penyarian

2.4.1. Ekstraksi

Ekstraksi merupakan salah satu teknik pemisahan kimia untuk memisahkan atau menarik satu atau lebih komponen atau

senyawa-senyawa (analit) dari suatu sampel dengan menggunakan pelarut tertentu yang sesuai. Ekstraksi padat-cair atau *leaching* merupakan proses transfer secara difusi analit dari sampel padatan dapat dilakukan jika analit yang diinginkan dapat larut dalam pelarut pengestraksi (Ergina *et. al.*, 2014).

Pada ekstraksi ini prinsip pemisahan didasarkan pada kemampuan atau daya larut analit dalam pelarut tertentu. Dengan demikian pelarut yang digunakan harus mampu menarik komponen analit dari sampel secara maksimal (Ergina *et. al.*, 2014)

Mekanisme ekstraksi ini dimulai dengan adsorpsi pelarut oleh permukaan sampel, diikuti difusi pelarut dalam sampel dan pelarutan analit oleh pelarut (interaksi analit dengan pelarut). Selanjutnya terjadi difusi analit-pelarut ke permukaan sampel dan desorpsi analit-pelarut dari permukaan sampel kedalam pelarut. Perpindahan analit-pelarut ke permukaan sampai berlangsung sangat cepat ketika terjadi kontak antara sampel dengan pelarut kecepatan difusi analit-pelarut ke permukaan sampel merupakan tahapan yang mengontrol keseluruhan proses ekstraksi ini. Kecepatan difusi bergantung pada beberapa faktor yaitu:

- a. Temperatur
- b. Luas permukaan partikel
- c. Jenis pelarut
- d. Perbandingan analit dengan pelarut
- e. Kecepatan dan lama pengadukan

Agar kondisi optimum ekstraksi dapat tercapai ada beberapa

hal yang harus diperhatikan:

- a. Kemampuan atau daya larut analit dalam pelarut harus tinggi
- b. Pelarut yang digunakan harus selektif
- c. Konsentrasi analit dalam sampel harus cukup tinggi
- d. Tersedia metode untuk memisahkan kembali analit dan pelarut pengestraksi.

Berdasarkan metode yang digunakan, ekstraksi padat cair dibedakan menjadi maserasi, perkolasi, sokletasi

2.4.2. Mekanisme ekstraksi padat-cair

Prinsip ekstraksi padat-cair adalah adanya kemampuan senyawa dalam suatu matriks yang kompleks dari suatu padatan, yang dapat larut oleh suatu pelarut tertentu. Beberapa hal yang harus diperhatikan untuk tercapainya kondisi optimum ekstraksi antara lain: senyawa dapat terlarut dalam pelarut dengan waktu yang singkat, pelarut harus selektif melarutkan senyawa yang dikehendaki, senyawa analit memiliki konsentrasi yang tinggi untuk memudahkan ekstraksi, serta tersedia metode memisahkan kembali senyawa analit dari pelarut pengestraksi (Mastuti *et. al.*, 2013).

2.4.3. Maserasi

Maserasi adalah salah satu metode ekstraksi suatu tanaman (yang zat aktifnya tidak tahan panas) diproses dalam tempat tertutup pada suhu kamar dan selama periode waktu tertentu. Maserasi sederhana dapat dilakukan modifikasi, misal kinetik atau dinamik,

digesti, infusa, dekok, dan ekstraksi. Pada maserasi sederhana simplisia (segar, kering atau serbuk) direndam dalam pelarut selama waktu tertentu sampai beberapa hari dalam suhu ruangan dengan sesekali pengadukan. Maserasi sering dilakukan mengingat alat yang digunakan cukup sederhana, tetapi cukup waktu yang lama. Umumnya, jumlah penyari yang ditambahkan 10 kali jumlah simplisia dan direndam selama 6 jam sambil sekali-kali diaduk, didiamkan selama 24 jam, kemudian maserat dipisahkan. Dalam metode ini terjadi proses keseimbangan senyawa/kandungan kimia dengan pelarut, akibatnya pelarut jenuh tidak dapat melarutkan lagi sehingga penyarian tidak menyeluruh. Guna memperbaiki dilakukan remaserasi dengan mengganti pelarut yang sudah jenuh dengan pelarut baru sehingga seluruh komponen simplisia larut (Endang H, 2021).

2.4.4 Perkolasi

Perkolasi merupakan salah satu jenis ekstraksi padat cair yang dilakukan dengan jalan mengalirkan pelarut secara perlahan pada sampel dalam suatu perkolator. Pada ekstraksi jenis ini, pelarut ditambahkan secara terus-menerus, sehingga proses ekstraksi selalu dilakukan dengan pelarut yang baru. Pola penambahan pelarut yang dilakukan adalah menggunakan pola peneteskan pelarut dari bejana terpisah (Wijaya *et al*, 2014).

Proses ekstraksi dilakukan hingga analit dalam sampel terekstraksi secara sempurna. Indikasi bahwa semua analit telah

terekstraksi secara adalah pelarut yang digunakan tidak warna. Untuk memastikan bahwa semua analit telah terekstraksi dengan sempurna dapat dilakukan uji dengan kromatografi lapis tipis (KLT) atau spektrofotometri *UV*. Apabila menggunakan KLT, indikasi bahwa semua analit telah terekstrak ditandai dengan tidak ada noda/spot pada pelat KLT. Sedangkan dengan spektrofotometri *UV* ditandai dengan tidak adanya puncak/*peak* pada kromatogram (Wijaya *et al.*, 2014).

2.4.5. Sokletasi

Sokletasi merupakan salah satu ekstraksi menggunakan alat soklet. Pada ekstraksi ini pelarut dan sampel ditempatkan secara terpisah. Prinsipnya adalah ekstraksi dilakukan secara terus-menerus menggunakan pelarut yang relatif sedikit. Bila ekstraksi telah selesai maka pelarut dapat diuapkan sehingga akan diperoleh ekstrak. Biasanya pelarut yang digunakan adalah pelarut-pelarut yang mudah menguap atau mempunyai titik didih yang rendah (Meisarani & Ramadhani, 2014).

Sokletasi dilakukan dengan cara pemanasan pelarut. Uap pelarut yang dihasilkan mengalami pendinginan dalam kondensor secara kontinyu akan membasahi sampel dan secara teratur pelarut yang digunakan dapat diuapkan kembali dan dipisahkan dari analit. Sokletasi dapat dihentikan dengan cara menghentikan pemanasan (Meisarani & Ramadhania, 2014).

2.5. Metode Ekstraksi Panas

Merupakan metode ekstraksi yang dilakukan dengan pemanasan

dengan suhu tertentu, macamnya yaitu:

2.5.1. Refluks

Refluks adalah ekstraksi dengan pelarut pada temperatur titik didihnya selama waktu tertentu dan dalam jumlah pelarut terbatas yang relatif konstan dengan adanya pendingin balik.

2.5.2. Digesti

Digesti adalah maserasi dengan pengadukan kontinyu pada temperatur yang lebih tinggi dari temperatur kamar yaitu 40-50°C.

2.5.3. Infus

Infus adalah ekstraksi menggunakan pelarut air pada temperatur penangas air (bejana infus tercelup dalam penangas air mendidih, temperatur terukur 90⁰ C selama 15 menit.

2.5.4. Dekok

Dekok adalah ekstraksi menggunakan pelarut air pada temperatur 90°selama 30 menit.

2.5.5. Sokletasi

Sokletasi adalah metode ekstraksi untuk bahan yang tahan pemanasan dengan cara meletakkan bahan yang akan diekstraksi dalam sebuah kantung ekstraksi (kertas kering) didalam sebuah alat ekstraksi dari gelas yang bekerja kontinyu (Adrianta *et al.*, 2017).

2.6. Spektrofotometri UV-Vis

Sebelum permulaan abad kedua puluh, hampir semua analisis kuantitatif menggunakan teknik volumetrik dan *gravimetrik* sebagai metode analisis. Dengan kedua teknik ini, analisis memperoleh hasil dengan akurasi yang tinggi, akan tetapi analisis akan dibatasi dengan suatu kenyataan bahwa kedua teknik ini tidak dapat menganalisis analit dalam jumlah yang sangat kecil. Karena alasan ilmiah, maka metode analisis yang dikembangkan diarahkan untuk mampu menganalisis analit dalam jumlah sekelumit. Salah satu metode yang dikembangkan adalah kolorimetri (metode analisis dengan

mengukur warna yang sudah ada) (Wahyuni, 2015).

Salah satu contoh analisis kolorimetri yang awal adalah metode *Nessler* untuk analisis ammonia, yang pertama kali diusulkan pada tahun 1856. *Nessler* menemukan bahwa penambahan larutan alkali HgI_2 dan KI pada larutan ammonia encer menghasilkan warna kuning sampai coklat kemerahan, yang mana warna tersebut ditentukan oleh konsentrasi ammonia. Perbandingan antara warna sampel dengan warna standar digunakan untuk menentukan konsentrasi ammonia dalam sampel. Kolorimetri yang mana sampel menyerap sinar tampak (*visible*), merupakan salah satu contoh metode analisis secara spektroskopi. Selama abad kedua puluh, spektroskopi telah berkembang melibatkan melibatkan berbagai macam radiasi elektromagnetik (spektroskopi foton) seperti sinar-X, gelombang mikro, gelombang radio, dan juga partikel-partikel energetik seperti elektron-elektron dan ion-ion. Spektroskopi didefinisikan sebagai interaksi antara radiasi elektromagnetik (REM) dalam sampel. Jika panjang gelombang REM yang digunakan bersesuaian dengan panjang gelombang ultraviolet-visible maka disebut spektroskopi ultraviolet-visibel yang biasa disebut *UV-Vis*, sementara itu, jika panjang gelombang REM yang digunakan bersesuaian dengan panjang gelombang infra merah maka disebut spektroskopi infra merah, dan sebagainya.

Spektrofotometer *UV/Tidak Tampak* mengumpulkan data pada kisaran yang diinginkan dan akan menghasilkan spectrum senyawa yang dianalisis sebagai suatu grafik yang menggambarkan transmittan (atau sebagai

absorban ϵ /sumbu y sebagai fungsi panjang gelombang (sumbu x) dalam nanometer yang merupakan satuan yang disarankan untuk digunakan dalam daerah ini sebanding cm^{-1}

Dalam spektroskopi, transmittan (T) merupakan suatu ukuran penguatan berkas sinar monokromatik yang didasarkan pada perbandingan antara intensitas sinar yang ditransmisikan (I) dan sinar yang mengenai (I^0) sesuai dengan apakah sampel ditempatkan, atau tidak, pada jalan optik antara sumber sinar dan *detector*. T diekspresikan sebagai fraksi atau sebagai presentasi.

2.6.1 Faktor-faktor yang mempengaruhi penyerapan *UV-Vis*

- a. Adanya gugus-gugus penyerap (kromofor)
- b. Pengaruh pelarut yang digunakan sampel untuk melarutkan sampel
- c. Pengaruh suhu
- d. Ion-ion anorganik
- e. Pengaruh pH

2.6.2 Instrumentasi Spektrofotometer *UV-Vis*

Spektrofotometer yang sesuai untuk pengukuran di daerah spektrum ultraviolet dan sinar tampak terdiri atas suatu sistem optik dengan kemampuan menghasilkan sinar monokromatis dalam jangkauan panjang gelombang 200-800 nm. Suatu diagram sederhana spektrofotometer *UV-Vis* ditunjukkan dalam gambar 2.3.



Gambar 2. 3 Spektrofotometer *UV-Vis* (Nazar, M., dan Hasan, 2018)

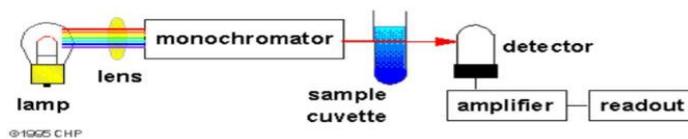
Tabel 2. 3 Spektrum cahaya tampak dan warna komplementer

Panjang gelombang (nm)	Warna	Warna komplementer
400-435	Violet	Kuning-Hijau
435-480	Biru	Kuning
480-490	Hijau-biru	Orange
490-500	Biru-Hijau	Merah
500-560	Hijau	Ungu
560-580	Kuning-Hijau	Violet
595-610	Kuning	Biru
610-750	Orange	Hijau-biru

Sumber: (Underwood, 2001).

2.6.3. Prinsip Spektrofotometer *UV-Vis*

Spektrofotometer adalah alat yang digunakan untuk analisa pada spektrofotometri. Spektrofotometer merupakan alat yang terdiri dari spektrometer dan fotometer. Spektrometer menghasilkan sinar dengan panjang gelombang tertentu dan fotometer mengukur intensitas sinar (Basett *et al.*, 1994). Hukum *Lambert-Beer* merupakan prinsip kerja dari spektrofotometer, seberkas sinar dilewatkan suatu larutan pada panjang gelombang tertentu, sehingga sinar tersebut sebagian ada yang diteruskan dan sebagian lainnya diserap oleh larutan (Warono dan Syamsudin, 2013). Gambar 2.4 menunjukkan prinsip kerja Spektrofotometer *UV-Vis*.



Gambar 2. 4 Prinsip kerja Spektrofotometer *UV-Vis* (Jones,2016)

Pada spektrofotometer *UV-Vis* interaksi yang diamati adalah adanya absorbansi pada panjang gelombang tertentu di daerah *UV-Vis* oleh sampel yang dianalisa. Absorbansi dengan ketelitian antara 0,2 - 0,8 nm (Huda., 2001). Spektrofotometer *UV-Vis* memanfaatkan sinar dengan panjang gelombang 180 - 380 nm untuk daerah *UV* dan 380 - 780 nm untuk daerah *visible* atau sinar tampak (Warono dan Syamsudin., 2013).

Pelarut yang digunakan untuk prosedur spektrofotometrik menyebabkan problem pada beberapa daerah spektrum. Pelarut tidak hanya melarutkan sampel, tetapi juga tidak boleh menyerap cukup banyak dalam daerah dimana penetapan itu dibuat. Air adalah pelarut yang bagus karena tembus cahaya di seluruh daerah tampak dan turun sampai panjang gelombang sekitar 200 nm di daerah *ultraviolet*. Akan tetapi karena air merupakan pelarut yang jelek bagi banyak senyawa organik maka seharusnya pelarut organik digunakan metanol, etanol, dan dieter yang tembus cahaya terhadap radiasi *ultraviolet* (Day and Underwood., 1986).

Keuntungan dari pemakaian spektrofotometer *UV* dan sinar tampak pada analisis kuantitatif yaitu dapat digunakan untuk zat organik dan anorganik. Pada beberapa zat harus dirubah dulu menjadi

senyawa berwarna sebelum dianalisa, selektif dan mempunyai ketelitian yang tinggi, dengan kesalahan 1% - 3%, akan tetapi kesalahan ini dapat diperkecil lagi. Dapat dilakukan dengan cepat dan tepat (Triyati., 1985).

2.6.4. Komponen Spektrofotometer

a. Sumber radiasi

Sumber radiasi berfungsi memberikan energi radiasi pada daerah panjang gelombang yang tepat untuk pengukuran dan mempertahankan intensitas sinar yang tetap pada pengukuran (Warono and Syamsudin., 2013). Sumber radiasi untuk daerah tampak, daerah ultraviolet dekat dan inframerah dekat menggunakan sebuah lampu pijar dengan kawat rambut terbuat dari *wolfram*. Energi yang dipancarkan oleh kawat yang di panaskan itu sesuai panjang gelombangnya (Day and Underwood., 1986). Lampu hidrogen atau lampu deuterium digunakan sebagai sumber radiasi *UV*. Gas hidrogen atau deuterium diisi ke dalam bola lampu yang dilengkapi dengan elektroda dan bila diberi tegangan listrik akan mengeksitasi elektron selanjutnya akan menghasilkan radiasi emisi cahaya sebagai sumber tenaga radiasi (Sitorus., 2009).

b. Monokromator

Radiasi yang didapat dari berbagai sumber radiasi yaitu sinar polikromatis (banyak panjang gelombang). Monokromator berfungsi mengurai sinar tersebut menjadi monokromatis sesuai

yang di inginkan. Monokromator terbuat dari bahan optik yang berbentuk prisma (Sitorus., 2009).

c. Tempat Sampel

Sel atau kuvet adalah tempat bahan yang akan diukur serapannya. Kuvet dibuat dari bahan yang tidak menyerap radiasi pada daerah yang digunakan, biasanya terbuat dari kaca tembus sinar tetapi bisa pula terbuat dari plastik (Warono and Syamsudin., 2013). Bahan yang dijadikan kuvet tidak boleh bereaksi dengan sampel dan pelarut. Bahan *quarts* digunakan untuk sinar *UV*. Bahan gelas biasa dapat digunakan untuk sinar tampak akan tetapi penggunaan *Quarts* lebih baik (Sitorus., 2009).

d. Fotosel

Fotosel berfungsi menangkap cahaya yang diteruskan zat dan kemudian mengubahnya menjadi energi listrik yang kemudian akan disampaikan ke detektor (Warono and Syamsudin., 2013).

e. Detektor

Detektor berfungsi untuk mengubah tenaga radiasi menjadi arus listrik atau pengubah panas lainnya dan biasanya terintegrasi dengan pencatat. Tenaga cahaya yang diubah menjadi tenaga listrik akan mencatat secara kuantitatif tenaga cahaya tersebut. Persyaratan detektor yang baik adalah memiliki sensitifitas yang tinggi dan sinyal elektronik mudah diperjelas (Sitorus., 2009).

f. Pembacaan

Tampilan mengubah sinar listrik dari detektor menjadi pembacaan

yang berupa meter atau angka yang sesuai dengan hasil analisis (Warono dan Syamsudin, 2013).

2.6.5. Hal yang perlu diperhatikan dalam analisis secara Spektrofotometri *UV-Vis*

Ada beberapa hal yang harus diperhatikan dalam analisis dengan spektrofotometri *UV-Vis* terutama untuk senyawa yang semula tidak berwarna yang akan dianalisis dengan spektrofotometri *visible* karena senyawa tersebut harus diubah terlebih dahulu menjadi senyawa yang berwarna. Berikut adalah tahapan-tahapan yang harus diperhatikan (Prabawati, 2015).

a. Pembentukan molekul yang dapat menyerap sinar *UV-Vis*

Hal ini perlu dilakukan jika senyawa yang dianalisis tidak menyerap pada daerah tersebut. Cara yang digunakan adalah dengan merubah menjadi senyawa lain atau direaksikan dengan pereaksi tertentu. Pereaksi yang digunakan harus memenuhi beberapa persyaratan yaitu: (a) reaksinya selektif dan sensitif; (b) reaksinya cepat, kuantitatif dan reproduibel; (c) hasil reaksi stabil dalam jangka waktu yang lama. Keselektifan dapat dinaikkan dengan mengatur pH, pemakaian masking agent, atau penggunaan teknik ekstraksi.

Sebagai contoh adalah analisis obat-obat golongan sulfonamide (misalkan, sulfisoksazol yang pada dasarnya tidak berwarna) dengan cara mengubahnya menjadi senyawa yang berwarna setelah sulfonamida tersebut didiazotasi dan dikopling dengan naftil etilen diamin (NED).

b. Waktu pengoperasian (*operating time*)

Cara ini biasa digunakan untuk pengukuran hasil reaksi atau pembentukan warna. Tujuannya adalah untuk mengetahui waktu pengukuran yang stabil. Waktu operasional ditentukan dengan mengukur hubungan antara waktu pengukuran dengan absorbansi larutan (Nugraheni *et al.*, 2021). Semakin lama waktu pengukuran, maka ada kemungkinan senyawa yang berwarna tersebut menjadi rusak atau terurai sehingga intensitas warnanya turun, yang menyebabkan absorbansinya juga turun. Karena alasan inilah, maka untuk pengukuran senyawa berwarna harus dilakukan pada saat waktu operasional.

c. Pemilihan panjang gelombang

Panjang gelombang yang digunakan untuk analisis kuantitatif adalah panjang gelombang yang mempunyai absorbansi maksimal. Untuk memilih panjang gelombang maksimal, dilakukan dengan membuat kurva hubungan antara absorbansi dengan panjang gelombang dari suatu larutan baku pada konsentrasi tertentu (Underwood, 2001).

Ada beberapa alasan mengapa harus menggunakan panjang gelombang maksimal, yaitu: (1) panjang gelombang maksimal, kepekaannya juga maksimal karena pada panjang gelombang maksimal tersebut, perubahan absorbansi untuk setiap satuan konsentrasi adalah paling besar; (2) disekitar panjang gelombang maksimal, bentuk kurva absorbansi datar dan pada kondisi tersebut hukum Lambert-Beer akan terpenuhi;

(3) jika dilakukan pengukuran ulang maka kesalahan yang disebabkan oleh pemasangan ulang panjang gelombang akan kecil sekali. Ada beberapa variabel yang dapat mempengaruhi absorbansi yaitu: jenis pelarut, pH larutan, suhu, konsentrasi yang tinggi, dan adanya zat-zat pengganggu.

d. Pembuatan kurva baku

Dibuat seri larutan baku dari zat yang akan dianalisis dengan berbagai konsentrasi. Masing-masing absorbansi larutan dengan berbagai konsentrasi diukur, kemudian dibuat kurva yang merupakan hubungan antara absorbansi dengan konsentrasi (Nugraheni *et al.*, 2021).

e. Pembacaan absorban sampel atau cuplikan

Dibuat seri larutan baku dari zat yang akan dianalisis dengan berbagai konsentrasi. Masing-masing absorbansi larutan dengan berbagai konsentrasi diukur, kemudian dibuat kurva yang merupakan hubungan antara absorbansi dengan konsentrasi (Underwood, 2001).

Dibuat seri larutan baku dari zat yang akan dianalisis dengan berbagai konsentrasi. Masing-masing absorbansi larutan dengan berbagai konsentrasi diukur, kemudian dibuat kurva yang merupakan hubungan antara absorbansi dengan konsentrasi (Nugraheni *et al.*, 2021).

2.7. Metode Uji Antioksidan

DPPH (*1,1-diphenyl-2-picrylhydrazil*) merupakan radikal bebas yang stabil pada suhu kamar dan sering digunakan untuk mengevaluasi aktivitas beberapa senyawa atau ekstrak bahan alam. DPPH menerima

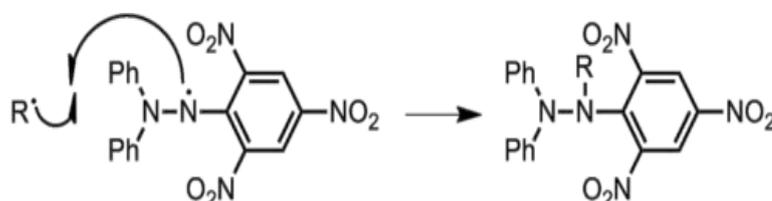
elektron atau radikal hidrogen sehingga membentuk molekul diametik yang stabil. Interaksi antioksidan dengan DPPH baik secara transfer elektron atau radikal hidrogen pada DPPH, akan menetralkan karakter radikal bebas dari DPPH. Jika semua elektron pada radikal bebas DPPH menjadi berpasangan, maka warna larutan akan berubah dari warna ungu tua menjadi kuning terang dan absorbansi pada panjang gelombang 517 nm akan menghilang. Perubahan ini dapat diukur pada stoikiometri sesuai dengan jumlah elektron atau atom hidrogen yang ditangkap oleh molekul DPPH akibat adanya zat antioksidan (Nabilla, 2012).

Prinsip dari uji antioksidan dengan metode DPPH adalah terjadinya perubahan warna larutan yaitu: perubahan warna ungu menjadi ungu pudar dan kuning. Perubahan warna dari ungu menjadi ungu pudar dan kuning karena absorptivitas molar dari molekul DPPH. Perubahan warna tersebut berdasarkan jumlah elektron yang tertangkap. Radikal bebas DPPH yang memiliki elektron bebas yang tidak berpasangan memberikan warna ungu. Perubahan warna yang terjadi disebabkan adanya ikatan antara elektron DPPH dengan atom hidrogen yang mengindikasikan adanya peningkatan kemampuan antioksidan dalam menangkal radikal bebas. Jika semua elektron pada radikal bebas DPPH menjadi berpasangan, maka warna larutan berubah dari ungu tua menjadi kuning terang dan absorbansi pada panjang gelombang 517 nm akan menghilang. Dengan demikian semakin besar konsentrasi larutan, maka semakin memudar warna larutan dan absorbansinya semakin kecil (Nabiella,

2012).

Menurut metode Blois ekstrak metanol (4 mL pada 0,5 mg/mL) ditambahkan sampai 1 mL DPPH (1 mM dalam larutan metanol) di dalam 5 mL botol penutup. Campuran diaduk rata dan disimpan dalam temperatur ruangan selama 10 menit. Lalu diukur absorbansinya dengan spektrofotometer *UV-Vis* (Nabiella, 2012).

Parameter yang dipakai untuk menunjukkan aktivitas antioksidan adalah nilai konsentrasi efisien atau *efficient concentration* (EC_{50}) atau *inhibition concentration* (IC_{50}) yaitu konsentrasi suatu zat antioksidan yang dapat menyebabkan 50% DPPH kehilangan karakter radikal bebas atau konsentrasi suatu zat antioksidan tinggi akan mempunyai harga EC_{50} atau IC_{50} rendah. Gambar 2.5 menunjukkan reaksi DPPH dengan senyawa antioksidan.



Gambar 2. 5 Reaksi DPPH Dengan Senyawa Antioksidan
(Sumber : Martysiak-Zurowska & Wenta., 2012)

2.8. Landasan Teori

Penetapan kadar antosianin total pada ekstrak etanol 70% bunga telang dengan menggunakan metode *diferensial* pH merupakan perhitungan melalui sinar tampak pada pH yang berbeda. Penelitian mengenai kandungan antosianin banyak ditemukan pada tanaman adalah sianidin-3-glukosida dengan absorptivitas molar (ϵ) sebesar 26,900.

Umumnya *sianidin-3-glukosida* digunakan sebagai senyawa referensi dari antosianin (Bridgers, 2010). Asen *et al.* (1972) dan Dangles *et al.* (1993) menyatakan bahwa kopigmentasi intermolekuler antara pigmen warna antosianin dengan senyawa kopigmen ditandai dengan adanya pergeseran antara batokromik dan hiperkromik. Pergeseran batokromik (*red shift* atau *bathochromic effect*) merupakan pergeseran pada puncak serapan ke arah panjang gelombang yang lebih besar. Hal ini terjadi karena adanya substitusi gugus glikon maupun aglikon atau pengaruh pelarut. Efek hiperkromik merupakan efek yang dapat disebabkan oleh gugus fungsi sehingga menyebabkan adanya kenaikan nilai intensitas serapan maksimum.

Penambahan gugus hidroksil menghasilkan pergeseran ke arah warna hijau (pelargonidin → sianidin → delphinidin), dimana pembentukan glikosida dan metilasi menghasilkan pergeseran ke arah warna merah (pelargonidin → pelargonidin-3-glukosida; sianidin → peonidin) (Sari, dkk., 2005).

Menurut penelitian Purwaniati *et al* (2020) Kadar antosianin total yang didapat pada sediaan bunga telang segar ($0,13 \pm SD 0,0050$) lebih banyak dibanding bentuk sediaananya berupa teh bunga telang ($0,16 \pm SD 0,0047$) karena bunga telang segar masih belum mengalami proses pemanasan ataupun pengawetan untuk pengonsumsian di masyarakat. Untuk sediaan bunga telang kandungan antosianin tertinggi terdapat pada sediaan tea bag karena bidang kontak dengan air lebih banyak. Perbedaan

suhu juga mempengaruhi kadar antosianin yang didapatkan, semakin tinggi suhu semakin banyak antosianin yang didapat saat penyeduhan, namun kadar antosianin akan menurun pada suhu 100⁰C karena terjadi degradasi pada antosianin.

Menurut penelitian Makasana *et al*, (2017) warna pada bunga telang selain ungu juga berupa biru dan merah yang disebabkan oleh adanya senyawa antosianin. Kandungan senyawa fitokimia antosianin pada bunga telang memiliki kestabilan yang baik sehingga dapat digunakan sebagai pewarna alami lokal pada industri pangan. Kandungan fitokimia lain yang terdapat pada bunga telang seperti flavonoid. Kandungan flavonoid pada bunga telang dapat berperan sebagai sumber antioksidan. Kandungan flavonoid tersebut dapat dikembangkan pada berbagai industri pangan. Sehingga selain meningkatkan atribut mutu terhadap warna juga dapat memberikan efek terhadap kesehatan. Menurut Nur Anisa Binti, (2019) *Clitoria ternatea L.* atau yang dikenal dengan nama bunga telang tanaman yang banyak digunakan dalam bidang kesehatan seperti antidiabetes, antiinflamasi, antimikroba, antikanker, analgesik, antipiretik dan mengandung kandungan metabolit sekunder yang berperan sebagai antioksidan. Hasil penelitian ini menunjukkan bahwa, ekstrak bunga telang memiliki aktivitas antioksidan sedang dengan nilai IC₅₀ (inhibition concentration 50%) lebih dari 200 ppm.

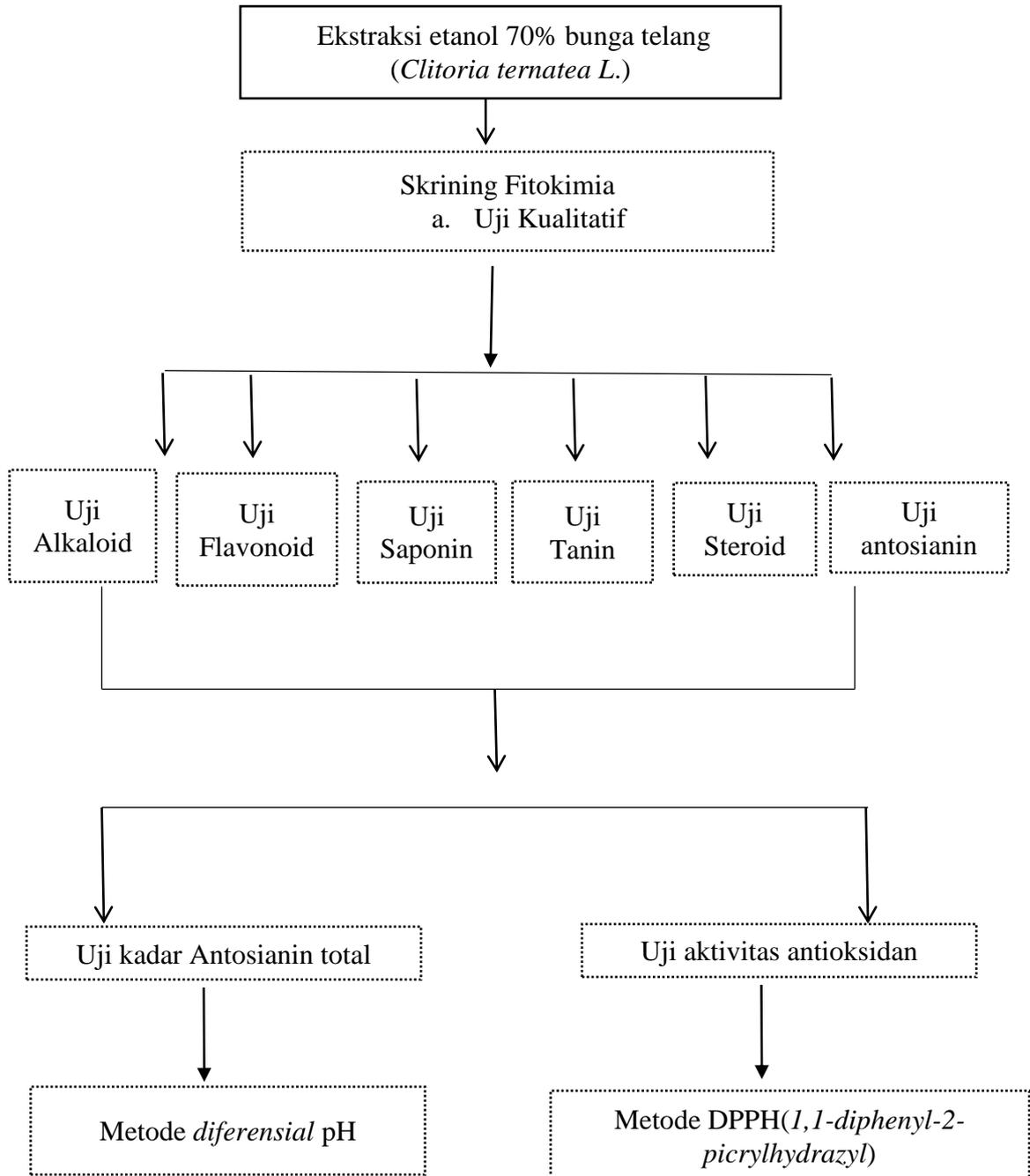
Menurut Disa Andriani (2020), bunga telang (*Clitoria ternatea L.*) mengandung senyawa fenolik yang dapat berperan sebagai antioksidan

dengan mendonorkan hidrogen sehingga menstabilkan kekurangan elektron pada radikal bebas. Penelitian ini bertujuan untuk mengetahui potensi antioksidan ekstrak etanol bunga telang dengan melihat nilai IC_{50} . Bunga telang diekstraksi dengan metode maserasi menggunakan pelarut etanol 70%. Potensi antioksidan ditetapkan dengan metode DPPH (*1,1-diphenyl-2-picrylhydrazyl*) dengan pembandingan vitamin C yang sudah terbukti memiliki potensi radikal bebas yang sangat poten. Hasil penelitian menunjukkan nilai IC_{50} ekstrak etanol bunga telang adalah $41,36 \pm 1,19$ $\mu\text{g/mL}$.

Berdasarkan penelitian Nithianantham (2013), senyawa fitokimia yang terdeteksi pada bunga telang yaitu flavonoid glikosida, seperti rutin, *delphinidin*, *kaempferol*, *quercetin* dan *malvidin*. Penelitian (Lamsaard *et al.*, 2014) membandingkan aktivitas antioksidan metode DPPH antara bunga telang dan vitamin C. Vitamin C memiliki nilai IC_{50} sebesar $(5,34 \pm 0,09)$ $\mu\text{g/ml}$ sedangkan ekstrak bunga telang memiliki nilai IC_{50} sebesar $(84,15 \pm 1,50)$ $\mu\text{g/ml}$. Dalam penelitian tersebut juga menyebutkan bahwa ekstrak bunga telang memiliki kekuatan yang tinggi dalam mereduksi besi.

Berdasarkan informasi tersebut dapat mendukung penelitian penulis tentang penetapan kadar antosianin total dan uji aktivitas antioksidan ekstrak etanol 70% bunga telang (*Clitoria ternatea L.*) dengan metode DPPH (*1,1-diphenyl -2-picrylhydrazyl*).

2.9. Kerangka konsep



Gambar 2. 6 Kerangka konsep

 : Variabel bebas

 : Variabel terikat

2.10. Hipotesis

- a. Ekstrak etanol 70% bunga telang (*Clitoria ternatea L.*) tersebut mempunyai kadar antosianin total
- b. Ekstrak etanol 70% bunga telang (*Clitoria ternatea L.*) tersebut mempunyai aktivitas antioksidan