

BAB IV HASIL DAN PEMBAHASAN

A. Hasil

1. Determinasi tanaman sambung nyawa

Determinasi tanaman bertujuan untuk mendapatkan kebenaran tanaman yang akan diuji agar terhindar dari kesalahan pengumpulan bahan ataupun tercampurnya tanaman yang diteliti dengan tanaman lain (Klau *et al.*, 2021). Determinasi tanaman dilakukan di B2P2TOOT Tawangmangu. Penyerahan tanaman untuk dideterminasi yaitu pada tanggal 29 Juli 2024 dengan nomor SK TL.02.04/D.XI.6/16634.910/2024. Hasil determinasi tanaman menunjukkan bahwa tanaman yang digunakan pada penelitian ini benar tanaman sambung nyawa dengan nama latin *Gynura procumbens* (Lour.) Merr (Lampiran 1).

2. Persiapan sampel

Daun sambung nyawa yang digunakan pada penelitian diperoleh dari kebun Dopleng di daerah Dopleng, Kecamatan Karangpandan, Kabupaten Karanganyar yang dipetik pada pagi hari sebanyak \pm 5 kg. Kemudian, dilakukan sortasi basah dengan mencuci menggunakan air mengalir dan dikeringkan dengan oven selama 2 hari pada suhu 50°C (Sari *et al.*, 2024). Kemudian, daun sambung nyawa yang sudah kering dihaluskan dan diayak sehingga diperoleh serbuk halus sebesar 550 g.

3. Pembuatan ekstrak dari daun sambung nyawa

Pada penelitian ini, dilakukan proses ekstraksi menggunakan metode UAE yang diperoleh hasil % rendemen pada tiap variasi waktu yang ditunjukkan pada Tabel 5. Rendemen ekstrak yang didapatkan dihitung sebagai persentase perbandingan bobot ekstrak yang dihasilkan terhadap bobot serbuk daun sambung nyawa yang digunakan saat diekstraksi. Berdasarkan Farmakope Herbal Indonesia Edisi II persyaratan % rendemen ekstrak daun sambung nyawa tidak kurang dari 7,2% (Kementrian Kesehatan RI, 2017). Hasil nilai %rendemen menunjukkan bahwa variasi waktu ekstraksi

menit ke 15, 30, 45, dan 60 tidak memenuhi syarat. Sedangkan variasi waktu ekstraksi menit ke 75 memenuhi syarat.

Tabel 5. Nilai % Rendemen Tiap Variasi Waktu

Waktu Ekstraksi (menit)	Berat simplisia (g)	Berat wadah + ekstrak (g)	Berat wadah kosong (g)	Berat ekstrak (g)	Rendemen (%)
15	100	120.0	115.9	4.1	4.1
30	100	119.0	113.2	5.8	5.8
45	100	121.2	115.9	5.3	5.3
60	100	118.6	112.4	6.2	6.2
75	100	113.5	105.7	7.8	7.8

4. Uji organoleptik

Dari pengujian yang dilakukan pada ekstrak daun sambung nyawa didapatkan sifat fisik dari ekstrak daun sambung nyawa pada Tabel 6 yaitu seluruh ekstrak daun sambung nyawa berwarna coklat, berbau khas, dan memiliki tekstur yang kental.

Tabel 6. Uji organoleptik ekstrak daun sambung nyawa

Uji	Hasil	Teori (Kementrian Kesehatan RI, 2017)
Warna	Coklat	Coklat
Bau	Khas daun sambung nyawa	Khas daun sambung nyawa
Tekstur	Ekstrak kental	Ekstrak kental

5. Penetapan kadar air

Tabel 7. Hasil Kadar Air Ekstrak Kental Tiap Variasi Waktu Ekstraksi

Waktu ekstraksi (menit)	Hasil kadar air (%)	Teori (Kementrian Kesehatan RI, 2017)	Keterangan
15	1.38		
30	1.58		
45	1.98	≤10 %	Memenuhi syarat
60	2.22		
75	2.51		

Kadar air dalam ekstrak sebaiknya tidak melebihi kadar yang telah dipersyaratkan yaitu $\leq 10\%$ (Kementrian Kesehatan RI, 2017). Hasil penetapan kadar air ekstrak tiap variasi waktu ekstraksi dengan menggunakan UAE dapat dilihat pada Tabel 7. Hasil menunjukkan bahwa seluruh ekstrak telah memenuhi kadar air yang telah dipersyaratkan.

6. Uji skrining fitokimia

Tabel 8. Hasil Skrining Fitokimia

Jenis uji	Reagen	Teori (Sari <i>et al.</i> , 2024).	Waktu ekstraksi (menit)				
			15	30	45	60	75
Alkaloid	Mayer	Endapan putih/kuning	- (tidak terbentuk endapan)	- (tidak terbentuk endapan)	- (tidak terbentuk endapan)	- (tidak terbentuk endapan)	- (tidak terbentuk endapan)
	Wagner	Endapan coklat	+ (terbentuk endapan coklat)	+ (terbentuk endapan coklat)	+ (terbentuk endapan coklat)	+ (terbentuk endapan coklat)	+ (terbentuk endapan coklat)
	Dragendorff	Endapan jingga	+ (terbentuk endapan jingga)	+ (terbentuk endapan jingga)	+ (terbentuk endapan jingga)	+ (terbentuk endapan jingga)	+ (terbentuk endapan jingga)
Flavonoid	Serbuk Mg + HCl	Berwarna merah/kuning/jingga	+ (perubahan warna kuning)	+ (perubahan warna kuning)	++ (perubahan warna kuning)	++ (perubahan warna kuning)	+ (perubahan warna kuning)
Saponin	Aquades + HCl 2N	Buih yang stabil	++ (terbentuk buih yang stabil)	+ (terbentuk buih yang stabil)	+ (terbentuk buih yang stabil)	+ (terbentuk buih yang stabil)	+ (terbentuk buih yang stabil)
Tanin	Etanol + FeCl ₃ 1%	Berwarna biru kehitaman	+ (perubahan biru kehitaman)	+ (perubahan biru kehitaman)	+ (perubahan biru kehitaman)	++ (perubahan biru kehitaman)	+ (perubahan biru kehitaman)
Fenolik	FeCl ₃ 1% + Etanol	Berwarna ungu kehitaman	+ (perubahan ungu kehitaman)	+ (perubahan ungu kehitaman)	++ (perubahan ungu kehitaman)	+ (perubahan ungu kehitaman)	+ (perubahan ungu kehitaman)
Terpenoid	Etanol + Pereaksi bouchardat	Berwarna jingga kecoklatan	++ (perubahan jingga kecoklatan)	++ (perubahan jingga kecoklatan)	+++ (perubahan jingga kecoklatan)	++ (perubahan jingga kecoklatan)	+ (perubahan jingga kecoklatan)
Keterangan :							
+			= Terjadi perubahan warna larutan				
++			= Warna pekat pada larutan				
+++			= Warna lebih pekat pada larutan				

Pengujian skrining fitokimia dilakukan untuk mengidentifikasi secara kualitatif kandungan senyawa metabolit sekunder pada ekstrak, sehingga dapat menjadi gambaran terkait kandungan zat aktif dalam ekstrak (Arianta *et al.*, 2022). Hasil pengujian menunjukkan bahwa ekstrak daun sambung nyawa positif mengandung alkaloid, flavonoid, fenolik, tanin, saponin, dan terpenoid.

Hasil uji skrining fitokimia dapat dilihat pada Tabel 8 dan gambar hasil dapat dilihat pada Lampiran 4.

7. Kromatografi Lapis Tipis

a. Identifikasi flavonoid

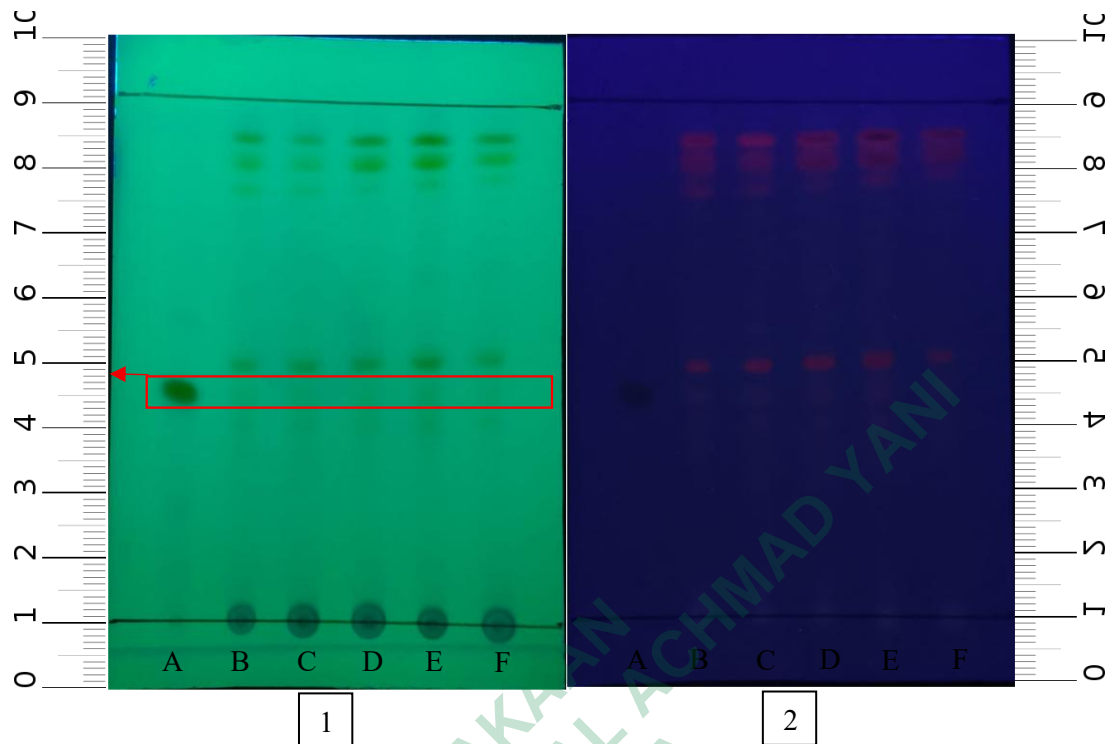
Dilakukan analisis secara kualitatif pada daun sambung nyawa dengan menggunakan metode KLT. Adanya analisis kualitatif dengan KLT ini bertujuan untuk mengidentifikasi senyawa penanda yaitu kuersetin pada sampel daun sambung nyawa tiap variasi waktu ekstraksi. Fase diam yang digunakan pada penelitian ini adalah plat silika GF₂₅₄ sedangkan untuk fase gerak dilakukan tahap optimasi terlebih dahulu. Hasil optimasi fase gerak yang dilakukan dapat dilihat pada Tabel 9 dan Lampiran 6.

Tabel 9. Hasil Optimasi Fase Gerak Pada KLT Uji Senyawa Flavonoid Sambung Nyawa

No.	Fase Gerak	Hasil
1.	Toluen: Aseton: Asam Format (6:2:2)	Standar dan sampel terlihat samar namun terjadi tailing pada sampelnya
2.	n-heksan: Etil Asetat: Etanol (1:8:1)	Standar dan sampel hingga batas atas
3.	n-heksan: Etil Asetat: Asam Format (6:4:0,2)	Terjadi elusi standar dan pemisahan sampel yang baik dan terdapat senyawa dengan Rf sama seperti standar yaitu 0,475

Berdasarkan hasil optimasi, diperoleh fase gerak yang optimal adalah n-heksan: etil asetat: asam format (6:4:0,2 v/v/v) dengan konsentrasi standar kuersetin yang digunakan adalah 1000 ppm. Hasil uji KLT dengan fase gerak n-heksan: etil asetat: asam format (6:4:0,2 v/v/v) untuk identifikasi senyawa flavonoid terhadap variasi waktu ekstraksi dapat dilihat pada Gambar 17.

Berdasarkan hasil pada Gambar 17, terlihat secara visual terdapat bercak yang sejajar antara sampel dengan standar kuersetin. Deteksi senyawa ditandai dengan bercak dan didapatkan nilai Rf yang dapat diamati pada UV 254 dan 365 nm. Hasil pengamatan dan perhitungan Rf dari bercak KLT tertera pada Tabel 10.



Gambar 17. Profil KLT Variasi Waktu Ekstrak Daun Sambung Nyawa
 Keterangan: (1) Deteksi dengan UV 254 nm, (2) Deteksi dengan UV 365 nm. (A) Kuersetin; (B) Ekstrak menit ke 15; (C) Ekstrak menit ke 30; (D) Ekstrak menit ke 45; (E) Ekstrak menit ke 60; (F) Ekstrak menit ke 75. Fase diam = silika GF₂₅₄; Fase gerak = n-heksan: etil asetat: asam format (6:4:0,2 v/v/v).

Tabel 10. Hasil Elusi Pada KLT Uji Senyawa Flavonoid

	Rf	UV 254 nm	UV 365 nm
Standar	0,475	Kuning kehitaman	Hitam
15	0,387	Kuning samar	Kuning samar
	0,475	Kuning samar	Kuning samar
	0,512	Kuning	Merah kehitaman
	0,843	Kuning kehitaman	Merah
	0,9	Kuning kehitaman	Merah
	0,956	Kuning kehitaman	Merah
	30	0,387	Kuning samar
0,475		Kuning samar	Kuning samar
0,512		Kuning	Merah kehitaman
0,843		Kuning kehitaman	Merah
0,9		Kuning kehitaman	Merah
0,956		Kuning kehitaman	Merah
45		0,387	Kuning samar
	0,475	Kuning samar	Kuning samar
	0,512	Kuning	Merah kehitaman
	0,843	Kuning kehitaman	Merah kehitaman
	0,9	Kuning kehitaman	Merah

	Rf	UV 254 nm	UV 365 nm
60	0,956	Kuning kehitaman	Merah kehitaman
	0,387	Kuning samar	Kuning samar
	0,475	Kuning samar	Kuning samar
	0,512	Kuning	Merah kehitaman
	0,843	Kuning kehitaman	Merah
	0,9	Kuning kehitaman	Merah kehitaman
75	0,956	Kuning kehitaman	Merah kehitaman
	0,387	Kuning samar	Kuning samar
	0,475	Kuning samar	Kuning samar
	0,512	Kuning	Merah kehitaman
	0,843	Kuning kehitaman	Merah
	0,9	Kuning kehitaman	Merah
	0,956	Kuning kehitaman	Merah

Sampel ekstrak daun sambung nyawa memiliki nilai Rf yang sejajar dengan nilai Rf standar kuersetin yaitu 0,475 dengan adanya bercak berwarna kuning samar di bawah sinar UV 254 nm dan UV 365 nm. Hasil uji KLT diperoleh bahwa pada sampel terdapat bercak yang tidak sejajar dengan standar dengan nilai Rf yang berbeda menunjukkan bahwa sampel mengandung senyawa lainnya.

b. Identifikasi Fenolik

Identifikasi fenolik secara kualitatif menggunakan metode KLT dengan optimasi fase gerak terlebih dahulu. Hasil optimasi fase gerak dapat dilihat pada Tabel 11.

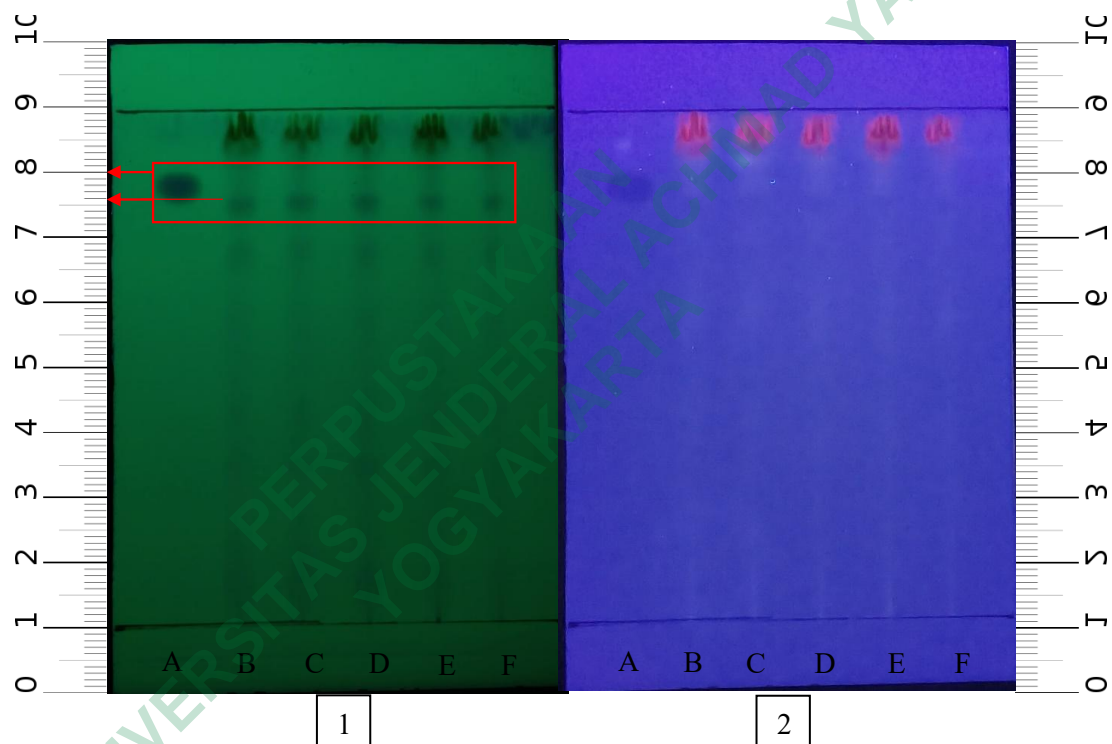
Tabel 11. Hasil Optimasi Fase Gerak Fenolik

No.	Fase Gerak	Hasil
1.	Toluen: Etil Asetat: Asam Format: Metanol (3:4:0,8:0,7)	Standar dan sampel terelusi dengan baik namun sampel tidak ada yang standar
2.	Toluen: Etil Asetat: Asam Format (9:1:0,5)	Tidak terjadi elusi
3.	n-heksan: Etil Asetat: Etanol (1:8:1)	Terjadi elusi standar yang baik dan sampel terjadi pemisahan namun tidak ada senyawa dengan RF yang sama dengan standar
4.	Kloroform: Etil Asetat: Asam Format (0,1:3,9:1) & (1:3:1)	Terjadi elusi standar yang baik dan sampel terjadi pemisahan pada rasio (1:3:1) dengan Rf mirip seperti standar namun pada rasio (0,1:3,9:1) standar dan sampel terelusi hingga batas atas

Hasil optimasi fase gerak diperoleh fase gerak yang optimal adalah kloroform: etil asetat: asam format (1:3:1 v/v/v) dengan asam galat sebagai

pembandingan sampel berkonsentrasi 1000 ppm. Hasil uji KLT dengan fase gerak kloroform: etil asetat: asam format (1:3:1 v/v/v) untuk identifikasi senyawa fenolik terhadap variasi waktu ekstraksi dapat dilihat pada Gambar 18.

Berdasarkan hasil pada Gambar 18, terlihat secara visual terdapat bercak yang sejajar antara sampel dengan standar asam galat. Deteksi senyawa ditandai dengan adanya bercak dan didapatkan nilai Rf yang dapat diamati pada UV 254 nm dan 365 nm. Hasil pengamatan dan perhitungan Rf dari bercak KLT tertera pada Tabel 12.



Gambar 18. Profil KLT Variasi Waktu Ekstrak Daun Sambung Nyawa

Keterangan: (1) Deteksi dengan UV 254 nm, (2) Deteksi dengan UV 365 nm; (A) Asam galat; (B) Ekstrak menit ke 15; (C) Ekstrak menit ke 30; (D) Ekstrak menit ke 45; (E) Ekstrak menit ke 60; (F) Ekstrak menit ke 75. Fase diam = silika GF₂₅₄; Fase gerak = kloroform: etil asetat: asam format (1:3:1 v/v/v).

Tabel 12. Hasil Elusi Pada KLT Uji Senyawa Fenolik

	Rf	UV 254 nm	UV 365 nm
Standar	0,875	Hitam	Hitam
15	0,331	Hitam samar	Bercak tidak terlihat
	0,437	Hitam samar	Bercak tidak terlihat
	0,625	Hitam samar	Bercak tidak terlihat
	0,737	Hitam samar	Bercak tidak terlihat
	0,825	Hitam	Biru samar

	Rf	UV 254 nm	UV 365 nm
	0,987	Hitam	Merah terang
30	0,331	Hitam samar	Bercak tidak terlihat
	0,437	Hitam samar	Bercak tidak terlihat
	0,625	Hitam samar	Bercak tidak terlihat
	0,737	Hitam samar	Bercak tidak terlihat
	0,825	Hitam	Biru samar
	0,987	Hitam	Merah terang
45	0,331	Hitam samar	Bercak tidak terlihat
	0,437	Hitam samar	Bercak tidak terlihat
	0,625	Hitam samar	Bercak tidak terlihat
	0,737	Hitam samar	Bercak tidak terlihat
	0,825	Hitam	Biru samar
	0,987	Hitam	Merah terang
60	0,331	Hitam samar	Bercak tidak terlihat
	0,437	Hitam samar	Bercak tidak terlihat
	0,625	Hitam samar	Bercak tidak terlihat
	0,737	Hitam samar	Bercak tidak terlihat
	0,825	Hitam	Biru samar
	0,987	Hitam	Merah terang
75	0,331	Hitam samar	Bercak tidak terlihat
	0,437	Hitam samar	Bercak tidak terlihat
	0,625	Hitam samar	Bercak tidak terlihat
	0,737	Hitam samar	Bercak tidak terlihat
	0,825	Hitam	Biru samar
	0,987	Hitam	Merah terang

Sampel ekstrak daun sambung nyawa memiliki nilai Rf yang mirip dengan nilai Rf standar asam galat yaitu 0,825 dengan adanya bercak berwarna hitam di bawah sinar UV 254 nm, sedangkan pada UV 365 nm ditandai dengan adanya bercak biru samar. Hasil uji KLT diperoleh bahwa pada sampel terdapat bercak yang tidak sejajar dan mirip standar dengan nilai Rf yang berbeda menunjukkan bahwa sampel mengandung senyawa lainnya.

8. Penetapan kadar flavonoid total
 - a. Penentuan panjang gelombang kuersetin

Penetapan kadar senyawa diawali dengan menemukan panjang gelombang maksimum. Hal tersebut dikarenakan nilai serapan sampel yang diuji harus berada pada panjang gelombang maksimum atau puncak sehingga dapat menghasilkan nilai serapan yang maksimal (Kresnadipayana *et al.*, 2017). Selain itu, faktor dari keadaan preparasi sampel yang berbeda, maka

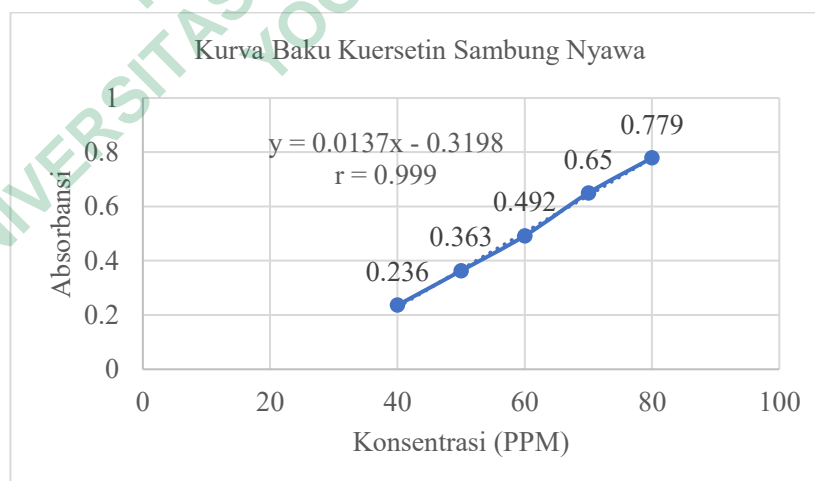
perlu dilakukan penetapan panjang gelombang maksimum pada penelitian ini. Hasil pengukuran panjang gelombang maksimum yang didapatkan pada penelitian ini adalah 427 nm dimana hasil tersebut sama dengan penelitian sebelumnya milik Mustofa *et al.*, (2024).

b. Penentuan *operating time* (OT) kuersetin

Tujuan dilakukannya OT adalah untuk mengetahui waktu optimal antara kuersetin dengan $AlCl_3$ agar dapat bereaksi membentuk kompleks yang sempurna (Suharyanto *et al.*, 2020). Pada penelitian ini, didapatkan waktu yang optimal untuk larutan tetap stabil yaitu pada waktu ke 33 menit. Hasil ini sama dengan penelitian Saputri *et al.*, (2022).

c. Penentuan kurva baku kuersetin

Penentuan kurva baku pada standar kuersetin bertujuan untuk mengetahui hubungan konsentrasi kuersetin dengan nilai absorbansinya sehingga mendapatkan persamaan regresi linear untuk mengukur suatu kadar dari nilai absorbansi yang didapatkan pada spektrofotometer UV-Vis (Saputri *et al.*, 2022). Perhitungan persamaan regresi linear didapatkan dari hubungan antara konsentrasi kuersetin (ppm) dengan absorbansinya. Hasil kurva baku kuersetin dapat diamati pada Gambar 19.



Gambar 19. Grafik kurva baku kuersetin

Berdasarkan kurva baku kuersetin yang telah dibuat, didapatkan persamaan regresi linear antara konsentrasi vs absorbansi yaitu $y = 0,0137x -$

0,03198 dan nilai r sebesar 0,999. Persamaan regresi dari kurva baku kuersetin dapat dilanjutkan untuk menentukan kadar flavonoid total yang terdapat pada sampel tiap variasi waktu ekstraksi.

d. Penentuan kadar flavonoid total

Dilakukan penentuan kadar flavonoid total dengan menggunakan spektrofotometer UV-Vis yang bertujuan untuk mendapatkan kadar flavonoid yang terkandung pada sampel tiap variasi waktu ekstraksi. Hasil penentuan kadar flavonoid total yang terkandung dalam sampel paling tinggi yaitu pada variasi waktu ekstraksi 60 menit, dilanjutkan secara berturut-turut pada menit ke 45, 15, 75, dan 30 yang dapat dilihat pada Tabel 13.

Tabel 13. Hasil perhitungan kadar flavonoid total

Sampel Daun Sambung Nyawa (Menit)	Kadar Flavonoid Total (\bar{X} Flavonoid Total (mg QE/g) \pm CV)
15	51,202 \pm 0,718
30	43,221 \pm 1,822
45	58,988 \pm 1,000
60	68,209 \pm 0,774
75	49,061 \pm 0,310

9. Penetapan kadar fenolik total

a. Penentuan panjang gelombang maksimum asam galat

Diukur panjang gelombang maksimum dari standar asam galat dengan konsentrasi 80 ppm lalu di *scanning* panjang gelombangnya pada rentang 600-800 nm dengan spektrofotometer UV-Vis. Didapatkan panjang gelombang maksimum pada penelitian ini yaitu 767 nm. Hasil panjang gelombang tersebut sama dengan penelitian Qonitah *et al.*, (2019).

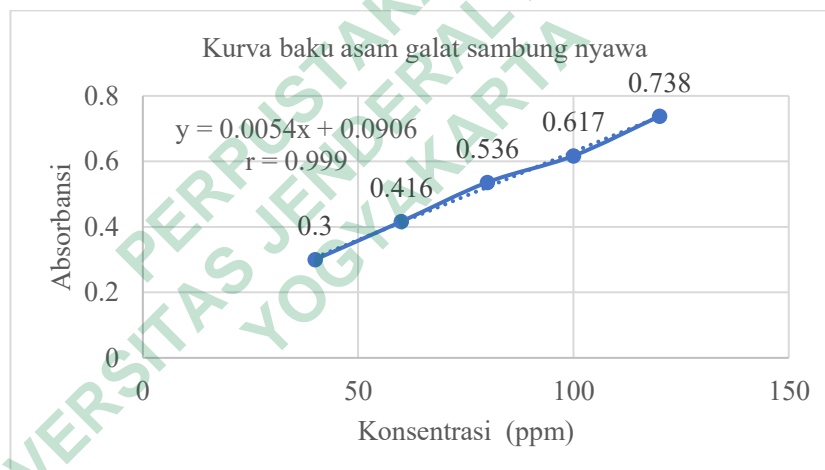
b. Penentuan *operating time* asam galat

Operating time (OT) dilakukan pada penelitian ini untuk mengetahui waktu pengukuran suatu senyawa yang dicari tetap stabil setelah direaksikan. Pada penelitian ini, didapatkan waktu yang optimal untuk larutan tetap stabil yaitu pada waktu ke-43 menit. Hasil ini mendekati dengan penelitian Rizki *et al.*, (2024) yaitu pada menit ke-44.

c. Penentuan kurva baku asam galat

Penentuan kurva baku pada standar asam galat bertujuan untuk mengetahui hubungan konsentrasi asam galat dengan nilai absorbansinya sehingga mendapatkan persamaan regresi linear untuk mengukur suatu kadar dari nilai absorbansi yang didapatkan pada spektrofotometer UV-Vis (Saputri *et al.*, 2022). Perhitungan persamaan regresi linear didapatkan dari hubungan antara konsentrasi asam galat (ppm) dengan absorbansinya. Hasil dari kurva baku asam galat yang telah dilakukan dapat dilihat pada Gambar 20.

Dari kurva baku asam galat yang dibuat, didapatkan persamaan regresi linear hubungan antara konsentrasi vs absorbansi yaitu $y = 0,0054x + 0,0906$ dan nilai r sebesar 0,999. Dari persamaan regresi kurva baku asam galat dapat dilanjutkan untuk menentukan kandungan fenolik total yang terdapat pada sampel variasi waktu.



Gambar 20. Grafik Kurva Baku Asam Galat

d. Penentuan kadar fenolik total

Dilakukan penentuan kadar fenolik total dengan menggunakan spektrofotometer UV-Vis yang bertujuan untuk mendapatkan kadar fenolik yang terkandung pada sampel tiap variasi waktu ekstraksi. Hasil penentuan kadar fenolik total yang terkandung dalam sampel paling tinggi yaitu pada variasi waktu ekstraksi 45 menit, dilanjutkan secara berturut-turut pada menit ke 75, 60, 15, dan 30 yang dapat dilihat pada Tabel 14.

Tabel 14. Hasil perhitungan kadar fenolik total

Sampel Daun Sambung Nyawa (menit)	Kadar Fenolik Total (\bar{X} Phenolic Total (mg GAE/g) \pm CV)
15	72,111 \pm 3,114
30	65,877 \pm 2,773
45	82,975 \pm 0,784
60	72,420 \pm 2,624
75	73,963 \pm 1,502

10. Analisis Statistik

Data yang telah didapatkan dan diolah kemudian dilanjutkan untuk dianalisis dengan menggunakan bantuan software SPSS. Berdasarkan data didapatkan hasil analisis statistik kadar flavonoid dan fenolik total sampel tiap variasi waktu ekstraksi sebagai berikut.

a. Hasil uji statistik kadar flavonoid total

Hasil analisis statistik pada penentuan kadar flavonoid total didapatkan bahwa data homogen dan terdistribusi normal karena nilai signifikansi memenuhi syarat yaitu $p > 0,05$. Data dilanjutkan dengan uji parametrik menggunakan *One Way ANOVA* untuk melihat adanya perbedaan rata-rata yang signifikan pada seluruh sampel tiap variasi waktu ekstraksi daun sambung nyawa, dengan diperoleh nilai signifikansi $p < 0,05$. Setelah *One Way Anova* menunjukkan adanya perbedaan yang signifikan, kemudian dilakukan uji *Post Hoc Tukey* untuk mengetahui ada tidaknya perbedaan yang signifikan antara sampel satu waktu dengan waktu lainnya yang diperoleh nilai signifikansi $p < 0,05$ dan dapat dilihat pada Lampiran 14. Didapatkan bahwa sampel variasi waktu ekstraksi terdapat perbedaan yang signifikan pada menit ke 60 dengan menit ke 15, 30, 45, dan 75.

Tabel 15. Uji Statistik Kadar Total Flavonoid

Waktu	Uji statistik flavonoid		
	Homogenitas	Normalitas	<i>One Way ANOVA</i>
15	0,144	0,780	0,000
30		0,266	
45		0,727	
60		0,132	
75		0,465	

Keterangan: Homogenitas = ($p > 0,05$)
 Normalitas = ($p > 0,05$)
One Way ANOVA = Berbeda signifikan ($p < 0,05$)

Tabel 16. Hasil Uji Post Hoc Tukey (Kadar Flavonoid)

	Menit	<i>Post Hoc Tukey</i>
60	15	0,000
	30	
	45	
	75	

Keterangan : *Post Hoc Tukey* = Berbeda signifikan ($p < 0,05$)

b. Hasil uji statistik kadar fenolik total

Berdasarkan hasil analisis statistik terhadap penentuan kadar fenolik total, data menunjukkan sifat homogen dan terdistribusi normal karena nilai signifikansi yang diperoleh lebih besar dari 0,05 ($p > 0,05$). Oleh karena itu, analisis dilanjutkan dengan uji parametrik *One Way ANOVA* untuk mengetahui apakah terdapat perbedaan rata-rata yang signifikan antar sampel pada berbagai waktu ekstraksi daun sambung nyawa. Hasil uji menunjukkan adanya perbedaan yang signifikan ($p < 0,05$). Untuk mengetahui perbedaan waktu ekstraksi satu dengan lainnya dilakukan uji lanjut menggunakan *Post Hoc Tukey*. Hasil uji tersebut juga menunjukkan nilai signifikansi $p < 0,05$ dan dapat dilihat pada Lampiran 15. Didapatkan bahwa sampel variasi waktu ekstraksi terdapat perbedaan yang signifikan pada menit ke 45 dengan menit ke 15, 30, 60, dan 75.

Tabel 17. Uji Statistik Kadar Total Fenolik

Waktu	Uji statistik fenolik		
	Homogenitas	Normalitas	<i>One Way ANOVA</i>
15	0,327	0,726	0,000
30		0,194	
45		0,843	
60		0,566	
75		1,000	

Keterangan : Homogenitas = ($p > 0,05$)
 Normalitas = ($p > 0,05$)
One Way ANOVA = Berbeda signifikan ($p < 0,05$)

Tabel 18. Hasil Uji *Post Hoc Tukey* (Kadar Fenolik)

	Menit	<i>Post Hoc Tukey</i>
45	15	0,000
	30	
	60	
	75	

Keterangan : *Post Hoc Tukey* = Berbeda signifikan ($p < 0,05$)

B. Pembahasan

Pada penelitian ini digunakan daun sambung nyawa yang berasal dari kebun Doplang di daerah Doplang, Kecamatan Karangpandan, Kabupaten Karanganyar, Jawa Tengah. Pemanenan daun sambung nyawa dilakukan pada pagi hari dikarenakan senyawa metabolit sekunder yang terdapat pada daun masih banyak, namun apabila dilakukan pemanenan pada siang hari pada saat matahari terik maka senyawa metabolit sekunder yang terdapat pada daun dapat berkurang (Ernawati., 2023). Setelah dilakukan pemanenan, daun sambung nyawa di sortasi basah menggunakan air mengalir dengan tujuan memisahkan daun sambung nyawa dari kotoran atau benda-benda asing yang masih terdapat pada daun (Maulidah *et al.*, 2022). Kemudian dilakukan pengeringan sampel pada suhu 50°C di oven hingga diperoleh simplisia kering daun sambung nyawa. Alasan dipilih suhu 50°C dikarenakan senyawa flavonoid dan fenolik diketahui tidak tahan terhadap pemanasan dan dapat terdegradasi pada suhu di atas 60°C (Sari *et al.*, 2024). Daun sambung nyawa yang sudah kering dihaluskan agar menjadi serbuk halus dengan tujuan untuk meningkatkan luas permukaan sampel sehingga memperbesar terjadinya kontak antara partikel serbuk dengan pelarut dimana semakin kecil ukuran partikel dari suatu sampel maka akan memudahkan pelarut dalam menarik senyawa yang terdapat dalam sampel (Maulidah *et al.*, 2022). Serbuk halus kemudian diayak dengan ayakan berukuran 40 mesh hingga menghasilkan serbuk simplisia dengan ukuran seragam.

Pada penelitian ini dilakukan ekstraksi sampel daun sambung nyawa dengan menggunakan metode UAE. Metode ini dipilih pada penelitian dikarenakan

memiliki beberapa keunggulan yaitu dapat meningkatkan penetrasi dari cairan menuju dinding sel, laju perpindahan masa lebih cepat, meningkatkan hasil ekstraksi, memerlukan pelarut yang sedikit, waktu ekstraksi yang singkat dan cocok digunakan untuk senyawa flavonoid dan fenolik yang tidak tahan terhadap pemanasan (Setyantoro *et al.*, 2019). Pelarut ekstraksi yang digunakan pada penelitian ini adalah etanol 96% karena penggunaan pelarut etanol 96% yang bersifat polar, dimana senyawa flavonoid dan fenolik akan tertarik dengan pelarut yang memiliki polaritas yang sama (Kusumawardany *et al.*, 2023). Filtrat yang diperoleh dari proses ekstraksi menggunakan UAE diuapkan menggunakan penangas air pada suhu 50 °C, pemilihan suhu tersebut agar senyawa metabolit sekunder yaitu flavonoid dan fenolik tidak rusak pada pemanasan tinggi, dimana senyawa ini dapat terdegradasi pada suhu diatas 60 °C (Sari *et al.*, 2024).

Berdasarkan hasil dari proses ekstraksi diperoleh nilai rendemen ekstrak daun sambung nyawa variasi waktu 15, 30, 45, 60, 75 menit yaitu secara berturut-turut sebesar 4,1%; 5,8%; 5,3%, 6,2%, dan 7,8%. Hasil tersebut menunjukkan bahwa semakin lama waktu ekstraksi maka semakin tinggi pula nilai %rendemen. Hal ini dikarenakan bahan memiliki kontak yang lebih lama dengan pelarut, sehingga difusi pelarut ke dalam sel jaringan semakin meningkat pula. Dari hasil rendemen pada Tabel 5 diketahui bahwa pada variasi waktu 75 menit telah memenuhi persyaratan rendemen yaitu >7,2% dan pada variasi waktu 15, 30, 45, 60 menit tidak memenuhi persyaratan. Waktu ekstraksi yang tepat dapat menghasilkan ekstrak dengan rendemen yang tinggi (Rifkia *et al.*, 2020). Setelah didapatkan ekstrak kental dilanjutkan pengamatan secara organoleptik dan dilakukan pengujian kadar air, dimana kadar air dapat mempengaruhi kualitas ekstrak seperti mudah terkontaminasi mikroba dan fisik simplisia menjadi rusak dan pada sampel daun sambung nyawa ini pengujian kadar air tiap variasi waktu ekstraksi memenuhi persyaratan sesuai dengan Farmakope Herbal Indonesia Edisi II yaitu $\leq 10\%$ (Kementrian Kesehatan RI, 2017). Terdapat hubungan antara nilai % rendemen dengan kadar air ekstrak tiap variasi waktu ekstraksi. Hasil menunjukkan semakin tinggi nilai % rendemen semakin tinggi pula kadar air. Peningkatan kadar air dalam ekstrak dapat menyebabkan peningkatan nilai rendemen basah karena air

menyumbang massa terhadap berat ekstrak. Namun demikian, hal ini tidak mencerminkan tingginya kandungan senyawa aktif. Selanjutnya, dilakukan analisis kualitatif untuk membuktikan adanya senyawa yang diteliti pada daun sambung nyawa.

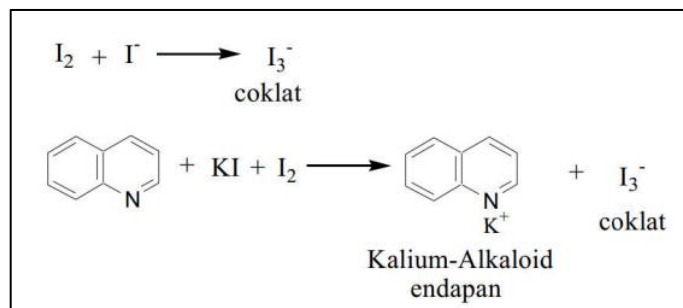
Analisis kualitatif yang digunakan pada penelitian ini yaitu melalui uji organoleptis, skrining fitokimia dan pengujian KLT sebagai pendahuluan untuk memastikan adanya senyawa flavonoid dan fenolik pada sampel ekstrak di tiap variasi waktu. Secara organoleptis ekstrak daun sambung nyawa memiliki tekstur kental, warna ekstrak yang kecoklatan, serta memiliki aroma khas daun sambung nyawa. Hasil uji organoleptis ini sesuai dengan Farmakope Herbal Indonesia Edisi II (Kementrian Kesehatan RI, 2017).

Analisis kualitatif dengan pengujian skrining fitokimia pada sampel daun sambung nyawa dilakukan untuk mengidentifikasi golongan senyawa yang ada dalam sampel tersebut. Hasil skrining fitokimia yang ditampilkan pada Tabel 8 menunjukkan bahwa seluruh ekstrak daun sambung nyawa mengandung alkaloid, flavonoid, fenolik, tanin, saponin, dan terpenoid di tiap variasi waktu yang digunakan.

Pada pengujian alkaloid dilakukan penambahan HCl sebelum ditambahkan pereaksi dikarenakan alkaloid bersifat basa sehingga dapat diekstrak dengan pelarut yang bersifat asam (Yasser *et al.*, 2022). Seluruh ekstrak daun sambung nyawa dinyatakan positif mengandung alkaloid dengan terbentuknya endapan berwarna coklat setelah ditambahkan pereaksi wagner dan endapan berwarna jingga setelah ditambahkan pereaksi dragendorff. Menurut Sari *et al.*, (2024) hasil positif alkaloid pada pengujian sekurang kurangnya terdapat dua pengujian dengan pereaksi yang menyatakan hasil positif.

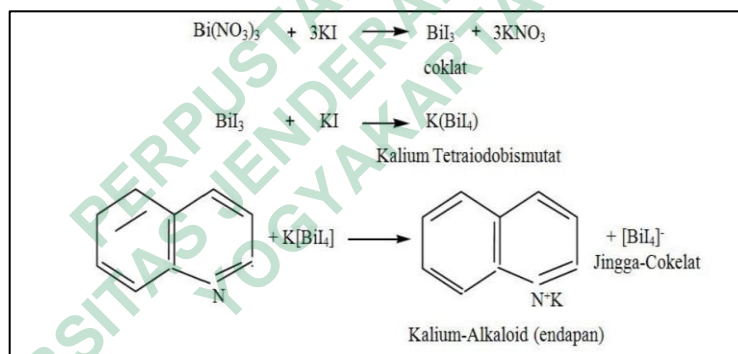
Hasil uji positif alkaloid pada pereaksi wagner ditandai dengan terbentuknya endapan coklat (Lampiran 4). Berdasarkan Gambar 21, pada pembuatan pereaksi wagner, iodin akan bereaksi dengan ion I^- dari kalium iodida menghasilkan ion I_3^- yang berwarna coklat. Pada uji Wagner, ion logam K^+ akan membentuk ikatan kovalen koordinat dengan nitrogen pada alkaloid membentuk

kompleks kalium-alkaloid yang mengendap dan berwarna coklat (Yasser *et al.*, 2022).



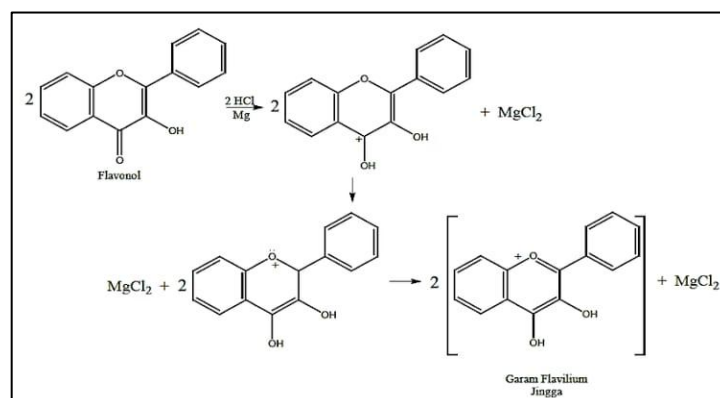
Gambar 21. Reaksi Uji Alkaloid Wagner (Yasser *et al.*, 2022)

Hasil uji positif alkaloid dengan pereaksi dragendroff ditandai dengan terbentuknya endapan jingga (Lampiran 4). Berdasarkan Gambar 22, hal ini terjadi karena adanya reaksi antara nitrogen pada alkaloid dengan ion logam K^+ dari kalium tetraiodobismutat (II) membentuk kompleks kalium-alkaloid yang mengendap (Marpuah *et al.*, 2021).



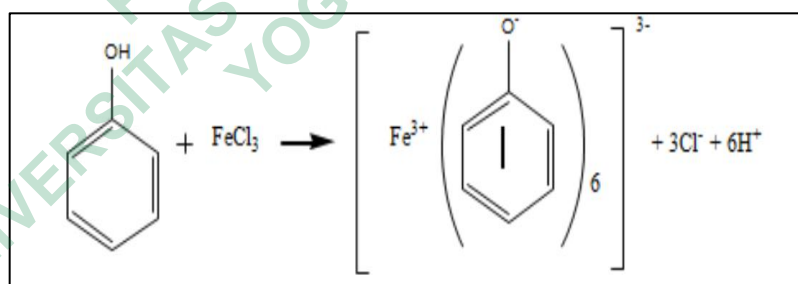
Gambar 22. Reaksi Uji Alkaloid Dragendroff (Marpuah *et al.*, 2021)

Hasil uji skrining fitokimia sampel daun sambung nyawa positif mengandung flavonoid ditandai dengan adanya perubahan warna menjadi kuning setelah diberi pereaksi magnesium dan HCl (Lampiran 4). Berdasarkan Gambar 23, hasil uji positif flavonoid dengan pereaksi magnesium dan HCl terjadi perubahan kemerahan, kuning hingga jingga. Hal ini dikarenakan senyawa flavonoid tereduksi dengan magnesium dan HCl sehingga menghasilkan garam flavilium kuning/jingga (Yasser *et al.*, 2022).



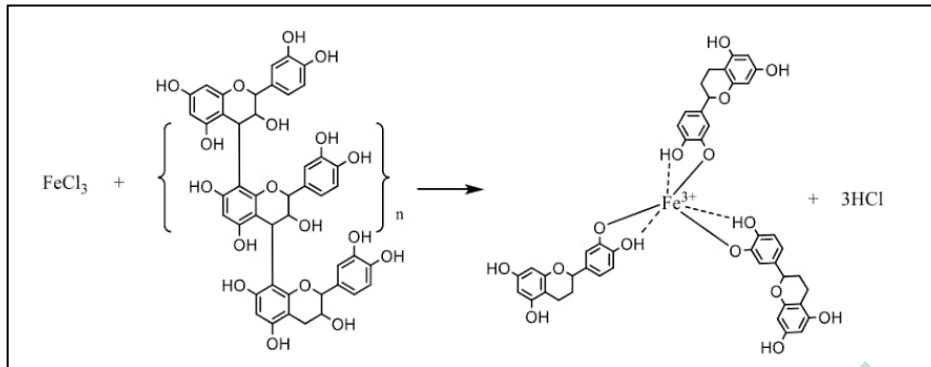
Gambar 23. Reaksi Uji Flavonoid dengan Pereaksi Serbuk Mg dan HCl (Yasser *et al.*, 2022)

Hasil uji skrining fitokimia sampel daun sambung nyawa positif fenolik ditunjukkan dengan terbentuknya warna ungu kehitaman pada sampel dengan penambahan reagen FeCl_3 1% (Lampiran 4). Berdasarkan Gambar 24, gugus hidroksil pada sampel yang mengandung fenolik akan mendonorkan elektron ke ion Fe_3^+ dari reagen FeCl_3 1% untuk membentuk ikatan koordinasi dan menghasilkan senyawa kompleks. Terbentuknya senyawa kompleks tersebut akan menghasilkan warna ungu kehitaman yang khas dan menandakan adanya senyawa fenolik dalam sampel (Putri *et al.*, 2018).



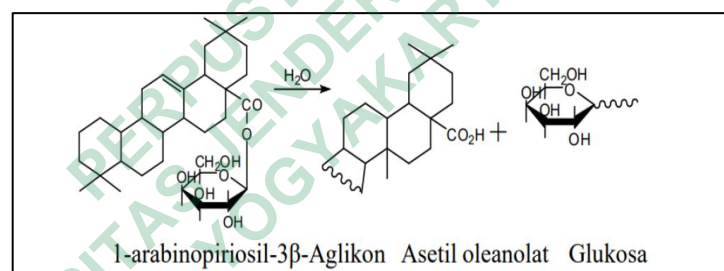
Gambar 24. Reaksi Uji Fenolik dengan FeCl_3 1% (Putri *et al.*, 2018)

Hasil uji skrining fitokimia sampel daun sambung nyawa positif mengandung tanin ditandai dengan adanya perubahan warna biru tua jika diberi pereaksi FeCl_3 1% (Lampiran 4). Berdasarkan Gambar 25, senyawa tanin akan bereaksi dengan pereaksi FeCl_3 1% membentuk perubahan biru, hijau atau hijau kehitaman (Abdulkadir *et al.*, 2024).



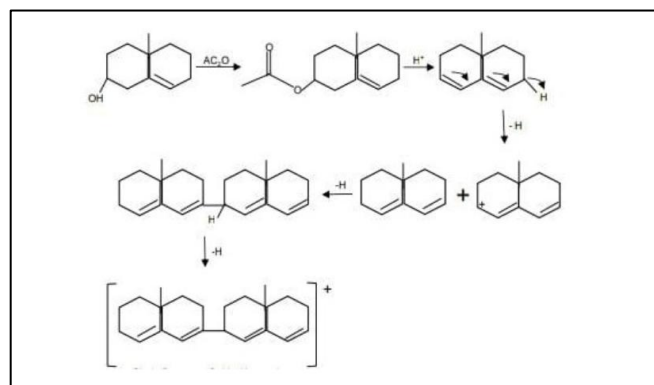
Gambar 25. Reaksi Uji Tanin dengan FeCl_3 1 % (Abdulkadir *et al.*, 2024)

Hasil uji skrining fitokimia sampel daun sambung nyawa positif mengandung saponin dibuktikan dengan terbentuknya busa yang stabil dan tidak hilang pada penambahan 5 tetes mL HCl 2N (Lampiran 4). Berdasarkan Gambar 26, terbentuknya busa menunjukkan adanya glikosida yang mempunyai kemampuan dalam membentuk buih dalam air yang terhidrolisis menjadi glukosa dan senyawa lainnya (Pongsapan *et al.*, 2024).



Gambar 26. Reaksi Uji Saponin dengan Air (Pongsapan *et al.*, 2024)

Hasil uji skrining fitokimia sampel daun sambung nyawa positif mengandung triterpenoid pada sampel yang ditandai dengan terbentuknya warna jingga kecoklatan (Lampiran 4). Berdasarkan Gambar 27, terjadi reaksi antar senyawa triterpenoid dengan Lieberman Bouchardat yang membentuk cincin berwarna coklat kemerahan karena terjadi ikatan rangkap terkonjugasi melalui reaksi kondensasi (Hasan *et al.*, 2023).



Gambar 27. Reaksi Uji Terpenoid dengan Reagen Liebermann Bouchardat
(Hasan *et al.*, 2023)

Selain dianalisis kualitatif dengan skrining fitokimia, sampel juga dianalisis menggunakan KLT yang bertujuan untuk mengidentifikasi dan memisahkan suatu senyawa. Prinsip pemisahan pada KLT yaitu distribusi dari senyawa analit berdasarkan tingkat polaritas dan afinitasnya terhadap fase diam dan fase gerak. KLT bekerja berdasarkan prinsip bahwa kapasitas adsorpsi setiap komponen dalam campuran untuk adsorben (fase diam) yang sama dapat menghasilkan hasil yang berbeda. Metode analisis ini didasari oleh senyawa yang mampu dipisahkan dengan adanya bahan adsorpsi pada permukaan plat KLT sebagai fase diam dengan eluen sebagai fase gerak (Prasetyawan *et al.*, 2024). Pada pengujian KLT ini, fase diam yang digunakan yaitu plat GF₂₅₄ yang bersifat polar. Hasil optimasi fase gerak dengan berbagai perbandingan, dan didapatkan pemisahan yang paling baik yaitu pada fase gerak n-heksan: etil asetat: asam format (6:4:0,2) pada flavonoid yang cenderung memiliki sifat semipolar sedangkan pada fenolik menggunakan fase gerak kloroform: etil asetat: asam format (1:3:1) yang cenderung bersifat semipolar.

Perbedaan polaritas ini menyebabkan sampel dan standar terelusi yang ditandai pada flavonoid dengan adanya hasil bercak berwarna kuning kehijauan pada standar kuersetin serta timbulnya beberapa bercak lain yang memisah yang kemungkinan terdapat senyawa lain yang ada pada sampel. Sedangkan pada fenolik menunjukkan adanya bercak yang memisah pada plat dan standar asam galat terbentuk bercak hitam. Sampel yang mengandung senyawa flavonoid dan fenolik ditandai dengan hasil bercak sejajar dengan standar kuersetin pada uji flavonoid

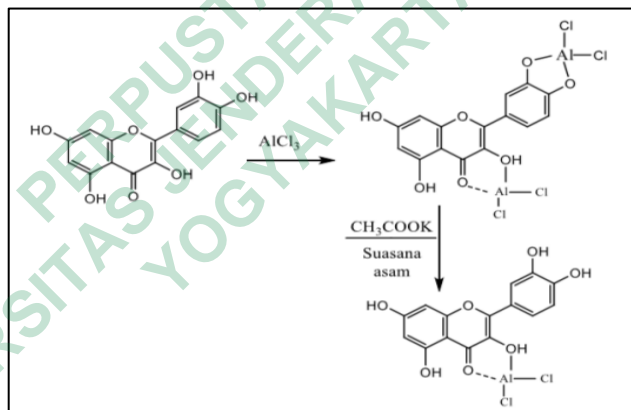
dan asam galat pada uji fenolik dengan memiliki nilai Rf yang mirip. Berdasarkan hasil elusi pada KLT didapatkan nilai Rf sampel dan standar sebesar 0,475 pada senyawa flavonoid kuersetin dan terdapat juga beberapa bercak dengan nilai Rf diantaranya 0,387; 0,512; 0,843; 0,9; 0,956 yang diduga adalah senyawa golongan lain. Pada hasil elusi senyawa fenolik asam galat diperoleh nilai Rf standar sebesar 0,875 dan Rf sampel sebesar 0,825. Sedangkan, pada plat KLT fenolik juga ada beberapa bercak yang memiliki nilai Rf diantaranya 0,331; 0,437; 0,625; 0,737; 0,987 yang diduga adalah senyawa golongan lain.

Hasil pengamatan di bawah sinar UV 254 nm dan 365 nm menunjukkan bahwa bercak yang menandakan warna dari standar dan sampel tiap variasi waktu yang mengandung senyawa flavonoid dan fenolik. Pada pengamatan di bawah sinar UV 254 nm plat KLT akan berfluoresensi sedangkan pada bercak standar dan sampel akan terjadi peredaman yang terlihat berwarna hitam samar pada senyawa fenolik serta terlihat berwarna kuning samar pada sampel senyawa flavonoid, sedangkan pada pengamatan di bawah UV 365 nm plat akan meredam dan pada sampel akan berfluoresensi. Pada bercak sampel terlihat samar hal tersebut disebabkan adanya pengaruh senyawa lain yang ikut terelusi atau senyawa memiliki ikatan rangkap yang sedikit, sehingga menyebabkan bercak tidak dapat berfluoresensi dengan jelas (Karima *et al.*, 2019). Dari hasil uji KLT terbukti bahwa masing-masing ekstrak daun sambung nyawa mengandung kedua senyawa yaitu flavonoid dan fenolik ditandai dengan adanya nilai Rf yang mirip atau sejajar antara sampel dan standar. Sehingga, dapat dilanjutkan analisis terhadap penetapan kadar untuk mengetahui berapa besar kadar senyawa flavonoid dan fenolik yang terkandung dalam sampel.

Dilakukan analisis kuantitatif dengan menentukan kadar total flavonoid pada masing-masing ekstrak. Penentuan total flavonoid pada ekstrak dengan variasi waktu dianalisis menggunakan metode kolorimetri. Berdasarkan Gambar 28, reaksi antara kuersetin dan $AlCl_3$ menghasilkan kompleks yang terbentuk melalui interaksi antara gugus keton pada atom C-4 dan gugus hidroksi yang berdekatan pada atom C-3 atau C-5 dari senyawa flavon dan flavonol. Interaksi ini

menyebabkan pergeseran panjang gelombang menuju ke arah visible yang ditandai dengan perubahan warna larutan menjadi lebih kuning.

Terbentuknya senyawa kompleks tersebut terjadi karena adanya reaksi reduksi-oksidasi antara kuersetin dan AlCl_3 , dimana kuersetin sebagai reduktor dan AlCl_3 sebagai oksidator seperti pada Gambar 28 (Suwartini *et al.*, 2021). Penambahan larutan AlCl_3 10% bertujuan untuk menghasilkan efek batokromik, yaitu pergeseran panjang gelombang ke nilai yang lebih tinggi. Hal ini menyebabkan panjang gelombang larutan standar kuersetin masuk ke dalam rentang sinar UV-Visibel, yaitu antara 400 hingga 600 nm (Kumalasari *et al.*, 2023). Efek batokromik ini juga membuat warna larutan menjadi lebih pekat. Selanjutnya, ditambahkan larutan CH_3COOK 1 M yang berfungsi untuk menstabilkan kompleks senyawa yang terbentuk selama reaksi. Larutan tersebut kemudian diinkubasi selama 33 menit agar reaksi antara kuersetin dan pereaksi dapat berjalan dengan sempurna (Haresmita *et al.*, 2022).



Gambar 28. Pembentukan reaksi kuersetin dengan AlCl_3 (Ni'ma *et al.*, 2022)

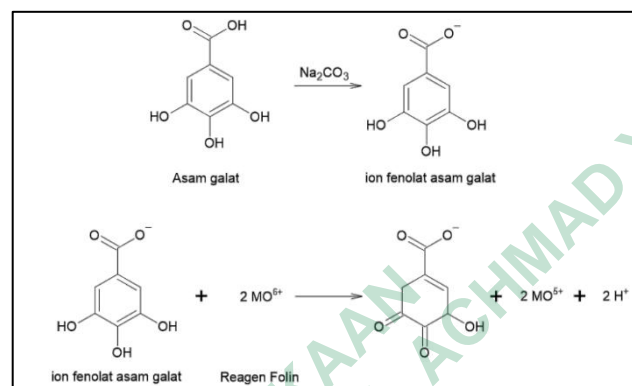
Penentuan flavonoid total hasil ekstraksi dikalibrasi terhadap standar kuersetin dan dinyatakan sebagai mg *Quercetin Equivalent* (mg QE)/g. Berdasarkan hasil pembuatan kurva baku larutan standar kuersetin didapatkan regresi linier $y = 0,0137x - 0,03198$ dengan nilai $r = 0,999$. Nilai r yang diperoleh mendekati angka 1 menunjukkan bahwa persamaan regresi tersebut adalah linier, sehingga dapat dikatakan bahwa absorbansi dan konsentrasi memiliki korelasi yang sangat kuat. Dengan demikian, kurva baku kuersetin menunjukkan bahwa konsentrasi berbanding lurus dengan nilai absorbansi, semakin besar konsentrasi larutan baku

standar kuersetin maka semakin tinggi nilai absorbansi yang dihasilkan. Kadar flavonoid total pada ekstrak daun sambung nyawa metode UAE dengan variasi waktu ekstraksi memiliki kisaran antara 43,221 - 68,209 mg QE/g yang tercantum dalam Tabel 13.

Hasil yang didapatkan menunjukkan bahwa kadar total flavonoid tertinggi diperoleh batas optimumnya pada waktu ekstraksi 60 menit yaitu sebesar 68,209 mg QE/g dan dilanjutkan secara berturut-turut pada menit ke 45, 15, 75, dan 30 yaitu sebesar 58,988; 51,202; 49,061; dan 43,221 mg QE/g. Oleh karena itu, pada waktu 60 menit adalah waktu optimum dalam mengekstraksi daun sambung nyawa untuk menghasilkan kadar flavonoid total paling tinggi. Kadar flavonoid total pada menit ke 75 lebih rendah dibandingkan menit ke 60. Pada tiap bahan dan pelarut dalam proses ekstraksi akan memberikan waktu yang optimal untuk melakukan kontak, tetapi waktu ekstraksi yang terlalu lama juga dapat membuat pelarut menjadi jenuh dan kemampuan mengekstrak akan kurang optimal sehingga nilai kadar flavonoid akan tidak stabil (Sari *et al.*, 2022). Waktu ekstraksi 15, 30, dan 45 menit menghasilkan kadar flavonoid yang lebih rendah dimana waktu ekstraksi yang terlalu singkat dapat menyebabkan tidak semua senyawa bioaktif terekstrak dari bahan sehingga menghasilkan kadar suatu senyawa rendah (Kristina *et al.*, 2022). Hal tersebut dibuktikan dengan pengujian *Post Hoc Tukey* dan diketahui adanya perbedaan yang signifikan pada ekstrak menit ke 60 dengan menit ke 15, 30, 45, dan 75 yaitu nilai sig 0,000 ($p < 0,05$). Dengan demikian, penelitian yang telah dilakukan menunjukkan bahwa faktor waktu ekstraksi memberikan pengaruh signifikan ($p < 0,05$) terhadap kadar total flavonoid ekstrak daun sambung nyawa.

Penetapan kadar senyawa fenolik total secara kuantitatif dilakukan menggunakan metode Folin Ciocalteu dan menggunakan standar pembanding asam galat dikarenakan standar ini mampu mendapatkan hasil yang realibilitas karena mempunyai reaktifitas yang cukup tinggi terhadap reagen Folin Ciocalteu dan termasuk salah satu jenis senyawa fenolik yang alami dan stabil. Seperti pada Gambar 29, terjadi reaksi antara asam galat dengan reagen Folin- Ciocalteu, dimana reagen Folin-Ciocalteu mengoksidasi fenolat (garam alkali) atau gugus fenolik-hidroksi untuk mengurangi asam heteropoli (phosphomolybdate-

phosphotungstate), yang terdapat dalam reagen Folin-Ciocalteu, menjadi kompleks molybdenum-tungsten yang berwarna hijau kebiruan. Kemudian ditambahkan Na_2CO_3 yang bertujuan agar senyawa fenolik dapat bereaksi dengan reagen Folin-Ciocalteu dalam kondisi alkali sehingga proton dalam senyawa fenolik berdisosiasi menjadi ion fenolik (Agustin *et al.*, 2022).



Gambar 29. Reaksi antara Asam Galat dengan Reagen Folin-Ciocalteu (Agustin *et al.*, 2022)

Penentuan total fenolik hasil ekstraksi dikalibrasi terhadap standar asam galat dan dinyatakan sebagai mg *Gallic Acid* (GAE)/g. Berdasarkan hasil pembuatan kurva baku larutan standar asam galat didapatkan regresi linier $y = 0,0054x + 0,0906$ dengan nilai $r = 0,999$. Nilai r yang diperoleh mendekati angka 1 menunjukkan bahwa persamaan regresi tersebut adalah linier. Berdasarkan persamaan regresi kurva baku asam galat menunjukkan bahwa konsentrasi berbanding lurus dengan nilai absorbansi, semakin besar konsentrasi larutan baku asam galat maka semakin tinggi pula nilai absorbansi yang dihasilkan. Kadar fenolik total pada daun sambung nyawa metode UAE dengan variasi waktu ekstraksi memiliki kisaran antara 65,877 – 82,975 mg GAE/g yang tercantum dalam Tabel 14.

Hasil yang didapatkan menunjukkan bahwa kadar total fenolik tertinggi mencapai batas optimumnya pada waktu ekstraksi 45 menit yaitu sebesar 82,975 mg GAE/g dan dilanjutkan secara berturut-turut pada menit ke 75, 60, 15, dan 30 mg sebesar 73,963; 72,420; 72,111; 65,877 mg GAE/g. Oleh karena itu, pada waktu

45 menit adalah waktu optimum dalam mengekstraksi daun sambung nyawa dikarenakan mampu menghasilkan kadar fenolik total yang paling tinggi. Pada masing-masing ekstrak variasi waktu perlu diketahui perbedaan signifikan dengan dilakukan pengujian *Post Hoc Tukey* dan diketahui adanya perbedaan signifikan pada menit ke 45 dengan menit ke 15, 30, 60, dan 75 yaitu nilai sig 0,000 ($p < 0,05$). Dengan demikian, penelitian yang telah dilakukan menunjukkan bahwa faktor waktu ekstraksi memberikan pengaruh signifikan ($p < 0,05$) terhadap kadar total fenolik ekstrak daun sambung nyawa.

Berdasarkan hasil kadar flavonoid dan fenolik yang diperoleh secara maksimal didapatkan dari waktu ekstraksi yang berbeda, yaitu 60 menit untuk flavonoid dan 45 menit untuk fenolik. Hasil uji skrining fitokimia terhadap senyawa flavonoid menunjukkan bahwa waktu ekstraksi selama 60 menit menghasilkan warna yang lebih intens dibandingkan waktu ekstraksi lainnya. Hal serupa juga terlihat pada senyawa fenolik, di mana waktu ekstraksi 45 menit menghasilkan intensitas warna tertinggi. Intensitas warna yang lebih tinggi mengindikasikan kadar senyawa yang lebih tinggi pula. Dengan demikian, terdapat perbedaan yang signifikan antara menit 60 dengan menit ke 15, 30, 45, dan 75 pada kadar total flavonoid. Sama halnya dengan waktu ekstraksi 45 menit dengan menit ke 15, 30, 60, dan 75 pada kadar fenolik total. Sehingga dari hasil ekstraksi kedua senyawa yang berbeda signifikan tiap variasi waktu ekstraksi tersebut, maka dapat dikatakan bahwa waktu yang baik atau optimum untuk mendapatkan senyawa flavonoid dan fenolik tertinggi pada daun sambung nyawa yaitu 60 menit dan 45 menit.