

BAB IV HASIL DAN PEMBAHASAN

A. Hasil

1. Determinasi Tanaman

Determinasi tanaman dilakukan di Laboratorium Biologi, Fakultas Sains dan Teknologi Terapan, Universitas Ahmad Dahlan dengan nomor SK 243/Lab.Bio/B/IV/2025. Hasil determinasi tanaman tersebut, tanaman yang digunakan adalah daun mengkudu (*Morinda citrifolia* L) yang dapat dilihat pada **Lampiran 2**.

2. Persiapan Sampel

Daun mengkudu yang telah dilakukan proses sortasi kering, sortasi basah, perajangan, pengeringan dan penyerbukan dapat dilihat pada **Tabel 2** dan **Lampiran 3**.

Tabel 2. Hasil sampel daun mengkudu

Parameter	Berat (g)
Daun segar	7.000
Daun kering	1.200
Serbuk	1.117,24

3. Ekstraksi sampel

Serbuk daun mengkudu diekstraksi menggunakan pelarut etanol 50% dengan metode UAE pada variasi durasi 20, 40, dan 60 menit, menggunakan rasio bahan terhadap pelarut 1:10. Setelah proses ekstraksi, filtrat yang diperoleh kemudian digunakan untuk menghitung persentase rendemen. Hasil perhitungan rendemen dapat dilihat pada **Tabel 3** dan **Lampiran 4**.

Tabel 3. Hasil Rendemen Ekstrak Etanol Daun Mengkudu

Sampel Daun Mengkudu	Berat Serbuk (g)	Berat Ekstrak (g)	Rendemen (%)	Farmakope Herbal Indonesia, (2017)
Durasi 20 menit		30,07	20,05	
Durasi 40 menit	150	33,06	22,04	>10%
Durasi 60 menit		31,57	21,05	

4. Uji organoleptis

Ekstrak kental daun mengkudu di uji organoleptis menggunakan indera manusia. Hasil pengamatan uji organoleptis ini dapat dilihat pada **Tabel 4**.

Tabel 4. Pengamatan Organoleptis

Parameter	Durasi 20 menit	Durasi 40 menit	Durasi 60 menit	Priamsari <i>et al.</i> , 2020.
Warna	Coklat Kehitaman	Coklat Kehitaman	Coklat Kehitaman	Coklat Kehitaman
Bentuk	Ekstrak Kental	Ekstrak Kental	Ekstrak Kental	Ekstrak Kental
Aroma	Khas	Khas	Khas	Khas

5. Uji Kadar Lembab

Hasil kadar kelembapan ekstrak daun mengkudu pada variasi durasi 20, 40, dan 60 menit dapat dilihat pada **Tabel 5 dan Lampiran 6**.

Tabel 5. Uji Kadar Lembab

Sampel Daun Mengkudu	Kadar Lembab (%)
Durasi 20 menit	1,38
Durasi 40 menit	2,45
Durasi 60 menit	2,90

6. Uji Penapisan Fitokimia

Analisis fitokimia dilakukan untuk mengidentifikasi dan mendeteksi keberadaan senyawa-senyawa kimia tertentu dalam daun mengkudu. Hasil penapisan fitokimia terhadap ekstrak etanol daun mengkudu pada variasi durasi 20, 40, dan 60 menit dapat dilihat pada **Tabel 6 dan Lampiran 5**.

Tabel 6. Skrining Fitokimia

Identifikasi	Sampel			(Nadia <i>et al.</i> , 2022)
	Durasi 20	Durasi 40	Durasi 60	
Alkaloid	Mayer	-	-	-
	Wagner	++	++	+
	Dragendorff	+++	++	+
Fenolik	++	+++	+++	+
Flavonoid	+	+++	++	+
Saponin	++	+	+++	+
Tanin	+++	+++	+++	+

Keterangan (+): Positif mengandung golongan senyawa

(++) : Positif (Kuat) mengandung golongan senyawa

(+++): Positif (Sangat Kuat) mengandung golongan senyawa

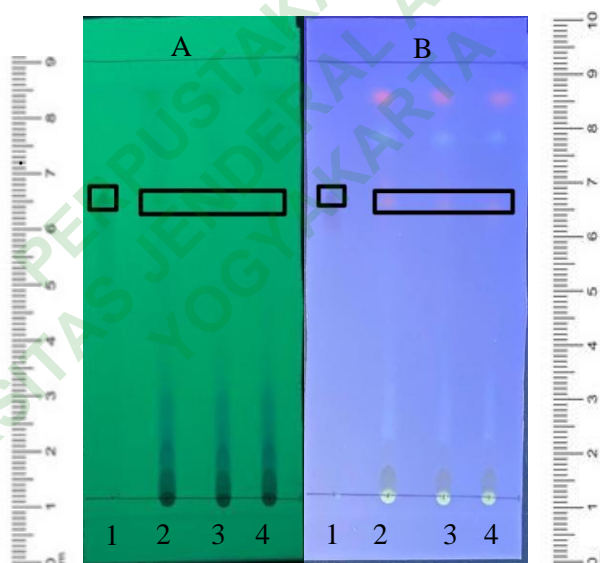
(-) : Negatif tidak mengandung golongan senyawa

7. Uji Kromatografi Lapis Tipis (KLT)

Uji Kromatografi Lapis Tipis (KLT) dilakukan untuk mengidentifikasi keberadaan senyawa fenolik dan flavonoid dalam daun mengkudu. Tahap awal dilakukan optimasi. Berdasarkan hasil optimasi fase gerak untuk uji senyawa fenolik dapat dilihat pada **Tabel 7** dan uji senyawa flavonoid dapat dilihat pada **Tabel 9**. Hasil identifikasi senyawa fenolik dapat dilihat pada **Gambar 8** dan **Tabel 8**, sedangkan pada senyawa flavonoid dapat dilihat pada **Gambar 9** dan **Tabel 10**.

Tabel 7. Hasil Optimasi Fase Gerak KLT Uji Senyawa Fenolik

No	Fase Gerak	Hasil
1	n-heksan: etil Asetat (3: 7) (v/v/v)	Sampel terelusi namun standar tidak terelusi
2	n-heksan: etil Asetat: etanol (1:8:1) (v/v/v)	Terelusi dan terjadi pemisahan yang baik.



Gambar 8. KLT Uji Senyawa Fenolik Ekstrak Daun Mengkudu

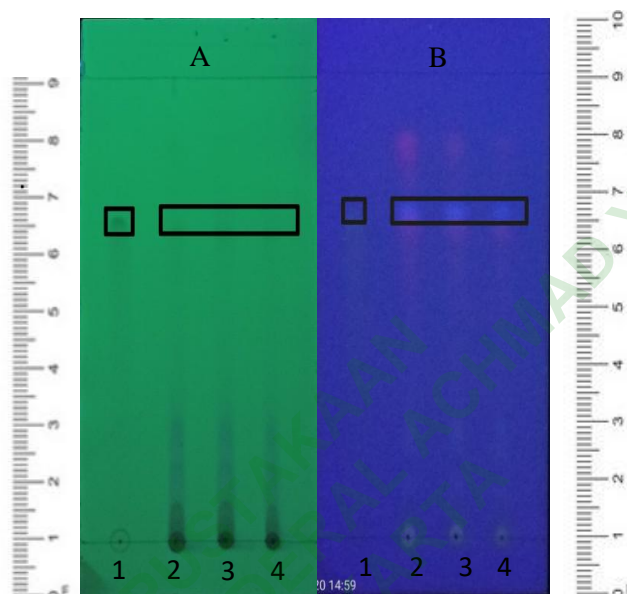
Keterangan: Profil KLT Ekstrak Etanol Daun Mengkudu A. Deteksi dengan sinar UV 254 nm; B. Deteksi dengan sinar UV 365 nm. (1) Standar Asam Galat, (2) Ekstrak durasi 20 menit, (3) Ekstrak durasi 40 menit, (4) Ekstrak durasi 60 menit. Fase diam Plat *silica gel* 60 F₂₅₄ Fase Gerak: n -heksan: etil asetat: etanol (1:8:1) (v/v/v).

Tabel 8. Nilai R_f (Retardation Factor) Uji Senyawa Fenolik

Durasi Ekstraksi Mengkudu	Nilai R _f Sampel	Standar	Nilai R _f Standar
Durasi 20 menit	0,7	Asam Galat	0,725
Durasi 40 menit	0,7		
Durasi 60 menit	0,7		

Tabel 9. Hasil Optimasi Fase Gerak KLT Uji Senyawa Flavonoid

No.	Fase Gerak	Hasil
1	Butanol: Asam Asetat: Air (3:1:1) (v/v/v)	Standar terelusi namun sampel tidak nampak.
2	Etanol: Etil Asetat: Kloroform (1,5:2:8,5) (v/v/v)	Terelusi dan terjadi pemisahan yang baik.

**Gambar 9. KLT Uji Senyawa Flavonoid Ekstrak Daun Mengkudu**

Keterangan: Profil KLT Ekstrak Etanol Daun Mengkudu A. Deteksi dengan sinar UV 254 nm; B. Deteksi dengan sinar UV 365 nm. (1) Standar Kuersetin, (2) Ekstrak durasi 20 menit, (3) Ekstrak durasi 40 menit, (4) Ekstrak durasi 60 menit. Fase diam Plat *silica gel* 60 F₂₅₄ Fase Gerak: Etanol: Etil Asetat: Kloroform (1,5:2:8,5) (v/v/v).

Tabel 10. Nilai R_f (Retardation Factor) Uji Senyawa Flavonoid

Durasi Ekstraksi Mengkudu	Nilai R _f Sampel	Standar	Nilai R _f Standar
Durasi 20 menit	0,825	Kuersetin	0,825
Durasi 40 menit	0,825		
Durasi 60 menit	0,825		

8. Penetapan Kadar Fenolik Total

a. Penentuan panjang gelombang maksimum asam galat

Scanning panjang gelombang asam galat dengan konsentrasi 300 ppm pada rentang panjang gelombang 600–800 nm sehingga diperoleh panjang gelombang serapan maksimum asam galat pada 761 nm yang dapat dilihat pada **Lampiran 8**.

b. Penentuan *operating time* (OT)

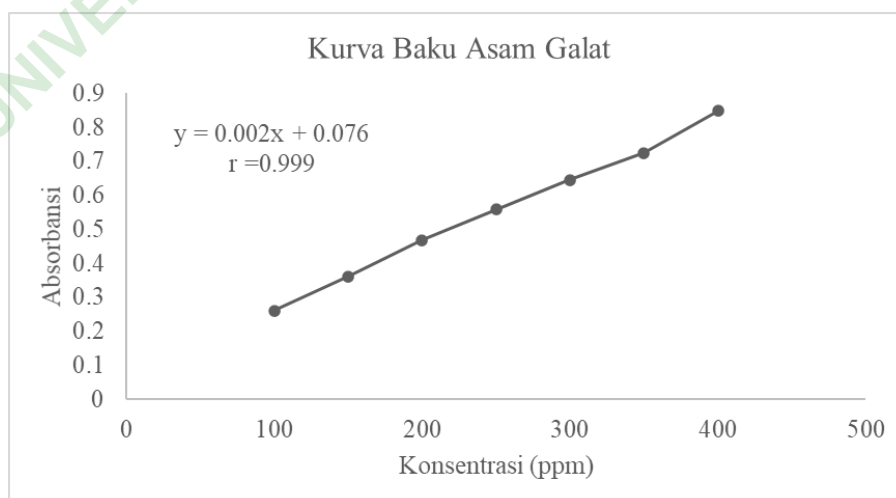
Operating time dilihat berdasarkan nilai absorbansi yang stabil pada panjang gelombang yang telah ditentukan sebelumnya dengan menggunakan larutan stok 300 ppm. *Operating time* ditentukan selama 2 jam, dengan interval pengukuran setiap 1 menit, sehingga diperoleh *operating time* selama 1 jam 47 menit yang dapat dilihat pada **Lampiran 8**.

c. Kurva baku asam galat

Kurva baku asam galat dengan menggunakan serangkaian konsentrasi standar, yakni 100, 150, 200, 250, 300, 350, dan 400 ppm yang diukur pada panjang gelombang 761 nm. Blanko yang digunakan yaitu metanol *p.a.* Hasil kurva baku asam galat dapat dilihat pada **Tabel 11** dan **Gambar 10** berikut.

Tabel 11. Absorbansi Kurva Baku Asam Galat

Konsentrasi (ppm)	Absorbansi (Rata-Rata ± SD)
100	0,261±0,002
150	0,361±0,003
200	0,469±0,002
250	0,558±0,003
300	0,645±0,002
350	0,725±0,002
400	0,848±0,002



Gambar 10. Kurva baku Asam Galat

d. Penentuan Kadar Fenolik Total

Berdasarkan kurva kalibrasi pada **Gambar 10**, hubungan linier antara konsentrasi standar asam galat dan absorbansi yang tercatat dijelaskan oleh persamaan $y = 0,002x + 0,076$, dengan nilai koefisien korelasi (r) 0,999. Persamaan ini digunakan untuk menghitung jumlah total senyawa fenolik dalam ekstrak etanol 50% daun mengkudu. Hasil kadar fenolik total yang diperoleh dalam ekstrak etanol daun mengkudu dapat dilihat pada **Tabel 12** dan **Lampiran 10**.

Tabel 12. Kadar Fenolik Total Daun Mengkudu

Durasi (Menit)	Replikasi	Kadar Fenolik Total (mg GAE/g)	Kadar Fenolik Total (Rata-rata \pm SD mg GAE/g)
20	1	9,753	9,718 \pm 0,040
	2	9,726	
	3	9,674	
40	1	14,726	14,796 \pm 0,066
	2	14,805	
	3	14,858	
60	1	15,042	15,086 \pm 0,040
	2	15,095	
	3	15,121	

e. Analisis Data Kadar Fenolik total

Langkah pertama dalam analisis data SPSS yaitu dengan melakukan uji normalitas dan homogenitas, apabila memenuhi syarat $p > 0,05$ maka dilakukan uji *one-way* ANOVA dan apabila terdapat perbedaan signifikan yang ditandai dengan $p < 0,05$ maka dilakukan uji *Post-Hock Tukey*. Hasil analisis data dapat dilihat pada **Tabel 13** dan **Tabel 14**.

Tabel 13. Uji Normalitas, Homogenitas dan *One-way* ANOVA Fenolik

Durasi (Menit)	Uji Normalitas	Uji Homogenitas	Uji <i>One-way</i> ANOVA
20	0,638 ^a	0,618 ^b	0.000 ^c
40	0,781 ^a		
60	0,636 ^a		

Keterangan: (a) Data Terdistribusi Normal ($p > 0,05$)
 (b) Data Homogen ($p > 0,05$)
 (c) Data Berbeda Signifikan ($p < 0,05$)

Tabel 14. Uji *Post-Hoc* Tukey Fenolik

<i>Post-Hoc</i> Tukey		
Durasi	Durasi	Sig
20	40	0.000*
	60	0.000*
40	20	0.000*
	60	0.001*
60	20	0.000*
	40	0.001*

Keterangan: (*) Terdapat perbedaan signifikan

9. Penetapan Kadar Flavonoid Total

a. Penentuan panjang gelombang maksimum kuersetin

Pemindaian panjang gelombang kuersetin menggunakan konsentrasi 80 ppm pada rentang panjang gelombang 350–450 nm. Sehingga diperoleh panjang gelombang maksimum pada 415 nm yang dapat dilihat pada **Lampiran 8**.

b. Penentuan *operating time* (OT)

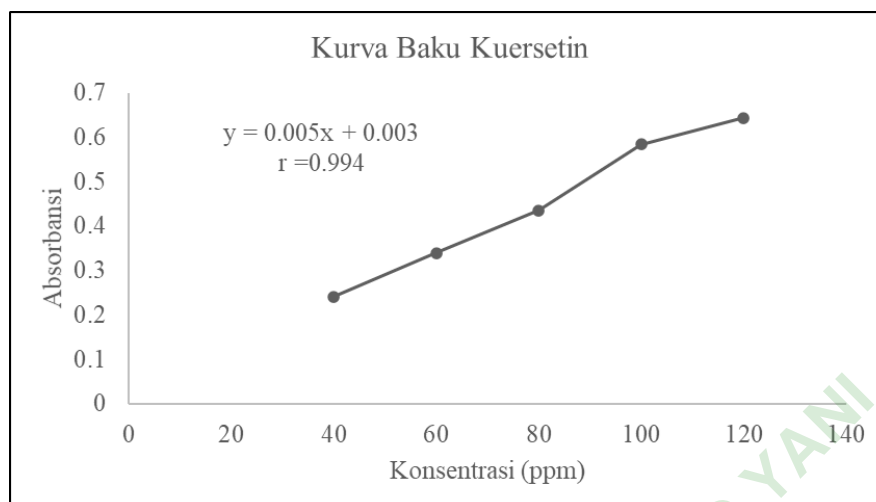
Operating time kuersetin ditentukan menggunakan konsentrasi 80 ppm gelombang 415 nm. *Operating time* dilakukan selama 45 menit dengan jarak pengukuran setiap 1 menit, sehingga total *operating time* yang diperoleh adalah 34 menit yang dapat dilihat pada **Lampiran 8**.

c. Kurva baku kuersetin

Kurva baku kuersetin ditentukan dengan mengukur absorbansi seri konsentrasi standar, yaitu 40, 60, 80, 100, dan 120 ppm pada panjang gelombang 415 nm, dengan blanko menggunakan metanol *p.a.* Hasil kurva kalibrasi kuersetin dapat dilihat pada **Tabel 15** dan **Gambar 11**.

Tabel 15. Absorbansi Kurva Baku Kuersetin

Konsentrasi (ppm)	Absorbansi (Rata-Rata ± SD)
40	0,241±0,005
60	0,340±0,000
80	0,435±0,002
100	0,584±0,004
150	0,643±0,003



Gambar 11. Kurva Baku Kuersetin

d. Penentuan Kadar Flavonoid Total

Hasil kurva baku yang ditampilkan dalam **Gambar 11**, dilakukan analisis untuk menentukan hubungan antara konsentrasi kuersetin dan nilai absorbansi yang diperoleh. Dari analisis tersebut, diperoleh persamaan regresi linier yang menggambarkan hubungan tersebut, yaitu $y = 0,005x + 0,003$ dengan nilai koefisien korelasi (r) yang diperoleh yaitu 0,994. Persamaan ini digunakan untuk menghitung jumlah total senyawa flavonoid dalam ekstrak etanol 50% daun mengkudu. Hasil kadar flavonoid total yang diperoleh dalam ekstrak etanol daun mengkudu dapat dilihat pada **Tabel 16** dan **Lampiran 11**.

Tabel 16. Kadar Flavonoid Total Daun Mengkudu

Durasi (Menit)	Replikasi	Kadar Flavonoid Total (mg QE/g)	(Kadar Flavonoid Total Rata-rata \pm SD mg QE/g)
20	1	9,508	9,533 \pm 0,029
	2	9,527	
	3	9,565	
40	1	14,719	14,771 \pm 0,048
	2	14,777	
	3	14,815	
60	1	12,431	12,431 \pm 0,038
	2	12,469	
	3	12,392	

e. Analisis Data Kadar Flavonoid Total

Langkah pertama dalam analisis data dengan SPSS yaitu dengan melakukan uji normalitas dan homogenitas sebagai syarat, apabila memenuhi syarat $p > 0,05$ maka dilakukan uji *one-way* ANOVA dan apabila terdapat perbedaan signifikan $p < 0,05$ maka dilakukan uji *Post-Hoc Tukey*. Hasil analisis data dapat dilihat pada **Tabel 17** dan **Tabel 18**.

Tabel 17. Uji Normalitas, Homogenitas dan *One-way* ANOVA

Durasi (Menit)	Uji Normalitas	Uji Homogenitas	Uji <i>One-way</i> ANOVA
20	0,636 ^a		
40	0,781 ^a	0,748 ^b	0.000 ^c
60	0,999 ^a		

Keterangan : (a) Data Terdistribusi Normal ($p > 0,05$)
 (b) Data Homogen ($p > 0,05$)
 (c) Data Berbeda Signifikan ($p < 0,05$)

Tabel 18. Uji *Post-Hoc Tukey*

<i>Post-Hoc Tukey</i>		
Durasi	Durasi	Sig
20	40	0.000*
	60	0.000*
40	20	0.000*
	60	0.000*
60	20	0.000*
	40	0.000*

Keterangan: (*) Terdapat perbedaan signifikan

B. Pembahasan

Penelitian ini merupakan penelitian eksperimental yang bertujuan untuk mengetahui pengaruh variasi durasi ekstraksi 20, 40, dan 60 menit menggunakan metode *Ultrasound-Assisted Extraction* (UAE), terhadap kadar fenolik dan flavonoid total daun mengkudu (*Morinda citrifolia* L). Daun mengkudu yang digunakan dalam penelitian diambil dari pekarangan rumah warga RT 002 RW 008 Piji, Balong, Girisubo, Kabupaten Gunung Kidul, Daerah Istimewa Yogyakarta, pada bulan april 2025. Sebelum dilakukan pemanenan, tanaman dilakukan determinasi yang bertujuan untuk memastikan kesesuaian spesies sehingga dapat mencegah kesalahan dalam pengambilan sampel (Klau & Hesturini, 2021). Determinasi sampel dilakukan di Laboratorium Pembelajaran Biologi, Fakultas Sains dan Teknologi Terapan, Universitas Ahmad Dahlan dengan nomor SK

243/Lab.Bio/B/IV/2025 (**Lampiran 2**). Berdasarkan hasil determinasi, tanaman yang digunakan dalam penelitian ini adalah daun mengkudu dengan spesies *Morinda citrifolia* L.

Daun mengkudu yang telah di determinasi kemudian dilakukan pemanenan pada pagi hari sekitar pukul 07.00 WIB. Menurut (Yuliani & Dienina, 2015), pemanenan pada pagi hari saat daun masih segar dan hijau cenderung menghasilkan kandungan senyawa aktif yang lebih tinggi, karena proses fotosintesis belum berlangsung secara maksimal. Pemanenan daun mengkudu dilakukan dengan mengambil daun yang berwarna hijau pada helai ke-4 dan ke-5 dari pucuk, dan diperoleh hasil panen sebanyak 7 kg. Menurut penelitian (Irfayanti *et al.*, 2023), daun pada helai ke-4 dan ke-5 merupakan daun “dewasa muda” (*young mature leaves*), yang secara fisiologis stabil dan memiliki kandungan fitokimia, seperti flavonoid, dan fenolik, yang lebih optimal dan konsisten untuk di analisis. Setelah proses pemanenan, daun disortir secara basah untuk memilih daun yang utuh, tidak rusak, tidak terkena hama seperti ulat, serta memastikan daun bersih dari debu, tanah, dan sisa-sisa bahan organik lainnya (Kusumawardany *et al.*, 2023). Selanjutnya, daun dirajang menjadi potongan kecil yang bertujuan untuk memperbesar luas permukaan, sehingga proses pengeringan menjadi lebih merata dan cepat (Irfayanti *et al.*, 2023). Setelah itu, dilakukan pengeringan untuk mengurangi kadar air, yang bertujuan agar pertumbuhan mikroba dan kerusakan senyawa melambat, sehingga daya simpan meningkat dan kualitas senyawa aktif tetap terjaga (Fikriyah & Nasution, 2022). Pengeringan dilakukan dengan oven pada suhu 40°C selama 4 hari atau mencapai kondisi kering sempurna, dan ditandai dengan tekstur yang rapuh saat diremas. Menurut penelitian (Sari *et al.*, 2024), suhu di atas 60°C dapat merusak struktur senyawa fenolik dan flavonoid. Simplisia kering yang telah dikeringkan kemudian dihaluskan menggunakan *grinder* untuk memperkecil ukuran partikel agar pelarut lebih mudah meresap dan menghasilkan rendemen ekstrak yang tinggi (Noviantari *et al.*, 2017). Proses dilanjutkan dengan pengayakan menggunakan *mesh* 40. Pemilihan ukuran *mesh* ini penting agar luas permukaan simplisia yang bersentuhan dengan pelarut lebih besar, sehingga meningkatkan efisiensi penarikan senyawa aktif (Ulfa *et al.*, 2024).

Serbuk daun mengkudu yang telah diayak hingga lolos mesh 40 kemudian ditimbang untuk menghitung persentase rendemen. Serbuk yang telah memenuhi ukuran tersebut selanjutnya diekstraksi menggunakan metode *Ultrasound-Assisted Extraction* (UAE). Menurut Andriani *et al.* (2019), UAE lebih unggul dibandingkan metode lainnya karena mampu menghasilkan ekstrak yang lebih pekat, kandungan zat aktif yang lebih tinggi, dan waktu ekstraksi yang lebih singkat, berkat bantuan gelombang ultrasonik yang meningkatkan permeabilitas dinding sel meskipun pada suhu rendah. Namun, di dalam metode UAE terdapat faktor yang mempengaruhi, salah satunya yaitu durasi ekstraksi. Pada penelitian ini, ekstraksi daun mengkudu dilakukan dengan membandingkan tiga durasi, yaitu 20, 40, dan 60 menit. Analisis variasi durasi dilakukan untuk mengetahui pengaruh waktu ekstraksi serta menentukan durasi optimum terhadap kadar senyawa fenolik dan flavonoid. Pemilihan durasi tersebut didasarkan pada hasil penelitian Buanasari *et al.*, (2021) yang menyatakan bahwa durasi 60 menit dan suhu 55°C mampu menghasilkan kadar fenolik dan flavonoid yang tinggi sebesar 197±0,148 mg GAE/g dan 173,4±0,65 mg QE/g. Sementara itu, penelitian Sekarsari *et al.*, (2019) menyebutkan bahwa ekstraksi dengan gelombang ultrasonik pada daun jambu biji (*Psidium guajava* L.) waktu 20 menit merupakan durasi terbaik untuk memperoleh kandungan senyawa aktif tertinggi yaitu sebesar 331,77 mg GAE/g dan 637,33 mg QE/g. Berdasarkan kedua penelitian tersebut, durasi 20 menit mewakili batas bawah, 60 menit mewakili batas atas, dan 40 menit dipilih sebagai batas tengah untuk mewakili tiap durasi. Oleh karena itu, pada penelitian ini digunakan tiga variasi durasi ekstraksi yang mewakili batas bawah, tengah, dan atas. Proses ekstraksi dilakukan menggunakan pelarut etanol 50% dengan rasio bahan terhadap pelarut sebesar 1:10. Pemilihan etanol 50% sebagai pelarut didasarkan pada penelitian (Komala *et al.*, 2020), yang menyatakan bahwa pelarut ini efektif melarutkan berbagai jenis senyawa, termasuk senyawa polar, semipolar, maupun non-polar, sehingga cocok digunakan untuk mengekstraksi senyawa bioaktif dari daun mengkudu.

Setelah proses ekstraksi selesai, larutan ekstrak disaring dengan kertas saring yang bertujuan untuk memisahkan partikel padat dari larutan sehingga hanya cairan

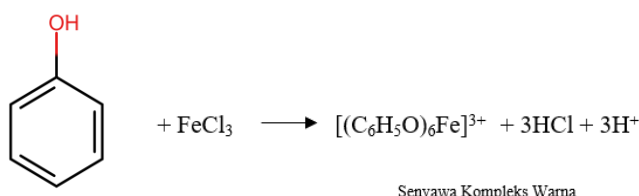
(filtrat) yang diperoleh. Ekstrak yang telah di saring, kemudian dipekatkan menggunakan *waterbath* dengan suhu 40°C setiap masing-masing durasi, sehingga didapatkan ekstrak kental. Pemekatan ekstrak bertujuan untuk mencegah kejenuhan pelarut, meningkatkan konsentrasi zat aktif, mengoptimalkan ekstraksi senyawa, serta mencegah pertumbuhan mikroba (Fauziah *et al.*, 2022). Hasil ekstrak yang sudah dipekatkan kemudian dilakukan perhitungan % rendemen. Berdasarkan **Tabel 3 dan Lampiran 4**, rendemen ekstrak etanol 50% pada durasi 20, 40, dan 60 menit sudah memenuhi syarat FHI yaitu >10%. Durasi ekstraksi 40 menit memiliki nilai rendemen yang lebih tinggi yakni sebesar 22,04% dibandingkan dengan durasi 20 dan 60 menit yakni berturut turut sebesar 20,05% dan 21,05%.

Ekstrak kental yang dihasilkan, kemudian dilakukan uji organoleptis bertujuan untuk memberikan identifikasi awal ekstrak melalui bentuk, bau, dan warna (Utami *et al.*, 2020). Berdasarkan uji organoleptis, didapatkan bahwa ekstrak etanol 50% durasi ke 20, 40, dan 60 menit memiliki karakteristik yang sama sesuai yang dilakukan oleh (Priamsari & Wibowo 2020), yang dapat dilihat pada **Tabel 4** yakni berwarna coklat kehitaman, bentuk ekstrak kental dengan aroma yang khas. Selanjutnya dilakukan uji fitokimia yang merupakan metode analisis kualitatif yang bertujuan untuk mengidentifikasi dan mendeteksi keberadaan senyawa metabolit sekunder tertentu dalam sampel daun mengkudu. Skrining fitokimia pada ekstrak daun mengkudu melibatkan pengujian terdapat beberapa jenis senyawa utama seperti alkaloid, flavonoid, fenolik, saponin dan tanin. Berdasarkan hasil fitokimia, ekstrak daun mengkudu mengandung positif alkaloid, flavonoid, fenolik saponin dan tanin, penemuan ini sejalan dengan riset yang dilakukan oleh (Nadia *et al.*, 2022).

Uji alkaloid dengan pereaksi *Wagner* menghasilkan perubahan warna dan terbentuk endapan coklat, Pada pereaksi *Dragendorff* menghasilkan perubahan warna serta membentuk endapan jingga, keduanya menunjukkan hasil positif. Sementara itu, pereaksi *Mayer* terdapat perubahan warna namun tidak menghasilkan endapan putih sehingga dinyatakan negatif. Penambahan HCl 2N pada uji alkaloid bertujuan menetralkan sifat basa alkaloid menjadi garam alkaloid hidroklorida, yang kemudian bereaksi dengan pereaksi: *Wagner* membentuk

kompleks iodin-alkaloid (endapan coklat), *Dragendorff* membentuk kompleks alkaloid-*bismut* (endapan jingga), sedangkan Mayer tidak membentuk kompleks alkaloid-*mercuri* iodida sehingga tidak terbentuk endapan putih, kemungkinan tidak mengandung senyawa alkaloid jenis tersier yaitu alkaloid yang bersifat basa bebas dan mampu membentuk kompleks dengan ion logam berat didalam daun mengkudu. pada penelitian ini hanya 2 dari 3 pereaksi yang menunjukkan hasil positif alkaloid. Hal ini dinyatakan bahwa sampel mengandung alkaloid.

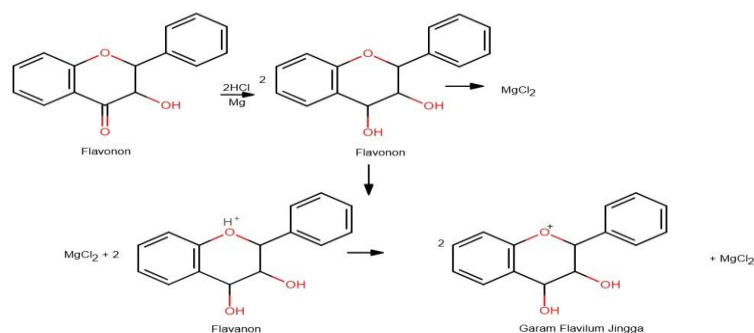
Selanjutnya dilakukan Uji terhadap senyawa fenolik dengan menambahkan larutan FeCl_3 5%, yang bertujuan untuk mengidentifikasi adanya gugus fenolik dalam sampel. Berdasarkan **Tabel 6** dan reaksi yang dirujuk pada **Gambar 12**, menunjukkan hasil positif dengan adanya warna hijau kehitaman yang mengidentifikasikan bahwa sampel mengandung senyawa fenolik. Perubahan warna ini karena fenolik dapat membentuk senyawa kompleks dengan FeCl_3 (Mukhriani *et al.*, 2019). Berdasarkan hasil uji senyawa fenolik, ekstrak dengan durasi 20 menit menunjukkan perubahan warna hijau kehitaman yang kurang intens dibandingkan dengan durasi 40 dan 60 menit. Perbedaan intensitas warna ini mengindikasikan bahwa kandungan senyawa fenolik yang terekstraksi pada durasi 20 menit lebih sedikit. Hal ini kemungkinan disebabkan oleh proses ekstraksi yang belum berlangsung optimal, sehingga pelarutan senyawa fenolik dari jaringan tanaman belum maksimal. Selain itu, proses penguapan yang lebih lama pada durasi 20 menit dibandingkan durasi lainnya juga dapat memengaruhi jumlah senyawa fenolik yang tertarik.



Gambar 12. Reaksi antara Senyawa Fenolik dengan FeCl_3 (Diadaptasi dari Mukhriani *et al.*, 2019 dengan program Marvin JS)

Berdasarkan **Tabel 6** dan reaksi yang dirujuk pada **Gambar 13**, uji flavonoid pada durasi 20, 40 dan 60 menunjukkan adanya warna jingga setelah

direduksi dengan asam klorida pekat dan serbuk magnesium, yang menghasilkan senyawa kompleks dan menandakan positif senyawa flavonoid golongan flavon, auron atau khalkon (Oktavia & Sutoyo, 2021). Menurut (Ramayani *et al.*, 2022), Perubahan warna hijau kehitaman pada ekstrak menjadi kuning jingga menunjukkan bahwa flavonoid dalam daun mengkudu merupakan golongan flavonol. Didukung dengan penelitian (Irfayanti *et al.*, 2023), yang menyatakan kandungan senyawa flavonoid utama dari daun mengkudu yaitu senyawa flavonol yakni kuersetin dan kaempferol. Berdasarkan hasil uji senyawa flavonoid, ekstrak dengan durasi 40 menit menunjukkan warna jingga paling intens, diikuti oleh durasi 60 menit, sedangkan durasi 20 menit menunjukkan warna paling kurang intens. Hal ini mengindikasikan bahwa kandungan flavonoid tertinggi terdapat pada durasi 40 menit, disusul oleh durasi 60 menit, dan terendah pada durasi 20 menit. Durasi 40 menit diduga merupakan waktu ekstraksi yang paling efektif untuk menarik senyawa flavonoid secara optimal. Sementara itu, pada durasi 60 menit, kandungan flavonoid kemungkinan mulai mengalami degradasi akibat durasi yang terlalu lama yang dapat menyebabkan peningkatan suhu. Adapun pada durasi 20 menit, rendahnya intensitas warna menunjukkan bahwa proses ekstraksi belum optimal dalam melarutkan senyawa flavonoid. Menurut penelitian Widyasanti *et al.*, (2018) menyatakan bahwa semakin lama proses ekstraksi berlangsung menyebabkan suhu pada sistem semakin tinggi. Didukung oleh penelitian Swara *et al.*, (2023) yang menyatakan bahwa waktu ekstraksi yang lama dan melampaui batas optimal membuat senyawa target mengalami oksidasi.



Gambar 13. Reaksi Flavonoid dengan HCl Pekat dan Serbuk Mg (Diadaptasi dari Oktavia & Sutoyo, 2021 dengan program Marvin JS)

Uji terhadap senyawa saponin memberikan hasil positif yang ditandai dengan kemunculan busa pada durasi 20 menit setinggi 2,4 cm, durasi 40 menit setinggi 1,8 cm dan durasi ke 60 menit setinggi 3 cm. Busa ini tidak hilang meskipun telah ditambahkan larutan asam klorida. Kondisi ini menunjukkan bahwa saponin bersifat larut dalam air dan akan membentuk busa ketika larutan dikocok atau mengalami agitasi. Pembentukan busa tersebut terjadi akibat interaksi antara molekul saponin dengan udara, yang menunjukkan karakteristik khas dari senyawa saponin sebagai senyawa amfipatik (mempunyai gugus hidrofilik dan hidrofobik) (Aryantini, 2021).

Uji fitokimia terhadap ekstrak daun mengkudu menunjukkan perubahan warna menjadi hijau kehitaman setelah penambahan larutan FeCl_3 1%. Perubahan warna ini mengindikasikan adanya senyawa tanin, khususnya golongan katekol atau tannin kondensasi, dalam sampel. Warna hijau kehitaman yang muncul merupakan hasil pembentukan kompleks antara tanin dan ion Fe^{3+} . Pembentukan kompleks ini terjadi karena ion Fe^{3+} berperan sebagai pusat koordinasi, sedangkan tanin berfungsi sebagai ligan dengan atom oksigen (O) yang memiliki pasangan elektron bebas. Dalam proses koordinasi ini, satu ion Fe^{3+} mampu berikatan dengan tiga molekul tanin, masing-masing menyumbangkan dua atom donor dari gugus hidroksil yang terletak pada posisi 4' dan 5'. Atom O pada posisi tersebut memiliki energi yang rendah, sehingga lebih stabil untuk membentuk ikatan koordinasi, dan sangat memungkinkan untuk menjadi ligan dalam pembentukan kompleks (Harahap *et al.*, 2024).

Kromatografi Lapis Tipis (KLT) digunakan dalam analisis kualitatif senyawa fenolik dan flavonoid ekstrak daun mengkudu yang bertujuan untuk mendukung dalam proses identifikasi senyawa kimia yang terdapat pada tumbuhan, serta sebagai pelengkap dari skrining fitokimia yang telah dilakukan (Forestryana & Arnida, 2020). Fase gerak yang digunakan ini melalui proses optimasi, hasil optimasi uji senyawa fenolik dapat di lihat pada **Tabel 7** sedangkan uji senyawa flavonoid dapat dilihat pada **Tabel 9**. Hasil optimasi menunjukkan bahwa kombinasi fase gerak kedua memberikan hasil terbaik karena menghasilkan elusi yang baik pada sampel dan standar serta mampu memisahkan keduanya dengan baik. Fase

gerak (eluen) yang digunakan pada uji senyawa fenolik terdiri dari campuran n-heksan: etil asetat: etanol dengan perbandingan 1:8:1 (v/v/v) yang bersifat cenderung semipolar, sedangkan pada uji senyawa flavonoid fase gerak yang digunakan terdiri dari campuran etanol: etil asetat: kloroform dengan perbandingan 1,5:2:8,5 (v/v/v) yang bersifat cenderung non polar. *Silika gel 60 F₂₅₄* berperan sebagai fase diam yang memiliki sifat polar. Sebelum digunakan, silika gel 60 F₂₅₄ diaktifkan terlebih dahulu dengan pemanasan di dalam oven pada suhu 100°C selama 30 menit. Hal ini bertujuan untuk mengurangi kelembapan dari plat, sehingga efisiensi daya adsorpsi dari fase diam dapat meningkat secara optimal (Trimulyani *et al.*, 2019). Standar asam galat dan kuersetin digunakan sebagai standar pembanding. Kuersetin dipilih karena memiliki struktur kimia yang mengandung gugus hidroksil yang secara posisi dan sifatnya serupa dengan flavon dan flavonol lain. Selain itu, di dalam sampel daun mengkudu terdapat senyawa kuersetin yang merupakan salah satu kelompok dari flavonoid subkelas flavonol (Irfayanti *et al.*, 2023). Sedangkan asam galat dipilih sebagai standar karena memiliki sifat stabil serta merupakan salah satu senyawa fenolik yang terdapat dalam daun mengkudu.

KLT pada metode ini, standar asam galat menunjukkan adanya bercak yang memisah pada plat dan standar asam galat terbentuk bercak hitam yang dapat dilihat pada **Gambar 8**. kuersetin dan senyawa flavonoid pada sampel dapat diidentifikasi dengan terbentuknya warna kuning yang terlihat secara visual saat terkena sinar UV 254 dan terbentuk warna gelap saat dikenai sinar UV 365. Berdasarkan **Gambar 9**, terlihat adanya bercak berwarna kuning kecoklatan pada standar kuersetin dan pada sampel hasil ekstraksi dengan durasi 20, 40, dan 60 menit muncul bercak kuning kehijauan. Munculnya bercak kuning kehijauan tersebut mengindikasikan kemungkinan keberadaan senyawa flavonoid dalam sampel yang dianalisis. Menurut Ayu *et al.*, (2019), perubahan warna noda menjadi kuning kehijauan setelah proses pemisahan menggunakan kromatografi lapis tipis (KLT) merupakan indikator positif adanya senyawa flavonoid. Berdasarkan hasil pengamatan KLT pada ekstrak etanol daun mengkudu dengan waktu ekstraksi 20, 40, dan 60 menit, teridentifikasi keberadaan senyawa kuersetin yang termasuk

dalam senyawa flavonoid dan asam galat yang termasuk dalam senyawa fenolik. Hal ini diperkuat oleh data pada **Tabel 8** dan **Tabel 10**, yang menunjukkan bahwa nilai R_f dari sampel hampir sejajar dengan nilai R_f standar asam galat pada uji senyawa fenolik sedangkan pada uji flavonoid nilai R_f sampel sejajar dengan Standar kuersetin. Kemiripan ini mengindikasikan bahwa ekstrak etanol dari ketiga durasi tersebut mengandung senyawa fenolik dan flavonoid. Selisih nilai R_f dianggap menunjukkan hasil positif apabila $\leq 0,05$, sedangkan perbedaan lebih dari 0,05 dinyatakan negative (Agustin *et al.*, 2021).

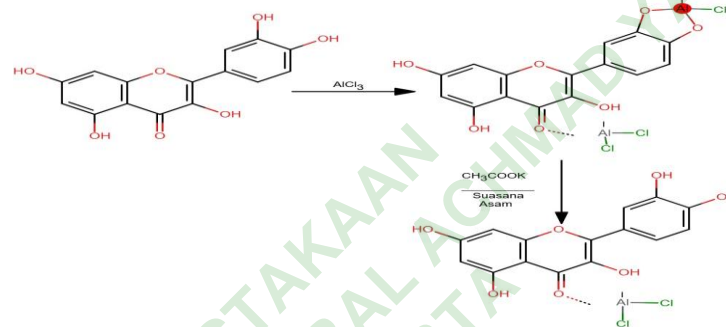
Uji kuantitatif dilakukan untuk menetapkan kadar fenolik dan flavonoid total ekstrak daun mengkudu menggunakan metode spektrofotometri UV-Vis. Metode ini dipilih karena senyawa fenolik dan flavonoid mengandung gugus kromofor dan aoksokrom yang mampu menyerap radiasi UV-Vis. Penetapan kadar fenolik dilakukan menggunakan reagen *Folin-Ciocalteu*, sedangkan kadar flavonoid ditentukan melalui metode kolorimetri dengan penambahan pereaksi aluminium klorida ($AlCl_3$).

Metode *Folin-Ciocalteu* didasarkan pada prinsip bahwa senyawa fenolik dapat dioksidasi oleh reagen *Folin-Ciocalteu*, menghasilkan senyawa kompleks berwarna biru. Warna biru ini terbentuk akibat interaksi antara gugus hidroksil pada senyawa fenolik dengan komponen dalam reagen, dan intensitas warnanya dapat diukur secara kuantitatif menggunakan spektrofotometer UV-Vis pada rentang panjang gelombang 600–800 nm. Kenaikan intensitas warna biru tersebut berbanding lurus dengan konsentrasi senyawa fenolik dalam sampel semakin tinggi kandungan senyawa fenolik yang teroksidasi, semakin pekat warna biru yang terbentuk (Rollando & Monica, 2018). Penelitian ini menggunakan asam galat sebagai senyawa pembanding karena asam galat termasuk dalam senyawa fenolik yang memiliki reaktivitas tinggi terhadap reagen *Folin-Ciocalteu*, sehingga menghasilkan data yang konsisten dan dapat diandalkan. Selain itu, asam galat merupakan senyawa fenolik alami yang bersifat stabil. Ketika asam galat bereaksi dengan reagen *Folin-Ciocalteu*, akan terbentuk warna kuning sebagai indikasi awal keberadaan senyawa fenolik dalam sampel. Reaksi ini berlangsung dalam kondisi basa untuk memfasilitasi disosiasi proton dari gugus hidroksil fenolik, sehingga

terbentuk ion fenolat yang diperlukan dalam proses oksidasi oleh reagen *Folin-Ciocalteu*. Larutan basa yang digunakan dalam reaksi ini adalah natrium karbonat (Na_2CO_3), yang berperan dalam menjaga pH reaksi tetap dalam kondisi basa optimal. Kondisi ini penting untuk mendukung pembentukan ion fenolat dari senyawa fenolik, yang diperlukan agar reaksi dengan reagen *Folin-Ciocalteu* dapat berlangsung secara efektif. Dalam proses ini, reagen *Folin-Ciocalteu* akan bereaksi dengan gugus hidroksil senyawa fenolik, menghasilkan kompleks *molibdenum-tungsten* berwarna biru. Intensitas warna biru yang terbentuk kemudian dapat dianalisis secara kuantitatif menggunakan spektrofotometer UV-Vis. (Andriani dan Murtisiwi 2018). Peningkatan intensitas warna biru yang terbentuk selama reaksi merupakan indikator langsung dari jumlah ion fenolat yang terdapat dalam larutan. Semakin tinggi konsentrasi senyawa fenolik dalam sampel, maka semakin banyak ion fenolat yang terbentuk. Ion fenolat ini berperan sebagai agen pereduksi terhadap senyawa heteropoli, yaitu kompleks *fosfomolibdat-fosfotungstat*. Reaksi reduksi tersebut menghasilkan pembentukan kompleks *molibdenum-tungsten*, yang bertanggung jawab atas munculnya warna biru dalam larutan. Semakin besar jumlah kompleks yang terbentuk, maka intensitas warna biru pun semakin kuat. (Nofita *et al.*, 2021).

Penetapan panjang gelombang (λ) maksimum dilakukan untuk memperoleh nilai serapan tertinggi dari sampel, sehingga pengukuran absorbansi dapat dilakukan secara optimal dan sesuai dengan prinsip Hukum *Lambert-Beer* (Anngela *et al.*, 2021). Berdasarkan hasil pengukuran, panjang gelombang maksimum yang diperoleh adalah 761 nm. Nilai ini sesuai dengan hasil penelitian Qonitah *et al.*, (2024), yang melaporkan bahwa kompleks reaksi menunjukkan serapan tertinggi pada panjang gelombang tersebut. Pemilihan panjang gelombang ini bertujuan agar analisis dilakukan pada titik serapan maksimal dari kompleks senyawa yang terbentuk, sehingga meningkatkan akurasi hasil pengukuran. Selain itu, panjang gelombang sebesar 761 nm berada dalam rentang panjang gelombang teoritis untuk senyawa asam galat, yaitu antara 750–765 nm, sebagaimana dijelaskan oleh (Asmorowati & Lindawati, 2019). Setelah didapatkan panjang gelombang maksimum kemudian dilakukan penentuan *operating time* yang bertujuan untuk

pergeseran panjang gelombang maksimum (*bathochromic shift*) yang menghasilkan perubahan warna menjadi lebih kekuningan. Reaksi pembentukan kompleks ini menghasilkan warna yang intensitasnya sebanding dengan konsentrasi flavonoid dalam sampel, sehingga semakin tinggi konsentrasi flavonoid, maka semakin tinggi pula nilai absorbansi yang terukur. Proses pembentukan kompleks flavonoid–AlCl₃ ditunjukkan pada **Gambar 15** (Masud & Puspitasari, 2017).



Gambar 15. Reaksi Flavonoid dengan AlCl₃ (Diadaptasi oleh Lindawati & Ni'ma, 2022 dengan program Marvin JS)

Kuersetin digunakan sebagai standar penetapan kadar flavonoid total karena tergolong flavonol yang banyak ditemukan pada berbagai spesies tumbuhan (Aminah *et al.*, 2017). Seperti ditunjukkan pada **Gambar 15**, kuersetin direaksikan dengan aluminium klorida (AlCl₃) dalam suasana asam. Pada penelitian ini digunakan asam asetat (CH₃COOH) sebagai pengasam. Kehadiran CH₃COOH mempertahankan kestabilan gugus keto pada posisi C-4 serta gugus hidroksi pada posisi C-3 atau C-5, memungkinkan pembentukan kompleks kuersetin–AlCl₃ yang memicu pergeseran panjang gelombang maksimum ke arah lebih panjang (*bathochromic shift*) (Pratiwi *et al.*, 2022). Penetapan panjang gelombang (λ) maksimum dilakukan untuk memperoleh nilai serapan tertinggi dari sampel, sehingga pengukuran absorbansi dapat dilakukan secara optimal dan sesuai dengan prinsip Hukum *Lambert-Beer* (Anngela *et al.*, 2021). Berdasarkan hasil pengukuran, panjang gelombang maksimum yang diperoleh adalah 415 nm. Nilai ini sesuai dengan penelitian Baturante *et al.*, (2024) yang melaporkan bahwa

kompleks reaksi menunjukkan serapan tertinggi pada panjang gelombang tersebut. Panjang gelombang ini dipilih karena memberikan tingkat serapan maksimum terhadap kompleks yang terbentuk, sehingga menghasilkan sensitivitas pengukuran yang optimal. Panjang gelombang tersebut berada dalam kisaran teoritis kuersetin yang termasuk senyawa golongan flavonol yaitu 370-450 nm (Az-Zahro *et al.*, 2023). Setelah didapatkan panjang gelombang maksimum kemudian dilakukan penentuan *operating time* yang bertujuan untuk mengetahui waktu pengukuran yang stabil yaitu ketika sampel bereaksi sempurna dan membentuk senyawa kompleks dengan reagen (Asmorowati & Lindawati, 2019). Hasil *operating time* didapatkan selama 34 menit. Hasil *operating time* ini sejalan dengan penelitian Fitri & Maharani, (2024) yang menunjukkan bahwa pada durasi tersebut nilai absorbansi telah mencapai kondisi stabil, memungkinkan pengukuran yang lebih akurat dan konsisten. Penentuan Panjang gelombang dan *operating time* ini penting dilakukan sebagai dasar validasi analisis kuantitatif kadar senyawa flavonoid menggunakan metode spektrofotometri.

Penetapan kadar total fenolik pada ekstrak daun mengkudu menggunakan rumus TPC sedangkan flavonoid menggunakan rumus TFC. Penetapan kadar diawali dengan mengukur absorbansi standar asam galat dan kuersetin untuk mencari kurva baku, yang kemudian digunakan untuk menentukan kadar fenolik dan flavonoid pada ekstrak etanol 50% daun mengkudu dengan variasi durasi ekstraksi 20, 40, dan 60 menit. Kurva baku asam galat yang diperoleh pada penelitian ini menunjukkan persamaan regresi linear $y = 0,002x + 0,076$ dengan nilai koefisien korelasi (r) sebesar 0,999. Kurva baku kuersetin yang diperoleh pada penelitian ini menunjukkan persamaan regresi linier $y = 0,005x + 0,003$ dengan nilai koefisien korelasi (r) sebesar 0,994. Nilai r yang mendekati 1/- 1 menunjukkan bahwa persamaan regresi tersebut memiliki hubungan yang sangat kuat dan linier antara konsentrasi asam galat dan kuersetin dengan nilai absorbansinya, sehingga hubungannya berbanding lurus (Yumita *et al.*, 2023) **Gambar 10** dan **Gambar 11**. Pengukuran absorbansi sampel untuk mencari kadar sesungguhnya dilakukan replikasi, tujuan dilakukan replikasi untuk meminimalkan terjadinya kesalahan

pengukuran serta memastikan keakuratan dan konsistensi data yang diperoleh (Suharyanto & Ramadhani, 2020).

Berdasarkan **Tabel 12** dan **Tabel 16**, hasil penelitian menunjukkan bahwa rata-rata kadar fenolik dan flavonoid total meningkat seiring dengan bertambahnya durasi ekstraksi. Pada durasi 20 menit, kadar fenolik tercatat sebesar $9,718 \pm 0,040$ mg GAE/g dan flavonoid $9,533 \pm 0,029$ mg QE/g. Setelah 40 menit, kadarnya meningkat menjadi $14,796 \pm 0,066$ mg GAE/g untuk fenolik dan $14,771 \pm 0,048$ mg QE/g untuk flavonoid. Namun pada 60 menit, kadar fenolik tetap meningkat menjadi $15,086 \pm 0,040$ mg GAE/g, sedangkan kadar flavonoid justru sedikit menurun menjadi $12,431 \pm 0,038$ mg QE/g. Hal ini mengindikasikan bahwa senyawa fenolik cenderung terus terekstraksi seiring bertambahnya waktu kontak antara pelarut dengan matriks sampel, sedangkan flavonoid memiliki titik optimum pada durasi tertentu sebelum mengalami degradasi. Penurunan kadar flavonoid pada waktu ekstraksi 60 menit diduga disebabkan oleh beberapa faktor. Salah satunya adalah peningkatan suhu lokal akibat energi ultrasonik yang bekerja terus-menerus, yang dapat memicu proses oksidasi sehingga mengurangi stabilitas flavonoid. Selain itu, pemanasan dalam waktu lama juga berpotensi menyebabkan kerusakan struktur kimia flavonoid, yang akhirnya menurunkan kadarnya dalam ekstrak (Buanasari *et al.*, 2021).

Data kadar fenolik dan flavonoid total yang dianalisis menggunakan SPSS versi 27 menunjukkan adanya perbedaan signifikan pada ekstrak etanol 50% daun mengkudu dengan variasi durasi ekstraksi 20, 40, dan 60 menit. Hasil uji *one-way* ANOVA menghasilkan nilai *sig. 3-tailed* sebesar 0,000 ($p < 0,05$), yang mengindikasikan bahwa durasi ekstraksi berpengaruh nyata terhadap kandungan fenolik dan flavonoid total yang dapat dilihat pada **Tabel 13** dan **Tabel 17**. Selanjutnya, dilakukan uji lanjutan menggunakan *post-hoc Tukey*. Hasil menunjukkan perbedaan signifikan antar setiap kelompok durasi ekstraksi, dengan nilai ($p < 0,05$).

Berdasarkan hasil penelitian, kadar fenolik tertinggi diperoleh pada durasi ke 60 menit sebesar $15,086 \pm 0,040$ mg GAE/g. Hasil ini sejalan dengan penelitian Buanasari *et al.*, (2021) yang menyatakan bahwa pada menit 60 menggunakan UAE

dengan sampel daun mengkudu menunjukkan hasil kadar fenolik lebih tinggi dengan nilai kadar sebesar $197,00 \pm 0,148$ mg GAE/g dibandingkan dengan kadar flavonoid sebesar $173,41 \pm 0,615$ mg ekstrak QE / g, Sedangkan pada kadar flavonoid total tertinggi didapatkan pada menit ke 40 dengan nilai kadar sebesar $14,771 \pm 0,048$ mg QE/g . Hasil kadar flavonoid sejalan dengan penelitian Lukmayani *et al.*, (2024), menyatakan bahwa waktu ekstraksi pada daun sirih merah selama 40 menit menghasilkan kadar flavonoid lebih tinggi dibandingkan waktu 20 dan 30 menit dengan nilai kadar sebesar 4,32 mg QE/g. Selain itu, hasil penelitian menunjukkan bahwa nilai kadar fenolik lebih besar dari pada nilai kadar flavonoid total dalam ekstrak daun mengkudu yang sejalan dengan penelitian (Buanasari *et al.*, 2021). Hal ini dikarenakan senyawa fenolik memiliki turunan senyawa lainnya seperti tanin, flavonoid, kumarin, lignin dan senyawa lainnya sehingga diperoleh nilai kadar total fenolik yang lebih besar dibandingkan dengan kadar total flavonoidnya. Kadar fenolik dan flavonoid yang tinggi memiliki potensi sebagai antioksidan. Aktivitas antioksidan dari senyawa fenolik dan flavonoid dapat memberikan berbagai manfaat kesehatan dengan melindungi tubuh dari kerusakan oksidatif (Nurhasanah *et al.*, 2024).