

BAB IV

HASIL DAN PEMBAHASAN

A. Hasil

1. Determinasi tanaman

Tahapan pertama dalam penelitian ini yaitu determinasi tanaman. Tujuan dari determinasi sendiri yaitu untuk mengetahui kebenaran identitas suatu tanaman sehingga dapat menghindari adanya kesalahan pada saat pengumpulan sampel (Sani et al., 2023). Determinasi dilakukan pada tanggal 14 Mei 2024 di Laboratorium Pembelajaran Biologi Universitas Ahmad Dahlan Yogyakarta dengan nomor surat 248/Lab.Bio/B/V/2024. Ditunjukkan dari surat determinasi tanaman bahwasannya sampel yang digunakan benar yaitu daun binahong (*Anredera cordifolia*). Surat hasil determinasi tercantum pada Lampiran 2.

2. Persiapan sampel

Daun binahong yang digunakan dipetik di daerah Jl. Monggang, RT 37, Monggang, Pendowoharjo, Sewon, Bantul, Yogyakarta yang dipetik pukul 06.00-07.00 pagi hari untuk memperoleh senyawa aktif yang tinggi dan mencegah kerusakan senyawa aktif akibat oksidasi saat fotosintesis. Daun yang dipetik yaitu daun yang berwarna hijau, segar, berukuran cukup besar sehingga sampel yang terkumpul sekitar 8,5 kg.

Daun binahong dibersihkan dari pengotor yang menempel pada daun dengan cara dicuci bersih dengan air mengalir lalu ditiriskan, dirajang dan dikering-anginkan. Dilakukan sortasi kering guna menyingkirkan pengotor atau benda asing lainnya yang masih menempel pada daun binahong sehingga didapatkan simplisia yang baik (Yani et al., 2023). Pengeringan sampel dilakukan dengan oven bersuhu 50°C selama 3 hari yang bertujuan agar kadar air dari sampel berkurang sehingga mampu menghambat pertumbuhan mikroba yang tidak diinginkan (Warnis et al., 2020). Sampel yang telah mengering lalu diserbukkan menggunakan *grinder*. Menurut Werdiningsih et al (2022) tujuan dilakukan penyerbukkan yaitu agar ukuran partikel semakin

kecil, dimana semakin kecil ukuran partikel akan membuat kontak antara permukaan dengan pelarut lebih besar sehingga senyawa target yang tertarik saat ekstraksi semakin banyak. Serbuk simplisia diayak menggunakan ayakan no 40 mesh yang bertujuan untuk menyamakan ukuran partikel dari serbuk simplisia. Total serbuk simplisia yang diperoleh yaitu 384,4 gram.

3. Desain faktorial

Pada penelitian ini rancangan yang digunakan ialah Rancangan Acak Kelompok (RAK) dengan 2 faktor: rasio pelarut dan waktu ekstraksi. Rasio pelarut yang digunakan adalah 1:5, 1:10 dan 1:15 serta waktu ekstraksi 10, 20, dan 30 menit. Agar mendapatkan data yang lebih akurat, penelitian ini dilakukan 3 kali replikasi dengan total 27 kali. Hasil RAK dapat dilihat pada Tabel 3.

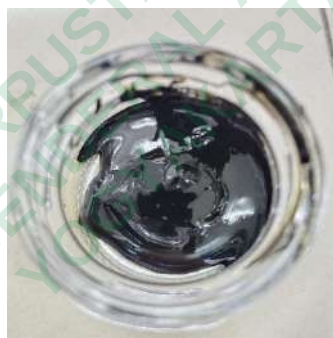
Tabel 3. Desain Rancangan Acak Kelompok (RAK)

Rasio Pelarut	Waktu Ekstraksi (menit)	Replikasi
1:5	10	1
		2
		3
	20	1
		2
		3
	30	1
		2
		3
1:10	10	1
		2
		3
	20	1
		2
		3
	30	1
		2
		3
1:15	10	1
		2
		3
	20	1
		2
		3
	30	1
		2
		3

Keterangan. **1:5** (10 g simplisia : 50 mL pelarut), **1:10** (10 g simplisia : 100 mL pelarut), **1:15** (10 g simplisia : 150 mL pelarut)

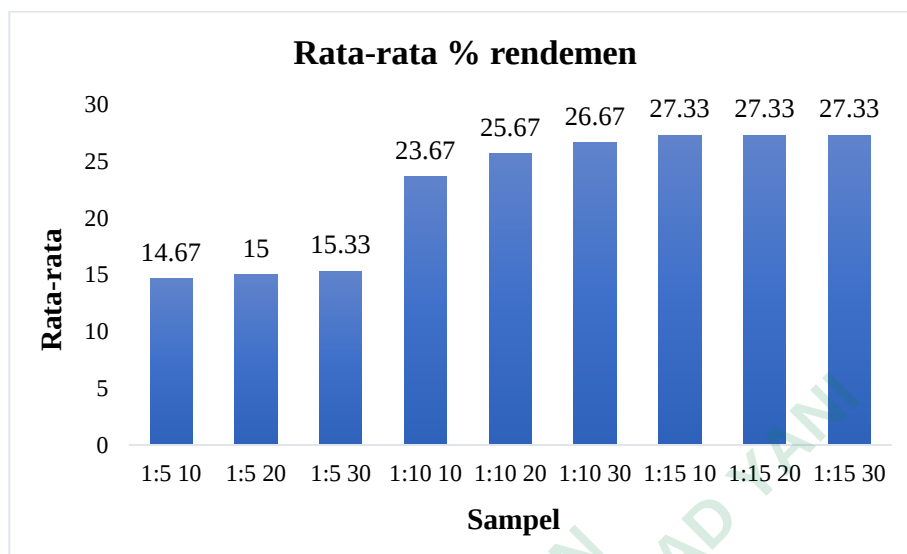
4. Pembuatan ekstrak daun binahong

Pada penelitian ini dilakukan ekstraksi menggunakan metode UAE dengan pelarut etanol 70% memakai rasio pelarut dan waktu ekstraksi sesuai dengan RAK pada **Tabel 3**. 10 gram serbuk daun binahong dilarutkan dalam etanol 70% dengan rasio 1:5, 1:10, 1:15 yang artinya 10 gram dalam 50 mL, 100 mL dan 150 mL etanol 70%. Waktu 10, 20 dan 30 menit digunakan sebagai waktu ekstraksi dengan suhu 40°C. Setiap variasi rasio pelarut dan waktu ekstraksi direplikasi sebanyak 3 kali. Hasil ekstraksi kemudian disaring menggunakan kertas saring lalu dipekatkan dengan *waterbath* bersuhu 40°C supaya senyawa kimia yang terdapat pada sampel tidak rusak karena pemanasan tinggi (R. Sari et al., 2017).



Gambar 13. Ekstrak Kental Daun Binahong
(Sumber : Dokumentasi Pribadi)

Ekstrak kental yang didapat seperti pada **Gambar 13** lalu ditimbang kemudian dilakukan perhitungan nilai rendemen. Hasil rerata nilai % rendemen tercantum pada **Gambar 14**, dimana hasil yang tinggi yaitu sebesar 26,67% pada rasio 1:10 30 menit dan 27,33% pada rasio 1:15 10, 20, 30 menit. Hasil tersebut memiliki hasil nilai $p > 0,05$ yang artinya tidak berpengaruh signifikan. Berdasarkan hasil yang dieproleh, nilai rendemen ekstrak kental daun binahong masuk dalam syarat pada Farmakope Herbal Indonesia yaitu tidak $\leq 11,9\%$ (Kemenkes RI, 2017).



Gambar 14. Hasil % Rendemen Ekstrak

5. Uji organoleptik

Hasil pengujian yang dilakukan pada sampel diperoleh sifat fisik ekstrak etanol daun binahong tercantum dalam **Tabel 4**. Hasil uji yang dilakukan ini memiliki kesamaan dengan penelitian terdahulu yaitu oleh Hita et al (2020).

Tabel 4. Uji Organoleptik

Uji	Hasil	Teori (Hita et al., 2020)
Warna	Hijau kehitaman	Hijau kehitaman
Aroma	Khas	Khas
Rasa	Pahit	Pahit
Tekstur	Kental	Kental

6. Uji penapisan fitokimia

Didapatkan hasil uji penapisan fitokimia ekstrak etanol daun binahong bahwa dari setiap ekstrak positif mengandung senyawa alkaloid, flavonoid, saponin, fenolik, triterpenoid dan steroid. Hasil uji bisa dilihat dalam **Tabel 5**. dan seluruh hasil uji tercantum dalam **Lampiran 6**.

Tabel 5. Hasil Uji Penapisan Fitokimia

Sampel	Alkaloid			Flavonoid	Saponin	Fenolik	Triterpenoid	Steroid
	Dragendroff	Mayer	Wagner					
1:5 10	+	-	+	+	+	+	+	+
1:5 20	+	-	+	+	+	+	+	+
1:5 30	+	-	+	+	+	+	+	+
1:10 10	+	-	+	+	+	+	+	+
1:10 20	+	-	+	+	+	+	+	+
1:10 30	+	-	+	+	+	+	+	+
1:15 10	+	-	+	+	+	+	+	+

1:15 20	+	-	+	+	+	+	+	+
1:15 30	+	-	+	+	+	+	+	+

Keterangan : (+) = Positif mengandung senyawa, (-) = Negatif mengandung senyawa

Berdasarkan **Tabel 5.** dari masing masing variasi rasio pelarut (1:5, 1:10 dan 1:15) pada waktu ekstraksi (10, 20, 30 menit) diperoleh hasil uji fitokimia. Pada uji alkaloid ekstrak ditambahkan dengan kloroform beramoniak lalu disaring dan diambil lapisan atas filtratnya. Dari penambahan 3 reagen yaitu Dragendroff, Mayer dan Wagner didapatkan hasil pada penambahan reagen Dragendroff menunjukkan endapan jingga. Pada penambahan reagen Mayer tidak menunjukkan adanya endapan putih kekuningan, sedangkan dengan penambahan reagen Wagner terbentuk endapan berwarna cokelat.

Pada uji identifikasi flavonoid ekstrak daun binahong ditambahkan 3 mL etanol 70%, disaring, lalu filtratnya ditambahkan 100 mg serbuk magnesium dan HCl pekat 5 tetes. Hasil yang positif ketika ditandai dengan terbentuknya warna jingga. Seluruh sampel mampu membentuk warna jingga yang artinya terdapat senyawa flavonod dalam sampel.

Pada uji saponin dengan penambahan 2 mL air panas pada ekstrak daun binahong kemudian digojog selama 1 menit. Dari hasil pengujian didapatkan adanya busa yang stabil setelah didiamkan 7 menit yang artinya mengandung senyawa saponin.

Pada uji senyawa fenolik masing-masing sampel ditambahkan dengan 2 mL FeCl_3 5% kemudian diperoleh hasil positif mengandung senyawa fenolik yang ditandai dengan perubahan warna menjadi hijau.

Pada uji senyawa triterpenoid dan steroid ekstrak dilarutkan dengan n-heksan dan ditambahkan dengan CH_3COOH glasial dan H_2SO_4 pekat. Hasil yang diperoleh menunjukkan terbentuknya cincin berwarna cokelat yang menandakan positif triterpenoid dan terbentuk cincin berwarna hijau yang menunjukkan positif steroid.

7. Pengujian KLT

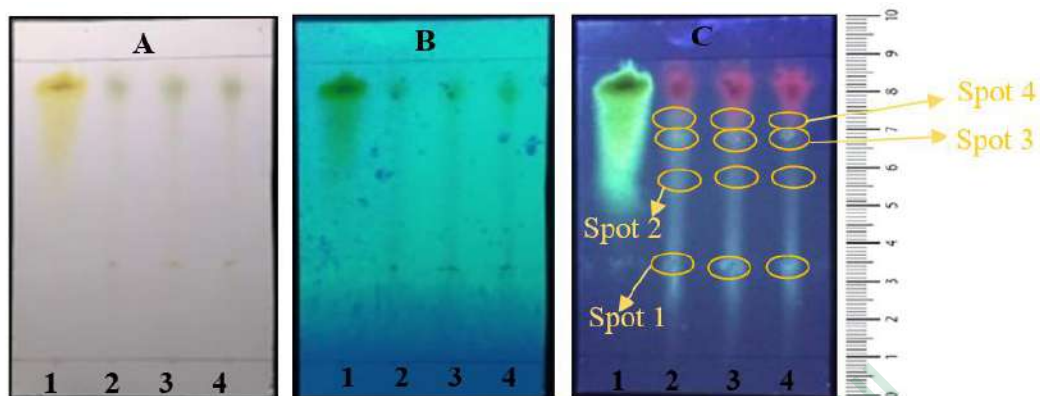
Pengujian KLT tujuannya ialah untuk identifikasi ada tidaknya senyawa flavonoid dari ekstrak daun binahong. Dalam penelitian ini kuersetin

digunakan sebagai standar. Digunakan fase diam yakni plat KLT 60 F₂₅₄ yang sudah diaktivasi menggunakan oven selama 30 menit dengan suhu 110°C agar kadar air yang terdapat pada plat hilang. Faktor yang berpengaruh dalam pengujian KLT ini diantaranya kesesuaian fase gerak, aktivasi plat, penotolan, serta kejenuhan dan uap dalam *chamber* (Fajriani et al., 2022). Melalui optimasi maka dihasilkan fase gerak yang optimal yang digunakan dalam penelitian ini. Tujuan dilakukannya optimasi adalah untuk mengetahui fase gerak mana yang cocok dalam uji KLT. Hasil optimasi fase gerak tercantum dalam **Tabel 6**.

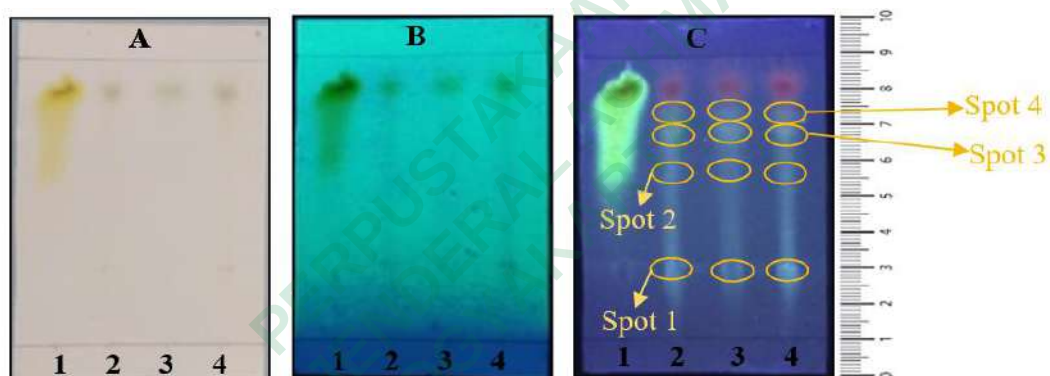
Tabel 6. Hasil Optimasi Fase Gerak

No	Fase Gerak	Hasil
1.	n-butanol: asam asetat: air (4:1:5)	Fase gerak naik, sampel terelusi dan menghasilkan warna kuning tetapi bercak kuersetin terdapat <i>tailing</i> .
2.	n-heksan: etil asetat: metanol (6:3:1)	Fase gerak sedikit naik, bercak kuersetin sedikit lebih naik daripada sampel, tetapi bercak sampel samar-samar.
3.	Etil asetat: n-heksan (7:3)	Fase gerak naik, bercak kuersetin dan sampel sejajar tetapi bercak tidak terlalu jelas.
4.	Etanol:etil asetat: kloroform (1,5:2:8,5)	Fase gerak naik, bercak kuersetin sedikit lebih naik dari pada sampel tetapi bercak sampel tidak jelas.

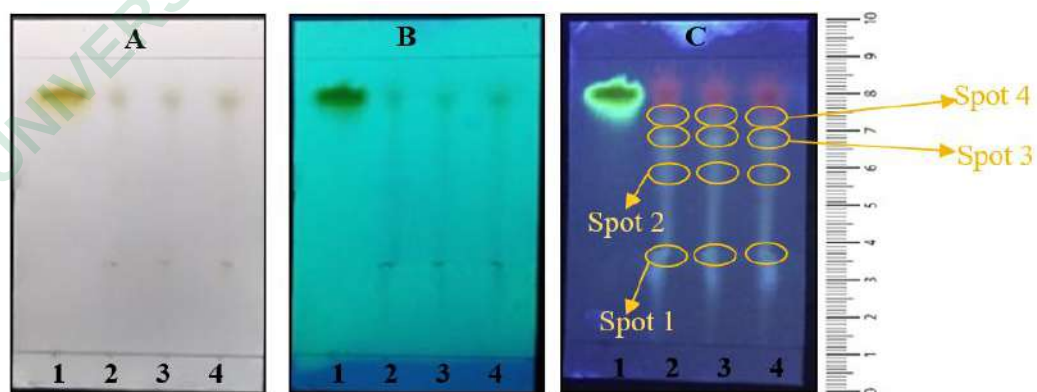
Berdasarkan hasil optimasi, fase gerak yang paling optimal yakni campuran n-butanol : asam asetat : air (4:1:5) yang dibuat dalam volume 10 mL. digunakan AlCl₃ 5% sebagai penampak bercak pada plat KLT. Kuersetin 0,5% digunakan sebagai standar dalam uji KLT ini. Plat KLT yang sudah disemprotkan dengan AlCl₃ kemudian diamati pada sinar UV 254 nm dan 365 nm. Hasil uji KLT terlihat dalam **Gambar 15**.



Keterangan. 1: Standar kuersetin, 2: Sampel 10 menit (1:5), 3: Sampel 20 menit (1:5), 4: Sampel 30 menit (1:5), A: Visualisasi sinar tampak, B: Deteksi UV 254 nm setelah disemprot AlCl_3 5%, C: Deteksi sinar 365 nm setelah disemprot AlCl_3 5%.



Keterangan. 1: Standar kuersetin, 2: Sampel 10 menit (1:10), 3: Sampel 20 menit (1:10), 4: Sampel 30 menit (1:10), A: Visualisasi sinar tampak, B: Deteksi UV 254 nm setelah disemprot AlCl_3 5%, C: Deteksi sinar 365 nm setelah disemprot AlCl_3 5%.



Keterangan. 1: Standar kuersetin, 2: Sampel 10 menit (1:15), 3: Sampel 20 menit (1:15), 4: Sampel 30 menit (1:15), A: Visualisasi sinar tampak, B: Deteksi UV 254 nm setelah disemprot AlCl_3 5%, C: Deteksi sinar 365 nm setelah disemprot AlCl_3 5%.

Gambar 15. Hasil Uji KLT

Berlandaskan hasil pengujian KLT, bercak yang ada pada plat KLT dan hasil nilai Rf menunjukkan bahwa ekstrak etanol daun binahong mengandung flavonoid. Hasil pengujian KLT dan nilai Rf dapat terdapat dalam **Tabel 7**.

Tabel 7. Hasil Uji KLT dan Hasil Nilai Rf

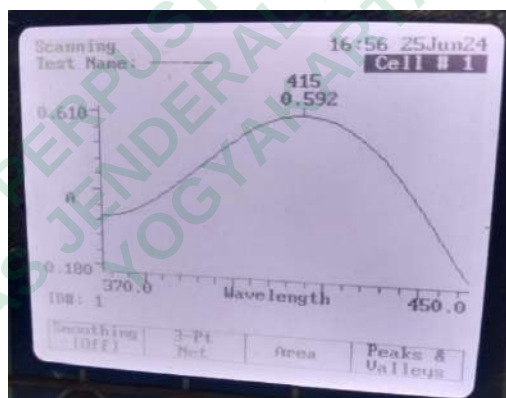
Sampel		Warna		Rf Standar	Rf Sampel
Rasio Pelarut	Waktu Ekstraksi (menit)	Spot	254 nm	365 nm	
1:5	10	1	BC	K	0,325
		2	BC	K	0,588
		3	BC	K	0,738
		4	BC	K	0,813
	20	1	BC	K	0,313
		2	BC	K	0,588
		3	BC	K	0,75
		4	BC	K	0,8
	30	1	BC	K	0,3
		2	BC	K	0,575
		3	BC	K	0,75
		4	BC	K	0,788
1:10	10	1	BC	K	0,25
		2	BC	K	0,613
		3	BC	K	0,725
		4	BC	K	0,8
	20	1	BC	K	0,25
		2	BC	K	0,613
		3	BC	K	0,738
		4	BC	K	0,813
	30	1	BC	K	0,25
		2	BC	K	0,613
		3	BC	K	0,725
		4	BC	K	0,8
1:15	10	1	BC	K	0,313
		2	BC	K	0,588
		3	BC	K	0,713
		4	BC	K	0,775
	20	1	BC	K	0,313
		2	BC	K	0,6
		3	BC	K	0,713
		4	BC	K	0,775
	30	1	BC	K	0,325
		2	BC	K	0,588
		3	BC	K	0,713
		4	BC	K	0,775

Keterangan. BC= Biru kecoklatan, K = Kuning

8. Penetapan kadar flavonoid total

a. Penetapan λ maksimum

Penetapan λ maksimum dilakukan guna mengetahui panjang gelombang pengukuran, ketika ikatan kuersetin dan AlCl_3 10% mampu memberikan absorbansi optimum. Penetapan λ maksimum bertujuan agar mengetahui panjang gelombang saat serapan tertinggi. Proses pembacaan serapan dilakukan menggunakan larutan kuersetin 100 ppm dicampur AlCl_3 10% dan CH_3COOH 5% yang kemudian dibaca dengan alat spektrofotometri UV-Vis dalam rentang λ 370-450 nm. Didapatkan λ maksimumnya yaitu 415 nm. Hasil λ maksimum yang didapat memiliki kesamaan dengan penelitian yang dilakukan oleh Ipandi et al (2016) dan Pratiwi et al (2022). Penetapan hasil λ maksimum terlihat dalam **Gambar 16**.



Gambar 16. Panjang gelombang maksimum kuersetin

b. Penetapan *operating time* kuersetin

Penetapan OT dilakukan guna menentukan berapa lama sampel bereaksi sempurna dan membentuk senyawa kompleks ditandai oleh absorbansi mencapai konstan (Yani et al., 2023). Larutan untuk OT yaitu terdiri dari kuersetin 100 ppm ditambahkan dengan AlCl_3 10% dan CH_3COOH 5% kemudian dibaca absorbansinya pada λ 415 nm dalam waktu 1 jam dengan interval setiap 1 menit. Hasil OT yang diperoleh yaitu konstan pada waktu ke-39 menit, dimana selisih 1 menit dengan penelitian

yang dilakukan oleh Khairunnisa et al (2022) yaitu pada menit ke-38. Hasil absorbansi stabil pada *operating time* dapat dilihat dalam **Lampiran 10**.

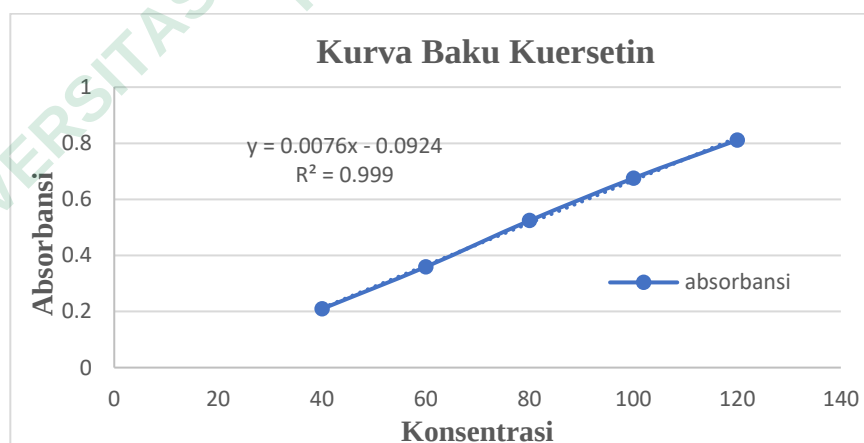
c. Pembuatan kurva baku kuersetin

Larutan kurva baku terbuat dalam seri konsentrasi 40, 60, 80, 100 dan 120 ppm lalu di *ad* etanol *p.a* sampai 10 mL. Setiap seri konsentrasi ditambahkan AlCl_3 10% dan CH_3COOH 5% kemudian diinkubasi selama 39 menit dan dibaca absorbansinya pada λ 415 nm. Hasil pembacaan absorbansi tercantum dalam **Tabel 8**.

Tabel 8. Hasil Absorbansi Kurva Baku Kuersetin

Konsentrasi Standar Kuersetin (ppm)	Absorbansi
40	0,209
60	0,359
80	0,524
100	0,675
120	0,811

Pada **Gambar 17**, menunjukkan hasil nilai regresi antara konsentrasi baku kuersetin (x) dan absorbansi (y) yaitu $y = 0,0076x - 0,0924$ dengan nilai r^2 sebesar 0,999 dimana hasilnya mendekati 1 atau semakin linear, sehingga bisa diartikan mempunyai korelasi yang sangat kuat antara absorbansi dan konsentrasi (Asmorowati & Lindawati, 2019).



Gambar 17. Kurva baku konsentrasi standar kuersetin

d. Penetapan kadar flavonoid total

Larutan ekstrak daun binahong dengan volume 0,5 mL dicampur dengan 0,5 mL AlCl_3 10% dan 4 mL CH_3COOH 5%. Larutan tersebut

dilakukan inkubasi dalam waktu 39 menit lalu dibaca absorbansinya dengan λ maksimum 415 nm dan blanko yang dipakai etanol *p.a.* Hasil pembacaan absorbansi dari setiap sampel yang didapat digunakan sebagai nilai *y* dalam persamaan regresi sehingga diperoleh kadar flavonoid total yang dapat dilihat pada **Lampiran 13**. Dari nilai absorbansi dan kadar yang diperoleh dari ekstrak daun binahong, sampel 1:10 30 merupakan kadar flavonoid total paling optimal yang dapat dilihat pada **Tabel 9**.

Tabel 9. Kadar Flavonoid Total Ekstrak Etanol Daun Binahong

Sampel		Kadar Flavonoid Total (mg QE/g) $\pm$ SD
Rasio Pelarut	Waktu Ekstraksi (menit)	
1:5	10	31,035 $\pm$ 0,166
	20	34,544 $\pm$ 0,833
	30	35,202 $\pm$ 0,703
1:10	10	37,636 $\pm$ 0,498
	20	39,368 $\pm$ 0,996
	30	39,654$\pm$1,676
1:15	10	40,904 $\pm$ 2,574
	20	41,671 $\pm$ 0,301
	30	41,342 $\pm$ 0,301

9. Analisis Data

Uji statistik ini menggunakan SPSS versi 25 untuk menganalisis data perhitungan setiap kadar flavonoid total yang didapat dari ekstrak daun binahong. Tujuan dari uji statistik ini ialah agar menunjukkan bahwa ada perbedaan yang signifikan dalam hasil pengukuran yang dihasilkan untuk masing-masing variabel sampel. Sampel dalam penelitian ini dilakukan uji parametrik yaitu *one-way* ANOVA. Syarat agar dapat dilakukan uji *one-way* ANOVA yaitu nilai standarisasi atau signifikansi harus terdistribusi normal dan homogen. Apabila nilai signifikansi $<0,05$ maka dapat dilakukan uji non parametrik *Kruskal Wallis*. Dalam penelitian ini, untuk melihat data terdistribusi secara normal dilakukan uji *Shapiro-Wilk* karena jumlah sampel <50 . Uji homogenitas dilakukan dengan uji *Levene Statistic* untuk melihat besarnya varians antara dua atau lebih data yang berbeda.

Hasil yang diperoleh dari nilai rendemen pada rasio 1:10 30 menit data terdistribusi normal tapi tidak homogen sedangkan pada rasio 1:15 10, 20,

30 menit data terdistribusi tidak normal serta tidak homogen. Dilakukan uji *Kruskal Wallis* dan uji lanjutan *Pairwise Comparisons*, didapatkan nilai $p > 0,05$ yang artinya tidak ada perbedaan yang signifikan. Hasil analisis data dapat dilihat dalam **Tabel 10**.

Tabel 10. Uji Statistik Nilai % Rendemen

Sampel		Uji		
		Normalitas	Homogenitas	<i>Kruskal Wallis</i> <i>Pairwise Comparisons</i>
1:10	30	0,253	0,023	0,851 0,851
	10	0,000		
1:15	20	0,000		
	30	0,000		

Keterangan. Sig. $> 0,05$: Data terdistribusi normal; Sig. $< 0,05$: Data tidak homogen; Asym. Sig. $> 0,05$: Tidak terdapat perbedaan yang signifikan.

Hasil data nilai Rf dianalisis statistik dan diperoleh hasil data yang terdistribusi normal dan homogen yang ditunjukkan dari nilai $p > 0,05$. Data dilanjutkan dengan uji parametrik *One Way Anova (Bonferroni)*, dimana diperoleh hasil nilai $p > 0,05$. Hasil tersebut menunjukkan bahwa tidak terdapat perbedaan signifikan antara rasio pelarut dan waktu ekstraksi terhadap nilai Rf. Hasil analisis statistik tercantum dalam **Tabel 11**.

Tabel 11. Uji Statistik Nilai Rf

Sampel		Uji		<i>One Way Anova (Bonferroni)</i>
		Normalitas	Homogenitas	
1:5	10	0,612	1,000	1,000
	20	0,461		
	30	0,407		
1:10	10	0,349		
	20	0,378		
	30	0,349		
1:15	10	0,478		
	20	0,428		
	30	0,505		

Keterangan. Sig. $> 0,05$: Data terdistribusi normal; Sig. $> 0,05$: Data homogen; Asym. Sig. $> 0,05$: Tidak terdapat perbedaan yang signifikan.

Data hasil uji flavonoid total yang ditunjukkan dari **Tabel 12** menunjukkan bahwa data sampel terdistribusi secara normal tetapi tidak homogen. Hasil data tersebut diuji dengan uji non parametrik *Kruskal Wallis* dengan nilai $p < 0,05$ yang dapat diartikan ada perbedaan nyata dari setiap

perlakuan, dimana H_0 ditolak dan H_1 diterima. Data yang telah diuji dengan *Kruskal Wallis* kemudian dilanjutkan dengan uji *Pairwise Comparisons*. Hasil data yang telah diuji menunjukkan adanya pengaruh pada kadar flavonoid total ekstrak daun binahong yang dihasilkan dari rasio pelarut serta waktu ekstraksi.

Tabel 12. Uji Statistik Kadar Flavonoid Total

Sampel		Uji		
		Normalitas	Homogenitas	<i>Kruskal Wallis</i>
1:10	30	0,150	0,022	0,147
	10	0,369		
1:15	20	0,636		
	30	0,636		

Keterangan. Sig. >0,05 : Data terdistribusi normal; Sig. <0,05 : Data tidak homogen; Asym. Sig. <0,05 : Terdapat perbedaan yang signifikan.

B. Pembahasan

Penelitian ini dilakukan untuk menguji efek rasio pelarut dan waktu ekstraksi terhadap kadar flavonoid total dari daun binahong (*Anredera cordifolia*). Metode UAE merupakan metode yang digunakan untuk ekstraksi dalam penelitian ini. Prinsip dari metode ini ialah adanya gelombang yang dapat melewati medium yang dilalui sehingga terbentuk getaran. Dari getaran ini akan membentuk gelembung kavitasi yang dapat memecah dinding sel dari sampel sehingga pelarut dapat menembus ke dalam bahan. Komponen yang ada di dalam sampel akan keluar terbawa oleh pelarut (Maharani et al., 2022). Senyawa target yang akan diteliti yaitu flavonoid dimana flavonoid merupakan senyawa yang bersifat polar, oleh karena itu pemilihan pelarut disesuaikan berdasarkan prinsip *like dissolve like* yang berarti bahwa senyawa yang memiliki sifat polar akan larut dalam pelarut yang memiliki sifat polar juga (Yani et al., 2023). Pelarut untuk ekstraksi menggunakan etanol 70% karena flavonoid memiliki sifat yang polar dan dibandingkan dengan jenis pelarut organik lainnya, etanol mampu menarik banyak senyawa aktif. Dari tingkat toksisitasnya yang rendah, etanol adalah satu-satunya jenis pelarut yang aman jika dikonsumsi karena tidak bersifat racun (Hasanah & Novian, 2020).

Nilai rendemen menggambarkan banyaknya senyawa bioaktif yang terkandung dalam sampel. Semakin tinggi nilai rendemen maka semakin tinggi juga

kandungan zat yang tertarik oleh pelarut saat ekstraksi. Nilai rendemen yang didapatkan dari variasi 1:5, 1:10 dan 1:15 menunjukkan hasil yang meningkat seiring dengan rasio pelarut dan lama ekstraksi. Hasil rendemen dengan rasio 1:10 30 menit dan rasio 1:15 dengan waktu ekstraksi 10, 20, 30 menit menunjukkan hasil yang tinggi berturut-turut yaitu sebesar 26,67% dan 27,33%. Faktor rasio pelarut dapat mempengaruhi luas kontak padatan dengan pelarut, semakin besar volume pelarut maka semakin besar luas kontak. Saat distribusi pelarut ke padatan merata, maka nilai rendemen yang dihasilkan meningkat. Begitu juga dengan waktu ekstraksi, ketika kontak antara padatan dan pelarut lebih lama maka nilai rendemen yang dihasilkan juga meningkat (Rifkia & Revina, 2023). Pada rasio pelarut 1:15 selama 10, 20 dan 30 menit menghasilkan nilai rendemen yang konstan karena dengan penambahan volume pelarut dan waktu ekstraksi dalam jumlah tertentu, sampel mengalami kondisi kesetimbangan atau jenuh dimana senyawa yang terlarut tidak maksimal atau tidak dapat larut dalam pelarut lagi. Nilai rendemen rasio 1:10 30 menit dan rasio 1:15 10, 20, 30 menit dilakukan analisis statistik dan diperoleh hasil bahwa rasio pelarut dan waktu ekstraksi tidak berpengaruh secara signifikan terhadap nilai rendemen yang dibuktikan dengan nilai $p > 0,05$ ($p = 0,851$). Dipilih rasio 1:10 dan waktu ekstraksi 30 menit sebagai nilai rendemen yang optimal karena rasio dan waktu ekstraksi tersebut efisien dalam hal volume pelarut dan mencegah terjadinya kondisi jenuh akibat penambahan sejumlah volume pelarut.

Ekstrak kental daun binahong dengan variasi rasio pelarut dan waktu ekstraksi dilakukan uji penapisan fitokimia guna mengidentifikasi kandungan metabolit sekunder apa saja yang ada dalam sampel. Hasil yang didapatkan yaitu ekstrak daun binahong positif mengandung senyawa alkaloid, flavonoid, saponin, fenolik, triterpenoid dan steroid. Hasil yang ditunjukkan tersebut sesuai dengan penelitian sebelumnya (Sanjaya et al., 2021; Sjahid et al., 2020). Hasil uji identifikasi alkaloid dengan reagen Dragendorff dan Wagner menunjukkan hasil positif, sedangkan dengan penambahan reagen Mayer hasil uji negatif. Hasil negatif yang ditunjukkan dengan penambahan reagen Mayer dikarenakan ekstrak daun binahong tidak mengandung alkaloid jenis *anthipyrin*, *papaverinum*, *pyramidon*, dan metadon (Himmah et al., 2016). Reaksi dengan reagen Mayer bukanlah tes

spesifik untuk suatu jenis alkaloid tertentu. Analisis lebih lanjut perlu dilakukan untuk memastikan jenis alkaloid seperti dengan metode kromatografi atau spektroskopi. Hasil positif yang diperoleh dalam penapisan fitokimia menurut Prayoga et al (2019) dalam pengujian alkaloid apabila dari tiga reagen, minimal dua reagen yang menunjukkan positif maka dikatakan positif senyawa alkaloid. Endapan jingga dan coklat yang terbentuk dengan penambahan reagen adalah kompleks kalium-alkaloid yang mengendap.

Hasil positif flavonoid bila ditambahkan magnesium dan HCl pekat membentuk warna jingga dikarenakan reaksi magnesium dan HCl pekat membentuk gelembung gas H_2 dimana inti benzopiron dalam struktur flavonoid akan tereduksi. Hasil akhirnya akan terjadi perubahan warna menjadi jingga atau merah. Hasil positif saponin dengan penambahan air panas dan penggojogan yang membentuk busa stabil selama 7 menit dikarenakan adanya glikosida akan terbentuk buih atau busa dalam air kemudian terhidrolisis menjadi glukosa. Senyawa glikosida steroid ini bersifat seperti sabun dengan kemampuan untuk menghasilkan buih (Susanty & Yudhistirani, 2018). Hasil yang menunjukkan positif fenol dengan penambahan $FeCl_3$ yakni warna yang berubah menjadi hijau-kehitaman akibat terbentuknya senyawa kompleks oleh adanya reaksi antara senyawa fenol dengan ion Fe^{3+} sehingga menghasilkan warna hijau kehitaman. Hasil positif dari triterpenoid dan steroid dengan dilarutkan n-heksan dan ditambahkan reagen *Lieberman-Burchard* (CH_3COOH glasial dan H_2SO_4) menghasilkan adanya cincin kecoklatan dan cincin hijau disebabkan pada kelompok triterpenoid/steroid akan membentuk ikatan rangkap terkonjugasi akibat reaksi oksidasi (Fajriaty et al., 2018).

Pengujian KLT dalam penelitian ini bertujuan untuk memberikan penegasan terhadap senyawa yang terdapat dalam sampel disamping skrining fitokimia. Informasi yang didapat dari uji KLT ini berupa nilai R_f dan bercak noda pada plat KLT. Nilai R_f dan warna noda yang dihasilkan pada KLT mampu memberikan identitas senyawa yang terkandung dimana warna kuning menunjukkan senyawa flavonoid (Forestryana & Arnida, 2020). Standar yang digunakan yaitu kuersetin dikarenakan kuersetin merupakan flavonoid dari kelompok flavonol yang

mempunyai gugus keto pada C-4 dan gugus OH pada atom C-3 atau C-5 yang berdekatan dengan flavon dan flavonol. Senyawa kuersetin juga paling luas penyebarannya yang ada di tumbuhan (Aminah et al., 2017; Natasa et al., 2021) . Plat KLT berukuran 6 x 10 cm dengan letak 1 standar dan 3 sampel yang berjarak 1,5 cm tiap totolan supaya pada saat pengembangan tidak terjadi penumpukan.

Plat KLT diamati dibawah lampu UV didasarkan pada prinsip pada λ 254 nm, plat akan berflouresensi sedangkan sampel berwarna gelap. Pada λ 365 nm plat akan berwarna gelap sedangkan noda sampel akan berpendar disebabkan interaksi sinar UV dengan gugus kromofor dan auksokrom yang terdapat pada noda sampel (Forestryana & Arnida, 2020). Penggunaan $AlCl_3$ dimaksudkan sebagai penampak noda pada plat KLT. Hasil dari uji KLT menunjukkan bahwa ekstrak etanol daun binahong positif berwarna kuning pada sinar UV 365 nm. Nilai Rf yang diperoleh dari standar kuersetin dari rasio 1:5, 1:10 dan 1:15 secara berturut-turut yaitu 0,913; 0,888; dan 0,875 dimana rentang Rf yang optimal berada dalam rentang 0,2-0,8 (Husna & Mita, 2020). Hasil Rf standar kuersetin dengan rasio 1:5 menunjukkan hasil diluar rentang Rf yang optimal, hal ini bisa jadi disebabkan oleh plat KLT yang dibiarkan pada udara terbuka yang dapat menyebabkan deaktivasi sehingga mempengaruhi nilai Rf (Rosamah, 2019). Hasil elusi membentuk 4 spot dengan nilai Rf pada masing-masing sampel yang memenuhi rentang yaitu 0,25-0,813. Spot dengan Rf terkecil yaitu 0,25-0,325 yang menunjukkan adanya senyawa flavonoid yang sifatnya seperti sifat kepolaran fase diam, sedangkan nilai Rf 0,588-0,8 senyawa flavonoid juga yang sifat polarnya mirip dengan fase gerak (Andrieyani et al., 2015). Hasil nilai Rf yang didapatkan tidak jauh berbeda dengan penelitian Kusnadi & Devi (2017) yaitu nilai Rf standar kuersetin sebesar 0,88 dan Rf sampel sebesar 0,86, dimana nilai Rf sampel sejajar dengan Rf standar yang artinya positif mengandung flavonoid. Hasil nilai Rf sampel ekstrak daun binahong memiliki arti bahwa sampel mengandung senyawa flavonoid, sehingga bisa dilanjutkan untuk analisis terhadap kadar flavonoid total.

Penetapan kadar flavonoid total pada masing-masing sampel dilakukan dengan metode kalorimetri $AlCl_3$. Ketika $AlCl_3$ dengan senyawa flavonoid membentuk kompleks maka akan panjang gelombangnya berubah ke arah visible

(sinar tampak). Penggunaan standar kuersetin dikarenakan kuersetin ialah flavonoid dari kelompok flavonol dengan gugus keto pada C-4 dan gugus OH pada atom C-3 atau C-5 yang berdekatan dengan flavon dan flavonol yang mana mampu terbentuk kompleks warna dengan AlCl_3 , ditandai dengan larutan yang berubah warna menjadi lebih kuning. Penambahan CH_3COOH bertujuan supaya menjaga stabilitas C-4 keto dan 3 atau 5-OH dan mempertahankan λ pada daerah *visible* yaitu 370-450 nm (Asmorowati & Lindawati, 2019; Helmidanora et al., 2020). Senyawa flavonoid memiliki kandungan sistem aromatik yang terkonjugasi yang menunjukkan pita serapan pada daerah spektrum sinar *ultraviolet* dan sinar tampak, sehingga penetapan kadar flavonoid ini menggunakan spektrofotometri UV-Vis (Maharani et al., 2022).

Berdasarkan hasil dari kurva baku larutan standar kuersetin, diperoleh persamaan regresi linier $y = 0,0076x - 0,0924$ dengan nilai $r = 0,9995$. Dari nilai r yang mendekati 1, maka nilai korelasi antara konsentrasi dan absorbansi kuat. Dari hasil kurva baku kuersetin ditunjukkan bahwa semakin besar konsentrasi maka semakin besar hasil absorbansi yang didapat, artinya konsentrasi dengan absorbansi berbanding lurus. Kadar flavonoid total dari ekstrak etanol daun binahong yang diekstraksi dengan metode UAE dengan variasi rasio pelarut serta waktu ekstraksi memiliki kisaran 31,035 – 41,671 mg QE/g yang tertera dalam **Lampiran 13**.

Hasil penelitian menunjukkan bahwa kadar flavonoid total terendah diperoleh pada rasio pelarut 1:5 dengan waktu ekstraksi 10 menit yaitu $31,035 \pm 0,166$ mg QE/g. Hasil yang rendah ini sesuai dengan nilai rendemennya yang rendah juga. Hal ini disebabkan karena jumlah pelarut yang sedikit akan menyebabkan senyawa dalam sampel tidak tertarik seluruhnya oleh pelarut dan waktu ekstraksi yang terlalu singkat menyebabkan senyawa tidak semua terekstrak yang dapat mengakibatkan hasil rendemen rendah dan kadar flavonoid total juga rendah.

Hasil kadar flavonoid total yang tinggi ditunjukkan pada rasio pelarut 1:10 30 menit, dan rasio 1:15 dengan waktu ekstraksi 10, 20, 30 menit secara berturut-turut yaitu $39,654 \pm 1,676$; $40,904 \pm 2,574$; $41,671 \pm 0,301$; $41,342 \pm 0,301$ mg QE/g. Hasil dari keempat kadar flavonoid total tertinggi seiring dengan nilai rendemen yang tinggi juga. Peningkatan kadar flavonoid total terjadi bersamaan dengan

meningkatnya volume pelarut serta waktu ekstraksi. Hal tersebut dikarenakan jumlah bahan dan pelarutnya cukup untuk mengekstrak seluruh flavonoid dengan waktu ekstraksi yang cukup juga (Januarti et al., 2017). Disebutkan juga dalam penelitian Handayani et al (2016) bahwa peningkatan kadar flavonoid total disebabkan karena semakin lama waktu ekstraksi maka kontak antara bahan dengan pelarut makin lama juga dengan volume pelarut yang cukup sehingga memperoleh rendemen yang tinggi dan kandungan senyawa flavonoid makin tinggi.

Kadar flavonoid total pada rasio pelarut 1:15 dengan waktu ekstraksi 30 menit mengalami penurunan dikarenakan waktu ekstraksi yang terlalu lama akan terjadi pemanasan yang lebih lama sehingga sampel mengalami perubahan struktur kimia akibat proses oksidasi dan terjadi kondisi kesetimbangan (Kristina et al., 2022). Oleh karena itu, semakin tinggi senyawa terdegradasi maka potensi senyawa flavonoid pada ekstrak semakin kecil. Keempat kadar tertinggi dianalisis statistika untuk mengetahui adanya pengaruh signifikan antara rasio pelarut dan waktu ekstraksi terhadap kadar flavonoid total. Hasil yang didapatkan menunjukkan tidak adanya perbedaan signifikan yang dibuktikan dengan hasil $p=0,147$ ($p>0,05$). Hasil tersebut memperlihatkan bahwasannya rasio pelarut 1:10 selama 30 menit ekstraksi dengan rasio pelarut 1:15 selama 10, 20, 30 menit ekstraksi tidak memberikan pengaruh yang signifikan pada kadar flavonoid total ekstrak daun binahong (*Anredera cordifolia*). Pemilihan kadar flavonoid tertinggi dalam penelitian ini pada rasio pelarut 1:10 dengan waktu ekstraksi selama 30 menit yaitu sebesar $39,654 \pm 1,676$ mg QE/g. Hal ini didasarkan pada nilai rendemen yang juga tidak terdapat pengaruh signifikan dari keempat sampel 1:10 30 menit dan 1:15 10, 20, 30 menit, kemudian adanya efisiensi penggunaan pelarut dan mencegah terjadinya kondisi jenuh akibat penambahan volume pelarut dan waktu ekstraksi.