

BAB IV

HASIL DAN PEMBAHASAN

A. Hasil

1. Determinasi Tanaman

Determinasi tanaman dilaksanakan di Laboratorium Pembelajaran Biologi, Fakultas Sains dan Teknologi Terapan, Universitas Ahmad Dahlan Yogyakarta. Hasil identifikasi mengungkapkan bahwa daun singkong yang digunakan dalam penelitian ini berasal dari spesies bagian tanaman singkong (*Manihot utilissima* Pohl). Hasil determinasi dapat dilihat (**Lampiran 1**).

2. Persiapan sampel

Daun singkong yang diperoleh melalui proses sortasi basah, kemudian dikeringkan, dilakukan sortasi kering, dan digiling menjadi serbuk. Hasil dapat dilihat pada **Tabel 3**.

Berat daun segar (kg)	Berat serbuk (g)
1,5	286

3. Ekstraksi daun singkong

Penelitian ini memakai metode UAE. Etanol 70% dan metanol digunakan sebagai pelarut dengan rasio 1:10 b/v. Hasil ekstraksi ditampilkan pada **Tabel 4** dan digunakan untuk menghitung persentase rendemen yang tercantum pada **Tabel 6**.

Pelarut	Ekstrak kental(g)
Etanol 70%	6,861
Metanol	6,895

4. Kontrol kualitas ekstrak daun singkong

a. Nilai rendemen

Ekstrak yang didapat dari kedua metode kemudian dihitung rendemennya dan diperoleh nilai rendemen seperti pada **Tabel 6**. Detail perhitungan dapat dilihat pada (**Lampiran 3**)

Tabel 5. Hasil Rendemen Ekstrak Kental Daun Singkong

Metode	Berat sampel (g)	Berat ekstrak (g)	Rendemen (%b/b)	Subaryanti <i>et al.</i> , (2022)
Etanol 70%	45	6,861	15,24	≥10%
Metanol	45	6,895	15,3	

b. Hasil uji organoleptik

Ekstrak kental daun singkong kemudian di uji organoleptik. Berdasarkan hasil uji organoleptik, ekstrak etanol daun singkong memiliki spesifikasi seperti pada **Tabel 7**.

Tabel 6. Hasil Uji Organoleptik Ekstrak Daun Singkong

Identifikasi	Hasil		Sari & Meitisa, (2017)
	Etanol 70%	Metanol	
Tekstur	Ekstrak kental	Ekstrak kental	Ekstrak kental
Bau	Bau khas	Bau khas	Berbau khas
Warna	Hijau kecolatan	Hijau	Hijau

c. Hasil skrining fitokimia

Uji fitokimia dilaksanakan untuk mengidentifikasi serta menganalisis berbagai jenis metabolit sekunder yang terdapat dalam ekstrak daun singkong. Berikut adalah hasil uji fitokimia ekstrak daun singkong dapat dilihat pada **Tabel 8**. Hasil perlakuan uji fitokimia dapat dilihat pada (**lampiran 5**).

Tabel 7. Hasil Uji Fitokimia Ekstrak Daun Singkong

Senyawa	Hasil		Aiyuba <i>et al.</i> , (2023)	Keterangan	
	Etanol 70%	Metanol		Etanol	Metanol
a. Alkaloid Mayer	a.Endapan kuning	a.Endapan kuning	a.Endapan putih atau kekuningan	+	+
b. Wagner	b.Endapan coklat	b.Endapan coklat	b.Endapan coklat	+	+

Senyawa	Hasil		Aiyuba <i>et al.</i> , (2023)	Keterangan	
	Etanol 70%	Metanol		Etanol	Metanol
c. Dragondorf	c.Endapan kuning	c.Endapan coklat	c.Endapan coklat kuning, jingga	+	+
Saponin	Busa setinggi 3cm	Busa setinggi 2 cm	Buih setinggi 1-10 cm	+	+
Flavonoid	Jingga	Merah	Merah, kuning atau jingga	+	+
Tanin	Hijau	Hijau	Hijau	+	+
Steroid/terpenoid	Coklat	Hijau	Merah atau biru	-	-

5. Hasil Pengukuran total flavonoid

a. Penentuan panjang gelombang maksimum

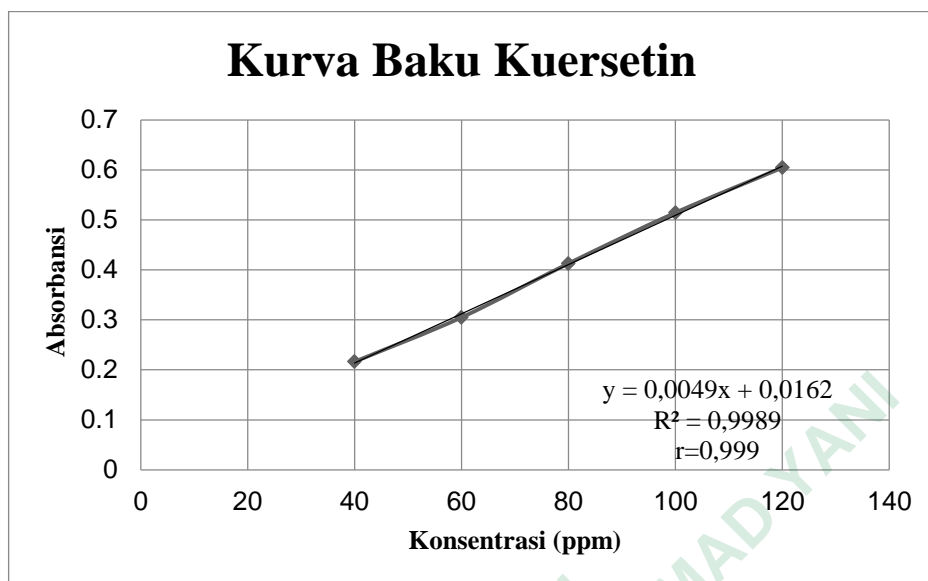
Scanning dilakukan dalam rentang panjang gelombang antara 400 nm hingga 800 nm. Dari hasil scanning tersebut, diketahui bahwa panjang gelombang maksimum kuersetin adalah 415 nm. Informasi lebih rinci mengenai hasil scanning panjang gelombang ini, dapat merujuk pada **Lampiran 6**.

b. Penentuan *operating time*

Penentuan waktu operasional (OT) dilaksanakan untuk mengidentifikasi waktu kestabilan yang optimal. Hasil dari penentuan OT menunjukkan bahwa nilai absorbansi stabil tercapai pada menit ke-31. Informasi lebih rinci mengenai *operating time* dapat merujuk pada **Lampiran 7**.

c. Penentuan kurva baku kuersetin

Hasil pengukuran yang didapatkan menunjukkan hasil yang berbanding lurus antara absorbansi dan konsentrasi. Hasil kurva baku dapat dilihat pada **Gambar 11**. Hasil penentuan kurva baku dapat dilihat pada **Lampiran 8**.



Gambar 11. Kurva baku kuersetin

d. Penentuan kadar total flavonoid

Hasil pengukuran kadar total flavonoid yang terkandung pada daun singkong dapat dilihat pada Tabel 9. Hasil penentuan kadar total flavonoid dapat dilihat pada Lampiran 10.

Tabel 8. Kadar Total Flavonoid

Ekstrak	Total Flavonoid (mgQE/g) ± SD
Etanol 70%	4,234±0,058
Metanol	8,424±0,035

e. Analisis data

Dilakukan analisis statistik menggunakan perangkat lunak SPSS versi 26 2019 untuk menguji nilai total kadar flavonoid dari pelarut etanol 70% dan metanol secara statistik. Hasil uji dapat dilihat pada Tabel 10.

Tabel 9. Hasil Uji Statistik Total Flavonoid

Ekstrak	Total Flavonoid		
	Homogenitas	Normalitas	Mann-whitney
Ekstak etanol 70% dan metanol	0,242*	0,001**	0,043***

Keterangan: (*) Homogen

(**) Tidak Normal

(***) Signifikan

B. Pembahasan

Penelitian ini mempunyai tujuan untuk mengevaluasi pengaruh pelarut etanol 70% dan metanol terhadap kadar total flavonoid daun singkong (*Manihot utilissima* Pohl). Daun singkong yang digunakan dalam penelitian diambil di wilayah Geblakan, Tamantirto, Kasihan, Bantul, Daerah Istimewa Yogyakarta. Penelitian ini dimulai dengan proses determinasi tanaman, yang bertujuan untuk memastikan kebenaran spesies. Proses ini dilaksanakan di Laboratorium Pembelajaran Biologi, Fakultas Sains dan Teknologi Terapan, Universitas Ahmad Dahlan, pada tanggal 16 Juli 2024. Pelaksanaan proses tersebut telah mendapatkan persetujuan dengan Nomor SK: 399/Lab.Bio/B/VII/2024. Hasil uji menyatakan bahwa sampel merupakan (*Manihot utilissima* Pohl) (**Lampiran 2**)

Daun Singkong dipetik dari daun ke lima sampai terakhir, warna daun hijau tua (Azizah *et al.*, 2020). Pengambilan dilakukan pada saat pagi hari pukul 05.00 WIB untuk menghindari proses fotosintesis sehingga metabolit sekunder yang didapat lebih tinggi (Sosilowati & Sari, 2020). Dicuci daun sebanyak 1,5 kg memakai air mengalir untuk menghilangkan kotoran yang melekat dan memastikan kebersihannya. Daun dikering anginkan, disortasi basah lalu keringkan menggunakan oven dengan suhu 50°C hingga kering. Pengeringan bertujuan untuk menurunkan kadar air dan mencegah reaksi enzimatik yang mengakibatkan pembusukan (Cica Riyani, 2016). Penggunaan suhu 50°C karena senyawa flavonoid bersifat termolabil yang artinya tidak tahan terhadap panas yang akan menyebabkan flavonoid menjadi rusak (Werdinginsih *et al.*, 2022). Daun singkong yang sudah kering disortasi untuk menghilangkan sisa kotoran, lalu serbuk dihasilkan dengan penyerbukan menggunakan grinder dan diayak dengan ayakan 40 mesh, untuk meningkatkan interaksi dengan pelarut serta mengurangi ukuran partikel. Hasil pengeringan dapat dilihat pada **Tabel 3**.

Setelah sampel menjadi serbuk halus kemudian diekstraksi dengan metode *Ultrasound Assisted Extraction*. Metode ekstraksi UAE dipilih karena dapat menghasilkan ekstrak yang lebih pekat, dengan kandungan zat aktif yang lebih tinggi, dan waktu yang digunakan lebih singkat karena alat ini bekerja dengan bantuan gelombang ultrasonik yang dapat meningkatkan pemecahan dinding sel

(Susiloningrum & Sari, 2023). Suhu UAE diatur 40°C karena zat aktif yang dituju yaitu flavonoid bersifat termolabil yang dapat rusak jika terkena panas. Ekstraksi berlangsung selama 30 menit, hal ini menyesuaikan dengan penelitian yang dilakukan Buanasari *et al.*, (2019) yang membandingkan waktu dan suhu ekstraksi terhadap kandungan senyawa dalam tanaman mendapatkan hasil terbaik yaitu pada waktu 30 menit dan suhu 40°C. Ekstrak daun singkong kemudian disaring dan dipekatkan menggunakan penangas air dengan suhu 40°C.

Ekstrak yang diperoleh kemudian diuji kualitasnya melalui perhitungan rendemen, uji organoleptik, dan uji fitokimia. Rendemen merupakan jumlah ekstrak yang diperoleh yang sebanding dengan jumlah metabolit sekunder yang dihasilkan. Berdasarkan hasil rendemen pada **Tabel 6** kedua pelarut memenuhi syarat, yakni $\geq 10\%$ (Subaryanti *et al.*, 2022).

Uji organoleptik dilakukan secara objektif terhadap ekstrak yang diperoleh dengan menguji tekstur, aroma, dan warna untuk menentukan apakah ekstrak tersebut mengalami kerusakan setelah melalui berbagai proses dan penyimpanan. Hasil uji ini sejalan dengan penelitian yang dilakukan oleh Sari & Meitisa (2017), yang juga menunjukkan ekstrak kental, aroma khas, dan warna hijau.

Uji fitokimia dilakukan untuk mengidentifikasi kandungan metabolit sekunder dalam ekstrak daun singkong. Hasil yang diperoleh, seperti yang ditampilkan pada **Tabel 8**, menunjukkan bahwa ekstrak daun singkong dari kedua pelarut mengandung alkaloid, saponin, tannin, dan flavonoid secara positif. Temuan ini sejalan dengan penelitian (Hasim *et al.*, 2016). Uji alkaloid dilakukan dengan menggunakan larutan HCl 2 N, di mana sifat basa alkaloid memungkinkan terbentuknya garam. Hasil positif ditandai dengan munculnya endapan, yang merupakan hasil kompleksasi antara atom nitrogen dalam sampel dengan ion logam K^+ dari reagen yang digunakan. Pada uji alkaloid dengan reagen Mayer, merkuri (II) klorida dicampurkan dengan kalium iodida untuk menghasilkan kalium tetraiodomerkurat (II), yang kemudian berinteraksi dengan senyawa alkaloid dan membentuk endapan merah merkuri (II) iodida. Sementara itu, uji alkaloid yang dilakukan dengan reagen Dragendorff menunjukkan hasil positif, yang ditandai dengan terbentuknya endapan berwarna jingga. Perubahan warna ini

disebabkan oleh ikatan kovalen antara ion kalium yang terdapat dalam kalium tetraiodobismut dari reagen dengan atom nitrogen pada senyawa alkaloid. Reaksi ini menghasilkan endapan jingga sebagai indikasi bahwa alkaloid ada dalam sampel yang diuji. Sementara itu, uji alkaloid menggunakan reagen Wagner menghasilkan endapan berwarna coklat sebagai indikasi positif, yang terbentuk akibat ikatan kovalen antara ion K^+ dan atom nitrogen (Cahyanto *et al.*, 2020). Hasil pengujian pada kedua pelarut menunjukkan hasil positif, yang ditandai dengan adanya endapan dalam setiap uji.

Uji saponin dilakukan dengan cara dikocok selama 10 menit. Pembentukan busa terjadi akibat interaksi antara saponin yang bersifat non-polar dan rantai samping yang bersifat polar. Saponin dapat larut dalam air dan memiliki sifat aktif permukaan, yang menyebabkan terbentuknya struktur misel saat pengocokan (Aiyuba *et al.*, 2023). Saponin, yang cenderung bersifat polar, memiliki kemampuan larut yang lebih baik dalam pelarut yang juga bersifat polar. Hasil uji menunjukkan bahwa ekstrak daun singkong dari pelarut etanol 70% dan metanol mengandung saponin, yang ditandai dengan terbentuknya busa.

Uji flavonoid dilakukan dengan menambahkan serbuk magnesium ke dalam larutan yang mengandung HCl 2 N. Metode ini dirancang untuk mereduksi senyawa-senyawa yang mempunyai inti α -benzopiron dalam struktur kimia flavonoid. Penambahan serbuk magnesium dan larutan HCl 2 N akan mempermudah identifikasi dan analisis senyawa flavonoid yang memiliki inti α -benzopiron, yang merupakan karakteristik penting dalam struktur flavonoid. Hasil positif ditandai adanya perubahan warna dari jingga menjadi ungu, yang mengindikasikan adanya golongan flavonon, dihidroflavonol, flavononol, dan flavonol (Putri *et al.*, 2023). Sementara itu, hasil positif dengan warna kuning, merah, atau jingga menunjukkan keberadaan golongan flavon, kalkon, atau auron (Putri *et al.*, 2023). Hasil pengujian ekstrak menggunakan pelarut etanol 70% dan metanol mendapatkan hasil positif, ditandai dengan perubahan warna merah yang menunjukkan golongan kalkon dan jingga untuk golongan auron pada setiap metode.

Uji tanin dilaksanakan dengan penambahan larutan FeCl_3 . Uji fitokimia ini bertujuan untuk mendeteksi adanya gugus fenol dalam sampel. FeCl_3 digunakan karena dapat bereaksi dengan gugus fenol, dan kehadiran gugus fenol akan ditandai dengan perubahan. Jika terjadi perubahan warna hitam kehijauan pada uji FeCl_3 , maka ekstrak tersebut merupakan tanin terkondensasi sedangkan jika perubahan warna biru kehitaman pada uji FeCl_3 , maka ekstrak tersebut merupakan tanin terhidrolisis (Matoa & Spektrofotometri, 2022). Hasil perubahan warna ketika bereaksi dengan FeCl_3 mengindikasikan kemungkinan adanya senyawa fenol dalam sampel. Senyawa fenol yang teridentifikasi bisa berupa tanin, yang merupakan salah satu jenis senyawa polifenol. Tanin adalah senyawa polifenol yang sering ditemukan dalam tanaman dan dikenal memiliki berbagai manfaat biologis, termasuk aktivitas antioksidan dan antimikroba (Safitri *et al.*, 2023). Pada penelitian ini didapat bahwa ekstrak etanol 70% dan metanol positif mengandung tanin.

Uji steroid dan terpenoid dilakukan dengan menggunakan asam asetat glasial yang berfungsi untuk memutuskan ikatan pada gugus steroid dan terpenoid. Penambahan asam sulfat pekat bertujuan untuk menghidrolisis ikatan gula yang ada dalam senyawa tersebut, sehingga menghasilkan perubahan warna menjadi merah. Kehadiran triterpenoid dapat ditandai dengan perubahan warna menjadi merah, sedangkan steroid menunjukkan perubahan warna menjadi biru (Aiyuba *et al.*, 2023). Kedua ekstrak menunjukkan hasil negatif ditandai dengan warna yang tetap pada kedua ekstrak. Hasil negatif steroid triterpenoid pada penelitian ini kemungkinan karena kompleks kalium steroid yang terbentuk tidak mencapai batas kejenuhan sehingga tidak dapat membentuk perubahan warna dan kecilnya kandungan steroid pada ekstrak sehingga pada saat proses ekstraksi senyawa tersebut tidak dapat terekstrak dengan sempurna.

Penentuan kadar flavonoid total dilakukan dengan menggunakan metode kolorimetri menggunakan spektrofotometer UV-Visibel. Metode kolorimetri digunakan untuk penetapan kadar flavonoid yaitu dengan menggunakan pereaksi AlCl_3 . Terjadi kompleks tahan asam antara gugus hidroksi dan keton yang bertetangga dengan pereaksi AlCl_3 dan membentuk kompleks tidak tahan asam

dengan gugus ortohidroksi pada flavonoid (Azizah *et al.*, 2020). Maka dari itu, pereaksi AlCl_3 digunakan untuk mendeteksi kedua gugus tersebut. Prinsip penetapan kadar flavonoid dengan menggunakan metode kolorimetri AlCl_3 adalah terbentuknya kompleks antara AlCl_3 dengan gugus keto pada atom C-4 dan juga dengan gugus hidroksil pada atom C-3 atau C-4 yang bertetangga dari flavon dan flavonol. Dalam penelitian ini, kuersetin digunakan sebagai pembanding sampel. Kuersetin direaksikan dengan AlCl_3 dalam suasana asam, di mana dalam penelitian ini digunakan asam asetat (CH_3COOH). Penambahan CH_3COOH ini menyebabkan C-4 keto dan 3 atau 5-OH tetap stabil dengan membentuk kompleks bersama AlCl_3 , sehingga pergeseran panjang gelombang yang lebih panjang (batokromik). Kemudian dibaca absorbansi larutan pada panjang gelombang 415 nm dan ditunggu *operating time* selama 31 menit. Pemilihan panjang gelombang tersebut karena pada panjang gelombang tersebut menunjukkan tingkat serapan yang paling tinggi dan dipilih *operating time* selama 31 menit karena pada waktu tersebut menghasilkan nilai absorbansi yang stabil antara Kuersetin dengan AlCl_3 yang menghasilkan warna kuning yang menunjukkan terdapat senyawa flavonoid. Ditambahkan asam asetat 5% untuk mempertahankan panjang gelombang pada saat pengukuran absorbansi (Yani *et al.*, 2023).

Penentuan kadar total flavonoid dilaksanakan menggunakan kuersetin sebagai standar dalam penelitian karena kuersetin merupakan flavonoid yang stabil dan mudah diperoleh. Kuersetin juga sering digunakan sebagai standar dalam pengukuran kadar total flavonoid karena reaksinya yang spesifik dengan AlCl_3 menghasilkan warna yang intens, sehingga memudahkan analisis kuantitatif menggunakan metode spektrofotometri. Pengukuran kadar total flavonoid dilakukan dengan mengukur absorbansi standar kuersetin terlebih dahulu untuk membuat kurva baku, yang kemudian digunakan untuk menghitung kadar flavonoid ekstrak etanol 70% dan metanol daun singkong. Selanjutnya mengukur absorbansi sampel untuk mencari kadar sesungguhnya. Pengukuran absorbansi ini dilakukan sebanyak tiga replikasi untuk memastikan keakuratan dan konsistensi data yang diperoleh. Kadar total flavonoid ekstrak etanol sebesar $4,234 \pm 0,058 \text{ mg QE/g}$ dan ekstrak metanol sebesar $8,424 \pm 0,035 \text{ mg QE/g}$.

Hasil penelitian menunjukkan kadar total flavonoid ekstrak metanol lebih tinggi dibanding dengan ekstrak etanol 70% dengan nilai $8,424 \pm 0,035$ mg QE/g dan $4,234 \pm 0,058$ mg QE/g. Hal ini sejalan dengan penelitian Putri *et al.*, (2023) yang meneliti pengaruh pelarut etanol 70% dan metanol terhadap kadar flavonoid total ekstrak daun sirsak menunjukkan bahwa pelarut metanol lebih efektif. Hasil ini diperkuat karena metanol mempunyai nilai konstanta dielektrik yang lebih tinggi dibandingkan etanol, dengan nilai konstanta dielektrik metanol sebesar 33,640, sementara etanol mempunyai nilai sebesar 25,16. konstanta dielektrik merupakan ukuran kepolaran suatu pelarut. Semakin tinggi konstanta dielektrik pelarut, semakin polar pelarut tersebut begitu pula sebaliknya (Putri *et al.*, 2023). Hal tersebut mempengaruhi kemampuan pelarut dalam ekstraksi sehingga penggunaan pelarut yang berbeda menghasilkan rendemen yang berbeda, bergantung pada polaritasnya, sehingga metanol lebih polar dibandingkan etanol dan dapat menarik lebih banyak senyawa flavonoid, sesuai dengan prinsip *like dissolve like* (Putri *et al.*, 2023). Hasil ini juga sinergis dengan hasil rendemen yang menunjukkan methanol menghasilkan nilai rendemen yang lebih tinggi menandakan metabolit sekunder seperti flavonoid terkstrak lebih banyak sehingga total flavonoidnya lebih tinggi. Hasil ini juga didukung oleh hasil skrining fitokimia yang menunjukkan pada kedua pelarut mendapatkan hasil yang sama yaitu positif mengandung alkaloid, saponin, flavonoid dan tanin. Sehingga secara kualitatif kedua pelarut dapat mengekstrak flavonoid dari daun singkong. Penelitian yang dilakukan oleh (Azizah *et al.*, 2020) yang menggunakan standar rutin untuk menentukan kadar total flavonoid pada ekstrak daun singkong dengan pelarut etanol 70% yang menghasilkan kadar flavonoid sebesar 49,87 mg QE/g. Sementara itu pada penelitian yang dilakukan menggunakan standar kueretin menunjukkan kadar flavonoid pada ekstrak daun singkong dengan metanol sebesar 8,424 mg QE/g dan dengan pelarut etanol 70% sebesar 4,234 mg QE/g. Berdasarkan hasil yang diperoleh kadar flavonoid ekstrak daun singkong dengan standar rutin dan kueretin menunjukkan adanya perbedaan yang signifikan dapat dilihat bahwa standar yang efektif dalam proses penarikan senyawa flavonoid ekstrak daun singkong yaitu pembanding rutin. Hal tersebut dikarenakan rutin

merupakan flavonoid yang lebih banyak terdapat dalam daun singkong dibandingkan dengan kuersetin. Keberadaan rutin yang lebih banyak dalam daun singkong menjadikannya pembanding efektif dalam proses ekstraksi flavonoid

Analisis statistik dengan menggunakan SPSS menunjukkan bahwa nilai total flavonoid antara ekstrak etanol 70% dan metanol berbeda secara signifikan. Hasil uji *mann-whitney* menghasilkan nilai sig. 2-tailed $<0,05$ (0.043), yang menyatakan bahwa terdapat perbedaan signifikan antara pelarut etanol 70% dan metanol terhadap kadar total flavonoid. Hal ini menunjukkan bahwa pemilihan pelarut etanol 70% dan metanol memiliki dampak signifikan terhadap kadar total flavonoid.

PERPUSTAKAAN
UNIVERSITAS JENDERAL ACHMAD YANUWIR
YOGYAKARTA