

## BAB IV HASIL DAN PEMBAHASAN

### A. Hasil

#### 1. Determinasi Sampel

Proses determinasi tanaman dilakukan di Laboratorium Pembelajaran Biologi, Fakultas Sains dan Teknologi Terapan, Universitas Ahmad Dahlan, Yogyakarta dengan nomor SK 197/Lab.Bio/B/III/2025. Hasil determinasi menyatakan bahwa tanaman yang digunakan pada penelitian ini benar tanaman sambung nyawa dengan nama latin *Gynura procumbens* (Lour) Merr. (**Lampiran 1**).

#### 2. Preparasi Sampel

Daun sambung nyawa dipanen di kebun Merapi Farma Herbal yang berlokasi di Hargobinangun, Pakem, Sleman, Yogyakarta. Daun sambung nyawa yang diperoleh dalam kondisi segar selanjutnya dikeringkan dan digrinder sehingga didapatkan serbuk. Hasil sampel daun sambung nyawa dapat dilihat pada **Tabel 2**.

**Tabel 2. Hasil Sampel Daun Sambung Nyawa**

Daun Sambung Nyawa	Bobot
Segar	1 kg
Kering	290 g
Serbuk	284 g

#### 3. Ekstraksi Sampel

Serbuk simplisia daun sambung nyawa diekstraksi dengan pelarut etanol 70% dan 96% menggunakan metode *Ultrasound Assisted Extraction* (UAE) dengan perbandingan antara simplisia dengan pelarut sebanyak 1:10. Pada penelitian ini, ekstrak kental yang dihasilkan kemudian ditimbang untuk menentukan persentase rendemen ekstrak, yang hasilnya ditunjukkan pada **Tabel 3**.

**Tabel 3. Hasil Rendemen Ekstrak Daun Sambung Nyawa**

Ekstrak	Berat Ekstrak (g)	Rendemen (%)	Syarat Rendemen (Kementrian Kesehatan RI, 2017)
Etanol 70%	5,61	5,61	>7,2 %
Etanol 96%	6,31	6,31	

#### 4. Kadar Air

Pengujian kadar air pada ekstrak dilakukan untuk menjaga mutu ekstrak dan mencegah terjadinya pertumbuhan jamur pada ekstrak. Pada penelitian ini, kadar air yang diperoleh dinyatakan dalam bentuk persentase yang dapat dilihat pada **Tabel 4**.

**Tabel 4. Hasil Kadar Air Ekstrak Daun Sambung Nyawa**

Pengujian	Sampel	Kadar air (%)	Syarat mutu (%) (Kementrian Kesehatan RI, 2017)	Keterangan
Kadar air	Ekstrak etanol 70%	2,64	≤ 10%	Memenuhi syarat
	Ekstrak etanol 96%	2,18		Memenuhi syarat

#### 5. Uji Organoleptis

Pengujian organoleptis dilakukan menggunakan panca indera, untuk mengamati dan mendeskripsikan karakteristik ekstrak etanol 70% dan ekstrak etanol 96% daun sambung nyawa berupa tekstur, warna, dan bau. Hasil uji organoleptis dapat dilihat pada **Tabel 5**.

**Tabel 5. Hasil Uji Organoleptis Ekstrak Daun Sambung Nyawa**

Parameter	Ekstrak Etanol 70%	Ekstrak Etanol 96%	Teori (Kementrian Kesehatan RI, 2017)
Tekstur	Kental	Kental	Kental
Warna	Coklat	Coklat	Coklat
Bau	Khas daun sambung nyawa	Khas daun sambung nyawa	Khas daun sambung nyawa

#### 6. Uji Fitokimia

Uji fitokimia bertujuan untuk mengidentifikasi senyawa metabolit sekunder pada ekstrak etanol 70% dan ekstrak etanol 96% daun sambung nyawa dengan uji tabung. Hasil uji fitokimia dapat dilihat pada **Tabel 6**.

Tabel 6. Hasil Uji Fitokimia Ekstrak Daun Sambung Nyawa

Senyawa Fitokimia	Reagen	Hasil Pengamatan		
		Ekstrak Etanol 70% Daun Sambung Nyawa	Ekstrak Etanol 96% Daun Sambung Nyawa	Referensi (Rahmadani <i>et al.</i> , 2025)
Alkaloid	Mayer	(-) Tidak terdapat endapan	(-) Tidak terdapat endapan	Endapan putih
	Wagner	(+) Terdapat endapan coklat	(+++) Terdapat endapan coklat	Endapan coklat
	Dragendroff	(+) Terdapat endapan merah	(++) Terdapat endapan merah	Endapan jingga/merah
Flavonoid	Serbuk Mg + HCl ( <i>p.a</i> )	(+++) Perubahan warna menjadi jingga	(+) Perubahan warna menjadi jingga	Perubahan warna merah/kuning/jingga
Saponin	Aquades + HCl 2N	(+) Terbentuk busa stabil	(++) Terbentuk busa stabil	Terbentuk busa stabil
Tanin	Etanol + FeCl 1%	(++) Perubahan warna hitam kehijauan	(+++) Perubahan warna hitam kehijauan	Perubahan warna biru/hitam kehijauan
Fenolik	Metanol + FeCl 5%	(+) Perubahan warna merah	(++) Perubahan warna merah	Perubahan warna merah/biru/ungu
Terpenoid	CH <sub>3</sub> COOH + H <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>	(+) Terbentuk cincin coklat	(++) Terbentuk cincin coklat	Terbentuk cincin coklat

Keterangan:

(+) = terjadi perubahan warna

(++) = perubahan warna yang intens

(+++)= perubahan warna yang lebih intens

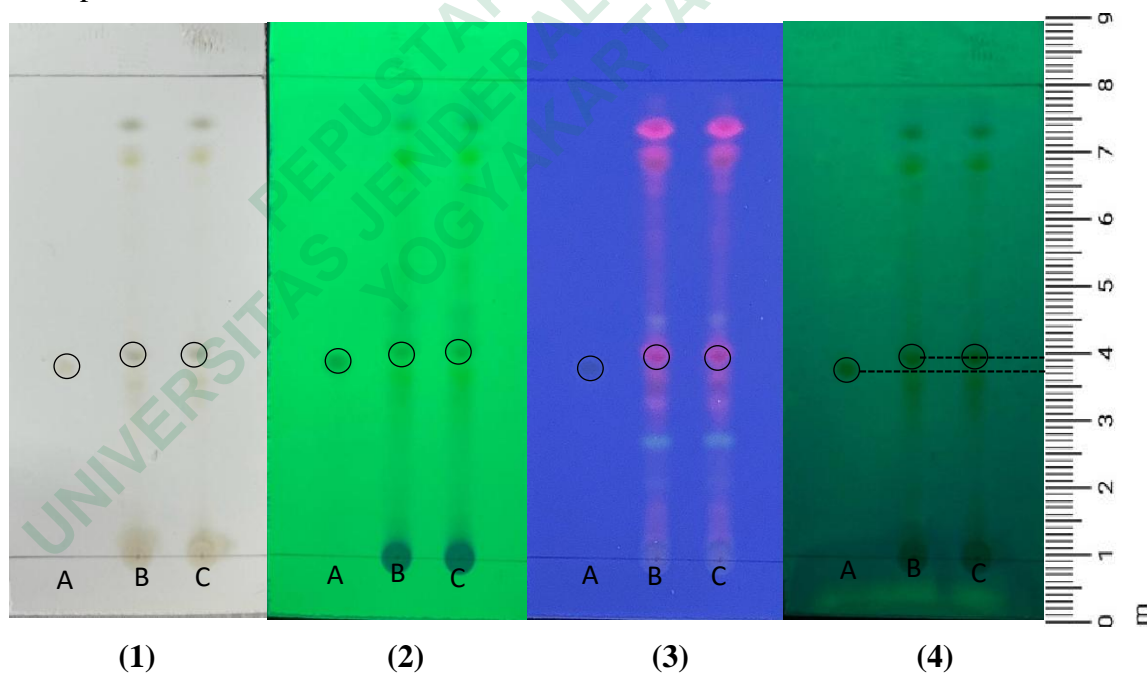
#### 7. Identifikasi Senyawa Flavonoid dengan KLT

Dilakukan analisis secara kualitatif untuk mengetahui ada tidaknya senyawa flavonoid yang terkandung dalam ekstrak etanol 70% dan ekstrak etanol 96% daun sambung nyawa. Kuersetin digunakan sebagai standar pembandingan dan silika gel F<sub>254</sub> digunakan sebagai fase diam. Optimasi fase gerak dilakukan untuk mendapatkan hasil elusi yang optimal. Percobaan dapat dilihat pada **Tabel 7**.

**Tabel 7. Hasil Optimasi Fase Gerak**

No.	Fase gerak	Volume	Hasil
1	n-butanol : asam asetat : air (Warnis & Angelina, 2022)	(4:1:5)	Standar dan sampel terelusi hingga batas atas
2	n-heksan : etil asetat : asam format (Kementrian Kesehatan RI, 2017)	(6:4:0,2)	Standar dan sampel terlihat dan terelusi dengan baik, terdapat senyawa dengan $R_f$ mendekati standar
3	n-heksan : etil asetat : etanol (Asma <i>et al.</i> , 2022)	(1:6:1)	Standar dan sampel terelusi dengan baik namun sedikit tailing pada sampel

Berdasarkan **Tabel 7** fase gerak yang digunakan yaitu n-heksan : etil asetat : asam format (6:4:0,2) karena kombinasi tersebut menghasilkan bercak standar dan sampel yang tampak jelas dan nilai  $R_f$  sampel yang diperoleh mendekati nilai  $R_f$  standar. Hasil KLT dengan fase gerak n-heksan : etil asetat : asam format (6:4:0,2) dapat dilihat pada **Gambar 12**.



**Gambar 12. Hasil KLT Variasi Konsentrasi Etanol Ekstrak Daun Sambung Nyawa**  
Keterangan: (1) Deteksi sinar tampak, (2) Deteksi UV 254 nm, (3) Deteksi UV 365 nm, (4) Deteksi UV 254 nm setelah disemprot  $\text{AlCl}_3$  5%, (A) Standar kuersetin, (B) Sampel ekstrak etanol 70% daun sambung nyawa, (C) Sampel ekstrak etanol 96% daun sambung nyawa. Fase diam yaitu silica gel  $f_{254}$ , Fase gerak yaitu n-heksan : etil asetat : asam format (6:4:0,2).

**Tabel 8. Hasil Nilai  $R_f$  Ekstrak Daun Sambung Nyawa dan Kuersetin**

Sinar/ Perekasi	Kuersetin	Ekstrak Etanol 70% Daun Sambung Nyawa	Ekstrak Etanol 96% Daun Sambung Nyawa
Sinar tampak	$R_f = 0,475$	$R_f = 0,462$	$R_f = 0,462$
		$R_f = 0,487$	$R_f = 0,487$
		$R_f = 0,85$	$R_f = 0,85$
		$R_f = 0,925$	$R_f = 0,925$
UV 254 nm	$R_f = 0,475$	$R_f = 0,462$	$R_f = 0,462$
		$R_f = 0,487$	$R_f = 0,487$
		$R_f = 0,85$	$R_f = 0,85$
		$R_f = 0,925$	$R_f = 0,925$
UV 365 nm	$R_f = 0,475$	$R_f = 0,25$	$R_f = 0,25$
		$R_f = 0,35$	$R_f = 0,35$
		$R_f = 0,437$	$R_f = 0,437$
		$R_f = 0,462$	$R_f = 0,462$
		$R_f = 0,487$	$R_f = 0,487$
		$R_f = 0,562$	$R_f = 0,562$
		$R_f = 0,75$	$R_f = 0,75$
		$R_f = 0,85$	$R_f = 0,85$
		$R_f = 0,925$	$R_f = 0,925$
		Perekasi $AlCl_3$	$R_f = 0,475$
$R_f = 0,487$	$R_f = 0,487$		
$R_f = 0,85$	$R_f = 0,85$		
$R_f = 0,925$	$R_f = 0,925$		

Hasil identifikasi senyawa flavonoid dengan KLT menunjukkan bahwa standar dan sampel menghasilkan bercak yang hampir sejajar dengan nilai  $R_f$  yang mirip, yaitu nilai  $R_f$  Standar 0,475 dan  $R_f$  sampel 0,487 (**Tabel 8**). Terjadi perubahan warna dari hitam menjadi kuning kehijauan dibawah UV 254 nm setelah disemprot dengan reagen  $AlCl_3$  5% pada standar kuersetin dengan nilai  $R_f$  0,475 dan sampel dengan  $R_f$  0,487. Terdapat bercak lain yang juga mengalami perubahan warna kuning kehijauan pada nilai  $R_f = 0,85$  dan 0,925 (**Gambar 12**).

## 8. Penentuan Kadar Flavonoid

### a. Penentuan panjang gelombang maksimum kuersetin

Proses ini bertujuan untuk menentukan daerah serapan visibel yang akan diketahui dari nilai absorbansi pada larutan yang diukur. Pengukuran dilakukan menggunakan spektrofotometer UV-Vis dengan rentang panjang gelombang 300-600 nm (Warnis & Angelina, 2022). Hasil pengukuran menunjukkan bahwa

panjang gelombang maksimum ( $\lambda$ ) yang diperoleh adalah 431 nm (**Lampiran 7**).

b. Penentuan *operating time* kuersetin

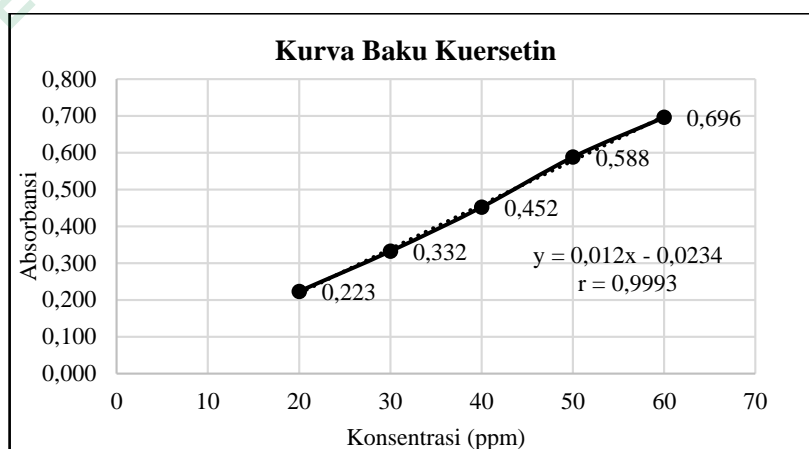
Penentuan *operating time* diperlukan untuk mengetahui waktu stabil optimal kuersetin dengan  $\text{AlCl}_3$  membentuk kompleks yang sempurna. Absorbansi diukur pada panjang gelombang 431 nm selama 60 menit dengan interval waktu 1 menit. Hasilnya menunjukkan bahwa absorbansi stabil pada menit ke-35 sampai menit ke-41 (**Lampiran 7**). Sehingga *operating time* kuersetin yang digunakan adalah 35 menit.

c. Penentuan kurva baku kuersetin

Penentuan kurva baku kuersetin dilakukan pada seri konsentrasi 20, 30, 40, 50, dan 60 ppm. Pengujian ini dilakukan untuk melihat interaksi antara konsentrasi dengan nilai absorbansi. Hasil pengukuran yang didapatkan menunjukkan hasil yang berbanding lurus antara nilai absorbansi dengan konsentrasi yang dapat dilihat pada **Tabel 9** dan **Gambar 13**.

**Tabel 9. Absorbansi Kurva Baku Kuersetin**

Konsentrasi (ppm)	Rata-Rata $\pm$ SD
20	0,223 $\pm$ 0,027
30	0,332 $\pm$ 0,028
40	0,452 $\pm$ 0,032
50	0,588 $\pm$ 0,007
60	0,696 $\pm$ 0,002



**Gambar 13. Kurva Baku Kuersetin**

Berdasarkan hasil kurva baku kuersetin didapatkan hasil persamaan regresi linier  $y = 0,012x - 0,0234$  dengan nilai koefisien korelasi ( $r$ ) sebesar 0,9993. Persamaan regresi kurva baku kuersetin akan digunakan untuk menghitung kadar flavonoid total ekstrak etanol 70% dan ekstrak etanol 96% daun sambung nyawa.

d. Penentuan kadar flavonoid total

Kadar flavonoid pada ekstrak etanol 70% dan ekstrak etanol 96% daun sambung nyawa diukur menggunakan spektrofotometer UV-Vis dengan metode kolorimetri. Hasil pengukuran kadar flavonoid total yang terkandung pada sampel dapat dilihat pada **Tabel 10**.

**Tabel 10. Rata-Rata Kadar Flavonoid Total Ekstrak Daun Sambung Nyawa**

Ekstrak	Rata-rata Kadar Flavonoid Total (mg QE/g $\pm$ SD)
Ekstrak Etanol 70%	40,67 $\pm$ 0,459
Ekstrak Etanol 96%	33,475 $\pm$ 0,555

9. Analisis data

Program SPSS versi 27 digunakan untuk menganalisis data secara statistik. Tujuan penelitian ini untuk mengetahui bagaimana perbedaan konsentrasi pelarut etanol 70% dan etanol 96% berpengaruh terhadap kadar flavonoid total ekstrak daun sambung nyawa. Hasil analisis dapat dilihat pada **Tabel 11**.

**Tabel 11. Hasil Analisis Ekstrak Daun Sambung Nyawa**

Sampel	Homogenitas	Normalitas	T-independent
Ekstrak etanol 70%	0,756*	0,173**	0,001***
Ekstrak etanol 96%		0,582**	

Keterangan:

\* = data terdistribusi homogen (Sig > 0,05)

\*\* = data terdistribusi normal (Sig > 0,05)

\*\*\* = ada perbedaan signifikan (Sig. (2-tailed) <0,05)

## B. Pembahasan

Tanaman yang digunakan sebagai sampel pada penelitian ini adalah daun sambung nyawa (*Gynura procumbens* (Lour) Merr.) yang diperoleh dari kebun Merapi Farma Herbal yang berlokasi di Hargobinangun, Pakem, Sleman, Yogyakarta. Daun sambung nyawa dipanen pada pagi hari pukul 08.00-10.00 WIB

saat cuaca cerah karena kondisi daun masih segar dan belum terjadi proses fotosintesis sehingga kandungan zat aktif dalam daun masih tinggi (Wijayanti, 2012). Daun yang dipanen adalah daun yang berusia 4 bulan, berwarna hijau muda dan segar. Daun yang dipakai terletak pada urutan kedua hingga kelima dari pucuk tanaman. Pada penelitian Hanin & Pratiwi, (2017) menyatakan bahwa urutan tersebut memiliki kadar fenolik dan flavonoid yang lebih tinggi dibandingkan dengan daun yang lebih muda atau lebih tua, hal ini karena metabolit sekunder seperti flavonoid disintesis seiring bertambahnya usia daun, namun pada daun yang terlalu tua sintesisnya justru menurun.

Setelah dipanen daun disortasi basah dengan cara dicuci menggunakan air mengalir untuk menghilangkan kotoran yang menempel pada simplisia. Selanjutnya daun ditiriskan dan dikering anginkan. Daun yang telah dikering anginkan selanjutnya dilakukan proses pengeringan menggunakan oven bersuhu 40°C untuk menjaga agar flavonoid tidak rusak, dikarenakan senyawa flavonoid tidak tahan terhadap pemanasan dan dapat terdegradasi pada suhu diatas 60°C (Sari *et al.*, 2024). Oven digunakan sebagai alat pengering karena mampu memberikan suhu pemanasan yang stabil dan merata, dapat dikontrol, serta tidak dipengaruhi oleh kondisi cuaca, sehingga proses pengeringan dapat berlangsung secara maksimal (Pujiastuti & El'Zeba, 2021). Proses pengeringan ini dimaksudkan untuk mengurangi kadar air yang terdapat pada sampel, sehingga dapat mencegah pertumbuhan mikroorganisme (Aminah *et al.*, 2017). Daun sambung nyawa yang telah kering dengan kriteria daun mudah hancur saat diremas kemudian digrinder dan diayak menggunakan ayakan 40 mesh untuk memperkecil ukuran partikel dan mendapatkan serbuk simplisia dengan ukuran yang seragam sehingga luas permukaan meningkat dan proses ekstraksi senyawa aktif dari simplisia daun sambung nyawa lebih optimal (Sari *et al.*, 2024).

Serbuk simplisia daun sambung nyawa diekstraksi dengan metode *Ultrasound Assisted Extraction* (UAE). Prinsip metode ini didasarkan adanya gelombang ultrasonik yang dapat meningkatkan laju perpindahan massa serta dapat memecah dinding sel sehingga senyawa aktif dalam sampel dapat keluar dengan mudah dan cepat (Dias *et al.*, 2021). Metode ini dipilih karena memiliki beberapa keunggulan yaitu cepatnya perpindahan masa, dapat meningkatkan penetrasi cairan menuju

dinding sel, memerlukan pelarut yang sedikit, mengefisiensi waktu dan pelarut yang digunakan karena adanya bantuan gelombang ultrasonik dan cocok untuk senyawa flavonoid yang tidak tahan terhadap pemanasan (Sari *et al.*, 2024). Pemilihan jenis pelarut dalam proses ekstraksi didasarkan pada kepolaran senyawa yang akan diekstraksi (Lukmayani *et al.*, 2024). Pelarut yang digunakan untuk mengekstraksi senyawa flavonoid pada ekstrak daun sambung nyawa yaitu pelarut etanol dengan konsentrasi etanol 70% dan etanol 96%.

Penggunaan konsentrasi etanol yang berbeda bertujuan untuk mengetahui konsentrasi mana yang dapat menarik senyawa flavonoid tertinggi. Etanol dipilih sebagai pelarut karena sifatnya yang polar dan memiliki gugus OH (gugus hidroksil) yang dapat membentuk suatu ikatan hidrogen dengan gugus hidroksil (OH) dari senyawa flavonoid sehingga mampu meningkatkan kelarutan senyawa flavonoid dalam etanol (Riwanti *et al.*, 2018). Flavonoid merupakan senyawa yang memiliki sifat polar sehingga etanol sebagai pelarut polar cocok untuk mengekstraksinya. Berdasarkan kepolarannya etanol 70% memiliki polaritas yang lebih tinggi dibandingkan dengan etanol 96% (Riwanti *et al.*, 2018). Proses ekstraksi dilakukan menggunakan masing-masing pelarut dengan perbandingan 1:10 dengan *ultrasonic bath* selama 20 menit pada suhu 45°C. Pemilihan suhu tersebut dikarenakan senyawa flavonoid tidak tahan terhadap pemanasan tinggi dan dapat terdegradasi pada suhu di atas 60°C (Sari *et al.*, 2024).

Pada penelitian ini dilakukan proses ekstraksi kembali dengan tujuan untuk memaksimalkan proses penarikan senyawa aktif yang masih tertinggal dalam sampel (Ilham *et al.*, 2024). Filtrat hasil ekstraksi pertama dan kedua selanjutnya digabungkan dan dilakukan proses penguapan dengan suhu 50°C menggunakan *waterbath* hingga diperoleh ekstrak kental. Alasan pemilihan suhu tersebut untuk mencegah kerusakan senyawa flavonoid pada ekstrak sambung nyawa. Ekstrak kental yang diperoleh kemudian ditimbang dan rendemen dihitung untuk mengetahui banyaknya ekstrak yang diperoleh selama proses ekstraksi. Rendemen ini dihitung sebagai persentase perbandingan berat ekstrak yang dihasilkan terhadap berat serbuk daun sambung nyawa yang digunakan dalam ekstraksi. Berdasarkan hasil rendemen dari ekstrak etanol 70% dan etanol 96% daun sambung nyawa menghasilkan nilai

yang berbeda secara berturut-turut yaitu 5,61% dan 6,31%. Persyaratan rendemen yang baik yaitu  $>7,2\%$  sehingga nilai tersebut tidak memenuhi syarat. Beberapa faktor dapat mempengaruhi jumlah rendemen yang diperoleh, termasuk dari konsentrasi pelarut, jenis polaritas pelarut, viskositas, ukuran partikel simplisia, dan lamanya waktu ekstraksi (Sahumena *et al.*, 2020). Bertambahnya durasi sonikasi, kontak antara sampel dan pelarut menjadi lebih lama, sehingga lebih banyak senyawa dari sampel yang terdifusi ke pelarut (Rifkia & Prabowo, 2020).

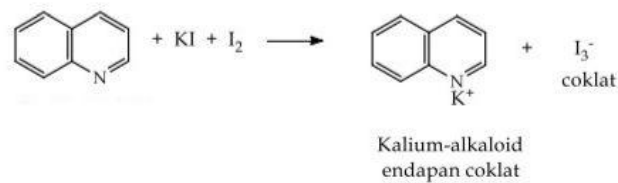
Perolehan nilai rendemen tertinggi dihasilkan pada konsentrasi 96% yang menunjukkan bahwa sebagian besar senyawa pada daun sambung nyawa memiliki kepolaran yang sama dengan konsentrasi tersebut (Puspitaningtyas *et al.*, 2021). Berdasarkan hasil rendemen dapat diasumsikan bahwa komponen senyawa metabolit sekunder yang terkandung dalam ekstrak etanol 96% daun sambung nyawa lebih banyak dibandingkan dengan ekstrak etanol 70% daun sambung nyawa, dimana faktor lain yang mempengaruhi nilai rendemen adalah kadar air dan tingkat kepolaran yang berbeda. Pada etanol 96% memiliki kadar air yang lebih rendah dan polaritas yang lebih rendah sehingga lebih baik dalam mengekstrak senyawa semi polar seperti alkaloid, terpenoid, saponin, tanin dalam jumlah lebih banyak (Sudira *et al.*, 2024). Sedangkan pada etanol 70% mengandung kadar air yang lebih tinggi yang membuatnya lebih polar sehingga lebih baik dalam mengekstrak senyawa polar seperti flavonoid. Hasil ini didukung dengan skrining fitokimia, dimana ekstrak etanol 96% menghasilkan warna yang lebih intens.

Ekstrak kental etanol 70% dan etanol 96% daun sambung nyawa selanjutnya dilakukan uji kadar air, dimana kadar air dalam ekstrak tidak boleh lebih dari 10% karena dapat mempengaruhi kualitas ekstrak dan mempercepat pertumbuhan jamur. Pada sampel daun sambung nyawa pada masing-masing konsentrasi 70% dan 96% memenuhi persyaratan yaitu kurang dari 10% (Pujiastuti & El'Zeba, 2021). Selanjutnya dilakukan uji kualitatif organoleptis, fitokimia dan KLT. Secara organoleptis ekstrak daun sambung nyawa memiliki warna kecoklatan, tekstur yang lebih kental pada ekstrak etanol 96% dibandingkan dengan etanol 70% yang cenderung lebih cair, serta memiliki bau khas daun sambung nyawa. Oleh karena itu, ekstrak 70% dikentalkan lebih lanjut untuk menurunkan kadar air dan meningkatkan

kekentalannya. Hasil tersebut sesuai dengan standar yang tercantum dalam Farmakope Herbal Indonesia, sehingga menunjukkan bahwa ekstrak yang dihasilkan memenuhi persyaratan mutu yang ditetapkan (Kementrian Kesehatan RI, 2017).

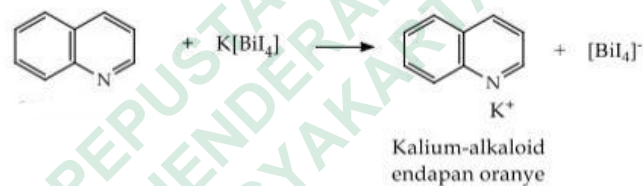
Uji fitokimia pada ekstrak 96% dan ekstrak 70% daun sambung nyawa dilakukan untuk mengidentifikasi kandungan senyawa metabolit sekunder yang terkandung dalam masing-masing ekstrak daun sambung nyawa. Berdasarkan hasil pada **Tabel 5** menunjukkan bahwa masing-masing ekstrak daun sambung nyawa positif mengandung alkaloid, flavonoid, fenolik, tanin, saponin, dan terpenoid. Terdapat hubungan antara nilai rendemen dengan hasil skrining fitokimia. Nilai rendemen ekstrak etanol 96% yang lebih tinggi menunjukkan kemampuan pelarut tersebut dalam mengekstrak lebih banyak senyawa lain yang bersifat semi polar dibandingkan etanol 70% (Puspitaningtyas *et al.*, 2021). Hal ini dibuktikan pada hasil uji skrining fitokimia warna yang dihasilkan yang lebih intens yaitu pada senyawa alkaloid, fenolik, terpenoid, saponin dan tanin. Hasil ini sejalan dengan penelitian oleh Alwie *et al.*, (2021) yang menyatakan bahwa rendemen ekstrak daun salam pada konsentrasi etanol 96% lebih besar dibandingkan dengan etanol 70%, sehingga menghasilkan warna skrining fitokimia yang lebih intens pada etanol 96% dibandingkan dengan etanol 70%.

Hasil pengujian menunjukkan hasil positif alkaloid yang ditandai dengan terbentuknya endapan coklat setelah penambahan reagen wagner, endapan jingga setelah penambahan dragendrof, dan endapan putih saat ditambahkan reagen mayer. Dikatakan positif alkaloid apabila sekurang-kurangnya terdapat dua pengujian dengan reagen yang menyatakan hasil positif. Penambahann HCl 2N dilakukan karena alkaloid bersifat basa dan lebih baik diekstraksi dengan pelarut asam (Oktavia & Sutoyo, 2021). Hasil uji positif alkaloid dengan reagen wagner ditandai dengan terbentuknya endapan coklat yang termasuk jenis alkaloid *Tertiary amine alkaloids* yang bereaksi dengan reagen wagner **Lampiran 5**. Dimana ekstrak etanol 96% menghasilkan warna yang lebih intens dibandingkan dengan ekstrak etanol 70%. Berdasarkan **Gambar 14** endapan coklat terbentuk dari nitrogen pada alkaloid bereaksi dengan ion logam  $K^+$  dari kalium tetraiodomerkurat (II) membentuk kompleks kalium-alkaloid yang mengendap (Oktavia & Sutoyo, 2021).



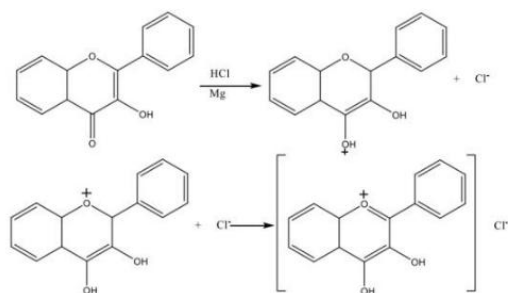
**Gambar 14. Mekanisme Reaksi Wagner (Oktavia & Sutoyo, 2021)**

Hasil uji positif dragendroff ditandai dengan endapan jingga (**Lampiran 5**) yang menunjukkan jenis alkaloid salah satunya yaitu golongan *pyrolizidin* yaitu senyawa *senecionine* dan *senirkine* yang ada pada ekstrak daun sambung nyawa (Windono *et al.*, 2012). Dimana ekstrak etanol 96% menghasilkan warna yang lebih intens dibandingkan dengan ekstrak etanol 70%. Berdasarkan **Gambar 15** terbentuknya endapan jingga diperkirakan karena nitrogen pada alkaloid membentuk ikatan kovalen koordinat dengan ion logam  $K^+$  dari kalium tetraiodobismutat membentuk kompleks kalium-alkaloid yang mengendap (Oktavia & Sutoyo, 2021).



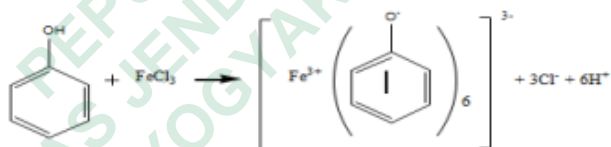
**Gambar 15. Mekanisme Pereaksi Dragendroff (Oktavia & Sutoyo, 2021)**

Hasil skrining fitokimia pada ekstrak etanol 70% dan ekstrak etanol 96% positif flavonoid ditandai dengan terbentuknya warna jingga yang dapat dilihat pada **Lampiran 5**, yang menunjukkan jenis flavonoid yaitu mirisetin, kaemferol, kuersetin dan katekin yang ada pada ekstrak daun sambung nyawa (Pramita *et al.*, 2018). Dimana pada ekstrak etanol 70% menghasilkan warna yang lebih intens dibandingkan dengan ekstrak etanol 96%. Perubahan warna larutan menjadi warna jingga dikarenakan reduksi senyawa flavonoid yang terkandung dalam ekstrak dengan  $Mg^{2+}$  dan HCl pekat akan membentuk kompleks yang berwarna jingga (Oktavia & Sutoyo, 2021). Mekanisme reaksi dapat dilihat pada (**Gambar 16**).



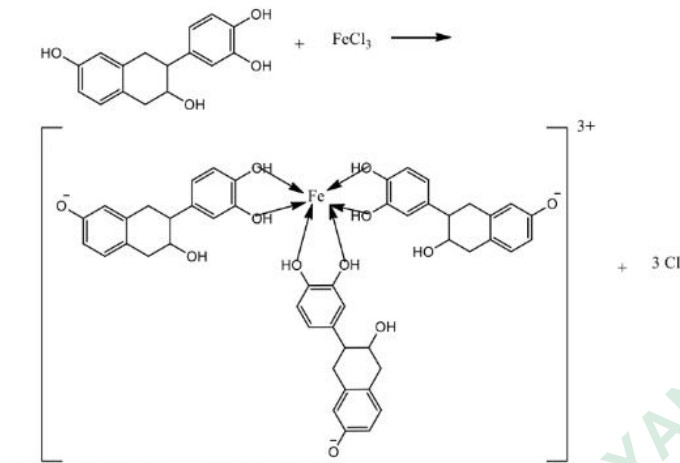
**Gambar 16. Mekanisme Reaksi Flavonoid Dengan Pereaksi Mg dengan HCl (Oktavia & Sutoyo, 2021)**

Skrining fitokimia pada ekstrak etanol 70% dan 96% positif mengandung jenis fenolik yaitu *chlorogenic acid*, dan *3,5-dicaffeoylquinic acid methyl ester* yang ada pada ekstrak daun sambung nyawa (Tan *et al.*, 2013), yang ditandai dengan terbentuknya warna merah setelah penambahan reagen  $\text{FeCl}_3$  5% yang dapat dilihat pada **Lampiran 5**. Dimana ekstrak etanol 96% menghasilkan warna yang lebih intens dibandingkan dengan ekstrak etanol 70%. Perubahan warna ini terjadi ketika  $\text{FeCl}_3$  bereaksi dengan gugus hidroksil yang ada pada senyawa fenolik (Oktavia & Sutoyo, 2021). Mekanisme reaksi fenol dengan  $\text{FeCl}_3$  dapat dilihat pada (**Gambar 17**).



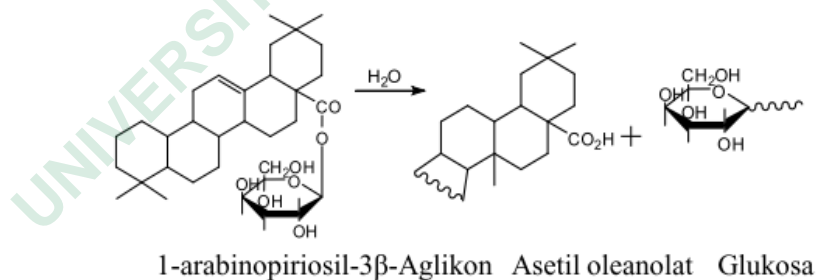
**Gambar 17. Mekanisme Reaksi Fenol dengan  $\text{FeCl}_3$  5% (Oktavia & Sutoyo, 2021)**

Hasil skrining fitokimia pada ekstrak etanol 70% dan ekstrak etanol 96% positif mengandung tanin ditandai dengan perubahan warna hijau kehitaman saat penambahan  $\text{FeCl}_3$  1% yang dapat dilihat pada **Lampiran 5**. Dimana ekstrak etanol 96% menghasilkan warna yang lebih intens dibandingkan dengan ekstrak etanol 70%. Perubahan warna ini terjadi akibat reaksi penambahan  $\text{FeCl}_3$  dengan salah satu gugus hidroksil yang ada pada senyawa tanin. Penambahan  $\text{FeCl}_3$  yang menyebabkan perubahan warna menunjukkan adanya tanin terkondensasi (Oktavia & Sutoyo, 2021). Dimana pada ekstrak etanol 96% menghasilkan warna yang lebih intens dibandingkan dengan ekstrak etanol 70%. Reaksi yang terjadi antara tanin dan  $\text{FeCl}_3$  dapat dilihat pada (**Gambar 18**).



**Gambar 18. Mekanisme Reaksi Tanin dengan FeCl<sub>3</sub> 1% (Oktavia & Sutoyo, 2021)**

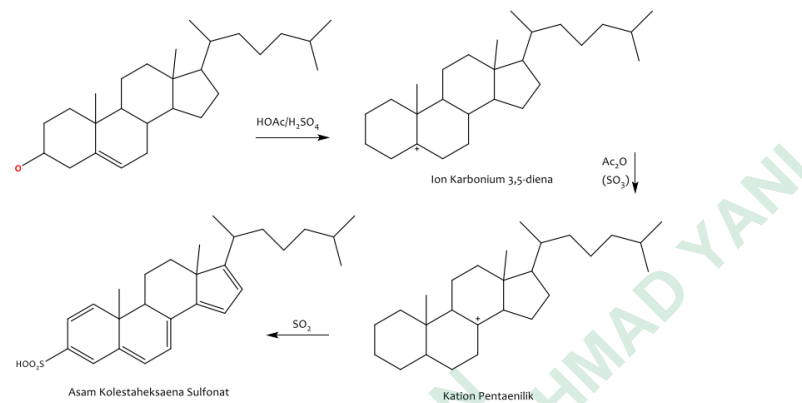
Hasil skrining fitokimia dari ekstrak etanol 70% dan ekstrak etanol 96% daun sambung nyawa positif mengandung senyawa saponin. Hal ini ditandai dengan terbentuknya busa stabil dan tidak hilang saat ditambahkan 4 tetes HCl 2N yang dapat dilihat pada **Lampiran 5**. Dimana ekstrak etanol 96% menghasilkan busa yang lebih tinggi (2,7 cm) dibandingkan dengan ekstrak etanol 70% (2,3 cm). Terbentuknya busa yang stabil disebabkan karena glikosida memiliki kemampuan memperoleh busa pada air lalu mengalami hidrolisis menjadi glukosa serta senyawa lainnya (Oktavia & Sutoyo, 2021). Mekanisme reaksi pembentukan busa pada saponin dapat dilihat pada (**Gambar 19**).



**Gambar 19. Mekanisme Reaksi Pengujian Senyawa Saponin (Oktavia & Sutoyo, 2021)**

Hasil skrining fitokimia pada ekstrak etanol 70% dan ekstrak etanol 96% daun sambung nyawa positif mengandung senyawa terpenoid yaitu triterpenoid jenis *friedelanol acetate* dan *β-amyrin* yang terdapat pada ekstrak daun sambung nyawa (Jobaer *et al.*, 2023) yang ditandai dengan terbentuknya cincin coklat kemerahan setelah penambahan CH<sub>3</sub>COOH dan H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> pekat yang dapat dilihat pada **Lampiran**

5. Dimana pada ekstrak etanol 96% menghasilkan warna yang lebih intens dibandingkan dengan ekstrak etanol 70%. Hal ini terjadi karena adanya reaksi oksidasi pada golongan terpenoid melalui pembentukan ikatan rangkap terkonjugasi (Gustiana *et al.*, 2022). Mekanisme reaksi dapat dilihat pada (**Gambar 20**).



**Gambar 20. Mekanisme Reaksi Senyawa Terpenoid (Gustiana et al., 2022)**

Hasil skrining fitokimia ini sejalan dengan penelitian Warnis & Angelina, (2022), dimana daun sambung nyawa mengandung beberapa senyawa aktif yaitu, alkaloid, flavonoid, saponin, tanin, fenolik, dan terpenoid. Setelah dilakukan skrining fitokimia, ekstrak etanol 70% dan ekstrak etanol 96% daun sambung nyawa kemudian dilanjutkan dengan uji kromatografi lapis tipis (KLT).

Uji KLT bertujuan untuk mengidentifikasi senyawa flavonoid secara kualitatif pada ekstrak etanol 70% dan ekstrak etanol 96%. Tahap pertama dilakukan optimasi fase gerak untuk menentukan campuran pelarut yang tepat. Hal ini dilakukan karena sifat kepolaran fase gerak dapat mempengaruhi pemisahan senyawa-senyawa dalam ekstrak, sehingga berdasarkan **Tabel 6** diperoleh optimasi fase gerak yang baik yaitu menggunakan pelarut n-heksan : etil asetat : asam format (6:4:0,2) yang cenderung bersifat semi polar. Prinsip pengujian ini yaitu memisahkan komponen kimia berdasarkan prinsip absorpsi dan partisi, yang ditentukan oleh fase diam (adsorben) dan fase gerak (eluen) (Romlah *et al.*, 2019). Fase diam yang digunakan adalah plat silika gel  $\text{F}_{254}$  yang bersifat polar dan mampu berfluoresensi dengan baik dibawah sinar UV dengan panjang gelombang 254 nm menghasilkan noda pemisahan berwarna gelap. Langkah selanjutnya adalah proses penjuanan yang bertujuan untuk memastikan proses elusi yang efektif selama proses pemisahan

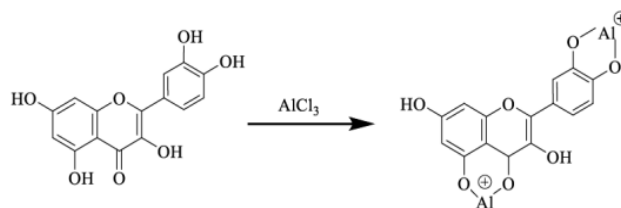
senyawa, karena tekanan uap pelarut dapat mempengaruhi hasil pemisahan (Trimulyani, 2019).

Hasil pengamatan bercak kuersetin, ekstrak etanol 70% dan ekstrak etanol 96% menunjukkan nilai  $R_f$  yang hampir sama. Nilai  $R_f$  standar yaitu 0,475, sedangkan  $R_f$  sampel yaitu 0,487, yang artinya senyawa yang ada pada ekstrak memiliki karakteristik yang mirip dengan pembanding kuersetin. Perbedaan nilai  $R_f$  sampel dan senyawa dianggap positif jika masuk rentang  $\leq 0,05$  dan negatif jika  $> 0,05$  (Nurhasanah *et al.*, 2024). Selain itu, terdapat bercak lain pada  $R_f$  0,462 ; 0,85 ; 0,925 pada sinar tampak dan UV 254 nm, sedangkan pada UV 365 nm dengan  $R_f$  0,25 ; 0,35 ; 0,437 ; 0,462 ; 0,562 ; 0,75 ; 0,925. Nilai  $R_f$  merupakan parameter dalam KLT untuk mengidentifikasi senyawa, dengan persyaratan nilai  $R_f$  yang baik yaitu kisaran 0,2-0,8 (Ferdinan *et al.*, 2022). Penampakan bercak  $AlCl_3$  5% digunakan agar kandungan senyawa flavonoid pada plat KLT dapat diidentifikasi dengan memberikan warna kuning (Romlah *et al.*, 2019). Penambahan reagen semprot  $AlCl_3$  menunjukkan bercak kuning lebih intensif yang dapat diamati pada UV 254 nm karena adanya pembentukan senyawa kompleks antara  $AlCl_3$  dengan flavonoid (Hasan *et al.*, 2023).

Pengamatan dibawah UV 254 nm sebelum penyemprotan  $AlCl_3$  diperoleh bercak standar 0,475 dan sampel  $R_f$  0,487 berwarna kuning kehitaman. Setelah penyemprotan  $AlCl_3$  warna bercak berubah menjadi kuning kehijauan. Perubahan juga terjadi pada  $R_f$  0,85 dan  $R_f$  0,925 yang menunjukkan bahwa terdapat senyawa flavonoid golongan kaemferol pada  $R_f$  0,85 dan katekin pada  $R_f$  0,925 hal ini dikarenakan struktur gugus OH yang lebih sedikit dibandingkan dengan kuersetin. Kuersetin digunakan sebagai standar dikarenakan kuersetin merupakan flavonoid golongan flavonol terbaik yang memiliki gugus keto pada C4 dan mempunyai gugus OH pada atom C5 yang dapat membentuk kompleks dengan  $AlCl_3$ , selain itu kuersetin juga tersebar luas di berbagai tanaman salah satunya pada daun sambung nyawa (Pramita *et al.*, 2018) kuersetin merupakan flavonoid golongan flavonol terbaik yang memiliki gugus keto pada C4 dan mempunyai gugus hidroksil pada atom C5 yang bertetangga dengan flavon dan flavonol yang tersebar luas di berbagai tanaman salah satunya daun sambung nyawa (Siswarni MZ *et al.*, 2017). Oleh karena

itu, uji KLT memberikan bukti lebih lanjut mengenai keberadaan senyawa flavonoid dalam ekstrak daun sambung nyawa. Setelah pengujian skrining fitokimia dan KLT langkah selanjutnya yaitu uji kuantitatif berupa penetapan kadar total flavonoid dalam ekstrak daun sambung nyawa. Standar flavonoid yang digunakan adalah kuersetin untuk mengukur kadar total flavonoid (TFC) dalam sampel yang hasilnya dinyatakan dalam mg QE/g (*Quersetin Equivalent*)/ g sampel.

Penetapan kadar total flavonoid dalam sampel dilakukan menggunakan metode kolorimetri yang melibatkan reaksi pembentukan kompleks antara flavonoid dengan  $\text{AlCl}_3$ . Prinsip metode ini adalah terjadinya kompleks antara  $\text{AlCl}_3$  dengan suatu gugus keto pada atom C4 dan gugus OH pada C5 pada senyawa flavonoid yang membentuk senyawa kompleks yang stabil ditandai dengan terbentuknya larutan yang berwarna lebih kuning. Penambahan  $\text{AlCl}_3$  menghasilkan kompleks dengan kuersetin sehingga warna yang dihasilkan dapat dilihat pada gelombang *visible*. Persamaan reaksi kuersetin dan  $\text{AlCl}_3$  dapat dilihat pada **Gambar 21**. Penggunaan kalium asetat pada uji kadar flavonoid total bertujuan untuk menstabilkan kompleks antara kuersetin dengan  $\text{AlCl}_3$ . Penetapan kadar flavonoid total diawali dengan pengukuran panjang gelombang maksimal untuk menentukan serapan maksimal (Saputri & Sa'ad, 2023). Pengukuran ini dilakukan menggunakan spektrofotometer UV-Vis pada panjang gelombang 300-600 nm. Hasil dari pengukuran panjang gelombang maksimal kuersetin adalah 431 nm. Hasil ini tidak jauh berbeda dengan penelitian Saputri & Sa'ad, (2023) yaitu panjang gelombang maksimal kuersetin 431,5 nm.



**Gambar 21. Persamaan Reaksi Kuersetin dengan  $\text{AlCl}_3$  (Saputri & Sa'ad, 2023)**

Kemudian dilakukan pengukuran *operating time* untuk mengukur waktu stabil pengukuran dengan absorbansi larutan. Hasil *operating time* kuersetin diperoleh pada menit ke-35 yaitu waktu yang diperlukan kuersetin untuk bereaksi

secara stabil dengan  $\text{AlCl}_3$  dan  $\text{CH}_3\text{COOK}$  ditandai dengan pembentukan kompleks. Fungsi penambahan  $\text{CH}_3\text{COOK}$  bertujuan untuk menjaga kestabilan kompleks antara kuersetin dan  $\text{AlCl}_3$ , sehingga kompleks tersebut menghasilkan warna yang stabil (Saputri & Sa'ad, 2023). Hasil ini tidak jauh berbeda dengan penelitian Saputri & Sa'ad, (2023) yaitu waktu stabil berada pada menit ke-33. Standar kuersetin digunakan dalam penetapan kadar flavonoid total dikarenakan kuersetin merupakan flavonoid golongan flavonol terbaik yang memiliki gugus keto pada C4 dan mempunyai gugus OH pada atom C5 yang dapat membentuk kompleks dengan  $\text{AlCl}_3$  sehingga dapat diukur kadarnya menggunakan metode spektrofotometri UV-Vis, selain itu kuersetin juga tersebar luas di berbagai tanaman salah satunya pada daun sambung nyawa (Pramita *et al.*, 2018). Kurva baku yang dihasilkan pada penelitian ini didapatkan regresi linier  $y = 0,012x - 0,0234$  dengan nilai  $r = 0,9993$ . Nilai  $r$  yang mendekati angka 1/-1 menunjukkan persamaan regresi tersebut adalah linier. Sehingga dapat dikatakan bahwa konsentrasi dan absorbansi memiliki korelasi yang sangat kuat dan linier antara konsentrasi kuersetin dan nilai absorbansinya, sehingga hubungannya berbanding lurus (Puspa *et al.*, 2023). Pada pengukuran absorbansi sampel dilakukan replikasi untuk mencari kadar sesungguhnya yang bertujuan untuk memastikan keakuratan dan konsistensi data yang diperoleh serta meminimalisir terjadinya kesalahan pengukuran (Suharyanto & Prima, 2020).

Pada uji kuantitatif diperoleh kadar flavonoid total ekstrak etanol 70% (40,67 mg QE/g) lebih tinggi dibandingkan ekstrak etanol 96% (33,475 mg QE/g). Selanjutnya dihitung nilai standar deviasi (SD) untuk melihat sebaran data rata-rata kadar flavonoid total, hasil nilai SD dari ekstrak etanol 70% dan etanol 96% menghasilkan nilai SD yang berbeda secara berturut-turut yaitu 0,459 dan 0,555. Hal ini menunjukkan bahwa data kadar flavonoid total pada etanol 70% lebih seragam atau konsisten antara satu pengukuran dengan pengukuran lainnya, sedangkan pada etanol 96% data hasil pengukurannya lebih bervariasi (Aldafiana *et al.*, 2021). Namun keduanya memiliki nilai SD yang baik yaitu <5% (Aldafiana *et al.*, 2021). Selanjutnya dihitung nilai koefisien variasi (CV) yang merupakan perbandingan SD dengan rata-rata yang dinyatakan dalam satuan persen. Hasil nilai CV dari ekstrak etanol 70% dan etanol 96% secara berturut-turut yaitu 1,128% dan 1,657%, hal ini

menunjukkan bahwa hasil data kadar flavonoid pada ekstrak 70% lebih seragam atau konsisten antara satu pengukuran dengan pengukuran yang lain. Hasil ini memenuhi persyaratan CV yang baik dimana nilai CV yang baik yaitu kurang dari 5% (Aldafiana *et al.*, 2021).

Hasil analisis statistika kadar flavonoid yang diekstraksi menggunakan pelarut etanol 70% secara signifikan berbeda dengan kadar flavonoid yang diekstraksi dengan etanol 96% yang ditunjukkan dengan nilai 0,001  $sig < 0,05$ . Berdasarkan hasil penelitian yang telah dilakukan menunjukkan bahwa faktor perbedaan konsentrasi pelarut etanol memberikan pengaruh signifikan ( $sig < 0,05$ ) terhadap kadar flavonoid total ekstrak daun sambung nyawa. Pelarut etanol 70% menghasilkan kadar flavonoid total lebih tinggi dibandingkan etanol 96%. Hal ini dipengaruhi oleh indeks polaritas, dimana etanol 70% lebih polar daripada etanol 96% dengan nilai indeks polaritas secara berturut-turut yaitu 6,34 dan 5,35. Penambahan konsentrasi etanol diatas 70% menyebabkan tingkat kepolaran pelarut etanol semakin menurun sehingga pengikatan senyawa flavonoid pada ekstrak daun sambung nyawa tidak optimum akibat ketidaksesuaian tingkat kepolaran (Guna *et al.*, 2020). Senyawa flavonoid salah satunya kuersetin memiliki gugus hidroksil (-OH) yang membuatnya bersifat polar atau semi polar sehingga lebih larut dalam pelarut seperti etanol 70%. Pelarut etanol 70% mengandung konsentrasi air yang lebih besar dibandingkan etanol 96% dimana air dalam etanol dapat mempercepat difusi senyawa seperti flavonoid melalui jaringan tanaman (Plaskova & Mlcek, 2023). Sejalan dengan penelitian yang dilakukan oleh Nurhasanah *et al.*, (2024) menyatakan bahwa etanol 70% lebih efektif dalam mengekstraksi senyawa flavonoid dari daun kupu-kupu, dikarenakan etanol 70% memiliki jumlah gugus OH lebih banyak sehingga meningkatkan kemampuan untuk melarutkan senyawa flavonoid yang bersifat polar secara lebih efisien.

Nilai rendemen yang diperoleh tidak linear dengan kadar flavonoid total, dimana nilai rendemen tertinggi pada konsentrasi 96% sebesar 6,31% diikuti nilai rendemen konsentrasi 70% sebesar 5,61%. Hubungan antara rendemen dan kadar flavonoid tidak selalu linear karena rendemen mencangkup semua senyawa, bukan hanya flavonoid. Hal ini didukung oleh hasil skrining fitokimia dimana pada

konsentrasi 96% menghasilkan warna yang lebih intens pada senyawa tanin, fenolik, saponin dan terpenoid dibandingkan pada konsentrasi etanol 70%, menandakan pada konsentrasi 96% memiliki kemampuan dalam mengekstrak lebih banyak senyawa semi polar dibandingkan pada konsentrasi 70%. Namun pada konsentrasi etanol 70% menghasilkan warna yang lebih intens dibandingkan etanol 96% pada uji skrining fitokimia senyawa flavonoid, dimana hasil tersebut linear dengan kadar flavonoid total yaitu ekstrak etanol 70% lebih besar kadar flavonoid totalnya dibandingkan ekstrak etanol 96% daun sambung nyawa.

PEPUSTAKAAN  
UNIVERSITAS JENDERAL ACHMAD YANI  
YOGYAKARTA