

## Penentuan Kadar Flavonoid Total dan Pembentukan Model Klasifikasi Serbuk Daun Singkong (*Manihot esculenta* Crantz) Berbeda Ketinggian Tempat Tanam

### *(Determination of Total Flavonoid Content and Classification Model of Cassava Leaf Powder (*Manihot esculenta* Crantz) in Different Altitudes)*

Nora Safira, Nia Kristiningrum, Lestyo Wulandari  
Fakultas Farmasi, Universitas Jember  
Jln. Kalimantan 37, Jember, Indonesia, 68121  
e-mail: [niakristiningrum.farmasi@unej.ac.id](mailto:niakristiningrum.farmasi@unej.ac.id)

#### **Abstract**

*Cassava is a plant in the Euphorbiaceae family and is commonly found in Indonesia. One of the main secondary metabolites of cassava leaves is flavonoids. The secondary metabolite content of plant is affected by several factors, including the height of the planting site. This research was conducted to determine differences in flavonoid content and to form a classification model of cassava leaf powder based on the height of the planting site. The UV-Vis spectrophotometer colorimetric method was used to measure the flavonoid content of cassava leaf powder, which was then analyzed statistically. The formation of the classification model was carried out using NIR spectroscopy and Chemometrics. The total flavonoid content of the sample from the highlands, medium plains, and lowlands was 13.599, 12.212, and 10.912 mg QE/gram powder, respectively. The One-Way ANOVA test showed that there is a significant difference in the average total flavonoid content of cassava leaf powder. The post-hoc test showed that the data for each altitude had a significant difference from the other. The formation of LDA, SVM, and SIMCA classification chemometric models has 100% accuracy and is validated with 100% accuracy, so the LDA, SVM, and SIMCA models could categorize all samples in the valid category. Therefore, the selected and validated chemometric models are LDA, SVM, and SIMCA models.*

**Keywords:** cassava, chemometric, flavonoid, NIR, UV-Vis

#### **Abstrak**

Singkong merupakan tanaman famili Euphorbiaceae yang banyak dijumpai di Indonesia. Salah satu metabolit sekunder utama daun singkong adalah flavonoid. Kandungan senyawa metabolit sekunder tanaman dapat dipengaruhi oleh beberapa faktor, diantaranya ketinggian tempat tanam. Penelitian ini dilakukan untuk mengetahui perbedaan kandungan flavonoid dan membentuk model klasifikasi serbuk daun singkong berdasarkan ketinggian tempat tanam. Metode kolorimetri spektrofotometer UV-Vis digunakan untuk mengukur kandungan flavonoid serbuk daun singkong yang kemudian dianalisis secara statistik. Pembentukan model klasifikasi dilakukan menggunakan spektroskopi NIR dan Kemometrik. Hasil penentuan kandungan senyawa flavonoid total sampel dari yang paling tinggi yaitu pada dataran tinggi, sedang dan rendah, yaitu 13,599, 12,212, dan 10,912 mg QE/gram serbuk. Uji *One Way ANOVA* menunjukkan bahwa terdapat perbedaan bermakna dari rata-rata kandungan flavonoid total serbuk daun singkong. Uji *Post Hoc* menunjukkan bahwa data setiap ketinggian memiliki perbedaan signifikan dengan ketinggian yang lainnya. Hasil pembentukan model kemometrik klasifikasi LDA, SVM, dan SIMCA memiliki akurasi 100% dengan hasil validasi akurasi 100% sehingga model LDA, SVM, dan SIMCA dikatakan dapat mengkategorikan semua sampel pada kategori yang sesuai dengan valid. Oleh karena itu, model kemometrik terpilih dan tervalidasi adalah model LDA, SVM, dan SIMCA.

**Kata kunci:** flavonoid, kemometrik, NIR, singkong, UV-Vis

## Pendahuluan

Indonesia merupakan salah satu negara dengan sumber daya alam melimpah, terutama pada ragam tanamannya. Banyak tumbuhan Indonesia diketahui berkhasiat obat dan berpotensi digunakan sebagai terapi herbal obat tradisional. Obat tradisional adalah bahan atau ramuan berupa bahan tumbuhan, bahan hewani, bahan mineral, sediaan ekstrak (galenik), atau campuran dari bahan-bahan tersebut, yang telah digunakan untuk pengobatan secara turun temurun dan dapat digunakan sesuai dengan ketentuan yang berlaku (1). Prevalensi penggunaan obat tradisional masyarakat Indonesia di atas usia 15 tahun adalah 59,12% (2). Salah satu tanaman yang berpotensi sebagai obat tradisional adalah tanaman singkong (*Manihot esculenta* Crantz).

Singkong merupakan tanaman famili Euphorbiaceae yang banyak dijumpai di Indonesia. Umbi singkong dimanfaatkan sebagai sumber karbohidrat sedangkan daun singkong dimanfaatkan sebagai sayuran atau pakan ternak (3). Daun singkong kaya akan asam amino, protein, klorofil, karotenoid, dan digunakan secara tradisional untuk mengobati sakit kepala dan diare (4). Aktivitas tersebut dapat dikaitkan dengan kandungan senyawa metabolit sekunder yang terkandung dalam daun singkong.

Flavonoid merupakan salah satu metabolit sekunder utama yang berperan penting dalam aktivitas senyawa daun singkong. Flavonoid terdiri struktur inti  $C_6-C_3-C_6$  dengan dua cincin aromatis yang dihubungkan dengan 3 atom C dan dapat juga berikatan dengan O membentuk ikatan oksigen heterosiklik (5). Rutin merupakan kandungan utama flavonoid daun singkong yang berupa glikosida golongan flavonol dan memiliki gugus gula yang berikatan dengan gugus hidroksil (3).

Kandungan senyawa metabolit sekunder suatu tanaman dapat dipengaruhi oleh beberapa faktor salah satunya adalah ketinggian tempat tanam. Rukmana (2002) membagi kriteria ketinggian tempat di Indonesia menjadi tiga bagian wilayah, yaitu dataran rendah (0-200 mdpl), dataran sedang (201-700 mdpl), dan dataran tinggi (>700 mdpl). Penelitian Tanamal dkk. (2017) menunjukkan adanya pengaruh lokasi tumbuh pada kandungan flavonoid. Semakin tinggi ketinggian tempat tanam, maka kadar flavonoid akan semakin tinggi (7,8). Oleh karena itu, dilakukan penentuan kadar flavonoid total serbuk daun singkong berdasarkan klasifikasi ketinggian tempat tanam berbeda.

Klasifikasi tanaman berdasarkan perbedaan ketinggian tempat tanam dapat digunakan sebagai kontrol kualitas dan mutu bahan baku obat. Untuk menilai ketepatan klasifikasi, dilakukan pembentukan model klasifikasi menggunakan spektroskopi Near Infrared (NIR). Spektroskopi NIR merupakan teknik analisis yang didasarkan pada rotasi dan vibrasi atom pada molekul. Spektrum inframerah yang dihasilkan merupakan hasil interaksi antar senyawa kimia yang terkandung dalam daun singkong. Metode NIR memiliki kelebihan seperti non-destruktif, non-invasif, waktu analisis cepat, relatif murah (9), cukup baik dalam analisis *in situ*, dan dapat diterapkan untuk sampel dalam berbagai kondisi, bentuk, maupun ketebalan (10). Namun, spektroskopi NIR juga memiliki kelemahan yaitu spektra yang dihasilkan saling tumpang tindih dan sensitivitas yang cukup rendah sehingga hasil spektra perlu interpretasi lebih lanjut (10). Oleh karena itu, digunakan metode analisis multivariat kemometrik untuk menginterpretasi data spektra NIR (11). Pada penelitian ini digunakan metode analisis kualitatif untuk membuat model klasifikasi. Beberapa metode kemometrik yang dapat digunakan adalah *Soft Independent Modelling of Class Analogy* (SIMCA), *Linear Discriminant Analysis* (LDA), dan *Support Vector Machine Classification* (SVM) (12).

Penelitian ini bertujuan untuk mengetahui ada tidaknya perbedaan kandungan flavonoid pada serbuk daun singkong yang memiliki perbedaan ketinggian tempat tanam dan untuk mengetahui kemampuan spektroskopi NIR dan kemometrik dalam mengklasifikasikan serbuk daun singkong berdasarkan perbedaan ketinggian tempat tanam.

## Metode Penelitian

Penelitian dilaksanakan di Laboratorium Kimia, Fakultas Farmasi, Universitas Jember. pada bulan Januari – Juli 2022.

Alat yang digunakan dalam penelitian ini adalah timbangan analitik (Ohaus), ultrasonikator (Elmasonic), alat-alat gelas, alat penyerbuk (*blender*), mikropipet (socorex), kuvet, oven, ayakan mesh 100, perangkat lunak *Altimeter by PixelProse* SARL versi 3.3.1, spektroskopi NIR (*Brimrose Luminar 3070*) dengan perangkat lunak *The Unscrambler X 10.4* (Camo), perangkat lunak SPSS versi 22 dan spektrofotometer UV-Vis (Hitachi U-1800).

Bahan yang digunakan pada penelitian ini yaitu sampel (*training set* dan *test set*) serbuk

daun singkong yang diambil dari ketinggian tempat tanam berbeda (dataran tinggi, dataran sedang, dan dataran rendah). Kuersetin (Sigma-Aldrich), aluminium klorida 1 % (Merck), kalium asetat 0,1 M (UPT BPPTK LIPI), etanol 96% teknis, aquadest, dan kertas saring.

Tabel 1. Daftar sampel *training set*

| Kode | Kategori Dataran | Kecamatan  | mdpl |
|------|------------------|------------|------|
| R1   | Rendah           | Ambulu     | 33   |
| R2   |                  | Sumbersari | 59   |
| R3   |                  | Jenggawah  | 61   |
| R4   |                  | Ajung      | 65   |
| S2   | Sedang           | Maesan     | 353  |
| S3   |                  | Tapen      | 400  |
| S4   |                  | Sukosari   | 491  |
| S5   |                  | Silo       | 512  |
| T2   | Tinggi           | Bumiaji    | 814  |
| T3   |                  | Junrejo    | 889  |
| T4   |                  | Batu       | 998  |
| T5   |                  | Pujon      | 1185 |

Tabel 2. Daftar sampel *test set*

| Kode | Kategori Dataran | Kecamatan     | mdpl |
|------|------------------|---------------|------|
| R5   | Rendah           | Kaliwates     | 74   |
| S1   | Sedang           | Jelbuk        | 279  |
| T1   | Tinggi           | Sumberwringin | 737  |

### Pengumpulan sampel

Pengambilan sampel daun singkong dilakukan pada daerah dataran rendah (<200 mdpl), dataran sedang (200-700 mdpl) dan dataran tinggi (>700 mdpl) di wilayah Jawa Timur.

### Pembuatan Serbuk Daun Singkong

Sampel daun singkong sebanyak  $\pm 300$  gram dicuci dengan air mengalir dan diangin-anginkan (tidak boleh terkena cahaya matahari langsung). Daun singkong kemudian dirajang menjadi kecil dan diangin-anginkan kembali hingga kering. Simplisia daun singkong kering kemudian dihaluskan menggunakan blender menjadi serbuk daun singkong. Serbuk daun singkong yang diperoleh kemudian diayak halus menggunakan ayakan mesh 100. Serbuk halus kemudian ditetapkan kadar airnya menggunakan *moisture content analyzer*.

### Pembuatan Larutan Standar Kuersetin

10 mg standar kuersetin dimasukkan dalam labu ukur 10 ml dan dilarutkan dengan etanol teknis 96% sampai batas labu ukur sehingga diperoleh konsentrasi baku induk sebesar 1000 ppm. Dibuat seri konsentrasi larutan kuersetin dari pengenceran larutan baku induk 1000 ppm menjadi 20, 40, 60, 80, dan 100 ppm.

### Penentuan Panjang Gelombang Maksimum

Larutan standar kuersetin dengan konsentrasi 2, 6 dan 10 ppm didiamkan selama 30 menit (hasil optimasi). Kemudian diukur panjang gelombang maksimum pada rentang panjang gelombang 350-500 nm. Panjang gelombang maksimum yang dipilih yaitu panjang gelombang dengan nilai absorbansi memiliki puncak maksimum.

### Penentuan Waktu Inkubasi

50 mg sampel serbuk daun singkong dimasukkan dalam labu ukur 10 ml (satu sampel mewakili setiap dataran) dan dilarutkan dengan etanol teknis 96% sampai batas tanda. Diultrasonik selama  $\pm 15$  menit dan disaring menggunakan kertas saring. Pipet 0,1 ml larutan standar kuersetin dan sampel, lalu ditambahkan 0,2 ml aluminium klorida 1%; 0,2 ml kalium asetat 0,1 M; 0,3 ml etanol teknis 96%; dan 0,2 ml aquadest. Kemudian dilakukan inkubasi dalam suhu ruang ( $\pm 25^\circ\text{C}$ ) selama 90 menit, dimana setiap 5 menit dilakukan pengukuran absorbansi pada panjang gelombang maksimal dengan spektrofotometer UV-Vis. Waktu inkubasi optimum diperoleh apabila hasil pengukuran absorbansi larutan stabil dan tidak mengalami perubahan yang besar.

### Pembuatan Kurva Baku Kuersetin

Masing-masing 0,1 ml standar kuersetin ditambahkan 0,2 ml aluminium klorida 1%; 0,2 ml kalium asetat 0,1 M; 0,3 ml etanol teknis 96%; dan 0,2 ml aquadest sehingga diperoleh konsentrasi 2, 4, 6, 8, dan 10 ppm. Larutan diinkubasi 30 menit, lalu dilakukan pengukuran absorbansi pada panjang gelombang 432 nm (hasil optimasi). Larutan blanko yang digunakan adalah semua reagen tanpa larutan standar. Hasil dari data ini kemudian dibuat persamaan regresi antara konsentrasi kuersetin dengan absorbansi.

### Penentuan Kadar Flavonoid Total

50 mg serbuk daun singkong (replikasi 3 kali) dimasukkan dalam labu ukur 10 ml dan dilarutkan dengan etanol teknis 96% sampai tanda batas. Selanjutnya labu ukur diultrasonik

( $\pm 15$  menit) dan disaring menggunakan kertas saring. Setiap larutan sampel dipipet sebanyak 0,1 ml kemudian ditambahkan dengan 0,2 ml aluminium klorida 1%; 0,2 ml kalium asetat 0,1 M; 0,3 ml etanol teknis 96%; dan 0,2 ml aquadest. Didiamkan sesuai waktu inkubasi optimum yang terpilih kemudian diukur absorbansinya pada panjang gelombang maksimum. Larutan blanko yang digunakan adalah semua reagen tanpa penambahan sampel. Nilai absorbansi sampel yang didapatkan selanjutnya dimasukkan ke dalam persamaan regresi linier standar kuersetin. Kemudian didapatkan kandungan flavonoid pada sampel yang dinyatakan dalam milligram kuersetin ekuivalen per gram serbuk (mg QE/g serbuk).

### Analisis Data

Data penentuan kadar flavonoid dilakukan analisis uji normalitas dan homogenitas untuk melihat apakah data yang didapatkan terdistribusi normal dan homogen. Selanjutnya dilakukan uji statistik *One Way ANOVA* dengan nilai signifikansi (Sig.) 0,05 (tingkat kepercayaan 95%) untuk menentukan ada tidaknya perbedaan bermakna kandungan flavonoid total pada sampel serbuk daun singkong berbeda ketinggian tempat tanam. Dilakukan juga uji *Post Hoc* untuk melihat data mana saja yang memiliki perbedaan bermakna.

### Pengukuran Spektrum Serbuk Daun Singkong

Pengukuran spektrum dilakukan pada semua sampel daun singkong menggunakan spektroskopi NIR (*Brimrose Luminar 3070*). Setiap sampel memiliki 4 replikasi dengan 10 kali tembakan pada setiap replikasinya.

### Penentuan Model Kemometrik Klasifikasi Klasifikasi Terpilih

Data hasil spektrum NIR yang telah didapatkan diolah menggunakan program perangkat lunak *The Unscrambler X 10.4* dengan metode analisis multivariat *Linear Discriminant Analysis* (LDA), *Support Vector Machines* (SVM), dan *Soft Independent Modelling of Class Analogies* (SIMCA).

### Validasi Metode Kemometrik

Validasi yang digunakan adalah validasi internal dan eksternal. Validasi internal menggunakan metode *Leave One Out Cross Validation* (LOOCV) menggunakan data sampel *training set* dan validasi eksternal menggunakan data dari sampel *test set*.

## Hasil

### Penentuan Kadar Air Serbuk Daun Singkong

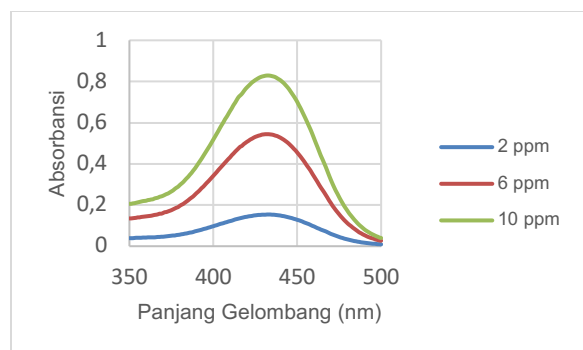
Tabel 3. Kadar air serbuk simplisia daun singkong

| No. | Kode Sampel | Kadar Air (%)<br>(n=1) |
|-----|-------------|------------------------|
| 1   | R1          | 6,40                   |
| 2   | R2          | 7,00                   |
| 3   | R3          | 6,00                   |
| 4   | R4          | 6,40                   |
| 5   | S2          | 5,60                   |
| 6   | S3          | 6,00                   |
| 7   | S4          | 6,40                   |
| 8   | S5          | 5,40                   |
| 9   | T2          | 5,60                   |
| 10  | T3          | 5,40                   |
| 11  | T4          | 5,60                   |
| 12  | T5          | 6,00                   |
| 13  | Test set R5 | 5,60                   |
| 14  | Test set S1 | 6,00                   |
| 15  | Test set T1 | 6,15                   |

Penentuan kadar air serbuk daun singkong menggunakan alat *moisture content analyzer*. Kadar air serbuk daun singkong dinyatakan dalam % kadar air dengan persyaratan kadar air <10% (13). Hasil penentuan kadar air serbuk daun singkong dapat dilihat pada Tabel 3, dimana semua sampel telah memenuhi persyaratan kadar air <10%.

### Penentuan Panjang Gelombang Maksimum

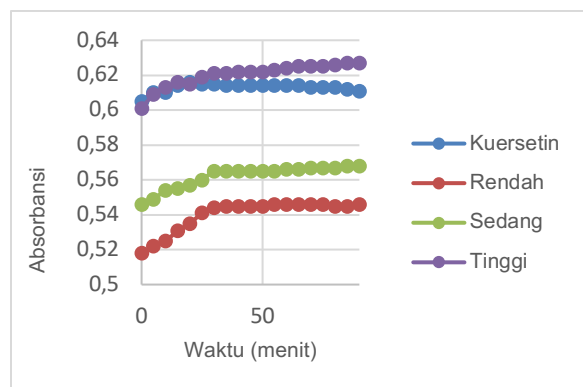
Penentuan panjang gelombang maksimum dilakukan pada tiga konsentrasi kuersetin, yaitu 2 ppm; 6 ppm; dan 10 ppm. Hasil penentuan dari tiga konsentrasi menunjukkan bahwa intensitas spektrum maksimum berada pada panjang gelombang 432 nm. Panjang gelombang maksimum yang didapatkan telah sesuai dengan penelitian Chang dkk. (2002) yang menyebutkan bahwa rentang pengukuran panjang gelombang kuersetin dengan reagen aluminium klorida berkisar antara 415 – 440 nm (14). Kurva hasil penetapan panjang gelombang maksimum dapat dilihat pada Gambar 1.



Gambar 1. Spektrum panjang gelombang kuersetin

### Penentuan Waktu Inkubasi

Penentuan waktu inkubasi optimum ini bertujuan untuk mengetahui kapan waktu larutan kuersetin yang telah direaksikan memberikan hasil absorbansi yang stabil (15). Hasil penentuan waktu inkubasi menunjukkan bahwa absorbansi larutan standar maupun sampel mulai konstan pada menit ke-30 (Gambar 2). Hasil ini sesuai dengan hasil penelitian yang dilakukan oleh Rukmana (2020) yang menyatakan bahwa waktu inkubasi optimum untuk penentuan kadar flavonoid dengan metode kolorimetri menggunakan aluminium klorida adalah 30 menit (16).

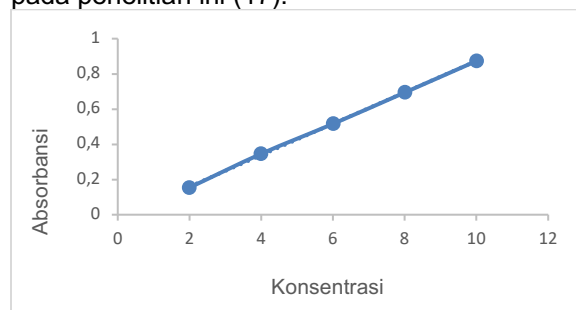


Gambar 2. Kurva penentuan waktu inkubasi optimum dengan spektrofotometer Uv-Vis

### Pembuatan Kurva Baku Kuersetin

Gambar 3 menunjukkan kurva baku kuersetin. Persamaan regresi linier antara konsentrasi kuersetin (x) dengan absorbansi kuersetin (y) yaitu  $y = 0,0893x - 0,0192$  dengan nilai koefisien korelasi ( $R^2$ ) sebesar 0,9997. Nilai R yang diperoleh dari persamaan mendekati nilai 1 menunjukkan bahwa data tersebut memiliki hubungan yang linier antara konsentrasi kuersetin dengan absorbansi, sehingga dapat

digunakan untuk penentuan kadar flavonoid total pada penelitian ini (17).



Gambar 3. Kurva baku kuersetin

### Penentuan Kadar Flavonoid Total Serbuk Simplisia Daun Singkong

Kadar flavonoid dinyatakan dalam milligram kuersetin tiap gram serbuk (mg QE/gram serbuk). Tabel 4 menunjukkan data hasil penentuan kadar flavonoid. Dari Tabel 4 diketahui bahwa kandungan flavonoid total tertinggi adalah sampel yang tumbuh pada dataran tinggi (>700 mdpl), diikuti dengan sampel yang tumbuh pada dataran sedang (200-700 mdpl) dan dataran rendah (<200 mdpl). Hal ini dapat menunjukkan bahwa serbuk simplisia daun singkong yang tumbuh pada dataran tinggi lebih berpotensi sebagai sumber flavonoid.

Tabel 4. Hasil kadar flavonoid total

| Kode sampel | Kategori dataran | Rata-rata kadar $\pm$ SD (mg QE/gram) (n = 3) |
|-------------|------------------|-----------------------------------------------|
| R1          | Rendah           | 10,331 $\pm$ 0,271                            |
| R2          |                  | 11,598 $\pm$ 0,065                            |
| R3          |                  | 10,859 $\pm$ 0,090                            |
| R4          |                  | 10,218 $\pm$ 0,118                            |
| R5          |                  | 11,553 $\pm$ 0,063                            |
| S1          | Sedang           | 11,724 $\pm$ 0,228                            |
| S2          |                  | 11,919 $\pm$ 0,146                            |
| S3          |                  | 12,797 $\pm$ 0,082                            |
| S4          |                  | 12,084 $\pm$ 0,051                            |
| S5          |                  | 12,536 $\pm$ 0,090                            |
| T1          | Tinggi           | 12,725 $\pm$ 0,117                            |
| T2          |                  | 14,189 $\pm$ 0,127                            |
| T3          |                  | 13,397 $\pm$ 0,067                            |
| T4          |                  | 13,583 $\pm$ 0,150                            |
| T5          |                  | 14,099 $\pm$ 0,226                            |

### Analisis Data

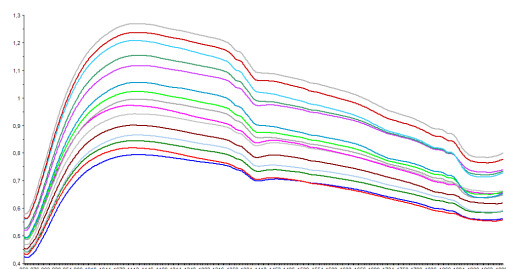
Hasil uji normalitas pada data kadar flavonoid menunjukkan nilai signifikansi untuk sampel dataran rendah sebesar 0,237; dataran sedang sebesar 0,691; dan dataran tinggi

sebesar 0,598. Hasil dari uji homogenitas menunjukkan nilai sig. sebesar 0,628. Berdasarkan hasil tersebut maka disimpulkan bahwa data telah terdistribusi normal dan memiliki kesamaan varian atau bersifat homogen karena memiliki nilai sig.>0,05.

Hasil uji *One Way ANOVA* didapatkan nilai signifikansi sebesar 0,000 (<0,05) yang berarti terdapat perbedaan yang bermakna dari rata-rata kandungan flavonoid total serbuk daun singkong pada tiga ketinggian yang berbeda (rendah, sedang, dan tinggi). Sehingga uji lanjutan *Post Hoc* dapat dilakukan. Uji *Post Hoc* menunjukkan bahwa setiap sampel memiliki perbedaan bermakna jika dibandingkan dengan sampel lainnya.

### Pengukuran Spektrum Serbuk Daun Singkong

Pengukuran spektrum serbuk daun singkong dilakukan menggunakan instrumen spektroskopi NIR *Brimrose Luminar 370*. Hasil pengukuran spektrum menunjukkan bahwa spektrum NIR antar sampel memiliki kemiripan karakteristik (Gambar 4). Perbedaan terdapat pada nilai transmittan pada setiap spektra sampel. Sampel yang memiliki nilai transmittan paling tinggi merupakan sampel yang berasal dari kelompok sampel dataran tinggi, dilanjutkan dengan dataran sedang dan dataran rendah. Sampel yang diambil pada dataran tinggi akan memiliki nilai transmittan yang tinggi, begitu pula pada sampel dataran sedang dan rendah.

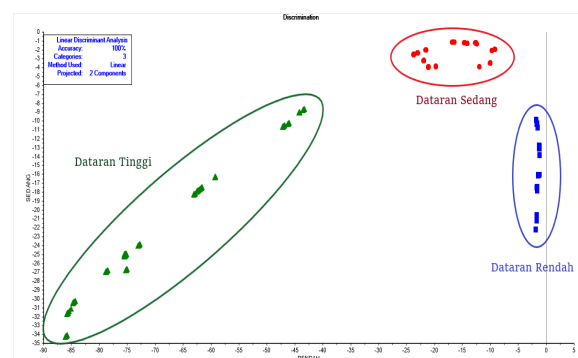


Gambar 4. Spektrum NIR Serbuk Daun Singkong

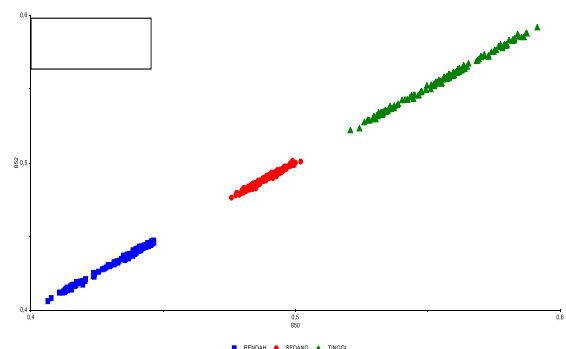
### Penentuan Model Kemometrik Klasifikasi Klasifikasi Terpilih

Model Kemometrik klasifikasi yang digunakan yaitu *Linier Discriminant Analysis* (LDA), *Support Vector Machine Classification* (SVM), dan *Soft Independent Modelling of Class Analogy* (SIMCA). Berdasarkan hasil pembentukan model kemometrik klasifikasi dapat memperlihatkan bahwa model kemometrik LDA,

SVM, dan SIMCA dapat memprediksi model dengan akurasi 100%. Hal ini menunjukkan bahwa untuk pengelompokan pada kategori dataran rendah, sedang, dan tinggi dengan baik.



Gambar 5. Grafik Pemetaan Model Klasifikasi LDA



Gambar 6. Gambar Pemetaan Model Klasifikasi SVM

Tabel 5. Tabel Pemetaan Model Klasifikasi SIMCA

| Kategori       | Kode Sampel            | Kategori Prediksi |        |        |
|----------------|------------------------|-------------------|--------|--------|
|                |                        | Rendah            | Sedang | Tinggi |
| Dataran Rendah | R1                     | ✓                 |        |        |
|                | R2                     | ✓                 |        |        |
|                | Panjang gelombang (nm) |                   |        |        |
|                | R4                     | ✓                 |        |        |
| Dataran Sedang | S2                     |                   | ✓      |        |
|                | S3                     |                   | ✓      |        |
|                | S4                     |                   | ✓      |        |
|                | S5                     |                   | ✓      |        |
| Dataran Tinggi | T2                     |                   |        | ✓      |
|                | T3                     |                   |        | ✓      |
|                | T4                     |                   |        | ✓      |
|                | T5                     |                   |        | ✓      |

Tabel 6. Akurasi Pengenalan Model Klasifikasi LDA, SVM, dan SIMCA

| Model | Kemampuan Pengenalan (Akurasi) |
|-------|--------------------------------|
| LDA   | 100%                           |
| SVM   | 100%                           |
| SIMCA | 100%                           |

**Validasi Metode Kemometrik**

Validasi Internal dilakukan menggunakan metode *Leave-one-out Cross-Validation* (LOOCV). Hasil yang didapatkan menunjukkan bahwa model kemometrik LDA, SVM dan SIMCA memiliki akurasi sebesar 100% dan tidak ada sampel yang masuk kedalam kategori yang salah.

Tabel 7. Hasil Validasi LOOCV Model LDA dan SIMCA

| Kode Sampel yang Dihilangkan | LDA  | SVM  | SIMCA |
|------------------------------|------|------|-------|
| R5                           | 100% | 100% | 100%  |
| S1                           | 100% | 100% | 100%  |
| T1                           | 100% | 100% | 100%  |

Validasi eksternal menggunakan 3 sampel *test set* yang telah diketahui kategorinya. Berdasarkan hasil validasi eksternal diperoleh hasil akurasi yang baik pada model kemometrik LDA, SVM dan SIMCA sebesar 100%, sehingga model LDA, SVM dan SIMCA dapat mengkategorikan semua sampel pada kategori yang sesuai secara valid.

Tabel 8. Akurasi Pengenalan Model Klasifikasi LDA, SVM, dan SIMCA *test set*

| Model | Kemampuan Pengenalan (Akurasi) |
|-------|--------------------------------|
| LDA   | 100%                           |
| SVM   | 100%                           |
| SIMCA | 100%                           |

**Pembahasan**

Sampel daun singkong dikumpulkan menggunakan teknik *purposive sampling* pada dataran rendah (<200 mdpl) tepatnya daerah Jember; dataran sedang (200-700 mdpl) di daerah Bondowoso dan Jember; serta dataran

tinggi (>700 mdpl) di daerah Bondowoso, Malang dan Batu. Sampel dikumpulkan langsung dari kebun singkong di pemukiman warga. Sampel daun singkong diambil dari daun yang terletak pada posisi ke 4-7 dari pucuk tanaman singkong (3). Sampel daun singkong dikeringkan dan dihaluskan menjadi serbuk kemudian diayak menggunakan ayakan mesh 100 untuk menyeragamkan ukuran, bentuk, rongga, dan susunan antar partikel yang dapat memengaruhi transmisi cahaya yang melewati sampel dan reflektansinya (18).

Serbuk daun singkong selanjutnya ditentukan kandungan kadar airnya. Penentuan kadar air bertujuan untuk memastikan bahwa sampel serbuk simplisia yang digunakan pada penelitian ini memenuhi syarat kadar air yang baik, yaitu dibawah 10% (13). Berdasarkan penelitian Dewi (2016), sampel yang memiliki kadar air <10% akan menunjukkan reflektan spektra yang tinggi. Hasil penentuan kadar air serbuk simplisia daun singkong menunjukkan bahwa semua sampel memiliki kadar air dibawah 10 % (memenuhi syarat).

Pada hasil penentuan kadar flavonoid total serbuk simplisia daun singkong menggunakan spektrofotometri UV-Vis, diketahui bahwa serbuk simplisia daun singkong yang tumbuh pada dataran tinggi lebih berpotensi sebagai sumber flavonoid. Rata-rata kandungan flavonoid total serbuk daun singkong setiap dataran yaitu pada dataran rendah sebesar 10,912 mg QE/g serbuk, dataran sedang sebesar 12,212 mg QE/g serbuk, dan dataran tinggi sebesar 13,599 mg QE/g serbuk.

Kadar flavonoid total pada penelitian ini bervariasi. Hal tersebut dapat terjadi karena dipengaruhi faktor perbedaan suhu, pH, kelembapan tanah, kondisi lahan, intensitas cahaya, ketersediaan air, dan ketinggian tempat (3,19). Kandungan flavonoid total tertinggi terdapat pada sampel T5 sebesar 14,099 mg QE/g serbuk yang diambil pada ketinggian 1185 mdpl. Hal ini sesuai dengan penelitian (7) yang mengatakan bahwa tanaman yang ditanam di wilayah dataran tinggi akan memiliki kandungan flavonoid yang lebih tinggi dari dataran rendah atau sedang.

Pada umumnya kadar flavonoid akan meningkat ketika tanaman mengalami tekanan dari lingkungannya, sehingga tanaman akan menghasilkan metabolit sekunder untuk mempertahankan diri dari kondisi lingkungan tersebut (7). Semakin tinggi suatu tempat, maka intensitas cahaya dan suhu udara semakin turun, sedangkan kelembapan akan semakin naik

sehingga kadar flavonoid akan semakin meningkat pula (7,8). Perbedaan suhu lingkungan menyebabkan proses metabolisme yang berbeda-beda pada tanaman sehingga metabolit sekunder yang dihasilkan pun berbeda (8). Namun, ada beberapa hasil sampel yang diperoleh dari tempat tanam yang lebih tinggi seperti T3 memiliki kadar flavonoid yang lebih rendah dari pada tempat tanam yang lebih rendah seperti T2. Hasil penelitian ini juga menunjukkan perbedaan yang kandungan flavonoid yang sedikit antar dataran seperti pada kandungan flavonoid R5 dan T1, padahal memiliki jarak ketinggian tempat tanam yang jauh. Hal tersebut dimungkinkan terjadi karena adanya faktor lain yang mempengaruhi seperti nutrisi yang tersedia pada tanaman misalnya Nitrogen (N), Kalium (K), Carbon (C) yang mempunyai hubungan yang linier dengan pembentukan metabolit sekunder (20).

Analisis data kandungan flavonoid menunjukkan bahwa terdapat perbedaan yang bermakna dari rata-rata kandungan flavonoid total serbuk daun singkong pada tiga ketinggian yang berbeda (rendah, sedang, dan tinggi) dimana setiap sampel memiliki perbedaan bermakna jika dibandingkan dengan sampel lainnya.

Pada hasil pengukuran spektrum serbuk daun singkong menunjukkan bahwa spektrum NIR antar sampel memiliki kemiripan karakteristik. Sampel yang memiliki nilai transmittansi paling tinggi merupakan sampel yang berasal dari kelompok sampel dataran tinggi, dilanjutkan dengan dataran sedang dan dataran rendah. Data spektrum NIR diolah dan dilakukan pembentukan model kemometrik menggunakan program perangkat lunak *The Unscrambler X 10.4*.

Berdasarkan hasil pembentukan model kemometrik klasifikasi dapat memperlihatkan bahwa model kemometrik LDA, SVM, dan SIMCA dapat memprediksi model dengan akurasi 100%. Hal ini menunjukkan bahwa untuk pengelompokan pada kategori dataran rendah, sedang, dan tinggi dengan baik. Daun singkong dengan wilayah tempat tumbuh yang berbeda seperti pada dataran rendah, dataran sedang, maupun dataran tinggi sulit dibedakan baik daun basah, bentuk simplisia, atau serbuk simplisianya. Adanya model kemometrik klasifikasi LDA, SVM dan SIMCA dapat membantu mengetahui identitas dari masing-masing wilayah dataran tersebut. Model tersebut dapat dimanfaatkan sebagai kontrol kualitas bahan baku obat tradisional dari daun singkong.

Hasil pembentukan model divalidasi menggunakan validasi internal (model) dan validasi eksternal (metode) (21). Validasi internal, merupakan metode pengambilan ulang sampel data yang digunakan untuk memperkirakan kesalahan prediksi model dan menyesuaikan parameter model (22). Prinsip kerjanya didasarkan pada pemisahan data (klasifikasi). Beberapa data dipakai untuk menyesuaikan masing-masing model dan yang lainnya dipakai untuk memprediksi kesalahan validasi model sehingga didapatkan model terbaik (22). Validasi dilakukan pada model kemometrik LDA, SVM, dan SIMCA.

Validasi Internal dilakukan menggunakan metode *Leave-one-out* (LOOCV) dengan cara mengeluarkan set data pada set R5, S1, dan T1 secara bergantian dan menggunakan set data sisanya untuk di validasi. Validasi eksternal dilakukan menggunakan 3 sampel *test set* yang telah diketahui kategorinya. Berdasarkan hasil validasi eksternal diperoleh hasil akurasi yang baik pada model kemometrik LDA, SVM dan SIMCA sebesar 100%, sehingga model LDA, SVM dan SIMCA dapat mengkategorikan semua sampel pada kategori yang sesuai secara valid.

### Simpulan dan Saran

Kandungan flavonoid total serbuk daun singkong dari 3 ketinggian tempat tanam yang berbeda menunjukkan adanya perbedaan bermakna berdasarkan uji statistik *One Way ANOVA*. Metode spektroskopi NIR dan kemometrik dapat digunakan untuk mengklasifikasikan kandungan flavonoid total serbuk daun singkong berdasarkan ketinggian tempat tanam yang berbeda. Model klasifikasi yang terbentuk adalah LDA, SVM dan SIMCA yang memiliki akurasi sebesar 100%.

Berdasarkan penelitian ini, maka peneliti memberikan saran penambahan sampel dalam ketinggian yang lebih beragam dan sampling lebih luas sehingga model yang didapatkan bisa diimplementasikan ke wilayah yang lebih luas. Selain itu, dapat dilakukan penentuan kandungan metabolit sekunder yang lain seperti fenol, tanin, dan lain-lain atau dapat pula dilakukan penentuan aktivitas yang ada dalam daun singkong seperti antioksidan.

### Daftar Pustaka

- [1] Menkes RI. Peraturan Menteri Kesehatan Republik Indonesia Nomor 6 Tahun 2016 Tentang Formularium Obat Herbal Asli Indonesia. In Indonnesia; 2016.



- [2] Adiyasa MR, Meiyanti. Pemanfaatan Obat Tradisional di Indonesia: Distribusi dan Faktor Demografis yang Berpengaruh. *J Biomedika dan Kesehatan*. 2021;4(3):130–8.
- [3] Hasim, Falah S, Dewi LK. Effect of Boiled Cassava Leaves (*Manihot esculenta* Crantz) on Total Phenolic, Flavonoid and its Antioxidant Activity. *Curr Biochem*. 2016;3(3):116–27.
- [4] KBM. Ensiklopedi Singkong: Deskripsi, Filosofi, Manfaat, Budidaya, dan Peluang Bisnisnya. Bantul: KBM Indonesia; 2020.
- [5] Hanani E. Analisis Fitokimia. Jakarta: Buku Kedokteran EGC; 2015.
- [6] Rukmana H. Usaha Tani Cabai Rawit. 1st ed. Yogyakarta: Kanisius; 2002.
- [7] Tanamal MT, Papilaya PM, Smith A. Kandungan Senyawa Flavonoid pada Daun Melinjo (*Gnetum gnemon* L.) Berdasarkan Perbedaan Tempat Tumbuh. 2017;3:142–7.
- [8] Fatchurrozaq, Suranto, Sugiyanto. Pengaruh Ketinggian Tempat Terhadap Kandungan Vitamin C dan Zat Antioksidan pada Buah *Carica pubescens* di Dataran Tinggi Dieng. *El-Vivo*. 2013;1(1):24–31.
- [9] Jamrógiewicz M. Application of the near-infrared spectroscopy in the pharmaceutical technology. *J Pharm Biomed Anal*. 2012;66:1–10.
- [10] Ozaki Y. Near-Infrared Spectroscopy—Its Versatility in Analytical. *Anal Chem*. 2012;28(June):545–62.
- [11] Rohman A. Statistika dan Kemometrika Dasar dalam Analisis Farmasi. 1st ed. Yogyakarta: Pustaka Pelajar; 2014.
- [12] Roggo Y, Chalou P, Maurer L, Lema-Martinez C, Edmond A, Jent N. A review of near infrared spectroscopy and chemometrics in pharmaceutical technologies. *J Pharm Biomed Anal*. 2007;44(3 SPEC. ISS.):683–700.
- [13] Depkes RI. *Materia Medika Indonesia Jilid VI*. Jakarta: Departemen Kesehatan Republik Indonesia; 1995.
- [14] Chang C, Yang M, Wen H, Chern J. Estimation of Total Flavonoid Content in Propolis by Two Complementary Colorimetric Methods. *J Food Drug Anal*. 2002;10(3):178–82.
- [15] Permadi A, Sutanto, Sri W. Perbandingan Metode Ekstraksi Bertingkat dan Tidak Bertingkat Terhadap Flavonoid Total Herba Ciplukan (*Physalis angukata* L.) Secara Kolorimetri. *J Online Mhs Bid Farm*. 2015;1(1):1–10.
- [16] Rukmana KQ. Penetapan Kadar Flavonoid Total dan Penentuan Model Klasifikasi Serbuk Jahe Gajah (*Z. officinale* var. *officinale*) dari Daerah Ketinggian Berbeda dengan Metode Spektroskopi NIR-Kemometrik. Skripsi. Digital Repository Universitas Jember. Jember University; 2020. 1–76 p.
- [17] Harmita. Petunjuk Pelaksanaan Validasi Metode dan Cara Perhitungannya. *Maj Ilmu Kefarmasian*. 2004;1(3):117–35.
- [18] Soriano-disla JM, Janik LJ, Rossel RAV, Macdonald LM, McLaughlin MJ. The Performance of Visible, Near-, and Mid-Infrared Reflectance Spectroscopy for Prediction of Soil Physical, Chemical, and Biological Properties. *Taylor Fr Gr*. 2014;37–41.
- [19] Sholekah FF. Perbedaan Ketinggian Tempat Terhadap Kandungan Flavonoid Dan Beta Karoten Buah Karika (*Carica pubescens*) Daerah Dieng Wonosobo. *Pros Semin Nas Pendidik Biol dan Biol*. 2017;75–82.
- [20] Rais IR. Isolasi dan Penentuan Kadar Flavonoid Ekstrak Etanolik Herba Sambiloto. *Pharmaciana*. 2015;5:100–6.
- [21] Wulandari L, Idroes R, Rizky TR, Indrayanto G. Application of chemometrics using direct spectroscopic methods as a QC tool in pharmaceutical industry and their validation [Internet]. 1st ed. Profiles of Drug Substances, Excipients, and Related Methodology. Elsevier Inc.; 2021. 1–53 p.
- [22] Berrar D. Cross-Validation. In: *Encyclopedia of Bioinformatics and Computational Biology*. Elsevier Inc.; 2018. p. 1–4.