

BAB IV

HASIL DAN PEMBAHASAN

A. Hasil

1. Determinasi tanaman

Daun kupu kupu (*Bauhinia purpurea* L.) yang digunakan sebagai sampel dalam penelitian ini diambil dari Desa Ngawu, Kecamatan Playen, Gunung Kidul, Yogyakarta pada bulan April 2021. Identifikasi tanaman dilakukan di Laboratorium Sistematika Tumbuhan, Fakultas Biologi Universitas Gadjah Mada Yogyakarta dengan nomor pendaftaran 014988/S.Tb./III/2021. Hasil identifikasi tanaman bisa dilihat pada (lampiran 1).

2. Pembuatan ekstrak

Sampel daun kupu-kupu (*Bauhinia purpurea* L.) yang telah diperoleh \pm 3 kg disortasi basah. Tujuan dilakukan sortasi basah yaitu untuk membersihkan kotoran ataupun bahan asing lainnya yang menempel pada tumbuhan dan dibuang bagian tumbuhan yang tidak diperlukan. Kemudian dicuci dengan air mengalir lalu dipotong-potong dengan tujuan untuk menghilangkan pengotor lainnya yang menempel dan pemotongan daun kupu-kupu dilakukan untuk memudahkan proses pengeringan. Daun kupu-kupu tersebut selanjutnya dikeringkan dengan menggunakan oven pada suhu 60° C. Tujuan pengeringan ini dilakukan untuk mengurangi kandungan air yang terdapat dalam daun kupu-kupu karena jamur dan mikroorganisme lain mudah tumbuh jika masih terdapat kandungan air dalam simplisia. Simplisia kering kemudian dibuat dalam bentuk serbuk dengan menggunakan alat penyerbuk (*grinder*) dengan tujuan untuk memudahkan proses pemisahan/penarikan zat aktif oleh pelarut yang terdapat dalam sel tumbuhan dan selanjutnya diayak menggunakan ayakan nomor 40 mesh.

Hasil serbuk sampel daun kupu-kupu (*Bauhinia purpurea* L.) kemudian diekstraksi dengan menggunakan pelarut etanol 70%. Ekstrak etanol daun kupu-kupu dalam penelitian ini diekstraksi dengan menggunakan metode

maserasi. Proses maserasi dilakukan dengan cara merendam 300 g serbuk daun kupu-kupu dalam etanol 70% sebanyak 3 liter selama 3 hari pada temperatur kamar dan dilanjutkan dengan proses remaserasi selama 2 hari dengan jumlah pelarut yang sama saat maserasi.

Selanjutnya filtrat dari proses maserasi dan remaserasi dikumpulkan kemudian disaring dengan corong *Buchner* yang di dalamnya diletakkan kertas saring dan dengan menggunakan pompa vakum dengan tujuan menghilangkan serbuk yang mungkin belum tersaring dengan sempurna. Hasil penyaringan filtrat kemudian dikentalkan dengan pemanasan pada suhu di bawah 60° C.

3. Perhitungan rendemen ekstrak, bobot jenis, dan kadar lembab

a. Perhitungan rendemen ekstrak

Pada penelitian ini, ekstrak kental daun kupu-kupu yang diperoleh yaitu sebanyak 68,65 g. Rendemen ekstrak kental yang diperoleh dihitung sebagai persentase perbandingan antara berat ekstrak kental yang diperoleh terhadap berat serbuk daun kupu-kupu yang digunakan pada saat proses maserasi yaitu 300 g dengan menggunakan persamaan :

$$\% \text{Rendemen} = \frac{\text{Bobot ekstrak}}{\text{Bobot sampel}} \times 100\%$$

Berdasarkan persamaan tersebut, sehingga rendemen ekstrak kental daun kupu-kupu yang diperoleh yaitu sebesar 22,88%. Hasil rendemen ekstrak daun kupu-kupu yang diperoleh memenuhi nilai yang dipersyaratkan Farmakope Herbal Indonesia (FHI) yaitu tidak kurang dari 7,2% (DepKes RI, 2008).

b. Penentuan bobot jenis dan kadar lembab

Pada penentuan bobot jenis ekstrak, dilakukan pada suhu 25° C dengan cara menimbang piknometer kosong (W_0) diperoleh 32,083 g. Kemudian piknometer diisi penuh dengan air dan ditimbang (W_1) diperoleh 57,3648 g. Sehingga kerapatan air dapat ditentukan. Kemudian piknometer dikosongkan dan diisi penuh dengan ekstrak cair 5% (W_2), lalu ditimbang dan diperoleh hasil 53,1225 g. Rumus penetapan bobot jenis yaitu sebagai berikut.

$$\text{Bobot jenis } (\rho) = \frac{W_2 - W_0}{W_1 - W_0}$$

Berdasarkan persamaan tersebut, hasil penentuan bobot jenis yang diperoleh dalam ekstrak daun kupu-kupu dalam penelitian ini diperoleh hasil 0,832 g/mL.

Kemudian dilakukan penetapan kadar lembab atau kadar air dalam ekstrak daun kupu-kupu. Penentuan kadar lembab dalam penelitian ini menggunakan alat *moisture content balance* dan diperoleh hasil yaitu 5%. Hasil penetapan kadar lembab tersebut memenuhi standar FHI, yaitu tidak lebih dari 10%.

4. Identifikasi ekstrak dan uji organoleptik

Identifikasi ekstrak dilakukan dengan tujuan memberikan objektivitas dari nama maupun spesifikasi dari tanaman bunga kupu-kupu. Sedangkan uji pengamatan organoleptik terhadap ekstrak dilakukan dengan tujuan untuk memberikan pengenalan awal yang menggunakan alat indera secara objektif dengan mendeskripsikan tekstur, warna, bau dan rasa (DepKes RI, 2000).

Tabel 2. Hasil pengujian identifikasi ekstrak dan pengamatan organoleptik

Parameter	Hasil
Identitas ekstrak	
Nama ekstrak	Ekstrak larut etanol daun kupu-kupu
Nama latin tanaman	<i>Bauhinia purpurea</i>
Bagian tanaman yang digunakan	Daun
Nama tanaman Indonesia	Tanaman bunga kupu-kupu
Uji organoleptik ekstrak	
Warna	Hijau tua kehitaman
Bau	Khas
Bentuk	Kental, lengket
Rasa	Hambar

5. Penapisan fitokimia

Tujuan dilakukan uji penapisan fitokimia adalah untuk mengetahui keberadaan senyawa metabolit sekunder yaitu akoloid, flavonoid, saponin, fenolik dan tanin dari ekstrak larut etanol daun kupu-kupu. Pada uji ini, hasil

yang diperoleh menunjukkan bahwa ekstrak larut etanol daun kupu-kupu positif/terdeteksi mengandung senyawa fenolik, flavonoid, tanin, dan saponin, serta diperoleh hasil negatif/tidak terdeteksi untuk identifikasi senyawa alkaloid.

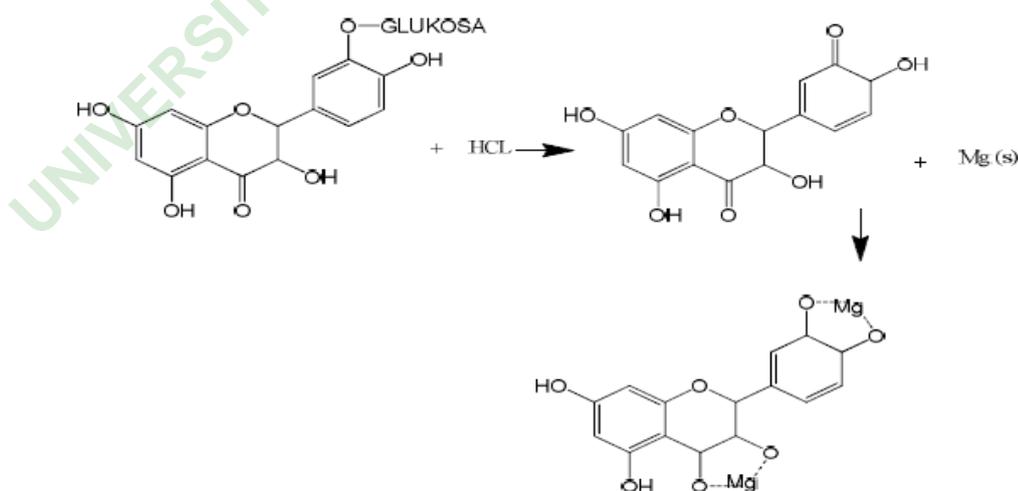
Tabel 3. Hasil uji penapisan fitokimia ekstrak larut etanol daun kupu-kupu

Identifikasi	Hasil	Keterangan
Alkaloid Wagner	negatif	Hasil positif jika terbentuk endapan coklat
Mayer	negatif	Hasil positif jika terbentuk endapan putih
Dragendorf	negatif	Hasil positif jika terbentuk endapan jingga
Flavonoid	positif	Hasil positif jika terbentuk larutan berwarna merah, kuning atau jingga
Saponin	Positif	Hasil positif jika terbentuk busa
Tanin	Positif	Hasil positif jika terbentuk larutan berwarna biru kehitaman
Fenolik	positif	Hasil positif jika terbentuk larutan berwarna hijau kehitaman

Keterangan : (+) positif : mengandung golongan senyawa

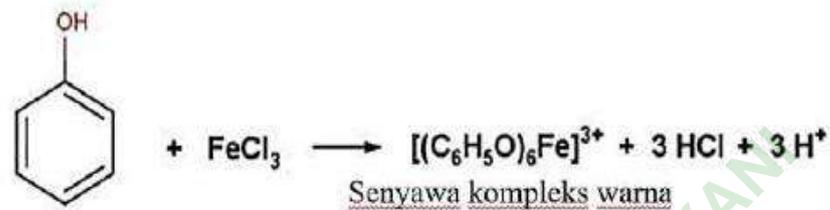
(-) negatif : tidak mengandung golongan senyawa

Pada identifikasi senyawa flavonoid, ekstrak ditambahkan dengan serbuk magnesium dan HCl pekat yang berfungsi untuk menghidrolisis O-glikosil. Terbentuk warna menjadi merah/kuning/jingga untuk menandakan bahwa terdapat kandungan flavonoid. Hasil yang didapatkan dalam penelitian ini yaitu positif mengandung flavonoid.



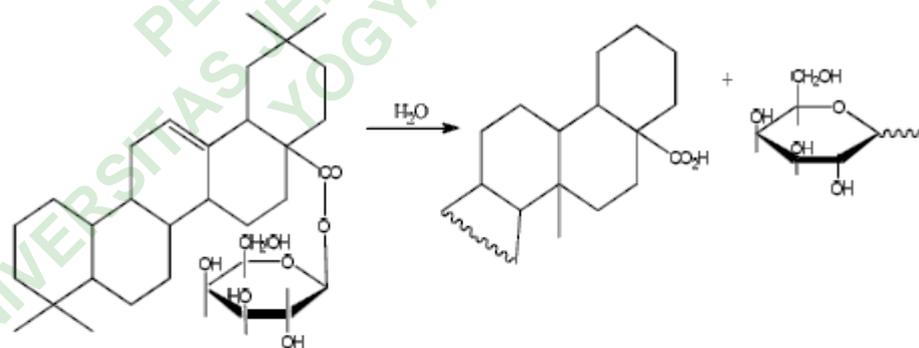
Gambar 11. Reaksi senyawa flavonoid dengan Mg dan HCl (Nugrahani et al., 2016).

Untuk identifikasi senyawa tanin dan fenolik, ekstrak direaksikan dengan FeCl_3 . Hasil yang didapat yaitu ekstrak larut etanol daun kupu-kupu mengandung tanin yang ditandai dengan terbentuknya warna biru kehitaman dan mengandung fenolik dengan terbentuknya warna hijau kehitaman.



Gambar 12. Reaksi senyawa fenol dengan FeCl_3 (Nugrahani et al., 2016).

Kemudian pada identifikasi senyawa saponin, sejumlah ekstrak ditambahkan dengan 5 mL air panas dan dikocok secara vertikal selama 10 detik. Hasil yang didapatkan dalam penelitian ini yaitu, ekstrak larut etanol daun kupu-kupu mengandung saponin yang ditandai dengan terbentuknya busa setinggi ± 1 cm dan tidak hilang setelah penambahan HCl 1%.



Gambar 13. Reaksi pembentukan buih pada uji saponin (Nugrahani et al., 2016).

Timbulnya buih menunjukkan adanya glikosida yang mempunyai kemampuan membentuk buih dalam air yang terhidrolisis menjadi glukosa dan senyawa lainnya.

Sedangkan pada uji senyawa alkaloid dengan menggunakan pereaksi dragendrof, mayer, dan wagner diperoleh hasil negatif (tidak terdeteksi) atau

tidak mengandung alkaloid. Hasil ini dikarenakan senyawa alkaloid yang terdapat dalam ekstrak hanya sedikit sehingga tidak dapat terdeteksi.

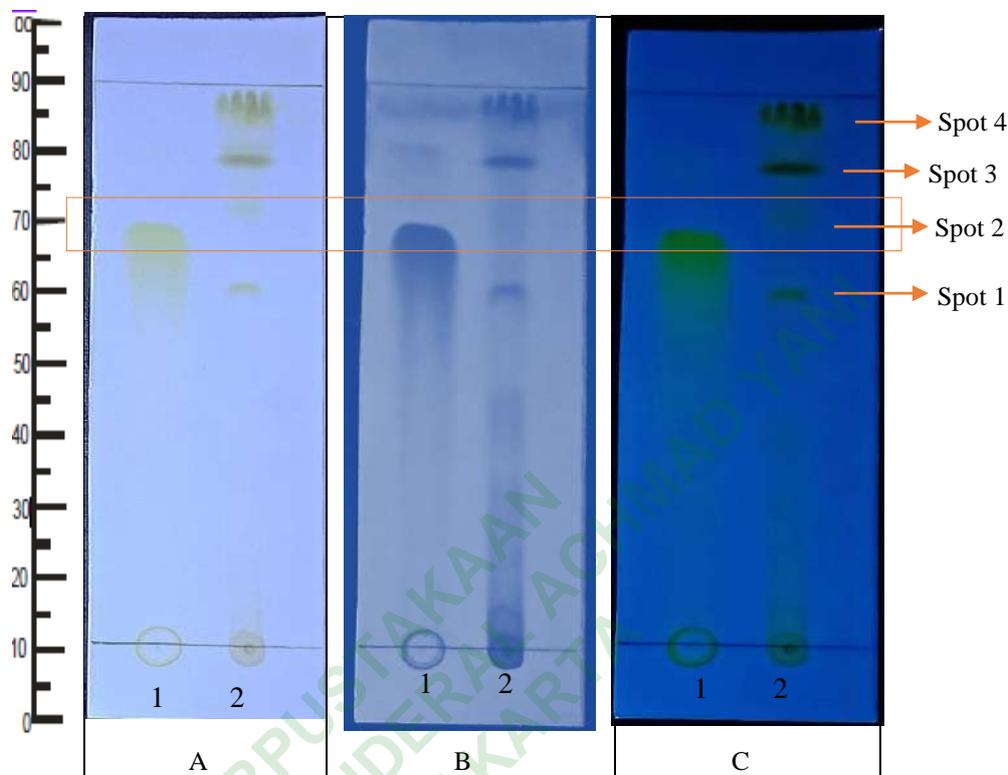
6. Kromatografi Lapis Tipis (KLT)

Identifikasi senyawa penanda yang terkandung dalam ekstrak larut etanol daun kupu-kupu dilakukan secara kualitatif. Metode yang digunakan dalam penelitian ini untuk analisis senyawa penanda dalam ekstrak ini yaitu menggunakan metode KLT (Kromatografi Lapis Tipis). Bagian-bagian yang digunakan untuk KLT antara lain, fase gerak, fase diam, dan *developing chamber*. Fase diam dapat berupa plastik, kaca ataupun *aluminium foil* yang dilapisi dengan absorben silika aluminium oksida dan selulosa. Sedangkan fase gerak yaitu suatu pelarut atau campuran dari beberapa pelarut atau solvent serta *developing chamber* yang berfungsi sebagai tempat elusi berlangsung. Pemisahan metode ini berdasarkan prinsip *like dissolve like*, yaitu didasarkan pada tingkat kepolaran analit yang dapat mempengaruhi interaksinya dengan fase diam dan fase gerak. Jika kepolaran analit sama dengan kepolaran fase gerak, maka analit akan larut dan terbawa oleh fase gerak pada permukaan fase diam. Jika interaksi analit dengan fase gerak semakin kuat, semakin jauh pula analit akan terelusi. Sebaliknya, jika kepolaran analit sama dengan fase diam, maka analit akan tertahan oleh fase diam (Lade, et al., 2014). Metode KLT yang digunakan dalam penelitian ini yaitu secara kualitatif yang bertujuan untuk mengetahui ada tidaknya senyawa penanda dalam ekstrak larut etanol daun kupu-kupu. Senyawa penanda dalam ekstrak yang diidentifikasi pada penelitian ini yaitu kuersetin. Pada uji KLT ini, dilakukan optimasi terlebih dahulu untuk menentukan fase gerak yang dapat digunakan dalam memisahkan senyawa dalam sampel. Berikut beberapa fase gerak yang dilakukan optimasi.

Tabel 4. Hasil optimasi fase gerak pada uji KLT

No	Fase gerak	Hasil
1	Toluena:Aceton:Asam Format (4:4:2 v/v)	Terjadi tailing
2	Petroleum eter:etil asetat (4:6 v/v)	Tidak terjadi pemisahan pada sampel
3	Kloroform:Metanol (9:1)	Terjadi pemisahan yang sempurna

Hasil uji KLT ekstrak larut etanol daun kupu-kupu dengan fase gerak kloroform:metanol (9:1 v/v) dapat dilihat pada (gambar 14) berikut.



Gambar 14. Hasil analisis KLT secara kualitatif ekstrak larut etanol daun kupu-kupu dengan fase diam silika gel GF254 dan fase gerak kloroform-metanol (9;1 v/v).

Keterangan :

- 1 : standar kuersetin
- 2 : ekstrak etanol daun kupu-kupu
- A : visualisasi sinar tampak
- B : deteksi UV 254
- C : deteksi UV 366

Preparasi ekstrak kental daun kupu-kupu dilakukan dengan cara melarutkan 50 mg ekstrak kental daun kupu-kupu dalam 1 mL metanol (5%) kemudian dihomogenkan dengan menggunakan vortex selama 5 menit. Ekstrak cair tersebut selanjutnya ditotolkan pada fase diam silika gel GF254 menggunakan *white tip*. Sebelumnya fase diam silika gel diaktifkan pada oven dengan suhu 100°C selama 15 menit yang bertujuan untuk menghilangkan pengotor dan air yang masih terdapat dalam plat KLT. Kemudian plat KLT

dielusikan pada fase gerak (kloroform-metanol) yang telah dijenuhkan sebelumnya di dalam *chamber*. Tujuan penjenuhan fase gerak di sini yaitu untuk menyamakan tekanan uap yang terjadi pada fase gerak yang digunakan sehingga pemisahan komponen senyawa dapat berjalan dengan baik.

Berdasarkan hasil KLT di atas, dapat diketahui bahwa ekstrak larut etanol daun kupu-kupu (*Bauhinia purpurea* L.) yang digunakan dalam penelitian ini mengandung kuersetin. Deteksi adanya senyawa kuersetin ditandai dengan nilai Rf (*retardation factor*) yang sama pada sampel dan kuersetin standar yang dilihat pada UV 254 dan 366 nm. Berikut hasil perhitungan Rf dari setiap bercak pada KLT.

Tabel 5. Hasil perhitungan nilai Rf KLT ekstrak larut etanol daun kupu-kupu

Sampel	Nilai Rf		
	Ekstrak sampel	Standar kuersetin	Standar kuersetin literatur
Spot 1	0,66	0,725	0,70
Spot 2	0,76		
Spot 3	0,875		
Spot 4	0,975		

Berdasarkan tabel hasil analisis KLT secara kualitatif tersebut, setelah sampel dan standar kuersetin dielusi pada fase gerak, terlihat bahwa pada ekstrak etanol daun kupu-kupu terdapat bercak yang memiliki nilai Rf yang sama dengan nilai Rf kuersetin standar yaitu 0,7.

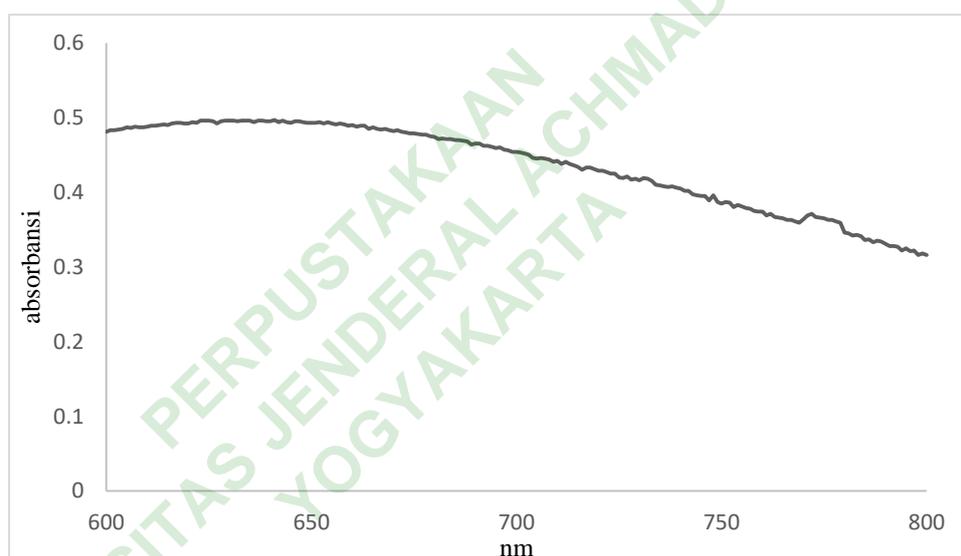
7. Penetapan kadar total fenolik

a. Penentuan panjang gelombang maksimum asam galat (nm)

Panjang gelombang maksimum adalah panjang gelombang yang pada saat pengukuran mampu memberikan nilai absorbansi maksimum. Untuk analisis kuantitatif, panjang gelombang yang digunakan yaitu panjang gelombang yang memiliki nilai absorbansi yang paling besar. Panjang gelombang maksimum ditetapkan dengan membuat kurva hubungan antara absorbansi dengan panjang gelombang dari suatu larutan pada konsentrasi tertentu (Gandjar & Rohman, 2007). Penentuan panjang gelombang maksimum asam galat dengan cara melakukan *scanning* panjang gelombang pada rentang 600-800 nm. Alasan pemilihan panjang

gelombang pada rentang tersebut berdasarkan pada panjang gelombang yang didapat pada penelitian sebelumnya dengan reaksi yang sama yaitu 760 nm (Blainski et al., 2013).

Pengukuran panjang gelombang maksimum asam galat dengan konsentrasi 200 $\mu\text{g/mL}$ dilakukan setelah penambahan reagen Folin-Ciocalteu dan larutan natrium karbonat 7%. Hasil yang diperoleh menghasilkan panjang gelombang maksimum 641 nm yang diukur dengan menggunakan spektrofotometri UV-Vis seperti yang dapat dilihat pada (gambar 15) berikut.



Gambar 15. Kurva panjang gelombang maksimum asam galat.

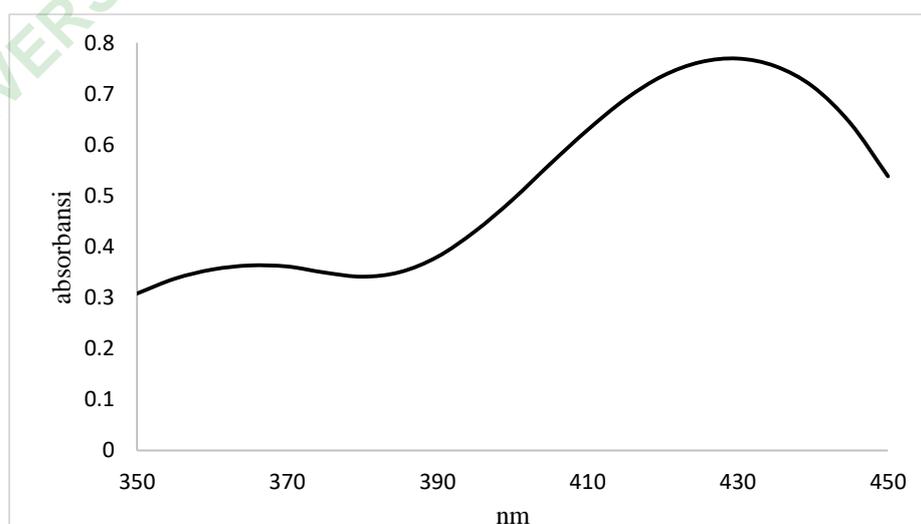
b. Penentuan *operating time (OT)* asam galat

Tujuan dilakukan *operating time (OT)* yaitu untuk menentukan waktu pengukuran pada saat larutan telah selesai bereaksi atau reaksi telah berjalan dengan sempurna yang ditandai dengan nilai absorbansi yang stabil, sehingga dapat memaksimalkan pengukuran. Penentuan *operating time* untuk metode Folin-Ciocalteu didapatkan dengan cara mereaksikan larutan asam galat dengan pereaksi Folin-Ciocalteu dan natrium karbonat kemudian diukur absorbansinya pada panjang gelombang maksimum yang telah diperoleh yaitu 641 nm. Penentuan OT dilihat dari nilai absorbansi yang

stabil selama atau saat pengukuran nilai absorbansi. Kestabilan nilai absorbansi selama pengukuran menandakan pembentukan senyawa molybdenum-tungsten yang ditandai dengan larutan yang berwarna biru. Hasil penentuan *operating time* larutan standar asam galat yang diperoleh yaitu 2 jam.

8. Penetapan kadar total flavonoid
 - a. Penetapan panjang gelombang kuersetin

Panjang gelombang maksimum adalah panjang gelombang yang pada saat pengukuran mampu memberikan nilai absorbansi maksimum atau yang paling tinggi. Panjang gelombang maksimum ditetapkan dengan membuat kurva hubungan antara absorbansi dengan panjang gelombang dari suatu larutan pada konsentrasi tertentu. Tahap ini dilakukan dengan tujuan untuk mengurangi terjadinya kesalahan dalam pembacaan serapan panjang gelombang. *Scanning* panjang gelombang kuersetin dilakukan dengan menggunakan larutan stok kuersetin 100 ppm yang telah direaksikan dengan $AlCl_3$ dan asam asetat 5% pada rentang panjang gelombang 350-450 nm. Hasil penentuan panjang gelombang maksimum kuersetin yang diperoleh menghasilkan panjang gelombang maksimum 430 nm yang diukur dengan menggunakan spektrofotometri UV Vis, seperti yang dapat dilihat pada (gambar 16) berikut.



Gambar 16. Kurva panjang gelombang maksimum kuersetin.

b. Penentuan *operating time* (OT) kuersetin

Tujuan dilakukan *operating time* (OT) yaitu untuk menentukan waktu pengukuran pada saat larutan telah selesai bereaksi atau reaksi telah berjalan dengan sempurna yang ditandai dengan nilai absorbansi yang stabil, sehingga dapat memaksimalkan pengukuran. Kestabilan senyawa produk diketahui dengan cara mengamati absorbansi dari awal direaksikan sampai tercapai nilai serapan yang stabil. Pada penelitian ini, senyawa yang diukur absorbansinya merupakan suatu senyawa kompleks antara kuersetin dengan AlCl_3 . Senyawa kompleks ini membutuhkan waktu agar reaksi yang terbentuk stabil. Jika pengukuran absorbansi dilakukan setelah waktu *operating time*, maka terjadi kemungkinan bahwa senyawa kompleks antara kuersetin dan AlCl_3 menjadi rusak (Indrayani, 2008). Penentuan *operating time* kuersetin dilakukan dengan menggunakan larutan stok kuersetin 100 ppm yang telah direaksikan dengan AlCl_3 dan asam asetat lalu diukur pada spektrofotometer. Hasil penentuan *operating time* larutan standar kuersetin yang diperoleh yaitu 10 menit.

9. Penetapan kadar total fenolik dan total flavonoid ekstrak etanol daun kupu-kupu

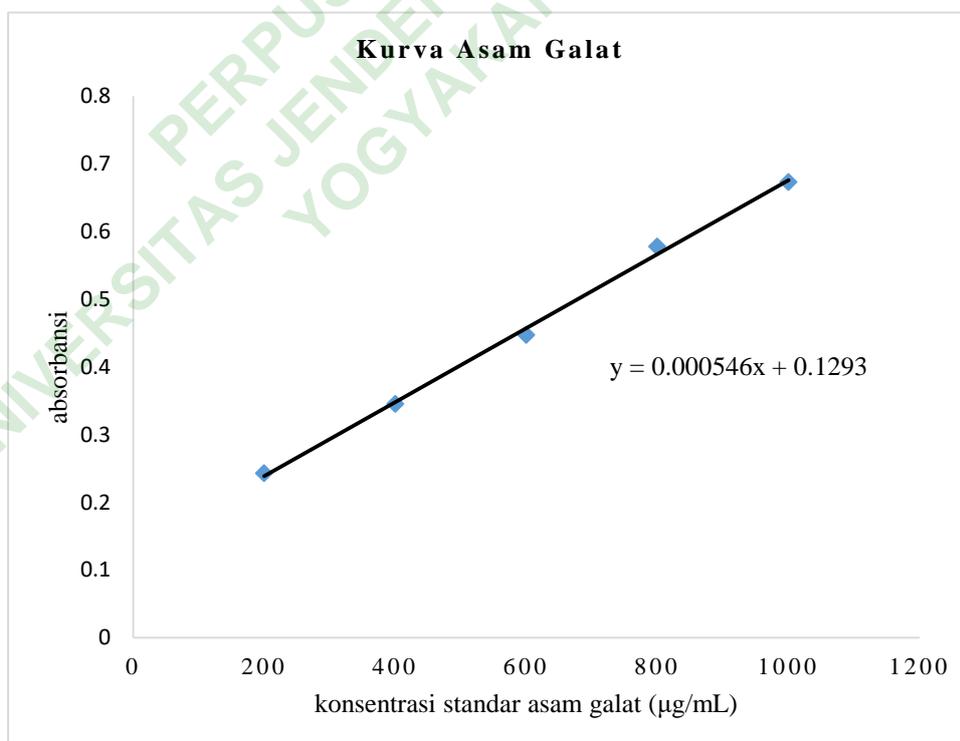
Panjang gelombang dan OT yang telah diperoleh digunakan untuk membuat kurva kalibrasi asam galat dengan menggunakan lima seri konsentrasi yaitu 200; 400; 600; 800; dan 1000 $\mu\text{g/mL}$ yang diukur absorbansinya pada panjang gelombang 641 nm dengan menggunakan metanol sebagai blanko. Setiap konsentrasi dari larutan standar asam galat diambil sebanyak 0,1 mL dan ditambahkan dengan 0,1 mL reagen Folin-Ciocalteu lalu didiamkan selama 4 menit. Kemudian ditambahkan 1 mL Na_2CO_3 7% dan dikocok hingga homogen dan dicukupkan dengan aquabidest 5 mL lalu diinkubasi selama 2 jam pada suhu ruangan.

Pada penelitian ini, penggunaan asam galat sebagai standar dalam penetapan kadar total fenolik karena asam galat termasuk fenolik alami dan stabil serta termasuk dalam senyawa fenolik turunan asam hidroksibenzoat yang tergolong dalam asam fenolik sederhana. Sehingga total fenolik yang ditetapkan baik dalam ekstrak etanol daun kupu-kupu dihitung sebagai asam galat. Metode

pengujian penetapan kadar total fenolik dilakukan dengan mereaksikan sampel dengan pereaksi Folin-Ciocalteu yang kemudian diukur dengan menggunakan spektrofotometer UV-Vis. Senyawa fenolik akan bereaksi dengan reagen Folin-Ciocalteu membentuk suatu kompleks molybdenum-tungsten yang berwarna biru yang intensitasnya sama dengan konsentrasi senyawa fenolik yang terdapat di dalam sampel. Kandungan fenolik didasarkan pada kurva absorbansi dari larutan standar asam galat. Hasil kurva kalibrasi asam galat untuk penentuan kadar total fenolik dapat dilihat pada (gambar 17) berikut.

Tabel 6. Absorbansi kurva kalibrasi asam galat

Konsentrasi ($\mu\text{g/mL}$)	Absorbansi			
	1	2	3	Rata-rata
200	0,266	0,237	0,225	$0,243 \pm 0,021079$
400	0,357	0,356	0,321	$0,345 \pm 0,020502$
600	0,462	0,464	0,416	$0,447 \pm 0,027154$
800	0,599	0,570	0,565	$0,578 \pm 0,018358$
1000	0,682	0,658	0,680	$0,673 \pm 0,013317$



Gambar 17. Kurva kalibrasi konsentrasi asam galat ($\mu\text{g/mL}$) terhadap absorbansi untuk penentuan kadar fenolik total.

Berdasarkan kurva kalibrasi di atas, hasil persamaan regresi linier antara konsentrasi asam galat standar terhadap absorbansi yang diperoleh yaitu $y = 0,000546x + 0,1293$ dengan nilai $r = 0,9988$. Persamaan regresi linier yang diperoleh tersebut kemudian digunakan untuk menghitung nilai kadar total fenolik yang terkandung dalam ekstrak larut etanol daun kupu-kupu yang dinyatakan atau dihitung sebagai asam galat. Hasil penetapan kadar total fenolik yang diperoleh dalam ekstrak larut etanol daun kupu-kupu yaitu sebesar $1,85 \pm 0,12 \%$

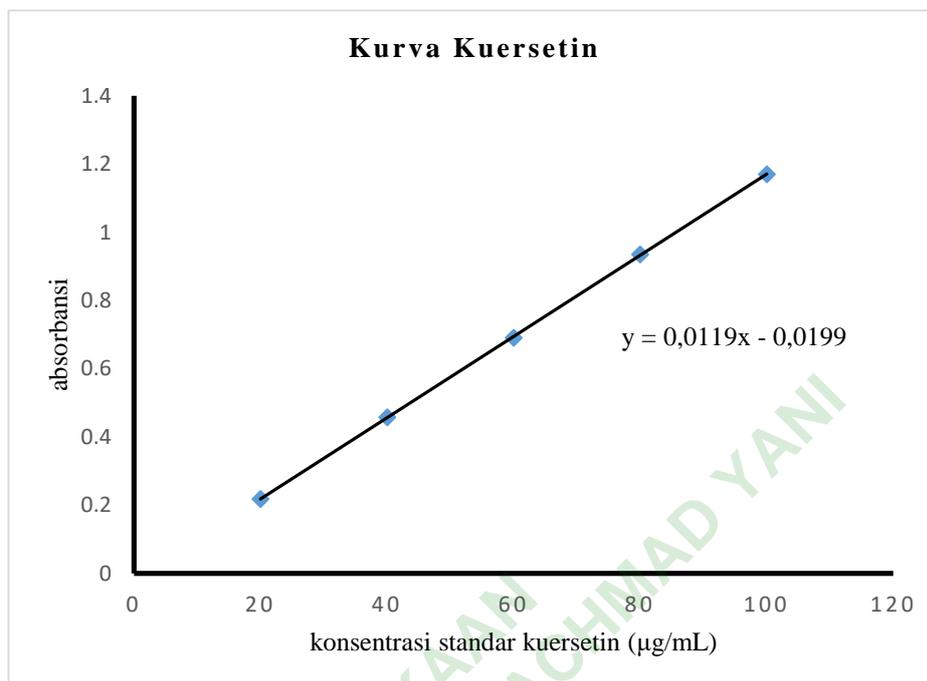
Tabel 7. Hasil perhitungan kadar total fenolik

Absorbansi	Kadar terhitung ($\mu\text{g/mL}$)	Kadar total fenolik (% b/b)
0,318	345,604	1,85
0,349	402,381	
0,333	373,077	
0,325	358,425	

Pada penentuan kadar total flavonoid, panjang gelombang dan OT yang telah diperoleh selanjutnya digunakan untuk membuat kurva kalibrasi kuersetin dengan menggunakan lima seri konsentrasi yaitu 20; 40; 60; 80; dan 100 $\mu\text{g/mL}$ yang diukur absorbansinya pada panjang gelombang maksimum yaitu 430 nm dengan menggunakan etanol sebagai blanko. Setiap konsentrasi larutan kuersetin diambil sebanyak 1 mL dan ditambahkan dengan 1 mL aluminium klorida (AlCl_3) kemudian ditambahkan dengan asam asetat 5% sebanyak 8 mL lalu diinkubasi selama waktu OT yang telah diperoleh yaitu 10 menit pada suhu ruangan. Kandungan flavonoid didasarkan pada kurva absorbansi dari larutan standar kuersetin. Hasil kurva kalibrasi kuersetin untuk penentuan kadar total flavonoid dapat dilihat pada (gambar 18) berikut.

Tabel 8. Absorbansi kurva kalibrasi kuersetin

Konsentrasi ($\mu\text{g/mL}$)	Absorbansi			
	1	2	3	Rata-rata
20	0,224	0,198	0,233	$0,218 \pm 0,018175$
40	0,465	0,423	0,487	$0,458 \pm 0,032517$
60	0,676	0,687	0,710	$0,691 \pm 0,017349$
80	0,939	0,960	0,907	$0,935 \pm 0,02669$
100	1,151	1,243	1,117	$1,170 \pm 0,065187$



Gambar 18. Kurva kalibrasi konsentrasi kuersetin ($\mu\text{g/mL}$) terhadap absorbansi untuk penentuan kadar flavonoid total.

Berdasarkan kurva kalibrasi di atas, hasil persamaan regresi linier antara konsentrasi kuersetin standar terhadap absorbansi yang diperoleh yaitu $y = 0,0119x - 0,0199$ dengan nilai $r = 0,9999$. Persamaan regresi linier yang diperoleh tersebut kemudian digunakan untuk menghitung nilai kadar total flavonoid yang terkandung dalam ekstrak larut etanol daun kupu-kupu. Hasil penetapan kadar total flavonoid yang diperoleh dalam ekstrak larut etanol daun kupu-kupu yaitu sebesar $0,93 \pm 0,06 \%$.

Tabel 9. Hasil perhitungan kadar total flavonoid

Absorbansi	Kadar terhitung ($\mu\text{g/mL}$)	Kadar total flavonoid (% b/b)
0,395	34,865	0,93
0,464	40,664	
0,426	37,471	
0,406	35,789	

B. Pembahasan

Penelitian ini termasuk dalam jenis penelitian yang bersifat eksperimental yang bertujuan untuk mengetahui kadar total fenolik dan total flavonoid ekstrak larut etanol daun kupu-kupu (*Bauhinia purpurea* L.). Tanaman ini banyak ditanam di Indonesia sebagai tanaman hias yang memiliki aktivitas farmakologis, seperti antioksidan, hipoglikemik, hepatoprotektif, dan antiproliferatif serta antimikroba (Shajiselvin et al., 2011). Berdasarkan penelitian sebelumnya yang dilakukan oleh Aryantini (2021), telah dilakukan penelitian tentang aktivitas antioksidan dan penetapan kandungan tanin total yang terdapat dalam daun kupu-kupu. Pada penelitian tersebut hanya sampai pada penetapan kandungan total tanin dan aktivitas antioksidannya, namun belum sampai pada identifikasi golongan senyawa antioksidan lain yang terkandung dalam sampel yaitu senyawa fenolik dan flavonoid, sehingga dalam penelitian ini dilakukan identifikasi total senyawa fenolik dan total flavonoid dengan menggunakan spektrofotometri.

Bahan daun kupu-kupu (*Bauhinia purpurea* L.) yang digunakan sebagai sampel dalam penelitian ini diperoleh dari Desa Ngawu, Kecamatan Playen, Kabupaten Gunung Kidul, Yogyakarta pada bulan April 2021. Daun tanaman bunga kupu-kupu yang digunakan dalam penelitian ini adalah daun muda karena menurut penelitian yang dilakukan oleh Nasution & Ardhiyati (2019), bahwa total fenolik dan total flavonoid lebih tinggi kandungannya dalam ekstrak etanol daun muda segar dibandingkan dengan daun tua. Pengambilan daun muda pada tanaman dilakukan dengan cara diambil pada urutan ke-2 sampai 4 daun dari pucuk tanaman *Bauhinia purpurea* L.

Sampel daun kupu-kupu yang telah dipanen dikeringkan terlebih dahulu dengan menggunakan oven pada suhu 60° C sampai diperoleh simplisia kering yang mana ditandai dengan simplisia tersebut mudah dihancurkan atau dipatahkan. Tujuan pengeringan ini dilakukan untuk mengurangi kandungan air yang terdapat dalam simplisia karena air dapat menjadi media tumbuhnya jamur dan mikroorganisme lain. Simplisia kering tersebut kemudian dibuat dalam bentuk serbuk dengan menggunakan alat penyerbuk dengan tujuan untuk memudahkan proses

pemisahan/penarikan zat aktif oleh pelarut yang terdapat dalam sel tumbuhan tersebut. Selain itu, bentuk serbuk ini dapat membuat luas kontak antara permukaan jaringan sel dengan pelarut akan semakin besar, sehingga memudahkan proses penyarian. Hasil serbuk sampel daun kupu-kupu (*Bauinia purpurea* L.) selanjutnya diekstraksi dengan menggunakan pelarut etanol 70%. Ekstrak etanol daun kupu-kupu dalam penelitian ini diekstraksi dengan menggunakan metode maserasi.

Proses maserasi dilakukan dengan menggunakan pelarut etanol 70% sebanyak 3 liter selama 3 hari pada temperatur kamar lalu dilanjutkan dengan proses remaserasi selama 2 hari dengan tujuan untuk memaksimalkan proses penyarian terhadap senyawa-senyawa aktif yang mungkin belum tersaring, sehingga dapat menarik senyawa aktif secara total dan memperoleh ekstrak yang lebih banyak. Selama proses maserasi digunakan wadah kaca tertutup yang dibungkus dengan kertas dan disimpan di tempat gelap untuk mencegah kerusakan senyawa akibat sinar matahari langsung dan selama proses maserasi berlangsung, dilakukan pengadukan beberapa kali dengan tujuan mempercepat terjadinya keadaan setimbang dan tidak cepat jenuh sehingga proses penarikan senyawa dari serbuk daun kupu-kupu oleh pelarut menjadi lebih optimal. Alasan memilih metode maserasi yaitu karena metode ini mudah dan tidak perlu pemanasan sehingga kecil kemungkinan senyawa aktif dalam sampel menjadi rusak atau terurai, karena umumnya kandungan zat aktif yang ada di dalam tanaman tidak tahan terhadap pemanasan sehingga lebih dipilih ekstraksi cara dingin yang tidak merusak sampel. Selain itu, pengerjaan metode maserasi yang lama dan keadaan diam selama maserasi memungkinkan penarikan senyawa yang lebih banyak (Istiqomah, 2013). Pemilihan etanol sebagai pelarut karena etanol merupakan pelarut universal yang mampu menarik senyawa-senyawa yang larut dalam pelarut non polar hingga polar dan terkait dengan sifat etanol yang tidak beracun, netral, mudah menarik keluar senyawa aktif dalam sel dan memiliki indeks polaritas sebesar 5,2 serta titik didih etanol yang relatif rendah sehingga mudah dan cepat menguapkannya (DepKes RI, 1995). Selanjutnya filtrat dikumpulkan kemudian disaring dengan corong *Buchner* yang di dalamnya diletakkan kertas saring dengan menggunakan pompa vakum sehingga proses penyaringan dapat berlangsung lebih cepat. Hasil penyaringan

filtrat kemudian diuapkan untuk memperoleh ekstrak kental dengan cara pemanasan menggunakan kompor listrik dengan suhu di bawah 60° C dengan tujuan agar senyawa aktif dalam ekstrak tidak rusak.

Setelah diperoleh ekstrak kental, kemudian dilakukan perhitungan rendemen ekstrak dengan dihitung sebagai persentase perbandingan antara berat ekstrak kental yang diperoleh terhadap berat serbuk daun kupu-kupu yang digunakan pada saat proses maserasi. Rendemen ekstrak kental daun kupu-kupu yang diperoleh yaitu sebesar 22,88%. Hasil rendemen ekstrak daun kupu-kupu yang diperoleh memenuhi nilai yang dipersyaratkan Farmakope Herbal Indonesia (FHI) yaitu tidak kurang dari 7,2%. (DepKes RI, 2008). Kemudian dilakukan pengujian terhadap ekstrak larut etanol daun kupu-kupu yang diperoleh.

1. Penentuan bobot jenis dan kadar lembab

Bobot jenis merupakan pengujian parameter non spesifik yang menggambarkan perbandingan kerapatan dari suatu zat terhadap kerapatan air dengan nilai masa per satuan volume. Tujuan penentuan bobot jenis untuk memberikan gambaran kandungan senyawa kimia yang terlarut pada suatu ekstrak. (DepKes RI, 2000). Hasil penentuan bobot jenis yang diperoleh dalam ekstrak daun kupu-kupu dalam penelitian ini yaitu 0,832 g/mL. Hasil ini memberikan gambaran besarnya massa per satuan volume untuk memberikan batasan antara ekstrak cair dengan ekstrak kental dan terkait dengan mengetahui kemurnian ekstrak yang ditentukan bobot jenisnya (DepKes, 2000).

Kemudian dilakukan penetapan kadar lembab atau kadar air dalam ekstrak daun kupu-kupu. Penetapan kadar lembab merupakan pengujian parameter non spesifik yang bertujuan untuk memberikan rentang atau batasan kandungan air yang terdapat di dalam ekstrak (DepKes, 2000). Penentuan kadar lembab yang diperoleh dalam penelitian ini yaitu 5%. Hasil tersebut memenuhi standar FHI, yaitu tidak lebih dari 10%. Hal ini dilakukan dengan tujuan untuk menghindari terjadinya reaksi hidrolisis/penguraian oleh enzim yang bisa menyebabkan terjadinya perubahan spesifikasi pada bahan dan penurunan kualitas produk serta pertumbuhan bakteri ataupun jamur.

2. Skrining fitokimia

Skrining fitokimia merupakan metode analisis secara kualitatif yang dilakukan dengan tujuan untuk mengetahui kandungan senyawa metabolit sekunder yang terdapat dalam ekstrak daun kupu-kupu (*Bauhinia purpurea* L.). Skrining fitokimia ekstrak etanol daun kupu-kupu yang dilakukan dalam penelitian ini antara lain identifikasi alkaloid, flavonoid, fenolik, tanin, dan saponin.

a. Alkaloid

Pada identifikasi senyawa alkaloid, digunakan tiga pereaksi yaitu pereaksi wagner, mayer dan dragendrof. Pengujian senyawa alkaloid diperoleh hasil yang negatif dari ketiga pereaksi yang digunakan. Pada pereaksi wagner endapan coklat tidak terbentuk, pereaksi mayer endapan putih tidak terbentuk, dan pereaksi dragendrof endapan jingga tidak terbentuk. Pada uji dengan pereaksi dragendrof, hasil negatif yang diperoleh terjadi karena kemungkinan senyawa alkaloid yang terdapat dalam daun kupu-kupu memiliki jumlah yang lebih sedikit sehingga nitrogen tidak dapat digunakan untuk membentuk ikatan kovalen koordinat dengan ion K^+ yang merupakan ion logam sehingga terbentuk endapan jingga atau membentuk kompleks kalium-alkaloid yang mengendap (Sangi et al., 2013). Pengujian ini hanya menghasilkan larutan yang berwarna hitam. Penelitian sebelumnya yang dilakukan oleh Pahwa et al., (2010) juga diperoleh hasil negatif untuk uji alkaloid pada daun kupu-kupu.

b. Flavonoid

Pengujian senyawa flavonoid dalam ekstrak etanol daun kupu-kupu diperoleh hasil positif yang ditandai dengan perubahan warna larutan menjadi merah bata setelah ditambahkan serbuk Mg dan HCl pekat. Perubahan warna yang terjadi disebabkan karena adanya reduksi flavonoid dengan HCl pekat dan serbuk magnesium yang dapat menghasilkan senyawa kompleks (Ikalinus, 2015). Flavonoid adalah senyawa polifenol yang memiliki kerangka dasar karbon yang terdiri dari 15 atom karbon yang membentuk susunan C6-C3-C6 yang terdapat dalam semua tumbuhan hijau

sehingga bisa ditemukan pada hampir setiap ekstrak tumbuhan (Arifin & Ibrahim, 2018). Senyawa flavonoid memiliki kemampuan sebagai antioksidan dan menghambat oksidasi lipid. Flavonoid dapat ditemukan pada semua bagian tanaman, termasuk akar, kulit, kayu, bunga, daun, biji dan buah (Zuraida et al., 2017).

c. Fenolik dan tanin

Untuk identifikasi senyawa fenolik dan tanin dilakukan dengan menggunakan larutan FeCl_3 . Ion Fe^{3+} akan bereaksi dengan gugus fenolik yang terdapat dalam sampel membentuk warna biru, hijau, atau hitam, yang menandakan bahwa adanya senyawa fenolik. Fungsi penambahan FeCl_3 yaitu untuk menentukan adanya gugus fenol dalam sampel. Hasil yang didapat yaitu ekstrak larut etanol daun kupu-kupu mengandung tanin yang ditandai dengan terbentuknya warna biru kehitaman dan mengandung fenolik dengan terbentuknya warna hijau kehitaman. Warna kehitaman yang dihasilkan terjadi karena tanin dan fenol dapat membentuk senyawa kompleks dengan FeCl_3 (Irianty, 2014).

Fenolik adalah senyawa metabolit sekunder yang ditemukan dalam tumbuhan yang tersebar luas yang memiliki karakteristik yaitu mempunyai cincin aromatik yang mengandung satu atau lebih gugus hidroksil (OH) (Julianto, 2019). Sedangkan tanin merupakan senyawa organik yang sangat kompleks yang termasuk dalam senyawa polifenol yang memiliki berbagai manfaat seperti sebagai antibakteri, antidiare, astringen, dan dapat sebagai antioksidan. (Desmiaty *et al.*, 2008).

d. Saponin

Saponin adalah senyawa metabolit sekunder yang memiliki permukaan yang jika dikocok dalam air dapat menimbulkan busa. Hal ini terjadi karena saponin dapat membentuk misel dari gugus polar dan non polarnya. Ketika misel terbentuk, maka gugus polar akan menghadap ke luar dan gugus nonpolar akan menghadap ke dalam. Sehingga keadaan inilah yang tampak seperti busa (Sangi et al., 2013). Pada uji senyawa saponin, diperoleh hasil positif yaitu ekstrak larut etanol daun kupu-kupu mengandung saponin yang

ditandai dengan terbentuknya busa setinggi ± 1 cm dan tidak hilang setelah penambahan HCl 1%. Timbulnya buih menandakan adanya glikosida yang memiliki kemampuan untuk membentuk buih dalam air yang dapat terhidrolisis menjadi glukosa dan senyawa lainnya. Reaksi yang terjadi saat uji saponin ditunjukkan pada Gambar 13.

Hasil uji skrining fitokimia yang diperoleh dalam penelitian ini sejalan dengan penelitian sebelumnya yang dilakukan oleh Aryantini (2021) dan Pahwa et al., (2010) yang memperoleh hasil positif terhadap senyawa fenol, tanin, flavonoid, dan saponin dalam ekstrak larut etanol daun kupu-kupu (*Bauhinia purpurea* L.).

3. Uji kromatografi lapis tipis (KLT)

Analisis kualitatif terhadap kandungan flavonoid pada ekstrak larut etanol daun kupu-kupu dilakukan dengan menggunakan metode KLT. Pemilihan metode KLT dikarenakan metode ini merupakan metode analisis pemisahan yang mudah digunakan, sederhana, cepat dan tidak terlalu mahal.

Kombinasi fase gerak yang digunakan yaitu kloroform : metanol dengan perbandingan 9:1, sedangkan fase diam yang digunakan adalah plat silika gel F254. Standar pembanding yang digunakan dalam pengujian KLT ini adalah kuersetin sebagai marker dari senyawa flavonoid. Hasil uji KLT menunjukkan bahwa terjadi pemisahan yang sempurna dari komponen komponen senyawa yang ditandai dengan adanya 4 spot/bercak yang dapat dilihat pada tabel 5 dan diperoleh senyawa dalam ekstrak etanol daun kupu-kupu mengandung senyawa kuersetin yang ditandai dengan kesamaan nilai Rf (*retardation factor*) bercak pada sampel dengan kuersetin standar yang terlihat pada lampu UV 254 dan 366 nm. Pengujian KLT senyawa flavonoid dapat dilihat pada gambar 14.

Pemilihan fase gerak dan fase diam pada sistem KLT ini yaitu yang mampu atau dapat memberikan penampakan senyawa kuersetin dari ekstrak daun kupu-kupu dengan dideteksi menggunakan UV 254 dan 366 nm yang memisahkan secara sempurna dengan komponen lain. Berdasarkan hasil optimasi penentuan fase gerak yang telah dilakukan, kombinasi fase gerak kloroform-metanol (9:1 v/v) merupakan fase gerak yang paling optimal dalam

memisahkan komponen senyawa kuersetin dalam ekstrak daun kupu-kupu. Sehingga fase gerak ini ditetapkan sebagai fase gerak yang akan digunakan untuk uji kualitatif senyawa kuersetin dalam ekstrak daun kupu-kupu.

4. Penetapan kadar total fenolik dan total flavonoid ekstrak larut etanol daun kupu-kupu

Untuk uji kuantitatif dilakukan penentuan kadar fenolik total dan flavonoid total pada ekstrak larut etanol daun kupu-kupu (*Bauhinia purpurea* L.) yang merujuk pada prosedur Chun et al., (2003) yaitu dengan menggunakan metode Folin-Ciocalteu untuk penetapan kadar total fenolik dan Metode $AlCl_3$ untuk penetapan kadar total flavonoid.

Metode Folin-Ciocalteu adalah metode yang paling banyak digunakan dalam menentukan kandungan senyawa total fenolik dalam tanaman dengan pertimbangan bahwa dengan metode ini pengerjaannya lebih sederhana. Selain itu juga, reagen Folin-Ciocalteu digunakan karena senyawa fenolik dapat bereaksi dengan Folin-Ciocalteu. Prinsip yang mendasar pada metode Folin-Ciocalteu yaitu terbentuknya senyawa kompleks yang berwarna biru dan dapat diukur absorbansinya pada panjang gelombang maksimum menggunakan spektrofotometer.

Pada Penelitian ini, asam galat digunakan sebagai standar dalam penentuan kadar total fenolik karena asam galat termasuk dalam fenolik alami dan stabil serta termasuk dalam senyawa fenolik turunan asam hidroksibenzoat yang tergolong ke dalam asam fenolik sederhana. Sehingga total fenolik yang ditetapkan baik dalam ekstrak etanol daun kupu-kupu dihitung sebagai asam galat. Asam galat yang direaksikan dengan reagen Folin-Ciocalteu menghasilkan warna hijau kehitaman dalam suasana basa yang menunjukkan hasil positif atau mengandung fenol. Reaksi senyawa fenolik dilakukan dalam suasana basa supaya terjadi disosiasi proton menjadi ion fenolat. Larutan basa yang digunakan dalam penetapan kadar total fenolik yaitu larutan natrium karbonat ($NaCO_3$). Saat asam galat direaksikan dengan Folin-Ciocalteu menghasilkan warna kuning yang menandakan bahwa sampel mengandung

fenolik, setelah itu ditambahkan dengan larutan Na_2CO_3 sebagai pemberi suasana basa. Selama reaksi berlangsung, gugus hidroksil pada senyawa fenolik akan bereaksi dengan reagen Folin-Ciocalteu yang membentuk kompleks molibdenum-tungsten yang berwarna biru yang bisa dideteksi dengan spektrofotometri UV-Vis. Warna biru yang terbentuk akan semakin pekat, sesuai dengan konsentrasi ion fenolat yang terbentuk, sehingga semakin besar konsentrasi senyawa fenolik maka akan semakin banyak ion fenolat yang mereduksi asam heteropoli (fosfomolibdat-fosfotungstat) menjadi kompleks molibdenum-tungsten sehingga akan semakin pekat warna biru yang dihasilkan. Reaksi reagen Folin-Ciocalteu dengan senyawa fenol dapat dilihat pada Gambar 6.

Kemudian untuk penentuan senyawa flavonoid total dilakukan dengan metode kolorimetri komplementer yang memiliki prinsip pengukuran dengan berdasarkan pembentukan warna. Prinsip penetapan kadar flavonoid dengan metode aluminium klorida (AlCl_3) adalah terjadinya pembentukan kompleks antara aluminium klorida dengan gugus keto pada atom C-4 dan gugus hidroksil pada atom C-3 atau C-5 membentuk kompleks senyawa yang stabil yang berwarna kuning dari golongan flavon dan flavonol yang dapat diukur intensitasnya menggunakan spektrofotometer (Azizah et al., 2014). Penentuan kadar total flavonoid digunakan standar kuersetin dengan alasan karena kuersetin adalah flavonoid yang termasuk dalam golongan flavonol yang memiliki gugus keto pada C-4 dan mempunyai gugus hidroksil pada atom C-3 atau C-5 yang bertetangga dari flavonol dan flavon. Selain itu, digunakan kuersetin sebagai standar karena kuersetin adalah senyawa yang penyebarannya paling luas dalam tanaman dan senyawa yang dapat bereaksi dengan AlCl_3 . Sehingga penetapan kadar total flavonoid dihitung sebagai kuersetin. Kandungan total flavonoid ditetapkan berdasarkan reaksi kolorimetri yaitu setelah sampel ekstrak daun kupu-kupu direaksikan dengan AlCl_3 dalam suasana asam. Larutan asam yang digunakan di sini yaitu asam asetat. Penambahan aluminium klorida dalam sampel untuk mendeteksi 7-hidroksil dan membentuk senyawa kompleks antara AlCl_3 dengan kuersetin yang ditandai

dengan perubahan larutan yang lebih berwarna kuning sehingga terjadi pergeseran panjang gelombang ke daerah visible (tampak). Sedangkan fungsi asam asetat di sini untuk mempertahankan panjang gelombang pada daerah visible (tampak). Reaksi senyawa flavonoid dengan $AlCl_3$ dapat dilihat pada gambar 8.

Dalam penetapan kadar total fenolik dan total flavonoid, pengukuran absorbansi sampel, standar asam galat dan standar kuersetin setelah direksikan dilakukan pengukuran absorbansi dengan replikasi sebanyak empat kali dengan tujuan untuk memperoleh data yang lebih akurat. Hasil penetapan kadar fenolik yang diperoleh dalam penelitian ini yaitu sebesar $1,85 \pm 0,12$ % dan kadar total flavonoid yaitu sebesar $0,93 \pm 0,06$ %. Berdasarkan hasil pengukuran tersebut, total fenolik pada ekstrak larut etanol daun kupu-kupu lebih besar dibandingkan dengan total flavonoid. Hasil yang diperoleh dalam penelitian ini berbeda dengan penelitian sebelumnya yang dilakukan oleh Krishnaveny (2014) yang memperoleh kadar total flavonoid yang lebih besar dibandingkan dengan kadar total fenolik dalam ekstrak air daun kupu-kupu (*Bauhinia purpurea* L.). Hal ini bisa terjadi dikarenakan pelarut yang digunakan dalam ekstraksi berbeda, sifat asam galat yang tidak stabil, dan bisa juga dipengaruhi oleh panjang gelombang serta *operating time* yang didapat sehingga hasil yang didapatkan berbeda.

Senyawa fenol yang terdapat di alam sangat luas memiliki variasi struktur yang beragam, mudah ditemukan di banyak tanaman, seperti pada bunga, daun maupun buah. Beberapa senyawa fenolik di alam telah diketahui strukturnya antara lain polifenol (tanin, melanin, lignin), flavonoid, fenil propanoid, fenol monosiklik sederhana, dan kuinon fenolik (Fauziah, 2008).

Pada penelitian ini, kadar fenolik ekstrak larut etanol daun kupu-kupu lebih besar dibandingkan dengan kadar total flavonoidnya. Hal ini dikarenakan senyawa fenolik memiliki turunan senyawa lainnya seperti tanin, flavonoid, kumarin, lignin dan senyawa lainnya sehingga diperoleh nilai kadar total fenolik yang lebih besar dibandingkan dengan kadar total flavonoid.