

BAB IV

HASIL DAN PEMBAHASAN

A. Hasil

1. Persiapan Sampel

Hasil sampel daun kupu-kupu yang sudah dilakukan sortasi basah, perajangan, pengeringan dan dilakukan penyerbukan. Sehingga diperoleh hasil pada **Tabel 2**.

Tabel 2. Hasil Sampel Daun Kupu-Kupu

Berat Daun Segar (kg)	Berat Daun Kering (kg)	Berat Serbuk (g)	Kadar Air (%)	Farmakope Herbal Indonesia, (2017)
3	1,5	1.437	6,40	<10%

2. Ekstraksi Sampel

Serbuk daun kupu-kupu diekstraksi menggunakan etanol konsentrasi 70% dan 96% secara maserasi dengan rasio 1:10 yaitu 100 g serbuk simplisia dalam 1 liter etanol 70% dan 100 g serbuk simplisia dalam 1 liter etanol 96%, masing-masing dimaserasi dalam waktu 3 hari dan filtrat yang dihasilkan dihitung %rendemen. Hasil rendemen dapat dilihat pada **Tabel 3**.

Tabel 3. Hasil Rendemen Ekstrak Etanol Daun Kupu-Kupu

Sampel	Berat Simplisia (g)	Randemen (%)	Farmakope Herbal Indonesia, (2017)
Ekstrak etanol 70%	Maserasi ke-1	22,016	>10%
	Maserasi ke-2	20,868	
	Maserasi ke-3	21,303	
Ekstrak etanol 96%	Maserasi ke-1	11	
	Maserasi ke-2	12	
	Maserasi ke-3	16,512	

3. Kontrol Kualitas Ekstrak

a. Uji organoleptik

Uji organoleptik menggunakan panca indera manusia sebagai penilaian awal secara objektif terhadap suatu ekstrak yaitu rasa, warna, bentuk, dan bau. Hasil pengamatan ini dapat diseskripsikan berdasarkan **Tabel 4.**

Tabel 4. Pengamatan Organoleptis

Sampel	Parameter	Hasil	Purwasari, (2021)
Etanol 70%	Warna	Hijau kehitaman	Hijau kehitaman
	Bentuk	Kental	Kental
	Aroma	Khas	Khas
	Rasa	Hambar	Hambar
Etanol 96%	Warna	Hijau Kehitaman	Hijau Kehitaman
	Bentuk	Kental	Kental
	Aroma	Khas	Khas
	Rasa	Hambar	Hambar

b. Uji kadar air ekstrak

Hasil kadar air ekstrak etanol 70% dan 96% daun kupu-kupu dapat dilihat pada **Tabel 5.**

Tabel 5. Kadar Air Ekstrak Daun Kupu-kupu

Sampel	Replikasi	Kadar Air (%)	Farmakope Herbal Indonesia, 2017)
Etanol 70%	M1	4,74	<10%
	M2	5,07	
	M3	6,45	
Etanol 96%	M1	5,13	
	M2	5,33	
	M3	5,91	

Keterangan: *M = maserasi

4. Penapisan Fitokimia

Uji fitokimia yaitu analisis untuk mengidentifikasi dan mendeteksi keberadaan senyawa-senyawa kimia tertentu dalam daun kupu-kupu. Metode ini mencakup pengujian untuk alkaloid, fenolik, flavonoid, dan saponin yang ada dalam sampel tersebut. Hasil uji fitokimia untuk ekstrak etanol 70% dan 96% daun kupu-kupu dapat dilihat pada **Tabel 6.**

Tabel 6. Penapisan Fitokimia

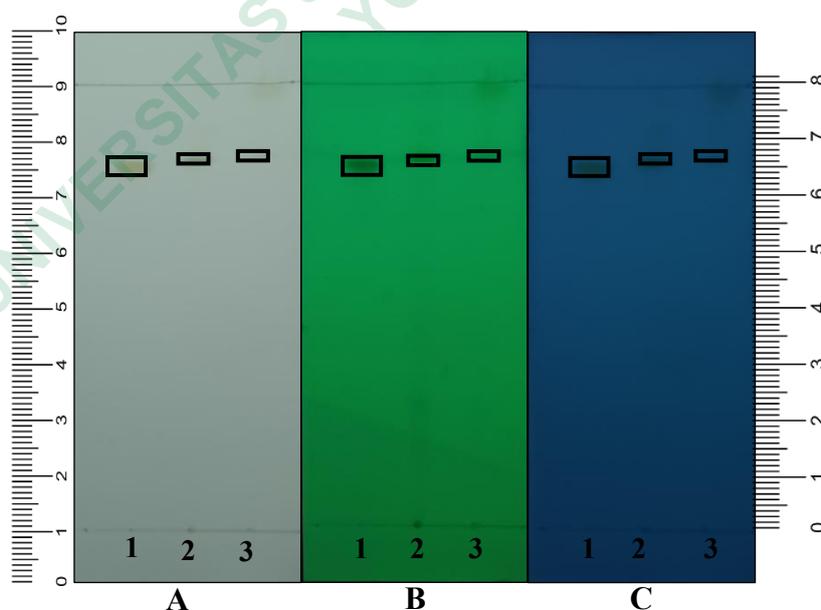
Identifikasi	Sampel		Djuleng, (2021)
	Etanol 70%	Etanol 96%	
Alkaloid			
Mayer	-	-	-
Wagner	-	-	-
Dragendroff	-	-	-
Fenolik	+	+	+
Flavonoid	+	+	+
Saponin	+	+	+

Keterangan: (+) positif: mengandung golongan senyawa
 (-) negatif: tidak mengandung golongan senyawa

5. Uji Kromatografi Lapis Tipis (KLT)

Uji KLT sebagai identifikasi keberadaan senyawa flavonoid dalam daun kupu-kupu. Fase gerak (eluen) yang digunakan digunakan terdiri dari campuran asam format, aseton, dan toluena dengan perbandingan 2:4:4 (v/v/v), Fase diam yang digunakan adalah *silika gel 60 F₂₅₄*.

Hasil pemisahan dilihat dengan sinar UV pada dua panjang gelombang berbeda, yaitu 254 nm dan 365 nm. Bercak yang terlihat selanjutnya dihitung nilai RF yang dapat dilihat pada **Tabel 7**.



Gambar 7. KLT Ekstrak Daun Kupu-Kupu (*Bauhinia purpurea* L.)

Keterangan: A. Deteksi dengan sinar tampak; B. Deteksi dengan sinar UV 254 nm; Deteksi dengan sinar UV 365 nm. (1) Kuersetin; (2) Ekstrak etanol 70%; (3) Ekstrak etanol 96%.

Tabel 7. Nilai RF (*Retardation Factor*)

Kuersetin	Ekstrak Etanol 70% Daun kupu-Kupu	Ekstrak Etanol 96% Daun kupu-Kupu	Purwasari, (2021)
0,812	0,825	0,837	0,875

6. Penetapan Kadar Fenolik Total

a. Penentuan panjang gelombang maksimum asam galat

Scanning panjang gelombang asam galat dengan konsentrasi 300 ppm pada rentang panjang gelombang 600–800 nm sehingga diperoleh panjang gelombang serapan maksimum asam galat pada 760 nm.

b. Penentuan *operating time* (OT)

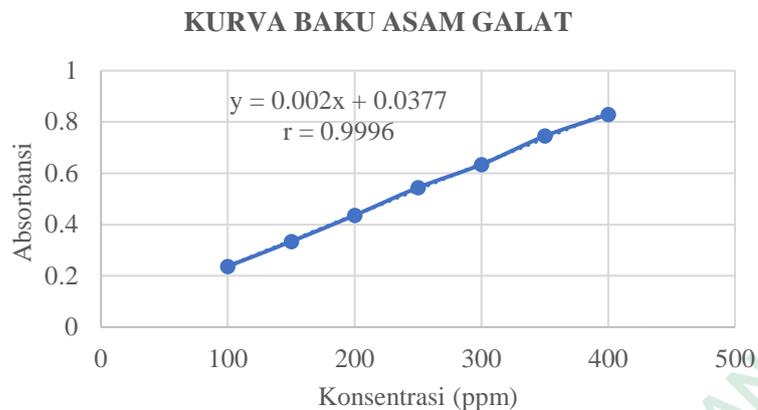
Operating time dilihat berdasarkan nilai absorbansi yang stabil pada panjang gelombang yang telah ditentukan sebelumnya dengan menggunakan larutan stok 300 ppm. *Operating time* ditentukan selama 2 jam, dengan interval pengukuran setiap 1 menit, sehingga diperoleh *operating time* selama 1 jam 44 menit.

c. Kurva baku asam galat

Kurva baku asam galat dengan menggunakan serangkaian konsentrasi standar, yakni 100, 150, 200, 250, 300, 350, dan 400 ppm yang diukur pada panjang gelombang 760 nm. Blanko yang digunakan yaitu metanol *p.a.* Hasil kurva baku asam galat dapat dilihat pada **Tabel 8** dan **Gambar 8** berikut.

Tabel 8. Absorbansi Kurva Baku Asam Galat

Konsentrasi (ppm)	Rata-Rata \pm SD
100	0.237 \pm 0,002
150	0.334 \pm 0,0025
200	0.436 \pm 0,003
250	0.544 \pm 0,0032
300	0.634 \pm 0,0042
350	0.746 \pm 0,0031
400	0.829 \pm 0,005



Gambar 8. Kurva Baku asam Galat

Berdasarkan kurva kalibrasi pada **Gambar 8**, hubungan linier antara konsentrasi standar asam galat dan absorbansi yang tercatat dijelaskan oleh persamaan $y = 0,002x + 0,0377$, dengan nilai koefisien korelasi (r) 0,9996. Persamaan ini digunakan untuk menghitung jumlah total senyawa fenolik dalam ekstrak etanol 70% dan etanol 96% daun kupu-kupu. Hasil perhitungan ini dinyatakan dalam satuan ekuivalen asam galat (GAE), yang digunakan sebagai standar untuk mengukur kandungan fenolik dalam sampel. Hasil kadar fenolik total yang diperoleh dalam ekstrak etanol daun kupu-kupu dapat dilihat pada **Tabel 9**.

Tabel 9. Kadar Fenolik Total Daun Kupu-Kupu

Sampel	Replikasi	Kadar Fenolik Total (mg GAE/g)	Rata-Rata \pm SD (mg GAE/g)
Etanol 70%	M1	14,413	14,644 \pm 0,222
	M2	14,663	
	M3	14,855	
Etanol 96%	M1	7,287	7,176 \pm 0,347
	M2	6,787	
	M2	7,453	

Keterangan: *M= maserasi

7. Penetapan Kadar Flavonoid Total

a. Penentuan panjang gelombang maksimum kuersetin

Pemindaian panjang gelombang kuersetin menggunakan konsentrasi 80 ppm pada rentang panjang gelombang 350–450 nm. Sehingga diperoleh panjang gelombang maksimum pada 416 nm.

b. Penentuan *operating time* (OT)

Operating time kuersetin ditentukan menggunakan konsentrasi 80 ppm gelombang 416 nm. *Operating time* dilakukan selama 45 menit dengan jarak pengukuran setiap 1 menit, sehingga total *operating time* yang diperoleh adalah 28 menit.

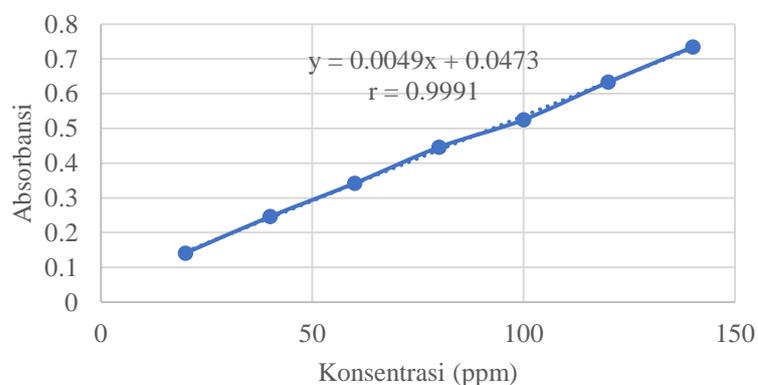
c. Kurva baku kuersetin

Kurva baku kuersetin ditentukan dengan mengukur absorbansi seri konsentrasi standar, yaitu 40, 60, 80, 100, dan 120 ppm pada Panjang gelombang 416, dengan blanko menggunakan etanol *p.a.* Hasil kurva kalibrasi kuersetin dapat dilihat pada **Tabel 10** dan **Gambar 9**.

Tabel 10. Absorbansi Kurva Baku Kuersetin

Konsentrasi (ppm)	Rata-Rata \pm SD
40	0.246 \pm 0,0015
60	0.342 \pm 0,0005
80	0.446 \pm 0,0035
100	0.525 \pm 0,0037
120	0.633 \pm 0.0031

KURVA BAKU KUERSETIN



Gambar 9. Kurva baku Kuersetin

Berdasarkan kurva baku yang ditampilkan dalam **Gambar 9**, dilakukan analisis untuk menentukan hubungan antara konsentrasi kuersetin dan nilai absorbansi yang diperoleh. Dari analisis tersebut, diperoleh persamaan regresi linier yang menggambarkan hubungan tersebut, yaitu $y = 0,0048x + 0,0556$ dengan nilai koefisien korelasi (r) yang diperoleh yaitu 0,9991. Hasil perhitungan kadar flavonoid ini dinyatakan dalam satuan ekuivalen kuersetin (QE), yang digunakan sebagai standar untuk mengukur kandungan flavonoid dalam berbagai sampel. Hasil kadar flavonoid total dapat dilihat pada **Tabel 11**.

Tabel 11. Kadar Flavonoid Total Daun Kupu-Kupu

Sampel	Replikasi	Kadar Flavonoid Total (mg QE/g)	Rata-Rata \pm SD (mg QE/g)
Etanol 70%	M1	25,024	25,519 \pm 0,921
	M2	24,951	
	M3	26,583	
Etanol 96%	M1	10,746	11,208 \pm 0,412
	M2	11,340	
	M2	11,539	

Keterangan: *M= maserasi

8. Analisis Data

Langkah pertama dalam analisis data dengan SPSS yaitu dengan melakukan uji normalitas dan homogenitas sebagai syarat. Hasil analisis data dapat dilihat pada **Tabel 12** dan **Tabel 13**.

Tabel 12. Analisis Data Kadar Fenolik Total

Sampel	Uji Normalitas	Uji Homogenitas	Uji <i>T-Test</i>
Etanol 70%	0,463	0,728	0,000*
Etanol 96%	0,373		

Keterangan: (*) Terdapat perbedaan signifikan

Tabel 13. Analisis Data Kadar Flavonoid Total

Sampel	Uji Normalitas	Uji Homogenitas	Uji <i>T-Test</i>
Etanol 70%	0,783	0,119	0,000*
Etanol 96%	0,924		

Keterangan: (*) Terdapat perbedaan signifikan

B. Pembahasan

Penelitian ini bertujuan untuk melihat pengaruh variasi konsentrasi etanol 70% dan 96% terhadap kadar fenolik dan flavonoid total daun kupu-kupu (*Bauhinia purpurea* L.). Daun kupu-kupu yang digunakan dalam penelitian ini dipetik langsung dari kawasan Ngawu, Playen, yang terletak di Gunung Kidul, Yogyakarta. Sebelum tanaman ini dianalisis, langkah pertama yang dilakukan yaitu melakukan identifikasi atau determinasi yang sebelumnya sudah dilakukan oleh Prameswari, (2022) di Laboratorium Sistematika Tumbuhan, Fakultas Biologi, Universitas Gadjah Mada Yogyakarta pada tanggal 18 Mei 2022 dengan nomor pendaftaran 084/S.Tb/V/2022. Berdasarkan hasil yang tercantum dalam **Lampiran 4**, tanaman yang diidentifikasi dan digunakan dalam penelitian ini adalah daun kupu-kupu (*Bauhinia purpurea* L.). Determinasi tanaman bertujuan untuk memverifikasi tanaman yang akan digunakan dalam penelitian telah diidentifikasi dengan benar dan sesuai dengan spesies yang diinginkan. Proses determinasi ini penting untuk mencegah kemungkinan kesalahan dalam pengumpulan sampel. Proses ini melibatkan perbandingan tanaman yang akan diteliti dengan tanaman yang sudah dikenal sebelumnya untuk memastikan identitasnya (Klau & Hesturini, 2021).

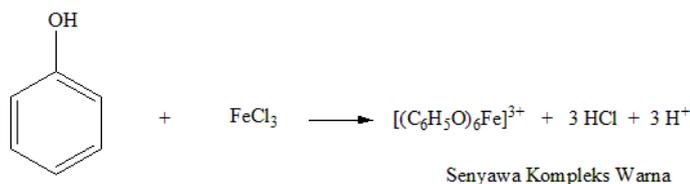
Daun kupu-kupu dipanen pada pagi hari karena pada waktu tersebut daun masih segar dan hijau dengan tingkat zat aktif yang tinggi karena belum mengalami proses fotosintesis sehingga senyawa yang ditarik dapat optimal. Kriteria daun yang dipetik yaitu daun berwarna hijau muda (berada pada bagian daun ke-2 hingga ke-4 dari pucuk tanaman) dan berukuran seragam karena pada kategori tersebut kandungan senyawa yang dihasilkan lebih banyak (Susiloningrum & Indrawati, 2020). Hasil panen daun kupu-kupu diperoleh sebanyak 3 kg disortasi basah dengan tujuan untuk memastikan bahwa daun bebas dari debu, tanah, dan sisa-sisa organik lainnya yang mungkin terdapat pada permukaan daun. Kemudian daun dipotong menjadi potongan-potongan kecil agar dapat mengoptimalkan proses pengeringan. Ukuran sampel yang kecil, maka luas permukaannya menjadi lebih besar, sehingga mempercepat waktu pengeringan. Daun kupu-kupu dioven pada suhu 40°C selama 3 hari karena suhu tersebut merupakan suhu optimal dan jika suhu diatas 50°C dapat merusak senyawa yang akan diambil yaitu fenolik dan flavonoid karena mengalami

perubahan struktur dan jumlah ekstrak yang dihasilkan lebih sedikit (Kusumawardany *et al.* , 2023). Pengeringan dilakukan untuk menurunkan kandungan air pada sampel. Simplisia kering diserbuk menggunakan grinder untuk mengurangi ukuran partikel sehingga pelarut dapat dengan mudah menyerapnya dan dilakukan pengayakan dengan ayakan mesh 40. Penggunaan mesh 40 karena ukuran partikel simplisia dengan ayakan tersebut akan memudahkan sampel kontak dengan pelarut. Luas permukaan simplisia yang bersentuhan dengan pelarut akan memberikan peluang lebih besar untuk mengekstraksi senyawa (Amaliah *et al.* , 2019). Berdasarkan **Tabel 2 dan Tabel 5**, kadar air serbuk dan ekstrak daun kupu-kupu diperoleh sudah memenuhi syarat kadar air yaitu <10% (Kementrian Kesehatan RI, 2017). Presentase kadar air kurang dari 10% dapat mengurangi risiko kontaminasi mikroba seperti bakteri, jamur, dan kapang, yang dapat mempengaruhi kualitas ekstrak (Utami, *et al.*, 2020).

Daun kupu-kupu diekstraksi secara maserasi selama 3 hari dengan pelarut etanol 70% dan etanol 96%. Pemilihan metode maserasi karena tidak melalui pemanasan, sehingga bisa menghindari kerusakan pada senyawa-senyawa yang sensitif terhadap panas, seperti senyawa fenolik dan flavonoid, yang rentan terhadap degradasi oleh suhu tinggi (Hidayah *et al.* , 2016). Proses maserasi harus terhindar dari cahaya untuk mencegah reaksi yang dikatalisis oleh cahaya sehingga dapat merusak sampel dan dilakukan pengadukan setiap 6 jam sekali. Tujuan dilakukan pengadukan untuk meratakan kontak antara simplisia dengan pelarut sehingga dapat mempercepat waktu larutan penyari dalam mengekstraksi sampel. Selanjutnya ekstrak disaring dan dipekatkan pada suhu 40-60°C sehingga didapat ekstrak kental lalu dihitung %rendemen. Rendemen menggambarkan banyaknya jumlah zat yang tersari. Rendemen menunjukkan jumlah zat yang berhasil diambil. Rendemen adalah jumlah ekstrak yang didapat dari proses ekstraksi tanaman dan dinyatakan dalam bentuk persen. Semakin tinggi rendemen, semakin banyak senyawa aktif yang terdapat dalam sampel (Kusuma & Aprileili, 2022). Berdasarkan **Tabel 3**, rendemen ekstrak etanol 70% dan etanol 96% sudah memenuhi syarat FHI yaitu >10%. Rendemen etanol 70% lebih besar dibandingkan etanol 96% karena etanol 70% memiliki persentase air yang lebih tinggi

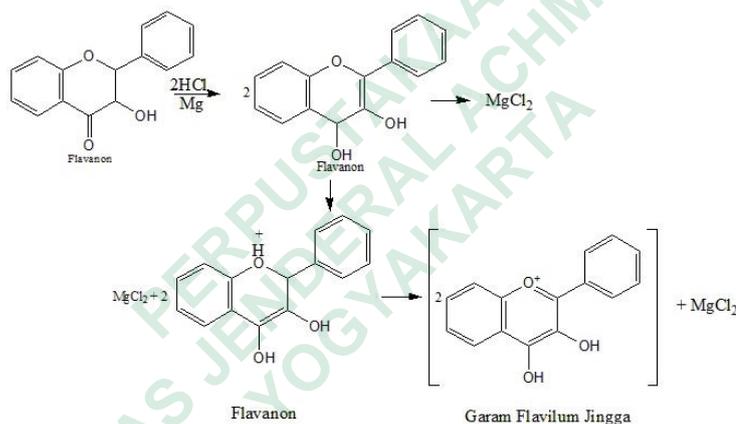
dibandingkan dengan etanol 96% dan gugus OH di dalam air merupakan senyawa yang sangat polar sehingga lebih efektif dalam mengekstraksi semua senyawa polar terutama senyawa fenolik dan flavonoid (Wahyudi & Minarsih, 2023).

Ekstrak kental yang dihasilkan, dilakukan uji organoleptis bertujuan memberikan identifikasi awal simplisia dan ekstrak menggunakan pancaindra, melalui deskripsi bentuk, bau, rasa, dan warna (Utami, *et al.*, 2020). Berdasarkan hasil uji organoleptis, didapatkan bahwa baik ekstrak etanol 70% maupun 96% memiliki karakteristik yang sama sesuai yg dilakukan oleh Purwasari (2021) yaikni warna hijau kehitaman, bentuk kental, aroma khas, dan rasa yang hambar. Selanjutnya dilakukan uji fitokimia yang merupakan metode analisis untuk melihat metabolit sekunder yang ada dalam tanaman. Pada penelitian ini, skrining fitokimia ekstrak daun kupu-kupu melibatkan pengujian terhadap beberapa jenis senyawa utama seperti alkaloid, flavonoid, fenolik, dan saponin. Berdasarkan hasil fitokimia, ekstrak ini mengandung senyawa flavonoid, fenol, dan saponin, penemuan ini sejalan dengan riset yang dilakukan oleh Djuleng (2021). Uji terhadap senyawa alkaloid menunjukkan hasil negatif karena tidak terjadi peubahan warna dan tidak terbentuk endapan berwarna ketika ditambahkan pereaksi *mayer*, *wagner* dan *dragendroff*. Penambahan HCl 2N dalam pengujian ini bertujuan untuk menetralkan sifat basa alkaloid, sehingga dapat diekstrak menggunakan pelarut asam. Jika alkaloid tidak terdeteksi dalam penelitian ini, kemungkinan disebabkan oleh pembentukan kompleks kalium alkaloid yang tidak mencapai batas kejenuhan, sehingga tidak membentuk endapan. Selain itu, kandungan alkaloid yang rendah dalam ekstrak dapat menyebabkan senyawa tersebut tidak terestraksi dengan sempurna selama proses ekstraksi (Minarno, 2015). Uji terhadap senyawa fenolik dilakukan dengan menambahkan larutan FeCl_3 , yang bertujuan untuk mengidentifikasi adanya gugus fenol dalam sampel. Berdasarkan **Tabel 6** dan reaksi yang dirujuk pada **Gambar 10**, menunjukkan hasil positif dengan adanya warna hijau kehitaman yang mengindikasikan bahwa sampel mengandung senyawa fenolik. Perubahan warna ini karena fenolik dapat membentuk senyawa kompleks dengan FeCl_3 (Mukhriani *et al.*, 2019).



Gambar 10. Reaksi antara Senyawa Fenolik dengan FeCl_3 (Mukhriani *et al.* , 2019)

Berdasarkan **Tabel 6** dan reaksi yang dirujuk pada **Gambar 11**, uji flavonoid menunjukkan adanya warna jingga setelah direduksi dengan asam klorida pekat dan serbuk magnesium, yang menghasilkan senyawa kompleks dan menandakan positif senyawa flavonoid golongan flavon, auron atau khalkon (Oktavia & Sutoyo, 2021).

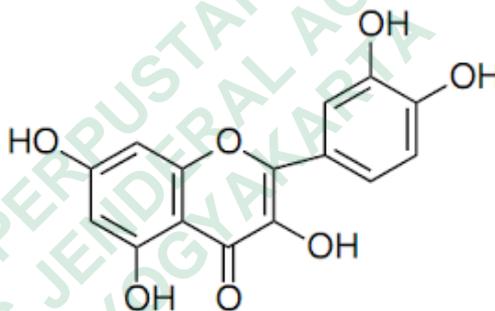


Gambar 11. Reaksi Flavonoid dengan HCL Pekat dan Serbuk Mg (Oktavia & Sutoyo, 2021)

Uji saponin menunjukkan hasil positif yaitu munculnya busa dengan tinggi 2 cm yang tetap ada setelah ditambahkan HCl 1%. Hasil ini mengindikasikan bahwa senyawa saponin memiliki sifat mudah larut dalam air dan cenderung menghasilkan busa ketika dikocok. Busa yang terbentuk merupakan hasil dari interaksi saponin dengan udara atau agitasi (Aryantini, 2021).

Analisis kualitatif senyawa flavonoid ekstrak daun kupu-kupu yaitu menggunakan Kromatografi Lapis Tipis (KLT) untuk memperkuat identifikasi senyawa kimia yang terkandung dalam tumbuhan, selain melakukan skrining fitokimia (Forestryana & Arnida, 2020). Metode KLT merupakan metode yang mudah digunakan, memiliki prosedur yang sederhana, tidak memerlukan biaya yang terlalu mahal, dan memberikan hasil dengan cepat (Pratiwi *et al.* , 2023). Fase

gerak (eluen) yang digunakan digunakan terdiri dari campuran asam format, aseton, dan toluena dengan perbandingan 2:4:4 (v/v/v), dimana asam format bersifat polar, aseton bersifat semi polar dan toluena bersifat non-polar yang sudah dilakukan optimasi pada penelitian yang dilakukan oleh Purwasari, (2021). *Silika gel* 60F₂₅₄ digunakan sebagai fase diam yang memiliki sifat polar. Sebelum digunakan, Silika gel 60F₂₅₄ dipanaskan dalam oven pada suhu 100°C selama 30 menit untuk mengurangi kelembapan dari plat, sehingga proses absorpsi pada fase diam dapat berlangsung secara maksimal (Trimulyani, 2019). Standar pembanding yang digunakan adalah kuersetin karena termasuk flavonoid golongan flavonol dimana memiliki gugus hidroksil mendekati dengan flavon dan flavonol. Berdasarkan **Gambar 13**, struktur kuersetin memiliki ikatan rangkap terkonjugasi, gugus aoksokrom dan gugus kromofor (Aminah *et al.* , 2017).



Gambar 12. Struktur Kuersetin (Siswarni *et al.* , 2017)

Pada metode ini, kuersetin dan senyawa flavonoid dapat diidentifikasi dengan terbentuknya warna kuning yang terlihat secara visual saat dikenai sinar UV 254 dan terbentuk warna gelap saat dikenai sinar UV 365. Berdasarkan **Gambar 7**, menunjukkan warna kuning kecoklatan pada standar kuersetin, warna kuning kehijauan pada ekstrak etanol 70%, dan warna kuning kehijauan pudar pada ekstrak etanol 96%. Bercak kuning kehijauan yang teridentifikasi, memungkinkan adanya senyawa flavonoid. Berdasarkan penelitian Ayu *et al.* , (2019), menegaskan bahwa perubahan warna menjadi kuning kehijauan pada noda atau bercak yang muncul setelah proses pemisahan KLT merupakan indikasi positif terhadap keberadaan flavonoid. Berdasarkan hasil pengamatan KLT, menunjukkan bahwa ekstrak etanol 70% dan 96% mengandung senyawa flavonoid. Berdasarkan **Tabel 7**, nilai R_f sampel dan standar hampir sejajar yang menandakan bahwa ekstrak etanol 70% dan

etanol 96% daun kupu-kupu mengandung senyawa flavonoid. Selisih nilai Rf dinyatakan positif jika $\leq 0,05$ dan dinyatakan negatif jika hasil nilai Rf $> 0,05$ (Oktaviantari *et al.* , 2019).

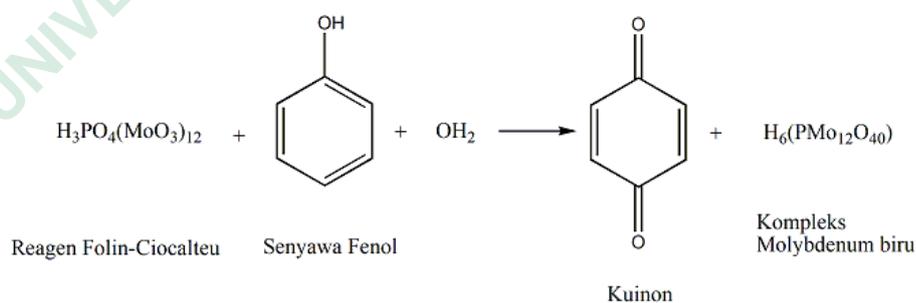
Pada lampu UV 254 nm, mekanisme penampakan noda melibatkan fluoresensi lempeng, sementara noda muncul sebagai area gelap. Hal ini disebabkan oleh interaksi antara sinar UV dan indikator fluoresensi yang ada pada lempeng. Sebaliknya, pada lampu UV 365 nm, noda akan mengalami fluoresensi, sedangkan lempeng akan tampak gelap. Hal ini disebabkan oleh interaksi antara sinar UV dan kromofor yang terikat oleh aoksokrom pada noda tersebut (Usman & Muin, 2023).

Uji kuantitatif dilakukan untuk menetapkan jumlah fenolik dan flavonoid total ekstrak daun kupu-kupu menggunakan metode spektrofotometri UV-Vis. Pemilihan metode ini karena senyawa fenolik dan flavonoid memiliki gugus kromofor dan aoksokrom. Penentuan kadar fenolik menggunakan metode *Follin-Ciocalteu* dan penentuan kadar flavonoid menggunakan metode kalorimetri dengan $AlCl_3$.

Prinsip metode *Follin-Ciocalteu* yaitu senyawa fenolik akan mengalami oksidasi oleh reagen *Follin-Ciocalteu*, sehingga terbentuk larutan dengan warna biru. Warna biru ini timbul karena senyawa fenolik berinteraksi dengan reagen tersebut maka dapat diukur dengan spektrofotometer UV-Vis dengan panjang gelombang 600-800 nm. Peningkatan intensitas warna biru tersebut secara langsung berkaitan dengan kandungan senyawa fenolik pada sampel. Semakin banyak senyawa fenolik yang teroksidasi, semakin kuat pula warna biru yang dihasilkan (Rollando & Monica, 2017). Penelitian ini menggunakan asam galat sebagai pembanding karena didasarkan pada reaktivitasnya yang tinggi terhadap reagen *Follin-Ciocalteu*, yang membuatnya menghasilkan hasil yang reliabel dan asam galat juga dikenal sebagai senyawa fenolik alami yang stabil. Asam galat saat bereaksi dengan reagen *Follin-Ciocalteu* akan mengeluarkan warna kuning yang menunjukkan indikasi awal bahwa sampel mengandung senyawa fenolik. Reaksi antara senyawa fenolik dan reagen *Follin-Ciocalteu* berjalan dalam kondisi basa untuk memungkinkan disosiasi proton, yang menghasilkan ion fenolat yang dibutuhkan untuk proses oksidasi. Larutan basa yang digunakan adalah larutan

natrium karbonat Na_2CO_3 yang berfungsi untuk menjaga kondisi basa yang optimal dalam campuran reaksi, memungkinkan terbentuknya ion fenolat dari senyawa fenolik yang mengikuti reaksi dengan reagen *Follin-Ciocalteu*. Ketika reaksi berlangsung, reagen *Follin-Ciocalteu* akan berinteraksi dengan gugus hidroksil pada senyawa fenolik. Hasil dari interaksi ini adalah terbentuknya kompleks molibdenum-tungsten yang memiliki warna biru. Warna biru ini kemudian dapat dideteksi dan diukur menggunakan spektrofotometri UV-Vis. (Andriani & Murtisiwi, 2018).

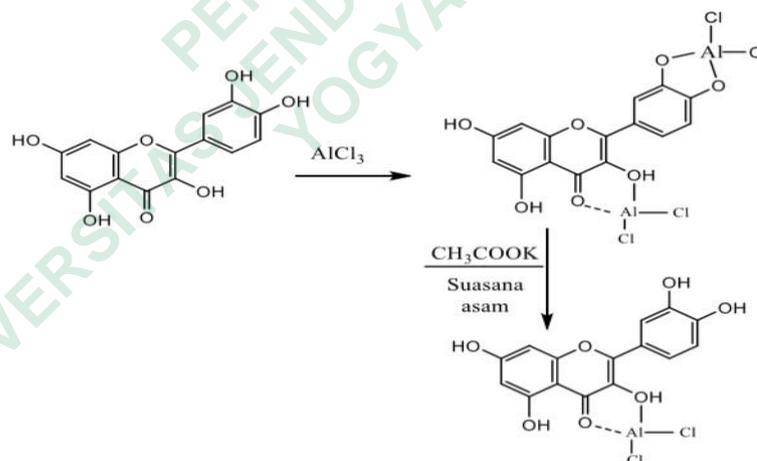
Peningkatan intensitas warna biru yang terbentuk selama reaksi langsung mengindikasikan jumlah ion fenolat yang ada dalam larutan. Konsentrasi senyawa fenolik yang lebih tinggi dalam sampel menghasilkan lebih banyak pembentukan ion fenolat. Ion fenolat bertindak dengan mereduksi asam heteropoli yaitu fosfomolibdat-fosfotungstat. Proses reduksi ini menghasilkan terbentuknya kompleks molibdenum-tungsten. Kompleks ini kemudian menyebabkan warna biru dalam larutan menjadi semakin pekat (Nofita *et al.*, 2020). Kemudian dibaca absorbansi larutan pada panjang gelombang 760 dan ditunggu reaksi berlangsung selama 1 jam 44 menit. Pemilihan panjang gelombang tersebut karena pada panjang gelombang tersebut menunjukkan tingkat serapan yang tinggi dan dipilih waktu selama 1 jam 44 menit karena pada waktu tersebut menghasilkan nilai absorbansi yang stabil. Reaksi antara asam galat dengan reagen *Follin Ciocalteu* dan Na_2CO_3 dapat dilihat pada **Gambar 13**.



Gambar 13. Reaksi Asam Galat dengan Na_2CO_3 (Novitasari, 2018)

Penetapan kadar flavonoid total berdasarkan metode kolorimetri, yakni dengan mengukur pembentukan warna menggunakan spektrofotometer UV-Vis.

Penetapan kadar flavonoid membutuhkan agen pengompleks untuk meningkatkan nilai absorbansi dan memperbaiki kualitas larutan ekstrak, yaitu AlCl_3 . Biasanya, larutan ekstrak flavonoid berwarna hijau muda hingga coklat, yang menunjukkan puncak serapan pada panjang gelombang 350-450 nm, agar nilai absorbansi dapat ditingkatkan dan warna larutan lebih stabil dan mudah diukur, diperlukan penambahan agen pengompleks seperti aluminium klorida (Pratiwi *et al.*, 2022). Metode kolorimetri didasarkan pada pembentukan kompleks antara AlCl_3 dengan gugus keto yang terletak pada atom C-4, serta gugus hidroksi yang berdekatan dengan atom C-3 atau C-5 dalam kerangka flavonoid sehingga mengakibatkan pergeseran panjang gelombang yang menyebabkan terjadinya perubahan warna lebih kuning. Metode ini memanfaatkan reaksi antara flavonoid dengan AlCl_3 untuk membentuk kompleks berwarna yang intensitasnya berbanding lurus dengan konsentrasi flavonoid dalam sampel, semakin tinggi konsentrasi maka absorbansinya juga semakin tinggi (Masúd & Puspitasari, 2017). Reaksi flavonoid dengan AlCl_3 dapat dilihat pada **Gambar 14**.



Gambar 14. Reaksi Flavonoid dengan AlCl_3 (Lindawati & Ni'ma, 2022)

Kuersetin digunakan sebagai pembanding untuk menetapkan kadar flavonoid total karena termasuk dalam kelompok flavonol yang tersebar luas di berbagai tumbuhan (Aminah *et al.*, 2017). Berdasarkan **Gambar 14**, kuersetin direaksikan dengan AlCl_3 dalam suasana asam, di mana dalam penelitian ini digunakan asam asetat (CH_3COOH). Penambahan CH_3COOH ini menyebabkan C-4 keto dan 3 atau 5-OH tetap stabil dengan membentuk kompleks bersama AlCl_3 ,

sehingga pergeseran panjang gelombang yang lebih panjang (batokromik) (Pratiwi *et al.*, 2022). Kemudian dibaca absorbansi larutan pada panjang gelombang 416 dan ditunggu reaksi berlangsung selama 28 menit. Pemilihan panjang gelombang tersebut karena pada panjang gelombang tersebut menunjukkan tingkat serapan yang tinggi dan dipilih waktu selama 28 menit karena pada waktu tersebut menghasilkan nilai absorbansi yang stabil.

Penetapan kadar fenolik dan flavonoid total yaitu dengan mengukur absorbansi standar asam galat dan kuersetin terlebih dahulu untuk mencari kurva baku yang akan digunakan untuk mencari kadar fenolik dan flavonoid ekstrak etanol 70% dan etanol 96% daun kupu-kupu. Selanjutnya mengukur absorbansi sampel untuk mencari kadar sesungguhnya. Pengukuran absorbansi ini dilakukan sebanyak 3x untuk memastikan keakuratan dan konsistensi data yang diperoleh. Berdasarkan **Tabel 7** dan **Tabel 8**, diperoleh rata-rata kadar fenolik total ekstrak etanol 70% dengan dilakukan replikasi maserasi 3x sebesar $14,644 \pm 0,222$ mg GAE/g sedangkan kadar flavonoid total yang diperoleh sebesar $25,519 \pm 0,921$ mg QE/g. Hasil penetapan kadar fenolik total yang dihasilkan pada ekstrak etanol 96% dengan dilakukan replikasi maserasi 3x sebesar $7,176 \pm 0,347$ mg GAE/g sedangkan kadar flavonoid total sebesar $11,208 \pm 0,412$ mg QE/g.

Analisis statistik menggunakan SPSS menegaskan bahwa nilai kadar fenolik dan flavonoid total dalam ekstrak etanol 70% daun kupu-kupu berbeda secara signifikan dibandingkan dengan etanol 96%. Berdasarkan hasil uji T-Test, diperoleh nilai sig. 2-tailed $<0,05$ (0,000), yang menunjukkan bahwa ada perbedaan signifikan antara penggunaan etanol 70% dan 96% dalam proses ekstraksi terhadap kadar fenolik dan flavonoid total dalam daun kupu-kupu. Hal ini mengindikasikan bahwa pemilihan konsentrasi etanol dalam ekstraksi memiliki dampak signifikan terhadap kandungan senyawa bioaktif tersebut.

Berdasarkan hasil penelitian, kadar fenolik dan flavonoid total dalam ekstrak etanol 70% daun kupu-kupu lebih tinggi dibandingkan dengan ekstrak etanol 96%. Hal ini mengindikasikan bahwa etanol 70% lebih optimal dalam mengekstraksi senyawa fenolik dan flavonoid dari daun kupu-kupu. Etanol 70% memiliki lebih banyak gugus OH, sehingga lebih polar dan memungkinkan

senyawa fenolik dan flavonoid yang bersifat polar lebih mudah larut dalam pelarut ini. Selain itu, hasil penelitian menunjukkan bahwa nilai kadar flavonoid total lebih besar daripada nilai kadar fenolik total dalam ekstrak tersebut. Penelitian yang dilakukan oleh Djuleng (2021) menunjukkan hasil yang berbeda yaitu kadar fenolik total lebih besar dibandingkan kadar flavonoid total. Perbedaan ini mungkin disebabkan oleh sifat asam galat yang tidak stabil serta faktor-faktor seperti *operating time* dan panjang gelombang yang digunakan juga dapat mempengaruhi hasil ekstraksi. Berdasarkan penelitian Krishnaveni (2014), menunjukkan bahwa kadar flavonoid total lebih besar dibandingkan kadar fenolik daun kupu- kupu yang diekstraksi dengan pelarut air yaitu sebesar 160.0 ± 6.9 QE mg/g sedangkan kadar fenolik total sebesar 126.66 ± 6.11 GAE mg/g. Penelitian ini menunjukkan bahwa daun kupu-kupu dengan kadar fenolik dan flavonoid yang tinggi memiliki potensi besar sebagai antioksidan. Aktivitas antioksidan dari senyawa fenolik dan flavonoid dapat memberikan berbagai manfaat kesehatan dengan melindungi tubuh dari kerusakan oksidatif.