

BAB IV
HASIL DAN PEMBAHASAN

A. HASIL

1. Persiapan Sampel

Sampel daun kupu-kupu yang telah melalui tahap determinasi (lampiran 2), kemudian sampel dipanen di desa Ngawu, Kecamatan Playen, Kabupaten Gunung Kidul, Yogyakarta. Selanjutnya sampel melalui tahap sortasi basah, pencucian, perajangan, pengeringan, dan penyerbukan sehingga diperoleh hasil pada Tabel 3.

Tabel 3. Hasil Sampel Daun Kupu-Kupu

Berat Daun Segar (kg)	Berat Daun Kering (kg)	Berat Serbuk (kg)
3	1,5	1,43

2. Ekstraksi Sampel

Ekstrak kental daun kupu-kupu dari masing-masing pelarut yang didapatkan menunjukkan hasil nilai rendemen seperti pada Tabel 4.

Tabel 4. Nilai Rendemen Ekstrak Daun Kupu-Kupu

Sampel	Maserasi ke-	Berat serbuk (gram)	Berat ekstrak kental (gram)	% Rendemen	Rata-rata
Metanol	1	100	11,029	11,029 %	20,545%
	2	100	15,965	15,965 %	
	3	100	34,64	34,64 %	
Etanol 96%	1	100	11,00	11,00 %	13,160%
	2	100	11,97	11,97 %	
	3	100	16,51	16,51 %	
Etanol 70%	1	100	22,016	22,016 %	21,396%
	2	100	20,868	20,868 %	
	3	100	21,303	21,303 %	

3. Uji Organoleptis

Ekstrak kental daun kupu-kupu selanjutnya diuji secara organoleptis. Pengujian organoleptis menggunakan indera manusia untuk menilai kualitas sampel. Hasil uji organoleptis dideskripsikan pada Tabel 5.

Tabel 5. Uji Organoleptis Ekstrak Daun Kupu-Kupu

Sampel	Uji organoleptis	Keterangan	Literatur (Purwasari <i>et al.</i> , 2017)
Metanol	Warna	Hijau kehitaman	Hijau kehitaman
	Bau	Khas	Khas
	Tekstur	Kental	Kental
Etanol 96%	Warna	Hijau kehitaman	Hijau kehitaman
	Bau	Khas	Khas
	Tekstur	Kental	Kental
Etanol 70%	Warna	Hijau kehitaman	Hijau kehitaman
	Bau	Khas	Khas
	Tekstur	Kental	Kental

4. Uji Kadar Air

Uji kadar air serbuk dan ekstrak daun kupu-kupu dilakukan pengujian menggunakan alat *moisture balance*. Hasil pengujian dilihat pada Tabel 6.

Tabel 6. Hasil Uji Kadar Air Sampel Daun Kupu-Kupu

Sampel	Maserasi	Kadar air (%)	Rata-rata	Literatur (Mewar, 2023)
serbuk		6,40		
Metanol	1	6,49	7,32 ± 0,835	≤10%
	2	8,16		
	3	7,30		
Etanol 96%	1	5,13	5,46 ± 0,405	
	2	5,33		
	3	5,91		
Etanol 70%	1	4,74	5,42 ± 0,907	
	2	5,07		
	3	6,45		

5. Skrining Fitokimia

Skrining fitokimia digunakan untuk mempelajari komponen senyawa aktif dalam sampel daun kupu-kupu. Hasil uji fitokimia menggunakan uji tabung pada Tabel 7.

Tabel 7. Hasil Skrining Fitokimia Ekstrak daun Kupu-Kupu

Skrining Fitokimia	Hasil			Hasil penelitian	Literatur (Purwasari <i>et al.</i> , 2017)
	Etanol 70%	Etanol 96%	Metanol		
	Wagner	-	-	-	Hijau pekat
					(-)
Alkaloid	Mayer	-	-	-	Hijau pekat
					berwarna hijau dan tidak terbentuk endapan
	Dragendrof	-	-	-	Hijau pekat
					(+)
Flavonoid		+	+	+	Berwarna jingga
					(+)
Saponin		+	+	+	Berwarna hijau kekuningan dan terbentuk busa ±1 cm.
					Terdapat busa setinggi 1 cm
					(+)
Tanin		+	+	+	Berwarna hijau
					warna hijau kehitaman
					(+)
Fenolik		+	+	+	hijau kehitaman
					warna hijau kehitaman

Keterangan : (+) = Sampel positif mengandung suatu senyawa

(-) = Sampel tidak mengandung suatu senyawa

6. Uji Aktivitas Antioksidan

Pengujian aktivitas antioksidan terhadap ekstrak daun kupu-kupu pada masing-masing pelarut dilakukan dengan metode peredaman radikal bebas (DPPH) secara kuantitatif dengan menghitung nilai IC_{50} dan pembanding yang digunakan yaitu kuersetin. Sampel dan standar diinkubasi selama 38 menit dan diukur pada panjang gelombang maksimal 513 nm (lampiran 6). Hasil pengujian aktivitas peredaman radikal bebas DPPH dapat dilihat pada tabel 8.

Tabel 8. Hasil Uji Aktivitas Peredaman Radikal Bebas DPPH

Sampel	$IC_{50} \pm SD$ (ppm)	Kategori
Kuersetin	$2,519 \pm 0,015$	Sangat kuat
Ekstrak Metanol	$276,248 \pm 26,654$	Sangat lemah
Ekstrak Etanol 96%	$274,051 \pm 6,804$	Sangat lemah
Ekstrak Etanol 70%	$405,268 \pm 24,534$	Sangat lemah

7. Uji Statistika

Analisis statistik dilakukan dengan SPSS Software dari nilai IC_{50} pada standar kuersetin dan pada masing-masing sampel daun kupu-kupu. Pada uji *One Way Anova* didapatkan hasil analisis data yaitu 0,000 ($<0,05$) yang berarti terdapat perbedaan pada sampel daun kupu-kupu. Dilanjutkan uji Post-Hoc Tukey HSD yang menunjukkan pelarut metanol dan etanol 96% memiliki perbedaan yang signifikan dengan pelarut etanol 70% karena nilai $p \leq 0,05$ (lampiran 8).

Tabel 9. Hasil Analisis Data Statistik Normalitas dan Homogenitas

Sampel	Normalitas	Homogenitas
Metanol	0,382*	
Etanol 96%	0,298*	0,111*
Etanol 70%	0,495*	

Keterangan:

*: normal

** : homogen

Tabel 10. Hasil Analisis Data Statistik One Way Anova

Sampel	One way anova	Post hoc tukey HSD	
		sampel	signifikasi
Metanol	0,000***	Etanol 70%	0,001*
		Etanol 96%	0,991
Metanol		0,991	
Etanol 96%		Etanol 70%	0,001*
		Metanol	0,001*
Etanol 70%		Etanol 96%	0,001*

Keterangan:

* : berbeda signifikan

B. PEMBAHASAN

Daun kupu-kupu pada penelitian ini diambil di Desa Ngawu Kecamatan Playen Kabupaten Gunung Kidul Yogyakarta dengan kriteria daun muda pada urutan ke-2 hingga ke-4 karena senyawa metabolit sekunder lebih banyak (Prameswari, 2022). Pemetikan daun dilakukan pada pukul 05.30-08.30 WIB di pagi hari agar kandungan metabolit sekundernya lebih optimal terutama senyawa flavonoid yang berperan sebagai antioksidan tidak berkurang karena belum mengalami fotosintesis (Akib *et al.*, 2021). Sampel disortasi basah dan dicuci untuk menghilangkan dan membersihkan sampel dari benda asing dan kotoran yang terdapat pada tanaman. Proses perajangan dilakukan untuk mempermudah pada saat proses pengeringan. Kemudian proses pengeringan pada suhu 40°C dilakukan untuk mencegah kerusakan senyawa flavonoid yang terdapat pada daun kupu-kupu (Wahyuni *et al.*, 2014). Tujuan pengeringan adalah untuk memperoleh simplisia yang tahan lama dan tidak rentan rusak saat disimpan dalam jangka waktu panjang (Indriaty *et al.*, 2022). Selanjutnya dilakukan penyerbukan untuk memperkecil ukuran partikel simplisia. Semakin kecil ukuran suatu partikel maka luas permukaan serbuk yang kontak dengan

pelarut semakin besar, sehingga cairan penyari lebih mudah untuk menembus dinding sel tanaman dan melarutkan senyawa aktif yang terkandung dalam simplisia (Salamah *et al.*, 2017). Penggunaan ayakan mesh no.40 bertujuan untuk mendapatkan serbuk simplisia dengan ukuran yang seragam dengan derajat kehalusan yang sesuai, sehingga dapat meningkatkan efisiensi proses ekstraksi senyawa aktif (Pujiastuti & Elzeba, 2021). Kemudian serbuk yang telah didapatkan diuji kadar air dan diperoleh kadar air $\leq 10\%$ yaitu 6,40% (tabel. 6). Penetapan kadar air bertujuan untuk mencegah reaksi hidrolisis atau penguraian oleh enzim yang dapat menyebabkan spesifikasi bahan berubah, kualitas produk menurun, serta pertumbuhan bakteri dan jamur (Djuleng, 2021).

Ekstraksi daun kupu-kupu dilakukan maserasi dengan 3 pelarut berbeda yaitu metanol, etanol 96%, dan etanol 70% dengan perbandingan 1:10. Penggunaan ketiga pelarut ini didasarkan pada sifat senyawa flavonoid. Berdasarkan Purwasari *et al.*, (2017) Senyawa flavonoid memiliki peran sebagai antioksidan sekunder. Senyawa flavonoid bersifat polar sehingga untuk mengekstraksi senyawa ini memerlukan pelarut dengan tingkat kepolaran yang sama. Hal ini sesuai dengan prinsip *like dissolve like* yakni suatu senyawa akan larut pada pelarut dengan tingkat kepolaran yang serupa (Verdiana *et al.*, 2018). Metanol dan etanol, sebagai pelarut polar memiliki kemampuan yang sangat baik dalam mengekstraksi senyawa bioaktif yang terkandung dalam sampel. Selama proses maserasi, pelarut yang digunakan mampu berpenetrasi melalui dinding sel tumbuhan dan mencapai rongga sel tempat senyawa aktif berada. Senyawa aktif yang larut dalam pelarut tersebut kemudian akan terbawa keluar dari sel. Sehingga menyebabkan senyawa aktif berpindah dari daerah dengan konsentrasi tinggi (di dalam sel) ke daerah dengan konsentrasi rendah (pelarut), sehingga terbawa keluar dari sel (Agustien & Susanti, 2021). Pada proses maserasi, sampel direndam pada masing-masing pelarut selama 3 hari agar pada saat proses pengambilan senyawa kimia yang ada pada sampel dapat secara maksimal (Indarto *et al.*, 2019) dan dilakukan pengadukan tiap 6 jam sekali agar keseimbangan

konsentrasi bahan yang diekstraksi dalam pelarut tercapai lebih cepat (Bani *et al.*, 2023). Ekstrak dikentalkan pada suhu 40°C - 50°C pemilihan suhu ini karena suhu tinggi dapat mengakibatkan senyawa metabolit sekunder yaitu senyawa flavonoid menjadi mudah rusak (Tara & Husni, 2021). Ekstrak kental yang telah didapat dilakukan perhitungan % rendemen. Hasil % rendemen (tabel. 4) dari ketiga sampel menunjukkan hasil yang baik karena $\geq 10\%$. Berdasarkan penelitian, daun kupu-kupu yang diekstraksi dengan etanol 70% memperoleh nilai rendemen yang lebih tinggi dibandingkan metanol dan etanol 96%. Metanol dan etanol merupakan pelarut yang sama-sama bersifat polar, namun nilai rendemen yang dihasilkan berbeda. Pada pelarut metanol (CH_3OH) lebih polar dibandingkan dengan etanol karena memiliki atom C lebih sedikit dibandingkan etanol ($\text{C}_2\text{H}_5\text{OH}$) (Loekitowati *et al.*, 2003). etanol 96% dan etanol 70% memiliki struktur dasar yang sama, yaitu $\text{C}_2\text{H}_5\text{OH}$, namun perbedaan konsentrasi mempengaruhi jumlah air yang terkandung. Etanol 70% mengandung 30% air sehingga lebih polar dibandingkan etanol 96% dan dapat mengekstraksi atau memisahkan senyawa polar maupun non polar. Semakin tinggi konsentrasi etanol, tingkat kepolaran pelarut semakin rendah. Semakin tinggi nilai rendemen, semakin banyak ekstrak yang dihasilkan sehingga senyawa metabolit sekunder yang diperoleh lebih banyak (sela, 2022).

Pengujian organoleptis menggunakan indera manusia sebagai alat utama untuk menilai kualitas suatu sampel (Badan Standarisasi Nasional, 2006). Ekstrak kental daun kupu-kupu selanjutnya di uji secara organoleptis yang meliputi warna, aroma/bau, dan tekstur. Hasil uji memiliki kesamaan dengan penelitian yang dilakukan oleh Purwasari *et al.*, (2017) warna hijau kehitaman, bau yang khas dan tekstur ekstrak kental.

Pada penelitian ini dilakukan skrining fitokimia untuk mengidentifikasi komponen senyawa aktif dalam sampel daun kupu-kupu (Riskiana & Vifta, 2021). Hasil skrining fitokimia pada penelitian ini (tabel.7) sejalan dengan penelitian Purwasari *et al.*, (2017) dan Djuleng, (2021) yang menunjukkan adanya kandungan senyawa flavonoid, saponin, senyawa fenolik, dan tanin dalam ekstrak daun kupu-kupu. Hasil dari Skrining fitokimia pada ekstrak daun

kupu-kupu menunjukkan hasil positif mengandung flavonoid, yang ditandai dengan perubahan warna dari hijau ke jingga. karena adanya proses reduksi antara sampel dengan HCl pekat dan serbuk magnesium (Mg) yang dapat menghasilkan senyawa kompleks dari ion magnesium dengan ion fenoksi pada senyawa flavonoid. Warna kuning hingga jingga pada flavonoid menunjukkan adanya flavon, kalkon, dan auron. Warna jingga juga bisa menunjukkan adanya flavonoid golongan flavonol dan flavanon (Susiloningrum & Indrawati, 2020). Hal ini sejalan dengan penelitian Djuleng (2021) yang menyatakan bahwa daun kupu-kupu mengandung senyawa kuersetin yang termasuk dalam flavonoid golongan flavonol.

Senyawa lain yang terkandung dalam daun kupu-kupu yaitu saponin yang ditandai adanya buih setinggi ± 1 cm karena adanya penggojokan kuat. Hal ini sejalan dengan penelitian Aryantini, (2021) 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. Uji terhadap senyawa fenolik dan tanin dilakukan dengan menambahkan larutan FeCl_3 , yang bertujuan untuk mengidentifikasi adanya gugus fenol dalam sampel. Hasil pada penelitian ini sejalan dengan penelitian Purwasari *et al.*, (2017) yang menyatakan bahwa daun kupu-kupu mengandung fenolik karena membentuk senyawa kompleks dengan FeCl_3 dan tanin golongan terhidrolisi karena menghasilkan warna hijau kehitaman.

Uji terhadap senyawa alkaloid menunjukkan hasil negatif karena tidak terjadi perubahan 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. Penelitian ini sejalan dengan penelitian Purwasari *et al.*, (2017) yang menyatakan daun kupu-kupu negatif alkaloid.

Pada penelitian ini dilakukan pengujian aktivitas peredaman radikal bebas DPPH. Metode DPPH dipilih karena memiliki keunggulan, antara lain metode yang sederhana, mudah, waktu analisis yang singkat, sensitivitas tinggi, dan kebutuhan sampel yang relatif kecil. Selain itu, radikal DPPH dikenal memiliki stabilitas yang lebih baik dibandingkan dengan radikal bebas lainnya (Martiani *et al.*, 2017). Tahap pertama dalam penelitian ini adalah penentuan panjang gelombang maksimum larutan DPPH dalam rentang 510-520 nm, yang merupakan panjang gelombang di mana larutan tersebut menyerap cahaya paling banyak (Pratiwi, 2021). Pada penelitian ini panjang gelombang yang dihasilkan 513 nm, hasil yang diperoleh sedikit berbeda dari penelitian sebelumnya yaitu mendapatkan hasil 515 nm (Purwasari *et al.*, 2017). Beberapa faktor yang mempengaruhi hal ini yaitu kondisi alat, perbedaan jenis alat dan jenis DPPH yang digunakan. Selanjutnya, penetapan *operating time* (OT) menggambarkan reaksi antara larutan baku pembanding dan larutan uji mulai stabil terhadap DPPH pada waktu tersebut (Anwar *et al.*, 2022). Pada penelitian ini didapatkan waktu inkubasi selama 38 menit (lampiran 6), hal ini sejalan dengan penelitian Sari *et al.*, (2022) yang menyatakan bahwa waktu stabil DPPH dan kuersetin pada 40 menit.

Pada penelitian ini, digunakan kuersetin sebagai standar karena termasuk golongan flavonoid yang banyak terdapat pada daun kupu-kupu. Selain itu, kuersetin juga memiliki aktivitas antioksidan yang sangat kuat dalam penangkal radikal bebas (Hasanah *et al.*, 2023), karena termasuk flavonoid golongan flavonol yang mempunyai gugus hidroksil (Dalming *et al.*, 2022). Pada penelitian ini dilakukan penentuan nilai IC_{50} yang didapatkan dari perhitungan nilai % inhibisi (lampiran 7). Dari data pada tabel 8, nilai IC_{50} yang diperoleh berturut-turut dari kategori sangat kuat hingga sangat lemah yaitu kuersetin, etanol 96%, metanol dan etanol 70%. Hal ini menandakan bahwa ekstrak daun kupu-kupu memiliki kemampuan dalam meredam radikal bebas yang sangat rendah. Pada penelitian Sernita *et al.*, (2024)

menyatakan etanol memiliki aktivitas antioksidan yang sangat kuat dibandingkan dengan pelarut metanol. Hal ini disebabkan oleh sifat pelarut etanol, terutama dalam konsentrasi tinggi seperti 96%, yang lebih efektif dalam menarik senyawa antioksidan seperti flavonoid dan polifenol, dibandingkan metanol. Selain itu, pelarut etanol yang lebih non-polar mampu mengekstraksi senyawa non-polar dengan lebih baik. Pelarut etanol 96% dapat dengan mudah menembus dinding sel sampel dan melarutkan senyawa-senyawa tersebut secara efektif daripada pelarut etanol dengan konsentrasi lebih rendah. Etanol digunakan sebagai pelarut karena bersifat universal, selektif, tidak toksik, memiliki kemampuan yang lebih baik dalam mengekstraksi berbagai jenis senyawa, baik polar maupun non-polar (Wendersteyt *et al.*, 2021).

Berdasarkan perhitungan hasil IC_{50} dapat dilihat bahwa pelarut etanol 70%, etanol 96% dan metanol memiliki kategori antioksidan yang sama yaitu sangat lemah. Langkah selanjutnya untuk melihat perbedaan signifikansi nilai IC_{50} antar pelarut dilakukan analisis Statistika. Berdasarkan tabel 9 dapat disimpulkan bahwa data ketiga pelarut terdistribusi normal dan homogen karena nilai signifikansi $\geq 0,05$, sehingga dilanjutkan dengan uji *One Way Anova*. Berdasarkan tabel 10 dapat disimpulkan bahwa terdapat perbedaan yang signifikan antar ketiga pelarut yang ditandai dengan nilai ($p \leq 0,05$). Kemudian dilanjutkan uji post-hoc tukey HSD untuk memperjelas perbedaan antar ketiga pelarut terhadap aktivitas peredaman radikal bebas DPPH. Berdasarkan tabel 10 dapat dilihat bahwa daun kupu-kupu yang diekstraksi dengan etanol 70% memiliki perbedaan yang signifikan dengan etanol 96% dan metanol pada pengujian aktivitas peredaman radikal bebas DPPH. Namun, daun kupu-kupu yang diekstraksi dengan etanol 96% tidak menunjukkan perbedaan yang signifikan dengan metanol dalam aktivitas peredaman radikal bebas DPPH. Hal ini menunjukkan bahwa jenis pelarut dapat mempengaruhi aktivitas peredaman radikal bebas pada ekstrak daun kupu-kupu.

Berdasarkan pada penelitian Purwasari *et al* (2017) nilai IC_{50} ekstrak etanol daun kupu-kupu sebesar $23,601 \mu\text{g/mL} \pm 3,1842$ termasuk dalam kategori antioksidan yang sangat kuat. Sedangkan hasil penelitian Aryantini

(2021) yang menyatakan aktivitas antioksidan daun kupu-kupu dengan pelarut etanol 96% termasuk dalam kategori sangat lemah dan memiliki persen inhibisi yang rendah untuk menghambat aktivitas DPPH. Hasil penelitian ini menunjukkan bahwa ekstrak daun kupu-kupu dengan pelarut etanol 96% dan metanol cenderung memiliki aktivitas antioksidan yang lebih tinggi dibandingkan etanol 70%. Oleh karena itu, pemilihan pelarut yang tepat penting untuk mengoptimalkan aktivitas peredaman radikal bebas.

Berdasarkan literatur aktivitas antioksidan dipengaruhi oleh senyawa metabolit sekunder. Banyaknya senyawa metabolit sekunder tergantung pada kemampuan pelarut menarik senyawa tersebut. Senyawa saponin berfungsi sebagai antioksidan karena dapat meredam superoksida dengan membentuk intermediat hiperoksida, yang mencegah kerusakan biomolekuler oleh radikal bebas (Aryantini, 2021). kemampuan senyawa fenolik dalam menyumbangkan atom hidrogen memungkinkan terjadinya reaksi reduksi pada radikal bebas DPPH, sehingga mengubahnya menjadi bentuk yang lebih stabil dan tidak reaktif. Aktivitas antioksidan senyawa fenolik meningkat seiring dengan bertambahnya jumlah gugus hidroksil. Selain itu, senyawa tanin memiliki gugus OH yang dapat mendonorkan atom hidrogen ke radikal bebas, mengubahnya menjadi senyawa non-radikal (DPPH-H) (Hasan *et al.*, 2022). Senyawa flavonoid memiliki peran penting sebagai antioksidan dengan mekanisme kerja menyumbangkan satu atom hidrogen yang dapat menetralkan efek toksik dari radikal bebas (Wayan *et al.*, 2014). Senyawa tanin bekerja sebagai antioksidan sekunder dengan mengkelat logam besi sehingga dapat menghambat pembentukan radikal bebas (Pujiastuti & Elzeba, 2021).