

BAB IV HASIL DAN PEMBAHASAN

A. Hasil

1. Preparasi Sampel

Daun kupu-kupu yang telah melalui determinasi (**lampiran 1**), kemudian dilakukan proses pemanenan, dilanjutkan dengan sortasi basah, pencucian menggunakan air mengalir, perajangan, pengeringan pada suhu 40°C, penghalusan, dan pengayakan sehingga diperoleh hasil pada **Tabel 2**.

Tabel 2. Hasil Sampel Daun Kupu-Kupu

Berat daun segar (Kg)	Berat daun kering (Kg)	Serbuk (Gram)
3	1,5	1437

2. Ekstraksi sampel

Metode maserasi pada penelitian ini untuk mengekstraksi serbuk daun kupu-kupu dalam perbandingan 1:10. Lalu 100 gram serbuk daun kupu-kupu ditimbang dan direndam dalam toples 1 liter pelarut dalam tiga kali percobaan. Filtrat yang dihasilkan dari proses penyaringan maserasi diuapkan pada suhu 50-60° hingga diperoleh ekstrak yang pekat. Ekstrak kental dari simplisia dibuat menggunakan pelarut etanol 70% dan 96%, dengan tingkat persen rendemen yang ditunjukkan pada **Tabel 3**.

Tabel 3. Hasil Persen Rendemen Ekstrak Daun Kupu-Kupu

Ekstrak	Maserasi	Berat ekstrak (gram)	Rendemen (%)	(Badriyah & Fariyah, 2023)
Etanol 70%	1	22,016	22,016	≥10%
	2	20,868	20,868	
	3	21,303	21,303	
Etanol 96%	1	11	11	
	2	12	12	
	3	16,5	16,5	

3. Organoleptis ekstrak

Ekstrak yang diperoleh dari pelarut etanol 70% dan etanol 96% kemudian diuji secara organoleptis. Pengujian organoleptik adalah metode evaluasi yang menggunakan indera manusia untuk memberikan penilaian awal terhadap karakteristik fisik ekstrak yang meliputi warna, tekstur, aroma, dan rasa yang dirujuk pada **Tabel 4**.

Tabel 4. Hasil Uji Organoleptis Ekstrak Daun Kupu-Kupu

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

4. Uji Kadar Air

Serbuk simplisia dan ekstrak daun kupu-kupu yang diperoleh kemudian diuji kadar airnya menggunakan alat *moisture balance*. Hasil pengujian ditampilkan dalam **Tabel 5**.

Tabel 5. Hasil Kadar Air Sampel Daun Kupu-Kupu

Sampel	Maserasi	Kadar Air (%)	(Wandira et al., 2023)
Serbuk		6,40	
Ekstrak Etanol 70%	1	4,74	
	2	5,07	
	3	6,45	≤10%
Ekstrak Etanol 96%	1	5,13	
	2	5,33	
	3	5,91	

5. Uji fitokimia

Skrining fitokimia dilakukan untuk mengidentifikasi komponen metabolit sekunder dalam ekstrak etanol 70% dan ekstrak 96% dari daun kupu-kupu (*Bauhinia purpurea* L.) menggunakan metode uji tabung. Pada skrining fitokimia ini, ekstrak etanol 70% dan 96% dari daun kupu-kupu diuji untuk keberadaan beberapa metabolit sekunder utama. Rincian hasil skrining fitokimia terdapat pada **Tabel 6**.

Tabel 6. Hasil Skrinning Fitokimia Ekstrak Daun Kupu-Kupu

Senyawa Fitokimia	Hasil Pengamatan		Referensi (Djuleng, 2021)
	Ekstrak etanol 70% daun kupu- kupu	Ekstrak etanol 96% daun kupu- kupu	
Alkaloid	Mayer	(-)	(-)
	Wagner	(-)	(-)
	Dragendroff	(-)	(-)
Flavonoid	(+)	(+)	(+)
Saponin	(+)	(+)	(+)
Tanin	(+)	(+)	(+)

Keterangan:

(+) : mengandung senyawa metabolit sekunder

(-) : tidak mengandung senyawa metabolit sekunder

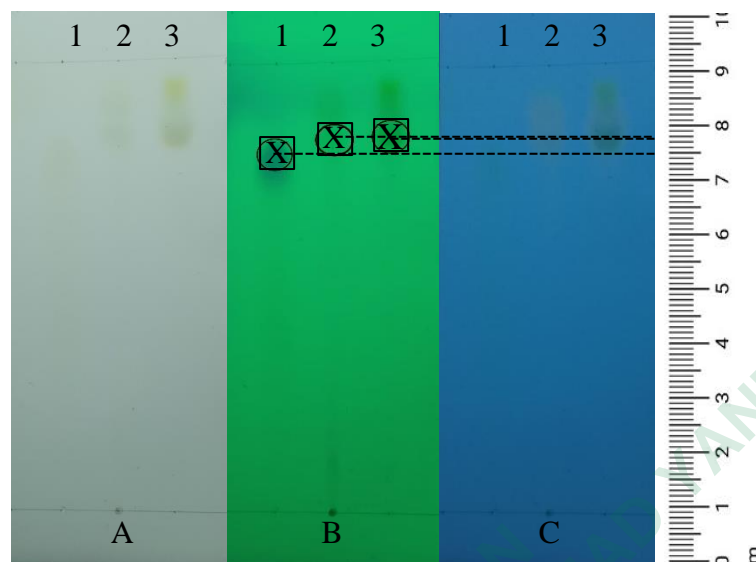
6. KLT

Penelitian ini, dilakukan analisis kualitatif untuk mencari dan mengidentifikasi senyawa tanin ekstrak daun kupu-kupu menggunakan teknik Kromatografi Lapis Tipis (KLT). Tahapan pertama pada analisis ini ialah optimisasi fase gerak untuk memastikan pemisahan yang efisien dari senyawa tanin. Optimisasi dilakukan dengan mencoba berbagai kombinasi pelarut untuk menemukan yang paling efektif memisahkan senyawa-senyawa dalam ekstrak. Detail hasil optimisasi ini disajikan dalam **Tabel 7**.

Tabel 7. Hasil Optimisasi fase gerak Tanin pada KLT

No	Fase Gerak	Hasil
1.	butanol : asam asetat : air (4 : 1: 5)	Fase gerak naik, sampel dan asam galat terelusi namun bercak noda tidak sejajar
2.	metanol : etil asetat (8 : 2)	Fase gerak naik, sampel dan asam galat terelusi dan menghasilkan spot noda yang sejajar dengan standar

Pada penelitian ini plat silika gel 60 F₂₅₄ sebagai fase diam yang bersifat polar. Sebelum digunakan plat diaktivasi dengan cara dipanaskan pada suhu 100°C selama 30 menit di dalam oven. Berdasarkan hasil uji KLT dapat dilihat pada **Gambar 6** dan nilai R_f pada **Tabel 8**.



Gambar 6. Hasil Uji KLT Sampel Dibandingkan dengan Standar Asam Galat

Keterangan: Fase diam: Silica gel 60 F₂₅₄; Fase gerak: methanol;etil asetat (8:2); 1: standar asam galat; 2: ekstrak etanol 70%; 3: ekstrak etanol 96%: A: visualisasi sinar tampak; B: deteksi UV 254 nm; C: deteksi UV 354 nm

Tabel 8. Hasil Perhitungan Nilai Rf KLT

Sampel	Nilai Rf
Asam galat	0,8125
Ekstrak etanol 70%	0,8375
Ekstrak etanol 96%	0,8375

7. Tanin

a. Penentuan panjang gelombang maksimum asam galat

Penentuan panjang gelombang dengan mereaksikan reagen *Folin-Ciocalteu* dan natrium karbonat (Na_2CO_3) 35% dan diukur absorbansinya dalam rentang panjang gelombang 400-800 nm. Berdasarkan hasil yang terlampir (**lampiran 8**), panjang gelombang maksimum diperoleh 757 nm.

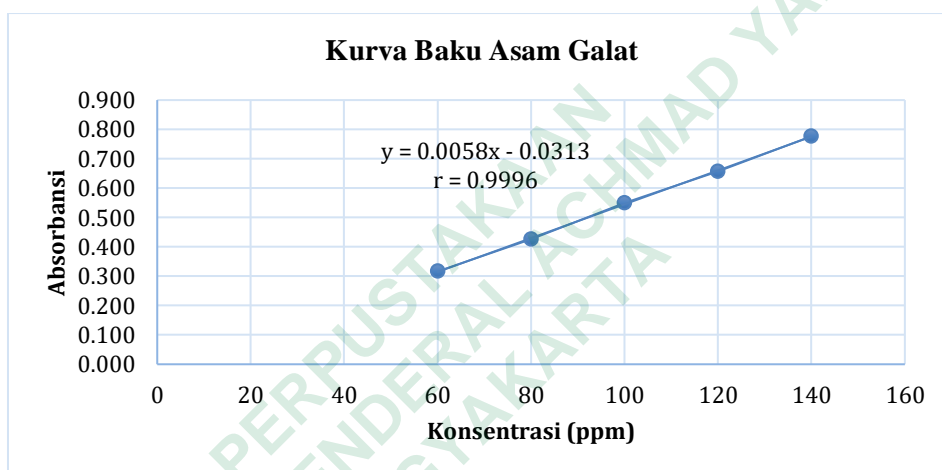
b. Penentuan *operating time* asam galat

Pengukuran *operating time* dilakukan dengan mereaksikan 500 μL asam galat 100 ppm dengan 500 μL reagen *Folin-Ciocalteu*, kemudian menambahkan 1000 μL natrium karbonat 35% dan akuades hingga mencapai volume 10 ml. Kemudian, absorbansi diukur pada panjang gelombang 757 nm selama 90 menit dengan interval waktu 1 menit.

Berdasarkan hasil yang terlampir (**lampiran 8**), *operating time* untuk asam galat adalah 31 menit.

c. Penentuan kurva baku asam galat

Tujuan penentuan kurva standar adalah untuk mengetahui bagaimana nilai absorbansi suatu larutan berhubungan dengan konsentrasinya. Asam galat dengan konsentrasi 60, 80, 100, 120, dan 140 ppm digunakan untuk menentukan kurva standar dalam penelitian ini. Gambar 7 menunjukkan hasil kurva baku asam galat.



Gambar 7. Kurva Baku Asam Galat

Berdasarkan hasil kurva baku asam galat, didapatkan persamaan regresi linier $y = 0,0058x - 0,0313$ dengan nilai koefisien korelasi (r) sebesar 0,9996. Persamaan regresi dari kurva baku asam galat akan digunakan untuk menghitung kadar total tanin dalam ekstrak etanol 70% dan ekstrak etanol 96% dari daun kupu-kupu (*Bauhinia purpurea* L.).

d. Penentuan kadar total tanin

Pengujian kadar total tanin dilakukan dengan mengambil sampel ekstrak yang telah dilarutkan, kemudian ditambahkan reagen *Folin-Ciocalteu* dan natrium karbonat 35% hingga volume mencapai 10 ml. Larutan tersebut diinkubasi selama 31 menit untuk memastikan reaksi berlangsung dengan optimal. Hasil penetapan kadar total tanin dapat dilihat pada **Tabel 9**.

Tabel 9. Kadar Tanin Total

Ekstrak	Maserasi	Total Tanin (mg GAE/g)	Rata-rata
Etanol 70%	1	19,183	17,914 ± 2,049
	2	19,010	
	3	15,551	
Etanol 96%	1	16,677	18,623 ± 1,766
	2	19,068	
	3	20,125	

8. Analisis data

Program SPSS versi 26 digunakan untuk menganalisis data secara statistik. Tujuan penelitian ini untuk mengetahui bagaimana perbedaan konsentrasi pelarut etanol 70% dan etanol 96% berdampak pada kadar tanin total pada daun kupu-kupu. Hasil analisis data dapat dilihat pada **Tabel 10**.

Tabel 10. Hasil Analisis Data Statistik

Homogenitas	Normalitas	T-independent
Etanol 70% (0,080) ^a	0,665 ^b	0,674 ^c
Etanol 96% (0,581) ^a		

Keterangan:

^a : Homogen

^b : Normal

^c : Tidak signifikan

B. Pembahasan

Tumbuhan yang digunakan sebagai sampel dalam penelitian ini adalah daun kupu-kupu (*Bauhinia purpurea* L.) didapatkan dari daerah Playen, Gunungkidul, Yogyakarta. Daun kupu-kupu dipanen saat pagi hari antara pukul 06.00-09.00 ketika cuaca cerah karena kondisi daun masih segar dan hijau, serta belum terjadi proses fotosintesis sehingga kandungan zat aktif dalam daun masih tinggi (Purwasari, 2021). Daun yang dipanen adalah daun muda, berwarna hijau muda, dan dalam keadaan segar. Daun yang dipakai terletak pada urutan kedua hingga keempat dari pucuk tanaman. Sebelum ekstraksi sampel, dilakukan sortasi basah untuk membersihkan bahan simplisia dengan menghilangkan kotoran, bahan asing, dan bagian tanaman yang tidak diinginkan. Pencucian dilakukan untuk menghilangkan tanah dan kotoran lain yang menempel pada simplisia (Ningsih, 2016). Tujuan dari perajangan adalah untuk mempercepat proses pengeringan (Purwasari, 2021).

Sebelum mulai ekstraksi, sampel dikeringkan terlebih dahulu dengan oven suhu 40°C untuk menjaga senyawa tanin dalam daun kupu-kupu agar tidak rusak. Proses pengeringan ini bertujuan untuk mencegah kerusakan simplisia akibat pertumbuhan mikroorganisme, sehingga memperpanjang waktu penyimpanan simplisia (Syafrida *et al.*, 2018). Pada pengeringan oven digunakan karena suhu pemanasannya lebih merata dan memiliki sirkulasi udara yang baik, sehingga proses pengeringan berlangsung cepat dan optimal tanpa tergantung pada cuaca. Daun kupu-kupu yang telah kering kemudian diayak dengan ayakan berukuran 40 mesh untuk mendapatkan serbuk halus. Langkah ini mempermudah proses ekstraksi dan penarikan senyawa aktif dari simplisia oleh pelarut. Penyerbukan simplisia bertujuan untuk memperkecil ukuran partikel dan memperbesar luas permukaan serbuk, sehingga cairan penyari lebih mudah masuk ke dalam sel tanaman dan melarutkan zat aktif yang terkandung dalam simplisia. Dengan memperbesar luas permukaan serbuk yang terkena pelarut proses ekstraksi menjadi lebih efektif karena lebih banyak zat aktif yang dapat terlarut dalam pelarut. Hal ini memungkinkan penarikan senyawa aktif yang lebih efisien dan optimal dari simplisia daun kupu-kupu (Antari *et al.*, 2015). Kemudian serbuk yang diperoleh dilakukan uji kadar air menggunakan *moisture balance* didapatkan hasil 6,40%. Berdasarkan **Tabel 5** hasil tersebut sudah sesuai dengan literatur yaitu $\leq 10\%$ (Wandira *et al.*, 2023). Menentukan kadar air bertujuan untuk mencegah reaksi hidrolisis atau penguraian oleh enzim yang dapat mengubah spesifikasi bahan, menurunkan kualitas produk, serta mencegah pertumbuhan bakteri dan jamur (Djuleng, 2021).

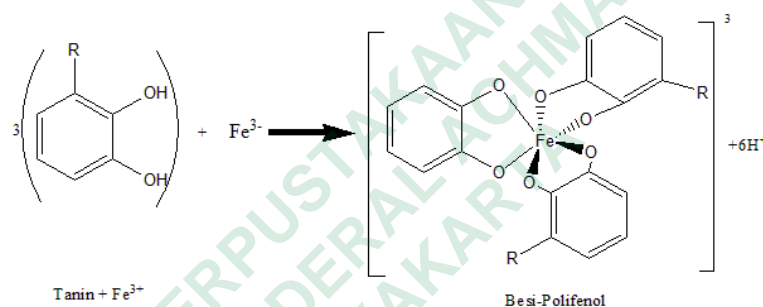
Penelitian ini bertujuan untuk mengidentifikasi senyawa tanin yang terdapat dalam daun kupu-kupu. Sehingga pelarut yang digunakan dalam ekstraksi senyawa tersebut yaitu etanol 70% dan etanol 96%. Etanol dipilih karena termasuk pelarut polar yang efektif dalam menarik senyawa aktif, toksisitas yang kecil, dan memiliki titik didih yang tinggi, sehingga aman digunakan dalam proses ekstraksi (Salsa Dinurrosifa, 2022). Tanin adalah senyawa polar yang memiliki gugus hidroksi sehingga etanol sebagai pelarut polar sangat cocok untuk mengekstraksinya. Berdasarkan perhitungan indeks polaritas, larutan etanol 96% dan etanol 70%

memiliki indeks polaritas masing-masing sebesar 5,35 dan 6,34. Ekstrak etanol 96% memiliki polaritas yang lebih rendah dibandingkan dengan etanol 70% (Aji *et al.*, 2023). Proses maserasi dilakukan menggunakan masing-masing pelarut sebanyak 3 kali. Pemilihan metode maserasi didasarkan pada sederhana, tanpa peralatan khusus, dan tanpa pemanasan, sehingga senyawa tanin dalam sampel tidak terdegradasi. Prinsip kerja metode maserasi melibatkan difusi senyawa ke dalam pelarut atau pelarutan zat aktif berdasarkan pada prinsip bahwa *like dissolve like* (Kemit *et al.*, 2016).

Selanjutnya proses pengentalan hingga diperoleh ekstrak yang kental. Selama proses pengentalan, suhu berada diantara 40°C - 50°C untuk mencegah kerusakan pada senyawa tanin. Tanin bisa rusak pada suhu diatas 50°C karena dapat mengalami perubahan struktur dan jumlah ekstrak yang dihasilkan lebih sedikit (Kusumawardany *et al.*, 2023). Setelah ekstrak kental diperoleh, ekstrak tersebut ditimbang dan rendemen dihitung. Berdasarkan hasil yang tercantum dalam tabel 3, persen rendemen tertinggi untuk etanol 70% ditemukan pada maserasi 1 sebesar 22,016%, sedangkan persen rendemen tertinggi untuk etanol 96% ditemukan pada maserasi 3 sebesar 16,5%. Berdasarkan penelitian (Aryantini, 2021) menghasilkan rendemen sebesar 8,228%. Oleh karena itu, penelitian ini memenuhi syarat karena rendemen yang dihasilkan tidak kurang dari 8,228%. Berdasarkan hasil rendemen yang mencapai nilai $\geq 10\%$ dianggap baik (Badriyah & Farihah, 2023). Menentukan nilai persen rendemen berfungsi untuk mengetahui jumlah metabolit sekunder yang diekstraksi oleh pelarut, tetapi tidak dapat mengidentifikasi jenis senyawa yang diekstraksi tersebut (Tahir *et al.*, 2022).

Ekstrak kental yang dihasilkan diuji organoleptis untuk memberikan penilaian objektif dan digunakan sebagai indikator fisik selama penyimpanan yang dapat mempengaruhi khasiat ekstrak. Selanjutnya dilakukan uji fitokimia untuk mengidentifikasi komposisi kimia dalam tanaman. Dalam ekstrak etanol daun kupu-kupu, teridentifikasi beberapa senyawa, yaitu alkaloid, flavonoid, saponin, dan tanin. Dalam proses identifikasi senyawa metabolit sekunder, khususnya tanin dilakukan dengan penambahan larutan FeCl_3 . Uji fitokimia ini bertujuan untuk mendeteksi adanya gugus fenol dalam sampel. FeCl_3 digunakan karena dapat

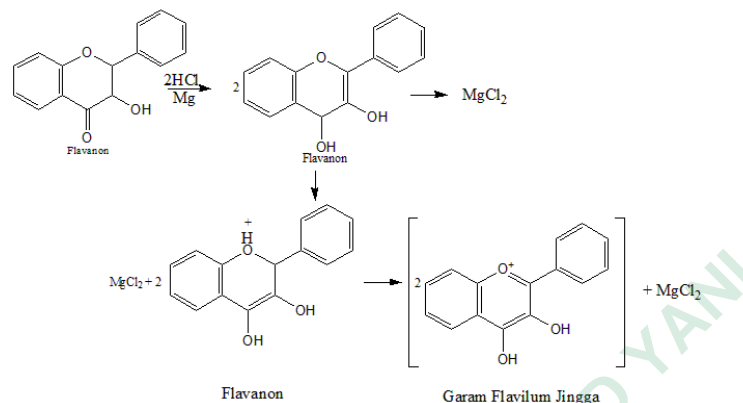
bereaksi dengan gugus fenol, dan kehadiran gugus fenol akan ditandai dengan perubahan warna menjadi hijau kehitaman setelah penambahan FeCl_3 , dirujuk pada **Gambar 8**. Jika hasil uji fitokimia dengan FeCl_3 menunjukkan perubahan warna, hal tersebut mengindikasikan kemungkinan adanya senyawa fenol dalam sampel. Senyawa fenol yang teridentifikasi bisa berupa tanin, yang merupakan salah satu jenis senyawa polifenol. Tanin adalah senyawa polifenol yang sering ditemukan dalam tanaman dan dikenal memiliki berbagai manfaat biologis, termasuk aktivitas antioksidan dan antimikroba. Pada metode ini dapat dipastikan bahwa tanin ialah salah satu komponen utama yang terdapat dalam ekstrak daun kupu-kupu. (Listiana *et al.*, 2022).



Gambar 8. Senyawa Tanin dengan FeCl_3 (Fatonah *et al.*, 2021)

Hasil analisis senyawa alkaloid menggunakan reagen Mayer, Wagner, dan Dragendorff menunjukkan hasil negatif (-) yaitu tidak terdeteksinya kandungan senyawa alkaloid dalam ekstrak etanol 70% maupun 96%. Sehingga ekstrak daun kupu-kupu tidak mengandung senyawa alkaloid yang dapat terdeteksi dengan reagen-reagen tersebut. Penambahan HCl 2N dilakukan karena alkaloid bersifat basa dan lebih baik diekstraksi dengan pelarut asam. Negatifnya hasil ini mungkin disebabkan oleh pembentukan kompleks kalium alkaloid yang tidak mencapai kejenuhan atau kandungan alkaloid yang rendah dalam ekstrak, sehingga ekstraksi tidak sempurna (Minarno, 2015). Kandungan flavonoid dalam ekstrak daun kupu-kupu dapat diindikasikan dengan terbentuknya warna jingga. Perubahan warna disebabkan oleh reaksi reduksi antara ekstrak dan serbuk magnesium (Mg) yang dicampur dengan HCl pekat. Warna jingga menunjukkan adanya flavonoid golongan flavon, auron, atau khalkon, sedangkan untuk golongan flavonoid

lainnya, warna yang terbentuk adalah ungu (xanthone), merah muda (flavonol), dan merah (2,3-dihidroflavonol) dirujuk pada **Gambar 9** (Oktavia & Sutoyo, 2021).



Gambar 9. Reaksi flavonoid dengan logam Mg dan HCl

Ekstrak etanol 70% dan etanol 96% juga terdapat senyawa saponin, yang ditunjukkan oleh terbentuknya busa setinggi 1-2 cm akibat pengocokan yang kuat dan penambahan HCl 2N untuk menstabilkan busa. Hasil skrining fitokimia ini sesuai dengan penelitian Purwasari (2021) menunjukkan bahwa ekstrak etanol 70% dan etanol 96% dari daun kupu-kupu mengandung beberapa senyawa aktif, yaitu flavonoid, saponin, dan tanin. Namun, uji tersebut juga mengindikasikan ekstrak tidak mengandung senyawa alkaloid.

Uji kualitatif menggunakan metode kromatografi lapis tipis (KLT) dilakukan untuk memperkuat hasil skrining fitokimia dengan fokus pada golongan senyawa yang menunjukkan hasil positif dalam skrining fitokimia. Kromatografi lapis tipis adalah teknik pemisahan senyawa kimia yang melibatkan penggunaan fase diam dan fase gerak. Tahapan pertama dilakukan optimasi fase gerak untuk menentukan campuran pelarut yang tepat. Hal ini penting karena sifat kepolaran fase gerak dapat mempengaruhi pemisahan senyawa-senyawa dalam ekstrak, sehingga berdasarkan **Tabel 7** diperoleh optimasi fase gerak yang baik yakni menggunakan pelarut methanol : etil asetat (8:2). Prinsip dasar dari metode KLT mencakup dua proses utama: adsorpsi dan partisi. Fase diam biasanya berupa lapisan tipis silika gel atau alumina yang terlapis pada plat kaca, berfungsi untuk menahan senyawa-senyawa kimia. Silika gel 60 F₂₅₄ yang digunakan memiliki indikator fluoresensi yang bersinar di bawah sinar UV pada panjang gelombang 254 nm menghasilkan pita

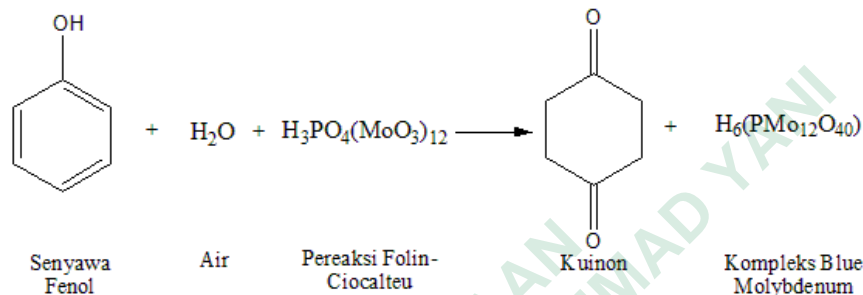
pemisahan berwarna gelap. Ketika disinari UV pada 366 nm, adsorben ini tidak fluoresen sehingga latar belakang tetap gelap. Sebaliknya, senyawa dengan gugus kromofor dan ausokrom pada pita akan berinteraksi dengan UV 366 nm dan bersinar, menghasilkan pita pemisahan yang terlihat (Kautsari *et al.*, 2021). Tujuan pemanasan pada proses Kromatografi Lapis Tipis (KLT) adalah untuk mempercepat reaksi pembentukan warna serta meningkatkan intensitas warna bercak yang dihasilkan (Vazira, 2023). Konsentrasi yang digunakan untuk ekstrak dan standar pada penotolan adalah ekstrak dengan konsentrasi 20.000 ppm dan standar asam galat dengan konsentrasi 5000 ppm. Setelah penotolan selesai, langkah berikutnya adalah proses penjenuhan yang dilakukan dengan memasukkan fase gerak ke dalam chamber dan menempatkan kertas saring di dalam chamber hingga terendam oleh fase gerak. *Chamber* kemudian ditutup rapat-rapat lalu dibiarkan hingga kertas saring menyerap fase gerak secara menyeluruh, menandakan bahwa chamber telah jenuh. Penjenuhan ini penting untuk memastikan proses elusi yang efektif selama pemisahan senyawa, mengingat tekanan uap pelarut yang dapat mempengaruhi hasil pemisahan (Yumita *et al.*, 2023). Berdasarkan **Gambar 6** hasil uji KLT ekstrak etanol 70% dan ekstrak etanol 96% daun kupu-kupu (*Bauhinia purpurea* L.) menunjukkan adanya kandungan tanin. Senyawa tanin dalam ekstrak membentuk noda pada plat KLT yang terlihat sebagai spot berwarna biru kehitaman ketika diperiksa dengan sinar UV 254 nm, dan berwarna biru kehitaman namun pudar saat diperiksa dengan sinar UV 365 nm. Warna ini mengindikasikan keberadaan tanin dalam sampel. Namun noda yang dihasilkan dari ekstrak etanol 96% menunjukkan intensitas warna kuning, kemungkinan karena adanya campuran dengan senyawa lain, sehingga noda tampak kurang jelas. Hal tersebut sesuai dengan penelitian yang dilakukan Rusmawijayanto & Luliana, (2019) bahwa senyawa fenol ditunjukkan dengan warna biru kehitaman serta warna kuning yang timbul merupakan senyawa dari flavonoid. Nilai R_f (rasio jarak migrasi senyawa terhadap jarak migrasi fase gerak) adalah parameter penting dalam KLT untuk mengidentifikasi senyawa. Kisaran 0,2-0,8 merupakan nilai R_f yang baik (Ferdinan *et al.*, 2022) dan nilai R_f antara standar dan sampel dikatakan positif jika masuk rentang antara $\pm 0,05$ (Oktaviantari *et al.*,

2019). Dilihat pada **Tabel 8** nilai Rf sampel yang diuji dan nilai Rf baku pembanding hampir sama, menunjukkan bahwa ekstrak etanol 70% dan etanol 96% daun kupu-kupu mengandung tanin. Sehingga uji KLT mengkonfirmasi hasil skrining fitokimia dan memberikan bukti lebih lanjut mengenai keberadaan senyawa tanin dalam ekstrak daun kupu-kupu (Pratiwi *et al.*, 2023).

Setelah melakukan serangkaian analisis fitokimia dan kromatografi lapis tipis, menunjukkan hasil bahwa ekstrak etanol 70% dan 96% dari daun kupu-kupu (*Bauhinia purpurea* L.) positif mengandung senyawa tanin. Langkah selanjutnya adalah penetapan kadar total tanin dalam sampel ekstrak daun kupu-kupu. Pada penelitian ini digunakan standar tanin berupa asam galat. Asam galat digunakan untuk mengukur kadar total tanin dalam sampel yang hasilnya dinyatakan dalam GAE (*Gallic Acid Equivalent*).

Tahap awal pada penentuan kadar total tannin adalah melakukan penetapan panjang gelombang maksimum untuk menentukan panjang gelombang optimal yang diperlukan untuk mencapai serapan maksimum dari senyawa yang diukur (Anngela *et al.*, 2021). Pada uji ini, larutan standar asam galat digunakan untuk menentukan panjang gelombang maksimum. Hasil uji menunjukkan bahwa panjang gelombang maksimum untuk asam galat adalah 757 nm dengan nilai absorbansi sebesar 0,635 sehingga sesuai dengan penelitian yang telah dilakukan oleh (Thakur & Kumari, 2022). Hal ini menandakan pada panjang gelombang tersebut, asam galat menunjukkan serapan tertinggi. Kemudian dilakukan pengukuran *Operating time* untuk mengetahui waktu optimal saat absorbansi suatu senyawa mencapai kestabilan. *Operating time* adalah waktu yang diperlukan agar absorbansi stabil pada nilai tertentu. Proses ini penting untuk memastikan keakuratan pengukuran dan mengurangi kemungkinan kesalahan akibat fluktuasi absorbansi selama waktu pengukuran (Suharyanto & Prima, 2020). Berdasarkan lampiran 8, nilai absorbansi yang stabil mulai tercapai pada menit ke-31 di mana nilai absorbansi stabil adalah 0,640 sesuai dengan penelitian (Thakur & Kumari, 2022).

Penetapan kadar tanin menggunakan metode spektrofotometri UV-Vis melibatkan reagen *Folin-Ciocalteu*. Dalam reaksi ini, standar asam galat berfungsi sebagai agen reduktor dan *Folin-Ciocalteu* sebagai agen oksidator. Hasil dari reaksi ini adalah pembentukan warna biru, dapat diukur pada panjang gelombang maksimum dirujuk pada **Gambar 10** (Noviyanty *et al.*, 2020).



Gambar 10. Reaksi Tanin dengan *Folin Ciocalteu*

Metode *Folin-Ciocalteu* didasarkan pada pembentukan senyawa kompleks berwarna biru yang diukur pada panjang gelombang maksimum dalam rentang λ 400-800 nm. Proses ini dimulai dengan oksidasi fenolat (garam alkali) atau gugus fenolik-hidroksi oleh reagen *Folin-Ciocalteu*. Senyawa ini kemudian mengurangi asam heteropoli yang terkandung dalam reagen tersebut, seperti fosfomolibdat-fosfotungstat, dan membentuk kompleks molibdenum-tungsten (Fatonah *et al.*, 2021). Dalam penentuan kadar tanin, penambahan reagen *Folin-Ciocalteu* bertujuan untuk memastikan bahwa panjang gelombang yang digunakan berada dalam rentang tampak, sehingga bisa diukur menggunakan spektrofotometer Uv-Vis. Selanjutnya, penambahan Na₂CO₃ 35% berfungsi untuk membentuk senyawa kompleks dengan senyawa-senyawa fenolik yang ada dalam sampel, dan menggeser panjang gelombang ke daerah tampak, mempermudah pengukuran (Listiana *et al.*, 2022). Penggunaan standar asam galat menurut penelitian (Aryantini, 2021) mengungkapkan bahwa memiliki nilai kadar total tanin yang tinggi, hal ini dikarenakan asam galat memiliki gugus fenol yang stabil, murni, dan ekonomis dalam penggunaannya (Utomo & Rizki, 2023). Kurva baku asam galat yang dihasilkan penelitian ini menunjukkan persamaan regresi linier $y = 0,0058x - 0,0313$ dengan nilai koefisien determinasi (r) sebesar 0,9996. Nilai r yang mendekati 1 menunjukkan bahwa persamaan regresi tersebut memiliki hubungan

yang sangat kuat dan linier antara konsentrasi asam galat dan nilai absorbansinya, sehingga hubungannya berbanding lurus (Yumita *et al.*, 2023) (**Gambar 7**).

Pada uji kualitatif diperoleh kadar total tanin ekstrak etanol 96% ($18,623 \pm 1,766$ mg GAE/g) lebih tinggi dibandingkan dengan etanol 70% ($17,914 \pm 2,049$ mg GAE/g) hal ini dikarenakan pada indeks polaritas etanol 96% kurang polar daripada etanol 70%. Dilihat dari hasil statistik kadar tanin yang diekstraksi menggunakan etanol 70% tidak menunjukkan perbedaan signifikan dibandingkan kadar tanin yang diekstraksi menggunakan etanol 96%, seperti yang ditunjukkan oleh nilai sig $>0,05$ sehingga hal tersebut sesuai dengan penelitian Swasono *et al.* (2022) yang menyatakan bahwa perbedaan konsentrasi etanol dapat mengakibatkan perubahan polaritas pelarut sehingga mempengaruhi kelarutan senyawa bioaktif. Perbedaan polaritas pelarut yang digunakan mempengaruhi rendemen ekstrak tanin. Hal ini dikarenakan tanin adalah senyawa polifenol dengan berat molekul tinggi yang dapat membentuk kompleks dengan protein, sehingga kelarutannya meningkat dalam pelarut etanol pada konsentrasi tinggi. Tanin dapat membentuk ikatan kimia dengan protein atau polimer lainnya melalui ikatan hidrogen, ikatan ionik, dan ikatan kovalen (Irianty & Yenti, 2014). Kandungan total tannin dalam ekstrak daun kupu-kupu diharapkan berkontribusi dalam pengobatan dengan efek farmakologi yang bermanfaat, seperti antimikroba, antidiabetes, analgesik, antiradang, dan antidepresan (Harda *et al.*, 2023).