

Artikel Penelitian

Penentuan Kandungan Total Fenol Dalam Ekstrak Etanol Daun Sirih Merah dan Hitam Dengan Memanfaatkan Teknik Spektrofotometri

Safira Evani¹, Litalia Early Katreen Junior¹, Meyke Herina Syafitri^{1*}

¹Akademi Farmasi Surabaya

*) E-mail: meyke.herina@akfarsurabaya.ac.id

Diterima : Agustus 2023

Disetujui : Januari 2024

ABSTRAK

Tanaman-tanaman dengan khasiat obat telah dikenal oleh masyarakat Indonesia sejak zaman dahulu, termasuk diantaranya adalah sirih merah (*Piper crocatum* Ruiz & Pav) dan sirih hitam (*Piper betle* var. *nigra*). Daun dari kedua tanaman ini diketahui mengandung flavonoid, minyak atsiri, tanin dan polifenol. Tujuan dari penelitian ini adalah untuk mengukur kandungan total fenol dalam ekstrak etanol daun sirih merah dan hitam menggunakan metode Folin-Ciocalteu dengan bantuan alat spektrofotometer. Sebagai pembanding, larutan asam galat digunakan untuk mendapatkan kuva baku. Hasil analisis menunjukkan persamaan regresi liner yaitu $y = 0,0028x + 0,1902$, dengan nilai koefisien korelasi (r) sebesar 0,9919. Penetapan kandungan total fenol dari masing-masing sampel dilakukan dengan tiga kali replikasi. Diperoleh rata-rata kandungan total fenol pada ekstrak etanol daun sirih merah dan hitam berturut-turut sebesar 31,87 dan 39,09 mg GAE (*gallic acid equivalent*) per gram ekstrak. Data ini mengindikasikan bahwa ekstrak etanol daun sirih hitam memiliki kandungan total fenol yang lebih besar dibandingkan dengan sirih merah.

Kata kunci: *Piper crocatum*, *Piper betle* var. *nigra*, Fenol total, Spektrofotometri.

Quantification of Total Phenol Concentration in Ethanol Extracts of Red and Black Betel Leaves Using UV-Vis Spectrophotometric Method

ABSTRACT

Red betel (*Piper crocatum* Ruiz & Pav) and black betel leaves (*Piper betle* var. *nigra*) are plant varieties known for their medicinal properties. These plants have various contents including flavonoids, essential oils, tannins and polyphenols. The objective of this research is to ascertain the quantity of phenolic compounds present in ethanol extracts of red and black betel leaves. Determination of the levels of ethanol extracts of red and black betel leaves is done quantitatively by the folin-ciocalteu method. This method relies on the formation of a blue complex compound of of phosphomolybdat-phosphotungstat, generated by the reduction of phenolic compounds in an alkaline environment. The measurement is performed using uv-vis spectrophotometry. Gallic acid, derived from hydroxybenzoic acid and identified as a simple phenolic acid, is employed. This stable and pure polyphenolic compound is commonly found in almost all plants. Drawing conclusions from the study results, it can be affirmed that the average total phenol concentration of red betel was 31.87 GAE per gram extract and the average total phenol concentration of black betel leaves was 39.09 mg GAE per gram extract.

Keywords: Red and black betel leaf, Phenolic compounds, UV-Vis Spectrophotometry.

1. PENDAHULUAN

Indonesia adalah negara yang kaya akan keanekaragaman hayati terutama dengan tanaman obat. Daun sirih merah (*Piper crocatum* Ruiz & Pav) dan daun sirih hitam (*Piper betle* var. *nigra*) merupakan tumbuhan berkhasiat obat yang termasuk dalam familia *Piperaceae*. Daun sirih merah memiliki banyak manfaat diantaranya dapat mengobati penyakit keputihan dan penyakit mata (1),

sedangkan daun sirih hitam digunakan untuk mengobati sakit perut, maag, kencing manis dan diabetes melitus (2). Baik daun sirih merah maupun hitam mengandung senyawa kimia tanin, flavonoid, minyak atsiri, saponin dan polifenol (3).

Senyawa fenolik memiliki variasi struktur yang luas dan mudah ditemukan di semua tanaman (4). Gugus OH pada fenolik dapat bereaksi dengan

reagen folin ciocalteu, membentuk senyawa kompleks berwarna biru dari fosfomolibdat-fosfotungstat yang direduksi senyawa fenolik dapat terdeteksi dengan spektrofotometri uv-vis (5). Spektrofotometri UV-Vis bisa mendeteksi fenol karena adanya ikatan konjugasi pada gugus kromofor, dalam hal ini adalah senyawa benzena pada fenol (6).

Asam galat digunakan sebagai pembanding pada penetapan kandungan fenol. Senyawa ini merupakan turunan dari asam hidroksibenzoat yang termasuk dalam kategori asam fenol sederhana. Selain itu, asam galat merupakan senyawa polifenol yang dapat ditemukan secara umum pada berbagai jenis tanaman yang bersifat stabil (4).

Dengan dasar tersebut, penulis menjalankan penelitian untuk mengetahui jumlah kadar fenol total ekstrak etanol 96 % dari daun sirih merah dan hitam menggunakan Spektrofotometri UV-Vis dan penelitian ini dilakukan juga untuk membandingkan kadar fenol total antara sirih merah dan hitam.

2. METODE PENELITIAN

2.1. Rancangan Penelitian

Penelitian eksperimental ini bertujuan untuk mengetahui kandungan total fenol ekstrak etanol 96% dari daun sirih merah dan hitam menggunakan spektrofotometer UV-Vis dengan metode folin-ciocalteu.

2.2. Alat dan Bahan

a. Alat

Mikropipet 100-1000 μ l (Vitelab), rotary vacuum evaporator (Heidolph), timbangan analitik (Ohaus, tipe PA224), kuvet, dan Spektrofotometer UV-Vis (Thermoscientific, tipe Genesis10s).

b. Bahan

Baik daun sirih merah maupun hitam diperoleh dari UPT Laboratorium Herbal Medica Batu, etanol 96%, reagen folin ciocalteu (Merck), natrium karbonat (Merck), asam galat (Sigma Aldrich), metanol (Fulltime).

2.3. Prosedur Kerja

a. Ekstraksi sampel

Serbuk daun sirih merah dan hitam yang sudah dikeringkan, ditimbang masing-masing sebanyak 500 gram dan dimaserasi dengan pelarut etanol 96% sebanyak 1,5 liter selama 24 jam. Kemudian dilakukan remaserasi sebanyak 2 kali menggunakan pelarut etanol

96% sebanyak 1 liter. Total filtrat yang diperoleh dipekatkan menggunakan rotary evaporator pada suhu 40 °C. Didapatkan ekstrak kental etanol 96% daun sirih merah dan hitam.

2.4. Analisis Kuantitatif

a. Penentuan operating time

Penentuan operating time dilakukan dengan memipet 200 μ l larutan asam galat 200 ppm, ditambahkan aquadest 15,8 ml dan 1 ml reagen folin ciocalteu, diaduk hingga homogen, kemudian didiamkan selama 8 menit. Selanjutnya ditambahkan natrium karbonat 20% sebanyak 3 ml, diaduk. Berdasarkan penelitian (Pamungkas 2016) absorbansi larutan dibaca pada panjang gelombang 765 nm (7). Pembacaan absorbansi dilakukan tiap interval 5 menit sampai diperoleh data absorbansi yang stabil.

b. Penetapan panjang gelombang maksimum

Penentuan panjang gelombang maksimum diawali dengan memipet larutan asam galat 200 ppm sebanyak 200 μ L, ditambahkan aquadest 15,8 mL dan reagen folin-ciocalteu sebanyak 1 mL, diaduk hingga homogen dan dibiarkan selama 8 menit. Selanjutnya natrium karbonat 20% sebanyak 3 ml ditambahkan, diaduk. lalu didiamkan selama *operating time* yang telah diperoleh pada poin a. Absorbansi dibaca pada panjang gelombang 600-800 nm.

c. Pembacaan absorbansi larutan pembanding

Penentuan absorbansi asam galat dilakukan dengan menggunakan konsentrasi 100, 125, 150, 175, dan 200 ppm, masing-masing diambil sebanyak 200 μ l. Selanjutnya ditambahkan 15,8 mL aquades dan 1 ml reagen folin-ciocalteu, diikuti oleh pengadukan hingga homogen dan diinkubasi selama 8 menit. Natrium karbonat 20% sebanyak 3 ml ditambahkan, diaduk, dan didiamkan selama *operating time*. Absorbansi diukur pada panjang gelombang maksimum dan dihitung menggunakan persamaan regresi linier $y = bx + a$.

d. Penentuan konsentrasi total fenol

Penentuan konsentrasi total fenol dilakukan dengan menimbang sampel ekstrak masing-masing sebanyak 35 mg dan direplikasi 3 kali. Selanjutnya masing-masing dilarutkan dalam 10 mL etanol 96%. Larutan sampel diambil sebanyak 200 μ L ditambahkan aquadest 15,8

ml dan reagen folin-ciocalteu sebanyak 1 mL, diaduk hingga homogen, kemudian diinkubasi selama 8 menit. Selanjutnya natrium karbonat 20% sebanyak 3 ml ditambahkan, diaduk. lalu didiamkan selama *operating time*. Serapan diukur pada pada lambda maksimum.

e. Analisis data

Data absorbansi larutan baku asam galat diolah menggunakan microsoft excel untuk mendapatkan persamaan regresi larutan perbandingan $y = bx + a$. Selanjutnya nilai serapan dari sampel dimasukkan ke dalam persamaan tersebut. Data konsentrasi total fenol masing-masing sampel selanjutnya dianalisis statistik menggunakan *software IBM SPSS Statistics 25*.

3. HASIL DAN PEMBAHASAN

Daun sirih merah dan hitam banyak digunakan sebagai bahan dalam ramuan obat tradisional untuk mengatasi sakit perut, maag, diabetes mellitus, hipertensi, keputihan, dan sakit mata (1,8). Inilah yang mendorong para peneliti untuk mengeksplorasi potensi yang terkandung dalam sirih merah dan hitam. Tanaman sirih merah dan hitam mengandung berbagai senyawa fitokimia seperti alkaloid, tannin, polifenol dan minyak volatil. Senyawa yang terdapat dalam sirih merah dan hitam merupakan metabolit sekunder yang memiliki potensi yang dapat dijadikan sebagai bahan obat.

Pada penelitian ini, metode ekstraksi maserasi digunakan. Metode ini dipilih karena sederhana dan tidak membutuhkan pemanasan. Ini memungkinkan untuk mencegah kerusakan pada senyawa metabolit sekunder yang sensitif terhadap suhu tinggi (4). Ethanol dipilih karena bersifat semi-polar dan mampu larut dalam berbagai senyawa, seperti tannin, flavonoid, fenol, dan minyak atsiri (9).

Karena senyawa fenolik dapat bereaksi dengan folin membentuk larutan berwarna yang dapat diukur absorbansinya, penetapan kadar senyawa fenolik dilakukan dengan menggunakan pereaksi folin ciocalteu (4). Ini karena gugus hidroksil pada komponen fenolik dengan reagen folin ciocalteu menghasilkan warna biru yang dapat dilihat dengan spektrofotometri UV-Vis (5). Metode ini mengukur konsentrasi suatu senyawa yang didasarkan pada kemampuan senyawa untuk mengabsorpsi berkas sinar atau cahaya, yang menghasilkan sinar monokromatis dalam jangkauan panjang gelombang antara 200 dan 800 nanometer. Kelebihan spektrofotometri UV-Vis adalah bahwa alat ini tidak

mahal, mudah digunakan, dan hasilnya cukup akurat (8).

Untuk mengetahui konsentrasi senyawa fenolik, pereaksi Folin-Ciocalteu digunakan (4). Gugus hidroksil pada komponen fenolik bereaksi dengan reagen Folin-Ciocalteu, menghasilkan warna biru yang dapat dilihat dengan spektrofotometri UV-Vis (5).

Penetapan *operating time* digunakan untuk mengetahui berapa lama suatu senyawa membutuhkan waktu untuk mencapai serapan maksimum. Senyawa fenol memerlukan waktu agar reaksi yang terbentuk mencapai kestabilan. Jika pengukuran dilakukan sebelum *operating time*, ada kemungkinan bahwa reaksi yang terbentuk belum mencapai kesempurnaan (10). Penentuan *operating time* dilakukan dengan mengukur serapan pada panjang gelombang 765 nm dalam rentang waktu 100 menit (serapan dicatat tiap interval 5 menit). Tercatat bahwa serapan maksimum terjadi pada menit ke-60, yang mengindikasikan bahwa senyawa fenol sudah maksimum bereaksi dengan *folin ciocalteu* yang ditandai dengan tercapainya absorbansi maksimum pada menit ke-60. Waktu ini selanjutnya digunakan untuk inkubasi pada tahapan-tahapan selanjutnya untuk menentukan kadar fenol total sampel.

Penentuan panjang gelombang maksimum dilakukan untuk memastikan bahwa absorbansi sampel berada pada panjang gelombang maksimum, sehingga hasil yang diperoleh menjadi maksimal (10). Proses penentuan panjang gelombang maksimum ini melibatkan pengukuran serapan larutan standar asam galat. Hasil pengukuran menunjukkan bahwa larutan standar asam galat memberikan serapan maksimum pada panjang gelombang 751,0 nm.

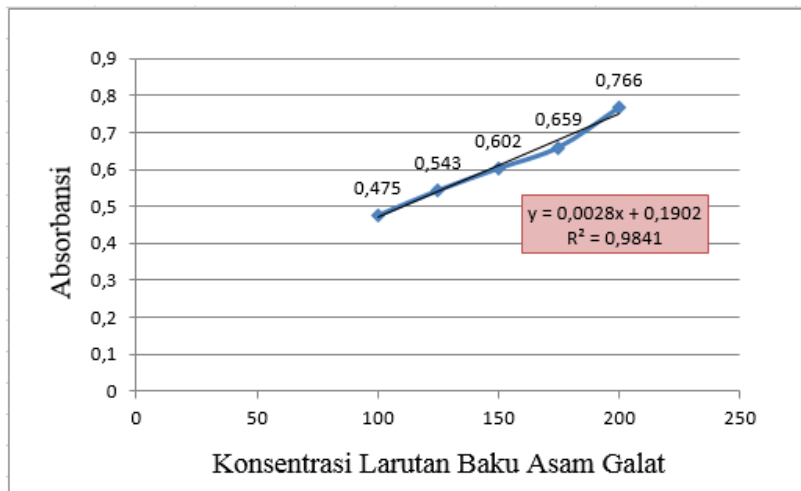
Senyawa standar yang dipilih adalah asam galat, karena memiliki reaktivitas tinggi terhadap reagen Folin-Ciocalteu dan dianggap sebagai senyawa fenolik alami yang stabil (11). Absorbansi dari larutan baku asam galat dapat ditemukan dalam Tabel 1 di bawah ini:

Tabel 1. Penentuan Absorbansi Asam Galat

Konsentrasi (ppm)	Absorbansi
100	0,475
125	0,543
150	0,602
175	0,659
200	0,766

Melalui perhitungan, diperoleh persamaan regresi larutan asam galat yaitu $y = 0,0028x +$

0,1902 dengan nilai koefisien korelasi (r) 0,9919. Kurva regresi linier tercantum dalam Gambar 1:



Gambar 1. Kurva linier larutan baku asam galat

Selanjutnya nilai serapan sampel yang telah didapat, dimasukkan ke persamaan regresi linier tersebut dan dihitung kadar fenol totalnya Hasilnya sebagai berikut:

Tabel 2. Penentuan konsentrasi total fenol sampel

Sampel	Replikasi	Absorbansi	Konsentrasi Total Fenol (mg GAE/g ekstrak)
Sirih Merah	1	0,496	30,79
	2	0,502	31,81
	3	0,504	33,02
Sirih Hitam	1	0,569	38,65
	2	0,571	38,74
	3	0,581	39,87

Dengan merujuk data pada Tabel 2, diketahui konsentrasi total fenol sirih merah dan hitam berturut-turut sebesar $(31,87 \pm 1,12)$ dan $(39,09 \pm 0,68)$ mg GAE/g ekstrak. Setelah itu, data diuji statistik menggunakan *independent sample t-test*. Kesimpulannya, bahwa kadar fenol total ekstrak sirih hitam secara signifikan lebih tinggi dibandingkan dengan sirih merah.

4. KESIMPULAN

Kadar fenol total rata-rata sirih hitam secara nyata lebih besar daripada sirih merah.

6.PENDANAAN

Penelitian ini tidak didanai oleh pihak manapun.

7.KONFLIK KEPENTINGAN

Seluruh penulis menyatakan tidak terdapat potensi konflik kepentingan dengan penelitian, kepenulisan (*authorship*), dan atau publikasi artikel ini.

DAFTAR PUSTAKA

1. Jei WP. Efektivitas pelarut etanol 96 % dan aquadest pada ekstrak jahe merah terhadap jamur candida albicans (In Vitro). Efektivitas Pelarut Etanol 96 % dan Aquadest Pada Ekstrak Jahe Merah Terhadap Jamur Candida albicans (In Vitro). Universitas Sumatera Utara Medan; 2018.
2. Siregar KAAK, Hamzah H, Kustiawan PM, Wimawati, Lutfi CFM. Bioactivity and Phytochemical Compound Test on Black Betel Leaves (Piper betle var. nigra) A Literature Review. Int J Med Sci Dent Res [Internet]. 2022;5(1):37–43. Available from: <https://www.researchgate.net/publication/357899808>.
3. Indah D. Aktivitas antibakteri ekstrak etanol 70 % daun sirih hitam (Piper betle L var nigra) terhadap bakteri Staphylococcus aureus. 2019;
4. Novitasari H. Analisis Senyawa Fenolik Pada Ekstrak Segar Daun Sirih Merah (Piper crocatum Ruiz & Pav) Menggunakan Metode Follin Ciocalteu Secara Spektrofotometri UV-Vis. J Anal Farm. 2018;3(3):155–63.
5. Supriningrum R, Nurhasnawati H, Faisah S. Penetapan kadar fenolik total ekstrak etanol daun serunai (Chromolaena odorata L.) dengan metode Spektrofotometri UV-Vis. Al Ulum J Sains Dan Teknol. 2020;5(2):54.
6. Marpaung melda elfryda, Luliana S, Susanti R. Uji Aktivitas Krim Ekstrak Metanol Bunga Rosella

- (Hibiscus sabdariffa) Sebagai Tabir Surya. J Mhs Farm Fak Kedokt UNTAN. 2015;3(1):3–8.
7. Pamungkas JD, Anam K, Kusri D. Penentuan Total Kadar Fenol dari Daun Kersen Segar, Kering dan Rontok (*Muntingia calabura* L.) serta Uji Aktivitas Antioksidan dengan Metode DPPH. J Kim Sains dan Apl. 2016;19(1):15.
 8. Dewi AP. Penetapan kadar vitamin C dengan spektrofotometri Uv-Vis pada berbagai variasi buah tomat. 2018;II(1):9–14.
 9. Suharyanto, Prima DAN. Penetapan Kadar Flavonoid Total pada Daun Ubi Jalar Ungu (*Ipomoea batatas* L.) yang Berpotensi Sebagai Hepatoprotektor dengan Metode Spektrofotometri UV-Vis. Cendekia J Pharm. 2020;4(2):110–9.
 10. Anngela O, Muadifah A, Nugraha DP. Validasi Metode Penetapan Kadar Boraks pada Kerupuk Puli Menggunakan Spektrofotometer UV-Vis. J Sains dan Kesehat. 2021;3(4):375–81.
 11. Sari AK, Ayuchecaria N. Penetapan Kadar Fenolik Total dan Flavonoid Total Ekstrak Beras Hitam (*Oryza Sativa* L) dari Kalimantan Selatan. J Ilm Ibnu Sina. 2017;2(2):327–35.

