

Validasi Metode Analisa Kadar Fenolik Ekstrak Etanol Daun Sirih Merah (*Piper crocatum*) dengan Menggunakan Spektroskopi UV-Vis

Rony Syahputera*

*Fakultas Farmasi, Program Studi Farmasi
Universitas Sumatera Utara, Indonesia
syahputerarony@gmail.com

ABSTRACT

Validation research has been carried out on the phenolic content analysis method using the Gallic Acid method on red betel ethanol extract. Red betel leaves in this research were previously characterized microscopically and macroscopically and a phytochemical screening test was carried out to determine the secondary metabolite content in the ethanol extract of red betel leaves. Next, extraction is carried out using the maceration method. The resulting extract is then analyzed to determine the phenolic content in the sample. Determination of phenolic content uses a method that is first calibrated, which includes linearity, LOD and LOQ, precision, accuracy and sensitivity. The results of each analytical parameter analysis are as follows: linearity = 0.9909, precision = 0.046; 0.06; 0.019 recovery = 98 and 102 %, sensitivity = 1.02. 105 L. Mol-1 cm-1. Analysis of the phenolic samples showed a concentration value of 150.04 mg GAE/gram of red betel extract.

Keywords: *Piper crocatum*, Gallic acid, Method Validation

ABSTRAK

Telah dilakukan penelitian validasi metode analisa kadar fenolik dengan menggunakan metode Asam Galat terhadap ekstrak etanol Sirih merah. Daun sirih merah pada penelitian ini sebelumnya di karakterisasi secara mikroskopis dan makroskopis serta dilakukan uji fitokimia skring untuk mengetahui kandungan metabolite sekunder pada ekstrak etanol daun sirih merah. Selanjutnya dilakukan ekstraksi dengan metode maserasi. Ekstrak yang telah dihasilkan kemudian dianalisa untuk menentukan kadar fenolik pada sample. Penentuan kadar fenolik ini menggunakan metode yang terlebih dahulu dikalibrasi yaitu mencakup linearitas, LOD dan LOQ, Presisi, Akurasi, dan sensitifitas. Hasil analisa parameter analitik tersebut masing-masing adalah sebagai berikut linearitas = 0,9909, Presisi = 0,046; 0,06; 0,019 recovery = 98 dan 102 %, sensitifitas = 1,02. 105 L. Mol⁻¹ cm⁻¹. Analisa sampel fenolik sampel menunjukkan nilai konsentrasi yaitu sebesar 150,04 mg GAE/gram ekstrak sirih merah.

Kata kunci: *Piper crocatum*, Asam galat, Validasi Metode

PENDAHULUAN

Indonesia merupakan negara kepulauan terdiri dari 62% perairan laut dan 38% wilayah darat dengan jumlah pulau sebanyak 17.508. Lima pulau terbesar di Indonesia yaitu Sumatera, Jawa, Kalimantan, Sulawesi dan Papua. Masing-masing pulau tersebut memiliki karakter topografi yang unik. Bentuk

permukaan pulau-pulau tersebut memberikan impresi terhadap kehidupan manusia di antaranya variasi iklim yang beragam, kesuburan berbagai tipe tanah, sistem perairan yang secara langsung akan mempengaruhi pola penyebaran berbagai vegetasi. Keanekaragaman vegetasi di Indonesia yang berkisar sekitar 47.000 jenis dikategorikan menjadi tiga bagian, di antaranya vegetasi

Validasi Metode Analisa Kadar Fenolik Ekstrak Etanol Daun Sirih Merah (*Piper crocatum*) dengan Menggunakan Spektroskopi UV-Vis

wilayah barat, vegetasi wilayah tengah dan vegetasi wilayah timur. Wilayah barat (sub-region Indonesia Malaysia) meliputi kepulauan Sumatera, Kalimantan, Jawa dan Bali. Wilayah tengah (Wallacea) meliputi kepulauan Sulawesi, Maluku dan Nusa Tenggara. Sedangkan wilayah timur (sub-region Australia) meliputi kepulauan Papua. Masing-masing wilayah memiliki flora endemik, yang tidak ditemukan di wilayah yang lain (Aziz, dkk., 2018).

Potensi Indonesia sebagai negara utama dalam pengembangan obatan herbal sangat terbuka. Hal ini didasari kekayaan spesies tumbuhan obat yang ada di Indonesia. Pengembangan obatan herbal pada dasarnya telah dilakukan sejak jaman dahulu kala. Banyak teknik pengobatan tradisional yang menggunakan tumbuhan obat dalam mengobati maupun mencegah penyakit. Beberapa teknik pengobatan tradisional itu menjadi suatu kearifan local, seperti yang ada di Provinsi Sumatera Utara beberapa contoh penggunaan obatan herbal digunakan oleh etnis Simalungun, Karo, Toba, Mandailing, Dairi, dan Nias. Penggunaan tumbuhan obat ini digunakan sebagai obat kanker, antidiabetes, antioksidan, dan antibakteri (Siregar, RS., dkk., 2020).

Sirih merah (*Piper crocatum*) adalah contoh tumbuhan obat yang sangat populer dimasyarakat Indonesia khususnya di Sumatera Utara. Sirih merah ini merupakan tumbuhan yang mudah ditemukan dan telah diaplikasikan penggunaannya dalam bidang kesehatan. Beberapa penelitian telah membuktikan khasiat tumbuhan ini yaitu sebagai antioksidan, antibakteri, bahan penyusun formula sabun, antidiabetes dan obat luka (Alfitri, T., 2014; Wati, YS., dkk., 2020; Widyawati, R., dkk., 2021)

Senyawa fenolik adalah bahan aktif yang merupakan hasil metabolit sekunder tumbuhan. Bahan aktif fenolik memiliki manfaat yang berlimpah terkhusus dalam bidang kesehatan. Senyawa fenolik telah banyak diteliti dan dijadikan salah satu obat dalam berbagai jenis penyakit seperti penyakit jantung. Hal ini didasari dari khasiat tannin yang memiliki

sifat antibakteri, antioksidan, antibiofouling pada makanan dan antikanker (Naufalza, A., 2021; Wibisono, Y., dkk., 2020).

Ekstraksi memiliki peran yang sangat penting dalam mengembangkan tumbuhan obat menjadi Obat Herbal Terstandar (OHT). Pemilihan metode ekstraksi harus dipertimbangkan dalam penggunaannya didasari oleh sifat fisika dan kimia analit atau senyawa aktif yang akan diekstrak. Metode ekstraksi golongan senyawa fenolik haruslah menggunakan metode ekstraksi dingin yang tidak menggunakan suhu yang tinggi. Hal ini disebabkan pada suhu yang tinggi akan merusak kadar Fenolik dalam sampel atau simplisia (Cahyani, DD., 2019).

Metode maserasi merupakan salah satu contoh model ekstraksi dingin yang sangat simple dalam penggunaannya namun tetap memiliki nilai recovery bahan aktif pada sampel yang baik (Gultom, RA, 2018).

METODOLOGI

Preparasi Sampel

Pembuatan ekstrak dilakukan dengan metode maserasi menggunakan pelarut etanol 96%. Sebanyak 600 g serbuk simplisia dimasukkan ke dalam sebuah bejana lalu dimaserasi dengan 750 mL pelarut etanol 96%, ditutup dibiarkan selama 5 hari dan terlindung dari cahaya sambil sering diaduk, diserkai, diperas dan disaring, cuci ampas dengan cairan penyari secukupnya hingga diperoleh 100 bagian. Kemudian dibiarkan selama 2 hari untuk proses dekantasi, terlindung dari cahaya, disaring. Ekstrak yang didapat kemudian diuapkan dengan menggunakan evaporator rotary vaccum pada suhu 50°C sampai tidak terdapat tetesan pelarut sehingga diperoleh ekstrak kental Daun Sirih Merah (*Piper crocatum*) (Ditjen POM RI, 1979).

Pembuatan Larutan Standar

Sebanyak 100 mg asam galat dimasukkan kedalam labu ukur 100 mL dan dilarutkan dengan etanol 96%. Dari larutan stok tersebut dibuat larutan standar asam galat dengan konsentrasi 10 ppm yang diencerkan

selanjutnya menjadi 1,2,3,4 dan 5 ppm. Hal ini digunakan untuk mengukur kurva standar asam galat. Pada masing-masing standar selanjutnya ditambahkan reagent folin-ciocalteu sebanyak 0,4 mL/10 mL larutan standar. Larutan selanjutnya diinkubasi selama 4-8 menit dan ditambahkan 4 mL Na_2CO_3 7%.

Penentuan Lamda Maksimum

Diambil salah satu konsentrasi larutan baku, diukur serapannya pada rentang panjang gelombang 400-800 nm. Panjang gelombang yang menunjukkan nilai serapan tertinggi merupakan panjang gelombang maksimum.

Penentuan Kurva Baku

Dibuat dengan menghubungkan konsentrasi larutan standar dengan hasil serapannya yang diperoleh dari pengukuran dengan menggunakan spektrofotometer UV-VIS pada panjang gelombang 740 nm.

Penentuan Linearitas

Linearitas diukur dengan melihat koefisien korelasi yang diperoleh dari kurva standar sebelumnya. Nilai regresi linear yang baik harus memiliki nilai $r^2 \geq 0,97$.

Penentuan Presisi

Penentuan presisi atau keterulangan dilakukan sama halnya dengan melakukan pengukuran absorbansi dari larutan standar asam galat 1 ppm, 3 ppm dan 5 ppm pada panjang gelombang maksimum yaitu 740 nm. Pengukuran absorbansi dilakukan pada hari yang sama dengan waktu yang berbeda dan pada hari yang berbeda di waktu yang sama. Hasil analisa dilakukan dengan menghitung nilai RSD dengan rumus berikut:

$$RSD = \frac{100 \times SD}{\bar{X}}$$

$$SD = \sqrt{\frac{\sum(X - \bar{X})^2}{(N-1)}}$$

Dengan X = nilai dari masing-masing pengukuran

$\bar{X}$ = rata-rata dari pengukuran

N = banyaknya data

$N-1$ = derajat kebebasan

SD = standar deviasi

Penentuan Akurasi

Penentuan akurasi dilakukan dengan teknik adisi yaitu dengan menambahkan larutan standar sebesar 1 ppm, 2 ppm, dan 3 ppm pada larutan sampel. Hasil analisa absorbansi akan menunjukkan akurasi dari metode yang digunakan. Pengukuran nilai akurasi dihitung dengan rumus sebagai berikut:

$$\% \text{ recovery} = \frac{C_{\text{spike sampel}} - C_{\text{unspike sampel}}}{C_{\text{ditambahkan}}}$$

Penentuan LOD dan LOQ

Penentuan LOD dan LOQ dilakukan sama dengan penentuan kurva standar seperti yang dilakukan sebelumnya. Kurva standar yang diperoleh selanjutnya dihitung nilai LOD dan LOQ dengan rumus sebagai berikut:

$$LOQ = \frac{10 \times sb}{m} ; \quad LOD = \frac{3,3 \times sb}{m}$$

Penentuan Sensitivitas

Dengan metode yang sama seperti di atas dilakukan pengukuran nilai sensitifitas dengan menggunakan persamaan baku sebagai berikut:

$$\text{Sensitivity } (\epsilon) = \frac{\text{Slope}}{b}$$

$$b = \text{cuvette thickness (cm)}$$

Kategori nilai sensitifitas yaitu sebagai berikut:

sensitifitas rendah: $\epsilon < 2 \times 10^4 \text{ L mol}^{-1} \text{ cm}^{-1}$

sensitifitas sedang: $\epsilon = 2-6 \times 10^4 \text{ L mol}^{-1} \text{ cm}^{-1}$

sensitifitas tinggi: $\epsilon > 6 \times 10^4 \text{ L mol}^{-1} \text{ cm}^{-1}$

Penetapan Kadar Fenolik pada Sampel

Sebanyak 0,5 gram maserat ditimbang dan dilarutkan dengan aquabidestilata sampai 10

Validasi Metode Analisa Kadar Fenolik Ekstrak Etanol Daun Sirih Merah (*Piper crocatum*) dengan Menggunakan Spektroskopi UV-Vis

ml. Jika belum larut sempurna bisa dibantu dengan alat yang berfungsi untuk menghomogenkan larutan. Dipipet 1,0 ml sampel dengan seksama, dimasukkan ke dalam wadah berukuran 10 ml yang telah berisi 7,5 ml aquabidestilat. Ditambahkan 0,4 ml pereaksi folin ciocalteu, didiamkan selama 4-8 menit, ditambahkan 4,0 ml larutan Na_2CO_3 7%. Diinkubasi selama 15 menit, kemudian dibaca serapannya pada panjang gelombang maksimum. Dihitung dengan menggunakan kurva baku yang telah didapat sehingga diketahui konsentrasi dari sampel yang diukur.

HASIL DAN PEMBAHASAN

Hasil Ekstraksi

Sampel serbuk simplisia daun sirih merah (*Piper crocatum* Ruiz & Pav.) yang digunakan sebanyak 433,345 g. Proses ekstraksi yang digunakan dengan metode maserasi menggunakan pelarut etanol (p.a). Proses maserasi dengan 7,5 L etanol (p.a) setiap ekstraksi, lalu direndam selama 2 hari kemudian dilakukan penyaringan menggunakan kertas Whatman No 1. Ekstrak (maserat) hasil maserasi ditampung dan dipekatkan dengan menggunakan evaporator rotari vakum sehingga diperoleh ekstrak kental. Ampas dimaserasi kembali sebanyak dua kali pengulangan dengan etanol (p.a) yang baru dengan 5 L per remaserasi. Total ekstrak yang diperoleh dari hasil ekstraksi sebanyak 17 L. Ekstrak etanol kental sirih merah (*Piper crocatum* Ruiz & Pav.) yang diperoleh sebanyak $65,05 \pm 0,006$ g.

Pemilihan penggunaan metode maserasi dalam proses ekstraksi didasarkan proses pengerjaannya pada suhu kamar. Proses pengentalan/pemekatan dengan evaporator rotari vakum dilakukan pada suhu 45°C . Pengulangan remaserasi yang dilakukan untuk memaksimalkan proses penyarian

senyawa metabolit sekunder yang terdapat dalam simplisia. Persen rendemen dari ekstrak etanol sirih merah (*Piper crocatum* Ruiz & Pav.) adalah 15,01%.

Penentuan Panjang Gelombang Maksimum

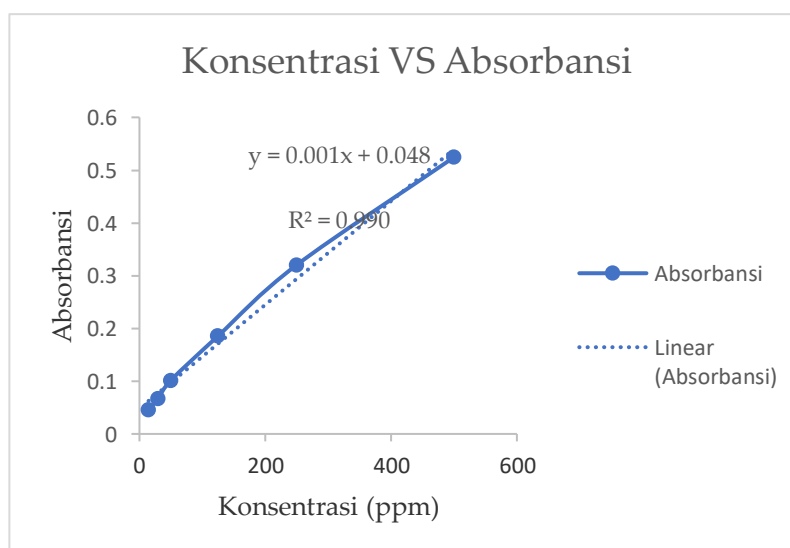
Analisis kadar fenolik juga menggunakan metode yang sama seperti analisis flavonoid yaitu menggunakan metode spektrofotometri Uv-Vis. Pengukuran panjang gelombang maksimum dilakukan untuk melihat panjang gelombang maksimum suatu larutan dimana larutan tersebut memberikan serapan terbesar. Penentuan panjang gelombang maksimum larutan dengan konsentrasi 100 ppm ditambahkan reagen Folin-Ciocalteu dan Na_2CO_3 7,5% dan didiamkan selama 17 menit (operating time). Kemudian larutan dibaca serapannya pada rentang 400-800 nm dan serapan terbesar pada panjang gelombang tertentu tersebut yang digunakan sebagai panjang gelombang maksimum. Hasil analisa menunjukkan bahwa nilai panjang gelombang maksimum sebesar 775 nm. Hal ini sesuai dengan hasil penelitian sebelumnya yang menunjukkan kisaran panjang gelombang maksimum asam galat sebesar 775 nm (Hapsari, 2018).

Penentuan Kurva Standar

Kurva standar yang dilakukan dalam menentukan linearitas antara konsnetrasi dengan absorbansi asam galat.

Tabel 1. Data konsentrasi vs absorbansi asam galat

No.	Konsentrasi (ppm)	Absorbansi
1	15	0,0452
2	30	0,0671
3	50	0,1009
4	125	0,1852
5	250	0,3201
6	500	0,5246



Gambar 1. Kurva Standar Asam Galat

Penentuan nilai LOD dan LOQ

Penentuan LOD dan LOQ dilakukan dengan menggunakan persamaan sebelumnya (pada BAB III). Hasil pengolahan data ditampilkan pada lampiran. Hasil analisa menunjukkan bahwa nilai LOD dan LOQ adalah sebagai berikut:

- $LOD = \frac{3,3 \times Sb}{m} = 0,781077885 \text{ mg/L}$
- $LOQ = \frac{10 \times Sb}{m} = 2,366902681 \text{ mg/L}$

Berdasarkan data tersebut dapat diketahui bahwa nilai LOD dan LOQ tergolong sangat rendah terutama jika dibandingkan dengan konsentrasi minimal yang digunakan dalam penentuan kurva kalibrasi. Sehingga dapat disimpulkan bahwa

metode ini memiliki nilai parameter analitik LOQ dan LOD sangat baik.

Penentuan Akurasi

Penentuan nilai akurasi menunjukkan nilai keakuratan dari metode analisa. Nilai akurasi dilakukan dengan metode adisi yaitu dengan menambahkan konsentrasi larutan standar dengan ukuran tertentu dalam sampel dan melihat nilai konsentrasi akhir yang terukur melalui konversi nilai absorbansi yang diperoleh. Nilai ini dikenal dengan istilah persen recovery. Nilai recovery yang baik dari suatu metode adalah berada pada range 80-120% (Harsojo, 2009). Data penelitian menunjukkan nilai recovery yaitu sebagai berikut:

Tabel 2. Penentuan Akurasi Metode

Asam galat yang ditambahkan (mg/L)	Absorbansi ($\lambda = 775 \text{ nm}$)				%Recovery
	I	II	III	Rata-rata	
30	0,0671	0,0671	0,0672	0,0671	98
50	0,0882	0,0881	0,0882	0,0882	108

Data tersebut menunjukkan bahwa nilai recovery metode analisa asam galat yang dilakukan sangat baik. Hal ini terlihat dari kesesuaian antara nilai persen recovery dengan aturan teoritis yang menunjukkan bahwa nilai recovery dari suatu metode yang baik adalah berada pada range 80-120%.

Penentuan Sensitivitas

Nilai sensitivitas metode ini memiliki besaran yaitu dengan membagi nilai slope terhadap nilai tebal kuvet. Dalam penelitian ini terlihat bahwa nilai slope pada kurva kalibrasi merupakan satuan ppm maka diubah terlebih dahulu kedalam satuan molaritas. Sehingga diperoleh persamaan baru

Validasi Metode Analisa Kadar Fenolik Ekstrak Etanol Daun Sirih Merah (*Piper crocatum*) dengan Menggunakan Spektroskopi UV-Vis

yaitu slopenya sebesar 1,02.105. Maka nilai sensitifitas = 1,02. 105 L. Mol-1 cm-1 tergolong sensitifitas tinggi.

sensitifitas rendah: $\varepsilon < 2 \times 10^4 \text{ L mol}^{-1} \text{ cm}^{-1}$

sensitifitas sedang: $\varepsilon = 2-6 \times 10^4 \text{ L mol}^{-1} \text{ cm}^{-1}$

sensitifitas tinggi: $\varepsilon > 6 \times 10^4 \text{ L mol}^{-1} \text{ cm}^{-1}$

Penentu Kadar Fenolik Pada Sampel

Kadar fenolik dari sampel terlihat dari data absorbansi yang diperoleh ($A = 0,0453$) sesuai prosedur. Nilai absorbansi selanjutnya dikonversi kedalam persamaan regresi linear sehingga diperoleh konsentrasi sementara adalah 15,02 ppm. Nilai konsentrasi ini dikalikan dengan faktor pengenceran (5 kali dan 2 kali untuk satuan pergram ekstrak sampel) dan yaitu sebesar 150,04 mg GAE/g Ekstrak. Hal ini menunjukkan bahwa nilai dari kandungan fenolik total pada ekstrak etanol daun sirih merah tergolong tinggi. Hasil penelitian ini juga didukung data sebelumnya bahwa nilai kadar fenolik total dari sampel ekstrak etanol sirih merah berkisar 142,6 mg GAE/ g Ekstrak (Prayitni, dkk, 2018).

KESIMPULAN

Penelitian ini menunjukkan nilai parameter analitik yang sangat baik mencakup nilai linearitas, presisi, akurasi, LOD, LOQ dan sensitifitas yang sangat baik yaitu dengan nilai linearitas = 0,9909, Presisi = 0,046; 0,06; 0,019 recovery = 98 dan 102 %, sensitifitas = 1,02. 105 L. Mol-1 cm⁻¹. Kadar fenolik total pada ekstrak etanol sirih merah sangat tinggi yaitu sebesar 150,04 mg GAE/ g ekstrak etanol Daun Sirih Merah

DAFTAR PUSTAKA

- Alfitri, T. 2014. Perbandingan efek ekstrak daun sirih hijau (*Piper betle* L.) dan daun sirih merah (*Piper crocatum*) terhadap pertumbuhan bakteri *Staphylococcus aureus*. Skripsi: Fakultas Kedokteran UIN Syarif Hidayatullah Jakarta.
- Aziz, IR., Anita Restu Puji Rahajeng, Susilo. (2018). Peran Etnobotani Sebagai

Upaya Konservasi Keanekaragaman Hayati Oleh Berbagai Suku di Indonesia. *Prosiding Seminar Nasional Megabiodiversitas Indonesia*.

Ditjen POM RI, (1995). *Farmakope Indonesia Edisi IV*. Jakarta: Departemen Kesehatan RI.

Ditjen POM RI. (1979). *Farmakope Indonesia Edisi Ketiga*. Jakarta: Departemen Kesehatan RI.

Kate, DI. (2014). Penetapan Kandungan Fenolik Total dan Uji Aktivitas Antioksidan Dengan Metode DPPH (1,1-Diphenyl-2-Pikrilhidrazil) Ekstrak Metanolik Umbi Bidara Upas (*Merremia mammosa* (Lour) Hallier F. Skripsi: Fakultas Farmasi Universitas Sanata Dharma.

Naufalza, A. (2021). Manfaat Daun Sirih Pada Pencegahan Penyakit Jantung Koroner. *Journal of Holistic and Traditional Medicine*. 6(2).

Siregar, RS., Rika Ampuh Hadiguna, Insannul Kamil, Novizar Nazir, Novialdi Novialdi. (2020). Permintaan Dan Penawaran Tanaman Obat Tradisional Di Provinsi Sumatera Utara. *Jurnal Tumbuhan Obat Indonesia*. 13(1).

Wati, YS., Ririn Muthia Zukhra, Ika Permanasari. (2020). Konsumsi Rebusan Daun Sirih Merah Efektif Terhadap Perubahan Kadar Gula Darah Penderita Diabetes Mellitus. *Jurnal Ilmu Kebidanan*. 9(2).

WHO. (1992). *Quality Control methods for Medicinal Plants Material*. *Journal of WHO/PHARM/92.559*. Switzerland, 25-27.

Wibisono, Y., Dian Savitri, Angky Wahyu Putranto, Ni'Matul Izza, Shinta Rosalia Dewi. (2020). Ekstraksi Senyawa Fenolik Dari Bawang Putih (*Allium sativum* L.) Untuk Agen Anti-Biofouling Pada Membran. *Jurnal Ilmu Rekayasa Pertanian dan Biosistem*. 8(1).

Widyawati, R., Ferrini Kasy, Retina Yunani, Junianto Wika Adi Pratama. (2021).

Efektivitas Salep Ekstrak Daun Sirih Merah (*Pipercrocatum*) Terhadap Luka Insisi Pada Tikus Putih (*Rattus norvegicus*). *VITEK-Bidang Kedokteran Hewan*. 11(2).