

Validasi Metode Analisa Kadar Fenolik Ekstrak Etanol Patikan Kebo (*Euphorbia hirta* L) dengan Menggunakan Spectroscopy UV- Vis

Mesi Puspita Sari*

*Program Studi Farmasi
Sekolah Tinggi Ilmu Kesehatan (STIKes) Senior Medan, Indonesia
puspitasarimesi@gmail.com

ABSTRACT

Validation research has been carried out on the phenolic content analysis method using the DPPH method on the ethanol extract of Patikan Kebo. In this research, the patikan kebo leaves were previously characterized microscopically and macroscopically and a phytochemical screening test was carried out to determine the secondary metabolite content in the patikan kebo 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 sample showed a concentration value of 36.3 mg GAE/gram of patikan kebo extract.

Keywords: *Euphorbia hirta, Gallic acid, Method Validation*

ABSTRAK

Telah dilakukan penelitian validasi metode analisa kadar fenolik dengan menggunakan metode DPPH terhadap ekstrak etanol patikan kebo. Daun patikan kebo pada penelitian ini sebelumnya di karakterisasi secara mikroskopis dan makroskopis serta dilakukan uji fitokimia skring untuk mengetahui kandungan metabolite sekunder pada daun patikan kebo. 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 36,3 mg GAE/gram ekstrak patikan kebo.

Kata kunci: *Euphorbia hirta, Asam galat, Validasi Metode*

PENDAHULUAN

Sebahagian pulau Jawa. Hutan tropis ini menyimpan berbagai jenis tumbuhan yang memiliki potensi untuk dikembangkan sebagai obat herbal (Fiolin, R., 2015).

Pengobatan herbal terutama di Indonesia sudah dikembangkan sejak lama. Hal ini terlihat dari berbagai jenis pengobatan

tradisional di berbagai daerah yang menggunakan tumbuhan atau yang sering disebut sebagai pengobatan herbal. Pengobatan ini didasari dari penggunaan bahan alami tumbuhan yang tumbuh di daerah-daerah tersebut. Pengembangan yang berbasis trial and error masih dominan dalam pemanfaatan obatan herbal tersebut. Hal ini terlihat masih kurangnya bukti ilmiah yang

menunjukkan ke efektifan pemanfaatan obatan herbal terutama di Indonesia (Widaryanto & Nur Azizzah, 2018).

Tumbuhan obat memiliki kandungan bahan aktif yang bermanfaat dalam mengobati berbagai jenis penyakit seperti jantung, gagal ginjal, asam urat, diabetes mellitus, hipertensi dan berbagai jenis penyakit lainnya (Vera, Y. dan Susi Yanti, 2020). Kandungan bahan aktif ini terdapat diseluruh bagian tumbuhan seperti batang, akar, daun, dan bunga atau biji. Salah satu tanaman yang dapat dimanfaatkan sebagai obat tradisional adalah Patikan Kebo (*Euphorbia hirta*). Secara empiris, berdasarkan kebiasaan masyarakat diberbagai daerah seperti Sumatera Utara tumbuhan ini dapat digunakan untuk mengobati berbagai amcam penyakit seperti demam berdarah dan juga dapat digunakan sebagai antioksidan dan antifungi (Mekam, dkk., 2019; Perera, dkk., 2018). Tumbuhan ini dikenal mengandung senyawa fenolik dalam jumlah besar terutama pada bagian daun. Hal ini menjadi dasar pengembangan atau pemanfaatan tumbuhan ini untuk lebih optimal.

Salah satu contoh bahan aktif dalam tumbuhan yang dapat digunakan dalam mengobati penyakit dan sering diaplikasikan dalam bidang kesehatan sebagai contoh dalam pengobatan kanker adalah fenolik (Rahman dkk., 2022). Senyawa fenolik merupakan senyawa yang dihasilkan oleh tumbuhan sebagai respons terhadap stres lingkungan. Senyawa fenolik berfungsi sebagai pelindung terhadap sinar UV-B dan kematian sel untuk melindungi DNA dari dimerisasi dan kerusakan Komponen pada senyawa ini diketahui memiliki peranan penting sebagai agen pencegah dan pengobatan beberapa gangguan penyakit seperti arteriosklerosis, disfungsi otak, diabetes dan kanker (Gargh, dkk., 2016; Rosa, L.A., dkk., 2019).

Senyawa aktif yang terdapat dalam tumbuhan ini harus diekstraksi untuk selanjutnya dapat dimanfaatkan dalam berbagai hal. Proses ekstraksi merupakan suatu proses pemisahan analit dari matriks sampel tertentu. Ekstraksi sangat berperan dalam penentuan kualitas penelitian terutama

dalam hal kualitatif maupun kuantitatif. Pemilihan metode ekstraksi harus dipertimbangkan dengan baik supaya tidak merusak bahan aktif yang akan diekstraksi. 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 zat padat yang mudah dilakukan namun tetap memiliki nilai recovery analis yang baik (Gultom, RA, 2018). Metode maserasi memiliki keunggulan yaitu proses ekstraksi yang sederhana tidak membutuhkan peralatan yang modern. Ekstraksi daun Nangka dilakukan dengan menggunakan pelarut metanol dengan metode maserasi yaitu dengan metode perendaman sampel yang terlebih dahulu telah dikeringkan.

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 50oC sampai tidak terdapat tetesan pelarut sehingga diperoleh ekstrak kental Patikan Kebo (*Euphorbia hirta*) (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

Validasi Metode Analisa Kadar Fenolik Ekstrak Etanol Patikan Kebo (*Euphorbia hirta* L) dengan Menggunakan Spectroscopy UV- Vis

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

Kurva baku dibuat dengan menghubungkan konsentrasi larutan standar dengan hasil serapannya yang diperoleh dari pengukuran dengan menggunakan spektrofotometer UV-VIS pada panjang gelombang 743 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 = 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 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 Na₂CO₃ 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

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

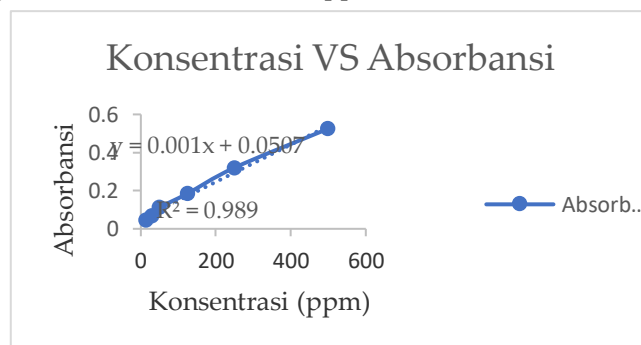
ditambahkan reagen Folin-Ciocalteu dan Na₂CO₃ 7,5% dan didiamkan selama 17 menit (operating time). Kemudian larutan dibaca serapannya pada rentang 400-800 nm dan serapan terbesar pada panjang gelombang tertentu tersebut yang digunakan sebagai panjang gelombang maksimum. Hasil analisa menunjukkan bahwa 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.

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	0,0451
2	30	0,0670
3	50	0,1008
4	125	0,1850
5	250	0,3200
6	500	0,5245



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

Validasi Metode Analisa Kadar Fenolik Ekstrak Etanol Patikan Kebo (*Euphorbia hirta* L) dengan Menggunakan Spectroscopy UV- Vis

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

Tabel 1. Pengukuran Nilai Presisi

Konsentrasi Asam galat (mg/L)	Absorbansi ($\lambda_{maks} = 775 \text{ nm}$)				RSD
	I	II	III	Rata-rata	
15	0.0455	0.0452	0.0451	0.0453	0,046
125	0.1852	0.1854	0.1854	0.1853	0,06
500	0.5246	0.5247	0.5248	0.5247	0,019

Dari data terlihat bahwa nilai presisi atau keterulangan sangat bagus sehingga metode ini dapat diaplikasikan dalam mengukur nilai konsnetrasi asam galat.

Penentuan Akurasi

Penentuan nilai akurasi menunjukkan nilai keakuratan dari metode analisa. Nilai akurasi dilakukan dengan metode adisi yaitu dengan menambahkan konsentrasi larutan

Tabel 2. Penentuan Nilai % Recovery

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 anatra 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 sensitifitas dapat dihitung sesuai persamaa pada bab III yaitu sebagai berikut:

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

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

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

b = cuvette thickness (cm)

Nilai sensitifitas metode ini memiliki besaran yaitu dengan membagi nilai slope terhadap nilai tebal kuvet. Dalam peneltian ini terlihat bahwa nilai slope pada kurva kalibrasi merupakan satuan ppm maka diubah terlebih dahulu kedalam satuan molaritas. Sehingga diperoleh persamaa baru yaitu slopenya sebesar 1,02.105. Maka nilai sensitifitas = 1,03. 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: $\varepsilon > 6 \times 10^4 \text{ L mol}^{-1} \text{ cm}^{-1}$

Kadar fenolik dari sampel terlihat dari data absorbansi yang diperoleh sesuai prosedur yaitu sebesar 36,3 mg GAE/g Ekstrak. Hal ini menunjukkan bahwa nilai dari kandungan fenolik total pada patikan kebo tergolong sedang.

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 = 1,03. $10^5 \text{ L. Mol}^{-1} \text{ cm}^{-1}$. Kadar fenolik pada andaliman tergolong sangat tinggi yaitu sebesar 36,3 mg GAE/gram ekstrak Patikan Kebo.

DAFTAR PUSTAKA

- Cahyani, Dinieta Dwi. (2019). Pengaruh Suhu Dan Waktu Pemanasan Terhadap Kadar Senyawa Fenolik Total Dan Profil Senyawa Volatil Dalam Bawang Putih (*Allium sativum L.*) Dan Bawang Merah (*Allium cepa L.*) Pada Proses Pembuatan Bawang Hitam. KTI. Malang: Universitas Negeri Malang.
- Ditjen POM RI. (1995). *Farmakope Indonesia Edisi IV*. Jakarta: Departemen Kesehatan RI.
- Ditjen POM RI. (1979). *Farmakope Indonesia Edisi Ketiga*. Jakarta: Departemen Kesehatan RI.
- Fiolin, Rachelia. (2015). *Agrowisata Saintifikasi Tanaman Obat Herbal Scientific Agrotourism*. Tangerang: Skripsi UNTAR.
- Garg, N., Abdel-Aziz, S.M., Aeron, A. (2016). *Microbes in Food and Health*, Springer, Switzerland 42-45.
- Gultom. RA. (2018). *Isolasi Minyak Kacang Tanah (Arachis Hypogaea L.) Dengan Metode Maserasi Dan Soxhlet Dan Analisis Produknya*. Yogyakarta: Thesis UGM.
- Mekam, PN., Serena Martini, Julienne Nguefack, Davide Tagliazucchi, Emilio Stefani. (2019). Phenolic compounds profile of water and ethanol extracts of *Euphorbia hirta L.* leaves showing antioxidant and antifungal properties. *South African Journal of Botany*. Vol.127.
- Perera, SD., Uthpala A. Jayawardena, Chanika D. Jayasinghe. 2018. Potential Use of *Euphorbia hirta* for Dengue: A Systematic Review of Scientific Evidence. *Journal of Tropical Medicine*. Vol.10.
- Rahman, MDM., Mds. Rahaman, Md. Rezaul Islam, Firoza Rahman, Faria Mannan Mithi, Taha Alqahtani, Muhannad A. Almikhalafi, Samia Qasem Alghamndi, Abdullah S Alruwailli, Md. Sohel Hoesain, Muniruddin Ahmed, Rajib Das, Talha bin Emran, Md. Sahab Udin. (2022). Role of Phenolic Compounds in Human Disease: Current Knowledge and Future Prospects. *Molecules*. Vol.27, No. 1
- Rosa, LA., Jesus Omar Moreno-Escamilla, Joaquin Rodrigo-Garcia, Emilio Alvarez-Parrilla. (2019). Phenolic Compounds. *Postharvest Physiology and Biochemistry of Fruits and Vegetables*. Vol.12
- Vera, Yulia dan Susi Yanti. (2020). Penyuluhan Pemanfaatan Tanaman Obat Dan Obat Tradisional Indonesia Untuk Pencegahan Dan Penanggulangan Penyakit Hipertensi Di Desa Salam Bue. *Jurnal Education and Development*. Vol.8, No.1
- WHO. (1992). *Quality Control methods for Medicinal Plants Material*. *Journal of WHO/PHARM/92.559*.Switzerland, 25-27.

Validasi Metode Analisa Kadar Fenolik Ekstrak Etanol Patikan Kebo (*Euphorbia hirta* L) dengan Menggunakan Spectroscopy UV- Vis

Widaryanto, Eko dan Nur Azizah. (2018).
Perspektif Tanaman Obat Berkhasiat: Peluang, Budidaya, Pengelolaan Hasil, dan Pemanfaatan. Malang: Universitas Brawijaya Press. Malang.