
JURNAL METAMORFOSA
Journal of Biological Sciences
ISSN: 2302-5697
<http://ojs.unud.ac.id/index.php/metamorfosa>

IDENTIFIKASI SENYAWA GOLONGAN FENOL DARI EKSTRAK ETANOL DAUN SIRIH HIJAU (*PIPER BETLE* LINN.) DENGAN METODE KLT-SPEKTROFOTODENSITOMETRI

IDENTIFICATION OF PHENOL COMPOUND IN GREEN *Piper betle* LEAF ETHANOL EXTRACT BY THE TLC-SPECTROPHOTODENSITOMETRY METHOD

**Ni Made Pitri Susanti*, Luh Putu Mirah Kusuma Dewi, Harlina Setiawati Manurung,
I Made Agus Gelgel Wirasuta**

*Jurusan Farmasi Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam Universitas Udayana Jimbaran-Bali,
Indonesia 80361 Telp/Fax: 0361-703837, *Email: dekpitsusanti@unud.ac.id*

INTISARI

Senyawa fenol dalam daun sirih memiliki aktivitas farmakologi sebagai antibakteri, antijamur, dan antioksidan. Aktivitas farmakologi obat herbal dipengaruhi oleh kandungan fitokimianya, sehingga diperlukan standarisasi untuk memperoleh pemastian kualitas, profil fitokimia, dan aktivitas farmakologi yang konsisten dari obat herbal. Fingerprint merupakan standar utama untuk menetapkan kualitas suatu obat herbal. Kromatografi lapis tipis (KLT) yang dipadukan dengan spektrofotodensitometri merupakan metode yang dapat digunakan untuk mendapatkan profil fingerprint senyawa fenol dalam daun sirih. Dalam penelitian ini, sampel daun sirih diekstraksi dengan metode refluks menggunakan pelarut etanol 96%. Identifikasi senyawa golongan fenol dilakukan dengan KLT menggunakan fase diam silika gel 60 F254 dan fase gerak toluen: Etil asetat (93:7 v/v), serta pereaksi warna yaitu FeCl_3 dan Folin-Ciocalteu. Profil *fingerprint* senyawa golongan fenol ekstrak etanol daun sirih (*Piper betle* Linn.) ditunjukkan pada R_f 0,19; 0,42; dan 0,62. Bercak positif senyawa golongan fenol berwarna hitam berdasarkan identifikasi dengan FeCl_3 dan biru tua dengan Folin-Ciocalteu. Panjang gelombang maksimum senyawa golongan fenol adalah 283 nm.

Kata Kunci: sirih, fenol, fingerprint, KLT-spektrofotodensitometri.

ABSTRACT

Phenol compound in *Piper betle* leaves has several pharmacology activities such as antibacteria, antifungi and antioxidant. The pharmacology activities of a herbal drug are influenced by the phytochemistry content, so in order to do a quality determination that provides phytochemistry profile and consistent pharmacology activities, a standardization is required. Fingerprint is the main standard to perform quality control for herbal drug. TLC-spectrophotodensitometry was used as the method in order to provide fingerprint profile of phenol compound. In this experiment, *Piper betle* leaves samples were extracted by reflux method using ethanol 96% as the solvent. Identification of phenol compound was done using TLC-spectrophotodensitometry with Silica gel 60 F254 as the stationary phase, toluena: ethyl acetate (93:7 v/v) as the mobile phase, FeCl_3 and Folin-Ciocalteu as the reagent. The fingerprint profile of phenol compound was shown in R_f value 0,19; 0,42; and 0,62. Positive results of phenol compound are black spot on FeCl_3 colour test and dark blue spot on Folin-Ciocalteu colour test. Maximum wavelength of phenol compound was 283 nm.

Keyword: Piper betle, phenol, fingerprint, TLC-spectrophotodensitometry.

PENDAHULUAN

Daun sirih hijau (*Piper betle* Linn.) merupakan salah satu tanaman yang sering digunakan sebagai obat herbal di Indonesia. Daun sirih hijau secara tradisional berkhasiat sebagai obat cuci mata, obat batuk, obat keputihan, menghilangkan bau mulut, dan obat sariawan (Harman, 2013). Senyawa fenol yang merupakan kandungan terbesar pada daun sirih memiliki aktivitas farmakologi sebagai antibakteri, antijamur, dan antioksidan (Parwata dkk., 2009; Ali *et al.*, 2010; Fuadi, 2014).

Aktivitas farmakologi obat herbal sangat tergantung dari kandungan fitokimia yang ada di dalamnya, sehingga dibutuhkan standarisasi untuk memperoleh pemastian kualitas, profil fitokimia, dan aktivitas farmakologi yang konsisten dari obat herbal tersebut (Liang *et al.*, 2004). Senyawa fenol merupakan kandungan terbesar dalam daun sirih yang merupakan penentu aktivitas farmakologisnya, sehingga perlu dilakukan identifikasi untuk mengetahui profil standar senyawa tersebut. Metode standar yang digunakan untuk standarisasi bahan baku obat herbal atau produk herbal menurut WHO adalah *fingerpint*.

Penentuan *fingerpint* kandungan kimia suatu tanaman merupakan metode yang dapat digunakan untuk menjamin integritas, kesamaan, dan menentukan perbedaan profil kandungan kimia dari suatu tanaman (Liang *et al.*, 2004). Beberapa metode analisis yang dapat digunakan untuk penentuan *fingerpint* adalah *HPLC*, *LC-MS*, *GC-MS*, *KLT* (Kromatografi Lapis Tipis) (Annegowda *et al.*, 2012). *KLT* merupakan metode sederhana yang dapat digunakan untuk mendapatkan *fingerpint* suatu senyawa, dimana dengan metode ini akan didapatkan parameter *fingerpint* yaitu nilai *R_f*, Spektrum, Kromatogram dan penampakan bercak pada plat *KLT* yang menunjukkan kandungan senyawa yang terkandung dalam ekstrak.

Identifikasi kandungan kimia dalam daun sirih dilakukan dengan sistem *KLT*: fase diam silika gel 60 F₂₅₄ dan fase gerak toluen: etil asetat atau dengan fase diam *HPTLC* silika gel 60 GF₂₅₄ dan fase gerak campuran toluen: etil

asetat: asam formiat (3:3:0,2) v/v (Depkes RI, 2008; Annegowda *et al.*, 2012).

Pada penelitian ini akan dilakukan kromatografi *fingerpint* senyawa golongan fenol dari ekstrak etanol daun sirih hijau (*Piper betle* Linn.) dengan metode *KLT*-spektrofotodensitometri.

BAHAN DAN METODE

Alat dan Bahan

Alat yang digunakan yaitu CAMAG Automatic TLC Sampler 4, CAMAG TLC Visualizer, densitometer CAMAG TLC Scanner 4, CAMAG TLC plate heater III, dan bejana kromatografi (CAMAG-Muttenz-Switzerland). Sampel daun sirih hijau diperoleh dari Desa Duda Utara, Kecamatan Selat, Kabupaten Karangasem, pelarut yang digunakan untuk ekstraksi adalah etanol 96% dan fase gerak: toluen, etil asetat, dan asam format.

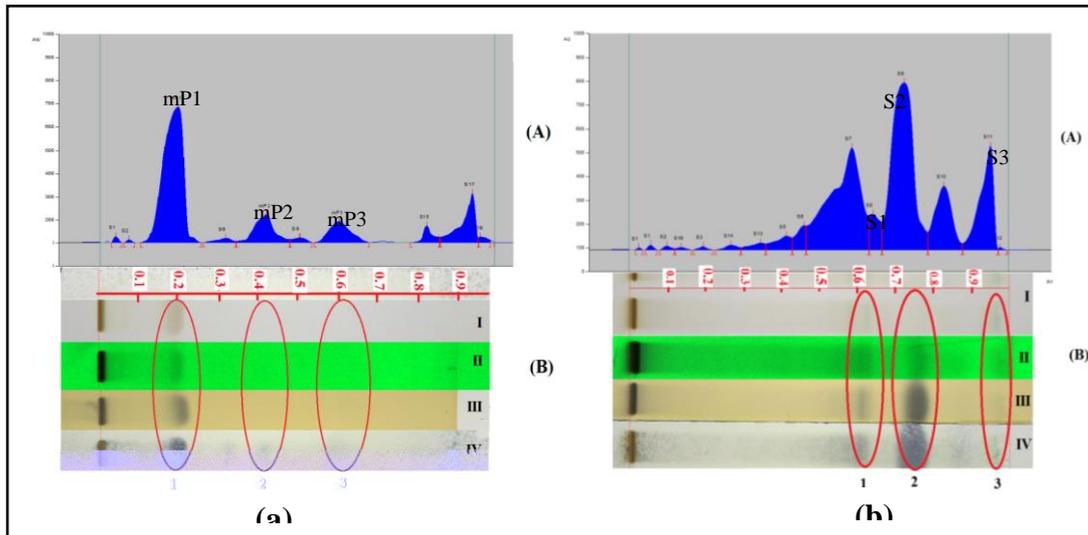
Metode

Ekstraksi senyawa golongan fenol dari daun sirih hijau dilakukan menggunakan pelarut etanol 96% dengan metode refluks pada suhu 60 °C selama 2 jam. Fase gerak yang digunakan untuk memisahkan senyawa golongan fenol dari daun sirih hijau adalah campuran toluen: etil asetat = 93: 7 v/v (fase gerak I) dan campuran toluen: etil asetat: asam formiat (3:3:0,2) v/v (fase gerak II). Masing-masing bercak diidentifikasi dengan pereaksi warna FeCl₃ dan Folin-Ciocalteu. Evaluasi pemisahan yang baik dilihat dari nilai *R_s* (Resolusi) dan *T_f* (*Tailing Factor*) dari masing-masing fase gerak. Fase gerak terbaik digunakan untuk tahap selanjutnya untuk menentukan profil *fingerpint* sampel. Sampel dielusi dengan fase gerak terpilih, yaitu fase gerak yang memenuhi persyaratan nilai *R_s* dan *T_f*. Identifikasi senyawa golongan fenol dilakukan dengan penampakan bercak menggunakan pereaksi warna, yaitu FeCl₃ dan Folin-Ciocalteu. Kromatogram dan hasil reaksi yang diperoleh diamati dan tentukan bercak yang positif senyawa golongan fenol ekstrak etanol daun sirih. Puncak kromatogram yang positif senyawa golongan fenol dipindai untuk melihat bentuk spektrum senyawa fenol.

HASIL

Ekstrak kental yang didapat berupa ekstrak berwarna hijau tua, dilarutkan dalam metanol dan dielusi dengan kedua fase gerak. Hasil pemisahan dari kedua fase gerak dapat dilihat pada gambar 1.

Berdasarkan hasil pemisahan dengan kedua fase gerak maka dapat dihitung nilai R_s dan T_f dari masing-masing fase gerak. Hasil perhitungan R_s dan T_f dari masing-masing fase gerak dapat dilihat pada tabel 1.



Gambar 1. Hasil Pemisahan dari Kedua Fase Gerak.

Keterangan:

(a) = Fase Gerak I (Toluen: Etil Asetat = 93:7 v/v); (b) = Fase Gerak II (Toluen: Etil Asetat: Asam Format = 3:3:0,2 v/v); (A) = Kromatogram pada Panjang Gelombang 210 nm; (B) = Pengamatan Bercak Kromatogram Sampel Ekstrak Etanol Daun Sirih; (I) = Sinar Tampak; (II) = UV 254; (III) = sinar tampak setelah dicelup dengan pereaksi $FeCl_3$; (IV) = sinar tampak setelah disemprot dengan pereaksi Folin-Ciocalteu; (1), (mP1), (S1) = Puncak senyawa golongan fenol 1; (2), (mP2), (S2) = Puncak senyawa golongan fenol 2; (3), (mP3), (S3) = Puncak senyawa golongan fenol 3.

Tabel 1. Nilai R_s dan T_f Masing-Masing Puncak Senyawa Golongan Fenol dari Kedua Sistem Fase Gerak.

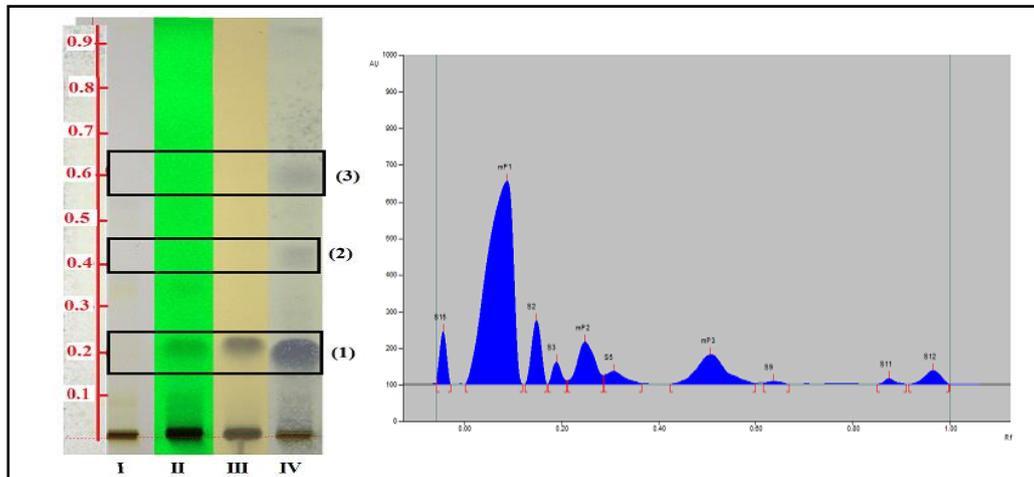
Parameter	Fase Gerak (FG)	
	I (Toluen:Etil Asetat = 93:7 v/v)	II (Toluen: Etil Asetat: Asam Format = 3:3:0,2 v/v)
R_s	A : X = 2 Y = 1,67	A : X = 0,47 Y = 1,125
	B : X = 1,11 Y = 1	B : X = 1,125 Y = 0,95
	C : X = 1,5 Y = 2,19	C : X = 1,44 Y = 0,55
	A = 0,9	A = 2
T_f	B = 0,93	B = 1
	C = 1,17	C = 0,64

Keterangan:

X = puncak senyawa yang muncul sebelum senyawa golongan fenol terhadap senyawa golongan fenol;
 Y = puncak senyawa golongan fenol terhadap puncak senyawa yang muncul setelah senyawa golongan fenol;
 A = senyawa golongan fenol 1 (FG I dan II); B = senyawa golongan fenol 2 (FG I dan II);
 C = senyawa golongan fenol 3 (FG I dan II).

Hasil kromatografi *Fingerprint* senyawa golongan fenol dapat dilihat pada gambar 2. Terdapat tiga bercak yang positif senyawa golongan fenol berdasarkan reaksi dengan pereaksi warna, yaitu hitam untuk $FeCl_3$ dan

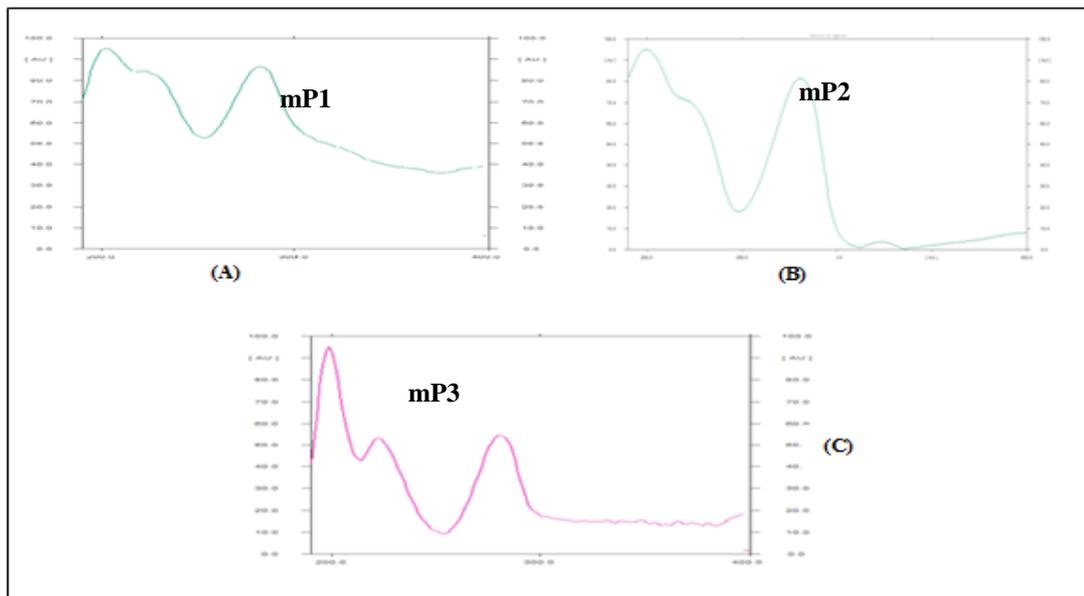
biru tua untuk Folin-Ciocalteu (Nugrahaningtyas dkk., 2005; Banu and Nagarajan, 2014). Spektrum dari masing-masing puncak kromatogram senyawa golongan fenol dapat dilihat pada gambar 3.



Gambar 2. Hasil Kromatografi *Fingerprint* Senyawa Golongan Fenol.

Keterangan:

(A) = Identifikasi dengan pereaksi warna; (I) = Sinar Tampak; (II) = UV 254; (III) = sinar tampak setelah dicelup dengan $FeCl_3$; (IV) = sinar tampak setelah disemprot dengan Folin-Ciocalteu; (1), (mP1) = Puncak senyawa golongan fenol 1; (2), (mP2) = Puncak senyawa golongan fenol 2; (3), (mP3) = Puncak senyawa golongan fenol 3.



Gambar 3. Spektrum dari Masing-Masing Puncak Kromatogram Senyawa Golongan Fenol.

Keterangan:

(A), (mP1) = Puncak senyawa golongan fenol 1; (B), (mP2) = Puncak senyawa golongan fenol 2; (C), (mP3) = Puncak senyawa golongan fenol 3.

PEMBAHASAN

Ekstraksi daun sirih dilakukan dengan menggunakan metode ekstraksi padat-cair yaitu refluks dengan suhu 60⁰. Ekstraksi senyawa golongan fenol akan lebih efisien dengan menggunakan suhu tidak lebih dari 80°C (Xu *et al.*, 2005; Dutra *et al.*, 2008).

Berdasarkan evaluasi hasil pemisahan, maka fase gerak yang terpilih adalah fase gerak I yaitu campuran toluen: etil asetat (93: 7 v/v). Evaluasi hasil pemisahan dilihat dari nilai R_s dan T_f masing-masing fase gerak. Nilai R_s dan T_f dari fase gerak I telah memenuhi persyaratan, yaitu $R_s > 1,5$ dan nilai T_f berada pada rentang 0,9-1,4 (Tabel 1).

Identitas *fingerprint* ditunjukkan dengan pengamatan warna bercak kromatogram pada plat dan dilengkapi dengan pola puncak kromatogram yang merupakan profil *fingerprint* yang lebih objektif. Hasil identifikasi dengan pereaksi warna menunjukkan terdapat tiga spot yang positif senyawa golongan fenol. Spot-spot tersebut teridentifikasi disekitar R_f 0,19 (mP1); 0,42 (mP2); dan 0,62 (mP3). Hal ini menunjukkan, dalam ekstrak daun sirih yang diteliti, terdapat tiga senyawa golongan fenol dengan polaritas yang berbeda, ditunjukkan dengan adanya tiga posisi bercak dengan urutan polaritas mP1 > mP2 > mP3. Setiap puncak kromatogram yang diduga positif senyawa golongan fenol dipindai kembali untuk mengetahui bentuk spektrum senyawa fenol.

Berdasarkan hasil pengukuran spektrum masing-masing puncak kromatogram, ketiga puncak yang teridentifikasi senyawa golongan fenol menghasilkan intensitas maksimum pada panjang gelombang 283 nm, yang menunjukkan ketiga senyawa tersebut memiliki struktur elektronik yang sama sehingga memberikan serapan maksimum pada daerah panjang gelombang yang sama.

KESIMPULAN

Profil *fingerprint* senyawa golongan fenol ekstrak etanol daun sirih (*Piper betle* Linn.) ditunjukkan pada R_f 0,19; 0,42; dan 0,62. Bercak yang positif senyawa golongan fenol

berwarna hitam berdasarkan identifikasi dengan pereaksi $FeCl_3$ dan biru tua dengan pereaksi Folin-Ciocalteu dan panjang gelombang maksimum senyawa golongan fenol adalah 283 nm.

DAFTAR PUSTAKA

- Ali. 2010. In Vitro Antifungal Activity of Hydroxychavicol Isolated from *Piper betle* L., *Annals of Clinical Microbiology and Antimicrobials*. 9 (7): 1-9
- Annegowda, H.V., P.Y. Tan, M.N. Mordi, S. Ramanathan, M.R. Hamdan, M.H. Sulaiman, and S.M. Mansor. 2012. TLC–Bioautography-Guided Isolation, HPTLC and GC–MS-Assisted Analysis of Bioactives of *Piper betle* Leaf Extract Obtained from Various Extraction Techniques: In vitro Evaluation of Phenolic Content, Antioxidant and Antimicrobial Activities. *Food Anal. Methods*
- Banu, H.R. and N. Nagarajan. 2014. TLC and HPTLC Fingerprinting of Leaf Extracts of *Wedelia chinensis* (Osbeck) Merrill. *Journal of Pharmacognosy and Phytochemistry*. 2 (6): 29-33
- Depkes RI. 2008. Farmakope Herbal Indonesia. Jakarta: Departemen Kesehatan Republik Indonesia.
- Dutra, R.C., M.N. Leite, and N.R. Barbosa. 2008. Quantification of Phenolic Constituents and Antioxidant Activity of *Pterodon emarginatus* Vogel Seeds. *International Journal of Molecular Sciences*. 9: 606-614
- Fuadi, S. 2014. Efektivitas Ekstrak Daun Sirih Hijau (*Piper betle* L.) Terhadap Pertumbuhan Bakteri *Streptococcus pyogenes* In Vitro (Skripsi). Jakarta: Fakultas Kedokteran dan Ilmu Kesehatan, Universitas Islam Negeri Syarif Hidayatullah.
- Harman, D.T.A. 2013. Efektivitas Anti Bakteri Ekstrak Daun Sirih (*Piper betle* Linn) Terhadap Bakteri *Enterococcus faecalis* (Penelitian In Vitro) (Skripsi). Makassar: Fakultas Kedokteran Gigi, Universitas Hasanuddin.

- Liang, Yi-Zeng, P. Xie, and K. Chan. 2004. Review: Quality Control of Herbal Medicines. *Journal of Chromatography B*. 812: 53-70
- Nikam, P.H., J. Kareparamban, A. Jadhav, and V. Kadam. 2012. Future Trends in Standardization of Herbal Drugs. *Journal of Applied Pharmaceutical Science*. 2 (6): 38-44
- Nugrahaningtyas, K.D., S. Matsjeh, dan T.D. Wahyuni. 2005. Isolasi dan Identifikasi Senyawa Flavonoid dalam Rimpang Temu Ireng (*Curcuma aeruginosa* Roxb.). *Biofarmasi*. 3 (1): 32-38
- Parwata, I M.O.A., W.S. Rita, dan R. Yoga. 2009. Isolasi dan Uji Antiradikal Bebas Minyak Atsiri pada Daun Sirih (*Piper Betle* Linn) secara Spektroskopi Ultra Violet Tampak. *Jurnal Kimia*. 3 (1): 7-13
- Xu, F., D.E. Koch, I.C. Kong, R.P. Hunter, and A. Bhandari. 2005. Peroxidase-Mediated Oxidative Coupling of 1-Naphthol: Characterization of Polymerization Products. *Water Research*. 39: 2358-2368