

# **JURNAL KIMIA UNAND**

**ISSN No. 2303-3401**

**Volume 8 Nomor 1**

**Maret, 2019**

*Media untuk mempublikasikan  
hasil-hasil penelitian seluruh  
dosen dan mahasiswa Kimia  
FMIPA Unand*

**Jurusan Kimia  
Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam  
Universitas Andalas**

# **Tim Editorial Jurnal Kimia Unand**

Emil Salim, M.Sc, M.Si

Dr. Syukri

Prof. Dr. Adlis Santoni

Prof. Dr. Rahmiana Zein

Prof. Dr. Syukri Arief

Dr. Mai Efdi

## **Alamat Sekretariat**

Jurusian Kimia FMIPA Unand

Kampus Unand Limau Manis, Padang – 25163

PO. Box 143, Telp./Fax. : (0751) 71 681

Website Jurnal Kimia Unand: [www.jurnalsain-unand.com](http://www.jurnalsain-unand.com)

Corresponding E-mail: [salim\\_emil17@yahoo.com](mailto:salim_emil17@yahoo.com)

[syukri@fmipa.unand.ac.id](mailto:syukri@fmipa.unand.ac.id)

## DAFTAR ISI

JUDUL ARTIKEL	Halaman
1. PRODUKSI GLUKOSA SEBAGAI BAHAN BAKU BIOETANOL DARI MIKROALGA <i>Scenedesmus dimorphus</i> Yunita Ari Santi, Zulkarnain Chaidir, Elida Mardiah	1-6
2. PENGARUH FITOHORMON INDOLE-3-BUTYRIC ACID DAN VITAMIN C TERHADAP KANDUNGAN LIPID MIKROALGA <i>Chlorella vulgaris</i> UNTUK BAHAN BAKU BIODIESEL Marniati Salim, Zulkarnain Chaidir, Hafizhatul Ilmi	7-13
3. ISOLASI DAN KARAKTERISASI TRITERPENOID DARI EKSTRAK ETIL ASETAT DAUN JARAK MERAH ( <i>Jatropha gossypifolia</i> Linn) Norman Ferdinal, Bustanul Arifin, Nurjelita	14-18
4. FORMULA PEMBUATAN PRODUK PEMBERSIH BADAN (BODY SCRUB) BERBASIS VCO DAN TEPUNG AMPAS KELAPA Sumaryati Syukur, Safni, Amrina Rasyada	19-23
5. PENENTUAN KUERSETIN PADA EKSTRAK ASETON DAUN EKOR NAGA ( <i>Epipremnum pinnatum</i> (L.) Engl) DENGAN METODE KROMATOGRAFI CAIR KINERJA TINGGI (CKCT) Refilda , Harits Hamman, Emil Salim	24-29
6. DETERMINATION OF TOTAL PHENOLIC CONTENT, ANTIOXIDANT AND CYTOTOXIC ACTIVITIES OF METHANOL EXTRACT AND FRACTION OF PINEAPPLE PEEL EXTRACT ( <i>Ananas comosus</i> L. Merr) Sosna Sri Rahayu, Adlis Santoni, Mai Efdi	30-38
7. SENYAWA TRITERPENOID DARI EKSTRAK ETIL ASETAT DAUN TUMBUHAN PEGAGAN ( <i>Centella asiatica</i> (Linn) Urban) Suryati, Rahmi Vika Ulia, Emil Salim	39-42
8. VALIDASI METODE KROMATOGRAFI CAIR KINERJA TINGGI UNTUK ANALISIS ASAM GALAT, BENZOAT DAN SALISILAT SECARA SERENTAK DALAM DAUN SIRIH MERAH ( <i>Piper crocatum</i> ) Refilda, Yulia Pratiwi, Indrawati	43-49

## PRODUKSI GLUKOSA SEBAGAI BAHAN BAKU BIOETANOL DARI MIKROALGA *Scenedesmus dimorphus*

Yunita Ari Santi\*, Zulkarnain Chaidir, Elida Mardiah

Laboratorium Biokimia Universitas Andalas  
Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam, Universitas Andalas,  
Kampus Limau Manis, Padang, 25163 Indonesia  
\*Email : [yunitaarisanti01@gmail.com](mailto:yunitaarisanti01@gmail.com)

**Abstrak:** Mikroalga *Scenedesmus dimorphus* merupakan salah satu jenis mikroalga yang memiliki kandungan karbohidrat yang tinggi. Karbohidrat pada *Scenedesmus dimorphus* dapat dihidrolisis menghasilkan glukosa yang merupakan bahan baku bioetanol. *Scenedesmus dimorphus* dikultur dalam medium BBM dengan penambahan limbah cair tahu (LCT) dengan berbagai variasi konsentrasi yaitu BBM + LCT 1,5%, BBM + LCT 2,5%, dan BBM + LCT 3%. Biomassa kering mikroalga dihidrolisis dengan asam sulfat ( $H_2SO_4$ ) dengan melakukan variasi konsentrasi asam sulfat, waktu, dan suhu hidrolisis untuk mendapatkan kondisi optimum yang menghasilkan kadar glukosa paling tinggi. Hasil penelitian menunjukkan bahwa medium BBM + LCT mampu meningkatkan pertumbuhan mikroalga *Scenedesmus dimorphus*, komposisi medium yang menunjukkan pertumbuhan paling baik adalah BBM + LCT 2,5%. Kondisi hidrolisis terbaik adalah pada konsentrasi asam sulfat 5,4%, waktu 15 menit, dan suhu 100°C dengan kadar glukosa 17,313 mg/gram biomassa mikroalga dengan efisiensi hidrolisis 74%.

**Kata kunci:** Glukosa, *Scenedesmus dimorphus*, hidrolisis, limbah cair tahu

### 1. Pendahuluan

Pesatnya pertumbuhan populasi manusia meningkatkan konsumsi energi sehingga minyak bumi alami tidak dapat mengom pensasi laju konsumsi energi pada saat ini. Di sisi lain penggunaan energi fosil disadari juga telah menjadi penyumbang emisi gas rumah kaca yang menyebabkan pemanasan global [1]. Oleh sebab itu penggunaan bioenergi akhir ini menjadi primadona, karena bioenergi berasal dari tumbuhan sehingga dapat diperbaharui. Salah satu sumber energi yang mudah didapatkan dari tumbuhan yang mengandung pati dan selulosa adalah bioethanol [2].

Mikroalga merupakan salah satu mikroorganisme yang dinilai ideal dan potensial untuk dijadikan sebagai bahan baku biofuel. Berbagai penelitian telah dilakukan untuk memanfaatkan mikroalga sebagai bahan baku biofuel salah satunya yaitu pemanfaatan mikroalga sebagai sumber bioetanol, yang merupakan sumber energi yang dapat diperbaharui dan ramah lingkungan serta memiliki nilai oktan yang lebih tinggi daripada premium. Produksi bioetanol dari mikroalga membutuhkan bahan baku glukosa yang diperolah dari hidrolisis karbohidrat dimana glukosa akan di fermentasi sehingga menghasilkan etanol [3].

Salah satu mikroalga yang memiliki kandungan karbohidrat yang tinggi adalah *Scenedesmus dimorphus* dengan kadar karbohidrat 21-52% [4]. Berikut ditampilkan beberapa jenis mikroalga beserta

kandungan karbohidrat masing-masing.

**Tabel 1.1** Kandungan karbohidrat mikroalga

Spesies	Berat Kering (%)
<i>Scenedesmus obliquus</i>	10-17
<i>Scenedesmus dimorphus</i>	21-52
<i>Chlorella vulgaris</i>	12-17
<i>Chlorella pyrenoidosa</i>	26
<i>Spirogyra sp.</i>	33-64
<i>Spirulina platensis</i>	8-14

Sumber : Becker (2012)[5]

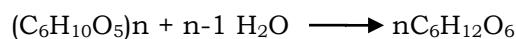
Pada industri komersial panen biomassa yang terbaik dapat dicapai antara 0,3-0,5 g sel kering/L atau 5 g sel kering/L. Hal ini membuktikan bahwa menghasilkan biomassa mikroalga dalam jumlah besar sangat sulit, sehingga diperlukan upaya yang dapat meningkatkan produksi biomassa mikroalga. Upaya untuk meningkatkan produksi biomassa dapat dilakukan dengan memanipulasi faktor lingkungan seperti cahaya, kadar  $CO_2$ , suhu, pH, salinitas, bentuk wadah kultur, dan medium [6], salah satunya yaitu melakukan variasi nutrisi pada medium pertumbuhan mikroalga dengan menambahkan limbah cair tahu.

Unsur hara yang dibutuhkan mikroalga terdiri dari unsur makro (N, P, K, S, Fe, Mg, Si, dan Ca) dan unsur mikro (Mn, Zn, Co, Bo, B, Cu, dll) [7]. Limbah cair

tahu mengandung posfor, nitrogen, ammonia, dan karbon yang dibutuhkan untuk pertumbuhan mikroalga [8]. Limbah cair tahu juga mengandung bahan-bahan organik kompleks yang tinggi terutama protein dan asam-asam amino dalam bentuk padatan tersuspensi maupun terlarut. Adanya senyawa-senyawa organik tersebut menyebabkan limbah cair industri tahu mengandung BOD, COD dan TSS yang tinggi, apabila dibuang kedalam perairan tanpa pengolahan terlebih dahulu dapat menyebabkan pencemaran perairan. Salah satu upaya untuk memanfaatkan limbah cair tahu adalah dengan menggunakan limbah tersebut sebagai medium pertumbuhan mikroalga *Scenedesmus dimorphus* [9].

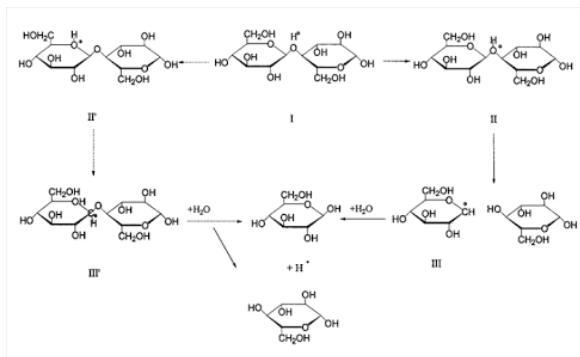
Selain sedikitnya biomassa dihasilkan, yang menjadi tantangan utama dalam produksi bioetanol dari mikroalga adalah bagaimana memecah gula kompleks menjadi gula sederhana/ glukosa. Glukosa diperoleh dengan cara hidrolisis asam yaitu menggunakan asam sulfat ( $H_2SO_4$ ) untuk mendapatkan kadar glukosa yang maksimum dilakukan optimasi hidrolisis yaitu dengan memvariasikan konsentrasi asam sulfat, suhu, dan waktu hidrolisis sehingga bisa didapatkan kondisi optimum untuk hidrolisis asam [2].

Hidrolisis adalah reaksi kimia yang memecah molekul air ( $H_2O$ ) menjadi kation hidrogen ( $H^+$ ) dan anion hidroksida ( $OH^-$ ) melalui suatu proses kimia. Hidrolisis pati merupakan proses pemecahan molekul amilum menjadi bagian-bagian penyusunnya yang lebih sederhana seperti dekstrin, isomaltosa, maltosa, dan glukosa. Prinsip dasar hidrolisis adalah untuk memotong ikatan  $\alpha$ -1,4 glukosida dan ikatan  $\alpha$ -1,6 glukosida dari amilopektin sehingga menghasilkan pati dalam ukuran yang lebih sederhana (glukosa). Secara umum reaksi hidrolisis dapat dituliskan sebagai berikut:



Hidrolisis selulosa dapat dilakukan secara enzimatis dan kimiawi. Hidrolisis secara enzimatis dilakukan dengan menggunakan enzim selulase, sedangkan hidrolisis secara kimiawi dapat dilakukan dengan menggunakan asam dan basa. Asam yang umumnya digunakan adalah asam sulfat atau asam klorida<sup>10</sup>. Penambahan asam dalam proses hidrolisis adalah sebagai katalis untuk mempercepat pemutusan rantai polisakarida menjadi glukosa karena hidrolisis alami menggunakan air berlangsung lambat dan sangat lama.

Mekanisme reaksi hidrolisis dengan katalis asam dapat ditunjukkan seperti gambar berikut:



**Gambar 1.1** Mekanisme reaksi hidrolisis ikatan glikosidik [11]

Glukosa yang dihasilkan dianalisis dengan metode Nelson Somogy. Metode Nelson-Somogy merupakan metode kimiawi yang dapat digunakan untuk analisis karbohidrat dengan menggunakan metode oksidasi. Metode ini didasari dengan tereduksinya kupri oksida menjadi kupro oksida karena adanya kandungan gula reduksi dalam sampel. Pada metode ini digunakan pereaksi fosfomolibdat sebagai peng kompleks. Reagen Nelson-Somogy berfungsi sebagai oksidator antara kupri oksida yang bereaksi dengan gula reduksi membentuk endapan merah bata. Dengan membandingkan terhadap larutan standar, konsentrasi gula dalam sampel dapat ditentukan. Reaksi dengan peng kompleks fosfomolibdat menghasilkan warna biru, dapat menentukan konsentrasi gula dalam sampel dengan mengukur absorbannya [12].

## 2. Metodologi Penelitian

### 2.1 Alat

Perlengkapan kultivasi (aerator, selang akuarium, botol kaca 500 ml, karet, plastik). Peralatan gelas (erlenmeyer, gelas ukur, labu ukur, batang pengaduk, tabung reaksi, pipet tetes). Botol vial, Spektrofotometer UV-Vis *Thermo Scientific Genesys 20*, H-C-12 *Centrifuge*, oven, autoclave, freezer, mikroskop fluorescent, hotplate, magnetik bar, neraca analitis, aluminium foil, plastik wrap.

### 2.2 Bahan

Isolat mikroalga *Scenedesmus dimorphus*,  $NaNO_3$  (Merck),  $CaCl_2 \cdot 2H_2O$  (Merck),  $MgSO_4 \cdot 7H_2O$  (Merck),  $K_2HPO_4$  (Merck),  $KH_2PO_4$  (Merck),  $NaCl$  (Merck), EDTA (Merck), KOH (Merck),  $FeSO_4 \cdot 7H_2O$  (Merck),  $H_2SO_4$  (Smart Lab),  $H_3BO_3$ ,  $ZnSO_4 \cdot 7H_2O$  (Merck),  $MnCl_2 \cdot 4H_2O$  (Merck),  $MoO_3$  (Merck),  $Co(NO_3)_2 \cdot 6H_2O$  (Merck),

$\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ (Merck), limbah cair tahu, reagen Nelson Somogy.

### 2.3 Prosedur Penelitian

#### 2.3.1 Persiapan Medium Pertumbuhan *Scenedesmus dimorphus*

Kultivasi *Scenedesmus dimorphus* dilakukan dalam kombinasi medium BBM dengan limbah cair tahu steril dan dicampurkan kedalam botol 500 mL. Komposisi masing-masing medium sebagai berikut:

- Medium A: BBM 100%
- Medium B: medium BBM + LCT 1,5%
- Medium C: medium BBM + LCT 2,5 %
- Medium D: medium BBM + LCT 3 %

#### 2.3.2 Pengamatan Morfologi Mikroalga

Kultur awal mikroalga didapatkan dari Laboratorium Biokimia Universitas Andalas. Morfologi mikroalga *Scenedesmus dimorphus* diamati dengan menggunakan mikroskop fluorescent pada perbesaan 1000 X.

#### 2.3.3 Kultivasi Mikroalga *Scenedesmus dimorphus*

Biakan *Scenedesmus dimorphus* dimasukkan kedalam medium pertumbuhan dengan perbandingan biakan dan medium yaitu 1:10 dalam botol kaca 300 mL, masing-masing kultur dihubungkan dengan aerator pada kondisi yang sama. Dilakukan pengukuran absorban kultur setiap satu kali dalam dua hari menggunakan spektrofotometer UV Vis Genesys 20 pada panjang gelombang 400 nm, nilai OD yang diperoleh dicatat dan diplotkan ke dalam kurva pertumbuhan mikroalga. Setelah didapatkan kurva pertumbuhan selanjutnya dilakukan perbanyak biakan pada medium yang menghasilkan kurva pertumbuhan tertinggi dan biakan dipanen pada fasa eksponensial yang dapat dilihat pada kurva pertumbuhan, dipanen dengan metode sentrifugasi. Biomassa yang didapat dipisahkan kedalam cawan petri kemudian dikering anginkan untuk mendapatkan biomassa kering.

#### 2.3.4 Pembuatan Kurva Standar Glukosa

Larutan standar glukosa dibuat dengan beberapa variasi konsentrasi. Masing-masing larutan dipipet sebanyak 1 mL dimasukkan kedalam tabung reaksi kemudian ditambahkan dengan 1 mL reagen Nelson, dipanaskan selama 20 menit dalam air mendidih setelah itu dinginkan sampai mencapai suhu ruang selanjutnya ditambahkan 1 mL reagen fosfomolibdat dan 7 mL akuades lalu diukur absorbannya pada panjang gelombang 540 nm.

#### 2.3.5 Hidrolisis Selulosa Menjadi Glukosa

Biomassa kering mikroalga ditimbang sebanyak 0,1 g dimasukkan kedalam 6 botol vial, masing-masing botol ditambahkan 10 mL  $\text{H}_2\text{SO}_4$  dengan variasi konsentrasi 2,7%, 5,4%, 8,1%, 10,8%, 12,5%, dan 15,2%, hidrolisat yang didapatkan diukur kadar glukosanya dengan metode Nelson Somogy. Selanjutnya dilakukan hidrolisis dengan asam sulfat yang menghasilkan kadar glukosa paling tinggi dengan memberikan perlakuan variasi suhu hidrolisis yaitu 90°C, 100°C, 110°C, 110°C, kadar glukosa diukur dan yang menghasilkan kadar glukosa tertinggi selanjutnya digunakan untuk hidrolisis dengan memvariasikan waktu hidrolisis yaitu 5 menit, 10 menit, dan 15 menit dan diukur kadar glukosa hidrolisatnya. Semua perlakuan yang menghasilkan kadar glukosa tertinggi merupakan kondisi optimum hidrolisis yang digunakan untuk mengukur kadar glukosa sampel.

### 3. Hasil dan Diskusi

#### 3.1 Morfologi Mikroalga *Scenedesmus dimorphus*

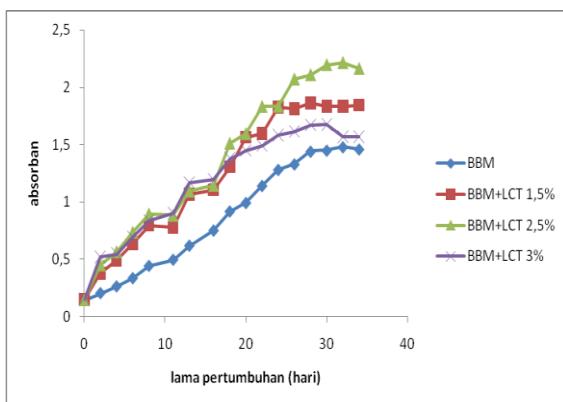


**Gambar 3.1** Morfologi mikroalga *Scenedesmus dimorphus* hasil kultur

Pengamatan morfologi mikroalga dilakukan untuk memastikan bahwa mikroalga yang akan dikultur tidak terkontaminasi dan merupakan spesies yang diinginkan.

#### 3.2 Pertumbuhan Mikroalga pada Medium BBM yang dikombinasikan dengan Limbah Cair Tahu

Mikroalga yang dikultur selama 28 hari menghasilkan kurva pertumbuhan seperti gambar berikut ini:



**Gambar 3.2** Kurva pertumbuhan mikroalga *Scenedesmus dimorphus*

Dari gambar 3.2 dinyatakan bahwa penambahan limbah cair tahu konsentrasi 1,5%, 2,5%, 3% dapat meningkatkan absorban medium yang menunjukkan meningkatnya pertumbuhan mikroalga *Scenedesmus dimorphus* dibandingkan dengan BBM. Pada semua perlakuan penambahan LCT, fase lag (adaptasi) tidak terlalu tampak karena jumlah pertumbuhan biomassa langsung meningkat setelah hari ke-2. Hal ini dapat terjadi karena fase lag berlangsung singkat sehingga tidak dapat diamati. Hal ini membuktikan bahwa sel *Scenedesmus* yang diinokulasikan kedalam medium limbah cair tahu mampu beradaptasi dengan lingkungan yang baru sehingga mampu membelah sel dengan cepat. Fase lag bergantung pada jumlah dan umur inokulum serta substrat yang digunakan sebagai medium [13].

Produksi biomassa sangat dipengaruhi oleh kandungan nutrisi dalam medium. Hal ini dapat dilihat dari meningkatnya nilai absorban dari medium yang ditambahkan limbah cair tahu disbandingkan dengan medium kontrol yaitu BBM (Bold Bassal Medium) tanpa perlakuan. Kepadatan sel tertinggi didapatkan pada medium BBM + LCT 2,5%, ini disebabkan karena tersedianya nutrien yang dibutuhkan untuk pertumbuhan limbah cair tahu dalam jumlah yang cukup seperti nitrogen, dimana nitrogen merupakan bahan penting untuk pembelahan sel. Faktor lain yang mempengaruhi kepadatan sel mikroalga adalah kandungan ammonia yang tinggi pada LCT, ammonia terionisasi sehingga menghasilkan ammonium ( $\text{NH}_4^+$ ) yang merupakan sumber nutrien bagi mikroalga.

Pada penambahan LCT 3% terjadi penurunan kepadatan sel, sesuai penelitian Dianursanti et al,(2014) bahwa konsentrasi  $\text{NH}_3$  dalam medium yang melebihi batas maksimum akan menghambat pertumbuhan sel sehingga terjadi penghambatan proses biosintesis protein [8]. Menurut

Widianingsih (2008)  $\text{NH}_3$  yang terlalu banyak dalam medium kultur akan bersifat racun dan mengakibatkan aktivitas sel terhambat dalam proses metabolism [14]. Kepadatan sel untuk medium BBM + LCT 1,5% lebih rendah daripada medium BBM + LCT 2,5%, hal ini diduga terjadi karena rendahnya nutrien yang terdapat dalam medium, walaupun pada kondisi demikian sel-sel mikroalga tetap tumbuh tetapi proses pembelahannya akan terhambat.

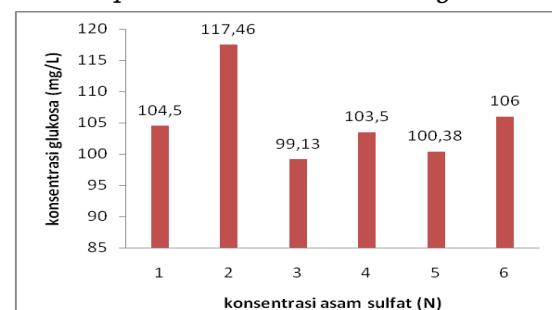
Biomassa dari masing-masing medium pada saat satu kali panen didalam kultur 500 mL dibandingkan dan didapatkan hasil sebagai berikut:

**Tabel 3.1** Bobot biomassa dari medium yang divariasiakan

Medium	Berat kering mikroalga (g)
BBM	0,0641
BBM + LCT1,5 %	0,2116
BBM + LCT 2,5 %	0,2740
BBM + LCT 3 %	0,2314

Berdasarkan hasil yang didapatkan, biomassa paling banyak didapatkan dari medium BBM + LCT 2,5% dan biomassa paling sedikit dari medium BBM. Hasil ini berbanding lurus dengan kurva pertumbuhan yang didapatkan, dimana medium yang menghasilkan kurva pertumbuhan tertinggi menandakan kepadatan sel yang lebih besar sehingga jumlah biomassa yang didapatkan lebih banyak.

### 3.3 Pengaruh Konsentrasi Asam Sulfat terhadap Kadar Glukosa Mikroalga

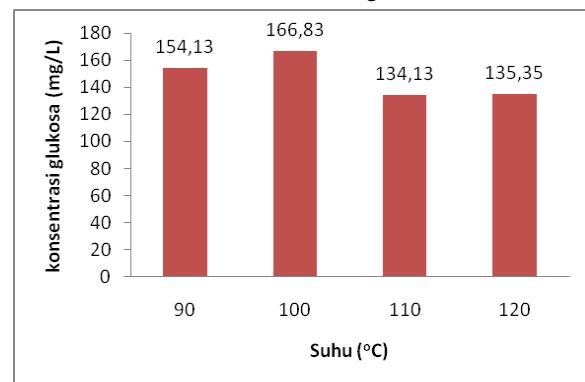


**Gambar 3.3** Pengaruh konsentrasi asam sulfat terhadap konsentrasi glukosa

Berdasarkan gambar 3.3 dapat dilihat bahwa kadar glukosa hasil hidrolisis dengan menggunakan asam sulfat 5,4% memberikan hasil yang paling baik. Berdasarkan penelitian Osvaldo (2012) peningkatan hasil glukosa dipengaruhi oleh konsentrasi katalis asam, karena dipengaruhi oleh banyaknya ion  $\text{H}^+$  pada

asam dapat memutuskan ikatan glikosida yang terdapat pada selulosa [15]. Sedangkan untuk penggunaan konsentrasi asam sulfat yang lebih dari 5,4% mengalami penurunan kadar glukosa ini disebabkan karena glukosa yang terbentuk akan terdegradasi lebih lanjut menjadi senyawa turunan glukosa. Beberapa senyawa yang dapat terbentuk selama proses hidrolisis asam encer adalah asetat, asam format, formaldehida, fenol, hidroksimetilfulfural (HMF), dan senyawa lain [16].

### 3.4 Pengaruh Suhu Hidrolisis terhadap Kadar Glukosa Mikroalga



**Gambar 3.4** Pengaruh suhu hidrolisis terhadap konsentrasi glukosa

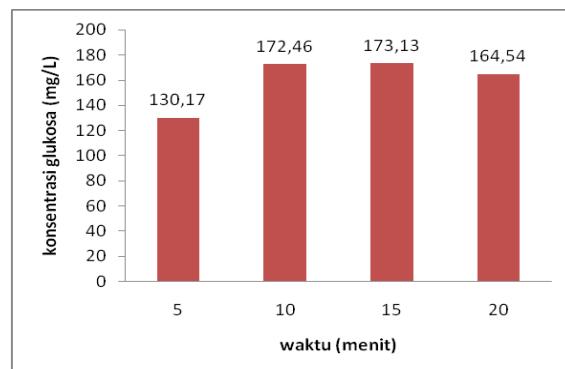
Hidrolisis selulosa dilakukan pada konsentrasi asam 2N dan variasi suhu 90°C, 100 °C, 110 °C, 120°C. Gambar 3.4 menunjukkan bahwa suhu 100°C merupakan suhu optimum hidrolisis mikroalga *Scenedesmus dimorphus* yang dibuktikan dengan tingginya kadar glukosa yang dihasilkan. Wahyudi et al. (2011) menyatakan bahwa proses hidrolisis merupakan reaksi endotermis yang memerlukan panas untuk bereaksi, akan tetapi apabila suhu terlalu tinggi maka katalis akan menguap yang mengakibatkan melambatnya reaksi hidrolisis dan akan berakibat pada konsentrasi glukosa yang diperoleh [17].

### 3.5 Pengaruh Waktu Hidrolisis terhadap Konsentrasi Glukosa Mikroalga

Hidrolisis dilakukan dengan asam sulfat konsentrasi 5,4, suhu 100°C, dan variasi waktu hidrolisis yaitu 5 menit, 10 menit, 15 menit, 20 menit. Pada gambar 4.5 dapat dilihat bahwa hidrolisis selama 10 menit dan 15 menit menghasilkan kadar glukosa yang tidak berbeda jauh sehingga untuk efisiensi waktu lebih baik menggunakan waktu hidrolisis 10 menit. Lamanya waktu hidrolisis mempengaruhi kadar glukosa yang dihasilkan ini disebabkan karena semakin lama waktu hidrolisis akan

memperpanjang kesempatan asam untuk mendegradasi ikatan rantai lurus dan panjang dari 1,4-beta-glukosa pada selulosa sehingga semakin banyak rantai selulosa dan hemiselulosa yang terurai menjadi glukosa. Namun pada waktu ke 20 menit terjadi penurunan kadar glukosa, hal ini disebabkan karena ion H<sup>+</sup> pada asam telah mencapai titik optimumnya dalam melepaskan ikatan rantai glikosidik pada selulosa [18].

**Gambar 3.5** Pengaruh waktu hidrolisis terhadap konsentrasi glukosa



### 3.6 Analisis Kadar Glukosa Mikroalga

Biomassa mikroalga paling banyak didapatkan pada medium dengan penambahan limbah cair tahu 2,5% yang dipanen pada hari ke 30 (fase eksponensial). Biomassa kering dihidrolisis dengan menggunakan asam sulfat 2N selama 15 menit dengan suhu 100°C, kemudian dilakukan pengukuran kadar glukosa dengan menggunakan metode Nelson-Somogy dan didapatkan kadar glukosa mikroalga *Scenedesmus dimorphus* 17,313 mg/gram biomassa dengan efisiensi hidrolisis yaitu 74%.

$$E (\%) = \frac{\text{massa glukosa} * f_h * 100}{\text{massa initial} * y_i}$$

## 4. Kesimpulan

Berdasarkan penelitian yang telah dilakukan terhadap medium pertumbuhan mikroalga *Scenedesmus dimorphus* maka dapat disimpulkan bahwa medium BBM yang ditambahkan dengan limbah cair tahu (LCT) efektif untuk meningkatkan pertumbuhan mikroalga *Scenedesmus dimorphus*. limbah cair tahu dengan konsentrasi 2,5% mampu meningkatkan pertumbuhan mikroalga *Scenedesmus dimorphus* lebih optimal dibandingkan dengan konsentrasi limbah cair tahu lainnya. Kondisi optimum hidrolisis yang menghasilkan kadar karbohidrat tertinggi didapatkan dengan menggunakan asam sulfat konsentrasi 5,4% dengan suhu

100°C dan waktu hidrolisis 15 menit. Kadar glukosa optimum yang didapatkan dari hasil hidrolisis adalah 17,313 mg/gram biomassa kering mikroalga dengan efisiensi hidrolisis 74%.

## Referensi

- [1]. Shuba, Eya Shumbulo.; Kifle.; Demeke.: Microalgae To Biofuels: 'Promising' Alternative and Renewable Energy, Review. *Renewable And Sustainable Energy Reviews*, 2018, 81, 743-755.
- [2]. Hyoung, kim kyong.: Bioethanol Production From Nutrient Stress Induced Microalga *Chlorella vulgaris* by Enzymatic Hydrolysis and Immbolized Yeast Fermentation. *Biotech*, 2014.153(10): 47-54.
- [3]. Comparison of pretreatment technologies and fermentation processes of bioethanol from microalgae. Review. *Energy Conversations and Management*. 2018. Halaman 81-94Kee, Phwan Chai.: Overview:
- [4]. Chadir, Zulkarnain.; Neri Fadjria.; Armaini.; Rahadian Zainul.: Isolation and Molecular Identification of Freshwater Microalgae in Maninjau Lake West Sumatra. *Der Pharmacia Lettre* 2016, 8:1 77- 1 87.
- [5]. Becker EW.: Microalgae Biotechnology and Microbiology. *Cambridge: University Press*. 1994. Halaman 279.
- [6]. Brown, M.R, et al. Nutritional Properties Of Microalgae for Marinculture. *Aquaculture*, .1997. 151, hal.315-331.
- [7]. S.F. Hadiwigeno.; Cholik.; F. Sukardi.: Peranan bioteknologi mikroalga dalam rangka menunjang pengembangan industri perikanan. *Prosiding Seminar Nasional Bioteknologi Mikroalga*.Bogor. 1995, 7-17.
- [8]. Dianursanti, Baharuddin Taufiq Ryzkitana.; Moh. Teguh Gumelar.: Industrial Tofu Wastewater as a Cultivation Medium of Microalgae *Chlorella vulgaris*.*Energy Procedia*. 2014. Hal. 56-61
- [9]. W.S. Agustini, N.W.S.; D. Susilaningsih.: Pertumbuhan Mikroalga *Scenedesmus sp.* dalam Limbah Cair Tahu dan Tapioka. *Prosiding Seminar Biologi XIV & Kongres Nasional Biologi XI*. Jakarta. 1997.Hal. 281-287
- [10]. Handayani, Sri Seno et al. Fermentasi Glukosa Hasil Hidrolisis Buah Kumbi Untuk Bahan Baku Bioetanol. *Jurnal Pijar Kimia*. 2016. Hal. 28-33
- [11]. Xiang, Q.et al. Heterogenous Aspect of Acid Hydrolysis of Cellulose. *Applied Biochemistry and Biotechnology*. 2003. 107. Hal 1-3
- [12]. Al-Kayyis.; Hasanuk Kiyan.; Hari Susanti.: Perbandingan Metode Somogyi-Nelson dan Anthrone-Sulfat pada Penetapan Kadar Gula Pereduksi dalam Umbi Cilembu (*Ipomea Batatas L.*). *Jurnal Farmasi Sains dan Komunitas*. 2016. Hal. 81-89
- [13]. Lutama, Dawud.; Sugeng Winarso. dkk: Uji Efektifitas Pertumbuhan *Spirulina sp* pada Limbah Cair Tahu yang Diperkaya Urea dan Super Phosfat 36 (SP 36). *Berkala Ilmiah Pertanian*. Hal. 10
- [14]. Widianingsih et al.: Kandungan Nutrisi *Spirulina platensis* yang dikultur Pada Media yang Berbeda. *Ilmu Kelautan*. 2008. Hal.169
- [15]. Osvaldo, Z. S. et al.: Pengaruh Konsentrasi Asam dan Waktu Pada Proses Hidrolisis dan Fermentasi Pembuatan Bioetanol dari Alang-alang. 2012. *Jurnal Teknik Kimia* .No. 2
- [16]. Taherzadeh, M.; J, Karimi K.: Acid Based Hydrolysis Processes for Ethanol from Lignocellulosic Materials: A Review. *BioResources*. 2007. Hal.472-499
- [17]. Wahyudi, et al.: Pengaruh Suhu terhadap Kadar Glukosa dan Konstanta Kecepatan Reaksi pada Hidrolisis Kulit Pisang. *Prosiding Seminar Nasional Teknik Kimia*. 2011. Hal.1-6
- [18]. Qaisum, Fajrina.: Hidrolisis Mikroalga Tetraselmis Chui Menjadi Glukosa Menggunakan Solvent Asam Sulfat dengan Variasi Waktu *Universitas Riau*.2015. Hal. 87-91

# PENGARUH FITOHORMON *INDOLE-3-BUTYRIC ACID* DAN VITAMIN C TERHADAP KANDUNGAN LIPID MIKROALGA *Chlorella vulgaris* UNTUK BAHAN BAKU BIODIESEL

Marniati Salim\*, Zulkarnain Chaidir, Hafizhatul Ilmi

Laboratorium Biokimia, Jurusan Kimia,  
Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam, Universitas Andalas, Kampus Limau Manis, Padang,  
25163 Indonesia

\*Author, Email: [bundosalim@gmail.com](mailto:bundosalim@gmail.com)

**Abstrak:** Mikroalga merupakan salah satu sumber bahan baku produksi biodiesel yang sangat potensial karena dapat menghasilkan lipid secara cepat. Mikroalga yang digunakan dalam penelitian ini adalah *Chlorella vulgaris* yang dikultur dengan variasi medium berbeda. Penelitian ini bertujuan untuk meningkatkan biomassa dan kandungan lipid dari mikroalga dengan penambahan fitohormon *Indole-3-Butyric Acid* (IBA) dan vitamin C. Mikroalga dikultur dalam medium dengan penambahan variasi konsentrasi IBA yaitu (1,5 mg/L; 2 mg/L dan 2,5 mg/L) dan variasi penambahan vitamin C (4 mg/L, 6 mg/L dan 8 mg/L). Hasil penelitian menunjukkan IBA dan vitamin C dapat meningkatkan pertumbuhan mikroalga *Chlorella vulgaris*, yaitu pada medium D (BBM + IBA 2,5 mg/L) menghasilkan biomassa optimum sebesar 0,1048 gram. Pada penambahan vitamin C, pertumbuhan optimum terdapat pada medium G (BBM + Vitamin C 8 mg/L) yaitu sebesar 0,1553 gram. Persentase kandungan lipid tertinggi pada variasi medium IBA dan vitamin C berturut-turut adalah 5,8 % (BBM + IBA 2,5 mg/L) dan 7,5% (BBM + Vitamin C 6 mg/L). Berdasarkan analisis FAME dengan GC-MS, jenis asam lemak yang dominan adalah asam palmitat .

**Kata Kunci:** Biodiesel, *Chlorella vulgaris*, fitohormon, *Indole-3-Butyric Acid*, vitamin C.

## 1. Pendahuluan

Pertumbuhan penduduk yang pesat dan kemajuan teknologi menyebabkan kebutuhan energi global semakin meningkat. Hampir setiap sarana dan prasarana penunjang kehidupan manusia digerakkan oleh energi. Meningkatnya kebutuhan energi menyebabkan sumber energi semakin berkurang, terutama Bahan Bakar Minyak (BBM). Sampai saat ini, energi sebagai penggerak roda perekonomian manusia masih berasal dari energi fosil yang tidak dapat diperbaharui<sup>1</sup>.

Proses pembakaran bahan bakar fosil menghasilkan efek yang kurang baik bagi lingkungan dan kesehatan seperti efek *green house*, dikarenakan kandungan karbon dioksida ( $\text{CO}_2$ ), sulfur dioksida ( $\text{SO}_2$ ), dan oksida nitrogen ( $\text{NO}_x$ )<sup>2</sup>. Mengatasi permasalahan ini, perlu adanya sumber energi alternatif yang dapat diperbaharui, ekonomis dan ramah lingkungan.

Biofuel merupakan sumber alternatif yang bisa menggantikan sumber energi fosil. Biofuel dapat dihasilkan dari biomassa yang dapat dikonversi menjadi bioetanol dan biodiesel. Biodiesel adalah sejenis bahan bakar yang termasuk kedalam kelompok bahan bakar nabati (BBN). Berbagai penelitian telah banyak melaporkan produksi biodiesel yang

bersumber dari lipid nabati seperti minyak kelapa sawit dan minyak jarak yang dapat diolah menjadi biodiesel melalui proses transesterifikasi<sup>3</sup>.

Konversi bahan pangan menjadi biodiesel akan menimbulkan persaingan bahan baku untuk konsumsi pangan sehari-hari dengan konsumsi biodiesel. Bahan pangan seperti kelapa sawit membutuhkan area pertanian yang luas sehingga biaya produksi mahal. Disisi lain, kebutuhan minyak diesel yang tinggi otomatis membutuhkan bahan baku dalam jumlah yang besar pula sehingga biaya produksi meningkat. Salah satu bahan baku yang berpotensi untuk menurunkan biaya produksi biodiesel adalah mikroalga, karena memiliki kandungan lipid tinggi serta lebih mudah dikembangkan pada area yang lebih kecil<sup>4,5</sup>.

Mikroalga merupakan sumber yang dapat diperbaharui dan dapat mengurangi emisi gas  $\text{CO}_2$  jika diolah sebagai bahan bakar<sup>2</sup>. Kandungan minyak mikroalga yang cukup tinggi menjadi salah satu alasan pengembangan biodiesel dari mikroalga<sup>5</sup>.

Menurut Mata (2010) persentase kandungan lipid mikroalga mulai dari 1,9% bahkan ada yang mencapai 75% dari berat kering biomassa. Salah satu mikroalga yang memiliki kandungan lipid yang tinggi

adalah *Chlorella vulgaris*, yaitu mencapai 5-58 %. Namun, potensi mikroalga sebagai sumber biodiesel belum layak secara ekonomi, karena rendahnya hasil biomassa dan lipid yang dihasilkan<sup>5</sup>.

Beberapa penelitian telah dilakukan untuk meningkatkan biomassa dan kandungan lipid mikroalga yaitu dengan penggunaan fitohormon dan antioksidan. Berdasarkan penelitian Parsaemehr (2017) telah dilakukan induksi beberapa senyawa fitohormon auksin dan sitokinin (BAP, Kin, IBA, NAA, 2,4-D, MeJA, SA, dan Eth) serta antioksidan (Cath, Vitamin C, PG, dan BHA) untuk memanipulasi pertumbuhan mikroalga *Chlorella protothecoides*<sup>6</sup>. Pada penelitian ini digunakan mikroalga *Chlorella vulgaris* karena *Chlorella vulgaris* memiliki potensi sebagai bahan baku biodiesel dengan kandungan lipid yang tinggi. Disamping itu, belum ada laporan mengenai *Chlorella vulgaris* yang ditambahkan fitohormon *Indole -3-Butyric Acid* (IBA) dan antioksidan vitamin C untuk mendapatkan biomassa dan kandungan lipid maksimum.

## 2. Metodologi Penelitian

### 2.1 Alat

Peralatan yang digunakan yaitu perlengkapan kultivasi (pompa akuarium, selang akuarium, botol kaca 500 mL, karet, plastik), peralatan gelas, botol vial, spektrofotometer *Visible*, *sentrifuge*, oven, *autoclave*, *freezer*, mikroskop cahaya, *hotplate*, magnetik bar, neraca analitis, aluminium foil, plastik wrap, GC-MS.

### 2.2 Bahan

Bahan-bahan yang digunakan dalam penelitian ini yaitu isolat mikroalga *Chlorella vulgaris*, medium BBM ( $\text{NaNO}_3$ ,  $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ ,  $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ ,  $\text{K}_2\text{HPO}_4$ ,  $\text{KH}_2\text{PO}_4$ ,  $\text{NaCl}$ , EDTA, KOH,  $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ ,  $\text{H}_2\text{SO}_4$ ,  $\text{H}_3\text{BO}_2$ ,  $\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ ,  $\text{MnCl}_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$ ,  $\text{MoO}_3$ ,  $\text{Co}(\text{NO}_3)_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ ,  $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ ), metanol, heksan,  $\text{H}_2\text{SO}_4$ , asam askorbat, IBA (*Indole 3 Butyric Acid*).

### 2.3 Prosedur Penelitian

#### 2.3.1 Pengamatan Sel Mikroalga *Chlorella vulgaris*

Sel mikroalga *Chlorella vulgaris* diamati dengan menggunakan mikroskop cahaya perbedasan 400x.

#### 2.3.2 Pembuatan Larutan Induk IBA (*Indole 3 Butyric Acid*).

Sebanyak 10 mg IBA ditimbang dan dilarutkan dalam akuades sebanyak 100 mL menjadi konsentrasi 100 mg/L. Kemudian dilakukan pengenceran untuk mendapatkan konsentrasi 1,5;2;2,5 mg/L.

Volume penggunaan untuk fitohormon ini adalah 1 mL/L.

**2.3.3 Pembuatan Larutan Induk Vitamin C**  
Vitamin C ditimbang sebanyak 10 mg kemudian dilarutkan dengan akuades steril pada labu 100 mL menjadi konsentrasi 100 mg/L. Kemudian dilakukan pengenceran menjadi untuk mendapatkan konsentrasi 4;6;8 mg/L. Volume penggunaan darivitamin C yaitu 1mL/L.

#### 2.3.4 Medium Pertumbuhan Mikroalga *Chlorella vulgaris*

**Tabel 2.1** Komposisi medium yang digunakan

Medium	Komposisi
A	BBM
B	BBM + IBA 1,5 mg/L
C	BBM + IBA 2 mg/L
D	BBM + IBA 2,5 mg/L
E	BBM + Vitamin C 4 mg/L
F	BBM + Vitamin C 6 mg/L
G	BBM + Vitamin C 8 mg/L

**2.3.5 Kultivasi Mikroalga *Chlorella vulgaris***  
Mikroalga *Chlorella vulgaris* dikultur pada medium A, B, C, D, E, F, dan G dalam botol kaca 500 mL pada kondisi yang sama. Bibit yang digunakan 1: 9 dari volume kultur. Setiap hari dilakukan *sampling* kultur dengan mengukur nilai *Optical Density* (OD) menggunakan spektrofotometer UV-Vis pada panjang gelombang 450 nm.

**2.3.6 Pemanenan dan Pengeringan**  
*Chlorella vulgaris* dipanen pada akhir fase eksponensial dengan metoda *sentrifuge*. Kultur BBM yang divariasi dengan IBA dipanen pada hari ke-6, sedangkan kultur variasi dengan vitamin C dipanen pada hari ke-7.

#### 2.3.7 Ekstraksi Lipid

Proses ekstraksi dilakukan dengan menggunakan metode maserasi menggunakan pelarut heksan dengan volume 10 ml untuk 0,1 g biomassa kering lalu di *shaker* selama 24 jam. Biomassa dan supernatan dipisahkan dengan *sentrifuge* pada kecepatan 3000 rpm selama 20 menit. Pelarut diuapkan dan didapatkan lipidnya. Proses ekstraksi diulangi beberapa kali<sup>7</sup>.

#### 2.3.8 Proses transesterifikasi

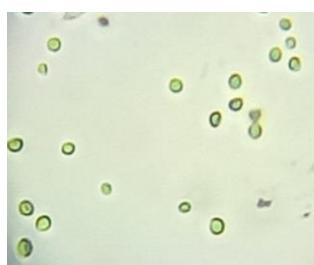
Proses transesterifikasi menggunakan methanol dan  $\text{H}_2\text{SO}_4$  96% sebagai katalis dengan perbandingan molar dari alkohol/lipid yaitu 10:1. Reaksi dilakukan pada suhu 60°C di bawah pengadukan konstan selama 1,5 jam<sup>8</sup>.

**2.3.9 Analisis Asam Lemak dan Metil Ester Asam Lemak (FAME) dengan GC- MS**  
Metil ester kemudian di analisis menggunakan GC-MS dengan kondisi

sebagai berikut: gas yang digunakan sebagai fase gerak adalah gas helium. Kolom yang digunakan adalah kolom DB-5 dengan aliran 2,03 mL/menit. Suhu oven kromatografi gas di program dari 50°C dibiarkan konstan selama 2 menit, kemudian dinaikkan hingga 250°C dengan kecepatan 50°C setiap 5 menit. Suhu injektor diatur 250°C. Data dicatat dan dianalisis dengan perangkat lunak GC-MS Real Time Analysis<sup>9</sup>.

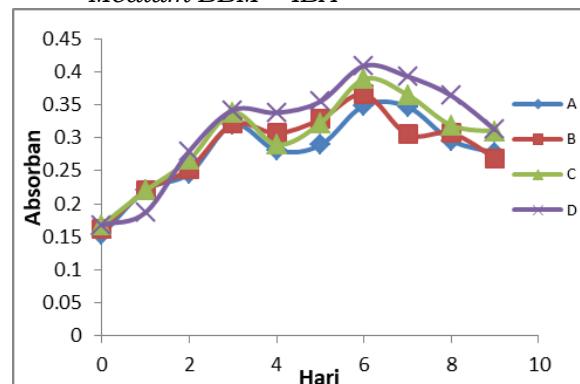
### 3. Hasil dan Diskusi

3.1 Morfologi Mikroalga *Chlorella vulgaris*  
Berdasarkan gambar dapat dilihat bahwa mikroalga yang terdapat pada kultur tidak terkontaminasi ditunjukkan dengan hanya terdapat 1 jenis spesies mikroalga pada kultur.



**Gambar 3.1** Morfologi mikroalga *Chlorella vulgaris* pada kultur

3.2 Kurva Pertumbuhan Mikroalga Pada Medium BBM + IBA



**Gambar 3.2** Kurva pertumbuhan mikroalga *Chlorella vulgaris* pada medium yang divariasikan dengan IBA.

Berdasarkan kurva pertumbuhan di atas dinyatakan bahwa dengan penambahan fitohormon IBA pada medium BBM dengan konsentrasi 1,5 mg/L, 2 mg/L, 2,5 mg/L dapat meningkatkan pertumbuhan mikroalga *Chlorella vulgaris*. Medium D (BBM + IBA 2,5 mg/L) menghasilkan nilai absorban paling tinggi pada akhir fase eksponensial yaitu mencapai nilai absorban (0,409). Hal ini dipengaruhi oleh konsentrasi yang berbeda dari fitohormon sehingga kinerja nitrogen pada masing-masing medium juga berbeda.

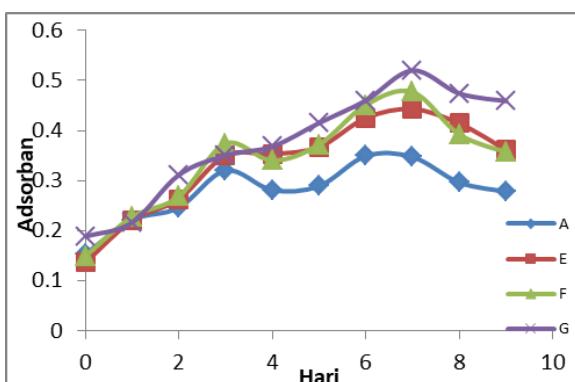
Kurva pertumbuhan menunjukkan, pada medium A, B, C dan D mikroalga tidak mengalami fase adaptasi. Pada hari ke-1 mikroalga langsung mengalami kenaikan nilai OD yang menandakan fase adaptasi mikroalga berlangsung cepat atau kurang dari 24 jam, karena sel-sel yang diinokulasikan berasal dari kultur yang berada dalam fase eksponensial. Akbar (2008) mengemukakan bahwa fase adaptasi juga ditentukan oleh medium dan lingkungan pertumbuhan. Sel yang ditempatkan dalam medium dan lingkungan pertumbuhan sama seperti medium dan lingkungan sebelumnya, tidak diperlukan waktu adaptasi yang lama<sup>10</sup>.

Berdasarkan nilai absorban pada masing-masing medium kultur, terjadi serapan tertinggi pada hari ke-6. Pertumbuhan dengan media BBM, mengalami fase stationer sampai hari ke-7 setelah mencapai puncak serapan tertinggi pada hari ke-6. Pada medium pertumbuhan yang ditambahkan fitohormon IBA, mikroalga tidak mengalami fase stasioner setelah mencapai fase eksponensial. Mikroalga cenderung menuju fase kematian, hal ini disebabkan mikroalga tidak tahan pada kondisi kritis sehingga langsung mengalami penurunan absorban<sup>10</sup>. Kondisi kritis pada kultur mikroalga berkaitan dengan berkurangnya sejumlah besar nutrisi dan akumulasi senyawa-senyawa sisa metabolisme<sup>11</sup>.

Kurva pertumbuhan mengalami kenaikan dan penurunan absorban, hal ini disebabkan karena cahaya yang digunakan hanya cahaya ruang. Berdasarkan penelitian Salim (2015) kultur dengan penyinaran lampu 2500 lux memiliki laju pertumbuhan lebih baik dibandingkan cahaya matahari karena intensitas cahaya lampu lebih besar dibandingkan cahaya matahari yang berkisar dari 1500 lux – 1800 lux<sup>12</sup>.

3.3 Kurva Pertumbuhan Mikroalga Pada Medium BBM + IBA

Kurva pertumbuhan pada Gambar 3.3 menunjukkan bahwa pertumbuhan mikroalga yang dikultivasi dengan penambahan vitamin C tidak mengalami fase adaptasi, sama hal nya dengan variasi IBA bahwa fase adaptasi berlangsung kurang dari 24 jam<sup>10</sup>.



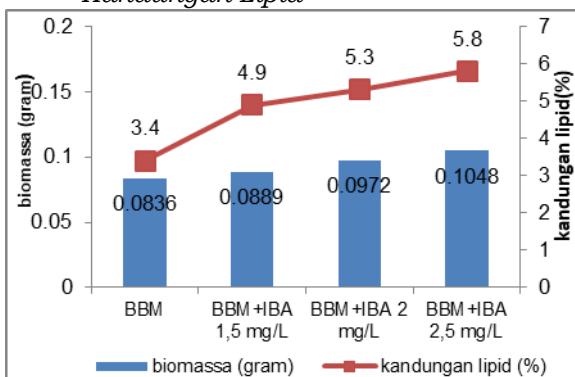
**Gambar 3.3** Kurva Pertumbuhan Mikroalga *Chlorella vulgaris* pada medium yang divariasikan dengan vitamin C.

Pada hari ke-0 sampai hari ke-3, mikroalga langsung mengalami fase eksponensial, kemudian mengalami peningkatan absorbansi sampai hari ke-7. Hari ke-7 merupakan puncak serapan tertinggi yang menandakan akhir fase eksponensial mikroalga *Chlorella vulgaris*. Namun, pada fase ini mikroalga tidak tahan pada kondisi kritis, sehingga langsung mengalami penurunan absorbansi.

Mikroalga *Chlorella vulgaris* dipanen pada hari ke-7 untuk mendapat lipid yang optimal. Pada fase ini mikroalga aktif memperbanyak sel dan merupakan kondisi optimum metabolit primer yang ada pada mikroalga, seperti karbohidrat, protein dan lipid<sup>1</sup>.

Pengaruh penambahan vitamin C pada kultur memberikan peningkatan yang paling besar pada medium G (BBM+Vitamin C 8 mg/L), dibandingkan medium lainnya. Kurva tersebut menunjukkan bahwa vitamin C mampu mempercepat pertumbuhan sehingga meningkatkan kepadatan sel mikroalga *Chlorella vulgaris* karena adanya pengaruh vitamin C yang membantu proses fotosintesis<sup>5</sup>.

### 3.4 Pengaruh Konsentrasi Indole Butyric Acid (IBA) Terhadap Biomassa dan Kandungan Lipid



**Gambar 3.4** Pengaruh Konsentrasi Indole Butyric Acid (IBA) terhadap Biomassa dan Kandungan Lipid.

Berdasarkan diagram diatas, dapat dinyatakan bahwa bobot biomassa berbanding lurus dengan konsentrasi fitohormon IBA yang ditambahkan. Biomassa paling besar didapatkan pada penambahan IBA konsentrasi 2,5 mg/L sebesar 0,1048 gram. Semakin besar konsentrasi IBA yang ditambahkan, maka semakin banyak biomassa yang dihasilkan karena adanya kandungan nitrogen tambahan untuk mikroalga. Nitrogen merupakan zat yang diperlukan untuk pembentukan klorofil yang dibutuhkan dalam proses fotosintesis. Semakin banyak proses fotosintesis, maka proses pembelahan sel akan semakin cepat sehingga biomassa juga akan semakin banyak<sup>13</sup>.

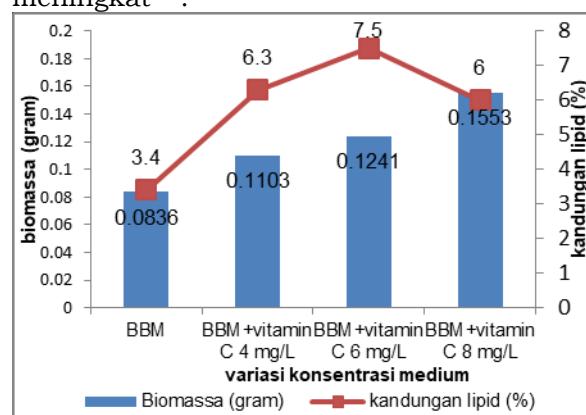
Induksi IBA dapat mengaktifkan pompa proton (ion H<sup>+</sup>) yang terletak pada membran plasma sehingga menyebabkan pH pada bagian dinding sel lebih rendah dari biasanya. Aktifnya pompa proton tersebut dapat memutuskan ikatan hidrogen. Putusnya ikatan hidrogen menyebabkan dinding sel mudah meregang yang mengakibatkan tekanan dinding sel akan menurun sehingga terjadilah proses pelenturan sel. pH rendah juga dapat mengaktifkan enzim tertentu pada dinding sel yang dapat mendegradasi bermacam-macam protein yang menyebar pada dinding sel yang lunak dan lentur, sehingga pembentangan dan pembesaran sel dapat terjadi yang diikuti oleh pembelahan sel mikroalga<sup>14</sup>.

Pengaruh konsentrasi IBA terhadap kadar lipid mikroalga menunjukkan hasil yang sebaliknya. Persentase lipid semakin meningkat dengan adanya penambahan fitohormon IBA. Persentase lipid paling tinggi pada penambahan fitohormon IBA pada konsentrasi 2,5 mg/L sebesar 5,8%. Hal ini disebabkan karena, hormon IBA memiliki kandungan nitrogen yang berfungsi sebagai sumber produksi protein yang akan diubah dalam bentuk asam piruvat, kemudian dirubah menjadi asetil KoA yang menjadi sumber biosintesis lipid pada mikroalga. Bertambahnya komposisi fitohormon IBA akan meningkatkan persentase lipid pada mikroalga<sup>13</sup>.

### 3.5 Pengaruh Konsentrasi Vitamin C Terhadap Biomassa dan Kandungan Lipid

Pada Gambar 3.5 menyatakan konsentrasi vitamin C yang ditambahkan dapat meningkatkan bobot biomassa pada konsentrasi tertentu. Kultur dengan BBM+vitamin C 8 mg/L menghasilkan biomassa terbanyak yaitu sebesar 0,1553 gram. Semakin besar konsentrasi vitamin C

yang ditambahkan, maka biomassa yang dihasilkan juga semakin banyak. Hal ini disebabkan karena vitamin C memiliki sumber karbon yang dapat digunakan mikroalga sebagai sumber fotosintesis. Disamping nitrogen sebagai nutrisi tambahan, karbon juga dapat meningkatkan biomassa mikroalga. Dalam proses fotosintesis, mikroalga menggunakan karbon sebagai sumber untuk pertumbuhan. Semakin besar konsentrasi vitamin C, maka jumlah karbon tambahan untuk fotosintesis semakin banyak. Proses fotosintesis dapat berjalan cepat sehingga kepadatan sel juga meningkat<sup>10</sup>.



**Gambar 3.5** Pengaruh Konsentrasi Vitamin C terhadap Biomassa dan Kandungan Lipid.

Disamping itu, vitamin C juga dapat membantu proses fotosintesis dengan menyumbangkan elektron dan meningkatkan kinerja fotosistem. Pada saat fotosistem tidak aktif bekerja pada kondisi stress, vitamin C akan mendonorkan elektron sehingga mampu mengembalikan fungsi dari fotosistem dan menjaga agar proses aliran elektron tetap berlangsung<sup>13</sup>.

Selanjutnya dilakukan ekstraksi lipid untuk mengetahui pengaruh konsentrasi terhadap kandungan lipid mikroalga *Chlorella vulgaris*. Metode ekstraksi yang digunakan adalah metode maserasi dengan pelarut heksan. Selain itu, proses ekstraksi juga dibantu dengan sonikator untuk mendapatkan hasil ekstraksi yang lebih sempurna. Adanya gelombang ultrasonik yang dialirkan dapat merusak dan memecah dinding sel mikroalga sehingga proses ekstraksi lebih cepat dan sempurna<sup>3</sup>.

Pada Gambar 3,5, persentase kandungan lipid tertinggi yaitu pada medium F (BBM+Vitamin C 6 mg/L) dengan persentase kandungan lipid sebesar 7,5 % sedangkan persentase

kandungan lipid pada konsentrasi 8 mg/L mengalami penurunan menjadi 6%. Hal ini dimungkinkan adanya senyawa metabolit sekunder lain yang ikut larut dalam heksan, mengingat proses ekstraksi lipid menggunakan metoda maserasi yang sederhana. Jika dibandingkan dengan kurva pertumbuhan, medium G (BBM+vitamin C 8 mg/L) optimum meningkatkan pertumbuhan mikroalga namun mengalami penurunan persentase lipid. Hal ini disebabkan karna vitamin C bersifat sebagai antioksidan, dengan penambahan vitamin C 8 mg/L mikroalga mampu bertahan dari kondisi stress lingkungan sehingga pertumbuhannya tidak terganggu.

### 3.6 Analisis Fatty Acid Metil Ester (FAME) *Chlorella vulgaris*

**Tabel 3.1.** Profil Fatty Acid Methyl Ester (FAME) dari lipid mikroalga *Chlorella vulgaris*

No	Metil ester	Asam Lemak	% Area
1	Metil dodekanoat	Asam laurat (C12:0)	0,10
2	Metil pentadekanoat	Asam pentadekanoat (C15:1)	0,44
3	Metil heksadekanoat	Asam palmitat (C16:0)	9,93
4	Metil 9-heksadekanoat	Asam palmitoleat (C16:1)	2,52
5	Metil oktadekanoat	Asam stearat (18:0)	1,60
6	Metil oktadekanoat	Asam oleat (C18:1)	1,60
7	Metil 9,12-oktadekadienoat	Asam linoleat (C18:2)	5,60
8	Metil dokosanoat	Asam behenik (C22:0)	0,19
9	Metil trikosanoat	Asam trikosilik (C23:0)	0,12
10	Metil tetrakosanoat	Asam lignoserik (C24:0)	0,07

Profil asam lemak yang didapatkan beragam, mulai dari SFA (Saturated Fatty Acid), MUFA (Mono Unsaturated Fatty Acid) dan PUFA (Poly Unsaturated Fatty Acid). SFA (Saturated Fatty Acid) dan MUFA (Mono Unsaturated Fatty Acid) merupakan asam lemak yang cocok untuk produksi biodiesel, karena tidak menurunkan angka setana, sedangkan PUFA (Poly Unsaturated Fatty Acid) dapat menyebabkan penurunan angka setana karena memiliki ikatan rangkap pada rantai karbonnya<sup>16</sup>. Asam linoleat (C18:2) adalah asam lemak omega-6 yang

termasuk asam lemak esensial untuk manusia, sehingga berpotensi sebagai makanan fungsional<sup>3</sup>. Tabel 3.1 menunjukkan jenis asam lemak yang dominan pada lipid *Chlorella vulgaris* adalah asam palmitat (C16:0), asam linoleat (C18:2) dan asam palmitoleat (C16:1)

#### 4. Kesimpulan

Berdasarkan penelitian yang telah dilakukan pada medium pertumbuhan mikroalga *Chlorella vulgaris*, dapat disimpulkan bahwa penambahan fitohormon IBA dan vitamin C dapat meningkatkan pertumbuhan biomassa dan kadar lipid pada konsentrasi tertentu. Persentase lipid tertinggi didapatkan dalam medium F (BBM + vitamin C 6 mg/L) yaitu sebesar 7,5% sedangkan dengan penambahan IBA kandungan lipid terbesar didapatkan pada konsentrasi 2,5 mg/L yaitu sebesar 5,8%. Berdasarkan hasil analisa dengan GC-MS, jenis asam lemak dominan pada mikroalga yang dikultur pada medium F adalah asam palmitat (C16:0) dan asam stearat (18:0) yang berpotensi sebagai biodiesel.

#### 5. Ucapan Terima Kasih

Penulis mengucapkan terima kasih kepada analis dan rekan-rekan yang telah membantu dalam pelaksanaan penelitian di Laboratorium Biokimia Jurusan Kimia Universitas Andalas.

#### Referensi

- [1] Amini, Sri.; Rini, S.: Produksi Biodiesel dari Mikroalga *Botryococcus braunii. Squalen* 2010, 5, 23-32.
- [2] Patil, V.; Tran, K.Q.; Giselrod, H.R.: Towards sustainable production of biodiesels from microalgae. *Int. J. Mol. Sci* 2008, 9, 1158–1195.
- [3] M.H. Young.; H. Lee.; C. Lee.; J, Kang.; et.al.: An intregative process for obtaining lipids and glucose from *Chlorella vulgaris* biomass with single treatment of cell disruption. *Algal Research* 2017, 27, 286-294.
- [4] Chisti, Y.; Biodiesel Form Microalgae. *Biotechnol Advances* 2007, 25, 294 –306.
- [5] Mata, T.M.; Anto' nio A.; Martins, Nidia.; S. Caetano.; 2010. Microalgae for Biodiesel Production and Other Applications: A review. *Renewable and Sustainable Energy Reviews* 2010, 14, 217-232.
- [6] Parsaeimehr, Ali, et.al.: A chemical approach to manipulate the algal growth, lipid content and high value alpha-linolenic acid for biodiesel production. *Algal Research* 2017, 26, 312–322.
- [7] Melanie, Susiana.; Diini Fithriani.: Rendemen Minyak dari Mikroalga *Spirulina Sp.* dan *Chlorella Sp.* dengan Teknik Pemecahan Dinding Sel. *Balai Besar Penelitian dan Pengembangan Pengolahan Produk dan Bioteknologi Kelautan dan Perikanan* 2015, 1, 61-70.
- [8] Al-Iwayzy, S.; Yusaf,T.; Al-Juboori, R.: Biofuels from The Fresh Water Microalgae *Chlorella vulgaris* (FWM-CV) for Diesel Engines. *Energies ISSN* 2014, 4, 176-183.
- [9] Azka, Aulia; Nurjanah; Agoes M.J.: Profile of Fatty Acids,Amino Acids,Caretenoid Total, and α-Tocopherol from Flying Fish Eggs. *JPHPI* 2015,18 (3), 252.
- [10] Akbar, T.M.: Pengaruh Cahaya Terhadap Senyawa Antibakteri dari *Chaetoceros gracils*. *Skripsi*, Fakultas Perikanan dan Ilmu Kelautan, IPB, Bogor, 2008.
- [11] Chaidir, Z.; Elida Mardiah; Nasrul Zuwardi: Isolasi Mikroalga dari Perairan Air Tawar di Aliran Sungai Daerah Lubuk Minturun yang Berpotensi untuk Produksi Biodiesel. *Jurnal Kimia Unand* 2015, 4 (2): 36-41.
- [12] Salim, Marniati; Zulkarnain Chaidir; Rini Yulia Ekanastiti: Variasi Penambahan Konsentrasi Nitrogen Pada Produksi Lipid Dari Mikroalga *Dunaliella Salina* Untuk Bahan Baku Biodiesel. *Jurnal Kimia Unand* 2015, 4 (4): 53-59.
- [13] Bellou, S and G. Aggelis.: Biochemical Activities in *Chlorella sp* and *Nannochloropsis salina* During Lipid and Sugar Synthesis in a Lab Scale Open Pound Simulating Reactor. *Jurnal Biotechnology* 2013, 1, 1-12.
- [14] Shofiana, Arini; Yuni, S.R.; Lukas, S.B.: Pengaruh Pemberian Berbagai Konsentrasi Hormon IBA (*Indole Butyric Acid*) terhadap Pertumbuhan Akar pada Stek Batang Tanaman Buah Naga (*Hylocereus undatus*). *Lentera Biologi* 2013, 2 (1), 101-105.
- [15] Ivanov, B.N.: Role Of Ascorbic Acid in Photosynthesis. *Review Biokhimiya* 2014, 79, 282-289.
- [16] Zahir, F.N.: Peningkatan Produksi Biomassa *Chlorella vulgaris* dengan Perlakuan Mikrofiltrasi Pada Sirkulasi Aliran Medium Kultur Sebagai Bahan Baku Biodiesel. *Skripsi*, Fakultas

Teknik, Universitas Indonesia, 2011,  
6-7.

# ISOLASI DAN KARAKTERISASI TRITERPENOID DARI EKSTRAK ETIL ASETAT DAUN JARAK MERAH (*Jatropha gossypifolia* Linn)

Norman Ferdinal, Bustanul Arifin, Nurjelita\*

Laboratorium Kimia Organik Bahan Alam, Jurusan Kimia FMIPA, Universitas Andalas

\*E-mail: [nurjelita20@gmail.com](mailto:nurjelita20@gmail.com)

**Abstrak:** Isolation and purification of triterpenoid compound from jarak merah (*Jatropha gossypifolia* Linn) leaves ethyl acetate extract was done by chromatography method. Isolation was done by silica gel stationary as stationary phase and eluted with SGP (*step gradient polarity*). The results of column chromatography separation in E fraction, positively contain triterpenoid and giving single simple spot on thin layer chromatography plate so purification was done with recrystallization. The isolation compound was white-solids melted at the temperatures of 134°C-135°C, it yields triterpenoid compound to testify with *Liebermann-Burchard* (LB) on the thin layer chromatography plate giving single stain purplish red spot. The compound pure was characterized using spectroscopy method. The UV spectrum isolation compound in methanol solvents showed the existence of maximum uptake of double bond at  $\lambda_{\text{max}} = 204$  nm. The IR spectrum showed the existence of characteristics of triterpenoid compounds was geminal dimethyl and also absorptions OH, C-H alifatik, C=C, and C-O.

**Kata Kunci:** *Jatropha gossypifolia* Linn, triterpenoid, UV, IR

## 1. Pendahuluan

Jarak merah (*Jatropha gossypifolia* Linn) termasuk kedalam famili Euphorbiaceae, yang dapat tumbuh pada negara beriklim tropis [1]. Secara tradisional, tumbuhan ini dimanfaatkan oleh masyarakat sebagai obat penurun panas, pencahar, diare, rematik, penyakit kulit, keseleo, luka, kanker kulit, mimisan, dan sakit gusi [2-5].

Tumbuhan jarak merah di Indonesia tidak hanya sebagai obat tradisional, tapi juga dimanfaatkan sebagai bahan alternatif dalam pengendalian keong *Oncomelania hupensis lindoensis* yang menyebarkan penyakit schistosomiasis [6].

Manfaat tumbuhan jarak merah dipengaruhi oleh kandungan senyawa metabolit sekunder didalamnya, sehingga penelitian sebelumnya melaporkan bahwa tumbuhan tersebut memiliki biaktivitas sebagai antioksidan, anti-inflamasi, analgesik, antihipertensi, antiphidian, antipiretik, antibiotik, antianemik, antidiabetik, antihemoragik dan antibakteri [7-11]. Adapun kandungan senyawa metabolit sekunder yang terdapat dalam jarak merah yang dilaporkan adalah alkaloid, kumarin, steroid, saponin, tanin, flavonoid, fenolik, dan triterpenoid [10,12].

Menurut Tinto (1992), isolasi ekstrak etanol daun jarak merah mengandung dua senyawa triterpenoid yaitu (2 $\alpha$ ,13 $\alpha$ ,14 $\beta$ ,20S)-2,24,25-trihydroxylanost-7-en-(3-one) dan (13 $\alpha$ ,14 $\beta$ ,20S)-2,24,25-trihydroxylanost-1,7 -diene-(3-one) dengan titik lelehnya sebesar 118°C -120°C [13].

Penelitian sebelumnya melaporkan bahwa ekstrak etil asetat daun jarak merah bagus sebagai antioksidan menggunakan metode 1,1-difenil-2-pikrilhidrazil (DPPH) dengan nilai IC<sub>50</sub> sebesar 57,248 mg/L. Dan juga bersifat toksik dengan nilai LC<sub>50</sub> sebesar 123,310 mg/L menggunakan metode *Brine Shrimp Lethality Test* [14].

Pada penelitian ini telah diisolasi senyawa triterpenoid dari ekstrak etil asetat daun jarak merah dan dikarakterisasi menggunakan UV serta IR.

## 2. Metode Penelitian

### 2.1 Alat

Peralatan yang digunakan saat penelitian adalah seperangkat alat distilasi, oven, botol reagen gelap, kolom kromatografi, botol vial 10 mL dan 100 mL, spektroskopi UV-Vis, spektroskopi FT-IR, neraca analitik, *melting point apparatus*, tabung reaksi, rak tabung reaksi, desikator, *chamber*, pipet tetes, spatula, pipa kapiler, lampu UV ( $\lambda$  254 nm dan 365 nm) sebagai penampak noda, dan peralatan gelas lainnya yang umum digunakan di Laboratorium.

### 2.2 Bahan

Bahan yang digunakan dalam penelitian adalah ekstrak etil asetat daun jarak merah (*Jatropha gossypifolia* L.) yang digunakan sebagai sampel diperoleh dari penelitian Yongki Vernando [14]. Pelarut organik yang sudah didestilasi (n-heksana, EtAOc, dan MeOH), akuades, HCl pekat, CHCl<sub>3</sub>, kloroform-amoniak 0,05 M, H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 2 N,

bubuk Mg dan pereaksi  $\text{FeCl}_3$ . Anhidrida asetat dan  $\text{H}_2\text{SO}_4$  pekat untuk membuat pereaksi *Liebermann-Burchard* (LB). Sedangkan KI dan  $\text{HgCl}_2$  sebagai pembuatan pereaksi Mayer. Fasa diam yang digunakan untuk kolom kromatografi yaitu silika gel (0,063 - 0,200 mm). Pada analisis kromatografi lapis tipis digunakan plat KLT (silika gel 60  $\text{F}_{254}$ ) dan uap  $\text{I}_2$  untuk penampak noda. Bahan yang digunakan sebagai penunjang percobaan, yaitu kapas dan aluminium voil.

### 2.3 Prosedur penelitian

#### 2.3.1 Persiapan reagen

a) Pereaksi *Liebermann-Burchard* (LB)  
Anhidrida asetat dan  $\text{H}_2\text{SO}_4$  pekat dicampurkan secara perlahan-lahan kedalam labu ukur 100 mL masing-masing sebanyak 5 mL, lalu diencerkan dengan pelarut etanol hingga volume 100 mL.

b) Pereaksi  $\text{FeCl}_3$  5%

$\text{FeCl}_3$  ditimbang sebanyak 5 gram dan dimasukkan ke dalam labu ukur 100 mL, kemudian encerkan dengan akuades hingga volume 100 mL.

c) Pereaksi Mayer

$\text{HgCl}_2$  ditimbang sebanyak 1,36 gram dan diencerkan dengan akuades hingga tanda batas dalam labu ukur 100 mL (larutan 1). Kemudian KI sebanyak 3 gram diencerkan sampai tanda batas dengan akuades dalam labu ukur 100 mL lainnya (larutan 2). Selanjutnya larutan 1 dipipet 60 mL dan dicampurkan dengan 10 mL larutan 2 kedalam labu ukur 100 mL baru diencerkan dengan akuades hingga tanda batas.

d)  $\text{H}_2\text{SO}_4$  2 N

$\text{H}_2\text{SO}_4$  pekat sebanyak 13,9 mL dimasukkan ke dalam 100 mL gelas piala yang telah berisi akuades secara perlahan, kemudian diencerkan dalam labu ukur 250 mL hingga tanda batas.

#### 2.3.2 Uji Skrining Fitokimia

Ekstrak etil asetat daun jarak merah diidentifikasi senyawa metabolit sekunder yang terkandung didalamnya dengan cara uji skrining fitokimia.

a) Uji Triterpenoid dan Steroid

Uji triterpenoid dan steroid dilakukan dengan cara sampel ditambahkan anhidrida asetat dan  $\text{H}_2\text{SO}_4$  pekat. Apabila positif mengandung triterpenoid adanya warna merah keunguan, sedangkan steroid ditandai dengan warna hijau.

b) Uji Fenolik

Sampel ditambahkan pereaksi  $\text{FeCl}_3$  5%, apabila terbentuk warna larutan hijau kehitaman positif mengandung fenolik.

c) Uji Flavonoid

Uji flavonoid dilakukan dengan *sianidin test*, dimana sampel ditambahkan HCl pekat dan beberapa bubuk Mg. Apabila terbentuk warna merah-jingga, positif mengandung flavonoid.

d) Uji Saponin

Uji saponin dilakukan dengan mengaduk lapisan air dalam tabung reaksi bila busa tidak hilang saat penambahan HCl pekat maka sampel positif mengandung saponin.

e) Uji Alkaloid

Sampel ditambah 10 mL  $\text{CHCl}_3$  dan 10 mL kloroform-amoniam 0,05 M kemudian diaduk. Campuran dimasukkan kedalam tabung reaksi dan ditambahkan 1 mL  $\text{H}_2\text{SO}_4$  2 N, lalu diaduk dan didiamkan sehingga terbentuk dua lapisan. Lapisan asam ditambahkan beberapa tetes pereaksi Mayer, apabila terbentuk endapan putih maka positif mengandung alkaloid.

#### 2.3.3 Isolasi Senyawa Metabolit Sekunder

Senyawa metabolit sekunder dari ekstrak etil asetat dipisahkan dengan kolom kromatografi. Sebelum dipisahkan terlebih dahulu dilakukan uji kromatografi lapis tipis (KLT) dengan beberapa perbandingan eluen untuk menentukan sistem elusi yang digunakan dalam kromatografi kolom yaitu *step gradient polarity* (SGP).

Sampel dipreabsorbsi sebelum dimasukkan kedalam kolom kromatografi dengan dicampurkan silika gel (1:1) hingga homogen dan berbentuk bubuk, kemudian dimasukkan dalam kromatografi kolom yang telah berisi silika. Selanjutnya dielusi menggunakan pelarut yang tingkat kepolarannya berbeda yaitu n-heksan 100%, n-heksan : EtAOc, EtAOc 100%, EtAOc : MeOH dan MeOH 100%.

Hasil kromatografi kolom tersebut diperoleh 16 fraksi (A-P), kemudian dilakukan pemurnian terhadap fraksi E yang positif mengandung triterpenoid dengan metode rekristalisasi. Hasilnya diperoleh padatan putih dan saat di KLT terdapat noda tunggal warna merah keunguan setelah ditotolkan pereaksi *Liebermann-Burchard* (LB).

#### 2.3.4 Uji Kemurnian dan Karakterisasi

Senyawa hasil isolasi di uji kemurnian menggunakan KLT dengan beberapa

perbandingan eluen, identifikasi golongan senyawa triterpenoid dan uji titik leleh.

Selanjutnya dikarakterisasi senyawa hasil isolasi menggunakan spektroskopi UV-Vis dan FT-IR.

### 3. Hasil dan Pembahasan

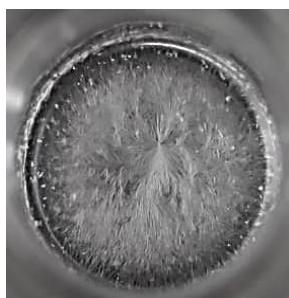
Tabel 3.1 Hasil uji skrining fitokimia ekstrak etil asetat daun jarak merah.

No.	Kandungan Kimia	Pereaksi	Pengamatan	Hasil
1.	Triterpenoid	<i>Liebermann-Burchard</i> (LB)	Terbentuk warna merah keunguan	(+)
2.	Steroid	<i>Liebermann-Burchard</i> (LB)	Terbentuk hijau	(+)
3.	Fenolik	FeCl <sub>3</sub> 5%	Timbul larutan warna hijau kehitaman	(+)
4.	Flavonoid	<i>Sianidin Test</i> (HCl pekat dan Mg)	Tidak terbentuk larutan warna merah-jingga	(-)
5.	Saponin	HCl pekat, kocok	Tidak terbentuk busa	(-)
6.	Alkaloid	Mayer	Tidak terbentuk endapan putih	(-)

Keterangan : (+) = Ada,  
(-) = Tidak ada

3.2 Isolasi Senyawa Metabolit Sekunder  
Hasil kromatografi kolom dari isolasi ekstrak etil asetat diperoleh eluat sebanyak 1044 vial. Kemudian eluat tersebut dikelompokkan berdasarkan pola noda dan nilai Rf yang dilihat pada plat KLT dengan interval lima sehingga diperoleh 16 fraksi (A-P).

Fraksi yang dimurnikan untuk selanjutnya adalah fraksi E sebanyak 0,325 gram. Fraksi tersebut digunakan karena terdapatnya padatan putih dan positif mengandung triterpenoid. Metode pemurnian yang dilakukan terhadap fraksi E yaitu metode rekristalisasi menggunakan pelarut n-heksan dan EtAOc. Padatan putih yang telah murni diperoleh sebanyak 9 mg. Senyawa hasil isolasi tersebut dapat dilihat pada gambar 3.1.



Gambar 3.1. Senyawa hasil isolasi

3.3 Uji Kemurnian dan Karakterisasi  
Senyawa hasil isolasi diuji kemurniannya dengan plat KLT menggunakan beberapa perbandingan eluen, kemudian diidentifikasi golongan senyawanya. Hasil

#### 3.1 Uji Skrining Fitokimia

Pengujian skrining fitokimia dilakukan untuk menentukan kandungan senyawa metabolit sekunder yang terkandung dalam ekstrak etil asetat daun jarak merah. Hasil uji skrining fitokimia dapat dilihat pada tabel 1.

uji kemurnian dan identifikasi golongan senyawa dapat dilihat pada tabel 3.2 dan 3.3.

Tabel 3.2 Hasil monitor senyawa hasil isolasi dengan KLT

No.	Perbandingan Eluen n-heksan	Jumlah EtAOc	Rf Noda
1.	9	1	0,35
2.	8	2	0,70
3.	7	3	0,77

Tabel 4.5 Hasil pengujian senyawa hasil isolasi dengan penampak noda

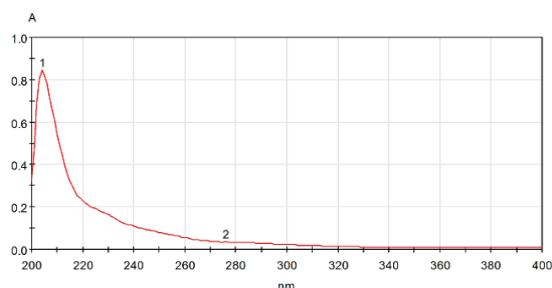
No.	Penampak Noda	Jumlah Noda	Warna Noda
1.	Sinar UV λ 254 nm	-	-
2.	Sinar UV λ 365 nm	-	-
3.	<i>Liebermann-Burchard</i> (LB)	1	Merah keunguan

Keterangan : (-) = Tidak ada

Berdasarkan uji kemurnian terhadap senyawa hasil isolasi menggunakan beberapa eluen menunjukkan bahwa senyawa tersebut telah murni karena noda yang terbentuk pada plat KLT yaitu tunggal.

Identifikasi golongan senyawa pada tabel 3.3 menunjukkan bahwa senyawa hasil isolasi merupakan senyawa golongan triterpenoid yang ditandai dengan adanya pola noda berwarna merah keunguan pada plat KLT menggunakan pereaksi *Liebermann-Burchard* (LB).

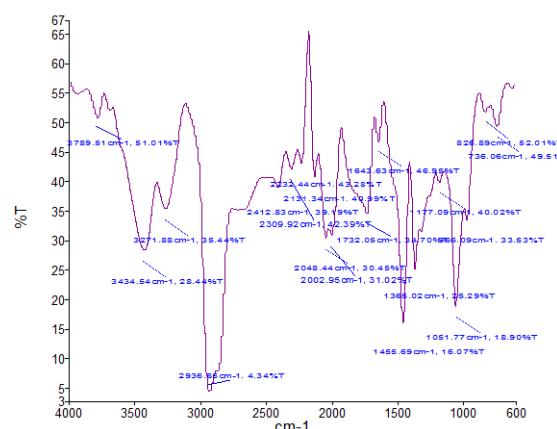
Kemurnian suatu senyawa murni juga dapat dilihat dari uji titik leleh dengan rentang kecil dari 2°C. Berdasarkan hasil penetuan titik leleh senyawa hasil isolasi diperoleh sebesar 134°C - 135°C dengan rentang 1°C. Hal ini menunjukkan bahwa senyawa triterpenoid yang diisolasi telah murni. Jika dibandingkan dengan senyawa triterpenoid yang dilaporkan oleh Tinto (1992) dari ekstrak etanol daun jarak merah berbeda jauh titik lelehnya [13].



Gambar 3.2. Spektrum UV senyawa hasil isolasi

Spektrum UV senyawa hasil isolasi pada gambar 3.2 menunjukkan terdapatnya puncak serapan maksimum pada  $\lambda_{\text{max}} = 204$  nm dalam pelarut metanol yang terjadi karena adanya eksitasi elektron dari  $\pi \rightarrow \pi^*$  yang menandakan terbentuknya kromofor dari ikatan rangkap ( $C=C$ ), sehingga senyawa hasil isolasi tersebut tidak membentuk ikatan rangkap yang berkongugasi.

Hasil karakterisasi menggunakan spektrofotometer FT-IR berupa spektrum IR yang dapat dilihat pada gambar 3.3 menunjukkan bahwa adanya pita serapan bilangan gelombang  $3434,54\text{ cm}^{-1}$  yang menandakan vibrasi ulur pada gugus hidroksi ( $\text{OH}$ ) yang didukung dengan adanya serapan  $\text{O-H}$  pada bilangan gelombang  $736,06\text{ cm}^{-1}$ . Pada bilangan gelombang  $2936,86\text{ cm}^{-1}$  mengindikasikan terbentuknya pita serapan  $\text{C-H}$  alifatik alkana yang diperkuat dengan adanya vibrasi tekuk  $-\text{CH}_3$  pada bilangan gelombang  $1455,69\text{ cm}^{-1}$  dan tekukan  $-\text{CH}_2$  pada bilangan gelombang  $1365,02\text{ cm}^{-1}$  yang merupakan geminal dimetil serapan khas dari senyawa golongan triterpenoid. Pita serapan gugus  $\text{C=C}$  ditunjukkan pada bilangan gelombang  $1643,63\text{ cm}^{-1}$  yang diperkuat dengan adanya vibrasi tekuk  $\text{C-H}$  alifatik alkena pada serapan  $826,59\text{ cm}^{-1}$ . Sedangkan pita serapan pada bilangan gelombang  $1051,77\text{ cm}^{-1}$  menandakan bahwa adanya vibrasi ulur dari  $\text{C-O}$



Gambar 3.3. Spektrum IR senyawa hasil isolasi

#### **4. Kesimpulan**

Senyawa hasil isolasi dari ekstrak etil asetat daun jarak merah (*Jatropha gossypifolia* L.) merupakan senyawa golongan triterpenoid berupa padatan putih dengan titik leleh 134°C - 135°C. Hal ini dibuktikan dengan uji kualitatif dengan pereaksi *Liebermann-Burchard* (LB) menunjukkan terbentuknya noda tunggal berwarna merah keunguan pada KLT setelah dipanaskan. Berdasarkan data spektrum UV menunjukkan adanya serapan maksimum ikatan rangkap dari senyawa hasil isolasi pada  $\lambda_{max} = 204$ , sedangkan spektrum IR menunjukkan bahwa adanya serapan hidroksi (OH), C-H alifatik, C-O, C=C, dan gugus ciri khas dari senyawa golongan triterpenoid yaitu geminal dimetil.

## **5. Ucapan terima kasih**

Penulis mengucapkan terimakasih kepada analis Laboratorium Jurusan Kimia Universitas Andalas dan semua pihak yang telah membantu penelitian ini.

## Referensi

- [1] Jain, S.; Choudhary, G.P.; Jain, D.K.: Pharmacological evaluation and antifertility activity of *Jatropha gossypifolia* in rats. *BioMed Research International* 2013, 1-5.
  - [2] Dhale, D. A.; Birari, A. R.: Preliminary screening of antimicrobial and phytochemical studies of *Jatropha gossypifolia* Linn. *Recent Research in Science and Technology* 2010, 2 (7), 24-28.
  - [3] Oduola, T.; O.G Avwioro; T.B Ayanniyi: Suitability of the leaf extract of *Jatropha gossyifolia* as an anticoagulant for biochemical and hematological analyses. *African*

- [4] *Journal of Biotechnology* 2005, 4 (7), 679-681.
- [5] Kayode, J.; Omotoyinbo, M.A.: Ethnobotanical Utilization and Conservation of Chewing Sticks Plants Species in Ekiti State, Nigeria. *Research Journal of Botany* 2008, 3(3), 107-115.
- [5] Oduola, T.; Adeosun, O.G.; Oduola, T.A.; Awwiroro, O.G.; Oyeniyi, M.A.: Use of *Jatropha gossypifolia* stem latex as a haemostatic agent: how safe is it?. *Journal of Medicinal Plants* 2007, 1(1), 14-17.
- [6] Harianto: Respon pertumbuhan jarak merah (*Jatropha gossypifolia L.*) asal kabupaten nganjuk akibat cekaman kekeringan. *Pgri Kediri* 2017, (6), 67-72.
- [7] Shahwar, D.; Shafiq-ur-Rehman,; Ahmad, N.; Ullah, S.; Raza, M.A.: Antioxidant activities of the selected plants from the family Euphorbiaceae, Lauraceae, Malvaceae and Balsaminaceae. *African Journal of Biotechnology* 2010, 9(7), 1086-1096.
- [8] Panda, B.B.; Gaur, K.; Kori, M.L.; Tyagi, L.K.; Nema, R.K.; Sharma, C.S.; Jain, A.K.: Anti-Inflammatory and analgesic activity of *Jatropha gossypifolia* in experimental animal models. *Global Journal of Pharmacology* 2009, 3(1), 01-05.
- [9] Torokano, S.; Khumaidi, A.; Nugrahani, A.W.: Aktivitas antibakteri ekstrak etanol daun jarak merah (*Jatropha gossypifolia*) terhadap bakteri *Escherichia coli* dan *Staphylococcus aureus*. *Journal of Science and Technology* 2018, 7(1), 117-126.
- [10] Abreu, I.C.; Marinho, A.S.S.; Paes, A.M.A.; Freire, S.M.F.; Olea, R.S.G.; Borges, M.O.R.; Borges, A.C.R.: Hypotensive and vasorelaxant effects of ethanolic extract from *Jatropha gossypifolia L.* in rats. *Fitoterapia* 2003, 74, 650-657.
- [11] Tinto, W.F.; John, L.I.M.D.: triterpenoids of *Jatropha gossypifolia*. *Journal of Natural Products* 1992, 55(6), 807-809.
- [12] Felix-Silva, J.; Giordani, R.B.: *Jatropha gossypifolia* L. (Euphorbiaceae): A review of traditional uses, phytochemistry, pharmacology, and toxicology of this medicinal plant. *Journal Hindawi Publishing Corporation* 2014, 20 (14), 32.
- [13] Khyade, M.S.; Vaikos, N.P.: Pharmacognostical and phytochemical evaluation of leaf of *Jatropha gossypifolia* L. *International Journal of Research in Ayurveda and Pharmacy* 2010, 2(1), 421-428.
- [14] Vernando, Y.: Penentuan aktivitas antioksidan, kandungan fenolik total dan uji sitotoksik dari ekstrak daun jarak merah (*Jatropha gossypifolia* Linn), Skripsi, FMIPA, Universitas Andalas, Padang, 2018.

# FORMULA PEMBUATAN PRODUK PEMBERSIH BADAN (**BODY SCRUB**) BERBASIS VCO DAN TEPUNG AMPAS KELAPA

Sumaryati Syukura<sup>a</sup>, Safni<sup>a</sup>, Amrina Rasyada<sup>a</sup>

Laboratorium Biokimia, Jurusan Kimia FMIPA, Universitas Andalas

Jurusan Kimia FMIPA Unand, Kampus Limau Manis, 25163

E-mail: [amrinarasyadaunand@gmail.com](mailto:amrinarasyadaunand@gmail.com)

**Abstrak:** Virgin Coconut Oil (VCO) merupakan pelembab kulit alami karena mampu mencegah kerusakan jaringan dan memberikan perlindungan terhadap kulit. Tepung ampas kelapa merupakan hasil samping dari produksi VCO. Ampas kelapa mengandung senyawa penting seperti kadar lemak kasar 36,95% dan kadar serat kasar 77,17 % yang berfungsi sebagai penyerap kotoran yang ada di kulit serta menambah kelembaban kulit sehingga dapat dimanfaatkan sebagai scrub dalam pembuatan *body scrub*. Penelitian ini menggunakan persentase scrub tepung ampas kelapa (2%, 4%, dan 6%) dan variasi tepung ampas kelapa dan VCO (1:0-1:1). Produk terbaik dihasilkan dari formulasi persentase scrub tepung ampas kelapa 6%, serta rasio bobot tepung ampas kelapa dan VCO 1:1. *Body scrub* ini memiliki pH 6,3, stabilitas emulsi 80,71%. Uji aktivitas antioksidan ditinjau berdasarkan kandungan total fenolik. Semakin banyak senyawa fenolik yang terkandung maka semakin tinggi antioksidannya. Total fenolik terbaik sebesar 18,66 µg GAE/mg . Uji organoleptik berdasarkan kesukaan panelis terhadap produk *body scrub* dengan parameter tekstur, warna, dan aroma. Rata-rata panelis menyukai produk dengan persentase scrub tepung ampas kelapa 2%, 4%, dan 6% serta rasio bobot tepung ampas kelapa dan VCO 1:0 dengan memberikan poin 8 (sangat suka) terhadap *body scrub*.

**Kata kunci:** tepung ampas kelapa, VCO, *body scrub*, formulasi, dan antioksidan.

## 1. Pendahuluan

Krim *body scrub* merupakan produk kosmetik perawatan kulit yang mengandung bahan agak kasar atau biasa disebut kosmetik *abrasiver*. Kosmetik pembersih seperti sabun, krim pembersih, susu pembersih, bahkan krim pembersih dirasa tidak sanggup untuk mengangkat sel-sel kulit mati. Sel kulit mati tidak dapat terlepas dari epidermis karena kosmetik pembersih terlalu halus dan licin. Oleh karena itu diperlukan bahan yang agak kasar untuk dapat melepaskan sel kulit mati dari kulit, seperti batu apung, handuk kasar atau kosmetik pengemblas atau penipis kulit yang umum disebut krim *body scrub* [1].

Virgin Coconut Oil (VCO) merupakan pelembab kulit alami karena mampu mencegah kerusakan jaringan dan memberikan perlindungan terhadap kulit tersebut. Komposisi dari VCO memberikan tekstur lembut dan halus pada kulit [2]. VCO ini mengandung asam laurat 58%, kaprilat 8,9%, kaprat 7% disamping itu juga mengandung omega 3 (4%), 6 dan 9 serta vitamin A, D, E,K dan tiga jenis fitohormon dalam jumlah yang cukup tinggi. VCO juga bersifat anti inflamasi, karena memiliki kandungan vitamin E yang tinggi [3-4]. VCO bermanfaat untuk menghaluskan kulit, karena VCO memiliki tekstur krim alami, bebas dari pestisida [5].

Produksi VCO akan menghasilkan limbah (*waste product*) berupa ampas kelapa. Limbah

ini bisa dimanfaatkan karena dinilai masih memiliki nutrisi yang tinggi. Ampas kelapa tersebut memiliki kandungan rata-rata kadar air 2,47%, kadar abu 0,36%, kadar lemak kasar 36,95%, kadar serat kasar 77,17%, kadar protein kasar 2,60%, dan kadar karbohidrat yaitu 57,61% [6].

Ampas kelapa ini memiliki struktur permukaan berpori dan kandungan kimia berupa selulosa 16%, mannan 23%, dan galaktomanan 61%. Selulosa dan galaktomanan merupakan polisakarida yang mengandung gugus -OH sehingga dapat digunakan sebagai adsorben [7].

Industri kecantikan sekarang ini banyak menggunakan metil paraben sebagai pengawet, silika dan garam sebagai butiran dalam produk krim *body scrub* yang mengakibatkan resiko iritasi pada kulit [8]. Untuk mengatasi hal ini maka perlu dikembangkan inovasi produk perawatan kulit menggunakan ekstrak alam. Salah satu ekstrak alamnya yaitu dengan penambahan VCO yang menggantikan metil paraben dan ampas kelapa menggantikan silika dan garam. Pengembangan produk *body scrub* dari VCO dan ampas kelapa menjadi hal yang baru untuk diteliti sehingga perlu dilakukan berbagai variasi baik penambahan tepung ampas kelapa maupun penambahan VCO untuk melihat pengaruh kualitas produk *body scrub*.

## 2. Metodologi Penelitian

### 2.1 Alat

Alat-alat yang digunakan adalah alat-alat gelas, alat *pressing*, *blender*, pemanas, pH meter, oven, lemari pendingin, timbangan analitik, dan spektrofotometer Uv-Vis.

### 2.2 Bahan

Bahan yang digunakan dalam penelitian ini adalah VCO, ampas kelpala, NaCl 2%, akuades, asam stearat, setil alkohol, propilen glikol, gliserin, trietanolamin (TEA), parfum, methanol, reagen folin ciocalteau, natrium karbonat, dan asam galat.

### 2.3 Prosedur Penelitian

#### 2.3.1 Pembuatan tepung ampas kelapa

Daging ampas kelapa yang sudah di parut kemudian dipisahkan santannya dengan menggunakan alat *pressing*. Hasil *pressing* direndam dengan air mendidih kemudian dibiarkan dingin. Setelah dingin, kelapa dipisahkan lagi dengan santan sisa dengan alat *pressing*. Perendaman dan pemisahan santan dilakukan sebanyak lima kali dengan air mendidih hingga didapatkan air hasil *pressing* bebas santan (filtrat bening). Ampas kelapa kemudian di rendam dengan NaCl 2% selama 30 menit. Ampas kelapa yang telah bebas santan kemudian dikeringkan dengan menggunakan api kecil. Ampas kelapa yang telah kering kemudian dihaluskan dengan menggunakan *blender* sehingga menjadi tepung. Hasil penghalusan tersebut kemudian disotasi dengan menggunakan ayakan ukuran 80-120 mesh.

#### 2.3.2 Formulasi Sabun

Sabun dibuat dengan bahan sebagai berikut:

Bahan	F1	F2
Asam stearat	15 g	15 g
Setil alkohol	1 g	1 g
Propilen glikol	5 mL	5 mL
gliserin	5 mL	5 mL
Trietanolamin	1.2 mL	1.2 mL
Ampas kelapa: VCO	2:0; 4:0; 6:0	2:2; 4:4; 6:6
Parfum	2 mL	2 mL
akuades	100 mL	100 mL

Keterangan :

F1: Formula 1 dengan variasi penambahan ampas kelapa 2 g, 4 g, dan 6 g

F2: Formula 2 dengan variasi penambahan ampas kelapa dan VCO (2 g: 2 mL, 4 g: 4 mL, dan 6 g: 6 mL).

Pembuatan basis sediaan *body scrub* dilakukan dengan melakukan tahap pencampuran. Bahan yang dicampur dibagi menjadi bahan fase air dan bahan fase minyak. Fase air dibuat dengan cara, ditimbang 15 g asam stearat ke gelas beker kemudian ditambahkan 1 g setil alkohol. Campuran fase air dipanaskan sampai

temperatur 75 °C. pada saat yang sama, dibuat fase minyak dengan cara, dicampurkan 100 mL akuades, 5 mL propilen glikol, 5 mL gliserin, dan 1, 2 mL *triethanolamine* (TEA) ke gelas beker. Campuran fase minyak dipanaskan sampai temperatur 75 °C . Setelah fase air dan fase minyak tersedia, dituangkan fase air ke dalam fase minyak dan dilakukan sedikit demi sedikit sambil diaduk, kemudian ditambahkan parfum, VCO, dan tepung ampas kelapa sampai terbentuk basis krim. Prosedur ini diulangi dengan variasi tepung ampas kelapa 2 g, 4 g, dan 6 g, dan variasi rasio bobot ampas kelapa dan VCO yaitu 1:0 dan 1:1. Tiap formulasi ditempatkan pada wadah krim plastik yang tertutup rapat. Formula yang telah ditempatkan pada wadah *body scrub*, diberi etiket dan siap untuk dianalisis.

#### 2.3.3 Uji Kualitas Body Scrub

##### 2.3.3.1 Derajat Keasaman

Uji derajat keasaman ini dilakukan dengan menggunakan pH meter yang sebelumnya telah dikalibrasi pada pH 4 dan pH 7. Sampel sebanyak 2 gram ditimbang dan dilarutkan dengan 20 ml air suling, lalu nilai pH dihitung dengan pH meter [9].

##### 2.3.3.2 Kestabilan Emulsi

Sampel bahan emulsi dimasukkan ke wadah dan ditimbang beratnya. Wadah dan bahan tersebut dimasukkan dalam oven dengan suhu 45 °C selama 1 jam lalu dimasukkan ke dalam pendingin bersuhu dibawah 0° C selama 1 jam. Kemudian, dimasukkan kembali kedalam oven dengan suhu 45°C. Pengamatan dilakukan terhadap kemungkinan terjadinya pemisahan air dari emulsi. Bila terjadi pemisahan, emulsi dikatakan tidak stabil dan tingkat kestabilannya dihitung berdasarkan persentase fase terpisahkan terhadap emulsi keseluruhan [10].

Stabilitas emulsi dapat dihitung berdasarkan rumus berikut :

$$SE = 100 \% - \frac{\text{berat fase yang memisah}}{\text{berat total bahan emulsi}} \times 100\%$$

#### 2.3.3.3 Pembuatan Kurva Kalibrasi Asam Galat

Larutan standar dibuat dengan cara melarutkan 10000 µg (10 mg) asam galat dalam 10 mL metanol didalam labu ukur 10 mL dan diperoleh konsentrasi 1000 µg/mL. Variasi konsentrasi larutan standar dibuat dengan konsentrasi 10; 20; 40; 60; 80 dan 100 µg/mL. Sebanyak 0,5 mL diambil dari masing-masing konsentrasi dan dimasukan kedalam labu ukur 10 mL lalu ditambahkan 0,5 mL reagen *follin ciocalteu*. Campuran

tersebut didiamkan selama 5 menit kemudian ditambahkan 1 mL larutan natrium karbonat 20% dan diencerkan dengan akuades sampai tanda batas. Larutan tersebut didiamkan selama 120 menit dan diukur absorbannya pada panjang gelombang 765 nm. Berdasarkan nilai absorban yang didapatkan, dibuat kurva kalibrasi dan didapatkan persamaan regresi dari larutan standar [11].

**2.3.3.4 Penentuan Kandungan Fenolik Total**  
Masing-masing ekstrak ditimbang sebanyak 10 mg dan dilarutkan dalam 10 mL metanol didalam labu ukur 10 mL sehingga didapatkan konsentrasi larutan induk 1000 mg/L. Larutan diambil sebanyak 0,5 mL dimasukkan kedalam labu ukur 10 mL dan ditambahkan 0,5 mL reagen *follin ciocalteu*. Campuran tersebut didiamkan selama 5 menit kemudian ditambahkan 1 mL larutan natrium karbonat 20% dan diencerkan dengan akuades sampai tanda batas. Larutan tersebut didiamkan selama 120 menit dan absorbannya diukur pada panjang gelombang 765 nm. Kandungan fenolik total dinyatakan dalam *Gallic Acid Equivalent* (GAE).

#### 2.3.3.5 Pengujian Organoleptik (SNI 01-2346-2006)

Uji organoleptik yang dilakukan yaitu uji kesukaan (*hedonik*) dengan parameter yang diujikan berupa warna, aroma dan kekasaran butiran *scrub* (tekstur). Penilaian dilakukan dengan memberi poin setiap parameter (1= amat sangat tidak suka, 2= sangat tidak suka, 3= tidak suka, 4= agak tidak suka, 5= netral, 6= agak suka, 7= suka, 8= sangat suka, 9= amat sangat suka), dengan panelis berjumlah 30 orang. Data yang diperoleh dari lembar penilaian ditabulasi dan ditentukan nilai mutunya dengan mencari hasil rerata pada setiap panelis pada tingkat kepercayaan 95%.

### 3. Hasil dan Pembahasan

#### 3.1 Bentuk Fisik Body Scrub

Hasil dari pengujian ini menunjukkan perubahan warna sediaan body scrub bertambah gelap dengan bertambahnya tepung ampas kelapa. Gambar A, B, dan C adalah sediaan *body scrub* dengan rasio penambahan tepung ampas kelapa dan VCO 1:0, dimana penambahan ampas kelapa 2 g, 4 g, dan 6 g. Gambar C tampak lebih gelap dibanding gambar A dan B. Hal ini terjadi karena penambahan tepung ampas kelapa dapat menambah intensitas kekeruhan pada produk sehingga menghasilkan warna yang sedikit gelap.



(A) (B)



(C)

Gambar 3.1 Produk sediaan *body scrub* dengan penambahan tepung ampas kelapa, A (2 g ampas kelapa), B (4 g ampas kelapa), dan C (6 g ampas kelapa)

Gambar D, E, dan F adalah sediaan *body scrub* dengan rasio penambahan tepung ampas kelapa dan VCO 1:1, dimana penambahan ampas kelapa dan VCO 2 g; 2 mL, 4g; 4mL, dan 6 g; 6mL. Dari gambar dapat dilihat gambar F memiliki warna keruh dan mengkilap dibanding gambar gambar D dan E. Selain dipengaruhi oleh jumlah tepung ampas kelapa, kekeruhan juga dipengaruhi oleh penambahan VCO [12].



(D)



(E)



(F)

Gambar 3.2 Produk sediaan *body scrub* dengan penambahan VCO dan tepung ampas kelapa, D (2 g ampas kelapa : 2 mL VCO), E (4 g ampas kelapa: 4 mL VCO), dan F (6 g ampas kelapa: 6 mL VCO)

### 3.2 Derajat Keasaman

Hasil uji menunjukkan bahwa pH turun seiring dengan meningkatnya penambahan *scrub* ampas kelapa dan VCO yang ditambahkan dalam sediaan *body scrub*. Derajat keasaman *body scrub* pada penambahan 2 g, 4 g, dan 6 g berturut-turut ialah 6.8, 6.7, dan 6.6. Pada ampas kelapa diduga masih memiliki asam lemak bebas, sehingga semakin banyak ampas kelapa yang ditambahkan pada produk akan menurunkan pH. Derajat keasaman *body scrub* pada penambahan tepung ampas kelapa dan VCO (2 g; 2 mL, 4 g; 4 mL, dan 6 g; 6 mL) berturut-turut ialah 6.6, 6.6, 6.3). Peningkatan konsentrasi VCO seiring dengan peningkatan kandungan asam-asam lemak pada sediaan *body scrub* [13]. Pengukuran pH ini didasarkan pada SNI 16-4399-1996 sebagai syarat mutu pelembab kulit (4,5-8,0) sehingga sediaan *body scrub* yang dihasilkan relatif aman digunakan.

### 3.3 Stabilitas Emulsi

Stabilitas emulsi yang didapatkan dari sediaan *body scrub* pada penambahan tepung ampas kelapa 2 g; 4 g; dan 6 g berturut-turut yaitu 76.78 %, 76.42%, dan 73.13 %. Stabilitas emulsi menurun dengan penambahan tepung ampas kelapa. Padatan yang masuk dan tercampur ke dalam sistem emulsi akan merusak selubung yang dibentuk *emulsifier* sehingga stabilitas emulsi menjadi tidak seimbang. Stabilitas emulsi pada variasi tepung ampas kelapa dan VCO (2 g; 2 mL, 4 g; 4 mL, dan 6 g; 6 mL) yaitu 78.55 %, 79.74%, dan 80.71 %. VCO merupakan komponen yang dapat membentuk emulsi. Hubungan antara konsentrasi minyak dan viskositas emulsi ialah produk emulsi akan semakin kental dengan meningkatkan konsentrasi minyak. Hubungan antara viskositas dan stabilitas emulsi ialah semakin kental suatu emulsi maka stabilitasnya akan meningkat. Nilai kestabilan produk berbasis emulsi dibawah 60% menyebabkan umur simpan yang dimiliki produk kosmetik cenderung singkat. Dari tabel diatas produk *body scrub* dapat dikatakan stabil karena memiliki nilai kestabilan emulsi diatas 60%.

### 3.4 Analisis Total Fenolik

Hasil total fenolik dari sediaan *body scrub* penambahan tepung ampas kelapa 2 g; 4 g;

dan 6 g berturut-turut yaitu 7.833 µg GAE/mg *body scrub*, 8.833 µg GAE/mg *body scrub*, dan 9.0 µg GAE/mg *body scrub*. Serta total fenolik dari variasi tepung ampas kelapa dan VCO (2 g; 2 mL, 4 g; 4 mL, dan 6 g; 6 mL) yaitu 12.16 µg GAE/mg *body scrub*, 13.75 µg GAE/mg *body scrub*, dan 18.66 µg GAE/mg *body scrub*. Sediaan *body scrub* dengan penambahan rasio tepung ampas kelapa dan VCO memiliki aktivitas antioksidan yang lebih banyak dibandingkan dengan sediaan *body scrub* yang lainnya. VCO mengandung komponen minor berupa senyawa fenolik, salah satu senyawa fenoliknya yaitu tokoferol [14].

### 3.5 uji Organoleptik

Uji kesukaan atau hedonik adalah parameter yang penting untuk melihat kesukaan dan penerimaan konsumen terhadap produk. Pada uji hedonik para panelis mengungkapkan kesukaan dan ketidaksesuaian terhadap produk yang diujikan [15]. Hasil uji hedonik terhadap parameter tekstur, warna, dan aroma dari sediaan produk *body scrub* yang lebih disukai adalah produk dengan penambahan tepung ampas kelapa 2 g; 4 g; dan 6 g dengan rasio tepung kelapa dan VCO (1:0).

## 4. Kesimpulan

Berdasarkan hasil penelitian yang telah dilakukan dapat disimpulkan bahwa, produk *body scrub* terbaik dihasilkan berdasarkan parameter derajat keasaman, stabilitas emulsi, dan total fenolik dari formulasi persentase *scrub* tepung ampas kelapa 6% serta rasio bobot tepung ampas kelapa dan VCO 1:1 yaitu produk sediaan dengan penambahan 6 g ampas kelapa dan 6 mL VCO. Berdasarkan uji organoleptik panelis rata-rata panelis sangat menyukai produk sediaan *body scrub* dengan formulasi persentase *scrub* tepung ampas kelapa 2%, 4%, dan 6% serta rasio bobot tepung ampas kelapa 1:0.

## 5. Ucapan Terima Kasih

Penulis mengucapkan banyak terima kasih kepada seluruh pihak yang telah membantu dalam menyelesaikan penelitian ini.

## Referensi

- [1] Tranggono, R.I. Buku Pegangan Ilmu Pengetahuan Kosmetik. Gramedia Pustaka Utama, Jakarta, 2007, 6 – 10.
- [2] Aulia, U. M. I. Pengaruh Konsentrasi Virgin Coconut Oil (VCO) Terhadap Stabilitas Emulsi Kosmetik dan Nilai Sun Protection Factor (SPF). Jurnal Berkala MIPA, 2014, 24(1).

- [3] Syukur, S.; Syafrizayanti.; Zulaiha, S.; Ismet, M.; Fachrial, E. *Virgin Coconut Oil Increase High Density Lipoprotein (LDL), Lower Triglyceride And Fatty Acids Profile (C6-C18) In Blood Serum of Mus musculus.*). *Research Journal of Pharmaceutical, Biological and Chemical Sciences.* 2017, 8(2).
- [4] Syukur, S.; dkk. *Probiotics and Strong Antimicrobial of Buffalo Milk Fermentation (dadih) from Different Places in West Sumatera.* *Reaserach Journal of Pharmaceutical, Biological and Chemical Sciences.* 2016, 7, 386-392.
- [5] Asmawit. Optimasi Proses Pembuatan VCO untuk Memenuhi Mutu Kosmetik Lulur. Biopropal Industri, 2010, 1(2), 1-2.
- [6] Oktaviyanti, M. Pemanfaatan Limbah Industri Virgin Coconut Oil (VCO) Di Padang, Sumatera Barat Sebagai Bahan Baku Makanan Kesehatan. Jurnal Kimia, Fakultas Matematika Dan Ilmu Pengetahuan Alam. Universitas Andalas. Padang, 2018, 5.
- [7] Zakaria, ZA.; Rofiee, M.S.; Somchit, M.N.; Zuraini, A.; Sulaiman, M.R.; The, L.K.; Salleh, M.Z.; Long, K. *Hepatoprotective Activity Of Dried- And Fermented-Processed Virgin Coconut Oil. Evidence-Based Complementary And Alternative Medicine,* 2011, 1-8.
- [8] Sumada, K; Aditya-Palaguna, S.K.; Anggun, L.B. Karakteristik Natrium Silika dari Geothermal Sludge dan Abu Bagasse. *Jurnal Teknik Kimia,* 2017, 11(2), 61.
- [9] Aswal, A.; Karla, M.; Rout, A.: *Preparation and Evaluation of Polyherbal Cosmetic Cream.* *Der Pharmacia Lettre,* 2013, 5(1), 83-88.
- [10] Yunilawati. Penggunaan Emulsifier steril Alkohol Etoksilat Derivat Minyak Kelapa Sawit pada Produk Lotion dan Krim. *J. Kimia Kemasan.* 2011, 33 (1), 83-89
- [11] Itam, A., Wulandari, A.; Rahman, M. M.; dan Ferdinal, N. Studies Preliminary Phytochemical Screening, Total Phenolic Content, Antioxidant and Cytotoxic Activities of *Alstonia scholaris* R. Br Leaves and Stem Bark Extracts. *journal of pharmaceutical sciences and research,* 2018, 10 (3), 518-522.
- [12] Fatimah, F. Stabilitas dan Viskositas Produk Emulsi Virgin Coconut Oil-Madu. *J.Teknol Dan Industri Pangan,* 2012, 23(1).
- [13] Raymundo, A.; Franco J. M.; Empis, J.; Sousa, I. *Optimization Of The Composition Of Low-Fat Oil-In-Water Emulsion Stabilized By White Lupin Protein.* *J Am Oil Chem Soc,* 2001, 79, 783-790.
- [14] Muis, A. Aktsivitas Antioksidan dan Antifotooksidan Komponen Minor dari Virgin Coconut Oil (VCO). *Jurnal Riset Industri,* 2009, 3(2), 86-93.
- [15] Setyaningsih, D. Apriyantono, A.; Sari M. P.: *Analisis Sensori untuk Industri Pangan dan Agro.* IPB Press, Bogor, 2010

# Penentuan Kuersetin pada Ekstrak Aseton Daun Ekor Naga (*Epipremnum pinnatum* (L.) Engl) dengan Metode Kromatografi Cair Kinerja Tinggi (KCKT)

Refilda<sup>1\*</sup>, Harits Hamman<sup>1</sup>, Emil Salim<sup>2</sup>

<sup>1</sup>Laboratorium Kimia Analisis Terapan, Jurusan Kimia FMIPA, Universitas Andalas, Kampus Limau Manis, Padang 25613

<sup>2</sup>Laboratorium Kimia Organik Bahan Alam, Jurusan Kimia FMIPA, Universitas Andalas, Kampus Limau Manis, Padang 25613

Email : [refilda@sci.unand.ac.id](mailto:refilda@sci.unand.ac.id)

**Abstrak :** The aim of this study is to determine quercetin from acetone extract of dragon tail leaf (*Epipremnum pinnatum* (L.) Engl) by High Performance Liquid Chromatography (HPLC) Agilent 1260 using quercetin as standard, chromatographic conditions were the mobile phase of acetonitrile and 1% acetic acid (10:90) with isocratic elution; flow rate of 0.7 mL/minute; volume injection 20  $\mu$ L; detection with DAD detectors at wavelength 272, 280 and 310 nm; and stationary phase of column C-18. The result of this study showed that quercetin content in acetone extract of dragon tail leaf was about 0.1728 mg/g at retention time 19.8 minutes.

**Kata Kunci :** Kuersetin, *Epipremnum pinnatum* (L.) Engl , KCKT

## 1. Pendahuluan

Tumbuhan ekor naga berasal dari himalaya, merupakan tumbuhan herba, merambat, memanjang dengan tinggi 5 hingga 20 meter. Akar tumbuhan ekor naga melekat pada tumpuannya seperti tembok atau pohon dan juga memiliki akar gantung. Batang tumbuhan ekor naga berwarna hijau dan berbentuk bulat dan memiliki nodus-nodus. Pada penelitian sebelumnya telah melaporkan bahwa tumbuhan ekor naga mengandung beberapa senyawa metabolit sekunder seperti flavonoid, tanin, alkaloid, glikosida, steroid/triterpenoid [1-2].

Masfria melaporkan bahwa fraksi kloroform dan ekstrak etanol dari daun ekor naga memiliki aktivitas sitotoksik, menghambat proliferasi, dan menghambat apoptosis pada MCF-7 dari sel kanker. Linnet *et.al.* melaporkan dari tumbuhan ekor naga memiliki aktivitas anti inflamasi, analgesik, anti peroksidasi lipid. Masfria melaporkan ekstrak etil asetat dan etanol tumbuhan ekor naga memiliki aktivitas antibakteri [3-5].

Neldawati dan Gusnaedi menemukan bahwa jenis flavonoid pada daun ekor naga adalah flavon dan kadar rata-rata flavonoid daun ekor naga sebesar 26,7137  $\mu$ g/mL menggunakan spektrofotometri. Sumaiyah *et al.* menentukan total fenolik, total flavonoid dari ekstrak etanol nanopartikel daun ekor naga menggunakan spektrofotometri [6-7].

Metode penentuan kandungan antioksidan dalam sampel salah satunya dengan metode Kromatografi Cair Kinerja

Tinggi (KCKT). KCKT termasuk metode analisis terbaru yaitu suatu teknik kromatografi dengan fasa gerak cairan dan fasa diam cairan atau padat. Banyak kelebihan metode ini jika dibandingkan dengan metode lainnya antara lain: mampu memisahkan molekul-molekul dari suatu campuran, mudah melaksanakannya, kecepatan analisis dan kepekaan yang tinggi, dapat dihindari terjadinya dekomposisi/kerusakan bahan yang dianalisis, kolom dapat digunakan kembali , dapat digunakan bermacam-macam detektor [8].

KCKT merupakan metode kromatografi cair yang pemakaianya telah berkembang, baik untuk analisis secara rutin maupun untuk preparatif pada banyak laboratorium. Dibandingkan dengan kromatografi gas, KCKT dioperasikan pada suhu kamar, sehingga senyawa yang tidak tahan panas dapat ditentukan dengan mudah dan sifat fase gerak dapat diubah dengan merubah komposisi dari fase gerak yang digunakan [9]. Li Yang *et al.* melaporkan 6 senyawa fenolik (rutin, kuersetin, luteolin, genistein, galangin, kurkumin) dari propolis dengan metode KCKT-DAD (Thermo Finnigan, MA,USA), dilakukan pada fase gerak asam fosfat pH=(4,5) dalam air dan metanol (40:60, v/v) dengan elusi isokratik, laju alir 0,8 mL/min, volume injeksi 20  $\mu$ L, deteksi dengan detektor DAD pada 260, pemisahan dengan fase terbalik menggunakan fase diamnya kolom Eclipse XDB C-18. Hasilnya diperoleh pemisahan senyawa yang baik dari 6 senyawa fenolik dalam waktu 50 menit,

kadar rutin 0,396 mg/g , kuersetin 0,554 mg/g, luteolin 1,241 mg/g, genistein 0,759 mg/g, galangin 2,213 mg/g, kurkumin 0,138 mg/g [10].

Pada penelitian ini dilakukan identifikasi tumbuhan, uji fitokimia flavonoid tumbuhan ekor naga dan penentuan kuersetin dalam ekstrak aseton daun ekor naga menggunakan metode KCKT, pemisahan fase terbalik dengan fase gerak campuran asetonitril dan asam asetat 1% (10:90) dan fase diam kolom C-18.

## 2. Metodologi Penelitian

### 2.1 Alat

Alat yang digunakan pada penelitian ini adalah KCKT (Kromatografi Cair Kinerja Tinggi) Agilent 1260 , pipet mikro, sonikator Bandelin Sonorex, neraca analitis Kern ABJ, Oven LDO-150N, alat sentrifugasi, gerinda, botol vial dan alat-alat gelas yang biasa digunakan dalam penelitian kimia.

### 2.2 Bahan

Bahan yang digunakan pada penelitian ini adalah daun ekor naga, aseton.p.a, akuades, metanol grade KCKT, asetonitril grade KCKT, asam asetat glasial, sianidin test (bubuk magnesium dan asam klorida pekat) dan standar kuersetin dengan kemurnian  $\geq 95\%$  (Sigma Aldrich).

### 2.3 Prosedur penelitian

#### 2.3.1 Identifikasi sampel

Sampel berupa tumbuhan ekor naga (*Epipremnum pinnatum* (L.) Engl) diambil di daerah jalan Ahmad Yani, Padang. Sampel daun ekor naga dianalisis taksonomi di Herbarium Universitas Andalas Jurusan Biologi.

#### 2.3.2 Uji fitokimia kandungan flavonoid pada tumbuhan ekor naga

Sebanyak 2 gram daun tumbuhan ekor naga diekstrak dengan menggunakan 10 mL pelarut metanol selama 15 menit yang kemudian sebanyak 2 mL larutan ekstrak metanol dimasukkan ke dalam tabung reaksi, ditambahkan asam klorida pekat dan sedikit serbuk magnesium (sianidin test), terbentuknya warna jingga sampai merah menunjukkan adanya flavonoid [11].

#### 2.3.3 Penentuan persen kadar air

Ditimbang cawan porselen kemudian dioven selama  $\pm 1$  jam pada suhu 105°C. Setelah itu dimasukkan ke dalam desikator selama 15 menit, kemudian ditimbang. Selanjutnya

sampel ditimbang bersama cawan porselen, kemudian dioven selama  $\pm 1$  jam pada suhu 105°C. Setelah itu dimasukkan kedalam desikator selama 15 menit, kemudian ditimbang dan dioven serta didesikator lagi sampai didapatkan berat konstan sehingga persen kadar airnya (KA) dapat dihitung.

#### 2.3.4 Ekstraksi sampel

Sebanyak 2 g daun ekor naga diekstrak dengan 20 mL pelarut aseton 75 %, kemudian campuran ditempatkan dalam sonikator selama 15 menit pada suhu kamar dan disentrifugasi selama 20 menit pada kecepatan 2000 rpm.

#### 2.3.5 Penentuan Kuersetin dengan Metode KCKT

##### 2.3.5.1 Pengaruh panjang gelombang terhadap tinggi puncak serapan kuersetin

1 mL larutan kuersetin 50 mg/L dimasukkan ke dalam botol vial gelap, dan diukur dengan KCKT Agilent 1260 menggunakan fase gerak asetonitril dan asam asetat 1% (10:90) dengan elusi isokratik, laju alir 0,7 mL/min, volume injeksi 20  $\mu$ L deteksi dengan detektor DAD pada panjang gelombang 272, 280 dan 310 nm, pemisahan dengan fase terbalik menggunakan fase diamnya kolom C-18.

##### 2.3.5.2 Pembuatan kurva kalibrasi standar kuersetin

1 mL larutan kuersetin 10,30,50,70,90 mg/L dimasukkan ke dalam botol vial gelap, dan diukur dengan KCKT Agilent 1260 menggunakan fase gerak asetonitril dan asam asetat 1% (10:90) dengan elusi isokratik, laju alir 0,7 mL/min, volume injeksi 20  $\mu$ L deteksi dengan detektor DAD pada panjang gelombang 272 nm, pemisahan dengan fase terbalik menggunakan fase diamnya kolom C-18.

##### 2.3.5.3 Penentuan kandungan kuersetin dalam larutan ekstrak ekstrak aseton 75% daun ekor naga dengan metode KCKT

Ekstrak sampel dipipet 1 mL ke dalam botol vial gelap dan diukur dengan KCKT Agilent 1260 menggunakan fase gerak asetonitril dan asam asetat 1% (10:90) dengan elusi isokratik, laju alir 0,7 mL/min, volume injeksi 20  $\mu$ L, deteksi dengan detektor DAD pada panjang gelombang 272 nm, pemisahan dengan fase terbalik menggunakan fase diamnya kolom C-18.

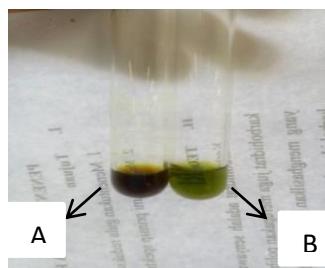
### 3. Hasil dan Diskusi

#### 3.1 Identifikasi Sampel

Berdasarkan hasil identifikasi tumbuhan di Herbarium Universitas Andalas (ANDA) Padang melalui Nomor surat 039/K-ID/ANDA/I/2019 diketahui bahwa sampel yang digunakan termasuk ke dalam famili *Araceae*, spesies *Epipremnum pinnatum* (L.) Engl.

#### 3.2 Uji Fitokimia Kandungan Flavonoid pada Tumbuhan Ekor Naga

Hasil uji fitokimia kandungan flavonoid pada tumbuhan ekor naga dapat dilihat pada Gambar 1.



Gambar 1. Hasil uji fitokimia flavonoid tumbuhan ekor naga (A) setelah diberi sianidin test dan (B) sebelum diberi sianidin test

Gambar di atas dapat diketahui untuk menentukan adanya flavonoid pada sampel diberi sianidin test dan hasilnya tumbuhan ekor naga positif mengandung metabolit sekunder flavonoid karena terbentuknya warna jingga (++) berarti kuat terkandung flavonoidnya. Berdasarkan penelitian Neldawati melakukan uji identifikasi flavonoid pada tumbuhan ekor naga menghasilkan warna jingga kemerahan (+++) berarti sangat kuat terkandung flavonoidnya. Secara kualitatif dari standar warna uji fitokimia flavonoid terdapat perbedaan kepekatan warna yang ditimbulkan menunjukkan ada perbedaan jumlah senyawa pada masing-masing ekstrak yang mungkin disebabkan oleh jenis kepolaran dan faktor lingkungan tumbuhan yang berbeda. Semakin merah warna yang ditimbulkan maka semakin tinggi kadar flavonoid yang terkandung dalam suatu daun. Warna jingga kemerahan pada uji flavonoid disebabkan karena terbentuknya garam flavilium [12-13].

#### 3.3 Persen Kadar Air dalam Tumbuhan Ekor Naga

Penentuan persen kadar air dalam sampel dilakukan untuk mengetahui berat kering

dari tumbuhan ekor naga. Metode yang digunakan dalam penentuan kadar air sampel yaitu gravimetri, dimana sampel dilakukan pemanasan dengan oven pada suhu 105°C untuk menguapkan molekul air yang terikat pada sampel. Dari penelitian yang dilakukan dapat diketahui persen kadar air dalam tumbuhan ekor naga segar dan tumbuhan ekor naga kering angin berturut-turut, yaitu 80,94% dan 12,87%. Jika digunakan sampel dengan kadar air yang tinggi akibatnya hanya sedikit senyawa metabolit sekunder yang dapat diekstrak dalam sampel, maka perlu dilakukan proses kering anginkan.

#### 3.4 Ekstraksi Sampel Daun Ekor Naga (*Epipremnum pinnatum* (L.) Engl) dengan pelarut aseton 75%

Ekstraksi sampel pada penelitian ini menggunakan sonikator karena lebih efisien dalam penggunaan pelarut, prosesnya cepat dan mudah. Dinding sel dari bahan dipecah dengan getaran ultrasonik sehingga kandungan yang ada didalamnya dapat keluar dengan mudah [14-15]. Hasil ekstraksi aseton 75% daun ekor naga dapat dilihat pada Gambar 2.

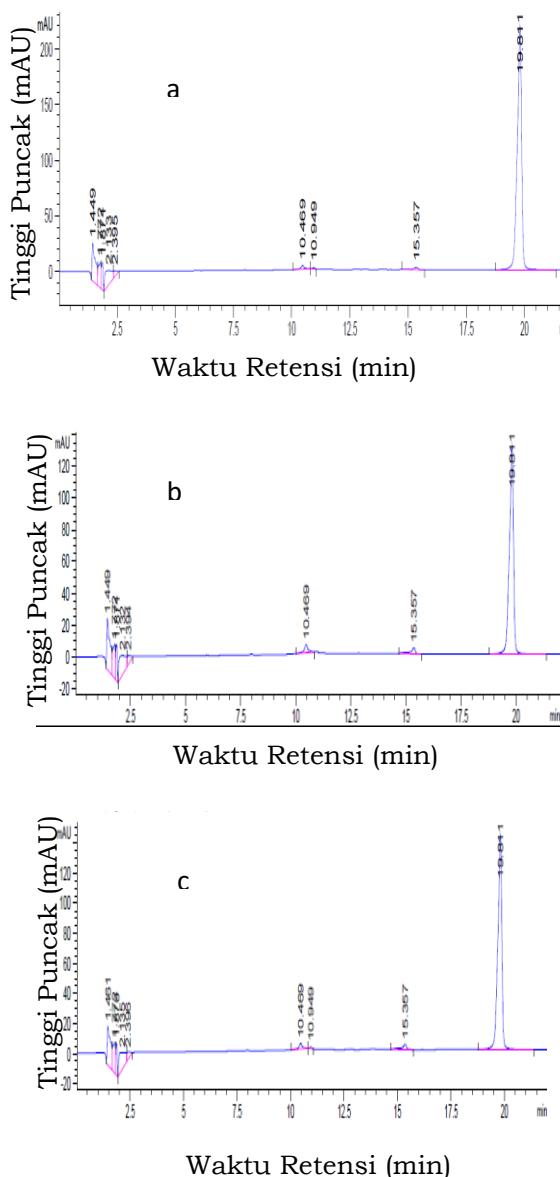


Gambar 2. Hasil ekstraksi aseton 75% daun ekor naga

Berdasarkan gambar di atas dapat diketahui bahwa ekstrak aseton 75% tumbuhan ekor naga dihasilkan warna coklat terang. Penggunaan pelarut aseton dalam proses ekstraksi ini dikarenakan aseton 75% dapat mengikat senyawa polar seperti senyawa flavonoid.

#### 3.5 Penentuan Kuersetin dengan KCKT

3.5.1 Serapan maksimum larutan standar kuersetin 50 mg/L  
Kromatogram standar kuersetin 50 mg/L dapat dilihat pada Gambar 3.

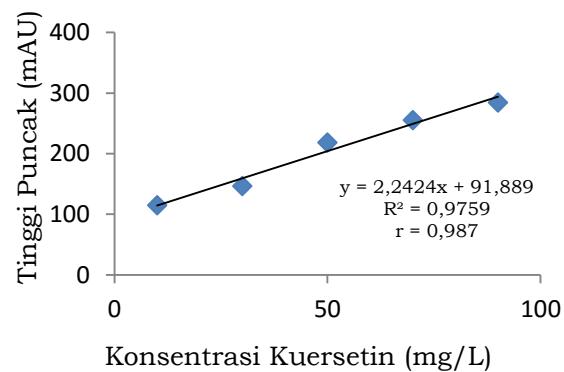


Gambar 3. Kromatogram standar kuersetin konsentrasi 50 mg/mL (a)  $\lambda = 272$  nm; (b)  $\lambda = 280$  nm; (c)  $\lambda = 310$  nm, fase gerak asetonitril dan asam asetat 1% (10:90) dengan elusi isokratik, laju alir 0,7 mL/min, volume injeksi 20  $\mu$ L

Gambar di atas merupakan hasil analisis KCKT pada injeksi standar kuersetin konsentrasi 50 mg/L. Dari gambar telah ditunjukkan bahwa standar kuersetin terdapat pada waktu retensi 19,8 menit. Dibandingkan juga tinggi puncak pada  $\lambda = 272, 280, 310$  nm, tinggi puncak pada  $\lambda = 272$  nm adalah 218,42 mAU,  $\lambda = 280$  nm adalah 131,68 mAU,  $\lambda = 310$  nm adalah 142,78 mAU. Sehingga didapatkan bahwa tinggi puncak paling maksimum terdapat pada  $\lambda = 272$  nm.

### 3.5.2 Kurva kalibrasi standar kuersetin

Untuk membuat kurva standar, dibuat standar kuersetin dengan 5 konsentrasi yang berbeda 10, 30, 50, 70, 90 mg/L. Dapat diketahui hubungan yang linear antara konsentrasi larutan standar kuersetin dengan nilai tinggi puncak yang dihasilkannya dibuat kurva kalibrasi dapat dilihat pada Gambar 4. Dari linearitas kuersetin diperoleh nilai koefisien korelasinya mendekati 1 ~ 0,99 dengan persamaan regresi  $y = 2,2424x + 91,889$ .

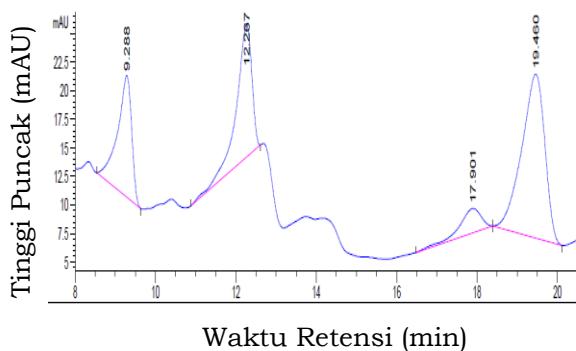


Gambar 4. Grafik hubungan konsentrasi kuersetin dengan tinggi puncak

Berdasarkan gambar di atas didapatkan nilai koefisien korelasi ( $r$ ) = 0,987. Nilai koefisien korelasi yang mendekati 1~0,99 membuktikan bahwa metode uji kuersetin dengan KCKT Agilent 1260 mempunyai linearitas yang baik. Korelasi yang diperoleh adalah korelasi positif, dimana menunjukkan semakin besar konsentrasi larutan standar maka nilai tinggi puncak yang diperoleh akan semakin besar [16].

### 3.5.3 Kandungan kuersetin dalam ekstrak aseton 75% daun ekor naga

Kromatogram hasil pengukuran ekstrak aseton 75% daun ekor naga dapat dilihat pada Gambar 5.



Gambar 5. Kromatogram sampel ekstrak aseton 75% daun ekor naga ( $\lambda = 272$  nm), fase gerak asetonitril dan asam asetat 1% (10:90) dengan elusi isokratik, laju alir 0,7 mL/min, volume injeksi 20  $\mu$ L

Gambar di atas merupakan hasil analisis KCKT pada injeksi sampel ekstrak aseton 75%. Dari gambar menunjukkan adanya kuersetin terdapat dalam sampel pada waktu retensinya 19,46 menit, terjadi sedikit perbedaan waktu retensi terhadap standar kuersetin diasumsikan akibat efek campuran dari sampel. Perhitungan dengan menggunakan persamaan regresi dari kalibrasi kurva standar diperoleh konsentrasi kuersetin dalam sampel sebesar 34,56 mg/L dan dikonversi menjadi satuan mg/g didapatkan 0,1728 mg/g.

Berdasarkan hasil penelitian dari Tuszynska melaporkan dengan kondisi kromatografi berbeda didapatkan kadar kuersetin dalam sampel brokoli sebesar 356,70  $\mu$ g. Tapan Seal melaporkan dengan kondisi kromatografi berbeda didapatkan kadar kuersetin dalam sampel ekstrak kloroform S.Arvensis sebesar 0,058 mg/g dan O.linearis 0,065 mg/g. Luyao wang *et al.* juga melaporkan dengan kondisi kromatografi berbeda didapatkan kadar kuersetin dalam sampel S.sarmentosum Bunge sebesar 1,1754 mg/g , S. lineare Thunb 0,5595 mg/g, S.emarginatum Migo 0,0275 mg/g [17-19].

#### 4. Kesimpulan

Dari penelitian yang dilakukan dapat disimpulkan bahwa ekstrak aseton daun ekor naga mengandung senyawa flavonoid dengan kandungan kuersetin sebesar 0,1728 mg/g pada waktu retensi 19,8 menit yang ditentukan dengan metode KCKT menggunakan fase gerak asetonitril dan asam asetat 1% (10:90) dengan elusi isokratik, laju alir 0,7 mL/min, volume

injeksi 20  $\mu$ L, deteksi dengan detektor DAD  $\lambda=272$  nm, fase diam kolom C-18.

#### Referensi

- [1] Lemmens, R.H., Bunyapraphatsara, N. Plant Resources of South-East Asia Medicinal and Poisonous Plants 3. *Journal of Ethnopharmacology*, 2003, 12, 346-347.
- [2] Masfria, U, Harahap., M.P, Nasution., S, Ilyas. Cytotoxic Activity, Proliferation Inhibition and Apoptosis Induction of *Rhaphidophora Pinnata* (L.f.) Schott Chloroform Fraction to MCF-7 Cell Line. *Int J Pharm Tech Res*, 2014, 6, 1327-1333.
- [3] Masfria, U, Harahap., M.P, Nasution., S,Ilyas. The Activity Of *Rhaphidophora Pinnata* Lf Schott Leaf On MCF-7 Cell Line. *Advances in Biological Chemistry*, 2013,3, 397-402.
- [4] A,Linnet., P,G,Latha., M,M,Gincy., G,I,Anuja., S,R,Suja., S,Shyamal., V,J,Shine. Anti-Inflammatory, Analgesic, and Anti-Lipid Peroxidative Effects of *Rhaphidophora pertusa* (Roxb.) Schott and *Epipremnum pinnatum* (Linn.) Engl. Aerial Parts. *Indian Journal of Natural Products and Resources*, 2010, 1 , 5-10.
- [5] Masfria. Antibacterial activity of Ethyl Acetate and Ethanol extract of *Rhaphidophora pinnata* (L.f) Schott leaf against four types of Bacteria. *International Journal of ChemTech Research*, 2015, 8 , 905-914.
- [6] Neldawati., Ratnawulan., Gusnedi. Analisis Nilai Absorbansi dalam Penentuan Kadar Flavonoid untuk Berbagai Jenis Daun Tanaman Obat. *Pillar of Physics*, 2013, 2, 76-83.
- [7] Sumaiyah., Masfria., A, Dalimunthe. Determination Of Total Phenolic Content, Total Flavonoid Content, And Antimutagenic Activity Of Ethanol Extract Nanoparticles Of *Rhaphidophora Pinnata* (L.F) Schott Leaves. *Rasayan J Chem*, 2018, 11 , 505-510.
- [8] Snyder,L, R., Kirkland, J,J. *Intoduction to Modern Liquid Chromatography*; second edition, John Wiley & Sons.Inc : New York, 1979.
- [9] Gritter,R,J.,J,M,Bobbitt.,A,E,Schwarting. *Intoduction to Chromatography*; Halden Day Inc Oakland: USA, 1985.
- [10] Li,Yang., Qing,Hua,Yan., Jin,You,Ma., Qing, Wang., Jian,Wei, Zhang., Guo,Xi,

- [Xi.] High Performance Liquid Chromatographic Determination of Phenolic Compounds in Propolis. *Tropical Journal of Pharmaceutical Research.* 2013, 12, 771-776.
- [11] Suryati, N., Bahar, E., Ilmiawati. Uji Efektivitas Antibakteri Ekstrak *Aloe vera* Terhadap Pertumbuhan *Escherichia coli* Secara In Vitro. *Jurnal Kesehatan Andalas*, 2017, 6, 519-521.
- [12] Harbone,J.B. Metode Fitokimia. Bandung. Penerbit ITB, 1987.
- [13] Dianty,W.,Putri,P., Setya, R,A .., Rizal,M. Screening Fitokimia dan Aktivitas Antioksidan Daun Eceng Gondok (*Eichhornia crassipes*). *Jurnal Kimia Valensi* , 2015, 1, 65-69
- [14] Ashley, K., Andrews, R., Cavazosa, L., Demange, M. Ultrasonic Extraction as a Sample Preparation Technique for Elemental Analysis by Atomic Spectrometry. *Journal Of Analytical Atomic Spectrometry*, 2001, 16, 1147-1153.
- [15] Mason,T.J.,Paniwnky L., Lorimer,J.P. The Uses of Ultrasound in Food Technology. *Ultrason Sonochem*, 1996, 3, 253-260.
- [16] Anderson, RL: *Practical Statistic For Analytical Chemists*. Van Nostrand Reinhold Company: New York; 1987.
- [17] Tuszynska,Magdalena. Validation of The Analytical Method for The Determination of Flavonoids in Broccoli. *Journal of Holticultural Research*, 2014, 22, 131-140.
- [18] Seal,Tapan. Quantitative KCKT Analysis of Phenolic Acids, Flavonoids and Ascorbic Acid in Four Different Solvent Extracts of Two Wild Edible Leaves,*Sonchus arvensis* and *Oenanthe linearis* of North-Eastern region in India. *Journal of Applied Pharmaceutical Science*, 2016, 6, 157-166.
- [19] Wang, Luyao., Mei, Qing., Wan, Dinrong. Simultaneous Determination by KCKT of Quercetin and Kaempferol in Three *Sedum* Medicinal Plants Harvested in Different Season. *Journal of Chromatographic Sciences*, 2014,52, 334-338.

# DETERMINATION OF TOTAL PHENOLIC CONTENT, ANTIOXIDANT AND CYTOTOXIC ACTIVITIES OF METHANOL EXTRACT AND FRACTION OF PINEAPPLE PEEL EXTRACT (*Ananas comosus L. Merr*)

Sosna Sri Rahayu\*, Adlis Santoni, Mai Efdi

Laboratory of Natural Material Organic Chemistry, Chemistry Department of Faculty of Mathematics and Natural Sciences, Andalas University, Campus of Limau Manis, Padang 25613

\*Email : [rahayusosna@gmail.com](mailto:rahayusosna@gmail.com)

**Abstract:** *Ananas comosus L. Merr* has been known as a plant which has many benefits such as anticancer, antibacteria, and antifungal. According to previous research, it is reported that pineapple contain bromelin enzyme, calcium, phosphorus, vitamin, carbohydrate, and dextrosa. Extraction of pineapple peel has been done by maceration method using methanol as solvent. Then, methanol extract is fractionated using hexane and ethyl acetate. The results of the phytochemical test show that the pineapple peel contain secondary metabolite compounds such as phenolic, coumarin, and steroid. Determination of total phenolic content, antioxidant and cytotoxic activities were performed on methanol extract, hexane fraction, ethyl acetate fraction and residual fraction. Determination of total phenolic content is by Folin-Ciocalteau method, antioxidant activity is by DPPH method and cytotoxic activity is by *Brine Shrimp Lethality Test* (BSLT) method. The result showed that the highest total phenolic content was showed by ethyl acetate fraction with total phenolic content is 0,3403 mg GAE/g fraction. The result of antioxidant activity test for methanol extract showed very strong antioxidant activity with IC<sub>50</sub> value is 11,29 mg/L. The results of cytotoxic test showed that ethyl acetate fraction classified as very toxic with LC<sub>50</sub> value is 6,1404 mg/L.

**Keywords :** *Ananas comosus L. Merr*, Phenolic Total, Antioxidant, Cytotoxic.

## 1. Introduction

Indonesia has a wide variety of plant species and has been reported that around 3,500 types of plants are efficacious as medicines [1]. At present, many people are returning to using natural ingredients in the treatment of various diseases. This is done to minimize the negative impact of using synthetic drugs. One of the plants that can be used as traditional medicine is *Ananas comosus L. Merr*.

Pineapple is one of the plants of the *Bromeliaceae* family which is spread in the tropics, including in Indonesia. This plant has been used by Asians as one of the traditional medicines known to contain groups of flavonoids, phenolics, alkaloids, tannins and steroids. Pineapple plants contain the bromelin enzymes, calcium, phosphorus, vitamins, fats, carbohydrates, magnesium, potassium, dextrose, sucrose, and water. The use of bromelin enzymes can be applied to the medical field, which is used as an anti-inflammatory agent in acute inflammation and burns, anticancer, antibacterial, and antifungal. Bromelin is also used in the treatment of acute inflammation and injury [2-10].

Methanol extract of pineapple flesh had high antioxidant activity and total phenolic content. Ethanol extract of pineapple leaves

contains eight phenylpropane diglycerides which provide antidiabetic, antihyperlipidemic and antioxidant effects. Pineapple hump extract which is made in the form of nanoparticles using chitosan which showed an increase in antimicrobial activity in gel preparations so that it could be used as a drug to treat skin diseases caused by *Staphylococcus aureus*. Pineapple plants based on information from the public and books on traditional medicines, not only have important economic values, but it also has benefit for health as a cure for constipation, urinary tract disorders, nausea, flu, hemorrhoids, blood deficiency, tumors, diabetes and skin disease [11-14].

Tumors and cancer is a disease caused by an increase in free radicals in the body and causes the human immune system to weaken. Thus, antioxidants from outside the human body are needed to stabilize the highly reactive free radicals. One of the plants that has a source of natural antioxidants is *Ananas comosus L. Merr*. Based on the description, the researchers are interested in conducting research on pineapple peel. Based on literature studies, the content of secondary metabolites and bioactivity as antioxidants and cytotoxins of *Ananas comosus L. Merr* peel has not been reported. Therefore, the researchers

conducted a study of the total phenolic content by the Folin-Ciocalteau method, antioxidant activity with the DPPH method, and cytotoxic test with the BSLT method of methanol extract and fraction of pineapple peel extract (*Ananas comosus L. Merr.*).

## 2. Methodology of Research

### 2.1 Tools

The tools used in this research were grinding, a set of distillation apparatus, analytical and technical balance, maserator for maceration, several glassware, rotary evaporator (Heidolph Laborota 4000), vial bottles, UV lamps (254 nm and 356 nm), Thermo Scientific UV-Vis spectrophotometer and hot plate.

### 2.2 Materials

Pineapple peel, mayer reagent, Liebermann Burchard, iron (III) chloride, ammonia, sodium hydroxide, methanol, ethyl acetate and hexane, Folin-Ciocalteu reagents, sodium carbonate, gallic acid, ascorbic acid, 1,1-diphenyl-2-picrylhydrazyl (DPPH), and dimethylsulfoxide.

### 2.3 Procedure of Research

#### 2.3.1 Sample Preparation

The sample is dried in a place that is not exposed to direct sunlight, for about 1 month. After drying the sample is smoothed using a grinder and weighed. The sample in the form of powder is then used for the next stage.

#### 2.3.2 Pineapple Peel Extraction

1000 grams of pineapple peel powder was macerated using methanol solvent and filtered. Maceration process was done repeatedly until macerate was colorless. The filtrate from maceration was collected, then it was concentrated with a rotary evaporator at 40°C so that the concentrated methanol extract was obtained and weighed.

#### 2.3.3 Fractionation of Methanol Extract

The concentrated methanol extract was fractionated using hexane and ethyl acetate solvents sequentially. The concentrated extract of methanol was put into beaker glass 250 mL and suspended with water and then added hexane. Then put in a separating funnel and do the shaking for ± 5 minutes. After shaking, the mixture was allowed to stand until two layers are formed, namely the hexane fraction layer and the water layer. Separate the upper layer from the water layer. Fractionation using hexane solvents was done until filtrate was colorless. After fractionation using hexane solvents was completed, followed by

fractionation using ethyl acetate solvent. From this fractionation process, four fractions were obtained, namely, methanol extract, hexane fraction, ethyl acetate fraction and residual fraction. Each fraction was concentrated using a rotary evaporator.

#### 2.3.4 Phytochemical Test

As much as 5 mg of methanol extract was put into a test tube and then dissolved with 5 mL of methanol. Then added 5 mL of chloroform : water (1: 1), then shaken and left to form two layers of chloroform-water. Upper layer (distilled water) is used for examination of flavonoid using cyanidin test, saponin using hydrochloric acid then the bottom layer (chloroform) is used for the examination of triterpenoid and steroid using Liebermann Burchard reagent. For alkaloid is done using Mayer, Coumarin test is done using thin layer chromatography method and NaOH 1%.

#### 2.3.5 Determination of Total Phenolic Content

Determination of total phenolic content was conducted on methanol extract, hexane fraction, ethyl acetate fraction and residual fraction using the Folin-Ciocalteu method [15].

##### a. Making standard solution of gallic acid

The standard solution was made by dissolving 10 mg of gallic acid in a 10 mL volumetric flask with methanol and obtaining a concentration of 1000 mg/L. Then taken 2.5 mL of stock solution 1000 mg/L and diluted in a 25 mL volumetric flask with methanol so that the concentration of 100 mg/L was obtained, then a variation of the standard solution concentration was made with a concentration of 10; 20; 40; 60; 80 mg/L. The sample was taken 0.5 mL and put in a 10 mL volumetric flask then added with 0.5 mL of Folin-Ciocalteu reagent and left for 5 minutes. Then added 1 mL of 20% sodium carbonate solution and diluted with distilled water to the boundary mark. The mixture was left to stand for two hours. Then absorbance is measured at a wavelength of 765 nm. Based on the absorbance values obtained, a calibration curve was made and a regression equation was obtained from the standard solution.

##### b. Making test solution

Each test sample was weighed as much as 100 mg and dissolved in a 100 mL volumetric flask with methanol to obtain a concentration of 1000 mg/L. Then take 3 mL of the stock solution 1000 mg/L. Then 0.5

mL was taken and put into a 10 mL volumetric flask and 0.5 mL of Folin-Ciocalteu reagent was added and left for 5 minutes. Then added 1 mL of 20% sodium carbonate solution and diluted with distilled water to the boundary mark. The mixture is left to stand for two hours. Next, the absorbance is measured at a wavelength of 765 nm. The total phenolic content of each test solution was determined from the standard solution curve regression equation. Total phenolic content is expressed in Gallic Acid Equivalent (GAE).

#### 2.3.6 Antioxidant Activity Test

Antioxidant testing was conducted on methanol extract, hexane fraction, ethyl acetate fraction and residual fraction with DPPH (1,1-diphenyl-2-picrylhydrazyl) method [16].

##### a. Making DPPH Solution

Weighed 10 mg DPPH and then put in a 250 mL volumetric flask and dissolved using methanol to the boundary mark and obtained DPPH 0.1 mM.

##### b. Making Sample Solution

Each extract was weighed 100 mg then dissolved with methanol in a 100 mL volumetric flask to obtain a sample solution of each extract with a concentration of 1000 mg/L. The test solution was made with various concentrations for methanol extract, hexane fraction and residual fraction namely 3,125; 6.25; 12.5; 25; and 50 (mg/L), while for ethyl acetate fractions which were 1.5625; 3,125; 6.25; 12.5; 25 (mg/L).

##### c. Making Negative Control Solution

Methanol was pipetted 3 mL and put in a vial. Next, 1 mL of 0.1 mM DPPH solution was added. Let stand for 30 minutes after adding DPPH 0.1 mM. Perform work in a dark place and not exposed to sunlight.

##### d. Making Positive Control Solution

Ascorbic acid ( $\text{Mr} = 176.13 \text{ g/mol}$ ) was weighed 10 mg dissolved in methanol in a 10 mL volumetric flask to obtain a solution concentration of 1000 mg/L. The main solution of 1000 mg/L was diluted to a concentration of 10 mg/L, then made five variations of the concentration of the test solution, namely 0.5; 1; 1.5; 2; and 2.5 mg/L.

##### e. Determination of Antioxidant Activity

Determination of antioxidant activity was carried out by adding 3 mL DPPH 0.1 mM into 2 mL of each extract solution with various concentrations. As a control, a mixture of 3 mL DPPH and 2 mL methanol

was used. The mixture was left to stand for 30 minutes, then measured test solution absorbance, positive control and negative control at a wavelength of 517 nm. Determination of the inhibition percentage of each extract was calculated using the formula:

$$\% \text{ inhibisi} = \frac{\text{Ac} - \text{A}}{\text{Ac}} \times 100\%$$

Information:

Ac = absorbance value of control

A = absorbance value of sample

#### 2.3.7 Cytotoxic Test

Cytotoxic tests in this study were conducted by the Brine Shrimp Lethality Test (BSLT) method which refers to the work procedures performed by Ningdyah (2015) with several modifications [17-18].

##### 1. Seedling of Shrimp Larvae of *Artemia salina* leach

Seawater was placed in a small glass container consisting of two parts, namely dark and light and equipped with lights, covers and aerators. Shrimp eggs were put in the dark part of the container and left for 48 hours. After 48 hours, the egg would hatch into larvae (nauplii) and then moved to the brightest part of the container. These larvae would be used as experimental animals for toxicity test in this research.

##### 2. Making Test Solution

100 mg of the sample (methanol, ethyl acetate, hexane and residual extract) was weighed and dissolved in a 100 mL flask to the boundary mark and the concentration of stock solution 1000 mg/L was obtained. The test solution was made with several variations of concentration through multilevel dilution, namely the concentration of 1000; 500; 250; 125; 62.5 and 31.25 mg/L.

##### 3. Testing of Toxicity Activity

In each test sample 50  $\mu\text{L}$  of dimethylsulfoxide solution were added until all samples were dissolved. Then 3 mL of seawater was added to each sample. Then each of 10 shrimp larvae was added to each sample. Then reduce the seawater in the sample to its volume 5 mL. After that, an observation of shrimp larvae was carried out in the sample solution by counting the number of dead larvae after 24 hours. The results of the observations were entered into the table and processed to obtain the  $\text{LC}_{50}$  value.

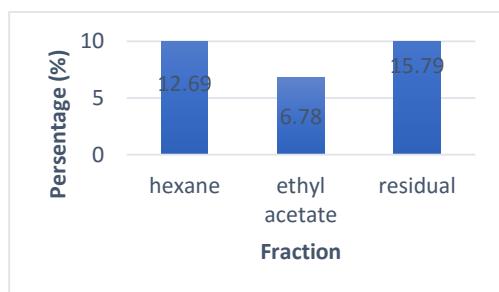
### 3. Result and Discussion

#### 3.1 Pineapple Peel Extraction

Pineapple peel powder was extracted using maceration method with methanol solvent. The choice of this method is due to its simple use, without using special tools and without using heating so that the compounds contained in the sample are not damaged. Methanol solvent was used in the extraction process because methanol is a universal solvent so that polar and non-polar compounds can be extracted completely. The mass of methanol extract obtained was 67.19 grams.

### 3.2 Fractionation of Methanol Extract

Methanol extract was fractionated respectively using hexane and ethyl acetate solvents. Fractionation aims to separate the compounds contained in the extract based on the level of polarity. Hexane solvents were used to dissolve non-polar compounds, while ethyl acetate was used to dissolve semi-polar compounds. Fractionation results can be seen in Figure 3.1



**Figure 3.1.** Fractionation results from methanol extract

Based on Figure 3.1 it can be seen that the residual fraction has a greater fraction weight than the hexane fraction and ethyl acetate fraction. This is probably due to the high glucose content in the residual fraction and other compounds which are not distributed in hexane and ethyl acetate solvents. In addition, the residual fraction has a density greater than the hexane fraction and ethyl acetate fraction, so the residual fraction has the greatest fraction weight.

### 3.3 Phytochemical test

The test results for the content of secondary metabolites from methanol extract and fractions from pineapple peel extract can be seen in Table 3.1.

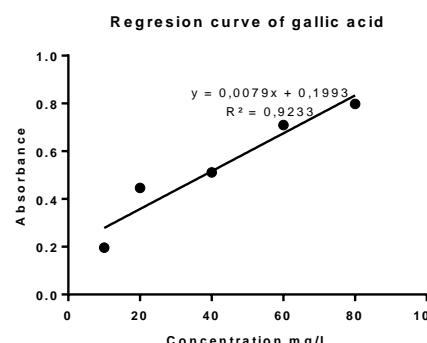
Secondary metabolite content	Reagent	MeOH	Fraction		
			Hex	EtOAc	Res
Flavonoid	HCl + Mg	-	-	-	-
Phenolic	FeCl <sub>3</sub>	+	+	+	+
Saponin	HCl	-	-	-	-
Triterpenoid	Liebermann Burchard	-	-	-	-
Steroid	Liebermann Burchard	+	+	+	-
Alkaloid	Mayer	-	-	-	-
Coumarin	NaOH 1%	+	+	-	-

Description: (+) = exist, (-) = not exist)

Based on Table 3.1 it can be concluded that methanol extract and each fraction have different secondary metabolites. Methanol extract contains secondary metabolic compounds phenolic, steroid and coumarin. While hexane fraction contains phenolic, steroid and coumarin compounds, ethyl acetate fraction contains phenolic and steroid compounds, residual fraction contains only phenolic compounds.

### 3.4 Determination of Total Phenolic Content

The Folin-Ciocalteu method is a method used in determining the total phenolic content of methanol extract and each fraction. In this method, phenolic compounds will react with Folin-Ciocalteu reagent to form a blue solution that can be measured absorbance using a spectrophotometer at a wavelength of 765 nm. At the time of the reaction, the phenolic ion will reduce phosphotungstate phosphomolibdate to the molybdenumtungsten complex [19]. The total phenolic content of the methanol extract and each fraction is expressed as Gallic Acid Equivalent (GAE). Gallic acid is used as a standard or comparison, because gallic acid is one of the natural phenolic compounds derived from stable hydroxybenzoic acid. The gallic acid standard curve can be seen in Figure 3.2.



**Table 3.1** Test results for the content of secondary metabolites of methanol extract and various fractions of pineapple peel extract

**Figure 3.2** Regression curve of gallic acid

Based on Figure 3.2. it can be seen that the greater the concentration of gallic acid, the greater the absorbance produced. From this curve, the gallic acid regression equation is obtained  $y = 0.0079x + 0.1993$ . The regression equation is used in determining the total phenolic content of the methanol extract and each fraction.

Data on the results of total phenolic analysis are shown in Table 3.2.

**Table 3.2** Data on total phenolic content of extracts and fractions

Sample	Total phenolic content (mg GAE/g sample)
Methanol extract	0,3335
Hexane fraction	0,0815
Ethyl acetate fraction	0,3403
Residual fraction	0,2087

Based on the table above, the ethyl acetate fraction contained the highest total phenolic content compared to methanol extract, hexane fraction and residual fraction. The order of total phenolic content in the extracts was ethyl acetate fraction > methanol extract > residual fraction > hexane fraction. Solubility of phenolic compounds depends on the solvent used. Phenolic compounds tend to dissolve in polar solvents. Although methanol is more polar than ethyl acetate, methanol can dissolve polar, semi-polar and polar compounds. Whereas ethyl acetate is a semipolar solvent and it is possible that the phenolic compounds are perfectly distributed in ethyl acetate solvents, so that the phenolic content of the ethyl acetate fraction is greater than the other fractions. The number of phenolic compounds found in methanol extract and fractions has an influence on antioxidant activity.

In the previous study, a total phenolic test of pineapple meat extract had been carried out and showed that methanol extract had a higher total phenolic than ethyl acetate fraction and residual fraction [12]. So that it can be concluded that the methanol solvent is very suitable used to extract the phenolic compounds in pineapple flesh while ethyl acetate is very suitable used to extract the phenolic compounds in pineapple peel, this is also in accordance with the results of phytochemical tests on ethyl acetate fraction which showed the presence of phenolic compounds.

### 3.5 Test of Antioxidant Activity

The DPPH (1,1-diphenyl-2-pikrilhidrazil) method is used in the antioxidant activity

test. This method is used because the method is simple, easy, effective and practical. The principle of the DPPH method is the measurement of antioxidant activity quantitatively by measuring DPPH radical capture by a compound that has antioxidant activity using UV-Vis spectrophotometry so that the value of free radical inhibitory activity can be known as  $IC_{50}$  (Inhibitory Concentration) [20].  $IC_{50}$  value is a value that shows the ability of 50% inhibition of free radicals by a sample concentration (mg/L). The  $IC_{50}$  value is obtained from the calibration curve of the test solution concentration (X axis) and % inhibition (Y axis) [21].

**Table 3.3.** The test results of antioxidant activity from methanol extract, fractions and ascorbic acid

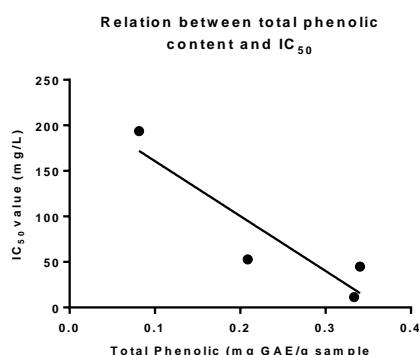
Sample	$IC_{50}$ (mg/L)
Methanol extract	11,29
Hexane fraction	193,71
Ethyl acetate fraction	44,94
Residual fraction	52,80
Ascorbic acid	4,07

Based on Table 3.3 it can be seen that methanol extract has a low  $IC_{50}$  compared to other fractions. The  $IC_{50}$  value of methanol extract approached ascorbic acid as a positive control, with an  $IC_{50}$  value of 11.29 mg/L. The smaller  $IC_{50}$  value, the higher the activity of free radical inhibition. This was caused by the presence of active phenolic compounds in methanol extract which supports antioxidant activity. Antioxidant activity was classified as very strong ( $IC_{50} < 50$  mg/L), strong ( $50 \text{ mg/L} < IC_{50} < 100$  mg/L), moderate ( $100 \text{ mg/L} < IC_{50} < 150$  mg/L), weak ( $150 \text{ mg/L} < IC_{50} < 200$  mg/L) and very weak ( $IC_{50} > 200$  mg/L) [22].

Based on the data in Table 4.3 it can be concluded that the methanol extract (11.29 mg/L) and ethyl acetate fraction (44.94 mg/L) were classified as very strong antioxidants, the residual fraction (52.80 mg/L) was a strong antioxidant and the hexane fraction (193.71 mg/L) was classified as a weak antioxidant. In the previous study, methanol extract of pineapple flesh also had higher antioxidant activity than the ethyl acetate fraction and residual fraction. The antioxidant activity in this study was proportional to the total phenolic contained in extract<sup>12</sup>. This showed that the phenolic content in the sample contributed to the antioxidant activity in the sample. The higher the total phenolic content, the greater the antioxidant activity.

### 3.6 Relationship of Total Phenolic Content to Antioxidant Activity

The relationship of total phenolic content to antioxidant activity can be seen in Figure 3.3.



**Figure 3.3.** Relation between total phenolic content and IC<sub>50</sub> value

Based on Figure 4.3, it was known that the greater the total phenolic content, the IC<sub>50</sub> value become smaller and the antioxidant activity increased so that many antioxidant compounds that inhibited free radicals. The highest total phenolic content was found in ethyl acetate fraction which was 0.3403 mg GAE/g fraction so the antioxidant activity was greater with IC<sub>50</sub> value of 44.94 mg/L.

### 3.7 Cytotoxic Test

Cytotoxic tests of methanol extract and each fraction of pineapple peel extract were carried out using the Brine Shrimp Lethality Test (BSLT) method. In this method the nature of toxicity was determined by determining the value of LC<sub>50</sub> in several variations in the concentration of the test solution. The results of the cytotoxic test were listed in Table 3.4.

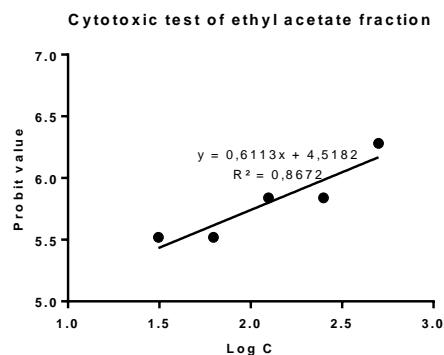
**Table 3.4** Observation result of cytotoxic test

Sample	Total of dead larvae	% Death	Probit value	Log C	LC <sub>50</sub> (mg/L)
MeOH	4	40	4.75	1.49	55.16
	5	50	5.00	1.79	
	6	60	5.25	2.09	
	9	90	6.28	2.39	
	9	90	6.28	2.69	
Hex	5	50	5.00	1.49	35.04
	6	60	5.25	1.79	
	7	70	5.52	2.09	
	8	80	5.84	2.39	
	9	90	6.28	2.69	
EtOAc	7	70	5.52	1.49	6.14
	7	70	5.52	1.79	
	8	80	5.84	2.09	
	8	80	5.84	2.39	
	9	90	6.28	2.69	
Res	7	70	5.52	1.49	8.40
	7	70	5.52	1.79	
	8	80	5.84	2.09	
	9	90	6.28	2.39	
	9	90	6.28	2.69	
Contro	0	0	0	0	
1					

Description: shrimp larvae which are included in each vial are 10 tails.

The results of the toxicity test of ethyl acetate fraction showed the lowest LC<sub>50</sub> value compared to methanol extract and other fractions, with an LC<sub>50</sub> value of 6.1404 mg/L. These results were obtained from the percentage of shrimp larvae deaths from various variations of the concentration converted into probit values according to the probit value table based on the percentage of deaths.

The results obtained show that the concentration of the sample solution was proportional to the number of dead shrimp. The LC<sub>50</sub> value was calculated based on the regression equation value between log concentrations and probit values. The toxicity curve of ethyl acetate fraction can be seen in Figure 3.4.



**Figure 3.4** Regression curve of determination of LC<sub>50</sub> value

In Figure 3.4 it can be seen that there was an increase in mortality based on the increase in concentration. After obtaining the regression equation for each extract, the LC<sub>50</sub> value can be calculated. From these results the LC<sub>50</sub> value of ethyl acetate fraction was 6.1404 mg/L. Based on the toxicity value in plants it can be said to be very toxic if LC<sub>50</sub> ≤ 30 mg/L, toxic if it is 31 mg/L ≤ LC<sub>50</sub> ≤ 1000 mg/L and non-toxic if LC<sub>50</sub> > 1000 mg/L. So that it can be seen that the highest cytotoxic activity of shrimp larvae (*Artemia salina* Leach) was indicated by ethyl acetate fraction with LC<sub>50</sub> of 6.1404 mg/L followed by residual fraction with LC<sub>50</sub> of 8.4043 mg/L, LC<sub>50</sub> of hexane fraction of 35.0429 mg/L, and the lowest activity was indicated by methanol extract with LC<sub>50</sub> of 55.1696 mg/L. The test results showed that the polar, semipolar and non-polar fractions of methanol extract of pineapple peel had cytotoxic activity against shrimp larvae (*Artemia salina* Leach). Phenolic compounds not only act as antioxidants but they are also toxic. Based on the total phenolic test results, the total

phenolic content in the ethyl acetate fraction was very high. The high total phenolic content in this ethyl acetate fraction caused the fraction to be very toxic. In a previous study, toxicity tests of juice and pineapple hump had also been carried out with three variations (fruit hump juice, fruit flesh extract, and fruit hump mixture) against shrimp larvae (*Artemia salina* Leach). The results indicated that the three pineapple juice had an LC<sub>50</sub> value > 1000 ppm which showed that all samples were non-toxic and did not have a positive correlation as anticancer drugs [23-24].

#### 4. Conclusion

Based on the results of research conducted on pineapple peel (*Ananas comosus L. Merr*) contains phenolic, coumarin and steroids. The total phenolic content contained in the methanol extract was 0.3335 mg GAE/g extract, while the hexane fraction, ethyl acetate fraction and residual fraction respectively were 0.0815; 0,3403; 0.2087 mg GAE/g. Antioxidant activity with the DPPH method showed that the methanol extract and ethyl acetate fraction were classified as very strong antioxidants, the residual fraction was classified as strong and the hexane fraction was classified as moderate. IC<sub>50</sub> values for methanol extract, hexane fraction, ethyl acetate fraction and residual fraction were 11.29; 193,71; 44.94; 52.80 mg/L. The cytotoxic test results showed that the ethyl acetate fraction and residual fraction were classified as very toxic with LC<sub>50</sub> values of 6.1404 and 8.4043 mg/L respectively. From this study, it was found that ethyl acetate fraction showed the highest total phenolic content and cytotoxic activity while the methanol extract showed the highest antioxidant activity.

#### 5. Preface

Author preface says to all parties who have helped and contributed in completing this thesis, provide suggestion, motivation, prayer, and advice to the author.

#### References

- [1] Khinho, J; Et.al. Tumbuhan Obat Tradisional di Sulawesi Utara Jilid II, *Balai Penelitian Kehutanan Manado Nandan Penelitian dan Pengembangan Kehutanan Kementrian Kehutanan*, 2011.
- [2] Emeka, E. E.; Et.al. Evaluation of Antibacterial Activities of Silver Nanoparticles Green-Synthesized Using Pineapple Leaf (*Ananas Comosus*). *Micron* 2014, 57, 1–5.
- [3] Hossain, M. F. Nutritional Value and Medicinal Benefits of Pineapple. *International Journal of Nutrition and Food Sciences* 2015, 4(1), 84.
- [4] Comparative Study on the Extraction of Bioactive Compound from Banana and Pineapple Peel Extract. *Dec. 14-15, 2017 Kuala Lumpur (Malaysia)* 2018.
- [5] Wang, Z.; Tochi, B. N.; Xu, S.-Y.; Zhang, W. Therapeutic Application of Pineapple Protease (Bromelain): A Review. *Pakistan Journal of Nutrition* 2008, 7(4), 513–520.
- [6] Salas, C. E.; Gomes, M. T.; Hernandez, M.; Lopes, M. T. Plant Cysteine Proteinases: Evaluation of the Pharmacological Activity. *Phytochemistry* 2008, 69(12), 2263–2269.
- [7] Mantovani, A.; Allavena, P.; Sica, A. & Balkwill, F. Cancer-related inflammation. *Nature* 2008, Volume 454, pp. 436-444.
- [8] Mynott, T.; Guandalini, S.; Raimondi, F.; Fasano, A. Bromelain Prevents Secretion Caused by Vibrio Cholerae and Escherichia Coli Enterotoxins in Rabbit Ileum in Vitro. *Gastroenterology* 1997, 113(1), 175–184.
- [9] Brakebusch, M. et al. Bromelain is an accelerator of phagocytosis, respiratory burst and Killing of *Candida albicans* by human granulocytes and monocytes. *Eur J Med Res*, Volume 6, pp. 193-200.
- [10] Brien, S. Bromelain as a Treatment for Osteoarthritis: a Review of Clinical Studies. *Evidence-based Complementary and Alternative Medicine* 2004.
- [11] Hossain, M. A.; Rahman, S. M. Total Phenolics, Flavonoids and Antioxidant Activity of Tropical Fruit Pineapple. *Food Research International* 2011, 44(3), 672–676.
- [12] Ma, C.; Et.al. Characterization of Active Phenolic Components in the Ethanolic Extract of *Ananas Comosus L.* Leaves Using High-Performance Liquid Chromatography with Diode Array Detection and Tandem Mass Spectrometry. *Journal of Chromatography A* 2007, 1165(1-2), 39–44.
- [13] Rahmat, D.; Et.al. Peningkatan Aktivitas Antimikroba Ekstrak Nanas (*Ananas Comosus* (L.). Merr) Dengan Pembentukan Nanopartikel. *Journal of Sains dan kesehatan* 2015, 1(5), 236–244.
- [14] Anggraini D; Rahmides WS; Malik M. Formulasi Sabun Cair dari Ekstrak

- Batang Nanas (*Ananas comosus.L*) untuk Mengatasi Jamur *Candida albicans*. Riau: Sekolah Tinggi Ilmu Farmasi Riau. Padang: Faculty of Pharmacy of Universitas Andalas Padang; 2012. h.30.
- [15] Pourmorad, F.; Hosseiniemehr, S.J.; Shahabimajd, N. Antioxidant Activity, Phenol and Flavonoid Contents of Some Selected Iranian Medicinal Plants. *African Journal of Biotechnology* 2006, 5(11), 1142-1145.
- [16] Parwati, Ni Kadek Fina. Uji Aktivitas Antioksidan Ekstrak Daun Binahing (Anredera Cordifolia (Tenore) Steenis) Dengan 1,1-difenil-2-pikrilhidrazil (DPPH) Menggunakan Spektrofotometer UV-VIS. *Journal of Akademika Kimia* 2014, 3(3), 143-149.
- [17] Ningdyah, A.W; Alimuddin, A.H; Jayuska, A. Uji Toksisitas Dengan Metode BS LT (*Brine Shrimp Lethality Test*) Terhadap Hasil Fraksinasi Ekstrak Kulit Buah Tampoi (*Baccaurea macrocarpa*). *JKK* 2015, 4(1), 75-83.
- [18] Tianandari, Febri and Rasidah. Uji Sitotoksik Ekstrak Etanol Buah Ketumbar (*Coriandrum sativum* Linn) Terhadap *Artemia salina* Leach Dengan Metode Brine Shrimp Lethality Test (BSLT). *Aceh Nutrition Journal* 2017.
- [19] Turkmen, N.; Sari, F.; Velioglu, Y. S. Effects of Extraction Solvents on Concentration and Antioxidant Activity of Black and Black Mate Tea Polyphenols Determined by Ferrous Tartrate and Folin-Ciocalteu Methods. *Food Chemistry* 2006, 99(4), 835-841.
- [20] Isnindar, Wahyuono, S. and Setyowati, E. P. Isolasi dan identifikasi senyawa antioksidan daun kesemek (*diospyros kaki* Thunb.) dengan metode DPPH (2,2-Difenil-1-Pikrilhidrazil), *Journal of Obat Tradisional* 2011, 16(3), 157-164.
- [21] Niah, R.; Baharsyah, R. N. Uji Aktivitas Antioksidan Ekstrak Etanol Kulit Buah Naga Merah Super (*Hyclocereus Costaricensis*). *Journal of Pharmascience* 2018, 5(1).
- [22] Bahriul, Putrawan. Uji Aktivitas Antioksidan Ekstrak Daun Salam *Syzygium polyanthum*) Dengan Menggunakan 1,1-difenil-2-pikrilhidrazil. *Journal of Akademika Kimia* 2014.
- [23] Frengki, Roslizawaty, Pertiwi, D. Toxicity Test Of Ethanol Extract Ant Plant Local Aceh (*Mymercodia Sp*) Method Of Bs LT Larvae Shrimp Artemia Salina Leach. *Journal of Medika Veterinaria* 2014, 8, 60-62.
- [24] Khuluq, Much Husna; Wardatun, Sri; Wiendarlina, Ike Yulia. Uji Toksisitas Sari Buah dan Bonggol Nanas (*Ananas comosus L. Merr*) terhadap Larva Udang (*Artemia salina* Leach). *Journal of Farmasi* 2015.

## SENYAWA TRITERPENOID DARI EKSTRAK ETIL ASETAT DAUN TUMBUHAN PEGAGAN (*Centella asiatica* (Linn) Urban)

Suryati\*, Rahmi Vika Ulia, Emil Salim

Laboratorium Kimia Organik Bahan Alam, Jurusan Kimia FMIPA, Universitas Andalas, Kampus Limau Manis, Padang 25613

Email : [suryati\\_chemua@yahoo.com](mailto:suryati_chemua@yahoo.com)

**Abstrak :** The pegagan plant (*Centella asiatica* (Linn.) Urban) has been used as traditional medicine such as cough, burn, hemorrhoids, intestinal worms, stomachache, chicken pox, and boils. The pegagan plant has known to contain flavonoid, phenolic, steroid, tannin, saponin, and triterpenoid compound. In this research, one triterpenoid compound from pegagan plant leaves was isolated and antibacterial activity tested against *Escherichia coli* and *Staphylococcus aureus* by diffusion method. Extraction was carried out by maceration and isolation was carried out by column chromatography. Purification of isolated compound by recrystallization method. Isolated compound was obtained white solid with melting point 143°-145°C, gave a triterpenoid positive test with Liebermann Buchard reagent. Structure characterization of triterpenoid isolated compound using infrared spectrophotometer showed the presence of absorption for the C-H stretching group at 2919,11 cm<sup>-1</sup>, at 3327,19 cm<sup>-1</sup> was showed O-H (hydroxyl), at 1734,58 cm<sup>-1</sup> was showed C=O (carbonyl). As well as absorption of the germinal group dimethyl at wave numbers 1460,38 cm<sup>-1</sup> and 1372,51 cm<sup>-1</sup>. Ultraviolet spectrophotometer of triterpenoid isolated compound show that was not conjugated bond. The isolated triterpenoid has no antibacterial activity activity against *Escherichia coli* and *Staphylococcus aureus* bacteria.

**Kata Kunci :** Pegagan, triterpenoid, anti-bacteria

### 1. Pendahuluan

Tumbuhan pegagan (*Centella asiatica* (Linn) Urban) banyak tersebar di kawasan Asia Tenggara, India, Cina, Jepang dan Australia. Tumbuhan ini secara tradisional telah digunakan sebagai obat batuk, wasir, cacingan, sakit perut, ayan (epilepsi), kesuburan wanita, mimisan, amandel, radang tenggorokan, campak, obat luka bakar, dan bisul [1,2,3].

Banyaknya khasiat dari tumbuhan pegagan sangat dipengaruhi oleh senyawa kimia yang terkandung dalam tumbuhan tersebut. Pada penelitian sebelumnya telah melaporkan bahwa tumbuhan pegagan mengandung beberapa senyawa metabolit sekunder seperti alkaloid, saponin, flavonoid, fenolik steroid, tanin, dan triterpenoid. Beberapa senyawa yang telah dilaporkan dari tumbuhan pegagan adalah quercetin dan kaemferol, asiatikosida, asam asiatik, asam brahmat, *medasiatic acid*, medakasosida, sitosterol, stigmasterol, vallerin dan brahmosida [4-7].

Penelitian sebelumnya telah melaporkan beberapa bioaktivitas dari tumbuhan pegagan antara lain sebagai anti tumor, anti jamur dan sitotoksik. Sedangkan untuk aktivitas antibakteri juga telah dilaporkan dari ekstrak etanol, kloroform, petroleum eter, metanol, aseton, etil asetat, heksana, dan air. Bk Dask *et al.* (2011) melaporkan bahwa ekstrak etanol, kloroform, petroleum eter, heksana dan air dari daun pegagan memiliki aktivitas antibakteri terhadap bakteri *Proteus vulgaris*, *Staphylococcus*

*aureus*, *Bacillus subtilis*, *Escherichia coli*. Dhanalakshmi *et al.* (2018) telah melaporkan ekstrak etil asetat, etanol, aseton, kloroform, petroleum eter dari daun tumbuhan pegagan memiliki aktivitas antibakteri terhadap bakteri *Staphylococcus haemolyticus*, *Staphylococcus lentus*, *Staphylococcus aureus*, *Bacillus cereus*, *Escherichia coli*, *Klebsiella pneumonia* dan *Brevibacterium paucivorans* [8-12].

Pada penelitian ini telah diisolasi satu senyawa triterpenoid dari daun tumbuhan pegagan dan uji aktivitas antibakteri terhadap bakteri *Escherichia coli* dan *Staphylococcus aureus*.

### 2. Metodologi Penelitian

#### 2.1 Alat

Alat yang digunakan pada penelitian ini adalah maserator, *rotary evaporator* (Heidolph Labora 4000), seperangkat alat distilasi, kolom kromatografi, plat KLT, Lampu UV (254-356 nm), *Melting Point Apparatus*, spektrofotometer UV-Vis, spektrofotometer FTIR, peralatan gelas yang umum digunakan dilaboratorium, serta peralatan untuk uji antibakteri seperti cawan petri, *autoclave*, inkubator, mikropipet dan *laminar air flow*.

#### 2.2 Bahan

Bahan yang digunakan pada penelitian <sup>39</sup> adalah daun tumbuhan pegagan, heksana, etil asetat, metanol, silika gel 60 F<sub>254</sub>, pereaksi Liebermann-Burchad, pereaksi Mayer, bubuk magnesium dan asam klorida pekat, NaOH, bakteri (*Escherichia coli* dan *Staphylococcus*

*aureus*), media MHA (*Mueller-Hinton Agar*), media NA (*Nutrient Agar*), alkohol 70% dan NaCl 0,9%.

### 2.3 Prosedur penelitian

#### 2.3.1 Identifikasi Sampel Tumbuhan Pegagan (*Centella asiatica* (Linn.) Urban)

Sampel berupa daun tumbuhan pegagan diperoleh di kota Payakumbuh, provinsi Sumatera Barat, dan di identifikasi di Herbarium Jurusan Biologi Universitas Andalas (ANDA)

#### 2.3.2 Ekstraksi

Sebanyak 1,1 kg serbuk halus pegagan dimaserasi dengan pelarut heksana, dan disaring. Proses maserasi dilakukan berulang kali hingga maserat tidak lagi memberikan warna, semua filtrat di kumpulkan kemudian dipekatkan dengan *rotary evaporator* pada suhu 40°C dan diperoleh ekstrak kental heksana. Ampas sisa maserasi ini dimaserasi lagi dengan etil asetat dengan cara yang sama sehingga di dapatkan ekstrak pekat etil asetat. Selanjutnya ampas sisa disimpan untuk proses maserasi selanjutnya.

#### 2.3.3 Uji Profil fitokimia

0,5 gram ekstrak etil asetat dilarutkan dengan 25 mL metanol ditambahkan kloroform dan akuades (1:1), kemudian dibiarkan beberapa menit dan terbentuk dua lapisan yaitu lapisan kloroform dan lapisan akuades. Lapisan atas (akuades) digunakan untuk memeriksa flavonoid dengan pereaksi sianidin tes, saponin dengan penambahan asam klorida, selanjutnya lapisan bawah (kloroform) digunakan untuk memeriksa triterpenoid dan steroid dengan pereaksi Lieberman burchard. Untuk uji alkaloid dilakukan dengan pereaksi meyer dengan menguapkan pelarut dari ekstrak metanol ditambahkan HCl dan pereaksi meyer, Uji kumarin dilakukan dengan metoda kromatografi lapis tipis dan NaOH 1% [13]

#### 2.3.4 Isolasi dan Pemurnian

Sebanyak 30 gram ekstrak etil asetat dilakukan isolasi dengan kromatografi kolom gravitasi menggunakan sistem elusi dengan metoda *Step gradient polarity* (SGP) dimulai dari heksana 100% sampai etil asetat 100%, hasil pemisahan ini menghasilkan 15 fraksi (F.1- F.15). Fraksi (F.6) (1,102 g) dilakukan pemisahan lebih lanjut dengan kromatografi kolom gravitasi dengan metoda yang sama dan menghasilkan 14 subfraksi (F.6.1-F.6.14). Subfraksi (F.6.8) dilakukan pemisahan kembali dengan metoda elusi secara isokratik dengan perbandingan eluen heksana : etil asetat (9,5 : 0,5) sehingga

diperoleh 47 vial. Subsubfraksi F.6.8.1 yang menunjukkan padatan putih dimurnikan lebih lanjut dengan cara rekristalisasi sehingga diperoleh padatan putih dengan massa 8,6 mg yang positif triterpenoid dengan peraksi Liebermann-Burchard.

Senyawa hasil dilakukan karakterisasi dengan spektoskopi ultraviolet (UV-Vis) dan Inframerah serta melakukan uji antibakteri terhadap bakteri *Staphylococcus aureus* dan *Escherichia coli*.

#### 2.3.5 Uji aktivitas antibakteri dengan metoda difusi

3 mg senyawa hasil isolasi dilarutkan dengan heksana dan diperoleh larutan induk 1500 mg/L. Selanjutnya dibuat beberapa variasi konsentrasi yaitu konsentrasi 1500, 750, 375, 187,5, 93,75 mg/L. Larutan kontrol positif dengan konsentrasi 93,75 mg/L menggunakan *amoxicillin* 78,70 %

Media NA (*Nutrient Agar*) sebanyak 0,28 g dilarutkan dengan 10 mL akuades dengan cara memanaskan dan diaduk menggunakan *magnetic stirrer* sampai mendidih dan larut dengan sempurna. Sebanyak 5 mL NA dituangkan masing-masing ke dalam tabung reaksi steril dan ditutup dengan aluminium foil, media disterilkan dalam autoklaf pada suhu 121°C selama 15 menit, media dibiarkan memadat pada suhu ruang ± 30 menit pada kemiringan 30°. Media NA yang telah memadat ditumbuhkan bakteri dengan cara menggoreskan bakteri ke media agar dan diinkubasi selama 24 jam. Bakteri yang telah tumbuh pada media NA diambil 1 ose disuspensikan dengan memasukan ke dalam NaCl fisiologi 0,9 % dan disamakan kekeruhan dengan standar Mc Farland untuk menentukan jumlah bakteri yang dipakai.

Untuk media *Mueller Hinton Agar* (MHA) ditimbang sebanyak 9,75 gram dan dilarutkan dengan 250 mL akuades lalu dibiarkan mendidih dan disterilkan dengan autoklaf. Kedalam media MHA dimasukan suspensi bakteri, kemudian media yang telah berisi suspensi bakteri dituangkan ke dalam cawan petri dan dibiarkan mengeras. Media yang sudah mengeras dibuat lubang/sumur dan dimasukan sampel, larutan kontrol positif, negatif dengan menggunakan kapas<sup>40</sup>. Selanjutnya dilakukan inkubasi selama 24 jam. Setelah 24 jam dilakukan pengukuran zona bening yang terbentuk

zona bening yang terbentuk

### 3. Hasil dan Diskusi

#### 3.1 Identifikasi tumbuhan pegagan (*Centella asiatica* (Linn) Urban)

Berdasarkan hasil identifikasi tumbuhan di Herbarium Universitas Andalas (ANDA)

melalui surat Nomor 169/K-ID/ANDA/IV/2019 diketahui bahwa sampel yang digunakan termasuk kedalam family apiaceae, spesies *Centella asiatica* (L.) Urb

**3.2 Ekstraksi daun tumbuhan pegagan**  
Ekstraksi dengan cara maserasi dipilih karena pengaruhnya yang sederhana, ekstrak yang didapatkan lebih banyak, dan mencegah senyawa rusak, karena pengrajan dilakukan pada suhu ruang [14]. Proses ekstraksi dimulai dengan pelarut non polar yaitu dengan pelarut heksana yang bertujuan untuk mengekstrak senyawasenyawa yang bersifat non polar. Maserasi

dengan pelarut heksana menghasilkan sebanyak 31,2920 gram ekstrak kental dari 10 kali penyaringan. Kemudian dilanjutkan pelarut etil asetat dan dihasilkan 30,7753 gram ekstrak etil asetat dari 3 kali penyaringan.

**3.3 Uji fitokimia daun tumbuhan pegagan (*Centella asiatica* (Linn) Urban)**  
Hasil uji fitokimia daun tumbuhan pegagan ekstrak etil asetat daun pegagan dicantumkan pada Tabel 1.

**Tabel 1.** Hasil uji profil fitokimia etil asetat daun tumbuhan pegagan

Metabolit Sekunder	Pereaksi	Pengamatan	Ekstrak Etil Asetat
Flavonoid	Sianidin Test	Jingga	(+)
Fenolik	FeCl <sub>3</sub>	Hijau pekat	(+)
Triterpenoid	Lieberman Burchad	Larutan jingga Kemerahan	(+)
Steroid	Lieberman-Burchad	Larutan hijau	(+)
Alkaloid	Mayer	Tidak ada endapan	(-)
Saponin	H <sub>2</sub> O	Terbentuk gelembung	(+)
Kumarin	NaOH 2 %	Adanya flouresensi merah	(-)

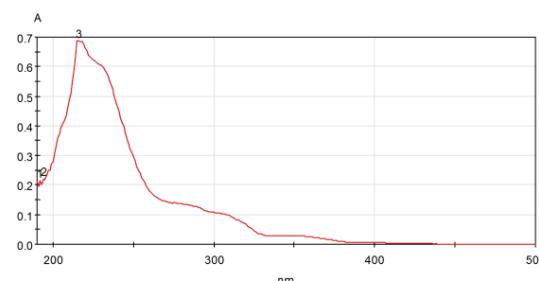
Dari hasil uji fitokimia diketahui adanya kandungan senyawa triterpenoid yang cukup tinggi dari ekstrak etil asetat daun tumbuhan pegagan, selanjutnya dilakukan isolasi, pemurnian, karakterisasi struktur dan uji aktivitas antibakteri.

#### 3.4 Isolasi dan pemurnian

Hasil pemisahan 30 gram ekstrak etil asetat dengan kromatografi kolom dengan cara elusi bergradien diperoleh 15 fraksi (F1-F.15). Pemisahan selanjutnya terhadap F.6 yang menunjukkan uji positif triterpenoid dengan pereaksi Liebermann buchard dilakukan dengan cara yang sama. Selanjutnya pemurnian dilakukan dengan cara rekristalisasi sehingga diperoleh padatan putih dengan berat 8,6 mg.

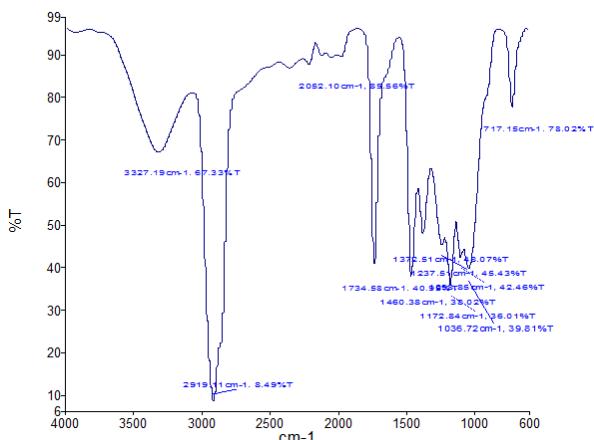
#### 3.5 Karakterisasi Senyawa hasil isolasi dengan spektoskopi UV dan FTIR

Hasil pengukuran spektrum UV senyawa hasil isolasi (Gambar 1), menunjukkan adanya serapan maksimum ( $\lambda_{maks}$ ) pada panjang gelombang 216 nm. Pada panjang gelombang ini elektron terjadi eksitasi elektron dari  $n \rightarrow \sigma^*$  atau  $\pi \rightarrow \pi^*$  dan juga menunjukkan tidak adanya ikatan rangkap yang berkonjugasi [15].



**Gambar 1.** Spektrum UV senyawa hasil isolasi

Spektrum FTIR senyawa hasil isolasi (Ditampilkan pada gambar 2) dari data spektrum diketahui bahwa triterpenoid hasil isolasi mempunyai gugus fungsi CH stretching pada bilangan gelombang 2919,11 cm<sup>-1</sup>, gugus OH pada bilangan gelombang 3327,19 cm<sup>-1</sup> dan juga didukung oleh vibrasi gugus C-O pada bilangan gelombang 1036,72 cm<sup>-1</sup>, 1172,82 cm<sup>-1</sup> dan 1237,5 cm<sup>-1</sup>. Gugus C=O pada bilangan 1734,58 cm<sup>-1</sup>. Selain itu diperoleh pita serapan pada bilangan gelombang 1460, 38 cm<sup>-1</sup> dan 1372,51 yang menunjukkan ada substituen germinal dimetil yang merupakan ciri khas dari senyawawwa triterpenoid[16].



**Gambar 2.** Spektrum Inframerah senyawa hasil isolasi

### 3.6 Hasil uji aktivitas antibakteri

Uji aktivitas antibakteri terhadap senyawa triterpenoid hasil isolasi dilakukan dengan metoda difusi dengan cara sumuran, hasilnya menunjukan bahwa senyawa triterpenoid tidak memiliki aktivitas antibakteri baik terhadap bakteri Gram positif *Staphylococcus aureus* bakteri Gram negatif *Escherichia coli*.

Hasil uji antibakteri senyawa triterpenoid hasil isolasi pada larutan uji untuk bakteri *Escherichia coli* menghasilkan zona bening pada konsentrasi 1500 mg/L, 750 mg/L dan 183 mg/L, namun pada larutan uji dengan konsentrasi yang sama pada bakteri *Staphylococcus aureus* tidak menghasilkan zona bening. Hal ini disebabkan karena senyawa hasil isolasi merupakan senyawa triterpenoid yang bersifat non polar. Bakteri *Escherichia coli* merupakan bakteri yang memiliki lapisan lipid yang bersifat non polar sehingga senyawa triterpenoid lebih mudah menembus lapisan lipid dari pada lapisan peptidoglikan yang bersifat polar yang terdapat pada bakteri *Staphylococcus aureus*[17].

### 4. Kesimpulan

Dari penelitian yang dilakukan diperoleh senyawa triterpenoid berupa padatan putih dengan titik leleh leleh 143 - 145°C. Karakterisasi struktur triterpenoid hasil isolasi dengan data spektrum UV dan FTIR menunjukan bahwa senyawa triterpenoid tidak memiliki ikatan rangkap berkonjugasi, memiliki gugus fungsi hidroksil , gugus karbonil dan adanya gugus germinal dimetil. Senyawa triterpenoid hasil isolasi tidak menunjukan adanya aktivitas antibakteri terhadap bakteri *Staphylococcus aureus* dan *Escherichia coli*.

### 5. Ucapan Terimakasih

Ucapan terimakasih disampaikan kepada kemenristek diktir yang telah memberikan bantuan dana untuk penelitian ini

### Referensi

- [1] Pribadi, I.R.: Pengaruh Ekstrak Etanol Daun Pegagan (*Centella asiatica* L. Urban) Terhadap Mortalitas Larva Intar IV Nyamuk *Aedes aegypti* (Linn). Skripsi. Program Sarjana Kedokteran Hewan, Fakultas Kedokteran Hewan 2013.
- [2] Dewi, R.T.; Maryani, F.: Antioxidant and α- Glucosidase Inhibitory Compounds of *Centella asiatica*. *Procedia Chemistry* 2015, 17, 148-149.
- [3] Ramadhan, N. S.; Rasyid, R.; Sy, E.: Daya Hambat Ekstrak Daun pegagan (*Centella asiatica*) yang diambil di Batusangkar terhadap Pertumbuhan Kuman *Vibrio cholera* secara In Vitro. *Jurnal Kesehatan Andalas.*, 4(1), 203: (2015)
- [4] Mora, E.; Fernando, A.: Optimasi Ekstraksi Triterpenoid Total Pegagan (*Centella asiatica* (Linn.) Urban) yang Tumbuh di Riau. *Jurnal Penelitian Farmasi Indonesia.*, 1(1): 11 (2012).
- [5] Kristina, N. N.; Kusumah, E. D.; Lailani, P.K.: Analisis Fitokimia dan Penampilan Polapita Protein Tanaman Pegagan (*Centella asiatica*) Hasil Konservasi In Vitro. *Bul. Littro.*, 20(1): 15-16 (2019).
- [6] Sugianto, I.S.; Subandi.; Muntholib.: Uji fitokimia Ekstrak Pegagan (*Centella asiatica*) dan Buah Sirsak (*Annona muricata* L.) Serta Potensinya Sebagai Inhibitor Xantin Oksidase. *Jurnal Kimia FMIPA Universitas Negeri Malang*.
- [7] Sutardi.: Kandungan Bahan Aktif Tanaman Pegagan dan Khasiatnya Untuk Meningkatkan Sistem Imun Tubuh. *Jurnal Litbang Pertanian.*, 35(3): 123-124 (2016).
- [8] Babu, T.D.; Kuttan, G.; Padikkala, J.: Cytotoxic and Anti-Tumour Properties of Certain Taxa of Umbelliferae with Special to *Centella asiatica* (L) Urban. *Journal of Ethnopharmacology.*, 48: 55-57 (1995).
- [9] Phuakjaiphao, C.; Kunasakdakul, K.: Isolation and Screening for Inhibitory Activity on *Alternaria brassicicola* of Endophytic Actinomycetes from *Centella asiatica* (L.) Urban. *Journal of Agricultural Technology.*, 11(4): 910-911 (2015).
- [10] Dash, BK.; Faruque, HM.; Biswas, SK.; Alam, MK.; Sisir, SM.; Prodhan, UK.: Antibacterial and Antifungal Activities of Several Extracts of *Centella asiatica* L. against Some Human Pathogenic

- Microbes. *Life Sciences and Medicine Research.*, 2011(35): 3-4 (2011).
- [11] Salmiwanti.; Ilyas, A.; Saleh, A.: Isolasi Senyawa Metabolit Sekunder Fraksi N-Heksana dari Daun Pegagan (*Centella asiatica* L.) dan Uji Antibakteri Terhadap *Mycobacterium tuberculosis*. *Jurnal Kimia*, Fakultas Sains Teknologi UIN Alauddin Makassar, 4(2): 56-63.
- [12] Dhanalakshmi, P.; Shamsudin, M.; Xavier, T.F: Biological Efficacy of *Centella asiatica* (L) urban Against Opportunistic Pathogens. *Journal of Pharmacy and Biological Sciences.*, 8(1): 209-213 (2018).
- [13] Rasyid, A.: Identifikasi Senyawa Metabolit Sekunder Serta Uji Aktivitas Antibakteri dan Antioksidan Ekstrak Metanol Teripang *Stichopus hermanii*. *Jurnal Ilmu dan Teknologi Kelautan Tropis.*, 4: 360-368 (2012)
- [14] Ibrahim, S., *Teknik Laboratorium Kimia Organik*, Pasca Sarjana Universitas Andalas, 1998
- [15] Kumar, K., *Organic Chemistry*, Dept of Chemistry Amaritsar-143005, 2006.
- [16] Zetta, Y.; Prasetya, P.: Isolasi Senyawa a-Amirin Dari Tumbuhan *Beilschmiedia Roxburghiana* (Medang) dan Uji Bioaktivitasnya. *Akta Kimindo.*, 1(3): 28 (2007)
- [17] Haryati, S.D.; Darmawati, S.; Wilson, W.: Perbandingan Efek Ekstrak Buah Alpukat (*Persea americana* Mill) Terhadap Pertumbuhan Bakteri *Pseudomonas aeruginosa* dengan Metode Disk dan Sumuran. *Prosiding Seminar Nasional Publikasi Hasil-Hasil Penelitian dan Pengabdian Masyarakat.*, 15: 348-351 (2017)

# VALIDASI METODE KROMATOGRAFI CAIR KINERJA TINGGI UNTUK ANALISIS ASAM GALAT, BENZOAT DAN SALISILAT SECARA SERENTAK DALAM DAUN SIRIH MERAH (*Piper crocatum*)

Refilda\*, Yulia Pratiwi, Indrawati

Laboratorium Kimia Analisis Terapan, Jurusan Kimia, Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam, Universitas Andalas, Kampus Limau Manis, Padang 25613

\*E-mail: [refilda@sci.unand.ac.id](mailto:refilda@sci.unand.ac.id)

**Abstrak:** Metode kromatografi cair kinerja tinggi (KCKT) untuk analisis asam galat, benzoat dan salisilat secara serentak dalam daun sirih merah telah divalidasi. Analisis KCKT dilakukan dengan menggunakan sistem elusi isokratik pada kolom C18, panjang gelombang 272, 280 dan 310 nm dengan menggunakan fase gerak asetonitril : asam asetat 1% (10:90), laju alir 0,7mL/menit, suhu kolom 28°C dan volume injeksi 20 µL. Hasil penelitian menunjukkan bahwa metode yang digunakan memenuhi persyaratan dari validasi metode, di mana nilai standar deviasi relatif (SDR) ≤ 4,28%, batas deteksi (LoD) ≤ 0,45 mg/L, batas kuantitasi (LoQ) ≤ 1,50 mg/L dan persen perolehan kembali 100,6%. Dengan demikian, metode ini dapat digunakan untuk analisis asam galat, benzoat dan salisilat secara serentak dalam daun sirih merah.

**Kata Kunci:** Validasi metode KCKT, asam galat, asam benzoat, asam salisilat

## 1. Pendahuluan

Validasi metode merupakan suatu tindakan penilaian terhadap parameter tertentu untuk membuktikan bahwa parameter tersebut memenuhi persyaratan untuk penggunaannya, di mana metode yang divalidasi bersifat akurat, spesifik, reproduksibel, dan tahan pada kisaran analit yang akan dianalisis [1-4]. Kromatografi cair kinerja tinggi (KCKT) adalah suatu teknik pemisahan yang berdasarkan pada perbedaan pergerakan komponen campuran. Perbedaan pergerakan ini dikarenakan pengaruh dari fase diam (*stationary phase*) dan fase gerak (*mobile phase*) yang digunakan pada kromatografi [5].

Sirih merah merupakan salah satu tanaman obat tradisional. Daun sirih merah dapat digunakan untuk mengobati berbagai macam penyakit seperti bengkak, mimisan, radang mata, diabetes dan kanker. Daun sirih merah mengandung metabolit sekunder seperti saponin, flavonoid, fenolik dan minyak atsiri [6-8]. Asam galat, asam benzoat dan asam salisilat merupakan senyawa fenolik yang sering dijumpai di dalam tanaman obat [9].

Metode KCKT telah banyak dikembangkan untuk analisis senyawa secara serentak. Gini dan Jothi telah melakukan pengembangan metode KCKT pada analisis senyawa fenolik (asam galat, katekol, asam benzoat, resorsinol, asam askorbat, vanilin, dan kuersetin) secara serentak dalam tanaman kiambang [10].

Skendi, dkk juga telah melakukan pengembangan metode KCKT untuk analisis 24 senyawa fenolik secara serentak pada 5 jenis tanaman Yunani [11]. Selain itu pengembangan metode KCKT pada analisis senyawa fenolik secara serentak juga telah dilakukan pada daun tanaman tempuyung, mitsuba dan buah jeruk [12-13].

Pada penelitian ini dilakukan validasi metode KCKT untuk analisis asam galat, benzoat dan salisilat secara serentak dalam daun sirih merah. Analisis KCKT dilakukan dengan mengacu pada penelitian yang telah dilakukan oleh Seal, yaitu pada kolom C18, panjang gelombang 272, 280 dan 310 nm dengan menggunakan fase gerak asetonitril : asam asetat 1% (10:90), laju alir 0,7mL/menit, suhu kolom 28°C dan volume injeksi 20 µL [13]. Parameter validasi metode yang ditentukan yaitu presisi, batas deteksi (LoD), batas kuantitasi (LoQ), dan akurasi.

## 2. Metodologi Penelitian

### 2.1 Alat

Peralatan yang digunakan pada penelitian ini adalah KCKT (Agilent 1260), sonikator (Bandelin Sonorex), timbangan analitik (Kern ABJ), *hot plate stirrer*, pipet mikro, botol vial dan beberapa peralatan gelas.

### 2.2 Bahan

Bahan yang digunakan pada penelitian ini adalah daun sirih merah, Asam galat (Sigma), asam benzoat (Merck), asam

salisilat (Merck), metanol p.a (Merck), akuabides, metanol *grade* HPLC (Merck), asetonitril *grade* HPLC (Merck) dan asam asetat p.a (Merck).

### 2.3 Persiapan Sampel

Daun sirih merah segar diambil di daerah Bariang Indah, Kota Padang. Daun sirih merah dibersihkan dengan air dan ditiriskan, kemudian sampel dipotong kecil-kecil dan dikering anginkan selama 10 hari dalam ruangan yang terhindar dari sinar matahari. Sampel kering kemudian dijadikan serbuk dengan menggunakan blender.

### 2.4 Ekstraksi Sampel

Sampel diekstrak dengan menggunakan metode maserasi, yaitu dengan merendam sebanyak 1 g serbuk daun sirih merah dengan 20 mL pelarut akuabides selama 2 hari di dalam erlenmeyer yang dilapisi oleh aluminium foil. Sampel dikocok dengan menggunakan *stirrer* selama 30 menit setiap hari. Kemudian sampel disaring dan filtrat disimpan di dalam botol vial yang tertutup rapat.

### 2.5 Uji Kandungan Senyawa Fenolik

Uji kandungan senyawa fenolik dilakukan dengan menambahkan beberapa tetes larutan FeCl<sub>3</sub> ke dalam ekstrak sampel.

### 2.6 Persiapan Larutan Standar

Larutan standar asam galat, benzoat dan salisilat konsentrasi 12 mg/L masing-masing dibuat dengan melarutkan sebanyak 0,02 mL larutan standar induk 600 mg/L ke dalam 0,98 mL metanol *grade* HPLC. Setelah itu larutan diultrasonifikasi selama 15 menit. Larutan standar induk asam galat, asam benzoat dan asam salisilat konsentrasi 600 mg/L masing-masing dibuat dengan melarutkan sebanyak 1,2 mg masing-masing standar dalam metanol *grade* HPLC pada labu ukur 2 mL hingga tanda batas. Kemudian larutan tersebut diultrasonifikasi selama 15 menit.

### 2.7 Pembuatan larutan standar campuran asam galat, benzoat dan salisilat

Larutan standar campuran asam galat, benzoat dan salisilat dibuat dengan konsentrasi 12, 36, 60, 84 dan 108 mg/L. Pembuatan larutan standar campuran konsentrasi 12 mg/L dilakukan dengan memipet larutan standar induk asam galat, benzoat dan salisilat 600 mg/L masing-masing sebanyak 0,02 mL ke dalam botol vial. Kemudian volumenya dijadikan 1 mL

dengan menambahkan metanol *grade* HPLC sebanyak 0,94 mL dan diultrasonifikasi selama 15 menit.

### 2.8 Penentuan Waktu Retensi dan Serapan Maksimum Asam Galat, Benzoat dan Salisilat

Penentuan waktu retensi asam galat, benzoat dan salisilat dilakukan dengan menginjeksikan masing-masing larutan standar konsentrasi 12 mg/L sebanyak 20 µL pada KCKT (Agilent 1260). Kolom yang digunakan yaitu C18 dengan detektor DAD, komposisi fasa gerak asetonitril : asam asetat 1% (10 : 90), laju alir 0,7 mL/menit, suhu kolom 28°C pada panjang gelombang 272, 280 dan 310 nm.

### 2.9 Validasi Metode KCKT

Pengukuran dilakukan pada larutan standar campuran asam galat, benzoat dan salisilat konsentrasi 12, 36, 60, 84 dan 108 mg/L untuk mendapatkan Kurva kalibrasi. Nilai LoD dan LoQ ditentukan dengan nilai simpangan baku (S) dan kemiringan (B). Presisi ditentukan dengan nilai standar deviasi relatif (SDR) yang menunjukkan ukuran kedekatan antara serangkaian hasil analisis yang diperoleh dari 5 kali pengukuran pada larutan standar campuran asam galat, benzoat dan salisilat konsentrasi 12 mg/L.

Akurasi dilakukan dengan menginjeksikan larutan sampel (ekstrak air), larutan standar (larutan standar campuran 60 mg/L) dan larutan sampel standar adisi (larutan sampel dengan penambahan sejumlah tertentu analit). Pembuatan larutan sampel dilakukan dengan melarutkan 0,5 mL ekstrak sampel dalam 0,5 mL metanol *grade* HPLC dan diultrasonifikasi selama 15 menit. Sedangkan untuk pembuatan larutan sampel standar adisi dilakukan dengan memipet 0,5 mL sampel, kemudian ditambahkan dengan larutan standar induk asam galat, benzoat dan salisilat 600 mg/L masing-masing sebanyak 0,1 mL. Setelah itu larutan ditambahkan dengan metanol *grade* HPLC sebanyak 0,2 mL dan diultrasonifikasi selama 15 menit.

## 3. Hasil dan Diskusi

### 3.1 Ekstrak Daun Sirih Merah

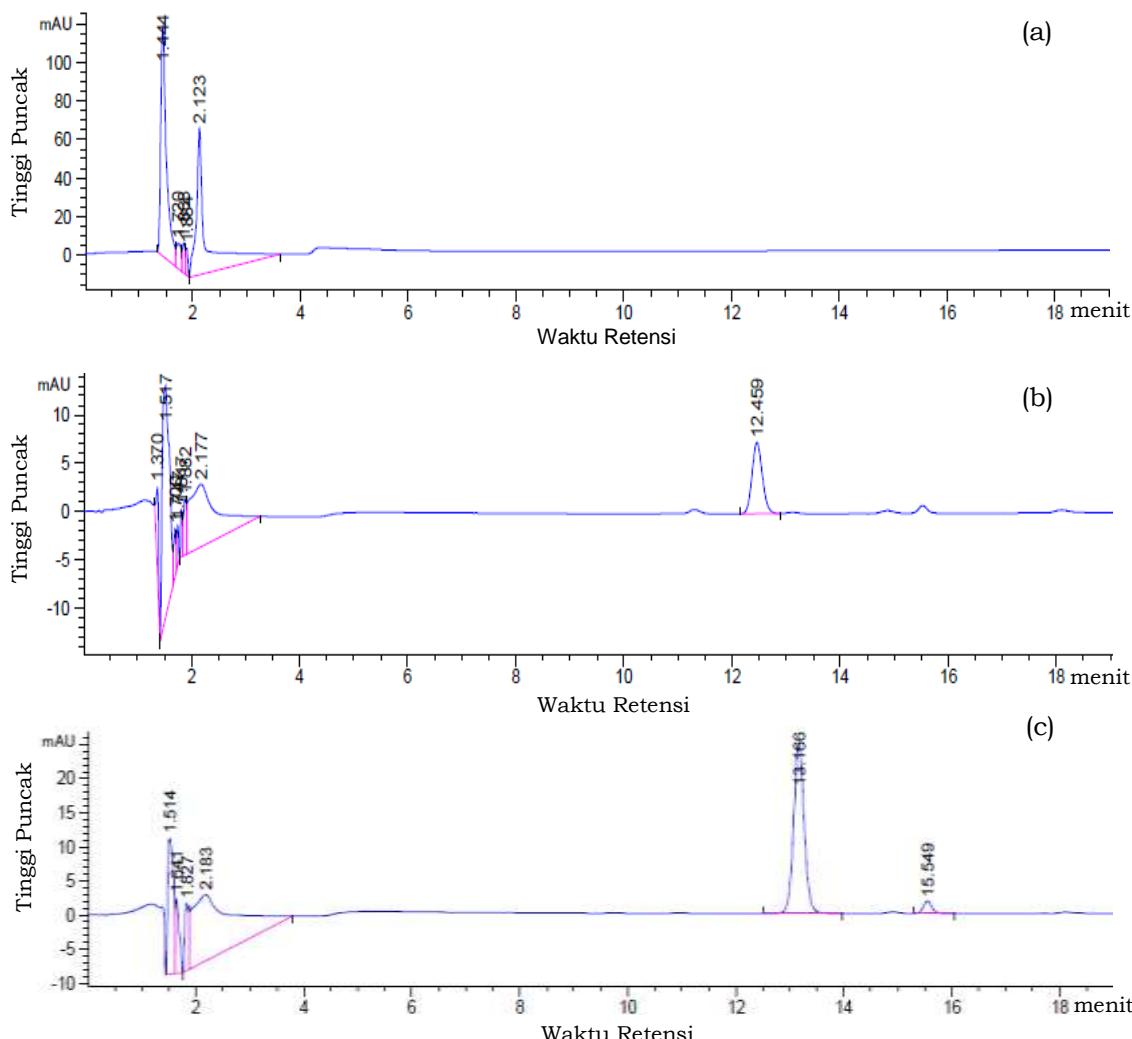
Hasil ekstraksi sampel dengan metode maserasi yaitu ekstrak berwarna coklat. Pelapisan erlenmeyer dengan aluminium foil pada proses ekstraksi bertujuan untuk menghindari ekstrak dari paparan cahaya. Hal ini dikarenakan paparan cahaya dapat menurunkan kadar dari senyawa aktif yang terkandung di dalam ekstrak [14].

Hasil uji kandungan senyawa fenolik pada ekstrak daun sirih merah menunjukkan perubahan warna menjadi kehitaman setelah penambahan beberapa tetes larutan  $\text{FeCl}_3$ . Perubahan warna terjadi karena adanya reaksi yang terjadi antara  $\text{FeCl}_3$  dengan salah satu gugus hidroksil ( $\text{OH}$ ) yang terdapat pada senyawa fenolik. Berdasarkan penelitian yang telah dilaporkan oleh Chichioco-Hernandez dan Paguigan, bahwa suatu sampel positif mengandung senyawa fenolik apabila mengalami perubahan warna menjadi biru, hijau, ungu atau hitam setelah penambahan  $\text{FeCl}_3$  [15]. Sehingga dapat diketahui bahwa ekstrak daun sirih merah mengandung senyawa fenolik. Hal ini

sesuai dengan yang dilaporkan oleh Kusuma, dkk., bahwa daun sirih merah positif mengandung senyawa fenolik [16]. Berdasarkan hal tersebut, maka dapat diketahui bahwa di dalam ekstrak daun sirih merah mengandung senyawa fenolik.

### 3.2 Waktu Retensi dan Serapan Maksimum Asam Galat, Benzoat dan Salisilat

Kromatogram dari hasil pengukuran masing-masing standar dapat dilihat pada Gambar 1. Berdasarkan kromatogram dapat diketahui bahwa waktu retensi dari asam galat yaitu 1,444 menit, asam benzoat 12,459 menit dan asam salisilat 13,166 menit.



**Gambar 1.** Kromatogram larutan standar asam galat (a) asam benzoat (b) dan asam salisilat (c) konsentrasi 12 mg/L pada kolom C18, detektor DAD dengan komposisi fase gerak asetonitril dan asam asetat 1% (10:90), laju alir 0,7 mL/menit, volume injeksi 20  $\mu\text{L}$  dan suhu kolom 28°C

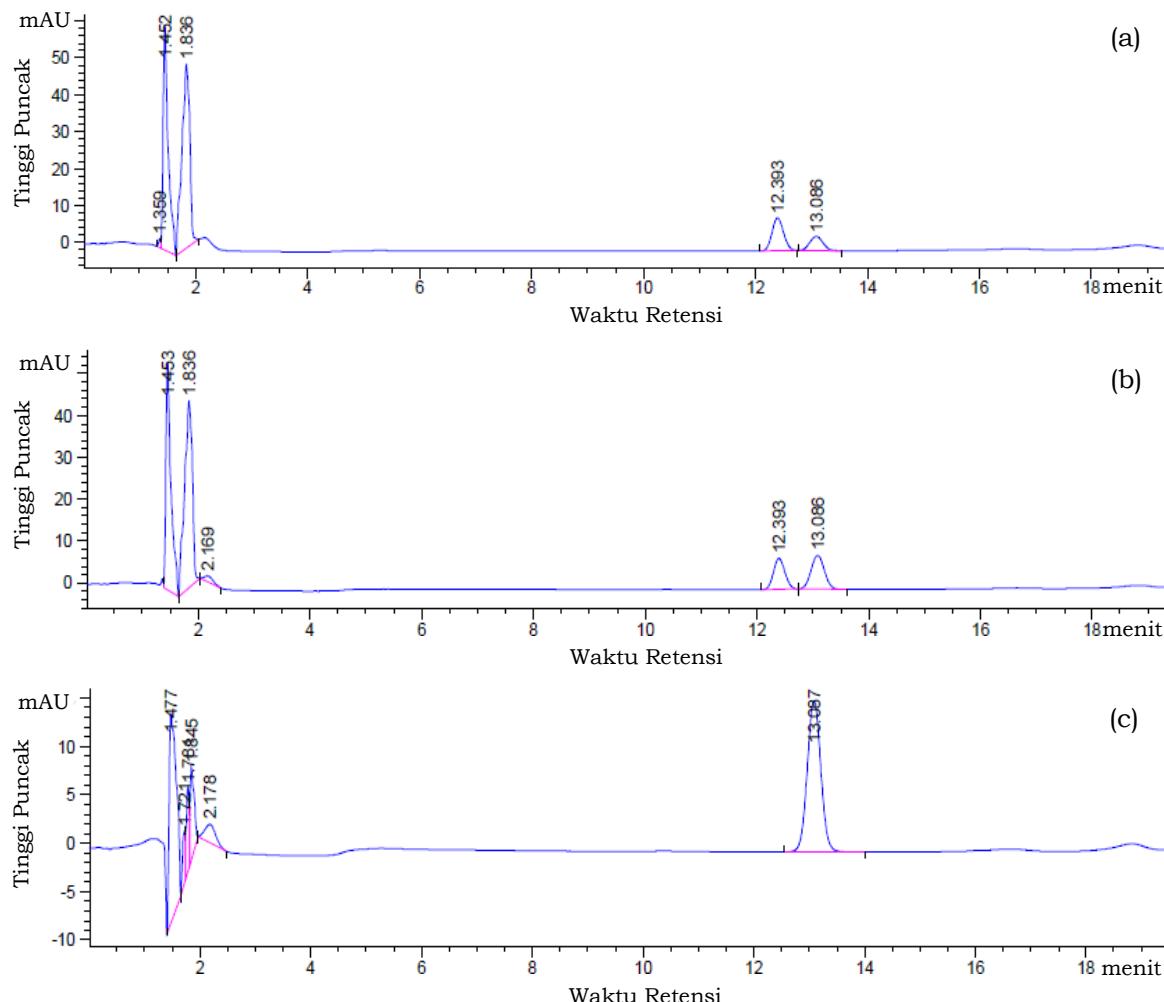
Kromatogram hasil pengukuran dari larutan standar campuran asam galat, benzoat dan salisilat konsentrasi 12 mg/L pada panjang gelombang 272, 280 dan 310 nm dapat dilihat pada Gambar 2. Berdasarkan kromatogram dapat dilihat bahwa pemisahan yang baik dari masing-

masing standar yaitu pada panjang gelombang 280 nm. Hal ini dikarenakan pada panjang gelombang 310 nm puncak dari asam benzoat tidak terdeteksi dan pada panjang gelombang 272 nm puncak dari asam salisilat yang dihasilkan tidak setajam pada panjang gelombang 280 nm.

Hal ini sesuai dengan nilai resolusi ( $R_s$ ) yang diperoleh, di mana nilai resolusi masing-masing puncak pada panjang gelombang 280 nm lebih besar dibandingkan dengan panjang gelombang 272 nm.

Nilai resolusi dari pemisahan puncak asam galat dan asam benzoat pada panjang gelombang 272 dan 280 nm yaitu 69,22 dan 69,68. Sedangkan nilai resolusi antara puncak asam benzoat dan asam salisilat pada panjang gelombang 272 dan 280 nm

yaitu 2,85 dan 2,86. Nilai  $R_s > 1,5$  menunjukkan bahwa suatu puncak terpisah secara sempurna dengan puncak disebelahnya [17]. Berdasarkan hal tersebut dapat diketahui bahwa serapan maksimum dari asam galat, benzoat dan salisilat yaitu pada panjang gelombang 280 nm. Hal ini sesuai dengan yang dinyatakan oleh Goleniowski, dkk., di mana panjang gelombang 280 nm merupakan alternatif terbaik untuk analisis kelompok senyawa fenolik [18].



**Gambar 2.** Kromatogram larutan standar campuran asam galat, benzoat dan salisilat konsentrasi 12 mg/L pada panjang gelombang 272 (a) 280 (b) dan 310 nm (c) dengan detektor DAD, kolom C18, komposisi fase gerak asetonitril : asam asetat 1% (10 : 90), laju alir 0,7 mL/menit, volume injeksi 20  $\mu$ L dan suhu kolom 28°C

Senyawa yang terelusi lebih awal yaitu asam galat, kemudian asam benzoat dan asam salisilat. Hal ini sesuai dengan yang dilaporkan oleh Mradu, dkk pada analisis 12 standar senyawa fenolik, di mana asam galat terelusi lebih awal, kemudian diikuti oleh asam benzoat dan asam salisilat [9]. Berdasarkan hal tersebut dapat diketahui bahwa asam galat bersifat lebih polar dibandingkan dengan asam benzoat dan

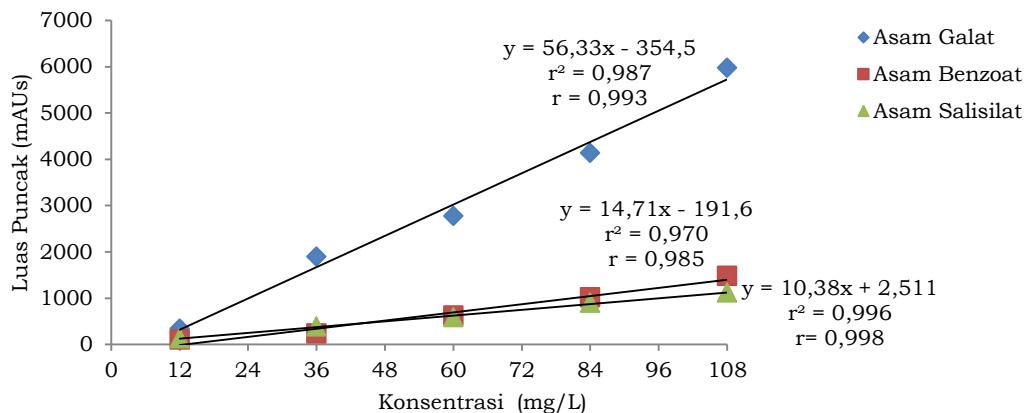
asam salisilat. Hal ini karena interaksi antara asam galat terhadap fase diam yang bersifat non polar kecil sehingga asam galat terelusi lebih awal dibandingkan dengan asam benzoat dan asam salisilat.

### 3.3 Validasi Metode KCKT

Hasil pengukuran larutan standar campuran asam galat, benzoat dan salisilat pada konsentrasi 12, 36, 60, 84 dan 108 mg/L dapat dilihat pada kurva kalibrasi

standar asam galat, benzoat dan salisilat pada Gambar 3. Persamaan regresi untuk asam galat yaitu  $y = 56,33x - 354,5$ , asam benzoat yaitu  $y = 14,71x - 191,6$  dan asam salisilat yaitu  $y = 10,38x + 2,511$ . Nilai koefisien determinasi ( $r^2$ ) untuk asam galat,

benzoat dan salisilat masing-masing yaitu 0,987, 0,970 dan 0,996. Sedangkan nilai koefisien korelasi ( $r$ ) yang diperoleh masing-masing yaitu 0,993, 0,985 dan 0,998 untuk asam galat, benzoat dan salisilat.



**Gambar 3.** Kurva kalibrasi larutan standar asam galat, benzoat dan salisilat

Nilai koefisien determinasi yang diperoleh yaitu mendekati nilai 1, sehingga dapat diketahui bahwa variabel bebas (konsentrasi) sangat berpengaruh terhadap variabel terikat (luas puncak). Nilai koefisien korelasi yang diperoleh juga mendekati nilai 1. Hal ini menunjukkan adanya hubungan linear antara konsentrasi dengan luas puncak, di mana nilai  $r = +1$  atau  $-1$  menunjukkan adanya hubungan linear yang ideal [3]. Skendi, dkk melaporkan bahwa adanya korelasi yang tinggi dari pengukuran 6 variasi

konsentrasi yang ditunjukkan dengan nilai koefisien korelasi  $\geq 0,998$  pada analisis 24 senyawa fenolik [11]. Seal juga melaporkan bahwa nilai koefisien korelasi yang diperoleh dari pengukuran 6 variasi konsentrasi yaitu  $\geq 0,995$  yang menunjukkan bahwa adanya hubungan linear antara konsentrasi dengan luas puncak [13]. Berdasarkan hal tersebut, maka diketahui bahwa asam salisilat memiliki hubungan linear atau korelasi yang tinggi antara konsentrasi dengan luas puncak yang terukur.

**Tabel 1.** Hasil validasi metode KCKT untuk analisis asam galat, benzoat dan salisilat

Senyawa	Koefisien Korelasi ( $r$ )	SDR Berdasarkan Waktu Retensi (%)	SDR Berdasarkan Luas Puncak (%)	LoD (mg/L)	LoQ (mg/L)	% Recovery (%)
Asam Galat	0,993	2,13	3,89	0,37	1,23	100,6
Asam Benzoat	0,985	4,28	0,67	0,16	0,52	-
Asam Salisilat	0,998	3,28	1,08	0,45	1,50	-

Nilai SDR yang dihasilkan dari pengukuran larutan standar campuran asam galat, benzoat dan salisilat konsentrasi 12 mg/L dengan 5 kali pengulangan yaitu  $\leq 4,28\%$ . Nilai yang diperoleh memenuhi kriteria dari validasi metode yaitu  $\leq 5\%$ . Anggraini melaporkan bahwa nilai SDR yang diperoleh pada analisis asam sitrat, format dan oksalat secara serentak berdasarkan waktu retensi dan luas puncak yaitu  $\leq 4,359\%$  [17]. Seal juga melaporkan bahwa nilai SDR yang diperoleh pada analisis asam askorbat, fenolik dan flavonoid secara serentak berdasarkan waktu retensi dan luas

puncak yaitu  $\leq 0,55\%$  [13]. Berdasarkan hal tersebut, maka presisi atau ketelitian dari metode KCKT yang digunakan cukup baik.

Berdasarkan nilai LoD dan LoQ yang diperoleh, diketahui bahwa konsentrasi terendah yang dapat terukur dengan metode ini yaitu 0,37 mg/L untuk asam galat, 0,16 mg/L untuk asam benzoat dan 0,45 mg/L untuk asam salisilat. Sedangkan konsentrasi terendah yang dapat terukur dengan presisi dan akurasi yang dapat diterima yaitu 1,23 mg/L untuk asam galat, 0,52 mg/L untuk asam benzoat dan 1,50 mg/L untuk asam salisilat. Asam

benzoat memiliki nilai LoD dan LoQ terkecil, sehingga dapat diketahui bahwa metode ini sangat sensitif terhadap asam benzoat. Skendi, dkk melaporkan bahwa pada analisis 24 senyawa fenolik secara serentak diperoleh nilai LoD dan LoQ yang kecil yaitu 0,16 dan 0,48 mg/L [11]. Berdasarkan hal tersebut, maka metode yang digunakan merupakan metode yang baik karena mampu mendeteksi dan mengkuantitasi pada konsentrasi kecil.

Per센 perolehan kembali standar asam galat dalam ekstrak air daun sirih merah yaitu 100,6%. Nilai persen perolehan kembali yang diperoleh memenuhi persyaratan dari validasi metode, yaitu berkisar antara 80-110% [3]. Berdasarkan hasil dari validasi metode, diketahui bahwa metode ini baik digunakan untuk analisis asam galat, benzoat, dan salisilat secara serentak dalam sampel daun sirih merah.

#### 4. Kesimpulan

Berdasarkan penelitian yang telah dilakukan, diketahui bahwa metode KCKT dengan sistem elusi isokratik pada kolom C18, detektor DAD, panjang gelombang 280 nm dengan komposisi fase gerak asetonitril : asam asetat 1% (10 : 90), laju alir 0,7 mL/menit, volume injeksi 20  $\mu$ L, dan suhu kolom 28°C telah divalidasi. Metode ini memiliki presisi dan akurasi yang baik serta batas deteksi (LoD) dan batas kuantitasi (LoQ) yang kecil.

#### 5. Ucapan Terima Kasih

Terima kasih penulis ucapkan kepada semua pihak yang telah membantu dalam kelancaran penelitian ini yang tidak dapat penulis sebutkan satu persatu.

#### Referensi

1. Rahmayuni, E., Harmita., Suryadi, H. Development and Validation Method for Simultaneous Analysis of Retinoic Acid, Hydroquinone and Corticosteroid in Cream Formula by High-Performance Liquid Chromatography. *Journal of Applied Pharmaceutical Science*, 2018, 087-092.
2. Astuti, E. J., Ilham, R. F. N., Rahman, J. Validation Method for Determining Sodium Benzoate in Fruit Juice Drinks in Malang. *Jurnal Farmasi dan Ilmu Kesehatan*, 2019, 19-23.
3. Harmita. Petunjuk Pelaksanaan Validasi Metode dan Cara Perhitungannya. *Majalah Ilmu Kefarmasian* 2004, 117-135.
4. Susanti, M., Dachriyanus. Kromatografi Cair Kinerja Tinggi. *LPTIK UNAND*, 2015, 1-92.
5. Anggraini, D. Penentuan Asam Sitrat, Oksalat dan Format secara Simultan pada Tanah dan Kompos dengan Metode Kromatografi Cair Kinerja Tinggi (KCKT). *Skripsi*, UNAND, 2015, 1-52.
6. Hariana, a. 262 Tumbuhan Obat dan Khasiatnya. *Penebar Swadaya*. Jakarta, 2013, 351-352.
7. Ulung, G., Pusat Studi Biofarmaka LPPM IPB. Sehat Alami dengan Herbal: 250 Tanaman Berkhasiat Obat, *Gramedia Pustaka Utama*. Jakarta, 2014, 369-374.
8. Luardini, M. A., Asi, N., Garner, M. Ecolinguistics of Ethno-Medicinal Plants of The Dayak Ngaju Community. *Language Sciences*, 2019, 77-84.
9. Mradu, G., Saumyakanti, S., Sohini, M., Arup, M. HPLC Profiles of Standard Phenolic Compounds Present in Medicinal Plants. *International Journal of Pharmacognosy and Phytochemical Research*, 2012, 162-167.
10. Gini, T. G., Jothi, G. J. Column Chromatography and HPLC Analysis of Phenolic Compounds in the Fractions of *Salvinia molesta* mitchell. *Egyptian Journal of Basic and Applied Sciences*, 2018, 1-7.
11. Skendi, A., Irakli, M. Analysis of Phenolic Compounds in Greek Plants of Lamiaceae Family by HPLC. *Journal of Applied Research on Medicinal and Aromatic Plants*, 2017, 1-8.
12. Mesquita, E., Monteiro, M. Simultaneous HPLC Determination of Flavonoids and Phenolic Acids Profile in Pêra-Rio Orange Juice. *Food Research International*, 2017, 1-28.
13. Seal, T. Quantitative HPLC Analysis of Phenolic Acids, Flavonoids and Ascorbic Acid in Four Different Solvent Extracts of Two Wild Edible Leaves, *Sonchus Arvensis* and *Oenanthe Linearis* of North-Eastern Region. *Journal of Applied Pharmaceutical Science*, 2016, 6, 157-166.
14. Amperawati, S., Hastuti, P., Pranoto, Y., Santoso, U. Efektifitas Frekuensi Ekstraksi Serta Pengaruh Suhu dan Cahaya Terhadap Antosianin dan Daya Antioksidan Ekstrak Kelopak Rosela (*Hibiscus sabdariffa* L.). *Jurnal Aplikasi Teknologi Pangan*, 2019, 38-45.
15. Chichioco-Hernandez, C. L., Paguigan N. D. Phytochemical Profile of Selected

- Philippine Plants used to Treat Asthma. *PHCOG J*, 2010, 2, 197-202.
16. Kusuma, S. A. F., Tjitraresmi, A., Susanti, G. Antibacterial Effect of Red Piper Betle Leaf Ethanolic Extracts to Lactobacillus Acidophilus and Lactobacillus Bifidus Growth Inhibition. *Asian Journal of Pharmaceutical and Clinical research*, 2017, 65-68.
17. Anggraini, D. Penentuan Asam Sitrat, Oksalat dan Format secara Simultan pada Tanah dan Kompos dengan Metode Kromatografi Cair Kinerja Tinggi (KCKT). *Skripsi*, UNAND, 2015, 1-52
18. Goleniowski, M., Cusido, R. M., Bonfill, M., Palazon, J. Phenolic Acids. *Springer*, 2013, 1952-1973.