Dalton : J. Pend. Kim. dan Ilmu. Kim. (e-ISSN 2621-3060) Vol. 06, No. 01, 2023
DOI: http://dx.doi.org/10.31602/dl.v6i1.10454

Dalton : Jurnal Pendidikan Kimia dan Ilmu Kimia

ORIGINAL ARTICLE

PENENTUAN KADAR FENOL TOTAL FRAKSI n-HEKSAN, KLOROFORM DAN METANOL HERBA PEGAGAN (*Centella asiatica* (L.) Urban)

Zahra Sugiani[1*], Purgiyanti[1], Kusnadi[1]

Received: 09 Maret 2023 | Accepted: 22 April 2023 | Published online: 30 April 2023
UPT Publikasi dan Pengelolaan Jurnal Uniska-Daltonjurnal 2023

Abstrak Pegagan memiliki kandungan kimia diantaranya adalah senyawa golongan triterpen ester glikosida yaitu asiatikosida dan madekosida, saponin alkaloid, tanin dan senyawa golongan fenolik. Tujuan dari penelitian ini untuk mengetahui pengaruh perbedaan fraksinasi terhadap kadar total fenol herba pegagan. Metode yang digunakan untuk menarik senyawa fenol yang ada pada herba pegagan dengan maserasi dilanjutkan dengan fraksinasi dan menentukan kadar fenol total menggunaan spektrofometri UV-Vis yang diukur pada panjang gelombang 740nm. Hasil penelitian kadar fenol total yang terkandung paling tinggi yaitu pada fraksi kloroform yaitu sebesar 6,554 mgGAE/g diikuti fraksi metanol sebesar 4,979 mgGAE/g dan fraksi n-heksan sebesar 0,664 mgGAE/g. Berdasarkan penelitian dapat disimpulkan bahwa fraksi kloroform merupakan fraksi yang memiliki kadar fenol paling besar diantara fraksi yang lain.

Kata Kunci: Herba pegagan, Fraksinasi, Total fenol, Spektrofotometri UV-Vis

This is an open access article under the CC-BY 4.0 License. Copyright © 2023 by authors.

✉ Zahra Sugiani
zahrrasugiani02@gmail.com

[1]DIII Farmasi, Politeknik Harapan Bersama, Tegal, Indonesia

Abstract *Centella asiatica has chemical constituents, including triterpene ester glycoside compounds, namely asiaticoside and madecoside, saponins, alkaloids, tannins, and phenolic group compounds. The purpose of this study was to determine the effect of differences in fractionation on the total phenolic content of Centella asiatica. The method used to extract the phenolic compounds present in Centella asiatica herb was by maceration followed by fractionation and determining the total phenol content using UV-Vis spectrometry measured at a wavelength of 740nm. The results of the study showed that the total phenolic content was highest in the chloroform fraction, which was 6.554% gallic acid equivalent/100 grams, followed by the methanol fraction and the n-hexane fraction. Based on this research, it can be concluded that the chloroform fraction is good and has the most amount of phenolic compounds.*

Keywords: *Centella asiatica, Fractionation, Total Phenol, Spectrophotometry UV-Vis*

PENDAHULUAN

Indonesia merupakan negara beriklim tropis yang diyakini memiliki keanekaragaman hayati yang tak terbatas jumlah dan jenisnya. Indonesia merupakan salah satu negara yang memiliki keanekaragaman obat di dunia dan memiliki berbagai jenis tanaman yang berkhasiat sebagai obat tradisonal. Adanya gaya hidup *back to nature* yang menjadi tren saat ini membuat masyarakat terinspirasi kembali untuk memanfaatkan bahan alam, termasuk tanaman

yang bisa digunakan sebagai obat herbal. Salah satu tanaman yang bisa digunakan sebagai pengobatan yaitu herba pegagan (Purgiyanti et al., 2019).

Herba merupakan seluruh bagian tanaman yang dapat digunakan sebagai obat, meliputi daun, batang, bunga, dan akar (Astia, 2018). Pegagan memiliki berbagai khasiat diantaranya yaitu untuk meningkatkan fungsi kognitif, selain itu pegagan juga berkhasiat untuk mengobati berbagai macam penyakit seperti batu ginjal, peluruh air seni, memar, infeksi usus, disentri, wasir, anti radang, pegal, rematik. Pegagan memiliki kandungan kimia diantaranya adalah senyawa golongan triterpen ester glikosida yaitu asiatikosida dan madekosida, senyawa golongan triterpen dan senyawa golongan fenolik (Wijoyo, 2012).

Senyawa fenol yang terdapat pada herba pegagan dapat ditarik menggunakan metode ekstraksi yang selanjutnya dilakukan fraksinasi. Fraksinasi merupakan ekstraksi dengan beberapa pelarut yang tingkat kepolarannya berbeda-beda (Septiana & Asnani, 2013). Pada penelitian kali ini dilakukan penetapan kadar fenol total dengan fraksinasi dari beberapa pelarut yaitu non polar dengan pelarut n-heksan, semi polar dengan pelarut kloroform dan polar dengan pelarut metanol. Pelarut tersebut dipilih berdasarkan tingkat kepolaritasannya yang dapat ditunjukkan lebih pasti dengan besarnya nilai konstanta yang dimiliki oleh pelarut, n-heksan sebagai pelarut non polar memiliki nilai indeks polaritas 0,1, pelarut kloroform sebagai pelarut semi polar memiliki nilai indeks polaritas sebesar 4,1 (Sundari et al., 2021) dan metanol sebagai pelarut polar memiliki nilai indeks polaritas sebesar 5,1 (Mangindaan & Lesnussa, 2013) semakin besar nilai konstanta maka pelarut semakin polar (Alfianingsih, 2016).

METODE PENELITIAN

Tempat dan Waktu Penelitian

Penelitian ini dilakukan di laboratorium farmasi Politeknik Harapan Bersama Kota Tegal pada bulan Agustus-Oktober 2022

Alat dan Bahan

Alat dan bahan yang digunakan dalam penelitian ini meliputi neraca analitik (*Ohaus*), batang pengaduk, beaker glass 100 ml (*Iwaki pyrex*), tabung reaksi (*Pyrex*), gelas ukur 100 ml (*Pyrex*), chamber, cawan porselin 100 ml (*Pyrex*), spatel logam, corong pisah (*Pyrex*), labu ukur (*Pyrex*), klem, statif, penjepit kayu, bunsen, kaki tiga, pipet volume (*Pyrex*), mikro pipet (*Dragonlab*), corong kaca, kuvet, water bath (*Thermostat water bath*), spektrofotometri uv-vis (*Thermo*).

Bahan yang digunakan pada penelitian ini meliputi herba pegagan (*Centella asiatica*), etanol 96% (*Bratachem*), Aquadest, n-heksan (*Bratachem*), kloroform (*Bratachem*), $FeCl_3$ (*Bratachem*), H_2SO_3 (*Bratachem*), Asam asetat (*E.Merck*), metanol (*E.Merck*), Asam galat (*Brataco*), Reagen *Folin-ciocalteau* (*E.Merck*).

Pembuatan Serbuk Simplisia

Herba Pegagan dikumpulkan dan dibersihkan dari kotoran, kemudian dicuci dengan air mengalir hingga bersih untuk selanjutnya dijemur dibawah sinar matahari langsung. Setelah simplisia kering kemudian dihaluskan dan diayak dengan ukuran mess 60 hingga didapat serbuk simplisia yang halus. Serbuk simplisia yang diperoleh disimpan dalam wadah bersih, kering dan tertutup rapat.

Pembuatan Ekstrak Herba Pegagan

Penelitian ini menggunakan pegagan sebanyak 300g kemudian diekstraksi dengan metode maserasi. Menyiapkan 300g sampel pegagan, tambahkan pelarut etanol 96% sebanyak 900ml, aduk selama 5 menit. Setelah 3 hari maserasi disaring dengan kain flanel, kemudian ekstrak diuapkan hingga diperoleh ekstrak kental. Setelah itu hitung rendemen ekstrak.

Identifikasi Senyawa Fenol

Menyiapkan ekstrak herba pegagan sebanyak 2ml masukan ke dalam tabung reaksi, kemudian ditambahkan $FeCl_3$ sebanyak 5 tetes akan menghasilkan warna biru atau hijau kehitaman.

Fraksinasi

Ekstrak herba pegagan ditimbang 20g. larutkan dengan pelarut air 40ml, kemudian difraksinasi sebanyak 3 kali dengan n-heksan menggunakan corong pisah, fraksi n-heksan yang didapat diuapkan. Residu yang didapat dari fraksi n-heksan dilanjutkan fraksinasi 3 kali dengan pelarut kloroform masing-masing 40ml, fraksi kloroform yang didapat diuapkan. Residu yang didapat dari fraksi kloroform dilanjutkan fraksinasi 3 kali dengan pelarut methanol masing-masing 40ml, hasil yang didapat adalah fraksi methanol, kemudian residu diuapkan sampai pekat.

Penentuan Panjang Gelombang Maksimum

Memipet larutan induk asam galat 1000ppm sebanyak 1ml, kemudian masukan kedalam tabung reaksi tambahkan sebanyak 3,5 ml aquadest. Selanjutnya tambahkan 250µl Follin-Ciocalteau kocok hingga homogen dan inkubasi larutan selam 8 menit. Kemudian tambahkan Na_2CO_3 20% sebanyak 750µl kocok hingga homogen, kemudian tambahkan volume akhir dengan aquadest hingga 5 ml dan larutan diinkubasi selama 2 jam pada suhu ruang. Lakuka pembacaan Panjang gelombang menggunakan spektrofotometri UV-Vis pada Panjang gelombang 730-790nm.

Pembuatan Kurva Kalibrasi Asam Galat

Ditimbang sebanyak 10mg asam galat kemudian dilarutkan dalam 10ml methanol (1000µg/mL), selanjutnya larutan induk asam galat (1000ppm) dipipet sebanyak 20,50,100 dan 200µl kedalam tabung reaksi. Pada masing-masing tabung ditambahkan 3,5ml aquadest dan 250µl Na2CO3 20% kocok sampai homogen , tambahkan volume akhir menjadi 5ml dengan aquadest. Larutan diinkubasi selama 2 jam pada suhu kamar. Serapan diukur pada panjang gelombang 740nm, dibuat kurva kalibrasi hubungan antara konsentrasi asam galam galat (mg/L) dengan absorban.

Penentuan Kandungan Total Fenol

Ditimbang msing-masing 50 mg sampel ekstrak kemudian dilarutkan dalam 50 ml dengan methanol (2000µg/mL). dipipet sebanyak 0,5 ml larutan ekstrak sampel dan ditambakan 3,5ml aquadest dan 0,25 ml Folin-Ciocalteau dan dikocok. Didiamkan selam 8 menit, kemudian ditambahkan 0,75 ml Na2CO3 20% kocok sampai homogen. Larutan didiamkan selam 2 jam pada suhu kamar. Serapan diukur pada panjang gelombang 740nm. Pengukuran dilakukan 3 kali pengulangan sehingga kadar fenol yang diperoleh hasilnya didapat sebagai mg ekuivalen asam galat/100 gram sampel.

HASIL DAN PEMBAHASAN

Ektraksi herba pegagan dilakukan dengan metode maserasi dengan menggunakan pelarut etanol 96% dengan perbandingan sampel dan pelarut 1:3 (b/v). pemilihan etanol 96% sebagai pelarut karena selektif tidak beracun, absorbansinya baik dan etanol dapat bercampur dengan air pada segala perbandingan. Proses maserasi dilakukan selama 3 hari dengan dilakukan pengadukan setiap 24 jam sekali selama ±5 menit agar simplisia tersari dengan sempurna. Hasil ekstraksi yang didapat kemudian disaring untuk memisahkan antara maserat dengan residu, kemudian maserat hasil ekstraksi diuapkan diatas waterbath dengan suhu <50°C yang bertujuan untuk menghilangkan pelarut untuk mendapatkan ekstak kental. Berdasarkan hasil rendemen ekstrak herba pegagan diperoleh sebesar 23,51%. Setelah didapat ekstrak kental selanjutnya dilakukan uji bebas etanol.

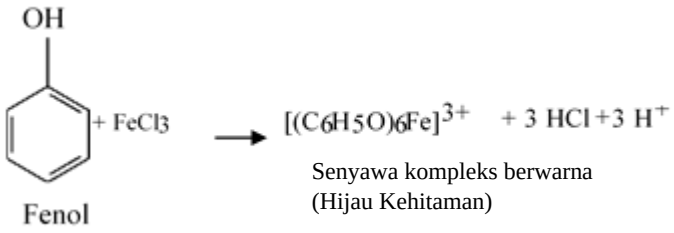
Uji bebas pelarut etanol dilakukan untuk memastikan bahwa ekstrak tidak mengandung etanol. Uji bebas pelarut etanol dilakukan dengan cara mengambil ekstrak sebanyak 2 tetes kemudian ditambahkan dengan H2SO4 pekat dan asam asetat, kemudian dipanaskan diatas api bunsen. Ekstrak dikatakan bebas pelarut etanol jika tidak terdapat bau khas etanol atau ester pada ekstrak.

Tabel 1. Hasil Uji Bebas Etanol

Perlakuan	Hasil	Literatur
2 tetes ekstrak + H_2SO_4 pekat + asam asetat	+ (tidak berbau ester)	Haliza, 2020

Berdasarkan tabel 1, menunjukan bahwa ekstrak herba pegagan bebas etanol ditandai dengan tidak adanya bau khas etanol atau ester saat dicium.

Ekstrak herba pegagan dilakukan uji fenolik, bertujuan untuk memastikan bahwa herba pegagan mengandung senyawa fenol. Hasil yang di dapatkan yaitu positif (+) bahwa herba pegagan mengandung senyawa fenol yang ditandai dengan timbulnya warna biru atau hijau kehitaman setelah penambahan $FeCl_3$ sebanyak 5 tetes karena $FeCl_3$ bereaksi dengan ion hidroksida, sehingga terbentuk endapan berwarna biru atau hijau kehitaman (Fatyanti, 2017).



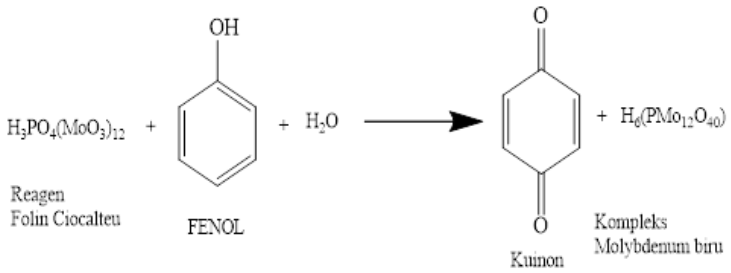
Gambar 1. Reaksi Fenol dengan $FeCl_3$

Ekstrak selanjutnya difraksinasi menggunakan beberapa pelarut yang memiliki tingkat polaritas yang berbeda-beda. Fraksinasi dilakukan bertingkat berdasarkan kepolarannya yaitu dari non polar, semi polar dan polar. Senyawa yang memiliki sifat non polar akan larut pada pelarut non polar, senyawa yang memiliki sifat semi polar akan larut pada pelarut semi polar, dan senyawa polar akan larut pada pelarut polar (Alfianingsih, 2016). Pelarut yang digunakan pada penelitian ini yaitu n-heksan bersifat non polar, kloroform bersifat semi polar, dan metanol bersifat polar.

Pada proses maserasi langkah pertama yang dilakukan yaitu menimbang ekstrak pegagan 20 gram larutkan dengan pelarut air sebanyak 40ml, kemudian difraksinasi dengan 40ml n-Heksan digojog sebanyak 3 kali, maka akan terbentuk dua fase yang terpisah yaitu fase non polar (n-Heksan) yang berada di bagian atas dan fase polar (ekstrak) yang berada dibagian bawah karena memiliki berat jenis yang lebih besar dari berat jenis n-Heksan. Selanjutnya residu yang tertinggal difraksinasi dengan pelarut kloroform, maka akan terbentuk dua fase yang memisah yaitu fase polar (residu n-Heksan) yang berada bagian atas dan fase semi polar (kloroform) yang berada dibagian bawah karena kloroform memiliki berat jenis yang lebih berat dari pada residu n-heksan. Residu yang tertinggal dari fraksinasi sebelumnya difraksinasi dengan pelarut metanol sebanyak 40ml kemudian digojog sebanyak 3 kali, selanjutnya hasil fraksi diuapkan diatas waterbath. Berdasarkan hasil rendemen diatas menunjukkan bahwa rendemen fraksi metanol memiliki nilai yang lebih besar dibandingkan dengan fraksi n-Heksan dan kloroform, hal ini dikarekan fraksi n-Heksan dan fraksi kloroform lebih mudah menguap dibandingkan dengan fraksi air pada proses penguapan dengan *waterbath.*

Penetuan kadar fenol total dilakukan menngunakan metode spektrofometri UV-Vis dengan menggunakan prinsip *Folin-Ciocalteau*, diukur pada Panjang gelombang 750 nm dengan nilai absorbansi sebesar 0,589. Larutan blanko yang digunakan yaitu metanol. Penggunaan metanol dikarenakan pada saat proses pelarutan asam galat telah menggunakan pelarut metanol. Prinsip pengukuran kandungan fenol dengan reagen *Folin-ciocalteau* adalah dengan terbentuknya senyawa kompleks berwarna biru. Penambahan Na_2CO_3 bertujuan untuk membentuk suasana basa agar terjadi reaksi

reduksi *Folin-Ciocalteau* oleh gugus hidroksil dari fenolik (Alfian & Susanti, 2012). Semakin besar konsentrasi senyawa fenolik dalam sampel maka semakin pekat warna biru yang dihasilkan (Wachidah, 2013).

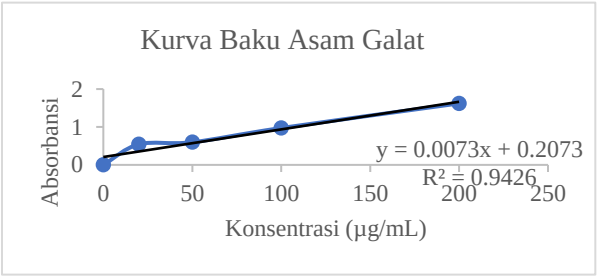


Gambar 2. Reaksi Senyawa fenol dengan Reagen *Folin-Ciocalteau*

Standar fenolat yang digunakan adalah asam galat, karena asam galat sangat efektif untuk membentuk senyawa kompleks dengan reagen *Folin-Ciocalteau*. Maka diperoleh kurva baku asam galat (tabel 2), Dari data konsentasi dan absorbansi kurva baku asam galat maka didapati grafik (gambar 3).

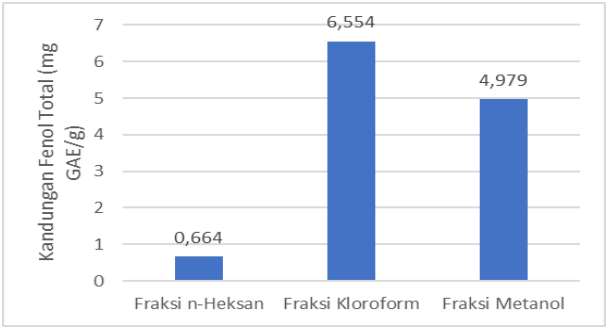
Tabel 2. Data Kurva Baku Asam Galat

NO	Konsentrasi (ppm)	Absorbansi rata-rata
1	0	0
2	20	0,542
3	50	0,597
4	100	0,972
5	200	1,621



Gambar 3. Grafik Kurva Baku Asam Galat

Dari hasil pada gambar 3, telah dilakukan pengamatan absorbansi kurva baku asam galat yang dilakukan pada Panjang gelombang 750nm didapat persamaan regresi asam galat adalah y = 0,0073x + 0,2073 dengan harga kofisiensi korelasi (r) adalah 0,9426. Kandungan fenol total yang terdapat dalam tumbuhan dapat ditentukan dengan spektrofotometri dengan reagen Folin-Ciocalteau dan dinyatakan dalam GAE (*gallic acid equivalent*) yaitu jumlah kesetaran milligram asam galat dalam 100 gram sampel.



Gambar 4. Kandungan Fenol total Masing-masing Fraksi

Berdasrkan grafik pada gambar 4 diatas hasil penentuan kadar total fenol pada fraksi n-heksan, fraksi kloroform dan fraksi metanol menujukan bahwa kandungan senyawa fenol yang terdapat pada fraksi n-heksan sebanyak 0,664 mg GAE/g, fraksi kloroform sebanyak 6,554 mg GAE/g, dan fraksi metanol sebanyak 4,979 mg GAE/g. Kadar fenol total yang paling tinggi yaitu ditujukkan pada fraksi kloroform sebanyak 6,554 mg GAE/g, artinya dalam setiap gram ekstrak setara dengan 6,554 mg asam galat. Kadar fenol total yang paling banyak tidak selalu terdapat pada pelarut polar, namun tergantung dari struktur senyawa fenol yang dijumpai (Mulyanita et al., 2019). Pada pelarut semi polar (kloroform) mampu mengekstrak senyawa fenol, terpenoid, alkaloid, aglikon dan glikosida. Jadi, dapat dikatakan bahwa fraksi kloroform mampu mengekstraksi senyawa fenol pada herba pegagan lebih efektif karena memiliki kandungan total fenol yang lebih besar dibandingkan dengan fraksi n-heksan dan fraksi metanol.

KESIMPULAN

Berdasarkan penelitian yang telah dilakukan terhadap penentuan kadar fenol total fraksi n-hekasan, kloroform dan metanol menujukan semua fraksi mengandung senyawa fenol. Kadar total fenol yang terkandung pada herba pegagan berdasarkan perbedaan fraksinasi secara berurutan dari yang tertinngi yaitu fraksi kloroform sebesar 6,554 mg GAE/g, fraksi methanol sebesar 4,979 mg GAE/g, dan fraksi n-heksan sebesar 0,664 mg GAE/g.

DAFTAR PUSTAKA

Alfian, R., & Susanti, H. (2012). Penetapan Kadar Fenolik Total Ekstrak Metanol Kelopak Bunga Rosella Merah (*hibiscus sabdariffa linn*) Dengan Variasi Tempat Tumbuh Secara Spektrofotometri. *Pharmaciana*, *2*(1).

Alfianingsih, S. (2016). Aktivitas Antibakteri Fraksi n-heksan, Kloroform dan Etanol Dari Ekstrak Etanol Daun Rambutan (*nephelium lappaceum*, l.) Terhadap Bakteri *Escherichia coli. Revista CENIC. Ciencias Biológicas*, *152*(3), 28.

Mangindaan, R. E. P., & Lesnussa, M. S. P. (2013). Aktivitas Sitotoksik Dari Ekstrak Bintang Ular (Ophiomastix annulosa) Terhadap Perkembangan Awal Embrio Bulu Babi (Tripneustes gratilla). *Jurnal Pesisir Dan Laut Tropis*, *1*(3), 18.

Mulyanita, Djali, M., & Setiasih, I. S. (2019). Total Fenol, Flavonoid dan Aktivitas Antimikroba Ekstrak Limbah Kulit Lidah Buaya (Aloe chinensis baker). *Jurnal Vokasi Kesehatan*, *5*(2), 100.

Purgiyanti, Purba, A. V., & Winarno, H. (2019). Penentuan kadar fenol total dan uji aktivitas antioksidan kombinasi ekstrak herba pegagan (Centella asiatica L. Urban) dan buah mahkota dewa (Phaleria macrocarpa(Scheff.) Boerl.). *Jurnal Ilmiah Farmasi*, *8*(2), 40–45.

Septiana, A. T., & Asnani, A. (2013). Antioxidan activity of Sargassum duplicatum seaweed extract. *Jurnal Teknologi Pertanian*, *14*(2), 79–86.

Sundari, R. S., Rizkuloh, L. R., & Mardianingrum, R. (2021). Pengaruh Perbedaan pelarut Terhadap Kadar Fenol Total Dan Aktivitas Antioksidan Ekstrak Gadung (Dioscorea Hispida Dennst .). *Jurnal Biopropal Industri*, *12*(1), 43–49.

Wachidah, L. N. (2013). *Uji Aktivitas Antioksidan Serta Penentuan Kadar Fenolat dan Flavonoid Total dari Buah Pajiroto (Medinilla speciosa Blume)*.

Wijoyo, Ir. Padmiarso M. (2012). Cara Tuntas Menyembuhkan Diabetes dengan Herbal.

Jakarta : Pusaka Argo Indonesia.