

**ISOLASI ASAM FENOLAT DALAM TANAMAN ANTING-ANTING (*Acalypha Indica L.*),
DAN UJI TOTAL FENOL SERTA UJI ANTIOKSIDAN DENGAN METODE DPPH****Gian Restu Prinanda*, Dewi Kusriani dan Enny Fachriyah**

Laboratorium Kimia Organik, Jurusan Kimia, FSM, Universitas Diponegoro

*Email: gianrestuprinanda@gmail.co.id

Abstrak

Tanaman anting-anting (*Acalypha indica L*) merupakan tanaman obat tradisional yang dapat dipergunakan sebagai obat luka, asma, kudis, bronkitis, diuretik, dan ekspektoran. *Acalypha indica L* atau tanaman anting-anting mengandung senyawa metabolit sekunder alkaloid, tannin, saponin, fenolik, glikosida, steroid, terpenoid, flavonoid dan mengandung senyawa fenolik yang cukup tinggi. Penelitian ini bertujuan untuk mengisolasi asam fenolat dan menguji total fenol *Acalypha indica* dan menentukan % kadar asam fenolat masing-masing fraksi. Sampel yang digunakan berupa ekstrak daun anting-anting dalam methanol diperoleh dengan metode maserasi, hidrolisis, kromatografi. Didapati fraksi hidrolisis asam (HA), hidrolisis basa (HB), tanpa hidrolisis (TH) masing masing sebesar 0.72g, 0.45g, 0.41g. Hasil analisis TLC Scanner terhadap fraksi HA, HB dan TH dengan Rf 0.63 diduga mengandung kafeat dengan kadar masing-masing 21.69%; 7.14%; 2.67%. Dari hasil uji aktivitas antioksidan pada fraksi HA, HB, TH dan glikosida HA menunjukkan nilai IC₅₀ masing-masing sebesar 133.68 ppm; 132.97 ppm; 127.87 ppm; 666.67 ppm.

Kata kunci : *Acalypha indica L*, Asam fenolat, Hidrolisis, TLC

1. PENDAHULUAN

Phenol merupakan salah satu komponen kimia tumbuhan yang memiliki manfaat sangat besar baik bagi tumbuhan itu sendiri maupun bagi manusia. Senyawa phenol memiliki ciri cincin aromatic dan adanya satu atau dua penyuluh hidroksil. Senyawa phenol lebih cenderung larut dalam air, karena senyawa ini biasanya berikatan dengan gula. Senyawa phenol mencakup beberapa golongan senyawa bahan alam. Mulai dari flavanoid, phenil propanoid, kuinon phenolik, lignin, melanin, dan tannin merupakan golongan senyawa phenol. Asam fenolat merupakan salah satu jenis metabolit sekunder yang ditemukan dalam berbagai jenis tumbuhan. Turunan asam hidroksibenzoat dan asam hidroksisinat adalah jenis asam fenolat yang banyak terdapat pada tumbuhan (Mattila, 2006).

Acalypha indica L digunakan secara tradisional untuk antiradang, peluruh kencing (diuretik), pencabar, menghentikan pendarahan (hemostatis). Kandungan kimia dari tanaman anting-anting baik dari daun, batang, dan akar adalah saponin dan tanin; batangnya mengandung flavonoid dan daunnya mengandung minyak atsiri, steroid, dan triterpenoid (Dalimartha, 2011), asam askorbat, β -sitosterol, Fiber, quercetin dan kaemferrol (Duke, 2010).

Secara biologi klasifikasi dari *Acalypha indica* yaitu :

Divisi : Magnoliophyta
Sub divisi : Spermatophyta
Kelas : Magnoliopsida
Ordo : Euphorbiales
Famili : Euphorbiaceae
Genus : *Acalypha*
Spesies : *Acalypha indica L* (Rizky, 2010)

Penelitian ini bertujuan untuk mengisolasi asam fenolat dan menguji aktivitas antioksidan *Acalypha indica*. Pada penelitian ini *Acalypha indica* diekstraksi dengan pelarut methanol kemudian dipartisi dengan n-heksana, dihidrolisis, selanjutnya dilakukan skrining fitokimia, pemisahan dengan kromatografi lapis tipis (KLT) dan uji antioksidan dengan metode DPPH.

2. METODOLOGI

2.1 Alat

Alat-alat yang digunakan dalam penelitian ini adalah evaporator vakum, seperangkat alat gelas, lampu detector UV, timbangan analitik, TLC *Scanner*, spektrofotometer UV-Vis.

2.2 Bahan

Bahan tanaman yang digunakan adalah *Acalypha indica* L yang berasal dari sekitar daerah Tembalang, Semarang. Bahan kimia yang digunakan adalah n-heksana p.a, etanol p.a, aquadest, serbuk magnesium, anhidrida asam asetat, pereaksi Meyer, pereaksi Dragendorff, asam sulfat p.a, natrium hidroksida p.a, eter, metanol p.a, kloroform p.a, natrium sulfat anhidrat, plat silika gel GF254, asam asetat p.a, natrium karbonat p.a, etil asetat p.a, asam galat, asam kafeat, asam ferulat, asam salisilat.

2.3 Cara Kerja

2.3.1 Penyiapan Sampel

Penelitian ini dilakukan di laboratorium kimia, Jurusan Kimia, Fakultas Sains dan Matematika, Universitas Diponegoro selama \pm 6 bulan. Tanaman *Acalypha indica* selanjutnya dibersihkan, dikeringkan dan dihaluskan sehingga diperoleh serbuk simplisia.

2.3.2 Pembuatan Ekstrak Etanol

Serbuk simplisia dimaserasi menggunakan pelarut etanol dilakukan penggantian pelarut etanol selama 24 jam. Ekstrak etanol yang diperoleh kemudian dipekatkan dengan *rotary vacuum evaporator*, sehingga diperoleh ekstrak etanol. Ekstrak etanol kemudian dipartisi dengan n-heksana untuk menghilangkan senyawa-senyawa yang berifat non polar.

2.3.3 Penapisan Fitokimia

Simplisia, ekstrak etanol dan ekstrak n-heksan selanjutnya diuji dengan penapisan fitokimia untuk mengetahui kandungan golongan senyawa kimianya. Uji penapisan fitokimia meliputi uji alkaloid, uji flavonoid, uji tanin, uji saponin, uji steroid dan triterpenoid.

2.3.4 Isolasi Asam Fenolat

Ekstrak etanol kemudian diisolasi dalam tiga metode yaitu hidrolisis asam (HA), hidrolisis basa (HB) dan tanpa hidrolisis (TH). Isolasi asam fenolat dalam bentuk tanpa hidrolisis bertujuan untuk mengambil asam fenolat bebas, untuk mengambil asam fenolat dalam bentuk ester dilakukan dengan hidrolisis basa, dan untuk membebaskan asam fenolat dari bentuk glikosida dilakukan dengan hidrolisis asam (Zadernowski, dkk, 2002).

2.3.5 Pemisahan Asam Fenolat

Fraksi HA, HB dan HT dilakukan pemisahan menggunakan kromatografi lapis tipis (KLT) dengan fase gerak pengembang kloroform, etil asetat, dan metanol serta campuran pelarut dengan perbandingan tertentu menggunakan fase diam plat silika gel 60GF₂₅₄. Sebagai pembanding digunakan asam fenolat berupa asam galat, asam salisilat, asam kafeat, asam ferulat dan pirogallol. Noda yang R_F-nya sejajar dengan senyawa pembanding diidentifikasi dengan KLT dan analisis kuantitatif dengan *TLC scanner*.

2.3.6 Uji Antioksidan dengan DPPH

Larutan DPPH 0,1 mM dibuat dengan cara melarutkan 3,94 mg serbuk DPPH ke dalam 100 mL metanol. Isolat asam fenolat dibuat berbagai konsentrasi yaitu 100 ppm, 80 ppm, 60 ppm, 40 ppm, 20 ppm sedangkan asam galat standar dibuat dengan konsentrasi 25 ppm, 20 ppm, 15 ppm, 10 ppm, 5 ppm. Kemudian 3,8 mL larutan DPPH ditambahkan dengan 0,2 mL dari larutan berbagai konsentrasi. Campuran dihomogenkan dan dibiarkan selama 30 menit di tempat gelap. Selanjutnya diukur absorbansi pada panjang gelombang 515,5 nm. Selanjutnya dilakukan perhitungan IC₅₀ yang merupakan konsentrasi sampel untuk dapat meredam 50% aktivitas radikal DPPH. Nilai IC₅₀ diperoleh dari perpotongan garis antara 50% daya inhibisi dengan konsentrasi sampel (Molyneux, 2004).

3. HASIL DAN PEMBAHASAN

Preparasi sampel dan uji skrining simplisia tanaman *Acalypha indica L* 4 kg didapatkan serbuk kering sebanyak 2 kg. pada uji skrining didapatkan bahwa simplisia tanaman *Acalypha indica* mengandung flavonoid, alkaloid, saponin, tanin, dan steroid.

3.1 Pembuatan Ekstrak Etanol

Serbuk daun *Acalypha indica L* dimaserasi dengan dengan etanol selama 3 x 24 jam. Setelah maserasi, dilakukan pemekatan dengan cara evaporasi diperoleh ekstrak kental etanol sebesar 296,39 gram. Kemudian hasil ekstrak etanol difraksinasi dengan pelarut n-heksana didapatkan fraksi n-heksan berwarna hijau kecoklatan. Tujuannya untuk mengikat senyawa-senyawa non polar yang selanjutnya dilakukan analisis fitokimia.

3.2 Penapisan Fitokimia Serbuk

Penapisan fitokimia terhadap kandungan senyawa metabolit sekunder merupakan langkah awal dalam penelitian mengenai berasal dari bahan alam. Pada hasil uji penapisan fitokimia yang dilakukan terhadap serbuk tanaman *Acalypha indica L* dapat dilihat pada Tabel 1.

Tabel 1. Hasil uji penapisan fitokimia tanaman *Acalypha indica L*

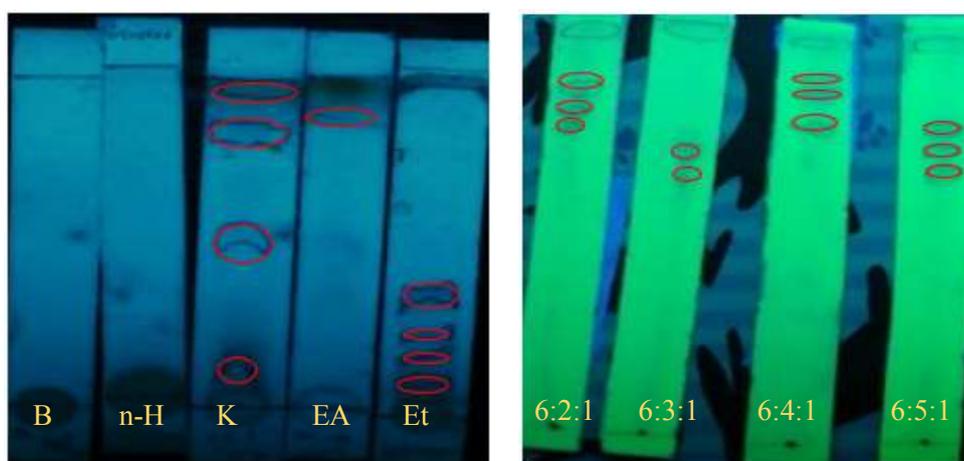
Uji Fitokimia	Simplisia	Fraksi Etanol	Fraksi n-Heksana
Saponin	+	+	-
Tanin	+	+	-
Kuinon	+	+	-
Alkaloid	+	+	-
Steroid	+	-	+
Triterpenoid	-	-	-
Flavonoid	+	+	-

3.3 Isolasi Asam Fenolat

Ekstrak etanol diisolasi dalam tiga bentuk yaitu hidrolisis asam, hidrolisis basa dan tanpa hidrolisis. Didapati hasil fraksi hidrolisis asam (HA), hidrolisis basa (HB), tanpa hidrolisis (TH) masing masing sebesar 0,72g ; 1,45g ; 0,41g .

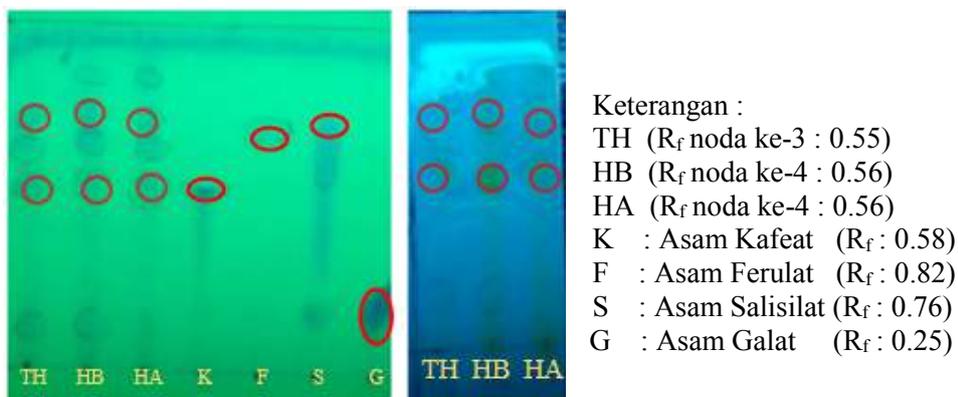
3.4 Pemisahan Asam Fenolat dengan Kromatografi Lapis Tipis

Fraksi HB, HA, dan TH diawali dengan menggunakan kromatografi lapis tipis (KLT) dengan fase diam silika gel GF₂₅₄ dengan eluen tunggal dan campuran untuk menentukan perbandingan eluen yang sesuai.



Gambar 1. Uji Eluen Tunggal (Benzena ; n-Heksana ; Kloroform ; Etil asetat ; Etanol) dan Uji Eluen Campuran (Etil asetat -Kloroform - Asam asetat)

Selanjutnya dianalisis dengan kromatografi lapis tipis (KLT) dengan fase diam silika gel GF₂₅₄ dengan ukuran 4x8 cm dan eluen campuran kloroform : etil asetat : asam asetat (60:50:10) sebagai fase gerak. Pengamatan hasil dilakukan pada sinar UV panjang gelombang 254 nm. Hasil yang diperoleh dari KLT dibandingkan dengan senyawa pembanding (asam kafeat, ferulat, salisilat, galat).

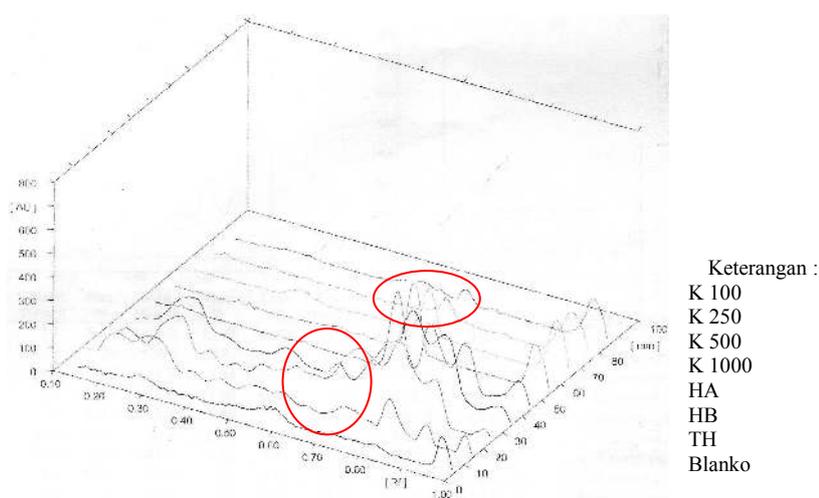


Gambar 2. Hasil KLT fraksi TH, HB, HA dan senyawa pembanding dengan eluen kloroform; etil asetat; asam asetat (50:60:10) diamati pada sinar UV 254 nm (1), dan setelah disemprot penampang bercak FeCl₃ (2).

Pada Hasil KLT di atas menunjukkan bahwa ada R_f noda dari fraksi HB, HA dan TH yang sejajar dengan asam fenolat pembanding. Hasil dari penampakan bercak FeCl₃ asam kafeat standar menghasilkan warna kuning cerah yang didapati R_f asam kafeat sebesar 0.58 sejajar dengan noda ke-3 fraksi TH, noda ke-4 fraksi HB, noda ke-4 fraksi HA. Data inilah yang akan digunakan untuk analisis TLC *Scanner*.

3.4 Identifikasi Asam Fenolat dan TLC *Scanner*.

Identifikasi asam fenolat dilakukan dengan TLC *Scanner* pada panjang gelombang 365 nm dan luas area sampel yang telah di KLT dan dielusi dengan fase diam silika gel dan eluen campuran kloroform : etil asetat : asam asetat (60:50:10) menghasilkan data TLC *Scanner* (Gambar 2) yang menunjukkan harga R_f sampel, selanjutnya dibandingkan dengan harga R_f asam kafeat standar yang ditunjukkan dalam Tabel 2.

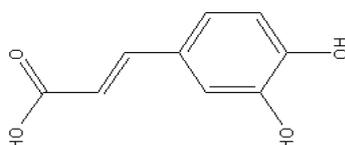


Gambar 3. Grafik Hasil TLC *Scanner*

Tabel 2. Hasil Analisis Asam Kafeat, Fraksi TH₂, HB₃, HA₃ dengan TLC Scanner

Senyawa (ppm)	Absorbansi
Kafeat 50	0.64
Kafeat 100	0.61
Kafeat 250	0.62
Kafeat 500	0.62
Kafeat 1000	0.65
HA	0.63
HB	0.61
TH	0.64

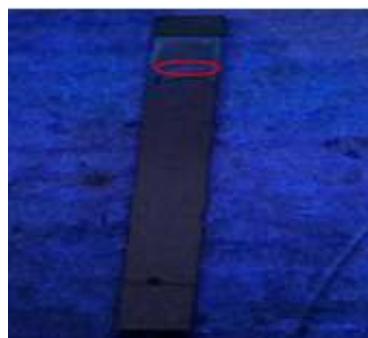
Pada hasil tersebut dapat disimpulkan bahwa Rf asam kafeat standar memiliki kemiripan dengan Rf dari masing-masing fraksi tersebut yaitu 0.63. Sehingga dapat disimpulkan bahwa ketiga fraksi tersebut terbukti mengandung asam kafeat. Struktur asam kafeat dapat dilihat pada gambar 4.

**Gambar 4. Struktur senyawa asam kafeat**

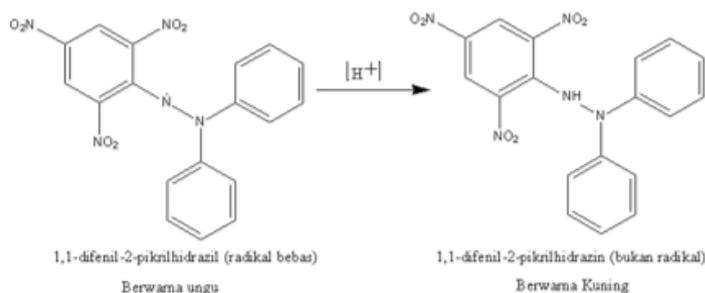
Dari hasil penentuan kadar dengan menggunakan TLC Scanner, didapatkan masing-masing fraksi TH 2.67%, fraksi HB 7.14%, dan fraksi HA 21.69%. Dapat disimpulkan bahwa asam kafeat fraksi HA memiliki kadar asam kafeat terbesar dari *Acalypha indica*.

3.5 Uji Antioksidan dengan DPPH

Hasil aktivitas antioksidan isolat asam kafeat dilakukan menggunakan KLT dengan eluen campuran kloroform : etil asetat : asam asetat (60:50:10) menunjukkan perubahan warna dari violet menjadi kuning pada noda.

**Gambar 6. Uji Antioksidan pada plat KLT**

Hasil dari uji aktivitas antioksidan dengan DPPH menunjukkan bahwa isolat asam kafeat tersebut aktif meredam radikal DPPH.

**Gambar 7. Mekanisme peredaman radikal bebas (Molyneux,2004)**

Persen inhibisi (IC₅₀) fraksi TH, HB, HA dan glikosida HA secara berturut-turut adalah 127,87 ppm; 132,97 ppm; 133,68 ppm; 666,67 ppm. Aktivitas antioksidan fraksi TH, HB, HA tergolong sedang, sementara glikosida HA tidak tergolong antioksidan.

4. KESIMPULAN

4.1 Kesimpulan

Jenis asam fenolat yang terkandung dalam fraksi TH, HB, HA tanaman *Acalypha indica* diduga merupakan asam kafeat. Uji aktivitas antioksidan pada fraksi HT, HB, HA dan glikosida HA menunjukkan nilai IC₅₀ masing-masing sebesar 127,87 ppm; 132,97 ppm; 133,68 ppm; 666,67 ppm.

4.2 Saran

Peneliti menyarankan untuk melakukan penelitian lebih lanjut terhadap senyawa antioksidan tersebut yang diduga merupakan senyawa golongan fenolik dengan uji UV-Vis, uji FT-IR, uji LC-MS, uji NMR

DAFTAR PUSTAKA

- Dalimartha S. 2011. *Atlas Tumbuhan Obat Indonesia*, Jilid II, Jakarta: Trubis Agri Widya, hal : 123-5
- Duke JA. 2009. "List of chemicals of *Acalypha australis* L." In: *Phytochemical and Ethnobotanical Databases*.
- Harborne, J.B. 1996. *Metode Fitokimia, Penuntun Cara Modern Menganalisis Tumbuhan*. Bandung; Institut Teknologi Bandung
- Mattila, P., dan Helstrom, J., 2006, Original Article : Phenolic acids in potatoes, vegetables, and some of their products, *J. of Food Composition and Analysis*, 20, 152-160
- Molyneux, P. 2004. *The use of the stable free radikal diphenylpicrylhydrazyl (DPPH) for estimating antioxidant activity*. *Journal Science of Technology*. 26(2):211-219.
- Rizky Ocktarini, 2010, *Pengaruh Ekstrak Herba Ating-anting (Acalypha australis L.) terhadap Kadar Glukosa Darah Mencit Balb/C Induksi Streptozotocin*, Fakultas Kedokteran, Universitas Sebelas Maret, Surakarta.
- Zadernowski, R., M. Naczka, and H. Nowak-Polakowska. 2002. *Phenolic Acids of Borage (Borago officinalis L.) and evening primrose (Oenothera biennis L.)*. *Journal AOCS* 79, Vol. 79, hal : 4, 335-338