

KANDUNGAN TOTAL FENOLIK EKSTRAK METANOL BUAH LEUNCA (*Solanum nigrum* L.) DAN FRAKSI-FRAKSINYA

*Total Phenolic Contents of Methanol Extract of Leunca (*Solanum nigrum* L.) Fruit and Its Fraction*

Nasya Khaerunnisa¹, Indah Saraswati¹, Widyandani Sasikirana^{1*}

¹Program Studi Farmasi, Universitas Diponegoro

*Corresponding author : widyandani.sasikirana@live.undip.ac.id

ABSTRAK

Senyawa fenolik merupakan metabolit sekunder yang keberadaannya sangat melimpah dan merupakan sumber antioksidan alami dari tumbuhan dan buah-buahan, salah satunya adalah leunca (*Solanum nigrum* L.). Studi ini bertujuan menentukan kandungan total fenolik yang terdapat pada ekstrak dan fraksi buah leunca. Buah leunca diekstraksi menggunakan metode maserasi memanfaatkan pelarut metanol, lalu difraksinasi bertingkat memanfaatkan metode partisi cair-cair dengan pelarut n-heksan dan etil asetat. *Total Phenolic Content* (TPC) dilakukan dengan pereaksi Folin-Ciocalteu secara spektrofotometri. Asam galat digunakan sebagai pembanding. Ekstrak metanol (E_M) memiliki kandungan fenol total tertinggi yaitu sebesar $3,83 \pm 0,06$ mg GAE/g, diikuti oleh fraksi etil asetat (F_{EA}) dan n-heksan (F_{HE}) sebesar $2,79 \pm 0,13$; $1,32 \pm 0,01$ mg GAE/g. Berdasarkan hasil tersebut, dapat disimpulkan bahwa pelarut yang lebih banyak mengekstrak senyawa fenolik dibandingkan pelarut n-heksan dan etil asetat yaitu pelarut metanol.

Kata Kunci: metabolit sekunder, antioksidan, maserasi, partisi cair-cair, spektrofotometri

ABSTRACT

Phenolic compounds are secondary metabolites which are very abundant and become one of the sources of natural antioxidants from plants and fruits. The study was conducted to determine the total phenolic content included in extract and fractions of leunca fruit (*Solanum nigrum* L.). Leunca fruits were extracted by maceration method using methanol and further partitioned gradually by liquid-liquid partitioning method with n-hexane and ethyl acetate. *Total Phenolic Content* was determined based on spectrophotometric assay using Folin-Ciocalteu reagent. Gallic acid was used for comparison. The methanol crude extract (E_M) of leunca fruit (*Solanum nigrum* L.) had the highest total phenolic content $3,83 \pm 0,06$ mg GAE/g, followed by ethyl acetate (F_{EA}) and n-hexane (F_{HE}) fraction ($2,79 \pm 0,13$; $1,32 \pm 0,01$ mg GAE/g). Based on the results, it could be deduced that the solvent extracted more phenolic than n-hexane and ethyl acetate was methanol.

Keywords: secondary metabolites, antioxidants, maceration, liquid-liquid partitioning, spectrophotometric

PENDAHULUAN

Senyawa fenolik merupakan satu dari tiga kelompok utama metabolit sekunder yang keberadaannya sangat melimpah dan merupakan salah satu sumber antioksidan alami dari tumbuhan

dan juga buah-buahan. Salah satu yang memiliki senyawa fenolik adalah leunca (*Solanum nigrum* L.). Tanaman leunca (*S. nigrum*) memiliki potensi sebagai antioksidan karena mengandung alkaloid, saponin, tanin, flavonoid dan lain-lain (Gogoi,

2012). Metabolit sekunder yang terkandung dalam leunca tersebut dapat dipisahkan berdasarkan polaritasnya melalui fraksinasi bertingkat dengan metode partisi cair-cair. Fraksinasi yang dilakukan akan memengaruhi profil kandungan metabolit sekunder pada masing-masing ekstrak dan fraksi terutama kandungan senyawa fenolik yang memiliki pengaruh pada aktivitas antioksidan, semakin besar aktivitas antioksidan disebabkan oleh semakin besarnya kandungan senyawa fenolik (Durre *et al.*, 2010; Kiessoun *et al.*, 2010).

Oleh karena itu, studi ini dilakukan uji *Total Phenolic Content* (TPC) dari ekstrak dan fraksi buah leunca sehingga kandungan senyawa fenolik yang terkandung di dalamnya dapat diketahui.

METODE PENELITIAN

Alat dan Bahan

Alat yang digunakan antara lain seperangkat alat gelas, *rotary evaporator*, *waterbath*, timbangan analitik, spektrofotometer UV-Vis 1280, *silica gel* 60 GF₂₅₄, dan lampu UV.

Bahan yang digunakan yaitu buah leunca (*Solanum nigrum* L.) yang diperoleh dari Kabupaten Kuningan, Jawa Barat, asam galat, *Folin-Ciocalteu's phenol reagent*, metanol p.a, etil asetat p.a, n-heksan p.a, natrium karbonat (Na₂CO₃), n-butanol, asam asetat glasial, *aquadest*, besi (III) klorida, kloroform, amonia, asam sulfat (H₂SO₄), dragendorf, etanol 95%, serbuk magnesium, asam klorida pekat, aquades, eter, dan asam asetat anhidrat.

Preparasi Sampel

Buah leunca (*Solanum nigrum* L.) diekstraksi dengan maserasi menggunakan pelarut metanol dengan perbandingan 1:2 (b/v) selama 3 × 24 jam. Maserat dipekatkan dengan *rotary evaporator* dan *waterbath* sehingga ekstrak metanol buah leunca didapatkan.

Fraksinasi

Setiap satu gram ekstrak kental metanol yang diperoleh dilarutkan dalam aquades dengan rasio solid terhadap pelarut 1:10 (b/v) kemudian fraksinasi dilakukan secara bertingkat dengan metode partisi cair-cair menggunakan corong pisah dengan pelarut n-heksan dengan perbandingan 10:10 (v/v), diulang hingga fase n-heksan jernih. Kemudian dilanjutkan dengan memfraksinasi fase air dengan pelarut etil asetat dengan perbandingan 10:10 (v/v), diulang hingga fase etil asetat jernih kemudian dipekatkan fraksi n-heksan dan etil asetat yang didapatkan dengan *rotary evaporator*.

Skrining Fitokimia

Skrining fitokimia dilakukan mengacu dengan metode yang dikembangkan oleh Farnsworth (1966) dan Harborne (1987).

Kromatografi Lapis Tipis (KLT) Senyawa Fenolik

Plat KLT (silika gel 60 GF₂₅₄) dibilas dengan metanol kemudian diaktivasi dengan pengeringan selama 30 menit pada suhu 120°C. Larutan uji (E_M, F_{EA}, F_{HE}) ditotolkan di atas plat KLT dan dielusi dengan fase gerak berupa n-butanol: asam asetat glasial: air (4 : 1 : 5). Noda diamati pada λ 254 nm dan 366 nm. Penampak bercak untuk deteksi senyawa fenolik yang digunakan adalah penampak bercak FeCl₃ 1%.

Penentuan Total Phenolic Content (TPC)

Penentuan Operating Time

Larutan asam galat dengan konsentrasi 100 µg/mL sebesar 0,5 mL ditambahkan 5 mL reagen Folin-Ciocalteu (sebelumnya diencerkan 10 kali dengan air), dihomogenkan, dan didiamkan dengan waktu 3 menit. Larutan tersebut ditambahkan 4 mL natrium karbonat (Na₂CO₃) 7,5% dan dihomogenkan kembali. Serapan diukur dengan

spektrofotometer UV-Vis pada panjang gelombang 765 nm setiap 2 menit selama 80 menit.

Penentuan Panjang Gelombang Serapan Maksimal

Larutan asam galat dengan konsentrasi 100 µg/mL sebesar 0,5 mL ditambah 1,5 mL reagen Folin-Ciocalteu sebelumnya diencerkan 10 kali dengan air), dihomogenkan, dan didiamkan dengan waktu 3 menit. Larutan tersebut ditambahkan 1,2 mL natrium karbonat (Na_2CO_3) 7,5% dihomogenkan kembali, dan didiamkan selama *operating time*. Serapan diukur menggunakan spektrofotometer UV Vis pada panjang gelombang 400 - 800 nm.

Pembuatan Kurva Baku Asam Galat

Larutan asam galat dengan konsentrasi 50, 75, 100, 125 dan 150 µg/mL sebesar 0,5 mL masing-masing ditambahkan 0,5 mL reagen Folin-Ciocalteu (sebelumnya diencerkan 10 kali dengan air), dihomogenkan dan didiamkan dengan waktu 3 menit. Larutan tersebut ditambahkan 4 mL natrium karbonat (Na_2CO_3) dan dihomogenkan kembali. Kemudian, campuran tersebut didiamkan pada suhu kamar selama waktu *operating time*. Serapan diukur menggunakan spektrofotometer UV Vis pada panjang gelombang maksimal kemudian dibentuk kurva kalibrasi hubungan korelasi konsentrasi asam galat dan konsentrasi.

Penetapan Total Phenolic Content (TPC)

Larutan uji (E_M , F_{EA} , F_{HE}) dengan konsentrasi 2500 µg/ml sebesar 0,5 mL ditambahkan reagen Folin-Ciocalteu 5 mL (sebelumnya diencerkan 10 kali dengan air), dihomogenkan, dan didiamkan dengan waktu 3 menit. Kemudian ditambahkan 4 mL natrium karbonat (Na_2CO_3) 7,5%, dihomogenkan kembali, dan campuran tersebut didiamkan

kembali dengan waktu *operating time* yang didapatkan sebelumnya pada suhu kamar. Serapan diukur menggunakan spektrofotometer UV Vis pada panjang gelombang maksimum hasil optimasi.

HASIL DAN PEMBAHASAN

Ekstraksi dan Fraksinasi

Buah leunca yang digunakan merupakan buah yang masih mentah. Pemilihan tersebut bertujuan untuk mendapatkan kandungan metabolit sekunder yang masih tinggi karena pada buah yang sudah matang jumlah metabolit sekundernya lebih rendah. Seluruh bagian tanaman *Solanum nigrum* mengandung glikoalkaloid, glikosida steroid, steroidal saponin (diosgenin), steroidal genin (gitogenin), tanin dan senyawa polifenol (Edmonds, 1997; Nur Alam *et al.*, 2012; Khan *et al.*, 2016). Buah yang belum matang mempunyai kandungan tanin lebih banyak (Nadila, Sobir and Syukur, 2019). Pelarut metanol dipilih untuk digunakan dalam proses maserasi karena termasuk pelarut yang paling baik dalam mengekstraksi senyawa fenolik (Mu'nisa *et al.*, 2012).

Tujuan dari proses fraksinasi yaitu memisahkan senyawa kimia berdasarkan tingkat kepolarannya. Senyawa yang bersifat polar akan larut dalam pelarut polar dan sebaliknya senyawa yang bersifat non polar akan larut dalam pelarut non polar sehingga senyawa pada fraksi yang didapat menjadi menjadi lebih spesifik (Harborne, 1987). Fraksinasi menggunakan pelarut n-heksan menghasilkan dua lapisan yang tidak saling campur yang terdiri dari fase organik berisi pelarut n-heksan serta senyawa yang terlarut pada pelarut tersebut dan fase air berisi sisa pelarut metanol yang mungkin tersisa pada

ekstrak serta garam dan air yang dihasilkan dari proses hidrolisis senyawa metabolit sekunder. Fraksi n-heksan berada pada lapisan atas dikarenakan densitas air ($0,9950 \text{ g/cm}^3$) lebih besar daripada densitas n-heksan ($0,6606 \text{ g/cm}^3$) (National Center for Biotechnology Information, 2004c, 2004a). Fraksinasi dengan pelarut etil asetat juga menghasilkan dua lapisan yang tidak saling campur yang terdiri dari fase organik berisi pelarut etil asetat serta senyawa yang terlarut pada pelarut tersebut dan fase air berisi sisa pelarut metanol yang mungkin tersisa pada ekstrak serta garam dan air yang dihasilkan dari proses hidrolisis senyawa metabolit sekunder. Fraksi etil asetat berada pada lapisan atas dikarenakan densitas air ($0,9950 \text{ g/cm}^3$) lebih besar daripada densitas etil asetat ($0,9003 \text{ g/cm}^3$) (National Center for Biotechnology Information, 2004c, 2004b).

Terbentuknya dua lapisan yang tidak saling bercampur pada masing-masing pelarut disebabkan oleh adanya perbedaan polaritas. Polaritas suatu pelarut menunjukkan tingkat kelarutannya terhadap suatu sampel, yang mana, tingkat kelarutan ini ditunjukkan oleh nilai konstanta dielektrik. Nilai konstanta dielektrik yang semakin besar mengindikasikan pelarut tersebut akan semakin bersifat polar (Sudarmadji, 2003). Konstanta dielektrik n-heksan, etil asetat dan air berurutan sebesar 1,89; 6,02 dan 80,4 (Stahl, 1985; Feher, 2017). Perbedaan konstanta dielektrik yang jauh antara air dengan n-heksan maupun etil asetat menyebabkan pelarut-pelarut tersebut tidak saling bercampur dan larut dalam air sehingga terbentuk dua lapisan. Adapun rendemen yang didapatkan dari ekstraksi dan fraksinasi tercantum pada Tabel 1.

Tabel 1. Rendemen Ekstrak dan Fraksi

Sampel	Berat awal (gram)	Berat akhir (gram)	Rendemen (%)
E_M	6000	199,17	3,32
F_{EA}	100	8,11	8,11
F_{HE}	100	3,29	3,29

Tabel 2. Hasil Skrining Fitokimia

Metabolit sekunder	E_M	F_{EA}	F_{HE}
Alkaloid	+	+	+
Flavonoid	+	+	-
Saponin	+	-	-
Fenolik	+	+	+
Tanin	+	+	+
Kuinon	+	-	-
Triterpenoid	-	-	-
Steroid	+	+	+

Tabel 3. Hasil Identifikasi KLT Senyawa Fenolik

Sampel	Penampakan Bercak	Warna Noda Tampak	Ket.
E_M		Merah, biru	+
F_{EA}	$FeCl_3$ 1%	Merah, biru	+
F_{HE}		Merah, biru	+

Skrining Fitokimia dan KLT Senyawa Fenolik

Hasil skrining fitokimia E_M , F_{EA} dan F_{HE} buah leunca tercantum pada Tabel 2. Identifikasi dengan Kromatografi Lapis Tipis (KLT), hasil positif adanya senyawa fenol ditunjukkan oleh ekstrak metanol dan fraksi n-heksan (Tabel 3) dengan timbulnya warna noda merah dan biru setelah dilakukan penyemprotan dengan penampakan bercak $FeCl_3$ 1%. Penampakan bercak $FeCl_3$ digunakan untuk mendeteksi fenol dengan indikasi akan menimbulkan warna hijau, merah, cokelat, ungu, biru atau hitam yang kuat (Harborne, 1987).

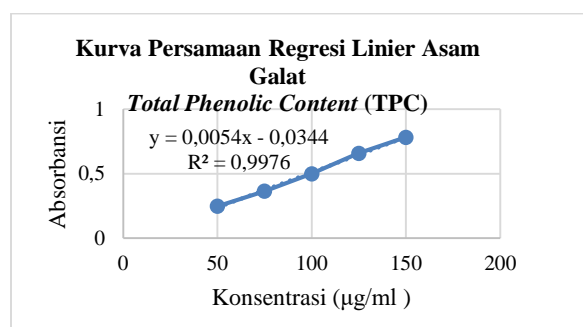
Tabel 4. Kandungan Total Fenolik Ekstrak dan Fraksi Buah Leunca

Sampel	Kandungan Total Fenolik (mg GAE/g)	SD
E _M	3,83	0,06 ^a
F _{EA}	2,79	0,13 ^b
F _{HE}	1,32	0,01 ^c

Reaksi pada pH ~ 10



Gambar 1. Reaksi pada Uji *Total Phenolic Content* (Sánchez-Rangel et al., 2013)



Gambar 2. Kurva Persamaan Regresi Linier Asam Galat

Penentuan *Total Phenolic Content* (TPC)

Penentuan *Total Phenolic Content* (TPC) dilakukan guna mengetahui keberadaan senyawa fenolik dalam sampel (E_M, F_{EA} dan F_{HE}) dengan prinsip reaksi reduksi oksidasi dalam keadaan basa. Senyawa fenolik pada keadaan basa dapat bereaksi dengan reagen Folin Ciocalteau dikarenakan terjadi disosiasi proton pada senyawa fenolik menjadi ion fenolat. Keberadaan dari senyawa fenolik diindikasikan dengan adanya perubahan warna larutan uji menjadi biru yang disebabkan oleh asam fosfomolibdat-fosfotungstat pada reagen Folin-Ciocalteu tereduksi oleh ion fenolat menjadi *molybdenum blue* (Singleton and Rossi, 1965).

Pada Gambar 1 menunjukkan reaksi yang terjadi pada Folin Ciocalteu.

Berdasarkan hasil pengukuran, E_M memiliki kandungan fenolik tertinggi diikuti oleh F_{EA} dan F_{HE} (Tabel 4) yang diperoleh dari persamaan $y = 0,0054x - 0,0344$ (Gambar 2). Hasil pengukuran kandungan fenolik E_M yang lebih tinggi dibandingkan dengan F_{EA} dan F_{HE} dapat disebabkan karena lebih banyaknya senyawa yang terekstrak oleh pelarut metanol dibandingkan dengan etil asetat dan n-heksan yang ditunjukkan pula oleh hasil skrining fitokimia masing-masing ekstrak dan fraksi (Tabel 2).

Banyaknya senyawa fenolik dari bahan tanaman yang dapat terekstrak dipengaruhi oleh beberapa faktor. Pelarut yang digunakan untuk mengekstraksi memengaruhi kandungan fenol. Pelarut yang lebih polar dapat melarutkan fenol lebih baik sehingga dalam suatu sampel kadarnya menjadi lebih tinggi (Mu'nisa et al., 2012).

Kandungan fenolik yang tinggi pada E_M dapat disebabkan oleh banyaknya flavonoid dalam bentuk glikosida. Beberapa flavonoid memiliki sejumlah gugus hidroksil yang tidak terganti atau suatu gula, pelarut polar seperti air, aseton, butanol, etanol, metanol, dimetil-sulfoksida, dimetilformamida dan lain-lain cukup mampu berikatan dengan flavonoid (Markham, 1988). Keberadaan gula yang berikatan dengan flavonoid cenderung berakibat pada lebih mudahnya flavonoid terlarut dalam air sehingga pelarut yang baik bagi glikosida adalah air dan campuran pelarut-pelarut yang telah disebutkan. Sementara itu, aglikon yang polaritasnya kurang seperti flavanon, flavon, flavonol termetoksilasi dan isoflavon cenderung lebih mudah terekstrak dalam pelarut seperti eter dan kloroform.

Aglikon flavonoid yaitu senyawa polifenol yang mampu larut dalam basa karena memiliki sifat agak asam, tetapi apabila dibiarkan dalam larutan basa dan terdapat oksigen maka banyak yang akan teroksidasi (Markham, 1988). Proses pengeringan yang dilakukan terhadap sampel menyebabkan komponen dinding sel mengalami kerusakan yang berakibat pada hasil ekstraksi yang lebih sempurna karena sistem membran sel yang terbuka lebih optimal (Chu and Juneja, 1997).

Efektifitas senyawa fenol juga tergantung pada jenis, struktur, jumlah, dan posisi gugus hidroksil pada cincin benzena. Sistem konjugasi pada ikatan rangkap 2, 3 menyebabkan radikal fenoksil flavonoid menjadi stabil akibat terjadinya resonansi sehingga dapat meningkatkan kemampuan flavonoid untuk menangkap radikal (Lukiati, 2014). Aktivitas antioksidan pada senyawa flavonoid dipengaruhi oleh adanya gugus hidroksil 3', 4' ortodihidroksi pada cincin B flavonoid, ikatan rangkap 2, 3 yang terkonjugasi dengan gugus 1, 4 *pyrone* pada cincin C dan gugus hidroksil pada posisi 3 dan 5.

SIMPULAN

Ekstrak metanol, fraksi etil asetat dan fraksi n-heksan buah leunca (*Solanum nigrum* L.) memiliki kandungan fenolik berturut-turut sebesar $3,83 \pm 0,06$; $2,79 \pm 0,13$; $1,32 \pm 0,01$ mg GAE/g.

DAFTAR PUSTAKA

Chu, D. C. and Juneja, L. R. (1997) *General Chemical Composition of Green Tea and Its Function Chemistry and Applications of Green Tea*. USA: CRC Press LLC.

Durre, S. *et al.* (2010) 'Antioxidant activities of the selected plants from the family Euphorbiaceae, Lauraceae, Malvaceae and Balsaminaceae', *African Journal of Biotechnology*, 9(7), pp. 1086–1096. doi: 10.5897/AJB09.1622.

Edmonds, J. M. . J. A. C. (1997) 'Black nightshades: *Solanum nigrum* L. and related species', in *Promoting the conservation and use of underutilized and neglected crops*.

Feher, J. (2017) 'Physical Foundations of Physiology II', in *Quantitative Human Physiology*. Elsevier, pp. 31–42. doi: 10.1016/B978-0-12-800883-6.00003-3.

Gogoi, P. (2012) 'Phytochemical Screening of *Solanum nigrum* L and *S.myriacanthus* Dunal from Districts of Upper Assam, India.', *IOSR Journal of Pharmacy (IOSRPHR)*, 2(3), pp. 455–459. doi: 10.9790/3013-0230455459.

Harborne, J. B. (1987) *Metode Fitokimia: Penuntun Cara Modern Menganalisis Tumbuhan, diterjemahkan oleh Kosasih Padmawinata dan Iwang Soediro*. Bandung: Penerbit ITB.

Khan, H. J. *et al.* (2016) 'Identification of Anticancer and Antioxidant phytoconstituents from chloroform fraction of *Solanum nigrum* L. berries using GC-MS/MS analysis.', *Indian journal of experimental biology*, 54(11), pp. 774–82. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/30179424>.

Kiessoun, K. *et al.* (2010) 'Polyphenol contents, antioxidant and anti-inflammatory activities of six Malvaceae species traditionally used

- to treat hepatitis B in Burkina Faso', *European Journal of Scientific Research*, 3(3), pp. 406–415.
- Lukiati, B. (2014) 'Penentuan Aktivitas Antioksidan dan Kandungan Fenol Total Ekstrak Daun Gendola (*Basella rubra* Linn) dan Daun Binahong (*Anredera cordifolia* Stennis) Sebagai Kandidat Obat Herbal', in *Seminar Nasional XI Pendidikan Biologi FKIP UNS*. Universitas Sebelas Maret. Available at: <https://jurnal.uns.ac.id/prosbi/article/view/7704/6870>.
- Markham, K. R. (1988) *Cara Mengidentifikasi Flavonoid*. Bandung: Penerbit ITB.
- Mu'nisa, A. *et al.* (2012) 'Aktivitas Antioksidan Ekstrak Daun Cengkeh (Antioxidant Activity of Clove Leaf Extract)', *Jurnal Veteriner*, 13(3), pp. 272–277.
- Nadila, D., Sobir and Syukur, M. (2019) 'Keragaman Morfologi dan Kandungan Tanin pada Tanaman Leunca [*Solanum nigrum* (L.)]', *Jurnal Agronomi Indonesia (Indonesian Journal of Agronomy)*, 47(1), pp. 76–83. doi: 10.24831/jai.v47i1.19554.
- National Center for Biotechnology Information (2004a) *Compound Summary for CID 8058; Hexane, PubChem Compound Database*. Available at: <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/Hexane> (Accessed: 14 March 2021).
- National Center for Biotechnology Information (2004b) *Compound Summary for CID 8857; Ethyl Acetate, PubChem Compound Database*. Available at: <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/8857> (Accessed: 14 March 2021).
- National Center for Biotechnology Information (2004c) *Compound Summary for CID 962; Water, PubChem Compound Database*. Available at: <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/962>.
- Nur Alam, M. *et al.* (2012) 'Antioxidant activity of the ethanolic extracts of leaves, stems and fruits of *Solanum nigrum*', *Pharmacognosy Communications*, 2(3), pp. 67–71. doi: 10.5530/pc.2012.3.14.
- Sánchez-Rangel, J. C. *et al.* (2013) 'The Folin-Ciocalteu assay revisited: Improvement of its specificity for total phenolic content determination', *Analytical Methods*. doi: 10.1039/c3ay41125g.
- Singleton, V. L. and Rossi, J. A. J. (1965) 'Colorimetry to total phenolics with phosphomolybdic acid reagents', *American Journal of Enology and Viticulture*, 16, pp. 144–158.
- Stahl, E. (1985) *Analisis Obat Secara Kromatografi dan Mikroskopi*. Edited by K. Padmawinata and I. Soediro. Bandung: Penerbit ITB.
- Sudarmadji, S. (2003) *Teknik Analisis Biokimia*. Yogyakarta: Yogyakarta Liberty.