

## BAB II

### TINJUAN PUSTAKA

#### A. Tanaman Pulutan



**Gambar 1. Tanaman Pulutan (Dokumentasi Pribadi)**

#### 1. Sistematika tanaman pulutan

Sistematika tanaman pulutan (*Urena lobata* L.) menurut (Depkes, 2000) adalah sebagai berikut:

Kingdom	: Plantae
Super Divisi	: Spermatophyta
Divisi	: Magnoliophyta
Kelas	: Magnoliopsida
Ordo	: Malvales
Famili	: Malvaceae
Genus	: <i>Urena</i>
Species	: <i>Urena lobata</i> L.

#### 2. Nama daerah tanaman pulutan

Tanaman pulutan (*Urena lobata* L.) terdapat nama lain di berbagai daerah diantaranya adalah pungpurtan (Sunda), legetan (Jawa), polot (Madura), kapuhak, kaporata (Sumba), bejak, kakamomoko, kokomomoko (Halmera), taba toko (Ternate), di tao hum (China) (Depkes, 2000).

#### 3. Morfologi tanaman pulutan

Tanaman pulutan (*Urena lobata* L.) termasuk kedalam suku Malveceae, tanaman ini mempunyai tinggi 1-2 meter. Batang dari tanaman pulutan berkayu bulat, berbulu lebat, dan bercabang ungu. Daun pulutan berciri-ciri tunggal, ujung runcing, pangkal berlekuk. Bunga dari

tanaman pulutan berbentuk bulat telur, tabung benang sari merah, pangkal putik menyatu, kepala putik berwarna merah. Buah tanaman pulutan berbentuk kotak, tertutup rambut seperti sikat, berwarna coklat. (Depkes, 2000)

#### **4. Kandungan kimia daun pulutan**

Pada bagian daun, akar dan Bunga pulutan (*Urena lobata* L.) terdapat kandungan senyawa saponin dan flavonoid. Daun tanaman pulutan juga mengandung senyawa tanin dan minyak atsiri (Depkes, 2000).

Saponin merupakan senyawa aktif yang mampu menghasilkan busa ketika dikocok dalam air. Pada konsentrasi rendah, senyawa ini dapat menyebabkan hemolisis pada sel darah merah (Robinson, 1995).

Flavonoid berperan sebagai penangkap yang efektif untuk radikal hidroksil dan superokida. keberadaan senyawa flavonoid, lipid membrane dapat terlindungi dari kerusakan (Robinson, 1995). Flavonoid merupakan antioksidan yang efektif dalam mencegah pembentukan radikal bebas. Senyawa flavonoid yang larut dalam air dapat diekstraksi menggunakan etanol. Flavonoid umumnya ditemukan pada tumbuhan yang terikat dengan gula sebagai glikosida dan bentuk aglikon merupakan kombinasi glikosida (Harborne, 1987).

Tanin mampu bereaksi dengan protein untuk membentuk kopolimer, yang berperan dalam proses pengubahan kulit hewan mentah menjadi kulit yang siap dipakai. Hewan cenderung menghindari senyawa tanin karena rasanya yang sepat (Harborne, 1987).

#### **5. Manfaat tanaman pulutan**

Daun pulutan adalah salah satu tanaman yang mempunyai efek sebagai obat. Daun pulutan ini dapat digunakan untuk pengobatan demam, malaria, luka dan sakit gigi. Senyawa metabolit yang terkandung pada daun pulutan ini dapat memberikan efek pengobatan (Meiviani, 2022).

Berdasarkan data empiris, daun pulutan mempunyai manfaat sebagai obat diabetes, demam dan penyembuhan luka. Pada hasil uji praklinik daun pulutan menunjukan bahwa daun ini berpotensi sebagai antioksidan (Meiviani, 2022).

## B. Simplisia

### 1. Definisi simplisia

Simplisia adalah bahan yang digunakan sebagai obat dan belum mengalami pengolahan apapun, kecuali dinyatakan lain, berupa bahan yang dikeringkan. Menurut Badan Penerapan Teknologi, simplisia merupakan tanaman obat yang belum dilakukan pengolahan kecuali hanya proses pengeringan (Kusuma *et al.*, 2023). Simplisia dapat dikelompokan menjadi tiga jenis yaitu simplisia nabati, simplisia hewani, dan simplisia pelikan.

### 2. Pembuatan simplisia

**2.1 Pengumpulan bahan baku.** Pengumpulan simplisia dilakukan berdasarkan pada pedoman panen, pengumpulan bahan baku perlu diperhatikan cara pengambilannya agar dapat menghasilkan senyawa yang diinginkan. Pengumpulan daun pulutan dilakukan pada saat proses fotosintesis berlangsung maksimal, agar didapatkan kandungan senyawa aktif yang optimal (Depkes, 1985).

**2.2 Sortasi basah.** Sortasi basah ini digunakan untuk menghilangkan kotoran-kotoran asing dari bahan simplisia yang sudah dipanen. Bahan bahan asing seperti tanah harus dibuang, karena tanah mengandung mikroba dalam jumlah yang banyak. Pembersihan simplisia dari tanah dapat mengurangi jumlah mikroba awal (Depkes, 1985).

**2.3 Pencucian.** Pencucian ini dilakukan untuk menghilangkan tanah dan pengotoran yang melekat pada simplisia. Pencucian ini dilakukan dengan air bersih. Pencucian dilakukan 3 kali, jumlah mikroba yang tertinggal hanya 42% dari jumlah mikroba awal. Proses ini tidak dapat membersihkan simplisia semua mikroba karena air juga mengandung sejumlah mikroba (Depkes, 1985).

**2.4 Perajangan.** Perajangan dilakukan untuk mempermudah proses berikutnya. Tanaman perlu dilakukan pengeringan terlebih dahulu selama 1 hari sebelum dilakukan perajangan. Perajangan yang terlalu tipis dapat menghilangkan zat berkhasiat yang mudah menguap (Depkes, 1985).

**2.5 Pengeringan.** Proses ini bertujuan untuk mendapatkan simplisia yang tidak mudah rusak. Dengan mengurangi kadar air dan menghentikan reaksi enzimatik dapat mencegah penurunan mutu atau perusakan simplisia. Air yang tersisa dalam simplisia dapat ditumbuhki oleh kapang dan jasad renik lainnya. Dari hasil penelitian terdahulu

diketahui bahwa reaksi enzimatis tidak berlangsung bila kadar air simplisia kurang dari 10% (Depkes, 1985).

**2.6 Sortasi kering.** Tujuan dari sortasi kering untuk memisahkan benda-benda asing yang tidak diinginkan yang masih tertinggal pada simplisia (Depkes, 1985).

**2.7 Pengepakan dan penyimpanan.** Simplisia dapat rusak karena ada beberapa faktor diantaranya cahaya, oksigen, reaksi kimia intern, dehidrasi, penyerapan air, pengotoran, serangga, dan kapang. Kerusakan pada simplisia dapat mengakibatkan kemunduran mutu (Depkes, 1985).

## C. Ekstraksi

### 1. Definisi ekstraksi

Ekstraksi merupakan proses pengambilan senyawa dengan pelarut tertentu (Sari *et al.*, 2021). Menurut Farmakope Indonesia edisi IV, ekstrak adalah sediaan kental yang diperoleh dengan mengekstraksi senyawa aktif dari simplisia menggunakan pelarut yang sesuai (Zulharmitta *et al.*, 2017). Ekstraksi dapat dilakukan dengan metode panas dan metode dingin. Pemilihan metode ekstraksi tergantung pada sifat simplisia dan senyawa yang ingin diisolasi (Mukhtarini, 2014).

### 2. Prinsip ekstraksi

Prinsip dari ekstraksi adalah menarik senyawa dengan menggunakan pelarut yang tepat. Senyawa polar akan mudah larut dalam pelarut polar, sedangkan senyawa non polar akan larut ke dalam pelarut non polar (Emilan *et al.*, 2011).

### 3. Metode ekstraksi

Proses ekstraksi bahan alam melibatkan berbagai metode dengan memanfaatkan pelarut organik atau pelarut air. Dalam ekstraksi cair-padat, bahan tanaman bersentuhan langsung dengan pelarut, dimana prosesnya berlangsung secara dinamis dan dapat dibagi menjadi beberapa tahap. Pelarut yang digunakan harus memiliki kemampuan melarutkan metabolit tanaman dan mendorong difusi metabolit keluar dari sel, sehingga jumlah zat yang diekstraksi dapat dimaksimalkan. Beberapa metode yang umum digunakan dalam ekstraksi bahan alam mencakup berbagai teknik yang efektif dan efisien (Najib, 2018). Metode ekstraksi berdasarkan energi yang digunakan dibagi menjadi 2 yaitu:

**3.1 Ekstraksi cara panas.** Ekstraksi cara panas lebih cepat dalam mendapatkan senyawa yang diinginkan sebab panas dapat memperbesar

kelarutan senyawa. Ekstraksi panas ini mempunyai kelemahan yaitu dapat membentuk senyawa baru (Emilan *et al.*, 2011). Ekstraksi cara panas dapat dibedakan menjadi:

**3.1.2 Soxhlet.** Soxhlet adalah metode ekstraksi yang memanfaatkan pelarut baru secara terus-menerus, dilakukan menggunakan alat khusus. Proses ini memungkinkan ekstraksi berlangsung secara kontinu dengan jumlah pelarut yang tetap stabil dikarenakan adanya sistem pendingin balik (Najib, 2018).

**3.1.3 Infusa.** Infusa adalah proses ekstraksi dengan pelarut air pada temperatur 90°C selama 15-20 menit. Metode ini dilakukan dengan merendam sampel dalam bejana (Najib, 2018).

**3.1.4 Dekok.** Dekok adalah proses ini sama dengan infus tetapi waktu yang digunakan lebih lama yaitu 30 menit (Najib, 2018).

**3.2 Ekstraksi cara dingin.** Ekstraksi ini dikhususkan untuk senyawa yang tidak tahan terhadap pemanasan (Emilan *et al.*, 2011).

**3.2.3 Maserasi.** Proses ekstraksi yang paling sederhana, dengan beberapa kali penggojokan pada suhu ruang. Sehingga metode ini masih digunakan secara luas. Prosedur dilakukan dengan merendam bahan tanaman (simplisia) dalam pelarut yang sesuai dalam wadah tertutup pada suhu kamar. Metode ini baik untuk ekstraksi pendahuluan dengan jumlah besar. Pengadukan sesekali ataupun secara konstan (dengan menggunakan alat pengocok mekanik untuk menjamin kehomogenan) dapat meningkatkan kecepatan ekstraksi. Proses ekstraksi dihentikan ketika tercapai keseimbangan antara konsentrasi metabolit dalam ekstrak dan dalam bahan tanaman. Setelah ekstraksi, residu bahan tanaman (maserat) harus dipisahkan dari pelarut. Hal ini melibatkan proses pemisahan kasar dengan cara dekantasi, biasanya diikuti dengan tahap penyaringan. Sentrifugasi mungkin diperlukan jika serbuk terlalu halus disaring. Untuk memastikan ekstraksi yang menyeluruh, umumnya dilakukan maserasi pendahuluan, yang diikuti pemisahan dan penambahan pelarut baru (fresh solvent) ke maserat. Hal ini bisa dilakukan secara periodik dengan semua filtrat dikumpulkan. Kelemahan yang utama dari maserasi adalah prosesnya cukup memakan waktu yang lama, dapat berlangsung beberapa jam sampai beberapa minggu. Ekstraksi secara menyeluruh juga dapat menghabiskan sejumlah besar volume pelarut dan dapat berpotensi hilangnya metabolit. Selain itu, beberapa senyawa tidak terekstraksi secara efisien jika kurang

terlarut pada temperatur kamar, maserasi tidak menyebabkan degradasi dari metabolit yang tidak tahan panas (Sugiat, 2010).

**3.2.2 Perkolasi.** Proses penyarian simplisia yang dilakukan pada temperatur kamar menggunakan pelarut yang selalu baru, jika penyarian sudah sempurna maka penambahan pelarut dihentikan (Najib, 2018).

#### **D. Pelarut Etanol**

Etanol adalah pelarut organik yang banyak digunakan dalam proses ekstraksi, sebagaimana dibuktikan oleh berbagai penelitian. Pemilihan pelarut etanol disebabkan oleh beberapa faktor diantaranya pelarut etanol selektivitas, ramah lingkungan dan aman digunakan (Depkes, 2002). Pelarut etanol mempunyai tingkat toksitas yang relatif rendah dibandingkan pelarut lain. Selain itu, etanol memiliki harga yang terjangkau, fleksibilitas dalam berbagai metode ekstraksi, serta keamanannya untuk produk yang akan digunakan dalam makanan atau obat-obatan. Hal-hal tersebut menjadikan etanol sebagai pilihan unggul dalam berbagai aplikasi ekstraksi (Hakim & Saputri, 2020).

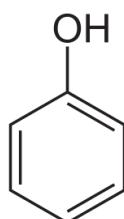
Konsentrasi dari etanol sangat mempengaruhi hasil dari ekstrak yang didapatkan. Jika konsentrasi etanol meningkat, maka etanol dapat meningkatkan laju pelarut dan ekstraksi melalui ikatan hidrogen atau gaya van der waals. Konsentrasi etanol lebih dari 70% maka laju ekstraksi sedikit menurun, hal ini disebabkan denaturasi protein yang meningkatkan resistensi difusi pada konsentrasi etanol (Fan *et al.*, 2020).

Pelarut etanol 96% mampu melarutkan senyawa yang bersifat polar seperti flavonoid, fenol. Etanol sebagai pelarut memiliki kelebihan diantaranya tidak beracun, netral, absorbsinya baik, memerlukan panas yang lebih sedikit untuk proses pemekatan dan zat penganggu yang larut terbatas. Pelarut etanol mudah melarutkan senyawa yang sesuai dengan cepat karena sifat kepolarnya yang tinggi dan memiliki harga yang terjangkau. Etanol 96% dapat mengekstraksi senyawa dari golongan flavonoid, steroid, dan tannin (Guenther, 2006).

Pada pelarut etanol 70% merupakan pelarut yang mudah diperoleh, tidak menyebabkan pembengkakan pada membran sel dan memperbaiki stabilitas dalam bahan pelarut, tidak mudah menguap, kemampuan absorbansi yang baik, serta dapat melarutkan minyak atsiri, glikosida, kurkumin, antrakuinon, flavonoid, steroid, tanin dan saponin. Pelarut etanol dapat menarik senyawa-senyawa yang larut dalam pelarut non polar hingga polar (Depkes, 2000).

### E. Fenol

Senyawa fenol mempunyai bau yang khas serta berbentuk kristal tak berwarna, sering disebut juga dengan nama senyawa asam karbon. Rumus kimia dari senyawa fenol adalah  $C_6H_5OH$  dan mempunyai gugus aromatis yang berikatan dengan -OH (Fessenden, 1984). Senyawa fenolik pada tumbuhan dapat berupa senyawa fenol sederhana, antrakuinon, asam fenolat, kumarin, flavonoid, dan tanin (Harborne, 1987).



**Gambar 2. Struktur Senyawa Fenol (Putri et al., 2019)**

Senyawa fenolik pada tumbuhan dengan family *euphorbiaceae* banyak ditemukan lebih dari 26 spesies di Mancanegara dengan 190 senyawa fenolik. Senyawa ini dapat bermanfaat sebagai antikanker, antimikroba, antioksidan dan antidiabetes (Megawati *et al.*, 2021). Senyawa sebagai antioksidan dapat menstabilkan radikal bebas, sehingga dapat mereduksi radikal bebas (Luntungan *et al.*, 2017).

Fenol yang dihasilkan dari lintasan asam sikimat diantaranya adalah asam sinamat, p-kumarat, kafeat dan ferulat. Senyawa-senyawa tersebut dapat diubah menjadi beberapa turunan diantaranya fitoaleksin, kumarin, lignin dan berbagai flavonoid. Fenol lainnya seperti asam klorogenat dan asam protokatekuat dapat berfungsi dalam resistensi penyakit pada tumbuhan dan asam galat yang diubah menjadi glutamin berfungsi sebagai ketahanan tumbuhan dan menghambat pertumbuhan spesies lain disekitar tumbuhan tersebut.

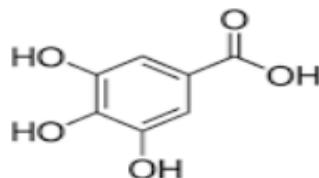
Senyawa fenol bersifat toksik dan korosif pada kulit sehingga dapat mengakibatkan iritasi. Tingkat toksitas fenol dipengaruhi oleh jumlah atom atau molekul yang terikat pada rantai benzena (Depkes, 2024).

Senyawa fenolik mempunyai struktur kimia umum yang terdiri dari cincin aromatik dengan satu atau lebih gugus hidroksil yang dapat dibagi menjadi beberapa kelas, dan kelompok utama, senyawa fenolik meliputi asam fenolik, tanin, stilben, dan lignan. Sedangkan, Polifenol adalah antioksidan paling umum yang sering dijumpai pada buah dan sayuran. Senyawa polifenol memiliki daya antioksidan yang baik karena

golongan ini dapat memberikan elektronnya untuk menetralkan elektron radikal bebas yang terbentuk dalam tubuh (Dhianawaty & Ruslin, 2015).

### **F. Asam Galat**

Penelitian ini menggunakan asam galat sebagai larutan standar. Asam galat dipilih menjadi larutan standar karena merupakan salah satu fenol alami dan relative dibanding senyawa fenol lain. Asam galat adalah asam trihidroksi benzoat, yang tergolong asam fenol sederhana. Asam galat ini memiliki aktivitas antioksidan yang tinggi (Lee *et al.*, 2003). Senyawa asam galat ini banyak ditemukan pada anggur merah dan teh hijau. Efek farmakologi asam galat dapat berupa antidiabetes, antitumor, antibiotic neuroprotective, cardioprotective (Refilda *et al.*, 2023).



**Gambar 3. Struktur Asam Galat (Junaidi & Anwar, 2018)**

### **G. Analisis kandungan kimia**

Analisis daun pulutan (*Urena lobata* L.) dilakukan beberapa pengujian diantaranya uji organoleptis, dan uji fitokimia.

#### **1. Uji organoleptis**

Simplisia yang baik memiliki aroma, rasa, bentuk dan warna yang tidak serupa dengan tanaman asalnya, sehingga dapat dipastikan secara organoleptis simplisia yang dihasilkan merupakan simplisia tanaman yang dimaksud (Depkes, 1995).

#### **2. Uji fitokimia**

Uji fitokimia merupakan suatu pemeriksaan golongan senyawa kimia yang terdapat dalam suatu simplisia tumbuhan. Uji tersebut dapat digunakan untuk membuktikan ada tidaknya senyawa kimia tertentu dalam tumbuhan yang berperan penting dalam penyembuhan penyakit (Harborne JB., 1987).

##### **2.1 Uji flavonoid**

Reaksi senyawa flavonoid terbentuk warna jingga menggunakan reaksi Mg dan HCl. Tujuan penambahan serbuk Mg dan HCl untuk mengidentifikasi senyawa flavonoid bertujuan untuk mereduksi inti

benzopiriron yang ada pada struktur flavonoid sehingga terjadi perubahan warna membentuk garam flavillium. Penambahan HCl dapat mengakibatkan reaksi oksidasi reduksi antara logam Mg sebagai pereduksi dengan senyawa flavonoid (Dewi, 2020)

**2.2 Uji tannin.** Uji senyawa tanin dilakukan dengan menambahkan reagen  $\text{FeCl}_3$ . Hasil positif tanin ditandai dengan adanya perubahan warna menjadi hijau kehitaman. Hal ini dikarenakan terjadi proses pembentukan senyawa kompleks antara Fe dan tanin yang disebabkan oleh adanya ion  $\text{Fe}^{3+}$  sebagai atom pusat dan tanin yang memiliki atom O yang memiliki elektron bebas yang mengkoordinasikan ke atom pusat sebagai lignannya (Ergina *et al.*, 2014).

**2.3 Uji saponin.** Uji saponin ini dilakukan dengan penambahan 5 mL aquades kemudian dikocok, maka terdapat buih. Jika buih tersebut tetap ada selama 30 detik maka identifikasi menunjukkan adanya saponin. Saponin memiliki gugus polar dan non polar sehingga ketika dikocok dengan aquades akan terbentuk misel. Pada struktur misel gugus polar akan berada di bagian luar sedangkan gugus yang bersifat non polar akan berada pada bagian terdalam yang dapat menyebabkan saponin berbusa (Harborne J.B., 1987). Buih atau busa ini menunjukkan adanya glikosida yang mempunyai kemampuan membentuk buih dalam air yang terhidrolisis menjadi glukosa dan senyawa lain (Agustina, 2017).

**2.4 Triterpenoid.** Senyawa metabolit yang merupakan senyawa turunan terpenoid yang memiliki kerangka karbon yang tersusun atas enam satuan isoprena (2-metilbuta1,3-diene). Senyawa triterpenoid dapat berbentuk siklik maupun asiklik. Triterpenoid juga diketahui banyak tersusun atas gugus aldehida, alkohol atau asam karboksilat. Triterpenoid memiliki beberapa manfaat dalam bidang kesehatan, antara lain sebagai senyawa antikanker, sebagai senyawa antioksidan, antiinflamasi, mampu mencegah berbagai penyakit seperti obesitas, hipertensi, dan diabetes (Khafid *et al.*, 2023)

## **H. Kromatografi Lapis Tipis (KLT)**

Kromatografi lapisan tipis (KLT) merupakan metode pemisahan komponen-komponen atas dasar perbedaan adsorbsi atau partisi oleh fase diam di bawah pengaruh gerakan pelarut pengembang atau pelarut

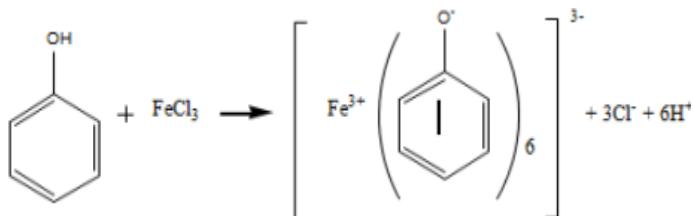
pengembang campur. Pemilihan pelarut pengembang sangat dipengaruhi oleh macam dan polaritas zat-zat kimia yang dipisahkan.

Kromatografi lapis tipis (KLT) adalah salah satu cara untuk memisahkan suatu komponen berdasarkan adsorpsi dan partisi. Absorben yang digunakan berupa bubuk halus dari silika gel yang dibuat serba rata di atas lempeng kaca. Ukuran partikel absorben halus, agar lapisan adsorben pada lempeng kaca berbentuk rata dan homogen, sehingga rembesan dari cairan pengelusi cepat dan rata, dengan demikian komponen dapat terpisah baik. Perbandingan kecepatan bergeraknya komponen terlarut dalam fase gerak adalah dasar untuk mengidentifikasi komponen yang dipisahkan, perbandingan kecepatan ini dinyatakan dalam  $R_f$  (Retardation of factor).

$$R_f = \frac{\text{jarak yang terbentuk oleh senyawa dari titik asal sampai noda}}{\text{jarak yang ditempuh oleh eluen dari titik asal sampai batas atas}}$$

Nilai  $R_f$  nilai dapat dipengaruhi oleh beberapa faktor: a. Ukuran partikel dari absorben, b. Derajat keaktifan dari lapisan adsorben, c. Kemurnian pelarut, d. Kosentrasi pelarut, e. Kejenuhan ruang elusi, f. Temperatur, g. Keterampilan bekerja dengan memakai KLT. Pemisahan senyawa yang amat berbeda seperti senyawa organik alam, senyawa organik sintetik, kompleks anorganik-organik, dan bahkan ion organik, dapat dilakukan dalam beberapa menit dengan alat yang harganya tidak terlalu mahal (Ibriani, 2012).

Uji kromatografi lapis tipis senyawa fenol dilakukan dengan cara menambahkan  $FeCl_3$  sebagai reaksi penyemprot. yang ditandai dengan terbentuknya warna hijau, merah, ungu, biru atau hitam pekat yang terjadi ketika  $FeCl_3$  bereaksi dengan gugus hidroksil yang ada pada senyawa fenol.



Gambar 4. Reaksi senyawa fenol dengan  $FeCl_3$  (Sagar, 2016)

## I. Penetapan Kadar Fenol

Penentuan kadar total fenol pada suatu sampel digunakan larutan standar yaitu asam galat. Asam galat digunakan sebagai larutan standar karena asam galat termasuk salah satu fenol alami yang mempunyai aktivitas antioksidan yang kuat. Asam galat merupakan turunan senyawa fenolik dari asam hidroksi benzoat yang termasuk ke dalam golongan asam fenol sederhana. Asam galat dipilih sebagai standar berdasar atas tersedianya substansi yang relatif lebih stabil dan reaktif (Suhaenah, 2016).

Reagen Folin-Ciocalteu digunakan sebagai pereaksi pada pengujian kadar total fenol yang memiliki prinsip yaitu terbentuknya senyawa kompleks berwarna biru yang dapat diukur pada panjang gelombang 765 nm. Senyawa fenolik bereaksi dengan reagen Folin-Ciocalteu hanya dalam suasana basa agar terjadi disosiasi proton pada senyawa fenolik menjadi ion fenolat. Untuk menciptakan kondisi basa digunakan NaOH 1%. Saat reaksi berlangsung, terjadi juga reaksi antara gugus hidroksil pada senyawa fenolik dengan reagen Folin-Ciocalteu. Reaksi tersebut membentuk kompleks yang disebut molybdenum-tungsten yang memiliki warna biru dan dapat diukur serapannya menggunakan spektrofotometer. Semakin besar konsentrasi senyawa fenolik, maka warna biru yang dihasilkan juga akan semakin pekat (Purgiyanti *et al.*, 2019).

Sebelum memeriksa kadar total fenol dalam suatu ekstrak, dilakukan pembuatan kurva larutan standar asam galat terhadap absorbansi terlebih dahulu, yaitu dibuat kurva persamaan regresi liner  $y = ax + b$ . Hasil dari pemeriksaan kadar total fenol ekstrak tersebut dilakukan dengan mengukur absorbansi larutan sampel, lalu menghitung kadar total fenol dengan menggunakan persamaan regresi liner yang telah diperoleh dari larutan standar (Purgiyanti *et al.*, 2019).

## J. Spektrofotometri UV-Vis

### 1. Definisi spektrofotometri

Spektrofotometer merupakan alat yang terdiri dari spektrometer dan fotometer. Spektrometer dapat menghasilkan sinar dari spektrum panjang gelombang tertentu, sedangkan fotometer alat yang dapat mengukur intensitas cahaya yang ditransmisikan dan diabsorbsi (Khophar, 1990).

Spektrofotometer UV-Vis merupakan pengukuran Panjang gelombang dan intensitas sinar ultraviolet dan cahaya tampak yang diabsorbsi oleh sampel. Sinar ultraviolet dan sinar tampak dapat mempromosikan elektron pada kulit terluar ke tingkat yang lebih tinggi. Alat ini biasanya digunakan untuk molekul dan ion non anorganik di dalam larutan (Dachriyanus, 2004).

Spektrum dari alat spektrofotometer dapat berguna untuk pengukuran secara kuantitatif. Konsentrasi analit dapat diukur dengan menggunakan hukum Lambert-Beer. Metode spektrofotometer UV-Vis ini menggunakan teknik analisis yang menggunakan sinar UV pada panjang gelombang sebesar 100-400 nm dan sinar tampak pada panjang gelombang 400-750 nm.

Prinsip kerja spektrofotometer UV-Vis didasarkan pada kemampuan sampel untuk menyerap cahaya pada panjang gelombang tertentu (Abriyani *et al.*, 2022). Hasil pengukuran menggunakan spektrofotometer UV-Vis dapat dimanfaatkan untuk analisis kualitatif (Shinde *et al.*, 2022).

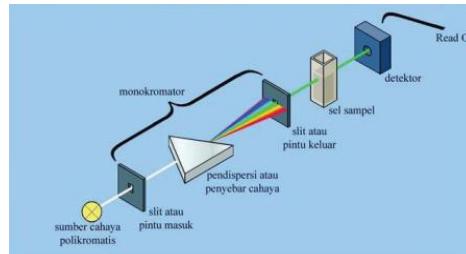
## 2. Prinsip kerja

Metode spektrofotometri didasarkan pada pengukuran sinar monokromatis oleh suatu lajur yang berwarna dengan Panjang gelombang khusus dengan menggunakan prisma atau difraksi dengan detektor fototube. Prinsipnya adalah cahaya yang datang merupakan sinar polikromatik yang dilewatkan melalui monokromator yang dapat diubah menjadi sinar monokromatis, sehingga dapat diteruskan melalui sel yang berisi sampel. Sebagian dari sinar akan diserap oleh sel dan sebagian lagi akan diteruskan ke fotosel yang dapat mengubah energi cahaya menjadi listrik. Energi listrik dapat memberikan sinyal pada detektor yang dapat mengubah menjadi serapan dari zat yang dianalisa (Amiliza & Legasari, 2022).

Prinsip kerja spektrofotometri menurut hukum Lambert-Beer jika suatu monokromatis dilewatkan pada larutan yang tebalnya sebesar  $dB$ , maka intensitas akan turun sebesar  $dl$ , berbanding langsung dengan intensitas sinar datang (Amiliza & Legasari, 2022).

## 3. Instrumen Spektrofotometer Ultraviolet-Visible (UV-Vis)

Komponen-komponen yang ada dalam spektrometri UV-Vis meliputi sumber tenaga radiasi, monokromator, kuvet, detektor, dan spektrum yang dapat digambarkan sebagai berikut:



**Gambar 5. Diagram Spektrofotometer (Suhartati, 2017)**

**3.1 Sumber Tenaga Radiasi.** Lampu hidrogen atau lampu deuterium dapat digunakan untuk sumber pada daerah UV. Pada lampu wolfram adalah energi radiasi yang dibebaskan tidak bervariasi pada bagian Panjang gelombang. Agar memperoleh tegangan yang stabil dapat digunakan transformator. Jika potensial tidak stabil maka dapat memberikan energi yang bervariasi (Khophar, 1990).

**3.2 Monokromator.** Monokromator dapat berperan dalam menghasilkan radiasi monokromatik dari sumber radiasi yang dapat memancarkan radiasi polikromatik. Pada komponen ini terdiri dari slit (celah), filter, prisma, kisi dan celah keluar (Sumardi, 2005).

**3.3 Kuvet.** Digunakan untuk wadah sampel yang dianalisis. Kuvet terdapat dua jenis yaitu kuvet dari leburan silika dan kuvet dari gelas. Kuvet dari silika dapat digunakan untuk Analisa kuantitatif dan kualitatif dengan rentang pengukuran 190-110 nm, sedangkan pada kuvet gelas dapat digunakan pada rentang pengukuran 380-1100 nm (Sumardi, 2005).

**3.4 Detector.** Detector dapat berperan merespon cahaya dari berbagai Panjang gelombang. (Khophar, 1990). Detektor pada spektrofotometer UV-Vis sangat menentukan kualitas pada alat spektrofotometri UV-Vis (Sumardi, 2005).

#### 4. Kesalahan pengukuran dengan spektrofotometri UV-Vis

Kesalahan pada pengukuran menggunakan spektrofotometri UV-Vis dapat disebabkan oleh beberapa alasan, misalnya dari beberapa zat seperti protein yang dapat melekat kuat pada sel dan sulit dibersihkan, sidik jari yang dapat menyerap radiasi ultraviolet. Pemeriksaan Panjang gelombang yang diterapkan oleh perangkat sangat penting, jika penyimpanan atau ketidakakuratan dalam sirkuit, maka perlu dilakukan perbaikan. Kesalahan dapat terjadi jika sampel tidak diambil dengan hati-hati dan tidak direncanakan dengan baik (Sari, 2024).

## K. Landasan Teori

Tanaman pulutan adalah tanaman yang dapat berkhasiat sebagai obat yang mengandung senyawa sekunder yang tersebar di seluruh bagian tanaman, salah satunya adalah fenol. Senyawa fenol adalah senyawa yang mempunyai satu atau lebih gugus hidroksil yang terikat pada cincin aromatik. Pada tanaman, senyawa fenol dapat disintesikan pada kloroplas daun dan dapat menumpuk di dalam vakuola sel daun yang bermanfaat untuk memperkuat dinding sel (Kalevitch & Borsari, 2012). Senyawa fenol merupakan molekul yang sederhana dan mudah diserap oleh sistem tubuh manusia yang dimanfaatkan sebagai antioksidan (Anonim, 2024). Senyawa fenol telah dipelajari secara ekstensif sebagai desinfektan yang memiliki aktivitas antibakteri, terhadap bakteri gram negatif dan bakteri gram positif.

Penetapan kadar fenol dapat dilakukan dengan beberapa metode diantaranya, metode kromatografi lapis tipis, kromatografi kertas, kromatografi gas, kromatografi cair kinerja tinggi, serta elektroforesis kapiler (Khoddami *et al.*, 2013). Namun, metode tersebut mempunyai kekurangan yaitu memerlukan waktu dan tenaga yang cukup besar, sehingga diperlukan pengembangan teknik analisis yang lebih cepat dan dipercaya (Ratnasari *et al.*, 2016).

Spektrofotometri UV-VIS merupakan metode yang efektif sebab dapat digunakan untuk menganalisis berbagai zat organik dan anorganik dengan selektivitas tinggi. Instrumen ini mempunyai akurasi yang baik, dengan kesalahan relatif hanya 1%-3%, analisis dapat dilakukan secara cepat dan tepat, bahkan untuk mengukur jumlah zat dalam konsentrasi sangat kecil. Selain itu, hasil pengukuran yang dihasilkan cukup akurat, dengan data yang langsung dicatat oleh detektor dan tercatat dalam bentuk angka digital atau grafik yang diregresi.

Sebelum menentukan kadar senyawa, yang harus dilakukan yaitu menentukan ekstraksi untuk memperoleh senyawa bioaktif dari simplisia tanaman. Pemilihan metode dan jenis pelarut dalam proses ekstraksi menjadi faktor penting dalam menghasilkan ekstrak dengan kandungan senyawa bioaktif yang tinggi. Mengingat potensi besar senyawa fenol pada daun pulutan, penelitian ini dilakukan untuk menentukan cairan penyari yang paling efektif dalam menghasilkan kadar fenol total tertinggi. Penelitian ini membandingkan pengaruh konsentrasi pelarut. Pelarut yang digunakan etanol 70% dan etanol 96%. Pelarut harus

disesuaikan dengan kepolaran senyawa yang ingin diambil. Menurut prinsip *like dissolves like*, suatu pelarut akan cenderung molarutkan senyawa yang mempunyai tingkat kepolaran yang sama. Pelarut polar akan molarutkan senyawa polar dan sebaliknya.

Menurut Nur dan Astawan (2011) senyawa fenol memiliki sifat kepolaran yang luas. Septiana dan Asnaini (2012) menyatakan bahwa kelarutan senyawa fenolik tidak selalu terdapat pada pelarut dengan kepolaran tinggi karena senyawa fenolik terdiri dari molekul- molekul dengan beragam struktur sehingga mempengaruhi kelarutannya. Menurut penelitian Kurniawati (2016) di antara konsentrasi etanol 96% dan etanol 80% pada penetapan kadar fenol dan nilai kadar air yang mempunyai nilai tertinggi adalah pelarut etanol 96% dengan metode ekstraksi maserasi selama 48 jam. Menurut Nurhasanah *et al.* (2023), ekstraksi daun *Bauhinia purpurea* menggunakan etanol 70% menghasilkan kadar fenol total sebesar 14,644 mg GAE/g, lebih tinggi dibandingkan etanol 96% yang hanya menghasilkan 7,176 mg GAE/g. Hal ini menunjukkan bahwa campuran etanol-air lebih optimal dalam molarutkan senyawa fenolik pada tanaman tersebut. Namun, tidak semua tanaman menunjukkan hasil yang sama. Rizki *et al.* (2022) melaporkan bahwa ekstrak daun cempedak (*Artocarpus integer*) yang diekstraksi menggunakan etanol 96% menghasilkan kadar fenol total tertinggi sebesar 31,14%, sedangkan pada ekstrak dengan etanol 70% sebesar 29,55%.

Menurut Farmakope Herbal (2017) pembuatan ekstrak dengan metode maserasi dapat digunakan pelarut etanol 70%. Etanol 70% merupakan campuran etanol dan air dengan polaritas sedang, sehingga dapat menarik senyawa metabolit sekunder seperti fenol, flavonoid, saponin, dan tanin. Pada penggunaan etanol 70% aman untuk dikonsumsi manusia dan sesuai untuk sediaan obat tradisional maupun fitofarmaka. Kandungan alkoholnya cukup tinggi untuk mencegah pertumbuhan mikroorganisme, namun cukup mengandung air untuk mengekstraksi senyawa polar secara efektif. Dengan demikian, etanol 70% menjadi pilihan pelarut yang ideal untuk metode maserasi karena efisien, selektif, dan ramah terhadap stabilitas senyawa aktif dalam ekstrak tanaman obat. Sehingga pada penelitian ini peneliti berkeinginan membuktikan bahwa dengan membandingkan konsentrasi etanol 70% dan 96% yang paling optimal dalam menetapkan kadar dari senyawa fenol tertinggi

## **H. Hipotesis**

Hipotesis dalam penelitian ini adalah:

1. Diantara pelarut etanol konsentrasi 70% dan 96% yang dapat menghasilkan rendemen ekstrak etanolik daun pulutan (*Urena Lobata* L.) dengan nilai tertinggi yaitu pelarut konsentrasi 70%.
2. Diantara ekstrak daun pulutan dengan pelarut etanol 70% dan etanol 96% yang dapat menghasilkan kadar fenol daun pulutan (*Urena Lobata* L.) dengan kadar tertinggi yaitu ekstrak daun pulutan etanol 96%.