

AKTIVITAS MUKOLITIK FRAKSI METANOL DARI EKSTRAK ETANOL DAUN SIRIH MERAH (*Piper crocotum* Ruiz and Pav.) PADA MUKOSA USUS SAPI DAN KANDUNGAN KIMIANYA

Ririn Lispita Wulandari¹⁾, Yulias Ninik Windriyati¹⁾, Aqnes Budiarti¹⁾

¹⁾ Fakultas Farmasi Universitas Wahid Hasyim Semarang

INTISARI

Sirih merah (*Piper crocotum* Ruiz and Pav.) merupakan tanaman obat yang dapat mengatasi beragam penyakit, salah satunya adalah batuk. Penelitian ini bertujuan untuk mengetahui aktivitas mukolitik fraksi metanol ekstrak etanol daun sirih merah pada mukosa usus sapi secara *in vitro* dan mengidentifikasi golongan senyawa aktifnya.

Ekstrak etanol daun sirih merah dibuat dengan metode maserasi menggunakan penyari etanol 70%, sedangkan fraksi metanol diperoleh dari fraksinasi ekstrak etanol secara bertingkat menggunakan pelarut petroleum eter, etil asetat, dan metanol. Fraksi metanol yang diperoleh dibuat seri konsentrasi yaitu 0,1%; 0,3%; 0,5%; 0,7%; 0,9% dalam larutan mukus sapi 80%. Aktivitas mukolitik diuji menggunakan Viskometer Rion, dan asetilsistein 0,1% sebagai kontrol positif. Identifikasi golongan senyawa aktif menggunakan kromatografi lapis tipis. Viskositas mukus sapi dianalisis secara statistik. Uji normalitas menggunakan *Shapiro Wilk*, uji statistik non parametrik menggunakan *Kruskal Wallis*, dan dilanjutkan menggunakan uji *Mann Whitney* dengan taraf kepercayaan 95%.

Hasil penelitian menunjukkan bahwa fraksi metanol memiliki aktivitas mukolitik, sementara pada konsentrasi 0,3% setara dengan asetilsistein 0,1%. Fraksi metanol mengandung senyawa golongan saponin, flavonoid, dan polifenol.

Kata kunci : daun sirih merah, mukolitik, mukus sapi

ABSTRACT

Red betel leaves (*Piper crocotum* Ruiz and Pav.) can cure many kinds of diseases, including cough. The aim of this research is to determine mucolitic activity of methanol fraction from ethanol extract of red betel leaves on cow's intestine mucous *in vitro* and to identify its active compound group.

Ethanol extract of red betel leaves was made by maceration method using ethanol 70%. Methanol fraction was made from ethanol extract by partitioned gradually using petroleum eter, ethyl acetate, and methanol. The obtained methanol fraction was made serial concentration started from 0.1%, 0.3%, 0.5%, 0.7%, 0.9% in 80% cow's mucous. The mucolitic activity was tested using Viscometer Rion, and 0.1% acethylcystein as positive control. Identification the active compound using thin layer chromatography. The viscosity cow's mucous analyzed statistically. Normality test using Shapiro Wilk, non parametric statistic test using Kruskal Wallis, and then continued using Mann Whitney Test with degree of trust of 95%.

The result shows that methanol fraction has mucolitic activity whether at concentration 0.3% is equivalent to 0.1% acethylcystein. Methanol fraction contains saponin, flavonoid, and polyphenol.

Key words: red betel leaves, mucolitic, cow's mucous

PENDAHULUAN

Batuk merupakan gangguan yang umum dan sering dialami oleh semua orang. Batuk yang tak kunjung reda kerap mengganggu aktivitas sehari-hari. Meskipun batuk biasanya terjadi akibat rangsangan di saluran napas, tetapi banyak pula jenis batuk yang disebabkan oleh adanya kelainan dalam tubuh (Tjay dan Raharja, 2007). Batuk merupakan gangguan saluran napas yang masih menjadi salah satu masalah terbesar di Indonesia pada saat ini. Hal inilah yang mendorong penelitian

tanaman obat yang dapat digunakan untuk pengobatan batuk karena bahan alamiah lebih murah, lebih aman dan tidak menimbulkan efek samping yang membahayakan.

Tanaman sirih merah merupakan tanaman yang memiliki banyak khasiat untuk mengatasi beragam penyakit. Daun tanaman ini secara empiris telah dimanfaatkan untuk mengatasi batuk, TBC, diabetes, kanker payudara, maag, batu ginjal, radang mata, keputihan, demam berdarah, penyakit jantung dan kolesterol. Berdasarkan pemeriksaan skrining fitokimia, daun sirih merah mengandung

flavonoid, alkaloid, senyawa polifenolat, dan tanin (Sudewo, 2005).

Penelitian yang dilakukan Maretta pada tahun 2006 menunjukkan bahwa terdapat aktivitas mukolitik pada ekstrak n-heksan dan etanol herba *Piper miniatum* Bl terhadap mukosa usus sapi secara *in vitro* dan golongan senyawa aktif yang terdapat dalam ekstrak etanol tersebut adalah senyawa golongan flavonoid, terpenoid dan saponin. Terdapat pula penelitian lain yang menyimpulkan bahwa minyak atsiri daun sirih (*Piper betle* L.) memiliki aktivitas mukolitik (Sulistiawati, 2003), dan ekstrak air daun sirih (*Piper betle* L.) dapat menurunkan kekentalan mukus sehingga dapat mengurangi batuk (Arifin, 2004). Namun hingga saat ini, belum ada penelitian ilmiah tentang aktivitas mukolitik fraksi metanol dari ekstrak etanol daun sirih merah (*Piper crocotum* Ruiz and Pav.) pada mukosa usus sapi secara *in vitro* sehingga dilakukan penelitian ini.



Gambar 1. Tanaman Sirih Merah

METODOLOGI

Bahan

Daun sirih merah diperoleh dari perkebunan tanaman sirih merah di Kopeng, Salatiga Jawa Tengah, dan dipanen pada bulan Juni 2010; etanol 70% *pharmaceutical grade* (Brataco); metanol (Brataco); mukus usus sapi, aqua destilata, kalium dihidrogen fosfat p.a (Merck), NaOH p.a (Merck), air bebas CO₂; asetilsistein (kapsul Fluimucyl yang mengandung 200 mg asetilsistein dalam tiap kapsulnya) sebagai kontrol positif; asam formiat p.a, asam asetat p.a, aseton p.a, aquadest, etil asetat p.a, kloroform p.a, metanol p.a, amoniak p.a, anisaldehyd asam sulfat, besi (III) klorida (FeCl₃), dragendorff, rhodamine B, rutin, saponin dari quillaja bark, kuinin, tanin, metil stearat, lempeng KLT (selulosa dan silika gel 60 F₂₅₄).

Alat

Blender, ayakan mesh 40, timbangan elektrik (Ohaus AR 3130), kertas saring, cawan porselin, *thermostatic waterbath* (Memmert), kompor listrik, kipas angin, termometer, corong pisah, *moisture balance* (Ohaus), timbangan

elektrik (Ohaus AR 3130), alat-alat gelas, pH meter (Hanna HI 8014), viskometer (Rion VT-04F), lempeng KLT, bejana kromatografi dan tutup bejana, pipa kapiler, kertas penjenuh, penyemprot bercak, lampu UV 254 nm dan lampu UV 365 nm.

Cara Kerja

Determinasi tanaman sirih merah dilakukan di Laboratorium Ekologi dan Biosistematik Jurusan Biologi Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam (FMIPA) Universitas Diponegoro Semarang.

Daun sirih merah yang digunakan adalah daun yang memiliki kandungan senyawa aktif yang tinggi dengan ciri-ciri yaitu daun tebal, segar, bersih dan berwarna merah terang di permukaan bagian bawahnya, dipanen pada pagi hari, serta berumur lebih dari 1 bulan.

Simplisia dibuat dengan cara daun sirih merah segar seberat 21 kg diiris tipis-tipis, lalu dikeringkan dengan oven pada suhu 45°C selama 14 hari dan diukur rendemen bahannya. Simplisia yang sudah kering dihaluskan menggunakan blender dan disaring menggunakan ayakan 40 mesh, kemudian diukur kadar airnya dengan *moisture balance*.

$$\text{Rendemen} = \frac{\text{Berat daun kering}}{\text{Berat daun basah}} \times 100\%$$

Pembuatan ekstrak pada penelitian ini dilakukan dengan menyari simplisia daun sirih merah menggunakan metode maserasi dan bahan penyari yang digunakan adalah etanol 70%. Maserasi dilakukan dengan cara serbuk kering daun sirih sebanyak 3985,17 gram direndam dengan pelarut etanol sebanyak 39,8 liter pada suhu kamar. Proses maserasi dilakukan dalam dua tahap, yaitu tahap pertama dengan menggunakan metanol sebanyak 29,9 liter, kemudian ditutup dan terlindung dari cahaya sambil berulang-ulang diaduk. Setelah 5 hari campuran tersebut diserkai, diperas, dipisahkan filtrat dengan ampasnya. Tahap kedua yaitu remaserasi dengan menggunakan metanol sebanyak 9,9 liter kemudian ditutup dan terlindung dari cahaya sambil berulang-ulang diaduk. Setelah 5 hari campuran tersebut diserkai, diperas, disaring, dipisahkan filtrat dengan ampasnya. Filtrat (1) dan (2) dicampur. Filtrat yang diperoleh disimpan di tempat yang sejuk terlindung dari cahaya selama 2 hari, kemudian endapan dipisahkan (Depkes RI, 1986).

Sari etanol daun sirih merah yang diperoleh ditambahkan petroleum eter (PE) dengan perbandingan 1:1, dicampur dan dikocok kemudian dipartisi dengan corong pisah, proses fraksinasi ini diulang hingga fraksi PE jernih. Selanjutnya fraksi etanol dicampur dengan etil asetat (1:1), dikocok, kemudian dipartisi juga dengan corong pisah, proses ini diulang hingga fraksi etil asetat jernih.

Sisa fraksi etanol dicampur dengan metanol sambil dikocok lalu dipisahkan filtrat dan ampasnya. Filtrat ditampung dan diuapkan pada *thermostatic waterbath* pada suhu 45°C. Fraksi yang sudah kental disimpan dalam botol tertutup *aluminium foil* dan almari pendingin untuk mencegah terjadinya kerusakan akibat kontaminasi dari mikroorganisme dan lingkungan. Fraksi kental metanol yang diperoleh diukur beratnya dan diuji aktivitas mukolitiknya.

Pengambilan mukus dilakukan dengan cara usus sapi dibersihkan dahulu dengan air mengalir hingga bersih lalu dipotong-potong secara membujur, kemudian lapisan mukosanya dikerok. Mukus yang didapat berwarna kuning kecoklatan dan kental. Setelah mukosa terkumpul diaduk pelan-pelan untuk menghomogenkan karena komposisi mukus tiap pengerokan berbeda-beda. Mukus tersebut dibagi-bagi sesuai dengan jumlah pengujian lalu dimasukkan ke dalam tempat pendingin sampai pengujian dilakukan (Maretta, 2006). Larutan dapar fosfat dibuat dengan cara mencampur 50,0 ml Kalium dihidrogen fosfat (p.a) 0,2 M dengan 29,1 ml NaOH (p.a) 0,2 M dimasukkan dalam labu takar. Ke dalam labu takar ditambahkan air bebas CO₂ secukupnya sampai 200,00 ml.

Kontrol negatif yang digunakan adalah larutan mukus 80% dalam dapar fosfat pH 7,0. Kontrol positif menggunakan kapsul Flumucyl yang mengandung 200 mg asetilsistein dalam tiap kapsulnya. Sebanyak 200 mg asetilsistein dilarutkan dalam 200 ml larutan mukus 80%, kemudian diinkubasi pada suhu 37°C selama 30 menit. Fraksi metanol ditimbang sesuai dengan konsentrasi yang akan diuji yaitu 0,1%; 0,3%; 0,5%, 0,7%; dan 0,9% b/v terhadap larutan mukus 80%. Ketujuh sampel tersebut diinkubasi pada suhu 37°C selama 30 menit agar kondisi reaksi sampel sesuai dengan kondisi fisiologis manusia. Kemudian masing-masing sampel dimasukkan dalam Viskometer Rion untuk mengetahui viskositasnya, dilakukan replikasi sebanyak 3 kali.

Identifikasi golongan senyawa aktif dilakukan dengan metode Kromatografi Lapis Tipis (KLT) di Laboratorium Penelitian Dan Pengujian Terpadu UGM Yogyakarta.

1. Uji Flavonoid

Sampel sebanyak 50 mg ditimbang, kemudian dimasukkan ke dalam labu dan dihidrolisis dengan asam sulfat 2 N selama 30 menit. Lalu didinginkan, ditambahkan dietileter, divortex, kemudian disentrifuge. Fase eter diambil, dievaporasi dengan gas nitrogen, lalu sampel ditotolkan sebanyak 10 µl pada lempeng selulosa disertai pembanding rutin. Lempeng kemudian dimasukkan ke dalam bejana jenuh berisi fase gerak etil asetat : asam asetat : asam formiat : air (100:11:11:27) lalu dieluasikan

hingga batas, lempeng dikeringkan dan diamati di bawah sinar UV, serta diuapi dengan amoniak.

2. Uji Saponin

Sampel sebanyak 200 mg ditimbang, dimasukkan ke dalam labu dan ditambahkan 10 ml asam sulfat 2 N, kemudian dihidrolisis/direfluk dengan pendingin balik selama 30 menit, didinginkan dan diekstraksi dengan 5 ml kloroform. Fase kloroform diambil, diuapkan dengan nitrogen lalu di-ad-kan hingga 500 µl, ditotolkan 10 µl pada plat silika gel 60 F₂₅₄, dimasukkan ke dalam bejana yang berisi jenuh fase gerak kloroform : metanol (95:5), dieluasikan hingga batas, lempeng diangkat dan dikeringkan, kemudian diamati di bawah sinar UV, disemprot dengan pereaksi anisaldehyd asam sulfat, dipanaskan pada suhu 110°C hingga warna bercak terlihat jelas.

3. Uji Polifenol

Sampel sebanyak 50 mg ditimbang, diekstraksi dengan etanol, divortex selama 2 menit, disentrifuge selama 3 menit, dan supernatan diambil lalu ditotolkan sebanyak 10 µl pada lempeng silika gel 60 F₂₅₄ disertai pembanding metil stearat. Lempeng dimasukkan ke dalam bejana yang telah jenuh asam asetat : aseton : air (40:20:4), dieluasikan hingga batas. Lempeng dikeringkan, diamati di bawah sinar UV 254 nm dan 365 nm, lalu disemprot dengan pereaksi rhodamine B.

4. Uji Alkaloid

Sampel sebanyak 100 mg ditimbang, dibasakan dengan 2 ml amoniak 10%, divortex selama 2 menit, lalu ditambahkan 2 ml kloroform dan divortex selama 2 menit, disentrifuge selama 3 menit. Fase kloroform diambil, diuapkan dengan gas nitrogen, lalu dilarutkan dalam 200 µl kloroform. Sampel ditotolkan sebanyak 10 µl pada lempeng silika gel 60 F₂₅₄, dimasukkan ke dalam bejana jenuh berisi fase gerak metanol : amoniak (100:1,5), dieluasikan hingga batas, diangkat dan dikeringkan, kemudian disemprot dengan pereaksi dragendorff.

5. Uji Tanin

Sampel sebanyak 50 mg ditimbang, diekstraksi dengan etanol 50%, divortex selama 2 menit, disentrifuge selama 3 menit dan supernatan diambil, kemudian ditotolkan sebanyak 5 µl pada lempeng silika gel 60 F₂₅₄, disertai pembanding tannin. Lempeng dimasukkan ke dalam bejana jenuh etil asetat : asam asetat : asam formiat : air (3:1:1), dieluasikan hingga batas. Lempeng dikeringkan, diamati di bawah sinar UV 254 nm dan 365 nm, lalu bercak

tanin direaksikan dengan FeCl_3 (Hellmut, 1990).

Analisis Data

1. Uji Mukolitik

Data yang diperoleh berupa nilai viskositas setiap sampel dan diolah dengan uji normalitas *Shapiro Wilk* untuk mengetahui distribusi data lalu dilanjutkan dengan uji statistik non parametrik *Kruskal Wallis*, kemudian dilanjutkan uji *Man Whitney* dengan taraf kepercayaan 95%.

2. Analisis golongan senyawa aktif

Analisis kandungan kimia dilakukan dengan metode KLT (Kromatografi Lapis Tipis). Pengamatan dilakukan dengan cara membandingkan kromatogram fraksi metanol ekstrak etanol daun sirih merah dengan bercak senyawa pembanding. Setelah itu dilakukan penghitungan nilai faktor retardasi (*R_f*) pada masing-masing bercak. Pengamatan dilakukan di bawah sinar UV λ_{254} , UV λ_{365} , dan visibel.

HASIL PENELITIAN

Determinasi Tanaman

Hasil determinasi tanaman membuktikan bahwa tanaman yang digunakan pada penelitian ini adalah benar *Piper crocotum* Ruiz and Pav. Determinasi dilakukan untuk mendapatkan kebenaran identitas dari tanaman sehingga dapat menghindari kesalahan dalam pengumpulan daun yang akan digunakan dalam penelitian.

Daun sirih merah yang digunakan pada penelitian diambil pada satu daerah dengan tujuan untuk menghindari adanya variasi kandungan senyawa yang berada dalam tanaman tersebut yang disebabkan karena kondisi lingkungan yang berbeda-beda.

Pembuatan Simplisia dan Ekstraksi

Bobot daun kering yang didapat sebanyak 4200 gram sehingga rendemen bahan pada penelitian ini sebesar 20%. Fraksi kental metanol yang diperoleh dari proses fraksinasi sebanyak 95,95 gram dan berwarna coklat tua.

Uji Aktivitas Mukolitik

Mukus yang didapat berwarna kuning kecoklatan dan kental. Mukus tersebut dibagi-bagi sesuai dengan jumlah pengujian lalu dimasukkan ke dalam tempat pendingin untuk menurunkan suhu sehingga menghentikan aktivitas enzim proteolitik yang dapat mencairkan mukus (Brain *et al.*, 1997). Mukus 80% dibuat dengan cara mengencerkannya dengan larutan dapar fosfat pH 7. Penggunaan dapar ini untuk menjaga agar komposisi mukus tidak berubah dan aktivitas mukolitik dapat berlangsung maksimal pada pH 7. Proses inkubasi dan pengujian dilakukan pada suhu 37°C agar didapat suatu kondisi reaksi larutan uji sesuai

dengan kondisi fisiologi manusia. Uji aktivitas mukolitik dilakukan dengan menggunakan Viskometer Rion karena mukus mempunyai tipe alir Non Newton (Brain *et al.*, 1997).

Tabel I. menunjukkan bahwa semakin besar konsentrasi larutan uji, semakin kecil viskositasnya dan viskositas semua larutan uji lebih kecil dibanding kontrol negatif, hal ini berarti fraksi metanol ekstrak etanol daun sirih merah pada konsentrasi 0,1%; 0,3%; 0,5%; 0,7%; 0,9% mempunyai efek mukolitik karena mampu menurunkan viskositas mukus usus sapi 80%. Secara teoritis, larutan uji mempunyai efek mukolitik jika viskositasnya lebih kecil dari kontrol negatif.

Hasil analisis statistik terhadap viskositas mukus berbagai larutan uji dengan uji *Kruskal Wallis* menunjukkan bahwa terdapat perbedaan yang signifikan dengan angka signifikansi 0,003 ($p < 0,05$), sehingga analisis dilanjutkan dengan uji *Mann Whitney* untuk mengetahui kelompok mana yang berbeda bermakna. Pada tabel 2 dapat dilihat bahwa perbandingan antara kelompok kontrol positif dengan kontrol negatif mempunyai perbedaan yang bermakna dengan angka signifikansi 0,034 ($p < 0,05$), hal ini menunjukkan bahwa kedua kelompok tersebut mempunyai perbedaan yang nyata karena viskositas kontrol positif jauh lebih kecil dibandingkan kontrol negatif sehingga kontrol positif terbukti mempunyai efek mukolitik.

Berdasarkan analisis uji *Mann Whitney*, viskositas mukus antar kelompok larutan uji mempunyai perbedaan yang bermakna ($p < 0,05$). Hal ini menunjukkan bahwa aktivitas mukolitik antar kelompok konsentrasi 0,1; 0,5; 0,7; 0,9% memiliki perbedaan yang bermakna dalam menurunkan viskositas mukus, sedangkan perbandingan viskositas antara kelompok konsentrasi 0,1% dengan kelompok konsentrasi 0,3% tidak berbeda bermakna ($p > 0,05$). Hal ini menunjukkan bahwa aktivitas mukolitik antar kedua kelompok tersebut tidak memiliki perbedaan yang berarti.

Perbandingan viskositas mukus antara kelompok kontrol positif dengan kelompok larutan uji konsentrasi 0,1; 0,5; 0,7; 0,9% menunjukkan perbedaan yang signifikan ($p < 0,05$), sedangkan antara kelompok konsentrasi 0,3% dengan kelompok kontrol positif menunjukkan tidak berbeda bermakna dengan angka signifikansi 0,317 ($p > 0,05$), berarti dapat disimpulkan bahwa fraksi metanol ekstrak etanol daun sirih merah pada konsentrasi 0,3% memiliki kemampuan yang sebanding dengan kontrol positif dalam menurunkan viskositas mukus. Hal ini bisa terjadi kemungkinan karena fraksi uji masih mengandung banyak senyawa aktif sehingga efek dari senyawa aktif yang berkhasiat mukolitik terhambat oleh senyawa aktif lain.

Tabel I. Data nilai viskositas berbagai larutan uji fraksi metanol dari ekstrak etanol daun sirih merah

No.	Konsentrasi larutan uji	Viskositas (dPa·s)			Rata-rata ± SD
		I	II	III	
1.	0,1 %	1	1,5	1	1,16 ± 0,28
2.	0,3 %	0,9	0,9	1	0,93 ± 0,06
3.	0,5 %	0,7	0,7	0,8	0,73 ± 0,06
4.	0,7 %	0,6	0,6	0,6	0,60 ± 0,00
5.	0,9 %	0,5	0,5	0,4	0,47 ± 0,06
6.	Asetilsistein 0,1 %	0,9	0,9	0,9	0,90 ± 0,00
7.	Mukus 80 %	3,5	3,5	4	3,66 ± 0,28

Tabel II. Tabel Ringkasan Hasil Uji *Mann Whitney* dengan menggunakan SPSS versi 15

Kelompok	Signifikansi	Keterangan
Kontrol positif - kontrol negatif	0,034	berbeda bermakna
Kontrol positif - konsentrasi 0,1%	0,034	berbeda bermakna
Kontrol positif - konsentrasi 0,3%	0,317	tidak berbeda bermakna
Kontrol positif - konsentrasi 0,5%	0,034	berbeda bermakna
Kontrol positif - konsentrasi 0,7%	0,025	berbeda bermakna
Kontrol positif - konsentrasi 0,9%	0,034	berbeda bermakna
Kontrol negatif - konsentrasi 0,1%	0,043	berbeda bermakna
Kontrol negatif - konsentrasi 0,3%	0,043	berbeda bermakna
Kontrol negatif - konsentrasi 0,5%	0,043	berbeda bermakna
Kontrol negatif - konsentrasi 0,7%	0,034	berbeda bermakna
Kontrol negatif - konsentrasi 0,9%	0,043	berbeda bermakna
Konsentrasi 0,1% - konsentrasi 0,3%	0,099	tidak berbeda bermakna
Konsentrasi 0,1% - konsentrasi 0,5%	0,043	berbeda bermakna
Konsentrasi 0,1% - konsentrasi 0,7%	0,034	berbeda bermakna
Konsentrasi 0,1% - konsentrasi 0,9%	0,043	berbeda bermakna
Konsentrasi 0,3% - konsentrasi 0,5%	0,043	berbeda bermakna
Konsentrasi 0,3% - konsentrasi 0,7%	0,034	berbeda bermakna
Konsentrasi 0,3% - konsentrasi 0,9%	0,043	berbeda bermakna
Konsentrasi 0,5% - konsentrasi 0,7%	0,034	berbeda bermakna
Konsentrasi 0,5% - konsentrasi 0,9%	0,043	berbeda bermakna
Konsentrasi 0,7% - konsentrasi 0,9%	0,034	berbeda bermakna

Identifikasi Golongan Senyawa Aktif dengan Metode Kromatografi Lapis Tipis (KLT)

1. Identifikasi Flavonoid

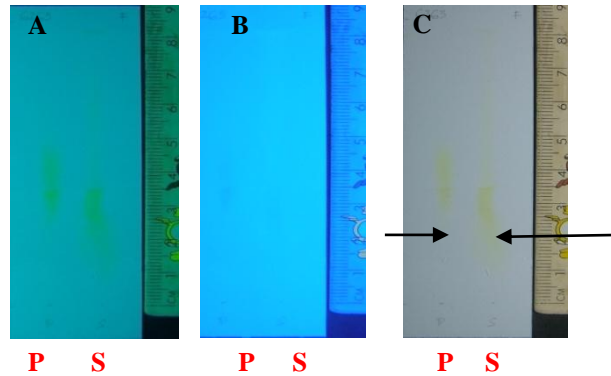
Analisis KLT untuk flavonoid dilakukan dengan menggunakan fase diam selulosa karena sangat cocok untuk isolasi flavonoid (Mursyidi, 1985). Penampak bercak yang digunakan adalah uap amonia untuk memberikan suasana basa agar dapat terdeteksi secara visibel maupun di bawah sinar ultraviolet. Perbandingan yang digunakan adalah senyawa rutin (kuersetin-3-rutinosida) yang merupakan glikosida flavonol. Senyawa ini digunakan sebagai pembanding karena merupakan jenis flavonoid yang paling sering dijumpai pada pemeriksaan flavonoid, banyak terdapat dalam tumbuhan dan tersebar luas dalam pigmen tanaman (Harborne, 1987).

Pengamatan dilakukan di bawah sinar UV 254 nm, sinar UV 365 nm, dan secara visibel. Pada pengamatan secara visibel, bercak sampel maupun pembanding berwarna kuning. Hal ini menunjukkan bahwa sampel mengandung flavonoid. Robinson (1995) menyebutkan beberapa glikosida salah satunya flavonoid dalam larutan netral atau asam tidak berwarna, akan tetapi berwarna terang atau jingga dalam larutan atau suasana basa. Pada pengamatan di bawah sinar UV 254 nm bercak terlihat berwarna kuning sedangkan pada UV 365 nm tidak terlihat adanya bercak. Wagner and Bladt (2001) menyebutkan bahwa flavonoid dapat berfluoresensi dan memberikan warna kuning, hijau, maupun biru.

Nilai Rf bercak sampel fraksi uji sebesar 0,40, sedangkan nilai Rf pembanding rutin

adalah 0,55. Nilai Rf sampel yang lebih kecil dibanding rutin menunjukkan bahwa senyawa aktif yang terdeteksi bersifat kurang polar

dibanding rutin. Hasil identifikasi flavonoid dari fraksi uji dapat dilihat pada Gambar 2.



Gambar 2. Kromatogram analisis flavonoid dari fraksi metanol ekstrak etanol daun sirih merah

Fase diam = selulosa, Fase gerak = etil asetat : asam formiat : asam asetat : air (100:11:11:27), penampak bercak = uap amonia

A. Pengamatan pada sinar UV 254 nm

B. Pengamatan pada sinar UV 365 nm

C. Pengamatan secara visibel

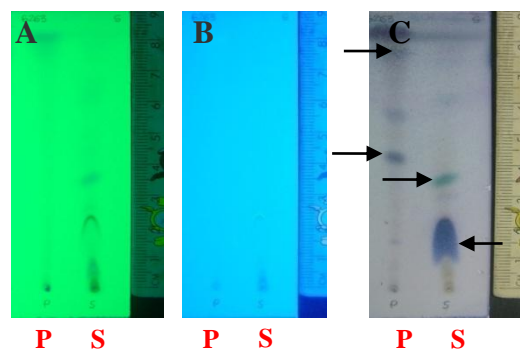
P = Pembanding Rutin, S = Fraksi metanol dari ekstrak etanol daun sirih merah

2. Identifikasi Saponin

Pada pengamatan secara visibel, bercak sampel maupun pembanding berwarna biru. Hal ini menunjukkan bahwa sampel mengandung saponin. Robinson (1995) menyebutkan bahwa warna biru tersebut diakibatkan oleh adanya reaksi Liebermann-Burchard yaitu salah satu reaksi warna yang paling umum terjadi pada senyawa terpenoid tinggi dan steroid. Bila sterol beserta triterpena alkohol dicampur dengan asam asetat anhidrat dan asam sulfat pekat akan dihasilkan warna biru. Selain itu, ikatan rangkap dua pada struktur kimia saponin memiliki spektrum serapan pada sinar ultraviolet dan

sinar visibel. Bercak sampel terlihat sangat jelas dan luas, hal ini menunjukkan bahwa kadar senyawa aktif saponin dalam sampel banyak. Hasil identifikasi saponin fraksi metanol dari ekstrak etanol daun sirih merah dapat dilihat pada Gambar 3.

Nilai Rf bercak sampel fraksi uji sebesar 0,37, sedangkan nilai Rf pembanding saponin adalah 0,50; 0,85 dan 0,97. Nilai Rf sampel yang lebih kecil dibanding pembanding menunjukkan bahwa senyawa aktif saponin yang terdeteksi bersifat polar seperti fase diam yang digunakan karena sulit terelusi dengan fase gerak yang bersifat semi polar.



Gambar 3. Kromatogram analisis saponin dari fraksi metanol ekstrak etanol daun sirih merah

Fase diam = silika gel 60 F₂₅₄, fase gerak = kloroform : metanol (95:5), penampak bercak = anisaldehyd asam sulfat

A. Pengamatan pada sinar UV 254 nm

B. Pengamatan pada sinar UV 365 nm

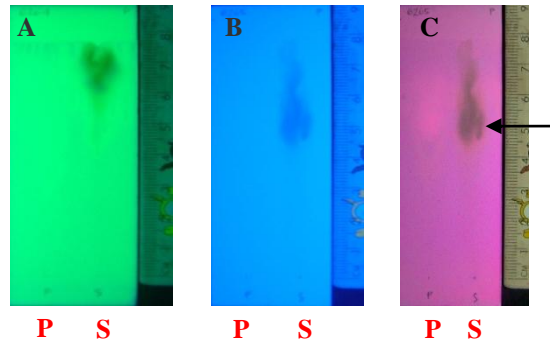
C. Pengamatan secara visibel

P = Pembanding saponin dari quillaja bark, S = Fraksi metanol dari ekstrak etanol daun sirih merah

3. Identifikasi Polifenol

Pada pengamatan secara visibel, bercak sampel berwarna pink di atas latar belakang kemerahan. Hal ini menunjukkan bahwa sampel mengandung polifenol. Nilai Rf bercak sampel fraksi uji sebesar 0,54 (Gambar 4). Nilai Rf

tersebut menunjukkan bahwa polaritas senyawa aktif polifenol yang terdeteksi menyerupai fase gerak yaitu semi polar. Hal ini menunjukkan bahwa polifenol pada sampel lebih bersifat semi polar.



Gambar 4. Kromatogram analisis polifenol dari fraksi metanol ekstrak etanol daun sirih merah

Fase diam = silika gel 60 F₂₅₄, fase gerak = asam asetat : aseton : air (40:20:4), penampak bercak = rhodamine B

A. Pengamatan pada sinar UV 254 nm

B. Pengamatan pada sinar UV 365 nm

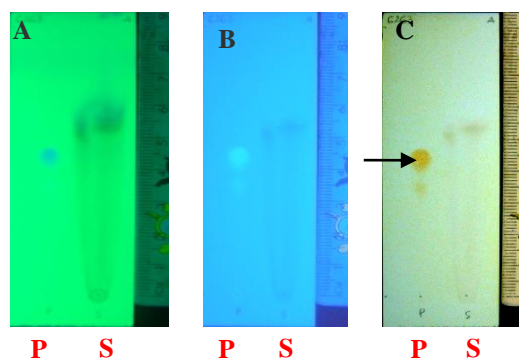
C. Pengamatan secara visibel

P = Pembanding metil stearat, S = Fraksi metanol dari ekstrak etanol daun sirih merah

4. Identifikasi Alkaloid

Uji KLT senyawa golongan alkaloid dilakukan dengan menggunakan fase diam silika gel 60 F₂₅₄ karena baik untuk memisahkan senyawa alkaloid (Sastrohamidjojo, 2002). Pembanding yang digunakan adalah senyawa kuinin karena senyawa ini merupakan senyawa golongan alkaloid. Pengamatan dilakukan di bawah sinar UV 254 nm, sinar UV 365 nm, dan secara visibel. Sampel dikatakan positif mengandung alkaloid jika bercak berwarna jingga sampai merah coklat pada pengamatan visual, pada pengamatan UV 254 nm terjadi peredaman, dan pada UV 365 nm menghasilkan bercak berwarna biru (Robinson,

1995). Pengamatan secara visibel terhadap bercak fraksi uji tidak memberikan warna jingga, sedangkan bercak pembanding kuinin berwarna jingga dengan nilai Rf sebesar 0,54. Hal ini menunjukkan bahwa fraksi uji tidak mengandung senyawa golongan alkaloid. Hal ini bisa terjadi kemungkinan karena tidak ada alkaloid yang larut dalam fraksi metanol tetapi larut dalam ekstrak etanol daun sirih merah. Hasil identifikasi dapat dilihat pada Gambar 5.



Gambar 5. Kromatogram analisis alkaloid dari fraksi metanol ekstrak etanol daun sirih merah

Fase diam = silika gel 60 F₂₅₄, fase gerak = metanol : amoniak (100:1,5), penampak bercak = dragendorff

A. Pengamatan pada sinar UV 254 nm

B. Pengamatan pada sinar UV 365 nm

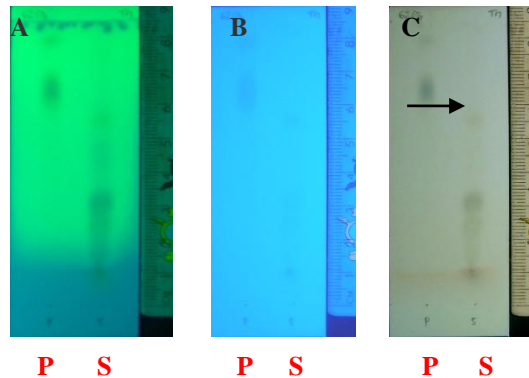
C. Pengamatan secara visibel

P = Pembanding kuinin, S = Fraksi metanol dari ekstrak etanol daun sirih merah

5. Identifikasi Tanin

Sampel positif mengandung tanin jika bercak berwarna hijau kelabu. Warna ini timbul akibat adanya reaksi antara larutan FeCl_3 dengan tanin. Hasil identifikasi tanin dalam fraksi uji dapat dilihat pada Gambar 6. Hasil pengamatan di bawah sinar UV 254 nm, 365 nm, dan visibel menunjukkan bahwa bercak sampel tidak terdeteksi, sedangkan bercak

pembanding terlihat berwarna hijau kelabu. Hal ini menunjukkan bahwa fraksi uji tidak mengandung senyawa tanin karena senyawa ini juga tidak ada dalam ekstrak etanol. Hasil identifikasi ini hampir sama dengan hasil penelitian Marettta (2006) yang menunjukkan bahwa pada ekstrak etanol herba *Piper miniatum* BI tidak mengandung tanin.



Gambar 6. Kromatogram analisis tanin dari fraksi metanol ekstrak etanol daun sirih merah

Fase diam = silika gel 60 F₂₅₄, fase gerak = etil asetat : asam formiat : asam asetat : air (100:11:11:27), penampak bercak = FeCl_3
A. Pengamatan pada sinar UV 254 nm
B. Pengamatan pada sinar UV 365 nm
C. Pengamatan secara visibel
P = Pembanding tanin, S = Fraksi metanol dari ekstrak etanol daun sirih merah

Hasil uji kualitatif dengan metode KLT menunjukkan bahwa golongan senyawa aktif yang terdapat dalam fraksi metanol ekstrak etanol daun sirih merah adalah senyawa golongan flavonoid, saponin, dan polifenol. Dengan demikian aktivitas mukolitiknya diduga diakibatkan oleh kandungan ketiga senyawa tersebut.

Beberapa penelitian telah menyebutkan tentang efek mukolitik terkait dengan kandungan senyawa aktif yang ada dalam tumbuhan tersebut. Marettta (2006) membuktikan bahwa ekstrak etanol herba *Piper Miniatum* BI mengandung senyawa golongan flavonoid, terpenoid dan saponin yang menimbulkan aktivitas mukolitik pada mukus sapi secara *in vitro*. Prastiyo (2008) menyebutkan bahwa infusa daun kembang sepatu pada kadar 5,0% memiliki aktivitas mukolitik yang sebanding dengan Flumucil® 3% dan mengandung saponin dan flavonoid. Wijayanti (2008) membuktikan bahwa infusa daun pare pada kadar 5,0% memiliki aktivitas mukolitik yang sebanding dengan Flumucil® 3% (asetilsistein 0,2%) dan efek mukolitiknya terkait dengan adanya kandungan saponin, flavonoid, dan polifenol dalam infusa tersebut.

KESIMPULAN

1. Fraksi metanol dari ekstrak etanol daun sirih merah dengan konsentrasi 0,1%; 0,3%; 0,5%;

0,7%; 0,9% dapat menurunkan viskositas mukus (mengencerkan mukus usus sapi) dan pada konsentrasi 0,3% aktivitasnya setara dengan asetilsistein 0,1%.

2. Senyawa aktif yang terdapat dalam fraksi tersebut adalah senyawa golongan saponin, flavonoid, dan polifenol.

DAFTAR PUSTAKA

- Arifin, H., 2004, Evaluasi Aktivitas Anti Batuk Ekstrak Air Daun Sirih, *Tesis*, ITB, Bandung.
- Brain, J.D., Proctor, D.F., and Reid, L.M., 1977, *Respiratory Defense Mechanism*, Part 1 and 2, 290-301, 405-408, Marcel Dekker Inc, New York and Basel.
- Depkes RI, 1986, *Sediaan Galenik*, 2-12, Departemen Kesehatan Republik Indonesia, Jakarta.
- Hellmut, J., 1990, *Thin Layer Chromatography Reagents and Detection Methods*, Vol. 1a, 401.
- Marettta, A.P., 2006, Aktifitas Mukolitik Ekstrak N-Heksan Dan Etanol Herba Piper

- Miniatur, BI Terhadap Mukosa Usus Sapi Secara In Vitro Dan Deteksi Golongan Senyawa Aktif Dengan Metode KLT, *Skripsi*, Universitas Islam Indonesia, Yogyakarta.
- Mursyidi, A., 1985, *Statistika Farmasi dan Biologi*, 61, 65, 69, Ghalia Indonesia, Jakarta.
- Prastiyo, A., 2008, Uji Aktivitas Mukolitik Infusa Daun kembang Sepatu Pada Mukus Usus Sapi Secara *In vitro*, *Skripsi*, Universitas Muhammadiyah Surakarta.
- Robinson, T., 1995, *Kandungan Organik Tumbuhan Tinggi*, Edisi keenam, 191-196, 209, ITB, Bandung.
- Sastrohamidjojo, H., 2002, *Kromatografi*, Edisi 2, 35, Liberty, Yogyakarta.
- Tjay, T.H., dan Raharja, K., 2007, *Obat-obat Penting, Khasiat, Penggunaan dan Efek-efek sampingnya*, Edisi V, 659-664, PT. Elex Media Komputindo Kelompok Gramedia, Jakarta.
- Sudewo, B., 2005, *Basmi Penyakit dengan Sirih Merah*, 35-45, Agro Media, Jakarta.
- Sulistiawati, 2003, Uji Aktivitas Mukolitik Minyak Atsiri Daun Sirih (*Piper betle* L.) Dan Deteksi Kandungan Kimianya Secara KLT Dan Kromatografi Gas-Spektrofotometri Massa, *Skripsi*, Universitas Islam Indonesia, Yogyakarta.
- Wagner, H., and Blatt, S., 2001, *Plant Drug Analysis; A Thin Layer Chromatography Atlas*, 2nd edition, 196-197, Springer, Germany.
- Wijayanti, A.W., 2008, Uji Aktivitas Mukolitik Infusa Daun Pare (*Momordica charatia* L.) pada Mukus Usus Sapi Secara *In vitro*, *Skripsi*, Universitas Muhammadiyah Surakarta, Surakarta.