

## BAB II

### TINJAUAN PUSTAKA

#### A. Deskripsi Buah Delima (*Punica granatum* L.)

Klasifikasi tanaman buah delima putih

- Divisi : *Magnoliophyta* (Tumbuhan berbunga)  
Kelas : *Magnoliopsida* (berkeping dua / dikotil)  
Sub Kelas : *Rosidae*  
Ordo : *Myrtales*  
Famili : *Lythraceae* (*Punicaceae*)  
Genus : *Punica*  
Spesies : *Punica granatum* L.  
*Punica protupunica* Balf



Gambar 1. Buah Delima

Gambar 1 adalah gambar dari buah delima. Buah delima (*Punica granatum* L.) memiliki tinggi pohon kurang lebih mencapai 5 meter, menyukai tanah gembur yang tidak terendam air dan memiliki beberapa varietas. Memiliki daun tunggal, bertangkai pendek, letaknya berkelompok, mengkilap, berbentuk lonjong dengan pangkal lancip, ujung tumpul, tepi rata, tulang menyirip, ukuran panjang

daun 3-7 cm dan lebar 0,5-2,5 cm, warna hijau. Kulit buahnya tebal dan warnanya beragam seperti hijau keunguan, putih, cokelat kemerahan atau ungu kehitaman. Buahnya berbentuk bulat dengan diameter 5-12 cm, beratnya kurang lebih 100-300 gram, terdiri dari biji-biji kecil, tersusun tidak beraturan, berwarna putih sampai kemerahan (Budka, 2008 ; Desmond, 2000).

Secara umum, buah delima mengandung senyawa kimia berupa alkaloid, estrone, granatin A dan B, flavonoid, punikalin, punikalagin (Syamsuhidayat dan Hutapea, 1991). Tabel 1 menunjukkan level kandungan beberapa senyawa dalam ekstrak kulit buah delima.

**Tabel 1.** Total Fenolik, Flavonoid, dan Asam Askorbat dari Ekstrak Kulit Delima (Purata  $\pm$  SD)

Ekstrak <sup>a</sup>	Total Fenol <sup>b</sup>	Total Flavonoid <sup>c</sup>	Asam Askorbat (mg/g)
ME	274,1* $\pm$ 17,2	56,4 $\pm$ 2.7	2,1 $\pm$ 0,9
WE	91,2 $\pm$ 09,5	-	-
EE	08,5 $\pm$ 11,5	-	-

Keterangan :

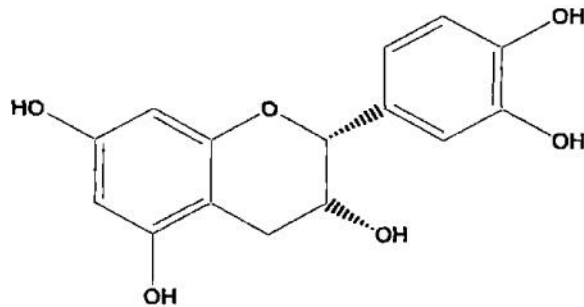
<sup>a</sup> ME: 80% metanol, WE: water (air), EE: ekstrak eter, <sup>b</sup> mg Ekuivalen Asam Galat (GAE)/g, <sup>c</sup> mg Ekuivalen Rutin (RE)/g, \*P < 0,05 tidak dilakukan (Shiban *et al.*, 2012)

Menurut Duke, kulit buah delima mengandung delfinidin-3,5-diglukosida, asam elaidat, flavogallol, granatin A dan B, isoquersetrin, manitol, punikalin, punikalagin, resin dan lilin. Kulit delima memiliki alkaloid dan flavonoid yang mempunyai aktivitas antimikroba terhadap *Candida albicans* (Sukanto, 2002). Menurut penelitian Jurenka (2008) yang bertanggung jawab menghambat pertumbuhan *Candida albicans* adalah komponen *tannin*. Huang *et al.*, (1998) menyatakan bahwa mekanisme antifungal yang dimiliki *tannin* adalah karena

kemampuannya menghambat sintesis *chytin* yang digunakan untuk pembentukan dinding sel pada jamur. Menurut Field dan Lettinga (1992), kemampuan inhibisi sintesis *chytin* yang dimiliki oleh *tannin* ini disebabkan karena besarnya daya polimerase yang terdapat pada gugus *hydroxyl* di cincin B dalam struktur kimia *tannin*.

## **B. Tanin**

Tanin merupakan senyawa polifenol yang dapat larut dalam air dan pelarut organik, juga dapat mengendapkan protein (Daniel, 2006). Tanin termasuk senyawa bahan alam dalam tanaman yang terdiri dari sejumlah besar gugus hidroksi fenolik. Senyawa ini diperlukan oleh tanaman sebagai sarana proteksi dari serangan hewan, bakteri, jamur, dan insekta. Proteksi ini terutama selama tanaman dalam masa pertumbuhan (White,1957). Tanin terdapat luas dalam tumbuhan, dalam angiospermae terdapat khusus dalam jaringan kayu. Di dalam tumbuhan letak tanin terpisah dari protein dan enzim sitoplasma, tetapi bila jaringan rusak, misalnya bila hewan memakannya, maka tanin akan terbebaskan dan kemudian mengikat zat-zat makanan (terutama protein) dalam sel tanaman membentuk ikatan kompleks yang stabil sehingga reaksi penyamakan pun dapat terjadi. Reaksi ini menyebabkan protein lebih sukar dicerna oleh enzim-enzim saluran pencernaan ataupun enzim-enzim ekstraseluler mikroba rumen. Sebagian besar tumbuhan yang banyak bertanin dihindari oleh hewan pemakan tumbuhan karena rasanya yang sepat sehingga dapat di fungsikan dalam tumbuhan ialah sebagai penolak hewan pemakan tumbuhan (Harborne,1996).



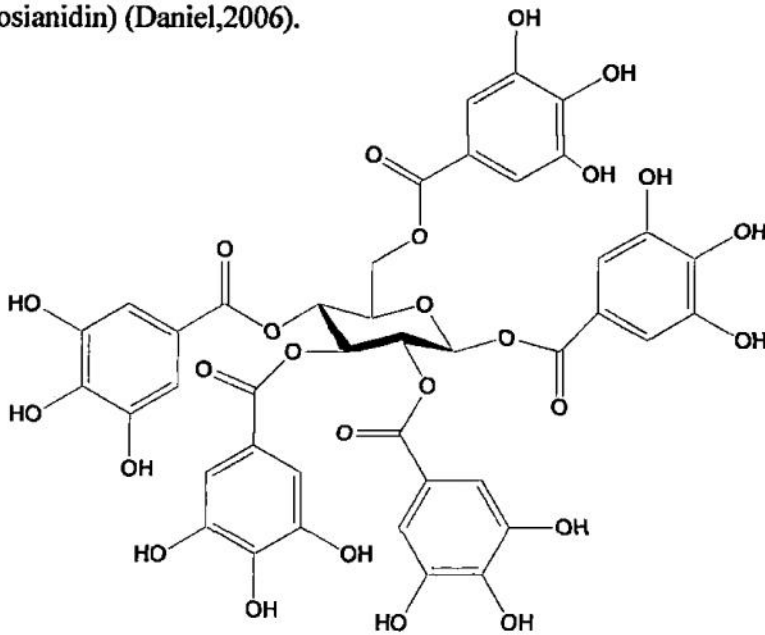
**Gambar 2. Struktur Inti Tanin**

Secara struktural tanin adalah suatu senyawa fenol yang memiliki berat molekul besar yang terdiri dari gugus hidroksi dan beberapa gugus yang bersangkutan seperti karboksil untuk membentuk kompleks kuat yang efektif dengan protein dan beberapa makromolekul (Horvart, 1981). Tanin memiliki peranan biologis yang kompleks sehingga tidak dapat diprediksi. Selain itu, tanin juga dapat berfungsi sebagai antioksidan biologis (Hagerman, 2002). Sebagai salah satu tipe dari senyawa metabolit sekunder, tanin mempunyai karakteristik sebagai berikut (Giner-Chavez, 2001):

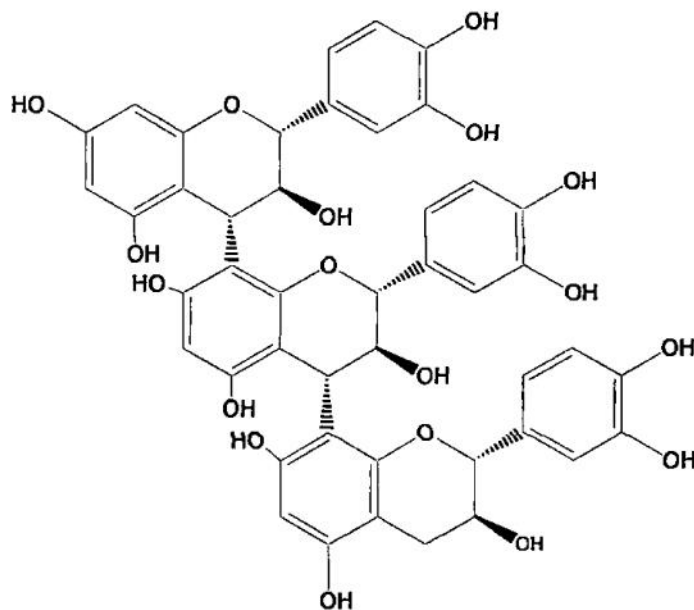
- a. Senyawa oligomer dengan satuan struktur yang bermacam-macam dengan gugus fenol bebas.
- b. Semua jenis larut dalam air dan pelarut organik seperti metanol, etanol, aseton dan pelarut organik lainnya terkecuali beberapa struktur yang mempunyai berat molekulnya besar.
- c. Mampu berikatan dengan protein dan terbentuk kompleks tanin-protein yang larut dan tidak larut.
- d. Warna tanin akan menjadi gelap apabila terkena cahaya atau dibiarkan di udara terbuka.

e. Tanin mempunyai sifat bakteristatik dan fungistatik.

Secara kimia terdapat dua jenis tanin yang tersebar tidak merata dalam dunia tumbuhan yaitu tanin terhidrolisis (*Hydrolyzable tannin*) dan tanin terkondensasi (Proantosianidin) (Daniel,2006).



**Gambar 3. Struktur Tanin Terhidrolisis**



**Gambar 4. Struktur Tanin Terkondensasi**

## 1. Tanin Terhidrolisis

Tanin terhidrolisis terdapat gugus glukosa dan disekitarnya ada gugus fenolik, dimana glukosa dengan gugus fenolnya disambungkan oleh ikatan ester. Ikatan ester mudah dihidrolisa dengan asam atau enzim sehingga dinamakan hydrolyzable tannin. Hydrolyzable tannin umumnya terurai perlahan-lahan pada saat berada dalam larutan air dan juga terhidrolisis oleh asam atau enzim seperti *tannase*. Komponen umum fenolik tanin terhidrolisis adalah asam gallic, digallic, dan ellagic (Daniel, 2006). Hagerman (2002) menuliskan tanin terhidrolisis adalah pecahnya karbohidrat dan asam fenolik oleh asam lemah atau basa lemah. Berdasarkan inti fenolik, tanin terhidrolisis dibagi menjadi *ellagitannin* dan *gallotannin*.

### a. Ellagitanin

Ellagitanin tersebar secara tidak merata pada dunia tumbuhan. Ellagitanin hanya terdapat pada angiospermae, khususnya pada tumbuhan dikotil, terutama Hammamelidae, Dilleniidae, Rosidae, serta beberapa lainnya (Harborne, 1996 ; Bruyne *et al.*, 1999). Menurut Fieser (1961) dan (Bate, 1972) ellagitanin terbentuk dari asam heksahidroksi difenil yang mungkin terbentuk dari terikatnya dua molekul asam gallat melalui reaksi oksidasi. Heksahidroksi difenil ini pecah menjadi asam galat jika dilarutkan dalam air. Hasil hidrolisis dari ellagitanin membentuk asam ellagat dan glukosa. Asam ellagat membentuk kristal jarum hijau kuning dengan piridin, meleleh pada 360°C, tidak larut dalam eter, sedikit larut dalam air, larut dalam alkali / basa dengan warna kuning yang kuat. Selain itu ellagitanin juga memberikan reaksi warna spesifik dengan adanya asam nitrit

(HNO<sub>2</sub>). Reaksi ini digunakan mendeteksi jaringan tumbuhan yang terekstrak dan merupakan metode yang penting dalam penentuan ellagitanin (Sa'adah, 2010).

Penentuan ellagitanin diperlukan reaksi warna dengan asam nitrat dalam lingkungan nitrogen, dimana akan memberikan warna merah yang lama kelamaan berubah menjadi biru. Bila ada udara dilingkungannya maka lama kelamaan berubah menjadi kuning (Bate, 1972).

Dalam dunia kesehatan ellagitanin diketahui memiliki aktivitas biologis dan farmakologi antara lain, penghambatan karsinogenesis, anti-tumor, antivirus, anti-oksidasi (peroksidasi lipida, lipoksigenase, oksidasi xanthin, dan oksidasi monoamin), anti hipertensi (Okuda *et al.*, 1992; Taylor, 2003), antibakteri dan jamur, anti-diabetes, dan antinematoda (Cowan, 1999; Hayashi *et al.*, 2002; Mori *et al.*, 2000).

#### **b. Gallotanin**

Menurut Engels *et al* (2011) gallotanin terbentuk dari asam gallat dan gula, biasanya glukosa. Beberapa asam gallat terikat pada satu molekul gula. Asam gallat terikat bersama pada gugus ester yang terbentuk antara gugus karboksil molekul satu dan gugus hidroksi pada molekul lain (Sa'adah, 2010).

Sifat fisik dari gallotanin berupa polimer amorf, berwarna putih kekuningan, dapat larut dalam air, gliserol, dan sangat larut dalam alkohol, aseton. Gallotanin tidak larut dalam benzen, kloroform, eter dan petroleum eter, karbon disulfida, karbon tetraklorida (Gohen, 1976).

Tyler (1947) menyatakan sifat kimia dari gallotanin adalah berwarna coklat jika terkena cahaya, dengan albumin, tepung, gelatin, alkaloid dan garam metalik

memberikan endapan yang tidak larut, sedangkan dengan  $\text{FeCl}_3$  memberikan warna biru kehitaman, pada suhu  $215^\circ\text{C}$  akan terdekomposisi menjadi pirogalol dan  $\text{CO}_2$  (Sa'adah, 2010).

Gallotanin merupakan suatu ester dimana dalam larutan gugus karbonil dari gugus esternya dapat diprotonkan, kemudian karbon yang bermuatan positif parsial dapat diserang oleh nukleofil lemah seperti air. Untuk reaksi hidrolisis dengan katalisis asam dalam air berlebih dan panas maka suatu ester menjadi asam karboksilat. Kelebihan air akan menggeser kesetimbangan ke arah sisi asam karboksilat (Solomons, 1976).

Tyler (1947) melaporkan asam gallat (3,4,5 trihidroksibenzoat) merupakan senyawa turunan dari aromatik karboksilat, dengan berat molekul 170,12, mempunyai titik didih  $200^\circ\text{C}$ , titik leleh  $110^\circ\text{C}$ , sedikit larut dalam air panas, alkohol, etil asetat, gliserol. Asam gallat tidak larut dalam benzena, kloroform, petroleum eter, dengan  $\text{FeCl}_3$  memberikan warna biru kehitaman (Sa'adah, 2010).

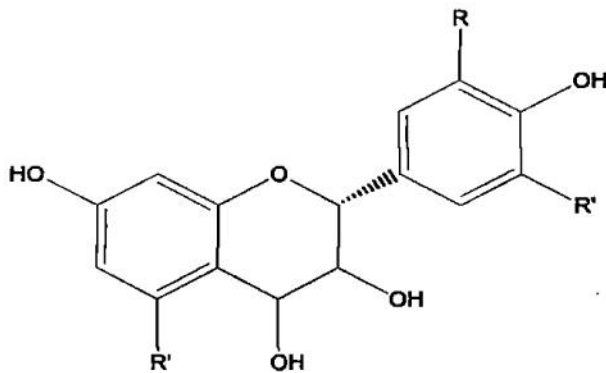
## **2. Tanin Terkondensasi**

Tanin terkondensasi merupakan flavan polimerik yang secara biosintesis terbentuk dengan cara kondensasi katekin tunggal (galokatekin) yang membentuk senyawa dimer dan oligomer yang lebih tinggi. Tanin jenis ini biasanya tidak dapat dihidrolisis dan banyak terdapat dalam kayu manis, kina, dan teh. Proantosianidin merupakan nama lain tanin terkondensasi karena jika direaksikan dengan asam panas, beberapa ikatan karbon penghubung satuan terputus dan dibebaskanlah monomer antosianidin (Harborne, 1987).

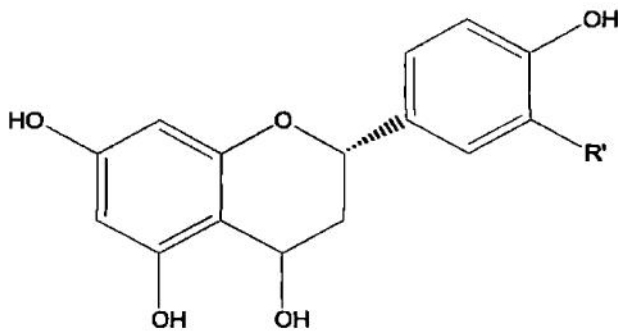


Proantosianidin didefinisikan sebagai oligo atau polimer flavonoid (flavan-3-ol atau flavan-3,4-diol), terdiri dari molekul katekin dan epikatekin sebagai monomer dan molekul yang mengandung 2-4 monomer dimana ikatan C-C tidak mudah untuk dihidrolisis (Etherington, 2002). Proantosianidin lebih banyak terdistribusi daripada tanin terhidrolisis, merupakan oligomer atau polimer satuan flavonoid (misalnya flavan-3-ol) yang terikat oleh ikatan karbon-karbon yang tidak mudah terpecah dengan adanya hidrolisis (Giner-Chavez, 2001).

Proantosianidin dapat dideteksi langsung dalam jaringan tumbuhan hijau dengan mencelupkan ke dalam HCl 2M mendidih selama setengah jam. Bila terbentuk warna merah yang dapat diekstraksi dengan amil atau butil alkohol, maka ini merupakan bukti adanya senyawa tersebut (Harborne, 1987).



**Gambar 5. Struktur Flavan-3,4-diol**



**Gambar 5. Struktur Flavan-4-ol**

Tanin pada kulit, daun dan buah delima mempunyai empat jenis tanin, yaitu gallotannins (1,2,4,6-tetra-O-galloyl-D-glucose dan 1,2,3,4,6- penta-O-galloyl-D-glucose), ellagitannins (ellagic acid esters of D-glucose dengan satu atau lebih substitusi galloyl), dan yang paling khas adalah punicalagin dan punicalin (Martin *et al*, 2008 ).

### C. Ekstraksi

Metode ekstraksi dengan menggunakan pelarut cara dingin dibedakan menjadi dua jenis yaitu maserasi dan perkolasi. Maserasi adalah proses pengekstrakan simplisia dengan menggunakan pelarut dengan beberapa kali pengadukan pada temperatur ruangan. Secara teknologi termasuk ekstraksi dengan prinsip metode pencapaian konsentrasi pada kesetimbangan. Remaserasi adalah dilakukan dengan pengulangan penambahan pelarut setelah maserat yang pertama disaring dan seterusnya. Perkolasi adalah ekstraksi dengan pelarut yang selalu baru sampai sempurna atau ekstraksi sampai habis yang umumnya dilakukan pada temperatur ruangan. Bahan yang digunakan untuk perkolasi biasanya dalam bentuk serbuk (Depkes RI, 2000).

Pada penelitian ini digunakan metode penyarian maserasi karena relatif lebih mudah dan diharapkan tidak merusak tanin dalam kulit delima yang akan dianalisis.

### D. Folin – Ciocalteu

Ada dua cara untuk menentukan kandungan fenol dalam suatu sampel. Pertama, dalam metode *Folin-Ciocalteu* (FC) yang merupakan metode yang paling umum digunakan untuk menentukan fenol total. Hasil yang didapatkan

adalah estimasi kandungan fenol total. Alternatif lainnya adalah dengan teknik identifikasi dan karakterisasi masing-masing senyawa fenol, seperti dengan teknik *Thin Layer Chromatography*, *Liquid Chromatography*, dan *Gas Chromatography*. Hasil yang didapatkan adalah jenis-jenis fenol, kuantitas masing-masing, dan kadar totalnya.

Nilai yang didapat dari metode teknik identifikasi dan karakterisasi dengan kromatografi biasanya lebih rendah daripada yang diestimasi dengan metode *Folin-Ciocalteu*. Salah satu alasannya adalah beberapa polifenol dapat lolos dalam determinasi oleh kromatografi. Hal ini dapat berupa senyawa yang tidak diketahui, senyawa yang muncul sebagai sisa-sisa yang tidak dipertimbangkan dalam kromatografi.

Dalam penelitian ini dipilih metode *Folin-Ciocalteu* sebagai analisis kualitatif dengan pertimbangan bahwa teknik ini lebih murah dan sederhana cara pengerjaannya.

Prinsip reaksi ini adalah berdasarkan reduksi reagen campuran fosfotungstic (WO<sub>4</sub><sup>2-</sup>)-fosfomolibdat (MoO<sub>4</sub><sup>2-</sup>) dengan gugus hidroksil fenolik yang menghasilkan produk berwarna biru.

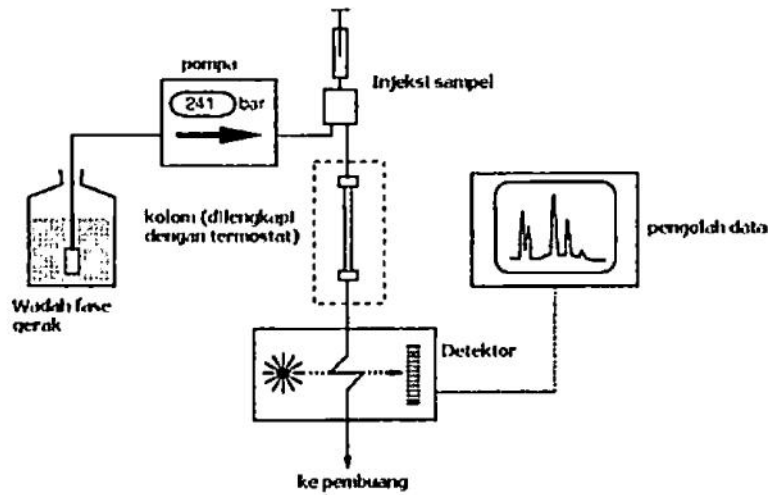
#### **E. Kromatografi Cair Kinerja Tinggi**

Kromatografi Cair Kinerja Tinggi atau KCKT merupakan suatu metode kromatografi cair yang paling banyak digunakan dalam analisis suatu senyawa karena kompatibel untuk sebagian besar senyawa terutama senyawa campuran yang konsentrasinya kecil dan tekanan uapnya rendah (nonvolatil). KCKT adalah sistem pemisahan dengan kecepatan dan efisiensi tinggi yang didukung oleh

kemajuan dalam teknologi kolom, sistem pompa tekanan tinggi, dan detektor yang sensitif dan beragam. KCKT mampu menganalisa berbagai cuplikan secara kualitatif maupun kuantitatif, baik komponen tunggal maupun campuran (Depkes RI,1995).

Kegunaan umum KCKT adalah untuk pemisahan sejumlah senyawa organik, anorganik, maupun senyawa biologis, analisis ketidakmurnian (*impurities*), analisis senyawa-senyawa yang tidak mudah menguap (*nonvolatil*), dan pemisahan senyawa-senyawa yang strukturnya hampir sama. Pemakaian KCKT secara luas menyangkut untuk isolasi senyawa, pemisahan senyawa campuran dan penetapan kadar senyawa. KCKT paling sering digunakan untuk: menetapkan kadar senyawa-senyawa tertentu seperti asam-asam amino, asam-asam nukleat dan protein-protein dalam cairan fisiologis, menentukan kadar senyawa-senyawa aktif obat dan lain-lain (Hostettmann *et al.*, 1986; Gandjar & Rohman, 2007).

Instrumentasi KCKT pada dasarnya terdiri atas delapan komponen pokok yaitu: (1) wadah fase gerak, (2) sistem penghantaran fase gerak, alat untuk memasukkan sampel, (4) kolom, (5) detektor, (6) wadah penampung buangan fase gerak, (7) tabung penghubung, dan (8) komputer atau perekam (Gandjar & Rohman, 2007). Skema dari KCKT dapat dilihat pada Gambar 7.



**Gambar 7.** Diagram skematik sistem KCKT

Teknik kromatografi dapat digolongkan menjadi dua jenis berdasarkan pola kepolaran fase diam dan fase geraknya, yaitu fase normal dan fase terbalik. Fase diam pada kromatografi fase normal memiliki sifat polar, polaritas pelarut meningkat kemampuan elusi meningkat. Sementara fase geraknya bersifat non polar, polaritas pelarut meningkat kemampuan elusi menurun. Sebaliknya, pada kromatografi fase terbalik, fase diamnya bersifat non polar, sedangkan fase geraknya bersifat polar. Kromatografi fase terbalik merupakan pilihan utama untuk kebanyakan sampel (Polite, 2000 ; Gandjar & Rohman, 2007).

Pengembangan metode KCKT diharapkan menghasilkan suatu metode analisis yang memiliki waktu analisis relatif pendek untuk analisis secara rutin, menghasilkan puncak yang sempit untuk rasio *signal to noise* yang besar dan meminimalkan penggunaan fase gerak (Snyder *et al.*, 1997).

Tahap awal pengembangan metode KCKT adalah pengumpulan informasi tentang sampel yang akan dianalisis. Informasi tersebut meliputi jumlah senyawa yang terdapat dalam sampel, struktur kimia, berat molekul, pKa, spektra UV dan

kelarutan sampel. Selanjutnya dilakukan penentuan tujuan pemisahan dengan KCKT. Sampel untuk analisis KCKT ada beberapa jenis, yaitu larutan yang siap diinjeksikan pada sistem KCKT, sampel padat yang perlu dilarutkan atau diekstraksi dan sampel padat yang perlu *pre-treatment* terlebih dahulu. Detektor UV merupakan pilihan utama karena dapat diaplikasikan untuk kebanyakan sampel yang memiliki kromofor. Oleh karena itu, informasi tentang spektra UV penting dalam pengembangan metode. Bila respon UV suatu senyawa tidak cukup kuat, dapat digunakan detektor lain, misalnya detektor fluoresen dan elektrokimia (Pramita, 2008). Pemilihan metode KCKT berdasarkan pada sifat analit. Sampel KCKT dapat berupa senyawa ion dan netral. Bila sampel merupakan senyawa netral, fase gerak tidak perlu ditambah dengan bufer, sedangkan senyawa asam atau senyawa basa biasanya memerlukan bufer. Pemilihan sistem KCKT juga meliputi pemilihan sistem elusi, yaitu isokratik atau gradien (Snyder *et al.*, 1997).

Kondisin isokratik paling sering digunakan pada KCKT karena dapat memperkecil masalah operasi. Senyawa yang sangat polar dan mudah larut dalam air paling cocok dipisahkan dengan kolom fase terbalik (Hostettmann *et al.*, 1986). Pada penelitian ini tanin bersifat polar dan mudah larut dalam air sehingga digunakan KCKT sistem fase terbalik dan elusi dengan sistem isokratik.

#### **F. Kerangka Konsep**

Tanin merupakan suatu senyawa polifenol yang berada di buah delima atau *Punica granatum L.* memberi rasa kesat dan sepat pada delima putih. Rasa kesat ini dikemukakan sebagai tanin dengan kandungannya yang cukup tinggi dalam buah delima (Diperta Jabar, 2013). Secara kimia terdapat dua jenis tanin yang

tersebar tidak merata dalam tumbuhan yaitu tanin terhidrolisis (*Hydrolyzable tannin*) dan tanin terkondensasi (Proantosianidin) (Daniel, 2006).

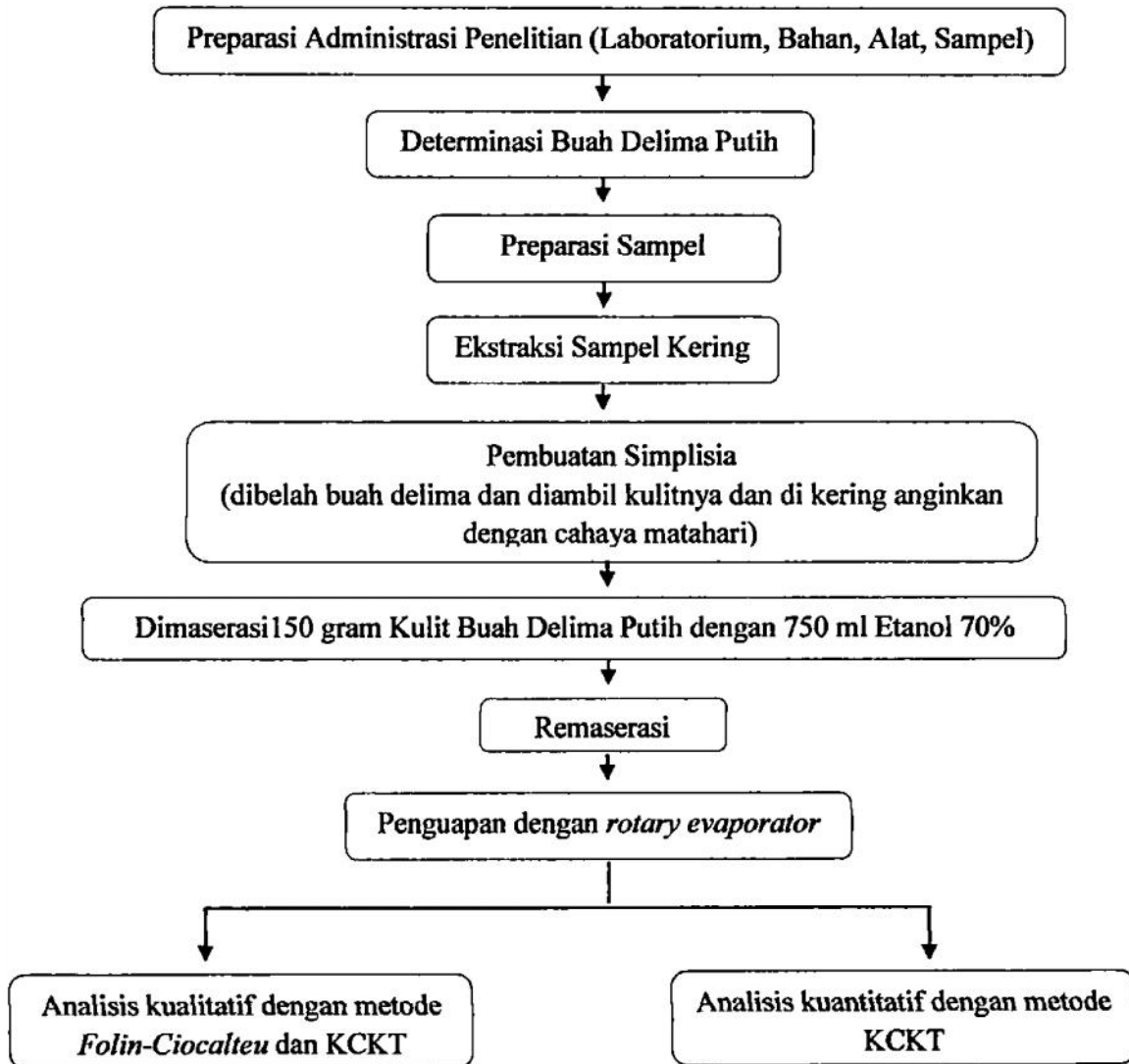
Secara struktural tanin adalah suatu senyawa fenol dengan memiliki berat molekul besar yang terdiri dari gugus hidroksi dan beberapa gugus yang bersangkutan seperti karboksil untuk membentuk kompleks kuat yang efektif dengan protein dan beberapa makromolekul (Horvart, 1981). Tanin memiliki peranan biologis yang kompleks dan juga dapat berfungsi sebagai antioksidan biologis (Hagerman, 2002).

Tanin larut dalam air dan pelarut organik seperti metanol, etanol, aseton dan pelarut organik lainnya terkecuali beberapa struktur yang mempunyai berat molekulnya besar. Dari sifat-sifat tanin tersebut tanin diekstraksi dari tumbuhan dengan pelarut etanol dan larutannya harus disimpan ditempat yang terhindar dari matahari serta sebaiknya didinginkan (Giner-Chavez, 2001).

Pada penelitian ini ekstraksi kulit delima digunakan larutan penyari etanol 70%. Proses ekstraksi dilakukan dengan metode maserasi selama 5 hari dan dilanjutkan remaserasi kembali dengan penyari yang sama selama 24 jam. Filtrat jernih yang diperoleh dikumpulkan dan diuapkan dengan *vacum rotary evaporator* pada suhu 50°C hingga diperoleh ekstrak yang kental. Selanjutnya dilakukan uji kualitatif menggunakan metode *Folin-Ciocalteu* dan KCKT.

Analisis kuantitatif tanin dilakukan menggunakan Kromatografi Cair Kinerja Tinggi (KCKT) fase terbalik, yaitu dengan fase diam C-18 dan fase gerak asam fosfat 0,55%. Detektor yang digunakan merupakan detektor UV 277 nm dengan

panjang gelombang yang berdasarkan hasil *scanning*. Skema kerangka konsep penelitian dapat dilihat pada Gambar 8.



**Gambar 8.** Diagram skematik sistem KCKT



## **G. Hipotesis**

Uji kualitatif kandungan tanin dalam delima putih (*Punica granatum L.*) dapat dilakukan menggunakan metode *Folin-Ciocalteu* dan KCKT sedangkan uji kuantitatif kandungan tanin dapat dilakukan dengan menggunakan metode kromatografi cair kinerja tinggi (KCKT) dengan detektor spektrofotometer *visible*.