

## BAB IV

### HASIL DAN PEMBAHASAN

#### A. Hasil Penelitian

##### 1. Pengumpulan Bahan

Buah delima putih (*Punica granatum L.*) segar diperoleh dari perkebunan Sabilla farm, Jl. Kaliurang Km.18,5 Pakem, Sleman, Yogyakarta. Buah delima yang diperoleh masih segar berwarna kuning kecokelatan. Pemanenan dilakukan di sore hari. Cara pemanenan buah delima dengan cara menggunting pangkal buah yang berikatan dengan ranting pohonnya. Setelah itu buah delima dibersihkan dan dipisahkan antara daging buah dan kulitnya lalu diambil bagian kulitnya saja untuk diekstraksi. Gambar buah delima putih segar tercantum pada *Lampiran 4*.

##### 2. Determinasi Tanaman

Untuk memastikan bahwa tanaman yang digunakan untuk penelitian benar maka perlu dilakukan determinasi. Determinasi dilakukan di bagian Biologi Farmasi oleh bapak Djoko Santosa, S.Si., M.Si. determinasi bertujuan untuk menghindari kesalahan dalam pengambilan sampel analisis fitokimia (Harborne, 1987). Surat keterangan hasil determinasi buah delima putih dapat dilihat pada lembar *Lampiran 2*.

##### 3. Ekstraksi

Bagian yang digunakan untuk ekstraksi adalah kulit buah delima putih yang telah dikeringkan dengan menggunakan sinar matahari dengan ditutupi kain hitam. Setelah itu di buat serbuk menggunakan blender tanpa

menggunakan air. Tujuannya untuk memperkecil bahan, sehingga luas permukaan bahan yang dapat berinteraksi dengan penyari semakin besar, sehingga penyarian akan terjadi lebih efektif (Harborne,1987). Sebanyak 150 gram serbuk kulit delima putih dimasukkan ke stoples dan ditambahkan 750 ml etanol 70% dan didiamkan selama 4 hari sambil diaduk tiap 6 jam. Setelah 4 hari disaring dan ampas diperas. Dilakukan remaserasi 1 kali dengan menggunakan pelarut dalam jumlah yang sama. Filtrat diuapkan dengan *vacum rotary evaporator* pada suhu 50<sup>0</sup>C hingga diperoleh ekstrak yang kental. Tuangkan dalam cawan porselin, dipanaskan dan diuapkan diatas penangas air yang dibantu dengan kipas dengan penurunan tekanan sambil terus diaduk. Proses ini untuk menguapkan etanol sehingga diperoleh ekstrak yang kental dengan konsentrasi 100%. Hasil penguapan yang diperoleh ini disebut ekstrak etanol kulit delima putih. Gambar proses penguapan dengan *rotary evaporator* disajikan pada *Lampiran 4*. Dari hasil penguapan diperoleh ekstrak etanol sebesar 95,415 gram sehingga diperoleh rendamen ekstrak etanolik sebesar 63,31% dalam kulit buah delima kering.

#### **4. Analisis Kualitatif Kandungan Tanin**

##### **a. Analisis Kualitatif Kandungan Tanin dengan Larutan *Folin-***

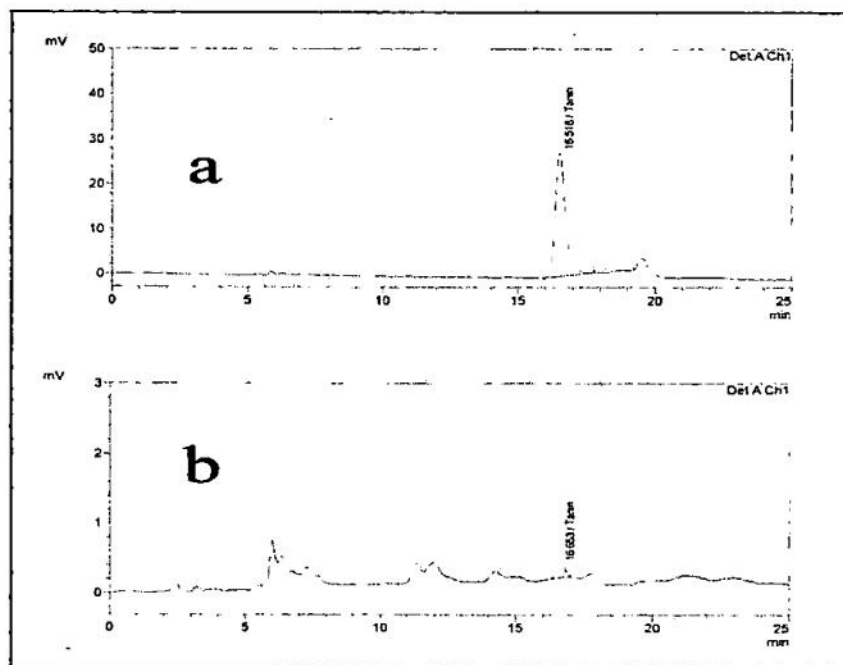
##### ***Ciocalteu***

Analisis kualitatif ini bertujuan untuk mengetahui komposisi kimiawi dalam ekstrak etanol. Identifikasi kandungan senyawa tanin ini dilakukan berdasarkan metode *Folin-Ciocalteu*. Filtrat hasil ekstraksi kulit delima diambil sebanyak 300 µL untuk dilakukan pengujian ada tidaknya

kandungan tanin di dalam filtrat kulit delima yang diperoleh. Filtrat tersebut ditetesi dengan larutan folin dan natrium karbonat, kemudian diamati perubahan warna filtrat yang semula berwarna kuning kecoklatan menjadi warna biru. Dalam hal ini, dapat disimpulkan bahwa di dalam filtrat terdapat tanin. Sifat kimia tanin akan memberikan reaksi warna biru jika bereaksi dengan larutan folin dan natrium karbonat. Hasil uji kualitatif tanin dengan metode *Folin-Ciocalteu* disajikan pada *Lampiran 6*.

#### **b. Analisis Kualitatif Kandungan Tanin dengan Metode KCKT**

Analisis kualitatif kandungan tanin dengan KCKT diperoleh waktu retensi standar tanin 16,518 menit. Pada sampel ekstrak kulit buah delima putih juga menghasilkan kromatogram pada waktu retensi standar tersebut, sehingga berdasarkan analisis kualitatif baik menggunakan metode *Folin-Ciocalteu* dan KCKT dapat membuktikan bahwa pada kulit buah delima putih mengandung tanin yang ditunjukkan dengan hasil positif dari metode *Folin-Ciocalteu* dan waktu retensi yang sama antara standar dan sampel. Kromatogram hasil analisis kualitatif tanin dapat dilihat pada Gambar 9.

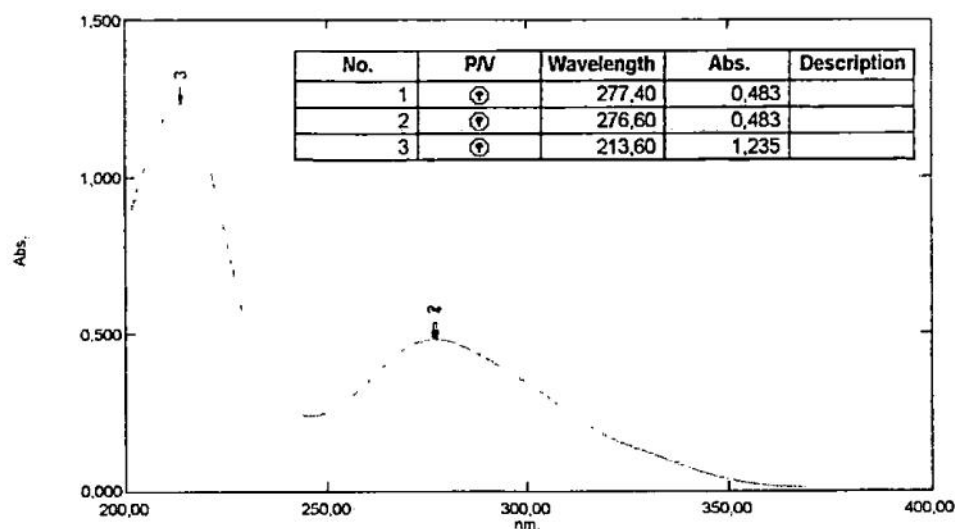


**Gambar 9.** Kromatogram standar tanin (a) dan sampel ekstrak kulit delima putih (b)

## 5. Analisis Kuantitatif Kandungan Tanin dengan Metode KCKT

### a. Penentuan Panjang Gelombang Pengukuran Baku Standar Tanin

Penentuan panjang gelombang pengukuran standar tanin dibuat menggunakan spektrofotometer UV dan di *running* pada panjang gelombang 200 – 400 nm untuk mengetahui pada panjang gelombang maksimum isolat. Dari hasil pembacaan absorbansi, didapatkan panjang gelombang maksimum adalah 277,4 nm. Panjang gelombang ini digunakan untuk menganalisis kadar dengan KCKT. Hasil *scanning* panjang gelombang dapat dilihat pada Gambar 10.



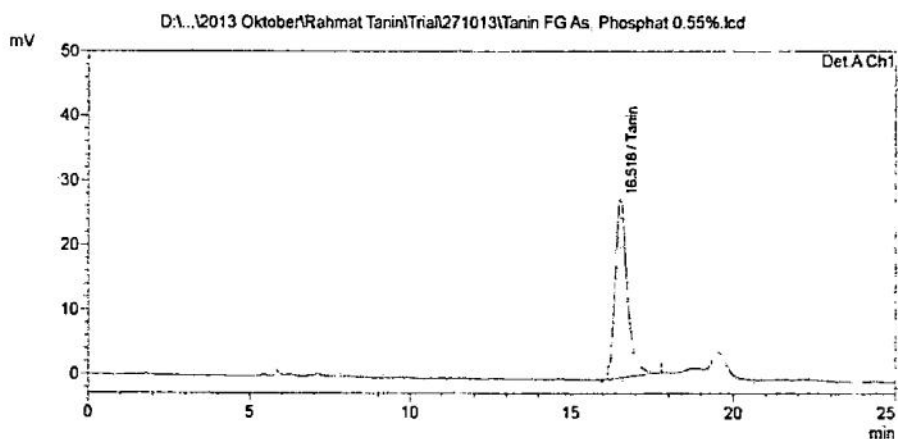
**Gambar 10.** Spektra Standar Tanin (*Scanning*  $\lambda$  maksimum menggunakan Shimadzu UV-1800)

#### b. Optimasi Sistem KCKT

Sistem KCKT yang digunakan untuk analisis kandungan tannin ini mengacu pada adalah Zhongkui *et al* (2001) sebagai berikut:

- KCKT : Shimadzu
- Fase diam : Kolom C-18 (250 x 4.6 mm)
- Fase gerak : Asam Fosfat 0,55% (v/v)
- Kecepatan alir : 1,5 mL/menit
- Volume injeksi (*loop*): 20  $\mu$ L
- Elusi : Isokratik.
- Waktu Retensi : 25,0 menit
- Detektor : UV 277 nm

Hasil optimasi sistem dalam analisis senyawa tanin diperoleh waktu retensi 16,518 menit dengan data kromatogram sebagai berikut:



**Gambar 11.** Trial Peak Kromatogram KCKT Kromatogram standar Tanin (*Scanning*  $\lambda$  maksimum menggunakan Shimadzu UV-1800) konsentrasi 1 mg/mL, waktu retensi 16,518 menit; Fase gerak: Asam Fosfat 0,55%; (merck®); Fase diam: Shimadzu® Shim-pack VP-ODS 250 x 4,6 mm; Elusi isokratik, Detektor Shimadzu® SPD-20A Uv-Vis  $\lambda$  277 nm; volume injeksi 20  $\mu$ L; laju alir 1,5 mL/menit.

### c. Pembuatan Larutan Baku Standar Tanin

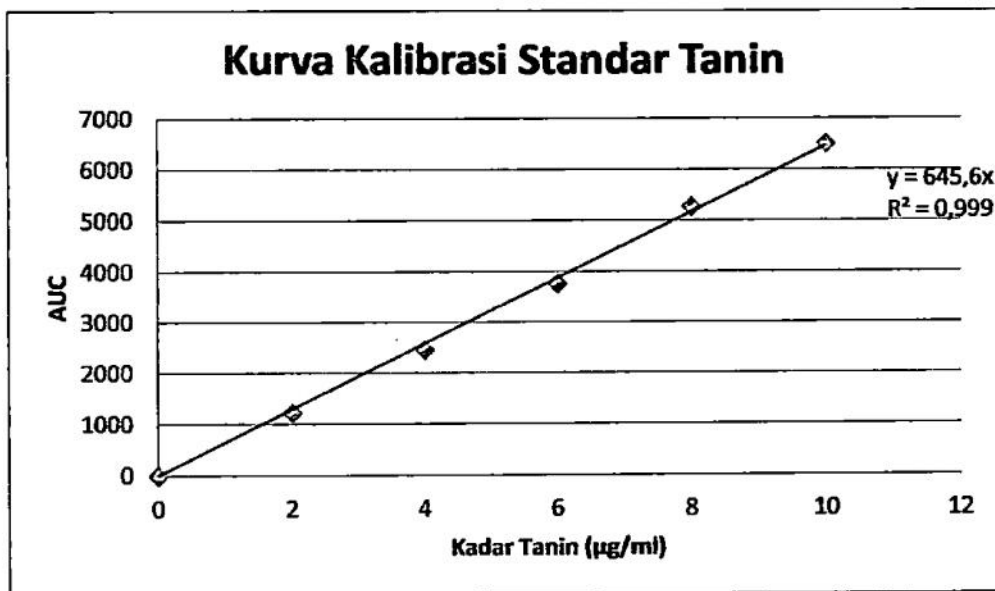
Larutan standar tanin dibuat dengan melarutkan standar tanin dengan aquabidest dan disonikator selama 15 menit, lalu disaring dengan *membrane filter* 0,22  $\mu$ m. Hasil pembuatan larutan standar tanin mendapatkan hasil yang larut dan siap digunakan untuk analisis ke dalam sistem KCKT.

#### d. Linieritas dan Kurva Kalibrasi

Uji linearitas dilakukan pada seri larutan standar tanin dengan konsentrasi tanin 2, 4, 6, 8 dan 10  $\mu\text{g/mL}$ . Hasil uji diperoleh persamaan garis  $y = 645,6x$  dan koefisien korelasi ( $r$ ) 0,999. Tabel linieritas dan kurva kalibrasi standar tanin dapat dilihat pada Tabel 2 dan Gambar 12.

**Tabel 2.** Tabel Linieritas

Kadar ( $\mu\text{g/mL}$ )	Luas Area
0	0
2	1222
4	2459
6	3762
8	5272
10	6501
Slope (b)	645,6
Aksis Intercept (a)	0
Koefisien Korelasi (r)	0,999



**Gambar 12.** Kurva Kalibrasi Standar Tanin

**e. Penetapan Kadar Kulit Buah Delima**

Hasil dari penetapan kadar tanin dalam ekstrak diperoleh sebesar 2,01%. Penetapan kadar tanin dari hasil luas area yang didapat dari kromatografi cair kinerja tinggi (KCKT) akan disajikan pada Tabel 3.

**Tabel 3. Hasil Penetapan Kadar Tanin dengan KCKT**

Sampel	Bobot (mg)	FP	Volume (mL)	Luas Area	C. Cal.	Kadar (% b/ b)	Kadar Rata-rata	SD	% CV
Ekstrak	10	3,333	10	3742	5,797	1,93%	2,01%	0,001	3,53%
Kering	10	3,333	10	4013	6,217	2,07%			
	10	3,333	10	3917	6,068	2,02%			

\*FP = Faktor Pengenceran; C. Cal = *Concentration Calculate*.

Sejumlah 1 kg buah delima putih yang dikeringkan mempunyai bobot kulit kering konstan 350 gram, sehingga dapat ditetapkan dalam ekstrak kering buah delima putih mengandung tanin sebesar 2,01 %. Perhitungan secara lengkap disajikan pada *lampiran 11*.



## B. Pembahasan

### 1. Ekstraksi

Pengambilan bahan dan zat aktif suatu tumbuhan dapat dilakukan dengan metode ekstraksi. Ekstraksi adalah proses pemisahan, penarikan atau pengeluaran suatu komponen campuran dari campurnya. Biasanya menggunakan pelarut yang sesuai dengan komponen yang diinginkan, cairan dipisahkan dan diuapkan sampai pada kepekatan tertentu. Kelarutan suatu komponen tergantung pada derajat kepolarannya. Hukum *"like dissolved like"* menyatakan bahwa senyawa yang bersifat polar hanya dapat larut dalam pelarut polar dan semipolar, dan sebaliknya. Senyawa yang bersifat nonpolar hanya dapat larut dalam pelarut nonpolar dan semipolar. Jenis pelarut yang digunakan menjadi salah satu faktor yang mempengaruhi untuk menghasilkan rendamen dari bahan dan kadar dari komponen bioaktif seperti tanin. Pelarut yang digunakan adalah etanol yang bersifat polar. Etanol memiliki polaritas tinggi sehingga mampu mengekstrak tanin lebih tinggi dengan tetapan derajat dielektrikum 24,30. Penggunaan pelarut etanol dimaksudkan untuk mengekstrak senyawa tanin yang bersifat polar dalam sampel. Pemilihan etanol sebagai pelarut juga didasarkan pada tingkat keamanan dan kemudahan penguapan (Houghton dan Raman, 1998). Markom *et al.* (2007) mengekstraksi tanin dari *Phyllanthus niruri Linn*, menggunakan berbagai pelarut organik (petroleum eter, diklorometana, khloroform, metanol, etanol dan aseton) dengan metode ekstraksi Soxhlet. Marnoto *et al.* (2012) mengekstraksi tanin dari tanaman Putrimalu (*Mimosa Pudica*) menggunakan

pelarut organik (n-heksan, aseton, metanol, dan etanol) dengan metode ekstraksi Soxhlet. Hasil terbaik diperoleh pada ekstraksi tanin dengan pelarut etanol.

Sampel kulit buah delima diekstraksi menggunakan metode maserasi dan diikuti remaserasi. Maserasi dilakukan dengan cara merendam serbuk simplisia dalam pelarut dengan beberapa kali penggojokan atau pengadukan pada temperatur ruangan. Perendaman sampel simplisia menyebabkan cairan penyari akan menembus dinding sel dan masuk ke dalam rongga sel yang mengandung bahan zat aktif. Zat aktif akan larut karena adanya perbedaan konsentrasi antara zat aktif di dalam sel dengan yang di luar sel, maka larutan yang terpekat akan didesak ke luar sehingga senyawa yang ada dalam sel akan terlarut dalam pelarut (Harbone, 1987).

## **2. Analisis Kualitatif Kandungan Tanin**

### **a. Analisis Kualitatif Kandungan Tanin dengan Metode *Folin-Ciocalteu***

Uji keberadaan kandungan senyawa tanin secara kualitatif dilakukan menggunakan metode *Folin-Ciocalteu*. Dari hasil pengamatan, warna biru yang dihasilkan menunjukkan bahwa sejenis senyawa polifenol yang terkandung dalam ekstrak adalah positif tanin sesuai dengan literatur bahwa kemampuan sampel untuk mereduksi reagen *Folin-Ciocalteu* yang mengandung senyawa asam fosfomolibdat-fosfotungstat, membentuk senyawa kompleks yaitu molibdenum tungstan yang berwarna biru.

Semakin pekat intensitas warna menunjukkan kandungan fenol dalam ekstrak semakin besar (Julkunen Tiiti, 1985).

#### **b. Analisis Kualitatif Kandungan Tanin dengan Metode KCKT**

KCKT merupakan teknik pemisahan dan digunakan secara luas untuk analisis kualitatif dan kuantitatif. Analisis kualitatif KCKT menggunakan parameter waktu retensi dan kuantitatif menggunakan luas puncak. Setiap komponen senyawa kimia memiliki waktu retensi dan luas puncak yang berbeda-beda. Analisis kualitatif dilakukan dengan membandingkan antara waktu retensi standar senyawa kimia dengan waktu retensi baku pembanding. Pada analisis kualitatif kandungan tanin dengan KCKT diperoleh waktu retensi standar tanin 16,518 menit. Pada sampel ekstrak kulit buah delima putih menghasilkan kromatogram pada waktu retensi standar tersebut. Hal ini menunjukkan bahwa pada sampel yang diteliti terdeteksi adanya tanin.

### **3. Analisis Kuantitatif Kandungan Tanin dengan Metode KCKT**

#### **a. Penentuan Panjang Gelombang Pengukuran Standar Tanin**

Setiap senyawa mempunyai panjang gelombang yang spesifik sehingga dalam penetapan kadar dengan kromatografi cair kinerja tinggi (KCKT) diperlukan penentuan panjang gelombang senyawa yang dimaksud terlebih dahulu. Pada penetapan kadar dengan KCKT ini ditetapkan terlebih dahulu panjang gelombang dari hasil isolat yang diperoleh. Panjang gelombang maksimum adalah panjang gelombang dimana terjadi eksitasi elektronik yang memberikan serapan maksimum.

Pembacaan serapan yang dilakukan pada panjang gelombang maksimum ( $\lambda_{maks}$ ) akan memberikan kesalahan pembacaan yang paling kecil atau dengan kata lain paling akurat (Sastrohamidjojo, 1991b).

Panjang gelombang dikatakan maksimum jika suatu zat yang memiliki nilai absorbansi paling besar. Panjang gelombang maksimum dipilih karena pada panjang gelombang tersebut zat akan memberikan respon yang maksimum, terutama apabila konsentrasi analit yang akan dianalisis mempunyai konsentrasi kecil. Nilai panjang gelombang maksimum ini dapat digunakan untuk identifikasi kualitatif suatu senyawa, karena bersifat spesifik untuk setiap senyawa yang mempunyai gugus kromofor tertentu dan jenis transisi elektronik tertentu (Gandjar dan Rohman, 2007). Untuk mengetahui panjang gelombang maksimum tanin maka senyawa tersebut *discanning* pada spektrofotometer UV, sehingga diperoleh spektra UV senyawa tersebut. Berdasarkan spektra yang diperoleh dapat digunakan untuk menentukan panjang gelombang yang akan digunakan pada detektor UV dalam penetapan kadar tanin secara KCKT menggunakan baku eksternal.

Hasil *scanning* pada  $\lambda$  200-400 nm diperoleh data bahwa  $\lambda_{maks}$  tanin adalah 275,5 nm. Panjang gelombang ini digunakan untuk menganalisis kadar dengan KCKT.

#### **b. Pembuatan Larutan Baku Standar Tanin**

Pembuatan larutan baku standar tanin bertujuan untuk mendapatkan persamaan regresi linear yang digunakan dalam menetapkan kadar senyawa tanin dalam kulit buah delima. Larutan baku konsentrasi 1 mg/mL diencerkan untuk membuat konsentrasi kurva baku yaitu 2, 4, 6, 8 dan 10  $\mu\text{g/mL}$  (perhitungan lengkap pembuatan seri konsentrasi kurva baku disajikan pada *Lampiran 7*).

Larutan standar tanin dibuat dengan melarutkan standar tanin dengan aquabidest dan disonikator selama 15 menit, lalu disaring dengan *membrane filter* 0,22  $\mu\text{m}$ . Sonikator selain difungsikan untuk menghilangkan gas-gas yang terlarut dalam larutan juga untuk menyebarkan nanopartikel yang masih dapat melewati *membrane filter* 0,22  $\mu\text{m}$  dalam larutan sampel (Khopkar, 2008). Hasil pembuatan larutan baku mendapatkan hasil yang larut dan sudah memenuhi syarat untuk digunakan analisis dengan KCKT.

#### **c. Linearitas**

Linearitas ditentukan dengan membuat sebuah kurva kalibrasi hubungan antara konsentrasi standar tanin dan luas area puncak. Penilaian linieritas suatu metode analisis didasarkan pada nilai koefisien korelasi ( $r$ ). Linieritas suatu metode analisis akan semakin baik apabila nilai koefisien variasinya semakin mendekati satu. Hubungan linier yang ideal dicapai jika  $r = +1$  atau  $-1$  bergantung pada arah garis, sedangkan nilai slope menunjukkan kepekaan analisis terutama instrumental yang digunakan

(Harmita, 2004). Kurva kalibrasi yang diperoleh dari Tabel 2 memiliki persamaan garis  $y = 645,6x$  dan koefisien korelasi ( $r$ ) 0,999 (Gambar 12) untuk kisaran konsentrasi standar tanin 2, 4, 6, 8, 10  $\mu\text{g}/\text{mL}$  (*Lampiran 8*).

Menurut ICH (2005), nilai  $r$  yang dihasilkan telah memenuhi persyaratan, yaitu harus lebih besar dari 0.990. Nilai  $r$  yang diperoleh mendekati satu sehingga dapat dikatakan bahwa kurva memiliki kelinieran yang tinggi, artinya dengan meningkatnya konsentrasi tanin maka luas puncak juga akan mengalami kenaikan yang linear, sehingga metode yang digunakan telah memenuhi syarat linearitas untuk digunakan pada penetapan kadar tanin dalam sampel ekstrak kulit delima.

#### **d. Penetapan Kadar Tanin Total dalam Ekstrak dengan Kromatografi Cair Kinerja Tinggi (KCKT)**

Sampel yang digunakan untuk menetapkan kadar tanin adalah ekstrak kulit delima putih, yaitu sebanyak 20  $\mu\text{L}$  disuntikkan ke dalam sistem KCKT. Gambar kromatogram sampel hasil analisis KCKT disajikan pada *Lampiran 9*. Dari hasil KCKT tersebut dideteksi banyak puncak, hal ini dikarenakan panjang gelombang yang digunakan pada 277 nm, kemungkinan senyawa yang bisa terdeteksi pada panjang gelombang tersebut banyak. Tanin mengandung sistem aromatik yang terkonjugasi oleh karena itu menunjukkan pita serapan yang kuat pada daerah ultraviolet dan tampak (Khopkar, 1990; Harborne, 1987).