



Analisis Kualitatif dan Kuantitatif Tanin Ekstrak Kulit Buah Delima Putih (*Punica Granatum L.*) Menggunakan Metode Kromatografi Cair Kinerja Tinggi (KCKT)

Qualitative and Quantitative Analysis of Tannin Extracted from White Pomegranate (*Punica Granatum L.*) by using High Performance Liquid Chromatography (HPLC) Method

Rahmat A Hi Wahid

Program Sarjana Farmasi, Universitas PGRI Yogyakarta, Yogyakarta

Email : rahmat@upy.ac.id

ABSTRAK

Kulit buah delima putih (*Punica granatum L.*) diketahui mengandung tanin. Tanin merupakan senyawa polifenol yang dapat larut dalam air dan pelarut organik juga dapat mengendapkan protein. Tanin terdapat luas dalam tumbuhan dan digunakan untuk sarana proteksi serangan hewan, bakteri, jamur, serta dapat digunakan sebagai hepatoprotektor. Penelitian ini bertujuan untuk mengetahui cara analisis tanin yang sesuai sehingga diperoleh kadar tanin dalam ekstrak kulit buah delima putih menggunakan metode Kromatografi Cair Kinerja Tinggi (KCKT). Kulit buah delima putih diekstraksi dengan pelarut etanol 70% dengan metode maserasi selama 5 hari. Pengujian kualitatif tanin dilakukan dengan metode *Folin-Ciocalteu* dan KCKT. Sedangkan pengujian kuantitatif tanin dengan KCKT menggunakan fase diam kolom C18 Octadesyl Silane (ODS) 25 cm x 4,6 mm, fase gerak asam fosfat 0,55% (v/v), kecepatan alir 1,5 mL/menit, elusi isokratik, dan menggunakan detektor spektrofotometer UV (λ 277 nm). Hasil analisis menunjukkan waktu retensi 25,0 menit. Linearitas diperoleh dengan memplotkan luas puncak kromatogram dan konsentrasi isolat menunjukkan korelasi yang baik ($r = 0,999$) dengan persamaan regresi linear $y = 645,6x$. Kadar rata-rata tanin ekstrak etanol kulit buah delima putih yang ditetapkan dengan KCKT sebesar 2,01%. Dari hasil penelitian ini dapat disimpulkan bahwa analisis kualitatif tanin dapat dilakukan dengan metode *Folin-Ciocalteu* dan KCKT sedangkan analisis kuantitatif dapat dilakukan dengan KCKT.

Kata kunci : *Folin-Ciocalteu*, KCKT, Kulit Buah Delima Putih (*Punica granatum L.*), Tanin.

ABSTRACT

The peel of white pomegranate (*Punica granatum L.*) is known to contain tannins. These chemical are polyphenols that can be dissolved in water in addition to organic solvent and protein. Tannins are widespread in plants and used as a medium for protecting toward animal attack, bacteria, fungi, and can also be used to hepatoprotektor. The aim of this study is to quantify and optimize the composition of tannin extracted from pomegranate peel extract by using High-Performance Liquid Chromatography (HPLC). The peel of white pomegranate is extracted by maceration method using 70% of ethanol liquid. HPLC and *Folin-Ciocalteu* was used as qualitative analyze of tannins, and quantitative analyze by HPLC with Octadesyl Silane (ODS) 25 cm x 4,6 mm as stationary phase C18 column, phosphoric acid 0,55% (v/v) as mobile phase, the flow rate 1,5 mL/minute, isocratic elution and with spektrofotometer UV detector (λ 277 nm). Result showed that a retention time of 25.0 minute. Linearity obtained by plotting the peak area of chromatogram and the concentrate of isolate showed that good correlation ($r=0,999$) with the equality of linear regrestion $y = 645,6x$. The average content of extract tannins ethanol the peel of white Pomegranate that determinated with HPLC is 2,01%. As a conclusion, the qualitative analyze of tannins can be used by *Folin-Ciocalteu* and HPLC methods, and quantitative analyze can be used by HPLC.

Keywords: *Folin-Ciocalteu*, HPLC, Tannins, Pomegranate (*Punica granatum L.*)

PENDAHULUAN

Buah delima (*Punica granatum* L.) merupakan buah asli negara Persia (Iran) yang telah lama dibudidayakan di daerah Mediterania dan banyak ditanam di daerah Tiongkok Selatan dan Asia Tenggara termasuk di Indonesia sebagai tanaman hias, tanaman obat, sekaligus untuk dimakan buahnya. Sebagai obat tradisional, buah delima putih lebih banyak digunakan oleh orang Indonesia daripada buah delima merah. Delima merah memiliki rasa yang lebih manis, segar dan kesat dibanding delima putih yang memiliki rasa lebih sepat, kesat dan kurang manis. Rasa sepat tersebut diduga terjadi karena kandungan flavonoid (golongan polifenol dan tanin) yang cukup tinggi (Diperta Jabar, 2013).

Buah delima juga sering digunakan sebagai bahan campuran salad, jus, dan berbagai minuman segar lainnya. Tanaman buah delima cukup populer digunakan sebagai bahan obat tradisional karena merupakan salah satu *phytoplant* yang kaya akan *nutraceuticals* dan antioksidan. Beberapa sumber menyatakan, buah delima merah dan putih (*Punica granatum* L.) memiliki kandungan metabolit diantaranya alkaloid, flavonoid, tanin, senyawa fenolik dan asam askorbat yang memiliki aktivitas antioksidan dan meningkatkan sistem imun (Gill *et al.*, 2012; Pedriali *et al.*, 2010; Osama *et al.*, 2010; Dikmen *et al.*, 2011).

Kulit dan buah delima merah maupun putih telah diteliti sebagai antioksidan (Shiban *et al.*, 2012; Mali *et al.*, 2011; Gill *et al.*, 2012), penghambat *Candida albicans* dibantu ketokonazol 2% (Nauli, 2010), sebagai antibakteri *Staphylococcus aureus*, *Staphylococcus mutans* dan antijamur *Aspergillus niger* (Dahham, 2010), antibakteri *Escherichia coli* (Perdana, 2011), antitumor, antikanker, dan sebagai hepatoprotektor (Apriliana, 2010), juga sebagai terapi dislipidemia (Sadeghipour *et al.*, 2014; Grabež *et al.*, 2019), aterosklerosis (Sharifan *et al.*, 2016),

diabetes mellitus tipe 2 (Middha *et al.*, 2014; Salwe *et al.*, 2015; Shishehbor, 2016; Grabež *et al.*, 2019). Penelitian oleh Wang *et al.* (2018) bahwa ekstrak kulit buah delima dosis 250mg/kg sekali sehari selama 3 hari mampu memperbaiki respon imun melalui aktivasi CD4⁺ dan CD8⁺ sel T pada tikus betina C57BL/6 yang diinduksi Concanavalin A.

Bhandari (2012) mengungkapkan bahwa komponen delima yang paling bermanfaat adalah ellagitanin, asam punicic, flavonoid, antosianidin, antosianin dan flavon estrogenik. Kulit buah delima putih mengandung alkaloid peletierene, granati, resin, tanin, kalsium oksalat dan pati. Bagian dari kulit buah delima banyak mengandung senyawa tanin yang dapat digunakan sebagai pengobatan (Bhandari, 2012), seperti antioksidan, antibakteri, antijamur dan lain-lain (Cuong *et al.*, 2019). Ada 30 jenis tanin dan hidrolisisnya yang dilaporkan ada didalam kulit buah delima diantaranya *punicalin*, *ellagic acid*, *gallagic acid*, and *ellagic acid glycosides* (Fischer *et al.*, 2011).

Tanin merupakan senyawa fenolik yang berada di tumbuhan (Cuong *et al.*, 2019; Patel, 2011), yang dapat larut dalam air dan pelarut organik (Sun *et al.*, 2015). Tanin memiliki struktur kimia yang beragam sehingga dibagi menjadi empat kelompok utama, yaitu gallotanin, ellagitanin, proantosianin (tannin terkondensasi) dan tannin kompleks. Tanin mempunyai kemampuan mengendapkan protein, karena tanin mengandung sejumlah kelompok ikatan fungsional yang kuat dengan molekul protein yang selanjutnya akan menghasilkan ikatan silang yang besar dan kompleks yaitu protein tanin. Tanin mempunyai berat molekul mulai dari 500 hingga 20.000 DA (Cuong *et al.*, 2019).

Dalam penelitian ini akan dilakukan analisis kualitatif dan kuantitatif kandungan tanin dari ekstrak kental kulit delima putih.

Dalam kulit delima putih terdapat tanin yang umumnya relatif polar sampai semipolar sehingga untuk mengisolasinya diperlukan pelarut yang polar atau semipolar. Ekstraksi kulit delima putih digunakan dalam etanol 70% yang bersifat relatif polar, sehingga diharapkan bisa mengekstraksi tanin (Cuong *et al.*, 2019; Sun *et al.*, 2015).

Galvao *et al.* (2018) membuktikan pada uji kualitatif dan kuantitatif pada kulit batang dari *Libidibia ferrea* menggunakan metode *Folin-Ciocalteu* dan KCKT. Hasil yang diperoleh bahwa uji senyawa tanin menggunakan metode *Folin-Ciocalteu* dan KCKT adalah dapat digunakan sebagai alat analitik yang tepat untuk menguji kualitas obat herbal dari *Libidibia ferrea*. Kontras dengan ini, Wiesneth & Jürgenliemk (2017) membuktikan bahwa uji tanin total dan kandungan fenolik menggunakan metode *Folin-Ciocalteu* dan KCKT adalah sangat tepat, sederhana, dan cepat yaitu setidaknya bisa dianalisis hingga 120 sampel dalam sehari oleh satu orang dengan tingkat sensitifitas dan spesifitas yang tinggi.

Pada penelitian ini akan dilakukan uji kualitatif tanin dalam ekstrak kulit delima putih menggunakan metode *Folin-Ciocalteu* dan KCKT dan digunakan Kromatografi Cair Kinerja Tinggi (KCKT) sebagai uji kuantitatif untuk penetapan kadar tanin.

METODE PENELITIAN

1. Bahan

Kulit kering buah delima putih yang sudah dideterminasi di Laboratorium Unit II Biologi Farmasi, Fakultas Farmasi, Universitas Gadjah Mada, asam fosfat 85% (Merck), aquabidest (Ostuka), etanol 70% (ekstraksi) Bratachem® / grade teknis, follin (Merck), methanol gradient grade for liquid chromatography (Merck), natrium karbonat (Merck), tanin (Sigma).

2. Alat

Alat-alat gelas yang lazim digunakan, batang pengaduk, freezer, kertas saring, kompor listrik, labu erlenmeyer, mikropipet ukuran 100 – 1000 µL dan 10 – 100 µL (Acura® manual 825), tabung reaksi, saringan (Corong Buchner), sentrifuge (K-Centrifuge® plc series PLC-05), sonikator, spektrofotometer (Simadzu® UV-1800), detektor UV-Vis (Simadzu® SPD-20A Uv-Vis), *syringe membrane filter* 0,22 µm, system alat KCKT (Simadzu® AD30), kolom fase diam KCKT (Simadzu® Shim-pack VP-ODS 250L x 4,6 µm), timbangan digital, *vacum rotary evaporator* (IKA® RV10), dan vortex (Labinco L46®).

3. Cara Kerja

a. Pembuatan Ekstrak Etanol Kulit Buah Delima Putih

Serbuk simplisia buah delima sebanyak 150 gram dimaserasi dengan pelarut etanol sebanyak 750 ml etanol 70% selama 5 hari dan digojok setiap pagi, siang dan sore. Selanjutnya ampas dan filtrat jernih dipisahkan. Ampas ini diremaserasi kembali dengan penyari yang sama selama 24 jam. Setelah itu Filtrat jernih hasil maserasi dan remaserasi yang diperoleh dikumpulkan dan diuapkan dengan *vacum rotary evaporator* pada suhu 50°C hingga diperoleh ekstrak yang kental. Tuangkan dalam cawan porselin, dipanaskan dengan kompor listrik dan dibantu dengan kipas angin sambil terus diaduk juga suhu tetap di kontrol dengan termometer. Proses ini untuk menguapkan etanol sehingga diperoleh ekstrak yang kental dengan konsentrasi 100%.

b. Pembuatan Larutan Folin

Larutan folin diambil sebanyak 1 ml. Kemudian ditambahkan aquabidest hingga volume 10 ml dan sonikasi hingga homogen.

c. Pembuatan Larutan Na₂CO₃

Na₂CO₃ ditimbang seksama sebanyak 7,5 gram. Kemudian dilarutkan dengan aquabidest hingga volume 100 ml dan sonikasi hingga homogen.

d. Uji Kualitatif Tanin dengan Larutan Folin-Ciocalteu

Disiapkan 2 tabung reaksi bersih dan kering, dimana satu untuk standar dan satu untuk sampel. Tabung pertama dimasukkan 300 μ L larutan standar tanin kadar 1000 μ g/mL dan tabung kedua diisi 300 μ g/mL sampel 1000 μ g/mL. Tambahkan pada masing-masing tabung 1,5 mL larutan folin (point a). Gojog dan didiamkan selama 3 menit. Kemudian ditambahkan kembali masing-masing tabung 1,2 mL larutan Na_2CO_3 . Gojog dan didiamkan. Amati perubahan warna yang terjadi (*positif tanin jika warna biru*).

e. Pembuatan Fase Gerak Kromatografi Cair Kinerja Tinggi (KCKT)

Pembuatan fase gerak sejumlah 500 ml, dengan cara mengukur 3,24 mL asam fosfat 85% menggunakan mikropipet kemudian menambahkan aquabidest hingga 500 mL. Selanjutnya larutan dihomogenkan dengan bantuan sonikator selama 15 menit.

f. Pembuatan Larutan Baku Standar Tanin

Standar tanin ditimbang seksama 10,0 mg, dimasukkan dalam labu takar 10 mL dan dilarutkan dalam aquabidest hingga tanda tera (1000 μ g/mL). Larutan tersebut disonikasi selama 15 menit dan disaring dengan *membrane filter* 0,22 μ m. Diperoleh konsentrasi larutan baku standar tanin 1000 μ g/mL.

g. Pembuatan Larutan Seri Baku Tanin

Dibuat larutan seri baku tanin dengan cara memipet 10; 20; 30; 40; dan 50 μ L masing-masing ke dalam labu takar 5 mL, kemudian diencerkan secara kuantitatif dengan aquabidest sampai tanda tera, sehingga diperoleh konsentrasi 2, 4, 6, 8 dan 10 μ g/mL. Setelah itu sebanyak 20 μ L diinjeksikan masing-masing larutan ke dalam sistem KCKT.

h. Penentuan Panjang Gelombang Pengukuran Baku Standar Tanin

Penentuan panjang gelombang pengukuran baku standar tanin dibuat menggunakan spektrofotometer UV antara panjang gelombang 200 – 400 nm. Diambil sebagian

larutan baku standar tanin dan dimasukkan kedalam kuvet lalu dilakukan *scanning* dengan spektrofotometer ultraviolet pada panjang gelombang 200 - 400 nm, sehingga diperoleh spektrum serapan dan panjang gelombang maksimum tanin. Nilai panjang gelombang maksimum yang diperoleh diset sebagai panjang gelombang deteksi pada sistem KCKT.

i. Kondisi KCKT untuk Penetapan Kadar Tanin

Sistem KCKT yang digunakan mengacu pada Zhongkui *et al.*, (2001) adalah 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 (<i>loop</i>):	20 μ L
Elusi	: Isokratik.
Waktu Retensi	: 25,0 menit
Detektor	: UV 277 nm

Setelah itu dilakukan pembilasan sistem dengan fase gerak selama 10 menit dengan kecepatan alir 1,5 mL/ menit, kemudian dihubungkan kolom dengan detektor. Selanjutnya diinjeksikan sampel sebanyak (20 μ L) dan dilihat kromatogram hasil elusi dan waktu retensi yang diperoleh.

j. Analisis Kurva Baku dan Sampel dengan Kromatografi Cair Kinerja Tinggi (KCKT)

Sejumlah 20 μ L larutan kurva baku dan sampel diinjeksikan dalam alat KCKT. Larutan kemudian dibawa masuk ke dalam kolom oleh aliran fase gerak yang dialirkan dengan tekanan dari pompa. Di kolom inilah larutan dianalisis kadarnya.

Running larutan kurva baku dan sampel dilakukan selama 10 menit dengan panjang gelombang hasil *scanning*. Dari analisis ini, didapatkan data berupa kromatogram yang menggambarkan luas area kurva baku. Selanjutnya data tersebut diolah dengan metode regresi linier.

k. Penetapan Kadar Kulit Buah Delima

Sebanyak 10,0 mg sampel ekstrak ditimbang seksama dan dilarutkan dalam 10 mL aquabidest. Larutan tersebut disonikasi selama 15 menit dan disaring dengan *membrane filter* 0,22 μm . Diperoleh konsentrasi larutan baku standar tanin 1000 $\mu\text{g}/\text{mL}$. Dipipet 300 μL larutan sampel tersebut menggunakan *micropipette* kemudian ditambahkan 700 μL aquabidest. Homogenisasi larutan tersebut menggunakan *vortex* selama 20 detik dengan kecepatan 40 rpm. Sampel disuntikkan sebanyak 20 μL ke sistem KCKT, kemudian dicatat luas puncaknya. Percobaan direplikasi sebanyak 3 kali. Kadar tanin dihitung dengan menggunakan persamaan regresi linear yang diperoleh dari kurva kalibrasi.

HASIL DAN PEMBAHASAN

1. Ekstraksi

Dari hasil penimbangan dan penguapan serbuk simplisia sebanyak 150 gram serbuk kulit delima putih diperoleh ekstrak etanol sebesar 95,415 gram sehingga diperoleh presentase rendamen ekstrak etanolik sebesar 63,31% dalam kulit buah delima kering. Perhitungan presentase rendemen ekstrak etanolik dihitung terhadap jumlah serbuk yang digunakan.

$$\text{Rumus Rendamen Ekstrak (\%)} = \frac{\text{bobot akhir sampel (ekstrak)}}{\text{bobot sampel (simplisia)}} \times 100\%$$

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 (Sun *et al.*, 2015).

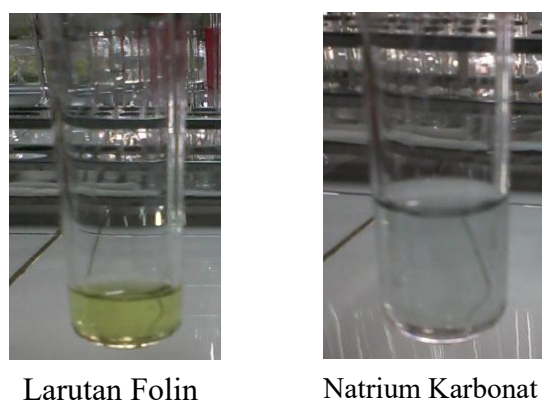
Rhazi *et al.*, (2019) mengekstraksi tanin dari kulit pohon *Acacia mollissima* dari Maroko, menggunakan berbagai pelarut organik (air, etanol, metanol dan etil asetat) dengan metode ekstraksi *microwave-assisted extract* (MAE). Marnoto *et al.*, (2012) mengekstraksi tanin dari tanaman Putrimalu (*Mimosa 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; Sun *et al.*, 2015; Cuong *et al.*, 2019).

2. Analisis Kualitatif 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*. Dari hasil pengamatan (Gambar 1), 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; Galvao *et al.*, 2018); Wiesneth & Jürgenliemk., 2017).



Larutan Folin

Natrium Karbonat



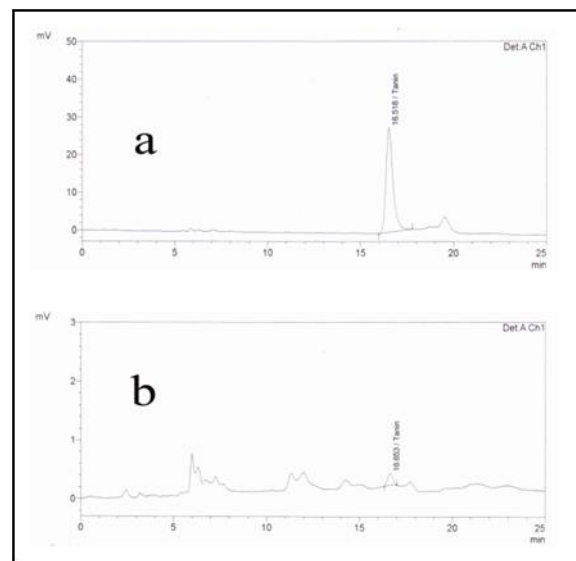
Terbentuk senyawa polyphenol (tannin)

Gambar 1. Hasil Uji Kualitatif Tanin dengan Metode *Folin-Ciocalteu*

3. 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 1.



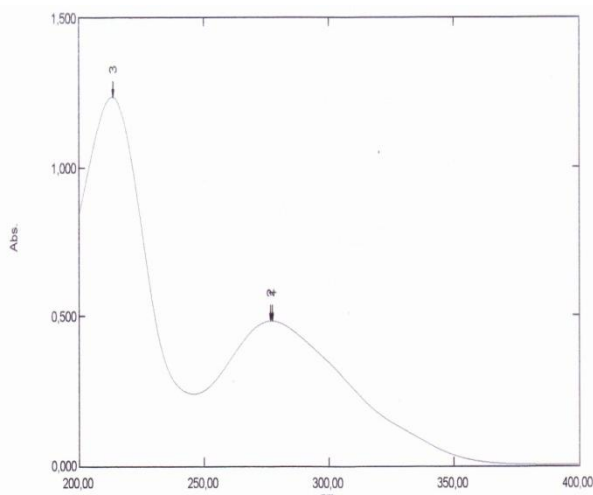
Gambar 2. Kromatogram standar tanin (a) dan sampel ekstrak kulit delima putih (b)

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.

4. 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 3.



Gambar 3. Spektra Standar Tanin (*Scanning* λ maksimum menggunakan Shimadzu UV-1800)

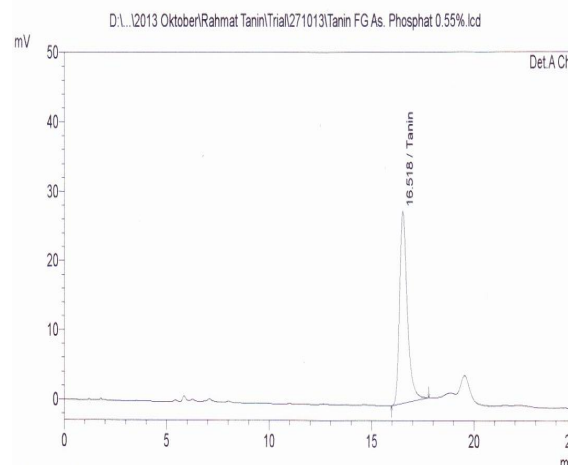
b. Optimasi Sistem KCKT

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 (<i>loop</i>)	: 20 μ 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 4. Trial Peak Kromatogram KCKT Kromatogram standar Tanin (*Scanning* λ 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 λ 277 nm; volume injeksi 20 μ L; laju alir 1,5 mL/menit.

c. Linieritas dan Kurva Kalibrasi

Uji linearitas dilakukan pada seri larutan standar tanin dengan konsentrasi tanin 2, 4, 6, 8 dan 10 μ 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 1 dan Gambar 4.

Tabel 1. Tabel Linieritas

Kadar (μ 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 5. Kurva Kalibrasi Standar Tanin

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 1 memiliki persamaan garis $y = 645,6x$ dan koefisien korelasi (r) 0,999 (Gambar 5) untuk kisaran konsentrasi standar tanin 2, 4, 6, 8, 10 µg/mL.

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)

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 2.

Tabel 2. 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 Kering	10	3,333	10	3742	5,797	1,93%	2,01%	0,001	3,53%
	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*.



Sampel yang digunakan untuk menetapkan kadar tanin adalah ekstrak kulit delima putih, yaitu sebanyak 20 μ L disuntikkan ke dalam sistem KCKT. 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 (Cuong *et al.*, 2019; Harborne, 1987).

SIMPULAN

Berdasarkan hasil penelitian yang dilakukan maka dapat disimpulkan bahwa analisis kualitatif menggunakan metode *Folin-Ciocalteu* dan KCKT terbukti terdapat senyawa tanin. Sedangkan untuk analisis kuantitatif dalam penetapan kadar tanin pada ekstrak kulit buah delima putih dapat dilakukan menggunakan metode KCKT fase terbalik yang dilengkapi dengan detektor spektrofotometer UV. Senyawa tanin ekstrak etanol kulit buah delima putih yang dianalisis dengan metode KCKT diperoleh kadar rata-rata sebesar 2,01%.

UCAPAN TERIMA KASIH

Penulis mengucapkan terima kasih kepada Kepala Program Studi Farmasi dan dosen pembimbing Universitas Muhammadiyah Yogyakarta yang telah memfasilitasi dan berkontribusi dalam pelaksanaan penelitian, serta beberapa pihak yang mendukung penelitian ini.

DAFTAR PUSTAKA

Apriliana, D., (2010), Aktivitas Hepatoproteksi Ekstrak Polifenol Buah Delima (*Punica granatum L.*) terhadap Tikus Putih yang Diinduksi Parasetamol,

Skripsi, Jurusan Biokimia Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam Institut Pertanian Bogor, Bogor.

Bhandari, P. R. (2012). Pomegranate (*Punica granatum L.*). Ancient seeds for modern cure? Review of potential therapeutic applications. *International Journal of Nutrition, Pharmacology, Neurological Diseases*, 2(3), 171.

Cuong, D.X., Hoan, N.X., Dong, D.H., Van Thanh, N., Ha, H.T., Tuyen, D.T.T. and Chinh, D.X. (2019). Tannins: Extraction from Plants. In *Tannins-Structural properties, Biological Properties and Current Knowledge*. IntechOpen.

Dahham, S.S., Ali, M.N., Tabassum H., Mazharuddin Khan, H.J., (2010). *Studies on Antibacterial and Antifungal Activity of Pomegranate (Punica granatum L.)*. American-Eurasian J. Agric. & Environ. Sci., 9 (3): 273-281.

Dikmen M, Ozturk N, Ozturk Y. (2011). "The antioxidant potency of *Punica granatum L.* Fruit peel reduces cell proliferation and induces apoptosis on breast cancer" *J. Med. Food*. 14(12):1638-46.

Dinas Pertanian Tanaman Pangan Provinsi Jawa Barat, (2013). *Khasiat Buah Delima (Punica granatum L.)*. Diakses tanggal 29 Mei 2013, dari <http://diperta.jabarprov.go.id/index.php/subMenu/informasi/artikel/detailartikel/296>.

Fischer U. A., Carle R., Kammerer D. R. (2011). Identification and quantification of phenolic compounds from pomegranate (*Punica granatum L.*) peel, mesocarp, aril and differently produced juices by HPLC-DAD-ESI/MSn. *Food Chem*. 127, 807–821. 10.1016/j.foodchem.2010.12.156.

Galvão, M.A.M., Arruda, A.O.D., Bezerra, I.C.F., Ferreira, M.R.A. and Soares, L.A.L., (2018). Evaluation of the Folin-

- Ciocaltu method and quantification of total tannins in stem barks and pods from *Libidibia ferrea* (Mart. ex Tul) LP Queiroz. *Brazilian Archives of Biology and Technology*, 61.
- Gill N.S., Dhawan S., Jain A., Arora R., Bali M., (2012). "Antioxidant and anti-ulcerogenic activity of wild *Punica granatum* ethanolic seed extract", *Research Journal of Medicinal plants*. 6(1);47-55.
- Grabež, M., Škrbić, R., Stojiljković, M. P., Rudić-Grujić, V., Paunović, M., Arsić, A., ... & Menković, N. (2019). Beneficial effects of pomegranate peel extract on plasma lipid profile, fatty acids levels and blood pressure in patients with diabetes mellitus type-2: A randomized, double-blind, placebo-controlled study. *Journal of Functional Foods*, 103692.
- Harborne, J.B., (1987 & 1996), *Metode Fitokimia: Penuntun Cara Menganalisis Tumbuhan*. Terjemahan Padmawiyata, K. dan Soediro. Edisi ke-1 dan ke-2. Bandung: ITB.
- Harmita, (2004), Petunjuk Pelaksanaan Validasi Metode dan Cara Perhitungannya, *Majalah Ilmu Kefarmasian*, 1 (3), 117-135.
- M. Shiban, M. Al-Otaibi and N. Al-zoreky., (2012). *Antioxidant Activity of Pomegranate (Punica granatum L.) Fruit Peels*. *Food and Nutrition Sciences*, Vol. 3 No. 7, 2012, pp. 991-996.
- Middha, S. K., Usha, T., & Pande, V. (2014). Pomegranate peel attenuates hyperglycemic effects of alloxan-induced diabetic rats. *EXCLI journal*, 13, 223-224.
- Nauli R.R., (2010). *Pengaruh pemberian ekstrak kulit buah delima putih (Punica granatum L.) dan ketokonazol 2% terhadap pertumbuhan candida albicans secara in vitro pada kandidiasis vulvovaginalis*. Fakultas Kedokteran, Universitas Diponegoro.
- Osama Y. A., Ahmed H., Tarawneh K., Khaled M. Khleifat M K., B.H. Ridzwan B, Qaralleh N. (2010). "Protective role of *Punica granatum* L. peel extract against oxidative damage in experimental diabetic rats" *Process Biochemistry*, 45(4);581-85.
- Patel, B.H., (2011). Natural dyes. In *Handbook of textile and industrial dyeing* (pp. 395-424). Woodhead Publishing.
- Pedrali A, Fernandes AU, Santos P, Silva M M, Severino D, Dilva M B., (2010). "Antioxidant activity, cito- and phototoxicity of Pomegranate (*Punica granatum* L.) seed pulp extract", *Cienc. Tecnol. Aliment*, 30(4);1017-21.
- Perdana, P.M., (2011). Daya Antibakteri Infusa Kulit Buah Delima Putih (*Punica granatum* L.) terhadap Pertumbuhan *Escherichia coli* ATCC 11229 dan *Staphylococcus aureus* ATCC 6538 secara *In Vitro*, *Skripsi*, Fakultas Kedokteran Universitas Muhammadiyah Surakarta, Surakarta.
- Sadeghipour, A., Eidi, M., Ilchizadeh Kavgani, A., Ghahramani, R., Shahabzadeh, S., & Anissian, A. (2014). Lipid lowering effect of *Punica granatum* L. peel in high lipid diet fed male rats. *Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine*, 2014.
- Sharifian, M., Hosseini-Vashan, S. J., Nasri, M. F., & Perai, A. H. (2019). Pomegranate peel extract for broiler chickens under heat stress: Its influence on growth performance, carcass traits, blood metabolites, immunity, jejunal morphology, and meat quality. *Livestock Science*.



- Shishehbor, F. (2016). Effects of concentrated pomegranate juice on subclinical inflammation and cardiometabolic risk factors for type 2 diabetes: A quasi-experimental study. *International journal of endocrinology and metabolism*, 14(1).
- Singh, R. P., Chidambara Murthy, K. N., Jayaprakasha, G. K. (2002). *Studies on the antioxidant activity of pomegranate (Punica granatum) peel and seed extracts using in vitro models. J. Agric. Food. Chem.*, Jan.2; 50(1):81-6.
- Sun, C., Wu, Z., Wang, Z. and Zhang, H., (2015). Effect of ethanol/water solvents on phenolic profiles and antioxidant properties of Beijing propolis extracts. *Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine*, 2015.
- Wang, T., Men, R., Hu, M., Fan, X., Yang, X., Huang, X., ... & Yang, L. (2018). Protective effects of Punica granatum (pomegranate) peel extract on concanavalin A-induced autoimmune hepatitis in mice. *Biomedicine & Pharmacotherapy*, 100, 213-220.
- Wiesneth, S. and Jürgenliemk, G. (2017). Total phenolic and tannins determination: A modification of Ph. Eur. 2.8. 14 for higher throughput. *Die Pharmazie-An International Journal of Pharmaceutical Sciences*, 72(4), pp.195-196.