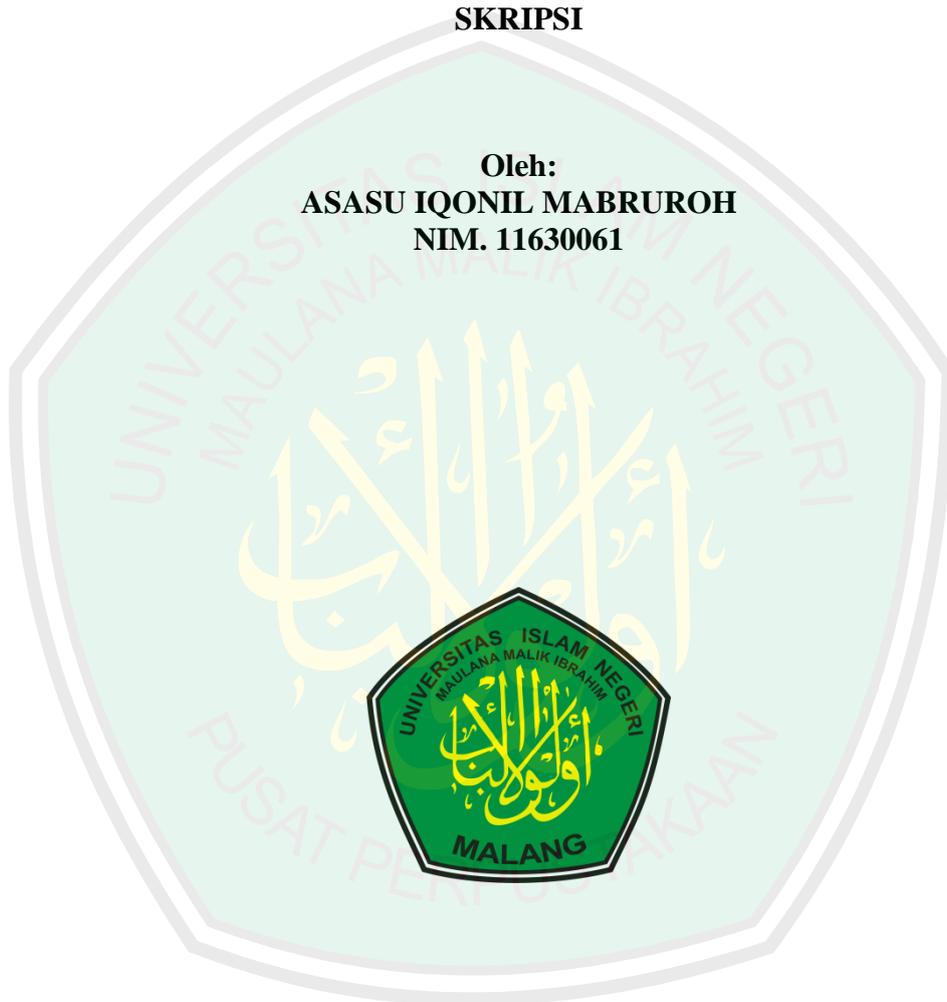


**UJI AKTIVITAS ANTIOKSIDAN EKSTRAK TANIN DARI DAUN  
RUMPUT BAMBU (*Lophatherum gracile* Brongn)  
DAN IDENTIFIKASINYA**

**SKRIPSI**

**Oleh:  
ASASU IQONIL MABRUROH  
NIM. 11630061**



**JURUSAN KIMIA  
FAKULTAS SAINS DAN TEKNOLOGI  
UNIVERSITAS ISLAM NEGERI  
MAULANA MALIK IBRAHIM MALANG  
2015**

**UJI AKTIVITAS ANTIOKSIDAN EKSTRAK TANIN DARI DAUN  
RUMPUT BAMBU (*Lophatherum gracile* Brongn)  
DAN IDENTIFIKASINYA**

**SKRIPSI**

**Oleh:  
ASASU IQONIL MABRUOH  
NIM. 11630061**

**Diajukan Kepada:  
Fakultas Sains dan Teknologi  
Universitas Islam Negeri Maulana Malik Ibrahim Malang  
Untuk Memenuhi Salah Satu Persyaratan Dalam  
Memperoleh Gelar Sarjana Sains (S.Si)**

**JURUSAN KIMIA  
FAKULTAS SAINS DAN TEKNOLOGI  
UNIVERSITAS ISLAM NEGERI  
MAULANA MALIK IBRAHIM MALANG  
2015**

**UJI AKTIVITAS ANTIOKSIDAN EKSTRAK TANIN DARI DAUN  
RUMPUT BAMBU (*Lophatherum gracile* Brongn)  
DAN IDENTIFIKASINYA**

**SKRIPSI**

**Oleh:  
ASASU IQONIL MABRUOH  
NIM.11630061**

**Telah Diperiksa dan Disetujui untuk Diuji:  
Tanggal: 02 Desember 2015**

**Pembimbing I**

**Pembimbing II**

**Elok Kamilah Hayati, M.Si  
NIP. 19790620 200604 2 002**

**Nur Aini, M.Si  
NIPT. 20130902 2 316**

**Mengetahui,  
Ketua Jurusan Kimia**

**Elok Kamilah Hayati, M.Si  
NIP. 19790620 200604 2 002**

**UJI AKTIVITAS ANTIOKSIDAN EKSTRAK TANIN DARI DAUN  
RUMPUT BAMBU (*Lophatherum gracile* Brongn)  
DAN IDENTIFIKASINYA**

**SKRIPSI**

Oleh :  
**ASASU IQONIL MABRUROH**  
**NIM.11630061**

**Telah Dipertahankan di Depan Dewan Penguji Skripsi  
Dan Dinyatakan Diterima Sebagai Salah Satu Persyaratan  
Untuk Memperoleh Gelar Sarjana Sains (S.Si)  
Tanggal: 02 Desember 2015**

**Penguji Utama : Tri Kustono Adi, M.Sc (.....)  
NIP. 19710311 200312 1 002**

**Ketua Penguji : A. Ghanaim Fasya, M.Si (.....)  
NIP. 19820616 200604 1 002**

**Sekretaris Penguji : Elok Kamilah Hayati, M.Si (.....)  
NIP. 19790620 200604 2 002**

**Anggota Penguji : Nur Aini, M.Si (.....)  
NIPT. 20130902 2 316**

**Mengesahkan,  
Ketua Jurusan Kimia**

**Elok Kamilah Hayati, M.Si  
NIP. 19790620 200604 2 002**

## SURAT PERNYATAAN ORISINILITAS PENELITIAN

Saya yang bertanda tangan dibawah ini :

Nama : Asasu iqonil Mabruroh

NIM : 11630061

Jurusan : Kimia

Fakultas : Sains dan Teknologi

Judul Penelitian : Uji Aktivitas Antioksidan Ekstrak Tanin dari Daun  
Rumput Bambu (*Lophatherum Gracile* Brongn) dan  
Identifikasinya

Menyatakan dengan sebenarnya bahwa skripsi yang saya tulis ini benar-benar merupakan hasil karya saya sendiri, bukan merupakan pengambilalihan data, tulisan atau pikiran orang lain yang saya akui sebagai hasil tulisan atau pikiran saya sendiri, kecuali dengan mencantumkan sumber cuplikan pada daftar pustaka. Apabila dikemudian hari terbukti atau dapat dibuktikan skripsi ini hasil jiplakan, maka saya bersedia menerima sanksi atas perbuatan tersebut.

Malang, 28 Desember 2015  
Yang Membuat Pernyataan,

Asasu Iqonil Mabruroh  
NIM.11630061

## KATA PENGANTAR

Puji syukur ke hadirat Allah SWT yang telah melimpahkan rahmat dan hidayah-Nya kepada penulis atas terselesaikannya tugas akhir skripsi yang berjudul: **“Uji Aktivitas Antioksidan Ekstrak Tanin dari Daun Rumput Bambu (*Lophatherum gracile* Brongn) dan Identifikasinya”**. Shalawat serta salam senantiasa penulis curahkan kepada junjungan kita, Nabi Muhammad SAW serta keluarga, sahabat dan para pengikutnya yang setia hingga akhir zaman, yang telah membimbing kita ke jalan yang benar, yaitu jalan yang diridhai Allah SWT.

Selama proses menyelesaikan tugas akhir, tentunya tidak terlepas dari bantuan berbagai pihak, maka penulis mengucapkan terimakasih kepada semua pihak yang telah membantu dalam penyelesaian tugas akhir:

1. Kedua orang tua, beserta keluarga besar yang telah memberi kasih sayang dan semangat tiada henti.
2. Bapak Prof. Dr. H. Mudjia Rahardjo, M.Si selaku rektor UIN Maulana Malik Ibrahim Malang.
3. Ibu Dr. drh. Hj. Bayyinatul Muchtaromah, M.Si selaku Dekan Fakultas Sains dan Teknologi, UIN Maulana Malik Ibrahim Malang.
4. Ibu Elok Kamilah Hayati, M.Si selaku Ketua Jurusan Kimia Fakultas Sains dan Teknologi Universitas Islam Negeri Maulana Malik Ibrahim Malang dan dosen pembimbing yang telah memberikan bimbingan, saran, serta motivasi yang membangun dan sangat bermanfaat bagi penulis.
5. Bapak A. Ghanaim Fasya, M.Si selaku konsultan dan ketua penguji, Ibu Nur Aini, M.Si selaku pembimbing agama, Bapak Tri Kustono Adi, M.Sc selaku dosen penguji, seluruh dosen dan laboran Jurusan Kimia Fakultas Sains dan

Teknologi Universitas Islam Negeri Maulana Malik Ibrahim Malang yang telah memberikan ilmu, pengalaman wacana dan wawasannya, sebagai pedoman dan bekal bagi penulis.

6. Rekan-rekan mahasiswa Jurusan Kimia Fakultas Sains dan Teknologi Universitas Islam Negeri Maulana Malik Ibrahim Malang, khususnya angkatan 2011 yang telah memberikan semangat, motivasi dan pengalaman yang tak pernah terlupakan.

Penyusun menyadari bahwa masih banyak terdapat kekurangan dalam penyusunan tugas akhir ini. Namun demikian dengan segala keterbatasan dan kemampuan yang ada, penulis telah berusaha untuk menyelesaikan tugas akhir dengan sebaik-baiknya. Oleh karena itu, penyusun mengharapkan saran dan kritik yang kiranya dapat membawa ke arah yang lebih baik. Akhir kata semoga tugas akhir ini dapat diambil manfaatnya oleh semua pihak, khususnya bagi pembaca. Amin.

Malang, Desember 2015

Penulis

## DAFTAR ISI

<b>HALAMAN JUDUL</b> .....	<b>i</b>
<b>HALAMAN PERSETUJUAN</b> .....	<b>ii</b>
<b>HALAMAN PENGESAHAN</b> .....	<b>iii</b>
<b>PERNYATAAN KEASLIAN TULISAN</b> .....	<b>iv</b>
<b>KATA PENGANTAR</b> .....	<b>v</b>
<b>DAFTAR ISI</b> .....	<b>vii</b>
<b>DAFTAR TABEL</b> .....	<b>ix</b>
<b>DAFTAR GAMBAR</b> .....	<b>x</b>
<b>DAFTAR LAMPIRAN</b> .....	<b>xi</b>
<b>ABSTRAK</b> .....	<b>xii</b>
<b>BAB I PENDAHULUAN</b> .....	<b>1</b>
1.1 Latar Belakang .....	1
1.2 Rumusan Masalah .....	6
1.3 Tujuan Penelitian .....	7
1.4 Batasan Masalah .....	7
1.5 Manfaat Penelitian .....	7
<b>BAB II TINJAUAN PUSTAKA</b> .....	<b>8</b>
2.1 Pemanfaatan Tanaman dalam Perspektif Islam .....	8
2.2 Tanaman Rumput Bambu ( <i>Lophatherum gracile</i> Brongn) .....	10
2.2.1 Morfologi dan Klasifikasi Tanaman Rumput Bambu .....	10
2.2.2 Manfaat Tanaman Rumput Bambu .....	11
2.2.3 Kandungan Kimia Rumput Bambu .....	12
2.3 Tanin .....	12
2.3.1 Sifat-Sifat Tanin .....	13
2.3.2 Penggolongan Tanin .....	15
2.4 Radikal Bebas .....	19
2.5 Antioksidan .....	20
2.5.1 Klasifikasi Antioksidan .....	20
2.5.2 Mekanisme Antioksidatif .....	22
2.5.3 Uji Efektivitas Antioksidan .....	23
2.6 Metode Pemisahan Senyawa Tanin .....	25
2.6.1 Ekstraksi Maserasi .....	25
2.6.2 Ekstraksi Cair-Cair .....	26
2.6.3 Kromatografi Lapis Tipis .....	27
2.7 Uji Kualitatif Senyawa Tanin .....	29
2.8 Identifikasi Tanin dengan Spektrofotometer UV-Vis dan Perekasi Geser .....	30
<b>BAB III METODOLOGI PENELITIAN</b> .....	<b>34</b>
3.1 Lokasi dan Waktu Penelitian .....	34
3.2 Alat dan Bahan Penelitian .....	34
3.2.1 Alat Penelitian .....	34
3.2.2 Bahan Penelitian .....	34
3.3 Tahapan Penelitian .....	35

3.4 Pelaksanaan Penelitian.....	35
3.4.1 Preparasi Sampel.....	35
3.4.2 Ekstraksi Tanin Menggunakan Maserasi dan Ekstraksi Cair-Cair .....	35
3.4.3 Uji Kualitatif Tanin dengan Reagen .....	36
3.4.4 Uji Aktivitas Antioksidan Tanin dengan Metode DPPH .....	37
3.4.4.1 Penentuan Panjang Gelombang Maksimum .....	37
3.4.4.2 Penentuan Waktu Kestabilan Pengukuran Antioksidan .....	37
3.4.4.3 Pengukuran Potensi Antioksidan pada Sampel .....	37
3.4.5 Pemisahan Senyawa Tanin .....	38
3.4.5.1 Pemisahan Menggunakan KLTA .....	38
3.4.5.2 Pemisahan Menggunakan KLTP .....	40
3.4.6 Identifikasi Tanin dengan Spektrofotometer UV-Vis dan Pereaksi Geser .....	41
3.4.7 Analisis Data.....	42
<b>BAB IV HASIL DAN PEMBAHASAN .....</b>	<b>43</b>
4.1 Preparasi Sampel .....	43
4.2 Ekstraksi Tanin .....	43
4.3 Uji Fitokimia Tanin dengan Reagen .....	47
4.3.1 Uji Fitokimia Tanin menggunakan FeCl <sub>3</sub> 1 % .....	48
4.3.2 Uji Fitokimia Tanin menggunakan Larutan Gelatin .....	52
4.3.3 Uji Fitokimia Tanin Katekol dan Galat .....	52
4.4 Uji Aktivitas Antioksidan Ekstrak Tanin dengan Metode DPPH .....	55
4.4.1 Penentuan Panjang Gelombang Maksimum .....	55
4.4.2 Penentuan Waktu Kestabilan Pengukuran Antioksidan .....	56
4.4.3 Uji Aktivitas Antioksidan .....	57
4.5 Pemisahan Senyawa Tanin dengan Kromatografi Lapis Tipis .....	63
4.5.1 Pemisahan Senyawa Tanin dengan KLTA .....	64
4.5.2 Pemisahan Senyawa Tanin dengan KLTP .....	68
4.6 Identifikasi Tanin dengan Spektrofotometer UV-Vis dan Pereaksi Geser .....	69
4.7 Pemanfaatan Daun Rumput Bambu sebagai Obat dalam Perspektif Islam .....	75
<b>BAB V PENUTUP .....</b>	<b>79</b>
5.1 Kesimpulan .....	79
5.2 Saran .....	79
<b>DAFTAR PUSTAKA .....</b>	<b>80</b>
<b>LAMPIRAN .....</b>	<b>87</b>

## DAFTAR TABEL

Tabel 2.1	Ketentuan kekuatan antioksidan .....	25
Tabel 2.2	Konstanta dielektrikum dan tingkat kelarutan beberapa pelarut .....	26
Tabel 2.3	Panjang gelombang dan pergeseran absorpsi spektrum flavonoid ..	33
Tabel 2.4	Panjang gelombang dan pergeseran absorpsi spektrum tanin .....	33
Tabel 4.1	Hasil maserasi daun rumput bambu .....	46
Tabel 4.2	Hasil uji fitokimia tanin .....	48
Tabel 4.3	Variasi stoikiometri tanin yang dipengaruhi oleh pH .....	49
Tabel 4.4	Waktu kestabilan sampel dan perbandingan .....	57
Tabel 4.5	Hasil persentase aktivitas antioksidan .....	58
Tabel 4.6	Nilai EC <sub>50</sub> sampel dan perbandingan .....	60
Tabel 4.7	Penampakan noda hasil KLTA ekstrak tanin dari berbagai eluen ..	65
Tabel 4.8	Hasil KLTA ekstrak tanin daun rumput bambu dengan eluen n- butanol: asam asetat: air (BAA) (4:1:5) .....	66
Tabel 4.9	Hasil KLTP ekstrak tanin daun rumput bambu dengan eluen n- butanol: asam asetat: air (BAA) (4:1:5) .....	68
Tabel 4.10	Data spektrum isolat sebelum dan sesudah ditambahkan pereaksi geser .....	70

## DAFTAR GAMBAR

Gambar 2.1	Rumput bambu ( <i>Lophatherum gracile</i> Brongn)	11
Gambar 2.2	Struktur senyawa tanin	13
Gambar 2.3	Struktur dasar tanin terkondensasi	15
Gambar 2.4	Struktur proantosianidin atau flavolan	16
Gambar 2.5	Struktur gallotanin dan asam galat	18
Gambar 2.6	Struktur asam heksahidroksidifenat dan asam elagat	18
Gambar 2.7	Struktur L-asam askorbat atau vitamin C	21
Gambar 2.8	Struktur <i>butylated hydroxytoluene</i> (BHT)	21
Gambar 2.9	Reaksi DPPH dengan asam askorbat	23
Gambar 2.10	Reaksi dugaan antara senyawa tanin dengan $\text{FeCl}_3$	30
Gambar 4.1	Kompleks besi-polifenol (Tanin)	50
Gambar 4.2	Proantosianidin atau flavolan, katekin, afzelekin dan galokatekin	54
Gambar 4.3	Struktur gallotanin dan asam galat	55
Gambar 4.4	Spektra larutan DPPH 0,2 mM	56
Gambar 4.5	Grafik pengukuran waktu kestabilan sampel dan pembanding ...	57
Gambar 4.6	Reduksi DPPH oleh senyawa peredam radikal bebas	58
Gambar 4.7	Reaksi DPPH dengan asam askorbat	61
Gambar 4.8	Dugaan reaksi tanin dengan DPPH	62
Gambar 4.9	Hasil KLTA tanin dengan eluen BAA (4:1:5)	66
Gambar 4.10	Struktur dasar flavonoid	70
Gambar 4.11	Reaksi tanin dengan $\text{AlCl}_3$ dan $\text{AlCl}_3/\text{HCl}$	72
Gambar 4.12	Struktur dasar flavonol	73
Gambar 4.13	Dugaan struktur isolat 3, 5 dan 6	74

## DAFTAR LAMPIRAN

Lampiran 1 Diagram Alir Penelitian .....	87
Lampiran 2 Skema Kerja .....	88
Lampiran 3 Perhitungan Pembuatan Reagen dan Larutan .....	94
Lampiran 4 Pembuatan Reagen dan Larutan .....	96
Lampiran 5 Data dan Perhitungan Hasil Penelitian .....	100
Lampiran 6 Dokumentasi .....	103
Lampiran 7 Halaman Persembahan .....	105



## ABSTRAK

Mabruroh, A. I. 2015. **Uji Aktivitas Antioksidan Ekstrak Tanin dari Daun Rumput Bambu (*Lophatherum gracile* Brongn) dan Identifikasinya**. Pembimbing I: Elok Kamilah Hayati, M.Si; Pembimbing II: Nur Aini, M.Si; Konsultan: A. Ghanaim Fasya, M.Si

**Kata kunci** : Aktivitas Antioksidan, Tanin, Daun Rumput Bambu (*Lophatherum gracile* Brongn).

Rumput bambu merupakan tanaman yang berpotensi sebagai obat. Bagian daunnya mengandung senyawa tanin. penelitian ini dilakukan untuk mengetahui aktivitas antioksidan ekstrak tanin dari daun rumput bambu dan dugaan strukturnya. Serbuk daun diekstraksi menggunakan aseton : air (7:3), ekstrak kasar dipartisi menggunakan kloroform kemudian etil asetat. Filtrat hasil maserasi dan partisi diuji kualitatif tanin menggunakan reagen. Ekstrak tanin diuji aktivitas antioksidan dengan metode *1,1-diphenyl-2-picrylhydrazyl* (DPPH) dan dipisahkan menggunakan kromatografi lapis tipis analitik (KLTA), eluen terbaik pada KLTA digunakan pada pemisahan kromatografi lapis tipis preparatif (KLTP). Isolat hasil KLTP diidentifikasi menggunakan spektrofotometer UV-Vis dan pereaksi geser. Uji kualitatif dengan reagen menunjukkan ekstrak mengandung tanin terhidrolisis dan katekin. Aktivitas antioksidan ekstrak tanin, BHT dan vitamin C tertinggi adalah 77,70 %, 87,29 % dan 97,86 % dengan nilai  $EC_{50}$  51,56, 8,173 dan 0,003 mg/L. Ekstrak tanin cukup berpotensi sebagai sumber antioksidan alami. Eluen terbaik KLTA yaitu n-butanol: asam asetat: air (4:1:5). Pemisahan dengan KLTP menghasilkan 6 noda Rf (0,17 – 0,78). Hasil identifikasi noda ke-3, 5 dan 6 dengan menggunakan spektrofotometer UV-Vis dan pereaksi geser diduga adalah golongan flavonol.

**Kata kunci** : Aktivitas Antioksidan, Tanin, Daun Rumput Bambu (*Lophatherum gracile* Brongn)

## ABSTRACT

Mabruroh, A.I. 2015. **Antioxidant Activity Assay of Tannin Extract from Bamboo Grass Leaves (*Lophatherum gracile* Brongn) and it's Identification.** Supervisor I: Elok Kamilah Hayati, M.Si; Supervisor II: Nur Aini, M.Si; Consultant: A. Ghanaim Fasya, M.Si

**Keywords:** Activity Antioxidants, Tannins, Bamboo Grass Leaves (*Lophatherum gracile* Brongn).

Bamboo grass has potential as medicine. It leaves contain tannin compound. This reseach is to determine antioxidant activity of tannin extract in bamboo grass leaves and it's structure. Powder of leaves was extracted using acetone:water (7:3), crude extract was partitioned by chloroform and ethyl acetate. The presence of tannin in extract was tested by reagent. The antioxidant activity of tannin extract was determined by *1,1-diphenyl-2-picrylhydrazyl* (DPPH). Tannin was separated by analytical thin layer chromatography (ATLC). The best eluent from ATLC used as eluent in preparative thin layer chromatography (PTLC). The isolats was identified by UV-Vis spectrophotometer and shift reagent. Qualitative test applied to tannin extract indicate positive for hydrolyzed tannin and catechin. The highest of antioxidant activity in tannin extract, BHT and vitamin C is 77.70%, 87.29% and 97.86% with  $EC_{50}$  value of 51.56, 8.173 and 0.003 mg/L. Tannin extract showed potential as source of natural antioxidant. n-butanol:acetic acid:water (4:1:5) as the best eluent in ATLC. Separation by PTLC resulting 6 spots Rf (0.17 to 0.78). UV-Vis spectrophotometer identification and shift reagent to spot number 3, 5 and 6 indicate assesment is group of flavonol.

**Keywords:** Activity Antioxidants, Tannins, Bamboo Grass Leaves (*Lophatherum gracile* Brongn).

## الملخص

المبروراة، أ. ي. ٢٠١٥. اختبار النشاط المضاد للأكسدة مقتطفة التانين من أوراق عشبة الخيزوران (لوباتيروم محاسيل برونجن) و تعريفه. المشرفة الأولى: إيلوك كميطة حياة، الماجستير؛ المشرفة الثانية: نور عيني، الماجستير؛ مستشار: أحمد خنائم فشا، الماجستير. كلمات البحث: نشاط المضاد للأكسدة، التانين، أوراق عشبة الخيزوران (لوباتيروم محاسيل برونجن)

عشبة الخيزوران من الأعشاب الضارة التي يستخدمها الإنسان كالدواء. أوراق عشبة الخيزوران تحتوي على التانين. و من نشاط التانين هو كالمضاد للأكسدة. هدف هذا البحث لمعرفة نشاط المضاد للأكسدة من مقتطفة التانين من أوراق عشبة الخيزوران و الظن الأول للتركيب التانين في مقتطفة أوراق عشبة الخيزوران. المسحوق من أوراق عشبة الخيزوران منتزع باستخدام الأسيتون : الماء (٧:٣) المقتطفة مقسم بالكلوروفورم ثم بإيثيل الخالي. اختبار الرشح من الذبول و المنتج من التقسيم الإختبار التانين النوعي بالكاشف الخاص. ثم أختبر مقتطفة التانين لاختبار نشاط المضاد للأكسدة بطريقة DPPH. وانفصل بطبقة رقيقة اللونية التحليلية (ك.ل.ص.أ). المرحلة النهائية الأحسن مستخدمة للإنفصال بطبقة رقيقة اللونية التحضيرية (ك.ل.ص.ف.ع). الإغزل مميز باستخدام UV-Vis ثم بزيادته كاشف المحرك. دل اختبار نوعي بالكاشف الخاص على أن المقتطفة يحتوي على التانين و الكاتيكين. نتيجة نشاط المضاد للأكسدة من مقتطفة التانين، BHT و فيتامين C هم ٧٧.٧٠ : ٨٨.٨٦ و ٩٧.٩٥ بلمانة. تقدر  $EC_{50}$  استخراج كانت ٥٦.٥١ التانين ملغم/لتر. BHT و فيتامين C منها ١٧٣.٨ و ٠٠٣.٠ ملغم/لتر. فلذلك يمكن مقتطفة التانين أن يستخدم كالمضاد للأكسدة. أحسن المرحلة النهائية في عملية (ك.ل.ص.أ) هو ن-بوتانول: حمض الخال: الماء (٥:١:٤). حصل التقسيم باستخدام (ك.ل.ص.ف.ع) على ستة إغزالات بنتيجة Rf (٠.١٧-٠.٧٨). الظن الأول للتركيب من تعريف الإغزال الثالث والخامس والسادس باستخدام UV-Vis وكاشف المحرك هو فلافون

## BAB I

### PENDAHULUAN

#### 1.1 Latar Belakang

Allah menciptakan alam semesta beserta isinya merupakan suatu bukti kebesaran dan kasih sayangNya terhadap makhluk terutama manusia, seperti halnya Allah menciptakan tumbuhan yang memberikan manfaat bagi manusia. Allah berfirman dalam surat al Syuara ayat 7.

أَوَلَمْ يَرَوْا إِلَى الْأَرْضِ كَمْ أَنْبَتْنَا فِيهَا مِنْ كُلِّ زَوْجٍ كَرِيمٍ ﴿٧﴾

Artinya: *Dan apakah mereka tidak memperhatikan bumi, berapakah banyaknya Kami tumbuhkan di bumi itu pelbagai macam tumbuh-tumbuhan yang baik (QS. al Syuara: 7)*

Surat al Syuara ayat 7 menjelaskan bahwa Allah menciptakan tanaman yang baik agar manusia berfikir dan mengkaji tentang manfaat serta kandungannya, seperti senyawa aktif yang memiliki aktivitas yang dapat dijadikan sebagai obat penyakit. Salah satu tumbuhan yang baik adalah jenis rumput-rumputan seperti rumput bambu. Allah berfirman dalam surat al A'la ayat 4.

وَالَّذِي أَخْرَجَ الْمَرْعَىٰ ﴿٤﴾

Artinya: *Dan yang menumbuhkan rumput-rumputan (QS. al A'la: 4)*

Flora Indonesia sangat kaya dengan berbagai spesies dan keanekaragamannya. Koleksi herbarium khususnya tanaman obat mempunyai 3302 spesies dalam 1468 genus dan termasuk dalam 199 famili. Salah satu tanaman tersebut adalah jenis rumput-rumputan yang dapat dimanfaatkan sebagai bahan pengobatan, seperti rumput bambu (*Lophatherum gracile* Brongn) (Kusumawati, dkk., 2003).

Tanaman rumput bambu di kalangan masyarakat tidak begitu dikenal sebagai tanaman yang memiliki potensi obat. Hal ini karena tanaman tersebut merupakan tanaman rumput-rumputan yang tumbuh liar seperti semak-semak, sehingga dianggap tidak memiliki manfaat dan tidak mempunyai nilai ekonomi. Menurut Kusumawati dkk (2003) *Lophatherum gracile* Brongn adalah salah satu dari tiga belas jenis tanaman yang sangat berpotensi sebagai obat herbal penyembuhan penyakit tertentu, seperti antiinflamasi maupun antikanker.

Bagian tanaman rumput bambu seperti akar, batang, dan daun rumput bambu banyak mengandung senyawa-senyawa kimia diantaranya triterpenoid, steroid arundoin, cylidrin, friedelin, beta-sitosterol, stigmasterol, campesterol, dan teraxerol, asam amino dan asam lemak. Seluruh bagian tubuh rumput ini memiliki rasa manis, hambar, dan bersifat dingin (Wijayakusuma, 2005).

Berawal dari asumsi untuk membiarkan tumbuhan ini tetap hidup maka untuk penelitian selalu dipilih daun sebagai sampel yang diteliti. Alasan lain adalah bagian daun merupakan bagian yang mudah didapatkan, dan pertumbuhannya yang lebih terhindar dari ancaman virus maupun penyakit atau kondisi yang ekstrim.

Jing *et al* (2009) berhasil menemukan 14 senyawa golongan flavonoid dari daun rumput bambu diantaranya salcolin A, salcolin B, triclin, luteolin, afzelin, triclin 7-O- $\beta$ -D-glucopyranoside, swertiajaponin, isoorientin, triclin 7-O-neohesperidoside, vitexin, isovitexin,  $\beta$ -(p-methoxyphenyl) acrylic acid,  $\beta$ -sitosterol dan daucosterol. Wang *et al* (2012) juga menemukan 4 senyawa golongan flavon C-glikosida. Hasil uji BSLT pada ketiga ekstrak daun rumput bambu memiliki nilai LC<sub>50</sub> 90,7896 ppm pada ekstrak n-heksana, 83,4150 ppm

pada ekstrak kloroform dan  $LC_{50}$  terendah pada ekstrak etanol yakni 25,2189 ppm. Nilai  $LC_{50}$  tersebut menunjukkan bahwa senyawa aktif dalam ekstrak etanol memiliki tingkat toksisitas tinggi. Hasil uji fitokimia ekstrak etanol positif ditemukan tiga senyawa diantaranya alkaloid, tanin dan triterpenoid (Purwitasari, 2014).

Tanin merupakan senyawa aktif metabolit sekunder yang diketahui mempunyai beberapa khasiat diantaranya sebagai astringen, antidiare, antibakteri dan antioksidan (Desmiaty, dkk., 2008 dalam Malanggia, dkk., 2012). Tanin dibagi menjadi dua kelompok yaitu tanin terkondensasi atau tanin katekat dan tanin terhidrolisis atau tanin galat. Tanin terhidrolisis dibagi menjadi dua yakni gallotanin dan ellagitanin. Tanin memiliki peranan biologis yang kompleks, mulai dari pengendap protein hingga pengkhelat logam. Tanin juga dapat berfungsi sebagai antioksidan biologis (Hagerman, 2002 dalam Malanggia, dkk., 2012).

Gallotanin maupun ellagitanin merupakan senyawa antioksidan yang cukup berpotensi. Aktifitas antioksidatif ellagitanin tersebut berkaitan dengan struktur kimianya. Naiknya jumlah gugus galloil, berat molekul, dan struktur ortohidroksil meningkatkan aktifitas antioksidatif tanin (Okuda, *et al.*, 1992; Yokozawa, *et al.*, 1998 dalam Hernawan dan Setyawan, 2003). Firdausi dkk (2013) menyebutkan bahwa tanaman yang berpotensi sebagai sumber tanin-protein kompleks yakni biji pinang yang diinteraksikan dengan biji melinjo, yang memiliki kandungan tanin 1,77 mg TAE/mL dengan aktivitas antioksidan sebesar 90 %. Hasil pengujian pada ekstrak etanol daun kersen menunjukkan bahwa terdapat senyawa tanin yang memiliki aktivitas antioksidan dengan nilai  $IC_{50}$  14,4873  $\mu$ g/ml (Dewi, 2013).

Meyer *et al* (1982) menyatakan bahwa senyawa uji dikatakan toksik jika harga  $LC_{50}$  lebih kecil dari 1000  $\mu\text{g/mL}$ . Menurut Mc Laughin *et al* (1991) dalam Purwitasari (2014) nilai  $LC_{50} < 30$  ppm, ekstrak berpotensi sebagai antikanker (sitotoksik). Hasil penelitian Purwitasari (2014) ekstrak daun rumput bambu memiliki nilai  $LC_{50}$  terendah pada fraksi etanol, sehingga diperkirakan adanya aktivitas antioksidan senyawa tanin yang terkandung dalam daun rumput bambu.

Antioksidan merupakan senyawa pemberi elektron. Antioksidan juga merupakan senyawa yang dapat menghambat reaksi oksidasi, dengan mengikat radikal bebas dan molekul yang sangat reaktif (Winarsi, 2007). Salah satu metode uji aktivitas antioksidan adalah metode DPPH (*1,1-difenil-2-picrilhidrazil*). Pemilihan metode DPPH karena sederhana, mudah, cepat dan peka serta hanya memerlukan sedikit sampel dan dapat mengukur efektivitas total antioksidan baik dalam pelarut polar maupun nonpolar. Senyawa antioksidan bereaksi dengan radikal DPPH melalui mekanisme donasi atom hidrogen dan menyebabkan terjadinya peluruhan warna DPPH dari ungu ke kuning (Prakash, *et al.*, 2001).

Ekstraksi tanin menggunakan perendaman atau maserasi. Pemilihan metode maserasi karena mudah dan sangat menguntungkan dalam isolasi bahan alam, saat perendaman sampel akan terjadi pemecahan dinding dan membran sel akibat perbedaan tekanan antara di dalam dan di luar sel, sehingga metabolit sekunder yang ada dalam sitoplasma terlarut dalam pelarut organik. Ekstraksi senyawa akan sempurna karena dapat diatur lama perendaman yang dilakukan (Guenther, 1987).

Maserasi dilakukan dengan menggunakan campuran pelarut aseton : air (7:3), dengan penambahan asam askorbat 10 mM selama 24 jam, kemudian dipekatkan menggunakan *vacuum rotary evaporator*. Ekstrak pekat dipartisi

dengan metode ekstraksi cair-cair menggunakan pelarut kloroform kemudian dengan etil asetat. Hasil penelitian Sa'adah (2010) menunjukkan bahwa dengan campuran pelarut aseton : air (7:3) didapatkan kadar tanin yang tinggi pada daun belimbing wuluh yakni 10,78 %, sedangkan penelitian Ummah (2010) diperoleh kadar tanin 10,92 % dengan pelarut dan sampel yang sama.

Uji kualitatif tanin dilakukan dengan penambahan reagen  $\text{FeCl}_3$  1 % dalam ekstrak, adanya senyawa tanin ditunjukkan dengan perubahan warna menjadi hijau kehitaman atau biru tinta. Uji fitokimia tanin juga dilakukan dengan penambahan larutan gelatin dalam ekstrak, yang ditunjukkan dengan adanya endapan putih. Uji fitokimia penentuan jenis golongan tanin yakni tanin katekol (tanin terkondensasi) atau tanin galat (tanin terhidrolisis) menggunakan formaldehid 3 % dan HCl untuk uji tanin katekol serta natrium asetat dan  $\text{FeCl}_3$  1 % untuk tanin galat. Adanya endapan merah menunjukkan bahwa positif mengandung tanin katekol dan terbentuknya warna biru tinta atau hitam menunjukkan adanya tanin galat.

Pemisahan senyawa tanin menggunakan metode kromatografi lapis tipis (KLT). Pemilihan metode kromatografi lapis tipis ini karena memiliki beberapa keunggulan diantaranya peralatan yang digunakan lebih sederhana dan cepat. Identifikasi dapat dilakukan dengan pereaksi warna, fluoresensi, atau dengan radiasi menggunakan sinar ultra violet. Ketepatan penentuan kadar akan lebih baik, karena komponen yang akan ditentukan merupakan bercak yang tidak bergerak (Gandjar dan Rohman, 2007).

Pemilihan eluen terbaik dilakukan pada KLT analitik. Beberapa penelitian telah menyebutkan bahwa terdapat eluen terbaik untuk pemisahan senyawa tanin,

diantaranya asam asetat glasial : H<sub>2</sub>O : HCl pekat (forestal) (30:10:3) (Nuraini, 2002), n-butanol : asam asetat : air (BAA) (2:0,5:1,1) (Nahari, 2015), n-butanol : asam asetat : air (4:1:5) (Ummah, 2010); n-heksana : etil asetat (6:4) (Mangunwardoyo, dkk., 2009) dan kloroform : metanol : air (7:3:0,4). Eluen terbaik dari KLT analitik yang dapat memisahkan noda terbaik selanjutnya digunakan untuk keperluan KLT preparatif.

Identifikasi senyawa tanin menggunakan spektrofotometer UV-Vis pada bilangan gelombang 200 – 800 nm. Kemudian diamati pergeseran puncak serapannya sebelum dan sesudah ditambahkan pereaksi geser. Pereaksi geser tersebut diantaranya NaOH 2 M, AlCl<sub>3</sub> 5%, AlCl<sub>3</sub> 5%/HCl, NaOAc, NaOAc/H<sub>3</sub>BO<sub>3</sub> (Hayati, dkk., 2010). Kedudukan gugus hidroksi fenol bebas pada inti flavonoida dapat ditentukan dengan menambahkan pereaksi geser ke dalam larutan cuplikan dan mengamati puncak serapan yang terjadi. Cara ini berguna untuk menentukan kedudukan gula atau metil yang terikat pada salah satu gugus hidroksil fenol (Markham, 1988).

Berdasarkan alasan di atas perlu dilakukan penelitian lebih lanjut untuk identifikasi adanya senyawa tanin dalam daun rumput bambu yang dapat digunakan sebagai antioksidan.

## **1.2 Rumusan Masalah**

1. Bagaimana aktivitas antioksidan ekstrak tanin pada daun rumput bambu (*Lophatherum gracile* Brongn)?
2. Bagaimana dugaan awal struktur tanin dalam ekstrak daun rumput bambu (*Lophatherum gracile* Brongn)?

### 1.3 Tujuan Penelitian

1. Untuk mengetahui aktivitas antioksidan ekstrak tanin pada daun rumput bambu (*Lophatherum gracile* Brongn).
2. Untuk mengetahui dugaan awal struktur tanin dalam ekstrak daun rumput bambu (*Lophatherum gracile* Brongn).

### 1.4 Batasan Masalah

1. Sampel yang digunakan adalah daun tanaman rumput bambu (*Lophatherium gracile* Brongn) yang diperoleh dari kota Malang.
2. Ekstraksi menggunakan metode maserasi dengan pelarut aseton : air (7:3), kemudian dipartisi menggunakan pelarut kloroform dan etil asetat.
3. Pemisahan senyawa tanin menggunakan metode kromatografi lapis tipis analitik dan preparatif.
4. Uji aktivitas antioksidan menggunakan metode DPPH.
5. Identifikasi senyawa tanin menggunakan spektrofotometer UV-Vis dan penambahan pereaksi geser.
6. Pereaksi geser yang digunakan diantaranya NaOH 2 M, AlCl<sub>3</sub> 5%, AlCl<sub>3</sub> 5%/HCl, NaOAc, NaOAc/H<sub>3</sub>BO<sub>3</sub>.

### 1.5 Manfaat Penelitian

Penelitian ini diharapkan dapat memberikan informasi mengenai manfaat daun rumput bambu sebagai antioksidan. Selanjutnya dapat digunakan sebagai antikanker dan antibakteri sehingga dapat memberikan manfaat bagi masyarakat dan meningkatkan nilai guna rumput bambu. Selain itu penelitian ini juga dapat digunakan sebagai rujukan untuk penelitian selanjutnya dalam bidang farmakologi maupun bidang lainnya.

## BAB II

### TINJAUAN PUSTAKA

#### 2.1 Pemanfaatan Tanaman dalam Perspektif Islam

Allah menciptakan tumbuh-tumbuhan yang baik dengan berbagai manfaat dan kandungan didalamnya. Allah berfirman dalam surat Luqman ayat 10.

خَلَقَ السَّمَوَاتِ بِغَيْرِ عَمَدٍ تَرَوْنَهَا ۚ وَأَلْقَىٰ فِي الْأَرْضِ رَوَاسِيَ أَن تَمِيدَ بِكُمْ وَبَثَّ فِيهَا مِن كُلِّ دَابَّةٍ ۗ وَأَنْزَلْنَا مِنَ السَّمَاءِ مَاءً فَأَنْبَتْنَا فِيهَا مِن كُلِّ زَوْجٍ كَرِيمٍ ﴿١٠﴾

Artinya: “Dia menciptakan langit tanpa tiang yang kamu melihatnya dan Dia meletakkan gunung-gunung (di permukaan) bumi supaya bumi itu tidak menggoyangkan kamu; dan memperkembang biakkan padanya segala macam jenis binatang dan Kami turunkan air hujan dari langit, lalu Kami tumbuhkan padanya segala macam tumbuh-tumbuhan yang baik” (QS. Luqman: 10).

Shihab (2002) menjelaskan bahwa Allah menumbuhkan dari berbagai macam tumbuhan yang baik, yaitu subur dan bermanfaat. Kata **كريم** dalam surat Luqman ayat 10 digunakan untuk menyifati segala sesuatu yang baik sesuai obyeknya. Pasangan tumbuhan yang **كريم** adalah yang tumbuh subur dan menghasilkan apa yang diharapkan penanamannya. Salah satu hasil yang diharapkan dari tanaman adalah pemanfaatannya yang sebagai obat. Seperti halnya tanaman rumput bambu (*Lophatherum gracile* Brongn) memiliki banyak manfaat bagi manusia, diantaranya untuk menurunkan panas, meluruhkan kemih, antiradang, mengatasi demam, mimisan, sakit tenggorokan, Purwitasariawan, dan gusi bengkak (Wijayakusuma, 2005).

Salah satu manfaat tumbuhan adalah sebagai obat, merupakan anugrah dari Allah SWT yang harus dipelajari dan dimanfaatkan, tidak terkecuali tanaman

yang selama ini dianggap sebagai tanaman pengganggu seperti tanaman rumput bambu sehingga dapat memberikan kontribusi pada pengembangan daun rumput bambu sebagai senyawa peredam radikal bebas atau antioksidan. Allah memerintahkan kita berbuat baik kepada sesama, salah satunya dengan cara memberikan informasi atau mengeksplor manfaat tanaman rumput bambu kepada masyarakat sehingga dapat digunakan dengan maksimal. Sebagaimana Allah berfirman dalam surat al-Qashash ayat 77:

وَأَتَّبِعْ فِي مِمَّا آتَاكَ اللَّهُ الدَّارَ الْآخِرَةَ ۗ وَلَا تَنْسَ نَصِيبَكَ مِنَ الدُّنْيَا ۗ وَأَحْسِنَ كَمَا أَحْسَنَ اللَّهُ إِلَيْكَ ۗ وَلَا تَبْغِ الْفَسَادَ فِي الْأَرْضِ ۗ إِنَّ اللَّهَ لَا يُحِبُّ الْمُفْسِدِينَ ﴿٧٧﴾

Artinya: *Dan carilah pada apa yang telah dianugerahkan Allah kepadamu (kebahagiaan) negeri akhirat, dan janganlah kamu melupakan bagianmu dari (kenikmatan) duniawi dan berbuat baiklah (kepada orang lain) sebagaimana Allah telah berbuat baik, kepadamu, dan janganlah kamu berbuat kerusakan di (muka) bumi. Sesungguhnya Allah tidak menyukai orang-orang yang berbuat kerusakan (QS. al-Qashash: 77)*

Al Qarni (2007) menyebutkan bahwa tafsir dari surat al Qashash ayat 77 merupakan perintah berbuat baik kepada orang lain, dengan cara memberi manfaat dan pertolongan sebagaimana Allah telah berlaku baik kepadamu dengan memberimu karunia yang banyak. Larangan berniat membuat kerusakan melalui ucapan dan perbuatan dusta, zalim, melakukan kekejian dan kemungkar.

Pemanfaatan bahan alam sebagai obat tradisional di Indonesia akhir-akhir ini meningkat, bahkan beberapa bahan alam telah diproduksi secara pabrikasi dalam skala besar. Penggunaan obat tradisional dinilai memiliki efek samping yang lebih kecil dibandingkan dengan obat yang berasal dari bahan kimia, disamping itu harganya lebih terjangkau. Selain itu keuntungan lain penggunaan obat tradisional adalah bahan bakunya mudah diperoleh dan harganya yang relatif

murah (Putri, 2010). Hasil penelitian eksplorasi keanekaragaman dan kandungan kimia tumbuhan obat di hutan tropis gunung arjuno menyatakan bahwa tanaman *Lophatherum gracile* Brongn merupakan salah satu dari tiga belas jenis tanaman yang sangat berpotensi untuk digunakan sebagai obat herbal penyembuhan penyakit tertentu, seperti antiinflamasi maupun antikanker (Kusumawati, dkk., 2003).

## **2.2 Tanaman Rumput Bambu (*Lophatherum gracile* Brongn)**

### **2.2.1 Morfologi dan Klasifikasi Tanaman Rumput Bambu**

Tanaman rumput bambu (*Lophatherum gracile* Brongn) tidak hanya terdapat di satu daerah saja, tetapi tersebar di beberapa daerah di Indonesia seperti di Sunda yang dikenal dengan nama Jukut awi. Selain itu diluar negeri rumput ini telah dikenal terutama di Inggris dan Tionghoa, seperti di Inggris dengan nama *sasagrass* dan di Tionghoa dengan nama *dan zhu ye* (Wijayakusuma, 2005).

*Lophatherum gracile* Brongn (Famili: Gramineae) merupakan tanaman rumput-rumputan yang menahun. Ciri-cirinya adalah memiliki tinggi 0,5 – 1,2 m dan bertangkai banyak, dengan rimpang pendek bercabang-cabang, berakar serabut yang tumbuh menjadi umbi-umbi. Tumbuh di atas 1500 m di atas permukaan laut di tempat yang senantiasa rindang, khususnya dalam hutan alam. Batang-batangnya tegak, mampat tidak berbulu, daun-daunnya bertangkai jelas, berbangun lancet garis, berurat melintang di antara lidinya yang membujur, lembut, berwarna hijau tua panjang 10 – 30 cm dan lebarnya 10 – 55 mm. Bunga majemuknya berupa sebuah malai bertangkai panjang dan terdiri atas bulir-bulir yang panjangnya 1 – 15 cm (Heyne, 1987).



Gambar 2.1 Rumput bambu (*Lophatherum gracile* Brongn)  
(Wijayakusuma, 2005)

Klasifikasi tanaman rumput bambu (*Lophatherum gracile* Brongn)  
(Cronquist, 1981):

Divisi	: Spermatophyta
Sub Divisi	: Angiosperma
Kelas	: Monocotyledoneae
Bangsa	: Poales
Suku	: Poaceae
Marga	: Lophatherum
Jenis	: <i>Lophatherum gracile</i> Brongn

### 2.2.2 Manfaat Tanaman Rumput Bambu

Rumput bambu (*Lophatherum gracile* Brongn), dalam bahasa sunda tanaman ini dikenal dengan nama jukut awi, rumput bambu memiliki beberapa khasiat diantaranya sebagai obat demam, infeksi saluran kencing, kemih berdarah, bisul, perasaan gelisah dan obat jika merasa kehausan terus menerus (Utami, 2008).

Rumput bambu juga memiliki beberapa manfaat lain sebagai obat untuk mengatasi kanker, buang air kecil tidak lancar dan terasa sakit, mimisan, sakit tenggorokan, sariawan dan gusi bengkak (Wijayakusuma, 2005). Menurut Jing *et al* (2009), riset farmakologi ekstrak daun rumput bambu (*Lophatherum gracile* Brongn) dapat digunakan sebagai antipiretik, antideuritik, antibakteri, antitumor, dan efek hiperglesimik.

### 2.2.3 Kandungan Kimia Rumput Bambu

Kandungan pada seluruh bagian tanaman ini antara lain akar, batang, dan daun mengandung triterpenoid dan steroid arundoin, cylindrin, friedelin, beta-sitosterol, stigmasterol, campesterol, taraxerol, asam amino, dan asam lemak. (Wijayakusuma, 2005).

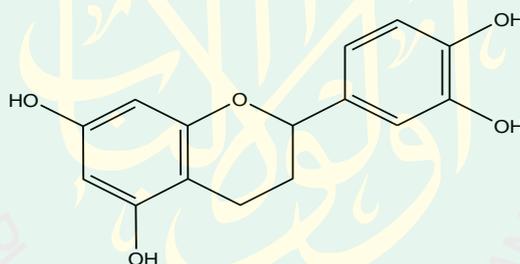
Penelitian farmakologi China menyatakan bahwa ekstrak daun *Lophatherum gracile* Brongn mengandung senyawa aktif flavonoid dan triterpenoid yang dapat dimanfaatkan sebagai antipiretik, diuretik, antibakteri, antitumor dan efek hiperglikemia (Jing, *et al.*, 2009). Purwitasari (2014) menyatakan bahwa fraksi etanol dari ekstrak daun tanaman rumput bambu (*Lophatherum gracile* Brongn) mengandung tiga golongan senyawa yakni alkaloid, tanin dan triterpenoid.

### 2.3 Tanin

Tanin secara umum didefinisikan sebagai senyawa polifenol dan dapat membentuk kompleks dengan protein membentuk kopolimer yang tidak larut dalam air. Terdapat dua jenis utama tanin yaitu tanin terkondensasi dan tanin terhidrolisis. Tanin terhidrolisis terbagi menjadi dua yakni galotanin dan elagitanin. Tanin terkondensasi memiliki berat molekul 1000 – 3000, sedangkan tanin terhidrolisis memiliki berat molekul 1000 – 1500 pada galotanin dan 1000 – 3000 pada elagitanin (Harbone, 1996). Tanin terdapat pada daun, buah yang belum matang, merupakan golongan senyawa aktif tumbuhan yang termasuk golongan flavonoid, mempunyai rasa sepat dan mempunyai kemampuan menyamak kulit (Robinson, 1995). Senyawa tanin merupakan senyawa yang termasuk golongan senyawa flavonoid, karena dilihat dari strukturnya yang

memiliki 2 cincin aromatik yang diikat oleh tiga atom karbon. Kedudukan gugus hidroksil fenol bebas pada inti flavonoid dapat ditentukan dengan menambahkan pereaksi geser ke dalam larutan cuplikan dan mengamati pergeseran puncak serapan yang terjadi (Hayati, dkk., 2010).

Tanin mempunyai beberapa khasiat yaitu sebagai astringen, antidiare, antibakteri dan antioksidan. Tanin merupakan komponen zat organik yang sangat kompleks, terdiri dari senyawa fenolik yang sukar dipisahkan dan sukar mengkristal, mengendapkan protein dari larutannya dan bersenyawa dengan protein tersebut (Desmiaty, dkk., 2008 dalam Malanggia, dkk., 2012). Beberapa tanin terbukti memiliki aktivitas antioksidan, menghambat pertumbuhan tumor dan menghambat enzim seperti “*reverse*” transkriptase dan DNA topoisomerase.



Gambar 2.2 Struktur senyawa tanin (Robinson, 1995)

### 2.3.1 Sifat-Sifat Tanin

Sifat utama tanin tumbuh-tumbuhan tergantung pada gugusan fenolik-OH yang terkandung dalam tanin, dan sifat tersebut secara garis besar dapat diuraikan sebagai berikut (Browning, 1966):

#### a. Sifat kimia tanin

1. Tanin memiliki sifat umum, yaitu memiliki gugus fenol dan bersifat koloid, karena itu di dalam air bersifat koloid dan asam lemah.

2. Semua jenis tanin dapat larut dalam air. Kelarutannya besar, akan bertambah besar apabila dilarutkan dalam air panas, begitu juga tanin akan larut dalam pelarut organik seperti metanol, etanol, aseton dan pelarut organik lainnya.
3. Tanin dengan garam besi memberikan reaksi warna hijau dan biru kehitaman yang digunakan untuk menguji klasifikasi tanin. Uji ini kurang baik, karena selain tanin yang dapat memberikan reaksi warna, zat-zat lain juga dapat memberikan warna yang sama.
4. Tanin akan terurai menjadi *pyrogallol*, *pyrocatechol* dan *phloroglucinol* bila dipanaskan sampai suhu 210 °F – 215 °F (98,89 °C – 101,67 °C).
5. Tanin dapat dihidrolisa oleh asam, basa dan enzim.
6. Ikatan kimia yang terjadi antara tanin-protein atau polimer-polimer lainnya terdiri dari ikatan hidrogen, ikatan ionik dan ikatan kovalen.

#### **b. Sifat fisik tanin**

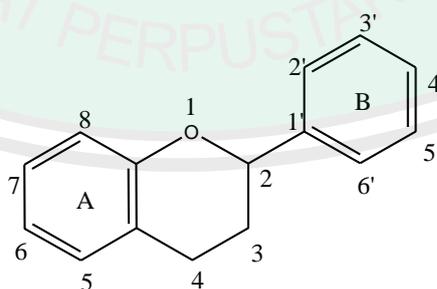
1. Umumnya tanin mempunyai berat molekul tinggi dan cenderung mudah dioksidasi menjadi suatu polimer, sebagian besar tanin bentuknya amorf dan tidak mempunyai titik leleh.
2. Tanin berwarna putih kekuning-kuningan sampai coklat terang, tergantung dari sumber tanin tersebut.
3. Tanin berbentuk serbuk atau berlapis-lapis seperti kulit kerang, berbau khas dan mempunyai rasa sepat (astringent).
4. Warna tanin akan menjadi gelap apabila terkena cahaya langsung atau dibiarkan di udara terbuka.
5. Tanin mempunyai sifat atau daya bakterostatik, fungistatik dan merupakan racun.

## 2.3.2 Penggolongan Tanin

### a. Tanin Terkondensasi

Tanin terkondensasi atau proantosianidin tersebar luas pada paku-pakuan, gimnospermae, angiospermae terutama dalam tumbuhan berkayu, sebagai penolak binatang menyusu dan serangga pemakan tumbuhan karena kesepatannya dan daya samaknya. Bukti menunjukkan bahwa jika kadar tanin dalam daun lebih dari 2 % bobot kering, barulah tanin tersebut merupakan penolak makanan (Harbone, 1996).

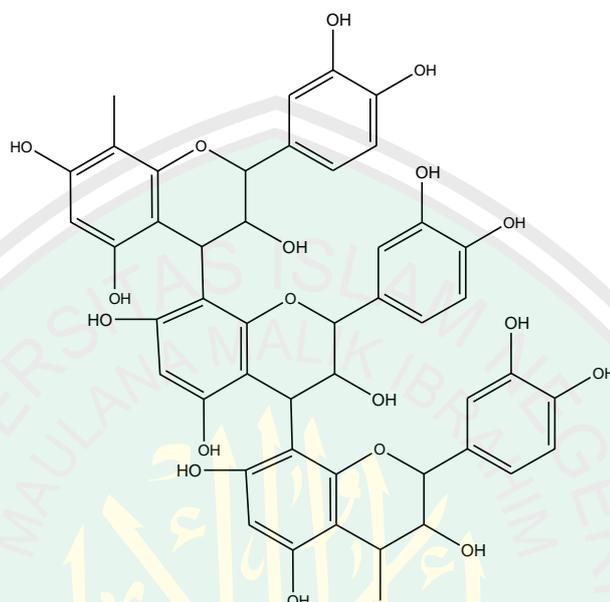
Tanin terkondensasi atau flavolan secara biosintesis dapat dianggap terbentuk dengan cara kondensasi katekin tunggal atau galokatekin yang membentuk senyawa dimer, dan kemudian oligomer yang lebih tinggi. Ikatan-ikatan karbon menghubungkan satu satuan flavolan dengan satuan berikutnya melalui ikatan 4 – 8 atau 6 – 8. Kebanyakan flavolan mempunyai 2 sampai 20 satuan flavon (Harbone, 1996). Tanin terkondensasi atau proantosianidin merupakan polimer flavonoid. Proantosianidin didasarkan pada sistem cincin heterosiklik yang diperoleh dari fenilalanin (B) dan biosintesis poliketida (A).



Gambar 2.3 Struktur dasar tanin terkondensasi (Hagerman, *et al.*, 1992)

Proantosianidin adalah senyawa yang menghasilkan pigmen antosianidin melalui pemecahan secara oksidatif dalam alkohol panas. Kebanyakan proantosianidin adalah prosianidin, jika direaksikan dengan asam akan

menghasilkan sianidin (Hagerman, *et al.*, 1992). Proantosianidin didefinisikan sebagai oligo atau polimer flavonoid (flavan-3-ol atau flavan-3-4-diol) dimana ikatan C-C tidak mudah untuk dihidrolisi.



Gambar 2.4 Struktur proantosianidin atau flavolan (Harborne, 1996)

Tanin dapat dideteksi dengan sinar UV pendek berupa bercak lembayung yang bereaksi positif dengan setiap pereaksi fenol baku. Proantosianidin dapat dideteksi langsung dalam jaringan tumbuhan hijau dengan mencelupkan ke dalam 2 M HCl mendidih selama setengah jam, bila terbentuk warna merah yang dapat diekstraksi dengan amil atau butil alkohol, maka ini suatu bukti positif adanya senyawa tersebut (Harborne, 1996). Terbentuknya warna coklat kuning setelah penambahan HCl 2M menunjukkan adanya katekin (Robinson, 1995).

#### **b. Tanin Terhidrolisis**

Tanin terhidrolisis merupakan turunan dari asam galat (asam 3,4,5-trihidroksil benzoat). Senyawa ini mengandung ikatan ester antara suatu monosakarida terutama gugus hidroksilnya. Tanin terhidrolisis dapat dibagi dalam

dua kelas besar yaitu gallotanin dan ellagitannin. (Hagerman, *et al.*, 1992). Terdapat gugus karbohidrat (biasanya D-glukosa) pada tanin terhidrolisis, merupakan hidroksil dari karbohidrat atau *phenolic esterified* seperti asam galat pada gallotannin atau asam elagat pada ellagitannin (Ismarani, 2012). Tanin terhidrolisis mudah terhidrolisis dengan penambahan asam lemah atau dengan basa lemah, dan membentuk karbohidrat serta asam fenolik (Manitto, 1981).

Tanin terhidrolisis biasanya berupa senyawa amorf, higroskopis, berwarna coklat kuning yang larut dalam air terutama air panas membentuk larutan koloid bukan larutan sebenarnya. Semakin murni tanin maka semakin kurang kelarutannya dalam air dan semakin mudah diperoleh dalam bentuk kristal. Tanin terhidrolisis larut pula dalam pelarut organik polar tetapi tidak larut dalam pelarut organik nonpolar seperti benzena dan kloroform (Robinson, 1995).

### **1. Gallotanin**

Gallotanin merupakan jenis tanin terhidrolisis yang paling sederhana dari suatu ester pentagaloiil glukosa ( $\beta$ -1,2,3,4,6-Pentagaloiil-O-D-Glukosa). Pentagaloiil glukosa atau PGG memiliki lima ikatan ester yang mengandung gugus alifatik hidroksil dengan glukosa sebagai inti (Hagerman, 2002). Gallotanin bila dihidrolisis akan menghasilkan asam gallat (Manitto, 1981).

Sifat fisik gallotanin ialah polimer amorf, berwarna putih kekuningan, bau spesifik, dapat larut dalam air dan gliserol, sangat larut dalam alkohol dan aseton, tidak larut dalam benzen, kloroform, eter, petroleum eter, karbon disulfida dan karbon tetraklorida (Gohen, 1976). Sifat kimia gallotanin berwarna coklat jika terkena cahaya dengan albumin, tepung, gelatin, alkaloid, dan garam metalik memberikan endapan yang tidak larut, sedangkan dengan  $\text{FeCl}_3$  memberikan



Aktivitas biologi ellagitanin merupakan implikasi dari ikatan antara ellagitanin dengan protein, senyawa dengan berat molekul tinggi, senyawa sederhana, dan ion logam berat. Ikatan tersebut membentuk kompleks senyawa yang dapat menyebabkan perubahan fisiologis dalam sel atau jaringan makhluk hidup. Berbagai penelitian telah dikembangkan untuk mengeksplorasi ellagitanin dan aktivitas biologinya. Tahun 1992 baru sekitar 90 senyawa ellagitanin yang diketahui memiliki aktivitas biologi. Aktivitas biologi ellagitanin yang telah diketahui antara lain sebagai antidiabetes, antimikrobia, antivirus, antihipertensi, antioksidan, dan antikanker atau antitumor. Hasil dari sekian banyak penelitian yang telah dilakukan, belum ada yang menunjukkan efek toksik ellagitanin. Aktifitas antioksidatif tanin, termasuk ellagitanin, antara lain penghambatan autooksidasi asam askorbat yang dikatalissi oleh ion  $\text{Cu}^{2+}$  (Okuda, *et al.*, 1992 dalam Hernawan dan Setyawan, 2003).

Prosedur ekstraksi biasa tidak cukup untuk mengisolasi ellagitanin. Proses ekstraksi umumnya dilakukan secara berulang dan bertahap. Sering kali, ekstraksi dengan aseton 70% dilakukan berulang sampai tiga kali dan dilanjutkan ke tahapan isolasi (Hernawan dan Setyawan, 2003).

#### **2.4 Radikal Bebas**

Radikal bebas adalah atom atau molekul yang memiliki satu atau lebih atom tak berpasangan. Meskipun suatu radikal tidak bermuatan positif atau negatif, spesi semacam ini sangat reaktif karena adanya elektron yang tidak berpasangan. Suatu radikal bebas dijumpai sebagai zat antara yang tak dapat diisolasi usia pendek karena sangat reaktif dan berenergi tinggi (Fessenden dan Fessenden, 1997).

Kemiripan sifat radikal bebas dengan oksidan terletak pada agresivitas menarik elektron di sekelilingnya. Sehingga radikal bebas dianggap sama dengan oksidan. Tidak setiap oksidan merupakan radikal bebas. Radikal bebas lebih berbahaya dibandingkan dengan senyawa oksidan non-radikal (Winarsi, 2007).

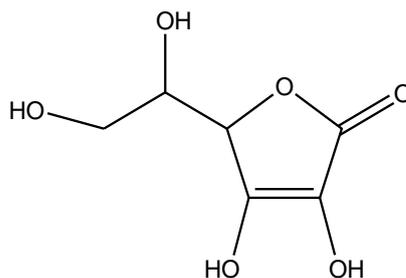
## **2.5 Antioksidan**

Antioksidan merupakan senyawa pemberi electron atau reduktan. Senyawa ini memiliki berat molekul kecil tetapi mampu menginaktivasi berkembangnya reaksi oksidasi, dengan cara mencegah terbentuknya radikal. Antioksidan juga merupakan senyawa yang dapat menghambat reaksi oksidasi dengan mengikat radikal bebas. Akibatnya kerusakan sel dapat dihambat (Winarsi, 2007).

### **2.5.1 Klasifikasi Antioksidan**

#### **a. Antioksidan Alami**

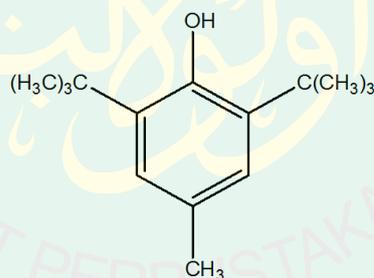
Antioksidan alami adalah antioksidan yang umumnya diisolasi dari sumber alami yang kebanyakan berasal dari tumbuh tumbuhan dan buah-buahan. Antioksidan alami secara toksikologi lebih aman untuk dikonsumsi dan lebih mudah diserap oleh tubuh dari pada antioksidan sintesis (Madhavi, *et al.*, 1996). Salah satu antioksidan alami adalah vitamin C (L-asam askorbat) merupakan suatu antioksidan penting yang larut dalam air. Vitamin C secara efektif menangkap radikal-radikal  $O_2^\bullet$ ,  $OH^\bullet$ ,  $ROO^\bullet$  dan juga berperan dalam regenerasi vitamin E. Vitamin C dapat melindungi membran biologis dan LDL (*Low Density Lipid*) dari kerusakan prooksidatif dengan cara mengikat radikal peroksid dalam fase berair dari plasma atau sitosol. Rumus struktur vitamin C atau asam askorbat dapat dilihat pada Gambar 2.7.



Gambar 2.7 Struktur L-asam askorbat atau vitamin C (Silalahi, 2006)

### b. Antioksidan Sintetik

Antioksidan sintetik yang banyak digunakan adalah senyawa fenol. Penambahan antioksidan ini harus memenuhi beberapa syarat, misalnya tidak berbahaya bagi kesehatan, tidak menimbulkan warna yang tidak diinginkan, efektif pada konsentrasi rendah, mudah didapat, dan ekonomis (Winarno, 2008). Beberapa contoh antioksidan sintetik yang diizinkan penggunaannya untuk makanan yaitu BHT, PG, TBHQ dan tokoferol.



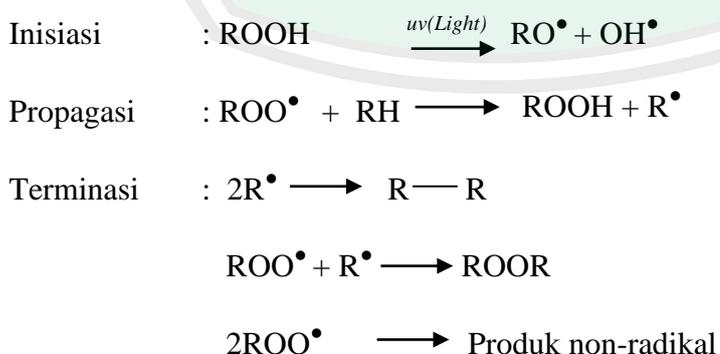
Gambar 2.8 Struktur *butylated hydroxytoluene* (BHT) (Cahyadi, 2006)

Antioksidan sintetik BHA, BHT, PG dan TBHQ sering digunakan untuk mengontrol terjadinya oksidasi, tetapi tidak menutup kemungkinan antioksidan tersebut menyebabkan efek karsinogenik. Oleh karena itu, penelitian dan pengembangan antioksidan yang berasal dari alam kini sedang giat-giatnya dilakukan sebagai alternatif pengganti antioksidan sintetik (Shahidi, *et al.*, 1995).

### 2.5.2 Mekanisme Antioksidatif

Menurut Gordon (1990) antioksidan mempunyai dua fungsi berdasarkan mekanisme kerjanya adalah sebagai berikut: Pertama, fungsi utama antioksidan yaitu sebagai pemberi atom hidrogen. Antioksidan (AH) yang memiliki fungsi tersebut disebut juga sebagai antioksidan primer. Senyawa ini dapat memberikan atom hidrogen secara cepat ke radikal lipid ( $R^\bullet$ ,  $ROO^\bullet$ ) atau mengubahnya ke bentuk lebih stabil, sementara hasil reaksi radikal antioksidan ( $A^\bullet$ ) tersebut memiliki keadaan lebih stabil dibanding dengan radikal lipid. Kedua, fungsi kedua antioksidan merupakan antioksidan sekunder, yaitu berfungsi untuk memperlambat laju autooksidasi dengan berbagai mekanisme pemutusan rantai oksidasi di luar mekanisme pemutusan rantai autooksidasi, dimana hal itu melalui perubahan radikal lipida ke bentuk yang lebih stabil.

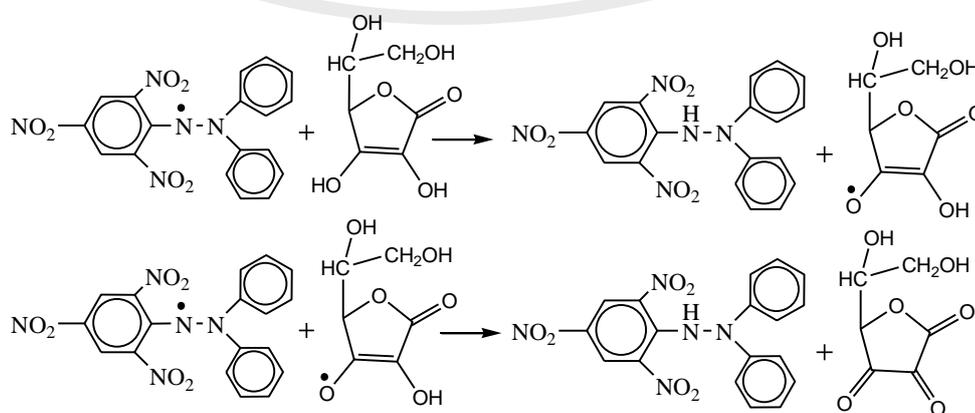
Terbentuknya senyawa radikal, baik radikal bebas endogen maupun eksogen terjadi melalui sederetan reaksi. Mula-mula terjadi pembentukan awal radikal bebas (inisiasi), lalu perambatan atau terbentuknya radikal baru (propagasi), dan tahap terakhir yaitu pemusnahan atau perubahan senyawa radikal menjadi non radikal (terminasi) (Mark, 2013 dalam Lailah, 2014).



### 2.5.3 Uji Efektifitas Antioksidan

Metode DPPH (*1,1-difenil-2-pikrilhidrazil*) digunakan secara luas untuk menguji kemampuan senyawa yang berperan sebagai pendonor elektron atau hidrogen. Metode DPPH dapat mengukur efektifitas total antioksidan baik dalam pelarut polar maupun nonpolar. Beberapa metode lain terbatas mengukur komponen yang larut dalam pelarut yang digunakan dalam analisa.

Metode DPPH dipilih karena sederhana, mudah, cepat dan peka serta hanya memerlukan sedikit sampel. Senyawa antioksidan akan bereaksi dengan radikal DPPH melalui mekanisme donasi atom hidrogen dan menyebabkan terjadinya peluruhan warna DPPH dari ungu ke kuning yang diukur pada panjang gelombang 517 nm. Pengurangan intensitas warna yang terjadi berhubungan dengan jumlah elektron DPPH yang menangkap atom hidrogen. Pengurangan intensitas warna mengindikasikan peningkatan kemampuan antioksidan untuk menangkap radikal bebas. Efektivitas antioksidan diperoleh dengan menghitung jumlah pengurangan intensitas warna ungu DPPH yang sebanding dengan pengurangan konsentrasi larutan DPPH melalui pengukuran absorbansi larutan uji. DPPH yang bereaksi dengan antioksidan akan menghasilkan bentuk tereduksi *1,1-difenil-2-pikrilhidrazin* dan radikal antioksidan.



Gambar 2.9 Reaksi DPPH dengan asam askorbat (Prakash, *et al.*, 2001)

Efektivitas penangkapan radikal bebas dapat dinyatakan dengan satuan persen (%) efektivitas antioksidan. Nilai ini diperoleh dengan persamaan berikut (Molyneux, 2004):

$$\% \text{ Efektivitas Antioksidan} = \frac{A_0 - A_1}{A_0} \times 100 \%$$

Keterangan :  $A_0$  = Absorbansi kontrol  
 $A_1$  = Absorbansi sampel

Nilai 0 % berarti sampel tidak mempunyai efektivitas antioksidan, sedangkan nilai 100 % berarti pengujian efektivitas antioksidan perlu dilanjutkan dengan pengenceran sampel untuk mengetahui batas konsentrasi efektivitasnya. Suatu bahan dapat dikatakan aktif sebagai antioksidan bila presentase efektivitas antioksidan lebih atau sama dengan 50 % (Parwata, dkk., 2009 dalam Rizkia, 2014).

Absorbansi kontrol yang digunakan dalam prosedur DPPH ini adalah absorbansi DPPH sebelum ditambahkan sampel. Kontrol digunakan untuk mengkonfirmasi kestabilan sistem pengukuran. Nilai absorbansi kontrol dapat berkurang dari hari ke hari dikarenakan kehilangan efektivitasnya saat dalam stok larutan DPPH, tetapi nilai absorbansi kontrol tetap dapat memberikan batasan untuk pengukuran saat itu. Kontrol juga berfungsi menjaga kekonstanan total konsentrasi DPPH dalam serangkaian pengukuran (Molyneux, 2004).

Dalam metode DPPH terdapat parameter  $EC_{50}$  (*Efficient Concentration 50 Value*). Parameter  $EC_{50}$  merupakan parameter yang menunjukkan konsentrasi ekstrak uji yang mampu menangkap radikal bebas sebanyak 50 % yang diperoleh melalui persamaan regresi. Semakin kecil  $EC_{50}$  suatu senyawa uji maka senyawa tersebut semakin efektif sebagai penangkal radikal bebas (Rizkia, 2014).

Tabel 2.1 Ketentuan kekuatan antioksidan (Afriani, dkk., 2014)

Nilai EC <sub>50</sub>	Kekuatan
< 50 ppm	Sangat kuat
50 – 100 ppm	Kuat
100 – 150 ppm	Sedang
150 – 200 ppm	Lemah
> 200 ppm	Sangat lemah

## 2.6 Metode Pemisahan Senyawa Tanin

### 2.6.1 Ekstraksi Maserasi

Ekstraksi adalah proses penarikan zat terlarut dari larutannya di dalam air oleh suatu pelarut lain yang tidak bercampur dengan air. Tujuan ekstraksi adalah memisahkan suatu komponen dari campurannya menggunakan pelarut tertentu (Soebagio, 2003). Salah satu metode ekstraksi adalah maserasi. Maserasi dilakukan dengan merendam serbuk dalam pelarut. Pelarut menembus dinding sel dan masuk dalam rongga sel yang mengandung zat aktif. Zat aktif larut karena perbedaan konsentrasi anantara larutan zat aktif di dalam sel dengan di luar sel, maka larutan yang terpekat didesak ke luar. Peristiwa ini berulang sehingga terjadi keseimbangan konsentrasi antara larutan di luar dan di dalam sel (Baraja, 2008).

Proses ini menguntungkan dalam isolasi bahan alam karena dalam perendaman sampel tumbuhan akan terjadi pemecahan dinding dan membran sel akibat perbedaan tekanan antara di dalam dan di luar sel sehingga metabolit sekunder dalam sitoplasma terlarut dalam pelarut organik, ekstraksi senyawa akan sempurna karena dapat diatur lama perendaman yang dilakukan (Guenther, 1987).

Pemilih pelarut organik yang digunakan dalam ekstraksi komponen aktif merupakan faktor penting dan menentukan pencapaian tujuan dan sasaran ekstraksi komponen. Semakin tinggi nilai konstanta dielektrik, titik didih dan kelarutan dalam air, maka pelarut bersifat makin polar (Sudarmadji, dkk., 2003).

Tabel 2.2 Konstanta dielektrikum dan tingkat kelarutan beberapa pelarut (Sax dan Lewis, 1998; Fesenden dan Fesenden, 1997; Mulyono, 2009)

Jenis pelarut	Konstanta dielektrikum	Tingkat kelarutan dalam air	Titik didih (°C)
Heksana	1,9	TL	68,7
Petroleum eter	2,28	TL	60
Benzene	2,38	TL	80,1
Toluene	4,81	TL	111
Kloroform	4,81	S	61,3
Etil asetat	6,02	S	77,1
Metil asetat	6,68	S	57
Metil klorida	9,08	S	39,75
Butanol	15,80	S	117,2
Propanol	20,1	L	97,22
Aseton	20,70	L	56,2
Etanol	24,30	L	78,5
Metanol	33,60	L	64
Air	78,4	L	100

Keterangan : TL = tidak larut; S = sedikit; L = larut dalam berbagai proporsi

Umumnya tanin diekstrak dengan menggunakan pelarut air, karena lebih murah dengan hasil yang relatif cukup tinggi, tetapi tidak menjamin jumlah senyawaan polifenol yang ada dalam bahan tanin tersebut (Hathway, 1962). Hasil randemen ekstrak tanin dari daun belimbing wuluh yaitu 10,78 % dari 50 gram serbuk dalam 400 mL pelarut aseton: air (7:3 ) (Hayati, dkk., 2010).

### 2.6.2 Ekstraksi Cair-Cair

Ekstraksi cair-cair merupakan metode ekstraksi yang didasarkan pada sifat kelarutan komponen target dan distribusinya dalam dua pelarut yang tidak saling bercampur, sebagian komponen larut pada fase pertama dan sebagian larut pada fase kedua. Syarat pelarutnya adalah memiliki kepolaran yang sesuai dengan bahan yang diekstraksi dan harus terpisah secara pengocokan yang ditandai dengan terbentuknya dua lapisan yang tidak campur (Khopkar, 2008).

Filtrat ekstrak tanin hasil penyaringan dipartisis dengan cara ekstraksi cair-cair. Partisis dilakukan dengan menambahkan kloroform menyebabkan

terbentuknya dua fase yaitu fase air dan fase kloroform. Fase air diambil untuk dilakukan tahap fraksinasi selanjutnya dengan etil asetat. Penambahan etil asetat menyebabkan terbentuknya dua lapisan yaitu lapisan atas (fase etil asetat) dan lapisan bawah (fase air). Fase etil asetat ditampung dan diambil fase airnya. Fase air dipekatkan sehingga diperoleh ekstrak pekat (Ummah, 2010).

### **2.6.3 Kromatografi Lapis Tipis**

#### **a. Kromatografi Lapis Tipis Analitik**

Prinsip pemisahan dengan kromatografi lapis tipis adalah adanya perbedaan sifat fisik dan kimia dari senyawa yaitu kecenderungan dari molekul untuk melarut dalam cairan (kelarutan), kecenderungan molekul untuk menguap dan kecenderungan molekul untuk melekat pada permukaan (Hendayana, 2006).

Fase diam yang dapat digunakan adalah silika atau alumina yang dilapiskan pada lempeng kaca atau aluminium. Jika fase diamnya berupa silika gel maka bersifat asam, jika fase diamnya berupa alumina maka bersifat basa. Fase gerak atau larutan pengembang biasanya digunakan pelarut organik atau bisa juga campuran pelarut organik-anorganik (Gritter, 1991). Fase diam yang digunakan dalam KLT merupakan penjerap yang berukuran kecil dengan diameter partikel antara 10 – 30  $\mu\text{m}$ . Semakin kecil ukuran rata-rata partikel fase diam dan semakin sempit kisaran ukuran fase diam, maka semakin baik kinerja KLT dalam hal efisiennya dan resolusinya (Gandjar dan Rohman, 2007).

Kromatografi lapis tipis analitik (KLTA) digunakan untuk mencari eluen terbaik, dari beberapa eluen yang baik dalam pemisahan senyawa tanin KLTA ini digunakan untuk mengetahui berapa noda yang terpisah dari hasil eluen terbaik. Eluen yang baik adalah eluen yang dapat memisahkan senyawa yang ditandai dengan munculnya noda yang tidak berekor dan jarak antara noda yang muncul

sangat jelas. Noda akan dideteksi menggunakan pereaksi yang sesuai dengan golongan senyawa yang dipisahkan. Pereaksi ini memberikan sebuah kepekaan dan perubahan warna yang ada kaitannya dengan struktur senyawanya, jika senyawa diamati di bawah lampu UV (Harborne, 1996; Hayati, dkk., 2010).

Pemilihan eluen terbaik digunakan pada proses pemisahan tanin dengan metode kromatografi lapis tipis analitik (KLTA). Eluen tersebut diantaranya forestal (asam asetat glasial : H<sub>2</sub>O : HCl pekat) (30:10:3) (Nuraini, 2002); n-heksana : etil asetat (6:4) (Mangunwardoyo, dkk., 2009). Pemisahan tanin pada daun belimbing wuluh (*Averrhoa bilimbi* L.) menggunakan eluen n-butanol : asam asetat : air (BAA) (4:1:5) berhasil memisahkan 3 noda dengan baik (Ummah, 2010). Nahari (2015) menyebutkan campuran eluen n-butanol : asam asetat : air (2:0,5:1,1) mampu memisahkan senyawa tanin dari ekstrak etanol umbi binahong, menghasilkan 3 noda dengan pola pemisahan yang terbaik. Mangunwardoyo dkk (2009) berhasil memisahkan 11 noda menggunakan eluen n-heksana : etil asetat (6:4) pada tanaman herba meniran (*Phyllanthus niruri* L.).

#### **b. Kromatografi Lapis Tipis Preparatif**

Pemisahan senyawa dilakukan menggunakan plat silika gel F<sub>254</sub> dengan menggunakan eluen terbaik untuk masing-masing senyawa. Plat KLT ini dilengkapi dengan indikator fluoresensi pada sinar UV yang bergelombang pendek. Pengamatan plat di bawah lampu UV yang dipasang panjang gelombang emisi 254 nm atau 366 nm untuk menampakkan komponen senyawanya sebagai bercak yang gelap atau bercak yang berfluorosensi terang pada dasar yang berfluorosensi seragam (Gritter, 1991).

Identifikasi dari senyawa-senyawa yang terpisah pada lapisan tipis menggunakan harga Rf. Harga Rf didefinisikan sebagai berikut:

$$\text{Harga Rf} = \frac{\text{Jarak senyawa yang digerakkan dari titik asal}}{\text{Jarak pelarut yang digerakkan dari titik asal}} \dots\dots\dots$$

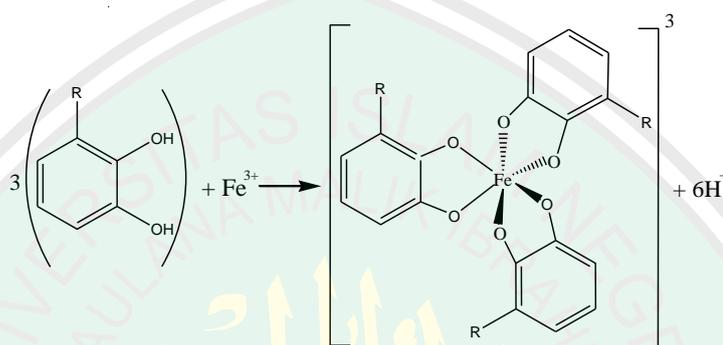
Harga Rf untuk senyawa murni dapat dibandingkan dengan harga standar. Harga Rf dapat dipengaruhi oleh faktor-faktor yang mempengaruhi gerakan noda dalam KLT diantaranya adalah struktur kimia dari senyawa yang sedang dipisahkan, sifat dari penyerap dan derajat aktivitasnya, jenis eluennya, serta jumlah cuplikan yang digunakan tidak terlalu berlebihan (Sastrohamidjojo, 2007).

Mangunwardoyo dkk (2009) memisahkan tanin dari herba meniran dengan nilai Rf sebesar 0,65 dengan pereaksi  $\text{FeCl}_3$  berwarna hijau kekuningan. Ketiga noda yang berhasil dipisahkan dari daun belimbing wuluh diperoleh nilai Rf tanin sebesar 0,61 dan warna noda saat disinari dengan lampu UV 366 berwarna lembayung (Hayati, dkk., 2010). Hasil KLT ekstrak *phyllanthus niruri* L (meniran) dengan Rf 0,66 diduga golongan tanin karena memberikan hasil positif dengan terbentuknya warna hitam dengan pereaksi  $\text{FeCl}_3$  dan terdapat endapan dengan penambahan gelatin 10 % (Mangunwardoyo, dkk., 2009). Hasil KLT pada ekstrak air kulit batang kelapa gading dengan eluen n-butanol : asam asetat : air (4 : 1 : 5), diperoleh tiga bercak noda dengan nilai Rf yaitu 0,51; 0,67; 0,78. Berdasarkan studi literatur dan pengamatan dibawah lampu UV 254 nm dan 366 nm bercak dengan nilai Rf 0,67 adalah senyawa yang diduga tanin (Sidik, 2012).

## 2.7 Uji Kualitatif Senyawa Tanin

Cara klasik mendeteksi senyawa fenol sederhana yaitu menambahkan ekstrak dengan  $\text{FeCl}_3$  1 % dalam air, menimbulkan warna hijau, merah, ungu, biru atau hitam yang kuat. Terbentuknya warna hijau kehitaman atau biru tinta pada

ekstrak karena tanin akan membentuk senyawa kompleks dengan ion  $\text{Fe}^{3+}$  (Harbone, 1996). Kecenderungan Fe dalam pembentukan senyawa kompleks dapat mengikat 6 pasang elektron bebas. Ion  $\text{Fe}^{3+}$  dalam pembentukan senyawa kompleks akan terhibridisasi membentuk hibridisasi  $d^2sp^3$  (Effendy, 2007) sehingga akan terisi oleh 6 pasang elektron bebas atom O pada tanin.



Gambar 2.10 Reaksi dugaan antara senyawa tanin dengan  $\text{FeCl}_3$  (Perron dan Brugmaghim, 2009)

Uji fitokimia menggunakan gelatin digunakan untuk memperkuat dugaan adanya tanin dalam ekstrak suatu tanaman. Selain itu, semua tanin menimbulkan endapan sedikit atau banyak jika ditambahkan dengan gelatin. Gelatin adalah protein yang dapat larut dalam air dan dapat dicernakan, berasal dari kolagen yang telah dipanaskan dalam air mendidih oleh larutan asam atau basa encer, terdiri atas 25 % glisin dan 25 % prolin serta hidroksi prolin (Poedjiaji dan Titin, 1994).

## 2.8 Identifikasi Tanin dengan Spektrofotometer UV-Vis dan Pereaksi Geser

Kedudukan hidroksi fenol bebas pada inti flavonoida dapat ditentukan dengan menambahkan pereaksi geser ke dalam larutan dan mengamati puncak serapannya. Langkah pertama yaitu menentukan jenis flavonoida dengan memperhatikan bentuk umum spektrum, panjang gelombang pita serapan dan data kromatografi kertas. Langkah kedua adalah memperhatikan perubahan spektrum yang disebabkan oleh penambahan pereaksi geser (Markham, 1988).

a. Spektrum natrium metoksida

Natrium metoksida merupakan basa kuat yang dapat mengionisasi hampir semua gugus hidroksi pada inti flavonoida. Spektrum ini biasanya merupakan petunjuk sidik jari pola hidroksilasi dan juga bermanfaat untuk mendeteksi gugus hidroksi yang lebih asam dan tidak tersubstitusi. Degradasi atau pengurangan kekuatan spektrum setelah waktu tertentu merupakan petunjuk baik akan adanya gugus yang peka terhadap basa. Pereaksi pengganti natrium metoksida yang cocok ialah larutan NaOH 2 M dalam air (Mabry, *et al.*, 1970).

b. Spektrum  $\text{AlCl}_3$  dan  $\text{AlCl}_3/\text{HCl}$

$\text{AlCl}_3$  membentuk kompleks tahan asam dengan gugus hidroksi (pada  $\text{C}_3$  atau  $\text{C}_5$ ) dan keton, juga membentuk kompleks tak tahan asam dengan gugus orto-dihidroksil, sehingga dapat digunakan untuk mendeteksi kedua gugus tersebut. Spektrum  $\text{AlCl}_3/\text{HCl}$  hanya berguna untuk mendeteksi gugus hidroksi yang bertetangga dengan gugus keton, karena gugus tersebut dengan  $\text{AlCl}_3$  akan membentuk senyawa kompleks yang tahan asam.

c. Spektrum natrium asetat

Natrium asetat hanya menyebabkan pengionan yang berarti pada gugus hidroksil flavonoida yang paling asam, jadi natrium asetat digunakan terutama untuk mendeteksi adanya gugus 7-hidroksil bebas atau yang setara.

d. Spektrum natrium asetat/asam borat

Natrium asetat dan asam borat menjebatani kedua gugus hidroksi pada gugus orto-dihidroksi dan membentuk senyawa khelat, sehingga pereaksi ini dapat digunakan untuk mendeteksi adanya gugus orto-dihidroksi pada senyawa flavonoida.

Isolat-isolat yang diperoleh dari hasil KLT preparatif, dilarutkan dengan aseton : air dan disentrifuse kemudian dianalisis dengan spektrofotometer UV-Vis. Masing-masing isolat sebanyak 2 mL dimasukkan dalam kuvet dan diamati spektrumnya pada bilangan gelombang 200 – 800 nm. Identifikasi dilanjutkan dengan penambahan pereaksi geser diantaranya NaOH 2 M, AlCl<sub>3</sub> 5%, AlCl<sub>3</sub> 5%/HCl, NaOAc, NaOAc/H<sub>3</sub>BO<sub>3</sub>. Tahapan kerja penggunaan pereaksi geser adalah sebagai berikut (Hayati, dkk., 2010):

1. Isolat diamati pada panjang gelombang 200 – 800 nm.
2. Isolat dari tahap 1 ditambah 3 tetes NaOH 2 M kemudian dikocok hingga homogen dan diamati spektrum yang dihasilkan. Sampel didiamkan selama 5 menit dan diamati spektrum yang dihasilkan.
3. Isolat dari tahap 1 ditambah 6 tetes pereaksi AlCl<sub>3</sub> 5 % dalam metanol kemudian dicampur hingga homogen dan diamati spektrumnya. Sampel ditambah dengan 3 tetes asam klorida (HCl) kemudian dicampur hingga homogen dan diamati spektrumnya.
4. Isolat dari tahap 1 ditambah serbuk natrium asetat kurang lebih 250 mg. Campuran dikocok sampai homogen menggunakan vortex dan diamati lagi spektrumnya. Selanjutnya larutan ini ditambah asam borat kurang lebih 150 mg dikocok sampai homogen dan diamati spektrumnya.

Hasil penelitian Asih dan Setiawan (2008) menyatakan bahwa jenis golongan senyawa flavonoid pada ekstrak n-butanol kulit batang bungur (*Lagerstroemia speciosa* Pers.) adalah flavanon, hal ini dapat diidentifikasi setelah diamati pergeseran spektrumnya melalui spektrofotometer UV-Vis dengan penambahan pereaksi geser MeOH, NaOH, NaOAc, H<sub>3</sub>BO<sub>3</sub>, AlCl<sub>3</sub> dan HCl.

Tabel 2.3 Panjang gelombang dan pergeseran absorpsi spektrum flavonoid

No.	Pereaksi Geser	Panjang gelombang absorpsi (nm)		Pergeseran absorpsi (nm)	
		Pita I	Pita II	Pita I	Pita II
1.	MeOH	378,6	275,6	-	-
2.	MeOH + NaOH	375,6	276,9	-3,0	+1,3
3.	MeOH + NaOH (setelah 5 menit)	376,8	276,0	-1,8	+0,4
4.	MeOH + NaOAc	375,6	276,2	-3,0	+0,6
5.	MeOH + NaOAc + H <sub>3</sub> BO <sub>3</sub>	381,1	275,1	+2,5	-0,5
6.	MeOH + AlCl <sub>3</sub>	375,6	275,5	-3,0	-0,1
7.	MeOH + AlCl <sub>3</sub> + HCl	375,6	274,1	-3,0	-1,5

Hasil identifikasi dari pemisahan ekstrak (isolat 2) pada daun belimbing wuluh (*Averrhoa bilimbi* L.) menggunakan FTIR dan spektrofotometer UV-Vis dengan penambahan pereaksi geser diduga struktur senyawa isolat 2 adalah flavan-3,6,7,4',5'-pentaol atau flavan-3,7,8,4',5'-pentaol. Spektrum isolat tanin dapat dilihat pada Tabel 2.4 (Hayati, dkk., 2010).

Tabel 2.4 Panjang gelombang dan pergeseran absorpsi spektrum tanin

Pereaksi	Panjang gelombang Isolat			Pergeseran absorpsi Isolat			Dugaan Distribusi Isolat		
	1	2	3	1	2	3	1	2	3
-	331,0	331,0	-	-	-	-	-	-	-
NaOH	341,5	333,5	-	+10,5	+2,5	-	4'-OH	4'-OH	-
NaOH 5 menit	341,5	333,0	-	+10,5	+2,0	-	4'-OH	4'-OH	-
AlCl <sub>3</sub> 5 %	328,0	331,0	-	-3,0	Tetap	-	Mungkin o-diOH pada cincin A	Mungkin o-diOH pada cincin A	-
AlCl <sub>3</sub> 5 % + HCl	331,0	333,0	-	Tetap	+2,0	-	Mungkin o-diOH pada cincin A	Mungkin o-diOH pada cincin A	-
NaOAc	329,0	329,0	-	-2,0	-2,0	-	Gugus yang peka terhadap basa, misal 6,7 atau 7,8 atau 3,4'-diOH	Gugus yang peka terhadap basa, misal 6,7 atau 7,8 atau 3,4'-diOH	-
NaOAc + H <sub>3</sub> BO <sub>3</sub>	330,0	331,5	-	-1,0	+0,5	-	o-diOH pada cincin A (6,7) atau (7,8)	o-diOH pada cincin A (6,7) atau (7,8)	-

## BAB III

### METODOLOGI PENELITIAN

#### 3.1 Lokasi dan Waktu Penelitian

Penelitian ini dilaksanakan di Laboratorium Kimia Organik Jurusan Kimia Universitas Islam Negeri (UIN) Maulana Malik Ibrahim Malang bulan Mei 2015 sampai Agustus 2015.

#### 3.2 Alat dan Bahan Penelitian

##### 3.2.1 Alat Penelitian

Alat-alat yang digunakan dalam penelitian ini adalah seperangkat alat gelas, timbangan neraca analitik, bola hisap, pisau, kertas saring, lemari asam, corong *buchner*, *vacuum rotary evaporator*, *shaker incubator*, vortex, corong pisah, oven, *hot plate*, botol larutan, bejana pengembang, plat silika gel F<sub>254</sub>, spektrometri 20<sup>+</sup>, spektrofotometer UV-Vis *Varian Carry*, penggaris, pensil, pipa kapiler dan sentrifuge.

##### 3.2.2 Bahan Penelitian

Bahan utama yang akan digunakan dalam penelitian ini adalah daun rumput bambu (*Lophaterium gracile* Brongn) yang diperoleh dari kota Malang. Bahan-bahan kimia yang digunakan meliputi : aluminium klorida 5 %, aquades, asam askorbat 10 mM, asam asetat, asam asetat glasial, asam borat, asam klorida pekat, aseton, aquades, BHT, DMSO, DPPH, etanol, etil asetat, FeCl<sub>3</sub> 1%, formaldehid 3 %, gelatin, kloroform, metanol, natrium asetat, natrium klorida, natrium hidroksida 2 M, n-butanol, n-heksana.

### 3.3 Tahapan Penelitian

1. Preparasi sampel.
2. Ekstraksi tanin pada daun rumput bambu dengan metode maserasi dan ekstraksi cair-cair.
3. Uji kualitatif ekstrak daun rumput bambu dengan reagen.
4. Uji aktivitas antioksidan dengan metode DPPH (*1,1-Diphenyl-2-picrylhydrazyl*) pada konsentrasi 10, 25, 50, 100 ppm.
5. Fraksinasi tanin dengan kromatografi lapis tipis analitik dan preparatif.
6. Identifikasi senyawa aktif tanin dengan spektrofotometer UV-Vis dan penambahan pereaksi geser.
7. Analisis data.

### 3.4 Pelaksanaan Penelitian

#### 3.4.1 Preparasi Sampel

Daun rumput bambu dicuci dengan air, selanjutnya dikeringkan dengan cara diangin-anginkan pada suhu kamar hingga bobot menyusut dari bobot semula, kemudian sampel diserbukkan, serbuk disaring menggunakan ayakan 90 mesh. Hasil yang diperoleh digunakan sebagai sampel penelitian (Purwitasari, 2014).

#### 3.4.2 Ekstraksi Tanin Menggunakan Maserasi dan Ekstraksi Cair-Cair (Purwitasari, 2014; Ummah, 2010)

Serbuk daun rumput bambu ditimbang sebanyak 60 g dan diekstraksi dengan perendaman selama 24 jam menggunakan pelarut aseton : air (7:3) total 500 mL, dengan penambahan 3 mL asam askorbat 10 mM. Pengadukannya dibantu dengan shaker selama 3 jam, kemudian disaring dan ampas yang diperoleh dimaserasi kembali dengan pelarut dan perlakuan yang sama sampai 3

kali pengulangan. Ekstrak tanin dipekatkan dengan *vacum rotary evaporator* dengan pemanasan pada suhu 50 °C. Ekstrak pekat yang dihasilkan kemudian dipartisi dengan cara diekstraksi cair-cair menggunakan kloroform (3x25 mL) menggunakan corong pisah sehingga terbentuk 2 lapisan, lapisan atas (fase air) dan lapisan bawah (fase kloroform). Senyawa tanin diperkirakan berada dalam lapisan air 1 (atas), sehingga lapisan tersebut diekstraksi kembali menggunakan pelarut etil asetat (3x25 mL), dan diperoleh dua lapisan yakni lapisan atas (fase etil asetat ) dan lapisan bawah (fase air 2). Filtrat hasil maserasi aseton : air, lapisan air 1 dan lapisan air 2 diuji kualitatif tanin menggunakan reagen. Kandungan senyawa tanin diasumsikan berada dalam lapisan air 2 (bawah), sehingga lapisan tersebut dipekatkan dengan *vacuum rotary evaporator* pada suhu 50 °C, tekanan ± 800 atm dan rotor 3 – 7 sampai diperoleh ekstrak pekat tanin. Ekstrak kasar tanin dapat dihitung randemennya menggunakan rumus berikut:

$$\% \text{ Rendemen} = \frac{\text{Berat ekstrak}}{\text{Berat sampel}} \times 100$$

Ekstrak pekat dapat disimpan dalam lemari pendingin pada suhu 4 °C agar ekstrak tersebut tidak menjadi rusak, kemudian dilanjutkan dengan uji aktivitas antioksidannya.

### 3.4.3 Uji Kualitatif Tanin dengan Reagen

Filtrat 1 (hasil ekstraksi aseton : air) daun rumput bambu dimasukkan dalam 3 tabung reaksi masing-masing sebanyak 3 mL. Ekstrak pada tabung pertama direaksikan dengan 3 tetes larutan FeCl<sub>3</sub> 1 %. Jika ekstrak mengandung senyawa tanin akan menghasilkan warna hijau kehitaman atau biru tua. Tabung kedua ditambahkan dengan larutan gelatin, jika terbentuk endapan putih maka positif mengandung tanin. Tabung ketiga digunakan untuk membedakan tanin

katekol dan galat dengan cara menambahkan ekstrak dengan formaldehid 3 % : asam klorida (2:1), dan dipanaskan dalam air panas suhu 90 °C. Jika terbentuk endapan merah muda menunjukkan senyawa tanin katekol. Filtrat dipisahkan dengan disaring dan dijenuhkan dengan Na-asetat dan ditambahkan dengan FeCl<sub>3</sub> 1 %, adanya tanin galat ditunjukkan dengan terbentuknya warna biru tinta atau hitam. Lapisan air 1 dan lapisan air 2 dilakukan seperti langkah diatas, fase kloroform dan etil asetat dilakukan uji kualitatif tanin menggunakan FeCl<sub>3</sub> 1 % saja (Ummah, 2010).

### **3.4.4 Uji Aktivitas Antioksidan Ekstrak Tanin dengan Metode DPPH**

#### **3.4.4.1 Penentuan Panjang Gelombang Maksimum**

Dibuat larutan DPPH 0,2 mM sebanyak 5 mL dan diambil 1,5 mL, ditambahkan pelarut etanol : DMSO (2:1) 4,5 mL, kemudian diinkubasi pada suhu 37 °C dan didiamkan selama ± 30 menit. Dimasukkan dalam kuvet. Diamati  $\lambda_{maks}$  larutan untuk digunakan pada tahap selanjutnya.

#### **3.4.4.2 Penentuan Waktu Kestabilan Pengukuran Antioksidan**

Dibuat larutan ekstrak tanin 100 ppm sebanyak 5 mL menggunakan pelarut etanol : DMSO (2:1) dan diambil sebanyak 4,5 mL. Ditambahkan larutan DPPH 0,2 mM sebanyak 1,5 mL, selanjutnya diinkubasi pada suhu 37 °C. Larutan dimasukkan dalam kuvet, kemudian dicari waktu kestabilan pada rentangan waktu 5 – 120 menit dengan interval 5 menit. Sampel diukur menggunakan spektrometri UV pada  $\lambda_{maks}$  yang telah diketahui pada tahap sebelumnya.

#### **3.4.4.3 Pengukuran Potensi Antioksidan pada Sampel**

- a. Absorbansi kontrol: 1,5 mL larutan DPPH 0,2 mM dimasukkan ke dalam tabung reaksi, ditambahkan pelarut etanol : DMSO (2:1) sebanyak 4,5 mL, kemudian ditutup tabung reaksi dengan aluminium foil agar tidak

terkontaminasi dengan udara luar, selanjutnya diinkubasi pada suhu 37 °C selama waktu kestabilan yang telah didapatkan pada tahap sebelumnya, kemudian diukur absorbansinya.

- b. Sampel dilarutkan dalam etanol : DMSO (2:1) dengan konsentrasi 10, 25, 50, 100 ppm. Tabung reaksi disiapkan untuk masing-masing konsentrasi, kemudian tiap-tiap tabung reaksi diisi dengan 4,5 mL ekstrak dan ditambahkan DPPH 1,5 mL (perbandingan larutan DPPH : ekstrak yang dilarutkan dengan konsentrasi tertentu 1:3). Perlakuan tersebut diulangi hingga tiga kali. Sampel diinkubasi pada suhu 37 °C kemudian diukur absorbansinya pada  $\lambda_{maks}$ . Data absorbansi yang diperoleh dari tiap konsentrasi masing-masing ekstrak dihitung nilai persen (%) aktivitas antioksidannya (Rizkia, 2014).

$$\% \text{ Aktivitas antioksidan} = \left( \frac{\text{Absorbansi kontrol} - \text{Absorbansi Sampel}}{\text{Absorbansi kontrol}} \right) \times 100 \%$$

Pembandingan BHT dan asam askorbat dilakukan uji aktivitas antioksidan seperti sampel. Setelah didapatkan persen aktivitas antioksidan, selanjutnya dihitung nilai  $EC_{50}$  dengan memperoleh persamaan regresi menggunakan program “*Graph Pad prism5 software, Regression for analyzing dose-response data*”.

### 3.4.5 Pemisahan Senyawa Tanin

#### 3.4.5.1 Pemisahan Menggunakan KLTA

Proses pemisahan senyawa tanin dengan metode KLTA dilakukan dengan beberapa persiapan diantaranya (Rahmawati, 2015):

##### 1. Persiapan Plat KLT

Plat KLT yang digunakan adalah plat silika  $G_{60} F_{254}$  sebagai fasa diamnya, dengan ukuran 1 cm x 10 cm. Kemudian diberi penanda garis pada tepi bawah

plat dengan jarak 1 cm sebagai posisi penotolan sampel, dan 1 cm pada tepi atas plat untuk menunjukkan batas dari proses elusi. Plat silika diaktivasi dengan cara dioven pada suhu 100 °C selama 30 menit.

## 2. Persiapan Fase Gerak (Eluen)

Masing-masing eluen di masukkan dalam bejana (*great chamber*) dan dijenuhkan terlebih dahulu selama 1 jam dengan ditutup rapat. Pengecualian untuk eluen n-butanol : asam asetat : air (BAA) dilakukan penjenuhan selama 24 jam untuk mempermudah proses elusi karena eluen ini sangat polar. Penjenuhan ini berfungsi untuk menyetarakan tekanan uap dalam bagian bejana. Beberapa eluen yang digunakan pada pemisahan senyawa tanin ini diantaranya fase gerak eluen tersebut diantaranya asam asetat glasial : H<sub>2</sub>O : HCl pekat (forestal) (30:10:3) (Nuraini, 2002), n-butanol : asam asetat : air (2:0,5:1,1) (Nahari, 2015), n-butanol : asam asetat : air (4:1:5) (Ummah, 2010); n-heksana : etil asetat (6:4) (Mangunwardoyo, dkk., 2009) dan kloroform: metanol: air (7:3:0,4).

## 3. Penotolan Sampel

Dibuat larutan ekstrak tanin 15.000 ppm dan ditotolkan pada plat KLT dengan jarak 1 cm dari tepi bawah plat. Penotolan dilakukan dengan pipa kapiler sebanyak 10 kali penotolan pada tempat yang sama, kemudian dikering anginkan (Hayati, dkk., 2010; Rahmawati, 2015).

## 4. Proses Elusi

Ekstrak yang telah ditotolkan pada plat KLT kemudian dielusi dengan masing-masing fasa gerak, plat dimasukkan dalam *great chamber* yang berisi fasa gerak yang telah jenuh, kemudian *great chamber* ditutup hingga larutan

pengembang (eluen) mencapai batas 1 cm dari tepi atas plat. Plat diangkat dan dikeringkan dengan cara diangin-anginkan (Rahmawati, 2015).

#### 5. Identifikasi Noda

Noda-noda yang terbentuk pada plat silika diperiksa dibawah sinar UV pada panjang gelombang 254 nm dan 366 nm (Nahari, 2015). Noda yang tampak ditandai dengan pensil, kemudian disemprot dengan reagen  $\text{FeCl}_3$  1 % dan diamati kembali dibawah sinar UV. Selanjutnya diamati perubahan warna, jika terbentuk warna lembayung setelah penambahan reagen  $\text{FeCl}_3$  1 % maka isolat tersebut positif tanin (Harborne, 1996; Hayati, dkk., 2010). Diamati bentuk masing-masing noda dan diukur jarak tempuhnya, kemudian dihitung nilai  $R_f$  masing-masing noda. Eluen yang menghasilkan pemisahan terbaik selanjutnya digunakan untuk keperluan preparatif.

$$R_f = \frac{\text{Jarak rambat suatu senyawa tertentu}}{\text{Jarak rambat fase gerak yang diukur dari penotolan}}$$

#### 3.4.5.2 Pemisahan Menggunakan KLTP

Pemisahan pada KLTP menggunakan plat silika  $G_{60} F_{254}$  dengan ukuran 10 cm x 20 cm. Dibuat ekstrak tanin 15.000 ppm dan ditotolkan sepanjang plat pada jarak 1 cm dari garis bawah menggunakan pipa kapiler sebanyak 10 x penotolan, setiap totolan dilakukan pengeriangan menggunakan *hair dryer*, selanjutnya dielusi menggunakan eluen yang memberikan pemisahan terbaik pada KLT analitik. Elusi dihentikan setelah gerakan larutan pengembang sampai garis batas atas. Noda yang terbentuk masing-masing diukur nilai  $R_f$ nya dan diperiksa dibawah sinar UV pada panjang gelombang 254 nm dan 366 nm. Noda yang menunjukkan positif senyawa tanin dikerok. Isolat atau noda dilarutkan dalam etanol p.a dan disentrifuge untuk mengendapkan silikanya, kemudian

disaring dan diambil filtratnya. selanjutnya dilakukan identifikasi tanin menggunakan spektrofotometer UV-Vis dan pereaksi geser.

#### **3.4.6 Identifikasi Tanin dengan Spektrofotometer UV-Vis dan Pereaksi Geser**

Filtrat yang diperoleh dari hasil KLT preparatif dianalisis menggunakan spektrofotometer UV-Vis, masing-masing filtrat sebanyak 3 mL dimasukkan dalam kuvet dan diamati spektrumnya pada panjang gelombang 200 – 800 nm. Identifikasi dilanjutkan dengan penambahan pereaksi geser NaOH 2 M, AlCl<sub>3</sub> 5 %, AlCl<sub>3</sub> 5 %/HCl, NaOAc, NaOAc/H<sub>3</sub>BO<sub>3</sub>, kemudian diamati pergeseran puncak serapannya, tahapan kerja penggunaan pereaksi geser adalah sebagai berikut (Hayati, dkk., 2010):

1. Isolat diamati pada panjang gelombang 200 – 800 nm, direkam dan dicatat spektrum yang dihasilkan.
2. Isolat dari tahap 1 ditambah dengan NaOH 2 M sebanyak 3 tetes, kemudian dikocok hingga homogen dan diamati spektrum yang dihasilkan. Sampel didiamkan selama 5 menit dan diamati spektrum yang dihasilkan.
3. Isolat dari tahap 1 kemudian ditambah 6 tetes pereaksi AlCl<sub>3</sub> 5 % dalam metanol kemudian dicampur hingga homogen dan diamati spektrumnya. Sampel ditambah 3 tetes HCl kemudian dicampur hingga homogen dan diamati spektrumnya.
4. Isolat dari tahap 1 ditambah serbuk natrium asetat ± 250 mg. Campuran dikocok hingga homogen menggunakan vorteks dan diamati lagi spektrumnya, selanjutnya larutan tersebut ditambah asam borat ± 150 mg, dikocok hingga homogen dan diamati spektrumnya.

### 3.4.7 Analisis Data

Analisis data pada penelitian ini dilakukan dengan menghitung persen (%) aktivitas antioksidan yang diperoleh dari data absorbansi ekstrak tanin, pembanding BHT dan vitamin C pada konsentrasi 10, 25, 50 dan 100 ppm. Nilai persen aktivitas antioksidan pada masing-masing konsentrasi sampel ekstrak tanin dibandingkan dengan BHT dan vitamin C. Setelah didapatkan data persen (%) efektivitas antioksidan pada masing-masing konsentrasi sampel dan pembanding, kemudian dilakukan perhitungan nilai  $EC_{50}$  dengan menggunakan persamaan regresi yang menyatakan hubungan antara log konsentrasi ekstrak (x) dengan persen (%) efektivitas antioksidan (y). Dibandingkan nilai  $EC_{50}$  antara sampel dengan pembanding. Semakin kecil nilai  $EC_{50}$  menunjukkan bahwa sampel tersebut memiliki kemampuan sebagai antioksidan yang tinggi. Uji kualitatif senyawa aktif tanin dilakukan menggunakan reagen, selanjutnya ekstrak pekat dilakukan pemisahan menggunakan kromatografi lapis tipis analitik (KLTA) untuk mencari eluen terbaik, eluen terbaik pada KLTA digunakan untuk pemisahan KLT preparatif. Data yang diperoleh dianalisa secara deskriptif dengan memperhatikan pola pemisahan noda. Noda yang diduga senyawa tanin diidentifikasi menggunakan spektrofotometer UV-Vis dan diperkuat dengan penambahan pereaksi geser. Perubahan spektrum yang disebabkan oleh berbagai pereaksi penggeser dianalisis sehingga dapat ditentukan dugaan awal struktur tanin dan golongannya.

## BAB IV

### HASIL DAN PEMBAHASAN

#### 4.1 Preparasi Sampel

Tahapan preparasi sampel daun rumput bambu (*Lophatherum gracile* Brongn) meliputi pencucian sampel, pengeringan dan penyerbukan. Pencucian sampel bertujuan untuk menghilangkan kotoran tanah dan sampah lainnya yang menempel pada sampel. Pengeringan dilakukan dengan cara diangin-anginkan pada suhu ruang, hal ini berfungsi mengurangi kadar air untuk menghindari tumbuhnya mikroba, sehingga sampel tidak mudah busuk dan mempermudah proses ekstraksi serta mencegah perubahan jaringan yang berakibat pada perubahan kadar tanin. Pengeringan sampel pada suhu ruang berfungsi untuk menghindari rusaknya senyawa aktif terutama tanin yang terkandung dalam sampel, sebagaimana Hernawan dan Setyawan (2003) menyatakan bahwa proses pengeringan sebaiknya dilakukan pada suhu kamar atau kurang dari 40 °C, pada suhu lebih dari 40 °C dapat terjadi penurunan kadar dan ekstraktibilitas tanin secara drastis. Tahap selanjutnya yakni penyerbukan sampel yang berfungsi untuk menyeragamkan ukuran sampel dengan ukuran 90 mesh dan memperluas permukaan, sehingga diharapkan proses ekstraksi lebih maksimal karena kontak antara sampel dengan pelarut lebih maksimal.

#### 4.2 Ekstraksi Tanin

Ekstraksi pada penelitian ini menggunakan metode maserasi tanpa pemanasan, berfungsi untuk menghindari kerusakan senyawa tanin dalam sampel karena tanin akan terurai menjadi *pyrogallol*, *pyrocatechol* dan *phloroglucinol* bila dipanaskan sampai suhu 210 °F – 215 °F (98,89 °C – 101,67 °C) (Browning,

1966). Prinsip dari ekstraksi maserasi adalah memisahkan suatu komponen dari campurannya menggunakan pelarut tertentu (Soebagio, 2003). Pelarut akan menembus dinding sel dan masuk dalam rongga sel yang mengandung zat aktif. Zat aktif akan larut, karena adanya perbedaan konsentrasi antara larutan zat aktif di dalam sel dengan yang di luar sel, maka larutan yang terpekat didesak ke luar. Peristiwa tersebut berulang sehingga terjadi keseimbangan konsentrasi antara larutan di luar dan di dalam sel (Baraja, 2008).

Pelarut yang digunakan berupa campuran aseton : air (7:3), Pemilihan pelarut ini bertujuan untuk mendapatkan ekstrak tanin secara maksimal. Struktur senyawa tanin tersusun atas atom-atom yang berbeda, tanin memiliki gugus hidroksi lebih dari satu serta memiliki momen dipol tidak sama dengan nol ( $\mu \neq 0$ ) yang menyebabkan tanin bersifat polar, sehingga harus dilarutkan dengan pelarut yang bersifat polar. Berdasarkan penelitian Ummah (2010) didapatkan kadar tanin lebih banyak menggunakan campuran pelarut aseton : air (7:3) yakni 10,92 %. Tanin dapat membentuk kompleks dengan protein, pelarut aseton bisa meminimalkan interaksi antara tanin dengan protein, dimana protein akan larut dalam aseton sedangkan ekstrak tanin larut dalam fase air, sehingga ekstrak tanin dapat terekstrak dalam air secara maksimal (Sa'adah, 2010). Ekstraksi paling baik menggunakan pelarut aseton: air untuk mencegah hidrolisis ikatan ester dalam tanin (Harborne, 1996).

Maserasi dilakukan dalam waktu 24 jam disertai pengadukan menggunakan *shaker* selama 3 jam dengan kecepatan 1500 rpm. Hal ini bertujuan untuk mendapatkan ekstrak tanin lebih banyak, karena proses ekstraksi berlangsung optimal dengan tersedianya waktu kontak antara sampel dengan

pelarut. Pengadukan bertujuan untuk meratakan konsentrasi larutan di luar serbuk sampel sehingga tetap terjaga adanya derajat perbedaan konsentrasi yang sekecil-kecilnya antara larutan di dalam dan di luar sel (Baraja, 2008).

Ekstraksi dilakukan 3 kali pengulangan untuk mendapatkan ekstrak tanin lebih banyak karena suatu ekstraksi berlangsung optimal jika dilakukan berulang kali. Berdasarkan hukum distribusi ekstraksi, ekstraksi dengan  $n$  kali lebih efektif dari pada ekstraksi tunggal dengan total volume yang sama (Wonorahardjo, 2013). Penambahan asam askorbat 10 mM saat proses maserasi berfungsi sebagai antioksidan untuk mencegah terjadinya oksidasi tanin selama proses ekstraksi, sehingga jika terjadi oksidasi maka yang diharapkan bukan tanin melainkan asam askorbat (Ummah, 2010). Robinson (1995) menyatakan senyawa polifenol seperti tanin sangat peka terhadap oksidasi udara dalam larutan netral atau basa, dianjurkan menambahkan senyawa pereduksi seperti asam askorbat pada ekstrak.

Tahapan selanjutnya yaitu proses penyaringan menggunakan corong *buchner* dengan bantuan pompa vakum bertujuan untuk mempercepat proses penyaringan. Prinsipnya pompa vakum akan memperkecil tekanan dalam erlenmeyer yang secara otomatis akan memperbesar tekanan diluar (sekitar erlenmeyer), sehingga tekanan di luar akan mendorong filtrat masuk ke dalam erlenmeyer. Filtrat yang diperoleh, dipekatkan dengan *rotary evaporator vacuum* pada suhu 50 °C untuk menguapkan pelarut sehingga diperoleh ekstrak pekat. Prinsip kerja *rotary evaporator vacuum* adalah penurunan tekanan sehingga pelarut menguap 5 – 10 °C pada suhu di bawah titik didihnya (Ernawati, 2013). Pelarut yang menguap lebih dahulu di bawah titik didihnya dikarenakan adanya pompa vakum yang berfungsi untuk menurunkan tekanan. Penurunan tekanan

menyebabkan titik didih pelarut menjadi turun sehingga pelarut akan lebih mudah menguap. Pelarut yang terkena panas dari *waterbath* di bawah suhu titik didihnya akan menguap, uap dari pelarut akan terkondensasi menjadi wujud cair yang tertampung dalam labu destilat, sedangkan ekstrak tertampung dalam labu alas bulat (Abraham, 2013 dalam A'ilah, 2015). Proses pemekatan dihentikan ketika ekstrak yang diperoleh cukup pekat dan ditandai dengan berhentinya penetesannya pelarut pada labu alas bulat.

Tabel 4.1 Hasil maserasi daun rumput bambu

No.	Ekstrak	Warna	Berat (gram)	Randemen (%) (b/b)
1.	Hasil maserasi aseton : air (7:3)	Hijau tua	8,63	14,38
2.	Hasil partisi kloroform dan etil asetat	Coklat kehijauan	4,0518	6,753

Keterangan: Maserasi 60 gram serbuk daun rumput bambu dalam 500 mL pelarut aseton : air (7:3)

Senyawa yang terkandung dalam ekstrak kasar diduga bukan hanya senyawa tanin melainkan kumpulan dari senyawa yang memiliki kepolaran yang sama dengan pelarutnya, oleh karena itu ekstrak kasar dipartisi menggunakan variasi pelarut dengan tingkat kepolaran yang berbeda yaitu kloroform dan etil asetat. Pemilihan pelarut ini dimaksudkan agar senyawa-senyawa yang memiliki kepolaran berbeda dapat terekstrak ke dalam pelarut yang sesuai. Penambahan pelarut kloroform berfungsi menghilangkan senyawa yang sifatnya lebih nonpolar seperti terpenoid (Harborne, 1996). Terbentuk 2 lapisan setelah dipartisi menggunakan kloroform, yakni lapisan atas dan bawah. Lapisan atas berupa fasa air dan lapisan bawah berupa fasa kloroform. Lapisan air berada pada bagian bawah karena air memiliki massa jenis lebih rendah dari massa jenis kloroform yaitu  $1 < 1,483$ .

Senyawa tanin larut dalam fasa air yang ditunjukkan dengan adanya perubahan warna dari coklat kehijauan menjadi biru kehitaman setelah ditambahkan  $\text{FeCl}_3$  1 %, oleh karena itu fasa air dipartisi lagi menggunakan pelarut etil asetat untuk menghilangkan senyawa yang sifat kepolarannya sesuai dengan etil asetat. Hasil partisi dengan etil asetat didapatkan 2 lapisan, yakni lapisan atas berupa fasa etil asetat dan lapisan bawah berupa fasa air. Tanin terkandung dalam fasa air karena memiliki kepolaran yang sesuai, sehingga fasa air dipisahkan menggunakan *vacuum rotary evaporator* untuk menghilangkan pelarutnya dan diperoleh ekstrak tanin. Selanjutnya dilakukan pemisahan dan uji aktivitas antioksidan ekstrak tanin.

#### **4.3 Uji Fitokimia Tanin dengan Reagen**

Uji fitokimia merupakan uji kualitatif untuk mengetahui kandungan senyawa dalam sampel. Prinsipnya adalah reaksi pengujian warna (*spot test*) dengan suatu pereaksi warna (Kristanti, dkk., 2008). Uji fitokimia yang dilakukan pada penelitian ini adalah uji fitokimia khusus untuk senyawa tanin, fungsinya untuk mengetahui ada tidaknya kandungan tanin dalam sampel menggunakan larutan  $\text{FeCl}_3$  1 % dan larutan gelatin, kemudian dilanjutkan uji fitokimia penentuan jenis golongan senyawa tanin yakni tanin katekol atau tanin terkondensasi dan tanin galat atau tanin terhidrolisis. Pengujian golongan tanin dilakukan menggunakan larutan formaldehid 3 % dan asam klorida (HCl) untuk uji tanin terkondensasi atau katekol serta Na-asetat dan larutan  $\text{FeCl}_3$  1 % untuk uji tanin terhidrolisis atau galat. Data hasil uji fitokimia senyawa tanin dapat dilihat dalam Tabel 4.2.

Tabel 4.2 Hasil uji fitokimia tanin

No.	Reagen	Filtrat maserasi	Sampel			Keterangan Senyawa	Keterangan hasil positif
			Fase air	Fase kloroform	Fase etil asetat		
1.	FeCl <sub>3</sub> 1 % (orange)	+++	+++	-	-	(+) dan (-) Tanin	Biru tinta
2.	Gelatin (bening)	-	-	-	-	(-) Tanin	Endapan koloidal
3.	Formaldehid 3 % (bening) :	+	+	-	-	(+) dan (-) Katekin	Coklat kekuningan
	HCl (bening) (3:1)	-	-	-	-	(-) Tanin katekol	Merah
	Na-asetat (padatan putih) + FeCl <sub>3</sub> 1 % (orange)	+++	+++	-	-	(+) dan (-) Tanin galat	Hitam kebiruan

Keterangan +++ = Mengandung senyawa lebih banyak (warna sangat pekat)

++ = Mengandung senyawa lebih (warna cukup pekat)

+ = Mengandung senyawa (berwarna)

- = Tidak mengandung senyawa (tidak terbentuk warna)

#### 4.3.1 Uji Fitokimia Tanin Menggunakan FeCl<sub>3</sub> 1 %

Uji fitokimia tanin pada penelitian ini menggunakan logam transisi Fe. Logam Fe merupakan salah satu logam yang sering digunakan untuk reaksi kompleksasi karena kemudahannya membentuk senyawa kompleks. Hal ini disebabkan karena delokalisasi elektron yang memungkinkan pada orbital s dan d. Senyawa transisi stabil dan lebih mudah membentuk kompleks dari pada senyawa golongan utama karena titik leleh dan entalpi molar penggabungan logam-logam transisi lebih tinggi dari pada unsur golongan utama (Rosyda dan Ersam, 2009).

Tabel 4.2 menunjukkan senyawa tanin terkandung dalam filtrat hasil maserasi aseton : air (7:3) dan fase air setelah dipartisi dengan pelarut kloroform dan etil asetat. Tanin sebagai golongan senyawa polifenol yang sifatnya polar dapat larut dalam gliserol, alkohol dan hidoalkoholik, air dan aseton, tetapi tidak larut dalam kloroform, petroleum eter dan benzene (Artati dan Fadilah, 2007).

Perubahan warna pada sampel setelah ditambahkan dengan  $\text{FeCl}_3$  menunjukkan adanya senyawa fenolik yang teroksidasi. Senyawa fenolik dalam sampel diperkirakan adalah senyawa tanin, hal ini ditunjukkan dengan perubahan warna filtrat dari coklat kehijauan menjadi biru tinta. Sebagaimana Sa'adah (2010) menyatakan bahwa terbentuknya warna hijau kehitaman atau biru tinta pada sampel setelah ditambahkan larutan  $\text{FeCl}_3$  karena terbentuknya senyawa kompleks antara tanin dengan ion  $\text{Fe}^{3+}$ . Adanya kandungan tanin dalam ekstrak daun rumput bambu didukung oleh Purwitasari (2014) yang melaporkan keberadaan 3 senyawa dalam daun rumput bambu (*Lophatherum gracile* Brongn) diantaranya tanin, alkaloid dan triterpenoid.

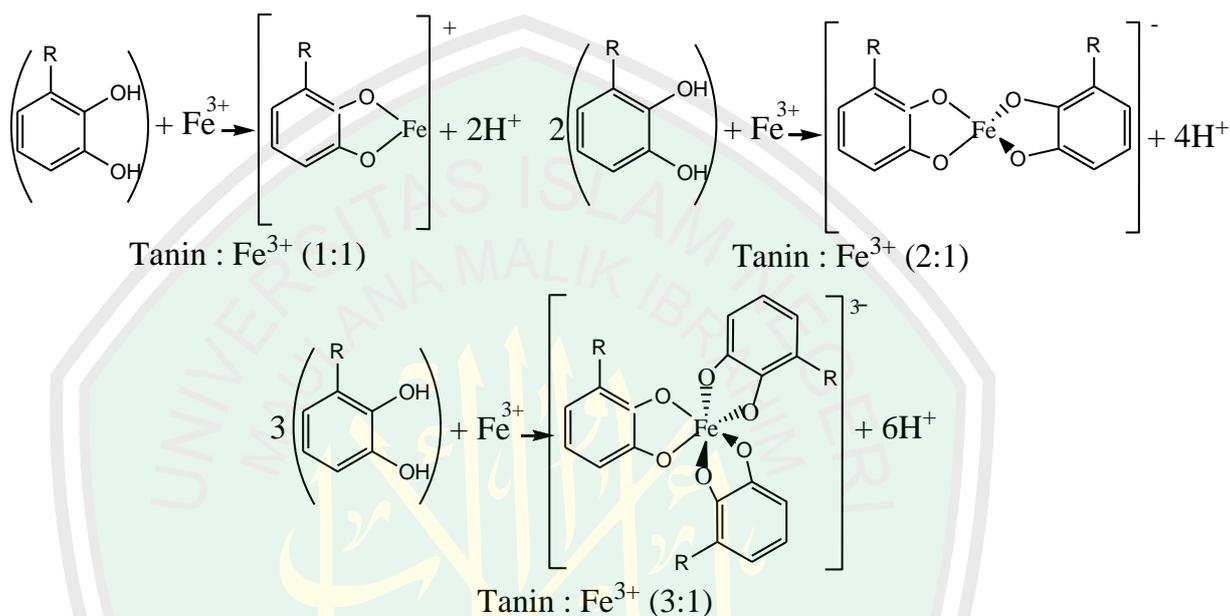
Ion logam pusat  $\text{Fe}^{3+}$  cenderung stabil dengan bilangan koordinasi 6 (oktahedral), oleh karena itu memungkinkan senyawa polifenol seperti tanin katekol mengikat besi dalam perbandingan 3 : 1 (1 atom Fe mengikat 3 ligan bidentat tanin katekol). Variasi stoikiometri senyawa polifenol dipengaruhi oleh pH disajikan dalam Tabel 4.3 (Perronn dan Brumaghim, 2009).

Tabel 4.3 Variasi stoikiometri tanin yang dipengaruhi oleh pH (Perronn dan Brumaghim, 2009)

No.	pH $\text{FeCl}_3$ + Sampel	Perbandingan Ligan : $\text{FeCl}_3$	Ion logam	Warna	$\lambda$ Maksimal
1.	7,2	3:1/2:1	$\text{Fe}^{3+}$	-	-
2.	5-6,5	3:1/2:1 (galat) atau 2:1 (katekol)	$\text{Fe}^{3+}$	Biru-ungu	Galat ( $\lambda$ 542 – 561) Katekol ( $\lambda$ 561 – 586)
3.	<4	1:1	$\text{Fe}^{3+}$	Biru-hijau	$\lambda$ 670 nm

Berdasarkan Tabel 4.3 menunjukkan perbandingan 3 : 1 ini adalah 1 atom Fe mengikat 3 ligan bidentat tanin katekol, sedangkan perbandingan 2 : 1 adalah 1 atom Fe mengikat 2 ligan bidentat tanin katekol. Pada perbandingan 1 : 1 atom Fe mengikat 1 ligan bidentat tanin katekol (Perronn dan Brumaghim, 2009).

Harborne (1996) menyatakan bahwa cara klasik untuk mendeteksi fenol sederhana ialah dengan menambahkan larutan besi (III) klorida 1 % dalam air atau etanol kedalam larutan cuplikan, yang menimbulkan warna hijau, merah, ungu, biru, atau hitam yang kuat.



Gambar 4.1 Kompleks besi-polifenol (Tanin)  
(Perronn dan Brumaghim, 2009)

Gambar 4.1 menunjukkan bahwa terjadi ikatan kovalen koordinasi pada senyawa kompleks antara ion atau atom Fe dengan 6 atom O dari senyawa tanin (senyawa fenolik). Secara umum senyawa yang pembentukannya melibatkan pembentukan ikatan kovalen koordinasi dianggap sebagai senyawa koordinasi, senyawa koordinasi merupakan senyawa yang melibatkan pembentukan ikatan kovalen koordinasi antara ion logam atau atom logam dengan atom nonlogam.

Atom Fe merupakan atom logam, sedangkan atom O dari senyawa tanin merupakan atom nonlogam. atom Fe adalah atom pusat dari senyawa kompleks tersebut yang menerima donor elektron, sedangkan atom O merupakan atom

donor yang memberikan elektron pada atom pusat Fe. Atom donor terdapat pada suatu ion atau molekul netral. Ion dan molekul netral yang memiliki atom-atom donor yang dikoordinasikan pada atom pusat disebut dengan ligan. Ligan O dari senyawa tanin memiliki pasangan elektron bebas (PEB). Atom O tersebut bertindak sebagai basa lewis yang mendonorkan PEB pada atom pusat Fe.  $\text{Fe}^{3+}$  dalam pembentukan senyawa kompleks akan terhibridisasi membentuk hibridisasi  $d^2sp^3$ , sehingga akan terisi oleh 6 pasang elektron bebas atom O (Effendy, 2007). Kestabilan dapat tercapai jika tolakan antara ligan pada 3 tanin minimal. Hal ini terjadi jika 3 tanin tersebut posisinya dijauhkan (Purwitasari, 2014).

Ion  $\text{Fe}^{3+}$  memiliki elektron valensi lebih kecil dari pada  $\text{Fe}^{2+}$  yakni  $3d^5 4s^0 < 3d^6 4s^0$  yang bertindak sebagai asam (kation), sedangkan gugus  $\text{OH}^-$  pada tanin bersifat basa (anion). Semakin sedikit jumlah elektronnya maka ukuran atomnya semakin kecil, semakin kecil ukuran suatu atom maka sifatnya semakin keras (sifat asam atau basanya) karena semakin kuat tarikan antara inti dengan awan elektron. Ketika membentuk ikatan kompleks dengan suatu basa, ion  $\text{Fe}^{3+}$  akan lebih cenderung berikatan dengan basa keras seperti atom O pada tanin. Hal ini sesuai dengan aturan Pearson yang berbunyi bahwa ion logam jenis A, yaitu asam yang bersifat keras menyukai ligan (basa) yang keras juga, sebaliknya ion logam jenis B yang bersifat lunak akan menyukai ligan yang bersifat lunak pula (Mukharromah, 2015).

Pernyataan tersebut menunjukkan bahwa ligan O dari senyawa tanin cenderung lebih stabil ketika membentuk kompleks dengan ion  $\text{Fe}^{3+}$  dari pada ion  $\text{Fe}^{2+}$ , sebab ion  $\text{Fe}^{3+}$  memiliki sifat asam yang lebih keras dibandingkan dengan ion  $\text{Fe}^{2+}$ .

### 4.3.2 Uji Fitokimia Tanin Menggunakan Larutan Gelatin

Uji fitokimia menggunakan larutan gelatin berfungsi untuk memperkuat dugaan awal adanya tanin dalam sampel daun rumput bambu (*Lophatherum gracile* Brongn). Tanin merupakan himpunan polihidroksi fenol yang dapat dibedakan dengan senyawa fenol lainnya karena sifat tanin dapat mengendapkan protein. Protein yang digunakan pada penelitian ini berupa larutan gelatin. Gelatin adalah protein yang dapat larut dalam air dan dapat dicernakan, berasal dari kolagen yang telah dipanaskan dalam air mendidih oleh larutan asam atau basa encer, terdiri atas 25 % glisin dan 25 % prolin serta hidroksi prolin (Poedjaji dan Titin, 1994).

Robinson (1995) menyatakan larutan tanin dalam air menimbulkan endapan jika ditambahkan dengan gelatin. Berdasarkan Tabel 4.2 tidak menunjukkan adanya endapan pada sampel, melainkan terbentuk koloid. Hal ini dimungkinkan karena sifat gelatin yang mudah rusak pada penyimpanan yang lama, sehingga hasil uji fitokimia tanin menggunakan gelatin kurang maksimal.

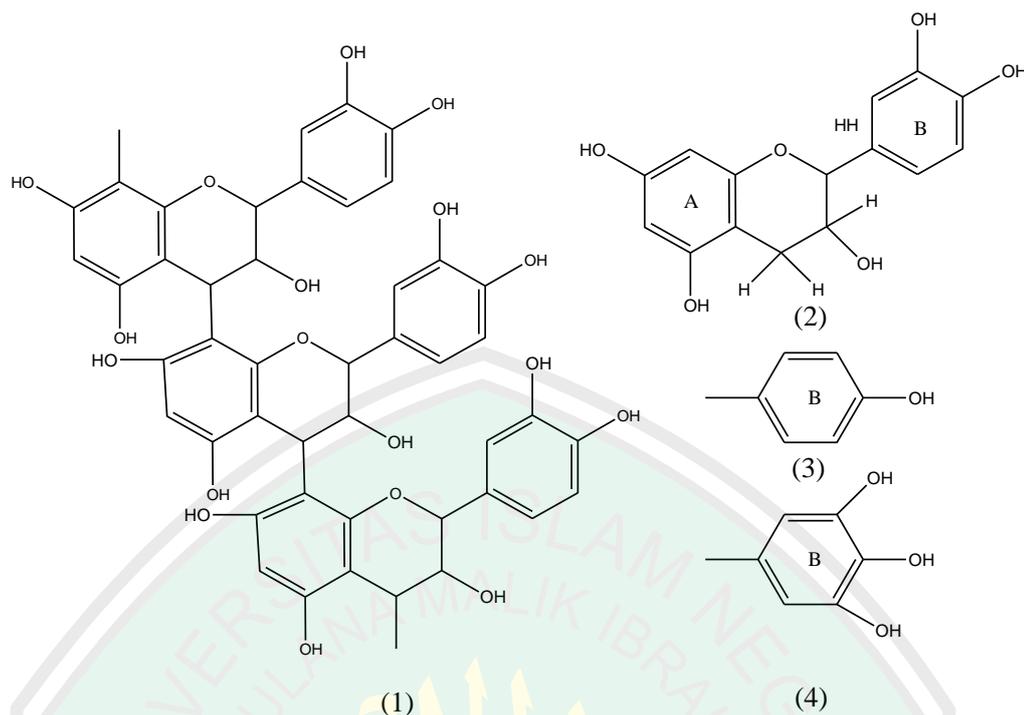
### 4.3.3 Uji Fitokimia Tanin Katekol dan Galat

Pengujian tanin dilanjutkan untuk mengetahui jenis golongannya. Secara kimia terdapat dua jenis golongan tanin yaitu tanin terkondensasi atau katekol dan tanin terhidrolisis atau tanin galat. Penambahan formaldehid 3 % : HCl pekat (3:1) dengan pemanasan pada sampel digunakan untuk mengetahui kandungan tanin katekol, adanya endapan merah menunjukkan bahwa dalam sampel positif mengandung tanin katekol atau proantosianidin, sedangkan warna coklat menunjukkan adanya katekin. Tanin adalah senyawa fenol yang dapat berkondensasi dengan formaldehid. Nama lain tanin terkondensasi ialah

proantosianidin, karena bila direaksikan dengan asam panas, beberapa ikatan karbon-karbon penghubung satuan terputus dan dibebaskanlah monomer antosianidin.

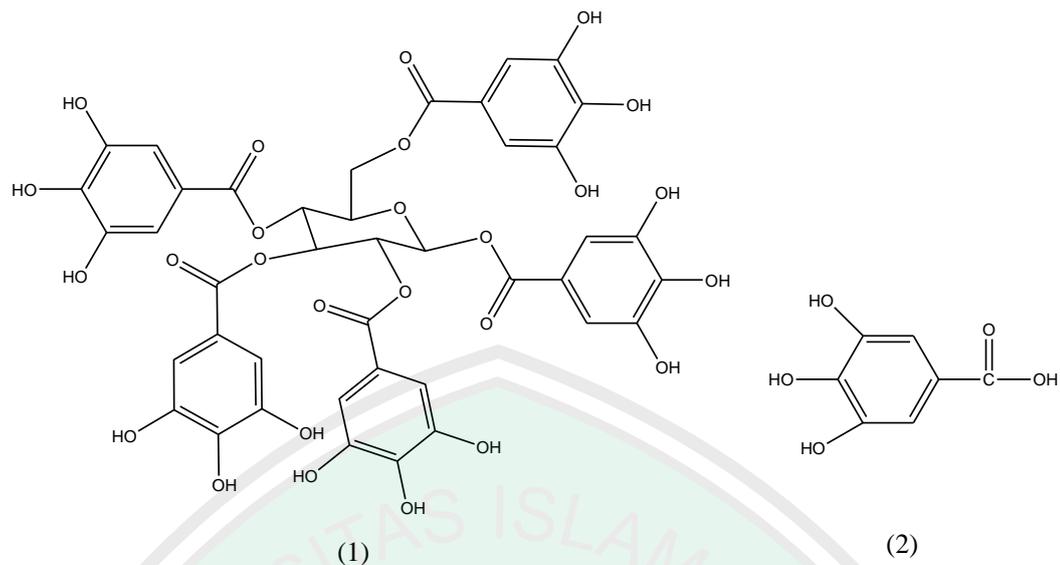
Penambahan HCl panas pada sampel tumbuhan digunakan untuk mendeteksi katekin dan leukoantosianidin, terbentuknya warna coklat kuning menunjukkan adanya katekin sedangkan timbulnya warna merah menunjukkan adanya leukoantosianidin (Harborne, 1996; Robinson, 1995). Uji fitokimia tanin galat atau tanin terhidrolisis dilakukan dengan menambahkan natrium asetat hingga jenuh kemudian ditambahkan  $\text{FeCl}_3$  1 % dalam sampel, terbentuknya warna biru tinta atau hitam menunjukkan adanya tanin galat (Sa'adah, 2010; Ummah, 2010).

Berdasarkan hasil penelitian yang ditunjukkan pada Tabel 4.2 tidak menunjukkan adanya proantosianidin, karena setelah penambahan formaldehid 3 %: HCl pekat (3:1) dengan pemanasan tidak membentuk endapan merah, melainkan terbentuk warna coklat kekuningan pada filtrat maserasi dan fase air setelah dipartisi. Terbentuknya warna sampel menjadi coklat kekuningan setelah penambahan HCl panas diduga adanya senyawa katekin dalam sampel tersebut. Tanin terkondensasi atau flavolan secara biosintesis dapat dianggap terbentuk dengan cara kondensasi katekin tunggal atau galokatekin yang membentuk senyawa dimer dan kemudian oligomer yang lebih tinggi. Katekin terbagi menjadi tiga jenis diantaranya katekin, afzelekin dan galokatekin. Perbedaannya hanya pada jumlah gugus hidroksi pada cincin B. Senyawa ini mempunyai 2 atom karbon kiral. Struktur proantosianidin, katekin, afzelekin dan galokatekin dapat dilihat pada Gambar 4.2.



Gambar 4.2 Proantosianidin atau flavolan (1), catekin (2), afzelekin (3) dan galokatekin (4) (Harborne, 1996; Robinson, 1995)

Filtrat hasil uji tanin katekol ditambahkan natrium asetat hingga jenuh, kemudian ditambahkan dengan  $\text{FeCl}_3$  1 % menghasilkan warna hitam kebiruan. Terbentuknya warna tersebut menunjukkan adanya dugaan tanin galat atau tanin terhidrolisis dalam sampel daun rumput bambu. Tanin terhidrolisis terbagi menjadi 2 jenis diantaranya gallotanin dan ellgitanin. Kandungan tanin terhidrolisis yang dimaksud dalam penelitian ini adalah jenis gallotanin, karena menurut Manitto (1981) gallotanin memberikan warna biru kehitaman jika ditambahkan  $\text{FeCl}_3$  1 % dan larut dalam air. Robinson (1995) juga menyatakan reaksi sampel dengan larutan besi (III) klorida membentuk warna hitam-biru membuktikan adanya 3,4,5-trihidroksifenol. Gallotanin jika dihidrolisis menghasilkan asam galat dan glukosa. Struktur gallotanin dan asam galat tertera dalam Gambar 4.3.



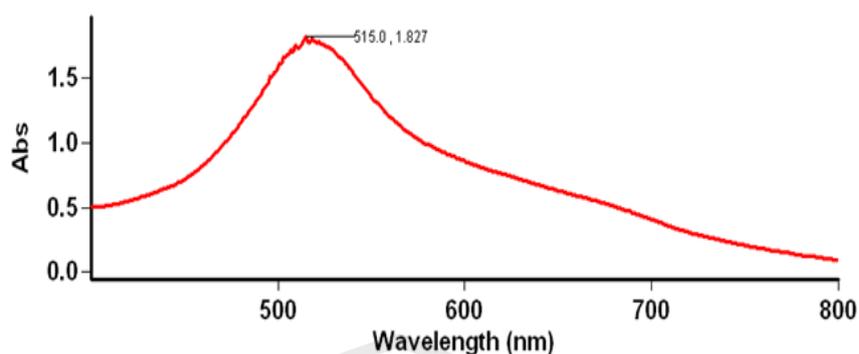
Gambar 4.3 Struktur gallotanin (1) dan asam galat (2) (Robinson, 1995)

Berdasarkan Gambar 4.3 menunjukkan struktur gallotanin merupakan pentagalatol glukosa yang memiliki lima ikatan ester yang mengandung gugus alifatik hidroksi dengan glukosa sebagai inti. Gallotanin merupakan ester dari asam galat (asam karboksilat). Jika dilihat dari strukturnya, asam galat memiliki tiga gugus hidroksi dengan posisi 3,4,5 pada atom C benzen. Semakin banyak gugus hidroksi maka semakin tinggi sifat kepolarannya yang disebabkan oleh adanya ikatan hidrogen intramolekul.

#### 4.4 Uji Aktivitas Antioksidan Ekstrak Tanin dengan Metode DPPH

##### 4.4.1 Penentuan Panjang Gelombang Maksimum

Pengukuran panjang gelombang maksimum bertujuan untuk mengetahui panjang gelombang yang memiliki serapan tertinggi. Pengukuran sampel harus dilakukan pada panjang gelombang maksimum agar kepekaannya lebih maksimal karena pada panjang gelombang maksimal tersebut, perubahan absorbansi untuk setiap satuan konsentrasi adalah yang paling besar, selain itu juga meminimalkan kesalahan (Gandjar dan Rohman, 2007).



Gambar 4.4 Spektra larutan DPPH 0,2 mM

Berdasarkan Gambar 4.4 menunjukkan bahwa panjang gelombang maksimal DPPH 0,2 mM adalah 515,0 nm. Sofiandari (2015) juga melakukan pengukuran antioksidan terhadap senyawaan oryzanol dalam bekatul, dan didapatkan panjang gelombang maksimal larutan DPPH 0,2 mM dengan nilai yang sama.

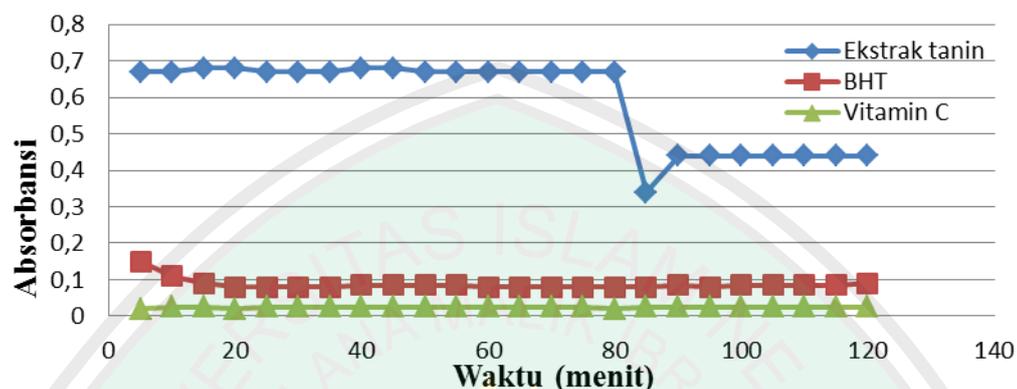
#### 4.4.2 Penentuan Waktu Kestabilan Pengukuran Antioksidan

Penentuan waktu kestabilan berfungsi untuk mengetahui waktu yang dibutuhkan sampel untuk mereduksi radikal DPPH dengan sempurna dan memiliki absorbansi yang stabil. Waktu kestabilan ditentukan dengan mengukur hubungan antara waktu pengukuran dengan absorbansi larutan. Absorbansi senyawa yang berwarna meningkat sampai waktu tertentu hingga diperoleh absorbansi yang stabil. Semakin lama ada kemungkinan senyawa rusak dan terurai sehingga intensitas warnanya menurun, akibatnya absorbansinya juga turun (Gandjar dan Rohman, 2007).

Ekstrak tanin, pembanding BHT dan vitamin C pada konsentrasi 100 ppm diukur waktu kestabilannya dalam rentang waktu 5 – 120 menit dengan interval 5 menit. Pengukuran waktu kestabilan sampel dan pembanding dapat dilihat pada Tabel 4.4 dan Gambar 4.5 sebagaimana yang ditunjukkan pada Lampiran 5.

Tabel 4.4 Waktu kestabilan sampel dan pembanding

No.	Sampel	Waktu kestabilan (Menit)
1.	Ekstrak tanin	50 – 80
2.	BHT	60 – 85
3.	Asam askorbat	25 – 75



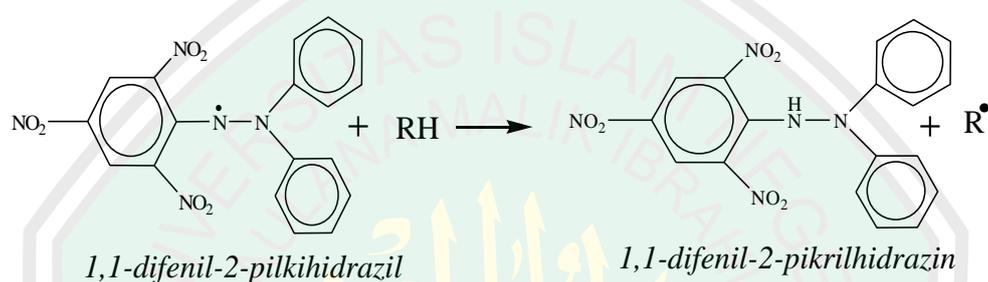
Gambar 4.5 Grafik pengukuran waktu kestabilan sampel dan pembanding

Masing-masing sampel diinkubasi pada suhu 37 °C selama pengukuran waktu kestabilan, karena suhu ini merupakan suhu yang telah terkondisikan sehingga reaksi antara radikal DPPH dengan senyawa metabolit sekunder akan berlangsung lebih cepat dan optimal. Hal ini ditunjukkan dengan nilai absorbansi yang diperoleh stabil. Bariyyah (2013) membandingkan pengukuran waktu kestabilan DPPH dari sampel yang diinkubasi suhu 37 °C dan suhu ruang, didapatkan absorbansi stabil pada suhu 37 °C. Berdasarkan Gambar 4.5 menunjukkan masing-masing sampel memiliki absorbansi yang stabil dalam rentang waktu yang telah disebutkan pada Tabel 4.4, sehingga uji aktivitas antioksidan selanjutnya diukur dalam waktu kestabilannya.

#### 4.4.3 Uji Aktivitas Antioksidan

Pengujian aktivitas antioksidan pada sampel dilakukan pada panjang gelombang 515 nm selama waktu kestabilan sebagaimana Tabel 4.4. Sampel yang diuji aktivitas antioksidannya adalah ekstrak tanin. BHT dan Vitamin C digunakan

sebagai pembanding antioksidan sampel. Penentuan aktivitas antioksidan menggunakan metode DPPH (*1,1-difenil-2-pikrihidrazil*). DPPH berperan sebagai radikal bebas akan bereaksi dengan antioksidan membentuk DPPH-H (*1,1-difenil-2-pikrilhidrazilin*). Antioksidan akan mendonorkan atom hidrogennya kepada radikal DPPH untuk melengkapi kekurangan elektron dan membentuk radikal antioksidan yang lebih stabil.



Gambar 4.6 Reduksi DPPH oleh senyawa peredam radikal bebas (Prakash, *et al.*, 2001)

Larutan kontrol digunakan pada pengukuran aktivitas antioksidan berfungsi untuk mengetahui absorbansi radikal DPPH (*1,1-difenil-2-pikrilhidrazilin*) sebelum direduksi oleh sampel. Selisih antara absorbansi DPPH (*1,1-difenil-2-pikrilhidrazilin*) yang telah direduksi sampel dan absorbansi kontrol merupakan sisa radikal DPPH yang terbaca pada spektrofotometer UV-Vis. Semakin besar selisihnya maka semakin besar efektivitas antioksidan sampel. Persentase aktivitas antioksidan dalam berbagai konsentrasi dapat dilihat pada Tabel 4.5.

Tabel 4.5 Hasil persentase aktivitas antioksidan

No.	Konsentrasi sampel (ppm)	% Aktivitas antioksidan		
		Ekstrak tanin	BHT	Vitamin C
1.	10	09,12	51,90	95,44
2.	25	23,62	76,17	97,85
3.	50	44,45	86,19	97,86
4.	100	77,70	87,29	97,62

Semakin besar persentase aktivitas antioksidan maka semakin berpotensi sebagai antioksidan. Data pada Tabel 4.5 menunjukkan persentase aktivitas antioksidan tertinggi adalah vitamin C diikuti BHT, kemudian ekstrak tanin. Konsentrasi 100 ppm merupakan konsentrasi maksimum ekstrak tanin dan BHT dalam meredam radikal bebas DPPH, karena pada konsentrasi tersebut ekstrak tanin dan BHT memiliki nilai persen aktivitas antioksidan tertinggi yakni 77,70 % dan 87,29 %. Nilai persen aktivitas antioksidan vitamin C tidak mengalami perubahan yang signifikan dengan naiknya konsentrasi, hal ini disebabkan oleh sifatnya yang sangat stabil.

Berdasarkan Tabel 4.5 persen aktivitas antioksidan mengalami kenaikan dengan semakin naiknya konsentrasi ekstrak tanin, hal ini dikarenakan semakin tinggi konsentrasinya maka semakin banyak senyawa tanin yang mendonorkan atom H pada radikal DPPH dan membentuk senyawa DPPH-H yang stabil. Semakin banyak senyawa DPPH yang terstabilkan oleh tanin maka semakin rendah intensitas warnanya atau memudar sehingga nilai absorbansinya juga semakin kecil, jika absorbansi sampel rendah maka nilai persen aktivitas antioksidannya semakin tinggi.

Secara kualitatif efektivitas antioksidan sampel dapat dilihat dari perubahan warnanya dari ungu menjadi kuning. Hasil penelitian menunjukkan perubahan warna dari ungu menjadi kuning muda pada ekstrak tanin, BHT dan vitamin C. Radikal DPPH memiliki warna ungu dan berubah menjadi kuning setelah radikal DPPH berpasangan dengan atom H dari sampel uji. Ekstrak tanin mengalami pengurangan intensitas warna maksimal menjadi kuning muda pada konsentrasi 100 ppm, sedangkan BHT pada konsentrasi 100 ppm, untuk senyawa

asam askorbat atau vitamin C mengalami pengurangan intensitas warna secara maksimal mulai dari 10 ppm hingga 100 ppm. Pengurangan intensitas warna mengindikasikan peningkatan kemampuan antioksidan dalam menangkap radikal bebas (Prakash, *et al.*, 2001). Perubahan warna yang terjadi pada ekstrak tanin, BHT dan vitamin C menunjukkan tingginya kemampuan ketiga antioksidan tersebut dalam menangkap radikal bebas DPPH.

Hasil persen aktivitas antioksidan dapat digunakan untuk mengetahui potensi antioksidan dalam sampel yang ditunjukkan dengan nilai  $EC_{50}$  (*Efficient concentration 50 Value*).  $EC_{50}$  merupakan parameter yang menunjukkan konsentrasi ekstrak uji yang mampu menangkap radikal bebas DPPH sebanyak 50%. Semakin kecil nilai  $EC_{50}$ , maka aktivitas antioksidannya semakin tinggi (Molyneux, 2004). Nilai  $EC_{50}$  diperoleh dengan mengolah data persen aktivitas antioksidan dan dianalisis menggunakan persamaan regresi non linear “*GraphPad prism5 software, Regression for analyzing dose-response data*”.

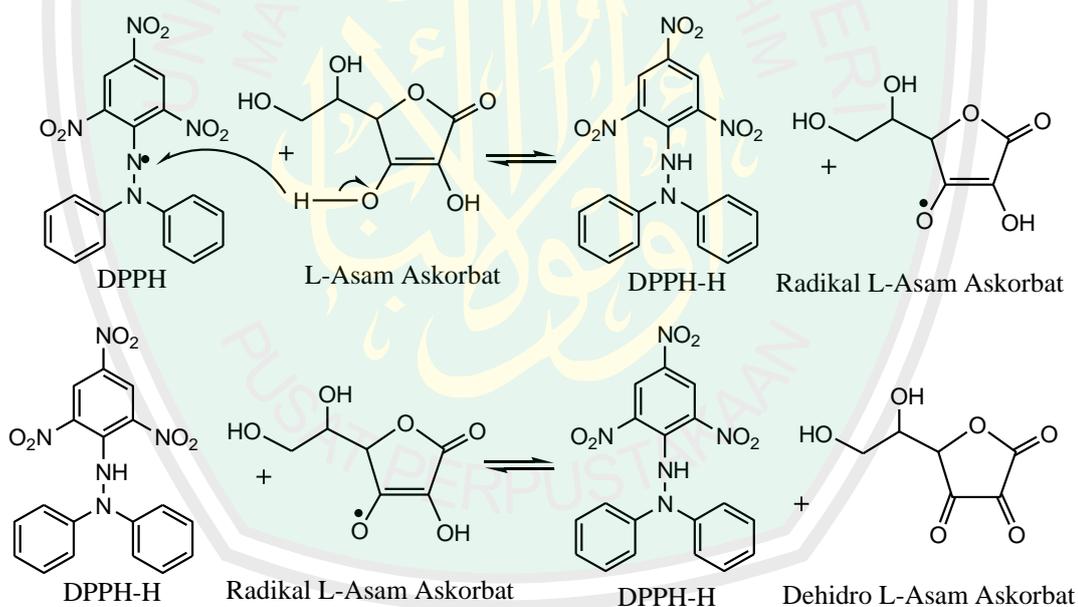
Tabel 4.6 Nilai  $EC_{50}$  sampel dan perbandingan

No.	Sampel	Nilai $EC_{50}$ (mg/L)
1.	Ekstrak tanin	51,56
2.	BHT	8,713
3.	Vitamin C	0,003

Semakin kecil nilai  $EC_{50}$  menandakan semakin besar efektivitas antioksidan sehingga konsentrasi yang dibutuhkan untuk meredam radikal DPPH sebesar 50% semakin kecil. Vitamin C merupakan antioksidan alami sedangkan BHT adalah antioksidan sintetik. Berdasarkan nilai  $EC_{50}$  dari Tabel 4.6 menunjukkan bahwa BHT dan vitamin C memiliki aktivitas antioksidan sangat kuat ( $EC_{50} < 50$  mg/L) dengan nilai  $EC_{50}$  8,713 mg/L dan 0,003 mg/L, sedangkan

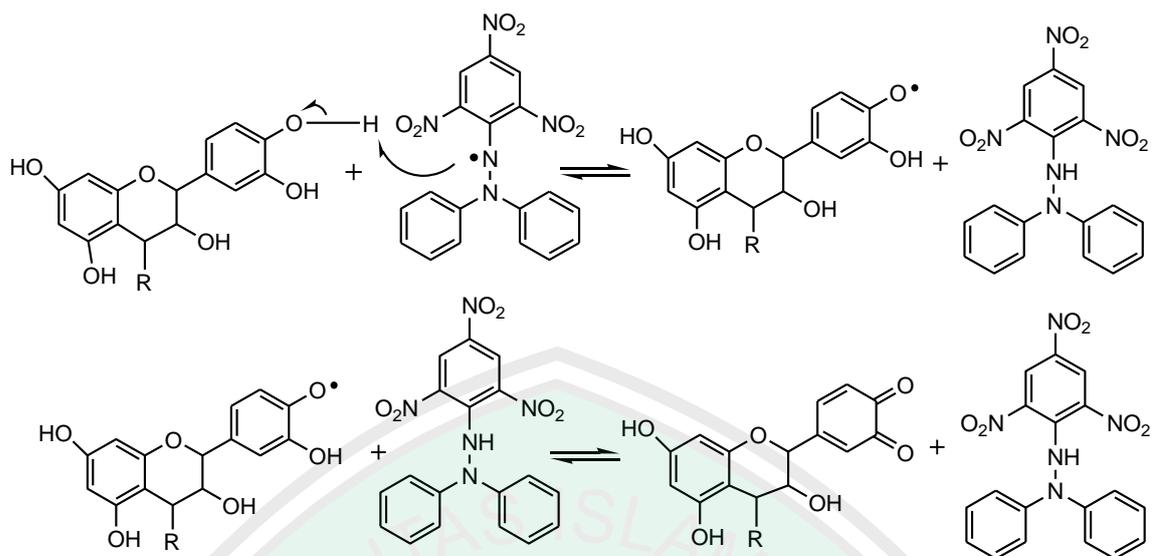
aktivitas antioksidan ekstrak tanin termasuk dalam kategori kuat karena nilai  $EC_{50}$  nya berada dalam rentang 50 – 100 mg/L (ppm) yakni 51,56. Kekuatan antioksidan BHT dan vitamin C didukung oleh hasil penelitian Rizkia (2014) yang melakukan pengujian efektivitas antioksidan BHT dan vitamin C, didapatkan nilai efektivitas antioksidan sangat kuat ( $EC_{50} < 50$  mg/L) dengan nilai  $EC_{50}$  sebesar 14,10 mg/L dan 4,58 mg/L.

Kekuatan aktivitas antioksidan vitamin C lebih besar dari pada BHT karena struktur vitamin C yang lebih stabil dan mampu mendonorkan dua atom hidrogen kepada radikal DPPH dan membentuk radikal L-askorbil yang stabil sedangkan BHT mendonorkan satu atom hidrogen.



Gambar 4.7 Reaksi DPPH dengan asam askorbat (Nishizawa, dkk., 2005)

Radikal dari senyawa tanin, BHT dan vitamin C merupakan radikal yang stabil karena memiliki bentuk siklik dengan ikatan rangkap sehingga dapat mendelokalisasikan elektronnya. Mekanisme reaksi antara DPPH dengan senyawa tanin dapat diilustrasikan sebagaimana mekanisme reaksi antara DPPH dengan vitamin C.



Gambar 4.8 Dugaan reaksi tanin dengan DPPH  
 Gambar diilustrasikan dari reaksi DPPH dengan asam askorbat

Ekstrak tanin memiliki aktifitas antioksidan yang kuat karena dipengaruhi oleh kestabilan strukturnya, sebagaimana pada Gambar 4.14 menunjukkan ketiga isolat merupakan golongan flavonol yang memiliki gugus hidroksi (OH) lebih dari satu. Tanin termasuk dalam golongan flavonoid yang merupakan senyawa pereduksi yang baik dan menghambat banyak reaksi oksidasi. Adanya senyawa flavonoid dalam ekstrak senyawa flavonoid diperkuat dari pengujian kualitatif secara fitokimia reagen. Hasil pengujian fitokimia ekstrak senyawa flavonoid menunjukkan perubahan warna kuning yang tajam disertai timbulnya gelembung. Tanin mendonorkan atom H sebagai peredam radikal DPPH, sehingga terjadi penstabilan radikal tanin dengan adanya resonansi sebagaimana ilustrasi reaksi DPPH dengan tanin yang ditunjukkan pada Gambar 4.8. Kestabilan struktur tanin juga disebabkan oleh kedudukan gugus hidroksi pada posisi orto, yakni gugus OH yang terikat pada C nomor 3' dan 4' dalam cincin B. Struktur ortohidroksil meningkatkan aktifitas antioksidatif tanin (Yokozawa, *et al.*, 1998 dalam Hernawan dan Setyawan, 2003).

#### 4.5 Pemisahan Senyawa Tanin dengan Kromatografi Lapis Tipis

Kromatografi lapis tipis adalah metode pemisahan suatu senyawa berdasarkan perbedaan distribusi dua fasa, yaitu fasa diam berupa adsorben dan fasa gerak berupa eluen. Adsorben kromatografi lapis tipis yang digunakan pada penelitian ini terbuat dari silika gel G60 F<sub>254</sub> (Merck) dengan ukuran 1 x 10 cm untuk kromatografi lapis tipis analitik (KLTA) dan 10 x 20 cm untuk kromatografi lapis tipis preparatif (KLTP). Penggunaan bahan silica karena pada umumnya silica digunakan untuk memisahkan senyawa asam-asam amino, fenol, alkaloid, asam lemak, sterol dan terpenoid. Plat KLT silica G60 F<sub>254</sub> diaktifasi pada suhu 100 °C selama 30 menit untuk menghilangkan air yang terdapat pada plat KLT.

Plat silika diamati di bawah sinar UV pada panjang gelombang 254 nm dan 366 nm, sebelum dan sesudah penyemprotan dengan pereaksi FeCl<sub>3</sub> 1 %. Timbulnya warna pada plat disebabkan karena adanya interaksi antara sinar UV dengan gugus kromofor pada noda. Kromofor adalah senyawa organik yang memiliki ikatan rangkap terkonjugasi yang dapat menyerap warna, sedangkan auksokrom adalah gugus fungsional yang memiliki elektron bebas yang apabila terikat pada kromofor menyebabkan terjadinya pergeseran panjang gelombang. Fluorosensi cahaya yang nampak merupakan emisi cahaya yang dipancarkan oleh komponen tersebut ketika elektron tereksitasi dari tingkat energi dasar ke tingkat energi yang lebih tinggi kemudian kembali ke keadaan semula dengan melepaskan energi (Gandjar dan Rohman, 2007; Purwitasari, 2014). Pemisahan dengan menggunakan KLT menghasilkan nilai R<sub>f</sub> (*retardation factor*), merupakan nilai antara 0 – 1 yang menunjukkan kecepatan elusi dari suatu

senyawa dalam spot/noda. Nilai Rf dihitung dengan membagi jarak titik tengah noda dari titik awal dengan jarak tempuh eluen. Nilai Rf berbeda-beda terkait dengan sifat eluen yang digunakan dan senyawa yang dipisahkan.

#### 4.5.1 Pemisahan Senyawa Tanin dengan KLTA

Pemisahan pada KLTA digunakan untuk mencari eluen terbaik dari beberapa eluen yang baik dalam pemisahan senyawa tanin. Eluen yang baik adalah eluen yang dapat memisahkan senyawa dalam bentuk noda dengan jumlah yang banyak. Noda yang terbentuk tidak berekor dan jarak antara noda satu dengan yang lainnya jelas. Pemilihan eluen terbaik diharapkan mampu memisahkan komponen tanin yang terkandung dalam daun rumput bambu dengan baik. Pemisahan tanin menggunakan beberapa variasi eluen terbaik dari berbagai penelitian yang sudah dilakukan sebelumnya, diantaranya asam asetat glasial : H<sub>2</sub>O : HCl pekat (forestal) (30:10:3) (Nuraini, 2002), n-butanol : asam asetat : air (BAA) (2:0,5:1,1) (Nahari, 2015), n-butanol : asam asetat : air (4:1:5) (Ummah, 2010); n-heksana : etil asetat (6:4) (Mangunwardoyo, dkk., 2009) dan kloroform: metanol: air (7:3:0,4).

Penjenuhan dilakukan dengan menutup rapat masing-masing bejana yang terisi 5 mL eluen diatas. Penjenuhan berfungsi untuk mempermudah proses elusi dengan adanya tekanan dari uap pelarut. Penjenuhan tiap eluen dilakukan selama 1 jam sebelum dilakukan proses elusi, kecuali penjenuhan BAA dilakukan 1 hari sebelum proses elusi, karena eluen tersebut mengandung air dan bersifat polar sehingga proses elusi berlangsung lama jika penjenuhannya kurang maksimal.

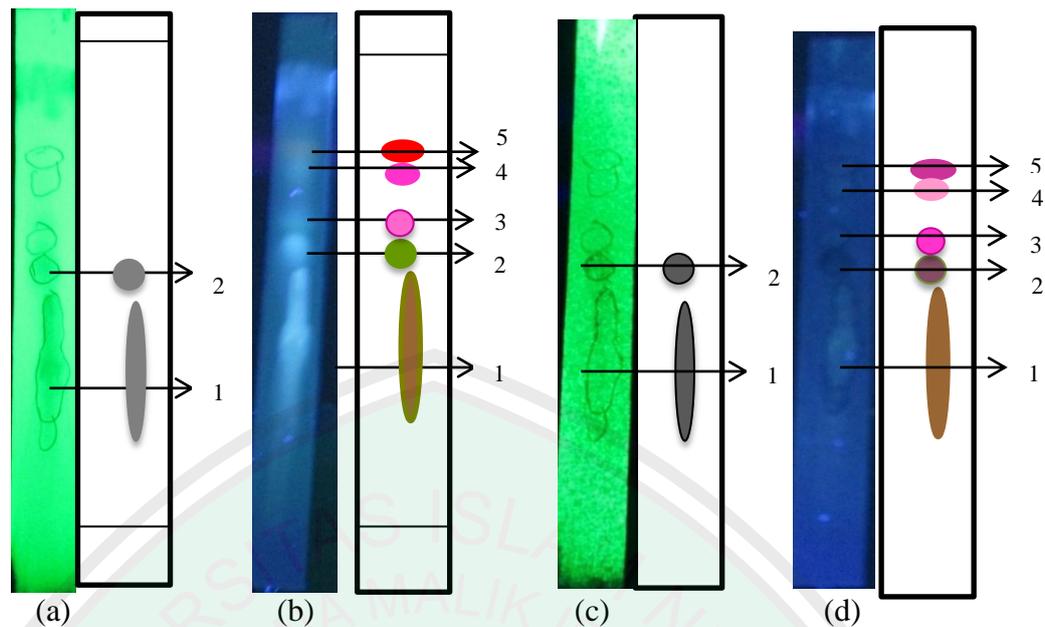
Penelitian ini menggunakan tehnik elusi *ascending* atau pengembangan menaik. Aplikasi penotolan sampel dilakukan dengan menotolkan larutan ekstrak

tanin dengan konsentrasi 15.000 ppm pada 5 plat silica, dilakukan 10 x penotolan pada setiap platnya. Penotolan dilakukan dengan ukuran bercak sekecil dan sesempit mungkin secara bertahap disertai pengeringan antar totalan untuk menghindari penurunan resolusi dan timbulnya bercak yang menyebar dan puncak ganda (Gandjar dan Rohman, 2007). Pemisahan ini terjadi karena adanya perbedaan kepolaran senyawa dengan fase diam berupa plat silica dan fase gerak berupa eluennya yakni n-butanol : asam asetat : air (4:1:5). Proses elusi dihentikan bila eluen telah mencapai tanda batas atas. Noda yang dihasilkan dideteksi dengan pereaksi  $\text{FeCl}_3$  1 %, kemudian diamati dibawah lampu UV dengan panjang gelombang 254 nm dan 366 nm. Penampakan spot atau noda hasil pemisahan senyawa tanin dengan KLTA dari berbagai eluen dapat dilihat pada Tabel 4.7.

Tabel 4.7 Penampakan noda hasil KLTA ekstrak tanin dari berbagai eluen

No.	Eluen	Jumlah noda	Nilai Rf	Keterangan
1.	n-butanol : asam asetat : air (BAA) (2:0,5:1,1)	2	0,68; 0,77	Terpisah
2.	n-butanol : asam asetat : air (4:1:5)	5	0,37; 0,57; 0,62; 0,75; 0,80	Terpisah
3.	asam asetat glasial : $\text{H}_2\text{O}$ : HCl pekat (30:10:3)	-	-	Tidak terpisah
4.	n-heksana : etil asetat (6:4)	-	-	Tidak terpisah
5.	kloroform: metanol: air (7:3:0,4)	1	0,91	Terpisah

Tabel 4.7 menunjukkan variasi pelarut BAA (4:1:5) merupakan eluen terbaik yang mampu memberikan pemisahan terbaik dibandingkan dengan eluen lainnya. Eluen ini mampu memisah 5 noda dan menunjukkan adanya tanin setelah diamati di bawah lampu UV 254 dan 366 nm dengan pereaksi  $\text{FeCl}_3$  1 %. Penampakan noda hasil pemisahan dengan eluen BAA ini dapat dilihat pada Gambar 4.9.



Gambar 4.9 Hasil KLTA tanin dengan eluen BAA (4:1:5)

Keterangan: (a) Hasil pengamatan di bawah sinar UV pada  $\lambda_{254}$  nm sebelum disemprot reagen  $\text{FeCl}_3$  (b) pada  $\lambda_{366}$  nm sebelum disemprot  $\text{FeCl}_3$  (c) pada  $\lambda_{254}$  nm setelah disemprot reagen  $\text{FeCl}_3$  (d) pada  $\lambda_{366}$  nm setelah disemprot reagen  $\text{FeCl}_3$ .

Tabel 4.8 Hasil KLTA ekstrak tanin daun rumput bambu dengan eluen n-butanol: asam asetat: air (BAA) (4:1:5)

No.	Rf noda	Warna noda dibawah lampu UV pada $\lambda$ 254 nm		Warna noda dibawah lampu UV pada $\lambda$ 366 nm		Dugaan positif tannin
		Sebelum disemprot $\text{FeCl}_3$	Sesudah disemprot $\text{FeCl}_3$	Sebelum disemprot $\text{FeCl}_3$	Sesudah disemprot $\text{FeCl}_3$	
1.	0,37	Hitam pudar	Hitam pudar	Hijau keunguan	Hijau tua keunguan	Tanin
2.	0,57	Hitam pudar	Hitam pudar	Hijau	Ungu kecoklatan	Tanin
3.	0,62	-	-	Ungu	Ungu	Tanin
4.	0,75	-	-	Ungu	Ungu pudar	Tanin
5.	0,80	-	-	Ungu kemerahan (lembayung)	Ungu tua	Tanin

Pemisahan menggunakan KLTA pada campuran eluen ini menghasilkan 5 noda dengan Rf yang berbeda. Gambar 4.9 menunjukkan noda pertama memiliki

bentuk ekor atau disebut *tailing*, hal ini dimungkinkan karena aplikasi penitolannya kurang sempurna sehingga proses elusi senyawa kurang maksimal, bentuk *tailing* bisa dimungkinkan adanya 2 noda yang menumpuk atau tidak terpisah. Semua noda diasumsikan sebagai senyawa tanin. Dugaan tersebut berdasarkan warna ungu yang dihasilkan dibawah sinar UV pada  $\lambda$  366 nm, Sa'adah (2010) melakukan identifikasi senyawa tanin dari belimbing wuluh dengan menggunakan eluen yang sama, didapatkan penampak noda berwarna ungu atau lembayung saat disinari UV pada  $\lambda$  366 nm menggunakan pereaksi  $\text{FeCl}_3$  1 %. Harborne (1996) juga menyatakan tanin dapat dideteksi dengan sinar UV pendek berupa bercak lembayung. Selain itu juga diperkuat dari hasil uji fitokimia ekstrak pekat yakni tidak menunjukkan adanya kandungan steroid, alkaloid, saponin dan triterpenoid, akan tetapi positif mengandung tanin.

Data pada Tabel 4.8 menunjukkan adanya 5 noda yang berhasil dipisahkan, kelima noda tersebut diasumsikan sebagai senyawa tanin. Perbedaan antara noda satu dengan lainnya diperkirakan karena dalam sampel terdapat berbagai golongan tanin atau golongan flavonoid lain yang memiliki struktur dan kepolaran yang berbeda. Sebagaimana Tabel 4.2 menunjukkan adanya kandungan tanin terhidrolisis atau tanin galat dan katekin dalam sampel daun rumput bambu, tanin terhidrolisis terbagi menjadi dua yakni gallotanin dan ellagitanin. Hasil identifikasi isolat 3, 5 dan 6 dari pemisahan KLTP juga diduga golongan flavonol yang memiliki struktur dengan posisi gugus hidroksi yang berbeda seperti pada Gambar 4.13. Pernyataan tersebut memperkuat dugaan bahwa perbedaan Rf masing-masing noda terjadi karena terdapat golongan tanin yang berbeda pula. Nilai Rf masing-masing noda adalah 0,37; 0,57; 0,62; 0,75 dan 0,80. Rf yang

lebih besar menunjukkan senyawa cenderung lebih terdistribusi pada fase geraknya (BAA) yang bersifat lebih polar dari pada fase diamnya (silika), sehingga proses migrasi solut berlangsung lebih cepat. Distribusi zat terlarut dalam kedua fase disebut sebagai koefisien distribusi (K) sebagaimana persamaan:

$$K = \frac{C_s}{C_m}$$

Adapun  $C_s$  adalah konsentrasi analit dalam fase diam, sedangkan  $C_m$  adalah konsentrasi analit dalam fase gerak. Noda dengan  $R_f$  rendah seperti noda pertama memiliki harga K yang tinggi, karena K berbanding lurus dengan  $C_s$ , jumlah molekulnya berada pada fase diam dan menghabiskan waktu relatif lama dari pada di dalam fase gerak.

#### 4.5.2 Pemisahan Senyawa Tanin dengan KLTP

Kromatografi lapis tipis preparatif merupakan pemisahan senyawa dalam jumlah yang lebih besar. Menggunakan plat silika G 60 F<sub>254</sub> dengan ukuran yang lebih besar yaitu 10 x 20 cm. Aplikasi penotolannya sama dengan KLTA hanya jumlah ekstrak yang ditotolkan lebih banyak dan konsentrasi ekstrak tanin yang digunakan adalah 15.000 ppm. Eluen yang digunakan pada KLTP ini merupakan eluen terbaik pada pemisahan KLTA yakni n-butanol: asam asetat: air (4:1:5).

Tabel 4.9 Hasil KLTP ekstrak tanin daun rumput bambu dengan eluen n-butanol: asam asetat: air (BAA) (4:1:5)

Noda	Nilai R <sub>f</sub>	Warna noda pada λ 254 nm	Warna noda pada λ 366 nm	Dugaan senyawa
1	0,17	Hitam pudar	Coklat kehijauan	Tanin
2	0,34	-	Ungu pudar	Tanin
3	0,44	-	Ungu	Tanin
4	0,62	Hitam	Biru pudar	Tanin
5	0,68	-	Ungu tua	Tanin
6	0,78	-	Ungu kemerahan (lembayung)	Tanin

Pemisahan senyawa menggunakan KLT preparatif berdasarkan Tabel 4.9 menghasilkan 6 spot atau noda. Perbedaan jumlah noda pada pemisahan KLT analitik dan KLT preparatif dimungkinkan karena pemisahan senyawa pada KLT analitik kurang maksimal, sebab terdapat noda yang berekor atau *tailing* sebagaimana yang telah dijelaskan sebelumnya. Hasil pengamatan semua noda diperkirakan adalah senyawa tanin sebagaimana yang telah dijelaskan pada pemisahan menggunakan KLT Analitik sebelumnya.

Noda ke-3, 5 dan 6 dikerok. Noda yang dikerok dilarutkan dalam etanol p.a, kemudian disentrifugasi untuk memisahkan silika gel dengan senyawa aktif yang terlarut dalam etanol p.a. Filtrat yang diperoleh diidentifikasi dengan menggunakan spektrofotometer UV-Vis dan penambahan pereaksi geser.

#### **4.6 Identifikasi Tanin dengan Spektrofotometer UV-Vis dan Pereaksi Geser**

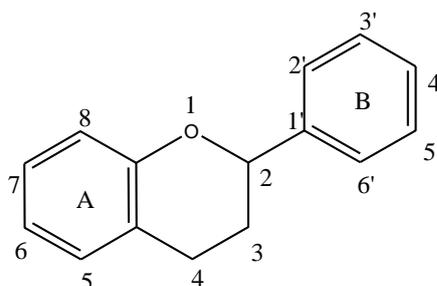
Spektrofotometer UV-Vis merupakan metode yang berguna untuk menganalisis dugaan awal struktur tanin. Metode ini membantu mengidentifikasi jenis senyawa polifenol dan pola oksigasinya. Kedudukan gugus hidroksi fenol pada inti senyawa tanin atau flavonoid dapat ditentukan dengan menambahkan beberapa pereaksi geser (Markham, 1988).

Terbentuknya pita spektrum UV-Vis disebabkan oleh terjadinya eksitasi elektronik lebih dari satu macam pada gugus molekul yang sangat kompleks. Isolat yang diidentifikasi pada penelitian ini dari hasil pemisahan dengan menggunakan kromatografi lapis tipis preparatif (KLTP) adalah isolat nomor 3, 5 dan 6 dan dilarutkan dalam pelarut etanol p.a. Data spektrum isolat 3, 5 dan 6 sebelum dan sesudah ditambahkan beberapa pereaksi geser dapat dilihat pada Tabel 4.10.

Tabel 4.10 Data spektrum isolat sebelum dan sesudah ditambahkan pereaksi geser

Pereaksi geser	Penjang gelombang			Pergeseran panjang gelombang			Dugaaan distribusi		
	Isolat			Isolat			Isolat		
	3	5	6	3	5	6	3	5	6
-	337,7	364,0	338,4	-	-	-	Flavon atau flavonol: 330-375		
NaOH	426,2	341,8	416,9	+88,5	-22,2	+78,5	4'-OH 3-OH	6-OH dengan oksigenasi pada 4'	4'-OH 3-OH
NaOH + 5 menit	417,7	336,7	292,0	+80	-27,3	-46,6	3,3',4'-OH	3,3',4'-OH	3,3',4'-OH
AlCl <sub>3</sub>	301,3	360,3	354,4	-36,4	-3,7	+16	5-OH	5-OH	5-OH
AlCl <sub>3</sub> + HCl	342,6	332,5	331,6	+4,9	-31,5	-6,8	5-OH	o-diOH:	o-diOH:
NaOAc	347,7	335,0	326,6	+10	-29	-11,8	-	7-OH	7-OH
NaOAc + H <sub>3</sub> BO <sub>3</sub>	423,6	498,7	-	+85,9	+134,7	-	orto-dihidroksil	orto-dihidroksil	-

Spektrum tanin dari isolat 3, 5 dan 6 memiliki panjang gelombang dalam rentang 300 – 500 nm. Dimungkinkan sebagai hasil transisi  $\pi - \pi^*$  dan ikatan  $n - \pi^*$ . Transisi  $\pi - \pi^*$  diperkirakan berasal dari ikatan C=C terkonjugasi, sedangkan transisi  $n - \pi^*$  berasal dari kromofor tunggal seperti ikatan C=O atau adanya auksokrom yaitu gugus fungsional yang memiliki elektron bebas seperti gugus OH (Sastrohamidjojo, 2007; Gandjar dan Rohman, 2007). Tanin adalah senyawa polifenol dan termasuk dalam golongan flavonoid, karena dilihat dari strukturnya memiliki 2 cincin aromatik yang diikat oleh 3 atom karbon.



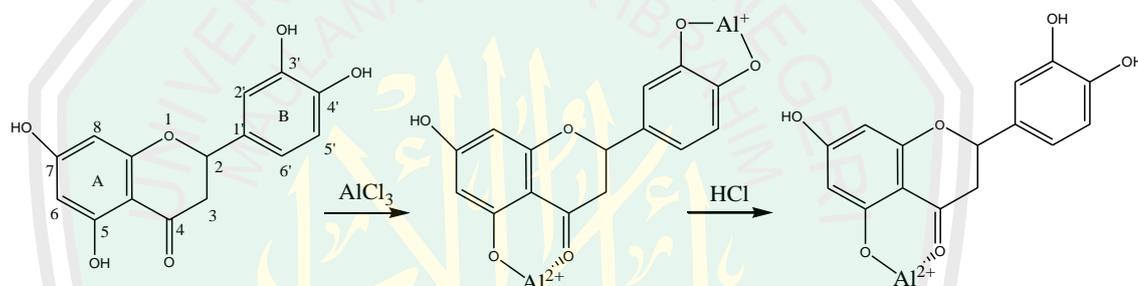
Gambar 4.10 Struktur dasar flavonoid

Gugus OH bebas yang terikat pada inti flavonoid dapat menentukan jenis dari golongannya. Berdasarkan Tabel 4.2 yang telah dijelaskan sebelumnya bahwa dalam ekstrak daun rumput bambu diduga positif terkandung katekin dan tanin galat. Katekin merupakan struktur pembentuk tanin terhidrolisis atau proantosianidin dan termasuk golongan flavonoid. Auksokrom berupa gugus OH pada katekin dan tanin galat memiliki elektron bebas yang berdekatan dengan lingkaran benzen. Gugus OH tersebut dapat menyebabkan pergeseran pita serapan ke panjang gelombang yang lebih besar atau pergeseran batokromik. Intensitas spektrum ketiga isolat tersebut hampir sama, hal tersebut dimungkinkan karena adanya glukosa, sebab tidak dilakukan hidrolisis pada sampel yang akan dianalisis (Sa'adah, 2010). Dugaan adanya glikosida yang terikat pada metabolit sekunder tanin didasarkan pada ekstrak tanin yang sangat larut dalam air, tetapi tidak larut dalam etanol, sebagaimana Robinson (1995) menyatakan glikosida sudah tentu kurang larut dalam pelarut organik dan lebih mudah larut dalam air dari pada aglikonnya.

Berdasarkan Tabel 4.10 penambahan basa NaOH pada isolat 3 dan 6 menyebabkan pergeseran panjang gelombang yang lebih besar atau pergeseran merah dengan disertai penurunan intensitas serapannya, hal ini dimungkinkan karena adanya gugus OH bebas pada C 3 dan 4' yang terurai oleh basa atau mengalami ionisasi (Robinson, 1995). Sehingga memperpanjang sistem delokalisasi elektron dari struktur inti tanin. Akibatnya energi yang digunakan untuk transisi elektron akan lebih rendah dan akan menyerap pada panjang gelombang yang lebih besar atau mengalami efek batokromik. Sedangkan penambahan basa NaOH pada isolat 5 menyebabkan pergeseran yang lebih kecil

dan diduga adanya gugus OH yang terikat pada C 6. Penurunan spektrum secara cepat pada ketiga isolat setelah 5 menit dari penambahan basa NaOH disebabkan oleh sistem 3, 3' dan 4'-OH yang peka terhadap basa (Markham, 1988).

Penambahan  $\text{AlCl}_3$  5 % dan  $\text{AlCl}_3$  5 %/ HCl berfungsi untuk mendeteksi gugus fungsi dengan cara membentuk kompleks dengan senyawa tanin yang tahan asam antara gugus hidroksi dan keton yang bertetangga dan membentuk kompleks tak tahan asam dengan gugus orto-dihidroksi. Tabel 4.10 menunjukkan bahwa pada ketiga isolat terdapat dugaan gugus hidroksida pada C 5 yakni cincin A.



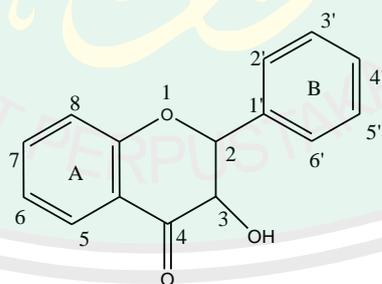
Gambar 4.11 Reaksi tanin dengan  $\text{AlCl}_3$  dan  $\text{AlCl}_3$ / HCl (Kristanti, dkk., 2008; Markham, 1988)

Penambahan asam klorida (HCl) pada sampel isolat menyebabkan terputusnya  $\text{Al}^{3+}$  pada gugus orto cincin B sehingga membentuk orto hidroksi dengan kembalinya atom H yang berasal dari HCl.

Natrium asetat ( $\text{NaOAc}$ ) menyebabkan pengionan pada gugus hidroksi flavonoid yang paling asam.  $\text{NaOAc}$  digunakan untuk mendeteksi adanya gugus 7-hidroksi bebas atau yang setara. Sedangkan  $\text{NaOAc}/\text{H}_3\text{BO}_3$  dapat menjembatani kedua gugus hidroksi pada gugus o-dihidroksi. Berdasarkan Tabel 4.10 setelah ditambahkan  $\text{NaOAc}$  isolat 5 dan 6 menunjukkan adanya gugus 7-hidroksi bebas, ditandai dengan pergeseran ke panjang gelombang yang lebih rendah. Penambahan asam borat tidak memberikan puncak serapan pada isolat 3, hal ini

dimungkinkan karena sampel isolat terlalu sedikit sehingga tidak dapat terdeteksi oleh spektrofotometer UV-Vis. Isolat 5 dan 6 mengalami pergeseran batokromik, yang diduga terdapat gugus orto-dihidroksi pada cincin B dari struktur tanin, sebagaimana menurut Robinson (1995) menyatakan borat dapat membentuk kompleks dengan gugus orto-dihidroksi dan menimbulkan pergeseran khas pada pita panjang gelombang tinggi.

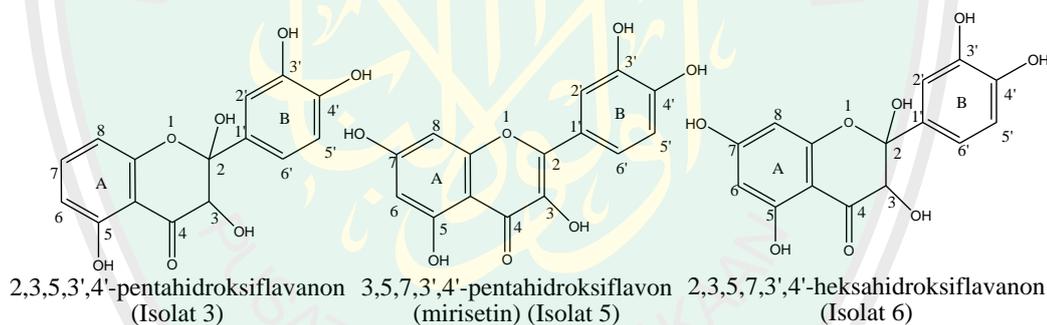
Hasil identifikasi senyawa menggunakan spektrofotometer UV-Vis dan penambahan pereaksi geser, diduga struktur ketiga isolat tersebut adalah golongan flavonol yang merupakan turunan dari flavonoid. Hal ini didasarkan pada panjang gelombang sebelum ditambahkan pereaksi geser yakni isolat 3, 5 dan 6 memiliki panjang gelombang maksimum 337,7; 364, 0 dan 338,4. Menurut Robinson (1995) golongan flavon dan flavonol memiliki panjang gelombang 330-375. Selain itu juga diperkuat penelitian Jing dkk (2009) yang menemukan adanya 14 senyawa golongan flavonoid dalam daun rumput bambu.



Gambar 4.12 Struktur dasar flavonol (Harborne, 1996)

Flavonol merupakan flavonoid utama karena termasuk jenis flavonoid yang banyak dijumpai di alam (Kristanti, 2008). Terdapat 300 aglikon flavonol, tetapi secara umum terbagi menjadi tiga diantaranya kemferol, kuersetin dan mirisetin. Terdapat turunan o-metil dari kuersetin diantaranya eter 3'-metil (isoramnetin) dan eter 5-metil (azaleatin). Pemisahan golongan flavonol

menggunakan eluen n-butanol: asam asetat: air (BAA) (4:1:5) dengan nilai Rf 0,43; 0,64 dan 0,74 menunjukkan adanya golongan mirisetin, kuersetin dan isoramnetin (Harborne, 1996). Ketiga Rf tersebut hampir sama dengan hasil pemisahan pada penelitian ini menggunakan eluen dengan perbandingan yang sama. Nilai Rf dari isolat 3, 5 dan 6 adalah 0,44; 0,68 dan 0,78. Pernyataan tersebut memperkuat dugaan senyawa yang terkandung dalam ekstrak daun rumput bambu (*Lophatherum gracile* Brongn) dari ketiga isolat merupakan golongan flavonol. Hasil interpretasi data pada Tabel 4.10 diduga struktur senyawa isolat ke-3 adalah 2,3,5,3',4'-pentahidroksiflavanon, sedangkan isolat ke-5 dan 6 adalah 3,5,7,3',4'-pentahidroksiflavanon atau mirisetin dan 2,3,5,7,3',4'-heksahidroksiflavanon. Dugaan struktur ketiga isolat tertera pada Gambar 4.13.



Gambar 4.13 Dugaan struktur isolat 3, 5 dan 6

Berdasarkan Gambar 4.13 menunjukkan isolat 3 dan 5 memiliki 5 gugus hidroksi, sedangkan isolat 6 memiliki 6 gugus hidroksi. Semakin banyak gugus hidroksi maka sifat kepolarannya semakin tinggi, semakin polar senyawanya maka semakin tinggi harga Rfnya, karena lebih terdistribusi ke fasa gerak dan memiliki nilai K rendah, sebagaimana yang ditunjukkan pada Tabel 4.9 bahwa Rf isolat 6 lebih besar dari pada isolat 3 dan 5 yakni  $0,78 > 0,44$  dan  $0,68$  karena isolat 6 bersifat lebih polar.

#### 4.7 Pemanfaatan Daun Rumpun Bambu sebagai Obat dalam Perspektif Islam

Penelitian ini mengkaji tentang ekstrak tanin yang terkandung dalam daun rumput bambu (*Lophatherum gracile* Brongn) sebagai antioksidan. Penelitian merupakan salah satu cara dalam mencari ilmu, dengan melakukan penelitian kita dapat berfikir tentang ciptaan dan kekuasaan Allah SWT. Menurut imam al Ghazali jalan untuk mengenal Allah dan mengagungkanNya adalah memikirkan hikmah yang terkandung dalam setiap ciptaanNya. Memikirkan dan merenungkan keajaiban serta memahami hikmah yang terkandung dalam setiap segala yang ada. Allah memberikan gelar *Ulul Albab* pada orang yang berfikir melalui aspek mata akal (fikir dan nadzar), jalan observasi (pengamatan), mata hati (dzikir) dan intropeksi (muhasabah, penghayatan dan perenungan). Sebagaimana firman Allah surat ali Imran ayat 190:

إِنَّ فِي خَلْقِ السَّمَوَاتِ وَالْأَرْضِ وَأَخْتَلَفِ اللَّيْلِ وَالنَّهَارِ لآيَاتٍ لِّأُولِي الْأَلْبَابِ ﴿١٩٠﴾

Artinya: “*Sesungguhnya dalam penciptaan langit dan bumi, dan silih bergantinya malam dan siang terdapat tanda-tanda bagi orang-orang yang berakal*” (QS. ali Imran: 190).

Menurut al-Jazairi (2007) maksud lafadz li ulil albab yakni bagi orang-orang yang berakal, yang dengan akalnya mereka mampu menangkap dan memahami tanda-tanda dan bukti-bukti pada ciptaan-Nya. Kebesaran Allah di alam semesta merupakan bukti rububiyah-Nya atas semua makhluk dan yang maha mengawasi mereka. Akan tetapi hal ini kurang difahami kecuali oleh orang yang memiliki mata hati dan berakal. Orang yang berakal selalu berfikir tentang kebesaran penciptaan bumi dan langit, sehingga mendapatkan jalan petunjuk untuk mengenal Allah. Allah menjelaskan sifat-sifat orang yang berakal dalam surat ali Imran ayat 191.

الَّذِينَ يَذْكُرُونَ اللَّهَ قِيَمًا وَقُعُودًا وَعَلَىٰ جُنُوبِهِمْ وَيَتَفَكَّرُونَ فِي خَلْقِ السَّمَوَاتِ وَالْأَرْضِ رَبَّنَا مَا خَلَقْتَ هَذَا بَطْلًا سُبْحَانَكَ فَقِنَا عَذَابَ النَّارِ ﴿١٩١﴾

Artinya: “Orang-orang yang mengingat Allah sambil berdiri atau duduk atau dalam keadan berbaring dan mereka memikirkan tentang penciptaan langit dan bumi (seraya berkata): “Ya Tuhan Kami, Tiadalah Engkau menciptakan ini dengan sia-sia, maha suci Engkau, maka peliharalah Kami dari siksa neraka” (QS. ali Imran: 191).

Al Quran QS. ali Imran ayat 191 menjelaskan ciri-ciri orang yang berakal adalah memikirkan kekuasaan Allah dalam berbagai keadaan, termasuk melakukan pengkajian ilmu pengetahuan melalui penelitian. Rumpun bambu memiliki berbagai manfaat, salah satunya sebagai antioksidan, sebagaimana yang telah dijelaskan dalam surat tersebut bahwa Allah tidak menciptakan apapun dengan sia-sia. Seperti halnya rumpun bambu yang kebanyakan orang menganggapnya sebagai tanaman pengganggu, akan tetapi dengan adanya penelitian tanaman ini, dapat memberikan informasi mengenai potensinya sebagai obat.

Seseorang yang disebut *Ulul albab* tidak hanya berfikir dan menganalisis manfaat dari tanaman tersebut, akan tetapi juga memanfaatkannya baik bagi dirinya sendiri maupun orang lain, dengan cara memberikan informasi atau mengeksplorasi tentang manfaatnya sehingga dapat diaplikasikan kegunaannya dengan maksimal. Dari Ibnu Mas’ud bahwa Nabi Muhammad bersabda:

إِنَّ اللَّهَ لَمْ يَنْزَلْ كِتَابًا إِلَّا أَنْزَلَ لَهُ شِفَاءً، عِلْمَهُ مِنْ عِلْمِهِ وَجَمَلَهُ مِنْ جَمَلِهِ.

Artinya: *Sesungguhnya Allah tidak menurunkan sebuah penyakit melainkan menurunkan pula obatnya, obat itu diketahui oleh orang yang mengetahuinya dan tidak diketahui oleh orang yang tidak mengetahuinya” (HR. Ahmad, Ibnu Majah, dan Al-Hakim, beliau menshahihkannya dan disepakati oleh Adz-Dzahabi. Al-Bushiri menshahihkan hadits ini dalam Zawa’id-nya. Lihat takhrij Al-Arnauth atas Zadul Ma’ad, 4/12-13)*

Maksud dari hadits tersebut dapat dikaitkan dengan sifat *ulul albab* yakni mencari informasi mengenai aktivitas sampel sehingga dapat mengetahui khasiatnya dalam pengobatan penyakit tertentu, sebagaimana yang telah penulis aplikasikan dalam bentuk penelitian dengan tujuan mengetahui aktivitas ekstrak tanin dari daun rumput bambu sebagai antioksidan. Allah menciptakan tanaman ini sebagai tanaman yang berpotensi sebagai obat penyakit yang disebabkan oleh radikal-radikal bebas. Potensi tersebut dibuktikan dengan kuatnya aktivitas antioksidan daun rumput bambu dengan nilai 77,70 % dan EC<sub>50</sub> 51,56 mg/L. Hasil penelitian ini memberikan hikmah berupa informasi mengenai potensi pemanfaatan daun rumput bambu sebagai antioksidan.

Sebagai ilmuwan muslim kita diwajibkan mengeksplorasi manfaat dari tanaman ini sebagai bentuk kepedulian dan berbuat baik terhadap sesama sebagaimana yang telah dijelaskan dalam surat al Qashash ayat 77 pada kajian teori sebelumnya. Al Quran menyebutkan dalam surat al Anam ayat 99.

وَهُوَ الَّذِي أَنْزَلَ مِنَ السَّمَاءِ مَاءً فَأَخْرَجْنَا بِهِ نَبَاتَ كُلِّ شَيْءٍ فَأَخْرَجْنَا مِنْهُ خَضِرًا حُجْرًا مِنْهُ حَبًّا مُتَرَاكِبًا وَمِنَ النَّخْلِ مِنَ طَلْعِهَا قِنْوَانٌ دَانِيَةٌ وَجَنَّاتٍ مِّنْ أَعْنَابٍ وَالزَّيْتُونَ وَالرُّمَّانَ مُشْتَبِهًا وَغَيْرَ مُتَشَبِهٍ ۗ انظُرُوا إِلَى ثَمَرِهِ إِذَا أَثْمَرَ وَيَنْعِهِ ۗ إِنَّ فِي ذَٰلِكُمْ لَآيَاتٍ لِّقَوْمٍ يُؤْمِنُونَ



Artinya: *Dan Dialah yang menurunkan air hujan dari langit, lalu Kami tumbuhkan dengan air itu segala macam tumbuh-tumbuhan. Maka Kami keluarkan dari tumbuh-tumbuhan itu tanaman yang menghijau. Kami keluarkan dari tanaman yang menghijau itu butir yang banyak, dan dari mayang korma mengurai tangkai-tangkai yang menjulai, dan kebun-kebun anggur, dan (kami keluarkan pula) zaitun dan delima yang serupa dan yang tidak serupa. Perhatikanlah buahnya di waktu pohonnya berbuah dan (perhatikan pulalah) kematangannya. Sesungguhnya pada yang demikian itu ada tanda-tanda (kekuasaan Allah) bagi orang-orang yang beriman (QS. al Anam: 99).*

Surat al Anam ayat 99 telah menggambarkan segala sesuatu yang baik bagi setiap obyek yang disifati-Nya. Tumbuhan yang baik merupakan tumbuhan yang bermanfaat bagi makhluk hidup termasuk tumbuhan yang dapat digunakan sebagai pengobatan. Menurut Shihab (2002: 318) dalam tafsir al Mishbah bahwa aneka tumbuhan dengan bermacam-macam jenis bentuk dan rasanya itu merupakan hal-hal yang sungguh menakjubkan lagi membuktikan betapa agung penciptanya. Setiap macam tumbuhan diciptakan Allah untuk kemaslahatan umat manusia, diantaranya sebagai salah satu sumber pangan bagi manusia dan dapat diambil hasilnya untuk memenuhi kebutuhan manusia. Allah SWT berfirman dalam surat al Syuaraa ayat 80.

وَإِذَا مَرِضْتُ فَهُوَ يَشْفِينِ ﴿٨٠﴾

Artinya: “ *Dan apabila aku sakit, Dialah yang menyembuhkan aku*” (QS. al Syuaraa: 80).

Surat al Syuaraa ayat 80 menjelaskan bahwa betapa adilnya Allah SWT yang memberikan suatu penyakit beserta penawarnya yaitu obat. Pengetahuan yang akan menuntun manusia untuk menemukan obat-obatan yang telah tersedia di alam. Allah menciptakan sesuatu ukuran yang sesuai dengan ketentuan-Nya, dan disertai dengan hikmah yaitu memberikan manfaat bagi kehidupan manusia. Ayat tersebut juga menjelaskan sebagai seorang muslim harus didasarkan kepada aqidah yakni meyakini bahwa penyembuhan hanya dari Allah sedangkan obat hanya sebagai perantara (Muhadi dan Muadzin, 2010 dalam A’ilah, 2015).

## BAB V

### PENUTUP

#### 5.1 Kesimpulan

1. Ekstrak tanin pada daun rumput bambu memiliki aktivitas antioksidan yang kuat dengan nilai  $EC_{50}$  51,56 mg/L dan persen tertinggi 77,70 %. Perbandingan BHT dan vitamin C memiliki nilai  $EC_{50}$  8,713 mg/L dan 0,003 mg/L.
2. Hasil identifikasi menggunakan spektrofotometer UV-Vis dan diperkuat dengan penambahan pereaksi geser menunjukkan bahwa tiga isolat (3, 5 dan 6) diduga merupakan golongan flavonol.

#### 5.2 Saran

1. Perlu dilakukan pengujian aktivitas antioksidan dengan menggunakan metode selain DPPH misalnya metode CUPRAC (*Cupric Ion Reducing Antioxidant Activity*).
2. Perlu dilakukan pengukuran pH campuran sampel dengan  $FeCl_3$  yang dilanjutkan dengan penegasan spektra UV-Vis untuk memperkuat dugaan golongannya yakni galat ( $\lambda$  542 – 561) atau katekol ( $\lambda$  561 – 586).
3. Perlu dilakukan identifikasi lebih lanjut mengenai struktur golongan flavonol menggunakan FTIR, LC-MS dan NMR.

## DAFTAR PUSTAKA

- Abraham, A. 2013. Uji Antitoksoplasma Ekstrak Kasar Alkaloid Daun Pulai (*Alstonia scholaris*, L.R.Br) Terhadap Mencit (*Mus musculus*) Balb/C Yang Terinfeksi *Toxoplasma Gondii* strain RH. *Skripsi*. Malang: Jurusan Kimia Saintek UIN Malang.
- Afriani, S.; Idiawati, N.; Destianti, L. Arianie, L. 2014. Uji Aktivitas Antioksidan Daging Buah Asam Paya (*Eleiodoxa conferta* Burret) dengan Metode DPPH dan Tiosianat. *JKK*, 3 (1): 49 – 56.
- Al-Jazairi, A. B. K. 2007. *Tafsir al-Quran al-Aisar*. Terjemahan oleh Hatim A dan Mukti, A. Jakarta: Darus sunnah Press.
- Al-Qarni, 'Aidh, 2007. *Tafsir Muyassar*. Jakarta: Qisthi Press.
- Artati, E. K. dan Fadilah. 2007. Pengaruh Kecepatan Putar Pengadukan dan Suhu Operasi pada Ekstraksi Tanin dari Jambu Mete dengan Pelarut Aseton. *Ekuilibrium*, 6 (1): 33 – 38.
- Asih, A. dan Setiawan, A. 2008. Senyawa Golongan Flavonoid pada Ekstrak N-Butanol Kulit Batang Bungur (*Lagerstroemia speciosa* Pers.). *Jurnal Kimia*, 2 (2): 111 – 116.
- A'ilah, A. F. 2015. Uji Aktivitas Antikanker terhadap Sel Kanker Payudara T47d dan Identifikasi Golongan Senyawa Aktif dari Ekstrak dan Fraksi Akar Rumput Bambu (*Lophatherum Gracile* B.). *Skripsi*. Malang: Jurusan Kimia Saintek UIN Malang.
- Baraja, M. 2008. Uji Toksisitas Ekstrak Daun *Ficus elastica* Nois ex Blume terhadap *Artemia salina* Leach dan Profil Kromatografi Lapis Tipis. *Skripsi*. Surakarta: Fakultas Farmasi Universitas Muhammadiyah Surakarta.
- Bariyyah, S.K. 2013. Uji Aktivitas Antioksidan terhadap DPPH dan Identifikasi Golongan Senyawa Aktif Ekstrak Kasar Mikroalga *Chlorella sp.* Hasil Kultivasi dalam Medium Ekstrak Tauge. *Skripsi*. Malang: Jurusan Kimia Saintek UIN Malang.
- Browning, B. L. 1966. *Methods of Wood Chemistry*. Vol I, II. New York: Interscience Publishers.
- Cahyadi, W. 2006. *Kedelai Khasiat Dan Teknologi*. Bandung: Bumi Aksara.
- Cronquist, A. 1981. *An Integrated System of Clasification of Flowering Plants*. New York: Columbia University Press.

- Desmiaty, Y.; Ratih H.; Dewi M. A.; Agustin R. 2008. Penentuan Jumlah Tanin Total pada Daun Jati Belanda (*Guazuma ulmifolia Lamk*) dan Daun Sambang Darah (*Excoecaria bicolor Hassk.*) secara Kolorimetri dengan Pereaksi Biru Prusia. *Ortocarpus*, 8: 106 – 109.
- Dewi, E. T. 2013. Fraksinasi dan Identifikasi Senyawa Antioksidan pada Ekstrak Etanol Daun Kersen (*Muntingia Calabura L.*) Secara Kolom Kromatografi. *Skripsi*. Surabaya: Fakultas Farmasi Unika Widya Mandala Surabaya.
- Effendy. 2007. *Perspektif Baru Kimia Koordinasi Jilid I*. Malang: Banyu Media Publishing.
- Ernawati. 2013. Identifikasi Awal dan Uji Aktivitas Antioksidan Ekstrak Teripang Pasir (*Holothuria scabra*) Pesisir Pamekasan dengan Metode DPPH. *Skripsi*. Malang: Jurusan Kimia Saintek UIN Malang.
- Fessenden dan Fessenden. 1997. *Kimia Organik Edisi Ketiga*. Terjemahan oleh Alyosius Hadyana Pudjaatmaka. Jakarta : Erlangga.
- Firdausi, A., Siswoyo, T.A. dan Wiryadiputra, S. 2013. Identifikasi Tanaman Potensial Penghasil Tanin-protein Kompleks Untuk Penghambatan Aktivitas  $\alpha$ -amylase Kaitannya Sebagai Pestisida Nabati. *Pelita Perkebunan*, 29(1): 31 – 34.
- Gandjar, I.G dan Rohman, A. 2007. *Kimia Farmasi Analisis*. Yogyakarta: Pustaka Pelajar.
- Gohen. 1976. *Encyclopedia of Chemical Technology*, 3<sup>nd</sup>. New York. Hal 294.
- Gordon, M.H. 1990. *The Mechanism of Antioxidants Action in Vitro*. Di dalam: B.J.F. Hudson, editor. *Food Antioxidants*. London: Elsevier Applied Science.
- Gritter, R.J. 1991. *Pengantar Kromatografi edisi kedua*. Terjemahan oleh Kokasih Padmawinata. Bandung: Penerbit ITB.
- Guenther, E. 1987. *Minyak Atsiri*. Jilid I. Terjemahan oleh Ketaren S. Jakarta: Universitas Jakarta Press.
- Hagerman, A. E. 2002. *Tannin Handbook*. Department of Chemistry and Biochemistry. Miami: Miami University Press.
- Hagerman, A.E., C.T. Robbins, Y. Weerasuriya, T.C. Wilson, and C. McArthur. 1992. Tannin chemistry in relation to digestion. *Journal of Range Management*, 45(1): 57 – 62.

- Harborne, J. B. 1987. *Metode Fitokimia: Penuntun Cara Modern Menganalisis Tumbuhan*. Terjemahan oleh Padmawinata K, Soedira I. 1996. Bandung: Penerbit Institut Teknologi Bandung.
- Hathway, D. E. 1962. *The Condensed Tannins. In Wood Extractives* (Hillis W. E). New York: Academic Press.
- Hayati, E.K., Fasyah, A.G. dan Sa'adah, L. 2010. Fraksinasi dan Identifikasi Senyawa Tanin pada Daun Belimbing Wuluh (*Averrhoa Bilimbi L.*). *Alchemy*, 4(2): 193 – 200.
- Hendayana, S. 2006. *Kimia Pemisahan Metode Kromatografi dan Elektroforesis Modern*. Bandung: PT Remaja Rosdakarya.
- Hernawan, U. E dan Setyawan, A. D. 2003. Review: Ellagitanin; Biosintesis, Isolasi, dan Aktivitas Biologi. *Biofarmasi*, 1(1): 25 – 38,
- Heyne. K. 1987. *Tumbuhan Berguna Indonesia*. Jakarta: Badan Litbang Kehutanan.
- Ismarani. 2012. Potensi Senyawa Tannin dalam Menunjang Produksi Ramah Lingkungan. *Jurnal Agribisnis dan Pengembangan Wilayah*, 3(2): 46 – 55
- Jing, Z., Ying, W., Xiao-Qi, Z., Qing-Wen, Z., dan Wen-Cai, Y. 2009. *Chemical Constituents from the Leaves of Lophatherium gracile*. *Chinese Journal of Natural Medicines*, 7(6): 428 – 431.
- Khopkar, S. M. 2008. *Konsep Dasar Kimia Analitik*. Jakarta: UI Press.
- Kristanti, A. N., Aminah, N. S., Tanjung, M. Dan Kurniadi, B. 2008. *Buku Ajar Fitokimia*. Surabaya: Airlangga University Press.
- Kusumawati, I., Djatmiko, W., dan Rahman, A. Studiawan, H., Ekasari, W. 2003. Eksplorasi Keanekaragaman dan Kandungan Kimia Tumbuhan Obat di Hutan Tropis Gunung Arjuno. *Jurnal Bahan Alam Indonesian*, 2(3): 100 – 104.
- Lailah, N. 2014. Uji Aktivitas Antioksidan dan Fitokimia Fraksi Etil Asetat, Kloroform, dan N-Heksana Ekstrak Metanol Alga Coklat *Sargassum Cristaefolium*. *Skripsi*. Malang: Jurusan Kimia Saintek UIN Malang.
- Mabry, T. J.; Markham, K. R. dan Thomas, M. B. 1970. *The systematic Identification of Flavonoids*. Berlin: Springer Verlag.
- Madhavi, D.L., Deshpande, S.S., and Salunkhe, D.K. 1996. *Food Antioxidants Technological, Toxicological, and Health Perspective*. New York: Marcell Dekker Inc.

- Malanggia, L. P., Sangia, M. S., Paedonga, J. J. E. 2012. Penentuan Kandungan Tanin dan Uji Aktivitas Antioksidan Ekstrak Biji Buah Alpukat (*Persea americana* Mill.). *Jurnal Mipa Unsrat Online*, 1(1): 5 – 10.
- Mangunwardoyo, H., Cahyaningsih, E., dan Tepy, U. 2009. Ekstraksi dan Identifikasi Senyawa Antimikroba Herba Meniran (*Phyllanthus niruri* L.). *Jurnal Ilmu Kefarmasian Indonesia*, 7(2) : 57 – 63.
- Manitto, P. 1981. *Biosintesis Produk Alami*. Terjemahan oleh Koensoemardiyah. Semarang: IKIP Press.
- Markham, K. R. 1988. *Cara mengidentifikasi Flavonoid*. Terjemahan oleh Kosasih Padmawinata. Bandung: ITB.
- Mark, H.F. 2013. *Encyclopedia Of Polymer Science and Technology, Concise*. John Wiley and Sons. ISBN 0470073691, 9780470073698.
- Meyer, B. N., Ferrigni, Putnam, J.E. Jacobsen, L.B. Nichols, and Mc Laughlin. 1982. *Brine Shrimp: A Convenient General Bioassay for Active Plant Constituents*. *Planta Medica*. 45: 31 – 34.
- Mc. Laughlin, J. L., Lingling, L. Dan Rogers, MS. 1991. *Crown Gall Tumours on Potato Disc and Brine Shrimp Lethality: Two Simple Bioassay for Higher Plant Screening and Fractination*. *Methods in Plants Biochemistry*. Academic Press.
- Molyneux. 2004. The Use of The Stable Free Radical Diphenylpicrylhydrazyl (DPPH) for Estimating Antioxidant Activity. *Songklanakarin Journal Science Technolgy*, 26 (2) : 211 – 219.
- Muhadi dan Muadzlin. 2010. *Semua Penyakit Ada Obatnya, Menyembuhkan Penyakit Ala rasulullah*. Yogyakarta: Mutuara Media.
- Mukharromah, I. 2015. Penentuan Kadar Merkuri (Hg) dalam Ikan Lemuru (*Sardinella Lemuru*) Menggunakan Destruksi Basah Secara Spektrofotometri Serapan Atom Uap Dingin (SSA-UD). *Skripsi*. Malang: Jurusan Kimia Saintek UIN Malang.
- Mulyono. 2009. *Kamus Kimia*. Jakarta: Bumi Aksara
- Nahari, D. S. 2015. Pemisahan Golongan Senyawa Aktif dan Penentuan Kandungan Fenolik Total dari Ekstrak Etanol Umbi Binahong (*Anredera cordifolia* (Ten.) Steen) serta Efek Terapinya Terhadap Aktivitas Superoksida Dismutase Hati Tikus Diabetes. *Skripsi*. Malang: Jurusan Kimia Saintek UIN Malang.

- Nishizawa, M., Kohno, M., Nishimura, M., Kitagawa, A. and Niwano Y. 2005. *Non Reductive Scavenging of 1,1-Diphenyl-2-Picrylhydrazyl (DPPH) by Peroxyradical: A Useful Method for Quantitative Analysis of Peroxyradical*. *Chem. Pharm. Bull*, 53(6): 714 – 716.
- Nuraini, F. 2002. Isolasi dan Identifikasi Tanaman dari Daun Gamal (*Gliricidia seium (jackquin) Kunth ex Walp*. *Skripsi*. Malang:Jurusan Kimia FMIPA Universitas Brawijaya.
- Okuda, T., T. Yoshida, and T. Hatano. 1992. *Pharmacologically Active Tannins Isolated from Medicinal Plants*. In Hemingway, R.W. and P.E. Laks (ed.). *Plant Polyphenols: Synthesis, Properties, and Significance*. New York: Plenum Press.
- Parwata, I. M. O. A., Wiwik, S. R., dan Raditya, Y. 2009. Isolasi dan Uji Antiradikal Bebas Minyak Atsiri pada Daun Sirih (*Piper betle* Linn) secara Spektroskopi Ultra Violet-Tampak. *Jurnal Kimia*, 3(1): 7 – 13.
- Perron, R. N. dan Brumaghim, L. J. 2009. A Review of the Antioxidant Mechanisms of Polyphenol Compounds Related to Iron Binding. *Cell Biochem Biophys*, (53): 75 – 100.
- Poedjiadi, A., dan Supriyanti, T. 1994. *Dasar-Dasar Biokimia*. Jakarta: UI-Press.
- Prakash, A., Rigelhof, F., dan Miller, E. 2001. *Antioxidant Activity*. *Journal of Analytical Chemistry. Medallion Laboratories: Analytical Progress*, 10(2).
- Purwitasari, S. P. 2014. Aktivitas Sitotoksik Ekstrak Kasar Daun Rumput Bambu (*Lopatherum gracile* B.) terhadap Larva Udang *Artemia salina leach* dan Identifikasi Awal Senyawa Aktifnya. *Skripsi*. Malang: Jurusan Kimia Saintek UIN Malang.
- Putri, Z. F. 2010. Uji Aktivitas Antibakteri Ekstrak Etanol Daun Sirih (*Piper betle* L.) terhadap *Propionibacterium acne* dan *Staphylococcus aureus multiresisten*. *Skripsi*. Surakarta: Fakultas Farmasi Universitas Muhammadiyah.
- Rahmawati, F. 2015. Optimasi Penggunaan Kromatografi Lapis Tipis (KLT) pada Pemisahan Senyawa Alkaloid Daun Pulau (*Alstonia scholaris* L. R. Br). *Skripsi*. Malang: Jurusan Kimia Saintek UIN Malang.
- Rizkia, P. 2014. Isolasi dan Identifikasi Senyawa Flavonoid dari Umbi Binahong (*Anredera Cordifolia* (Ten.) Steenis). *Skripsi*. Malang: Jurusan Kimia Saintek UIN Malang.
- Robinson, T. 1995. *Kandungan Senyawa Organik Tumbuhan Tinggi*. Terjemahan oleh Kosasih Padmawinata. Bandung: Penerbit ITB.

- Rosyda, A. I. dan Ersam, T. 2009. Peningkatan Kualitas Kayu (*Instia bijuga*) : Kompleksasi Logam Cu(II), Fe(III) dan Zn(II) oleh Senyawa Tanin. *Prosiding Kimia*. Surabaya: Jurusan Kimia FMIPA Institut Teknologi Sepuluh Nopember.
- Sastrohamidjojo, H. 2007. *Kromatografi*. Yogyakarta: UGM Press.
- Sax, D. dan Lewis, R. 1998. *Dictionary Chemistry*. Canada: Galler International.
- Sa'adah, L. 2010. Isolasi dan Identifikasi senyawa Tanin dari Daun Belimbing Wuluh (*Averrhoa bilimbi* L.). *Skripsi*. Malang: Jurusan Kimia Saintek UIN Malang.
- Shahidi, F., Wanasundoro, U., and Amarowicz,. 1995. *Isolation and Partial Characterization of Oil Seed Phenolics and Evaluation of Their Antioxidant Activity, Dalam Charolambous, editor, Food Flavors; Generation, Analysis and Process Influence*. London: Elvisier Applied Science.
- Shihab, M. Q. 2002. *Tafsir al-Misbah: Pesan, Kesan dan Keserasian al-Quran*. Jakarta: Lentera Hati.
- Sidik, Y. 2012. Isolasi dan Identifikasi Senyawa Tanin dari Ekstrak Air Kulit Batang Kelapa Gading (*Cocos Nucifera* Var. *Eburnea*). <http://www.digilib.stikesbth.ac.id/page.php?pg=dokumen&id=48&title=solasi-dan-identifikasi-senyawa-tanin-dari-ekstrak-air-kulit-batang-kelapa-gading-%28cocos-nucifera-var--eburnea%29>. Diakses tanggal 13 Januari 2015.
- Silalahi, J. 2006. *Makanan Fungsional*. Yogyakarta: Kanisius.
- Soebagio. 2003. *Kimia Analitik II*. Malang: UM Press.
- Sofiandari, A. 2015. Ekstraksi dan Uji Aktivitas Antioksidan Senyawaan Oryzanol dalam Bekatul. *Skripsi*. Malang: Jurusan Kimia Saintek UIN Malang.
- Sudarmadji, S.B., Haryoto dan Suhardi. 2003. *Analisa Bahan Makanan dan Pertanian*. Yogyakarta: Liberty.
- Ummah, M. K. 2010 Ekstraksi dan Pengujian Aktivitas Antibakteri Senyawa Tanin pada Daun Belimbing Wuluh (*Averrhoa bilimbi* L.) (Kajian Variasi Pelarut). *Skripsi*. Malang: Jurusan Kimia Saintek UIN Malang.
- Utami, P. 2008. *Buku Pintar Tanaman Obat*. Jakarta: Agromedia Pustaka

- Wang, Y., Chen, M., Zhang, J., Zhang, X.L., Huang, X.J., Wu, X., Zhang, Q.W., Li, L.L., Ye, W. C. 2012. *Flavone C-glycosides from the Leaves of Lophatherum gracile and Their In Vitro Antiviral Activity. Planta Medicines*, 78: 46 – 51.
- Wijayakusuma, H. 2005. *Atasi Kanker dengan Tanaman Obat*. Jakarta: Puspa Swara.
- Winarno. 2008. *Kimia Pangan dan Gizi*. Jakarta: Gramedia.
- Winarsi, H. 2007. *Antioksidan Alami dan Radikal Bebas*. Yogyakarta: Penerbit Kanisus (Anggota IKAPI).
- Wonorahardjo, S. 2013. *Metode-Metode Pemisahan Kimia*. Jakarta: Akademia permata.
- Yokozawa, T.; Chen, E; Dong, T. Tanaka, G. I. Nonaka, and I. Nishioka. 1998. *Study of inhibitory effect of tannins and flavonoid against the 1,1-diphenyl-2-picrylhydrazyl radical (chemotherapy and metabolic inhibitors)*. *Biochemistry and Pharmacology*, 56(2): 213 – 222.