

BAB IV HASIL DAN PEMBAHASAN

A. Hasil

1. Determinasi tanaman

Identifikasi tanaman kersen (*Muntingia calabura* L.) dilakukan pada tanggal 28 Juni 2024 di Laboratorium Biologi, Fakultas Sains dan Ilmu Terapan, Universitas Ahmad Dahlan dengan nomor 246/Lab.Bio/B/V/2024. Hasil identifikasi tanaman daun kersen terdapat pada **Lampiran 2**.

2. Penyiapan sampel

Sampel daun kersen yang segar dipanen sebanyak 2,3 kg, dibersihkan menggunakan air mengalir agar menghilangkan kotoran, dikering anginkan kemudian dilanjutkan dengan pengeringan menggunakan oven pada suhu 40°C hingga kering. Selanjutnya diserbuk sampel yang sudah kering menggunakan grinder dan diayak menggunakan ayakan 40 mesh yang terdapat pada **Tabel 3**.

Tabel 3. Hasil Sampel Daun Kersen

Daun segar (kg)	Daun kering (kg)	Serbuk (g)
2,3	0,964	400

3. Ekstraksi sampel

Serbuk daun kersen yang telah diperoleh ditimbang sebanyak 200 g, dibagi menjadi 4 kali *running* diekstraksi menggunakan metode UAE dengan pelarut metanol dengan rasio 1:10, artinya 50 g serbuk daun kersen dilarutkan dalam 500 mL pelarut metanol, selama 10 menit pada suhu 40°C. Lalu filtrat disaring menggunakan kain saring. Filtrat yang didapatkan kemudian dipekatkan menggunakan *waterbath* pada suhu 40°C. Hasil rendemen dapat dilihat pada **Tabel 4**.

Tabel 4. Hasil Rendemen Ekstrak Metanol Daun Kersen

Berat simplisia (g)	Berat ekstrak (g)	Rendemen (%)	Literatur (FHI ed.II, 2017)
200	40	20	>10%

4. Kontrol kualitas ekstrak

a. Uji organoleptik

Uji ini dilakukan secara objektif terhadap tekstur, aroma dan warna pada ekstrak metanol daun kersen yang terdapat pada **Tabel 5**. Hasil uji yang dilakukan memiliki kesamaan dengan peneliti terdahulu yaitu oleh Sari (2022).

Tabel 5. Hasil Uji Organoleptik

Parameter	Hasil	Literatur (Sari, 2022)
Tekstur	Kental	Kental
Aroma	Khas	Khas
Warna	Hijau kehitaman	Hijau kehitaman

b. Kadar air

Uji kadar air ini menggunakan alat *Moisture Balance* (**Lampiran 7**). Berdasarkan hasil uji yang telah dilakukan, didapatkan hasil yaitu 2,90% yang terdapat pada **Tabel 6**.

Tabel 6. Hasil Uji Kadar Air

Hasil	Literatur (FHI ed. I, 2008)
2,90%	<10%

5. Identifikasi senyawa tanin secara kualitatif

a. Uji tabung

Uji tabung ini dilakukan untuk mengidentifikasi senyawa tanin yang terkandung dalam ekstrak metanol daun kersen. Hasil uji tabung dapat dilihat pada **Tabel 7**.

Tabel 7. Hasil Uji Tabung

Identifikasi	Hasil	Literatur (Ola et al., 2020)
Tanin	+	+
Asam tanat	+	+

Keterangan: (+): mengandung golongan senyawa

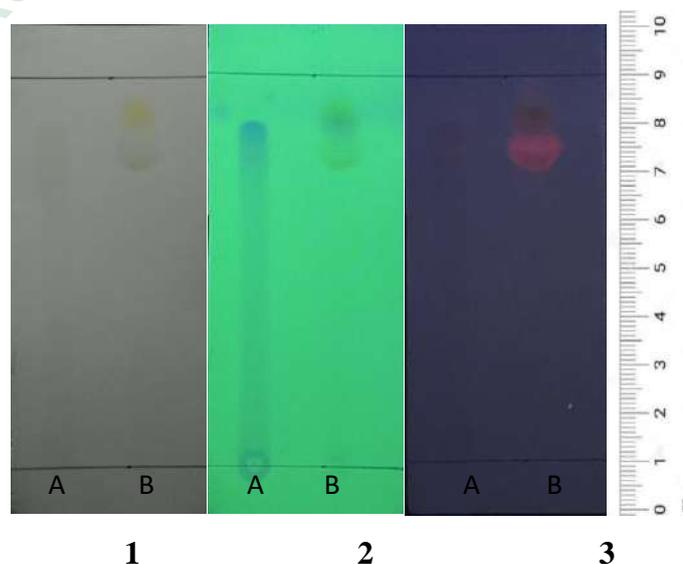
b. Uji KLT

Pengujian KLT pada penelitian ini dilakukan dengan tujuan agar mengetahui ada tidaknya kandungan senyawa tanin pada ekstrak metanol daun kersen. Digunakan asam tanat sebagai standar pembanding. Pada penelitian ini, plat KLT silika gel F₂₅₄ digunakan sebagai fase diam. Selanjutnya, fase gerak dioptimasi 2 kali untuk mencapai hasil yang optimal yang tercantum dalam **Tabel 8**.

Tabel 8. Hasil Uji KLT

No.	Fase Gerak	Hasil
1.	Etanol:etil asetat (9:1)	Terbentuk <i>tailing</i> pada asam tanat
2.	Metanol:etil asetat (8:2)	Bercak asam tanat dibagian atas terlihat naik dan terdapat bercak yang sejajar.

Berdasarkan hasil optimasi fase gerak yang telah dilakukan, dengan konsentrasi 10.000 ppm ekstrak metanol daun kersen dan 10.000 ppm asam tanat standar, fase gerak metanol:etil asetat (8:2) dalam 10 mL dipilih berdasarkan hasil optimasi. Ini karena fase gerak ini adalah yang terbaik untuk memisahkan senyawa tanin dari ekstrak metanol daun kersen. Bercak dapat diamati di bawah sinar UV pada 254 nm dan 366 nm yang terdapat pada **Gambar 6**. Untuk hasil perhitungan nilai R_f dapat dilihat pada **Tabel 9 (Lampiran 8)**.



Gambar 6. Hasil Uji KLT

Keterangan. A. Standar asam tanat, B: Sampel daun kersen, 1: Visualisasi sinar tampak, 2: Deteksi UV 254 nm, 3: Deteksi sinar UV 356 nm.

Tabel 9. Hasil Perhitungan Rf

Sampel	Nilai Rf
Standar	0,862
Ekstrak metanol daun kersen	0,887

6. Penetapan kadar total tanin

a. Penentuan panjang gelombang maksimum

Proses pembacaan gelombang maksimum dilakukan dengan menggunakan larutan asam tanat dengan konsentrasi 80 ppm yang ditambahkan dengan Na_2CO_3 35% dan reagen *Folin Ciocalteu* lalu dibaca dengan alat spektrofotometri UV-Vis pada rentang 400-800 nm dengan interval 1 nm. Hasil menunjukkan bahwa panjang gelombang maksimum yang didapat adalah 752 nm yang terdapat pada **Lampiran 9**.

b. Penentuan *operating time*

Larutan yang digunakan untuk pembacaan OT adalah asam tanat dengan konsentrasi 80 ppm yang ditambahkan dengan Na_2CO_3 35% dan reagen *Folin Ciocalteu*, dibaca absorbansi pada 752 nm dalam waktu 1 jam dengan interval 1 menit. Berdasarkan hasil *operating time* yang telah dilakukan, absorbansi mencapai titik stabil atau konstan pada menit ke-34 yang terdapat pada **Lampiran 10**.

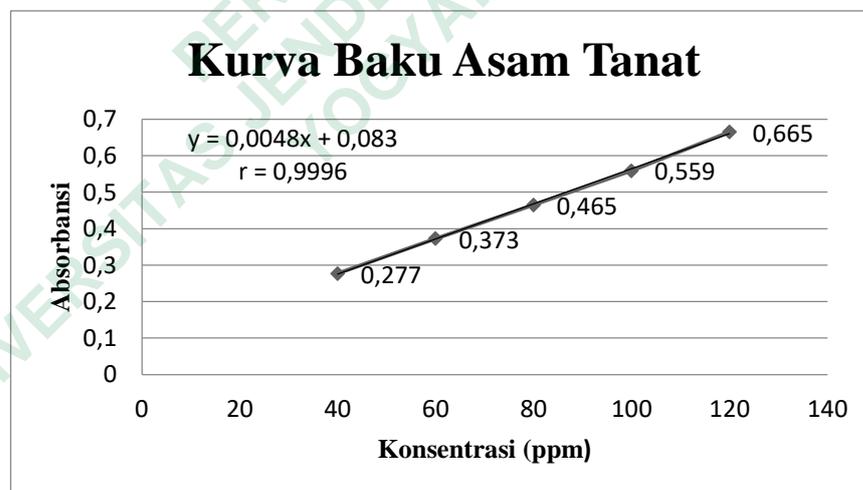
c. Penentuan kurva baku asam tanat

Larutan yang digunakan untuk penentuan kurva baku terbuat dalam seri konsentrasi 40, 60, 80, 100 dan 120 ppm, yang mana dari tiap konsentrasi tersebut dilarutkan dengan Na_2CO_3 35% dan reagen *Folin Ciocalteu* kemudian diinkubasi selama 34 menit yang dibaca absorbansinya pada 752 nm. Hasil pembacaan absorbansi terdapat pada **Tabel 10**.

Tabel 10. Absorbansi Kurva Baku Asam Tanat

Konsentrasi (ppm)	Absorbansi		
	1	2	3
40	0,261	0,253	0,276
60	0,382	0,340	0,363
80	0,483	0,468	0,476
100	0,594	0,579	0,503
120	0,663	0,616	0,686

Pada **Gambar 7.** menunjukkan hasil kurva baku yang diperoleh, didapatkan persamaan regresi antara konsentrasi baku asam tanat (x) dan absorbansi (y) yaitu $y = 0,0048x + 0,083$ dengan nilai r sebesar 0,9996 dimana hasilnya mendekati 1 atau -1, maka dapat diartikan memiliki korelasi antara absorbansi dan konsentrasi yang sangat kuat. Persamaan regresi ini selanjutnya digunakan untuk menghitung kadar total tanin dari ekstrak metanol daun kersen.

**Gambar 7.** Kurva Baku Asam Tanat

d. Penentuan kadar total tanin

Pengujian kadar total tanin dilakukan dengan mengambil larutan sampel 1000 ppm, ditambahkan dengan reagen *Folin Ciocalteu* dan natrium karbonat 35% lalu di *ad aquadest* hingga volume mencapai 5 mL, kemudian larutan tersebut diinkubasi selama 34 menit lalu dibaca absorbansinya pada

gelombang maksimum yaitu 752 nm. Hasil pembacaan absorbansi dapat dilihat pada **Tabel 11**.

Tabel 11. Hasil Absorbansi Sampel

Replikasi	Absorbansi
1	0,852
2	0,831
3	0,836

7. Metode pengolahan dan analisis data

Dilakukan analisis regresi linier menggunakan data absorbansi yang telah diperoleh pada masing-masing konsentrasi standar asam tanat yang digunakan untuk menghitung kadar tanin. Hasil penetapan kadar total tanin dapat dilihat pada **Tabel 12**.

Tabel 12. Hasil Penetapan Kadar Total Tanin Ekstrak Metanol Daun Kersen

Replikasi	Absorbansi	Kadar Terhitung (mg/L)	Kadar Terhitung (mg/mL)	Berat Sampel (g)	Volume Total (mL)	Kadar Tanin (mgTAE/g)
1	0,852	160,208	0,160			80
2	0,831	155,833	0,155	0,01	5	77,5
3	0,836	156,875	0,156			78
		Rata-rata				78,5
		SD				1,322
		CV				1,684%
		SEM				0,763

B. Pembahasan

Pada penelitian ini dilakukan analisis kadar total tanin dari ekstrak metanol daun kersen dengan metode UAE. Daun kersen dipanen pada pagi hari pukul 06.00-10.00 WIB karena pada waktu tersebut belum terjadi proses fotosintesis dan senyawa yang terkandung dalam daun kersen belum terurai, sehingga kandungan metabolit sekunder didalamnya masih

tinggi. Daun dipanen di area Kampus 2 Fakultas Kesehatan Universitas Jenderal Achmad Yani Yogyakarta, yang memiliki kriteria yaitu berwarna hijau tua, daunnya mendatar, tepinya bergerigi dan memiliki ujung yang runcing (Sari, 2022). Setelah dipanen, daun ditimbang terlebih dahulu sebelum disortasi basah dengan air mengalir untuk menghilangkan kotoran yang terdapat dari daun selanjutnya dikering anginkan. Kemudian dilakukan pengeringan menggunakan oven pada suhu 40°C. Ini dilakukan untuk mengurangi jumlah air pada simplisia, yang dapat mencegah penyebaran mikroba dan memperpanjang masa penyimpanan. Setelah itu dilakukan penyerbukan menggunakan *grinder*, untuk memperbesar luas permukaan dan memperkecil ukuran partikel dari sampel agar dapat memudahkan proses penarikan zat aktif oleh pelarut. Setelah didapatkan sampel yang sudah berbentuk serbuk kemudian diayak dengan ayakan 40 mesh agar menyamakan ukuran partikel dari serbuk simplisia, sehingga dalam proses ekstraksi didapatkan hasil yang maksimal. Hasil sampel daun kersen terdapat pada **Tabel 3**.

Serbuk daun kersen kemudian diekstraksi menggunakan metode UAE dengan pelarut metanol. Adapun prinsip dari metode UAE adalah dengan adanya gelombang melewati suatu medium sehingga terbentuk getaran, maka getaran ini akan membentuk gelembung kavitasi dimana akan memecah dinding sel sampel sehingga pelarut akan memasuki bahan. Senyawa yang ada dalam sampel akan keluar ditarik oleh pelarut. Proses ekstraksi ini dilakukan dengan cara menimbang serbuk sebanyak 200 g yang kemudian dibagi menjadi 4 kali *running* dengan rasio 1:10, artinya 50 g serbuk daun kersen dilarutkan dalam 500 mL pelarut metanol, selama 10 menit pada suhu 40°C. Suhu 40°C dipilih karena merupakan suhu yang cocok untuk menarik senyawa tanin dari daun kersen supaya tidak rusak. Metanol dipilih sebagai pelarut dalam penelitian ini karena metanol sendiri memiliki sifat polar, sehingga cocok untuk menarik senyawa tanin dari daun kersen yang juga bersifat polar (Verdiana *et al.*, 2018). Dibandingkan dengan etanol, metanol sendiri memiliki indeks kepolaran lebih besar yaitu

5,1 sedangkan etanol memiliki indeks kepolaran yaitu 4,3 (Rubiyanto, 2017). Sehingga dalam penarikan senyawanya pun lebih maksimal.

Perbandingan persentase berat ekstrak yang diperoleh terhadap berat serbuk daun kersen yang digunakan selama proses ekstraksi dapat digunakan untuk menentukan nilai rendemen ekstrak. Hasil rendemen diperlukan untuk menentukan jumlah ekstrak yang dihasilkan selama ekstraksi. Nilai rendemen yang baik adalah jika nilainya $>10\%$ (Kemenkes RI, 2017). Berdasarkan perhitungan diperoleh rendemen ekstrak sebesar 20% yang terdapat pada **Tabel 4**, artinya rendemen yang dihasilkan dapat tertarik secara maksimal. Setelah dilakukan perhitungan rendemen, maka dilakukan uji kadar air yang bertujuan untuk mengevaluasi dari kualitas ekstrak yang dihasilkan, dimana jika kandungan air terlalu tinggi maka akan menjadi sarana pertumbuhan bakteri dan jamur sehingga dapat merusak senyawa. Syarat kadar air yang baik adalah $<10\%$ (FHI ed. I, 2008), berdasarkan hasil uji kadar air diperoleh hasil 2,90% yang terdapat pada **Tabel 6**, maka dapat dikatakan memenuhi syarat, sehingga metabolit yang terkandung dalam daun kersen juga banyak.

Metode kualitatif untuk mengidentifikasi senyawa tanin yang ditemukan dalam daun kersen menggunakan uji tabung, untuk ekstrak metanol daun kersen dengan penambahan larutan FeCl_3 1% menunjukkan warna hijau kehitaman yang merupakan golongan dari tanin terkondensasi, dan standar asam tanat menunjukkan warna biru kehitaman yang merupakan golongan dari tanin terhidrolisis (**Lampiran 6**), asam tanat digunakan sebagai kontrol positif. Hal ini dikarenakan tanin yang terkandung dalam sampel memiliki senyawa fenolik yang bereaksi dengan FeCl_3 , maka dapat dikatakan positif mengandung tanin. Fungsi penambahan FeCl_3 1% yaitu agar memberikan kompleks warna yang terikat dengan gugus hidroksil pada tanin (Razoki *et al.*, 2023).

Uji kualitatif dengan menggunakan metode Kromatografi Lapis Tipis (KLT) bertujuan untuk mempertegas hasil skrining fitokimia. Hasil yang didapat dari uji KLT ini ialah berupa nilai R_f dan bercak noda pada

plat KLT. Digunakan silika gel F₂₅₄ sebagai fase diam yang bersifat relatif polar, memiliki agen pengikat yaitu silika dengan gipsum dan indikator fluoresen yang berfluoresensi. Plat silika yang digunakan pada penelitian ini sebelumnya diaktivasi terlebih dahulu menggunakan oven pada suhu 100°C selama 30 menit, hal ini ditujukan agar menghilangkan kadar air yang terkandung dalam plat, mempercepat reaksi pembentukan warna dan menghasilkan intensitas warna bercak. Fase gerak yang digunakan ialah hasil optimasi sebelumnya, digunakan metanol:etil asetat (8:2) yang terdapat pada **Tabel 8**. Pemilihan eluen ini didasarkan pada seberapa larut senyawa dalam larutan; etil asetat dipilih karena bersifat semipolar, yang memungkinkan untuk menarik campuran yang bersifat polar dan nonpolar, sedangkan metanol bersifat polar. Kemudian dilakukan penjenuhan dengan cara memasukkan fase gerak ke dalam chamber, setelah itu dimasukkan kertas saring, dimana jika fase gerak membasahi kertas saring atau eluen sudah naik keatas maka dapat dikatakan fase gerak sudah jenuh. Setelah itu dimasukkan plat KLT yang sudah diaktivasi lalu ditutup chamber dan tunggu hingga eluen naik ke atas. Penjenuhan berfungsi untuk memastikan jika proses elusi ini efektif selama proses pemisahan senyawa, karena tekanan uap pelarut juga dapat mempengaruhi hasil pemisahan. Jika plat KLT sudah terelusi, maka kemudian diamati plat KLT dibawah sinar UV 254 nm dan 365 nm yang didasarkan pada prinsipnya jika pada 254 nm, maka plat akan berfluoresensi sedangkan sampel akan berwarna gelap. Pada 365 nm maka plat akan berwarna gelap sedangkan noda yang terdapat pada sampel akan berpendar yang disebabkan oleh interaksi sinar UV dengan gugus kromofor dan ausokrom yang terdapat pada noda sampel (Karima *et al.*, 2019). Hasil dari uji KLT menunjukkan bahwa ekstrak metanol daun kersen berwarna biru pada sinar UV 254 nm. Hal ini menandakan bahwa sampel mengandung tanin. Karena fase gerak yang digunakan bersifat polar, sehingga senyawa yang tertarik tidak hanya tanin, muncul warna kuning pada plat yang menandakan adanya senyawa flavonoid (Ramlah *et al.*, 2019). Setelah itu

dilakukan perhitungan nilai Rf yang dihasilkan oleh standar asam tanat yaitu 0,862 dan ekstrak metanol daun kersen diperoleh hasil yaitu 0,887. Dengan demikian, dapat dikatakan bahwa ekstrak metanol daun kersen menunjukkan adanya kandungan senyawa tanin karena bercak noda yang dihasilkan pada plat menghasilkan warna biru.

Metode *Folin Ciocalteu* digunakan untuk mengetahui jumlah tanin total dalam sampel daun kersen. Asam heteropoli (*Fosfomolibdat-fosfotungstat*) dalam pereaksi *Folin Ciocalteu* akan direduksi menjadi suatu kompleks *Molibdenumtungsten* melalui oksidasi fenolat (garam alkali) atau gugus fenolik-hidroksi (Guntarti *et al.*, 2021). Standar pembanding sampel yang digunakan adalah asam tanat yang merupakan golongan tanin terhidrolisis. Asam tanat identik dengan penentuan kadar total tanin dibandingkan dengan asam galat, jika menggunakan asam galat sebagai standar yang identik dengan penentuan kadar fenolik, dikhawatirkan yang terbaca bukan hanya tanin saja melainkan fenolik juga. Ketika standar asam tanat direaksikan dengan reagen *Folin Ciocalteu* maka akan terbentuk warna kuning kehijauan dan penambahan Na_2CO_3 akan memberikan suasana basa sehingga menghasilkan warna biru dan dapat diukur secara kuantitatif menggunakan spektrofotometri UV-Vis.

Pada penetapan kadar tanin dari ekstrak metanol daun kersen dengan spektrofotometri UV-Vis ini, langkah pertama adalah penentuan panjang gelombang maksimum untuk mengetahui panjang gelombang yang menghasilkan absorbansi yang optimal, didapatkan hasil pada pengukuran adalah 752 nm yang terdapat pada **Lampiran 9**. Hasil pengukuran panjang gelombang tersebut tidak jauh berbeda dengan penelitian yang dilakukan oleh Nurjannah (2017) yaitu 751 nm. Selanjutnya adalah penentuan *operating time*, tujuan dilakukan *operating time* adalah untuk mengetahui seberapa lama waktu yang diperlukan oleh sampel dan reagen bereaksi dengan maksimal, dimana ditandai dengan hasil absorbansi yang sama atau stabil, maka diperoleh hasil absorbansi

yang stabil pada menit ke-34 (**Lampiran 10**). Untuk mengetahui hubungan antara konsentrasi larutan dan nilai absorbansinya, maka dibuat kurva baku asam tanat sehingga diperoleh persamaan regresi linier. Diperoleh hasil $y = 0,0048x + 0,083$ dengan nilai $r = 0,9996$ yang selanjutnya digunakan untuk menghitung kadar total tanin ekstrak metanol daun kersen. Dari nilai r yang mendekati 1, maka nilai korelasi antara konsentrasi dan absorbansi kuat. Berdasarkan hasil kurva baku yang diperoleh bahwa semakin besar konsentrasi maka semakin besar hasil absorbansi yang didapat, artinya konsentrasi dan absorbansi berbanding lurus. Diperoleh hasil pada pengukuran absorbansi sampel yang terdapat pada **Tabel 12**. Berdasarkan perhitungan regresi yang telah dilakukan diperoleh kadar total tanin pada ekstrak metanol daun kersen yaitu sebesar $78,5 \pm 0,763$ mgTAE/g sampel.

Tanin memiliki efek farmakologi sebagai astringen, antidiare, antibakteri dan antioksidan (Fathurrahman & Musfiroh, 2018). Kadar total tanin yang tinggi dipengaruhi oleh nilai rendemen, semakin tinggi rendemen yang dihasilkan maka semakin banyak ekstrak yang dihasilkan. Rendemen berfungsi untuk mengetahui banyaknya senyawa bioaktif yang terbawa pada proses ekstraksi. Pada penelitian yang dilakukan oleh Pambudi *et al* (2021) diperoleh rendemen ekstrak sebesar 31% menggunakan metode maserasi, sedangkan pada penelitian ini diperoleh hasil rendemen ekstrak sebesar 20% menggunakan metode UAE. Hal ini dipengaruhi oleh suhu ekstraksi, pelarut ekstraksi dan waktu ekstraksi (Pambudi *et al.*, 2021).

Sampel yang mengandung kadar tanin tinggi cenderung menghasilkan rendemen ekstrak yang lebih tinggi, terutama jika metode ekstraksi yang digunakan efektif dalam menarik senyawa tanin. Sebaliknya, jika kadar tanin rendah atau proses ekstraksi tidak efisien, maka nilai rendemen ekstrak bisa lebih rendah. Ini berarti bahwa peningkatan dalam kadar total tanin sering kali disertai dengan peningkatan rendemen ekstrak, asalkan kondisi ekstraksi dioptimalkan.