

PENETAPAN KADAR FLAVONOID TOTAL JUS BUAH DELIMA (*Punica granatum* L.) YANG BERPOTENSI SEBAGAI HEPATOPROTEKTOR DENGAN METODE SPEKTOFOTOMETRI UV-VIS

Submitted : 06 Mei 2020

Edited : 22 Desember 2020

Accepted : 29 Desember 2020

Suharyanto, Anisa Dinda Ramadhani

DIII Farmasi

Sekolah Tinggi Ilmu Kesehatan Nasional

Email: suharyanto522@gmail.com

ABSTRACT

*Pomegranate is one of the plants of the Lythraceae family. Pomegranate plants are spread from the subtropics to the tropics, from the lowlands to altitudes below 1000 masl. Pomegranate contains flavonoid compounds that can be used as traditional medicine for hepatoprotectors. The aim of the researcher was to determine the total flavonoid levels in pomegranate juice (*Punica granatum* L) by UV-Vis Spectrophotometry. The method used in the study is the Chang method. Identification of flavonoids with concentrated HCl reagents and magnesium metal causes a change in color to red which indicates a positive sample containing flavonoids. The results of the study showed total flavonoid levels contained in pomegranate juice 0.0075766% QE. Results Variation Coefficient Value (% KV) of the sample is 0.7475%, Variation Coefficient (% KV) is the percentage ratio between the standard deviation and the average. % KV is used in grading to express precision.*

Keywords : *determination, flavonoid, juice, Pomegranate, Total Flavonoids, Spectrophotometry*

PENDAHULUAN

Di Indonesia penyakit hati mempunyai prevalensi yang cukup tinggi. Hepatitis atau radang hati dapat disebabkan oleh berbagai faktor, seperti virus, bakteri, parasit, obat-obatan, alkohol, cacing, atau gizi buruk⁽¹⁾. Adapun penyakit hati lainnya yaitu kerusakan hati. Kerusakan hati terjadi karena adanya radikal bebas, sebagaimana yang telah dibuktikan pada penelitian sebelumnya bahwa buah delima dapat mengeliminasi radikal bebas sehingga dapat digunakan sebagai protektor organ hati akibat dari paparan radikal bebas⁽²⁾.

Penyakit hepar dapat diatasi menggunakan obat baik secara kimia maupun herbal. Tujuan pengobatan

penyakit hepar adalah mengurangi peradangan hati dengan cara menghilangkan atau menekan replikasi virus penyebab kerusakan hati sehingga tidak berlanjut. Sampai saat ini belum ada terapi yang optimal serta biaya terapi mahal, efek samping yang serius, maka para ahli mencoba terapi alternatif seperti terapi herbal⁽³⁾. Oleh karena itu, penelitian ini diharapkan dapat memberikan informasi kepada masyarakat kandungan flavonoid jus buah delima.

Buah delima atau yang dikenal dengan sebutan buah pomegranate, memiliki beberapa senyawa aktif, yaitu alkaloid, flavonoid, saponin, tannin dan triterpenoid⁽⁴⁾. Aktivitas antioksidan

tertinggi ditemukan pada buah delima (*Punica granatum Linn.*) dengan dua tipe komponen polifenol, yaitu flavonoid (antosianin) dan tanin terhidrolisis ⁽⁵⁾. Muruges *et al* (2005) mengatakan bahwa senyawa alami yang dihasilkan oleh tumbuhan seperti flavonoid, terpenoid, dan steroid dapat memulihkan kerusakan hati yang disebabkan parasetamol ⁽⁶⁾. Penelitian mengenai ekstrak polifenol buah delima sebagai hepatoprotektor telah dilakukan oleh Dian, A ,dkk., (2015) yang menyatakan bahwa pemberian ekstrak polifenol buah delima dengan dosis 500 mg/kg BB selama 16 hari perlakuan berfungsi sebagai hepatoprotektor paling baik dalam menghambat kerusakan jaringan hati akibat induksi parasetamol 500 mg/kg BB selama 34 hari ⁽⁷⁾.

Efek proteksi flavonoid penting untuk diaplikasikan pada penyakit-penyakit yang diakibatkan oleh radikal bebas ⁽⁸⁾. Aktivitas antioksidannya mungkin dapat menjelaskan mengapa flavonoid tertentu merupakan komponen aktif tumbuhan yang digunakan secara tradisional untuk mengobati gangguan fungsi hati ⁽⁹⁾.

METODE PENELITIAN

Teknik pengumpulan data

Bahan yang digunakan dalam penelitian ini adalah buah delima (*Punica granatum L.*) segar yang diperoleh di Pasar Gedhe Surakarta, aquadest, AlCl₃, HCl pekat, logam magnesium, standar kuersetin, metanol p.a, kalium asetat.

Alat yang digunakan Spektrofotometri uv-vis; mikropipet, pipet volume, labu ukur, gelas, beaker glass, kuvet, pusbol, tabung reaksi, rak tabung reaksi, batang pengaduk, juicer, kaca arloji, spatel, stopwatch, cawan porselen, kertas saring, pisau, timbangan analitik, nampan, pipet.

Prosedur penelitian

Penyiapan Sampel

Sampel Buah delima (*Punica granatum L.*) diperoleh di pasar Gedhe, Surakarta. Pengambilan sampel dilakukan dengan cara mengambil buah yang berumur 3-4 bulan yang sudah matang, yang berwarna merah dengan kuncup buah yang sudah mekar.

Pengolahan Sampel

Buah delima (*Punica granatum L.*) yang telah diambil, dicuci hingga bersih dengan air kemudian dipotong menjadi dua lalu di ambil bagian buahnya.

Ekstraksi

Sebanyak masing masing 100 gram Buah delima (*Punica granatum L.*) sebanyak tiga kali dilakukan proses pengambilan sari buah dengan diekstraksi menggunakan mesin juicer. Ekstraksi dengan mesin juicer menghasilkan sari buah lebih banyak daripada menggunakan blender. Hasil ekstraksi sari buah delima, kemudian dilakukan penyaringan menggunakan kertas saring untuk pengambilan sari buah delima yang jernih.

Analisis Kualitatif Kandungan Flavonoid

Jus buah delima ditambahkan beberapa tetes HCl pekat dan logam magnesium Adanya flavonoid, diidentifikasi dari terbentuknya warna merah ⁽¹⁰⁾.

Analisis Kuantitatif dan Penetapan Kadar Flavonoid Total

Analisis kuantitatif senyawa flavonoid total dilakukan secara spektrofotometri uv-visibel menggunakan metode Chang ⁽¹¹⁾ Analisisnya dilakukan dengan beberapa langkah sebagai berikut:

Pembuatan Reagen AlCl_3 10%

Serbuk aluminium klorida ditimbang 1 gram lalu dilarutkan dalam beaker glass dengan sebagian aquadest hingga larut sempurna. Masukkan ke dalam labu ukur 10,0 ml dan tambahkan aquadest sampai tanda batas.

Pembuatan CH_3COOK 1 M

Serbuk kalium asetat ditimbang 0,98 gram lalu dilarutkan dalam beaker glass dengan sebagian aquadest hingga larut sempurna. Masukkan ke dalam labu ukur 10,0 ml dan tambahkan aquadest sampai tanda.

Pembuatan Larutan Baku Induk Kuersetin 1000 ppm

Kuersetin ditimbang 100,0 mg lalu larutkan dalam labu ukur 100,0 ml dengan metanol p.a. sehingga didapatkan konsentrasi 1000 ppm.

Pembuatan Larutan kerja induk kuersetin 100 ppm

Larutan baku induk kuersetin 1000 ppm dipipet 1 ml dimasukan ke dalam labu ukur 10 ml, diencerkan dengan metanol pa sampai tanda batas.

Pembuatan Larutan Baku Kerja Kuersetin 8 ppm

Larutan baku induk kuersetin 100 ppm dipipet sebanyak 0,8 ml, dimasukkan dalam labu ukur 10,0 ml, kemudian ditambahkan 3 ml metanol p.a; 0,2 ml AlCl_3 10%; 0,2 ml CH_3COOK 1 M dan diencerkan dengan aquadest sampai tanda batas.

Pembuatan Larutan Blangko

Metanol p.a sebanyak 3 ml dimasukkan kedalam labu ukur 10,0 ml tambahkan 0,2 ml AlCl_3 10%; 0,2 ml

CH_3COOK 1 M dan ditambahkan aquadest sampai tanda batas.

Penentuan *Operating Time* Kuersetin 8 ppm

Larutan baku induk kuersetin 100 ppm dipipet sebanyak 0,8 ml masukkan dalam labu ukur 10,0 ml, kemudian ditambahkan 3 ml metanol p.a; 0,2 ml AlCl_3 10%; 0,2 ml CH_3COOK 1 M dan diencerkan dengan aquadest sampai tanda batas. Larutan dikocok homogen lalu diukur absorbannya pada panjang gelombang maksimum teoritis 428 nm dengan spektrofotometer pada 0-60 menit. Amati kurva hubungan antara waktu dengan absorbansi dan tentukan *operating time*.

Penentuan Panjang Gelombang Maksimum Kuersetin 8 ppm

Larutan baku induk kuersetin 100 ppm dipipet sebanyak 0,8 ml, dimasukkan dalam labu ukur 10,0 ml, kemudian ditambahkan 3 ml metanol p.a; 0,2 ml AlCl_3 10%; 0,2 ml CH_3COOK 1 M dan diencerkan dengan aquadest sampai tanda batas. Dikocok homogen lalu dibiarkan selama waktu *operating time*, diukur absorbannya pada panjang gelombang 250-500 nm dengan spektrofotometer.

Pembuatan Kurva Baku Kuersetin

Deret standar kuersetin 4, 6, 8, 10 dan 12 ppm dibuat dari larutan baku induk 100 ppm. Larutan baku kerja 100 ppm dipipet sebanyak 0,4; 0,6; 0,8; 1,0 dan 1,2 ml kemudian dimasukkan dalam labu ukur 10,0 ml. Selanjutnya ditambahkan 3 ml metanol p.a; 0,2 ml AlCl_3 10%; 0,2 ml CH_3COOK 1 M dan diencerkan dengan aquadest sampai tanda batas. Dikocok homogen lalu dibiarkan selama *operating time* kemudian diukur absorbannya pada panjang gelombang maksimal dengan spektrofotometer. Amati kurva hubungan

antara konsentrasi dengan absorbansi dan tentukan koefisien korelasi.

Penetapan Kadar Flavonoid Total

Larutan sampel jus buah delima dipipet sebanyak 0,2 ml, kemudian dimasukkan ke dalam labu ukur 10,0 ml lalu ditambahkan 3 ml metanol p.a; 0,2 ml AlCl_3 10%; 0,2 ml CH_3COOK 1 M dan aquadest sampai tanda batas, dikocok homogen lalu dibiarkan selama *operating time*, kemudian serapan dari sampel diukur pada panjang gelombang maksimum. Kadar flavonoid dihitung dalam larutan sampel kerja (ppm) dengan memasukkan absorbansi yang diperoleh sebagai nilai Y ke dalam persamaan regresi linier dari kurva baku kuersetin

$$Y = BX + A$$

Keterangan

X = konsentrasi

(ppm) Y = absorbansi

A = intersep

B = slope

Kemudian kadar flavonoid total yang diperoleh masing-masing dihitung koefisien korelasinya (% KV) dari tiga kali pengukuran (triplo).

$$\% KV = \frac{SD}{rata - rata}$$

Keterangan:

% KV = koefisien korelasi

SD = standar deviasi

Rata-rata = rata-rata kadar flavonoid dalam jus

Koefisien variasi digunakan untuk mengetahui kesesuaian analisis atau metode suatu sampel secara berulang-ulang dari sampel yang homogen. Nilai persen KV dikatakan baik jika <2%, hal tersebut

menunjukkan bahwa yang diperoleh dilakukan dengan tingkat ketelitian yang baik.

HASIL DAN PEMBAHASAN

Penyiapan Larutan Uji

Buah delima yang akan dijuicer diperoleh dari pasar Gedhe Surakarta. Buah Delima yang didapatkan dari pasar Gedhe Surakarta disortir basah bertujuan untuk memastikan bahwa bahan baku yang digunakan, sudah benar berasal dari bagian tumbuhan yang dimaksud dan bukan berasal dari bagian tumbuhan lain yang tidak diperlukan.

Pencucian pada buah delima untuk memisahkan bagian yang tidak layak digunakan, pencucian harus dilakukan dengan air bersih, agar tidak mencemari buah. Setelah itu dipotong menjadi dua bagian untuk memudahkan proses pengambilan daging buah delima yang nantinya akan dijuicer.

Hasil pengambilan sari buah delima kemudian di saring menggunakan kertas saring supaya terhindar dari gelembung gelembung udara dan diperoleh hasil bening. Pada penelitian ini senyawa yang akan diteliti adalah flavonoid maka yang diambil adalah sari buah delima yang berbentuk cairan karena flavonoid adalah senyawa yang lebih mudah larut dalam pelarut polar seperti air. Sari buah delima yang didapatkan dari hasil preparasi sampel dengan volume 35 ml, dengan volume yang diperoleh sebanyak 100 gram pada replikasi 1, 35 ml pada replikasi 2, 35 ml pada replikasi 3.

Uji Kualitatif Flavonoid

Hasil uji kualitatif kandungan flavonoid pada sari buah delima dengan penambahan logam Mg dan larutan HCl menunjukkan hasil yang positif. Secara teoritis, sampel yang mengandung flavonoid ketika dilakukan penambahan logam Mg dan

larutan HCl akan menimbulkan perubahan warna menjadi merah atau jingga.

Penambahan logam Mg dan larutan HCl bertujuan untuk mereduksi inti benzopiron yang terdapat di struktur flavonoid kemudian terbentuk garam flavilium. Garam flavilium yang terdapat pada larutan sampel akan berubah warna menjadi warna jingga atau merah. Penambahan HCl mengakibatkan terjadinya reaksi oksidasi reduksi antara logam Mg sebagai pereduksi dengan senyawa flavonoid⁽¹²⁾.

Uji Kuantitatif dan Penetapan Kadar Flavonoid Total

Penetapan kadar flavonoid total dilakukan secara spektrofotometri uv-visibel karena flavonoid memiliki gugus kromofor dan auksokrom. Gugus kromofor adalah gugus yang memiliki ikatan rangkap terkonjugasi, sedangkan gugus auksokrom adalah gugus fungsional yang memiliki pasangan elektron bebas yang terikat pada gugus kromofor. Kandungan total flavonoid dalam ekstrak pada penelitian ini ditetapkan dengan metode Chang, sebagai Quercetin Equivalent (%) dari persamaan kurva baku kuersetin.

Penetapan kadar flavonoid pada sampel dengan Spektrofotometri UV-Vis dapat menggunakan metode Chang atau metode Zhou. Pada praktikum ini penetapan kadar flavonoid dalam sampel menggunakan metode Chang. Kelebihan dari metode Chang adalah metode Chang menghasilkan parameter analitik yang meliputi λ max, operating time, batas deteksi (LOD), rentang linier, kurva kuantifikasi (LOQ) yang baik untuk semua standard flavonoid meliputi flavonoid apigenin, kuersetin, rutin dan hesperidin. Parameter analitik tidak dapat dipenuhi pada metode Zhou yang diterapkan pada apigenin, kuersetin dan hesperidin, sedangkan pada rutin terpenuhi. Metode Chang merupakan metode terpilih untuk analisis flavonoid secara Spektroskopi UV-Vis.

Penentuan operating time

Tujuan perlakuan *operating time* selama 29 menit dimaksudkan agar reaksi berjalan sempurna dan memberikan intensitas warna yang maksimal, sehingga dihasilkan absorbansi larutan yang stabil. *Operating time* kuersetin pada penelitian ini tercapai pada menit ke-29, yang artinya kuersetin setelah direaksikan dengan $AlCl_3$ dan CH_3COOK menghasilkan absorbansi yang stabil pada saat menit tersebut. *Operating time* dari kuersetin adalah pada menit ke-30. Penentuan Operating Time berfungsi untuk mengetahui waktu yang stabil saat sampel jus buah Delima bereaksi sempurna membentuk kompleks dengan reagen pembentukan warna, sehingga dihasilkan absorbansi yang stabil⁽¹²⁾.

Penentuan panjang gelombang maksimum

Pada penelitian ini, panjang gelombang maksimal kuersetin yang diperoleh yaitu 440 nm. Penentuan panjang gelombang maksimal kuersetin dilakukan pada rentang 250-500 nm pada saat tercapai *operating time* yaitu pada menit ke-29 dengan menggunakan larutan 8 ppm. Secara teori, hasil panjang gelombang maksimal untuk suatu senyawa pasti sama meskipun konsentrasi yang digunakan berbeda dan tinggi rendahnya konsentrasi akan mempengaruhi tinggi rendahnya absorbansi, tetapi tidak mempengaruhi panjang gelombang⁽¹³⁾.

Pembuatan kurva baku

Kurva baku kuersetin digunakan untuk mengetahui hubungan korelasi antara konsentrasi dan absorbansi dari kuersetin. Kurva baku kuersetin diperoleh nilai $r = 0,9999$; nilai $A = 0,3600$ dan nilai $B = 0,0250$ sehingga diperoleh persamaan regresi linier $y = 0,0250x + 0,3600$ yang ditunjukkan pada gambar 11. Nilai (koefisien korelasi) r merupakan parameter linearitas kurva. Nilai r digunakan untuk mengetahui linearitas

hubungan antara konsentrasi dan absorbansi, dimana linearitas kurva semakin baik jika nilai r mendekati 1 atau minimal 0,997. Pada penelitian ini korelasi antara konsentrasi dan absorbansi adalah berbanding lurus, yang artinya kenaikan konsentrasi diikuti dengan kenaikan absorbansi. Nilai A merupakan intersep kurva, yaitu titik potong kurva pada sumbu y . Semakin kecil harga A maka penyimpangan juga semakin kecil, sehingga kurva ideal memiliki harga $A = 0$, dengan demikian apabila kurva diperpanjang maka akan melalui titik (0,0). Nilai B merupakan harga kemiringan kurva baku, sehingga menjadi parameter sensitifitas metode pengukuran. Kurva yang representatif memiliki nilai sudut α yang dihasilkan oleh slope kurva baku mendekati 45° , sehingga metode penelitian menjadi semakin sensitif⁽¹³⁾.

Kadar Flavonoid dalam jus buah delima

Rata-rata kadar flavonoid total dalam jus buah delima 0,0075766 % QE (Tabel 1). Kadar flavonoid yang terukur ekuivalen terhadap kuersetin. Nilai Standar Deviasi (SD) dari sampel ditunjukkan pada tabel yaitu $7,5608 \times 10^{-3}$.

Standar Deviasi (SD) adalah nilai statistik yang digunakan untuk menentukan bagaimana sebaran data dalam sampel dan seberapa dekat titik data individu ke mean atau rata-rata nilai sampel. Sebuah standar deviasi dari kumpulan data sama dengan nol menunjukkan bahwa semua nilai-nilai dalam himpunan tersebut adalah sama. Sebuah nilai deviasi yang lebih besar akan memberikan makna bahwa titik data individu jauh dari

nilai rata-rata. Nilai Standar Deviasi (SD) dari jus buah delima sangat kecil atau mendekati nilai nol sehingga dapat diketahui bahwa jus buah delima ketika dilakukan pengukuran triplo menghasilkan kadar flavonoid yang sama atau seragam (Jamaluddin, 2012). Nilai Koefisien Variasi (% KV) dari sampel ditunjukkan pada tabel 3 yaitu 0,7475%, Koefisien Variasi (% KV) adalah persentase perbandingan antara standar deviasi dengan rata-rata. % KV digunakan dalam penetapan kadar untuk menyatakan presisi. Presisi menunjukkan sejauh mana ketepatan dan pengulangan pengukuran dalam kondisi yang tidak berubah menghasilkan hasil yang sama. Nilai koefisien korelasi menunjukkan seberapa dekat perbedaan nilai pada saat dilakukan pengulangan pengukuran. Syarat % KV yang baik adalah kurang dari 2 %, sehingga kadar flavonoid dalam jus buah delima memenuhi syarat parameter presisi. Tetapi kadar flavonoid masih lebih tinggi apabila buah Delima dilakukan penelitian menggunakan metode refluks dibandingkan dengan pengambilan sari buah. Karena pada metode refluks ekstrak yang didapatkan lebih murni sedangkan pada metode jus masih banyak sari yang belum keluar tetapi metode jus lebih aplikatif dalam penerapan di masyarakat.

Dari hasil diatas dapat diketahui korelasi antara kadar flavonoid dengan potensi hepatoprotektor. Semakin tinggi kadar flavonoid maka semakin rendah dosis yang dibutuhkan untuk hepatoprotektor. Rata-rata kadar flavonoid jus buah delima sebesar 0,0075766 % QE dapat sebagai hepatoprotektor.

Tabel 1. Rata-rata kadar flavonoid total dalam jus buah delima

Triplo	Konsentrasi % QE	Metode Refluks %QE
1	0,0075908	
2	0,0075782	
3	0,0075608	
Rata-rata	0,0075766	1,223%
SD	$7,5608 \times 10^{-3}$	
%KV	0,7475	

SIMPULAN

Hasil penetapan kadar flavonoid total pada jus buah delima diperoleh kadar rata-rata sebesar 0,0075766 % QE . Kadar flavonoid yang terukur ekuivalen terhadap kuersetin.

DAFTAR PUSTAKA

1. Ulfa, M., 2008, Efek hepatoprotektif ekstrak etil asetat daun sambung nyawa (*Gynura procumbens* Lour.) terhadap mencit jantan galur swiss terinduksi parasetamol, Skripsi, Universitas Muhammadiyah Surakarta, Surakarta
2. Mills SE., 2007, *Histology for Pathologists Ed ke-3*, Lippincott Williams and Wilkins, USA
3. Merinda, D., 2014, *Hepatoprotective Effect Of Curcumin In Chronic Hepatitis*, Faculty of Medicine, Lampung University, Lampung
4. Yuniarti T., 2008, *Ensiklopedia Tanaman Obat Tradisional*, Pressindo, Yogyakarta
5. Malik, *et al.*, 2005, *Pomegranate fruit juice for chemoprevention and chemotherapy of prostate cancer*, Proc. Natl. Acad. Sci, USA
6. Muruges KS *et al*, 2005, Hepatoprotective and antioxidant role of *Berberis tinctoria* leaves on paracetamol induced hepatic damage in rats, *Irian J Pharmacology and Therapeutics*
7. Dian, A., 2015, Aktivitas Hepatoproteksi Ekstrak Polifenol Buah Delima (*Punica granatum* L.) Terhadap Tikus Putih Yang Diinduksi Parasetamol, Skripsi Fakultas kedokteran Yarsi
8. Winarsi, Hery. 2007., *Antioksidan Alami dan Radikal Bebas*. Kanisius. Yogyakarta
9. Robinson, Trevor., 1995, *Kandungan Organik Tumbuhan Tinggi*. Penerbit ITB, Bandung.
10. Malik, A., Edward, F., & Waris, R., 2013, Skrining Fitokimia dan Penetapan Kandungan Flavonoid Total Ekstrak Metanolik Herba Boroko (*Celosia argentea* L.). *Jurnal Fitofarmaka*, Indonesia, 1 (1)
11. Chang, C. C., Yang, M. H., Wen, H. M., Chern, J. C., 2002, Estimation of total flavonoid content in propolis by two complementary colorimetric methods, *Journal Food Drug Analysis*, Vol.10, No.3
12. Marzuki, Asnah., 2012, *Kimia Analisis Farmasi*, Dua Satu Press, Makassar
13. Aeni, N., 2012, *Spektrofotometer UV-Visible*, Untad Press, Palu