

DETERMINATION OF TOTAL TANIN CONTENTS OF *Terminalia Catappa*, L. LEAF EXTRACT AND TEST OF ITS ABILITY AS A COMPLEXION AGENT OF Fe (III)

Pius D. Ola, Mariana I. Sandri, Antonius R.B. Ola dan Luther Kadang

Jurusan Kimia Fakultas Sains Dan Teknik Universitas Nusa Cendana

Article Received: 20 November 2020

Article Accepted: 06 December 2020

Abstract

In this work, we evaluated the effect of the solvent composition and the time of maceration on the content of tannin extracted from the leaves of *Terminalia Catappa*, L. and evaluation of its ability as complexing agent of Fe (III). Extraction of tannin was carried out using maceration technique with three variations of solvent composition: ethanol 70%, ethanol 50 %, and water, and the times of maceration were 1, 3, and 5 days. The total tannin content in the extract was determined using the spectrophotometry method with Folin Denis as a complexing agent, while the extract's ability to form a complex compound with Fe (III) was conducted using spectrophotometric titration. It was found that average tannin content ranged from 2.215 – 7.741 mg TAE /g. The two-way ANOVA test showed that the solvent composition, maceration time, and the interaction between the two parameters affected the total tannin content obtained. The results of the spectrophotometric titration showed that *Terminalia Catappa*, L. leaf extract could form complexes with Fe (III); still, the total tannin content was not directly proportional to the absorbance values.

Keywords: Tannins, Complexing agent, *Terminalia Catappa*, L., Fe (III)

Abstrak

Telah dilakukan penelitian untuk mengetahui pengaruh komposisi pelarut dan waktu maserasi terhadap kadar tanin total ekstrak daun ketapang (*Terminalia Catappa*, L.) dan uji kemampuannya membentuk kompleks dengan Fe (III). Ekstraksi dilakukan dengan cara maserasi menggunakan tiga komposisi pelarut yaitu etanol 70%, etanol 50% dan air, dengan waktu maserasi 1, 3, dan 5 hari. Kadar tanin total diukur dengan menggunakan spektrofotometer UV-Vis dengan pereaksi Folin Denis sebagai pengompleks, sedangkan uji kemampuan ekstrak dalam membentuk kompleks dengan ion Fe (III) dilakukan dengan titrasi spektrofotometri. Hasil penelitian menunjukkan bahwa kadar tanin total rata-rata berkisar antara 2,215 - 7,741 mg TAE/g. Uji Anova dua arah menunjukkan bahwa komposisi pelarut, waktu maserasi maupun interaksi antara keduanya berpengaruh terhadap kadar tanin total yang diperoleh. Hasil titrasi spektrofotometri menunjukkan bahwa ekstrak daun ketapang dapat membentuk kompleks dengan Fe (III) namun kadar tanin total tidak berbanding lurus dengan nilai absorbansi.

Kata kunci: Tanin, Pengompleks, daun ketapang, Fe (III)

Pendahuluan

Senyawa kompleks merupakan golongan senyawa yang terbentuk dari ikatan kovalen koordinasi antar ion pusat dengan satu atau lebih ligan. Pembentukan senyawa kompleks banyak diaplikasikan dalam analisis ion logam secara spektrofotometri disebabkan karena senyawa kompleks pada umumnya berwarna. Sejauh ini, zat-zat pengompleks yang digunakan untuk analisis tersebut merupakan pengompleks sintetik seperti EDTA, ferozine, asam nitrilotriasetat, 1,10-fenantrolin dan lain-lain. Pengompleks-pengompleks ini terbukti memiliki kemampuan yang baik dalam mengikat ion logam dan telah diaplikasikan secara luas dalam analisis ion logam. Namun kelemahannya adalah tidak menguntungkan ditinjau dari aspek lingkungan maupun ekonomis. Oleh karena itu, maka perlu dicari pengompleks lain yang lebih ramah lingkungan dan murah. Salah satu alternatifnya adalah senyawa organik yang jumlahnya melimpah di alam seperti senyawa golongan polifenol.

Akibat memiliki gugus hidroksil (-OH) dan gugus karboksil (-COOH), tanin yang merupakan senyawa polifenol paling melimpah di alam, dapat dimanfaatkan sebagai pengkhelet logam (Hovart, 1981). Hal ini telah dibuktikan oleh Fajriati (2006), yang menggunakan tanin ekstrak daun teh sebagai pengompleks ion Fe (III)¹. Supriyanto (2011) memanfaatkan tanin dari ekstrak daun gambir sebagai pengompleks ion Cr(III)², Wandari (2018) membuktikan bahwa asam tanat dapat membentuk kompleks dengan ion Cu(II)³. Oleh karena itu diduga bahwa ekstrak jaringan tumbuhan dengan kadar tanin yang tinggi dapat pula digunakan sebagai pengompleks ion-ion logam. Dalam penelitian ini diuji kemampuan ekstrak daun ketapang (*Terminalia Catappa, L.*) sebagai pengompleks ion Fe (III).

Ketapang (*Terminalia Catappa, L.*) merupakan tanaman liar yang banyak tumbuh subur di berbagai daerah di Indonesia. Packirisamy dan Khrisnamorthi (2012), dan Neelavathi (2013) melaporkan bahwa ekstrak etanol daun ketapang mengandung tanin sebesar 11-23 %⁴⁻⁵. Insain, dkk. (2013) melaporkan bahwa ekstrak daun ketapang dapat digunakan sebagai pengompleks untuk analisis Al(III) dalam air limbah industri keramik, di mana penambahan Fe (III) ke dalam campuran dengan rasio Al(III) : Fe (III) = 1 : 1, dapat meningkatkan nilai absorbansi dari 0,321 menjadi 0,628. Hal ini menunjukkan bahwa Fe (III) memiliki kemampuan yang sama baiknya dengan Al(III) dalam membentuk kompleks dengan ekstrak daun ketapang⁶.

Metode ekstraksi tanin dari berbagai jaringan tanaman yang paling banyak digunakan adalah maserasi. Hal ini disebabkan karena teknik ini lebih mudah dan murah karena hanya dilakukan perendaman tanpa pemanasan. Pemanasan pada suhu antara 98,89 °C-101,67°C dapat menyebabkan peruraian tanin menjadi *pyrogallol*, *pyrocatechol*, dan *phloroglucinol*.

Dalam maserasi, faktor yang paling menentukan adalah pelarut dan waktu maserasi. Tiwari dkk. (2011) mengatakan bahwa hampir semua komponen yang diidentifikasi dari tanaman yang berperan aktif terhadap mikroorganisme, paling sering diperoleh melalui ekstrak etanol⁸. Sebelumnya telah dilakukan pengambilan tanin dengan proses ekstraksi diantaranya Monisa (2016) menggunakan ekstraksi etanol dan ekstrak air daun surian menghasilkan tanin 6,24 mg/g dan 5,20 mg/g, serta ekstrak etanol dan ekstrak air kulit batang surian menghasilkan 9,35 mg/g dan 7,61 mg/g⁹. Adapun penelitian sebelumnya yang menggunakan ekstrak etanol daun ketapang menghasilkan tanin 354,02 mg/g¹⁰ (Pandya, dkk., 2013) dan Krishnaveni, dkk. (2015) melaporkan bahwa ekstrak air daun ketapang menghasilkan tanin 250,00 mg/g¹¹. Namun belum diketahui bagaimana pengaruh komposisi pelarut (etanol-air) terhadap ekstraksi tanin. Oleh karena itu maka dalam penelitian ini juga diuji pengaruh komposisi pelarut (etanol-air) dan waktu maserasi terhadap kadar tanin total yang diperoleh.

Hasil dan Pembahasan

Preparasi ekstrak

Preparasi sampel bertujuan untuk mendapatkan sampel daun ketapang yang siap diekstraksi untuk mendapatkan ekstrak daun ketapang. Sampel yang digunakan merupakan daun ketapang hijau dan segar. Sampel daun ketapang dikeringkan selama 14 hari diperoleh daun kering berwarna hijau pudar.

Proses selanjutnya adalah penyerbukan, yang bertujuan untuk mendapatkan sampel dengan ukuran partikel yang kecil. Ukuran partikel yang kecil memperbesar luas permukaan kontak dengan pelarut sehingga dapat memaksimalkan penarikan komponen-komponen aktif dalam daun oleh pelarut. Hasil maserasi sebanyak 10 gram serbuk halus dalam 50 mL pelarut untuk tiap-tiap variasi komposisi pelarut dan waktu maserasi, setelah disaring diperoleh filtrat daun ketapang. Filtrat hasil ini tidak dievaporasi karena memiliki kandungan air yang tinggi, sehingga langsung digunakan untuk uji selanjutnya.

Karakterisasi ekstrak

Sebelum digunakan untuk uji lebih lanjut, ekstrak terlebih dahulu diuji kandungan metabolit sekundernya (uji skrining fitokimia). Hasil pengujian metabolit sekunder disajikan pada Tabel 1. Ekstrak yang diuji adalah hasil maserasi dengan etanol 70 % selama 3 hari. Hasil uji pada Tabel 1 menunjukkan bahwa ekstrak etanol daun ketapang mengandung

tanin dan flavonoid dalam kadar yang lebih tinggi dibandingkan dengan jenis metabolit sekunder lainnya.

Penetapan kadar tanin total

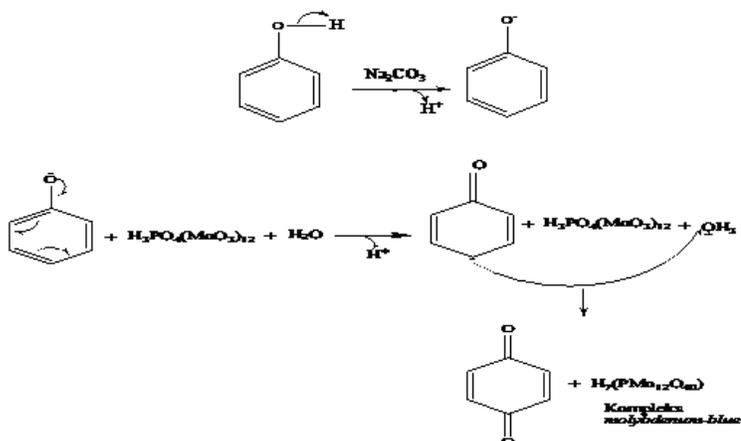
Penetapan Panjang Gelombang Maksimum (λ_{maks})

Pengukuran panjang gelombang maksimum dilakukan dengan menggunakan larutan baku asam tanat 1 ppm menggunakan pereaksi Folin Denis pada 400-800 nm. Pereaksi Folin Denis digunakan sebagai pengompleks asam tanat yang hanya dapat bereaksi dengan baik dalam kondisi basa menghasilkan kompleks berwarna biru. Natrium karbonat digunakan untuk memberikan suasana basa tersebut. Mekanisme reaksi ditunjukkan pada Gambar 1, sedangkan spektra kompleks asam tanat-pereaksi Folin Denis ditunjukkan pada Gambar 2.

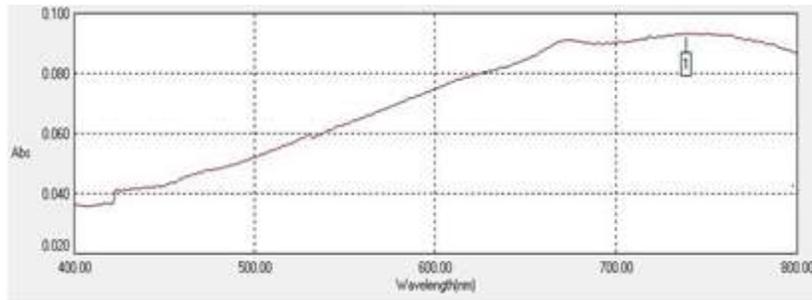
Tabel 1. Hasil uji skrining fitokimia ekstrak daun Ketapang

Uji	Pereaksi	Warna/Endapan	Kesimpulan
Alkaloid	Wagner	Merah Bata	+
Flavonoid	Mg + HCl Pekat	endapan coklat	+++
Tanin	FeCl ₃ 1%	Biru Kehitaman	+++
Saponin	Aquades + HCl pekat	Tidak Berbuih	-
Triterpenoid	Lieberman-Burchard	Coklat-Merah	+

+ = mengandung senyawa (intensitas warna rendah).
 +++ = mengandung senyawa (intensitas warna tinggi).
 - = tidak mengandung senyawa.



Gambar 1. Mekanisme reaksi pembentukan kompleks antara asam tanat dengan pereaksi Folin-Denis

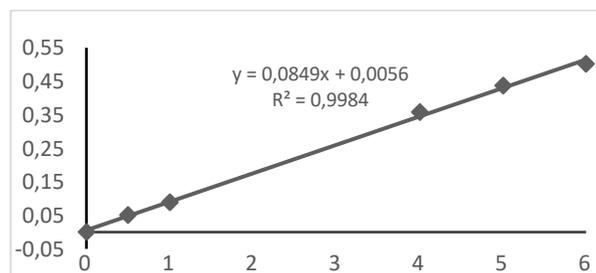


Gambar 2. Spektra panjang gelombang maksimum asam tanat

Dari hasil pengukuran diperoleh panjang gelombang maksimum 739 nm. Menurut Apsari dan Susanti (2011), panjang gelombang maksimum dari tanin berkisar antara 600-850 nm¹². Oleh karena panjang gelombang ekstrak berada pada kisaran ini maka panjang gelombang maksimum ekstrak (739 nm) diduga merupakan kontribusi dari senyawa tanin yang ada dalam ekstrak, yang dalam uji fitokimia menunjukkan konsentrasi paling tinggi (selain flavonoid) dibandingkan dengan metabolit sekunder yang lain. Pengukuran absorbansi selanjutnya baik untuk larutan standar maupun larutan sampel dilakukan pada panjang gelombang ini.

Penetapan kurva baku asam tanat

Oleh karena warna biru yang dihasilkan oleh kompleks asam tanat-pereaksi Follin Denis berbanding lurus dengan kadar asam tanat¹², maka dapat digunakan untuk membuat kurva kalibrasi seperti terlihat pada Gambar 3.



Gambar 3. Kurva standar asam tanat

Hasil pengukuran diperoleh nilai $R^2 = 0,998$ dan persamaan regresi liner $Y = 0,0849x + 0,0056$.

Penetapan Kadar Tanin Total Ekstrak

Pencampuran ekstrak dengan pereaksi Folin Denis pada suasana basa menghasilkan larutan warna biru tinta. Hasil pengukuran absorbansi setiap larutan sampel dari setiap

komposisi pelarut dan waktu maserasi didapatkan nilai kadar total tanin seperti disajikan pada Tabel 2. Berdasarkan data pada Tabel 2, diketahui bahwa kadar tanin hasil ekstraksi tidak mengikuti trend (kecenderungan tertentu). Oleh karena itu maka perlu dilakukan uji statistik (Anova dua arah) untuk mengetahui berpengaruh atau tidaknya kedua parameter uji (komposisi pelarut dan lama perendeman) terhadap kadar tanin.

Analisis pengaruh variasi komposisi pelarut dan waktu perendaman terhadap kadar total tanin menggunakan *TWO WAY ANOVA*

Untuk memperoleh kesimpulan berpengaruh atau tidaknya komposisi pelarut dan waktu maserasi terhadap kadar tanin total, maka dilakukan uji Two way Anova. Hasil analisis disajikan pada Tabel 3, dimana berpengaruh atau tidaknya variabel uji ditentukan oleh nilai signifikansi (sig). Nilai signifikansi yang kurang dari 0,05 (sig.< 0,05) menunjukkan adanya perbedaan yang nyata.

Data pada Tabel 3 menunjukkan bahwa baik komposisi pelarut, waktu maserasi dan inetraksi antara keduanya memiliki nilai signifikansi masing-masing 0,001, 0,006 dan 0.004 (< 0,05) yang berarti H_0 ditolak atau terdapat perbedaan yang signifikan antara komposisi pelarut (etanol 70 %, 50 % dan air), waktu maserasi (1, 3, dan 5 hari), dan interaksi keduanya terhadap kadar tanin total.

Tabel 2. Kadar tanin total ekstrak etanol daun ketapang

Perendaman (hari)	Komposisi pelarut	Replikasi	Absorbansi	Kadar tanin (mg TAE/g)	Rerata (mg TAE/g)
1	Etanol 70%	1	0.050	5,229	6,681
		2	0.064	6,878	
		3	0.073	7,938	
	Etanol 50%	1	0.053	5,583	7,074
		2	0.076	8,292	
		3	0.068	7,349	
	Air	1	0.086	9,469	7,741
		2	0.059	6,289	
		3	0.069	7,467	
3	Etanol 70%	1	0.078	8,527	7,585
		2	0.060	6,407	
		3	0.072	7,821	
	1	0.415	4,822		

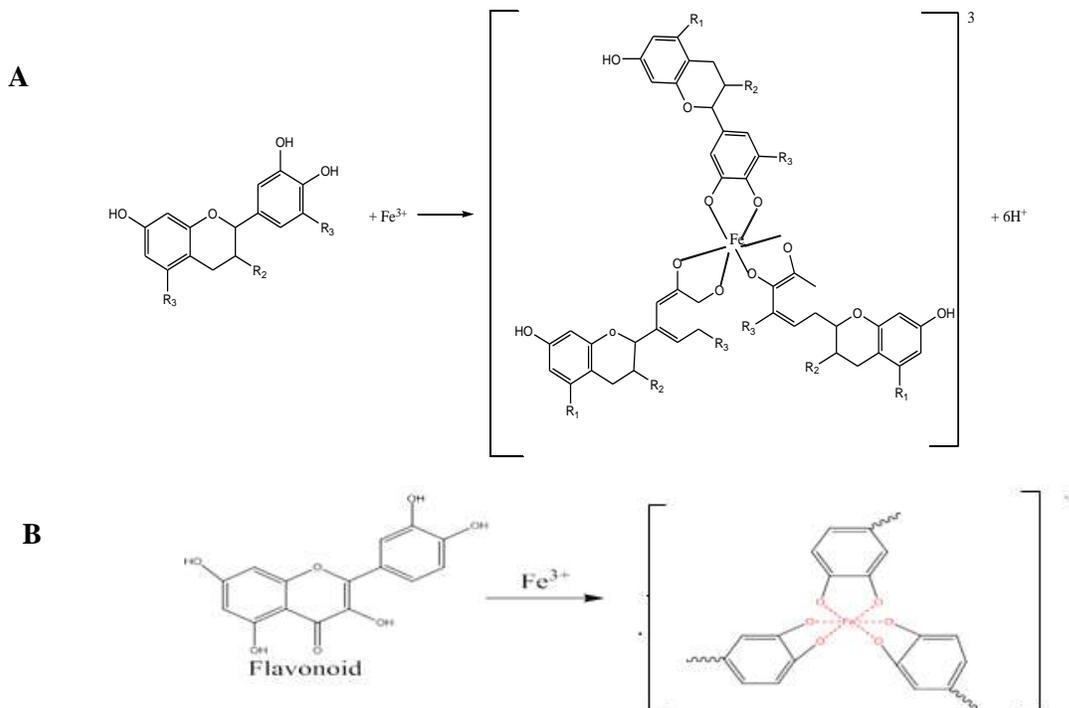
5	Etanol 50%	2	0.065	6,996	6,624
		3	0.074	8,056	
		1	0.050	0,523	
	Air	2	0.337	3,903	2,215
		3	0.194	2,219	
		1	0.445	5,175	
	Etanol 70%	2	0.053	5,583	5,878
		3	0.064	6,878	
		1	0.056	5,936	
	Etanol 50%	2	0.060	6,407	6,289
		3	0.061	6,525	
		1	0.300	3,467	
Air	2	0.211	2,419	3,153	
	3	0.309	3,573		

Tabel 3. Data ANOVA

Source	Type III Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
Corrected Model	94.662 ^a	10	9.466	6.271	0.001
Intercept	944.963	1	944.963	626.041	0.000
Komposisi pelarut	32.282	2	16.141	10.693	0.001
Perendaman	21.704	2	10.852	7.189	0.006
Jenispelarut*Perendaman	36.080	4	9.020	5.976	0.004
Error	24.151	16	1.509		

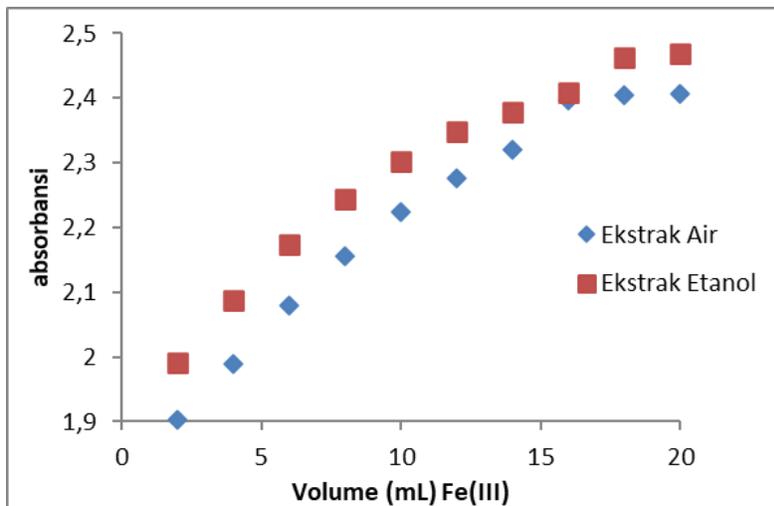
Uji kemampuan ekstrak sebagai pengompleks ion Fe (III)

Oleh karena ekstrak daun ketapang mengandung tanin dan flavonoid dalam konsentrasi yang lebih tinggi dibandingkan dengan metabolit sekunder yang lain maka dihipotesiskan bahwa ekstrak dapat digunakan sebagai pengompleks ion Fe (III). Reaksi pembentukan kompleks antara tanin dan flavonoid dengan ion (Fe (III)) ditunjukkan pada Gambar 4.



Gambar 4. Perkiraan reaksi pembentukan kompleks antara ion Fe (III) dengan tanin (A), flavonoid (B)

Untuk menguji kemampuan ekstrak dalam membentuk kompleks dengan ion Fe (III) maka digunakan dua jenis ekstrak dengan kadar tanin berbeda dan dari pelarut yang berbeda yaitu ekstrak air hari ke-1 dengan kadar tanin 6,591 mg TAE/g dan ekstrak etanol 70 % hari ke-3 dengan kadar tanin 6,433 mgTAE/g. Kompleks antara tanin dengan ion Fe (III) dapat terbentuk pada pH antara 3-6. Oleh karena itu maka digunakan larutan buffer pH 4. Uji dilakukan dengan menggunakan titrasi spektrofotometri, dan hasilnya ditampilkan pada Gambar 5.



Gambar 5. Kurva titrasi spektrofotometri ekstrak daun ketapang dengan larutan Fe (III)

Gambar 5 menunjukkan bahwa semakin meningkat volume ion logam maka semakin besar pula nilai absorbansi. Hal ini menunjukkan bahwa semakin besar jumlah ion Fe (III) yang ditambahkan maka semakin besar pula konsentrasi spesi yang menyerap radiasi, yang berarti pula bahwa semakin besar konsentrasi kompleks yang terbentuk antara ion Fe (III) dengan tanin yang terdapat dalam ekstrak. Pada penambahan ion Fe (III) sebesar 16 mL (untuk ekstrak air) dan 18 mL (untuk ekstrak etanol), absorbansi larutan relatif tidak mengalami perubahan. Hal ini menunjukkan bahwa pada titik ini, komponen dalam ekstrak yang membentuk kompleks dengan ion Fe (III), yang diduga adalah tanin, semuanya telah bereaksi dengan ion Fe (III).

Berdasarkan kadar tanin dalam ekstrak di mana ekstrak air memiliki kadar tanin yang lebih tinggi dibandingkan dengan ekstrak etanol, maka baik nilai absorbansi maupun volume larutan Fe (III) yang dibutuhkan untuk mencapai titik ekuivalen untuk ekstrak air seharusnya lebih besar dari pada ekstrak etanol. Namun hipotesis ini berbeda dengan hasil pengamatan, di mana baik nilai absorbansi maupun volume larutan Fe (III) yang dibutuhkan untuk mencapai titik ekuivalen untuk ekstrak etanol lebih besar dari ekstrak air. Hal ini dapat dijelaskan sebagai berikut: meskipun air memiliki kemampuan yang lebih baik dalam mengekstraksi tanin, namun tanin yang diekstraksi oleh pelarut air adalah yang memiliki kemampuan rendah dalam membentuk kompleks dengan Fe (III). Hal sebaliknya terjadi pada pelarut etanol. Meskipun etanol memiliki kemampuan yang relatif rendah dalam mengekstraksi tanin namun tanin yang dihasilkan adalah yang memiliki kemampuan lebih baik dalam membentuk kompleks dengan Fe (III). Oleh karena itu, jika tanin yang diekstraksi digunakan sebagai pengompleks ion logam, maka direkomendasikan untuk menggunakan pelarut etanol. Secara keseluruhan, ekstrak daun ketapang yang mengandung tanin dapat membentuk kompleks dengan ion Fe (III), namun

kadar tanin total tidak berbanding lurus dengan nilai absorbansi, yang berarti bahwa tidak semua tanin dapat membentuk kompleks yang dapat mengabsorpsi radiasi pada daerah sinar tampak.

Kesimpulan

Berdasarkan hasil penelitian dapat disimpulkan bahwa secara keseluruhan komposisi pelarut dan waktu perendaman berpengaruh terhadap kadar tanin melalui uji ANOVA, setelah diuji lanjut menggunakan *Tukey* rata-rata kadar tanin pada perlakuan air memiliki beda nyata dibandingkan dengan perlakuan etanol 70% dan etanol 50%, sementara itu juga perlakuan perendaman hari ke-1 memiliki beda nyata dibandingkan hari ke-3 dan ke-5. Kadar tanin yang diperoleh berkisar dari 2,215 -7,741 mg TAE/g. Ekstrak daun ketapang yang mengandung tanin dapat membentuk kompleks dengan ion Fe (III), namun kadar tanin total tidak berbanding lurus dengan nilai absorbansi.

Daftar Pustaka

1. Fajriati. 2006. Optimasi Metode Penentuan Tanin (Analisis Tanin Secara Spektrofotometri dengan Pereaksi Orto-Fenantrolin). *Kaunia*, Vol. II, No. 2
2. Supriyanto, R. 2011. Studi Analisis Spesiasi Ion Logam Cr(III) dan Cr(IV) dengan Asam Tanat dari Ekstrak Gambir Menggunakan Spektrometri UV-Vis. *Jurnal Sains MIPA*. 17 (1) : 35-42
3. Wandari. 2018. *Studi Analisis Ion Logam Cu(II) Dengan Asam Tanat Menggunakan Spektrofotometer Ultraungu-Tampak*. Skripsi. Fakultas Matematika Dan Ilmu Pengetahuan Alam Universitas Lampung
4. Packirisamy, P. dan Khrisnamorthi, V. 2012. Evaluation of Proximate Composition and Phytochemical analysis of *Terminalia catappa* L. from Nagapattinam Region. *International Journal of Science and Research*
5. Neelavathi. 2013. Antibacterial Activities Of Aqueous And Ethanolic Extracts Of *Terminalia Catappa* Leaves And Bark Against Some Pathogenic Bacteria. *International Journal of Pharmacy and Pharmaceutical Sciences*, Vol 5, Issue 1
6. Insain, I., Khonyoung, S., Sooksamiti. 2013. Green Analytical Methodology Using Indian Almond (*Terminalia Catappa* L.) Leaf for Determination of Aluminium Ion in Waste from Ceramic Factories. *Journal Analytical Chemistry*. Japan.
7. Browning, B. L. 1966. *Methods Of Wood Chemistry*. Vol 1. No. 2. New York Interscience Publisher
8. Tiwari, M. 2011. Science Behind Human Iiva. *Jurnal of Natural Science, Biology, and Medicine*. Vol 2 Issue .1
9. Monisa, F. S., dkk., 2016. Potensi Ekstrak Tanin Daun dan Kulit Batang Surian Sebagai Penghambat α -Glukosidase (Tannin Extract Potential Of Surian Leaf And Bark as α -Glukosidase Inhibitor). *Jurnal Ilmu Teknologi Kayu Tropis* Vol. 14 No. 2. Bogor. Departemen Biokimia, Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan
10. Pandya, N. B., dkk., 2013. Antitumor and antioxidant status of *Terminalia catappa* against Ehrlich ascites carcinoma in Swiss albino mice. *Indian Journal Of Pharmacology*, Vol. 45. No. 5

11. Krishnaveni, M., 2015. A Preliminary Study on Terminalia catappa L. Leaf, Stem. *Research J. Pharm. and Tech.* Vol. 8, No.12
12. Apsari, P.D., and Susanti, H., 2011. Perbandingan Kadar Fenolik Total Ekstrak Metanol Kelopak Merah dan Ungu Bunga Rosella (*Hibiscus sabdariffa* Linn) secara Spektrofotometri. *Prosiding Seminar Nasional Home Care*. Fakultas Farmasi dan Kesehatan Masyarakat UAD. Yogyakarta

Metode

Prosedur

Preparasi Sampel

Daun ketapang dicuci untuk menghilangkan debu dan pengotor lainnya yang melekat pada bahan, kemudian dipotong kecil-kecil dan dikeringkan. Pengeringan dilakukan dengan cara diangin-anginkan pada suhu kamar untuk selama 14 hari. Simplisia kering kemudian blender kemudian dan diayak dengan ayakan 60 mesh.

Tahap ekstraksi

Sebanyak 10 g serbuk halus dimasukkan ke dalam wadah maserasi dan ditambahkan 50 mL pelarut. Maserasi dilakukan secara triplo. Dilakukan pengadukan sesering mungkin, agar pelarut tercampur secara merata. Setelah waktu yang ditentukan, sampel disaring menggunakan kertas saring. Filtrat dari masing-masing penyaringan digunakan untuk pengujian selanjutnya.

Uji Fitokimia

Uji Flavonoid

Sebanyak 2 gram ekstrak daun ketapang dimasukan kedalam tabung reaksi kemudian ditambahkan 1 mL akuades lalu dipanaskan sampai mendidih selama 5 menit. Setelah itu disaring dan filtratnya digunakan sebagai larutan uji. Filtrat dimasukkan kedalam tabung reaksi lalu ditambahkan 0.1 gram pita Mg dan 1 mL HCl pekat. Uji positif flavonoid ditandai dengan terbentuknya warna merah bata.

Uji Alkaloid

Sebanyak 0.1 gram ekstrak dimasukan kedalam tabung reaksi kemudian ditambahkan 1 mL HCl pekat dan 2 mL akuades lalu dipanaskan sampai mendidih selama 5 menit. Setelah itu disaring dan filtratnya digunakan sebagai larutan uji. Filtrat dimasukkan

kedalam tabung reaksi lalu ditambahkan Reagen Wagner sebanyak 3 tetes. Uji positif flavonoid ditandai dengan terbentuknya endapan coklat.

Uji Triterpenoid

Sebanyak 5 mL ekstrak dimasukkan kedalam tabung reaksi kemudian ditambahkan 2 mL kloroform (CHCl_3) dan 3 mL H_2SO_4 . Uji positif triterpenoid ditandai dengan terbentuknya warna coklat kemerahan.

Uji Saponin

Sebanyak 0.1 gram sampel dimasukkan kedalam tabung reaksi kemudian ditambahkan 1 mL air panas dan dididihkan selama 5 menit. Setelah itu, disaring dan filtratnya digunakan sebagai larutan uji. Filtratnya dimasukkan kedalam tabung reaksi kemudian dikocok selama \pm 10 detik dan dibiarkan selama 10 menit lalu ditambahkan 1 mL HCl pekat. Adanya saponin ditunjukkan dengan terbentuknya buih yang stabil.

Tanin

Sebanyak 0.2 gram ekstrak ditambahkan dengan 1 ml air panas lalu dididihkan selama 5 menit dan disaring. Filtratnya ditambahkan 3 tetes FeCl_3 1%. Hasil positifnya ditunjukkan oleh terbentuknya warna hijau kehitaman.

Penetapan Kadar Tanin Ekstrak Secara Spektrofotometri UV-Vis

Kadar tanin dari berbagai variasi komposisi pelarut dan waktu perendaman ditentukan dengan mengikuti metode yang telah dilakukan oleh Sthepanie (2008) yaitu sebagai berikut :

Pembuatan kurva kalibrasi

Ditimbang secara seksama \pm 0,05 g asam tanat, ditambahkan dengan akuades dalam labu 50 mL. Diambil sebanyak 0,5; 1,0; 2,0; 3,0; 4,0; 5,0; dan 6,0 mL, masing-masing dimasukkan ke dalam 7 buah labu ukur 10 mL ditambah dengan akuades sampai tanda batas sehingga diperoleh seri konsentrasi 50; 100; 200; 300; 400; 500; dan 600 ppm. Sebanyak 0,5 mL larutan, masing-masing dimasukan ke dalam 7 buah labu ukur 50 mL yang mengandung 1,2 mL reagen Folin Denis yang telah diencerkan dengan akuades 1:1. Didiamkan selama 2 menit, kemudian ditambah 3,7 mL Na_2CO_3 1,9 M dan diencerkan dengan akuades sampai tanda batas. Diperoleh seri konsentrasi standar asam tanat 0,5; 1; 2; 3; 4; 5; dan 6 ppm. Larutan

standar ini diukur absorbansinya pada panjang gelombang maksimum yang telah ditentukan terlebih dahulu dengan menggunakan salah satu larutan standar. Kurva kalibrasi dibuat dengan memplot absorbansi sebagai fungsi konsentrasi. Dari kurva kalibrasi maka dapat diketahui persamaan regresi linear ($Y = ax + b$) dan koefisien korelasi (R). Persamaan ini digunakan untuk menentukan konsentrasi tanin dalam sampel.

Penetapan kadar tanin total dalam ekstrak daun ketapang

Ekstrak dari masing-masing komposisi pelarut dan waktu ekstraksi ditimbang $\pm 0,05$ g, lalu dimasukkan ke dalam labu ukur 50 mL dan diperlakukan dengan cara yang sama seperti pada larutan standar. Hasil berupa kadar tanin dihitung dengan memasukkan nilai absorbansi sampel ke dalam persamaan kurva baku asam tanat, sehingga diperoleh nilai ekivalensi larutan uji terhadap asam tanat. Konsentrasi tanin total dinyatakan sebagai mg ekivalen asam tanat per gram ekstrak dihitung dengan menggunakan rumus:

$$\text{Kadar tanin total} = \frac{C.V. \cdot FP}{m}$$

C = Kadar tanin larutan (nilai x) dalam mg TAE/g yang dihitung berdasarkan persamaan regresi linear, v = volume larutan uji (mL), m = massa ekstrak yang ditimbang (gram), FP = faktor pengenceran

Analisis Data

Untuk melihat apakah ada pengaruh komposisi pelarut dan waktu perendaman terhadap kadar tanin yang diperoleh maka dilakukan analisis menggunakan Rancangan *Anova* dua arah ($\alpha = 0,05$), dengan rancangan percobaan seperti terlihat pada Tabel di bawah ini:

Komposisi Pelarut	Waktu Maserasi (hari)								
	B1			B3			B5		
Etanol 70 % (A1)	A1B1	A1B1	A1B1	A1B3	A1B3	A1B3	A1B5	A1B5	A1B5
Etanol 50 % (A2)	A2B1	A2B1	A2B1	A2B3	A2B3	A2B3	A2B5	A2B5	A2B5
Air (A3)	A3B1	A3B1	A3B1	A3B3	A3B3	A3B3	A3B5	A3B5	A3B5

Hipotesis:

- Pengaruh komposisi pelarut terhadap kadar tanin total

H_0 = Tidak ada perbedaan nyata antara komposisi pelarut yang digunakan terhadap kadar tanin total.

H_1 = Ada perbedaan nyata antara komposisi pelarut yang digunakan terhadap kadar tanin total.

- Pengaruh waktu perendaman terhadap kadar total tanin

H_0 = Tidak ada perbedaan nyata antara waktu perendaman terhadap kadar total tanin.

H_1 = Ada perbedaan nyata antara waktu perendaman terhadap kadar total tanin.

- Pengaruh interaksi antara komposisi pelarut dan lama waktu perendaman terhadap kadar total tanin.

H_0 = Tidak ada perbedaan nyata antara komposisi pelarut dan waktu perendaman terhadap kadar tanin total.

H_1 = Ada perbedaan nyata antara komposisi pelarut dan waktu perendaman terhadap total kadar

Uji ekstrak sebagai pengompleks ion Fe (III)

Sebanyak 5 mL ekstrak 100 mg/L dipindahkan ke dalam erlenmeyer, ditambahkan masing-masing 45 mL larutan buffer asetat pH 4 yang dibuat dengan menambahkan natrium asetat 0,1 M ke dalam asam asetat hingga pH 4. Ke dalam campuran ditambahkan larutan Fe (III) 100 mg/L (dalam HCl 0,1 M). Setiap penambahan 2 mL larutan Fe (III), campuran dihomogenkan dan absorbansi diukur hingga total penambahan 20 mL. Dibuat kurva titrasi absorbansi versus volume larutan Fe (III). Nilai absorbansi relatif tidak mengalami perubahan setelah titik ekuivalen.