

BAB I

PENDAHULUAN

A. Latar Belakang Masalah

Penggunaan obat tradisional sejak zaman dahulu hingga sekarang telah lama digunakan, baik di negara maju maupun di negara berkembang. *World Health Organization (WHO)* menyatakan hampir 80% manusia menggantungkan dirinya pada tumbuh-tumbuhan sebagai bahan obat dalam memelihara kesehatan (Choirul, 2003). Pemakaian bahan herbal alami untuk menangani penyakit dipercaya dapat membantu memberikan efek kesembuhan dengan memanfaatkan golongan senyawa aktif yang terkandung pada bahan herbal tersebut seperti senyawa aktif golongan flavonoid dan fenolik (Dalimartha, 2007).

Tanaman herbal yang banyak mengandung senyawa aktif golongan flavonoid dan fenolik salah satunya adalah tanaman rambutan. Rambutan merupakan salah satu tumbuhan yang banyak dibudidayakan di Indonesia untuk dimanfaatkan buahnya. Rambutan merupakan tanaman buah tropis asli Indonesia dan Malaysia (Janssens *et al.*, 2013) namun saat ini banyak ditemukan di daratan yang mempunyai iklim subtropis (Firman, 2012). Penelitian terdahulu melaporkan bahwa ekstrak kulit buah rambutan dan biji rambutan mengandung senyawa aktif golongan flavonoid dan polifenol (Wardhani dan Supartono, 2015). Hariana (2012) menyatakan bahwa kulit batang rambutan mengandung senyawa aktif golongan flavonoid, tanin dan saponin. Pelarut etil asetat dapat menarik senyawa

flavonoid dan fenol total dengan menunjukkan kandungan tertinggi. (Putranti, 2013).

Artanti *et al.*, (2006) menyatakan bahwa sejumlah tanaman obat yang mengandung flavonoid dilaporkan memiliki aktivitas antioksidan, antibakteri, antivirus, antiradang, antialergi dan antikanker. Senyawa aktif golongan fenolik memiliki aktivitas sebagai antioksidan (Atmoko dan Ma'ruf, 2009). Winarsih (2007) menyatakan konsumsi antioksidan dalam jumlah memadai dilaporkan dapat menurunkan kejadian penyakit degeneratif, seperti kardiovaskular, kanker, aterosklerosis, dan osteoporosis.

Tanaman rambutan dapat memberikan khasiat apabila telah diketahui kadar flavonoid dan fenolik totalnya. Berdasarkan penelitian yang dilakukan Siringoringo (2014), hasil isolasi senyawa flavonoid ekstrak etanol kulit batang rambutan fraksi etil asetat adalah senyawa flavonoid golongan isoflavon. Beberapa metode yang dapat digunakan untuk penetapan kadar suatu senyawa yaitu metode spektrofotometri UV-Visibel (Gandjar dan Rohman, 2008). Spektrofotometri UV-Visibel dan absorbansi merupakan cara tunggal yang paling berguna untuk menetapkan kadar flavonoid dan fenolik (Markham, 1988).

Dari permasalahan di atas maka perlu dilakukan penelitian mengenai validasi metode penetapan kadar fenolik dan flavonoid total pada fraksi etil asetat ekstrak etanol dari kulit batang rambutan. Penelitian ini bertujuan untuk mengetahui kadar senyawa aktif golongan flavonoid dan fenolik total serta memberikan jaminan bahwa metode yang digunakan untuk penetapan kadar sudah tervalidasi. Penelitian ini, kulit batang rambutan diekstraksi dengan pelarut etanol

kemudian difraksinasi dengan etil asetat. Tujuan dilakukan fraksinasi adalah untuk memisahkan senyawa-senyawa yang ada berdasarkan polaritasnya. Fraksi-fraksi yang diperoleh mungkin menunjukkan sifat kimia dan sifat senyawa yang khas dari pada ekstrak awalnya (Sarker *et al.*, 2006). Fraksi etil asetat ekstrak etanol kulit batang rambutan dilakukan uji fitokimia dan uji validasi serta dilakukan penetapan kadar flavonoid dan fenolik total.

B. Perumusan Masalah

Berdasarkan uraian latar belakang di atas, rumusan permasalahan pada penelitian ini adalah :

1. Apakah validasi metode penetapan kadar fenolik dan flavonoid pada fraksi etil asetat ekstrak etanol kulit batang rambutan menggunakan spektrofotometri UV-Visibel memenuhi syarat presisi, akurasi, linieritas, LOD dan LOQ?
2. Apakah aplikasi metode penetapan kadar fenolik dan flavonoid pada fraksi etil asetat ekstrak etanol pada kulit batang rambutan dapat dilakukan?

C. Tujuan Penelitian

Tujuan dilakukan penelitian ini adalah :

1. Melakukan validasi metode penetapan kadar fenolik dan flavonoid pada fraksi etil asetat ekstrak etanol dari kulit batang rambutan.
2. Mengaplikasikan metode penetapan kadar fenolik dan flavonoid pada fraksi etil asetat ekstrak etanol dari kulit batang rambutan.

D. Manfaat Penelitian

Penelitian bermanfaat dalam rangka pengembangan fraksi etil asetat ekstrak etanol dari kulit batang rambutan sebagai senyawa yang berkhasiat dalam pengobatan. Kedepannya, masyarakat diharapkan dapat menggunakan produk herbal kulit batang rambutan. Penelitian ini diharapkan dapat menambah bukti ilmiah mengenai kadar flavonoid dan fenolik total dari kulit batang rambutan, serta untuk membuktikan adanya senyawa aktif golongan fenolik dan flavonoid pada fraksi etil asetat ekstrak etanol dari kulit batang rambutan. Penelitian ini juga memberikan bukti dan kebenaran bahwa metode penetapan kadar fenolik dan flavonoid memenuhi persyaratan uji validasi.

E. Tinjauan Pustaka

1. Tanaman Rambutan (*Nephelium lappaceum* L.)

a. Deskripsi Tanaman Rambutan

Rambutan termasuk dalam keluarga *Sapindaceae* dengan ordo *Sapindales*. Tanaman rambutan merupakan tanaman buah-buahan tropis asli Indonesia, dan saat ini telah menyebar luas di daerah beriklim tropis seperti Filipina dan negara-negara di Amerika Latin. Penyebaran tanaman rambutan yang pada awalnya sangat terbatas hanya di daerah tropis saja, saat ini sudah bisa ditemui di daratan yang beriklim subtropis. Rambutan banyak ditanam sebagai tanaman buah, dan kadang-kadang ditemukan tumbuh liar. Tumbuhan rambutan memerlukan iklim lembab dengan curah hujan tahunan paling sedikit 2.000 mm. Rambutan merupakan tanaman dataran rendah, hingga

ketinggian 300-600 m di bawah permukaan laut. Pohon dengan tinggi 15-25 m ini mempunyai banyak cabang. Jenis-jenis rambutan yang banyak terdapat di Indonesia adalah Rambutan Rapih, Aceh, Lebak bulus, Simacan, Binjai, Garuda, dan lain-lain (Mahisworo,1998). Tanaman rambutan dapat dilihat pada gambar 1.



Gambar 1. Tanaman Rambutan (GRIN, 2010)

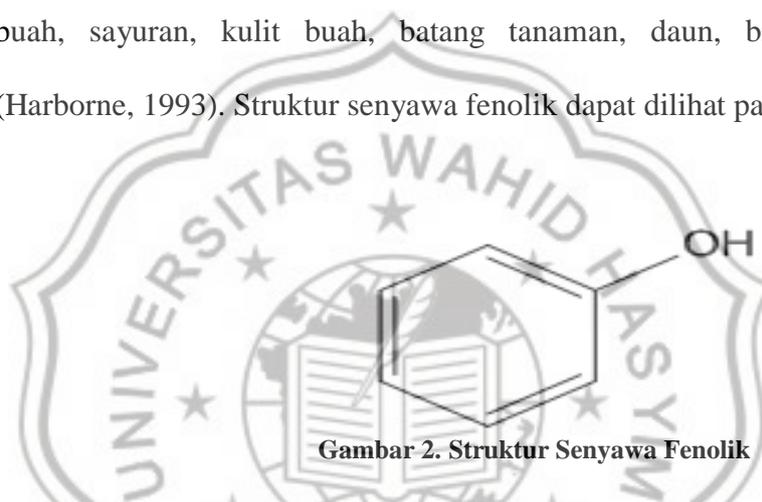
b. Klasifikasi Tanaman

Menurut (Mahisworo, 1998) tanaman rambutan diklasifikasikan sebagai berikut:

Kingdom : Plantae
 Divisio : Magnoliophyta
 Kelas : Magnoliopsida
 Ordo : Sapindales
 Familia : Sapindaceae
 Genus : *Nephellium*
 Spesies : *Nepphellium lappaceum* L.

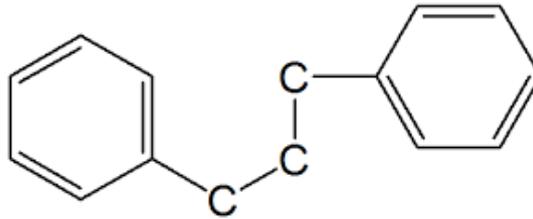
c. Kandungan Kimia

Polifenol merupakan senyawa turunan fenol yang mempunyai aktivitas sebagai antioksidan (Hernani dan Raharjo, 2006). Senyawa fenolik memiliki ciri yaitu mempunyai cincin aromatik yang mengandung satu atau dua gugus hidroksi dan bersifat mudah larut dalam air (Harborne, 1987). Senyawa fenolik banyak terkandung dalam tanaman seperti pada buah, sayuran, kulit buah, batang tanaman, daun, biji dan bunga (Harborne, 1993). Struktur senyawa fenolik dapat dilihat pada gambar 2.



Gambar 2. Struktur Senyawa Fenolik

Flavonoid merupakan senyawa polifenol yang tersebar luas di alam, sesuai struktur kimianya yang termasuk flavonoid yaitu flavonol, flavon, flavanon, katekin, antosianidin dan kalkon (Harborne, 1987). Golongan flavonoid dapat digambarkan sebagai deretan senyawa C₆-C₃-C₆. Artinya, kerangka karbonnya terdiri atas dua gugus C₆ (cincin benzen tersubstitusi) disambungkan oleh rantai alifatik tiga-karbon. Pengelompokan flavonoid dibedakan berdasarkan cincin heterosiklik-oksigen tumbuhan dan gugus hidroksil yang tersebar menurut pola yang berlainan pada rantai C₃ (Robinson, 1995). Struktur Senyawa golongan flavonoid dapat dilihat pada gambar 3.



Gambar 3. Struktur Senyawa Flavonoid (Robinson, 1995)

d. Khasiat

Bagian utama yang berguna untuk bahan pangan yaitu buahnya. Adapun kegunaan tanaman rambutan adalah sebagai bahan pangan. Bagian yang dapat dikonsumsi dari tanaman ini yaitu buahnya. Buah rambutan banyak mengandung zat gizi yang diperlukan tubuh. Tanaman rambutan mempunyai khasiat dalam pengobatan diantaranya sebagai antioksidan (Tjandra *et al.*, 2011) dan sebagai anti jamur (Frendsiane *et al.*, 2010). Akar tanaman rambutan mempunyai khasiat untuk membantu mengobati demam, kulit kayu untuk berkhasiat membantu mengobati radang mulut, dan daunnya membantu mengobati sakit kepala (Sunarjono, 2000).

2. Ekstraksi

Ekstraksi adalah kegiatan penarikan kandungan kimia yang dapat larut sehingga terpisah dari bahan yang tidak larut dengan pelarut cair. Senyawa aktif yang terdapat dalam berbagai simplisia dapat digolongkan ke dalam golongan minyak atsiri, alkaloid, flavonoid dan lain-lain. Pengetahuan terhadap kandungan senyawa aktif yang terdapat dalam simplisia akan

mempermudah pemilihan pelarut dan cara ekstraksi yang tepat (DepKes, 1986).

Ekstraksi dapat dilakukan dengan beberapa macam metode, tergantung dari tujuan ekstraksi, jenis pelarut yang digunakan, serta senyawa aktif yang dikehendaki. Salah satu metode ekstraksi adalah perkolasi. Perkolasi adalah ekstraksi dengan pelarut yang selalu baru sampai sempurna. Perkolasi umumnya dilakukan pada temperatur ruangan. Proses perkolasi terdiri dari beberapa tahapan diantaranya: pengembangan, tahap maserasi antara, tahap perkolasi sebenarnya terus-menerus sampai diperoleh ekstrak (perkolat). Cara perkolasi lebih baik dibandingkan dengan cara maserasi karena aliran cairan penyari menyebabkan adanya pergantian larutan yang terjadi dengan larutan yang konsentrasinya lebih rendah, sehingga meningkatkan derajat perbedaan konsentrasi. Ruang antara butir-butir serbuk simplisia membentuk saluran tempat mengalir cairan penyari. Karena kecilnya saluran kapiler tersebut, maka kecepatan pelarut cukup untuk mengurangi lapisan batas, sehingga dapat meningkatkan perbedaan konsentrasi (Depkes, 2000).

3. Fraksinasi

Fraksinasi merupakan cara pemisahan yang bertujuan untuk memisahkan senyawa golongan utama dari kandungan yang satu dengan kandungan yang lain. Fraksinasi dapat dilakukan secara partisi maupun kromatografi. Pemisahan senyawa dengan proses partisi dipengaruhi terutama oleh perbedaan polaritas solut yang dipisahkan. Hal ini disebabkan karena polaritas merupakan faktor yang menentukan daya larut (Adnan, 1997).

Senyawa yang bersifat polar akan masuk ke pelarut polar dan senyawa non polar akan masuk ke pelarut non polar (Harborne, 1987). Pada proses partisi sistemnya terdiri dari dua jenis pelarut yang berbeda polaritasnya. Hal ini menyebabkan dua jenis pelarut tidak dapat campur. Campuran solut tidak sama kelarutannya pada kedua jenis pelarut sehingga dapat terjadi pemisahan (Adnan, 1997). Campuran dua komponen dimasukkan dalam pelarut, kemudian dimasukkan ke dalam corong pisah dan dikocok agar bercampur sempurna. Setelah itu, dibiarkan sampai pelarut keduanya memisah (Syukri, 1999).

4. Uji Fitokimia

Uji fitokimia adalah serangkaian cara untuk menentukan golongan senyawa aktif dari suatu tumbuhan. Menurut Robinson (1991) alasan dilakukan uji fitokimia adalah untuk menentukan ciri senyawa aktif penyebab efek racun atau efek yang bermanfaat, yang ditunjukkan oleh ekstrak tumbuhan kasar bila diuji dengan sistem biologis. Pemanfaatan prosedur uji fitokimia telah mempunyai peranan yang sudah berkembang dalam semua cabang ilmu tumbuhan.

Uji fitokimia merupakan bagian dari ilmu farmakognosi yang mempelajari metode atau cara analisis kandungan kimia yang terdapat dalam tumbuhan atau hewan secara keseluruhan atau bagian-bagiannya, termasuk cara isolasi atau pemisahannya (Moelyono, 1996). Keanekaragaman dan jumlah struktur molekul yang dihasilkan oleh tumbuhan banyak sekali, demikian juga laju pengetahuan tentang hal tersebut. Kandungan kimia

tumbuhan dapat digolongkan menurut beberapa cara. Pengolahan didasarkan pada asal biosintesis, sifat kelarutan dan adanya gugus fungsi kunci tertentu (Harborne,1984).

5. Validasi Metode Analisis

Validasi metode analisis adalah suatu tindakan penelitian terhadap parameter tertentu, berdasarkan percobaan dari laboratorium, untuk membuktikan bahwa parameter tersebut memenuhi persyaratan untuk penggunaannya (Harmita, 2004). Suatu tes atau instrumen pengukuran dapat dikatakan mempunyai validitas yang tinggi apabila alat tersebut menjalankan fungsi ukurnya, atau memberikan hasil ukur yang sesuai dengan maksud dilakukannya pengukuran tersebut. Beberapa parameter yang dipertimbangkan dalam validasi metode analisis meliputi:

a. Kecermatan (*Accuracy*)

Kecermatan adalah ukuran yang menunjukkan derajat kedekatan hasil analisis dengan kadar analit yang sebenarnya. Kecermatan dinyatakan sebagai persen perolehan kembali (*recovery*) analit yang ditambahkan (Harmita, 2004). Kecermatan ditentukan dengan dua cara yaitu metode simulasi (*spiked placebo recovery*) atau metode penambahan baku (*standard addition methode*). Dalam metode simulasi, sejumlah analit bahan murni ditambahkan ke dalam campuran pembawa sediaan farmasi (plasebo) lalu campuran tersebut dianalisis dan hasilnya dibandingkan dengan kadar analit yang ditambahkan (kadar yang sebenarnya). Pada metode penambahan baku, sampel dianalisis lalu

sejumlah tertentu analit yang diperiksa ditambahkan ke dalam sampel dicampur dan dianalisis lagi dengan metode tersebut. Selisih kedua hasil dibandingkan dengan kadar yang sebenarnya. Dalam kedua metode tersebut, persen perolehan kembali dinyatakan sebagai rasio antara hasil yang diperoleh dengan hasil yang sebenarnya. Persen perolehan kembali dapat ditentukan dengan cara membuat sampel plasebo (ekspien obat, cairan biologis) kemudian ditambah analit dengan konsentrasi tertentu (biasanya 80%-120% dari kadar analit yang diperkirakan), kemudian dianalisis dengan metode yang akan divalidasi. Bila tidak dimungkinkan membuat sampel plasebo karena matriknya tidak diketahui seperti obat-obatan paten, atau karena analitnya berupa suatu senyawa endogen misalnya metabolit sekunder pada kultur kalus, maka dapat dipakai metode adisi (Harmita, 2004).

b. Keseksamaan (*precision*)

Keseksamaan adalah ukuran yang menunjukkan derajat kesesuaian antara hasil uji individual, diukur melalui penyebaran hasil individual dari rata-rata jika prosedur diterapkan secara berulang pada sampel-sampel yang diambil dari campuran yang homogen (Harmita, 2004). Keseksamaan diukur sebagai simpangan baku atau simpangan baku relatif (koefisien variasi). Keseksamaan dapat dinyatakan sebagai keterulangan (*repeatability*) atau ketertiruan (*reproducibility*). Keterulangan adalah keseksamaan metode jika dilakukan berulang kali oleh analis yang sama pada kondisi sama dan interval waktu yang pendek. Keterulangan dinilai

melalui pelaksanaan penetapan terpisah lengkap terhadap sampel-sampel identik yang terpisah dari *batch* yang sama, jadi memberikan ukuran keseksamaan pada kondisi yang normal. Ketertiruan adalah keseksamaan metode jika dikerjakan pada kondisi yang berbeda. Biasanya analisis dilakukan dalam laboratorium-laboratorium yang berbeda menggunakan peralatan, pereaksi, pelarut dan analisis yang berbeda pula. Analisis dilakukan terhadap sampel-sampel yang diduga identik yang dicuplik dari *batch* yang sama. Kriteria seksama diberikan jika metode memberikan simpangan baku relatif atau koefisien variasi 2% atau kurang. Akan tetapi kriteria ini sangat fleksibel tergantung pada konsentrasi analit yang diperiksa, jumlah sampel dan kondisi laboratorium. Dari penelitian dijumpai bahwa koefisien variasi meningkat dengan menurunnya kadar analit yang dianalisis. Ditemukan bahwa koefisien variasi meningkat seiring dengan menurunnya konsentrasi analit. Pada kadar 1% atau lebih standar deviasi relatif antara laboratorium adalah sekitar 2,5 %, pada satu per seribu adalah 5%. Pada kadar satu per sejuta (*ppm*) *Relative Standard Deviation* (RSD) nya adalah 16%, dan pada kadar part per billion (*ppb*) adalah 32%. Pada metode yang sangat kritis, secara umum diterima bahwa RSD harus lebih kecil atau sama dengan <2% (Harmita, 2004).

c. Selektivitas

Selektivitas atau spesifitas suatu metode adalah kemampuan dalam mengukur suatu zat tertentu secara cermat dan seksama dengan adanya komponen lain yang mungkin ada dalam sampel (Harmita, 2004). Dalam

teknik pemisahan, daya pisah atau (resolusi) antara analit yang dituju dengan pengganggu lainnya harus lebih dari 1,5 (Rohman, 2009).

d. Linieritas

Linieritas adalah kemampuan metode analisis yang memberikan respon yang secara langsung atau dengan bantuan transformasi matematik yang baik, proposional terhadap konsentrasi analit dalam sampel (Harmita, 2004). Linieritas biasanya dinyatakan dalam istilah variasi sekitar arah garis regresi yang dihitung berdasarkan persamaan matematik data yang diperoleh dari hasil uji analit dalam sampel dengan berbagai konsentrasi analit. Dalam beberapa kasus, untuk memperoleh hubungan proposional antara hasil pengukuran dengan konsentrasi analit, data yang diperoleh diolah melalui transformasi matematik dulu sebelum dibuat analisis regresinya (Harmita, 2004). Dalam praktek, digunakan satu seri larutan yang berbeda konsentrasi antara 50-150% kadar analit dalam sampel. Sebagai parameter adanya hubungan linier digunakan koefisien korelasi r pada analisis regresi linier $y = a + bx$. Hubungan linier yang ideal dicapai jika nilai $a = 0$ dan $r = +1$ atau -1 bergantung pada arah garis. Nilai b menunjukkan kepekaan analisis terutama instrumen yang digunakan. Parameter lain yang harus dihitung adalah simpangan baku residual (Harmita, 2004).

e. Batas Deteksi dan Batas Kuantitasi

Batas deteksi (LOD/*limit of detection*) adalah jumlah terkecil analit dalam sampel yang dapat dideteksi yang masih memberikan respon

signifikan dibandingkan dengan blanko. Batas deteksi merupakan parameter uji batas (Harmita, 2004). Cara yang paling umum untuk menghitung LOD adalah menetapkan jumlah sampel yang dapat memberikan perbandingan sinyal terhadap gangguan atau *signal to noise* (S/N) 2:1 atau 3:1, dan yang lebih sering digunakan adalah 3:1 (Lister, 2005). Definisi LOD yang umum digunakan adalah kadar analit yang memberikan respon sebesar respon blanko, Y_B , ditambah simpangan baku blanko (S_B). Jadi, $Y - Y_B = 3S_B$. (Miller dan Miller, 1998).

Batas kuantitasi (*LOQ/limit of quantitation*) adalah parameter pada analisis renik dan diartikan sebagai kuantitas terkecil analit dalam sampel yang masih memenuhi kriteria cermat dan seksama (Harmita, 2004). LOQ seringkali didasarkan pada nilai *signal to noise* (S/N) = 10 (Snyder dkk., 1997). Batas kuantifikasi sering digunakan sebagai batas bawah untuk pengukuran kuantitatif yang tepat. Nilai $Y_B + 10 S_B$ disarankan untuk batas kuantifikasi ini (Miller dan Miller, 1998).

6. Spektrofotometri

Spektrofotometri serapan ultraviolet dan serapan sinar tampak merupakan cara tunggal yang paling berguna untuk menganalisis flavonoid (Markham, 1988). Spektrofotometer UV-Vis merupakan teknik spektroskopik yang memakai sumber radiasi elektromagnetik ultraviolet dekat (190-380 nm) dan sinar tampak (380-780 nm) dengan memakai instrument spektrofotometer. Spektrofotometer UV-Vis melibatkan energi elektronik yang cukup besar pada molekul yang dianalisis sehingga

spektrofotometer UV-Vis lebih banyak digunakan untuk analisis kuantitatif dibandingkan kualitatif (Mulja dan Suharman, 1995). Semua molekul mempunyai energi dan jika suatu molekul bergerak dari suatu tingkat energi ke tingkat energi yang lebih rendah maka beberapa energi akan dilepaskan. Energi ini hilang sebagai radiasi dan dikatakan telah terjadi emisi radiasi. Jika suatu molekul dikenai suatu radiasi elektromagnetik pada frekuensi yang sesuai sehingga energi molekul tersebut ditingkatkan ke level yang lebih tinggi maka terjadi peristiwa penyerapan absorpsi energi oleh molekul (Gandjar dan Rohman, 2008). Serapan cahaya oleh suatu molekul dalam daerah spektrum UV-Vis tergantung pada struktur elektronik molekul (Mulja dan Suharman, 1995). Banyaknya sinar yang diabsorpsi pada panjang gelombang tertentu sebanding dengan banyaknya molekul yang menyerap radiasi (Gandjar dan Rohman, 2008).

F. Landasan Teori

Kandungan senyawa fenolik dan flavonoid terdapat banyak di tumbuhan salah satunya tanaman rambutan. Kulit dan biji rambutan dilaporkan mengandung flavonoid dan polifenol (Dalimartha, 1999). Penelitian penapisan fitokimia yang dilakukan oleh Asrianti *et al.*, (2006) juga melaporkan bahwa biji buah rambutan memberikan hasil positif terhadap golongan senyawa flavonoid.

Berdasarkan penelitian Siringoringo (2014) menyatakan bahwa pelarut etanol dan etil asetat dapat menarik senyawa aktif flavonoid dan fenolik.

Spektroskopi serapan ultraviolet dan serapan sinar tampak merupakan cara tunggal yang paling berguna untuk menetapkan kadar flavonoid dan fenolik (Markham, 1988). Perbedaan metode, alat dan cara penetapan kadar suatu senyawa dapat memberikan hasil yang berbeda-beda sehingga metode penetapan kadar perlu dilakukan validasi.

G. Hipotesis

1. Metode penetapan kadar fraksi etil asetat ekstrak etanol dari kulit batang rambutan memenuhi persyaratan uji validasi dan mengandung senyawa aktif golongan flavonoid dan fenolik.
2. Mengaplikasikan metode penetapan kadar fenolik dan flavonoid pada fraksi etil asetat ekstrak etanol kulit batang rambutan.