

# LAPORAN PENELITIAN

## EKSTRAKSI, ISOLASI, DAN UJI KEAKTIFAN SENYAWA AKTIF BUAH MAHKOTA DEWA (*PHALERIA MACROCARPA*) SEBAGAI PENGAWET MAKANAN ALAMI



**Disusun Oleh:**

**Dr. Tedi Hudaya, ST, MEngSc  
Susiana Prasetyo, ST, MT  
Anastasia Prima Kristijarti, SSi, MT**

**Lembaga Penelitian dan Pengabdian kepada Masyarakat  
Universitas Katolik Parahyangan  
November 2013**

# DAFTAR ISI

DAFTAR ISI.....	1
ABSTRAK.....	4
BAB I PENDAHULUAN.....	5
1.1 Latar Belakang.....	5
1.2 Tujuan Umum dan Khusus.....	7
BAB II TINJAUAN PUSTAKA.....	11
2.1 Zat Aktif dalam Tanaman dan Peranannya sebagai Zat Warna dan Pengawet Alami.....	11
2.2 Jenis dan Mekanisme Kerja Antioksidan Sebagai Pengawet Alami Pangan.....	12
2.3 Zat Aktif Mahkota Dewa : Kandungan, Aktivitas dan Metode Isolasinya.....	13
2.4. Metode Pengujian Senyawa Aktif dalam Mahkota Dewa.....	15
2.4.1 Uji Keaktifan Antioksidan.....	15
2.4.2 Uji Antimikroba.....	16
2.4.3 Uji Fitokimia.....	16
2.4.3.1 Analisis Kadar Sari Larut Air.....	16
2.4.3.2 Analisis Kadar Sari Larut Etanol.....	17
2.4.3.3 Uji Alkaloid.....	17
2.4.3.4 Uji Tanin.....	18
2.4.3.5 Uji Saponin.....	19
2.4.3.6 Uji Flavonoid.....	20
2.4.3.7 Uji Triterpenoid dan Steroid.....	20
2.4.4 Uji Kestabilan Zat Warna.....	21
2.5 Roadmap Penelitian.....	22
BAB III METODE PENELITIAN.....	23
BAB IV JADWAL PELAKSANAAN.....	25
BAB V HASIL DAN PEMBAHASAN.....	33

5.1 Bahan Penelitian .....	33
5.2 Peralatan Penelitian .....	34
5.3 Prosedur Penelitian .....	34
5.3.1 Penentuan Kecepatan Pengadukan .....	34
5.3.2 Optimasi Perlakuan Awal .....	36
5.3.3 Perbandingan Kualitatif Ekstrak Metanol Murni dan Petroleum Eter-Metanol .....	37
5.3.4 Penelitian Utama .....	38
5.4 Rancangan Percobaan .....	40
5.4.1 Rancangan Percobaan Penelitian Pendahuluan .....	40
5.4.2 Rancangan Percobaan Penelitian Utama .....	41
5.5 Analisis .....	42
5.6 Laporan Kemajuan Penelitian .....	43
5.6.1 Penentuan Metode Persiapan Bahan Baku .....	43
5.6.1.1 Pengeringan dengan <i>Tray Drier</i> .....	44
5.6.1.2 Pengeringan dengan Kering Angin .....	45
5.6.1.3 Pengeringan dengan Cahaya Matahari .....	46
5.6.1.4 Ekstraksi dan Uji Fitokimia Buah Mahkota Dewa dengan Berbagai Variasi Metode Pengeringan .....	47
5.6.1.4.1 Percobaan Pendahuluan Ekstraksi .....	48
5.6.1.4.1.1 Ekstraksi Buah Mahkota Dewa yang Dikeringkan dengan Metode <i>Tray Dryer</i> .....	49
5.6.1.4.1.2 Ekstraksi Buah Mahkota Dewa yang Dikeringkan dengan Cahaya Matahari .....	50
5.6.1.4.1.3 Ekstraksi Buah Mahkota Dewa yang Diperoleh dari Toko Obat Tradisional .....	52
5.6.1.4.1.4 Ekstraksi Buah Mahkota Dewa yang Dikeringkan dengan Kering Angin .....	55
5.6.1.5 Perbandingan Kualitas Ekstrak Buah Mahkota Dewa dari Berbagai Variasi perlakuan Awal .....	56
5.6.2 Optimasi Proses Ekstraksi .....	59

5.6.2.1 Pengaruh Faktor Temperatur dan F:S Terhadap Perolehan Ekstrak.....	60
5.6.2.2 Pengaruh Faktor Temperatur dan F:S Terhadap Aktivitas Antioksidan (DPPH Ekuivalen).....	62
5.6.2.3 Penentuan Titik Maksimum.....	66
BAB VI KESIMPULAN.....	68
DAFTAR PUSTAKA.....	69
LAMPIRAN A PROSEDUR ANALISIS.....	72
A.1 Perhitungan Kadar Air.....	72
A.2 Analisis Fitokimia.....	72
A.2.1 Uji Saponin Steroid.....	72
A.2.2 Uji Alkaloid.....	72
A.2.3 Uji Tanin.....	73
A.2.4 Uji Flavonoid.....	73
A.3 Uji Aktivitas Antioksidan.....	74

## ABSTRAK

Indonesia yang sangat kaya dengan keanekaragaman hayati merupakan sumber dan penghasil tanaman rempah-rempah terbesar di dunia, yang berpotensi untuk diolah lalu dimanfaatkan sebagai bahan pangan, kosmetika, dan obat-obatan. Salah satu tanaman asli Indonesia yang memiliki banyak potensi adalah mahkota dewa (*Phaleria macrocarpa*), karena dapat dimanfaatkan sebagai zat pewarna alami (merah keunguan), pengawet makanan alami karena memiliki kemampuan antioksidan dan antimikroba (Hendra et al., 2011; Winarni et al., 2012), suplemen makanan karena kandungan antioksidan yang tinggi (Hendra et al., 2011), obat-obatan karena menunjukkan efek anti kanker [Hendig & Ermin, 2009; Maurya et al., 2011], dan bahan kosmetika karena kandungan antioksidan dan efek antimikroba yang dimiliki.

Tujuan penelitian untuk mengkaji secara mendalam komponen bioaktif serta potensi mahkota dewa sebagai pengawet makanan alami, disertai dengan kajian-kajian teknis dan optimasi dari mekanisme ekstraksi (khususnya terkait dengan kombinasi perlakuan pelarut dan perlakuan awal bahan), serta penentuan prosedur operasi baku (standard operating procedure) dalam pengeringan, pengecilan ukuran dan perlakuan mekanik bahan baku untuk dapat diaplikasikan dalam industri kecil-menengah. Metode penelitian dengan menggunakan teknik ekstraksi batch dengan variasi temperatur operasi dan variasi rasio umpan terhadap pelarut metanol. Analisis fitokimia dilakukan terhadap ekstrak dan dilengkapi dengan uji antioksidan dengan metode inhibisi radikal bebas DPPH (1, 1-diphenyl-2-picrylhydrazyl).

Kesimpulan metode tray drier dan kering angin menghasilkan ekstrak dengan komponen bioaktif terlengkap. Metode pengeringan dengan matahari kehilangan senyawa alkaloid selama pengeringan sedangkan bahan beli selain kehilangan senyawa alkaloid, juga kehilangan senyawa saponin. Proses pengeringan buah mahkota dewa dengan tray drier mampu memberikan aktivitas antioksidan ekstrak tertinggi dengan nilai DPPH ekuivalen sebesar 0,200  $\mu\text{mol}$  DPPH/mg padatan kering. Metode pengeringan lain seperti pengeringan dengan matahari dan kering angin serta pembandingan bahan beli dari pasar tradisional menghasilkan nilai DPPH ekuivalen secara berurutan sebesar 0,037, 0,117 dan 0,117  $\mu\text{mol}$  DPPH/mg padatan kering. Titik maksimum dari penelitian ini tercapai pada  $T=50\text{ }^{\circ}\text{C}$  dan rasio F:S= 1:50 (g/mL) dengan perolehan oleoresin maksimum sebesar 0,3034 g oleoresin/g padatan kering dan aktivitas antioksidan maksimum sebesar 0,2925  $\mu\text{mol}$  DPPH/g padatan kering.

# BAB I PENDAHULUAN

## 1.1 Latar Belakang

Indonesia merupakan salah satu sumber, produsen, sekaligus konsumen tanaman rempah-rempah terbesar di dunia. Manfaat tanaman rempah-rempah telah disadari sejak nenek moyang dan diaplikasikan sebagai bumbu masak dan obat-obatan, bahkan menjadi tradisi turun temurun. Minum jamu misalnya, telah menjadi tradisi turun temurun dan dipercaya dapat memperpanjang usia dan menyebabkan awet muda, menambah stamina dan kebugaran tubuh, serta mengobati penyakit tertentu. Jamu merupakan ramuan tradisional dari bahan alami khas dan unggulan Indonesia, terutama berasal dari tanaman rempah-rampah. Namun ironisnya, tradisi yang baik tersebut tidak didukung oleh pengetahuan yang cukup dan ilmiah tentang kandungan zat aktif dalam bahan alami tersebut dan teknologi pengolahannya masih belum tersentuh dengan baik.

Selain tanaman rempah-rempah, bahan alami potensial lainnya yang tersedia cukup melimpah di Indonesia adalah hasil perkebunan dari industri perkebunan maupun limbahnya, seperti: biji teh yang potensial sebagai sumber **saponin** untuk *foaming agent* [Anonim, 2010], kulit buah manggis [Asmah, 1996] dan suji [Istichomah, 2004] sebagai sumber **pigmen alami**. Sisa industri perkebunan cengkeh seperti batang, daun dan rantingnya yang masih mengandung kandungan **eugenol** yang cukup tinggi yang dapat diaplikasikan di bidang farmasi karena sifatnya sitotoksin terhadap sel osteoblastik manusia di dalam studi *in vitro*, dan sebagai bahan baku pembuatan vanillin sintesis, serta batang tanaman serih yang merupakan sumber **citroneal dan geraneol** sebagai obat anti nyamuk dan pengharum / parfum (Kirk & Othmer, 1993). Pigmen alami seperti **betalain dan antosianin** juga berfungsi ganda sebagai antikanker dan antioksidan (Chattopadhyay et al., 2008).

Walaupun bahan alami potensial, seperti tanaman rempah-rempah tersedia dalam jumlah yang berlimpah dan jenisnya pun beragam di Indonesia, pengolahan dan produksi tanaman rempah-rempah di Indonesia tidaklah terlalu diminati oleh pengusaha dalam negeri. Kendala utama yang dihadapi yaitu kapasitas produksi yang masih sangat terbatas. Seringkali para pengusaha kecil tidak dapat memenuhi kebutuhan konsumen yang menginginkan produk dalam jumlah besar. Keterbatasan kapasitas produksi ini dikarenakan keterbatasan teknologi dalam memproduksi produk yang diinginkan. Para pengusaha, yang kebanyakan pengusaha kecil-menengah masih menggunakan teknologi yang sangat sederhana sehingga selain kuantitas yang dihasilkannya pun relatif sedikit, kualitas produknya kadang-kadang tidak memenuhi standar yang diharapkan konsumen.

Laboratorium Rekayasa Reaksi Kimia dan Pemisahan Jurusan Teknik Kimia Unpar memiliki visi dan misi untuk mengembangkan teknologi tepat guna **non-destruktif** (tidak merusak kandungan komponen aktif) dalam pengolahan **bahan alami khas dan unggulan Indonesia**, khususnya **tanaman rempah-rempah dan obat-obatan**. Hal ini tertuang dalam salah satu road map penelitian (**terlampir dalam Bab II**) di laboratorium ini, yang juga merupakan bidang unggulan perguruan tinggi Unpar, yaitu bidang Ketahanan dan Keamanan Pangan.

Teknologi yang dipilih untuk dikembangkan dalam Laboratorium ini dalam pengolahan bahan alami ini adalah metode konvensional yang cukup aplikatif untuk industri kecil dan menengah, yaitu ekstraksi padat-cair dan distilasi uap. Teknologi sederhana yang dibarengi dengan pemilihan metode pemisahan dan pemurnian yang tepat, serta optimasi kondisi proses yang ilmiah akan mampu meningkatkan efisiensi proses, kualitas serta kuantitas produk yang didapat sehingga diharapkan mampu mengangkat keterpurukan dan menghidupkan kembali industri pengolahan bahan alami skala kecil dan menengah di Indonesia.

Salah satu tanaman asli Indonesia yang berasal dari Papua, adalah mahkota dewa (*Phaleria macrocarpa*) yang sangat mudah dibudidayakan karena cocok dengan iklim tropis dan dapat tumbuh pada ketinggian 10 – 1000 m di atas permukaan laut. Mahkota dewa telah digunakan sebagai tanaman obat yang populer karena daun dan buahnya (tetapi bijinya mesti dipisahkan dulu karena dapat menyebabkan alergi bila tertelan) telah terbukti secara klinis sebagai antihistamin atau antialergi, dan **secara empiris** dianggap mampu menyembuhkan berbagai macam penyakit seperti tekanan darah tinggi, diabetes, asam urat, ginjal, dan beberapa penyakit kulit bahkan untuk terapi penderita kanker (<http://www.naturindonesia.com/mahkota-dewa.html>).



**Gambar 1.** Daun dan buah mahkota dewa (*Phaleria macrocarpa*)

Selain itu, mahkota dewa juga memiliki banyak potensi untuk dimanfaatkan sebagai zat pewarna alami (merah keunguan), pengawet makanan alami karena memiliki kemampuan antioksidan dan antimikroba [Hendra, R., et al, 2011; Winarni, T., et al, 2012], suplemen makanan karena kandungan

antioksidan (*flavonoids* seperti kaempferol, myricetin, naringin, dan rutin) yang tinggi [Hendra, R., et al,2011], obat-obatan karena menunjukkan efek anti kanker (Faried, A., et al, 2007; Raina, K., et al, 2008; Hendig W. & Ermin K. W., 2009; Maurya, D., et al, 2011), dan bahan kosmetika karena kandungan antioksidan dan efek antimikroba yang dimiliki.

Penelitian ini akan fokus untuk mengkaji secara mendalam potensi mahkota dewa sebagai zat pewarna dan pengawet makanan alami, disertai dengan kajian dan optimasi teknologi non-destruktif untuk mengekstraksi dan mengisolasi komponen-komponen aktif yang relevan (senyawa fenolik, flavonoid, dan betalain) dalam buah mahkota dewa. Sebagai pelengkap, juga akan dilakukan uji-uji keaktifan antioksidan, uji antimikroba, dan unjuk kerja zat warna alami.

Dengan demikian, hasil-hasil penelitian ini akan dapat dimanfaatkan lebih jauh oleh sektor riil dan berorientasi pada kebutuhan pasar yang semakin cenderung mencari dan menggunakan bahan-bahan alami, terutama yang berkaitan dengan keamanan pangan (*food safety*). Selain itu, kajian-kajian teknis dalam pengolahan dan isolasi komponen-komponen aktif akan dapat mengembangkan sektor produksi secara strategis, karena teknologi dan rekayasa yang diperlukan telah dapat dikuasai serta uji ilmiah yang relevan terhadap kualitas produk telah dilakukan.

## **1.2 Tujuan Umum dan Khusus**

Tujuan umum dari penelitian ini adalah kajian / eksplorasi potensi buah mahkota dewa sebagai salah satu tanaman asli Indonesia yang dapat diaplikasikan dan dimanfaatkan sebagai zat warna dan pengawet makanan alami.

Sedangkan tujuan-tujuan khusus yang ingin dicapai dalam penelitian ini meliputi:

1. mempelajari berbagai aspek perlakuan awal bahan baku, kondisi dan sistem/metode ekstraksi agar didapatkan perolehan (*yield*) dan kualitas pigmen dan antioksidan yang semaksimal mungkin
2. isolasi dan determinasi senyawa-senyawa aktif (senyawa fenolik, flavonoid, dan betalain) disertai uji keaktifan dan kinerja
3. mengkaji aplikasi senyawa-senyawa antioksidan tersebut melalui uji keaktifan dan kinerja
4. membandingkan unjuk kerja (intensitas, kestabilan) zat warna alami dengan pewarna makanan sintetis yang sejenis (*comparable*)

## **1.3 Urgensi Penelitian**

Mahkota dewa sebagai tanaman asli Indonesia telah dipergunakan secara populer untuk obat-obatan herbal atau alternatif, walaupun hanya secara empiris diyakini dapat mengatasi berbagai macam penyakit. Potensi lain yang dimiliki oleh tanaman ini, terutama buahnya, adalah kandungan anti

oksidan yang tinggi dan efek anti mikroba sehingga sangat cocok dipergunakan sebagai pengawet makanan alami (*natural food preservatives*) yang sangat aman dibandingkan dengan pengawet bahan kimia sintetis. Selain itu, buah mahkota dewa juga mengandung cukup banyak pigmen yang dapat diisolasi menjadi pewarna makanan alami. Walaupun terdapat potensi lain sebagai antioksidan dan anti kanker untuk digunakan sebagai suplemen makanan, kosmetika, dan obat-obatan, penelitian yang menyeluruh untuk aplikasi-aplikasi tersebut membutuhkan waktu yang sangat panjang (lebih dari 10 tahun) dan tidak mungkin dicapai dalam jangka waktu penelitian ini.

Oleh karena itu, penelitian ini akan sangat bermanfaat untuk menaikkan nilai ekonomis buah mahkota dewa sebagai pengawet dan pewarna makanan alami, di mana kajian teknis pengolahan dan uji senyawa-senyawa aktif yang relevan dapat dilakukan dalam jangka waktu menengah (selama 3 tahun). Salah satu dari tujuan penting dari penelitian ini adalah untuk mencari teknologi yang efektif tapi sederhana untuk dapat diaplikasikan dalam industri kecil-menengah.

Dalam jangka panjang, sebagian hasil yg diperoleh dari penelitian ini juga dapat dijadikan dasar (karena telah dilakukan identifikasi dan isolasi komponen2 aktif dalam buah mahkota dewa serta uji keaktifan antioksidan dan uji anti mikroba) untuk penelitian lebih jauh dengan melakukan pengujian-pengujian tambahan seperti uji toksisitas, uji alergi, uji manfaat medis (klinis) yang lebih spesifik seperti anti kanker, untuk mengkaji potensi aplikasi di bidang kosmetika, suplemen makanan, dan obat-obatan. Sejauh ini, manfaat medis yang telah terbukti secara klinis dari buah mahkota dewa hanya sebagai antihistamin yang telah dilakukan oleh dr. Regina Sumastuti dari Jurusan Farmakologi, Universitas Gadjah Mada [Ning, 2004]. Selebihnya, manfaat buah mahkota dewa yang diyakini berkhasiat untuk mengobati penyakit-penyakit lain hanya berdasarkan pengalaman empiris bukan didukung oleh bukti-bukti ilmiah sehingga dapat dipertanggungjawabkan kebenarannya.

**Bagi masyarakat**, penelitian ini dapat berguna untuk **menumbuhkan budi daya** mahkota dewa di mana buahnya sangat berpotensi menjadi **komoditi yang bernilai ekonomis** dan bermanfaat untuk berbagai aplikasi, termasuk dalam bidang pangan sebagai pengawet dan pewarna makanan alami. Industri kecil-menengah yang ingin mengolah buah mahkota dewa juga dapat berkembang karena telah tersedianya teknologi pengolahan yang telah dikaji dan dirancang **sesuai dengan karakteristik industri kecil-menengah** (yang membutuhkan teknologi tepat guna yang relatif sederhana, padat karya, dan memerlukan investasi yang relatif kecil), dan **didukung** dengan **bukti-bukti ilmiah dari manfaat** senyawa-senyawa aktif dalam buah mahkota dewa untuk aplikasinya di bidang pangan.

Manfaat penelitian ini bagi **institusi pendidikan** adalah berupa **pengembangan ilmu** dan kontribusi publikasi jurnal ilmiah dalam level

nasional maupun internasional. Selain itu, penelitian ini akan melibatkan mahasiswa S-1 maupun S-2 Teknik Kimia Unpar sehingga dapat **meningkatkan kualitas pendidikan riset** bagi para mahasiswa yang menjadi bekal penting untuk mereka di kemudian hari. Para mahasiswa akan banyak belajar dan mendapatkan pengalaman berharga dalam berbagai aspek ekstraksi, isolasi, dan pengujian komponen-komponen aktif dalam suatu bahan alami untuk aplikasi tertentu. Ilmu yang telah mereka timba merupakan bekal penting yang dapat bermanfaat dalam pekerjaan atau wirausaha mereka di masa yang akan datang. Di kemudian hari, pengetahuan dan pengalaman tersebut dapat terus dikembangkan dan diaplikasikan dalam rangka menumbuhkan industri kecil-menengah untuk mengolah aneka ragam tanaman asli khas Indonesia yang kaya manfaat dengan cara-cara yang dapat dipertanggungjawabkan secara ilmiah, efisien dan efektif. Selain itu, penelitian juga selaras dengan bidang penelitian unggulan yang telah digariskan oleh universitas.

Penelitian ini juga merupakan perwujudan tanggung jawab dan kepedulian dunia akademik terhadap pengembangan ilmu pengetahuan dan teknologi untuk diaplikasikan dalam rangka menaikkan taraf hidup masyarakat dengan memanfaatkan potensi lokal berupa kekayaan alam Indonesia, sebagai bagian dari Tridharma Perguruan Tinggi.

## **INDIKATOR CAPAIAN TAHUNAN**

### **Tahun 1 (2013)**

- Fitokimia bagian-bagian buah mahkota dewa
- Pemetaan potensi manfaat bagian-bagian buah mahkota dewa beserta mekanisme ekstraksinya (khususnya terkait dengan kombinasi perlakuan pelarutnya)
- *Guideline* prosedur operasi standar (*standard operating procedure*) dalam pengeringan, pengecilan ukuran dan perlakuan mekanik (*cutting*, penggerusan, *milling*) bahan baku
- Perancangan alat ekstraktor yang tepat guna untuk industri, terutama industri kecil di perkebunan beserta *standard operating procedure*-nya dengan produk berupa pekatan ekstrak kasar (*crude extract*) mahkota dewa

### **Tahun 2 (2014)**

- Model matematik yang valid untuk optimasi ekstraksi zat pigmen dan pengawet alami dari buah mahkota dewa
- Rancangan teknik pemisahan pra-kromatografi beserta *standard operating procedure* untuk purifikasi ekstrak kasar mahkota dewa
- Deteksi komponen-komponen aktif dari ekstrak hasil purifikasi secara akurat dengan metode Mass Spectrometry

### Tahun 3 (2015)

- Pemisahan lanjut dengan teknik *fraction collector* sehingga diperoleh daftar komponen-komponen aktif pigmen dan pengawet alami dari buah mahkota dewa
- Deteksi awal kemungkinan aplikasi ekstrak yang didapat, termasuk di dalamnya prosedur pegemasan dan penyimpanannya
- Desain dan pemetaan pemanfaatan komponen-komponen aktif mahkota dewa, berdasarkan berbagai uji terhadap komponen-komponen aktif tersebut

**Target akhir** adalah berupa teknologi tepat guna bagi industri kecil-menengah untuk ekstraksi dan isolasi senyawa aktif dari buah mahkota dewa (*Phaleria macrocarpa*) sebagai zat warna dan pengawet makanan alami. Di samping itu, luaran lainnya adalah **minimal** 1 publikasi di jurnal nasional dan 1 publikasi jurnal internasional **yang terakreditasi**.

## BAB II. TINJAUAN PUSTAKA

### 2.1 Zat Aktif dalam Tanaman dan Peranannya sebagai Zat Warna dan Pengawet Alami Pangan

Zat aktif dalam tanaman umumnya berupa senyawa antioksidan. Antioksidan dipercaya mempunyai peran penting terhadap kesehatan, khususnya untuk menghambat dan memerangi penuaan dini dan beberapa jenis penyakit degeneratif, seperti kanker kardiovaskuler; penyumbatan pembuluh darah yang meliputi CHD (*Coronary Heart Disease*), hiperlipidemik, aterosklerosis, stroke dan tekanan darah tinggi; gagal ginjal; diabetes; pikun; katarak dan glukoma; serta penurunan fungsi kognitif. Selain di bidang kesehatan, antioksidan juga diaplikasikan di bidang pangan sebagai pengawet makanan dan kosmetik. Antioksidan juga ditambahkan pada kosmetik berbasis lemak seperti lipstik dan pelembab untuk mencegah kerusakan. Selain itu, antioksidan ditambahkan pada produk industri kimia, misalnya sebagai stabilisator pada bahan bakar dan pelumas serta untuk mencegah degradasi oksidatif polimer seperti karet, plastik dan perekat yang menyebabkan hilangnya kekuatan dan fleksibilitas (Bjelakovic, G. , 2007; Schuler, P., 1990; Ozyurt, 2005).

Di bidang pangan, antioksidan digunakan sebagai aditif untuk membantu mencegah kerusakan pangan akibat oksidasi. Berbagai kerusakan seperti ketengikan, perubahan nilai gizi, perubahan warna dan aroma, serta kerusakan fisik lain pada produk pangan karena oksidasi dapat dihambat oleh antioksidan. Efek antimikroba yang dimiliki antioksidan juga dapat membantu perannya sebagai agen pengawet pangan yang cukup ampuh. Beberapa jenis antioksidan merupakan pigmen alami sehingga seringkali juga digunakan sebagai zat warna alami pangan yang sekaligus memiliki efek positif terhadap kesehatan. Tokoferol dan asam askorbat telah dikenal secara luas sebagai pengawet alami.

Antioksidan alami banyak ditemukan pada tanaman dan lebih diminati karena tingkat keamanan yang lebih baik dan manfaatnya yang lebih luas di bidang makanan, [kesehatan](#) dan [kosmetik](#). Metabolit sekunder dalam tumbuhan yang berasal dari golongan senyawa fenolik atau polifenolik (tokoferol; [flavonoid](#): flavonol, flavon, katekin, flavanon, kalkon, antosianidin, dan isoflavonoid; turunan asam sinamat: asam kafeat, asam ferulat, asam klorogenat; kumarin; asam fenolat dan asam-asam organik polifungsional lainnya), senyawa nitrogen ([alkaloid](#), turunan klorofil, asam amino dan amina), [saponin](#), [kuinon](#), [tanin](#), [steroid](#) atau triterpenoid, saponin, turunan senyawa asam hidroksiamat, kumarin, vitamin (provitamin A, C, dan E), dan asam organik dipercaya sebagai senyawa antioksidan. Antioksidan fenolik biasanya digunakan untuk mencegah kerusakan akibat reaksi oksidasi pada pangan, kosmetik, farmasi, dan plastik. Bioflavanoid (flavon, flavonol, flavanon, katekin, antosianidin, isoflavon) memiliki aktivitas antioksidan cukup tinggi dan mempunyai sifat antibakteri dan antiviral sehingga aplikatif

untuk pengawet makanan maupun untuk obat-obatan (Halliwell, B., 1995; Ramle, S.F.M., 2008; Gordon I., 1994; Fessenden, 1982).

## 2.2 Jenis dan Mekanisme Kerja Antioksidan Sebagai Pengawet Alami Pangan

Senyawa antioksidan alami polifenolik ini adalah multifungsional dan dapat beraksi sebagai (Aulia, 2009):

- a) pereduksi,
- b) penangkap radikal bebas,
- c) pengkelat logam, dan
- d) peredam terbentuknya singlet oksigen.

Berdasarkan mekanisme kerjanya, antioksidan dikategorikan menjadi 2, yaitu antioksidan primer dan sekunder.

Antioksidan primer merupakan antioksidan yang berfungsi sebagai pemberi atom hidrogen. Senyawa ini dapat memberikan atom hidrogen secara cepat ke radikal lipida ( $R^*$ ,  $ROO^*$ ) atau mengubahnya ke bentuk lebih stabil. Sementara turunan radikal antioksidan ( $A^*$ ) tersebut memiliki keadaan lebih stabil dibanding radikal lipida. Reaksi penghambatan antioksidan primer terhadap radikal lipida mengikuti persamaan reaksi berikut [Yuswantina, 2009; Aulia, 2009]:



Mekanisme kerjanya mengikuti tahapan sebagai berikut:

1. pemberian hidrogen,
2. pemberian elektron,
3. penambahan lipida pada cincin aromatik antioksidan, serta
4. pembentukan kompleks antara lipida dan cincin aromatik antioksidan.

Antioksidan sekunder merupakan antioksidan yang berfungsi memperlambat laju autooksidasi dengan berbagai mekanisme diluar mekanisme pemutusan rantai autooksidasi dengan perubahan radikal lipida ke bentuk yang lebih stabil. Antioksidan sekunder ini bekerja dengan satu atau lebih mekanisme berikut [Aulia, 2009]:

- a) memberikan suasana asam pada medium (sistem makanan),
- b) meregenerasi antioksidan utama,
- c) mengkelat atau mendeaktifkan kontaminan logam prooksidan,
- d) menangkap oksigen dan atau
- e) mengikat singlet oksigen dan mengubahnya ke bentuk triplet oksigen.

Aktivitas antioksidan dari berbagai tanaman di atas diperkirakan mempunyai kekuatan sedang sampai tinggi. Beberapa ekstrak tanaman yang telah diketahui mempunyai aktivitas antioksidan tinggi antara lain dari golongan rempah-rempah seperti cengkeh, jahe, kunyit, temulawak, kayu manis, pala,

bunga *rosmarinus officinalis*, cabe, daun teh, mahkota dewa, dan buah merah. Quezada et al. (2004) menyatakan bahwa [fraksi alkaloid](#) pada [daun \*Peumus boldus\*](#) dapat berperan sebagai antioksidan. Zin et al. (2002), menyatakan bahwa golongan senyawa yang aktif sebagai antioksidan pada batang, buah, dan daun mengkudu berasal dari golongan flavonoid yang berperan sebagai antioksidan, [antidiabetes](#), [antihepatitis](#), [antistres](#), dan [antineoplastik](#), mengandung [saponin glikosida](#) ([steroid glikosida](#)). Tanin dipercaya memiliki aktivitas antioksidan yang tinggi. *Pleurotus ostreatus* yang mengandung triterpenoid, tanin, dan steroid glikosida dapat berperan sebagai antioksidan dan [antimikroba](#) (Iwalokum et al., 2007) Di bidang pangan, polifenol biji pinang dan gambir dapat digunakan sebagai pengawet (Sihombing T., 2000).

### **2.3 Zat Aktif Mahkota Dewa : Kandungan, Aktivitas dan Metode Isolasinya**

Buah mahkota dewa diyakini sebagai salah satu sumber antioksidan dengan aktivitas yang tinggi secara tradisional ekstraknya (daun, batang, buah dan biji) dalam air panas digunakan untuk mengendalikan penyakit kanker, impotensi, *hemorrhoids*, diabetes, alergi, hati dan jantung, gagal ginjal, gangguan peredaran darah, jerawat, stroke, migrain dan berbagai macam jenis penyakit kulit (Zhang, Y., et al., 2006; Harmanto, N., 2003). Metabolit sekunder tanaman mahkota dewa seperti tanin, saponin, resin, senyawa fenolik dan polifenol, terpenoid, alkaloid, dan flavonoid dilaporkan memiliki aktivitas antioksidan, anti inflammatory, antimikroba dan memiliki aktivitas cytotoxic sehingga digunakan di bidang farmasi sebagai obat-obatan ataupun suplemen diet serta dapat pula digunakan sebagai agen pengawet alami pada pangan (Hendra, R., 2011; Sher, A., 2009; Asep, A., 2010). Faried et al. (2007) mengisolasi asam galat buah mahkota dewa selektif memerangi berbagai jenis sel kanker seperti human esophageal cancer (TE-2), gastric cancer (MKN-28), colon cancer (HT-29), breast cancer (MCF-7), cervix cancer (CaSki), dan malignant brain tumor (CGNH-89 and CGNH-PM) serta memiliki efek cytotoxic.

Antosianin, suatu flavonoid dari golongan polifenol, merupakan pigmen alami dengan variasi warna merah, ungu, biru, sampai jingga juga diduga terkandung di dalam buah mahkota dewa. Antosianin larut dalam air sehingga memudahkan inkorporasi ke dalam bahan pangan. Aktivitas *antioksidan* antosianin terlihat baik pada buah berantosianin maupun pada antosianin murni. Senyawa antioksidan tersebut tersebar pada berbagai bagian tumbuhan seperti akar, batang, kulit, ranting, daun, bunga, buah, dan biji. Antosianin merupakan pigmen alami pangan yang cukup potensial pemanfaatannya karena sekaligus memiliki efek antioksidan.

Beberapa penelitian melaporkan efek ekstrak buah mahkota dewa sebagai agen pengawet alami yang cukup ampuh. Winarni, T. et al (2012) melaporkan bahwa ekstrak buah mahkota dewa menggunakan aquadest memiliki efek antimikroba dan mampu memperpanjang daya simpan ikan

tersebut namun memberikan efek perubahan warna pada ikan menjadi lebih coklat (Winarni, T. et al, 2012). Crozier et al. (2007) dan Hendra, R. (2011) mengisolasi mahkota dewa menggunakan metanol (1:80 g/mL) dengan penambahan larutan HCl 6 M (0,25 % v/v metanol) di dalam sebuah ekstraktor *batch* berpengaduk dengan refluks selama 2 jam pada 90°C. Pemisahan pelarut dari ekstrak dilakukan menggunakan *rotary vaccum evaporator* (Buchii, Switzerland) pada 40°C. Mesocarp buah mahkota dewa mengandung senyawa fenolik terbesar, disusul pericarp dan bijinya sedangkan kandungan flavonoid terbesar pada bagian pericarp, disusul mesocarp dan bijinya. Hasil ini lebih besar dibandingkan hasil isolasi Rohyami (2009) yang mengisolasi flavonoid buah mahkota dewa (tanpa biji) menggunakan metode soxhlet dengan pelarut metanol. Hendra et al. (2011) menemukan beberapa senyawa flavonoid buah mahkota dewa seperti kaempferol, myricetin, naringin, dan rutin pada bagian pericarp, naringin dan quercetin pada mesocarp serta quercetin pada biji. Selain itu, icaricide C<sub>3</sub>, phalerin, dodecanoic acid, palmitic acid, ethyl stearate, sukrosa dan mangiferin juga berhasil diisolasi dari mahkota dewa (Osimi, S. et al., 2008; Wahyuningsih, M.S.H. et al, 2005).

Aripin, A. (2010) melaporkan bahwa ekstrak buah mahkota dewa mengandung benzophenone, diphenylmethanone, dan diphenylkethone yang memiliki khasiat antikanker dan anti proliferasi. Benzophenone glucoside dan 4'-6'-dihydroxy-4-methoxybenzophenone-2-O-glucoside berhasil diisolasi dari buah dan daun mahkota dewa (Hakim, R. et al., 2004; Kusmaardiyani, S. et al, 2004; Zhang, Y., et al., 2006). Benzophenone glucoside baru berhasil ditemukan pada daun mahkota dewa, dikenal dengan phalerin (4,5 dihidroksi, 4'-metoksibenzopenon-3- $\beta$ -D-glukosida), merupakan senyawa non toksik dan memiliki potensi untuk stimulasi kekebalan. [Wahyuningsih, M.S.H. et al, 2005] Phorbol ester ditemukan di bagian biji buah mahkota dewa memiliki efek inhibitor terhadap pertumbuhan jamur (Borris, R. et al. , 1988).

Ekstraksi dilakukan secara *batch* menggunakan pelarut alkohol (variasi rasio 1:1 s.d 1:20) selama 4 hari pada temperatur kamar hingga 70 °C. Fraksinasi ekstrak kasar dilakukan dengan ekstraksi cair-cair menggunakan pelarut organik dan air pada rasio 1:1 hingga 2:1 pada temperatur kamar, diinkubasi maksimum semalaman. Fasa organik dimurnikan menggunakan kolom kromatografi dan rekristalisasi (Aripin, A., 2010). Metode fraksinasi lainnya dapat pula menggunakan berturut-turut dengan pelarut n-heksana, metilenklorida dan etil asetat. Dari fraksi etil asetat dapat diidentifikasi adanya senyawa flavonoid. Pemisahan lebih lanjut dilakukan secara kromatografi kertas preparatif dengan pengembang asam asetat 6%. Selain flavonoid dari ekstrak alkohol juga dapat diidentifikasi adanya asam fenolat dan tanin yang dipisahkan secara ekstraksi cair-cair. Pemisahan asam fenolat selanjutnya dilakukan secara kromatografi kertas preparatif dua dimensi menggunakan pengembang asam asetat 2% dan benzena-asam asetat-air (60: 22 : 2,1). Pemisahan tanin dilakukan secara kromatografi lapis tipis preparatif dengan pengembang etil asetat-kloroform-

asam format (4:1:3). Pemeriksaan senyawa dilakukan secara kromatografi kertas, kromatografi lapis tipis, dan spektrofotometri UV (Sutjihati, R., et al., 1995).

Pelarut organik lain yang biasa digunakan untuk ekstraksi senyawa aktif mahkota dewa adalah etil asetat, alkohol seperti metanol, etanol, n-butanol (dalam bentuk absolut maupun larutan dalam air dengan berbagai konsentrasi), aquadest, metilen klorida, aseton serta kombinasi antar pelarut tersebut (Winarno, H., 2008; Aripin, A., 2010; Sutjihati, R., et al., 1995).

## 2.4 Metode Pengujian Senyawa Aktif dalam Mahkota Dewa

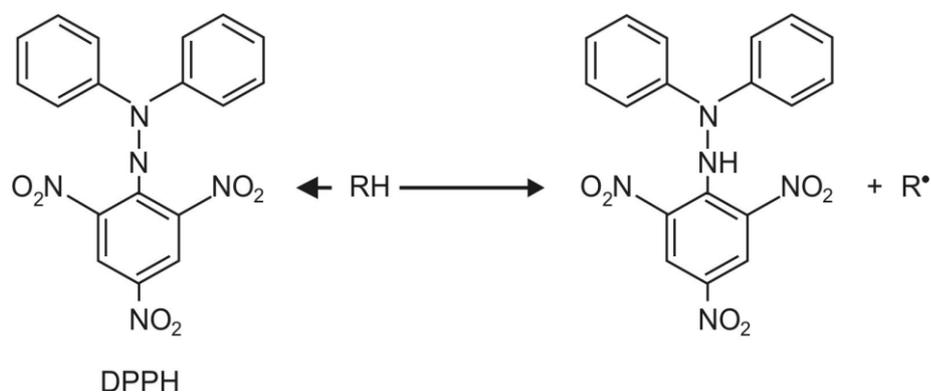
Beberapa uji komponen aktif dalam mahkota dewa yang relevan dengan penelitian ini adalah uji keaktifan antioksidan, uji antimikroba, uji fitokimia, dan uji kestabilan zat warna.

### 2.4.1 Uji Keaktifan Antioksidan

Salah satu metode uji keaktifan antioksidan yang sering dipakai dalam bidang pangan adalah metode DPPH atau *1,1-diphenyl-2-picrylhydrazyl* (Vrchovska et al., 2006). Metode ini didasarkan pada kemampuan antioksidan untuk bereaksi dengan radikal bebas DPPH dengan menyumbang atom hidrogen sehingga metode ini berfungsi untuk mengukur aktivitas penghambatan radikal bebas.

DPPH merupakan radikal bebas yang digunakan secara luas untuk pengujian keaktifan antioksidan dari beberapa senyawa aktif alami seperti komponen fenolik, dan antosianin. Metode DPPH ini sangat cocok untuk pengujian awal berbagai sampel yang mengandung senyawa antioksidan terutama ekstrak dari tumbuh-tumbuhan (Pezzuto & Park, 2002).

Reaksi yang terjadi pada penggunaan metode DPPH adalah ([http://www.medlabs.com/Downloads/Antiox\\_acti\\_.pdf](http://www.medlabs.com/Downloads/Antiox_acti_.pdf)) :



**Gambar 2.** Mekanisme Penghambatan Radikal DPPH

## 2.4.2 Uji Antimikroba

Salah satu uji antimikroba dari suatu bahan terhadap bahan yang diawetkan yang umum dilakukan adalah metode Total Plate Count (TPC), yang telah distandarkan dalam SNI-01-2332.3-2006 (Winarni et al., 2012). Bahan pangan yang telah diberi pengawet dicampurkan dengan larutan buffer pH lalu diencerkan beberapa kali. Sebanyak 1 ml sampel ditaruh dalam cawan petri berisi plate count agar yang kemudian diinkubasikan pada 35 °C selama 24 jam.

Uji antimikroba yang lebih spesifik dapat juga dilakukan terhadap bakteri-bakteri patogen (gram-positive dan gram-negative) dengan metode *disc diffusion*, sedangkan efek anti jamur (fungi) dapat diuji dengan metode *agar well diffusion assay* (Hendra et al., 2011). Contoh bakteri gram-positive yang dapat dipergunakan adalah *Bacillus cereus*, *Bacillus subtilis*, *Micrococcus luteus*, *S. aureus*. Selain itu, *E. coli*, *Enterobacter aerogenes*, *P. aeruginosa*, dan *Klebsiella pneumonie* adalah contoh-contoh bakteri gram-negatif yang sering menjadi kultur uji. Beberapa jenis jamur yang dipakai dalam uji anti fungi adalah *Aspergillus niger*, *Fusarium oxysporum*, *Ganoderma lucidum*, dan *Mucor indicus*.

## 2.4.3 Uji Fitokimia

### 2.4.3.1 Analisis Kadar Sari Larut Air (Harborne.J.B., 1996; Depkes RI, 2000; Soetarno, S., 1997)

Dalam persiapan suatu sampel yang akan diolah menjadi obat, analisis kadar sari larut air akan sangat penting. Kadar sari larut air ini akan menunjukkan keberadaan zat khasiat yang dapat tersari dengan baik oleh air. Besarnya kadar sari larut air maupun dengan yang larut etanol dapat dipengaruhi oleh beberapa faktor seperti umur tanaman, waktu panen (panen pagi, siang, atau sore dan hal ini berkaitan dengan fungsi daun sebagai tempat terjadinya fotosintesis tumbuhan), serta iklim dan kondisi tanah tempat tumbuhan itu tumbuh. Pada penentuan kadar sari larut air diperlukan sampel serbuk sebanyak 5 gram telah dikeringkan di udara. Serbuk tersebut kemudian dimaserasi selama 24 jam dengan 100 ml air-kloroform P, menggunakan labu bersumbat, sambil berkali-kali dikocok selama 6 jam kemudian dibiarkan selama 18 jam. Sejumlah 20 ml filtrat diambil dan diuapkan dalam cawan dangkal berdasar rata yang telah ditara dan sisanya dipanaskan pada suhu 105°C hingga bobot tetap. Kadar sari yang larut dalam air dihitung dalam persen terhadap bobot bahan yang telah dikeringkan di udara.

$$\% \text{ Kadar Sari Larut dalam Air} = \frac{\text{berat sari}}{\text{berat sampel}} \times \frac{100}{20} \times 100\%$$

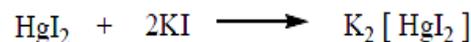
### 2.4.3.2 Analisis Kadar Sari Larut Etanol (Harborne.J.B., 1996; Depkes RI, 2000; Soetarno, S., 1997)

Kadar sari larut etanol merupakan indikator lain yang dapat menunjukkan kadar zat khasiat yang terkandung dalam tumbuhan obat yang kemudian dapat tersari dengan baik dalam etanol. Dalam analisis penentuan kadar sari larut etanol ini dapat dilakukan dengan cara yang cukup sederhana di mana diperlukan sejumlah 5 gram serbuk yang telah dikeringkan di udara. Serbuk tersebut kemudian dimaserasi selama 24 jam dengan 100 ml etanol 95% menggunakan labu bersumbat sambil berkali-kali dikocok selama 6 jam kemudian dibiarkan selama 18 jam. Hasil disaring, dan sejumlah 20 ml filtrat diuapkan dalam cawan dangkal berdasar rata yang telah ditara, sisanya dipanaskan pada suhu 105°C hingga bobot tetap. Kadar sari yang larut dalam etanol dihitung dalam persen terhadap bobot bahan yang telah dikeringkan di udara.

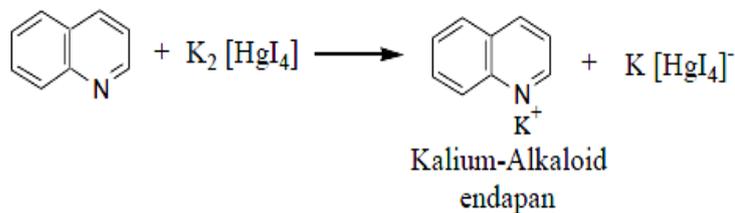
$$\% \text{ Kadar Sari Larut dalam Etanol} = \frac{\text{berat sari}}{\text{berat sampel}} \times \frac{100}{20} \times 100\%$$

### 2.4.3.3 Uji Alkaloid (Harborne.J.B., 1996; Depkes RI, 2000; Soetarno, S., 1997; Marlina, S., 2005)

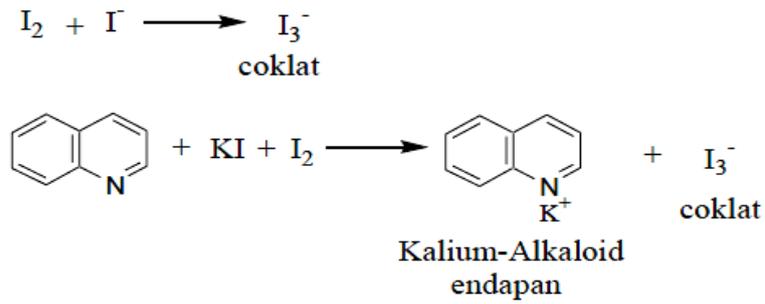
Pada uji kualitatif senyawa alkaloid digunakan reagen-reagen tertentu untuk mengendapkan senyawa alkaloid, diantaranya adalah reagen Mayer ( $K_2[HgI_2]$ ), Wagner ( $KI+I_2$ ), dan Dragendorf ( $K[BiI_4]$ ). Penambahna HCl berfungsi untuk membuat suasana menjadi asam karena golongan alkaloid bersifat basa, sedangkan akuades panas berfungsi untuk mendekstruksi protein karena dapat mengganggu kualitas hasil uji. Perkiraan reaksi uji Meyer, Wagner, dan Dragendorf dapat terlihat pada gambar 3, 4, dan 5.



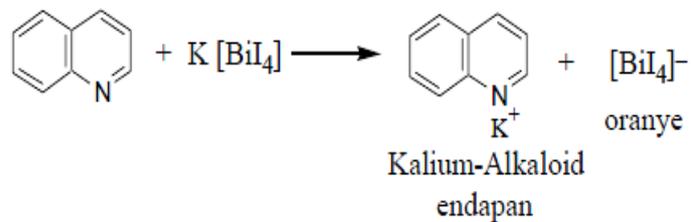
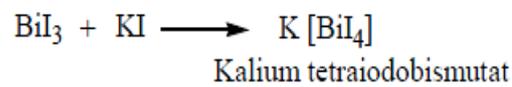
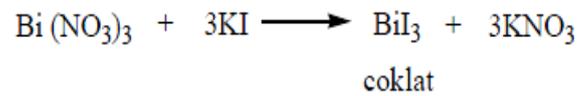
Kalium tetraiodomerkurat(II)



**Gambar 3.** Reaksi uji Mayer (Marlina, S., 2005)



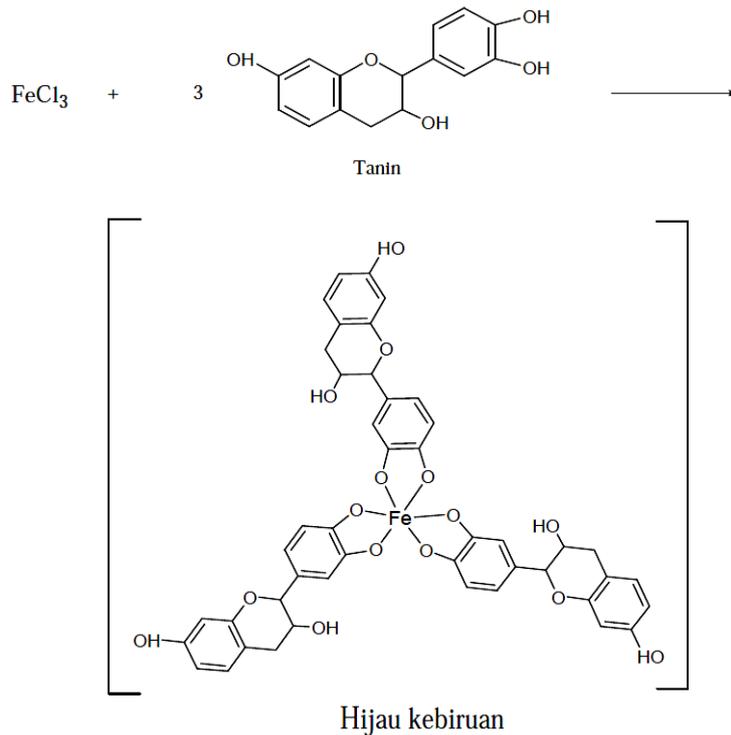
**Gambar 4.** Reaksi uji Wagner (Marliana, S., 2005)



**Gambar 5.** Reaksi uji Dragendorff (Marliana, S., 2005)

#### 2.4.3.4 Uji Tanin (Harborne.J.B, 1996; Depkes RI, 2000; Soetarno, S., 1997; Marliana, S., 2005)

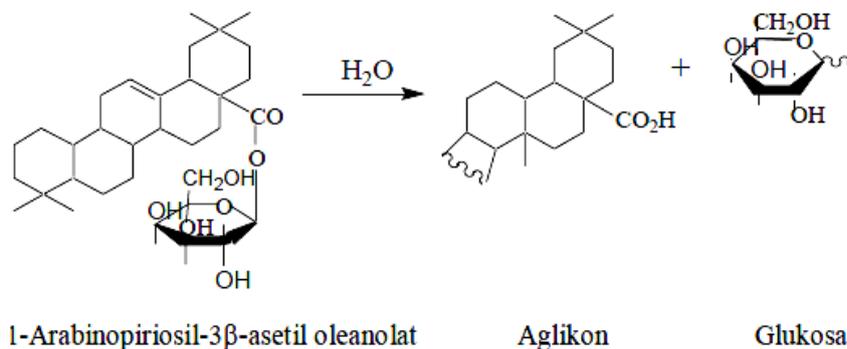
Tanin merupakan senyawa polifenol yang berarti termasuk dalam senyawa fenolik. Keberadaan senyawa tanin dapat diidentifikasi dengan reaksi menggunakan  $FeCl_3$ . Perkiraan reaksi antara tanin dengan  $FeCl_3$  dapat dilihat pada gambar 6.



**Gambar 6. Reaksi uji Tanin [Marliana, S., 2005]**

**2.4.3.5 Uji Saponin** (Harborne.J.B., 1996; Marliana, S., 2005; Depkes RI, 2000; Soetarno, S., 1997)

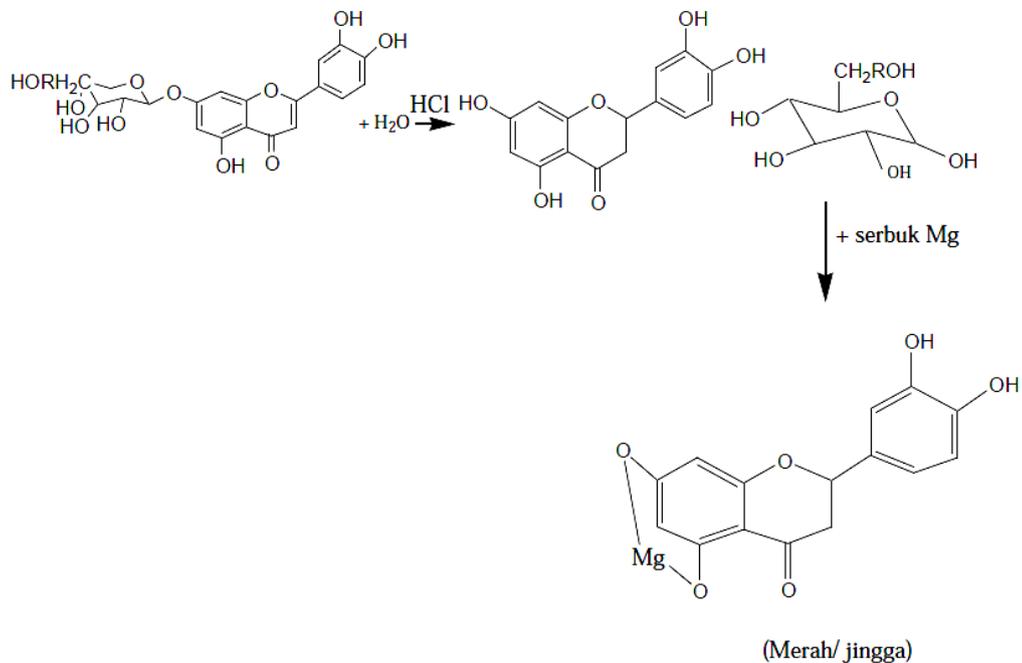
Saponin terdiri dari sapogenin yang terdiri dari sapogenin yang merupakan molekul aglikon dan sebuah gula. Saponin merupakan senyawa yang menimbulkan busa jika dikocok dalam air. Uji Saponin dilakukan dengan metode Forth, yaitu hidrolisis saponin dalam air. Timbulnya busa pada uji Forth menunjukkan adanya glikosida yang mempunyai kemampuan membentuk buih dalam air yang terhidrolisis menjadi glukosa dan senyawa lainnya. Reaksi pembentukan busa pada uji saponin ditunjukkan pada gambar 7.



**Gambar 7. Reaksi hidrolisis saponin dalam air (Marliana, S., 2005)**

**2.4.3.6 Uji Flavonoid** (Halimah, 2010; Harborne.J.B., 1996; Depkes RI, 2000; Soetarno, S., 1997)

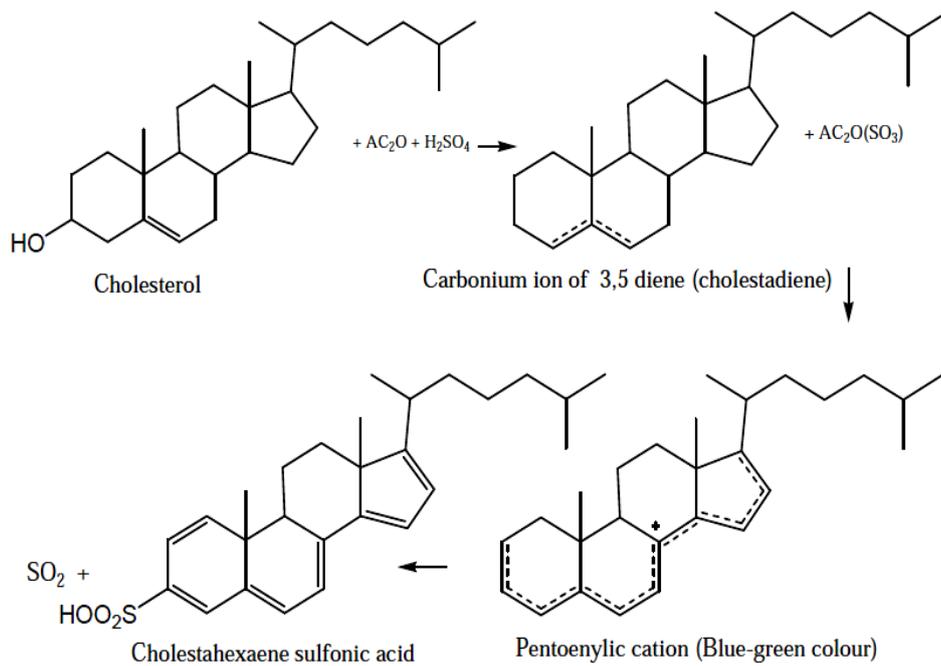
Flavonoid merupakan senyawa yang larut air, dapat diekstraksi dengan etanol 70% dan tetap ada dalam lapisan air, setelah ekstrak ini dikocok dengan eter minyak bumi. Flavonoid berupa senyawa fenol, oleh karena itu warnanya berubah bila ditambah basa atau ammonia. Uji senyawa flavonoid dilakukan dengan metode Wilstater, dimana hasil positif terhadap flavonoid ditunjukkan dengan timbulnya warna merah atau jingga yang disebabkan oleh reduksi flavonoid oleh Mg dan HCl pekat. Reaksi flavonoid dengan Mg dan HCl pekat ditunjukkan oleh gambar 8.



**Gambar 8.** Reaksi flavonoid dengan Mg dan HCl pekat (Halimah, 2010)

**2.4.3.7 Uji Triterpenoid dan Steroid** (Harborne.J.B., 1996; Depkes RI, 2000; Soetarno, S., 1997)

Triterpenoid adalah senyawa yang kerangka karbonnya berasal dari enam satuan isoprene dan secara biosintesis diturunkan dari hidrokarbon C<sub>30</sub> asiklik yaitu skualen. Steroid adalah senyawa organik lemak sterol tidak terhidrolisis yang dapat dihasil reaksi penurunan dari terpena atau skualena. Steroid merupakan kelompok senyawa yang penting dengan struktur dasar sterana jenuh dengan 17 atom karbon dan 4 cincin. Uji yang biasa digunakan untuk mengidentifikasi senyawa triterpenoid dan steroid adalah reaksi Lieberman-Buchard (anhidrida asetat-H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> pekat). Reaksi steroid dengan reagen Lieberman-Buchard ditunjukkan oleh gambar 9.



**Gambar 9. Reaksi steroid dengan reagen Liebermann-Buchard**

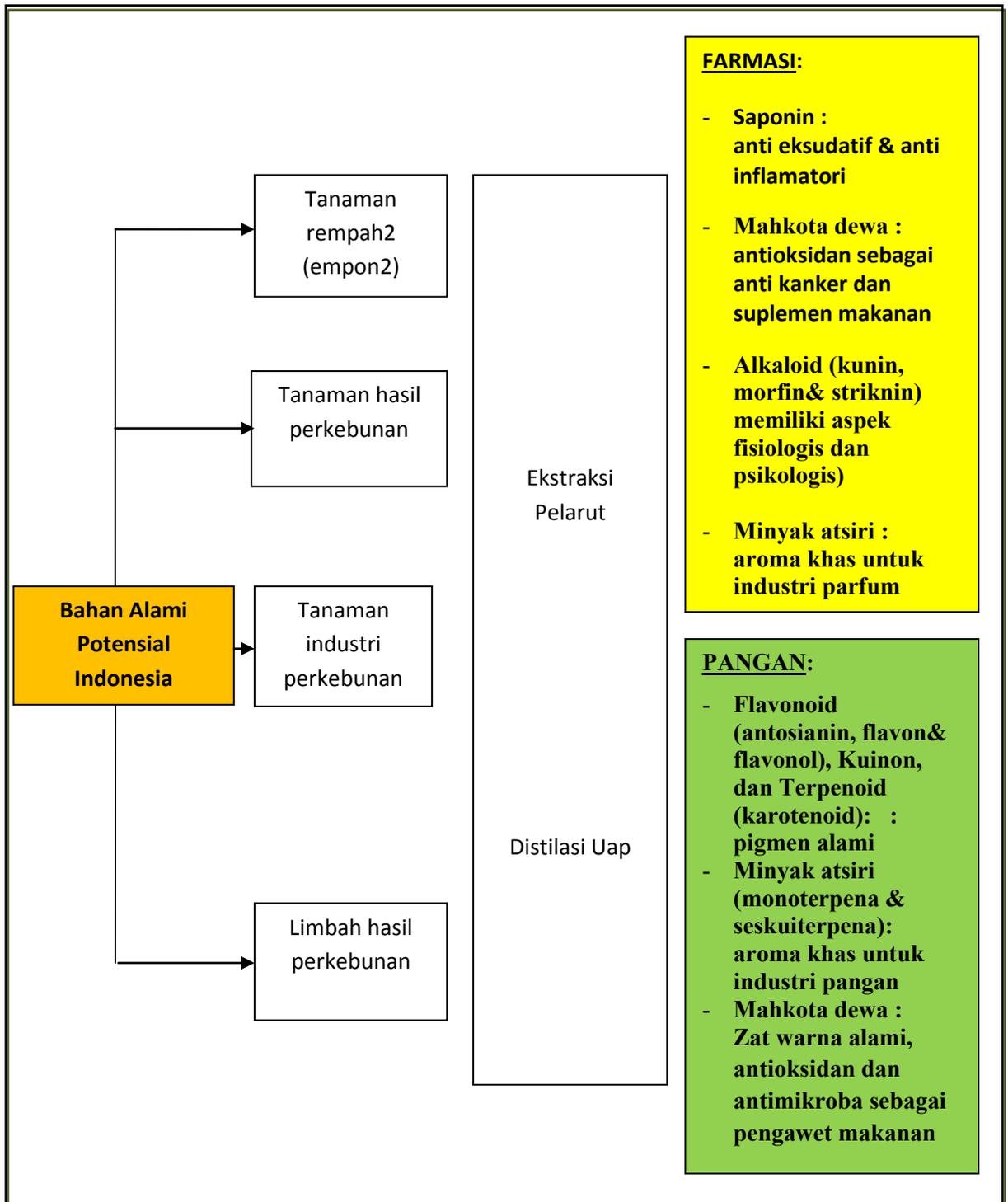
Keterangan untuk hasil diberi peringkat dengan simbol sebagai berikut :

- Hasil negatif = (-)
- Hasil positif lemah = (+)
- Hasil positif kuat = (++)
- Hasil positif kuat sekali = (+++)
- Hasil positif sangat kuat = (++++)

#### 2.4.4 Uji Kestabilan Zat Warna

Pengujian kestabilan zat warna terhadap pengaruh temperatur, sinar matahari atau lampu UV, pH, dan oksidator (seperti H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>) dapat dibandingkan dengan zat warna sintetik yg sebanding atau memiliki warna dengan panjang gelombang yang mirip, dengan bantuan metode spektrofotometri (<http://www.leatherheadfood.com/stability-testing-service-for-natural-colours>)

## 2.5 Roadmap Penelitian

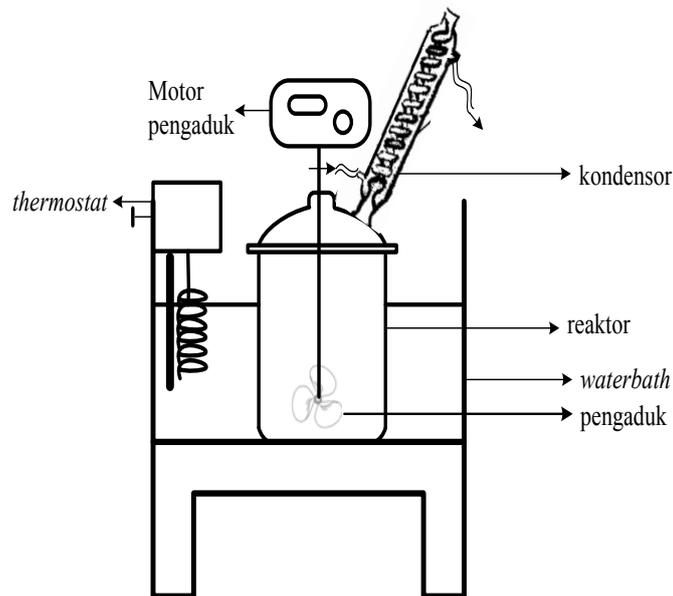


**Gambar 10.** Road map penelitian pemanfaatan bahan alami khas Indonesia untuk aplikasi farmasi dan pangan

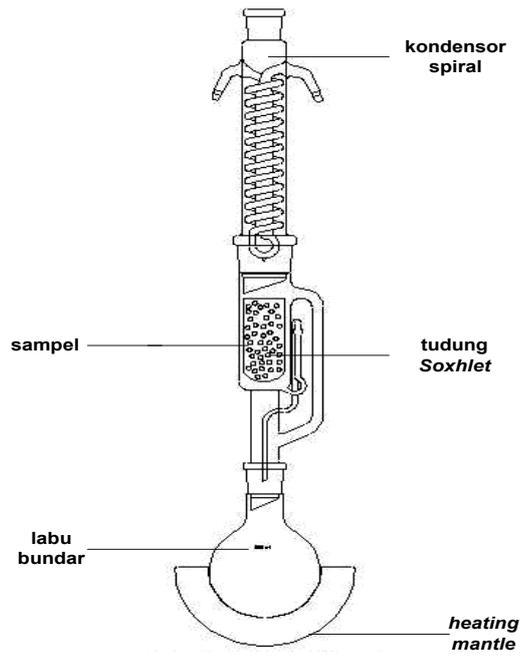
### BAB III. METODE PENELITIAN

Metode pemisahan yang dipilih untuk mendapatkan antioksidan mahkota dewa adalah metode non destruktif berupa ekstraksi padat cair menggunakan pelarut. Ekstraktor yang dipilih dioperasikan secara *batch* dengan memvariasikan metode pengontakannya, yaitu secara:

1. dispersi menggunakan ekstraktor *batch* berpengaduk (disajikan pada Gambar 11) dan
2. imersi menggunakan ekstraktor *Soxhlet* (disajikan pada Gambar 12).



**Gambar 11.** Perangkat Ekstraktor *Batch* Berpengaduk



**Gambar 12.** Perangkat Soxhlet

## BAB IV. JADWAL PELAKSANAAN

Penelitian di tahun 2013 ini merupakan tahun pertama dalam rangkaian penelitian selama 3 tahun. Rencana pelaksanaan usulan penelitian ini secara lengkap dapat dilihat dalam Tabel 1, meliputi nama kegiatan, tujuan kegiatan, keluaran yang diharapkan dan alokasi waktu yang dibutuhkan untuk melaksanakan kegiatan tersebut.

**Tabel 1. Rancangan dan Jadwal Penelitian**

Kegiatan	TAHUN 1		TAHUN 2		TAHUN 3	
	Sem. I	Sem. II	Sem. III	Sem. IV	Sem. V	Sem. VI
<p><b>Proses 0</b> (survey lapangan serta identifikasi, determinasi dan sortasi tanaman mahkota dewa)</p> <p>Tujuan:</p> <ul style="list-style-type: none"> <li>• Mengetahui ketersediaan dan merencanakan mekanisme pemasokan tanaman mahkota dewa sehingga penelitian dapat berjalan dengan lancar dan mendapatkan pasokan bahan penelitian yang berkualitas baik (tidak rusak selama pengiriman) dan seragam</li> <li>• Melakukan identifikasi dan determinasi tanaman, sortasi dan analisis awal, jika data tidak tersedia, terhadap tanaman mahkota dewa untuk menentukan <i>species</i>, umur, serta tingkat kematangan buah yang paling cocok untuk digunakan sebagai bahan penelitian</li> </ul>						
<p>Luaran:</p> <ul style="list-style-type: none"> <li>• Prosedur pengemasan, pengiriman dan penyediaan bahan penelitian (buah mahkota dewa) yang baik</li> <li>• List <i>species</i>, umur, tingkat kematangan bahan penelitian yang paling tepat beserta prosedur identifikasinya</li> </ul>						

Kegiatan	TAHUN 1		TAHUN 2		TAHUN 3	
	Sem. I	Sem. II	Sem. III	Sem. IV	Sem. V	Sem. VI
<p><b>Proses 1</b> (studi ekstraksi dalam ekstraktor <i>batch</i> dengan pengontakan dispersi dan imersi)</p> <p>1.1. Perlakuan awal bahan baku</p> <p>Tujuan</p> <ul style="list-style-type: none"> <li>Menentukan bagian buah mahkota dewa yang cocok sebagai sumber pigmen dan pengawet pangan alami</li> </ul>						
<ul style="list-style-type: none"> <li>Variabel yang divariasikan bagian-bagian buah naga meliputi: kulit, pericarp, mesocarp, inti biji dan kombinasinya</li> <li>Analisa: <ul style="list-style-type: none"> <li>Kuantitas: <i>yield</i> (gravimetri)</li> <li>Kualitas : uji keaktifan (DPPH), uji antimikroba (TPC), uji intensitas warna (spektrofotometri), uji kestabilan warna</li> </ul> </li> </ul>						
<ul style="list-style-type: none"> <li>Merancang dan menentukan prosedur perlakuan awal bahan baku yang tepat sehingga proses ekstraksi dapat berlangsung optimal</li> <li>Variabel yang divariasikan: metode pengurangan kadar air buah segar (segar/tanpa perlakuan panas, keringangin, oven, tray dryer dengan variasi temperatur, waktu, kadar air produk akhir, kemungkinan penambahan senyawa penstabil); metode <i>size reduction</i> (cutting dengan pisau plastik/ logam, crushing/ penggerusan menggunakan logam/keramik)</li> <li>Analisa: <ul style="list-style-type: none"> <li>Kuantitas: <i>yield</i> (gravimetri)</li> <li>Kualitas : kadar air, penampakan fisik (perubahan warna, mikrobiologi), uji keaktifan (DPPH), uji antimikroba (TPC), uji intensitas warna (spektrofotometri), uji kestabilan warna</li> </ul> </li> </ul>						
Kegiatan	TAHUN 1		TAHUN 2		TAHUN 3	
	Sem. I	Sem. II	Sem. III	Sem. IV	Sem. V	Sem. VI

<p>Luaran</p> <ul style="list-style-type: none"> <li>List ranking potensi bagian-bagian buah mahkota dewa (kulit buah, pericarp, mesocarp, inti biji, gabungan) sebagai pigmen dan pengawet pangan alami</li> <li>Fitokimia bagian-bagian buah mahkota dewa</li> <li>Kondisi bahan baku yang tepat (segar/semi kering/kering) beserta prosedur standar proses penghilangan kadar airnya</li> <li>Prosedur operasi standar (<i>standard operating procedure</i>) size reduction dan perlakuan mekaniknya (<i>cutting</i>, penggerusan, <i>milling</i>)</li> </ul>						
<p>1.2 Penentuan jenis pelarut yang tepat (polar, semi, non polar dan kombinasinya)</p> <p>Tujuan</p> <ul style="list-style-type: none"> <li>Mempelajari dan mengoptimasi kemungkinan penggunaan pelarut untuk mengekstraksi senyawa non antioksidan (pengotor) terlebih dahulu <ul style="list-style-type: none"> <li>Variabel yang divariasikan: jenis pelarut non polar untuk menyingkirkan komponen non pigmen dan non pengawet</li> <li>Analisa: <ul style="list-style-type: none"> <li>Kuantitas: <i>yield</i> (gravimetri)</li> <li>Kualitas : uji keaktifan (DPPH), uji antimikroba (TPC), uji intensitas warna (spektrofotometri), uji kestabilan warna → pada ekstrak dan rafinat</li> </ul> </li> </ul> </li> </ul>						
<ul style="list-style-type: none"> <li>Mempelajari dan mengoptimasi jenis pelarut yang tepat (tunggal dan kombinasi beserta variasi urutannya) untuk ekstraksi antioksidan mahkota dewa menggunakan ekstraktor <i>batch</i> dengan pengontakan secara dispersi dan mengkaji apakah ekstrak yang didapat memiliki kestabilan warna dan daya awet yang cukup memadai <ul style="list-style-type: none"> <li>Variabel yang divariasikan: jenis pelarut (tunggal, biner, tersier dan kuarter, kombinasi sifat kepolar dan variasi urutannya)</li> <li>Analisa:</li> </ul> </li> </ul>						

<p>Kuantitas: <i>yield</i> (gravimetri)  Kualitas : uji keaktifan (DPPH), uji antimikroba (TPC), uji intensitas warna (spektrofotometri), uji kestabilan warna</p>						
<p>Luaran</p> <ul style="list-style-type: none"> <li>• Pelarut yang tepat beserta mekanisme urutan ekstraksi menggunakan kombinasi perlakuan pelarut sehingga didapat ekstrak kaya antioksidan dan minim pengotor dengan aktivitas antioksidan yang optimal yang akan digunakan sebagai pelarut pada penelitian selanjutnya</li> </ul>						
<p>Kegiatan</p>	<p>TAHUN 1</p>		<p>TAHUN 2</p>		<p>TAHUN 3</p>	
	<p>Sem. I</p>	<p>Sem. II</p>	<p>Sem. III</p>	<p>Sem. IV</p>	<p>Sem. V</p>	<p>Sem. VI</p>
<p>1.3 Pengkajian sistem ekstraktor dengan variasi 2 metode pengontakan (imersi dan dispersi)  Tujuan</p> <ul style="list-style-type: none"> <li>• Mempelajari dan mengoptimasi sistem ekstraktor (khususnya metode pengontakannya) yang yang cocok untuk ekstraksi pigmen dan pengawet alami dari buah mahkota dewa <ul style="list-style-type: none"> <li>- Variabel yang divariasikan: metode pengontakan ekstraksi (dispersi dan imersi)</li> <li>- Analisa: <ul style="list-style-type: none"> <li>Kuantitas: <i>yield</i> (gravimetri)</li> <li>Kualitas : uji keaktifan (DPPH), uji antimikroba (TPC), uji intensitas warna (spektrofotometri), uji kestabilan warna</li> </ul> </li> </ul> </li> </ul>						
<p>Keluaran</p> <ul style="list-style-type: none"> <li>• Metode dan sistem ekstraksi yang tepat untuk mendapatkan pigmen dan pengawet alami yang optimal dari mahkota dewa</li> <li>• Perancangan ekstraktor beserta sistem pengontakannya yang tepat untuk ekstraksi antioksidan mahkota dewa</li> <li>• Prosedur operasi standar untuk ekstraksi padat cair antioksidan mahkota dewa</li> </ul>						

<p><b>Proses 2:</b> (studi ekstraksi lanjutan: <i>screening</i> variabel dan optimasi kondisi ekstraksi)</p> <p>2.1 Screening variabel kondisi ekstraksi</p> <p>Tujuan</p> <ul style="list-style-type: none"> <li>• Mempelajari pengaruh variabel ekstraksi serta interaksinya terhadap kuantitas dan kualitas ekstrak yang diperoleh</li> <li>- Variabel yang divariasikan: (dispersi: rasio umpan/pelarut, temperatur, kecepatan pengadukan, dan ukuran partikel; imersi: massa umpan, laju penguapan dan kondensasi, dan ukuran partikel )</li> </ul>						
Kegiatan	TAHUN 1		TAHUN 2		TAHUN 3	
	Sem. 1	Sem. 2	Sem. 3	Sem. 4	Sem. 5	Sem. 6
<p>- Analisa: Kuantitas: <i>yield</i> (gravimetri) Kualitas : uji keaktifan (DPPH), uji antimikroba (TPC), uji intensitas warna (spektrofotometri), uji kestabilan warna</p> <p>Keluaran</p> <ul style="list-style-type: none"> <li>• Variabel yang berpengaruh dan prediksi level variasi yang tepat untuk optimasi</li> </ul> <p>Rancangan percobaan (<i>experimental design</i>) yang akan diterapkan di penelitian utama.</p>						
<p>2.2 Optimasi kondisi ekstraksi (imersi dan dispersi)</p> <p>Tujuan</p> <ul style="list-style-type: none"> <li>• Menentukan kondisi optimum ekstraksi antioksidan mahkota dewa dan penurunan modelnya</li> <li>- Variabel yang divariasikan: idem (yang berpengaruh)</li> <li>- Analisa: Kuantitas: <i>yield</i> (gravimetri) Kualitas : uji keaktifan (DPPH), uji antimikroba (TPC), uji intensitas warna (spektrofotometri), uji kestabilan warna</li> </ul> <p>Keluaran</p> <ul style="list-style-type: none"> <li>• Model matematik optimasi ekstraksi pigmen dan pengawet alami dari buah mahkota dewa yang valid</li> </ul>						

<p>2.3 Kajian pemisahan (ekstrak dari pelarutnya serta zat aktif dari ekstrak) Tujuan</p> <ul style="list-style-type: none"> <li>Mempelajari, menganalisis dan menentukan metode pemisahan ekstrak dari pelarut yang tepat sehingga didapatkan ekstrak antioksidan yang relatif bebas dari pelarut tanpa kerusakan berarti</li> <li>Variabel yang divariasikan: <ul style="list-style-type: none"> <li>metode pemisahan (evaporasi: atmosferik, vakum – variasi temperatur, pengeringan: oven vakum/atmosferik/ke langkah berikutnya*)</li> </ul> </li> </ul>						
Kegiatan	TAHUN 1		TAHUN 2		TAHUN 3	
	Sem. I	Sem. II	Sem. III	Sem. IV	Sem. V	Sem. VI
<ul style="list-style-type: none"> <li>Analisa: <ul style="list-style-type: none"> <li>Kuantitas: <i>yield</i> (gravimetri)</li> <li>Kualitas : uji keaktifan (DPPH), uji antimikroba (TPC), uji intensitas warna (spektrofotometri), uji kestabilan warna</li> </ul> </li> </ul>						
<ul style="list-style-type: none"> <li>Mempelajari, menganalisis dan menentukan metode pemisahan senyawa aktif dari ekstrak kasar yang tepat</li> <li>Variabel yang divariasikan: <ul style="list-style-type: none"> <li>metode pemisahan *(ekstraksi cair-cair, pengendapan, rekristalisasi)</li> </ul> </li> <li>Analisa: <ul style="list-style-type: none"> <li>Kuantitas: <i>yield</i> (gravimetri)</li> <li>Kualitas : uji keaktifan (DPPH), uji antimikroba (TPC), uji intensitas warna (spektrofotometri), uji kestabilan warna</li> </ul> </li> </ul>						
<p>Keluaran</p> <ul style="list-style-type: none"> <li>Prosedur standar pemisahan ekstrak dari pelarutnya yang tepat</li> <li>Rancangan proses dan alat untuk isolasi zat aktif</li> </ul>						

<p><b>Proses 3</b> (isolasi/<i>fraction collector</i> komponen aktif pigmen dan pengawet alami menggunakan <i>Reversed-Phase HPLC</i>)</p> <p>3.1 Isolasi komponen aktif pigmen dan pengawet alami buah mahkota dewa</p> <p>Tujuan Melakukan purifikasi/isolasi senyawa aktif antioksidan sehingga diketahui senyawa aktifnya dan komposisinya secara kuantitatif dan kualitatif</p> <ul style="list-style-type: none"> <li>- Variabel yang divariasikan: jenis eluen dan rasionya</li> <li>- Analisa: Kuantitas: <i>yield</i> (gravimetri)</li> </ul> <p>Kualitas : uji keaktifan (DPPH), uji antimikroba (TPC), uji intensitas warna (spektrofotometri), uji kestabilan warna, kromatogram</p>						
Kegiatan	TAHUN 1		TAHUN 2		TAHUN 3	
	Sem. 1	Sem. 2	Sem. 3	Sem. 4	Sem. 5	Sem. 6
<p>Keluaran</p> <ul style="list-style-type: none"> <li>• List komponen-komponen aktif antioksidan mahkota dewa</li> <li>• Deteksi awal kemungkinan aplikasi ekstrak yang didapat</li> </ul>						
<p>Pengujian aktivitas antioksidan dan antimikroba</p> <p>Tujuan</p> <ul style="list-style-type: none"> <li>• Mengetahui aktivitas antioksidan dan antimikroba sehingga aplikasi/pemanfaatan komponen-komponen antioksidan tersebut dapat ditentukan</li> <li>- Variabel yang divariasikan: jenis pangan yang akan diawetkan (variasi: bahan pangan kaya lemak, protein, karbohidrat, asam, netral, basa) dan diberi aditif warna ((variasi: bahan pangan kaya lemak, protein, karbohidrat, asam, netral, basa)</li> <li>- Analisa: Kualitas : daya tahan, visual (warna, tekstur, kekenyalan,</li> </ul>						

<p>dll) atau menggunakan texture analyzer, mikrobiologi (TPC)</p> <p>Keluaran</p> <ul style="list-style-type: none"><li>• Desain dan pemetaan pemanfaatan komponen-komponen aktif mahkota dewa</li></ul>						
--	--	--	--	--	--	--

## BAB V. HASIL DAN PEMBAHASAN

Terdapat tiga tahapan utama dalam penelitian ini yaitu :

1. Perlakuan awal buah mahkota dewa
2. Ekstraksi buah mahkota dewa untuk memperoleh berbagai komponen bioaktif
3. Pemisahan pelarut dari ekstrak kasar dan uji fitokimia dari ekstrak yang diperoleh

Buah mahkota dewa pada awalnya akan melewati tahapan perlakuan awal yang mencakup pencucian, pengeringan dan pengecilan ukuran. Selanjutnya buah mahkota dewa yang sudah kering dan memiliki ukuran tertentu diekstraksi menggunakan teknik yaitu teknik ekstraksi batch dengan pengontakkan dispersi.

Ekstrak kasar yang diperoleh akan melewati tahapan pemurnian berupa filtrasi untuk memisahkan antara rafinat dan ekstrak dan evaporasi vakum untuk memisahkan pelarut dari ekstrak menggunakan alat *rotary vacuum evaporator*. Ekstrak yang sudah dipekatkan akan dianalisis kandungan komponen bioaktif nya dengan berbagai metode pengujian fitokimia diantaranya adalah uji alkaloid, uji flavonoid, uji tannin dan uji saponin.

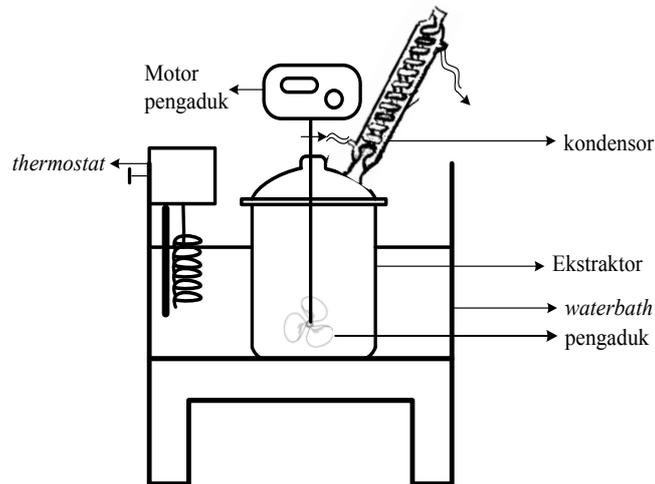
### 5.1 Bahan Penelitian

Bahan penelitian yang akan digunakan dalam studi ekstraksi mahkota dewa meliputi bahan baku, bahan utama penelitian dan bahan untuk analisis ekstrak yang diperoleh. Berikut ini adalah daftar terperinci dari bahan yang diperlukan :

1. Bahan baku  
Bahan baku yang digunakan pada penelitian ini adalah buah mahkota dewa segar yang diperoleh dari perkebunan Mahkota Dewa di Kabupaten Subang.
2. Bahan utama penelitian  
Bahan utama penelitian mencakup pelarut yang akan selama optimasi proses ekstraksi dilaksanakan yaitu metanol dan petroleum eter.
3. Bahan kimia untuk analisa  
Untuk melakukan analisa fitokimia dari hasil ekstrak kasar yang diperoleh dibutuhkan berbagai jenis pereaksi diantaranya HCl (2 N, 0,1 N), DPPH (1, 1-Diphenyl –2-picrylhydrazyl), larutan timbal asetat, larutan gelatin 1%, reagen Hager (larutan asam pikrat jenuh), reagen Dragendroff (larutan Kalium Bismut Iodida), reagen Wagner (Iodin dalam Kalium Iodida (KI)), dan reagen Mayer (Kalium Merkuri Iodida).

## 5.2 Peralatan Penelitian

Dalam penelitian ini akan digunakan alat ekstraktor *batch* dengan kapasitas 2 Liter yang dilengkapi dengan ekstraktor berpengaduk, motor pengaduk, kondensor, thermostat dan *waterbath*. Untuk skema alat ekstraktor *batch* dapat dilihat pada **Gambar 13**.



**Gambar 13.** Perangkat Ekstraktor *Batch* Berpengaduk

Selain alat utama di atas, terdapat juga berbagai alat pendukung diantaranya adalah *blender*, oven, pengering *tray*, corong *Buchner*, *rotary vaccum evaporator* dan peralatan untuk analisis (cawan penguapan, oven, eksikator, timbangan analitis, labu erlenmeyer, buret, statif) beserta alat-alat gelas pendukung seperti pipet, labu ukur, labu erlenmeyer, dan gelas kimia.

## 5.3 Prosedur Penelitian

Berdasarkan urutan pengerjaan, penelitian ini akan dilakukan dalam 4 tahapan yaitu :

1. Penentuan kecepatan pengadukan untuk ekstraktor *batch*
2. Perlakuan awal pada buah mahkota dewa
3. Perbandingan kualitatif ekstrak metanol yang didahului proses ekstraksi dengan petroleum eter dengan ekstrak metanol tanpa proses ekstraksi pendahuluan, dan
4. Penelitian utama

### 5.3.1. Penentuan Kecepatan Pengadukan

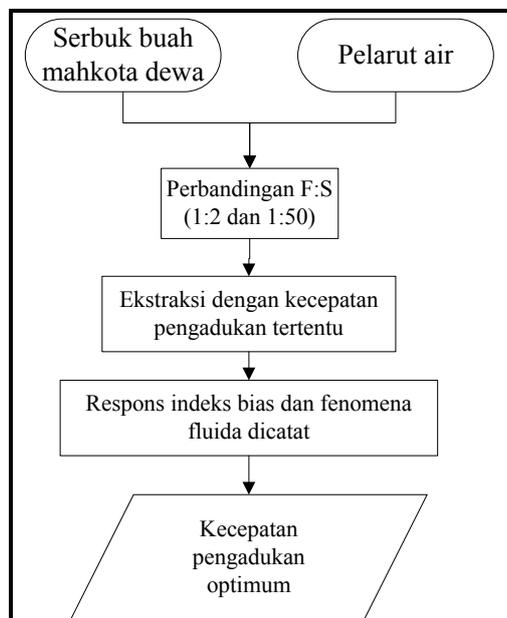
Tahapan ini dilakukan untuk menentukan kecepatan pengadukan yang sesuai, yang kemudian digunakan pada penelitian utama. Kecepatan pengadukan yang dipilih adalah pengadukan yang tidak menimbulkan fenomena seperti *vorteks* dan *dead zone* serta memberikan homogenitas campuran yang baik, diwakili oleh nilai indeks bias ekstrak yang dihasilkan dengan teknik *sampling* pada 4 titik di dalam ekstraktor.

Percobaan pendahuluan ini akan dilakukan dengan memvariasikan kecepatan pengadukan pada 2 level perbandingan F:S ekstrim (1:2 dan 1:50) dengan menggunakan pelarut air. Tujuan dari variasi ekstrim ini untuk menentukan rentang laju pengadukan yang mampu memberikan fenomena pengadukan yang baik dan homogenitas yang baik dalam ekstraktor. Air digunakan karena memiliki densitas yang tidak terlalu jauh dari metanol sehingga dapat mewakili model pengadukan dengan metanol, selain itu penggunaan air disini bertujuan untuk mengurangi jumlah penggunaan pelarut metanol yang digunakan.

Matriks percobaan penentuan kecepatan pengadukan optimum dapat dilihat pada **Tabel 2**. Tahapan percobaan pendahuluan untuk optimasi laju pengadukan adalah sebagai berikut :

1. Buah mahkota dewa yang sudah menjadi serbuk dan pelarut air dimasukkan ke dalam ekstraktor dengan berbagai variasi F:S yang sudah ditentukan yaitu 1:2 dan 1:50
2. Kecepatan pengadukan diatur dengan rentang variasi percobaan sesuai dengan kemampuan motor pengaduk dengan temperatur ekstraksi dilakukan pada temperatur ruang.
3. Proses ekstraksi dilangsungkan dengan selang waktu tertentu (90 menit) lalu sampling dilakukan pada beberapa titik di dalam ekstraktor.
4. Sampel yang diperoleh akan diuji indeks biasnya sebagai respon yang dapat mewakili konsentrasi di dalam ekstraktor serta perolehan ekstrak setelah dipekatkan yang dinyatakan massa ekstrak yang diperoleh.
5. Fenomena fluida di dalam ekstraktor selama proses ekstraksi diamati.

Diagram alir percobaan dapat dilihat pada **Gambar 14** di bawah ini.



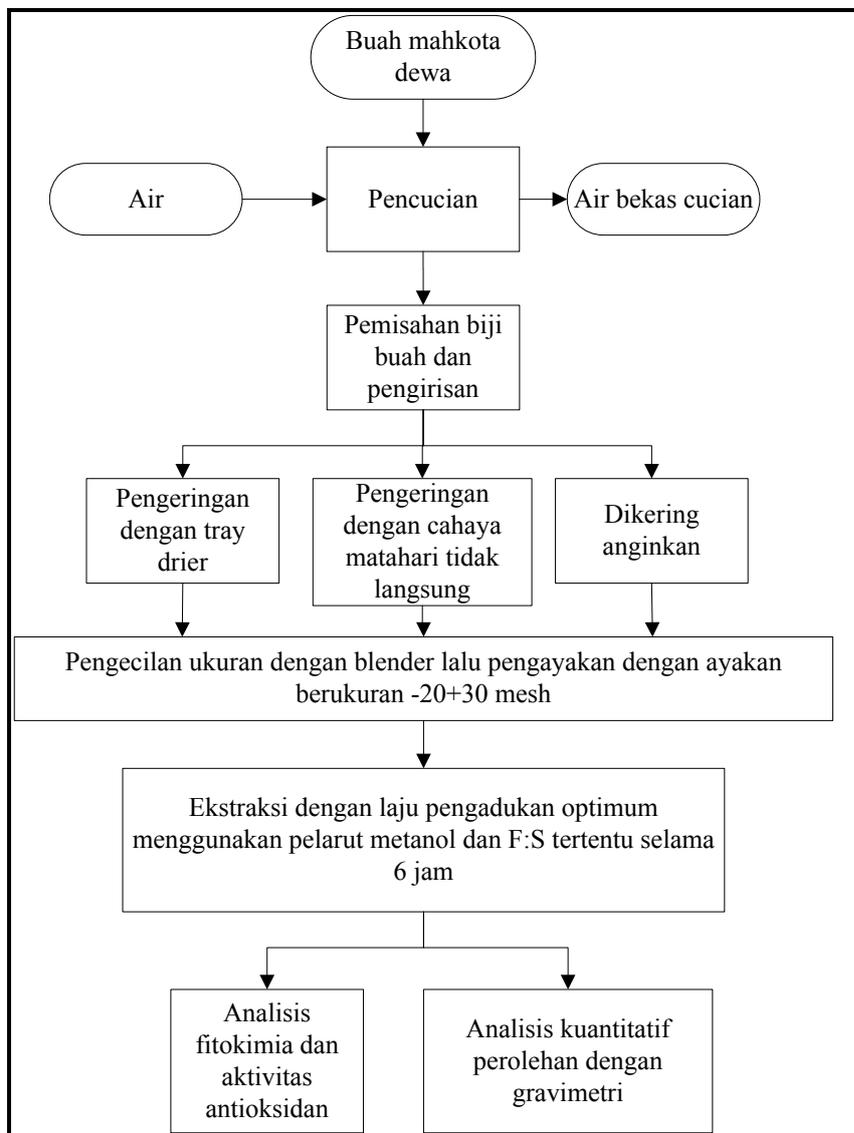
**Gambar 14.** Diagram Alir Penentuan Kecepatan Pengadukan Optimum

### 5.3.2 Optimasi Perlakuan Awal

Tujuan dari perlakuan awal ini adalah untuk meningkatkan efektifitas dari ekstraksi dengan cara menghilangkan segala pengotor yang akan mengurangi kemurnian dari ekstrak. Perlakuan awal ini juga diharapkan dapat meningkatkan perolehan ekstrak yang lebih maksimal. Bahan baku buah mahkota dewa akan melalui tahap perlakuan awal dimulai dari pencucian, pengecilan ukuran lalu dilanjutkan dengan tahap pengeringan. Tahapan perlakuan awal (dapat dilihat pada **Gambar 15**) secara rinci dapat dijabarkan sebagai berikut :

1. Buah mahkota dewa segar dicuci terlebih dahulu menggunakan air bersih untuk menghilangkan pengotor yang masih tertinggal pada buah seperti pasir, debu dan tanah.
2. Buah yang sudah dicuci dibelah dan bijinya yang beracun dipisahkan lalu daging buah yang berwarna putih dengan kulit buah yang berwarna merah diiris tipis sehingga menjadi berukuran 3 cm panjang dan lebar sekitar 1 cm.
3. Irisan buah kemudian dikeringkan dengan berbagai metode diantaranya dengan teknik pengeringan dengan perlakuan panas seperti dengan bantuan cahaya matahari, dan *tray dryer* pada temperatur maksimum 40 °C, serta tanpa perlakuan panas yaitu dengan dikering anginkan. Metode pengeringan akan divariasikan dengan tujuan untuk mencari teknik pengeringan yang dapat menghasilkan ekstrak dengan kandungan fitokimia yang masih lengkap dengan perolehan ekstrak yang baik. Pengeringan dilangsungkan sampai dengan berat irisan buah mahkota dewa kering mencapai berat yang setimbang.
4. Irisan buah yang sudah kering kemudian akan memasuki tahap pengecilan ukuran menggunakan berbagai variasi bahan dari alat pengecil ukuran, meliputi pemotongan dengan pisau plastik atau logam dan penggerusan menggunakan logam atau keramik. Setelah dikecilkan ukurannya, serbuk buah mahkota dewa akan diayak menggunakan ayakan dengan ukuran -20+30 mesh sampai ukuran partikel rata-rata mencapai 520 mikron.
5. Bubuk buah mahkota dewa dari berbagai jenis teknik pengeringan akan diekstraksi dengan teknik ekstraksi dengan pengadukan optimum selama 6 jam dengan pelarut air dan F:S tertentu untuk menguji keberhasilan teknik perlakuan awal yang dilakukan. Respon yang akan digunakan adalah kandungan senyawa fitokimia pada ekstrak, aktivitas antioksidan serta perolehan ekstrak secara gravimetri. Perhitungan perolehan ekstrak secara gravimetri dilakukan dengan melakukan sampling pada selama proses ekstraksi berlangsung dengan mekanisme pengambilan sampel sebanyak 5 mL per 15 menit sekali untuk 3 jam pertama dan 30 menit sekali untuk 3 jam selanjutnya. Sampel yang diperoleh diuapkan terlebih dahulu pelarutnya dengan teknik evaporasi dengan bantuan *hot plate* pada temperatur 40 °C di ruang asam lalu berat sampel akhir setelah penguapan dicatat. Tujuan akhir dari proses ini adalah untuk mengetahui profil perolehan berat ekstrak sehingga waktu kesetimbangan proses ekstraksi dapat ditentukan.

6. Selain itu, akan dilakukan ekstraksi buah mahkota dewa kering yang dapat dibeli di pasaran sekarang ini sebagai pembanding.



**Gambar 15.** Skema Perlakuan Awal Bahan Baku

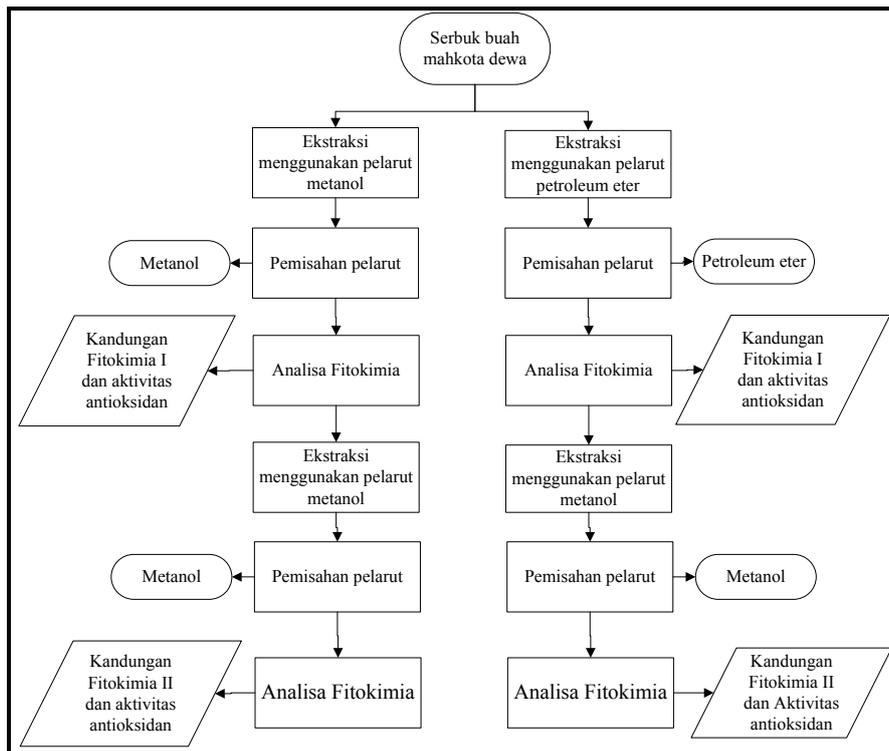
### 5.3.3 Perbandingan Kualitatif Ekstrak Metanol Murni dan Petroleum Eter-Metanol

Pada percobaan ini akan dilakukan ekstraksi buah mahkota dewa menggunakan 2 variasi perlakuan yaitu ekstraksi buah mahkota dewa dengan pelarut metanol murni dan ekstraksi buah mahkota dewa dengan pelarut metanol yang didahului dengan ekstraksi menggunakan pelarut petroleum eter.

Tujuan percobaan ini untuk mengetahui secara kualitatif ekstrak yang dihasilkan mengingat komponen bioaktif bersifat polar sedangkan senyawa pengotor lain seperti asam lemak bersifat non-polar dan dapat diekstraksi

secara spesifik menggunakan eter. Diagram alir percobaan ini dapat dilihat pada **Gambar 16**. dengan rincian prosedur percobaan sebagai berikut:

1. Serbuk buah mahkota dewa yang sudah dikeringkan menggunakan metode pengeringan yang sudah dioptimasi pada percobaan sebelumnya dimasukkan ke dalam ekstraktor dengan F:S tertentu
2. Proses ekstraksi dilakukan dengan laju pengadukan optimum selama waktu kesetimbangan yang sudah diperoleh pada kondisi gelap menggunakan pelarut metanol dan petroleum eter.
3. Ekstrak yang diperoleh akan dipisahkan pelarutnya menggunakan alat *rotary vacuum evaporator* lalu ekstrak dianalisa kandungan fitokimia dan aktivitas antioksidannya.
4. Ekstrak yang sudah terpisah dari pelarutnya akan diekstraksi kembali dengan pelarut metanol pada laju pengadukan optimum selama waktu kesetimbangan.
5. Ekstrak akan kembali dipisahkan dari pelarutnya dan dilakukan kembali analisa kandungan fitokimia serta aktivitas antioksidan dari ekstrak yang diperoleh.



**Gambar 16.** Skema perbandingan kualitatif ekstrak metanol murni dan petroleum eter-metanol

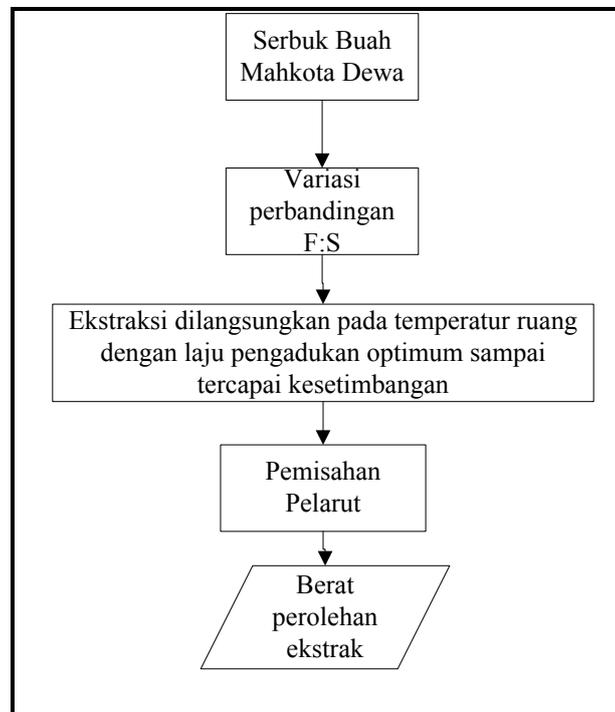
### 5.3.4 Penelitian Utama

Pada penelitian utama ini akan dilakukan optimasi kondisi operasi dari ekstraksi. Dimulai dari penentuan rentang terbaik pada berbagai rasio umpan terhadap pelarut (F:S) dan dilanjutkan dengan optimasi temperatur dan F:S pada rentang optimum yang dapat memberikan respon perolehan ekstrak yang baik dan senyawa fitokimia dalam ekstrak yang terlengkap.

Respon yang akan dicatat berupa perolehan hasil ekstrak secara gravimetri dan hasil analisa fitokimia yang terlengkap dari ekstrak yang diperoleh dari masing-masing percobaan. Berikut ini adalah prosedur penentuan rentang optimum rasio umpan terhadap pelarut :

1. Serbuk mahkota dewa dengan F:S yang sudah divariasikan dimasukkan ke dalam ekstraktor bersama pelarut metanol.
2. Ekstraksi dilangsungkan pada kondisi temperatur ruang sampai kesetimbangan tercapai dan dengan kecepatan pengadukan optimum yang sudah diperoleh.
3. Ekstrak yang diperoleh dipekatkan dengan *rotary vacuum evaporator* lalu beratnya ditimbang sehingga dapat diperoleh berat perolehan ekstrak

Diagram alir penelitian utama untuk menentukan jenis pelarut terbaik dapat dilihat pada **Gambar 17** di bawah ini.



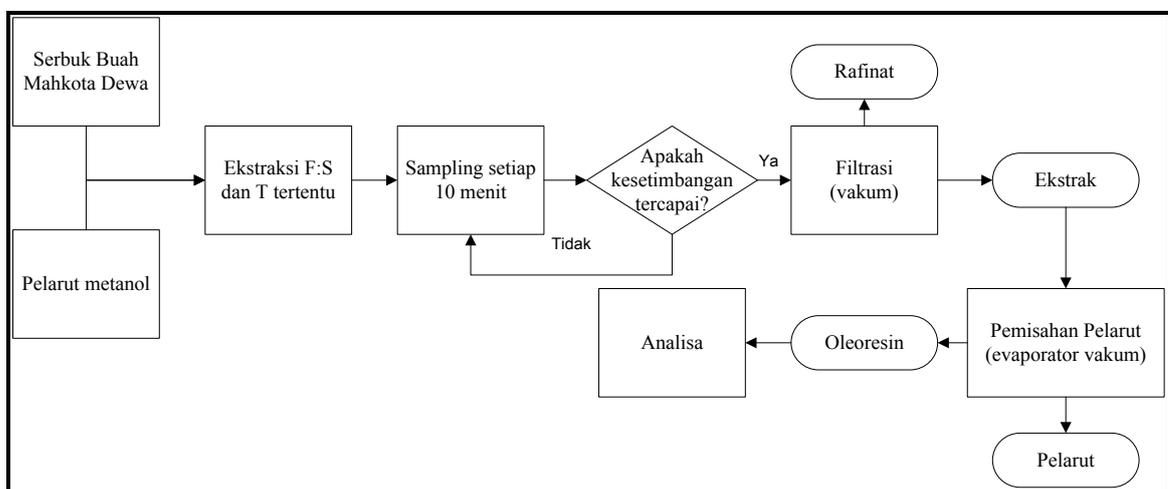
**Gambar 17.** Diagram Alir Penentuan Rentang F:S optimum

Selanjutnya penelitian dilanjutkan dengan penentuan kondisi operasi ekstraksi optimum. Penelitian akan dilakukan dengan memvariasikan rasio umpan dengan pelarut (F:S) dengan kondisi temperatur operasi. Penelitian akan dilakukan dengan melakukan variasi F:S sebanyak 5 level pada rentang optimum yang diperoleh dari percobaan sebelumnya sedangkan temperatur sebanyak 4 level pada rentang 30-60 °C yaitu (33 °C, 45 °C, 50 °C dan 60 °C). Berikut ini adalah prosedur penelitian utama :

1. Campuran serbuk buah mahkota dewa dan pelarut dengan rasio F:S dengan variasi yang akan ditentukan pada rentang variasi optimum dimasukkan ke dalam ekstraktor.

2. Pengadukan diatur pada kecepatan pengadukan optimum dan temperatur ekstraksi diatur pada 33 °C, 45 °C, 50 °C dan 60 °C.
3. Ekstrak yang dihasilkan disampling setiap 10 menit dan indeks biasanya diperiksa. Proses ekstraksi dilakukan hingga kondisi kesetimbangan tercapai.
4. Ekstrak yang diperoleh perlu dipisahkan terlebih dahulu dari rafinat yang masih terbawa menggunakan teknik filtrasi dengan bantuan pompa vakum.
5. Ekstrak yang diperoleh kemudian dipekatkan dan dipisahkan dari pelarutnya menggunakan *rotary vacuum evaporator* lalu hasilnya dianalisa.
6. Respon yang dicatat adalah berat ekstrak yang diperoleh dan analisa fitokimia dari masing-masing ekstrak.

Digram alir penelitian utama untuk menentukan kondisi ekstraksi optimum dapat dilihat pada **Gambar 18** di bawah ini.



**Gambar 18.** Diagram Alir Penelitian Utama

## 5.4 Rancangan Percobaan

Penelitian ini menggunakan berbagai rancangan percobaan dengan tujuan untuk menentukan variabel yang dapat memberikan nilai respon optimum dalam proses ekstraksi.

### 5.4.1 Rancangan Percobaan Penelitian Pendahuluan

Dalam penelitian pendahuluan ini dilakukan penentuan kecepatan pengadukan yang optimum secara visual. Variabel yang divariasikan adalah kecepatan pengadukan pada rentang 20-390 rpm divariasikan untuk 2 jenis F:S ekstrim yaitu 1:2 dan 1:50.

Respon yang diamati adalah berat perolehan ekstrak, keseragaman konsentrasi campuran yang dapat diwakili dengan pengukuran indeks bias di 4 titik beserta standard deviasi dari indeks bias dan ada tidaknya fenomena

seperti *vorteks*, *deadzone* dan *solid body*. Percobaan ini tidak menggunakan rancangan percobaan. Matriks percobaan dapat dilihat pada **Tabel 2**.

**Tabel 2.** Matriks percobaan penelitian pendahuluan

Run	Rasio F:S	Respon 1	Respon 2	Respon 3	Respon 4	Respon 5	Respon 6	Respon 7	Respon 8	Respon 9
		Perolehan ekstrak (gram)	Indeks bias 1	Indeks bias 2	Indeks bias 3	Indeks bias 4	SD Indeks Bias	<i>Vorteks</i>	<i>Dead zone</i>	<i>Solid Body</i>
1	1 : 2									
2	1 : 50									

#### 5.4.2 Rancangan Percobaan Penelitian Utama

Dalam penelitian utama ini dibagi menjadi 2 tahap penelitian yaitu penentuan jenis pelarut terbaik dan optimasi kondisi ekstraksi yang mencakup temperatur operasi dan rasio F:S. Berikut ini adalah tahapan penelitian yang dilakukan:

1. Penentuan rentang optimum F:S dengan pelarut metanol  
 Penentuan rentang F:S optimum akan dilakukan dengan melakukan variasi F:S dari rentang terkecil (1:5) sampai dengan rentang terbesar dengan tujuan untuk mencari profil perolehan ekstrak maksimum dengan rancangan percobaan disajikan pada Tabel 3.

**Tabel 3.** Penentuan rentang optimum F:S

F:S	Berat perolehan ekstrak
1:5	
1:10	
1:15	
1:20	
1:25	
dst.	

Dari hasil perolehan ekstrak akan dilakukan penentuan rentang F:S terbaik menggunakan bantuan metode LSD (*Least Singificant Difference*) untuk menentukan rentang F:S yang berbeda nyata atau memiliki efek terhadap respon berat perolehan ekstrak.

2. Penentuan kondisi optimum ekstraksi  
 Kondisi optimum ekstraksi yang akan dicari adalah perbandingan F:S dengan temperatur operasi ekstraksi. Penelitian akan dilakukan dengan melakukan variasi F:S rentang terbaik dari percobaan yang dilakukan sebelumnya sedangkan temperatur sebanyak 5 level pada rentang 35-45 °C yaitu (33 °C, 35 °C, 40 °C, 45 °C dan 47 °C). Respon yang dicatat adalah berat perolehan ekstrak dan analisa fitokimia dari masing-masing ekstrak.

Respon yang akan dicatat berupa perolehan hasil ekstrak secara gravimetri (%-rendemen), uji aktivitas antioksidan dan hasil analisa fitokimia (uji alkaloid, uji flavonoid dan uji saponin) dan rancangan percobaan yang dipilih adalah *Response Surface – Central Composite Design* yang disusun menggunakan bantuan *software design expert* versi 7.00 seperti disajikan dalam **Tabel 4**.

**Tabel 4.** Rancangan percobaan penentuan kondisi optimum ekstraksi

Run	Faktor 1	Faktor 2	Respons 1	Respons 2	Respons 3	Respons 4	Respons 5	Respons 6
	F:S (coded)	T (°C)	Berat Perolehan Ekstrak	Uji Alkaloid	Uji Flavonoid	Uji Saponin	Uji Tannin	Aktivitas Antioksidan
1	0	40						
2	0	40						
3	1	35						
4	-1	35						
5	-1.41	40						
6	0	33						
7	0	40						
8	0	47						
9	0	40						
10	1	45						
11	0	40						
12	1.41	40						
13	-1	45						

## 5.5 Analisis

Metode analisis yang dilakukan dalam penelitian ini bertujuan untuk menentukan berbagai respons yang berhubungan langsung dengan efektifitas dan efisiensi dari proses ekstraksi demi mencapai proses ekstraksi yang optimal. Berikut ini adalah beberapa analisis yang dilakukan :

### 1. Indeks Bias

Penentuan indeks bias dalam penelitian ini dilakukan menggunakan bantuan instrumen Refraktometer. Penentuan indeks bias ini didasarkan pada pengukuran langsung sudut bias ekstrak yang dihasilkan. Prosedur kerja secara lengkap dapat dilihat pada lampiran A.1

### 2. Fitokimia

Uji fitokimia yang dilakukan bertujuan untuk menentukan kandungan senyawa bioaktif di dalam ekstrak buah mahkota dewa yang kelak akan

memberikan informasi tentang kandungan antioksidan di dalam ekstrak yang diperoleh. Uji yang dilakukan mencakup uji alkaloid, uji flavonoid, uji tannin dan uji saponin. Prosedur uji fitokimia secara lengkap dapat dilihat pada lampiran A.2.

## 5.6 Laporan Kemajuan Penelitian

Dalam laporan tahap II ini akan dibahas hasil-hasil penelitian yang sudah selesai dilaksanakan **sampai dengan tanggal 30 Oktober 2013**, diantaranya penentuan metode persiapan bahan baku buah mahkota dewa berdasarkan hasil uji kualitatif penapisan fitokimia dan uji kuantitatif antioksidan dengan metode DPPH, penentuan rentang operasi F:S untuk ekstraksi buah mahkota dewa dengan pelarut metanol teknis dan optimasi proses ekstraksi.

### 5.6.1 Penentuan Metode Persiapan Bahan Baku

Pada tahap awal penelitian, terlebih dahulu dilakukan pencarian pemasok bahan baku buah mahkota dewa segar dengan tujuan mencari pemasok buah mahkota dewa yang memiliki skala produksi buah yang cukup besar dan berkala sehingga ketersediaan buah selama penelitian dapat terjaga. Buah mahkota dewa yang digunakan dalam penelitian ini diperoleh dari perkebunan masyarakat di Kelurahan Dangdeur, Kota Subang, Jawa Barat. Pada **Gambar 19** di bawah ini dapat dilihat perkebunan masyarakat yang dimaksud.



(a)

(b)

**Gambar 19.** Perkebunan masyarakat buah mahkota dewa, Kelurahan Dangdeur, Kota Subang, Jawa Barat

Perlakuan awal bahan baku dimulai dengan melakukan seleksi buah mahkota dewa segar. Buah mahkota dewa yang digunakan dalam penelitian ini adalah buah yang sudah berwarna merah dan tidak memiliki cacat atau kerusakan pada kulit buah ataupun daging buahnya. Buah mahkota dewa mula-mula akan dibelah lalu bijinya dipisahkan dan kemudian diiris tipis. Irisan buah akan segera dikeringkan menggunakan variasi pengeringan diantaranya adalah dengan *tray dryer*, pengeringan dengan dianginkan, dan dengan bantuan sinar matahari. Proses pengeringan dilakukan dengan tujuan untuk memperpanjang masa simpan dengan

memperhatikan kualitas bahan (kandungan bioaktif) sebelum tahapan proses ekstraksi.

Proses pengeringan ini dilakukan sampai dengan kadar air bahan mencapai kisaran 7-10 %, sehingga buah segar yang biasanya busuk dalam hitungan hari dapat disimpan sampai 2-3 bulan. Dalam percobaan ini, penentuan kadar air bahan dilakukan dengan bantuan instrumen *moisture analyzer* yang menggunakan prinsip *thermo-gravimetri*, yaitu metode pemanasan dengan lampu halogen, untuk menentukan kadar air bebas (teruapkan) yang masih terdapat dalam sampel. **Gambar 20** memperlihatkan buah mahkota dewa sebelum dan sesudah dikeringkan



**Gambar 20.** Buah mahkota dewa sebelum (a) dan sesudah dikeringkan (b)

Penjelasan dan hasil percobaan dari berbagai variasi teknik pengeringan seperti *tray dryer*, kering angin, serta pengeringan dengan matahari akan dijelaskan lebih lanjut.

#### 5.6.1.1 Pengeringan dengan *Tray Dryer*

Pada proses pengeringan dengan *tray dryer*, dilakukan penimbangan massa buah masing-masing tray setiap rentang waktu tertentu untuk menentukan titik akhir dari proses pengeringan. Titik akhir pengeringan ini dicapai saat massa buah dalam tray tidak berubah lagi atau konstan, atau dengan kata lain titik ini merupakan titik saat kandungan air dalam buah sudah tidak dapat teruapkan lagi pada kondisi proses tersebut.

Proses pengeringan dengan *tray dryer* dilakukan pada kondisi operasi temperatur 40 °C. Profil perubahan massa buah selama proses pengeringan dengan *tray dryer* dapat dilihat pada **Tabel 5** di bawah ini. Data tersebut pada awalnya akan digunakan untuk membuat kurva pengeringan dengan tujuan untuk menentukan lamanya proses pengeringan dengan *tray dryer*. Proses pengambilan data di atas ini tidak selesai dan profil yang

tercatat hanya selama 270 menit sejak pengeringan dimulai dan massa buah dalam tray baru ditimbang lagi keesokan harinya.

Buah kering yang diperoleh diukur kadar airnya dengan *moisture analyzer* dan diperoleh kadar air pada buah kering sebesar 5,07 % (sudah memenuhi standar yang ditetapkan yaitu berada pada kisaran 7-10% atau lebih rendah). Pembuatan kurva pengeringan sedang dilakukan kembali dan data akan dimasukkan dalam laporan akhir penelitian ini.

**Tabel 5.** Profi massa buah selama proses pengeringan dengan *Tray Dryer*

t (menit)	m buah (g)
0	89,39
15	84,74
30	79,88
45	75,17
60	70,63
75	66,88
90	62,45
105	58,41
120	54,50
135	50,52
150	46,94
165	43,61
180	40,31
195	37,14
210	33,61
225	31,50
240	29,01
255	26,73
270	24,80
~	14,86 (konstan)

### 5.6.1.2 Pengeringan dengan Kering Angin

Metode lain yang digunakan untuk pengeringan buah mahkota dewa adalah pengeringan dengan diangin-anginkan (metode kering angin). Pengeringan metode ini dilakukan dengan cara menempatkan irisan-irisan tipis buah mahkota dewa di atas loyang plastic, kemudian didiamkan dalam ruangan berventilasi baik dan terhindar dari cahaya matahari. Pengukuran massa untuk metode pengeringan ini dilakukan satu kali per hari dan hasilnya dapat dilihat pada **Tabel 6** di bawah ini.

Selain pengukuran massa, sesekali buah yang sudah dikeringkan diukur kadar airnya dengan instrumen *moisture analyzer*. Berdasarkan data yang diperoleh, dapat dilihat bahwa sebenarnya pengeringan dengan diangin-anginkan ini menghasilkan profil massa buah yang berfluktuasi. Massa buah akan naik dan turun seiring dengan berubahnya cuaca pada lingkungan sekitar ruangan. Apabila terjadi hujan, maka kelembaban udara akan meningkat sehingga terjadi perpindahan air dari udara menuju ke buah mahkota dewa yang sudah kering, sehingga terjadi kenaikan massa.

**Tabel 6.** Profil massa buah selama proses pengeringan dengan angin

<b>Tanggal</b>	<b>Massa Buah (gram)</b>	<b><i>Moisture analyzer</i></b>
24/5/2013	233,93	-
29/5/2013	43,43	18,38 %
30/5/2013	42,46	-
31/5/2013	42,22	-
3/6/2013	40,52	-
4/6/2013	40,63	13,46 %
5/6/2013	40,79	-
10/6/2013	40,14	-
11/6/2013	41,97	-
12/6/2013	41,62	16,56%
13/6/2013	41,86	-
17/6/2013	37,83	13,50 %

Berdasarkan data di atas, dapat diambil kesimpulan, pengeringan dengan metode ini cukup dilakukan selama kira-kira 10 hari (dari 24 Mei sampai dengan 3 Juni 2013) dan kadar air buah kering hanya dapat mencapai 13%. Oleh karena, pengeringan buah mahkota dewa dengan metode ini kurang disarankan untuk proses produksi kontinu skala besar karena sangat dipengaruhi oleh faktor cuaca yang merupakan faktor yang tidak dapat dikendalikan oleh manusia, proses pengeringan yang lambat dan kadar air akhir masih relatif tinggi. Namun cara pengering ini memiliki kelebihan utama yaitu biaya investasi maupun operasi yang sangat rendah.

### **5.6.1.3 Pengeringan dengan Cahaya Matahari**

Teknik pengeringan ini merupakan salah satu teknik yang paling umum digunakan oleh pengusaha kecil-menengah dalam bentuk ekstrak ataupun masih dalam bentuk buah kering saja yang dijadikan serbuk teh. Buah mahkota dewa segar selain dikeringkan dengan diangin-anginkan dan tray dryer, dicoba dikeringkan juga dengan metode ini. Pengeringan buah

mahkota dewa dengan metode ini dilakukan dengan cara menempatkan irisan buah mahkota dewa ditempatkan dalam loyang yang bagian atasnya ditutupi dengan *fiber glass* dengan tujuan untuk mengurangi paparan sinar UV yang terkandung dalam cahaya matahari pada buah. Selain itu, apabila cuaca berubah mendung atau hujan, buah akan langsung dipindahkan ke dalam ruangan dan didiamkan terbuka di dalam ruangan.

Untuk mengetahui titik akhir pengeringan maka dilakukan pula pengukuran massa sebelum dan sesudah buah dikeringkan per hari mengingat terdapat efek pengeringan karena ada kombinasi pengeringan dengan diangin-anginkan pada saat buah didiamkan di dalam ruangan. Selain pengukuran massa, dilakukan pula pengukuran kadar air pada beberapa titik seperti disajikan pada Tabel 7.

**Tabel 7.** Profil massa buah selama pengeringan matahari

<b>Tanggal</b>	<b>Massa Buah Awal (gram)</b>	<b>Massa Buah Akhir (gram)</b>	<b>Moisture analyzer</b>
24/5/2013	204,10	-	-
29/5/2013	39,56	32,62	33,98 %
30/5/2013	32,62	29,39	-
31/5/2013	29,36	30,38	-
3/6/2013	30,19	30,36	-
4/6/2013	30,26	28,79	5,86 %

Pada **Tabel 7** di atas dapat dilihat bahwa profil massa buah mahkota dewa yang diperoleh tidak mengalami penurunan massa yang konsisten, melainkan terdapat data dengan massa buah yang naik kembali. Hal ini diakibatkan karena tertutupnya cahaya matahari oleh awan pada hari tersebut. Selain itu, terkadang hari hujan sehingga buah tidak dijemur. Dari data yang diperoleh, dapat disimpulkan bahwa pengeringan dengan matahari dapat memperoleh kadar air di bawah 10% yaitu 5,86% setelah dilakukan pengeringan dengan matahari selama 11 hari. Jika diinginkan target kadar air sebesar 10%, waktu pengeringan sekitar satu minggu sudah memadai.

#### **3.6.1.4 Ekstraksi Dan Uji Fitokimia Buah Mahkota Dewa dengan Berbagai Variasi Metode Pengeringan**

Buah mahkota dewa yang sudah dikeringkan, kemudian dikecilkan ukurannya dengan menggunakan blender. Buah mahkota dewa, yang berserabut, tidak dapat diblender dengan mudah dan ketika diblender tidak menghasilkan produk buah berbentuk serbuk melainkan seperti serabut-serabut halus seperti kapas. Oleh karena itu, dalam penelitian ini tidak

dilakukan penyeragaman ukuran menggunakan ayakan mesh. Namun demi mempersempit ketersebaran ukuran buah kering maka proses pengecilan ukuran perlu dikendalikan agar diperoleh hasil yang seragam, yaitu dengan menggunakan kecepatan putaran blender yang sama, massa buah per proses yang sama dan waktu proses yang sama.

Metode ekstraksi yang digunakan adalah teknik ekstraksi dengan sistem kontak dispersi. Dalam teknik dispersi ini, padatan dan pelarut akan dikontakkan sambil diaduk dengan intensitas tinggi. Proses ekstraksi dilangsungkan hingga mencapai titik kesetimbangan. Penentuan titik kesetimbangan dalam proses ekstraksi ini dilakukan dengan melakukan pengambilan sampel sebanyak 5 mL selama proses ekstraksi berlangsung dengan frekuensi pengambilan sampel 15 menit untuk 2 jam pertama, diikuti dengan 30 menit sekali untuk 2 jam berikutnya dan 60 menit sekali untuk jam-jam selanjutnya sampai kesetimbangan tercapai.

Sampel yang diperoleh kemudian diuapkan di dalam cawan penguapan menggunakan bantuan alat *hot plate* sebagai sumber panas untuk proses evaporasi di dalam ruang asam. Proses penguapan sampel dilakukan sampai berat sampel di dalam cawan penguapan mencapai titik kesetimbangan atau dengan kata lain jumlah pelarut yang diuapkan sudah mencapai jumlah maksimumnya. Penentuan kesetimbangan proses penguapan sampel dilakukan dengan melakukan pengecekan berat sampel dalam cawan setiap 15 menit sekali menggunakan neraca analitik dengan ketelitian 0,1 mg.

#### **3.6.1.4.1 Percobaan Pendahuluan Ekstraksi**

Untuk proses ekstraksi pada bagian ini, tidak dilakukan variasi parameter proses mengingat tujuan percobaan pendahuluan ini adalah hanya untuk mencari dan membandingkan kualitas ekstrak yang diperoleh dari berbagai jenis metode perlakuan awal. Untuk proses ekstraksi pada bagian ini, proses dilangsungkan pada temperatur ruang dan dengan F:S = 1:40 dengan kecepatan pengadukkan yang tidak menimbulkan efek seperti *deadzone*, *vortex* dan *solid body* yaitu pada kecepatan 400 rpm. Pelarut yang digunakan adalah metanol teknis dengan kemurnian sekitar 99% yang diperoleh dari Bratachem. Jumlah pelarut yang digunakan per batch proses adalah sebanyak 500 mL, sehingga untuk F:S = 1 :40, maka umpan yang diperlukan per batch adalah 12,5 gram buah mahkota dewa kering.

Umpan yang digunakan dalam proses ekstraksi ini adalah buah mahkota dewa yang sudah dikeringkan dengan metode kering angin, tray dryer dan pengeringan dengan matahari. Selain itu, sebagai pembanding (*benchmark*) digunakan juga buah mahkota dewa yang sudah dikeringkan dan dapat dengan mudah diperoleh di toko obat tradisional di Kota Bandung. Pada bagian selanjutnya akan disajikan data dan pembahasan hasil penelitian untuk percobaan pendahuluan ini.

Setelah proses mencapai kesetimbangan, maka ekstrak yang diperoleh dipisahkan terlebih dahulu dari padatannya menggunakan teknik

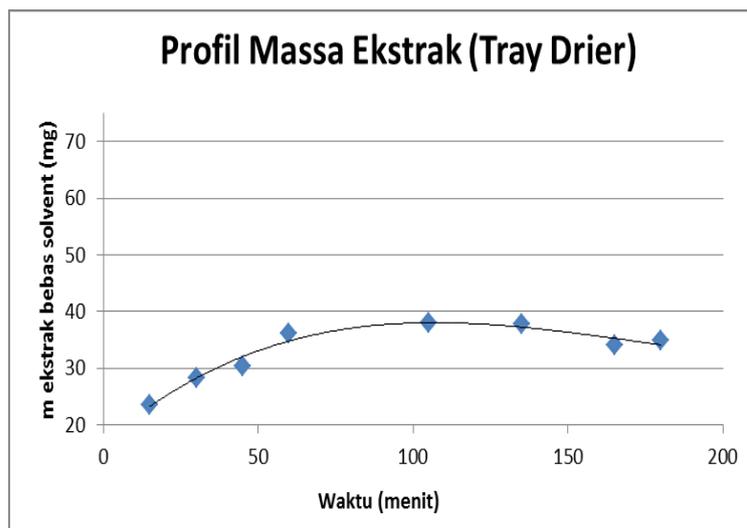
filtrasi vakum. Ekstrak bebas padatan yang diperoleh kemudian dipisahkan dari pelarutnya dengan alat *rotary vacuum evaporator* ( $P = 33,7$  kPa sampai dengan  $7,2$  kPa ;  $T$  water bath =  $50$  °C ;  $T$  larutan ekstrak di dalam labu erlenmeyer =  $\pm 42$  °C) sampai ekstrak yang diperoleh berbentuk pasta dan tidak ada lagi pelarut yang dapat teruapkan.

#### 5.6.1.4.1.1 Ekstraksi Buah Mahkota Dewa Yang Dikeringkan dengan Metode *Tray Dryer*

Pada **Tabel 8** di bawah ini dapat dilihat profil massa sampel untuk penentuan kesetimbangan dari proses ekstraksi buah mahkota dewa yang dikeringkan dengan metode *tray dryer*. Berdasarkan data yang diperoleh, dapat dilihat bahwa jumlah sampel yang diambil memiliki ketersebaran data yang besar, sehingga dapat disimpulkan bahwa setiap kali pengambilan sampel, jumlah sampel yang diambil sangat berbeda. Namun sebenarnya yang terjadi adalah sampel yang diambil sebenarnya tetap  $5$  mL namun sering terdapat banyak padatan yang terbawa ke dalam sampel, sedangkan pada saat akan diuapkan menggunakan cawan penguapan, ekstrak yang dipindahkan ke dalam cawan penguapan adalah ekstrak yang dari bebas padatan. Berdasarkan data pada **Tabel 8** di atas, dapat dibuat grafik profil massa ekstrak yang diperoleh terhadap waktu pada **Gambar 21** di bawah ini.

**Tabel 8.** Profil massa sampel (ekstrak) yang sudah diuapkan dari proses ekstraksi buah mahkota dewa yang dikeringkan dengan metode *tray dryer*

t	m sampel (mg)	m ekstrak free solvent (mg)
15	2682,4	23,6
30	2212,3	28,4
45	2285,2	30,3
60	2107,7	36,1
75	3061,7	26,0
90	1524,7	29,3
105	3144,8	38,0
120	3258,2	31,6
135	3195,6	37,8
150	2252,0	20,1
165	2828,8	34,0
180	2600,7	34,9
195	1435,7	18,7
210	2586,1	22,3
240	2310,9	23,4
270	2577,7	15,5



**Gambar 21.** Profil massa ekstrak (sampel) bebas pelarut terhadap lamanya proses ekstraksi untuk pengeringan *tray dryer*

Dari grafik pada **Gambar 21** dapat dilihat bahwa kesetimbangan proses ekstraksi terjadi setelah proses berlangsung sekitar 100 menit dengan perolehan maksimum massa ekstrak per 5 mL sampel sekitar 38 mg. **Tabel 9** di bawah ini merupakan hasil perhitungan neraca massa dan perolehan ekstrak dari proses ekstraksi ini.

**Tabel 9.** Perhitungan neraca massa proses ekstraksi buah mahkota dewa yang dikeringkan dengan metode *tray dryer*

<i>Feed</i> = 12,50 gram
<i>Solvent</i> (500 mL) = 393,63 gram
Ekstrak = 311,095 gram
Rafinat = 95,04 gram
Produk bebas pelarut (pasta) = 2,44 gram

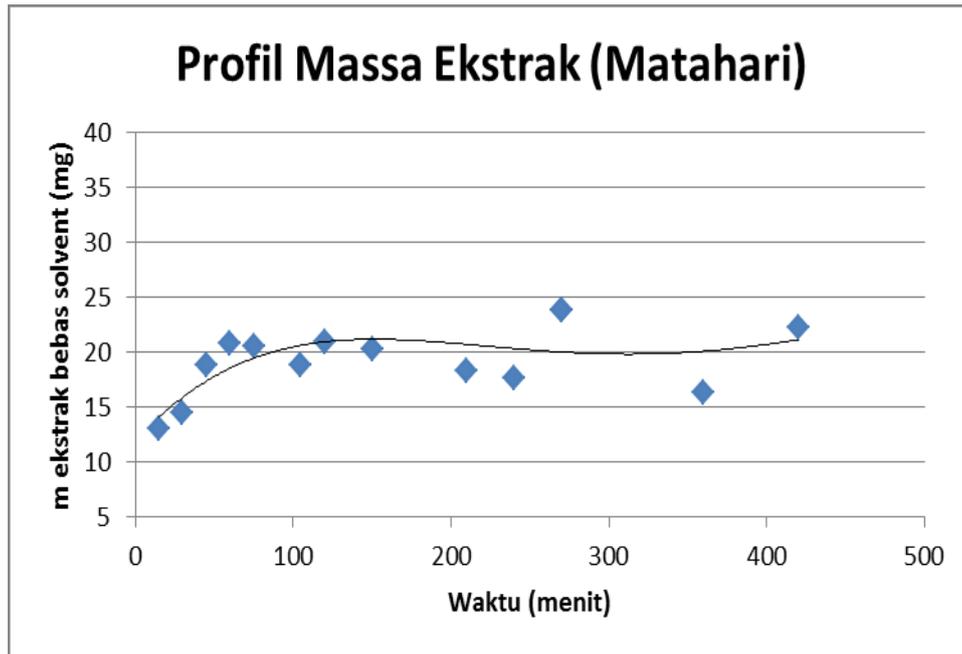
#### 5.6.1.4.1.2 Ekstraksi Buah Mahkota Dewa Yang Dikeringkan dengan Cahaya Matahari

Dengan metode ekstraksi yang sudah dijelaskan sebelumnya, maka data pada **Tabel 10** di bawah ini adalah profil massa sampel untuk penentuan kesetimbangan dari proses ekstraksi buah mahkota dewa yang dikeringkan dengan bantuan cahaya matahari.

**Tabel 10.** Profil massa sampel (ekstrak) yang sudah diuapkan dari proses ekstraksi buah mahkota dewa yang dikeringkan dengan bantuan cahaya matahari

t	m sampel (mg)	m ekstrak free solvent (mg)
15	4602,9	13,1
30	4441,3	14,5
45	4295,1	18,9
60	4251,1	20,8
75	4478,2	20,6
90	4409,6	7,7
105	4513,3	18,9
120	4147,9	20,9
150	3909,6	20,3
180	4341,9	8,8
210	4293,6	18,3
240	4838,6	17,7
270	4891,4	23,9
300	4494,3	11,3
360	4385,0	16,3
420	4111,7	22,3

Berdasarkan dari data di atas dapat dilihat bahwa massa sampel yang diperoleh untuk percobaan ini memiliki ketersebaran data yang relatif sempit (standard deviasi =  $4400.35 \pm 250.32$  mg) sehingga massa perolehan ekstrak bebas pelarut memiliki kecenderungan seperti yang dapat dilihat pada grafik pada **Gambar 22** bawah ini.



**Gambar 22.** Profil massa ekstrak (sampel) bebas pelarut terhadap lamanya proses ekstraksi untuk pengeringan dengan cahaya matahari

Berdasarkan grafik di atas dapat disimpulkan bahwa waktu kesetimbangan untuk proses ekstraksi ini adalah setelah proses ekstraksi berjalan selama kurang lebih 100 menit dengan perolehan maksimum massa ekstrak per 5 mL sampel sekitar 20 mg. Pada **Tabel 11** dapat dilihat hasil perolehan proses ekstraksi batch untuk buah mahkota dewa yang dikeringkan dengan cahaya matahari.

**Tabel 11.** Perhitungan neraca massa proses ekstraksi buah mahkota dewa kering matahari

<i>Feed</i> = 12,50 gram
<i>Solvent</i> (500 mL) = 393,63 gram
Ekstrak = 291,38 gram
Rafinat = 44,345 gram
Produk bebas pelarut (pasta) = 0,45 gram

#### 5.6.1.4.1.3 Ekstraksi Buah Mahkota Dewa yang Diperoleh dari Toko Obat Tradisional

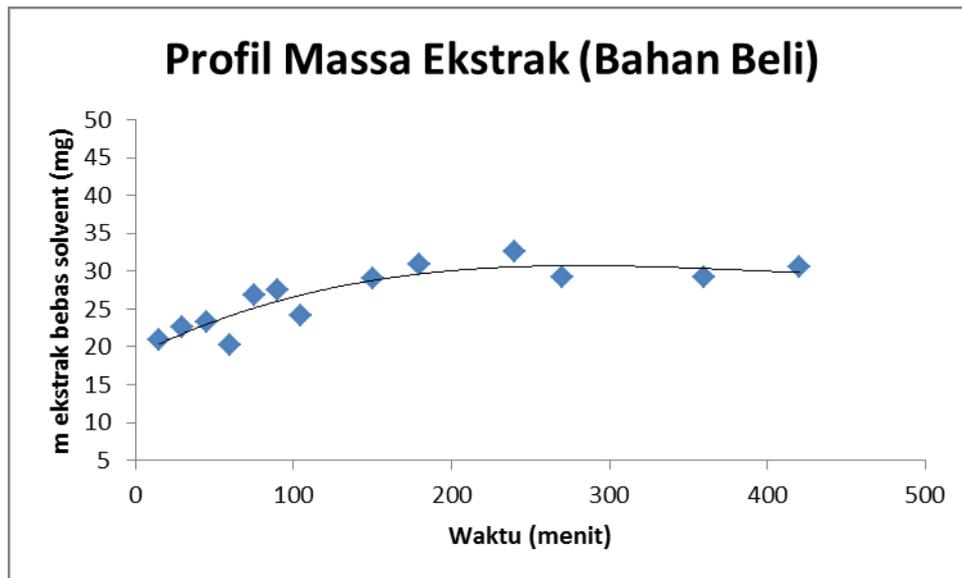
Sebelum proses ekstraksi dilakukan, buah mahkota dewa kering yang diperoleh dari toko obat tradisional pun tetap mengalami proses perlakuan

awal seperti metode lainnya dan tetap diperiksa kadar airnya. Buah mahkota dewa kering yang diperoleh dari toko obat tradisional memiliki kadar air sebesar 9,38 %. Berikut ini pada **Tabel 12** profil massa sampel untuk penentuan kesetimbangan dari proses ekstraksi buah mahkota dewa kering yang diperoleh dari toko obat tradisional.

**Tabel 12.** Profil massa sampel (ekstrak) yang sudah diuapkan dari proses ekstraksi buah mahkota dewa kering yang diperoleh dari toko obat tradisional

t	m sampel (mg)	m ekstrak free solvent (mg)
15	4258,6	21,0
30	4067,1	22,6
45	4352,5	23,3
60	4267,8	20,3
75	4503,8	26,8
90	4338,5	27,5
105	4042,3	24,2
120	4114,7	18,1
150	4430,1	29,0
180	4682,9	30,9
210	4181,4	18,1
240	4380,9	32,6
270	4433,2	29,2
300	4276,7	19,9
360	4363,6	29,2
420	4390,7	30,5

Berdasarkan data di atas dapat dihitung ketersebaran massa sampel menggunakan perhitungan standard deviasi dari populasi massa sampel. Dari perhitungan diperoleh hasil  $4317.8 \pm 165.96$  mg. Sehingga dapat disimpulkan ketersebaran massa per sampel relatif sempit atau jumlah sampel yang diambil per pengambilan hampir sama dengan perkiraan error sebesar 165.96 mg. **Gambar 23** menunjukkan profil massa sampel yang sudah dikeringkan sampai berat konstan.



**Gambar 23.** Profil massa ekstrak (sampel) bebas pelarut terhadap lamanya proses ekstraksi untuk buah mahkota dewa kering yang diperoleh dari pasar

Berdasarkan profil di atas dapat dilihat bahwa waktu proses mencapai kesetimbangan adalah sekitar 200 menit dengan perolehan ekstrak bebas pelarut maksimum per 5 mL sampel sebesar 30 mg. Pada **Tabel 13** dapat dilihat hasil perolehan proses ekstraksi batch untuk buah mahkota dewa yang dikeringkan dengan cahaya matahari.

**Tabel 13.** Perhitungan neraca massa proses ekstraksi buah mahkota dewa kering yang dibeli dari pasar

<i>Feed</i> = 12,50 gram
<i>Solvent</i> (500 mL) = 392,64 gram
Ekstrak = 367,87 gram
Rafinat = 37,28 gram
Produk bebas pelarut (pasta) = 1,38 gram

#### 5.6.1.4.1.4 Ekstraksi Buah Mahkota Dewa yang Dikeringkan dengan Kering Angin

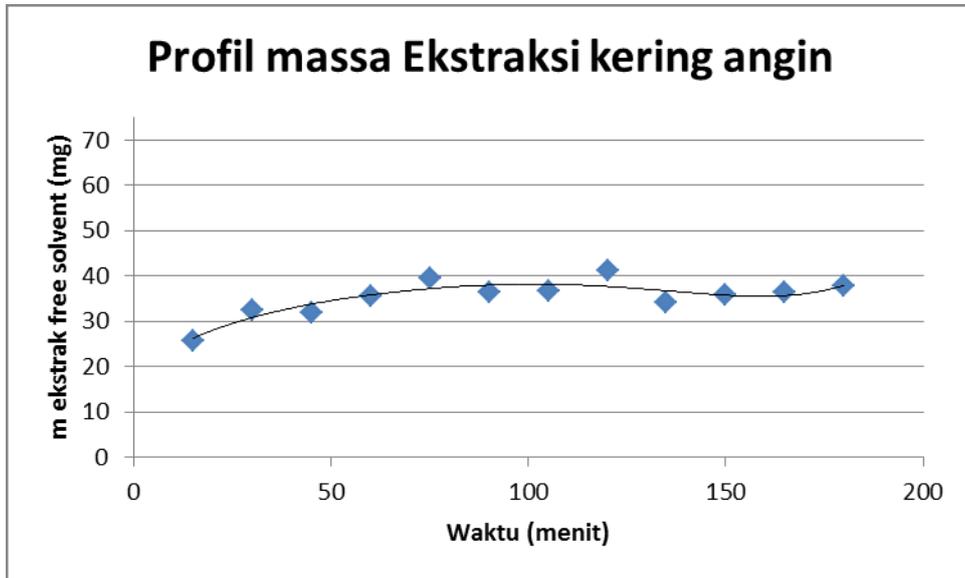
Proses ekstraksi dilakukan dengan metode yang sama persis dengan proses-proses sebelumnya. **Tabel 14** menunjukkan profil massa sampel untuk penentuan kesetimbangan dari proses ekstraksi buah mahkota dewa yang dikeringkan dengan kering angin.

**Tabel 14.** Profil massa sampel (ekstrak) yang sudah diupkan dari proses ekstraksi buah mahkota dewa kering yang dikeringkan dengan kering angin

t	m sampel (mg)	m ekstrak free solvent (mg)
15	4090,1	25,8
30	4331,3	32,5
45	4278,0	31,8
60	4490,1	35,5
75	4948,8	39,6
90	4418,9	36,5
105	4496,6	36,8
120	4790,1	41,1
150	4233,0	34,2
180	4408,4	35,9

Berdasarkan data-data sebelumnya yang selalu menunjukkan titik kesetimbangan setelah proses ekstraksi dilakukan sekitar 2 jam (100 menit), maka proses ekstraksi untuk bahan kering angin hanya dilakukan selama 3 jam saja (180 menit). Berdasarkan data di atas dapat dihitung keterseban massa sampel menggunakan perhitungan standard deviasi dari populasi massa sampel. Dari perhitungan diperoleh hasil  $4439.3 \pm 232.89$  mg yang menunjukkan bahwa jumlah sampel yang diambil per pengambilan hanya memiliki error yang kecil yaitu berada pada kisaran 232.89 mg. **Gambar 24**

menunjukkan profil massa sampel yang sudah dikeringkan sampai berat konstan.



**Gambar 24.** Profil massa ekstrak (sampel) bebas pelarut terhadap lamanya proses ekstraksi untuk buah mahkota dewa kering dengan teknik kering angin

Dari **Gambar 24** di atas dapat dilihat waktu kesetimbangan proses ekstraksi tercapai saat proses sudah dioperasikan selama 100 menit dengan massa ekstrak maksimum per 5 mL sampel yang diambil berada pada kisaran 40 mg. Pada **Tabel 15** dapat dilihat hasil perolehan proses ekstraksi batch untuk buah mahkota dewa yang dikeringkan dengan kering angin yang dihitung dengan neraca massa ideal.

**Tabel 15.** Perhitungan neraca massa proses ekstraksi buah mahkota dewa kering yang dikeringkan dengan kering angin

<i>Feed</i> = 12,50 gram
<i>Solvent</i> (500 mL) = 391,26 gram
Ekstrak = 353,54 gram
Rafinat = 50,22 gram

#### 5.6.1.5 Perbandingan Kualitas Ekstrak Buah Mahkota Dewa dari Berbagai Variasi Perlakuan Awal

Sebagai dasar penilaian, dalam penelitian ini dilakukan 2 uji yang terdiri dari uji kualitatif dan uji kuantitatif. Uji kualitatif yang digunakan adalah

uji penapisan fitokimia sedangkan uji kuantitatif yang digunakan adalah uji DPPH untuk menentukan banyaknya antioksidan dalam ekstrak kasar buah mahkota dewa.

Uji kualitatif penapisan fitokimia yang dilakukan diantaranya uji fenolik, uji flavonoid, uji tannin, uji saponin, uji alkaloid dan uji fitosterol (steroid dan triterpenoid). Prosedur rinci dari masing-masing uji dan foto-foto hasil uji fitokimia akan dilaporkan dalam laporan akhir.

**Tabel 16** menunjukkan hasil uji penapisan fitokimia dari berbagai ekstrak buah mahkota dewa dengan variasi perlakuan awal. Dapat dilihat pada **Tabel 3.15** bahwa metode kering angin dan metode tray dryer memberikan senyawa aktif fitokimia yang terlengkap sedangkan ekstrak kasar buah mahkota dewa yang diperoleh dari hasil pengeringan dengan cahaya matahari kehilangan senyawa-senyawa golongan alkaloid di dalam buah mahkota dewa. Sementara itu, buah mahkota dewa kering yang diperoleh dari toko obat tradisional selain kehilangan alkaloid, ekstrak juga kehilangan komponen saponin yang diduga disebabkan oleh proses pencucian buah dengan air.

**Tabel 16.** Hasil uji penapisan fitokimia dari berbagai ekstrak buah mahkota dewa dengan berbagai variasi perlakuan awal

Uji Fitokimia	<i>Tray Dryer</i>		Kering Angin		Matahari			Bahan Beli		
<b>Fenolik</b>	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
<b>Flavonoid</b>	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
<b>Saponin</b>	+	+	+	+	+	+	+	-	-	-
<b>Alkaloid</b>	+	+	+	+	-	-	-	-	-	-
<b>Fitosterol</b>	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
<b>Tannin</b>	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+

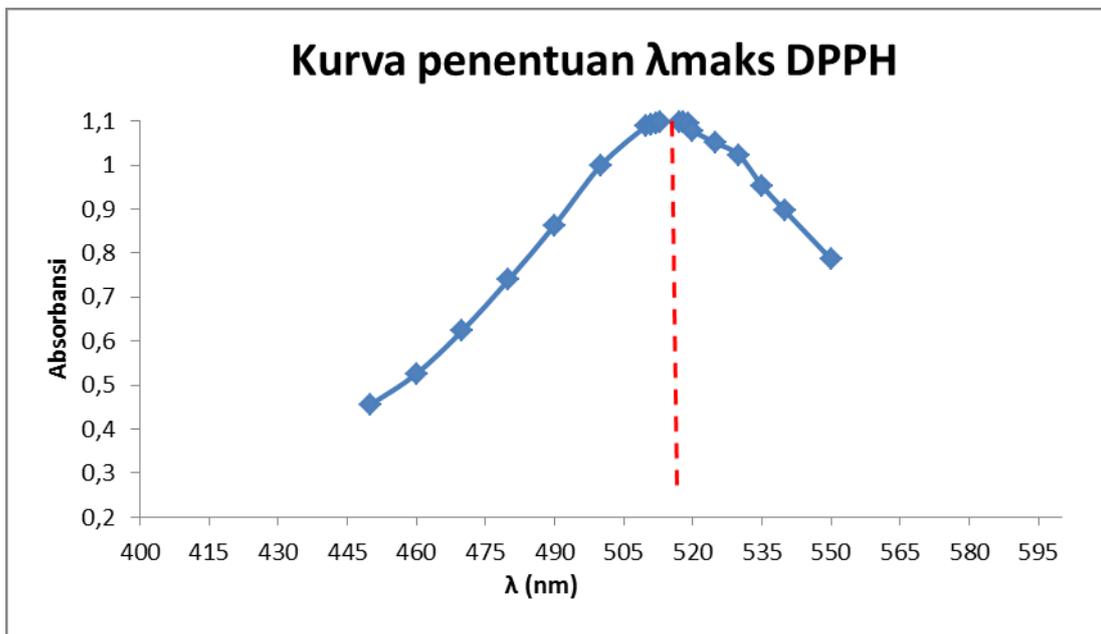
Hasil uji penapisan fitokimia di atas didukung dengan data hasil uji kuantitatif dengan DPPH. Uji DPPH dilakukan dengan konsentrasi ekstrak 200 ppm dengan konsentrasi DPPH sebesar 0,1 mM dengan komposisi volume ekstrak : volume DPPH = 2:3 dengan waktu inkubasi selama 4 jam.

Pengujian DPPH dilakukan dengan bantuan spektrofotometer UV-Vis pada panjang gelombang maksimum 515 nm. Data hasil percobaan

penentuan panjang gelombang maksimum dapat dilihat pada **Gambar 25**. Hasil uji DPPH yang disajikan dalam %inhibisi dapat dilihat pada **Tabel 17** di bawah ini. % inhibisi dapat dihitung dengan melakukan selisih absorbansi sampel yang mengandung ekstrak dengan absorbansi kontrol (larutan DPPH dalam metanol p.a.) lalu dibagi dengan absorbansi kontrol.

**Tabel 17.** Hasil uji DPPH

Variasi Perlakuan	A kontrol	A sampel	% inhibisi	DPPH ekuivalen ( $\mu\text{mol DPPH} / \text{mg ekstrak}$ )
Bahan beli	0,498	0,0264	94,69 %	0,7102
Matahari	0,498	0,0241	95,15 %	0,7137
Tray Dryer	0,498	0,0236	95,24 %	0,7144



**Gambar 25.** Kurva penentuan panjang gelombang maksimum

Berdasarkan hasil ini, maka dapat ditarik kesimpulan bahwa metode perlakuan awal bahan yang mampu memberikan kualitas ekstrak terbaik adalah dengan metode *tray dryer*. Selain itu metode tray dryer tidak membutuhkan waktu yang lama untuk mencapai kadar air sesuai dengan keinginan (7-10%) yaitu tidak lebih dari 24 jam. Dibalik semua keunggulannya, metode ini memiliki beberapa kekurangan diantaranya biaya investasi alat yang cukup mahal dalam skala besar dan biaya energi yang tidak murah.

## 5.6.2 Optimasi Proses Ekstraksi

Optimasi proses ekstraksi dilakukan dengan menggunakan *response surface method* dengan rancangan percobaan *Central Composite Design* dengan variasi F:S = 1:20 sampai dengan 1:50 dan temperatur operasi dari temperatur kamar (25,9°C) sampai dengan 50 °C. **Tabel 18** menunjukkan matriks percobaan yang digunakan untuk optimasi proses ekstraksi beserta dengan hasil penelitian yang diperoleh.

**Tabel 18.** Hasil Percobaan Utama

Run	Faktor 1	Faktor 2	Respon 1	Respon 2
	F:S (g/mL)	T (°C)	Berat Perolehan Ekstrak (g oleoresin/g padatan kering)	DPPH ekuivalen (µmol DPPH / mg padatan kering)
1	0,035	40	0,2415	0,2331
2	0,035	40	0,2477	0,2392
3	0,05	30	0,2127	0,2062
4	0,02	30	0,2594	0,2502
5	0,014	40	0,2929	0,2843
6	0,035	25,9	0,2495	0,2417
7	0,035	40	0,2341	0,2254
8	0,035	54,1	0,2601	0,2504
9	0,035	40	0,2341	0,2257
10	0,05	50	0,2876	0,2754
11	0,035	40	0,2633	0,2535
12	0,056	40	0,2764	0,2663
13	0,02	50	0,3409	0,3234

Pada bagian selanjutnya akan dibahas pengaruh dari faktor temperatur dan F:S terhadap respon perolehan dan kualitas antioksidan yang diwakili dengan nilai DPPH ekuivalen. Dalam penelitian ini, digunakan model *response surface quadratic* karena rentang percobaan yang sudah dipersempit dengan percobaan pendahuluan sehingga model kuadratik ini sangat cocok untuk diterapkan dalam proses optimasi ini (Montgomery, D.C., 1997).

### 5.6.2.1 Pengaruh Faktor Temperatur dan F:S Terhadap Perolehan Ekstrak

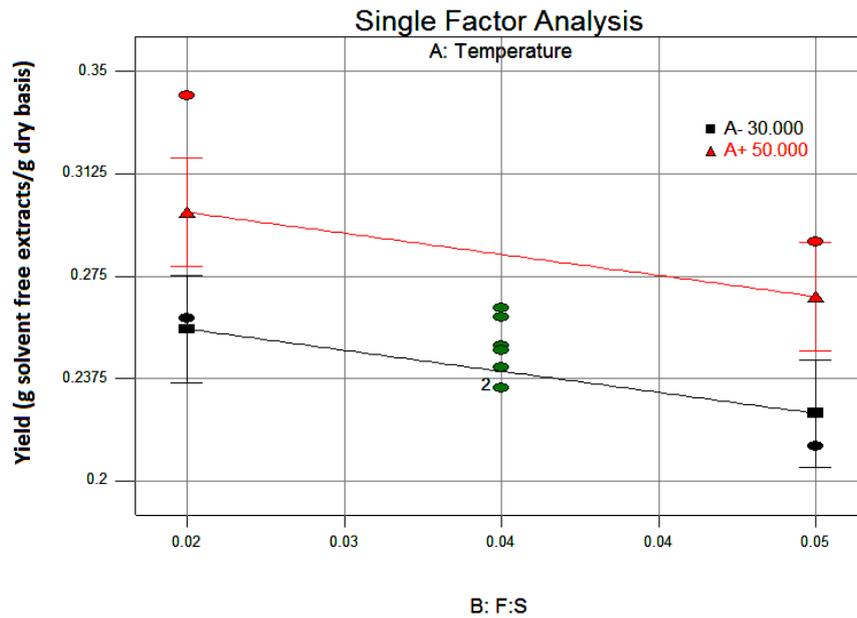
Perhitungan yang dilakukan dengan bantuan *software Design Expert* V.7.0.0. ANOVA untuk melihat pengaruh temperatur dan F:S terhadap perolehan ekstrak yang dapat dilihat pada **Tabel 19**. Faktor temperatur memberikan pengaruh yang signifikan terhadap perolehan berat ekstrak sedangkan faktor interaksi temperatur dan F:S tidak muncul berdasarkan perhitungan statistik kecocokan data dengan model sehingga model regresi yang cocok digunakan dalam percobaan ini adalah regresi multilinear biasa dengan faktor utama yang mempengaruhi perolehan ekstrak adalah faktor temperatur saja tanpa adanya interaksi dengan faktor F:S baik interaksi secara kuadrat ataupun lurus.

**Gambar 26** menunjukkan profil pengaruh faktor temperatur dan F:S terhadap perolehan berat ekstrak. Dapat dilihat bahwa faktor temperatur memberikan respon positif terhadap perubahan berat ekstrak, dengan kata lain semakin besar nilai temperatur maka perolehan berat ekstrak akan terus meningkat. Sedangkan, faktor F:S memberikan pengaruh negatif terhadap perolehan berat ekstrak. Berdasarkan perhitungan yang dilakukan, dapat disusun persamaan regresi multilinear sebagai berikut :

$$\text{Yield} = 0,2119 + (0,00214 * \text{Temperatur}) - (1,028 * \text{rasio F:S}) \quad (1)$$

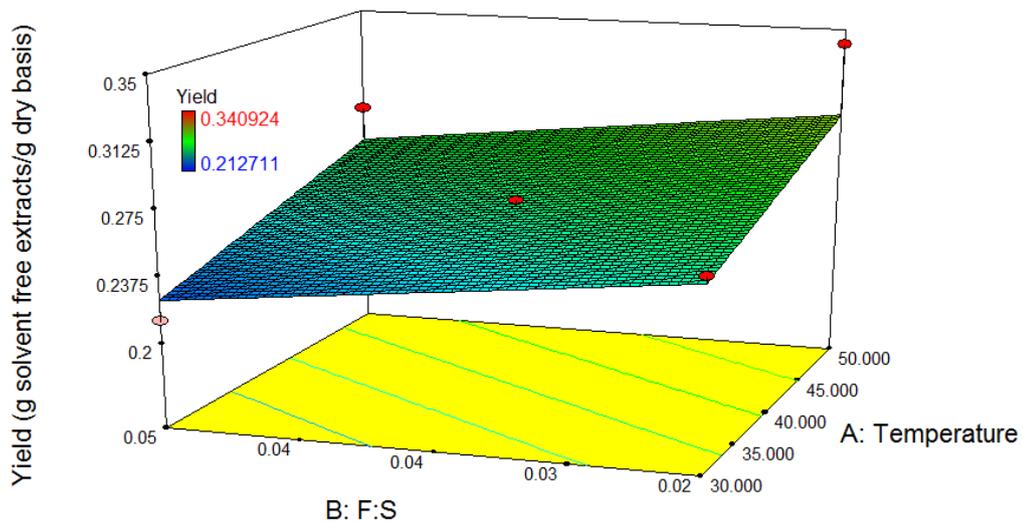
**Tabel 19.** ANOVA Faktor Temperatur dan F:S terhadap Perolehan Ekstrak

Sumber Perlakuan	Jumlah Kuadrat ( $10^3$ )	df	Rata-rata Kuadrat ( $10^3$ )	F value	p value
Temperatur	3,666	1	3,666	5,05	0,0484
F:S	1,902	1	1,902	2,62	0,1366
Error	7,26	10	0,726		
Total	13	12			

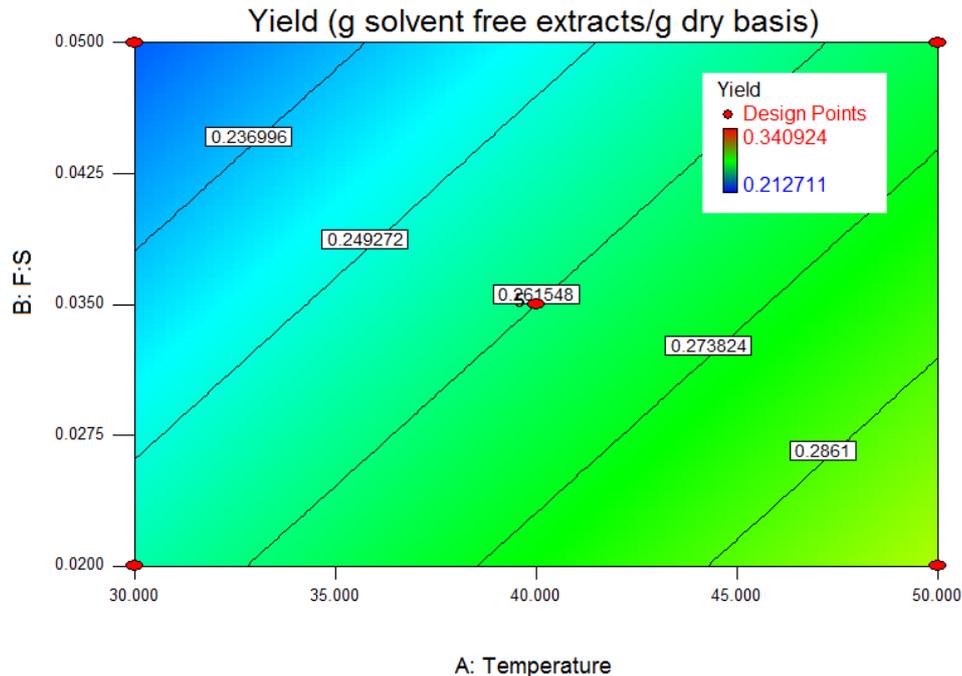


**Gambar 26.** Profil Pengaruh Faktor Temperatur dan F:S Terhadap Yield

Untuk proses optimasi, dengan bantuan *software* Design Expert V.7.0.0 dihasilkan model grafik berupa permukaan 3D dan *contour plot* yang dapat digunakan sebagai dasar untuk mencari titik stationer baik untuk percobaan dengan nilai maksimum, minimum ataupun *saddle*. **Gambar 27** menunjukkan dua buah model grafik yaitu *3D surface* dan *contour plot* dari penelitian utama dengan respon berupa perolehan berat ekstrak.



(a)



(b)

**Gambar 27.** Model Grafik 3D surface (a) dan *Contour Plot* (b) Pengaruh Temperatur dan Rasio F:S Terhadap *Yield*

Berdasarkan hasil optimasi pada Gambar 27 dapat dilihat bahwa tidak terdapat titik optimum dari hasil penelitian ini. Oleh karena sangat disarankan untuk melakukan metode *steepest ascent* dari rentang percobaan yang sudah dilakukan sekarang. Berdasarkan persamaan (1), dapat dilihat bahwa temperatur merupakan faktor yang memberikan efek positif terhadap perolehan ekstrak sedangkan rasio F:S memberikan efek negatif terhadap perolehan ekstrak sehingga berdasarkan hasil regresi multilinear tersebut diperoleh informasi untuk melakukan perancangan matriks percobaan baru untuk menemukan daerah optimum yaitu dengan menaikkan terus temperatur percobaan sambil menurunkan rasio F:S dengan respon perolehan berat ekstrak (*yield*). Namun terdapat beberapa hal yang perlu dipertimbangkan yaitu temperatur maksimum yang diperbolehkan agar proses dapat berlangsung, mengingat rentang temperatur percobaan untuk pelarut metanol sangat sempit yaitu dari temperatur ruang (25 °C) sampai dengan di bawah titik didih metanol (sekitar 62 °C).

### 5.6.2.2 Pengaruh Faktor Temperatur dan F:S Terhadap Aktivitas Antioksidan (DPPH Ekuivalen)

Berdasarkan matriks percobaan utama, akan dilihat pengaruh faktor temperatur dan rasio F:S terhadap aktivitas antioksidan yang diperoleh dari percobaan yang dinyatakan dalam besaran DPPH ekuivalen. Nilai DPPH ekuivalen merupakan salah satu nilai yang baik digunakan untuk

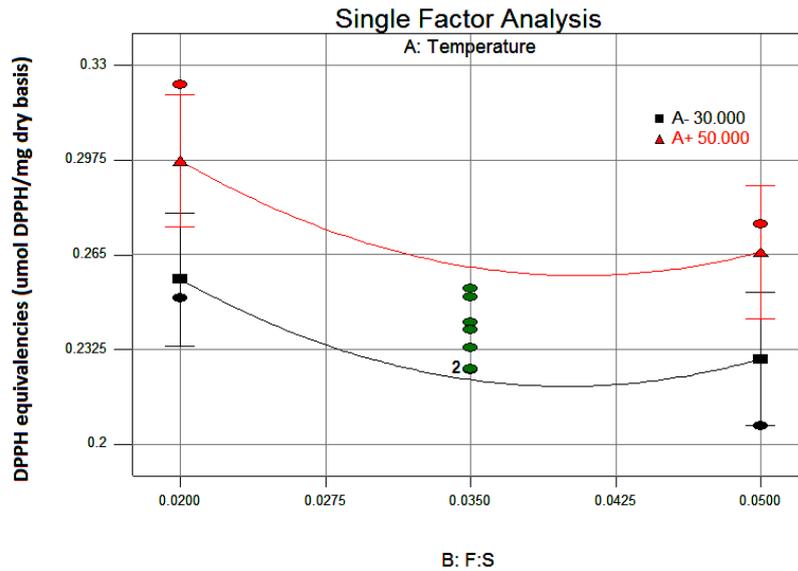
menyatakan kandungan antioksidan ekstrak yang dihasilkan. Untuk bahan alam yang menghasilkan produk ekstrak dengan berbagai macam komponen bioaktif yang memiliki potensi antioksidan, biasanya dinyatakan dalam satuan mol DPPH yang bereaksi per berat umpan (padatan kering). Namun untuk sampel antioksidan yang sudah berupa isolat, satuan yang lebih umum digunakan adalah mol DPPH yang bereaksi per mol senyawa isolat tersebut (Molyneux, P., 2004).

**Tabel 20.** ANOVA Pengaruh Faktor Temperatur dan F:S Terhadap Aktivitas Antioksidan

Sumber Perlakuan	Jumlah Kuadrat ( $10^3$ )	df	Rata-rata Kuadrat ( $10^3$ )	F value	p value
Temperatur	2,992	1	2,992	6,48	0,038
F:S	1,725	1	1,725	3,74	0,095
Temperatur*F:S	0,004	1	0,004	0,01	0,929
(Temperatur) <sup>2</sup>	0,26	1	0,26	0,56	0,477
(F:S) <sup>2</sup>	2,993	1	2,993	6,48	0,038
Error	3,223	7	0,462		
Total	11	12			

Berdasarkan hasil perhitungan ANOVA dengan model kuadrat yang disajikan pada **Tabel 20**, dapat ditentukan pengaruh F:S dan temperatur terhadap aktivitas antioksidan. Ternyata baik faktor temperatur, rasio F:S dan kuadrat dari rasio F:S memberikan pengaruh yang signifikan terhadap aktivitas antioksidan dalam penelitian ini dan tidak terdapat interaksi antara faktor F:S dan temperatur.

Pada **Gambar 28** dapat dilihat profil pengaruh faktor temperatur dan rasio F:S terhadap aktivitas antioksidan yang diperoleh. Berdasarkan profil yang diperoleh dapat disimpulkan bahwa faktor rasio F:S memberikan efek negatif terhadap aktivitas antioksidan sedangkan faktor temperatur memberikan efek positif terhadap aktivitas antioksidan yang diperoleh. Semakin besar rasio F:S, aktivitas antioksidan akan menurun namun seiring dengan kenaikan temperatur maka akan terjadi peningkatan aktivitas antioksidan dari ekstrak yang diperoleh.

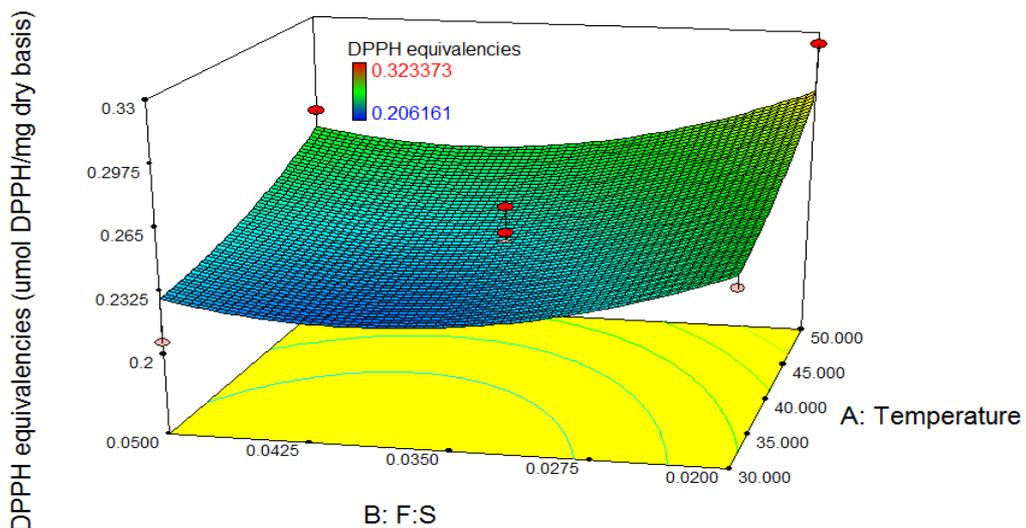


**Gambar 28.** Profil Pengaruh Faktor Temperatur dan Rasio F:S Terhadap Aktivitas Antioksidan

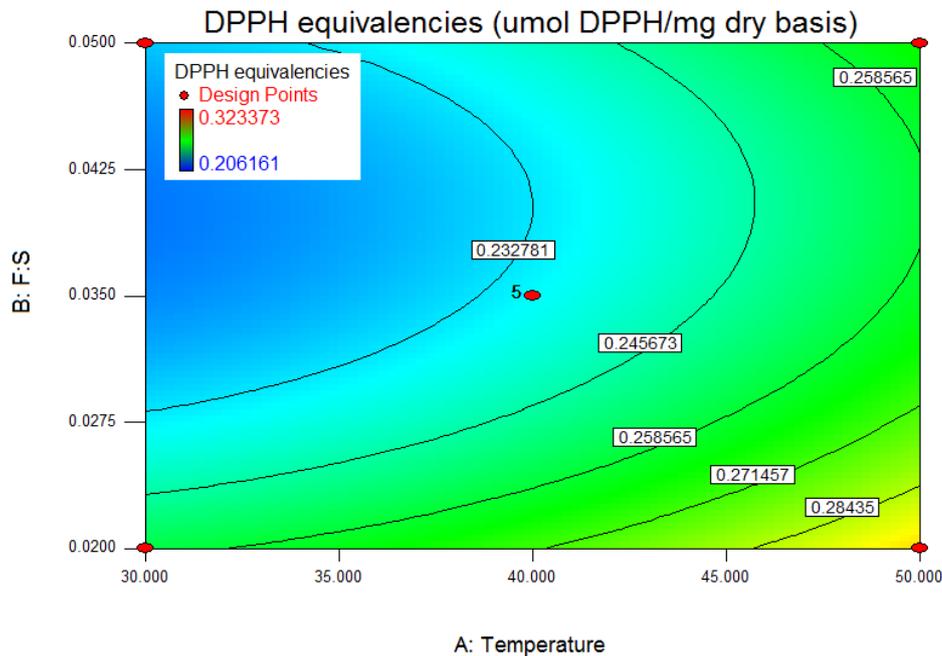
Persamaan (2) merupakan persamaan yang diperoleh dari hasil regresi multilinear untuk mengetahui pengaruh faktor signifikan yaitu pengaruh temperatur dan kuadrat rasio F:S terhadap aktivitas ekstrak yang dihasilkan.

$$\text{DPPH ekuivalen} = 0,39371 - (0,00272 * \text{Temperatur}) - (7,167 * \text{F:S}) + 92,188 * (\text{F:S})^2 \quad (2)$$

Persamaan (2) menunjukkan korelasi positif antara DPPH ekuivalen dengan kuadrat rasio F:S namun memberikan korelasi negatif terhadap faktor temperatur dan rasio F:S.



(a)



(b)

**Gambar 29.** Model Grafik 3D surface (a) dan Contour Plot (b) Pengaruh Temperatur dan Rasio F:S Terhadap Nilai DPPH Ekuivalen

Berdasarkan hasil optimasi pada **Gambar 29** dapat dilihat bahwa tidak terdapat titik optimum dari hasil penelitian ini. Oleh karena sangat disarankan untuk melakukan metode *steepest ascent* dari rentang percobaan yang sudah dilakukan sekarang. Selain itu dapat dilihat bahwa temperatur merupakan faktor yang memberikan efek positif terhadap perolehan ekstrak sedangkan rasio F:S memberikan efek negatif terhadap perolehan ekstrak sehingga berdasarkan kurva analisa pengaruh faktor tunggal tersebut diperoleh informasi untuk melakukan perancangan matriks percobaan baru untuk menemukan daerah optimum yaitu dengan menaikkan terus temperatur percobaan sambil menurunkan rasio F:S dengan respon berupa aktivitas antioksidan dalam nilai DPPH ekuivalen.

Beberapa hal yang perlu dipertimbangkan sebelum melakukan percobaan dengan *steepest ascent* untuk menentukan parameter rasio F:S dan temperatur yang mampu memberikan aktivitas antioksidan optimum, perlu juga mempertimbangkan tingkat stabilitas kandungan antioksidan dalam buah mahkota dewa, mengingat antioksidan merupakan senyawa yang sangat tidak stabil terhadap temperatur tinggi (Genova, G., 2012; Larrauri, J.A., et al., 1998).

Selain faktor temperatur dan F:S, dalam proses optimasi lebih lanjut dari penelitian ini faktor biaya pun perlu dimasukkan. Semakin kecil nilai F:S berarti jumlah pelarut yang akan digunakan dalam proses akan semakin

besar, sehingga diperlukan biaya energi ekstra untuk proses pemisahan pelarut dari produk. Mengingat sasaran penelitian ini adalah industri skala kecil menengah diharapkan diperoleh suatu titik yang mampu memberikan bukan hanya kualitas produk yang baik serta kuantitas produk yang besar, tetapi mampu memberikan biaya keseluruhan proses yang paling efektif dan efisien.

### 5.6.2.3 Penentuan Titik Maksimum

Dalam penelitian ini tidak dilakukan proses optimasi lebih lanjut dengan metode *steepest ascent* untuk mencari daerah operasi optimum, namun karena penelitian ini merupakan penelitian bersaing selama 3 tahun, ada baiknya untuk menyelesaikan proses optimasi ini sampai dengan menemukan titik atau daerah optimum untuk proses ekstraksi buah mahkota dewa dengan pelarut metanol.

Namun dari percobaan ini, dapat diperoleh titik yang mampu menghasilkan respon terbaik untuk *yield* dan aktivitas antioksidan yang dapat dicari menggunakan pendekatan numerik dari respon permukaan yang diperoleh dengan bantuan *software Design Expert V.7.0.0.* dengan tujuan untuk mencari respon maksimum dari hasil penelitian. **Tabel 21** menyajikan data titik temperatur dan F:S yang dapat memberikan respon terbaik dalam *yield* dan aktivitas antioksidan.

**Tabel 21.** Paramater Operasi dengan Respon Terbaik

Parameter	Kondisi Operasi		Nilai Respon
	Temperatur (°C)	F:S (g/mL)	
<i>Yield</i> (g oleoresin/g padatan kering)	50	0,02	0,2984
DPPH Ekuivalen ( $\mu$ mol DPPH/mg padatan kering)	50	0,02	0,2972

Nilai DPPH ekuivalen dapat dinyatakan dalam dua basis yaitu basis terhadap padatan kering atau basis terhadap mg oleoresin yang bereaksi dengan DPPH. Dari percobaan utama ini nilai DPPH ekuivalen menghasilkan nilai maksimal pada 0,2972  $\mu$ mol DPPH/g padatan kering dengan *yield* maksimum sebesar 0,2984 g oleoresin/g padatan kering.

DPPH ekuivalen dapat dinyatakan dalam basis lain yaitu basis terhadap nilai oleoresin yang tidak umum digunakan namun dapat digunakan hanya sebagai perbandingan kekuatan ekstrak buah mahkota dewa dengan ekstrak bahan alam lain. Sebenarnya basis padatan kering merupakan salah satu basis yang disarankan oleh Molyneux (2004) untuk digunakan namun sangat disayangkan bahwa tidak semua jurnal dan hasil penelitian menyertakan hasil perolehan ekstrak (g oleoresin/g padatan kering) di dalamnya sehingga nilai DPPH ekuivalen hanya dapat dinyatakan dalam basis mol DPPH/massa oleoresin dan tidak dapat dinyatakan dalam basis mol DPPH/massa padatan kering seperti pada penelitian ini.

Berdasarkan percobaan ini dapat ditentukan posisi aktivitas antioksidan buah mahkota dewa apabila dibandingkan dengan tanaman obat lainnya. Namun sampai sekarang penulis belum menemukan literatur yang melakukan pengujian aktivitas antioksidan dengan metode DPPH-assay yang metodenya dijelaskan secara lengkap dengan konsentrasi DPPH yang digunakan, volume ekstrak dan konsentrasi ekstrak yang digunakan serta perbandingan volume DPPH terhadap volume sampel yang digunakan. Terdapat literatur yang sudah menyediakan data secara lengkap seperti penelitian oleh Wong et. al., namun penelitian tersebut menggunakan pelarut (etanol 95%), yang berbeda dengan pelarut yang digunakan dalam penelitian ini, sehingga tidak dapat dibandingkan.

## BAB VI. KESIMPULAN

Penelitian tentang kajian beberapa metode pengeringan dan pengaruhnya terhadap kualitas (uji fitokimia dan uji DPPH) bahan dan studi awal ekstraksi telah dilakukan. Hasil penelitian telah diperoleh sejauh ini dapat memberikan beberapa kesimpulan:

1. Pengeringan dengan *tray dryer* merupakan cara pengeringan tercepat dan memberikan kadar air terendah (sampai sekitar 5%) serta kualitas terbaik yang ditunjukkan oleh kandungan senyawa bioaktif terlengkap melalui uji fitokimia dan kadar antioksidan tertinggi dengan uji DPPH.
2. Pengeringan dengan metode kering angin sebaiknya dilakukan selama kira-kira 10 hari dengan kadar air buah kering sekitar 13%.
3. Pengeringan dengan bantuan sinar matahari dapat memperoleh kadar air di bawah 10% yaitu 5,86% selama 11 hari. Jika diinginkan target kadar air sebesar 10%, waktu pengeringan sekitar satu minggu sudah memadai.
4. Pengeringan dengan *tray dryer* dan kering angin memiliki kandungan senyawa bioaktif terlengkap, sementara pengeringan dengan bantuan sinar matahari menghilangkan kandungan senyawa-senyawa golongan alkaloid. Sebagai pembandingan, ekstrak dari produk komersil mahkota dewa kering selain kehilangan alkaloid, ekstrak juga kehilangan komponen saponin.
5. Kandungan antioksidan dari bahan yang dikeringkan dengan tray dryer identik dengan yang dikeringkan dengan matahari.
6. Pengeringan *tray dryer* memberikan hasil ekstrak kasar (pasta) sebesar 0,1952 gram ekstrak / gram bahan kering, sedangkan metode kering matahari menghasilkan ekstrak kasar sebanyak 0,036 gram ekstrak / gram bahan kering dan sebagai pembandingan ekstrak dari produk komersil mahkota dewa kering memberikan hasil ekstrak kasar (pasta) sebesar 0,1104 gram ekstrak / gram bahan kering.
7. Perolehan ekstrak buah mahkota dewa hanya dipengaruhi secara signifikan oleh temperatur operasi saja.
8. Aktivitas antioksidan dari ekstrak buah mahkota dewa dipengaruhi secara signifikan oleh faktor temperatur operasi, rasio F:S serta kuadrat dari rasio F:S.
9. Titik maksimum untuk perolehan berat ekstrak buah mahkota adalah 0,2984 g oleoresin/g padatan kering yang tercapai pada kondisi operasi F:S=1:50 pada temperatur 50 °C.
10. Titik maksimum untuk aktivitas antioksidan ekstrak buah mahkota adalah 0,2972  $\mu\text{mol}$  DPPH/g padatan kering yang tercapai pada kondisi operasi F:S=1:50 pada temperatur 50 °C.

## DAFTAR PUSTAKA

- Anonim, <http://en.wikipedia.org/wiki/Saponin>, di-download pada 28 Desember 2010 pukul 08.15 WIB
- Aripin, A., Firzani, P., Tjandrawinata, R.R., 2010, Isolate Compounds from *Phaleria Macrocarpa* as Anticancer, PT. Dexa Medica, Patent WO 2010/064172 A2
- Asmah. N., 1996, Pemeriksaan Fitokimia Daun Manggis (*Garcinia Mangostana* L., Clusiaceae), *Skripsi*, Institut Teknologi Bandung.
- Aulia, I. P., 2009, *Efek Minyak Atsiri Cabe Jawa terhadap Jumlah Limfosit Tikus Wistar yang Diberi Diet Kuning* Telur, Universitas Diponegoro Semarang.
- Bjelakovic, G., et al., 2007, Mortality in Randomized Trials of Antioxidant Supplements for Primary and Secondary Prevention: Systematic Review and Meta-Analysis, *JAMA* **297** (8): 842–57, [doi:10.1001/jama.297.8.842](https://doi.org/10.1001/jama.297.8.842). PMID 17327526
- Borris, R., Blaskó, G., Cordell, G., 1988, Ethnopharmacologic and Phytochemical Studies of The Thymelaeaceae, *J. Ethnopharmacol*, 24:41–91
- Chattopadhyay, P., S. Chatterjee, K., Sen, S., 2008, Biotechnological potential of natural food grade biocolorants, *African Journal of Biotechnology*, 7 (17): 2972-2985
- Crozier, A., Jensen, E., Lean, M.E.J., McDonald, M.S., 1997, **Quantitative Analysis. of Flavonoids by Reversed-Phase High-Performance Liquid Chromatography**, *Journal of Chromatography A*, **761**:315-321.
- Departemen Kesehatan Republik Indonesia, 2000. *Parameter Standar Umum Ekstrak Tumbuhan Obat*, Edisi I, Direktorat Jenderal Pengawasan Obat dan Makanan, Direktorat Pengawasan Obat Tradisional, Jakarta.
- Fariied, A., et al., 2007, **Anticancer Effects of Gallic Acid Isolated from Indonesian Herbal Medicine, *Phaleria macrocarpa* (Scheff.) Boerl, on Human Cancer Cell Lines**, *International journal of oncology*, **30**:605
- Fesenden dan Fesenden, 1982, Radikal Bebas dan Antioksidan Alami Tumbuh-Tumbuhan, *Jurnal Kesehatan*, 28: XI
- Genova, G., P. Lacopini, M. Baldi, A. Ranieri, P. Storchi, L. Sebastiani, 2012, **Temperature and Storage Effects on Antioxidant Activity of Juice from Red and White Grapes**, *International Journal of Food Science and Technology*, 47:13-23
- Hakim, R., Nawawi, A., Adnyana, I., Achmad, S., Makmur, E., Hakim, E., Syah, Y., Kitajima, M., 2004, Benzophenone Glucoside from Red Fruit *Phaleria macrocarpa* and Test the Activity Against DPPH and Murine Leukemia Cells P-388, *Bull. Soc. Nat. Prod. Chem.*, 4:67–70
- Halimah N, 2010, *Fitokimia dan Uji Toksisitas Ekstrak Tanaman Anting-Anting (*Acalypha indica* linn) Terhadap Larva Udang *Artemia salina* Leach*, Laporan tidak diterbitkan. Malang: Kimia UIN Malang

- Harborne.J.B., 1996, *Metode Fitokimia Penuntun Cara Modern Menganalisis Tumbuhan*. Terbitan Kedua. ITB, Bandung ,lm. 69-109, 127-158, 234-236, 259-269
- Istichomah, K., 2004, Pengaruh lama penyimpanan daun terhadap komposisi dan kandungan klorofil daun suji (*Pleomele angustifolia* N. E. Brown), *Skripsi*, FSM-UKSW, Salatiga.
- Kirk, R.E and Donald F.Othmer,1993, *Encyclopedia of Chemical Technology*, Volume 12 The Interscience Encyclopedia, Inc., New York, pp. 917-921.
- Kusmaardiyani, S., Nawawi, A., Rahmi, K., 2004, Isolation of benzophenone from *Phaleria macrocarpa* (Scheff.) Boerl. (Thymelaeaceae) leaf, *Acta Pharm. Indones.*, 29:150–152.
- Larrauri, J.A., C. Sanchez-Moreno, F. Saura-Calixto, 1998, **Effect of Temperature on The Free Radical Scavenging Capacity of Extracts from Red and White Grape Pomace Peels**, *Journal of Agriculture Food Chemistry*, 46 : 2694-2697
- Montgomery, D.C., 1997, Design and Analysis Experiments, 5th ed., John Wiley & Sons Inc., United States of America
- Marliana, S., Suryanti, Suyono, 2005, *Skrining Fitokimia dan Analisis Kromatografi Lapis Tipis Komponen Kimia Buah Labu Siam (Sechium edule Jacq. Swartz.) dalam Ekstrak Etanol*, Surakarta: Jurusan Kimia FMIPA, Universitas Sebelas
- Maurya, D. K., Nandakumar, N., Devasagayam, T.P.A., 2011, **Anticancer Property of Gallic Acid in A549, a Human Lung Adenocarcinoma Cell Line, and Possible Mechanisms**, *J. Clin. Biochem. Nutr.*, 48(1):85-90
- Molyneux, P., 2004, **The Use of The Stable Free Radical Diphenulpicrylhydrazyl (DPPH) for Estimating Antioxidant Activity**, *Songklanakar Journal of Science and Technology*, 26:211-219
- Ning, Harmanto, 2004, *Mahkota Dewa panglima Penakluk Kanker*, Agromedia Pustaka.
- Oshimi, S., Zaima, K., Matsuno, Y., et al, 2008, Studies on the Constituents from The Fruit of *Phaleria macrocarpa*, *J.Nat.Med.*, **62**, 207-210
- Ozyurt, D., et al., 2005, *Determination of Total Antioxidant Capacity by a New Spectrophotometric Method Based on Ce(IV) Reducing Capacity Measurement*, diakses tanggal 18 Mei 2010
- Pezzuto, J.M., Park, E.J. (2002): Autooxidation and antioxidation in Swarbrick. Pp.97-113, In: Boylan, J.C. (Eds): *Encyclopedia of Pharmaceutical Technology* (Vol.1, 2nd ed.). Marcel Dekker Inc., New York.
- Quezada, M., et al., 2004, Antioxidant Activity of Crude Extract, Alkaloid Fraction, and Flavonoid Fraction from *Boldo Peumus boldus Molina* Leaves, *Food Sci*, 69: C371-C376
- Raina, K., Rajamanickam, S., Deep, G., et al., 2008, **Chemopreventive Effects of Oral Gallic Acid Feeding on Tumor Growth and Progression in TRAMP mice**, *Mol. Cancer Ther.*, 7:1258-1267
- Ramle, S.F.M., et al., 2008, *Study on Antioxidant Activities, Total Phenolic Compound, and Antifungal Properties of Some Malaysian Timbers from*

- Selected Hardwoods Species*, International Conference of Environmental Research and Technology: 472-475
- Rohyami, Y., 2009, **Penentuan Kandungan Flavonoid dari Ekstrak Metanol Daging Buah Mahkota Dewa (*Phaleria macrocarpa* Scheff Boerl)**, *Jurnal Logika*, 2009:5
- Rudi Hendra, Syahida Ahmad, Aspollah Sukari, M. Yunus Shukor, and Ehsan Oskoueian, Flavonoid Analyses and Antimicrobial Activity of Various Parts of *Phaleria macrocarpa* (Scheff.) Boerl Fruit, *Int J Mol Sci*. 2011; 12(6): 3422–3431.
- Schuler, P., 1990, Natural Antioxidant Exploited Commercially, di dalam: *Food Antioxidants*. Husdnt BJB, editor. New York: Elsevier Applied Science
- Sher, A., 2009, **Antimicrobial Activity of Natural Products from Medicinal Plants**, *Gomal Journal of Medical Sciences*, 7:72
- Sihombing, T., 2000, *Pinang Budidaya dan Prospek Bisnis*, Penebar Swadaya. Jakarta
- Soetarno, S., dan Soediro, I.S., 1997. *Standardisasi Mutu Simplisia dan Ekstrak Bahan Obat Tradisional*, Presidium Temu Ilmiah Nasional Bidang Farmasi.
- Sutjihati, R., et al., 1995, Pemeriksaan Senyawa Fenolik Daun *Rhizophora mucronata* Lamk. (Rhizoporaceae), Suatu Tumbuhan Mangrove, *Skripsi*, Dept. Farmasi, ITB, <http://bahan-alam.fa.itb.ac.id>
- Vendula Vrchovska, Carla Sousa, Patricia Valentao, Federico Ferreres, Jose A. Pereira, Rosa M. Seabra, and Paula B. Andrade. 2006. Antioxidative properties of tronchuda cabbage (*Brassica oleracea* L. var. *costata* DC) external leaves against DPPH, superoxide radical, hydroxyl radical and hypochlorous acid. *Food Chemistry*, vol. 98 (3), p 416 – 425
- Wahyuningsih, M.S.H., Mubarika, S., Gandjar, I.G., Hamann, M.T., Rao, K.V., and Wahyuono, S., 2005, *Indonesian J.Pharm*, 16(1), 51-57
- Winarni, T.A., Eko, S., Ismail, M.A., dan Mohammad, S.R., 2012, "Effect of Aloe Vera and Crown of God Fruit on Sensory, Chemical, and Microbiological Attributes of Indian Mackerel During Ice Storage, *International Food research Journal*, 19(1): 119-125
- Winarno, H. dan Ermin, K.W., 2008, Benzophenone Glucoside Isolated from The Ethyl Acetate Extract of The Bark of Mahkota Dewa (*Phaleria macrocarpa* (Scheff.) Boerl.) and It's Inhibitory Activity on Leukemia L1210 Cell Line, *Indo J. Chemical*, 9(1), 142-145
- Wong, F.C., T.-T. Chai, Y.-W. Hoo, 2012, **Antioxidation and Cytotoxic Ativities of Selected Medicinal Herbs Used in Malaysia**, *Journal of Medicinal Plants Research*, 6:3169-3175
- Yuswantina, R., 2009, *Uji Aktivitas Penangkap Radikal dari Ekstrak Petroleum Eter, Etil Asetat, dan Etanol Rhizoma Binahong dengan metode DPPH (2,2-difenil-1-pikrihidrazil)*, Universitas Muhamadiyah Surakarta.
- Zhang, Y., et al., 2006, **Chemical Constituents from Mahkota Dewa**, *Journal of Asian Natural Products Research*, 8:119-123

# LAMPIRAN A

## PROSEDUR ANALISIS

### A.1 Perhitungan Kadar Air

Analisis kadar air bertujuan untuk menentukan kandungan air pada bahan baku buah mahkota dewa yang sudah dikeringkan. Untuk jumlah air yang teruapkan selama pengeringan dilakukan metode gravimetri dengan melakukan penimbangan massa akhir bahan sampai konstan selama proses pengeringan. Prosedur yang dilakukan dalam perhitungan kadar air adalah :

1. Sampel ditimbang dalam cawan penguapan kemudian dicatat massanya (massa awal)
2. Cawan berisi sampel tersebut dikeringkan dalam oven pada temperatur 50°C selama 12 jam, kemudian didinginkan dalam eksikator
3. Cawan ditimbang massanya sampai diperoleh massa cawan dan daun yang konstan (massa akhir).

Kadar air dihitung dengan perhitungan berikut :

$$\text{Kadar air (\%)} = \frac{\text{massaawal} - \text{massaakhir}}{\text{massaawal} - \text{massa cawan kosong}} \times 100\%$$

Sedangkan untuk mengetahui kadar air akhir dari buah mahkota dewa kering dilakukan dengan menggunakan alat *moisture analyzer* yang juga menggunakan prinsip gravimetri.

### A.2 Analisis Fitokimia

Analisis fitokimia pada ekstrak buah mahkota dewa bertujuan untuk menemukan profil komponen bioaktif dalam ekstrak mahkota dewa dala, berbagai perlakuan pengeringan dan ekstraksi. Profil yang diperoleh diharapkan dapat memberikan informasi awal untuk pengujian keaktifan ekstrak yang diperoleh. Analisis fitokimia yang dilakukan diantaranya adalah uji kandungan steroid saponin, alkaloid, tannin dan flavonoid.

#### A.2.1 Uji Saponin Steroid

Identifikasi kandungan saponin dapat dilakukan dengan uji busa sederhana. 0,5 mg ekstrak bebas pelarut dilarutkan dalam 2 ml air. Larutan kemudian dikocok, apabila terbentuk busa yang bertahan sampai dengan 10 menit menandakan terdapatnya saponin di dalam ekstrak.

#### A.2.2 Uji Alkaloid [72]

Identifikasi senyawa alkaloid dapat dilakukan dengan uji kualitatif sebagai berikut :

1. Ekstrak yang sudah bebas dari pelarut (50mg) dilarutkan asam klorida (HCl) dan dibagi ke dalam 4 tabung reaksi (tabung A, tabung B, tabung C, dan tabung D)
2. Larutan pada tabung A disaring lalu filtrat yang diperoleh ditetesi dengan reagen Mayer (Kalium Merkuri Iodida). Endapan berwarna kuning yang terbentuk menunjukkan terdapatnya senyawa alkaloid. Reagen Mayer dibuat dengan melarutkan 1,358 gram Merkuri Klorida dalam 60 mL air dan 5 gram Kalium Klorida dalam 10 mL air. Kedua larutan tersebut dicampurkan dan diencerkan dengan air sampai volume total 100 mL [100]
3. Larutan pada tabung B dipisahkan lalu filtrat yang diperoleh ditetesi dengan reagen Wagner (Iodin dalam Kalium Iodida (KI)). Terbentuknya endapan merah kecoklatan menandakan terdapatnya senyawa alkaloid.
4. Larutan pada tabung C dipisahkan lalu filtrat yang diperoleh ditetesi dengan reagen Dragendorff (larutan Kalium Bismut Iodida). Terbentuknya endapan merah menandakan terdapatnya senyawa alkaloid. Reagen Dragendorff dibuat dengan melarutkan 5,2 gram bismut karbonat dan 4 gram kalium iodida dalam 50 mL asam asetat sambil dididihkan. Setelah 12 jam, kristal natrium asetat yang terbentuk dipisahkan dengan filtrasi. Filtrat berwarna merah kecoklatan jernih sebanyak 40 mL dicampurkan dengan 160 mL etil asetat dan 1 mL air dan disimpan dalam botol coklat. 10 mL larutan tersebut dicampurkan dengan 20 mL asam asetat lalu diencerkan sampai dengan 100 mL dengan air dan larutan ini yang digunakan sebagai reagen Deagendorff.
5. Larutan pada tabung D dipisahkan lalu filtrat yang diperoleh ditetesi dengan reagen Hager (larutan asam pikrat jenuh). Terbentuknya endapan kuning menandakan terdapatnya senyawa alkaloid.

### **A.2.3 Uji Tanin**

Uji tannin dapat dilakukan dengan memasukkan larutan gelatin 1% dalam HCl ke dalam ekstrak. Terbentuknya endapan putih menandakan terdapatnya senyawa tanin dalam ekstrak.

### **A.2.4 Uji Flavonoid**

Identifikasi senyawa flavonoid dapat dilakukan dengan uji kualitatif sebagai berikut :

1. Uji reagen alkalin : ekstrak ditetesi beberapa tetes natrium hidroksida (NaOH). Terbentuknya warna kuning pekat yang akan berubah menjadi tidak berwarna saat dilarutkan dalam asam menandakan terdapatnya senyawa flavonoid dalam ekstrak.
2. Uji timbal asetat : ekstrak ditetesi beberapa tetes larutan timbal asetat. Terbentuknya padatan kuning menandakan terdapatnya senyawa flavonoid dalam ekstrak.

### A.3 Uji Aktivitas Antioksidan

Pengujian aktivitas antioksidan dari ekstrak yang diperoleh dilakukan dengan uji secara kuantitatif dengan metode DPPH [101]. 4,3 mg DPPH (1, 1-Diphenyl –2-picrylhydrazyl) dilarutkan dalam 3,3 mL metanol. Reagen DPPH harus disimpan dalam keadaan gelap. 150 µL DPPH ditambahkan dengan 3 mL metanol dan absorbansi diukur pada 517 nm dan dicatat sebagai nilai absorbansi kontrol. 50 µL ekstrak dengan berbagai konsentrasi diencerkan dengan metanol sampai dengan 150 µL. Sampel yang sudah diencerkan kemudian diencerkan kembali dengan 3 mL metanol lalu ditambahkan 150 µL larutan DPPH. Absorbansi sampel dapat diukur setelah 15 menit inkubasi dalam kondisi gelap pada panjang gelombang 517 nm dengan pelarut metanol sebagai blanko. % inhibisi dapat dihitung dengan rumus sebagai berikut :

$$\% \text{ inhibisi} = \frac{\text{Absorbansi kontrol} - \text{Absorbansi sampel}}{\text{Absorbansi kontrol}} \times 100$$

EC50 (*efficient concentration* 50%) atau IC50 dihitung dari kurva regresi linear yang dibuat dengan mengalurkan % inhibisi terhadap variasi konsentrasi sampel ekstrak buah mahkota dewa. Nilai EC 50 dapat dihitung dengan memasukkan nilai % inhibisi sebesar 50% ke dalam persamaan regresi linear yang diperoleh.