



## Tannin Removal by Hot Water as the Pretreatment of the Multi Stages Extraction of *Phaleria macrocarpa* Bioactive Compounds

Tedi Hudaya\*, Alex Sabianto, and Susiana Prasetyo S.

Undergraduate Programs in Chemical Engineering, Parahyangan Catholic University  
Ciumbuleuit 94, Bandung 40141, Telp. (022) 2032655, Fax. (022) 2032700

\*E-mail: t\_hudaya@yahoo.com.au

### Abstract

*Phaleria macrocarpa* is a native Indonesia plant originated from Papua. Its fruit, which is known and widely used as herbal medicine contains various bioactive compounds such as polyphenol, flavonoids, tannin, alkaloid, saponin, sterol, and terpenoid. They contribute to the antioxidant and antimicrobial activities of the fruit extract. The objective of this study was to assess the selection of solvent treatments which were not only capable of removing unwanted tannin and other sticky components, but also maintained the high content of the antioxidants. A pretreatment prior to the extraction was carried out by using hot water with temperature range of 55 – 100°C to remove tannin. The best pretreatment temperature was then used with a combination of non-polar (*n*-hexane and chloroform), semi-polar (ethyl acetate), and polar (70% ethanol) solvents. The results showed that the best operating pretreatment temperature for the removal of tannin was 65°C, with removal of 0.5798 mg gallic acid equivalents / g feed. Meanwhile, the best solvent combination was a two stages extraction with ethyl acetate and ethanol which could reduce the tannin content as much as 13%. Finally, ethanol extracts obtained from this combination resulted in the yield of 0.0696 g crude extract / g feed, tannin content of 2.9830 mg gallic acid equivalents / g crude extract, and antioxidant activity of 2.1983  $\mu$ moles DPPH / mg crude extract.

**Keywords:** antioxidant activity, *Phaleria macrocarpa*, tannin, water, 70% ethanol

### Pendahuluan

Indonesia merupakan wilayah yang kaya akan berbagai sumber daya alam karena iklim tropisnya yang memungkinkan berbagai jenis flora untuk tumbuh dengan baik. Berdasarkan data yang diperoleh dari Menteri Kehutanan dan Penelitian dan Pengembangan Tanaman Industri, diketahui bahwa luas hutan Indonesia mencapai 134,167 juta hektar dengan kekayaan hayati yang mencapai 30.000 jenis tumbuhan dari 40.000 jenis tumbuhan di dunia. Dari 30.000 jenis tumbuhan yang ada di Indonesia, diketahui bahwa 940 jenis diantaranya merupakan tumbuhan yang memiliki khasiat sebagai obat. Namun, dari 940 jenis tumbuhan obat tersebut hanya 20-22% tanaman obat yang dibudidayakan oleh masyarakat. Hal ini sangat disayangkan mengingat tanaman obat tersebut memiliki potensi untuk dikembangkan menjadi tanaman obat yang bernilai lebih tinggi (Puslitbangtri, 1992).

Salah satu tanaman obat yang memiliki potensi untuk dikembangkan adalah *Phaleria macrocarpa* (Scheff.) Boerl. atau yang dikenal dengan tanaman mahkota dewa. Mahkota dewa dikenal sebagai obat tradisional yang secara empiris mampu menyembuhkan penyakit-penyakit berat, seperti sakit jantung, liver, kanker, kencing manis, sakit ginjal, dan tekanan darah tinggi. Mahkota dewa dapat dijadikan sebagai obat-obatan karena mahkota dewa mengandung senyawa fitokimia, seperti alkaloid, flavonoid, polifenol, saponin, tanin, sterol, dan terpenoid (Harmanto, 2003). Senyawa fitokimia ini dikenal memiliki aktivitas antioksidan, antimikroba, dan antikanker dalam tubuh manusia. Menurut Hendra, et al. (2011), buah mahkota dewa kering sebesar 1 gram memiliki total kandungan fenolik sebesar 60,5 mg ekuivalen asam galat. Bila dibandingkan total kandungan fenoliknya dengan buah lain (seperti *blackberry* yang mengandung 12 mg ekuivalen asam galat, *blueberry* yang mengandung 42 mg ekuivalen asam galat, dan *strawberry* yang mengandung 24 mg ekuivalen asam galat), buah mahkota dewa memiliki total kandungan fenolik yang paling besar dibandingkan buah-buah tersebut. Senyawa fenolik merupakan senyawa yang berkontribusi paling besar dalam aktivitas antioksidan dan antimikroba.

Di Indonesia, pengolahan bahan alami, seperti mahkota dewa, umumnya kurang diminati oleh industri dalam negeri. Bahan alami ini kurang diminati karena produktivitas industri dan pemasok bahan alami yang masih sangat terbatas. Industri seringkali menggunakan teknologi yang sangat sederhana dalam memproduksi sehingga kuantitas dan kualitas produk terkadang tidak sesuai dengan standar yang diharapkan. Salah satu usaha yang dapat dilakukan untuk mengatasi hal tersebut adalah dengan mengembangkan teknologi pengolahan yang tepat guna non-destruktif dan aplikatif dalam industri kecil, yaitu metode ekstraksi padat cair. Melalui pengembangan teknologi pengolahan

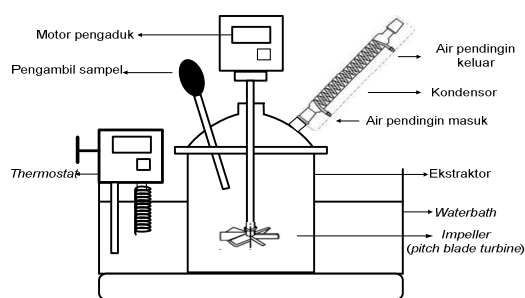


bahan, diharapkan kualitas dan kuantitas produk buah mahkota dewa dapat diperbaiki sehingga potensi mahkota dewa sebagai antioksidan alami dapat dikembangkan.

Tanin merupakan golongan metabolit fenolik yang unik dan memiliki berat molekul yang tinggi. Tanin tersebar di daun, akar, dan buah untuk melindungi tanaman dari infeksi dan *herbivore*. Tanin memiliki cukup banyak manfaat bagi manusia, antara lain berfungsi sebagai *astringent*, antimitogenik, dan pelindung liver (Harborne, 1984; Permadi, 2008). Namun, kandungan senyawa tanin juga kurang baik bagi manusia karena tanin dapat bersifat racun dan menyebabkan alergi. Lengketnya *crude extract* oleh tanin disebabkan karena tanin merupakan polimer yang sangat panjang dan bila terkena panas pada suhu yang tinggi maka tanin akan menyebabkan lengket pada *crude extract*. *Crude extract* yang lengket ini dikhawatirkan dapat menyumbat proses isolasi menggunakan *High Pressure Liquid Chromatography (HPLC)* yang direncanakan pada tahun berikutnya. Berdasarkan penelitian tahun sebelumnya (Andreas, 2013; Ariffianli, 2013; Lidya, 2013; Kurniawan, 2013), diketahui bahwa senyawa tanin dalam buah mahkota dewa larut dengan pelarut metanol, etil asetat, aseton, dan etanol. Dari penelitian yang dilakukan Yayah (2014), diketahui bahwa proses *pretreatment* mahkota dewa dengan proses ekstraksi padat cair menggunakan pelarut etil asetat dan pelarut etanol hanya memindahkan senyawa tanin ke dalam ekstrak pelarut lainnya. Kombinasi pelarut-pelarut ini ternyata belum mampu menghilangkan senyawa tanin secara signifikan. Oleh sebab itu, akan dilakukan proses *pretreatment* lainnya menggunakan pelarut air dengan variasi temperatur. Pelarut air dipilih dalam proses *pretreatment* ini karena air mampu melarutkan senyawa tanin (Tiwari, et al, 2011). Variasi temperatur juga bertujuan untuk meningkatkan kelarutan *solute* didalam pelarut sehingga diharapkan senyawa tanin dapat larut cukup banyak dalam pelarut air. Namun, temperatur yang tinggi juga dapat melarutkan senyawa *solute* lainnya sehingga dapat mengurangi jumlah aktivitas antioksidan yang diinginkan. Untuk menghindari kehilangan aktivitas antioksidan ini, ekstraksi serbuk buah mahkota dewa dengan pelarut air pada temperatur tinggi akan dilangsungkan dengan waktu yang cukup singkat, yaitu 5 menit. Dari proses *pretreatment* ini, diharapkan senyawa tanin dapat terpisahkan dari *crude extract* sehingga tahap ekstraksi selanjutnya, *crude extract* yang diperoleh dapat lebih murni dan berkurang sifat lengketnya.

## Metodologi

Buah mahkota dewa segar diperoleh dari perkebunan di Kelurahan Dangdeur, Kota Subang, Jawa Barat, pelarut etanol 70%, yang digunakan sebagai pelarut diperoleh dari PT. Brataco Chemicals, dan reagen DPPH (*1,1-Diphenyl-2-picrylhydrazyl*) yang diperoleh dari Sigma-Aldrich. Ekstraksi buah mahkota dewa dilangsungkan secara *batch* dalam ekstraktor berkapasitas 1 Liter yang dilengkapi dengan *thermostat*, *waterbath*, kondensor, dan *impeller pitch blade turbine* (disajikan pada **Gambar 1**). Tahapan penelitian yang dilakukan ialah perlakuan awal buah mahkota dewa, penentuan kondisi *pretreatment* menggunakan pelarut akuatik (air) terbaik, penentuan perlakuan kombinasi pelarut lanjutan terbaik, dan analisis kuantitatif (perolehan *crude extract*, uji aktivitas antioksidan dengan metode DPPH dan kadar tanin dengan metode pembentukan senyawa kompleks).



**Gambar 1.** Ekstraktor Batch

Buah mahkota dewa dicuci terlebih dahulu untuk membersihkan kontaminan yang melekat pada buah, kemudian diiris menggunakan pisau untuk meningkatkan luas kontak udara pengering dengan bahan. Pengeringan dilakukan pada temperatur 40°C menggunakan *tray drier* sehingga diperoleh kadar air 7-10%-b. Irisan buah mahkota dewa yang telah kering kemudian mengalami pengecilan ukuran hingga diperoleh serbuk buah mahkota dewa berbentuk serabut berukuran panjang x tebal  $\pm 0,5 \text{ cm} \times 0,1 \text{ cm}$ .

Penentuan kondisi *pretreatment* pelarut air terbaik dilakukan untuk mengkaji pengaruh pelarut air dengan variasi temperatur terhadap perolehan tanin. Ekstraksi ini akan dilakukan dengan rasio F:S sebesar 0,00625 g/mL dengan temperatur operasi yang divariasikan (55 °C - 100 °C) dan waktu ekstraksi selama 5 menit. Serbuk buah mahkota dewa diekstraksi dengan pelarut air sebesar 600 mL selama 5 menit selesai. Ekstrak kemudian dipisahkan dari rafinat dengan memanfaatkan sistem filtrasi bertahap menggunakan pompa *vacuum*, dipekatkan dan diuapkan menggunakan *rotary vacuum evaporator* hingga diperoleh *crude extract*. *Crude extract* yang diperoleh dianalisa perolehan, kadar tanin, dan aktivitas antioksidannya sebagai respon untuk menentukan temperatur terbaik.

Temperatur terbaik merupakan temperatur yang mampu melarutkan tanin paling tinggi dibandingkan yang lainnya, ditentukan menggunakan analisa varians dengan bantuan metode LSD.

Penentuan perlakuan kombinasi pelarut lanjutan terbaik dilakukan dengan mengeringkan rafinat yang diperoleh dari ekstraksi serbuk buah mahkota dewa menggunakan pelarut air terlebih dahulu di dalam *tray drier* pada temperatur 50°C. Ekstraksi lanjutan menggunakan kombinasi pelarut non polar (n-heksana dan kloroform), semi polar (etil asetat), dan polar (etanol 70%). Selain itu, rafinat yang diperoleh juga akan diekstraksi menggunakan air pada temperatur terbaik yang diperoleh sebelumnya dengan waktu yang lebih lama, yaitu 10 menit. Variasi penentuan kombinasi pelarut lanjutan pelarut air terbaik disajikan dalam Tabel 1. *Crude extract* yang diperoleh dianalisa perolehan, kadar tanin, dan aktivitas antioksidannya sebagai respon untuk menentukan kombinasi pelarut lanjutan terbaik yang dapat menurunkan kadar tanin. Penentuan kombinasi pelarut lanjutan terbaik yang dapat menurunkan kadar tanin secara optimum akan menggunakan analisa varians dengan metode LSD.

**Tabel 1** Variasi Kombinasi Pelarut Lanjutan Pelarut Air Terbaik

Run	Pelarut 1	Pelarut 2	Pelarut 3	Pelarut 4
1	Air	Etanol 70%	-	-
2	Air	Heksana	Etil Asetat	Etanol 70%
3	Air	Kloroform	Etil Asetat	Etanol 70%
4	Air	Etil Asetat	Etanol 70%	-
5	Air	Air	-	-

Analisa perolehan dilakukan secara gravimetri dengan menimbang produk *crude extract* yang diperoleh menggunakan neraca analitis dan dihitung menggunakan persamaan (1).

$$\text{Perolehan} = \frac{\text{massa crude extract basis basah}}{\text{massa uyuan basah}} \quad (1)$$

Uji aktivitas antioksidan dilakukan dengan melarutkan *crude extract* dalam metanol pa sehingga diperoleh larutan berkonsentrasi 30 ppm. 2,5 mL larutan ini kemudian dicampurkan dengan larutan DPPH-metanol 0,1 mM sebanyak 2,5 mL. Campuran tersebut kemudian dikocok dan diinkubasi pada temperatur ruang dalam keadaan gelap selama 4 jam. Absorbansi campuran tersebut diukur menggunakan spektrofotometer pada panjang gelombang 517. Pelarut metanol pa digunakan sebagai blanko sedangkan larutan DPPH-metanol dijadikan sebagai *control negative* (Marinova dan Bachtvarov, 2011). Aktivitas antioksidan dinyatakan dalam DPPH *equivalent* ( $\mu\text{mol DPPH/mg crude extract basis basah}$ ), yang dihitung dengan persamaan (2) dan (3).

$$\% \text{ Inhibisi} = \frac{A_{\text{kontrol}} - A_{\text{sampel}}}{A_{\text{kontrol}}} \times 100\% \quad (2)$$

$$\text{DPPH equivalent} = \frac{\% \text{ inhibisi} \times [\text{DPPH}] \times V_{\text{DPPH}}}{[\text{ekstrak}] \times V_{\text{ekstrak}}} \quad (3)$$

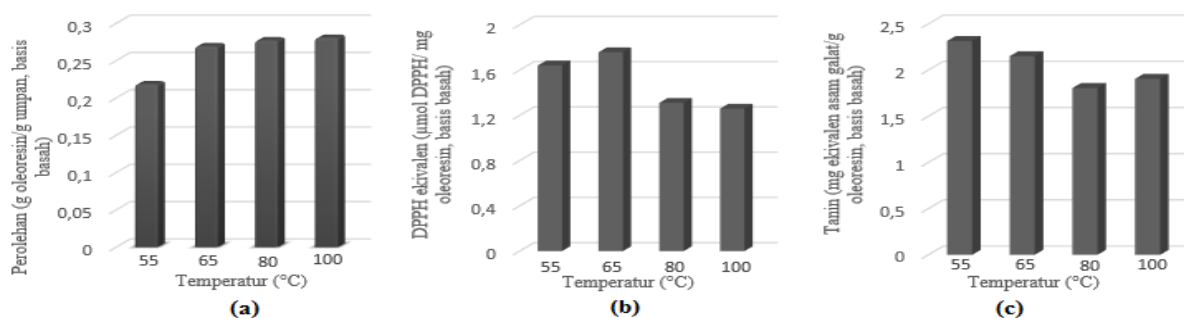
Uji kadar tanin dilakukan dengan mencampurkan 500  $\mu\text{L}$  sampel, 8 mL air suling, 1 mL larutan sodium karbonat 7,5% (w/v), dan 500  $\mu\text{L}$  Foli-Ciocalteu 10% (v/v) ke dalam tabung tes selama 30 menit pada temperatur ruang. Campuran tersebut kemudian diukur absorbansi pada panjang gelombang 760 nm menggunakan spektrofotometer sehingga diperoleh total fenol yang terdapat didalam sampel. Setelah itu, dilakukan juga pencampuran 500 mg *casein*, 5 mL sampel, dan 5 mL air suling ke dalam 25 mL labu erlenmeyer selama 2 jam. Campuran tersebut difiltrasi dan filtrat dicampurkan dengan air suling pada labu ukur 10 mL hingga diperoleh larutan sisa fenol sebanyak 10 mL. Larutan sisa fenol tersebut diukur absorbansinya pada panjang gelombang 760 nm. Perhitungan kadar tanin diperoleh dengan mengurangkan total fenol dengan fenol sisa (Amorim, *et al*, 2012). Kadar tanin dalam sampel dinyatakan sebagai miligram *gallic acid* yang ekuivalen dengan per gram sampel atau ekstrak ( $\text{mg gallic acid/g crude extract}$ ), yang dihitung dengan persamaan (4).

$$\text{Kadar Tanin} = \text{kadar total fenol} \left( \frac{\text{mg ekuivalen asam galat}}{\text{gram crude extract}} \right) - \text{kadar fenol sisa} \left( \frac{\text{mg ekuivalen asam galat}}{\text{gram crude extract}} \right) \quad (4)$$

## Hasil dan Pembahasan

Penentuan *pretreatment* pelarut air terbaik dilakukan dengan mengekstraksi buah mahkota dewa menggunakan pelarut air yang divariasikan temperaturnya. Pemilihan pelarut air didasarkan karena pelarut air yang murah dan memiliki kemampuan untuk melarutkan senyawa fenol yang sangat baik (Tiwari, *et al*, 2011). Pengontakan selama 5 menit bertujuan untuk menghindari larutnya senyawa *solute* lain dalam jumlah besar pada ekstrak. Temperatur operasi yang tinggi bertujuan untuk meningkatkan kelarutan *solute* di dalam pelarut sehingga diharapkan senyawa tanin dapat larut cukup banyak dalam air. *Crude extract* yang diperoleh kemudian dianalisa kuantitatif untuk mengetahui aktivitas antioksidan, perolehan, dan kadar taninnya.

Dari hasil analisa kuantitatif yang dilakukan (disajikan pada Gambar 4), dapat dilihat bahwa perolehan terbesar pada temperatur 100°C, kemudian diikuti temperatur 65°C, 80°C, dan 55°C. Semakin tinggi temperatur maka semakin banyak *solute* yang larut sehingga perolehan diperoleh juga semakin banyak. Namun, dari segi kualitas *crude extract* yang diperoleh, belum tentu menunjukkan perolehan yang besar menunjukkan kualitas yang baik karena pada temperatur tinggi umumnya senyawa bioaktif akan terdekomposisi dan mengakibatkan larutnya zat yang tidak diinginkan, seperti pektin dan pati (Shi, et al, 2002).



**Gambar 4.** Perbandingan Analisa Kuantitatif pada *Pretreatment* Pelarut Terbaik  
(a) Perolehan, (b) Aktivitas antioksidan, (c) Kadar tanin

Penelitian yang dilakukan oleh Lidya (2013) menunjukkan bahwa ekstraksi buah mahkota dewa pada temperatur 72°C mulai menghasilkan aktivitas antioksidan yang menurun akibat adanya degradasi komponen pada temperatur tinggi. Dari hasil kuantitatif yang dilakukan (dapat dilihat pada Gambar 4), dapat dilihat bahwa kadar DPPH tertinggi diperoleh pada temperatur 65°C sedangkan yang terendah diperoleh pada temperatur 100°C. Hal ini membuktikan bahwa temperatur tinggi menurunkan kualitas *crude extract* yang diperoleh.

Dari analisa kuantitatif kadar tanin yang dilakukan (disajikan pada Gambar 4), dapat dilihat bahwa senyawa tanin terbanyak larut dalam pelarut air bertemperatur 55°C dan terkecil diperoleh pada temperatur 80°C. Namun, bila dilihat dari segi kuantitas per massa umpan atau secara total, dapat dilihat bahwa kadar tanin terbesar berada pada temperatur 65°C. Dari hasil analisa dengan uji ANOVA dan uji rata-rata LSD, dapat dilihat bahwa interaksi temperatur 55°C dengan temperatur 65°C tidak berbeda nyata dan interaksi temperatur 100°C dengan temperatur 65°C dan 80°C tidak berbeda nyata. Interaksi temperatur lainnya menghasilkan perbedaan yang nyata. Artinya, temperatur 55°C dan 65°C merupakan temperatur yang terbaik dalam melarutkan senyawa tanin untuk per gram *crude extract*. Kedua temperatur ini mampu melarutkan senyawa tanin per gram *crude extract* lebih baik 1,2 kali dari daripada temperatur 80°C dan 100°C. Kemampuan melarutkan tanin yang lebih baik dapat disebabkan karena pada temperatur tersebut senyawa bioaktif tanin belum terdegradasi dan semakin tingginya temperatur akan meningkatkan kelarutan tanin dalam air. Namun, berhubungan dengan tujuan dari *pretreatment* ini adalah untuk menghilangkan senyawa tanin secara maksimal, maka yang harus ditinjau dari kedua temperatur ini adalah kemampuan untuk melarutkan kadar tanin dalam per massa umpan. Dalam kuantitas per massa umpan, dapat dilihat bahwa temperatur kadar 65°C menghasilkan tanin yang lebih besar daripada temperatur 55°C. Oleh sebab itu, temperatur 65°C dipilih menjadi temperatur terbaik dalam melarutkan senyawa tanin dalam mahkota dewa.

Penentuan perlakuan kombinasi pelarut lanjutan terbaik dilakukan setelah temperatur optimum untuk penentuan *pretreatment* pelarut air terbaik telah diperoleh. Dari hasil analisa kuantitatif pada kombinasi pelarut lanjutan pada *pretreatment* pelarut akuatik (air) terbaik yang telah dilakukan (disajikan pada Gambar 5), dapat dilihat bahwa perolehan ekstrak etanol yang melalui ekstraksi satu tahap lebih besar daripada ekstrak etanol yang melalui ekstraksi bertahap. Hal ini dapat disebabkan karena senyawa bioaktif buah mahkota dewa telah terekstraksi cukup banyak oleh pelarut air sehingga saat akan diekstraksi dengan pelarut etanol lagi senyawa bioaktif ini cenderung berkurang karena pelarut air yang sangat selektif terhadap senyawa bioaktif yang terdapat di mahkota dewa yang cenderung bersifat polar.

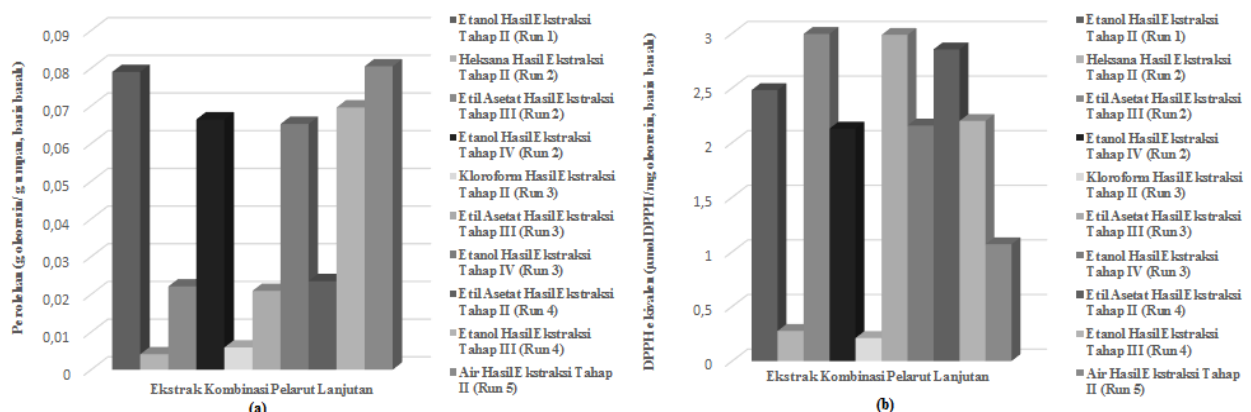
Dari perbandingan ekstrak etanol hasil ekstraksi tahap II (*run 1*), hasil ekstraksi tahap IV pasca ekstraksi tahap II dengan pelarut n-heksana (*run 2*), hasil ekstraksi tahap IV pasca ekstraksi tahap II dengan pelarut kloroform (*run 3*), dan hasil ekstraksi tahap III (*run 4*), dapat dilihat bahwa perolehan ekstrak etanol hasil ekstraksi tahap II (*run 1*) lebih besar 1,19 kali lebih besar dibandingkan hasil ekstraksi tahap IV pasca ekstraksi tahap II dengan pelarut n-heksana (*run 2*) dan pasca ekstraksi tahap II dengan pelarut kloroform (*run 3*). Perolehan lebih banyak ini mungkin disebabkan karena ekstrak ini tidak mendapatkan kombinasi pelarut non polar dan semi polar terlebih dahulu sehingga pelarut etanol dapat mengekstraksi senyawa bioaktif secara menyeluruh. Perolehan yang lebih kecil dapat disebabkan karena ekstraksi bertahap yang digunakan untuk mengekstraksi senyawa tersebut. Perolehan kloroform yang lebih besar dari n-heksana dapat disebabkan karena kemampuan pelarut kloroform yang lebih selektif untuk



melarutkan senyawa pengotor seperti minyak dan lipid yang terkandung di dalam buah mahkota dewa. Pelarut etil asetat sendiri merupakan pelarut yang dapat melarutkan senyawa flavonoid, tanin, saponin, dan terpenoid dalam buah mahkota dewa. Penggunaan pelarut-pelarut ini dalam ekstraksi bertahap akan memisahkan senyawa bioaktif berdasarkan jenis kepolaran pelarut yang akan digunakan. Perolehan ekstrak air hasil ekstraksi tahap II (*run 5*) terbesar jika dibandingkan dengan yang lain. Namun, perolehan ini lebih kecil 3,35 kali dari perolehan dengan ekstraksi air sebelumnya, karena ekstraksi air pada tahap sebelumnya telah melarutkan banyak *solute*.

Dari analisa kuantitatif (disajikan pada Gambar 5), dapat dilihat bahwa ekstrak etil asetat menghasilkan DPPH ekivalen yang lebih besar dibandingkan yang lain. Hal ini menunjukkan bahwa kualitas ekstrak etil asetat sangat besar; lebih besar jika dibandingkan dengan ekstrak etanol 70% pada hasil ekstraksi tahap II (*run 1*), hasil ekstraksi tahap IV pasca ekstraksi tahap II dengan pelarut n-heksana (*run 2*), hasil ekstraksi tahap IV pasca ekstraksi tahap II dengan pelarut kloroform (*run 3*), dan hasil ekstraksi tahap III (*run 4*). Aktivitas antioksidan yang besar ini dapat disebabkan karena kemudahan pelarut etil asetat untuk berdifusi masuk dan melarutkan *solute* dalam buah mahkota dewa setelah senyawa-senyawa pengotor telah diekstraksi oleh pelarut air. Aktivitas antioksidan ekstrak air hasil ekstraksi tahap II (*run 5*) mengalami penurunan sebesar 1,64 kali bila dibandingkan dengan ekstrak air hasil ekstraksi tahap I. Penurunan ini dapat disebabkan karena telah terlarutnya cukup banyak *solute* dalam ekstraksi tahap I sehingga terjadi pengurangan senyawa antioksidan yang terekstrak.

Ekstrak etanol hasil ekstraksi tahap II (*run 1*) menghasilkan aktivitas antioksidan yang lebih besar (signifikan) dibandingkan dengan ekstrak etanol lainnya. Ekstrak etanol hasil ekstraksi tahap III (*run 4*) menghasilkan aktivitas antioksidan yang lebih besar tetapi tidak signifikan dibandingkan ekstrak etanol pada hasil ekstraksi tahap IV pasca ekstraksi tahap II dengan pelarut n-heksana (*run 2*) dan hasil ekstraksi tahap IV pasca ekstraksi tahap II dengan pelarut kloroform (*run 3*). Aktivitas antioksidan yang besar dalam ekstrak etanol hasil ekstraksi tahap II (*run 1*) dapat disebabkan karena besarnya kadar flavonoid yang larut dalam ekstrak tersebut. Ekstrak n-heksana memiliki kualitas DPPH yang tidak berbeda nyata walaupun lebih besar bila dibandingkan ekstrak kloroform.

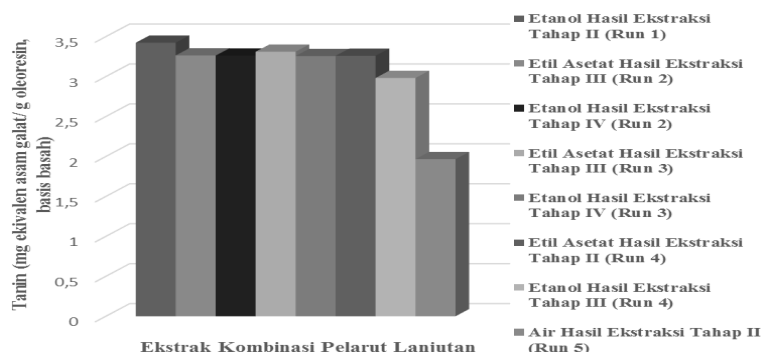


**Gambar 5.** Perbandingan Analisa Kuantitatif pada Kombinasi Pelarut Terbaik Lanjutan  
(a) Perolehan, (b) Aktivitas antioksidan

Berdasarkan analisa kuantitatif total fenol dan tanin (disajikan pada Gambar 6), dapat dilihat bahwa ekstrak etil asetat setiap *run*nya dapat mengekstrak total fenol dan tanin dengan sangat baik. Total fenol dan tanin terbesar untuk ekstrak etil asetat diperoleh dari ekstrak etil asetat hasil ekstraksi tahap III pasca ekstraksi tahap II dengan pelarut kloroform (*run 3*). Namun, besarnya perolehan ini tidak signifikan bila dibandingkan dengan ekstrak etil asetat hasil ekstraksi tahap III pasca ekstraksi tahap II dengan pelarut n-heksana (*run 2*) dan ekstrak etil asetat hasil ekstraksi tahap II (*run 4*). Total fenol dan tanin merupakan senyawa bioaktif yang berperan dalam aktivitas antioksidan. Besarnya total fenol dan tanin yang ada dalam ekstrak etil asetat menyebabkan besarnya DPPH ekivalen yang dimiliki oleh ekstrak etil asetat. Bila dibandingkan dengan ekstraksi dua tahap dengan pelarut etil asetat pada penentuan kombinasi terbaik, dapat dilihat bahwa kadar tanin yang diperoleh tidak terlalu berbeda jauh.

Ekstrak etanol yang memiliki kadar total fenol dan kadar tanin terbesar adalah ekstrak etanol hasil ekstraksi tahap II (*run 1*). Ekstrak etanol hasil ekstraksi tahap III (*run 4*) yang memiliki kadar tanin terkecil berbeda (signifikan) dengan ekstrak etanol lainnya. Interaksi ekstrak etanol 70% (v/v) pada *run* lainnya menunjukkan tidak adanya perbedaan yang nyata bila dibandingkan satu dengan yang lainnya. Hal ini menunjukkan bahwa ekstraksi tiga tahap pada kombinasi pelarut terbaik lanjutan tidak memberikan pengurangan kadar tanin yang signifikan bila dibandingkan dengan ekstraksi satu tahap. Namun, ekstraksi dua tahap setelah *pretreatment* pelarut air terbaik dapat menurunkan kadar tanin lebih baik jika dibandingkan dengan ekstraksi tiga tahap setelah *pretreatment*. Berdasarkan

analisa kuantitatif, pelarut yang bersifat non polar, seperti n-heksana dan kloroform, tidak melarutkan senyawa fenol dan tanin. Ekstraksi lanjutan dengan pelarut air yang bertemperatur 65°C selama 10 menit ternyata masih mampu melarutkan senyawa tanin. Namun, kadar tanin yang diperoleh cenderung menurun jika dibandingkan dengan ekstraksi pada tahap sebelumnya dengan pelarut air.



Gambar 6. Perbandingan Kadar Tanin pada Kombinasi Pelarut Terbaik Lanjutan

## Kesimpulan

Temperatur operasi terbaik dalam *pretreatment* menggunakan pelarut akuatik (air) pada 65°C menghasilkan (dalam basis basah) perolehan sebesar 0,2696 g *crude extract*/ g umpan, kandungan tanin 0,5798 mg ekvalen/ g umpan serta aktivitas antioksidan 1,7586  $\mu\text{mol DPPH}$ / mg *crude extract*. Penggunaan pelarut air pada ekstraksi tahap II dalam kombinasi pelarut lanjutan *pretreatment* pelarut akuatik (air) terbaik mengalami penurunan (dalam basis basah) perolehan menjadi 0,0805 g *crude extract*/ g umpan, kadar fenol menjadi 2,8934 mg ekvalen asam galat / g *crude extract*, kadar tanin menjadi 1,9667 mg ekvalen/ g *crude extract*, dan aktivitas antioksidan menjadi 1,0699  $\mu\text{mol DPPH}$ / mg *crude extract*. Kombinasi pelarut lanjutan dengan ekstraksi dua tahap menggunakan pelarut etil asetat dan etanol 70% setelah *pretreatment* merupakan kombinasi terbaik untuk menurunkan kadar tanin dalam ekstrak etanol 70%; dapat menurunkan kadar tanin sebesar 13,03% dengan perolehan yang diperoleh sebesar 0,0696 g *crude extract*/ g umpan, kadar tanin sebesar 2,9830 mg ekvalen asam galat / g *crude extract*, dan aktivitas antioksidan sebesar 2,1983  $\mu\text{mol DPPH}$ / mg *crude extract* bila dibandingkan dengan ekstraksi satu tahap setelah *pretreatment*.

## Ucapan Terimakasih

Terimakasih kepada Direktorat Jenderal Pendidikan Tinggi (Dikti) yang telah mendanai penelitian ini melalui proyek penelitian unggulan Ekstraksi, Isolasi, dan Uji Keaktifan Senyawa Aktif Buah Mahkota Dewa (*Phaleria macrocarpa*) sebagai Pengawet Makanan Alami berdasarkan kontrak No. 1102/K4/KM/2014 sehingga dapat terlaksana.

## Daftar Pustaka

- Andrean, D., 2014, The Extraction and Activity Test of Bioactive Compounds in *Phaleria macrocarpa* as Antioxidant, *International Conference and Workshop on Chemical Engineering UNPAR 2013, ICCE UNPAR 2013*
- Amorim, E.L.C., et al, 2012, *Standard Operating Procedures (SOP) for the Spectrophotometric Determination of Phenolics Compounds Contained in Plant Samples*, Federal University Pernambuco, Brazil
- Ariffianli, D., 2013, Studi Ekstraksi Batch Pengontakan Dispersi Senyawa Bioaktif Buah Mahkota Dewa (*Phaleria macrocarpa*) dengan Pelarut Etil Asetat 8,85%-v/v, *Prosiding Seminar UPN 2014 (5 Maret)*
- Harborne, J.B., 1996, *Metode Fitokimia Penuntun Cara Modern Menganalisis Tumbuhan*, ITB, Bandung
- Harmanto, N., 2001, *Mahkota Dewa Obat Pusaka Para Dewa*, AgroMedia Pustaka, Jakarta
- Hendra, R., et al, 2011, Antioxidant, Anti-inflammatory and Cytotoxicity of *Phaleria macrocarpa* (Boerl.) Scheff Fruit, *BMC Complementary and Alternative Medicine*, 11, 110-119
- Kurniawan, L., 2013, Studi Ekstraksi Batch Pengontakan Dispersi Senyawa Bioaktif Buah Mahkota Dewa (*Phaleria macrocarpa*) dengan Pelarut Aseton 70%-v/v, *Prosiding Seminar UPN 2014 (5 Maret)*
- Lidya, M., 2013, Studi Ekstraksi Batch Pengontakan Dispersi Senyawa Bioaktif Buah Mahkota Dewa (*Phaleria macrocarpa*) dengan Pelarut Etanol 70%-v/v, *Prosiding Seminar UPN 2014 (5 Maret)*



- Marinova dan Batchvarov, 2011, Evaluation of The Methods For Determination of The Free Radical Scavenging Activity by DPPH, *Bulgarian Journal of Agricultural Science*, 17 (1), 11-24
- Permadi, A., 2008, *Membuat Kebun Tanaman Obat*, Pustaka Bunda, Jakarta
- Puslitbangtri, 1992, *Sepuluh Tahun Pusat Penelitian dan Pengembangan Tanaman Industri 1982-1991*, Sumbangan Penelitian dalam Pembangunan Perkebunan Rakyat, Jakarta
- Shie, J., Mazza, G., dan Maguer, M.L., 2002, *Biochemical and Processing Aspects*, CRC Press, New York
- Tiwari, P., et al, 2011, Phytochemical Screening and Extraction : A Review, *Internationale Pharmaceutica Scientia*, 1 (1), 98-106
- Yayah, W., (2014), Kajian Kombinasi Pelarut dan Optimasi Ekstraksi Senyawa Bioaktif Buah Mahkota Dewa (*Phaleria macrocarpa*) sebagai Antioksidan Alami, *2014 Regional Conference on Chemical Engineering Aun Seed Net – Chemical Engineering*, 2-3 Desember





## Lembar Tanya Jawab

**Moderator : Suhartono (Universitas Jenderal Achmad Yani)**  
**Notulen : Siswanti (UPN "Veteran" Yogyakarta)**

1. Penanya : Siswanti (UPN "Veteran" Yogyakarta)
- Pertanyaan :
  - Alasan pemilihan pelarut yang digunakan dalam penelitian ini?
  - Tanin rusak pada suhu berapa?
  - Mengapa dengan menggunakan pelarut air, suhu operasi terbaik adalah 65°C, kenapa bukan pada suhu yang lebih besar?
- Jawaban :
  - Dipilih yang murah dan mempunyai daya larut yang tinggi.
  - Tanin rusak pada suhu berapa, belum diketahui.
  - Pemilihan suhu tersebut berdasarkan pertimbangan daya larut tanin dan nilai aktivitas oksidan. Kualitas anti oksidannya akan rusak pada suhu lebih besar dari 65°C.

