PENENTUAN KONDISI TERBAIK EKSTRAKSI ANTIOKSIDAN DARI GAMBIR MENGUNAKAN METODE PERMUKAAN RESPON

Determination of the Best Conditions for the Extraction of Antioxidant from Gambier Using Response Surface Methodology

Gustri Yeni^{1,2}, E. Gumbira-Sa'id³, Khaswar Syamsu³, Etik Mardliyati⁴

1 Program Pascasarjana Doktor Teknologi Industri Pertanian, Institut Pertanian Bogor (IPB)

2 Baristand Industri Padang Jl. Raya LIK No. 23 Ulu Gadut Padang 25164

3 Dep. TIN Fateta Institut Pertanian Bogor (IPB) Jl. Raya Darmaga Bogor 16680

4 Badan Pengkajian dan Penerapan Teknologi (BPPT) Jl. MH. Thamrin No. 8 Jakarta 10340

*e-mail: khaswars@yahoo.com

Diterima: 1 April 2014, revisi akhir: 22 Mei 2014 dan disetujui untuk diterbitkan: 24 Mei 2014

ABSTRAK

Ekstrak dari *Uncaria gambir* mengandung senyawa fenolik katekin yang berfungsi sebagai antioksidan. Kandungannya pada hasil ekstrak bergantung pada kondisi ekstraksi yang digunakan. Untuk mendapatkan kondisi ekstraksi terbaik senyawa fenolik dari gambir dengan aktivitas antioksidan yang tinggi dilakukan proses optimasi menggunakan metode permukaan respon (RSM) pada tiga variabel yaitu rasio pelarut, rasio sampel dengan pelarut, dan lama ekstraksi dengan respons aktivitas antioksidan terhadap antiradikal DPPH (IC_{50}). Hasil optimasi menunjukkan persamaan kuadrat polinomial regresi yaitu $Y = 137,25 + 5,18 (R \text{ pelarut}) + 24,75 (R \text{ sampel}) + 11,53 (Lama \text{ eks}) + 6,17 (R \text{ pelarut} \times \text{ sampel}) + 3,14 (R \text{ pelarut} \times \text{ lama eks}) + 13,79 (R \text{ sampel} \times \text{ lama eks}) - 5,44 (R \text{ pelarut}^2) - 15,33 (R \text{ sampel}^2) - 5,42 (Lama \text{ eks}^2)$. Kondisi optimum dicapai pada rasio etil asetat dengan etanol 0,37:0,55, rasio sampel dengan pelarut 1:2, dan lama ekstraksi 20 jam. Hasil validasi menunjukkan nilai prediksi ($IC_{50} = 82.89 \text{ mg/ml}$) dari model tidak berbeda signifikan dengan nilai hasil validasi ($IC_{50} = 82,735 \pm 0,362 \text{ mg/ml}$). Karakteristik produk hasil ekstraksi secara visual menunjukkan warna yang berbeda dari setiap perlakuan dan tergantung dari rasio pelarut yang digunakan.

Kata Kunci : *Uncaria gambir*, antioksidan, ekstraksi, RSM.

ABSTRACT

Extract of *Uncaria gambier* contains phenolic compounds that have function as an antioxidants. Antioxidant content depends on the extraction conditions. To obtain high antioxidant activity of the phenolic compounds, the optimization process was carried out using response surface methodology (RSM) with three variables namely the ratio of solvent (ethyl acetat : ethanol), the ratio of sample : solvent, and time of extraction with the antioxidant activity DPPH (IC_{50}) as response. Optimization result showed a quadratic polynomial regression equation of $Y = 137.25 + 5.18 (R \text{ solvent}) + 24.75 (R \text{ sample}) + 11.53 (Time \text{ of extrac}) + 6.17 (R \text{ solvent} \times \text{ sample}) + 3.14 (R \text{ solvent} \times \text{ Time of extrac}) + 13.79 (R \text{ sample} \times \text{ Time of extrac}) - 5.44 (R \text{ solvent}^2) - 15.33 (R \text{ sample}^2) - 5.42 (Time \text{ of extrac}^2)$. The optimum response was achieved at the solvent ratio of ethyl acetat : ethanol = 0,37 : 0,55, ratio of sample : solvent = 1:2 and time of extraction 20 hours. Validation result revealed that the predicted value ($IC_{50} = 82.89 \text{ mg/ml}$) of this model was reasonably close to the experimental result ($IC_{50} = 82,735 \pm 0,362 \text{ mg/ml}$). Visual characterization of the extracts indicated that the extracts have different colour in each treatment, depended on the ratio of the solvent used.

Keywords: *Uncaria gambier*, antioxidant, extraction, RSM.

PENDAHULUAN

Ekstraksi merupakan salah satu unit operasi yang paling banyak digunakan untuk mendapatkan senyawa bioaktif yang tersimpan pada suatu tanaman dan memiliki fungsi menguntungkan bagi kesehatan manusia. Beberapa peneliti telah melakukan proses ekstraksi terhadap gambir untuk mendapatkan senyawa fenolik katekin (Nazir, 2006; Pambayun *et al*, 2007; Rauf *et al*, 2010; Muchtar *et al*, 2010; Kurnia *et al*, 2011; Widiyarti *et al*, 2009; Anggraini *et al*, 2011; Gani *et al*, 2013; Yeni *et al*, 2013). Senyawa ini dilaporkan memiliki sifat sebagai antibakteri, anti diabetes dan antioksidan (Bakhtiar, 2004; Pambayun *et al*, 2007; Taniguchi *et al*, 2007; Nazir *et al*, 2009; Apea-Bah *et al*, 2009; Widiyarti *et al*, 2011).

Dalam mengekstrak senyawa fenolik, pemilihan metode ekstraksi, jenis pelarut, lama ekstraksi, jumlah dan derajat kehalusan simplisia merupakan faktor yang menentukan terhadap hasil ekstrak yang dihasilkan. Penggunaan pelarut dengan tingkat kepolaran yang sama dengan senyawa yang diekstrak dapat meningkatkan kelarutan. Jumlah pelarut dan ukuran partikel menentukan terhadap besarnya laju transfer masa antara padatan dan larutan (Pinelo *et al*, 2005).

Proses ekstraksi senyawa fenolik dari gambir oleh Rauf *et al*. (2010), menggunakan pelarut etanol, etil asetat dan campurannya memberikan hasil yang tidak berbeda nyata dan ekstraksi dengan aquades menghasilkan senyawa fenolik dengan aktivitas antioksidan yang paling rendah. Ditambahkan oleh Gani *et al*. (2013), kondisi ekstraksi seperti suhu, waktu dan sifat pelarut sangat berpengaruh terhadap banyaknya senyawa fenolik yang dapat diekstrak. Penelitian tersebut belum melaporkan tentang pengaruh kondisi pelarut dengan sampel dan lama waktu ekstraksi yang digunakan. Untuk senyawa fenolik yang mudah rusak seperti katekin, penggunaan suhu tinggi tidak disarankan karena dapat menyebabkan pembentukan polimer fenol dari hasil ekstrak (Pinelo *et al*, 2005).

Untuk mendapatkan senyawa fenolik dengan aktivitas antioksidan yang optimum dari gambir perlu dievaluasi efisiensi proses

ekstraksi gambir yang dilakukan. Menurut Wanasundara dan Shahidi (1999), metode respon permukaan (RSM) dapat digunakan untuk menentukan kondisi proses yang optimum dari berbagai faktor yang dikaji. Metode ini tidak memerlukan data yang banyak, hasil disampaikan dalam bentuk ringkasan grafik dan plot-plot kontur yang mudah dipahami (Montgomery, 2001).

Dalam penelitian ini, proses produksi senyawa fenolik dari gambir yang memiliki aktivitas antioksidan tinggi dilakukan dengan metode respon permukaan (RSM) menggunakan dua pendekatan. Pertama, mengevaluasi pengaruh rasio etil asetat dengan etanol, rasio sampel dengan pelarut, dan lama ekstraksi terhadap efisiensi proses ekstraksi gambir untuk menghasilkan senyawa fenolik dengan aktivitas antioksidan yang tinggi. Respos terhadap proses ekstraksi ditentukan dengan menghitung aktivitas antioksidan sebagai antiradikal DPPH. Kedua, menentukan kondisi yang optimum pada ekstraksi gambir untuk menghasilkan aktivitas antioksidan yang tinggi.

METODOLOGI PENELITIAN

Bahan baku yang digunakan dalam penelitian ini adalah gambir yang diperoleh dari daerah Mungka, Kabupaten Lima Puluh Kota, Propinsi Sumatera Barat.

Bahan kimia untuk proses dan pengujian adalah etanol dan etil asetat yang bermutu teknis, asam askorbat, 2,2-Diphenyl-1-pikrilhidrazil hydrate (DPPH), dan metanol bermutu analitis dibeli dari Sigma Chemical (St Louis, MO).

Peralatan yang digunakan adalah mortar, ayakan 40 mesh, *shaker*, Whatman 40, *spray dryer* dan *spektrofotometer* U-2010 (Hitachi).

Proses produksi senyawa fenolik dari gambir yang memiliki aktivitas antioksidan tinggi dilakukan dalam beberapa tahap yaitu menghaluskan sampel gambir hingga lolos saringan 40 mesh, proses ekstraksi menggunakan metode maserasi dengan pengadukan pada suhu kamar. Proses ekstraksi melalui proses pengadukan dapat meningkatkan kelarutan zat terlarut (Kirk, 1998). Sampel hasil ekstrak disaring dengan kertas saring Whatman 40 dan dikeringkan

dengan *spray dryer* pada kondisi suhu inlet = 175°C dan suhu outlet = 60°C dan laju aliran larutan 143 ml min⁻¹ (Krishnaswamy *et al*, 2012). Pengeringan hasil ekstrak menggunakan *spray dryer* bertujuan untuk mengurangi efek kerusakan dari senyawa fenolik yang rentan terhadap panas. Pengeringan senyawa yang rentan terhadap panas, harus dalam keadaan terawasi agar tidak terjadi perubahan kimia terlalu banyak dan sebaiknya dikeringkan secepatnya menggunakan suhu rendah (Harborne, 1987).

Penentuan kondisi proses terbaik ekstraksi gambir untuk menghasilkan senyawa fenolik dengan aktivitas antioksidan yang tinggi pada skala laboratorium menggunakan *central composite design* (CCD) (Montgomery, 2001). Faktor-faktor yang diteliti adalah perbandingan penggunaan pelarut etil asetat dengan etanol (v:v) (X1), perbandingan bobot sampel dengan pelarut (w:v) (X2) dan lama ekstraksi (t) (X3) (Box, and Draper, 1987). Nilai level sebagai variabel bebas dikodekan dengan nilai -1 dan 1, sebagai titik tengah adalah 0 (Tabel 1). Titik tengah perancangan percobaan terhadap rasio sampel dengan jumlah pelarut, lama ekstraksi terpilih dari penelitian Yeni *et al.* (2013) dan rasio pelarut etil asetat dengan etanol dipilih dari penelitian Rauf *et al.* (2010).

Rentang rasio pelarut dari perlakuan adalah perbandingan etil asetat dengan

etanol antara 0,2 sampai 1 liter, rasio sampel dengan pelarut antara 1:1 hingga 1:5 (kg/liter) dan lama ekstraksi antara 8 sampai 24 jam. Respon yang diamati adalah peningkatan aktivitas antioksidan sebagai antiradikal DPPH (IC₅₀). Model rancangan percobaan faktorial yang digunakan untuk mengetahui pengaruh dari ketiga faktor terhadap respon yang diinginkan adalah seperti persamaan 1 (Montgomery, 2001).

$$Y = \beta_0 + \beta_1 X_1 + \beta_2 X_2 + \beta_3 X_3 + \beta_{11} X_1^2 + \beta_{22} X_2^2 + \beta_{33} X_3^2 + \beta_{12} X_1 X_2 + \beta_{13} X_1 X_3 + \beta_{23} X_2 X_3 + \varepsilon \tag{1}$$

Dimana Y = Aktivitas antioksidan (Ic₅₀), β₀, β₁, β₁₁,..., β₂₃ = koefisien regresi, X₁ = variabel bebas faktor rasio etil asetat dan etanol, X₂ = variabel bebas rasio sampel dengan pelarut, X₃ = lama ekstraksi, ε = komponen galat.

Data yang diperoleh dianalisis menggunakan *software Design expert* versi 7. Model persamaan diuji dengan analisa varian (ANOVA) dengan α = 0,05. *Response Surface Method* (RSM) dilakukan untuk mengetahui pengaruh faktor-faktor rasio pelarut etil asetat dengan etanol, rasio sampel dengan pelarut dan lama ekstraksi terhadap respon aktivitas antioksidan (IC₅₀). Kondisi proses dan variabel yang paling berpengaruh ditampilkan dalam bentuk grafik 3 dimensi dan permukaan kontur (*contour plot*).

Tabel 1: Kondisi proses produksi antioksidan dari gambir

Faktor	Satuan	Kode	Nilai level				
			- 2	-1	0	1	2
Rasio etil asetat	Liter	X1	0,2	0,4	0,6	0,8	1
Rasio pelarut	kg/liter	X2	1	2	3	4	5
Lama ekstraksi	Jam	X3	8	12	16	20	24

Analisis aktivitas antioksidan sampel dilakukan dengan menggunakan DPPH sebagai sumber radikal bebas pada berbagai konsentrasi larutan ekstrak dalam selang 10-200 mg/ml untuk mendapatkan nilai IC₅₀ dari larutan yang diuji. DPPH merupakan sumber radikal bebas yang ditangkap hidrogen dari katekin sebagai antioksidan hasil ekstrak, sehingga DPPH

(1,1-diphenyl-2-pikrilhidrazil) berubah dari ungu kekuning. Sebagai pembanding digunakan asam askorbat (vitamin C) sebagai standar untuk mengetahui apakah larutan yang diuji memiliki aktivitas yang sama, lebih rendah atau lebih tinggi dari standar. Suatu ekstrak dikategorikan aktif sebagai antioksidan jika nilai IC₅₀ kurang dari 100 mg/ml (Blois, 1958).

Pengurangan radikal bebas DPPH ditentukan dengan mengukur absorbansi pada panjang gelombang (λ) 517 nm menggunakan spektrofotometer UV-Visible. Nilai IC_{50} yang diwakili oleh nilai persentase inhibisi dihitung dengan rumus seperti persamaan 2.

Persen inhibisi = $\frac{Abs._{DPPH} - Abs._{ekst}}{Abs._{DPPH}} \times 100\%$ (2)

Dengan menggunakan nilai konsentrasi ekstrak sebagai absis (x) dan persen inhibisi sebagai ordinat (y) maka dengan metode LR (*linear regression*) diperoleh persamaan garis. Nilai IC_{50} ditentukan berdasarkan konsentrasi larutan ekstrak saat persen inhibisi 50% (Brand *et al*, 1995).

HASIL DAN PEMBAHASAN

Respon Aktivitas Antioksidan Hasil Optimasi dengan RSM

Proses untuk mendapatkan senyawa fenolik katekin dari gambir dilakukan secara ekstraksi padat cair. Pada proses ekstraksi, interaksi antara zat terlarut dari suatu padatan dengan pelarut sangat berpengaruh terhadap hasil ekstrak. Ekstraksi padat cair merupakan proses perpindahan terlarut (solute) dari padatan ke pelarut sehingga ukuran partikel, perbandingan sampel padatan dengan pelarut dan jenis pelarut sangat berpengaruh terhadap hasil ekstrak (Earle,1983).

Pengaruh variabel proses pada ekstraksi gambir terhadap respon aktivitas antioksidan (IC_{50}) sebagai antiradikal DPPH, kombinasi perlakuan rasio pelarut etil asetat dengan etanol, rasio sampel dengan pelarut dan lama ekstraksi, aktivitas antioksidan tertinggi diperoleh pada Run 1 (IC_{50} = 69,671) dan terendah pada Run 8 (IC_{50} = 178,293) (Tabel 2). Berdasarkan klasifikasi Blois (1958), semakin rendah nilai IC_{50} semakin tinggi aktivitas antioksidan hasil ekstrak. Respon aktivitas antioksidan (IC_{50}) menunjukkan senyawa fenolik dari gambir dapat larut baik pada pelarut dengan tingkat kepolaran antara pelarut etanol yang polar (1,69D) dan etil asetat yang semi polar (1,78D) (Sadovoy *et al*, 2011; Gani *et al*, 2013).

Tabel 2. Respons aktivitas antioksidan (IC_{50}) hasil perlakuan pada ekstraksi gambir

Run	Variabel			Aktivitas antioksidan (IC_{50}) (mg/ml)
	X1	X2	X2	
1	4:6	2	12	69,671
2	4:6	2	20	81,925
3	4:6	4	12	95,630
4	4:6	4	20	106,26
5	8:2	2	12	73,915
6	8:2	2	20	72,438
7	8:2	4	12	128,750
8	8:2	4	20	178,293
9	6:4	3	16	136,463
10	6:4	3	16	136,340
11	6:4	3	16	136,295
12	6:4	3	16	136,403
13	6:4	3	16	136,438
14	6:4	3	16	136,312
15	2:8	3	16	74,903
16	10:0	3	16	159,115
17	6:4	1	16	70,718
18	6:4	5	16	146,223
19	6:4	3	8	119,350
20	6:4	3	24	153,533

Menurut Sadovoy *et al*. (2011), besarnya kandungan fenolik yang diperoleh dari hasil ekstraksi tergantung dari kesesuaian nilai polaritas atau momen dipol dari senyawa fenolik yang akan diekstrak dengan pelarut yang digunakan. Bila nilai polaritas atau momen dipol dari suatu pelarut semakin mendekati nilai polaritas dari senyawa fenolik yang diekstrak, maka pelarut tersebut akan lebih efektif dalam mengekstrak senyawa tersebut.

Pemilihan Model yang Sesuai

Metode permukaan respons (RSM) digunakan untuk menentukan model yang sesuai untuk memprediksi respons aktivitas antioksidan terhadap rasio pelarut etil asetat dengan etanol, rasio sampel dengan pelarut dan lama ekstraksi gambir. Respons dengan kondisi proses terbaik ditentukan dengan

nilai IC₅₀ terendah yang menunjukkan aktivitas antioksidan paling tinggi (Blois, 1958). Model yang dievaluasi mencakup linear, 2FI (interaksi), kuadratik atau kubik. Pemilihan model berdasarkan *sequential model sum of squares* (Tabel 3), menunjukkan model yang signifikan ($p < 0,05$) adalah kuadratik dan disarankan program. Untuk mengetahui kesesuaian model pada metode permukaan respons adalah dengan melihat nilai *p-value* yang dihasilkan (Sun *et al*, 2011).

Perhitungan ketidaktepatan model (*lack of fit test*) adalah jika *p-value* ($0,0563 > 0,05$) (Tabel 5), menunjukkan model yang digunakan sudah baik atau model mampu menjelaskan respon. Menurut Bas dan Boyaci (2007), model dianggap tepat apabila *lack of fit test* dari model bersifat tidak signifikan ($p > 0,05$), sehingga model yang disarankan adalah kuadratik.

Proses pemilihan model berikutnya berdasarkan ringkasan model secara statistik (*model summary statistics*) (Tabel

4). Parameter yang digunakan untuk memilih model yang tepat adalah standar deviasi terendah, koefisien determinan (R^2) dan *adj. R²* paling besar dan nilai *press* terendah. Diantara model yang memenuhi kriteria dan disarankan program adalah model linear atau kuadratik.

Dari ketiga proses pemilihan model tersebut, model yang paling tepat dalam penentuan kondisi proses ekstraksi terbaik untuk mendapatkan aktivitas antioksidan (IC₅₀) dari gambir adalah kuadratik. Hasil analisis ragam (Tabel 5) menunjukkan bahwa model signifikan, dimana *p-value* yaitu $0,0074 < 0,05$ (model kuadratik) dan variabel berpengaruh terhadap respon aktivitas antioksidan (IC₅₀) adalah rasio sampel dalam pelarut, lama ekstraksi, dan rasio sampel (kuadrat). Semakin besar perbandingan antara sampel dengan pelarut, dan semakin lama waktu ekstraksi, aktivitas antioksidan yang dihasilkan semakin rendah.

Tabel 3. Uraian jumlah kuadrat dari urutan model (*sequential model sum of squares*) untuk respon aktivitas antioksidan (IC₅₀) dari ekstrak gambir

Sumber	Jumlah kuadrat	db	Kuadrat tengah	Nilai F	Prob > F	Keterangan
Rata-rata	285088.4	1	285088.4			
Linear	10545.39	3	3515.132	6.2158	0.0053	Disarankan
2FI (interaksi)	1907.672	3	635.8906	1.1576	0.3632	
Kuadratik	3783.715	3	1261.238	3.7572	0.0484	Disarankan
Kubik	677.0861	4	169.2715	0.3791	0.8166	
Residu	2679.757	6	446.6262			

Tabel 4. Ringkasan statistik model (*model summary statistics*) respon aktivitas antioksidan (IC₅₀)

Sumber Keragaman	Standar Deviasi	R ²	adj R ²	Pred. R ²	Press	Keterangan
Linear	23,78	0,5482	0,4516	0,2299	15088,5	disarankan
2FI (interaksi)	23,44	0,6356	0,4673	-0,5854	31064,9	
Kuadratik	18,32	0,8288	0,6744	-0,1401	22339,6	disarankan
Kubik	21,13	0,8632	0,5669	-227,6544	463475	

Tabel 5. Analisis ragam antioksidan hasil ekstraksi gambir

Sumber	Jumlah kuadrat	db	Kuadrat tengah	Nilai F	p-value Prob > F
Model	16236.78	9	1804.09	5.37	< 0.0074
A-Rpelarut	366.69	1	366.69	1.09	0.3206
B-Rsampel	8364.45	1	8364.45	24.92	< 0.0005
C-Lamaeks.	1814.25	1	1814.25	5.40	< 0.0424
AB	305.00	1	305.00	0.91	0.3630
AC	79.27	1	79.27	0.24	0.6375
BC	1523.41	1	1523.41	4.54	0.0590
A2	425.08	1	425.08	1.27	0.2867
B2	3374.36	1	3374.36	10.05	< 0.0100
C2	421.35	1	421.35	1.26	0.2887
Residual	3356.84	10	335.68		
Lack of Fit	2772.58	5	554.52	4.75	> 0.0563
Galat	584.26	5	116.85		

Permukaan Respon dan Kondisi Proses Ekstraksi Gambir

Persamaan kuadratik dalam metode permukaan respon dapat digunakan untuk memprediksi respon aktivitas antioksidan terhadap variabel rasio pelarut, rasio sampel dan lama ekstraksi. Persamaan kuadratik yang menghubungkan antara respons dan variabel adalah sebagai berikut: $Y = 37,25 + 5,18 (R \text{ pelarut}) + 24,75 (R \text{ sampel}) + 11,53 (Lama \text{ eks}) + 6,17 (R \text{ pelarut} \times \text{sampel}) + 3,14 (R \text{ pelarut} \times \text{lama eks}) + 13,79 (R \text{ sampel} \times \text{lama eks}) - 5,44 (R \text{ pelarut}^2) - 15,33 (R \text{ sampel}^2) - 5,42 (Lama \text{ eks}^2)$.

Hasil persamaan yang didapat menunjukkan, semakin tinggi rasio pelarut dan semakin lama ekstraksi sampel, semakin tinggi antioksidan yang dihasilkan. Interaksi antara masing-masing variabel yang semakin besar akan menghasilkan antioksidan yang semakin tinggi, tetapi pengaruh rasio pelarut, rasio sampel dan lama ekstraksi kuadrat menyebabkan semakin rendah aktivitas antioksidannya. Hasil optimasi ditunjukkan oleh grafik 3 dimensi dan kontur permukaan yang merupakan grafik hubungan dari masing-masing faktor terhadap aktivitas antioksidan (IC_{50}).

Penelitian ini menentukan tiga faktor berpengaruh dalam proses ekstraksi gambir untuk mendapatkan aktivitas antioksidan yang tinggi, maka terdapat 3 grafik permukaan respon dan kontur plot yaitu

rasio pelarut dengan rasio sampel (Gambar 1), rasio pelarut dengan lama ekstraksi (Gambar 2) dan rasio sampel dengan lama ekstraksi (Gambar 3).

Pengaruh rasio pelarut etil asetat dengan etanol dan rasio sampel dengan pelarut menunjukkan respon aktivitas antioksidan yang semakin tinggi (nilai IC_{50} semakin rendah) ketika rasio etil asetat dengan etanol semakin kecil dan jumlah pelarut dalam sampel semakin sedikit (rasio sampel besar). Hal ini dapat disebabkan pada rasio sampel besar, konsentrasi larutan sudah mendekati titik equilibrium, senyawa fenolik yang terdapat dalam permukaan gambir menjadi sulit dapat terekstrak lagi dan ketika rasio sampel dan pelarut kecil, waktu yang dibutuhkan untuk mencapai titik equilibrium lebih lama dan konsentrasi fenolik dalam cairan menjadi sangat encer sehingga antioksidan yang dihasilkan semakin rendah. Aktivitas antioksidan (IC_{50}) yang semakin rendah ditunjukkan oleh warna kontur plot yang semakin terang.

Gambar 1. Respon permukaan dan plot kontur dari aktivitas antioksidan, faktor rasio pelarut dan rasio sampel.

Grafik hubungan rasio pelarut dengan lama ekstraksi (Gambar 2), menunjukkan rasio pelarut etil asetat dengan etanol yang semakin kecil dan waktu ekstraksi yang semakin pendek menghasilkan aktivitas antioksidan yang semakin tinggi (nilai IC_{50} semakin rendah). Waktu ekstraksi yang semakin lama, menyebabkan senyawa fenolik mengalami perpindahan massa dari padatan menuju cairan semakin sedikit. Hal ini menyebabkan konsentrasi fenolik di permukaan gambir menurun sedangkan konsentrasi fenolik di cairan meningkat, sehingga kecepatan fenolik yang terekstrak lebih rendah dibandingkan pada saat awal

ekstraksi. Grafik kontur plot menunjukkan warna yang semakin gelap ketika aktivitas antioksidan semakin tinggi.

Gambar 2. Respon permukaan dan plot kontur dari aktivitas antioksidan, faktor rasio pelarut dan lama ekstraksi.

Hubungan rasio sampel dengan lama ekstraksi (Gambar 3), menggambarkan warna yang semakin terang pada kontur plot, ketika semakin kecil jumlah pelarut dalam sampel (rasio sampel dengan pelarut besar) dan semakin pendek waktu ekstraksi, menghasilkan respon aktivitas antioksidan yang semakin tinggi (nilai IC_{50} semakin rendah).

Gambar 3. Respon permukaan dan plot kontur dari aktivitas antioksidan, faktor lama ekstraksi dan rasio sampel.

Penentuan Nilai Optimum untuk Aktivitas Antioksidan (IC_{50}) dengan Metode Permukaan Respon (RSM)

Nilai optimum hasil analisis menggunakan RSM, untuk faktor rasio pelarut, rasio sampel dan lama ekstraksi ditentukan dengan nilai range -1 sampai 1. Hasil prediksi persamaan yang didapat dan menggunakan kriteria aktivitas antioksidan menurut Blois (1958), dimana nilai IC_{50} 50-100 mg/ml tergolong antioksidan kuat, diperoleh nilai optimum respon aktivitas antioksidan (IC_{50}) sebesar 82,89 mg/ml pada nilai level rasio pelarut -0.92, rasio sampel -1, dan lama ekstraksi 1 dengan ketepatan pendugaan (*desirability*) sebesar 56,40%, seperti terlihat pada Tabel 5.

Validasi kondisi proses terbaik ekstraksi gambir untuk mendapatkan aktivitas antioksidan yang tinggi dilakukan berdasarkan prediksi titik optimum pada Tabel 6. Tujuan validasi adalah untuk mengetahui ketepatan prediksi terhadap model persamaan kuadratik yang diperoleh. Hasil validasi menunjukkan bahwa terdapat hubungan ketepatan pendugaan (*desirability*) antara nilai prediksi dengan nilai validasi. Semakin besar nilai ketepatan pendugaan (0.5640) semakin rendah tingkat kesalahan data yang dihasilkan. Respon pada kondisi ekstraksi rasio pelarut etil asetat (0,37 liter) dengan etanol (0,55 liter) (-0,92), rasio sampel dengan pelarut 1:2 (-1) dan lama ekstraksi 20 jam menghasilkan nilai aktivitas antioksidan ($IC_{50} = 82,735 \pm 0,362$ mg/ml) yang hampir sama dengan hasil prediksi ($IC_{50} = 82.8940$ mg/ml). Hal ini menunjukkan model persamaan kuadratik yang diperoleh dapat digunakan untuk memprediksi respon.

Tabel 6. Titik optimum hasil prediksi aktivitas antioksidan ekstrak gambir menggunakan kriteria aktivitas antioksidan (IC_{50}) 50-100 mg/ml dan eksperimen validasi

Rasio Pelarut	Rasio Sampel	Lama Ekstraksi	Pendugaan Antioksidan (IC_{50}) (mg/ml)	Desirability	Eksperimen validasi
-0.92	-1	1	82.8940	0.5640	82,735 ± 0,362
-1	-0.96	1	84.2766	0.5184	84,195 ± 1,117
1	-0,96	-0.87	85.8951	0.4650	85,915 ± 2, 118
1	-1	-0.76	86.9162	0.4313	86,121 ± 2, 246
1	-1	-0.75	86.9901	0.4289	86,591 ± 3,249

Karakteristik Produk Hasil Ekstraksi

Aktivitas antioksidan hasil ekstrak *Uncaria gambir* berhubungan dengan kandungan senyawa fenoliknya seperti tanin, katekin dan quersetin. Produk hasil ekstraksi dengan aktivitas antioksidan (IC_{50}) yang berbeda, secara visual juga menunjukkan warna yang berbeda. Warna produk yang dihasilkan yaitu coklat muda sampai kekuningan (Run 1, 7, 15, 16) (Gambar 4). Warna yang berbeda dipengaruhi oleh konsentrasi pelarut etil asetat dengan etanol dan lama ekstraksi. Semakin tinggi konsentrasi etanol dalam campuran dan semakin lama waktu ekstraksi, warna produk semakin gelap. Hal ini disebabkan pelarut etanol selain melarutkan senyawa katekin juga melarutkan senyawa fenolik lainnya seperti tanin dan quersetin yang merupakan zat warna pada ekstrak gambir. Kandungannya dalam ekstrak tergantung pada kondisi ekstraksi yang dilakukan (Hayani, 2003; Mukhtar *et al*, 2010).

Gambar 4. Produk hasil ekstraksi gambir dengan perbandingan pelarut etil asetat : etanol Run 1 (4:6), Run 15 (2:8), Run 7 (8:2), Run 16 (10:0).

Pelarut etanol dapat digolongkan sebagai senyawa polar dan juga senyawa non-polar. Gugus hidroksil (-OH) yang dimiliki oleh etanol adalah gugus yang sangat polar karena elektronegatif dari oksigen tinggi yang memungkinkan ikatan hidrogen bertukar tempat dengan molekul lain, sehingga etanol dapat melarutkan senyawa polar. Di sisi lain gugus etil (C_2H_5) yang dimiliki oleh etanol merupakan senyawa non-polar, sehingga etanol juga dapat melarutkan senyawa non-polar (Schiller, 2010). Penggunaan rasio pelarut dengan konsentrasi etil asetat tertinggi (tanpa etanol) (Run 16) menghasilkan produk berwarna kekuningan dan lebih stabil terhadap perubahan warna dalam penyimpanan.

KESIMPULAN

Optimasi proses untuk menghasilkan senyawa fenolik katekin dengan aktivitas antioksidan yang tinggi dari gambir menunjukkan bahwa rasio pelarut dengan sampel gambir dan lama ekstraksi berpengaruh terhadap respons aktivitas antioksidan (IC_{50}). Respons yang diperoleh bersifat kuadratik dengan persamaan polinomial yang diperoleh adalah: $Y = 137,25 + 5,18 (R \text{ pelarut}) + 24,75 (R \text{ sampel}) + 11,53 (Lama \text{ eks}) + 6,17 (R \text{ pelarut} \times \text{sampel}) + 3,14 (R \text{ pelarut} \times \text{lama eks}) + 13,79 (R \text{ sampel} \times \text{lama eks}) - 5,44 (R \text{ pelarut}^2) - 15,33 (R \text{ sampel}^2) - 5,42 (Lama \text{ eks}^2)$. Hasil validasi pada titik optimum rasio pelarut etil asetat dengan etanol (0,37 : 0,55), rasio sampel dengan pelarut 1:2, dan lama ekstraksi 20 jam menghasilkan respon aktivitas antioksidan (IC_{50}) $82,735 \pm 0,362$ mg/ml dengan nilai yang tidak berbeda secara signifikan dengan nilai hasil prediksi (82.89 mg/ml).

Karakteristik produk hasil ekstraksi, secara visual menghasilkan warna yang lebih gelap pada saat konsentrasi etanol lebih tinggi dalam larutan campuran.

Saran

Untuk mendapatkan senyawa fenolik katekin dengan aktivitas antioksidan tinggi, rasio pelarut, rasio sampel dengan pelarut dan lama ekstraksi dapat menjadi pertimbangan untuk dipilih sesuai kebutuhan aplikasi produk.

UCAPAN TERIMA KASIH

Seluruh anggota tim peneliti mengucapkan terima kasih kepada Kementerian Riset dan Teknologi Indonesia untuk bantuan keuangan melalui Insentif SINas Penelitian Tahun Anggaran 2013.

DAFTAR PUSTAKA

- Anggraini, T., Tai, T., Yoshino, T and Itani, T. 2011. Antioxidative activity and catechin content of four kinds of *Uncaria gambir* extracts from West Sumatra, Indonesia. *African Journal of Biochemistry Research*. Vol. 5 (1): 33-38.

- Apea-Bah, F.B., Hanafi, M., Dewi, R.T., Fajriah, S., Darwaman, A., Artanti, N., Lotulung, P., Ngadymang, P., Minarti, B. 2009. Assessment of the DPPH and alpha-glucosidase inhibitory potential of gambier and qualitative identification of major bioactive compound. *Journal of medicinal plants research*. 3(10): 736-757.
- Bakhtiar, A. 2004. Peningkatan nilai tambah gambir melalui diversifikasi produk. *Prosiding Seminar Nasional, Tanaman Obat Indonesia XXVI*. 7-8 September 2004.
- Bas, D., dan Boyaci, I.S., 2007. Modeling and optimization I: Usability of response surface methodology. *Journal of Food Engineering*. 78: 836-845.
- Blois, M.S. 1958. Antioxidant determinations by the use of a stable free radical. *Nature*. 181: 1199-1200.
- Box, G.E.P and Draper, N.R. 1987. Empirical model-building and respon surfaces. New York : John wiley & Sons, Inc.
- Brand, W., Cuvelier, ME and Berset, C. 1995. Use of free radical method to evaluate antioxidant activity. *Lebensm-Wiss.u-Technol*. 28: 25-30.
- Earle, R.L. 1983, Unit operation in food processing. 2nd ed., Pergamon Press. Oxford.
- Gani, M., Cuaca, Y., Ayucitra, A. dan Indraswati, N. 2013. Ekstraksi senyawa fenolik antioksidan dari daun dan tangkai gambir. *Jurnal Teknik Kimia Indonesia*. Vol. 11, No.5: 250-256.
- Harborne. J.B. 1987. Metode fitokimia, terjemahan Ratmawinata, K dan Soediso, I. Bandung. ITB Press.
- Hayani, E. 2003, Analisis kadar katekin dari gambir dengan berbagai metode. *Buletin Teknik Pertanian*. 8(1): 31-33.
- Kirk, O. 1998. Encyclopedia of chemical technology 4th. Ed.10:88.
- Krishnaswamy, K., Orsat, V and Thangavel, K. 2012. Synthesis and characterization of nano-encapsulated catechin by molecular inclusion with beta-cyclodextrin. *Journal of Food Engineering*. 111:255-264.
- Kurnia, P., Rauf, R. 2011. Optimasi ekstraksi terhadap kadar fenolik dan aktivitas penangkapan radikal DPPH ekstrak gambir (*Uncaria gambir* Roxb.). *Seminar Nasional: Membangun Daya Saing Produk Pangan Berbasis Bahan Baku Lokal*. Surakarta 8 Juni 2011. Hal. 17-24.
- Muchtar, H., Yeni, G., Hermianti, W., Diza, Y.H. 2010. Pembuatan konsentrat polifenol gambir (*Uncaria gambir* Roxb) sebagai antioksidan pangan. *Jurnal Riset Industri*. Vol. IV, No.2:71-82.
- Montgomery, D.C. 2001. Design and anaysis of experiment 5^{ed}. Wiley. United States of America.
- Nazir, N., 2006. Pengaruh jenis pelarut dalam isolasi catechin murni dari gambir. *Jurnal Pertanian STIGMA*. Vol. XII. No.2: 34-39.
- Nazir, N., Ferdinal, N., Sulistyo, J. 2009. Bioproses enzimatik flavonoid-glikosida dari ekstrak gambir (*Uncaria Gambir* Roxb.) dan uji aktivitasnya sebagai antioksidan dan antimikroba. Laporan penelitian hibah bersaing. Universitas Andalas. Padang.
- Pambayun, R., Gardjito, M., Sudarmadji, S., dan Kuswanto, K.R. 2007. Kandungan fenol dan sifat antibakteri dari berbagai jenis ekstrak produk gambir (*Uncaria gambir* Roxb). *Majalah Farmasi Indonesia*. 18:141-146.
- Pinelo, M., Fabbro, P.Del., Manzocco, Lara., Nicoli, M.J.N., Cristina, M. 2005. Optimization of continuous phenol

- p>extraction from
- Vitis vinifera*
- by products.
- Food Chemistry*
- . 92: 109–117.
- Rauf, R., Santoso, U., Suparmo. 2010. Aktivitas penangkapan radikal DPPH ekstrak gambir (*Uncaria gambir* Roxb.). *Agritech*. Vol. 30, No. 1: 1-11.
- Sadovoy, V., Silantyev, A., Selimov, M., Shchedrina, T. 2011. An examination of chemical composition and molecular properties of grape berry skin flavonoids. *Food and Nutrition Sciences*. 2: 1121-1127.
- Schiller, M. 2010. Ethanol as a Solvent. <http://www.easychem.com.au/product-ion-ofmaterials/renewable-ethanol/ethanol-as-a-solvent> (Akses 2 Maret 2014).
- Sun, J., Guoyuo, Y., Peng, D., Lanying, C, 2011. Optimization of extraction technique of polysaccharides from pumpkin by response surface method. *Journal of Medicinal Plants Research*. 5 (11): 2218–2222.
- Taniguchi, S., Kuroda K., Doi, K., Inada, K., Yoshikado, N., Yoneda, Y., Tanabe, M., Shibata, T., Yoshida, T., and Hatano, T. 2007. Evaluation of gambir quality based on quantitative analysis of polyphenolic component. *Yakugaku Zasshi*. 127(8):1291-1300.
- Wanasundara, U.N dan F., Shahidi. 1999. Concentration of omega-3 polyunsaturated fatty acids of seal bubbler oil by urea complexation: optimization of reactions conditions. *Food Chemistry* 65: 41-49
- Widiyarti, G.; Sundowo, A.; Ngadiman; Hanafi, M.; Effendi, R.; Darmawan, A.; Lotulung, P. D. 2009. Ekstraksi dan identifikasi senyawa katekin dari gambir. *Ekstrak*. 4(3): 85-90.
- Widiyarti, G., Sundowo, A. And Hanafi, M. 2011. The free radical scavenging and anti-hyperglycemic activities of various gambiers available in Indonesian market. *Makara, Sains*. Vol. 15, No. 2: 129-134.
- Yeni, G., Sa'id, E.G., Syamsu, K., Mardiyati, E., Muchtar, H., Aviana, T., Fadilah, A., Sumarno, D.Z., Bushanovti, K. 2013. Pengembangan nanoenkapsulasi katekin dari gambir sebagai antioksidan untuk bahan baku kosmetik dan farmasi. Laporan Insentif Riset SINas. Kementerian Riset dan Teknologi.