

AKTIVITAS ANTIOKSIDAN EKSTRAK BIJI DUWET (*Syzygium cumini* Linn.) PADA PEROKSIDASI LIPIDA SECARA IN VITRO

Antioxidant Activity of Duwet Seed (*Syzygium cumini* Linn.) Extract on Lipid Peroxidation Models in Vitro

Rohadi¹, Sri Raharjo², lip Izul Falah³, Umar Santoso²

¹Fakultas Teknologi Pertanian, Universitas Semarang (USM), Jl. Arteri Soekarno-Hatta Semarang 50196

²Fakultas Teknologi Pertanian, Universitas Gadjah Mada, Jl. Flora No. 1, Bulaksumur, Yogyakarta 55281

³Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam, Universitas Gadjah Mada,

Jl. Sekip Utara Kotak Pos 21, Bulaksumur, Yogyakarta 55281

Email: umar_santoso@yahoo.com

ABSTRAK

Tanaman duwet (*Syzygium cumini* Linn.) pada semua kompartemennya dimanfaatkan masyarakat untuk pengobatan suatu penyakit. Ekstrak bijinya dimanfaatkan untuk penurunan gula darah. Bijinya merupakan bagian tanaman yang kaya senyawa polifenol. Fraksi kaya senyawa fenolik dipreparasi dengan mengekstraksi biji duwet varietas “Genthong”, dengan tiga jenis ekstraktan; etil acetat 85%, metanol 50% dan etanol 50%. Ekstrak biji duwet (EBD) yang diperoleh dianalisis kelompok senyawa fenolik dan aktivitas antioksidan menggunakan metode uji penangkapan radikal DPPH (2,2-diphenil 1-picrylhydrazyl), uji reduksi ion Feri (*ferric reduction antioxidant power*-FRAP) dan uji penghambatan peroksidasi asam lemak linoleat. Tujuan penelitian adalah memilih satu dari tiga ekstraktan yang menghasilkan ekstrak, dengan *yield* dan kadar senyawa polifenolik terbesar serta sifat antioksidatif terkuat. *Yield* dengan ekstraktan Met-OH-50%, sebesar 16,29% (db), senyawa fenoliknya sebesar 45,99 ±0,25 g-GAE/100 g-EBD; 2,28±0,07 g-QE/100 g-EBD dan 26,9±0,07 g-TAE/100 g-EBD. Ketiga ekstrak kuat dalam uji penangkapan radikal DPPH antara 87-95 % (100µg-mL⁻¹) dan uji reduksi ion Feri (Fe³⁺), moderat pada uji penghambatan peroksidasi lipid, 49-52 % pada 400 µg-mL⁻¹.

Kata kunci: Biji duwet (*Syzygium cumini* Linn.), antioksidan, ekstraksi

ABSTRACT

All parts of *Syzygium cumini* Linn. (duwet) were widely used for medicinal plant in the treatment of various diseases. The seed extract was used to lower blood glucose. Cumini's seed had higher phenolic fractions than others. It were prepared by extracted of duwet seed “Genthong” varieties, using various extractants such as 85% ethyl acetate, 50% methanol and 50% ethanol. Duwet seed extract collected then was determined of phenolics compound and antioxidant activity assayed by measuring 2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl radical (DPPH) scavenging activity, reducing Ferric ion (Fe³⁺) power and inhibition of linoleic acid oxidation. The objective was to select one of the extractant which gave highest yield and polyphenolic content and its stronger antioxidant activity. Extractant 50% methanol gave highest the extract yields was 16.29 % (db.) and phenolics compounds of extract was composed: total phenolic 45.99±0.25 g-GAE/100 g-extract; total flavonoid 2.28±0.07 g-QE/100 g-extract and total tannin 26.9±0.07 g-TAE/100 g-extract. All of extract exhibited strong on behalf of RSA-DPPH assay 87-95% (100 µg-mL⁻¹) and reducing power, nevertheless in inhibition of linoleic acid oxidation was moderate 49-55% (400 µg-mL⁻¹).

Keywords: *Syzygium cumini* Linn, seed, antioxidant, extraction

PENDAHULUAN

Oksidasi merupakan penyebab utama kerusakan lipid dan pangan berminyak. Oksidasi lipid berlangsung dalam tiga mekanisme: (1) oksidasi spontan (*auto oxidation*) oleh

oksigen udara, (2) oksidasi yang diinisiasi cahaya (*photo-oxidation*), dan (3) oksidasi oleh panas (*thermal oxidation*). Lipid (trigliserida) dimungkinkan tersusun baik oleh asam lemak jenuh (*saturated fatty acids*) dan asam lemak tidak jenuh (*unsaturated fatty acids*) yang rentan rusak oleh

oksidasi, sehingga dihasilkan flavor menyimpang (*off-flavor*) selama proses pengolahan dan penyimpanan. Asam lemak jenuh adalah materi yang kekurangan elektron pada atom oksigen (O_2) pada sisi ikatan karbonil ($C=O$), sementara asam lemak tidak jenuh, kekurangan elektron pada sisi ikatan rangkapnya ($C=C$). Kondisi ini menyebabkan asam lemak rentan atas serangan elektron dari radikal bebas melalui peristiwa oksidasi (Brewer, 2011). Pada sisi lain atom karbon (C) dari asam lemak tidak jenuh yang berada diantara dua ikatan rangkap (*allelic*) berpotensi mengabstraksi atom H° hingga terbentuk radikal alkil diena terkonjugasi (R°), yang selanjutnya R° teroksidasi menjadi peroksil radikal (ROO°) dan hidroperoksida ($ROOH$) dalam fase propagasi. Oksidasi bersifat termodinamika dan dipicu oleh senyawa radikal (Shahidi dan Zhong, 2005; Brewer, 2011).

Penambahan antioksidan sintetis pada lipid dan pangan berminyak adalah metode yang umum dan efektif untuk penghambatan kerusakan oksidatif. Namun demikian, penambahan antioksidan sintetis seperti *butylated hydroxyanisole* (BHA), *butylated hydroxytoluene* (BHT), *propyl gallate* (PG), dan *tert-butylhydroquinone* (TBHQ) pada pangan belum sepenuhnya diterima konsumen, karena bersifat toksik dan karsinogenik (Madavi dan Salunke, 1995; Buxiang dan Fukuhara, 1997; Baydar dkk., 2007; Vayuphar dan Laksanalamai, 2012). Antioksidan alami diyakini sebagai antioksidan alternatif yang aman.

Tanaman duwet (*Syzygium cumini* Linn.) nama lainnya *Syzygium jambolanum* Lam., atau *Eugenia cumini* Druce, pada semua kompartemennya dimanfaatkan masyarakat untuk pengobatan tradisional (Sultana dkk., 2007; Ayyanar dan Babu, 2012; Ahsan dkk., 2012). Biji duwet merupakan limbah, berpotensi sebagai antioksidan alami pada pangan sebab kaya senyawa polifenolik (Vasi dan Austin, 2009; Peixoto dan Freitas, 2012; Saha dkk., 2013; Rydlewski dkk., 2013). Senyawa polifenolik menunjukkan kemampuan antioksidatifnya melalui tiga mekanisme: (1) *scavenging radical species*, (2) penghambatan enzimatis atau pengkelat logam yang terlibat pada pembentukan radikal bebas serta (3) perlindungan atas oksidan (Dai dan Mumper, 2010).

Rydleski dkk. (2013) menyatakan biji duwet sumber senyawa fenolik. Ekstrak metanoliknya mengandung senyawa organik setara 411,02 mg-GAEq/liter, kulit buahnya setara 227,83 mg-GAE/liter, dan pada daging buah (*flash*) setara 225,56 mg-GAE/liter. Ditambahkan nilai penghambatan 50% radikal DPPH (IC_{50}) ekstrak biji duwet sebesar 15,47 μgml^{-1} . Vasi dan Austin (2009) menyebutkan *yield* ekstrak biji duwet (bebas etanol 50%) sebesar 12,96 %, dan mengandung senyawa fenolik 27,37 \pm 0,18 mg-GAE/g-ekstrak dan flavonoid 14,7 \pm 0,0,09 mg-QE/g-ekstrak, serta memiliki kapasitas antioksidan maksimal 98,92% (RSA-ABTS) dan 52,46% (RSA- NO°) pada konsentrasi 1000 μgml^{-1} , serta 94,43%

(uji FRAP) dan 53,47% (RSA-DPPH) pada konsentrasi 800 μgml^{-1} . Saha dkk. (2013) menyatakan fenolik total dalam sari buah, pulp dan biji duwet berturut-turut sebesar 6.900, 20.700 dan 21.000 mg-TAE/kg (pelarut metanol).

Di Indonesia berkembang tiga varietas duwet yakni “duwet genthong”, “kerikil” dan “duwet putih”. Varietas “duwet genthong”, lebih banyak tumbuh secara sporadis di Jawa Tengah dan buahnya dimanfaatkan sebagai buah meja. Musim panen duwet antara bulan Nopember hingga Desember, dengan produktivitas 50-80 kg. buah/musim-pohon.

Tujuan penelitian adalah memilih ekstrak yang sesuai dari tiga jenis: etil asetat 85% (v/v), etanol 50% (v/v) dan metanol 50% (v/v), dengan parameter: *yield*, kelompok senyawa fenolik (fenolik total, flavonoid total, dan tannin total) dan uji aktivitas antioksidan yang meliputi uji penangkapan radikal DPPH (*radical scavenging activity* 2,2-diphenyl 1-1-picrylhydrazyl), uji reduksi ion Ferik, Fe^{3+} (*ferric reduction antioxidant power*- FRAP) dan uji penghambatan peroksidasi asam lemak linoleat atas ekstrak yang diperoleh. Ketiga jenis ekstrak tersebut telah direkomendasikan oleh beberapa peneliti sebelumnya sebagai ekstrak yang efektif untuk ekstraksi senyawa polifenolik dari biji duwet (Vasi dan Austin, 2009) pada biji anggur (Vayuphar dan Laksanalamai, 2012).

METODE PENELITIAN

Bahan dan Alat Penelitian

Bahan penelitian berupa bubuk kering biji duwet (*Syzygium cumini* Linn.) varietas “Genthong”, kadar air ≤ 14 %, lolos ayakan ≥ 80 mesh, diperoleh dari penggilingan (*cutting mill*) bagian kernel. Diperoleh dari buah duwet segar dan masak optimal (warna ungu-kehitaman) yang dipetik dari tanaman duwet milik warga di Jl. Cempedak, Lamper Kidul, Kota Semarang, Jawa Tengah, yang sudah teridentifikasi secara taksonomi (*authenticating*) di Laboratorium Taksonomi Tanaman, Fakultas Biologi, Universitas Gadjah Mada (UGM), Yogyakarta.

Bahan kimia meliputi etanol, metanol, ethyl acetat. *Folin Ciocalteu reagent*, gallic acid (Sigma Chemical Co. St. Louis USA), asam askorbat, tannic acid (Sigma), quercetin (Waco Pure Chemical Industry-Osaka Japan), *butylated hydroxyanisole* –BHA (Sigma Chemical Co.), *aqueous* Na_2CO_3 , Tween-40, HCl, buffer fosfat pH 7, Ferrous Chlorida ($FeCl_2$), Ferric Chloride ($FeCl_3$), amonium thiocyanat, $K_3Fe(CN)_6$, trichloroacetic acid (TCA), tungsto-phosphoric acid, 2,2-diphenyl-1-picryl hydroxyl radical (DPPH), dan asam lemak linoleat. Semua bahan kimia yang dipakai berkategori analisis (*analytical grade*) dan teknis. Peralatan meliputi pengering tipe kabinet (*cabinet dryer*),

mesin penggiling (*cutting mill*), ayakan Tyler, *a rotary vacuum evaporator* (IKA-RV 10 basic), vortex, inkubator, *water-bath shaker* (Julabo SW 22), *UV-Visible spectrophotometer* (UV-1601 Shimadzu) dan HPLC.

Analisis Proksimat Daging Buah dan Tepung Biji Duwet (TBD)

Analisis daging buah dan tepung biji duwet (TBD) meliputi: analisis kadar air secara termogravimetri menurut (AOAC, 2005), protein menurut (AOAC, 2005), lemak (AOAC, 2005), serat kasar (AOAC, 2005), abu (AOAC, 2005), jenis gula (sukrosa, glukosa, galaktosadan fruktosa) dengan HPLC dan kandungan mineral: Ca, Cu, Fe, Mg, Na, K dan P dengan metode *Atomic Absorption Spectroscopy* –AAS (AOAC, 2005).

Ekstraksi Biji Duwet

TBD diekstrak dengan pelarut metanol/air, 50% (v/v), etanol/air 50%, (v/v), dan etil-asetat 85% (v/v) menurut (Vasi dan Austin, 2009). Sebanyak 25 gram TBD diekstraksi berulang (3x) dengan pelarut yang sama pada rasio bahan: pelarut (1:10) secara maserasi 6 jam, suhu ruang ($28 \pm 2^\circ\text{C}$) dengan *water-bath shaker* (Julabo SW 22, 100 rpm). Ekstrak dipisahkan dengan *a rotary vacuum evaporator*, hingga diperoleh cairan kental (*crude solid extract*) dan dikering bekukan dengan *freeze dryer* (Virtis SP Scientific Sentry 2.0) dilanjutkan dengan penyemprotan dengan gas nitrogen sampai diperoleh ekstrak biji duwet bebas pelarut (EBD). Selanjutnya EBD disimpan pada suhu beku (-20°C) untuk pemakaian berikutnya. Tiap eksperimen dilakukan tiga kali ulangan.

Analisis Senyawa dan Aktivitas Antioksidan

EBD ditera *yield* (%), senyawa fenolik dan flavonoid total menurut (Ebrahimzadeh dkk., 2008) dan peneraan tanin total menurut (Palici dkk., 2005). Pada EBD dilakukan pula uji aktivitas antioksidan metode *radical scavenging activity*-DPPH menurut Vasi dan Austin (2009), *ferric reducing power* (FRAP) menurut Vasi dan Austin (2009), *linoleic acid peroxidation* menurut (Jayaprakasha dkk., 2001). Data dianalisis secara statistik untuk dipilih ekstrak yang menghasilkan *yield*, kelompok senyawa fenolik terbesar dan aktivitas antioksidan terkuat untuk dilakukan fraksinasi dan identifikasi jenis senyawa fenoliknya dan aplikasi sebagai antioksidan alami pada minyak ikan patin (*Pangasius hypophthalmus*).

Penentuan Kadar Senyawa Fenolik

Kadar senyawa fenolik total EBD ditera secara spektrometri dengan metode pewarnaan *Folin-Ciocalteu*

Reagent (FCR) pada absorbansi $\lambda=765$ nm dengan *gallic acid* sebagai standarnya menurut (Ebrahimzadeh dkk., 2008), dan dinyatakan sebagai (g GAE/100 g.EBD). Kadar senyawa flavonoid total ditera secara spektrometri pada absorbansi $\lambda=415$ nm dengan *quercetine* sebagai standarnya menurut (Ebrahimzadeh dkk., 2008; Vasi dan Austin, 2009), dinyatakan dalam persen (g.QE/100g.EBD). Kadar senyawa tanin total ditera secara spektrometri pada absorbansi $\lambda=725$ nm dengan *tannic acid* sebagai standarnya menurut (Palici dkk., 2005) dinyatakan dalam persen (%) sebagai g. TAE/100 g. EBD.

Pengukuran Radical Scavenging Activity (RSA)-DPPH

Pengukuran *radical scavenging activity* (RSA)-DPPH EBD dikerjakan menurut prosedur Vasi dan Austin (2009). Secara ringkas sebanyak 0.5 mL EBD berbagai konsentrasi (10,25,50, 75,100, 150 dan 200 ppm) dalam etanol 50% + 0,5 mL 2,2-diphenyl-1-picryl hydroxyl radical (DPPH)-100 μM , diinkubasi di dalam ruang gelap pada suhu ruang ($37 \pm 2^\circ\text{C}$) selama 30 menit. *Scavenging activity* radikal DPPH diamati dengan membaca absorbansinya pada $\lambda=517$ nm UV-Vis spectrometer (UV-1601 Shimadzu). Eksperimen dilakukan dengan tiga kali ulangan. Vitamin C, BHA dan quercetin dipakai sebagai pembanding. Aktivitas penangkapan radikal bebas DPPH dapat dihitung dengan persamaan Vasi dan Austin (2009):

$$\text{RSA-DPPH (\%)} = 1 - \frac{[\text{Nilai } \Delta \text{ absorbansi sampel} / \text{Nilai } \Delta \text{ absorbansi kontrol}] \times 100}{\%} \quad (1)$$

Pengukuran Daya Reduksi Ion Feri (Fe^{+3})

Kemampuan mereduksi ion ferik, Fe^{+3} , *ferric reducing antioxidant power* (FRAP) dipakai sebagai indikator aktivitas transfer elektron senyawa fenolik Vasi dan Austin (2009). Ringkasnya sebanyak 2,5 ml EBD berbagai konsentrasi (50,100,200, 400,800 dan 1000 ppm) dalam etanol ditambah 2,5 mL buffer pospat 0,2 M, pH = 6,6 ditambahkan 2,5 mL $\text{K}_3\text{Fe}(\text{CN})_6$ sebesar 1%. Campuran tersebut diinkubasi pada suhu 50°C selama 20 menit, selanjutnya ditambahkan 2,5 mL trichloroacetic acid (TCA) 10% untuk menghentikan rekasi. Campuran selanjutnya dilakukan sentrifugasi (*vortex*) pada 3.000 rpm selama 10 menit. Dari campuran diambil 2,5 mL supernatan, ditambahkan padanya 2,5 mL aquades dan 0,5 mL feri klorida (FeCl_3) 0,1%. Kemampuan mereduksi sampel ditera dengan pengukuran absorbansi pada $\lambda=700$ nm. Peningkatan absorbansi sebagai indikator peningkatan ndaya mereduksi. Sebagai pembanding daya mereduksi sampel digunakan vitamin C.

Aktivitas Antioksidan dengan Metode Peroksidasi Asam Linoleat

Untuk mengetahui aktivitas penghambatan oksidasi dilakukan dengan metode peroksidasi asam lemak linoleat menurut Jayaprakasha dkk. (2001). Secara ringkas diawali dengan pembuatan emulsi asam lemak linoleat. Sebanyak 0,28 gram asam linoleat, 0,28 gram *Tween-40* dan 50 mL *buffer phosphate* (0,2 M-pH = 7,0) dicampur dan dihomogenisasi. Sebanyak 0,5 mL larutan EBD (Met-OH 60%) dalam berbagai konsentrasi (50-800 ppm), dicampur dengan 2,50 mL emulsi asam linoleat dan 2,5 mL *buffer phosphate* (0,2 M/pH = 7,0) dan diinkubasi pada suhu 37 °C, selama 120 jam (5 hari). Sampel kontrol disiapkan seperti diuraikan di atas, tanpa EBD. Sebanyak 0,1 mL (diambil dari cairan yang diinkubasi) pada interval 24 jam dicampur dengan 5 mL etanol 75%, 0,1 mL *ammonium thiocyanate* 30%, dan 0,1 mL larutan 20 mM *Ferrous Chloride* (FeCl₂) dalam 3,5% HCl. Campuran tersebut diinkubasi dalam suhu ruang selama 3 menit. Pada campuran akan terbentuk warna merah bata dan tera absorbansinya pada λ= 500 nm. BHA dan quercetin dipakai sebagai pembanding. Aktivitas antioksidan dapat dihitung dengan persamaan Jayaprakasha dkk. (2001):

$$\text{Aktivitas antioksidan} = 100 - \left[\frac{(\text{Perubahan nilai OD sampel})}{(\text{Perubahan nilai OD kontrol})} \right] \times 100 \quad (2)$$

Analisis Data

Data disajikan dalam format rata-rata ± SD. Analisis statistik menggunakan *one-way Anova* dengan tingkat signifikansi 95% dan bila ada perbedaan nyata antarperlakuan dilanjutkan dengan uji *Duncan's Multiple Range Test* (DMRT) dengan program statistik *SPSS 21 for Windows, SPSS Inc. Chicago, USA*. Analisis regresi diterapkan untuk melihat korelasi antar variabel.

HASIL DAN PEMBAHASAN

Sifat Fisikokimia Buah dan Biji Duwet

Identifikasi sifat fisik dan kimia buah dan biji duwet (*Syzygium cumini* Linn.) varietas “Genthong”, terlihat pada Tabel 1. Identifikasi sifat fisikokimia diperlukan untuk memberikan diskripsi duwet varietas “Genthong” lebih komprehensif. Adapun identifikasi sifat kimia biji duwet bertujuan untuk menyediakan data yang dimungkinkan korelatif dengan sifat antioksidatifnya.

Sifat fisikokimia buahnya sedikit berbeda dengan yang disampaikan (Baliga dkk., 2011; Swami dkk., 2012). Hal ini disebabkan perbedaan varietas duwet, usia petik dan lokasi tumbuhnya. Gula jenis fruktosa dan glukosa pada duwet “Genthong”, cukup dominan dan sebaliknya sedikit sukrosa

maupun galaktosa. Hal ini sesuai dengan yang dilaporkan Saha dkk. (2013) bahwa dua jenis gula fruktosa dan glukosa cukup dominan pada buah duwet. Jumlah vitamin C pada daging buahnya moderat, sementara mineral kalium (K), magnesium (Mg), dan besi (Fe) jumlahnya cukup besar terutama pada biji duwet.

Tabel 1. Sifat fisikokimia duwet varietas “Genthong”

Sifat fisik	Buah duwet	Referensi**	Biji duwet
Bentuk	Oblong	Bulat-Oblong	Oblong
Berat (g/buah)	8,06± 1,21	4,8-1,6	1,67 ± 0,31
Panjang (cm)	3,08 ± 0,17	2,22-4,51	2,18± 0,15
Lebar/φ (cm)	2,07 ± 0,11	1,66-3,04	1,03 ± 0,05
Warna (*L;a*;b*)	28,85; 2,44; -0,33	Ungu-Hitam	63,92; 2,67; 9,88
Sifat Kimia	Pulp	Pulp	TBD
Air (%)	87,87± 0,37	85,9 ±1,4	14,45 ±0,22
Protein, fk=6,25 (%)	1,3±0,24	1,4 ± 0,7	5,67±0,08
Lipid (%)	0,67 ± 0,08	0,6 ± 0,2	0,66±0,02
Abu (%)	0,30 ± 0,01	< 0,22 ±0,04	3,82± 0,04
Karbohidrat Total (%)	10,98 ± 0,15	16,6 ± 1,2	75,4±15
Serat Tidak Terlarut (%)	1,32 ± 0,15	0,6 ± 0,06	1,24±0,17
Sukrosa (ppm)	2.120	95.500	1.684,33
Fruktosa (ppm)	37.743	57.500	27.800
Galaktosa (ppm)	< 29,85	52.500	22.400
Glukosa (ppm)	33.394	20.000	761,06
Vitamin C (ppm)	845,1± 8,3	30 ± 6,9	*
Mg (ppm)	145,1±1,0	498 ± 12	2.161,5±16,6
Na (ppm)	33,2±6,9	35 ± 8	115,2± 2,45
Ca (ppm)	279,2±16,4	215 ± 15	86,6±0,9
K (ppm)	1.459,1±211	1.300 ± 80	8.812,8 ± 60,8
P (ppm)	731,3±99,7	185 ± 28	35,8 ± 4,8
Fe (ppm)	*	1,5±0,1	136,8±0,19
Cu (ppm)	*	0,7±0,2	5,0 ± 0,28

Keterangan: * = tidak dilakukan analisis/tidak ada data ** = Baliga, dkk. (2011)

Yield Ekstraksi Tepung Biji Duwet

Nilai *yield* ekstraksi TBD dengan tiga ekstrak masing-masing etil asetat 85% (EtO-Ac), metanol 50% (Met-OH) dan etanol 50% (Et-OH) berturut-turut adalah 3,53±0,72% (db), 16,29±0,50 dan 14,2±0,56% (*dry-basis*) ditunjukkan pada Tabel 2. Tampak bahwa pengaruh ekstrak atas rendemen yang diperoleh berbeda nyata (*P*<0.05), ekstrak metanol 50% dihasilkan rendemen tertinggi. Sifat polaritas ekstrak yang berbeda, berpengaruh atas pencapaian *yield*. Diketahui metanol 50% adalah ekstrak terpolar diantara ketiganya. Hasil serupa ditunjukkan oleh Sultana dkk. (2007) yang menggunakan pelarut metanol 80%, etanol 80% dan aseton 80% untuk mengesktrak senyawa fenolik dari kulit kayu duwet (*Syzygium cumini* Linn.), yang mana *yield* yang dihasilkan oleh metanol 80% tertinggi, yakni berturut-turut 14,1±0,56 %, 13,5±0,27 dan 3,60±0,11 %. Vasi dan Austin (2009) menyebutkan *yield* ekstrak biji duwet dengan pelarut etanol 50% sebesar 12,96%. Perbedaan nilai dengan hasil di atas dimungkinkan karena perbedaan varietas duwet yang digunakan.

Tabel 2. Karakteristik EBD yang dihasilkan tiga jenis pelarut

Ekstrak	Yield (%)	Fenolik total* (%)	Flavonoid total** (%)	Tanin total*** (%)	RSA-DPPH (%)	FRAP (OD)	Penghambatan oksidasi (%)
EtO-Ac85	3,53±0,72a	10,77±0,28a	0,33±0,002a	6,32±0,26a	87,85a	2,97a	52,75c
Et-OH50	14,2±0,56b	42,39±0,17b	2,28±0,06b	22,21±0,10b	90,59b	2,82a	52,25c
Met-OH50	16,29±0,5b	45,99±0,25c	2,28±0,07b	26,90±0,07c	91,90b	2,84a	49,17ab

Keterangan: * = Fenolik total (g-GAE/100 g-ekstrak)

** = Flavonoid total (g-QE/100g-ekstrak)

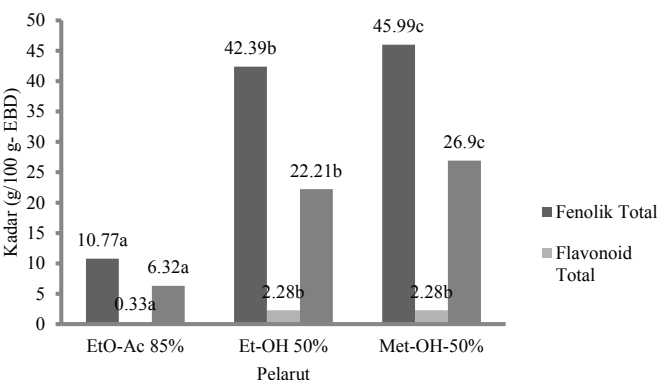
*** = Tanin total (g-TAE/100g-ekstrak)

RSA-DPPH (%) pada 100 ppm, FRAP (OD) pada 400 ppm dan penghambatan lipoksidasi asam linoleat (%) pada 400 ppm

Notasi huruf yang berbeda pada kolom yang sama menunjukkan adanya perbedaan nyata pada tingkat kepercayaan 95% (p<0,05)

Kadar Senyawa Polifenolik

Analisis kuantitatif komposisi senyawa polifenolik dari ekstrak biji duwet (EBD) yang diperoleh diekspresikan dengan tiga cara, yakni ekuivalensi asam galat (*gallic acid equivalen-GAE*) untuk fenolik total dengan kurva standar $y=7.144x - 0.034$, $r^2=0,986$, ekuivalensi kuersetin (*quercetin equivalen-QE*) untuk flavonoid total dengan kurva standar $y=1.364x + 0.006$, $r^2 = 0,996$ dan ekuivalensi asam tanat (*tannic acid equivalen-TAE*) untuk senyawa tanin total dengan kurva standar, $y=7.441x + 0.033$, $r^2 = 0,991$. Nilai ketiganya untuk tiap ekstrak adalah: ekstrak etil asetat 85%, sebesar 10,77±0,28% (g GAE/100 g EBD); 0,33±0,001% (g QE/100 g-EBD) dan 6,32±0,26% (g TAE/100 g-EBD). Untuk ekstrak etanol 50% beturut-turut 42,39±0,17% (g-GAE/100 g-EBD); 2,28 ±0,06% (gQE/100 g-EBD) dan 22,21 ±0,1% (g-TAE/100 g-EBD). Sedangkan untuk ekstrak metanol 50%, 45,99 ±0,25% (g-GAE/100 g-EBD); 2,28±0,07% (g-QE/100 g-EBD) dan setara 26,9±0,07% (g-TAE/100 g-EBD), terlihat pada Gambar 1.



Gambar 1. Kelompok senyawa polifenolik EBD dari tiga ekstrak berbeda. Huruf yang berbeda pada kolom kelompok senyawa polifenolik yang sama menunjukkan ada perbedaan nyata (p < 0,05)

Kadar kelompok senyawa polifenolik ekstrak dari ketiga jenis ekstrak tersebut menunjukkan adanya perbedaan nyata ($P<0.05$) antar perlakuan atas uji fenolik total, tanin total dan flavonoid total, kecuali antara pelarut etanol 50% dengan metanol 50% atas uji total flavonoid. Berdasarkan hasil tersebut terbukti, bahwa biji duwet merupakan sumber senyawa polifenolik (fenolik), seperti dikatakan para peneliti sebelumnya (Vasi dan Austin, 2009; Peixoto dan Freitas, 2012; Saha dkk., 2013).

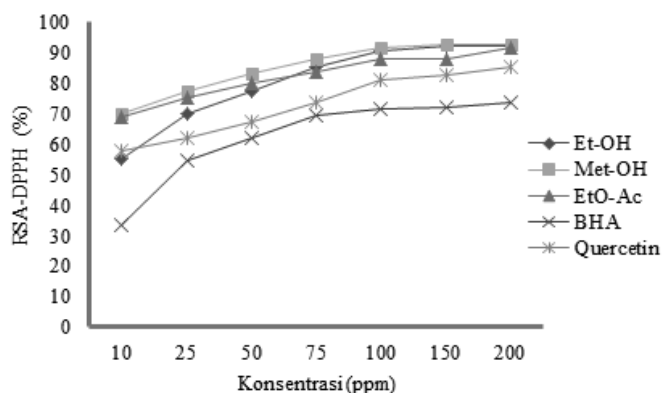
Hasil tersebut jauh lebih tinggi dibanding yang dilaporkan Vasi dan Austin (2009). Dikemukakan ekstrak biji duwet bebas pelarut Et-OH50% terkomposisi oleh senyawa fenolik setara 2,74±0,02 g-GAE/100 g-ekstrak dan flavonoid, 1,47±0,09 g-QE/100 g-ekstrak. Sedangkan Rydleski, (2013) melaporkan ekstrak biji duwet bebas pelarut metanol mengandung senyawa fenolik setara 411,02 mg GAE/L dan 61,68 mg QE/L. Adapun Saha, dkk. (2013) menyatakan kandungan tanin biji duwet 21.000 mg TAE/kg (ppm) dibanding 43.816 mg TAE/kg (ppm) yang setara dengan 26,90 % (g-TAE/100 g-EBD). Hal ini dimungkinkan karena perbedaan varietas, lokasi tumbuh dan tingkat kemasakan buah (Vasi dan Austin, 2009; Vayupharp dan Laksanalamai, 2012).

Ekstrak etanol 50% biji duwet, bila dikomparasikan dengan ekstrak etanol 50% biji anggur (*grape seed*), dengan rasio bahan : pelarut (10:1) lama maserasi 6 jam suhu 50°C, maka hasilnya *comparable*, yakni diperoleh *yield* 14,86±0,03%, dan 32,86±0,04 g GAE/100 g-GSE (Vayupharp dan Laksanalamai, 2012). Jayaprakasha dkk. (2001) mengatakan ekstraksi senyawa fenolik biji anggur, dengan ekstrak Met-OH memberikan *yield* tertinggi (8,1±0,14%) dibanding *acetone*, *etil acetat* (EtO-Ac), tetapi jauh lebih rendah fraksi flavonoid total dibanding pelarut EtO-Ac dan kombinasinya dengan air. Ditambahkan flavonoid total biji anggur sebesar 54,0± 4,86 %. Hal ini menurut penulis berpengaruh atas sifat antioksidatifnya.

Aktivitas Penangkapan Radikal DPPH

DPPH adalah senyawa radikal bebas dan reaktif berwarna violet dan memiliki absorbansi maksimal pada $\lambda = 515-528$ nm. Intensitas warna akan mengecil (memudar) menjadi kuning seiring dengan transfer proton dari pendonor atom hidrogen utamanya senyawa fenolik. Semakin meningkat proses hidrosilasi (*hydrogen atom transfer*), maka dikatakan aktivitas penangkapan radikal DPPH (*DPPH radical scavenging activity*) oleh senyawa dimaksud makin kuat (Sultana dkk. 2007; Vasi dan Austin, 2009; Dai dan Mumper, 2010).

Dari ketiga EBD dengan ekstrak EtO-Ac85%, Et-OH50%, dan Met-OH50% serta dikomparasi dengan antioksidan BHA dan kuercetin, tampak bahwa ketiga EBD lebih besar aktivitas penangkapan radikal bebas DPPH dibanding BHA dan kuercetin, seperti ditunjukkan oleh Gambar 2. Aktivitas penangkapan radikal bebas DPPH dari ekstrak Met-OH 50% paling kuat dan berbeda nyata ($p < 0,05$) dibanding ekstrak lain dan BHA serta kuercetin, tetapi tidak berbeda nyata ($p < 0,05$) dengan ekstrak Et-OH-50% pada konsentrasi 100 ppm seperti terlihat pada Tabel 2.



Gambar 2. Aktivitas penangkapan radikal bebas DPPH oleh ketiga EBD (Et-OH 50%, Met-OH 50% EtO-Ac 85%), BHA dan quercetin

Hal demikian disebabkan kadar dan ragam kelompok senyawa polifenolik (fenolik) pada ekstrak Met-OH50% lebih besar dibandingkan dua ekstrak lainnya dan lebih beragam, sementara BHA dan kuercetin adalah senyawa tunggal. Dari Gambar 2 diketahui nilai koefisien korelatif (r), tiap-tiap EBD atas uji RSA-DPPH adalah sebagai berikut: Et-OH 50% ($r = 0,904$), Me-OH 50% ($r = 0,86$), EtO-Ac 85% ($r = 0,91$) dan quercetin ($r = 0,94$) serta BHA ($r = 0,83$).

Aktivitas Mereduksi ion Feri (Fe^{3+})

Kemampuan mereduksi ion Feri (Fe^{3+}) menjadi Fero (Fe^{2+}) oleh senyawa organik korelatif dengan kapasitas antioksidannya (Jayaprakasha dkk., 2001). Tabel 2,

memperlihatkan hasil uji reduksi ion Feri (*ferric reducing power-FRAP*) dari tiga jenis ekstrak (EtO-AC85%; Et-OH50% dan Met-OH50%) pada konsentrasi 400 $\mu\text{g/mL}$ berdasarkan metode reduksi potasiumferisianida ($K_3Fe(CN)_6$) yang nilai absorbansinya (OD) 2.97, 2.82 dan 2.84. Tidak ada perbedaan yang nyata ($p < 0,05$) nilai OD ketiganya dan juga dengan vitamin C. Artinya baik ketiga ekstrak dan vitamin C memiliki kemampuan mereduksi setara hingga konsentrasi 400 $\mu\text{g/mL}$. Jika konsentrasi ekstrak dinaikkan (1000 $\mu\text{g/mL}$), tampak ketiga ekstrak menunjukkan peningkatan nilai OD hingga 3,2, namun tidak untuk vitamin C.

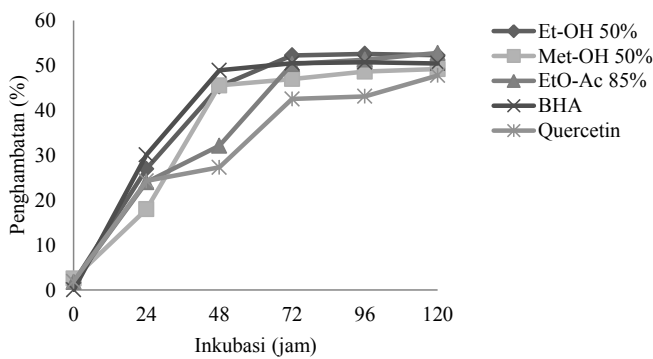
Kadar tanin pada ketiga ekstrak diduga kuat berkontribusi pada uji RSA-DPPH dan FRAP yang tinggi. Zhang dan Lin (2009) mengatakan tanin pada buah duwet memiliki sifat antioksidatif yang baik pada uji DPPH dan reduksi ion Feri (FRAP) dan berasosiasi dengan senyawa reduktor (Brewer, 2011). Gordon (1990) menjelaskan sifat antioksidatif reduktor (*reductones*) berdasarkan pada mekanisme pemutusan rantai radikal bebas (*breaking of the free radical -chain*) dengan cara mendonasikan atom hidrogen. Reduktor juga bereaksi dengan prekursor peroksida, sehingga secara tidak langsung mencegah formasi pembentukan peroksida. Data-data dari penelitian ini mengindikasikan bahwa sifat antioksidatif EBD dihasilkan dari sifat penangkapan radikal bebas dan kekuatan pereduksi. Hal ini sejalan dengan pendapat Zhang dan Lin (2009) bahwa sifat antioksidatif yang kuat buah duwet (*whole fruit*) disebabkan oleh kandungan tanin yang tinggi.

Peroksidasi Asam Lemak Linoleat

Sifat antioksidatif EBD, kuercetin dan BHA pada konsentrasi 400 ppm ditentukan melalui lipoksidasi emulsi asam lemak linoleat sesuai metode Jayaprakasha dkk. (2001) yang dipresentasikan pada Gambar 3. Dari gambar tersebut tampak bahwa ketiga EBD menunjukkan daya hambat peroksidasi berkisar 49-52 persen dibanding kontrol. Nilai tersebut setara dengan penghambatan antioksidan sintetik BHA dan lebih kuat dibanding kuercetin (47,7%).

Radikal asam lemak linoleat ($R\bullet$) yang terbentuk sebagai akibat abstraksi atom H dari salah satu *diallylic methylen group*, mudah teroksidasi membentuk radikal peroksida ($ROO\bullet$). Mekanisme antioksidan EBD pada penghambatan peroksidasi lipid adalah dengan cara mencegah dan atau menghambat peroksidasi asam lemak linoleat dengan monitoring pembentukan senyawa feri-thiocyanat kompleks sebagai produk sekunder dekomposisi hidroperoksida yang diukur secara spektrometri absorbansinya pada $\lambda = 500$ nm (Hua- Ming, dkk., 1996; Jayaprakasha dkk., 2001).

Setelah inkubasi 96 jam, tampak nilai penghambatan semua ekstrak menurun, dan formasi pembentukan peroksida terhenti. Hal ini disebabkan sudah tidak tersedia substrat



Gambar 3. Nilai penghambatan (%) EBD (Et-OH 50%, Met-OH 50%, EtO-Ac 85%), BHA dan Quercetin pada peroksidasi asam linoleat 400 ppm selama inkubasi 120 jam

(asam lemak linoleat) juga dimungkinkan karena produk intermediet terkonversi menjadi produk akhir yang stabil. Tidak tersedianya hidroperoksida sekaligus berakhirnya oksidasi ferro sulfat menjadi feri sulfat dan feri-thiocianat kompleks (Jayaprakasha dkk., 2001).

Ekstrak etil acetat 85%, etanol 50% dan metanol 50% biji duwet, bilamana dikomparasikan dengan aktivitas penghambatan peroksidasi lipid pada ekstrak kulit pohon duwet (*bark*) bebas etanol 80% dan methanol 80% senilai 80-90% (Sultana dkk., 2007), maka data-data pada Tabel 2 tampak lebih rendah. Demikian juga bila dikomparasikan dengan penghambatan oksidasi lipid oleh ekstrak biji anggur yang nilainya mencapai 86% (Jayaprakasha dkk., 2001). Hal ini diduga disebabkan perbedaan komposisi dan jumlah senyawa fenoliknya. Disebutkan Jayaprakasha dkk. (2001) nilai flavonoid total pada ekstrak biji anggur (*Vitis vinifera*) bebas pelarut etil asetat sebesar $54,0 \pm 4,86\%$.

KESIMPULAN

Dari penelitian ini terbukti bahwa biji duwet (*Syzygium cumini* Linn.) sumber senyawa polifenolik yang bersifat antioksidan. Sifat antioksidatif EBD adalah kuat pada uji penangkapan radikal bebas DPPH (*radical scavenging activity-DPPH*) dan pereduksi ion Feri (Fe^{3+}). Dari ekstrak Met-OH 50% diperoleh *yield* terbesar 16,29% (db.) dan kelompok fenoliknya adalah $45,99 \pm 0,25\%$ fenolik total (g-GAE/100 g-EBD); $2,28 \pm 0,07\%$ flavonoid total (g-QE/100 g-EBD) dan $26,9 \pm 0,07\%$ tannin total (g-TAE/100g-EBD).

UCAPAN TERIMA KASIH

Penulis mengucapkan terima kasih kepada Kopertis Wilayah VI Semarang yang telah memfasilitasi penelitian ini dengan Hibah Penelitian 2015 Batch 1 melalui skema

Penelitian Disertasi Doktor dari Kementerian Ristek dan Pendidikan Tinggi.

DAFTAR PUSTAKA

- Ali, E.M., Feresteh, P. dan Hafezi, S. (2008). Antioxidan activities of Iranian corn silk. *Turkish Journal of Biology* **32**: 43-49.
- AOAC (2005). *AOAC Official Methods of Analysis*. 18th ed. AOAC Intern. Maryland, USA.
- Ayyanar, M. dan Babu, P.S. (2012). *Syzygium cumini* (L.): A review of its phytochemical constituents and traditional uses. *Asian Pacific Journal of Tropical Biomedicine* **2**(3): 240-246.
- Baliga, M.S., Baht, H.P., Baliga, B.R.V., Wilson, R. dan Palatty, P.L. (2011). Phytochemistry, tradisional uses and pharmacology of *Eugenia jambolana* Lam. (black plum): A review. *Food Research International* **44**: 1776-1789.
- Baydar, N.G., Ozkan, G. dan Yasar, S. (2007). Evaluation of the antiradical and antioxidant potential of grape extract. *Food Control* **18**: 1131-1136.
- Brewer, M.S. (2011). Natural antioxidant: source, compounds, mechanisms of action, and potential application. *Comprehensive Reviews. Food Science and Food Safety* **10**: 221-247.
- Buxiang, S. dan Fukuhara, M. (1997). Effect of co-administration of butylated hydroxytoluene, butylated hydroxyanisole and flavonoids on the activation of mutagens and drugs-metabolizing enzymes in mice. *Toxicology* **122**(2-4): 61-72.
- Dai, J. dan Mumper, R.J. (2010). Plant phenolics: extraction, analysis and their antioxidant and anticancer properties (review). *Molecules* **15**: 7313-7352.
- Faria, A.F., Marques, M.C. dan Mercadante, A.Z. (2011). Identification of bioactive compounds from jambolao (*Syzygium cumini*) and antioxidant capacity evaluation in different pH conditions. *Food Chemistry* **126**: 1571-1579.
- Gordon, M.F. (1990). The mechanism of antioxidant action in vitro. *Dalam: J.F. Hudson (ed.). Food Antioxidant*, hal: 1-18. Elsevier Applied Science, London.
- Jayaprakasha, G.K., Singh, R.P. dan Sakariah, K.K. (2001). Antioxidant activity of grape seed (*Vitis vinifera*) extracts on peroxidation models in vitro. *Food Chemistry* **73**: 285-290.

- Madavi, D.L. dan Salunkhe, D.K. (1995). Toxicological aspect of food antioxidant. *Dalam: Madavi, D.L., Despanthe, S.S. dan Salunkhe, D.K. (ed.). Food Antioxidant*. Mercel Decker Inc., NY.
- Maqsood, S. (2010). *Maximized Uses of Phenolic Compound in Retardation of Lipid Oxidation and Shelf-Life Extension of Fish and Fish Product*. A thesis submitted in Fulfillment of the Requirements of Degree of Doctor of Philosophy in Food Science and Technology Prince of Songkla University.
- Palici, I., Tita, B., Ursica, L. dan Tita, D. (2005). Method for quantitative determination of polyphenolic compounds and tannins from vegetal Products. *Acta Universitatis Cibiniensis Seria F. Chemia* **8**: 21-32.
- Peixoto, Paula, M.G. dan Freitas, L.A.P. (2012). Spray-dried extracts from *Syzygium cumini* seed: physicochemical and biological evaluation. *Brazilian Journal of Pharmacognosy* **23**(1): 145-152.
- Rydlowski, Adriela, A., de Moraes, D.R., Rotta, E.M. dan Visentainer, J.V. (2013). Evaluation of antioxidant activity of methanolic extract of seed, peel, and pulp of jambolan (*Syzygium Cumini*). Agricultural Science Center of State University of Marings, Colombo. <http://www.Iufos.org>. [10 September 2013].
- Saha, Repon, K., Zaman, N.M. dan Roy, P. (2013). Comparative evaluation of the medicinal activities of methanolic extract of seed, fruit pulp and fresh juice of *Syzygium cumini* in vitro. *Journal of Coastal Medicine* **1**(4): 288-296.
- Shahidi, F. dan Zhong, Y. (2005). *Antioxidants: Regulatory Status*. *Bailey's Industrial Oil and Fats Products*. 6th ed. John Wiley and Sons Inc, Canada.
- Sultana, B., Anwar, F. dan Przybylski, R. (2007). Antioxidant activity of phenolic components present in bark of *Azadirachta indica*, *Terminalia arjuna*, *Acacia nilotica* dan *Eugenia jambolana* Lam. trees. *Food Chemistry* **104**: 1106-1114.
- Swami, Shrikant, B., Thakor, N.S.J., Patil, M.M. dan Haldankar, P.M. (2012). Jamun (*Syzygium cumini* L.): A review of its food and medicinal uses. *Food and Nutrition Science* **3**: (1100-1117).
- Vayuphar, B. dan Laksanalamai, V. (2012). Recovery of antioxidant from grape seeds and its application in fried food. *Journal of Food Processing Technology* **3**(4): 1-6.
- Vasi, S. dan Austin, A. (2009). Antioksidan potential of *Eugenia jambolana* Lam. seeds. *Journal of Biological Sciences* **9**(8): 894-898.
- Zhang, L.L. dan Lin, Y.M. (2009). Antioxidant tannins from *Syzygium cumini* fruit. *African Journal of Biotechnology* **8**(10): 2301-2309.