

Identifikasi Bakteri Asam Laktat dan Aktivitas Penghambatan Radikal pada Jaruk Tigarun (*Crataeva nurvala*, Buch Ham)

Identification of Lactic Acid Bacteria and Radical Scavenging Activity in Jaruk Tigarun (*Crataeva nurvala*, Buch HAM)

Nazarni Rahmi¹, Eni Harmayani², Umar Santosa², Purnama Darmadji²

¹Baristand Industri, Jalan Panglima Batur Barat No. 2 Banjarbaru 70711, Indonesia

²Departemen Teknologi Pangan dan Hasil Pertanian, Fakultas Teknologi Pertanian, Universitas Gadjah Mada, Jl. Flora No. 1 Bulaksumur, Yogyakarta 55281, Indonesia
 Email: nazarni.rahmi@yahoo.com

Submisi: 21 Mei 2015; Penerimaan: 30 September 2015

ABSTRAK

Jaruk tigarun adalah salah satu makanan fermentasi tradisional dari Kalimantan Selatan yang dibuat dengan cara merendam bunga tigarun dalam air matang selama beberapa hari. Penelitian ini bertujuan untuk mengisolasi dan mengidentifikasi bakteri asam laktat yang terlibat selama fermentasi jaruk serta mengetahui aktivitas penghambatan radikal DPPH pada jaruk tigarun. BAL diisolasi dari bunga tigarun yang difermentasi selama 7 hari pada suhu kamar sampai menjadi jaruk. Isolasi BAL menggunakan media MRS+CaCO₃ dan diidentifikasi dengan API 50 CHL Kit. Bunga segar dan jaruk tigarun juga masing-masing dikeringbekukan, dihaluskan dan diekstraksi dengan metanol, etanol dan etil asetat. Total fenolik dan aktivitas antioksidan dari masing-masing ekstrak ditentukan dengan metoda Folin Ciocalteu dan DPPH. Tiga isolat BAL berhasil diisolasi dan diidentifikasi sebagai *Lactobacillus plantarum*. Fermentasi berhasil meningkatkan total fenolik dari jaruk tigarun yang diekstrak dengan metanol, etanol dan etil asetat berturut-turut sebesar 53,24 ± 0,73, 44,86 ± 0,90 dan 23,95 ± 0,13 mg GAE/g ekstrak. Demikian pula halnya dengan aktivitas antioksidan dari jaruk yang diekstrak dengan metanol, etanol dan etil asetat meningkat menjadi 92,68 ± 0,02 %, 92,43 ± 0,11 %, dan 42,94 ± 0,02 %. Ekstrak metanol dari jaruk tigarun memiliki IC₅₀ yang paling baik yaitu sebesar 1.511 µg/mL. Hasil isolasi dan identifikasi senyawa yang dimurnikan dari ekstrak metanol jaruk menggunakan analisis spektrum UV-Vis dan FT-IR diperoleh dugaan senyawa adalah golongan flavonoid.

Kata kunci: DPPH; flavonoid; jaruk tigarun; *L. Plantarum*; total fenolik

ABSTRACT

Jaruk tigarun is a traditional fermented food from South Borneo made from tigarun flower that was fermented in water without salt addition. The objectives of the research were to isolate and identify the Lactic Acid Bacteria (LAB) from jaruk tigarun then to determine the DPPH radical scavenging activities of jaruk tigarun extracts. LAB was isolated from jaruk tigarun which was fermented for 7 days at room temperature. Media of MRS+CaCO₃ were used to isolate the LAB while API 50 CHL kit was utilised to identify them. Fresh flowers and jaruk tigarun were also freeze-dried, crushed and extracted using methanol, ethanol and ethyl acetate. The total phenolic and antioxidant activity of each extract were determine with Folin-Ciocalteu method and DPPH. Three isolates of LAB were isolated and identified as *Lactobacillus plantarum*. The fermentation was able to increase total phenolic of jaruk tigarun which was extracted with methanol, ethanol, and ethyl acetate (53.24 ± 0.73, 44.86 ± 0.90 and 23.95 ± 0.13 mg GAE/g extract, respectively). Similarly, the antioxidant activity of jaruk tigarun that were extracted with methanol, ethanol and ethyl acetate increased to 92.68 ± 0.02 %, 92.43 ± 0.11 %, and 42.94 ± 0.02 %. Methanolic extract of jaruk tigarun has the highest IC₅₀ that was equal to 1.511 µg/mL. UV-Vis spectrum analysis and FT-IR were used to identify the compounds isolated from methanolic extract of jaruk tigarun resulting flavonoid as tentative identified compounds.

Keywords: DPPH; flavonoid; jaruk tigarun; *L. Plantarum*; total phenolic content

PENDAHULUAN

Buah-buahan dan sayuran mengandung banyak komponen antioksidan seperti komponen fenolik, karotenoid, antosianin, dan tokoferol. Sebagian besar antioksidan adalah komponen fenolik yang bersifat sebagai agen pereduksi, pengkkelat logam, peredam oksigen singlet (Mathew dan Abraham, 2006) dan pendonor hidrogen (Miller dan Rice-Evans, 1997). Pangan segar, terutama sayuran sangat direkomendasikan dalam diet karena kaya akan antioksidan, vitamin, serat, dan mineral. Meskipun demikian beberapa jenis sayuran seperti timun, wortel, terung, kubis, dan zaitun yang difermentasi tradisional atau melalui fermentasi asam laktat dilaporkan meningkat kandungan gizi, keamanan, umur simpan, dan sifat sensorisnya (Rodríguez dkk., 2009).

Proses fermentasi berperan dalam mengubah komponen dan bioaktivitas senyawa aktif. Perubahan biokimia yang terjadi selama fermentasi turut mengubah rasio komponen nutrisi dan antinutrisi sehingga mempengaruhi sifat produk seperti bioaktivitas dan pencernaan (Zhang dkk., 2012), contohnya fermentasi pada kacang polong yang berhasil meningkatkan kandungan bioaktif komponen fenolik sekaligus aktivitas antioksidannya (Lee dkk., 2008; Torino dkk., 2013). Fermentasi memperbaiki sifat antioksidan dengan cara meningkatkan kandungan flavonoid bebas pada pangan berbasis tanaman. Fermentasi menginduksi degradasi dinding sel yang pada akhirnya akan membebaskan atau bahkan menginduksi proses sintesis beberapa komponen bioaktif (Dordevic dkk., 2010).

Jaruk tigarun merupakan salah satu makanan fermentasi tradisional yang berasal dari Kalimantan Selatan yang dibuat dengan cara memfermentasikan bunga tigarun (*Crataeva nurvala*, Buch HAM) dalam air matang hangat. Makanan ini dikonsumsi sebagai sayuran pelengkap lauk dan cukup digemari oleh penduduk setempat karena dinilai mampu menaikkan selera makan dengan rasa khasnya, yaitu sedikit pahit, getir, dan asam. Tigarun juga dipercaya dapat menurunkan demam dan menyembuhkan 'kalalah'-sebuah gangguan pada wanita setelah melahirkan (Hapip, 2008).

Pemanfaatan tigarun secara tradisional juga ditemukan di negara lain seperti India, dengan cara mengekstrak kulit batangnya untuk mengobati batu ginjal, demam, muntah, dan iritasi pencernaan (Bhattacharjee dkk., 2012). Aktivitas farmakologis yang telah diteliti dari ekstrak batang tigarun antara lain antiinflamatory, anti arthritis (Das dkk., 1974) dan anti radikal (Bhaskar dkk., 2009). Beberapa komponen yang berhasil diidentifikasi pada kulit batang tigarun meliputi flavonoid, glukosinolat, *plant* sterols, lupeol, saponin, dan tanin (Geetha dan Varalaksmi, 1998) termasuk juga asam suksinat, asam laktat, dan mannitol (Paarakh dkk., 2011). Pada bagian daunnya terdapat senyawa golongan flavonoid

seperti kuersetin dan kaemferol (Gagandepdkk., 2006), sedangkan pada bagian buahnya terdapat senyawa golongan triterpen (Gagandep dkk., 2009).

Senyawa flavonoid dan tanin digolongkan sebagai komponen fenolik yang dikenal memiliki aktivitas antioksidan (Bhaskar dkk., 2009; Abdul-Alla dkk., 2009). Aktivitas ini terkait dengan gugus dan jumlah grup hidroksil pada kelompok fenol yang diperkirakan berhubungan dengan aktivitas antioksidan. OH aromatis merupakan penentu penting adanya donasi hidrogen dan penangkap radikal bebas oleh senyawa fenol (Ng dkk., 2000).

Proses fermentasi tigarun seperti halnya fermentasi tradisional sayuran lainnya diduga melibatkan bakteri asam laktat dalam prosesnya, karena mereka secara alami ada di dalamnya. Bakteri ini terdapat dalam jumlah kecil ($2.0 - 4.0 \log \text{ cfu/g}$) dari mikrobiota asli dalam sayuran mentah dan buah-buahan (Di Cagno dkk., 2013). Oleh karena itu, penting untuk mengetahui keberadaan bakteri ini dalam fermentasi jaruk. Sebagian besar spesies yang diisolasi dari sayuran mentah dan fermentasi spontan adalah *L. plantarum*, *L. paraplantarum*, *L. fermentum* dan *L. pentosus* yang memiliki aktivitas β -glucosidase, tanase dan dekarboksilase (Osawa dkk., 2000; Sánchez dkk., 2000; Di Cagno dkk., 2008). Degradasi komponen flavonoid dan polifenol secara enzimatis dapat meningkatkan jumlah senyawa fenolik sederhana sekaligus meningkatkan bioaktivitas jaruk tigarun.

Penelitian terhadap jaruk tigarun diperlukan untuk mengetahui potensi dan manfaatnya sebagai produk pangan tradisional yang dapat menyumbang antioksidan alami. Penelitian ini bertujuan untuk mengisolasi dan mengidentifikasi bakteri asam laktat yang terlibat dalam fermentasi jaruk tigarun serta mengetahui pengaruh fermentasi terhadap kandungan total fenolik dan aktivitas penghambatan radikal DPPH pada jaruk tigarun yang diekstrak dengan metanol, etanol dan etil asetat. Dengan demikian akan diperoleh informasi ilmiah isolat bakteri asam laktat yang terlibat dalam fermentasi jaruk tigarun serta potensi antiradikalnya.

METODE PENELITIAN

Bahan

Bunga tigarun segar diperoleh dari daerah Banjarmasin, Martapura, Sungai Tabuk, Marabahan dan Pelaihari propinsi Kalimantan Selatan. Bunga dipetik saat musim mekar dari bulan November 2012-Maret 2013. Bunga mekar optimal dipetik langsung dari pohon lalu dimasukkan wadah semi terbuka dan dibawa ke bagian pengiriman cargo bandara untuk dikirim ke Yogyakarta. Bunga segar diidentifikasi dan dideterminasi di laboratorium Sistematik Tumbuhan, Fakultas

Biologi, Universitas Gadjah Mada, Yogyakarta. Pelarut untuk ekstraksi dan eluen adalah metanol, etanol, etil asetat, dan diklorometan (analytical grade, Merck). DPPH (α, α -diphenyl- β -picrylhydrazyl) diperoleh dari Merck, L-asam askorbat, kuersetin, asam galat, asam tanat dan reagen Folin-Ciocalteu (Sigma Aldrich).

Preparasi Sampel

Bubuk bunga segar dibuat dengan cara mengeringkan bunga dengan *freeze drier*, kemudian dihaluskan sampai menjadi bubuk dan diayak sampai diperoleh ukuran 30 mesh. Sampel disimpan pada suhu $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ sampai siap diekstraksi. Bubuk jarak tigarun dibuat dengan cara memfermentasikan bunga segar menjadi jarak tigarun. Bunga direndam dalam air matang (suhu awal $75\text{ }^{\circ}\text{C}$) selama 7 hari dalam panci stainless pada suhu kamar ($\pm 30\text{ }^{\circ}\text{C}$) sampai terjadi perubahan warna dari kuning-hijau cerah menjadi semicoklat-kemerahan, timbul rasa asam, tidak ada rasa pahit (*bitter taste*), bau langu hilang dan tekstur bunga tetap renyah tidak lembek (Rahmi, 2013). Jarak kemudian ditiriskan, dikeringbekukan dengan *freeze drier* dan dihaluskan. Bubuk diayak sampai diperoleh ukuran 30 mesh kemudian disimpan pada $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ untuk diekstraksi lebih lanjut.

Isolasi dan Identifikasi Bakteri Asam Laktat

Isolasi bakteri asam laktat dilakukan setiap hari selama fermentasi jarak tigarun dari hari ke-0 sampai hari ke-7. Sejumlah 10 g sampel dilarutkan dalam 90 mL larutan NaCl 0,85 % kemudian dihancurkan dengan *stomacher* selama 15 menit. Sampel diambil 1 mL (duplo) untuk diplating pada media MRS + 1% CaCO_3 dan diinkubasi selama 2 hari pada suhu $37\text{ }^{\circ}\text{C}$. Pada setiap petri dipilih koloni yang menghasilkan zona jernih dan dimurnikan dengan metoda goresan. Koloni yang sudah murni dikarakterisasi morfologi sel, pewarnaan gram, uji katalase, produksi gas dari glukosa dan dibedakan berdasarkan deskripsi taksonomi standar (Stiles dan Holzappel, 1997).

Morfologi sel diamati menggunakan mikroskop perbesaran 40-100x. Uji katalase dilakukan dengan meneteskan larutan hidrogen peroksida 3 % pada sel, pembentukan gelembung menandakan adanya katalase dalam sel. Isolat yang menunjukkan katalase negatif diuji reaksi pewarnaan Gram dan hanya yang Gram positif yang diuji lebih lanjut.

Penentuan tipe fermentasi dilakukan dengan menumbuhkan isolat dalam medium MRS broth 5 mL yang dibagian dalamnya sudah diletakkan tabung Durham dan diinkubasi pada suhu $37\text{ }^{\circ}\text{C}$ selama 24 jam (tes Durham). Timbulnya gas dalam tabung durham menunjukkan isolat tergolong heterofermentatif, bila sebaliknya berarti

homofementatif. Isolat juga diuji kemampuan tumbuh pada variasi suhu dan jenis gula. Identifikasi lebih lanjut dilakukan dengan kit API 50 CHL (Bio-merieux, Perancis). Pembacaan hasil dilakukan dengan software API.

Ekstraksi Sampel

Bubuk bunga segar dan jarak masing-masing dimaserasi terpisah dalam metanol, etanol dan etilasetat (1 : 20) pada suhu $60\text{ }^{\circ}\text{C}$, 100 rpm, 96 jam (*Waterbath shaker* WS-240 SIBATA). Hasil ekstraksi disaring dengan Whatman no.1. Filtrat yang diperoleh diuapkan dengan *rotary evaporator* (IKA@HB10 Basic) pada suhu $60\text{ }^{\circ}\text{C}$ (65 rpm, 30 menit) sampai didapat ekstrak kental yang akan diuji total fenolik dan aktivitas antioksidan.

Penentuan Total Fenolik

Total fenolik dari ekstrak bunga segar dan jarak tigarun dilakukan sesuai protokol dari Hung dan Yen (2000). Ekstrak (0,1 mg) dilarutkan dalam 0,1 mL aquades ditambah 0,1 mL reagen Folin-Ciocalteu konsentrasi 50 % dan divortex. Setelah 3 menit ditambahkan 2 mL larutan Na_2CO_3 2 % dan disimpan dalam ruang gelap selama 30 menit. Absorbansi diukur pada λ 750 nm menggunakan spektrofotometer UV 1650 Shimadzu. Kurva standar disiapkan dengan menggunakan asam galat. Hasil ditunjukkan dalam mg per gr ekstrak ekuivalen asam galat (GAE).

Penentuan Aktivitas Antioksidan dengan Penangkapan Radikal DPPH

Aktivitas penangkapan radikal DPPH ditentukan sesuai prosedur Sreeramulu (2010), dengan sedikit modifikasi. 100 μL sampel ditambah 2,9 mL reagen DPPH (0,1 mM dalam metanol) dan divortex merata. Inkubasi dilakukan pada suhu kamar dalam ruang gelap selama 30 menit. Perubahan warna DPPH diukur pada λ 517 nm. Persentasi hambatan dari ekstrak dihitung dengan persamaan berikut:

$$\% \text{ hambatan} = \left\{ \frac{A_{\text{blanko}} - A_{\text{sampel}}}{A_{\text{blanko}}} \right\} \times 100\%$$

Sementara IC_{50} ditentukan dengan cara memplotkan % hambatan dengan konsentrasi menggunakan persamaan linier. Data yang dihasilkan adalah rata-rata dari 3 ulangan \pm standar deviasi. Kurva standar disiapkan dengan menggunakan asam askorbat.

Elusidasi Komponen dari Ekstrak Jarak Tigarun

Ekstrak yang mempunyai aktivitas antioksidan paling tinggi selanjutnya diisolasi dan dimurnikan sampai tingkat fraksi dan senyawa. Ekstrak kasar di fraksinasi dengan eluen

metanol : etilasetat (2 : 8) menggunakan kromatografi kolom (2,0 × 50 cm) dengan fase diam silika gel (60 – 120 mesh, Merck) dan eluen metanol : etil asetat (2 : 8) serta kecepatan alir 2 mL/menit. Eluen yang menurun ditampung dalam vial-vial kecil. Fraksi yang diperoleh diperiksa dengan kromatografi lapis tipis (plat gel silika GF₂₅₄, Merck) dan dikelompokkan berdasarkan warna dan harga Rf yang sama. Fraksi yang mempunyai bercak sama dijadikan satu, kemudian pelarutnya diuapkan sampai kering. Fraksi-fraksi ini kemudian diuji aktivitas antioksidannya. Fraksi yang memiliki aktivitas penghambatan tertinggi selanjutnya diisolasi dan dipisahkan lebih lanjut dengan kromatografi lapis tipis preparatif (Silika gel GF60, Merck) menggunakan eluen diklorometan : etil asetat (7 : 3). Senyawa yang diperoleh diuji aktivitas antioksidan dan ditentukan data spektrum UV dengan Spektro UV 1800 series pada kisaran 200 - 500 nm sementara identifikasi gugus fungsional menggunakan spektrofotometer FTIR (SHIMADZU, Jepang) didaerah inframerah 200 – 4000 (cm⁻¹).

Analisis Statistik

Data kuantitatif yang diperoleh dari tiga kali ulangan dinyatakan dalam rata-rata ± standar deviasi. Data diuji statistik dengan analisis keragaman (ANOVA). Apabila ada perbedaan yang signifikan dilanjutkan dengan Tukey methods range test dengan tingkat signifikan 95 % menggunakan software SPSS statistik 22.

HASIL DAN PEMBAHASAN

Isolasi dan Identifikasi Bakteri Asam Laktat

Hasil isolasi bakteri asam laktat dari jaruk tigarun diperoleh 3 isolat yang berbentuk batang, gram positif, katalase negatif, dan bersifat homofermentatif. Identifikasi lebih lanjut berdasarkan *Bergey's Manual Identification for Gram positif* dengan menguji pertumbuhan isolat pada suhu 15 °C dan 45 °C. Hasilnya semua isolat mampu tumbuh pada suhu 15 °C sedangkan pada suhu 45 °C hanya isolat JBS 6.31 yang tidak mampu tumbuh. Hasil ini kemudian

dikonfirmasi dengan menggunakan API® 50 CHL kit (BIOMÉRIEUX), yaitu menguji pertumbuhan isolat pada 49 jenis gula. Identifikasi dengan API kit menunjukkan bahwa semua isolat adalah *Lactobacillus plantarum* dengan tingkat kepercayaan 99,9 % (Tabel 1). Menurut *Bergey's manual of systematic bacteriology*, *L. plantarum* mempunyai sifat homofermentatif, mampu tumbuh pada suhu 15 °C akan tetapi tidak mampu tumbuh pada 45 °C. Hasil identifikasi ini menunjukkan bahwa fermentasi jaruk tigarun melibatkan bakteri asam laktat jenis *L. plantarum*.

Bakteri asam laktat banyak digunakan dalam fermentasi tradisional sayuran karena mereka secara alami ada di dalamnya. Bakteri ini terdapat dalam jumlah kecil (2.0 - 4.0 log cfu/g) dari mikrobiota asli dalam sayuran mentah dan buah-buahan (Di Cagno dkk., 2013). Sebagian besar spesies yang diisolasi dari sayuran mentah dan fermentasi spontan adalah *L. plantarum*, *L. paraplantarum*, *L. fermentum* dan *L. pentosus* yang memiliki aktivitas β-glucosidase, tanase dan dekarboksilase (Sánchez dkk., 2000; Di Cagno dkk., 2008; Osawa dkk., 2000).

Total Fenolik Ekstrak Bunga Segar dan Jaruk Tigarun

Ekstrak dari bunga segar dan jaruk tigarun menunjukkan kandungan total fenolik yang berkisar antara 12,58 ± 0,09 sampai 53,24 ± 0,73 mg GAE/g ekstrak. Kandungan tertinggi terdapat pada ekstrak metanol jaruk sebesar 53,24 ± 0,73 mg GAE/g ekstrak.

Secara umum kandungan total fenolik pada bunga tigarun meningkat secara signifikan setelah difermentasi menjadi jaruk (Tabel 2). Pada ekstrak metanol, terjadi peningkatan total fenolik dari 50,37 ± 0,22 menjadi 53,24 ± 0,73 mg GAE/g ekstrak atau kenaikan sebesar 5,39 %. Sementara pada ekstrak etanol dan etil asetat terjadi kenaikan total fenolik masing-masing sebesar 20,88 dan 47,47 %. Hal ini menunjukkan bahwa proses fermentasi meningkatkan kandungan total fenolik pada bunga tigarun. Proses fermentasi menyebabkan pelepasan enzim mikrobial yang menghasilkan bentuk bebas dari komponen kimia tanaman seperti flavonoid, tannin dan alkaloid (Messen dkk., 2002). Ng dkk. (2011) juga melaporkan bagian tanaman herbal *Anoectochilus formosanus*

Tabel 1. Hasil identifikasi awal isolat bakteri asam laktat

Kode isolat	Ukuran sel	Tipe fermentasi	Pertumbuhan pada suhu		Identifikasi API® 50 CHL	% ID
			15 °C	45 °C		
JBS 4	Batang	Homofermentatif	+	+	<i>L. plantarum</i>	99,9
JBS 6.31	Batang berantai	Homofermentatif	+	-	<i>L. plantarum</i>	99,9
JBS 6.22	Batang	Homofermentatif	+	+	<i>L. plantarum</i>	99,9

Tabel 2. Total fenolik dari ekstrak bunga segar dan jaruk tigarun

Sampel	Ekstrak	Total fenolik (mg GAE/g ekstrak)
Bunga segar	Metanol	50,37 ± 0,22 ^e
	Etanol	35,49 ± 0,12 ^e
	Etil Asetat	12,58 ± 0,09 ^a
Jaruk	Metanol	53,24 ± 0,73 ^f
	Etanol	44,86 ± 0,90 ^d
	Etil Asetat	23,95 ± 0,13 ^b

* huruf yang berbeda pada kolom yang sama menunjukkan perbedaan yang nyata pada p < 0,05

Hayata yang mengalami peningkatan total fenolik setelah fermentasi.

Tabel 2 menunjukkan bahwa meskipun kandungan total fenolik pada ekstrak etil asetat lebih sedikit dibandingkan ekstrak lainnya namun perubahan total fenolik akibat fermentasi justru paling besar terjadi pada ekstrak etil asetat. Hal ini menimbulkan dugaan bahwa selama fermentasi komponen bioaktif yang umumnya bersifat polar telah terdegradasi menjadi komponen nonpolar, contohnya pelepasan gugus gula pada komponen glukosida menjadi aglikon yang mengubah polaritasnya menjadi lebih rendah, sehingga menaikkan jumlah total fenolik yang cukup besar pada pelarut etil asetat. Djaafar dkk. (2013) menyebutkan adanya kenaikan komponen aglikon hasil hidrolisis glukosida isoflavon pada fermentasi susu kerandang. Peningkatan komponen aglikon ini juga ditemukan pada susu kedelai yang difermentasi dengan bakteri *L. plantarum* (Otieno dkk., 2006).

Keberadaan bakteri asam laktat (BAL) dalam fermentasi turut berkontribusi dalam konversi komponen fenolik sederhana dan depolimerisasi senyawa fenolik yang memiliki berat molekul tinggi (Othman dkk., 2009). Enzim-enzim yang dihasilkan dalam fermentasi alami ataupun yang diinduksi oleh *L. plantarum* dan BAL lainnya ini mampu meningkatkan konsentrasi senyawa fenolik dalam produk tanaman yang difermentasi (Duenas dkk., 2005; Ciafardini dkk., 1994). Polifenol kompleks dihidrolisis menjadi sederhana dan lebih aktif oleh tanase dan dekarboksilase, sementara β-glukosidase menghidrolisis ikatan gula pada glikosida dan membebaskan gugus aglikon fenolik (Martins dkk., 2011).

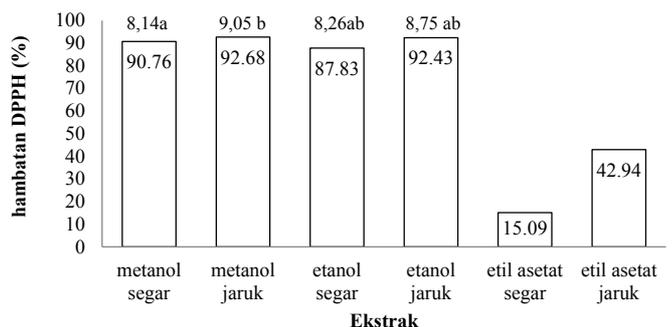
Total fenolik tertinggi ditunjukkan oleh ekstrak metanol diikuti oleh ekstrak etanol dan etil asetat. Terlihat bahwa pelarut metanol lebih efisien dalam mengekstrak komponen polifenol dibanding pelarut etanol maupun etil asetat. Komponen fenolik umumnya lebih mudah larut dalam pelarut organik yang bersifat polar. Tingginya kelarutan senyawa

fenolik dalam pelarut organik ini menyebabkan tingginya konsentrasi senyawa ini dalam ekstrak yang diperoleh dengan menggunakan pelarut polar untuk ekstraksi (Mohsen dan Ammar, 2008; Zhou dan Yu, 2004).

Aktivitas Penghambatan Radikal DPPH dari Ekstrak Bunga Segar dan Jaruk Tigarun

Aktivitas penghambatan radikal dari masing-masing ekstrak ditunjukkan dalam bentuk persen hambatan terhadap radikal DPPH yang berkisar dari 15,10 sampai 92,68 % (Gambar 1). Secara umum terlihat bahwa fermentasi ternyata meningkatkan aktivitas penghambatan radikal dari semua ekstrak yang diuji. Fermentasi menginduksi degradasi dinding sel sehingga membebaskan atau bahkan menginduksi pembentukan komponen bioaktif (Katina dkk., 2007; Dord-ovic' dkk., 2010). Enzim lignolitik maupun enzim yang memetabolisme karbohidrat menghidrolisis glikosida dari fenolik dan melepaskan aglikon yang menyebabkan aktivitas antioksidannya menjadi lebih tinggi (Vattem dan Shetty, 2003). Hubert dkk. (2008) juga menyebutkan bahwa konversi dari glikosilasi isoflavon menjadi aglikon yang terjadi pada fermentasi kedelai berhubungan langsung dengan aktivitas antioksidatif, hal ini terjadi karena sebagian komponen strukturnya termodifikasi atau dibebaskan setelah dihidrolisis oleh bakteri.

Ekstrak metanol dari jaruk tigarun menunjukkan aktivitas penghambatan radikal yang paling tinggi (Gambar 1). Pelarut organik polar seperti metanol sering digunakan dalam ekstraksi meski ia bukan pelarut terbaik untuk melarutkan molekul target. Komponen biologis tanaman seperti komponen bioaktif sebagian tersimpan dalam bentuk yang terlindungi, seperti terikat pada membran, terkompartmenten, terlindungi oleh bahan lipofilik dan sebagainya (Shimizu, 1998). Pelarut metanol diduga dapat merusak struktur kompartemen dan secara efisien menembus membran sel sehingga terjadi ekstraksi sejumlah besar komponen endoselular (Silva dkk., 1998). Kemampuan mengekstrak



Gambar 1. Grafik aktivitas penghambatan radikal DPPH dari ekstrak tigarun segar dan jaruk; huruf yang berbeda pada grafik menunjukkan perbedaan yang nyata pada p < 0,05

Tabel 3. Nilai IC₅₀ dari ekstrak *jaruk* tigarun

Asal ekstrak	Persamaan garis	Nilai IC ₅₀ (µg/mL)
Metanol	$y = 0,0146x + 28,089$	1.511
Etanol	$y = 0,0119x + 16,399$	2.823
Etil asetat	$y = 0,001x + 18,436$	31.564
Standar asam askorbat	$y = 0,6863x + 11,753$	55,72

komponen bioaktif lebih efisien ini diduga membuat pelarut metanol memiliki aktivitas penghambatan radikal yang lebih baik dibanding pelarut organik lain.

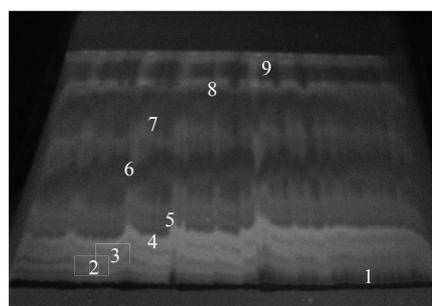
Secara umum aktivitas antioksidan dari ekstrak berbanding lurus terhadap total fenolik. Semakin tinggi total fenolik semakin tinggi juga aktivitas antioksidan dari ekstrak. Fenol merupakan komponen tanaman yang sangat penting karena kemampuan penangkapan radikal bebasnya berkaitan erat dengan keberadaan gugus hidroksil yang dimiliki. Kandungan fenolik dari tanaman berkontribusi secara langsung dengan aktivitas antioksidannya (Tosun dkk., 2009). Beberapa penelitian mengenai aktivitas antioksidan pada tanaman telah membuktikan adanya korelasi tinggi antara kandungan fenolik dan aktivitas antioksidan. Verzelloni dkk. (2007) melaporkan bahwa kapasitas antioksidan dari wine dan cuka vinegar sangat berhubungan dengan kandungan fenoliknya. Sementara Lee dkk. (2008) serta Torino (2013) melaporkan bahwa fermentasi yang dilakukan pada legum mampu meningkatkan total fenolik sekaligus aktivitas antioksidannya. Ng dkk. (2011) juga menyebutkan terjadinya peningkatan total fenolik setelah fermentasi herbal dan bahwa aktivitas antioksidatif yang teramati ternyata berhubungan dengan meningkatnya total fenolik.

Nilai IC₅₀ ekstrak metanol menunjukkan hasil yang lebih baik dari ekstrak etanol (Tabel 3). Ekstrak metanol mampu menetralkan 50 % radikal bebas pada konsentrasi 1.511 µg/mL, sementara ekstrak etanol sebesar 2.823 µg/mL diikuti oleh ekstrak etil asetat sebesar 31.564 µg/mL. Meskipun demikian, kemampuan meredam radikal DPPH semua ekstrak *jaruk* tigarun masih dibawah asam askorbat yang memberikan nilai IC₅₀ sebesar 55,72 µg/mL.

Isolasi dan Identifikasi Senyawa Aktif dari Ekstrak Metanol

Ekstrak metanol yang mempunyai potensi antioksidan selanjutnya diisolasi dan dipisahkan dengan kromatografi kolom menggunakan fasa diam silika gel H₆₀ dan eluen metanol : etil asetat (2 : 8).

Pemisahan fraksi-fraksi hasil kolom ini menghasilkan 5 fraksi yaitu fraksi A, B, C, D, dan E. Hanya fraksi A, B,



Keterangan :
 Senyawa 1, Rf= 0,07
 Senyawa 2, Rf= 0,09
 Senyawa 3, Rf= 0,15
 Senyawa 4, Rf= 0,23
 Senyawa 5, Rf= 0,33
 Senyawa 6, Rf= 0,43
 Senyawa 7, Rf= 0,48
 Senyawa 8, Rf= 0,75
 Senyawa 9, Rf= 0,87

Gambar 2. Hasil kromatografi lapis tipis preparatif fraksi C dengan eluen diklorometan : etilasetat (7 : 3) dilihat pada λ 365 nm

dan C yang diuji aktivitas antioksidannya dengan DPPH karena fraksi D dan E jumlah sampelnya terlalu sedikit untuk dilakukan analisa (Tabel 4). Hasil pengujian menunjukkan Fraksi C yang mempunyai aktivitas antioksidan yang lebih tinggi dari ekstrak awal dengan nilai inhibisi sebesar 69,21 %. Fraksi C selanjutnya dimurnikan dengan kromatografi lapis tipis (KLT) preparatif menggunakan fasa diam silika gel GF₂₅₄ dan eluen diklorometan : etilasetat (7 : 3). Hasil KLT preparatif diperoleh sembilan senyawa dengan pita dan harga Rf yang dapat dilihat pada Gambar 2.

Sembilan senyawa ini kemudian diuji aktivitas peredaman radikalnya masing-masing menggunakan DPPH. Hasil uji penghambatan radikal dengan DPPH menunjukkan senyawa 1 memiliki aktivitas penghambatan paling tinggi sebesar 45,37 % diikuti oleh senyawa 5 sebesar 29,32 %. Meskipun demikian aktivitas masing-masing senyawa ini ternyata lebih rendah dibandingkan dengan aktivitas dari fraksi C (69,21 %) yang merupakan gabungan dari sembilan

Tabel 4. Aktivitas penghambatan radikal DPPH dari ekstrak, fraksi dan senyawa hasil isolasi

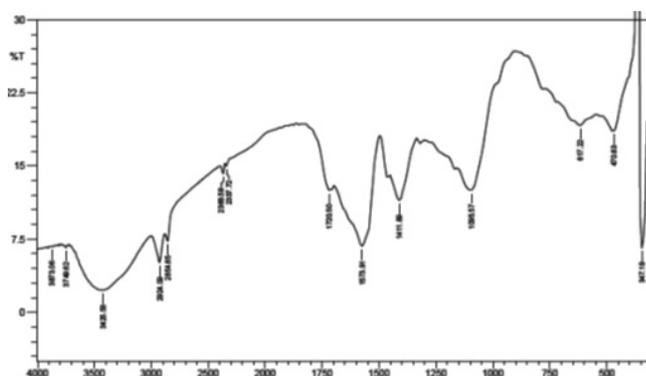
Sampel (1000 µg/mL)	% Hambatan DPPH
Ekstrak metanol	44,51
Fraksi A	10,13
Fraksi B	29,06
Fraksi C	69,21
Senyawa 1	45,37
Senyawa 2	7,87
Senyawa 3	4,58
Senyawa 4	17,74
Senyawa 5	29,32
Senyawa 6	27,77
Senyawa 7	27,77
Senyawa 8	24,49
Senyawa 9	26,23

senyawa ini. Sehingga diduga senyawa-senyawa ini memiliki sifat sinergis saat bergabung dalam fraksi C. Pemisahan fraksi menjadi komponen tunggal ternyata menurunkan aktivitas penghambatan. Menurut Naczki dan Shahidi (2006), sinergisme antara senyawa polifenol dan komponen lain yang ada dalam ekstrak dapat berkontribusi dengan aktivitas antioksidan secara keseluruhan.

Senyawa 1, 5, dan 9 yang mempunyai aktivitas penghambatan yang tinggi selanjutnya akan ditentukan strukturnya menggunakan spektrofotometer UV-Vis dan FT-IR. Analisis spektrum UV-vis dapat digunakan untuk melihat serapan cahaya maksimum dalam penentuan struktur molekul. Berdasarkan data UV-Vis terhadap analisis isolat senyawa 1 diketahui bahwa terdapat dua serapan maksimum yaitu pada panjang gelombang 306 nm (pita II) dan 339 nm (pita I) yang merupakan ciri golongan flavonoid (Markham, 1988). Demikian pula halnya dengan senyawa 5 yang mempunyai serapan maksimum pada panjang gelombang 201 nm (pita II) dan 339 nm (pita I) serta senyawa 9 yang mempunyai serapan maksimum pada panjang gelombang 207 nm (pita II) dan 339 nm (pita I).

Pengujian selanjutnya adalah analisis spektrum IR (Gambar 3). Spektrum IR merupakan jenis spektrum yang bersifat spesifik dan dapat memberikan informasi mengenai gugus-gugus fungsional suatu molekul (Rohman, 2014). Berdasarkan analisis serapan gelombang dapat diketahui pada isolat 1 terdapat gugus-gugus hidroksi (OH), alkil dan aldehyd (C-H) serta karbon aromatis seperti yang ditunjukkan dalam Tabel 5. Hasil analisis IR dari senyawa 5 dan 9 juga ditampilkan dalam tabel sebagai pembandingan.

Bila diperhatikan lebih cermat, masing-masing senyawa isolat yang dipisahkan ternyata mengandung gugus hidroksil pada bilangan gelombang 3550 - 3450 cm^{-1} . Hal ini menunjukkan bahwa jumlah gugus hidroksil mempunyai peranan dalam aktivitas antioksidan senyawa dalam hal ini



Gambar 3. Spektrum IR dari isolat 1

penghambatan radikal bebas. Pemisahan komponen penyusun fraksi menjadi senyawa tunggal dapat menurunkan aktivitas antioksidan karena terpisahnya senyawa-senyawa yang mempunyai gugus hidroksil aktif. Miller dan Rice - Evans (1997) menyebutkan aktivitas antioksidan dari komponen fenolik tergantung dari jumlah dan letak gugus hidroksil yang dapat bertindak sebagai agen pereduksi, pendonor hidrogen dan peredam singlet oksigen.

Hasil analisis serapan bilangan gelombang menunjukkan dugaan senyawa isolat 1, 5 dan 9 adalah senyawa golongan flavonoid. Dugaan ini didasarkan adanya kandungan gugus fungsional aromatis dan gugus hidroksil yang merupakan salah satu ciri senyawa golongan flavonoid.

KESIMPULAN

Bakteri asam laktat yang berhasil diisolasi dalam fermentasi jaruk tigarun adalah *Lactobacillus plantarum*. Fermentasi bunga tigarun menjadi jaruk meningkatkan kandungan total fenolik dan aktivitas antioksidan. Total fenolik dan aktivitas antioksidan paling tinggi terdapat pada

Tabel 5. Analisa gugus fungsi isolat 1, 5 dan 9 dengan spektrofotometer FT-IR

Bilangan gelombang isolat 1	Bilangan gelombang isolat 5	Bilangan gelombang isolat 9	Gugus fungsi
3425,58	3425,58	3425,58	OH ulur yang dapat membentuk ikatan hidrogen
2924,09	2916,37	2924,09	C-H ulur (asimetri)
2854,65	2854,65	2854,65	C-H ulur (simetri)
		1658,78	C=O ulur
1573,91	1566,20	1581,63	C=C aromatik
1411,89			C-H tekuk
		1381,63	O-H tekuk
		1319,31	O-H tekuk
		1026,13	C-O ulur (alkohol primer)

jaruk yang diekstrak dengan metanol yaitu sebesar $53,24 \pm 0,73$ mg GAE/g ekstrak dan $92,68 \pm 0,02$ %. Pemisahan ekstrak menjadi fraksi mampu meningkatkan aktivitas antioksidan namun pemisahan lanjut menjadi komponen tunggal ternyata menurunkan aktivitas antioksidan. senyawa-senyawa yang tergabung dalam fraksi bersifat sinergis. Hasil analisis spektrum UV-Vis dan IR dari senyawa menunjukkan dugaan senyawa flavonoid.

DAFTAR PUSTAKA

- Abdul–Alla, H.I., Shaaban, M., Shaaban, K. A., Abu – Gabal, N. S., Shalaby, N.M. dan Laatsch, H. (2009). Newbioactive compounds from *Aloe hijazensis*. *Natural Product Research* **23**:1035-1049.
- Bhaskar, V. H., Profulla, Kumar, M., Balakrishnan, B. dan Sangameswaran (2009). Evaluation of the anti-fertility activity of stem bark of *Crataeva nurvala* buch-hum. *African Journal of Biotechnology* **8**(22): 6453-6456.
- Bhattacharjee, A., Shashidhara, S.C. dan Aswathanarayana (2012). Phytochemical and ethno-pharmacological profile of *Crataeva nurvala* Buch-Hum (Varuna): a review. *Asian Pasific Journal of Tropical Biomedicine*: S1162-S1168.
- Ciafardini, G., Marsilio, V., Lanza, B. dan Pozzi, N. (1994). Hydrolysis of oleuropein by *Lactobacillus plantarum* strains associated with olive fermentation. *Applied and Environmental Microbiology* **60**: 4142-4147.
- Das, P.K., Rathor, R.K., Lal, R., Tripathi, R.M., Ram, A.M. dan Biswas, M. (1974). Antiinflammatory and antiarthritic activity of *Crataeva nurvala* Buch Ham (Varuna). *Journal Research Indian Medical* **9**: 9-16.
- Di Cagno, R., Surico, R.F., Siragusa, S., De Angelis, M., Paradiso, A., Minervini, F., De Gara, L. dan Gobbetti, M. (2008). Selection and use of autochthonous mixed starter for lactic acid fermentation of carrots, French beans or marrows. *International Journal of Food Microbiology* **127**: 220-228.
- Di Cagno, R., Coda, R., Angelis, M.D. dan Gobbetti, M. (2013). Review Exploitation of vegetables and fruits through lactic acid fermentation. *Food Microbiology* **33** :1-10.
- Djaafar, T.F., Santoso, U., Cahyanto, M.N., Takuya, S., Endang, S.R. dan Kosuke, N. (2013). Effect of indigenous lactic acid bacteria fermentation on enrichment of isoflavon and antioxidant properties of kerandang (*Canavalia virosa*) extract. *International Food Research Journal* **20**(5): 2945-2950.
- Dord-ovic', T.M., Šiler-Marinkovic', S.S. dan Dimitrijevic' -Brankovic', S.I. (2010). Effect of fermentation on antioxidant properties of some cereals and pseudo cereals. *Food Chemistry* **119**(3): 957-963.
- Dueñas, M., Fernández, D., Hernández, T., Estrella, I. dan Muñoz, R. (2005). Bioactive phenolic compounds of cowpeas (*Vigna sinensis* L.). Modifications by fermentation with natural microflora and with *Lactobacillus plantarum* ATCC 14917. *Journal of the Science of Food and Agriculture* **85** (2): 297-304.
- Esaki, H., Onozaki, H., Kawakishi, S. dan Osawa, T. (1996). New Antioxidant Isolated from Tempeh. *Journal of Agriculture and Food Chemistry* **44**: 696-700.
- Gagandeep, Meera dan Kalidhar, S.B. (2009). Chemical investigation of *Crataeva nurvala* (Buch-ham) Fruits. *Indian Journal of Pharmaceutical Science* **71**(2): 129-130.
- Gagandeep, Meera dan Kalidhar, S.B. (2006). Chemical constituents of *Crataeva nurvala* (Buch-ham) leaves. *Indian Journal of Pharmaceutical Science* **68**(2) : 804-806.
- Geetha, T. dan Varalakshmi, P. (1999). Anticomplement activity of triterpenes from *Crataeva nurvala* stem bark in adjuvant arthritis in rats. *General Pharmacology* **32**: 495-497.
- Silva, G.L., Lee, I.K. dan Kinghorn, D. (1998). Special problems with the extraction of plant. *Dalam* : Cannell, R.J.P. *Natural Product Isolation*. Human Press Inc. Totowa, New Jersey.
- Hapip, A.D. (2008). *Kamus Banjar Indonesia*. Cetakan ke VI. CV. Rahmat Hafiz Al Mubaraq. Banjarmasin.
- Hartiningrum, S.Y. (2010). *Pengaruh Pemberian Formula Preda dan Tempe terhadap Lama Penyakit Diare Akut pada Anak Usia 6-24 Bulan. Studi Di RSUD Kartini Kabupaten Jepara Tahun 2010*. Tesis. Universitas Diponegoro. Semarang, Indonesia.
- Hubert, J., Berger, M., Nepveu, F., Paul, F. dan Dayde, J. (2008). Effects of fermentation on the phytochemical composition and antioxidant properties of soy germ. *Food Chemistry* **109**(4) : 709-721.
- Hung, C.Y. dan Yen, G.C. (2000). Effect of alkaline and heat treatment on antioxidative activity and total phenolic of extract from Hsian-tsao (*Mesona procumbens* Hemsl). *Food Research International* **33**: 487-492.
- Katina, K., Laitila, A., Juvonen, R., Liukkonen, K.H., Kariluoto, S. dan Piironen, V. (2007). Bran fermentation as a means to enhance technological properties

- and bioactivity of rye. *Food Microbiology* **24**(2) : 175-186.
- Kumari, A. dan Kakkar, P. (2008). Screening of antioxidant potential of selected barks of Indian Medicinal plants by multiple in vitro assay. *Biomedical and Environmental Sciences* **21**: 24-29.
- Lee, I.H., Hung, Y.H. dan Chou, C.C. (2008). Solid-state fermentation with fungi to enhance the antioxidative activity, total phenolic and anthocyanin contents of black bean. *International Journal of Food Microbiology* **121**(2): 150-156.
- Markham, K.R. (1988). *Cara Mengidentifikasi Flavonoid*. Terjemahan Kosasih Padmawinata. ITB, Bandung.
- Martins, S., Mussatto, S.I., Martinez-Avila, G., Montanez-Saenz, J., Aguilar, C.N. dan Teixeira, J.A. (2011). Bioactive phenolic compounds: Production and extraction by solid-state fermentation. A review. *Biotechnology Advances* **29**(3): 365-373.
- Mathew, S. dan Abraham, T.E. (2006). Studies on the antioxidant activities of cinnamon (*Cinnamomum verum*) bark extracts, through various in vitro models. *Food Chemistry* **94**(4): 520-528.
- Messens, W. dan Vuyst, L.D. (2002). Inhibitory substances produced by *Lactobacilli* isolated from sourdoughs - a review. *International Journal of Food Microbiology* **72**(1-2): 32-43.
- Miller, N.J. dan Rice-Evans, C.A. (1997). Factors influencing the antioxidant activity determined by the ABTS radical cation assay. *Free Radical Research* **26**(3): 195-199.
- Naczki, M. dan Shahidi, F. (2006). Phenolics in cereals, fruits and vegetables: Occurrence, extraction and analysis. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis* **41**(5): 1523-1542.
- Ng, C.C., Wang, C.Y., Wang, Y.P., Tzeng, W.S. dan Shyu, Y.T. (2011). Lactic acid bacterial fermentation on the production of functional antioxidant herbal *Anoectochilus formosanus* Hayata. *Journal of Bioscience and Bioengineering* **111**(3): 289-293.
- Osawa, R.O., Kuroiso, K., Goto, S. dan Shimizu. (2000). Isolation of tannin degrading lactobacilli from humans and fermented foods. *Applied and Environmental Microbiology* **66**(7): 3093-3097
- Othman, N.B., Roblain, D., Chammen, N., Thonart, P. dan Hamdi, M. (2009). Antioxidant phenolic compounds loss during the fermentation of Chetoui olives. *Food Chemistry* **116**(3) : 662-669.
- Otieno, D.O., Ashton, J.F. dan Shah, N.P. (2006). Isoflavone phytoestrogen degradation in fermented soymilk with selected β -glucosidase producing *L. acidophilus* strains during storage at different temperatures. *International Journal of Food Microbiology* **115**(1): 79- 88.
- Paarakh, P.M., Chanda, S., Deepak, M. dan Agarwal, A. (2011). Phytochemical studies on stem bark of *Crataeva nurvala* Ham. *Journal of Pharmacy Research* **4**(2): 401-402.
- Rahmi, N. (2006). Teknologi Proses Fermentasi dan Pengemasan pada Pengolahan Bunga Tigarun. *Laporan Riset DIPA*. Departemen Perindustrian. Baris dan Banjarbaru.
- Rahmi, N., Harmayani, E., Santosa, U. dan Darmadji, P. (2013). The study of 'jaruk' tigarun (*Crataeva nurvala*, HAM), an Indonesian traditional food fermentation derived from South Borneo. *Proceedings of the 2nd International Food Safety Conference*. Kuala Lumpur, Malaysia.
- Rodríguez, H., Curiel, J.A., Landete, J.M., Rivas, B., Felipe, F.L., Cordovés, C.G., Mancheño, J.M. dan Muñoz, R. (2009). Food phenolics and lactic acid bacteria. *International Journal of Food Microbiology* **132**: 79-90.
- Rohman, A. (2014). *Spektroskopi Inframerah dan Kemometrika untuk Analisis Farmasi*. Cetakan I. Pustaka Pelajar, Yogyakarta.
- Sánchez, I., Palop, L. dan Ballesteros, C. (2000). Biochemical characterization of lactic acid bacteria isolated from spontaneous fermentation of "Almagro" eggplants. *International Journal of Food Microbiology* **59**: 9-17.
- Shimizu, Y. (1998). Purification of water-soluble natural products. *Dalam: Cannell, R.J.P. Natural Product Isolation*: Human Press Inc. Totowa, New Jersey.
- Sreeramulu, D. dan Raghunath, M. (2010). Antioxidant activity and phenolic content of roots, tubers and vegetables commonly consumed in India. *Food Research International* **43**: 1017-1020.
- Stiles, M.E. dan Holzapfel, W.H. (1997). Lactic acid bacteria of food and their current taxonomy. *International Journal of Food Microbiology* **36**(1): 1-29.
- Torino, M.I., Limon, R.I., Martinez-Villaluenga, C., Makinen, S., Pihlanto, A. dan Vidal-Valverde, C. (2013). Antioxidant and antihypertensive properties of liquid and solid state fermented lentils. *Food Chemistry* **136**(2): 1030-1037.

- Tosun, M., Ercisli, S., Sengul, M., Ozer, H. dan Polat, T. (2009). Antioxidant properties and total phenolic content of eight *Salvia* species from Turkey. *Biological Research* **42**(2): 175-181.
- Vattem, D.A. dan Shetty, K. (2003). Ellagic acid production and phenolic antioxidant activity in cranberry pomace (*Vaccinium macrocarpon*) mediated by *Lentinusedodes* using a solid-state system. *Process Biochemistry* **39**(3): 367-379.
- Verzelloni, E., Tagliacuci, D. dan Conte, A. (2007). Relationship between the antioxidant properties and the phenolic and flavonoid content in traditional balsamic vinegar. *Food Chemistry* **105**(2): 564-571.
- Verzelloni, E., Tagliacuci, D. dan Conte, A. (2007). Relationship between the antioxidant properties and the phenolic and flavonoid content in traditional balsamic vinegar. *Food Chemistry* **105**(2): 564-571.
- Zhang, Z., Lv, G., Pan, H., Fan, L., Socol, C.R. dan Pandey, A. (2012). Production of powerful antioxidant supplements via solid-state fermentation of wheat (*Triticum aestivum* Linn.) by *Cordyceps militaris*. *Food Technology and Biotechnology* **50**(1): 32-39.