

PERUBAHAN AKTIVITAS ANTIOKSIDAN, KADAR ANTOSIANIN DAN POLIFENOL PADA BEBERAPA TINGKAT KEMASAKAN BUAH DUWET (*Syzygium cumini*) CHANGES OF ANTIOXIDANT ACTIVITY, ANTHOCYANIN AND POLYPHENOL CONTENT AT SEVERAL STAGES OF JAVA PLUM (*Syzygium cumini*) FRUIT MATURITY

Lydia Ninan Lestario ¹⁾, Suparmo ²⁾, Sri Raharjo ²⁾, Tranggono ²⁾

ABSTRACT

*Research on antioxidant activity, anthocyanin, and polyphenol contents of Java plum (*Syzygium cumini*) from several stages of maturity was carried out with three aims: to prove that the fruit contain anthocyanins; to compare antioxidant activity from three stages of fruit maturity; and to examine the possible correlation between maturation and antioxidant activity, anthocyanin and polyphenol contents.*

The fruit pulp was separated from the seed, frozen dried, and kept in freezer. The freeze dried fruit was extracted (macerated) with methanol-HCl 1% for overnight at 4 °C, and filtered with Whatman no 1 to obtain fruit extract.

Anthocyanin-betacyanin testing was used to indicate that the fruit contain anthocyanin. Antioxidant activity test was conducted with ferri-thiocyanate method in linoleic acid emulsion system. Anthocyanin content was determined with pH differential method, while its polyphenol with spectrophotometric method with Folin-Ciocalteu reagent.

The result showed that the fruit contained anthocyanin, ranging from 1,68 mg/g at young stage (green) to 29,39 mg/g at overripe stage (black), and showed that antioxidant activity was influenced by fruit maturity. With regard to fruit maturity, the antioxidant activity of purple, red, and green fruit were 64.75 %, 62.42 %, and 29.86 % respectively; whereas that of BHT was 79.45 %.

It was noted that there were significant correlation between the level of anthocyanins, polyphenols, and the degrees of maturity. As the fruit maturity increased, the anthocyanin increased, but the polyphenol decreased.

The fruit contained considerable amount of anthocyanins and had antioxidant activity that was influenced by stages of maturity. It was indicated that the more mature the fruit the higher anthocyanins and the lower polyphenols concentrations.

Key words: Java plum fruit (*Syzygium cumini*), anthocyanin, polyphenol, antioxidant activity.

PENDAHULUAN

Buah duwet (*Syzygium cumini*) merupakan buah tropis Indonesia yang ketika masak berwarna ungu tua pada kulit dan daging buahnya. Pohonnya seringkali tumbuh di pekarangan, ladang ataupun tumbuh liar di pegunungan, berukuran tinggi besar, sehingga seringkali menjadi kendala

dalam memanennya. Buah ini mempunyai beberapa nama daerah seperti 'duwet', 'jamblang', atau 'jambolan', dan termasuk dalam familia *Myrtaceae* (Steenis dkk., 1981; Verheij dan Coronel, 1992).

Antosianin, yaitu pigmen ungu yang terdapat pada buah duwet juga terdapat pada berbagai macam buah dan sayur. Warna antosianin bisa bervariasi, yaitu: merah, ungu, dan biru. Pigmen ini sebelumnya hanya dikenal manfaatnya sebagai penarik serangga, sehingga membantu dalam penyerbukan bunga dan penyebaran biji; namun akhir-akhir ini banyak hasil penelitian menunjukkan bahwa antosianin mempunyai beberapa manfaat lain, yaitu sebagai sumber antioksidan (Wang dkk., 1997).

Dibandingkan dengan antioksidan sintetik yang banyak disinyalir mempunyai efek toksik (Kikuzaki dan Nakatani, 1993) dan promosi karsinogenesis (Amarowicz, dkk., 2000), antioksidan dari antosianin relatif aman karena buah ini sudah biasa dikonsumsi dan belum pernah ada laporan mengenai efek samping yang ditimbulkannya.

Buah-buah berwarna ungu dari daerah subtropis seperti buah anggur, blue berry, dan strawberry menunjukkan aktivitas antioksidan yang tinggi yang disebabkan oleh antosianinnya (Prior dan Cao, 2000). Wang dkk. (1997) menemukan korelasi positif antara aktivitas antioksidan dan kadar beberapa jenis antosianin (sianidin, delphinidin, malvidin, peonidin, dan pelargonidin). Mazza (1997) juga mencatat banyak laporan mengenai sifat antioksidatif antosianin murni, maupun yang berasal dari ekstrak buah-buahan seperti anggur, currant, raspberry, dan blue berry. Prior dkk. (1998) menemukan bahwa aktivitas antioksidan antosianin 2-6 kali lebih besar dibandingkan antioksidan lain seperti asam askorbat dan glutatation.

Antosianin disintesis dengan kecepatan tinggi pada masa pemasakan buah, dan mencapai maksimum saat buah masak. Pada buah strawberry, produksi antosianin sangat rendah sampai buah berumur 35 hari, kemudian meningkat sangat tajam, mencapai 75% dari konsentrasi akhir dalam 7 hari menjelang buah masak (Gross, 1987).

Oleh sebab itu perlu dilakukan penelitian untuk menggali potensi buah duwet sebagai sumber antioksidan. Sebagai langkah pertama dilakukan uji untuk mengetahui bahwa pigmen ungu pada buah duwet adalah antosianin, selanjutnya tujuan penelitian ini adalah mengetahui kadar antosianin, kadar polifenol, dan aktivitas antioksidan pada beberapa tingkat kemasakan buah duwet.

¹⁾ Fakultas Pertanian, Universitas Kristen Satya Wacana, Jl. Diponegoro 52-60 Salatiga-50711.

²⁾ Fakultas Teknologi Pertanian, Universitas Gadjah Mada, Jl. Sosio Yustisia, Bulaksumur Yogyakarta-55281.

METODE PENELITIAN

Bahan

Buah duwet dari beberapa tingkat kemasakan (tahap kemasakan ditentukan berdasarkan warna kulit buah, yaitu : hijau, hijau-merah, merah, merah tua, ungu muda, ungu tua, hitam) dipetik dari pohonnya pada bulan Oktober 2002, langsung dibawa ke laboratorium. Buah yang rusak dibuang, sedang yang baik dicuci dengan air. Selanjutnya daging buah dipisahkan dari bijinya dengan pisau yang tajam, lalu daging buah dikeringbekukan. Buah kering beku kemudian diblender dan diayak (lolos 8 mesh). Serbuk buah kering beku dari tiap tingkat kemasakan dimasukkan dalam wadah tersendiri, lalu disimpan di freezer (-20 °C) sampai saat digunakan.

Bahan kimia yang digunakan dalam penelitian ini adalah: Metanol, HCL 37 %, NaOH, butanol, asam asetat, etanol, FeCl₂, amonium tiosianat, KH₂PO₄, K₂HPO₄, BHT, KCL, asam sitrat, natrium sitrat, Folin Ciocalteu, natrium karbonat, Tween 20 dibeli dari E. Merck Co. (Darmstadt, Jerman). Asam linoleat 60 % dibeli dari Sigma Chemical Co. (St Louis, MO).

Penyiapan Ekstrak Buah.

Satu gram buah kering beku dimaserasi dalam 60 mL metanol-HCl 1%, pada suhu 4 °C selama semalam, kemudian dilakukan penyaringan dengan Whatman no. 1. Ampas yang masih berwarna keunguan diekstrak lagi dengan 2x20 mL metanol-HCl 1% selama masing-masing 30 menit, filtrat disatukan, dan volume ditingkatkan menjadi 100 mL.

Uji Untuk Memastikan Adanya Antosianin

Uji antosianin dilakukan terhadap ekstrak buah duwet masak (berwarna ungu) dengan tujuan untuk memastikan adanya antosianin (memastikan pigmen ungu pada buah duwet adalah antosianin). Uji ini bersifat kualitatif, dan meliputi beberapa butir, yaitu: ekstrak buah dipanaskan dengan 2 M HCl pada suhu 100 °C selama 5 menit dan diamati perubahan warnanya; ditambah dengan 2 M NaOH tetes demi tetes dan diamati perubahan warnanya; dikromatografi kertas dengan larutan pengembang HCl 1 % dan larutan pengembang BAA (butanol : asam asetat : air = 4:1:5) dan dihitung Rfnya ; diukur absorbansi maksimumnya dalam larutan metanol-HCl 1 %. Hasil-hasil tersebut dicatat dan dicocokkan dengan bel untuk membedakan antosianin dan betasianin (Harborne, 1996).

Kadar Antosianin dan Polifenol

Kadar antosianin diukur dengan metode perbedaan pH (Cheng dan Breen, 1991 dalam Prior dkk., 1998), yaitu mengukur absorbansi ekstrak buah pada pH 1 dan pH 4,5 yang diukur pada $\lambda=510$ dan $\lambda=700$ dan dihitung dengan rumus : $Abs = [(A_{510} - A_{700})_{pH1} - (A_{510} - A_{700})_{pH4,5}]$; dengan koefisien ekstingsi molar sianidin 3-glukosida = 29.600. Masing-masing sampel diulang tiga kali.

Kadar polifenol diukur dengan dengan metode pewarnaan (Povilaityte dan Venskutonis, 2000), yaitu dengan menambahkan reagen 10 % Folin Ciocalteu dan larutan 7,5 % Na karbonat ke dalam ekstrak buah. Setelah

didiamkan selama 30 menit, diukur absorbansinya pada $\lambda=765$ nm. Dibuat juga larutan standar dengan cara yang sama dengan asam pirogalat. Masing-masing sampel diulang tiga kali.

Aktivitas Antioksidan (metode feritiosianat)

Ekstrak buah dari tingkat kemasakan mentah (hijau), setengah matang (merah), dan masak (ungu) dengan konsentrasi 200 ppm dicampurkan kepada emulsi asam linoleat. Emulsi asam linoleat dibuat dengan cara mencampurkan 0,2840 g asam linoleat, 0,2804 g Tween 20, dan 50 mL bufer fosfat pH 7, kemudian dihomogenisasi. Campuran diinkubasi pada suhu 37 °C. Sejumlah 0,1 mL alikot diambil setiap 24 jam, ditambah dengan etanol (4,7 mL, 75 %), amonium tiosianat (0,1 mL, 30 %), dan FeCl₂ (0,1 mL, 0,02M dalam 3,5 % HCL). Sesudah didiamkan selama 3 menit, nilai peroksida diukur dengan membaca absorbansinya pada spektrofotometer pada $\lambda=520$ nm. Kontrol dibuat dengan asam linoleat, tetapi tanpa sampel; sebagai pembanding dibuat juga emulsi asam linoleat yang diberi BHT (antioksidan sintetik) dengan konsentrasi 200 ppm. Masing-masing sampel diulang dua kali. Setiap 24 jam diambil 0,1 mL sampel sampai dua hari sesudah absorbans kontrol mencapai maksimum (Yen dan Hsieh, 2000).

Aktivitas antioksidan dihitung dengan membandingkan kenaikan absorbansi sampel sejak hari pertama sampai hari saat absorbansi kontrol mencapai maksimum terhadap kenaikan absorbansi kontrol sejak hari pertama sampai saat absorbansi kontrol mencapai maksimum, dikalikan 100 %. Untuk lebih jelasnya dinyatakan dengan rumus : Akt. Antioksidan = $[100 - (\text{selisih absorbansi sampel} / \text{selisih absorbansi kontrol})] \times 100 \%$ (Duh, 1998).

HASIL DAN PEMBAHASAN

Uji Untuk Memastikan Adanya Antosianin

Uji antosianin dilakukan terhadap ekstrak buah masak (ungu) secara kualitatif untuk memastikan bahwa pigmen ungu pada buah duwet adalah antosianin. Hasil uji menunjukkan bahwa pigmen ungu pada buah duwet adalah antosianin (Tabel 1). Semua butir dari no 1 sampai no 5 memenuhi syarat antosianin, dan bukan betasianin yang juga berwarna merah dan bersifat polar, namun keduanya tidak pernah berada bersama-sama dalam satu tanaman (Harborne, 1996).

No.	Testing	Anthocyanin	Betacyanin	Results
1.	Heating with 2 M HCl, 100 °C for 5 minutes	Stable Red	Colorless	Stable Red
2.	Addition of 2 M NaOH by drops	Green	Yellow	Green
3.	Paper Chromatography with HCl 1 % as eluent	Rf low to medium	Rf high	Rf : 13 - 31
4.	Paper Chromatography with BAW as eluent	Rf medium (10-40)	Rf very low (00-10)	Rf : 31 - 43,5
5.	Maximum absorbance in metanol-HCl 1 %	505-535 nm	532-554	530 nm

Karena hasil uji ini positif, maka penelitian dilanjutkan ke tahap berikutnya yaitu mengukur kadar antosianin secara kuantitatif pada beberapa tingkat kemasakan buah duwet dengan metode perbedaan pH (Prior, dkk., 1998)

Kadar Antosianin pada Beberapa Tingkat Kemasakan Buah Duwet

Hasil pengukuran kadar antosianin ekstrak buah duwet dari beberapa tingkat kemasakan dapat dilihat pada Tabel 2.

Table 2. Anthocyanin Content of Duwet Fruit at Several Different Steps of Maturity

Step of Maturity	Anthocyanin (mg/g freeze dried fruit)
Green	1,68 ± 0,03
Green-red	3,05 ± 0,10
Pink	4,32 ± 0,08
Red	5,96 ± 0,07
Light Purple	7,85 ± 0,12
Dark purple	12,16 ± 0,08
Black	29,39 ± 0,36

Data pengukuran kadar antosianin menunjukkan bahwa kadar antosianin makin meningkat sejalan dengan meningkatnya kemasakan buah duwet. Hal ini sejalan dengan penampakan buah secara visual yang warnanya makin ungu pada saat makin masak, dan sesuai dengan pustaka yang menyatakan bahwa antosianin disintesa dengan kecepatan tinggi pada saat pemasakan buah, dan mencapai maksimum saat buah masak penuh (Gross, 1987).

Kadar Polifenol pada Beberapa Tingkat kemasakan Buah Duwet.

Hasil pengukuran kadar polifenol ekstrak buah duwet dari beberapa tingkat kemasakan dapat dilihat pada Tabel 3.

Table 3. Polyphenol Content of Duwet Fruit at Several Different Steps of Maturity

Steps of Maturity	Polyphenol (mg/g g freeze dried fruit))
Green	138,62 ± 0,47
Green-red	133,80 ± 0,69
Pink	112,47 ± 0,26
Red	93,12 ± 0,14
Light Purple	78,51 ± 0,11
Dark purple	75,45 ± 0,12
Black	58,93 ± 0,12

Dalam pengukuran kadar polifenol ini, asam pirogalat digunakan sebagai larutan standar yang menghasilkan persamaan $Y = 0,0215 + 13,075 X$. Hasilnya menunjukkan bahwa kadar polifenol makin menurun sejalan dengan makin meningkatnya kemasakan buah duwet. Hal ini berlawanan dengan kadar antosianin yang makin meningkat sejalan dengan meningkatnya kemasakan buah. Penurunan kadar polifenol selama pemasakan juga terjadi pada buah *blackberry* dan *strawberry* (Wang dan Lin, 2000). Konsentrasi senyawa-senyawa fenol biasanya lebih tinggi pada buah yang masih muda dibandingkan buah yang sudah masak, kecuali antosianin, yang biasanya terakumulasi selama pemasakan pada buah-buah berwarna merah (Kahkonen dkk.,2001).

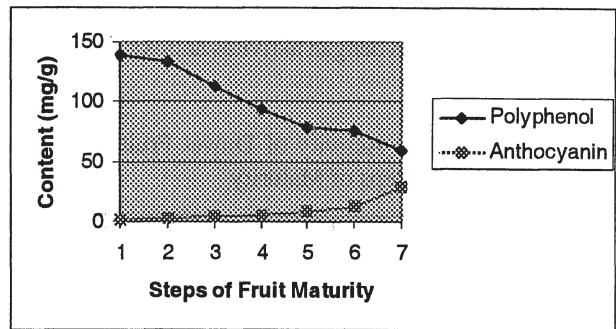


Figure 1. Anthocyanin dan Polyphenol Content of Duwet Fruit at Several Different Steps of Maturity.

Aktivitas Antioksidan pada Beberapa Tingkat Kemasakan Buah Duwet

Pengukuran aktivitas antioksidan yang dilakukan dengan metode feritiosianat didasarkan pada terbentuknya peroksida yang merupakan hasil oksidasi asam linoleat. Peroksida ini akan mengoksidasi ion fero menjadi feri, dan kemudian membentuk feritiosianat yang dapat diukur secara kuantitatif dengan mengukur absorbansinya pada $\lambda = 520$. Makin tinggi absorbans menunjukkan makin tingginya jumlah peroksida, yang berarti oksidasi asam linoleat makin tinggi. Gambar 2 menunjukkan oksidasi asam linoleat tertinggi terdapat pada kontrol (tidak diberi ekstrak buah); diikuti dengan sampel buah duwet mentah (hijau), belum masak (merah), masak (ungu), dan yang terendah adalah BHT (Butylated hidroksitoluen) yang merupakan antioksidan sintetik. Dapat disimpulkan bahwa ekstrak buah duwet dapat menurunkan oksidasi asam linoleat, yang dipengaruhi oleh tingkat kemasakan buah. Makin masak buah, kemampuannya menurunkan oksidasi asam linoleat makin besar. Pada buah duwet masak (ungu) kemampuannya untuk menurunkan oksidasi asam linoleat hampir setara dengan BHT, sebagai antioksidan sintetik yang masih banyak digunakan.

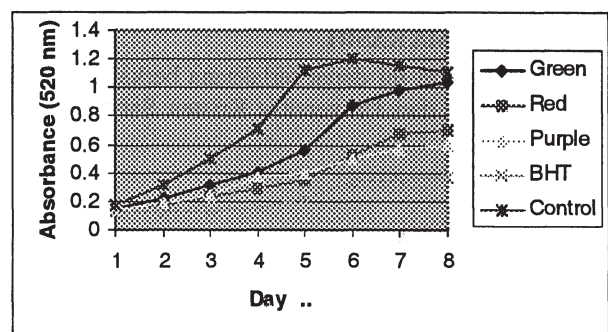


Figure 2. Absorbance at 520 nm from Several Different Steps of Fruit Maturity

Hasil perhitungan aktivitas antioksidan pada Tabel 4 menunjukkan hasil yang sama, yaitu bahwa ekstrak buah duwet mempunyai aktivitas sebagai antioksidan yang dipengaruhi oleh tingkat kemasakan. Buah mentah (hijau) aktivitas antioksidannya paling rendah, buah belum masak (merah) aktivitas antioksidannya lebih tinggi, buah masak

(ungu tua) yang biasa dikonsumsi aktivitas antioksidannya tertinggi. Aktivitas antioksidan pada buah yang berwarna ungu tua hampir sama dengan aktivitas antioksidan sintetik BHT.

Table 4. Antioxidant Activity of Duwet Fruit at Several Different Steps of Maturity

Steps of Maturity	Antioxidant Activity (% inhibition of linoleic acid oxidation)
Green	29,86 ± 0,59
Red	47,81 ± 0,54
Purple	64,75 ± 0,11
BHT (synthetic antioxidant)	79,45 ± 0,57

Data-data pada penelitian ini menunjukkan bahwa makin masak buah duwet kadar antosianinnya yang makin tinggi, kadar polifenolnya makin rendah, dan aktivitas antioksidannya makin tinggi. Dari persamaan regresi sederhana dari 3 tahap kemasakan buah duwet, diperoleh korelasi positif antara aktivitas antioksidan terhadap kadar antosianin, yaitu $Y = 28,94 + 3,06 X$, dengan nilai $r = 0,96$; dan korelasi negatif antara aktivitas antioksidan terhadap kadar polifenol, yaitu $Y = 106,90 - 0,55 X$, dengan nilai $r = 0,99$.

Antosianin pada buah-buah berwarna merah dan ungu memang sering berperan dalam menentukan aktivitas antioksidan, misalnya pada buah *berry* masak (Wang dan Lin, 2000). Hubungan linier antara aktivitas antioksidan dan kadar antosianin juga terdapat pada buah *Vaccinium* (Prior, dkk, 1998).

KESIMPULAN

Dari hasil penelitian ini dapat disimpulkan bahwa pigmen ungu pada buah duwet adalah antosianin; makin masak buah duwet, makin tinggi kadar antosianinnya, makin rendah kadar polifenolnya, dan makin tinggi aktivitas antioksidannya.

UCAPAN TERIMA KASIH

Penelitian ini dapat terlaksana berkat dukungan dana penelitian dari Universitas Kristen Satya Wacana, Salatiga.

DAFTAR PUSTAKA

Amarowicz, R., M. Naczek, dan F. Shahidi. 2000. Antioxidant activity of crude tannins of Canola and Rapeseed hulls. *JAOC*S, Vol. 77 (9): 957-961.

Aruoma, O.I. dan S. Cupett, 1997. *Antioxidant Methodology. In vivo and in vitro Concepts*. AOCS Press, Champaign, Illionis.

Duh, P.D., 1998. Antioxidant Activity of Burdock (*Arctium lappa* Linné): Its Scavenging Effect on Free-Radical and Active Oxygen. *JAOC*S Vol. 75 (4): 455-461.

Gross, J. 1987. *Pigments in Fruits*. Academic Press, London.

Harborne, J.B., 1996. *Metode Fitokimia*. ITB, Bandung.

Kahkonen, M.P., A.I. Hopia, dan M. Heinonen, 2001. Berry phenolics and their antioxidant activity. *J. Agric Food Chem.* 49 (8): 4076-4082.

Kikuzaki, H. dan N. Nakatani. 1993. Antioxidant effects of some ginger constituents. *J. Food Sci.* 58 (6): 1407-1410.

Povilaityte, V. dan P.R. Venskutonis. 2000. Antioxidative activity of Purple Peril, Moldavian Dragonhead, and Roman Chamomile extracts in Rapeseed Oil. *JAOC*S Vol. 77 (9): 951-956.

Prior, R.L., Cao, G., Martin A., Soffic E., McEwen J., O'Brien C., Lischner N., Ehlenfeldt M., Kalt W., Krewer G., Mainland C.M., 1998. Antioxidant capacity as influenced by total phenolic and anthocyanin content, maturity and variety of *Vaccinium* species. *J. Agric. Food Chem.* 46:2686-2693.

Prior, R.L. dan G. Cao. 2000. Antioxidant phytochemicals in fruits and vegetables : diet and health implications. *Hort. Science.* 35 (4):588-592.

Shahidi, F. 1997. *Natural Antioxidants : Chemistry, Health Effects, and Applications*. AOCS Press, Champaign, Illionis.

Steenis, van C.G.G.J., S. Bloembergen; P.J. Eyma, 1981. *Flora of Java, Pradnya Paramita*, Jakarta.

Verheij, E.W.M. dan R.E. Coronel, 1992. *Plant Reseources of South-East Asia 2 : Edible Fruits and Nuts*. Prosea Foundation, Bogor, Indonesia.

Wang, H., G. Cao, dan R. L. Prior, 1997. Oxygen radical absorbing capacity of anthocyanins. *J. Agric Food Chem.* 45: 30.

Wang, S.Y. dan H-S Lin, 2000. Antioxidant Activity in Fruits and Leaves of Blackberry, Raspberry, and Strawberry Varies with Cultivar and Developmental Stage. *J. Agric Food Chem.* 48 (2): 140-146.

Yen, G. dan C. Hsieh, 2000. Reactive oxygen species scavenging activity of Du-zhong (*Eucommia ulmoides* Oliv.) and its active compounds, *J. Agric. Food Chem.* 48:3431-3436.