

PENGARUH PROPORSI AIR DAN ETANOL SEBAGAI PELARUT TERHADAP AKTIVITAS ANTIOKSIDAN ANGKAK BIJI DURIAN DENGAN METODE *PHOSPHOMOLYBDENUM* DAN DPPH

(Effect of proportion of water and ethanol as solvent on antioxidant activity of durian seeds angkak with phosphomolybdenum and DPPH methods)

Christine Subianto^{a*}, Ignatius Srianta^a, Netty Kusumawati^a

^a Fakultas Teknologi Pertanian, Universitas Katolik Widya Mandala Surabaya, Indonesia

* Penulis korespondensi
Email: christine.subianto@gmail.com

ABSTRACT

Angkak is rice fermented product by *Monascus sp.* Beside rice, durian seeds can be a substrate of *Monascus sp.* *Monascus sp.* produces some antioxidant metabolites during fermentation. The purpose of this research investigated the effect of proportion of water and ethanol as solvent for antioxidant activity of durian seeds angkak with phosphomolybdenum and DPPH method. The proportions of water and ethanol as solvents were 100:0 (E0) ; 80:20 (E20) ; 60:40 (E40) ; 40:60 (E60) ; 30:70 (E70) ; and 20:80 (E80) (v/v). ANOVA's result ($\alpha=5\%$) showed that proportion of water and ethanol as solvent interacted pigment content and antioxidant activity of durian seeds angkak. Yellow pigment was dominant pigmen in durian seeds angkak. Ethanol 40% was most effective solvent and ethanol 80% was not effective solvent to extraction durian seeds angkak pigment. The higher antioxidant activity of durian seeds angkak was ethanol 40% (0,5876 mg AAE/g sample (wb)) for DPPH method and ethanol 0% (6,7899 mg AAE/g sample (wb) and 6,4247 mg GAE/g sample (wb)) for phosphomolybdenum method.

Keywords: water, ethanol, antioxidant activity, durian seeds angkak

ABSTRAK

Angkak merupakan produk fermentasi dari beras oleh *Monascus sp.* Substrat selain beras yang dapat digunakan yaitu biji durian. *Monascus sp.* selama fermentasi memproduksi senyawa metabolit, beberapa diantaranya memiliki aktivitas antioksidan. Tujuan penelitian ini adalah untuk mengetahui pengaruh proporsi air dan etanol terhadap aktivitas antioksidan angkak biji durian dengan metode *phosphomolybdenum* dan DPPH. Proporsi air dan etanol yang digunakan meliputi 100:0 (E0) ; 80:20 (E20) ; 60:40 (E40) ; 40:60 (E60) ; 30:70 (E70) ; dan 20:80 (E80) (v/v). Hasil ANOVA ($\alpha = 5\%$) menunjukkan adanya pengaruh antara perlakuan proporsi air dan etanol sebagai pelarut terhadap kadar pigmen dan aktivitas antioksidan angkak biji durian. Hasil pengujian analisis kadar pigmen didapatkan bahwa pigmen kuning merupakan pigmen yang paling dominan pada angkak biji durian. Pelarut yang paling efektif untuk melarutkan pigmen angkak biji durian yaitu etanol 40%, sedangkan pelarut yang kurang efektif yaitu etanol 80%. Hasil pengujian analisis aktivitas antioksidan didapatkan bahwa aktivitas antioksidan angkak biji durian yang paling tinggi yaitu pada pelarut etanol 40% (0,5876 mg AAE/g sampel (wb)) untuk metode DPPH dan etanol 0% (6,7899 mg AAE/g sampel (wb) dan 6,4247 mg GAE/g sampel (wb)) untuk metode *phosphomolybdenum*.

Kata kunci: air, etanol, aktivitas antioksidan, angkak biji durian

PENDAHULUAN

Stres oksidatif merupakan keadaan karena terjadi perubahan keseimbangan antara kapasitas pro-oksidan dan antioksidan. Sel dalam tubuh memiliki antioksidan alami, namun saat tubuh mengalami stres oksidatif diperlukan asupan antioksidan tambahan untuk menjaga kecukupan antioksidan dalam tubuh. Sumber-sumber antioksidan dapat berupa antioksidan sintetik maupun antioksidan alami. Salah satu bahan pangan sumber antioksidan alami yang banyak dikembangkan yaitu angkak. Angkak merupakan produk fermentasi dari beras (substrat yang mengandung pati) oleh *Monascus sp.* (Pattanagul *et al.*, 2007). *Monascus sp.* selama fermentasi akan menghasilkan berbagai macam senyawa metabolit, termasuk senyawa antioksidan. Angkak secara tradisional diproduksi secara fermentasi padat dengan beras sebagai substrat yang mengandung pati (Srianta *et al.*, 2012). Banyak substrat lain yang dapat digunakan sebagai media pertumbuhan *Monascus*, salah satunya yaitu biji durian.

Penelitian ini dilakukan untuk mengetahui aktivitas antioksidan angkak yang diproduksi dari biji durian. Analisis antioksidan yang digunakan yaitu metode *phosphomolybdenum* dan DPPH (1,1-difenil-2-pikrilhidrazil). Metode DPPH merupakan metode yang umum digunakan dalam menganalisis aktivitas antioksidan. Kedua metode ini memiliki mekanisme yang berbeda saat bereaksi dengan antioksidan, sehingga hasil pengukuran aktivitas antioksidan dengan kedua metode ini dapat digunakan untuk memprediksi mekanisme kerja senyawa antioksidan dalam angkak biji durian.

Analisis aktivitas antioksidan dilakukan dengan mengekstraksi hasil metabolit *Monascus* dalam angkak biji durian. Pelarut yang digunakan untuk mengekstrak hasil metabolit *Monascus sp.* dalam penelitian ini adalah etanol dalam berbagai macam konsentrasi. Etanol merupakan pelarut yang sering digunakan karena harganya yang lebih murah dan

tidak bersifat toksik. Konsentrasi etanol yang digunakan yaitu 0, 20, 40, 60, 70, dan 80%. Penetapan konsentrasi etanol yang digunakan berdasarkan penelitian-penelitian lain mengenai angkak, penelitian-penelitian tersebut menggunakan konsentrasi etanol yang berbeda satu sama lain. Penelitian ini bertujuan untuk mengetahui pengaruh proporsi air dan etanol sebagai pelarut terhadap aktivitas antioksidan angkak biji durian dengan metode *phosphomolybdenum* dan DPPH.

BAHAN DAN METODE

Bahan

Bahan-bahan yang digunakan dalam pembuatan dan ekstraksi angkak biji durian adalah biji durian varietas Petruk, kultur murni *Monascus sp.* KJR 2, *Sabouraud 4% Dextrose Agar* (Merck 1.05438.0500), *Sabouraud 2% Dextrose Broth* (Merck 1.08339.0500), larutan Ca(OH)_2 5% (b/v), akuades, etanol p.a (Merck 1.00983.0000), *aluminium foil*, kertas saring kasar, kertas *Whatman no.1* (Schleicher & Schuell), dan kertas cokelat. Bahan-bahan yang digunakan untuk analisis meliputi: *Sabouraud 4% Dextrose Agar* (Merck 1.05438.0500) dan NaCl 0,85%, metanol p.a (Merck 1.06009.2500), serbuk DPPH (Sigma Aldrich D9132-1G), asam galat (Merck 1.59630.0001), vitamin C (Sigma A5960-100G), akuades, kertas lensa, dan *aluminium foil*, asam sulfat pekat, kristal Na_3PO_4 , kristal amonium molibdat, asam galat (Merck 1.59630.0001), dan vitamin C (Sigma A5960-100G).

Pembuatan Kultur Starter *Monascus sp.* KJR 2

Monascus sp. KJR 2 dalam 100 mL media SDB steril. SDB yang telah diinokulasi, kemudian diinkubasi pada suhu kamar ($30 \pm 1^\circ\text{C}$) selama 10 hari.

Pembuatan Angkak Biji Durian

Biji durian mula-mula disortasi, dicuci, ditimbang, dan direbus dalam air kapur 5% (b/v): air yaitu 1:1. Perebusan dilakukan pada suhu $85-90^\circ\text{C}$ selama 10 menit. Biji

durian kemudian dicuci (dengan air mengalir), dikupas, dipotong ($\pm 1 \text{ cm}^3$), ditimbang, disterilisasi, dan didinginkan. Inokulasi dilakukan dengan menambahkan 6% (v/b) kultur starter pada biji durian, lalu diinkubasi pada suhu kamar ($30 \pm 1^\circ\text{C}$) selama 14 hari. Angkak biji durian kemudian dikeringkan pada suhu 45°C selama 24 jam dan dilakukan pengecilan ukuran.

Ekstraksi Angkak Biji Durian dan Biji Durian

Bubuk angkak biji durian dan biji durian mula-mula ditimbang dan ditambahkan pelarut (1:25) berupa akuades (E0), etanol 20% (E20), etanol 40% (E40), etanol 60% (E60), etanol 70% (E70), dan etanol 80% (E80). Kemudian dihomogenisasi dengan *shaking waterbath* ($30 \pm 1^\circ\text{C}$, 200 rpm, 1 jam) dan disentrifugasi (27°C , 5000 rpm, 30 menit). Supernatan kemudian disaring dengan kertas saring *Whatman* no.1. Ekstrak akan digunakan untuk analisis kadar pigmen, analisis total fenol, dan analisis antioksidan.

Analisis Kadar Pigmen

Ekstrak angkak dan biji durian dengan berbagai macam konsentrasi etanol sebagai pelarut masing-masing sebanyak $\pm 4 \text{ mL}$ dimasukkan dalam kuvet dan diukur absorbansinya pada $\lambda = 392 \text{ nm}$ (pigmen kuning), $\lambda = 470 \text{ nm}$ (pigmen oranye), $\lambda = 501 \text{ nm}$ (pigmen merah), dan $\lambda = 517 \text{ nm}$ (untuk koreksi data analisis DPPH). Data absorbansi ini kemudian dinyatakan dalam satuan *Absorbance Unit* per gram sampel (AU/g).

Analisis Aktivitas Antioksidan dengan metode DPPH

Sampel (ekstrak angkak biji durian dan biji durian)/standar sebanyak 3,8 mL ditambahkan 0,2 mL larutan DPPH (50 mg dalam 100 mL atau 500 ppm) dalam tabung reaksi dan didiamkan (ruang gelap) selama 30 menit, kemudian diukur absorbansinya pada $\lambda = 517 \text{ nm}$. Standar yang digunakan dalam analisis ini yaitu vitamin C dengan

konsentrasi 0, 3, 4, 5, 10, dan 15 ppm. Aktivitas antioksidan sampel yang diukur dinyatakan dalam ekuivalen miligram vitamin C per gram sampel (mg AAE/g (wb)).

Analisis Aktivitas Antioksidan dengan Metode *Phosphomolybdenum*.

4 mL *mixed solution* (0,6 M H_2SO_4 , 28 mM Na_3PO_4 , dan 4 mM Amonium Molibdat) dimasukkan dalam tabung reaksi dan ditambahkan 0,4 mL sampel/standar, kemudian dihomogenisasi dan diinkubasi selama 60 menit pada suhu 95°C . Setelah inkubasi, dilakukan pengukuran absorbansi sampel pada $\lambda = 725 \text{ nm}$. Standar yang digunakan untuk analisis yaitu asam galat dan vitamin C dengan konsentrasi 100, 200, 300, 400, dan 500 ppm. Aktivitas antioksidan dalam angkak biji durian dinyatakan dalam miligram ekuivalen miligram asam galat (GAE) per gram sampel (mg GAE/g) dan vitamin C per gram sampel (mg AAE/g (wb)).

HASIL DAN PEMBAHASAN

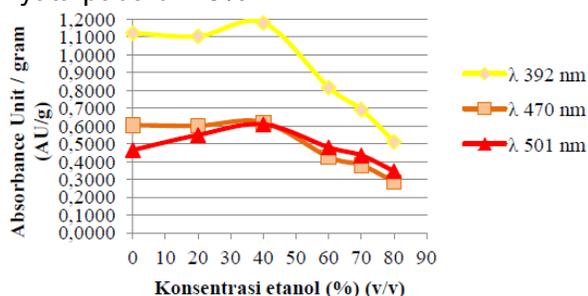
Berdasarkan hasil penelitian (Gambar 1. dan Tabel 1.), didapatkan bahwa pigmen kuning merupakan pigmen yang paling dominan dibandingkan pigmen yang lain pada angkak biji durian. Puspitadewi (2012) dalam penelitiannya juga menyatakan pigmen kuning merupakan pigmen yang dominan diproduksi oleh *Monascus sp.* KJR 2 pada media biji durian Petruk. Pelarut yang paling efektif untuk melarutkan pigmen angkak biji durian yaitu etanol 40% (v/v). Ankaflavin (pigmen kuning) merupakan senyawa polar, dimana senyawa ini memiliki atom O yang dapat berikatan dengan atom H yang ada pada etanol 40% dengan ikatan hidrogen. Menurut Timotius (2004), pigmen merah, kuning, dan oranye memiliki kelarutan yang rendah dalam air. Jika pigmen-pigmen tersebut bereaksi dengan gugus amino akan menghasilkan cincin piran sehingga larut dalam air. Dengan demikian diduga bahwa pigmen yang diproduksi oleh

Monascus sp. Selama fermentasi bereaksi dengan gugus amino pada biji durian yang mengandung protein sebesar 2,6% (Srianta *et al.*, 2012) sehingga kelarutannya dalam air meningkat. Namun keterbatasan jumlah gugus amino dalam biji durian menyebabkan kelarutan dalam air tidak terlalu tinggi, sehingga lebih larut pada etanol 40%. Selain itu juga terdapat pigmen-pigmen lain yang larut pada etanol 40%.

Tabel 1. Kadar Pigmen Angkak Biji Durian

Perlakuan	Pigmen Kuning (AU/g)	Pigmen Oranye (AU/g)	Pigmen Merah (AU/g)
E0	1,1213 ^d	0,6038 ^d	0,4643 ^c
E20	1,1033 ^d	0,6008 ^d	0,5483 ^d
E40	1,1784 ^e	0,6198 ^e	0,6075 ^e
E60	0,8153 ^c	0,4253 ^c	0,4788 ^c
E70	0,6910 ^b	0,3800 ^b	0,4340 ^b
E80	0,5107 ^a	0,2865 ^a	0,3458 ^a

Keterangan: Notasi yang berbeda pada kolom yang sama menunjukkan perbedaan nyata pada $\alpha = 5\%$



Gambar 1. Analisis Kadar Pigmen Angkak Biji Durian

Aktivitas antioksidan angkak biji durian dengan metode DPPH yang paling tinggi yaitu 0,5876 mg AAE/g sampel (wb) pada pelarut etanol 40% (v/v) (E40) (Tabel 2). Dengan demikian pelarut yang paling efektif untuk melarutkan senyawa-senyawa antioksidan pada angkak biji durian yaitu etanol 40%, sedangkan pelarut yang kurang efektif untuk melarutkan yaitu etanol 0% atau akuades ketika diuji dengan metode DPPH. Hal tersebut berkaitan dengan kelarutan senyawa antioksidan, struktur antioksidan, dan kepolaran senyawa antioksidan tersebut. Menurut Kurnia (2010) daya melarutkan yang tinggi berhubungan dengan kepolaran pelarut dan kepolaran senyawa yang diekstraksi.

Pelarut yang bersifat polar mampu mengekstrak senyawa alkaloid kuartener, komponen fenolik, karotenoid, tanin, gula, asam amino, dan glikosida (Harborne, 1987). Selain itu, senyawa golongan flavonoid bersifat polar, sehingga larut pelarut yang bersifat polar.

Aktivitas antioksidan angkak biji durian yang paling tinggi yaitu pada etanol 0% (v/v) (E0) dengan nilai 6,7899 mg AAE/g sampel (wb) dan 6,4247 mg GAE/g sampel (wb). Sedangkan aktivitas antioksidan yang paling rendah ditunjukkan pada etanol 80% (v/v) (E80) dengan nilai 3,9452 mg AAE/g sampel (wb) dan 3,8150 mg GAE/g sampel (wb) (Tabel 2). Hal tersebut dikarenakan perbedaan jumlah dan senyawa yang terlarut dalam tiap-tiap pelarut. Selama pengujian dengan metode *phosphomolybdenum* terjadi pemanasan yaitu pada tahap inkubasi pada suhu 95°C selama 60 menit. Berdasarkan adanya pemanasan tersebut, maka diduga bahwa senyawa antioksidan yang terdapat dalam angkak biji durian yang diukur aktivitas antioksidannya dengan metode *phosphomolybdenum* merupakan senyawa antioksidan yang tahan panas, seperti lovastatin dan pigmen kuning.

Tabel 2. Aktivitas Antioksidan Angkak Biji Durian dengan Metode DPPH dan *Phosphomolybdenum*

Perlakuan	DPPH (mg AAE/g (wb))	<i>Phosphomolybdenum</i>	
		mg AAE/g (wb)	mg GAE/g (wb)
E0	0,3366 ^a	6,7899 ^e	6,4247 ^e
E20	0,4314 ^b	6,3796 ^d	5,9753 ^d
E40	0,5876 ^e	6,1514 ^d	5,7253 ^d
E60	0,5292 ^c	5,5519 ^c	5,5747 ^c
E70	0,5609 ^d	5,1357 ^b	5,1188 ^b
E80	0,5061 ^c	3,9452 ^a	3,8150 ^a

Keterangan: Notasi yang berbeda pada kolom yang sama menunjukkan perbedaan nyata pada $\alpha = 5\%$

Berdasarkan Tabel 3. dan Tabel 4. didapatkan bahwa kadar pigmen kuning, oranye, merah, serta aktivitas antioksidan dengan metode DPPH pada biji durian lebih rendah dibandingkan pada angkak biji durian. Hal ini membuktikan bahwa selama

fermentasi, *Monascus sp.* menghasilkan senyawa metabolit berupa pigmen dan senyawa-senyawa antioksidan.

Berdasarkan Tabel 4., didapatkan bahwa pada pelarut etanol 0, 20, 40, dan 60%, aktivitas antioksidan biji durian dengan metode *phosphomolybdenum* lebih tinggi dibandingkan angkak biji durian. Sedangkan pada pelarut 70 dan 80% aktivitas antioksidan angkak biji durian lebih tinggi dibandingkan biji durian. Hal ini dikarenakan senyawa-senyawa antioksidan yang terkandung dalam biji durian maupun yang

diproduksi oleh *Monascus sp.* selama fermentasi memiliki karakteristik yang berbeda yaitu peka terhadap pH, cahaya, panas serta kelarutan yang berbeda. Berdasarkan data yang didapat, biji durian mengandung senyawa antioksidan berupa senyawa fenol yang diduga memberikan kontribusi aktivitas antioksidan pada angkak biji durian. Dengan demikian senyawa antioksidan yang ada pada angkak biji durian selain berasal dari hasil metabolit *Monascus sp.*, juga berasal dari biji durian.

Tabel 3. Kadar Pigmen Biji Durian dan Angkak Biji Durian

Perlakuan	Pigmen Kuning (AU/g)		Pigmen Oranye (AU/g)		Pigmen Merah (AU/g)	
	Angkak	Biji	Angkak	Biji	Angkak	Biji
E0	1,1213	0,2773	0,6038	0,1505	0,4643	0,1263
E20	1,1033	0,2866	0,6008	0,1740	0,5483	0,1430
E40	1,1784	0,2568	0,6198	0,1380	0,6075	0,1110
E60	0,8153	0,1618	0,4253	0,0890	0,4788	0,0868
E70	0,6910	0,1351	0,3800	0,0865	0,4340	0,0720
E80	0,5107	0,0823	0,2865	0,0667	0,3458	0,0559

Tabel 4. Aktivitas Antioksidan Biji Durian dan Angkak Biji Durian dengan Metode DPPH dan *Phosphomolybdenum*

Perlakuan	DPPH		<i>Phosphomolybdenum</i>			
	Angkak	Biji	Angkak	Biji	Angkak	Biji
	mg AAE/g (wb)	mg AAE/g (wb)	mg AAE/g (wb)	mg GAE/g (wb)	mg AAE/g (wb)	mg GAE/g (wb)
E0	0,3366	0,2362	6,7899	6,4247	9,1568	9,0170
E20	0,4314	0,3243	6,3796	5,9753	7,5902	7,3012
E40	0,5876	0,4942	6,1514	5,7253	8,0114	7,7625
E60	0,5292	0,4980	5,5519	5,5747	5,8552	5,4009
E70	0,5609	0,4922	5,1357	5,1188	5,0295	5,0025
E80	0,5061	0,4940	3,9452	3,8150	2,3970	2,1193

KESIMPULAN

Pigmen kuning merupakan pigmen dominan dalam angkak biji durian. Pelarut yang paling efektif untuk melarutkan pigmen angkak biji durian yaitu etanol 40%. Aktivitas antioksidan angkak biji durian dengan metode DPPH yang paling tinggi yaitu 0,5876 mg AAE/g sampel pada pelarut etanol 40%, sedangkan dengan metode *phosphomolybdenum* yaitu pada etanol 0% dengan nilai 6,7899 mg AAE/g (wb) sampel dan 6,4247 mg GAE/g (wb) sampel.

UCAPAN TERIMA KASIH

Penulis mengucapkan terima kasih kepada Direktorat Penelitian dan Pengabdian Masyarakat (DP2M) DIKTI Departemen Pendidikan Nasional yang telah membiayai penelitian ini melalui Hibah Bersaing 2012 dengan nomor kontrak 0006/SP2H/PP/K7/KL/II/2012.

DAFTAR PUSTAKA

- Harborne, J.B. 1987. Metode Fitokimia Edisi Kedua. Bandung: ITB.
Kurnia, R. 2010. Ekstraksi dengan Pelarut.

<http://lordbroken.wordpress.com/2010/02/17/ekstraksi-pelarut/> (8 November 2012)

Pattanagul, P., R. Pinthong, dan A. Phianmongkhol. 2007. Review of Angkak Production (*Monascus purpureus*). Chiang Mai Journal Science. 34(3):319-328.

Puspitadewi, S.R.D. 2012. Pola Produksi Pigmen *Monascus sp.* KJR 2 pada Media Biji Durian Varietas Petruk melalui Fermentasi Padat. Skripsi S-1. Fakultas Teknologi Pertanian.

Universitas Katolik Widya Mandala Surabaya. Surabaya.

Srianta, I., B. Hendrawan, N. Kusumawati, dan P.J. Blac. 2012. Study on Durian Seed as A New Substrate For Angkak Production. International Food Research Journal. 19(3):941-945.

Timotius, K.H. 2004. Produksi Pigmen Angkak oleh *Monascus*. Jurnal Teknologi dan Industri Pangan. 15(1):1-8.