

**DAYA ANTIOKSIDAN EKSTRAK ETANOL BIJI KENARI
(*Canarium indicum* L.) DENGAN METODE DPPH
(*1,1-Diphenyl-2-picrylhydrazyl*)**

Sylvia Limbono
Fakultas Farmasi
sylvialimbono@hotmail.com

Abstrak – Telah dilakukan penelitian mengenai daya antioksidan ekstrak etanol biji kenari (*Canarium indicum* L.) dengan metode DPPH (*1,1-Diphenyl-2-picrylhydrazyl*). Biji kenari yang telah dihaluskan diekstraksi secara modifikasi maserasi menggunakan pelarut etanol 96%. Kemudian ekstrak yang didapat diuji daya antioksidan secara kualitatif maupun kuantitatif. Dari hasil uji kualitatif diperoleh hasil bahwa larutan uji dapat meredam radikal bebas DPPH yang ditandai dengan memudarnya warna dari larutan DPPH dari warna ungu hingga menjadi kekuningan. Hasil uji kuantitatif didapatkan dengan mengukur absorbansi pada panjang gelombang maksimum DPPH yaitu 528,0 nm dengan waktu reaksi 10 menit sehingga diperoleh adanya korelasi yang bermakna antara konsentrasi larutan uji dengan %peredaman. Selain itu didapat nilai EC_{50} rata-rata sebesar 10106,7 bpj dimana untuk dapat meredam 50% radikal bebas diperlukan ekstrak etanol biji kacang kenari sebanyak 1010,675 mg yang setara dengan 2,555 gram bahan biji kacang kenari.

Kata kunci : *Canarium indicum* L., biji kenari, daya antioksidan, DPPH

Abstract – A study examining antioxidant activity of ethanol extract of canary nuts (*Canarium indicum* L.) using DPPH (*1,1-Diphenyl-2-picrylhydrazyl*) method was conducted. The nuts having been crushed were extracted by modified maceration using ethanol 96%. Then, the concentrated extract was tested for its antioxidant activity both qualitatively and quantitatively. The results of qualitative test showed that the test solution could reduce DPPH free radicals, as seen from changing color of DPPH which gradually changed from purple into yellowish color. The quantitative results were obtained by measuring the absorbance at the maximum wavelength which was 528,0 nm within 10-minutes reaction time; thus the test revealed a significant correlation between the concentration of test solution and percentage or reduction. In addition, the average EC_{50} value of the ethanol extract was 10106,7 ppm, which meant that reducing about 50% free radicals would require 1010,675 mg ethanol extract of canary nuts equivalent to 2,555 gram of canary nuts.

Keywords : *Canarium indicum* L., canary nut, antioxidant activity, DPPH

PENDAHULUAN

Seiring dengan berkembangnya penelitian di dunia kesehatan, muncul pemahaman baru bahwa kerusakan pada sel dan jaringan yang merupakan akar

dari sebagian besar penyakit disebabkan oleh kelompok kimia yang sangat aktif dan berbahaya yang disebut 'radikal bebas' (Youngson, 2005). Dalam kondisi-kondisi tertentu keberadaan radikal bebas sangat dibutuhkan, misalnya, untuk membunuh bakteri yang masuk ke dalam tubuh (Winarsi, 2007). Tetapi jika radikal bebas diproduksi lebih banyak daripada yang diperlukan oleh tubuh, atau jika metode pengolahan radikal bebas dari tubuh tidak memadai, maka akan menimbulkan berbagai macam penyakit. Oleh sebab itu, keberadaannya harus dikendalikan oleh sistem antioksidan.

Antioksidan dapat diperoleh dari bahan makanan yang berasal dari alam seperti dalam biji kenari (*Canarium indicum* L.). Kenari merupakan jenis kacang-kacangan yang bijinya memiliki kandungan antioksidan dengan salah satu komponennya yaitu senyawa polifenol (Djarkasi *et al.*, 2011). Kenari banyak tumbuh di daerah Sulawesi Utara dimana oleh penduduk sekitarnya, bijinya banyak dimanfaatkan sebagai pelengkap kue seperti pada halua kenari, dodol kenari, *klaper koek*, dan lain-lain (Amisan, 2012). Biji kenari dipercaya dapat mencegah penurunan daya ingat (Anna, 2010), mengurangi stres, mencegah impotensi pada pria hingga mengurangi risiko terjadinya penyakit kanker.

Berdasarkan permasalahan di atas, timbul suatu dugaan bahwa khasiat biji kenari (*Canarium indicum* L.) berasal dari kandungan antioksidannya sehingga pada penelitian ini dilakukan uji daya antioksidan dari biji kenari (*Canarium indicum* L.). Sebelumnya, biji kenari (*Canarium indicum* L.) diekstraksi terlebih dahulu dengan metode modifikasi maserasi menggunakan pelarut etanol 96%. Pengujian daya antioksidan biji kenari (*Canarium indicum* L.) dilakukan dengan menggunakan metode DPPH (*1,1-Diphenyl-2-picrylhydrazyl*), baik secara kualitatif dengan reaksi warna maupun secara kuantitatif dengan menggunakan spektrofotometer *visible*. Kemampuan senyawa antioksidan dalam biji kenari (*Canarium indicum* L.) untuk meredam radikal bebas DPPH dapat diketahui dengan menghitung harga EC_{50} (*Effective Concentration*), dimana EC_{50} ini merupakan konsentrasi efektif ekstrak biji kenari untuk menghambat atau

merendam sebanyak 50% jumlah radikal bebas. Dari hasil pengujian tersebut dapat diketahui apakah biji kenari memiliki daya antioksidan atau tidak.

METODE PENELITIAN

Alat

Alat-alat yang digunakan dalam penelitian ini antara lain: timbangan analitik (AND GR-202), *rotary evaporator* (Buchi), *moisture content balance* (Mettler Toledo), penangas air, *stopwatch*, *blender*, pengaduk *stirrer* (IKA RW 20N), spektrofotometer UV-Visible (Shimadzu), dan alat-alat gelas laboratorium.

Bahan

Bahan yang digunakan dalam penelitian ini yaitu biji kenari (*Canarium indicum* L.) yang sudah dikupas dari pasar di Manado, Sulawesi Utara yang dibeli pada bulan Agustus 2012. Biji kenari ini telah dideterminasi di Pusat Informasi dan Pengembangan Obat Tradisional Universitas Surabaya. Bahan kimia yang digunakan antara lain: etanol 96% p.a. (Mallinckrodt CHEMICALS), DPPH (1,1-Diphenyl-2-picrylhydrazyl), kloroform (Mallinckrodt CHEMICALS), aquadem (Laboratorium Kimia Farmasi Ubaya).

Prosedur Kerja

Penyiapan Bahan Penelitian

Biji kenari dikupas dan dipisahkan dari lapisan pembungkusnya, kemudian dihaluskan dengan cara dimasukkan ke dalam *blender*.

Pembuatan Ekstrak

Biji kenari yang telah dihaluskan ditimbang sebanyak 800 gram lalu ditambahkan etanol 96% kemudian diaduk dengan menggunakan pengaduk *stirrer* selama satu jam. Selanjutnya direndam selama satu malam (24 jam). Hasil rendaman kemudian disaring dan didapat filtrat hasil perendaman hari pertama. Ampas dari proses ekstraksi sebelumnya diekstraksi ulang dengan penambahan pelarut 96% hingga diperoleh empat dari hasil perendaman selama empat hari.

Kemudian keseluruhan filtrat dipekatkan dengan alat *rotary evaporator* sampai sepertiga volume awal. Sisa etanol selanjutnya diuapkan dalam cawan porselen diatas penangas air hingga diperoleh ekstrak pekat dengan bobot konstan.

Uji Kualitatif Daya Antioksidan dengan Reaksi Warna

Pembuatan larutan DPPH 0,004%

Ditimbang kristal DPPH seberat 4,0 mg kemudian dilarutkan dalam kloroform 100,0 ml sehingga didapatkan larutan dengan konsentrasi 0,004% atau 40,0 bpj. Larutan dijaga pada suhu rendah dan terlindung dari cahaya.

Pembuatan larutan sampel uji kualitatif

Ekstrak etanol biji kenari ditimbang sejumlah tertentu, kemudian ditambahkan kloroform hingga volume tertentu sehingga didapatkan larutan dengan konsentrasi tertentu. Dari larutan tersebut dibuat pengenceran sebanyak lima kali sehingga didapat larutan dengan lima konsentrasi yang berbeda.

Uji kualitatif dengan reaksi warna

3,0 ml larutan DPPH 0,004% ditambah 1,5 ml larutan sampel untuk tiap konsentrasi. Sebagai kontrol digunakan larutan DPPH 0,004% sebanyak 3,0 ml ditambah 1,5 ml kloroform. Lalu amati perubahan warna yang terjadi (warna larutan akan berubah dari ungu dan semakin memudar sampai menjadi tidak berwarna).

Uji Kuantitatif Daya Antioksidan dengan Spektrofotometer *Visible*

Pembuatan larutan sampel uji kuantitatif

Ekstrak etanol biji kenari ditimbang sejumlah tertentu, kemudian ditambahkan kloroform hingga volume tertentu sehingga didapatkan larutan dengan konsentrasi tertentu. Dari larutan tersebut dibuat pengenceran sebanyak lima kali sehingga didapat larutan dengan lima konsentrasi yang berbeda.

Pengukuran absorbansi daya antioksidan secara kuantitatif

3,0 ml larutan DPPH 0,004% ditambah 1,5 ml larutan sampel pada berbagai konsentrasi, dikocok homogen dan didiamkan selama 10 menit. Lalu amati pada panjang gelombang pada absorbansi maksimum. Sebagai kontrol digunakan larutan DPPH 0,004% sebanyak 3,0 ml ditambah 1,5 ml larutan kloroform. Pengukuran absorbansi dilakukan pada panjang gelombang 528,0 nm dan pada waktu reaksi menit ke-10. Kemudian dilakukan replikasi sebanyak empat kali.

Dari data absorbansi yang diperoleh, daya antioksidan dapat diketahui dengan menghitung %peredaman dengan menggunakan rumus:

$$\%peredaman = \left[1 - \left(\frac{\text{Absorbansi larutan uji}}{\text{Absorbansi larutan kontrol}} \right) \right] \times 100\%$$

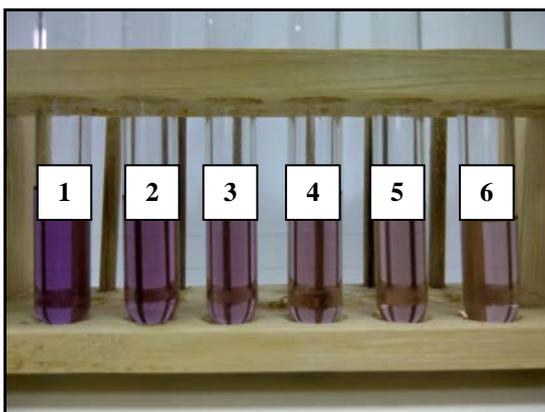
Dari nilai %peredaman dari berbagai konsentrasi larutan sampel, dibuat kurva konsentrasi (C) vs %peredaman. Lalu dari kurva tersebut dihitung regresinya sehingga dapat dihitung harga EC_{50} (*Effective Concentration* = konsentrasi yang efektif untuk menghambat atau meredam 50% jumlah radikal bebas) (Joyeux, 1995).

HASIL & PEMBAHASAN

Pada penelitian ini dilakukan uji daya antioksidan ekstrak etanol biji kenari (*Canarium indicum* L.) dengan menggunakan metode DPPH, baik secara kualitatif dengan reaksi warna maupun secara kuantitatif menggunakan spektrofotometer *visible*. Dalam pengujian daya antioksidan ekstrak etanol biji kenari ini digunakan kloroform sebagai pelarut karena ekstrak dengan bobot konstan yang didapat merupakan ekstrak cair yang berupa minyak yang tidak dapat larut dalam pelarut etanol. Metode DPPH ini dipilih karena merupakan metode yang paling sederhana dan mudah dilaksanakan dalam menetapkan aktivitas antioksidan suatu tanaman, dan tidak memerlukan peralatan yang rumit dibandingkan metode-metode yang lain. Selain itu, DPPH juga merupakan

senyawa radikal bebas yang relatif stabil selama bertahun-tahun apabila disimpan dalam kondisi penyimpanan yang baik (Larson, 1997).

Pengujian daya antioksidan etanol biji kenari dengan metode DPPH secara kualitatif dilakukan dengan menggunakan reaksi warna. Semakin besar konsentrasi larutan uji, maka semakin besar pula daya antioksidannya. Daya antioksidan ditunjukkan dengan kemampuannya memudarkan warna ungu dari senyawa radikal bebas DPPH (Gambar 1). Daya antioksidan ini disebabkan karena DPPH memiliki satu atom N yang elektronnya tidak berpasangan yang apabila bereaksi dengan senyawa yang dapat meredam radikal bebas (senyawa antioksidan) maka akan terjadi pengikatan satu elektron dengan atom yang dapat mendonorkan elektronnya (atom H) membentuk *diphenylpicrylhydrazin* yang stabil (Molyneux, 2003).



Gambar 1 Hasil Pengujian Daya Antioksidan dengan Metode DPPH secara Kualitatif (reaksi warna) Ekstrak Etanol Biji Kenari

Keterangan:

1. 3,0 ml larutan DPPH 0,004% + 1,5 ml kloroform : ungu tua
2. 3,0 ml larutan DPPH 0,004% + 1,5 ml larutan sampel 4000 bpj
3. 3,0 ml larutan DPPH 0,004% + 1,5 ml larutan sampel 6000 bpj
4. 3,0 ml larutan DPPH 0,004% + 1,5 ml larutan sampel 8000 bpj
5. 3,0 ml larutan DPPH 0,004% + 1,5 ml larutan sampel 10000 bpj
6. 3,0 ml larutan DPPH 0,004% + 1,5 ml larutan sampel 12000 bpj

Pengujian daya antioksidan secara ekstrak etanol biji kenari secara kuantitatif menggunakan spektrofotometer *visible*. Pengukuran absorbansi larutan uji ini dilakukan pada panjang gelombang absorbansi maksimum dan waktu reaksi yang telah ditentukan sebelumnya yaitu 528,0 nm pada menit ke-10. Dari hasil pengukuran, dibuat perhitungan dan diperoleh harga %peredaman radikal bebas DPPH ekstrak etanol biji kenari yang dapat dilihat pada tabel 2.

Tabel 2 Hasil Pengamatan Absorbansi dan Perhitungan %Peredaman Ekstrak Etanol Biji Kenari terhadap Larutan DPPH

Replikasi	Bobot ekstrak (gram)	Kadar (bpj)	Absorbansi (A)	%Peredaman
I	2,1367	Kontrol	0,905	
		4273,4	0,699	22,76
		6410,1	0,626	30,83
		8546,8	0,521	42,43
		10683,5	0,446	50,71
		12820	0,371	59,01
II	2,1217	Kontrol	0,965	
		4243,4	0,793	17,82
		6365,1	0,674	30,16
		8486,8	0,578	40,10
		10608,5	0,478	50,47
		12730,2	0,406	57,93
III	2,1117	Kontrol	0,861	
		4223,4	0,661	23,23
		6335,1	0,567	34,15
		8446,8	0,485	43,67
		10558,5	0,405	52,96
		12670,2	0,273	68,29
IV	2,0850	Kontrol	0,861	
		4170	0,664	22,88
		6255	0,567	34,15
		8340	0,479	44,37
		10425	0,397	53,89
		12510	0,306	64,45

Dari hasil tersebut, dibuat persamaan regresi linier konsentrasi larutan uji vs %peredaman terhadap DPPH untuk ekstrak etanol biji kenari dan diperoleh persamaan regresi linier dengan nilai r_{hitung} yaitu 0,9981; 0,9967; 0,9953; 0,9996 (tabel 3) dimana keempat nilai r_{hitung} tersebut lebih besar daripada r_{tabel} ($\alpha = 0,05$; $n = 5$) yaitu 0,878. Hal ini menunjukkan bahwa terdapat korelasi yang bermakna antara konsentrasi larutan uji dengan %peredaman terhadap DPPH untuk ekstrak etanol biji kenari.

Tabel 3 Hasil Perhitungan Persamaan Regresi Linier dan EC₅₀ Ekstrak Etanol Biji Kenari

Replikasi	Persamaan Regresi Linier	r hitung	EC ₅₀ (bpj)
I	$y = 4,3234 \times 10^{-3}x + 4,1984$	0,9981	10593,96
II	$y = 4,7376 \times 10^{-3}x - 0,9119$	0,9967	10746,30
III	$y = 5,1590 \times 10^{-3}x + 0,8827$	0,9953	9520,66
IV	$y = 4,935 \times 10^{-3}x + 2,787$	0,9996	9566,06
Rata-rata			10106,75

Nilai EC₅₀ (*Effective Concentration 50*) adalah konsentrasi yang efektif untuk menghambat atau meredam 50% jumlah radikal bebas (Joyeux, 1995). Dari hasil perhitungan, EC₅₀ dari keempat replikasi tersebut seperti yang dapat dilihat pada tabel 3, didapat rata-rata EC₅₀ yaitu 10106,75 bpj, sehingga agar dapat meredam 50% radikal bebas diperlukan ekstrak etanol biji kenari sebanyak 1010,675 mg yang setara dengan 2,555 gram bahan biji kenari.

KESIMPULAN DAN SARAN

Dari penelitian yang telah dilakukan diperoleh kesimpulan sebagai berikut:

1. Ekstrak etanol biji kenari memiliki daya antioksidan dengan harga EC₅₀ dari ekstrak etanol biji kenari yang diperoleh yaitu 10106,75 bpj.

Dari penelitian yang telah dilakukan, diperoleh hal-hal yang perlu diteliti lebih lanjut, yang kemudian dirumuskan dalam saran sebagai berikut:

1. Dilakukan penelitian terhadap biji kenari dengan ekstraksi menggunakan pelarut yang bertahap dimulai dari pelarut non polar hingga pelarut yang polar untuk memisahkan kandungan kenari menurut kepolarannya.
2. Dilakukan penelitian terhadap daya antioksidan biji kenari dengan menggunakan metode lain seperti metode ORAC, metode *nitric oxide*, metode angka peroksida, metode ABTS, dan metode FTC.

DAFTAR PUSTAKA

- Amisan S, 2012, *Pameran Kuliner di Golden Kawanua Tawarkan Produk Khas Manado* (Online), (<http://manado.tribunnews.com> diakses 17-07-2012).
- Anna LK, 2010, *6 Alasan Harus Makan Kacang* (Online), (<http://health.kompas.com> diakses 30-01-2013).
- Departemen Kesehatan RI, 1986, *Sediaan Galenik*, 1-31.
- Djarkasi GSS, Nurali EJM, Sumual MF, Luluhan LE, 2011, *Analysis of Bioactive Compound Canarium Nut (Canarium indicum L)*, Skripsi, Universitas Sam Ratulangi in cooperation with USAID – Texas A&M University.
- Fessenden RJ, Joan SF, 1986, *Kimia Organik Edisi Ketiga*, Terjemahan oleh Aloysius Hadyana Pudjaatmaka, 1992, Jakarta, Penerbit Erlangga.
- Hadi S, 2000, *Analisis Regresi jilid 1 Cetakan ke-7*, Yogyakarta, Penerbit Andi, 70.
- Joyeux M, Lobstein A, Anton R, Mortier F, 1995, *Comparative Antiliperoxidant, Antinecrotic and Scavenging Properties of Terpenes and Biflavones from Ginkgo and some Flavonoids, Planta Medica*, 61, 126-129.
- Larson RA, 1997, *Naturally Occuring Antioxidant*, New York, Lewis Publisher, 106-107.
- Molyneux P, 2003, *The Use of the Stable Free Radical Diphenylpicrylhydrazyl (DPPH) for Estimating Antioxidant Activity*, Songklanakarin J. Sci. Technol. Vol. 26, No. 2, Mar.-Apr. 2004, 211-219.
- Suharman, MM, 1995, *Analisis Instrumental*, Surabaya, Airlangga University Press.
- Winarsi H, 2007, *Antioksidan Alami & Radikal Bebas: Potensi dan Aplikasinya dalam Kesehatan*, Yogyakarta, Kanisius, 11, 17-18, 21, 79-81.
- Youngson Robert, 2005, *Antioksidan: Manfaat Vitamin C & E Bagi Kesehatan*, Terjemahan oleh Susi Purwoko, Jakarta, Penerbit Arcan, 1.