

LAMPIRAN



Ethanol Extract, Ethyl Acetate Extract, Ethyl Acetate Fraction, and n-Hexane Fraction Mangosteen Peels (*Garcinia mangostana* L.) As Source of Bioactive Substance Free-Radical Scavengers

Ekstrak etanol, Ekstrak etil asetat, Fraksi etil asetat, dan Fraksi n-heksan Kulit Manggis (*Garcinia mangostana* L.) Sebagai Sumber Zat Bioaktif Penangkal Radikal Bebas

Liza Pratiwi^{1*}, Achmad Fudholi², Ronny Martien², Suwidjiyo Pramono²

¹ Fakultas Kedokteran, Universitas Tanjungpura, Pontianak;

² Fakultas Farmasi, Universitas Gadjah Mada, Yogyakarta;

*email Korrespondensi: liza_pratiwi@yahoo.com

Abstract: Mangosteen peels (*Garcinia mangostana* L.) is well known as an excellent source of antioxidative compounds. The name of mangosteen is xanthone. Antioxidant of mangosteen peels can be extracted by ethanol, ethyl acetate and can be fractionated by ethyl acetate and n-hexane. The aim of this research was to compare the antioxidant activity of the peel extract by ethanol and ethyl acetate and fractionated by ethyl acetate and n-hexane. Extract and fraction exhibited higher scavenging activity of DPPH. The purpose of this study was to compare antioxidant activity of ethanol extract, ethyl acetate extract, fraction of ethyl acetate and n-hexane fraction. The antioxidant activity test using DPPH method with UV-Vis spectrophotometer. Ethanol extract shown IC50 value 5,03 µg/mL, ethyl acetate extract shown IC50 value 41,56 µg/mL. Ethyl acetate fraction shown IC50 value 2,78 µg/mL, and n-hexane fraction with IC50 22,33 µg/mL. It means peel extract and fraction by mangosteen peels has very strong antioxidant activity and ethyl acetate fraction that its antioxidant activity higher than the other solvent.

Keywords: mangosteen peels, antioxidant, xanthone, DPPH, IC50

Abstrak: Kulit manggis (*Garcinia mangostana* L.) merupakan sumber antioksidan yang baik. Mangostin yang utama adalah xanton. Kulit manggis sebagai senyawa antioksidan dapat diperoleh melalui ekstraksi dengan etanol, etil asetat dan dapat difraksinasi dengan etil asetat dan n-heksan. Ekstrak dan fraksi kulit manggis diduga memiliki aktivitas menangkal radikal bebas terhadap DPPH. Penelitian ini memiliki tujuan untuk membandingkan aktivitas antioksidan ekstrak etanol, ekstrak etil asetat, fraksi etil asetat dan fraksi n-heksan dari kulit manggis. Pengujian aktivitas antioksidan pada penelitian ini menggunakan metode DPPH dengan alat spektrofotometer UV-Vis. Ekstrak etanol

Memiliki nilai IC50 5,03 µg/ml, ekstrak etil asetat dengan nilai IC50 41,56 µg/ml. Fraksinasi dengan etil asetat menunjukkan nilai IC50 sebesar 2,78µg/ml, dan fraksi n-heksana memiliki IC50 sebesar 22,33 µg/ml. Hal tersebut menunjukkan bahwa ekstrak dan fraksi kulit manggis memiliki aktivitas antioksidan yang sangat kuat dan ekstrak etanol memiliki aktivitas antioksidan lebih tinggi dibandingkan pelarut lainnya.

Kata kunci: kulit manggis, antioksidan, xanton, DPPH, IC50.

1. Pendahuluan

Penuaan terjadi pada hampir semua sistem tubuh manusia dan umumnya semua sistem tidak mengalami kemunduran dalam waktu yang bersamaan. Seiring dengan perkembangan ilmu dan teknologi secara ilmiah menemukan bahwa proses penuaan dapat diperlambat (Thappa dan Konda, 2013). Proses yang mempengaruhi penuaan dipengaruhi oleh faktor intrinsik dan ekstrinsik. Faktor ekstrinsik sering menyebabkan penuaan dini kulit (*premature skin aging*). Penuaan yang dikarenakan sinar ultraviolet (UV) disebut sebagai *photoaging*. Faktor lingkungan yang paling berperan adalah radiasi sinar ultraviolet. Sinar UV dapat menginduksi radikal bebas sehingga menimbulkan penuaan seluler (Athawale dkk., 2011) selain itu juga menyebabkan kerusakan kulit yang terjadi pada komponen epidermis, dermis maupun jaringan appendages kulit. Salah satu perubahan yang terjadi pada lapisan dermis kulit yang mengalami *photoaging* adalah berkurangnya jumlah serat kolagen, antioksidan dapat menghambat proses ini (Sahu dkk., 2013).

Antioksidan merupakan molekul yang dapat bekerja pada kulit untuk mengurangi efek *radical oxygen species* (ROS). Antioksidan dapat menengangs produksi kolagen dermis dengan meningkatkan produksi *Tissue Inhibitor of Matrix Metalloproteinase-1* di demis yang berfungsi untuk menghambat pemecahan kolagen-1. Banyak produk perawatan kulit yang menggunakan antioksidan seperti vitamin C, vitamin E, *ferulic acid*, koenzim Q10, teh hijau (Baumann, 2005). Salah satu tanaman Indonesia yang dapat dimanfaatkan sebagai *photoaging* adalah manggis (*Garcinia mangostana* L.) khususnya pada bagian kulitnya.

Tanaman manggis berasal dari hutan tropis di wilayah Asia Tenggara, salah satunya Indonesia. Penggunaan secara tradisional telah menggunakan kulit manggis sebagai masker untuk menyegarkan, melembabkan dan mengencangkan kulit (Suyanti, 2007). Kulit manggis kaya akan xanton (Akao dkk., 2008). Xanton utama adalah mangostin. Priya dkk., mengekstraksi kulit manggis menemukan kandungan xanton, isoflavon, tannin, dan flavonoid (Priya dkk., 2010). Pelarut sangat berpengaruh pada penyarian senyawa aktif sehingga dengan pemakaian pelarut yang berbeda dapat diketahui pelarut yang memiliki aktivitas antioksidan yang paling tinggi serta nilai IC50 yang paling kecil. Penelitian ini dilakukan untuk mengetahui aktivitas antioksidan dari ekstrak etanol, ekstrak etil asetat, fraksi etil asetat dan fraksi n-heksan terhadap radikal bebas dengan metode DPPH.

2. Bahan dan Metode

Bahan yang digunakan pada penelitian ini adalah kulit manggis (Kali gesing, Purworejo), DPPH (Sigma Aldrich), Etanol 70% (Bratachem), n-heksan (Bratachem), Etil Asetat (Bratachem), Aquadest (Dwicentra), metanol (Merck). Adapun metode penelitian adalah sebagai berikut:

2.1 Uji Akurasi (Kecermatan)

Kecermatan ditentukan dengan metode simulasi (*spiked placebo recovery*). Pada metode ini, digunakan larutan DPPH dengan konsentrasi 16 μ g/mL, 18 μ g/mL, 20 μ g/mL, 22 μ g/mL, dan 24 μ g/mL masing-masing sebanyak 10 mL. Sebanyak 3 mL DPPH dengan berbagai konsentrasi yang telah dibuat tersebut diukur absorbansinya menggunakan spektrofotometer UV-Vis. *Zeroing awal* menggunakan metanol *p.a* 3 mL. Akurasi (kecermatan) dinyatakan dengan persen perolehan kembali (% *recovery*) yakni rasio antara konsentrasi DPPH hasil pengukuran dengan konsentrasi DPPH yang sebenarnya (Harmita, 2004).

2.2 Presisi (Keseksamaan)

Keseksamaan ditentukan dengan metode keterulangan (*repeatability*). Pada metode ini, digunakan larutan DPPH dengan konsentrasi 22 μ g/mL sebanyak 25 mL. Keseksamaan dilakukan dengan mengukur absorbansi dari 3 mL larutan standar DPPH 22 μ g/mL menggunakan spektrofotometer UV-Vis sebanyak 6 kali pengulangan. *Zeroing awal* menggunakan metanol *p.a* 3 mL.

2.3 Pembuatan Larutan DPPH 100 ppm

Sebanyak 5 mg DPPH dilarutkan dengan metanol 50 mL. tambahkan metanol sampai tanda batas sehingga di peroleh larutan dengan konsentrasi 100 ppm (Supiyanti, 2010).

2.4 Optimalisasi Panjang Gelombang DPPH

Sebanyak 2 mL larutan DPPH 100 ppm dimasukkan kedalam labu ukur 10 mL, cukupkan hingga tanda batas dan homogenkan hingga didapat larutan DPPH dengan konsentrasi 20 ppm. Sebagai blanko digunakan metanol. Larutan kemudian ditentukan spektrum serapannya pada panjang gelombang 400-800 nm serta ditentukan panjang gelombang optimumnya (Supiyanti, 2010).

2.5 Pembuatan Larutan DPPH 0,1mM

Kristal DPPH ditimbang secara seksama sebanyak 1,97 mg kemudian dimasukkan ke dalam labu ukur 50 mL dan ditambahkan pelarut metanol *p.a* sampai hingga mencapai volume 50 mL kemudian dihomogenkan. Larutan DPPH yang telah dibuat harus segera digunakan dan dijaga agar terlindung dari cahaya (Nurliyana, 2010).

2.6 Penentuan Panjang Gelombang Maksimum Larutan DPPH 0,1 mM

Pengujian aktivitas antioksidan fraksi etil asetat kulit manggis diawali dengan penentuan panjang gelombang maksimum (λ_{max}) DPPH 0,1 mM dalam metanol menggunakan spektrofotometri UV-Vis. Larutan tersebut dibaca serapannya pada panjang gelombang 400-800 nm (Molyneux, 2004).

2.7 Pembuatan Larutan Baku Sampel

Sebanyak 100 mg sampel uji ditimbang secara seksama, dimasukkan ke dalam labu ukur 10 mL dilarutkan dengan metanol *p.a* lalu volumenya dicukupkan dengan metanol hingga mencapai volume 10 mL dengan konsentrasi 10.000 $\mu\text{g/mL}$ (konsentrasi 1%). Larutan induk ini selanjutnya digunakan untuk pembuatan larutan uji pada lima konsentrasi larutan uji yaitu 5 $\mu\text{g/mL}$, 13 $\mu\text{g/mL}$, 25 $\mu\text{g/mL}$, 37 $\mu\text{g/mL}$ dan 50 $\mu\text{g/mL}$ (Mardawati dkk., 2008).

2.8 Pembuatan Larutan Uji Sampel

Masing-masing sampel uji ditimbang secara seksama, dimasukkan ke dalam labu ukur 10 mL dilarutkan dengan metanol hingga mencapai volume 10 mL. Larutan uji menggunakan berbagai konsentrasi uji (Mardawati dkk., 2008).

2.9 Pengukuran Absorbansi Peredaman Radikal Pada Fraksi Etil Asetat Kulit Manggis

Sebanyak 1 mL fraksi (dengan berbagai konsentrasi) ditambahkan ke dalam 2 mL DPPH 0,1 mM. Campuran selanjutnya dikocok dan diinkubasi pada suhu kamar selama 30 menit di tempat gelap. Larutan ini selanjutnya diukur absorbansinya pada panjang gelombang yang telah didapatkan pada tahap sebelumnya dengan menggunakan spektrofotometer UV-Vis. Perlakuan yang sama juga dilakukan untuk larutan blanko (larutan DPPH yang tidak mengandung bahan uji). Larutan blanko terdiri dari 2 mL DPPH 0,1 mM dan 1 mL metanol *p.a*. *Zeroing* awal dilakukan dengan menggunakan metanol *p.a* 3 mL (Nurliyana, 2010).

3. Hasil dan Pembahasan

3.1 Pengumpulan dan Pengolahan Sampel

Sampel yang digunakan dalam penelitian ini adalah kulit buah manggis. Jumlah simplisia kulit manggis yang diperoleh setelah melalui tahap pengolahan memiliki bobot 1.650 g atau memiliki nilai rendemen sebesar 74,0909 % dari bobot sampel buah keseluruhan. Nilai rendemen tersebut dipengaruhi oleh beberapa faktor, diantaranya yakni jumlah kandungan air yang cukup tinggi, baik dalam buah utuh maupun kulitnya.

3.2 Ekstraksi Kulit Buah Manggis

Pelarut yang digunakan pada ekstraksi kulit manggis menggunakan dua pelarut yang berbeda bertujuan untuk mengetahui nilai IC_{50} yang lebih kecil atau memiliki aktivitas antioksidan yang kuat. Ekstrak etanol 70% yang didapat setelah pemekatan adalah sebanyak 290,0346 g atau dengan nilai rendemen sebesar 17,5778 % dari jumlah simplisia. Ekstrak etil asetat yang didapat setelah pemekatan adalah sebanyak 3,3423 g atau dengan nilai rendemen sebesar 3,3423 % dari jumlah simplisia. Nilai rendemen menunjukkan seberapa besar jumlah kandungan yang dapat terekstraksi oleh pelarut dalam persen (%). Salah satu faktor yang mempengaruhi besarnya nilai rendemen adalah proses ekstraksi.

Pemilihan metode ekstraksi dalam penelitian ini didasarkan atas sensitivitas senyawa antioksidan terhadap suhu yang tinggi, oleh karena itu dipilih metode maserasi, dimana metode ekstraksi ini dilakukan tanpa pemanasan serta dilakukan dalam suhu ruangan. Prinsip ekstraksi dengan metode maserasi adalah terjadinya proses difusi lantan penyari ke dalam sel tumbuhan yang mengandung senyawa aktif. Difusi tersebut mengakibatkan tekanan osmosis dalam sel menjadi berbeda dengan keadaan di luar sel. Sehingga senyawa yang memiliki kepolaran yang sama dengan pelarut kemudian terdesak keluar karena adanya perbedaan tekanan osmosis di dalam sel dan di luar sel (Dean, 2009).

Pelarut yang digunakan dalam proses ekstraksi ini adalah etanol 70% dan etil asetat. Pemilihan pelarut etanol 70% sebagai pelarut maserasi didasarkan atas penyarian yang optimal sehingga diharapkan banyak senyawa aktif yang terkandung didalamnya, sedangkan pelarut etil asetat yang memiliki sifat semi polar diharapkan mampu menyari senyawa xanton yaitu α -mangostin. Dengan penggunaan kedua pelarut yang berbeda pada ekstraksi kulit manggis bertujuan dapat dihasilkan nilai IC_{50} yang lebih kecil atau memiliki aktivitas antioksidan yang kuat.

3.3 Fraksi Etil Asetat dan n-Heksana Kulit Manggis

Fraksi etil asetat yang diperoleh dalam penelitian ini memiliki bobot 5,9352 g atau memiliki nilai rendemen sebesar 5,9352 % dari ekstrak etanol 70% dan fraksi n-heksana yang diperoleh dalam penelitian ini memiliki bobot 0,3174 g atau memiliki nilai rendemen sebesar 0,3174 % dari ekstrak etanol 70%. Jumlah ekstrak yang terfraksi oleh pelarut etil asetat dan n-heksana memiliki jumlah rendemen yang relatif kecil. Hal ini dimungkinkan oleh sedikitnya jumlah kandungan yang bersifat non-polar yang dapat tersari oleh etil asetat dan n-heksana dari ekstrak etanol 70%. Tujuan dari tahap fraksinasi adalah untuk memisahkan senyawa berdasarkan tingkat kepolaran yang berbeda dalam dua pelarut yang memiliki tingkat kepolaran yang berbeda pula. Fraksinasi dengan ekstraksi cair-cair dilakukan dengan pengocokan. Prinsip pemisahan pada proses fraksinasi adalah didasarkan pada perbedaan tingkat kepolaran dan perbedaan bobot jenis antara dua fraksi.

3.4 Akurasi dan Presisi

Akurasi merupakan ukuran yang menunjukkan derajat kedekatan hasil analisis dengan kadar analit sebenarnya. Akurasi dinyatakan sebagai persentase perolehan kembali (% *recovery*) analit yang ditambahkan. Penetapan akurasi digunakan setidaknya lima sampel yang mengandung analit dan placebo yang harus disiapkan. Persamaan regresi yang didapat selanjutnya digunakan untuk memperoleh persen perolehan kembali (% *recovery*). Persen perolehan kembali diperoleh dengan membandingkan konsentrasi DPPH sebenarnya dengan konsentrasi DPPH yang diperoleh berdasarkan hasil pengukuran oleh spektrofotometer UV-Vis. Berdasarkan tabel diatas, nilai % perolehan kembali yang didapat berkisar antara 98,5478 % hingga 101,702 %. Hal tersebut sesuai dengan syarat persentase perolehan kembali untuk analit pada sampel dalam kisaran 0,001% hingga 0,0099% atau 10-99 ppm, yaitu 90-107 % (Harmita, 2004).

Presisi dengan metode ketelitian, yaitu parameter yang digunakan untuk melihat seberapa baik metode analisis yang digunakan. Presisi dinilai melalui konsentrasi DPPH hasil pengukuran menggunakan spektrofotometer UV-Vis. Konsentrasi DPPH yang digunakan yaitu 22 ppm sebanyak enam replika sampel yang diambil dari larutan induk yang sama. Konsentrasi hasil perhitungan diperoleh dengan menggunakan persamaan regresi yang telah diperoleh sebelumnya pada parameter akurasi. Nilai yang telah diperoleh tersebut selanjutnya dimasukkan ke dalam persamaan simpangan baku dan diperoleh simpangan baku (SD) sebesar 0,2398. Nilai SD tersebut digunakan untuk memperoleh nilai simpangan baku relatif (RSD). RSD yang diperoleh pada pengukuran presisi adalah sebesar 1,0668 %. Nilai yang diperoleh ini tergolong baik, karena nilai RSD lebih kecil dari 16 %. Menurut Harmita (2004), RSD meningkat seiring dengan menurunnya konsentrasi analit, dan analit dengan kadar per sejuta (1 µg/mL) memiliki syarat nilai RSD yang baik adalah lebih kecil dari 16 %. Berdasarkan hasil yang diperoleh dapat disimpulkan bahwa sistem operasional alat dan analisis memiliki nilai presisi yang baik terhadap metode dengan respon yang relatif konstan.

3.5 Uji Aktivitas Ekstrak Etanol Kulit Manggis

Penentuan nilai aktivitas antioksidan dilakukan dengan menggunakan metode kuantitatif penangkapan radikal DPPH. Prinsip metode pengukuran aktivitas antioksidan secara kuantitatif ini adalah pengukuran penangkapan radikal DPPH oleh suatu senyawa yang mempunyai aktivitas antioksidan dengan menggunakan spektrofotometri UV-Vis. Hasil spektra UV-Vis pada pengujian menunjukkan bahwa nilai panjang gelombang yang berada pada 515,5 nm dan termasuk dalam kisaran panjang gelombang sinar tampak (Gandjar dan Rohman, 2009).

Hasil penelitian menunjukkan adanya aktivitas peredaman radikal DPPH, yang dilihat dari adanya penurunan nilai absorpsi radikal DPPH yang disebabkan oleh sampel uji pada berbagai konsentrasi dan semakin meningkatnya nilai persen (%) aktivitas antioksidan. Hal tersebut juga terlihat secara kasat mata dengan adanya perubahan warna ungu yang semakin memudar dan menjadi agak kekuningan setelah masa inkubasi 30 menit. Perubahan warna ini terjadi dikarenakan adanya senyawa dalam sampel yang mendonorkan atom hidrogen kepada radikal DPPH sehingga tereduksi menjadi bentuk yang lebih stabil yaitu DPPH-H (1,1-difenil-2-

pikrilhidrazin). Dari hasil pengukuran ekstrak etanol kulit buah manggis menunjukkan bahwa semakin tinggi konsentrasi sampel yang digunakan, maka semakin rendah nilai absorpsi dari lantan DPPH dalam metanol.

Parameter yang dipakai untuk menunjukan aktivitas antioksidan adalah harga konsentrasi efisien atau *efficient concentration* (EC_{50}) atau *Inhibitory Concentration* (IC_{50}) yaitu konsentrasi suatu zat antioksidan yang dapat menyebabkan 50% DPPH kehilangan karakter radikal atau konsentrasi suatu zat antioksidan yang memberikan persen peredaman sebesar 50%. Suatu senyawa dikatakan sebagai antioksidan sangat kuat apabila nilai IC_{50} kurang dari 50 $\mu\text{g/ml}$, kuat apabila nilai IC_{50} 50-100 $\mu\text{g/ml}$, sedang apabila nilai IC_{50} berkisar antara 100-150 $\mu\text{g/ml}$, dan lemah apabila nilai IC_{50} berkisar antara 150-200 $\mu\text{g/ml}$. Nilai IC_{50} 200-1.000 $\mu\text{g/ml}$ dinyatakan kurang aktif namun masih berpotensi sebagai antioksidan (Molyneux, 2004). Berdasarkan hasil penelitian, nilai IC_{50} ekstrak etanol adalah 5,030 $\mu\text{g/ml}$. sehingga masuk kedalam kategori antioksidan yang sangat kuat.

3.6 Uji Aktivitas Antioksidan Ekstrak Etil Asetat Kulit Manggis

Kandungan utama dari kulit manggis yang memiliki aktivitas antioksidan adalah xanton yaitu α -mangostin yang memiliki sifat semi polar. Penyarian senyawa aktif dengan menggunakan pelarut etil asetat sehingga diperoleh ekstrak diharapkan memiliki aktivitas antioksidan yang tinggi. Cairan pelarut dalam proses pembuatan ekstrak adalah pelarut yang baik (optimal) untuk senyawa kandungan yang berkhasiat atau yang aktif, dengan demikian senyawa tersebut dapat dipisahkan dari bahan dan dari senyawa kandungan lainnya, serta ekstrak hanya mengandung sebagian besar senyawa kandungan yang diinginkan. Faktor utama untuk pertimbangan pada pemilihan cairan penyari adalah selektivitas, kemudahan bekerja dan proses dengan cairan tersebut, ekonomis, ramah lingkungan dan keamanan (Depkes RI, 2000). Berdasarkan nilai IC_{50} diketahui bahwa ekstrak etil asetat kulit manggis memiliki persentase penghambatan terhadap radikal bebas yang cukup besar dalam rentang 46,67-90,47% dan memiliki nilai IC_{50} sebesar 41,46 $\mu\text{g/ml}$. sehingga merupakan antioksidan yang sangat kuat.

3.7 Uji Aktivitas Antioksidan Fraksi Etil Asetat Kulit Manggis

Fraksinasi merupakan prosedur pemisahan yang bertujuan untuk memisahkan golongan utama yang lain. Pemisahan jumlah dan jenis senyawa menjadi fraksi yang berbeda yang bergantung pada jenis simplisia. Senyawa-senyawa bersifat polar akan masuk dalam pelarut polar, begitu pula senyawa yang bersifat non-polar akan masuk kepelarut non-polar (Harborne, 1987). Kandungan utama kulit manggis yang potensial sebagai senyawa antioksidan adalah xanton yaitu α -mangostin.

Diduga bahwa golongan senyawa yang membenkan aktivitas antioksidan dalam fraksi etil asetat kulit manggis adalah fenolik dan flavonoid. Menurut Gusrav, senyawa flavonoid berperan sebagai antioksidan karena memiliki gugus hidroksil yang dapat melepaskan proton dalam bentuk ion hidrogen. Ion hidrogen hanya memiliki satu buah proton dan tidak memiliki elektron, sehingga dalam electron radikal yang terdapat pada atom nitrogen di senyawa DPPH berikatan

dengan ion hydrogen dan menghasilkan DPPH yang tereduksi (Gusrav dkk., 2007). Radikal pada DPPH dapat tereduksi ketika bereaksi dengan donor hidrogen yang terdapat dalam senyawa fenolik (Araza dkk., 2011).

Berdasarkan hasil penelitian, pada fraksi etil asetat diperoleh nilai IC50 paling kecil diantara lainnya yaitu 2,78 µg/mL yang artinya aktivitas antioksidan fraksi etil asetat paling tinggi dibandingkan aktivitas antioksidan pada ekstrak etanol, ekstrak etil asetat, fraksi n-heksan dan residu. Pada penelitian sebelumnya yang telah dilakukan oleh Wu dkk yang telah menguji aktivitas antioksidan pada *Receptaculum Nelumbinis*, dimana fraksi butanol dan *Receptaculum Nelumbinis* memiliki aktivitas antioksidan yang lebih kuat dibandingkan dengan aktivitas antioksidan pada ekstrakrya (Wu dkk., 2012). Hal tersebut disebabkan oleh aktivitas antioksidan dari senyawa fenolik dan flavonoid. Demikian pula pada penelitian yang dilakukan oleh Das dkk yang membandingkan aktivitas antioksidan pada ekstrak etanol, fraksi kloroform, fraksi etil asetat, dan fraksi polar dari daun dan batang *Crescentia cujete*. Hasil penelitian menunjukkan pada fraksi etil asetat baik pada daun maupun batang memiliki nilai IC50 yang paling kecil yang artinya memiliki aktivitas penghambatan terhadap radikal bebas yang paling besar (Das dkk., 2014).

3.8 Uji Aktivitas Antioksidan Fraksi n-heksana Kulit Manggis

Pada fraksi n-heksan, diduga golongan senyawa yang memberikan aktivitas antioksidan adalah alkaloid, flavonoid dan steroid. Senyawa flavonoid berperan sebagai antioksidan karena memiliki gugus hidroksil yang dapat melepaskan proton dalam bentuk ion hidrogen. Ion hidrogen hanya memiliki satu buah proton dan tidak memiliki elektron, sehingga dalam elektron radikal yang terdapat pada atom nitrogen di senyawa DPPH berikatan dengan ion hidrogen dan menghasilkan DPPH yang tereduksi (Gusrav dkk., 2007). Namun flavonoid yang terkandung dalam fraksi n-heksana kulit manggis merupakan senyawa-senyawa yang bersifat non-polar, yang masih terikat pada gugus glikosidanya sehingga menghambat pengikatan radikal DPPH dan mengakibatkan lemahnya aktivitas antioksidan yang dihasilkan. Gugus samping yang berikatan dengan flavonoid dapat mengakibatkan penghambatan aktivitas antioksidan. Hal tersebut mengakibatkan flavonoid tidak dapat mendonasikan hidrogen dan elektron untuk menangkul radikal bebas dikarenakan terjadinya halangan sterik (Harbome dkk., 2000). Adanya gugus lain di dalam fraksi n-heksana juga dapat menyebabkan flavonoid termetilasi. Perubahan atom -H menjadi gugus metil (-CH₃) melalui reaksi metilasi dapat menurunkan aktivitas antioksidan, yang disebabkan pengurangan atom -H yang merupakan sumber proton untuk penangkapan radikal bebas (Mikamo dkk., 2000).

Potensi antioksidan fraksi n-heksana yang tergolong kurang aktif diduga turut disebabkan oleh adanya pengganggu seperti protein, lemak dan senyawa lainnya yang dapat terlarut dalam pelarut non-polar, dalam hal ini adalah pelarut n-heksana, sehingga menghalangi proses penangkapan radikal bebas. Adanya senyawa protein atau lemak pada fraksi dapat mengganggu proses penangkapan radikal bebas oleh senyawa flavonoid. Protein atau lemak pada tumbuhan dapat memberikan atom hidrogen yang dimilikinya sehingga akan berikatan dengan radikal hidroksil pada DPPH (Pine, 1988).

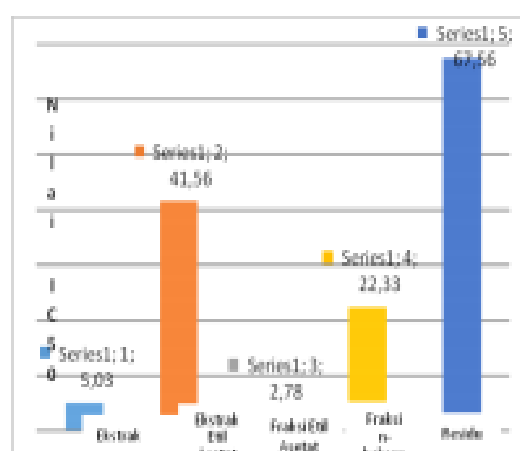
Selain flavonoid, alkaloid diduga turut bertanggung jawab dalam memberikan aktivitas antioksidan dengan mekanisme sekunder, yakni sebagai penangkap radikal bebas. Hal ini didukung dari penelitian yang telah dilakukan oleh Maiza-Benabdesselam tentang aktivitas antioksidan dari ekstrak alkaloid dua spesies *Fumaria* (*Fumaria capreolata* dan *Fumaria bastardi*), yang menyatakan bahwa aktivitas antioksidan ekstrak alkaloid dari dua spesies *Fumaria* memiliki aktivitas antioksidan yang bekerja dengan mekanisme sebagai *free radical scavenger* (maiza dkk., 2007).

Senyawa steroid dalam fraksi n-heksana kulit manggis diduga turut berperan dalam memberikan aktivitas antioksidan. Mekanisme yang berperan oleh steroid adalah sebagai penangkap radikal. Hal ini didukung berdasarkan penelitian oleh Cui yang menyatakan bahwa ekstrak etanol 80% dari *Manotus obliquus* yang positif mengandung steroid seperti lanosterol dan ergosterol peroksida menghasilkan aktivitas antioksidan sekunder *radical scavenger* yang cukup aktif (Cui dkk., 2004).

Berdasarkan penelitian, hasil pengukuran aktivitas antioksidan pada fraksi n-heksana kulit manggis memiliki nilai IC_{50} yang lebih besar dan tergolong sangat aktif namun lebih rendah dibandingkan dengan ekstrak dan fraksi kulit manggis lainnya, yakni 22,33 $\mu\text{g/mL}$.

Tabel 1. Nilai IC_{50} Ekstrak etanol, ekstrak etil asetat, fraksi etil asetat dan fraksi n-heksana kulit manggis

No.	Sampel Uji	Nilai IC_{50} ($\mu\text{g/mL}$)
1.	Ekstrak Etanol	5,03
2.	Ekstrak Etil Asetat	41,56
3.	Fraksi Etil Asetat	2,78
4.	Fraksi n-heksana	22,33



Gambar 1. Nilai IC_{50} ekstrak dan fraksi

4. Kesimpulan

Kulit manggis memiliki aktivitas antioksidan yang sangat kuat. Aktivitas antioksidan yang paling besar dengan parameter IC50 berturut-turut adalah fraksi etil asetat, ekstrak etanol, fraksi n-heksan, dan ekstrak etil asetat.

Ucapan Terimakasih

Terima kasih kepada prodi farmasi Universitas Tanjungpura dan kepada fakultas farmasi Universitas Gadjah Mada Yogyakarta.

Conflict of Interest

Tidak terdapat potensi konflik.

Daftar Pustaka

- Akao, Y., Nakagawa, Y., Linuma, M. and Nozawa, Y, 2008. Anti-Cancer Effects of Xanthones from Pericarps of Mangosteen. *International Journal of Molecular Sciences*.9, 355-370.
- Anzo, M., Bello, A., Rastrelli, L., Mortelier, M., Delgado, L., Panfili, C., dkk., 2011. Antioxidant properties of pulp and peel of yellow mangosteen fruits. *Emir. J. Food Agric*,23, 517-524.
- Athawale, R., Salavkar, S., dan Tamarekar, R, 2011. Antioxidants in skin ageing - Future of dermatology. *International Journal of Green Pharmacy*,5, 161.
- Baumann, L, 2005. How to Prevent Photoaging? *Journal of Investigative Dermatology*.125, 12-13.
- Cui, Y., Kim, D.S., dan Park, K.C. 2004. Antioxidant Effect *Inonotus Obliquus*. *J Ethnopharmacol*.96, 79-85.
- Das, N., Islam, M.E., Jahan, N., Islam, M.S., Khan, A., Islam, M.R., dan Parvin, M.S. Antioxidant activities of ethanol extracts and fractions of *Crescentia cujete* leaves and stem bark and the involvement of phenolic compounds. *BMC. Complementary & Alternative Medicine*. 14, 45.
- Dean, J, 2009. *Extraction Techniques In Analytical Science*. London: John Wiley And Sons LTD, pp. 43-46.
- Departemen Kesehatan Republik Indonesia, 2000. *Parameter Standar Umum Ekstrak Tumbuhan Obat*. Jakarta: Departemen Kesehatan Republik Indonesia, pp. 4, 7, 9-11, 13-14, 17.
- Gandjar, I.G., dan Rohman, A, 2009. *Kimia Farmasi Analisis*. Yogyakarta: Pustaka Pelajar, pp. 240; 252-256; 353-355; 359-360.
- Gusrav, S., Deshkar, N., Gulkari, V., Duragkar, N., dan Patil, A, 2007. Free Radical Scavenging Activity of *Polygala chinensis* Linn. *Pharmacology*.2, 245-253.
- Harborne J B, 1987. *Metode Fitokimia: Penuntun Cara Modern Menganalisis Tumbuhan*. Bandung: Penerbit ITB, pp. 7-8, 49, 65, 70-72, 78, 88, 140, 156, 234.
- Harnita, 2004. Petunjuk Pelaksanaan Validasi Metode dan Cara Perhitungannya. *Majalah Ilmu Kefarmasian*. 1, 117 - 135.
- Maiza-Benabdeslam, F., Khentache, S., Bougoffa, K., Chibane, M., Adach, S., Chapeleur, Y., Max, H, 2007. Antioxidant activities of alkaloid extract of two algerian species of *Fumaria*: *Fumaria capreolata* and *Fumaria bastardi*. *Record. Nat. Prod*.1, 28-35.
- Mardawati, E., Filianty, F., Marta, H, 2008. Kajian Aktivitas Antioksidan Ekstrak Kulit Manggis (*Garcinia mangostana* L) Dalam Rangka Pemanfaatan Limbah Kulit Manggis Di Kecamatan Puspahiang Kabupaten Tasikmalaya. *Laporan Penelitian*. Universitas Padjadjaran.
- Marliana, S. D., Suryanti, V. dan Soyono, 2005. Skrining Fitokimia dan Analisis Kromatografi Lapis Tipis Komponen Kimia Buah Labu Siam (*Schinus molle* Jacq. Swartz) dalam Ekstrak Etanol. *Biofarmasi*.3(1), 26-31.
- Mikano, E., Okada, Y., Semma, M., Itto, Y., dan Morimoto T, 2000. Studies on Structural Correlation with Antioxidant Activity of Flavonoids. *J. Jpn. Soc. Food Sci. Technol*. 7, 97-101.
- Molyneux, P, 2004. The use of the stable free radical diphenylpicrylhydrazyl (DPPH) for estimating antioxidant activity. *Songklanakart J Sci Technol*. 26, 211-219.
- Nurliyana, R., Syed Z.I., Mustapha S.K., Aisyah, M.R., dan Kamarul R.K, 2010. Antioxidant study of pulp and peel dragon fruits: a comparative study. *Int. Food Res. J*. 17, 365-375.

- Pine, H.S, 1988. *Radikal Bebas*. Bandung: ITB. Terjemah dari: Organic Chemistry 2, pp. 23-26.
- Priya, V., Jaina, M., Mohan, S.K., Saraswati, P. and Gopan, C.S, 2010. Antimicrobial activity of pericarp extract of *garcinia mangostana* linn. *International Journal of Pharma Sciences and Research*.1: 278-281.
- Sahu, R., Mailam, M., Deshmukh, V., Dwivedi, J., Iha, A., dan Roy A, 2013. In vitro techniques to assess the proficiency of skin care cosmetic formulations. *Pharmacognosy Reviews*. 7, 97.
- Supiyanti, W., Endang, D.W., Lia, K., 2010. Uji Aktivitas antioksidan dan Perentuan Kandungan Antiosianin pada kulit buah manggis (*Carcinia Mangostana*). *Majalah Obat Tradisional*. 15, 64-70.
- Suyanti, Setyadi, 2007. Teknologi Penanganan Buah Manggis Untuk Mempertahankan Mutu Selama Penyimpanan. *Buletin Teknologi Pascapanen Pertanian*.3, 67.
- Thappa, D. dan Konda, D, 2013. Age reversing modalities: An overview. *Indian Journal of Dermatology, Venereology, and Leprology*.79, 3.
- Wu, Y.B., Zheng, L.J., Wu, J.G., Chen, T.Q., Yi, J., dan Wu, L.Z. 2012. Antioxidant activities of extract and fraction from *Receptaculum Nelumbinis* and Related Flavonol Glycosides. *International Journal of Molecular Sciences*. 13: 7163-7173.

UJI AKTIVITAS ANTIOKSIDAN EKSTRAK DAN FRAKSI KULIT BUAH MANGGIS (*Garcinia mangostana L.*) MENGGUNAKAN METODE DPPH

N. P. A. D. Wijayanti, A. A. G. R. Y. Putra, I. A. P. Suryantari, G. A. D. Dwiantari

Program Studi Farmasi Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam Universitas Udayana

*Email: dewi_wijayanti@unud.ac.id

ABSTRAK

Penelitian mengenai uji aktivitas antioksidan ekstrak dan fraksi kulit buah manggis menggunakan metode DPPH ini bertujuan untuk memperoleh perbandingan nilai IC_{50} antara ekstrak dan fraksi sehingga diperoleh aktivitas antioksidan yang optimum serta mengetahui golongan senyawa dari fraksi aktif. Metode yang digunakan untuk fraksinasi adalah kolom kromatografi dengan pelat bergradien n-hexana: etil asetat (9:1, 8:2, 7:3, 6:4, 5:5, 4:6, 3:7, 2:8, 1:9, 0:10). Uji pendahuluan KLT dilakukan untuk melihat kromatogram yang sama, dengan menggunakan fase gerak kloroform : metanol (9,50,5) v/v sehingga diperoleh fraksi gabungan A(4 dan 5), B(6-14), C(15-22), D(23-36). Profil KLT-bioautografi aktivitas antioksidan digambarkan dengan semua spot berwarna kuning dengan latar belakang ungu dan terdapat 3 spot pada ekstrak dan fraksi A, B, dan C sedangkan 2 spot pada fraksi D. Nilai IC_{50} untuk masing-masing ekstrak menggunakan metode DPPH menunjukkan aktivitas antioksidan dengan nilai IC_{50} untuk fraksi A, B, C dan D berturut-turut sebesar 27,51 μ g/ml, 22,46 μ g/ml, 22,72/ml, 10,71 μ g/ml, 15,71 μ g/ml. Fraksi C merupakan fraksi yang memiliki aktivitas lebih kuat jika dibandingkan dengan ekstrak dan fraksi lainnya dengan kandungan kimia flavonoid dan polifenol yang mampu meredam radikal bebas DPPH.

Kata kunci : aktivitas antioksidan, DPPH (2,2-difenil-1-picrylhidrazil), IC_{50} , kromatografi kolom

ABSTRACT

This study aimed to examine the antioxidant activity of the extract and the fractions of mangosteen peel with the use of the DPPH method, as well as to obtain the ratio of IC_{50} values between extracts and fractions so that the optimum antioxidant activity could be established and moreover, the class of the compound of active extract could be determined. The fractionation was carried out with the use of column chromatography with gradient solvents, namely n-hexane: ethyl acetate (9:1, 8:2, 7:3, 6:4, 5:5, 4:6, 3:7, 2:8, 1:9, 0:10). The TLC was run to find out similar chromatogram using a mobile phase of chloroform: methanol (9.5:0.5) v/v and silica gel 60 GF as the stationary phase. The fractionation performed using column chromatography resulted in four combined fractions which were of A (4 and 5), B (6-14), C (15-22), and D(23-36). TLC-Bioautography profile of antioxidant activity was figured out by the fact that all spots showed yellow colour with violet background, 3 spots from fractions A, B, and C, while 2 spots from D fraction. The IC_{50} values using DPPH method for the fraction of A, B, C and D were of 27.51 μ g/ml, 22.46 μ g/ml, 22.72/ml, and 10.71 μ g/ml, 15.71 μ g/ml, respectively. Evidently, C fraction was the most active fraction that contained flavonoids and polyphenol as the chemical compounds and able to reduce free radical (DPPH).

Keywords : antioxidant activity, DPPH (2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl), column chromatography, IC_{50}

PENDAHULUAN

Manggis (*Garcinia mangostana L.*) merupakan salah satu tanaman yang telah diketahui aktivitas antioksidannya yang dapat dimanfaatkan sebagai obat tradisional. Aktivitas

antioksidan dinyatakan dengan nilai IC_{50} (Inhibitory Concentration 50) yaitu konsentrasi larutan sampel yang dibutuhkan untuk menghambat 50% radikal bebas. Semakin kecil nilai IC_{50} maka semakin besar aktivitas penangkal radikal bebas (Dungir dkk., 2012). Pada penelitian

sebelumnya yang telah dilakukan oleh Shaine (2016), yang mengoptimasi pelarut ekstraksi menggunakan etanol 96%, etil asetat dan metanol menunjukkan hasil aktivitas antioksidan paling kuat pada ekstrak metanol dengan nilai IC_{50} sebesar $9,00 \pm 0,048 \mu\text{g/ml}$.

Pada uji KLT *bioautography* ekstrak metanol menghasilkan 3 spot yang mampu meredam DPPH yaitu pada Rf 0,26; 0,50; 0,88. Spot dengan nilai Rf 0,50 memiliki pola yang sama dengan larutan standar yaitu alpha mangostin. Namun untuk spot dengan nilai Rf 0,26 yang bersifat relatif polar dan 0,88 yang bersifat relatif nonpolar belum dilakukan uji lebih lanjut untuk mengetahui golongan senyawanya. Berdasarkan kekurangan penelitian yaitu belum diketahui golongan senyawa pada spot 0,26 dan 0,88 yang dapat meredam DPPH, maka akan dilakukan penelitian lebih lanjut dengan melakukan fraksinasi dengan menggunakan pelarut dengan kepolaran yang meningkat dan penyemprotan reagen pada spot untuk mengetahui golongan senyawa yang bertanggung jawab terhadap aktivitas antioksidan.

MATERI DAN METODE

Bahan

Bahan-bahan yang digunakan dalam penelitian ini yaitu Kulit buah manggis (*Garcinia mangostana L.*), metanol teknis (Bratachem), n-heksana teknis (Bratachem), aquades (Bratachem), kloroform (Bratachem), metanol PA (Asian Chemical), plat KLT silika gel 60 F₂₅₄, asam askorbat (Merck), DPPH (Sigma), dan reagen sempot FeCl₃ (Bratacho), AlCl (Bratacho), dan Citroborat (Bratacho).

Peralatan

Peralatan yang digunakan dalam penelitian ini yaitu alat-alat gelas, timbangan analitik (Adam AFP-360L), blender (Philips), oven (Binder), *moister analyzer* (Shimadzu), heater, *rotary evaporator* (Eyela), *waterbath* (Memmert), *freeze dryer*, spektrofotometer UV-Vis (GENESYS), bejana pengembang (CAMAG).

Cara Kerja

Pembuatan Ekstrak

Simplisia kulit luar dan dalam buah manggis adalah bagian kulit buah manggis yang diperoleh dari Desa Lurus, Kecamatan Baturiti, Tabanan, kemudian dikeringkan pada suhu 65°C kemudian diblender dan diayak dengan mesh 20. Serbuk kulit buah manggis di maserasi dengan menggunakan pelarut metanol. Ekstrak hasil maserasi dan remaserasi diuapkan dengan alat *Rotary evaporator* pada suhu 50°C, sehingga diperoleh ekstrak kental (Mardawati *et al.*, 2008).

Kolom dengan panjang 30 cm dan diameter 1 cm disiapkan dengan cara dikemas dengan metode basah menggunakan fase diam silika gel. Silika gel ditimbang sebanyak 4 gram. Ekstrak sebanyak 4 gram dilarutkan dengan sedikit metanol lalu diimpregnasikan dengan bubuk silika gel sebanyak 4 gram. Pemisahan ekstrak metanol kulit buah manggis menggunakan pelarut n-hexanasetil asetat dengan perbandingan (9:1, 8:2, 7:3, 6:4, 5:5, 4:6, 3:7, 2:8, 1:9, 0:10) dibuat sebanyak 20 ml. Setiap 5 ml eluat ditampung dalam vial (Mailandari, 2012).

Penentuan Kualitatif Profil KLT-Bioautografi Aktivitas Antioksidan

Secara kualitatif aktivitas antioksidan dilihat dengan pembuatan larutan sampel dari ekstrak dan fraksi metanol kulit buah manggis dan pembuatan larutan perbandingan α -mangostin. Plat kemudian dilusi dalam bejana yang telah dijenuhkan dengan fase gerak kloroform:metanol (9,5:0,5) v/v. Plat disemprotkan dengan larutan DPPH 1 mM, diamkan selama 30 menit. Kemudian diamati secara visual. Dihitung nilai Rf dan warna spot yang tampak. Spot bahan uji yang memiliki aktivitas antioksidan akan berwarna kuning dengan latar belakang ungu (Gu *et al.*, 2009).

Penentuan Nilai IC_{50} Aktivitas Antioksidan dengan Metode DPPH

Larutan DPPH diukur absorbansinya menggunakan spektrofotometer UV-Vis. Sebanyak 1,5 ml. larutan DPPH dimasukkan ke dalam kuvet, ditambahkan 1,5 ml. seri larutan uji atau larutan kontrol positif (perbandingan 1:1) dan diamkan pada suhu kamar selama 30 menit. Kontrol positif berupa larutan seri vitamin C. Larutan uji serta

kontrol positif diukur absorbansinya pada panjang gelombang maksimum (Fidrianny *et al.*, 2013). Diperoleh data berupa absorbansi ekstrak dan fraksi kulit buah manggis yang digunakan.

Penentuan Golongan Senyawa Ekstrak dan Fraksi Secara KLT

1 plat KLT akan dibagi menjadi 3 bagian lalu masing-masing bagian ditotolkan fraksi aktif dan ekstrak juga diperlakukan dengan sama seperti fraksi. Dielusi dengan menggunakan fase gerak kloroform P:metanol (9,5:0,5) v/v. Setelah terelusi maka plat dipotong menjadi 3 bagian terpisah. Plat pertama, kedua, dan ketiga masing-masing akan disemprotkan dengan pereaksi $FeCl_3$, $AlCl_3$, dan Citroborat untuk skrining fitokimia golongan flavonoid dan polifenol. Hasil positif untuk identifikasi flavonoid dengan pereaksi $FeCl_3$ ditunjukkan dengan bercak berwarna ungu, untuk pereaksi $AlCl_3$ dengan warna kuning dan identifikasi polifenol dengan pereaksi Citroborat dengan warna kuning (Mauby *dkk.*, 1970; Robinson, 1983).

HASIL DAN PEMBAHASAN

Proses ekstraksi kulit buah manggis dilakukan menggunakan metode maserasi dengan metanol sebagai luntan penyari. Kandungan lemak dalam serbuk manggis dihilangkan (*defatting*) terlebih dahulu menggunakan pelarut n-heksana sebelum dimaserasi. Maserasi dilakukan selama tiga hari dengan sesekali pengadukan dilanjutkan dengan proses remaserasi selama satu hari. Ekstrak kental yang diperoleh dari hasil maserasi kemudian diuapkan pelarutnya agar lebih pekat menggunakan oven pada suhu 50°C. Diperoleh nilai rendemen ekstrak metanol yaitu 6,25% b/b.

Ekstrak difraksinasi menggunakan kolom kromatografi, hasil fraksinasi yang diperoleh sebanyak 36 vial. Pada tumpangan vial 1-3 hasil tumpangan berwarna bening, hal ini menandakan bahwa hasil yang ditampung hanya eluen saja dan setelah diuapkan hasil tersebut tidak menghasilkan residu. Berdasarkan pola kromatogramnya maka diperoleh 4 fraksi yang dibagi menjadi fraksi A(4 dan 5), B(6-14), C(15-22), D(23-36) dengan nilai rendemen fraksi A, B, C, dan D yaitu masing-masing sebesar 19,25% b/b; 14% b/b; 3% b/b; 3,25% b/b.



Gambar 1. KLT Bioautografi (S: standar alpha mangostin, E: ekstrak dan A,B,C,D: sampel)

Berdasarkan hasil yang diperoleh pada gambar diatas, beberapa spot yang memiliki aktivitas yang antioksidan ditandai dengan spot berwarna kuning berlatar belakang ungu. Selain spot yang memiliki pola yang sama dan nilai Rf yang mendekati standar alfa mangostin (0,57) terdapat beberapa spot dengan Rf yang berbeda yang juga menunjukkan aktivitas peredaman DPPH. Pada *track* fraksi A, B, C terdapat 3 spot dengan nilai Rf fraksi A (0,37; 0,56; 0,94), fraksi B (0,40; 0,56; 0,94), fraksi C (0,32; 0,41; 0,56) sedangkan fraksi D memiliki 2 spot dengan nilai Rf 0,41 dan 0,5. Hal ini menunjukkan bahwa telah terjadi pemisahan akibat proses fraksinasi menggunakan kromatografi kolom. Intensitas warna plat KLT pada UV 254nm terlihat bahwa pada spot ekstrak, fraksi A dan fraksi B spot dengan nilai Rf 0,56 lebih jelas terlihat dan memiliki pola yang sama seperti standar alfa mangostin lebih mendominasi dibandingkan dengan spot pada fraksi C dan D. Dapat disimpulkan bahwa alfa mangostin yang merupakan turunan xanthon adalah kandungan mayor yang terdapat pada kulit buah manggis (Chaverni *et al.*, 2008). Namun pada *track* fraksi C, intensitas warna pada spot dengan Rf 0,56 tidak terlalu jelas terlihat melainkan spot dengan Rf 0,41 yang lebih kuat intensitas warnanya dan pada fraksi D spot tidak tampak spot dengan nilai Rf 0,56, melainkan terdapat spot lain yang memberikan aktivitas.

Uji Aktivitas Antioksidan Ekstrak dan Fraksi Kulit Buah Manggis (*Garcinia Mangostana L.*) menggunakan Metode DPPH

(N.P.A.D. Wijayanti, A.A.G.R.Y. Puta, I.A.P. Suryantari, G.A.D. Dwiastari)

Tabel 1. Data spot yang memiliki aktivitas antioksidan

No.	Ekstrak	Spot	Warna	Rf
1.	Standar alfa mangostin	1 (S)	Kuning dengan latar belakang ungu	0,57
2.	Ekstrak	1	Kuning dengan latar belakang ungu	0,40
		2	Kuning dengan latar belakang ungu	0,56
		3	Kuning dengan latar belakang ungu	0,94
3.	A	1	Kuning dengan latar belakang ungu	0,37
		2	Kuning dengan latar belakang ungu	0,56
		3	Kuning dengan latar belakang ungu	0,94
4.	B	1	Kuning dengan latar belakang ungu	0,40
		2	Kuning dengan latar belakang ungu	0,56
		3	Kuning dengan latar belakang ungu	0,94
5.	C	1	Kuning dengan latar belakang ungu	0,32
		2	Kuning dengan latar belakang ungu	0,41
		3	Kuning dengan latar belakang ungu	0,56
6.	D	1	Kuning dengan latar belakang ungu	0,41
		2	Kuning dengan latar belakang ungu	0,50

Hasil uji aktivitas antioksidan dengan metode DPPH diperoleh hasil masing-masing nilai IC_{50} pada ekstrak, fraksi A dan B ialah 27,51 $\mu\text{g/ml}$, 22,46 $\mu\text{g/ml}$, 22,72 $\mu\text{g/ml}$. Ekstrak, fraksi A dan fraksi B pada KLT- Bioautografi memiliki pola kromatogram yang hampir sama dilihat dari nilai Rf dan intensitas warna yang kuat jika dibandingkan dengan standar alfa mangostin. Namun pada fraksi C dilihat dari profil KLT- Bioautografi memiliki spot Rf 0,56 dengan intensitas warna yang kuning dan fraksi D yang tidak memiliki spot dengan nilai Rf yang sama dengan alfa mangostin akan tetapi menunjukkan aktivitas antioksidan yang lebih baik dengan nilai IC_{50} yaitu sebesar 10,71 $\mu\text{g/ml}$ dan 15,71 $\mu\text{g/ml}$. Sehingga dapat diduga bahwa tidak hanya alfa mangostin yang memiliki aktivitas antioksidan pada ekstrak kulit buah manggis namun terdapat senyawa lain yang mampu meredam radikal bebas.

Untuk mengetahui golongan senyawa yang berperan pada fraksi C yang merupakan fraksi tentatif maka akan dilakukan penyempurnaan dengan pereaksi kimia. Fraksi C dengan nilai IC_{50} yang paling kecil, yaitu sebesar 10,71 $\mu\text{g/ml}$. Dilakukan pengujian dengan menggunakan pereaksi sempot AlCl_3 , FeCl_3 dan sitroborat. Hasil positif untuk identifikasi flavonoid dengan pereaksi FeCl_3 ditunjukkan dengan berak berwarna ungu kehitaman, untuk pereaksi AlCl_3 dengan warna kuning dan identifikasi polifenol dengan pereaksi Citroborat dengan warna kuning (Marby dkk, 1970; Robinson, 1983). Nilai Rf yang menunjukkan hasil positif pada 0,32 dan 0,41. Diperoleh hasil bahwa fraksi C mengandung flavonoid dan polifenol yang dapat meredam radikal bebas (DPPH) seperti pada gambar berikut:



Gambar 2. Secara Visual Untuk Identifikasi Golongan Senyawa Pada Fraksi dengan menggunakan fase diam: plat silika gel GF_{254} dan fase gerak: kloroform:metanol (9,50,5 v/v) (A: pereaksi FeCl_3 , B: pereaksi AlCl_3 , C: pereaksi Citroborat)

SIMPULAN DAN SARAN

Simpulan

Aktivitas antioksidan secara kualitatif ditunjukkan dengan adanya warna spot yang berwarna kuning dengan latar belakang ungu pada ekstrak dan fraksi-fraksi. Ekstrak dan fraksi A, B, C, D menunjukkan aktivitas antioksidan sangat kuat dengan nilai IC_{50} berturut-turut adalah 27,51 $\mu\text{g/ml}$, 22,46 $\mu\text{g/ml}$, 22,72/ml, 10,71 $\mu\text{g/ml}$, 15,71 $\mu\text{g/ml}$. Fraksi C merupakan fraksi yang memiliki aktivitas lebih kuat jika dibandingkan dengan ekstrak dan fraksi lainnya dengan kandungan kimia flavonoid dan polifenol yang mampu meredam radikal bebas DPPH.

Saran

Diperlukan penelitian lebih lanjut mengenai metode pemisahan lebih spesifik pada kandungan Fraksi C yang merupakan fraksi teraktif.

UCAPAN TERIMA KASIH

Terimakasih kepada semua pihak yang terlibat pada penelitian ini termasuk pihak laboratorium bidang teknologi, analisis, bahan alam Jurusan Farmasi Universitas Udayana

DAFTAR PUSTAKA

- Chaverri, J. P., Noemi C. R., Marisol O. L, Jazmin M. P. R. 2008. Medicinal Properties of Mangosteen (*Garcinia mangostana*). *Food and Chemical technology*. 46(2008): 3227-3239.
- Dungir, S., G., Dewa, G., K., Vanda, S., K. 2012. Aktivitas Antioksidan Ekstrak Fenolik dari Kulit Buah Manggis (*Garcinia mangostana* L.). *Jurnal Mpa Unswat Online*. 1 (1): 11-15.
- Fidrianny, I. Ari, S. W., Komar, R. W. 2013. Antioxidant Capacities of Various Leaves Extract From Five Colors Varieties of Sweet Potatoes Tubers Using ABTS, DPPH Assays and Correlation with Total Flavonoid, Phenolic, Carotenoid Content. *Research Journal of Medicinal Plant*. 7(3):130-140.
- Gu, L., Tao Wu, Zhengtao Wang. 2009. TLC Bioautography-Guided Isolation of Antioxidants from Fruit of *Perilla frutescens* var. *acuta*. *LWT - Food Science and Technology* 42: 131-136
- Mardawati, F., Filianty, F., dan Manta, H. 2009. *Kajian Aktivitas Antioksidan Ekstrak Kulit Manggis (Garcinia mangostana L.) dalam Rangka Pemanfaatan Limbah Kulit Manggis di Kecamatan Puspahaning Kabupaten Tasikmalaya*. Padjajaran: FTIP Universitas Padjajaran.
- Mely Mailandari. 2012. Uji Aktivitas Antioksidan Ekstrak Daun *Garcinia kydia* Roxb. Dengan Metode DPPH dan Identifikasi Senyawa Kimia Fraksi Yang aktif. *Skrifst*. Depok: Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam Program Studi Ekstensi Farmasi Universitas Indonesia.



Aktivitas Antioksidan Ekstrak Fenolik dari Kulit Buah Manggis (*Garcinia mangostana* L.)

Stevi G. Dungir^{a*}, Dewa G. Katja^a, Vanda S. Kamu^a

^aJurusan Kimia, FMIPA, Unsrat, Manado

KATA KUNCI

Manggis
Fenolik
antioksidan

ABSTRAK

Penelitian ini bertujuan untuk menentukan kandungan total senyawa fenolik dan aktivitas antioksidan dari ekstrak kulit buah manggis. Sampel yang digunakan adalah kulit buah manggis segar dan kering, diekstraksi dengan pelarut air panas dan metanol selama 24 jam. Metode penelitian ini dilakukan dengan menentukan kandungan total senyawa fenolik dan aktivitas antioksidan menggunakan metode penangkal radikal bebas DPPH. Kandungan total senyawa fenolik tertinggi pada ekstrak metanol sampel kering (MK), diikuti ekstrak metanol sampel basah (MB), ekstrak air sampel kering (AK), dan ekstrak air sampel basah (AB). Aktivitas antioksidan sebagai penangkal radikal bebas DPPH yang besar diketahui dengan nilai IC_{50} yang kecil, yaitu aktivitas antioksidan tertinggi pada MK sebesar 44,49 mg/L, diikuti MB, AK, AB berurut-turut 54,95; 346,73; 346,74 mg/L.

KEYWORDS

Mangosteen
Phenolic
antioxidants

ABSTRACT

This study has been conducted to measure the total phenolic compounds and antioxidant activity of mangosteen skin extract. The samples were prepared by extracting the fresh and dry mangosteen skin using hot water and methanol for 24 hours. The total phenolic compounds and the antioxidant activity of the samples were measured using Folin-Ciocalteu method and DPPH method respectively. The result showed that the methanol extract of dry mangosteen skin gave the highest total phenolic compounds, followed by methanol extract of fresh mangosteen skin, water extract of dry mangosteen skin and water extract of dry mangosteen skin. The antioxidant activity of the samples were measured as the IC_{50} values. The highest IC_{50} value was in methanol extract of dry mangosteen skin (44.49 mg/L), followed by methanol extract of fresh mangosteen skin, water extract of dry mangosteen skin and water extract of dry mangosteen skin.

1. Pendahuluan

Berbagai penyakit dalam tubuh disebabkan oleh adanya radikal bebas. Radikal bebas adalah atom atau gugus yang memiliki satu atau lebih elektron tidak berpasangan. Radikal bebas juga dijumpai pada lingkungan, beberapa logam (contohnya besi dan tembaga), asap rokok, obat, makanan dalam kemasan, bahan aditif, dan lain-lain (Droge, 2002).

Dalam melindungi tubuh dari serangan radikal bebas, substansi antioksidan berfungsi untuk menstabilkan radikal bebas dengan melengkapi kekurangan elektron dari radikal bebas sehingga menghambat terjadinya reaksi berantai (Windono et

al, 2001). Menurut Windono et al. (2001), antioksidan adalah senyawa yang dapat digunakan untuk melindungi bahan pangan melalui perlambatan kerusakan, ketengikan atau perubahan warna yang disebabkan oleh oksidasi. Antioksidan mampu bertindak sebagai penyumbang radikal hidrogen atau dapat bertindak sebagai akseptor radikal bebas sehingga dapat menunda tahap inisiasi pembentukan radikal bebas.

Adanya antioksidan alami (seperti senyawa fenolik) maupun sintesis dapat menghambat oksidasi lipid, mencegah kerusakan, perubahan komponen organik dalam bahan makanan sehingga dapat memperpanjang umur simpan (Rohdiana, 2001).

*Corresponding author: Jurusan Kimia FMIPA UNSRAT, Jl. Kampus Unsrat, Manado, Indonesia 95115; Email address: stevigang2@gmail.com

Beberapa penelitian menunjukkan bahwa kulit buah manggis (*Garcinia mangostana* L.) mengandung senyawa yang memiliki aktivitas farmakologi dan antioksidan. Senyawa tersebut diantaranya flavonoid, tanin dan xanton (Ho et al., 2002; Jung et al., 2006; Moorgiamdi et al., 2004; Weecharangan et al., 2006)

Sangat banyak manfaat dari kulit buah manggis, namun demikian belum ada penelitian yang mengungkapkan tentang aktivitas antioksidan ekstrak metanol dari kulit buah manggis. Penelitian ini bertujuan untuk menentukan kandungan total fenolik ekstrak kulit buah manggis serta pengaruh ekstrak kulit buah manggis terhadap aktivitas antioksidan.

2. Metode

2.1. Alat

Alat yang digunakan adalah kertas saring Whatman, timbangan digital, mikropipet, spektrofotometer UV-Vis Milton Roy 501, rotary evaporator, vakum, vortex, water bath, desikator, dan ayakan 65 mesh.

2.2. Bahan

Bahan-bahan yang digunakan sebagai sampel yaitu kulit buah manggis segar dan kering. Bahan-bahan kimia yang digunakan yaitu metanol 96%, aquades yang dipanaskan, 1,1-difenil-2-picilhidrazil (DPPH), reagen Folin Ciocalteu 50%, larutan Na₂CO₃ 2%, aquades.

2.3. Prosedur Penelitian

2.3.1. Pengambilan dan Penetapan Sampel

Sampel yang digunakan adalah kulit buah manggis yang diperoleh dari Pasar Bersihati, Manado, Sulawesi Utara. Sampel yang digunakan adalah sampel segar (basah) dan kering. Untuk sampel basah, sampel dicuci dan dipotong-potong kecil, sedangkan untuk sampel kering, sampel dikeringginkan selama 3 hari kemudian dihaluskan dengan blender lalu disaring dengan ayakan 65 mesh untuk mendapatkan serbuknya.

2.3.2. Pembuatan Ekstrak

Sebanyak 50 g sampel dimaserasi dengan 200 mL metanol dalam Erlenmeyer 500 mL selama 24 jam dengan beberapa kali pengadukan. Ditakukan perlakuan yang sama terhadap pelarut air panas. Setelah itu larutan disaring dengan menggunakan vakum dan kertas saring untuk memisahkan ampas dan filtratnya, filtratnya kemudian dievaporasi untuk menguapkan pelarutnya. Sehingga diperoleh ekstrak pelarut dari kulit buah manggis. Ekstrak kemudian ditimbang dan disimpan pada suhu 40 °C. Masing-masing ekstrak kemudian dilarutkan dalam metanol.

2.3.3. Penentuan Kandungan Total Fenolik

Kandungan total fenolik kulit buah manggis ditentukan dengan metode Jeong et al. dalam Kiy et al. (2011). Sebanyak 0,1 mL ekstrak metanol dan air dimasukkan dalam tabung reaksi lalu ditambah 0,1

mL reagen Folin Ciocalteu 50%, campuran tersebut divortex selama 3 menit, lalu ditambah 2 mL larutan Na₂CO₃ 2%, selanjutnya campuran disimpan dalam ruangan gelap selama 30 menit. Absorbansinya dibaca pada panjang gelombang 750 nm dengan spektrofotometer UV-Vis. Hasilnya diplotkan terhadap kurva standar asam galat yang dipersiapkan dengan cara sama. Kandungan total fenol dinyatakan sebagai mg ekivalen asam galat/g ekstrak.

2.3.4. Penentuan Aktivitas Penangkal Radikal Bebas DPPH

Penentuan aktivitas penangkal radikal bebas DPPH kulit buah manggis ditentukan dengan metode Gaultjac et al. dalam Kiy et al. (2011) yang sedikit dimodifikasi. Sebanyak 0,5 mL masing-masing ekstrak metanol dan air (kering dan basah) ditambahkan dengan 2 mL larutan DPPH dan divortex selama 2 menit. Berubahnya warna larutan dari ungu ke kuning menunjukkan efisiensi penangkal radikal bebas. Selanjutnya pada 5 menit terakhir menjelang 30 menit inkubasi, absorbansinya diukur pada panjang gelombang 517 nm dengan menggunakan spektrofotometer UV-Vis. Aktivitas penangkal radikal bebas dihitung sebagai persentase berkurangnya warna DPPH dengan menggunakan persamaan:

% Aktivitas penangkal radikal bebas =

$$\left(1 - \frac{\text{absorbansi sampel} + \text{kontrol}}{\text{absorbansi kontrol}}\right) \times 100\%$$

Dari harga persen penangkal radikal bebas yang diperoleh, dibuat kurva antara persen penangkal radikal bebas terhadap konsentrasi larutan uji. Dari persamaan regresi linear tersebut dapat ditentukan nilai IC₅₀, yaitu konsentrasi inhibisi brutan uji yang mampu menangkal 50% radikal bebas.

3. Hasil dan Pembahasan

3.1. Ekstrak Kulit Buah Manggis

Ekstraksi kulit buah manggis dilakukan dengan pelarut air panas dan metanol 96%. Kulit buah manggis yang dimaserasi selama 24 jam adalah kulit buah manggis segar (basah) dan kulit buah manggis kering. Persen rendemen masing-masing ekstrak terlihat pada Tabel 1.

Tabel 1 – Persen rendemen ekstrak kulit buah manggis

Ekstrak	% rendemen
air sampel kering (AK)	1,2
air sampel basah (AB)	1,1
metanol sampel kering (MK)	21
metanol sampel basah (MB)	15,5

Tabel 1 menunjukkan bahwa hasil ekstraksi pelarut tertinggi diperoleh dari ekstrak metanol sampel kering (MK) dengan rendemen sebesar 21%,

sedangkan untuk ekstrak pelarut air sampel kering dan basah (AK dan AB), ekstrak metanol sampel basah (MB) menghasilkan rendemen berturut-turut adalah 12%, 11% dan 15,5%. Persen rendemen ekstrak metanol lebih tinggi karena ketika diekstraksi senyawa-senyawa yang terakstrak lebih banyak terlarut dalam pelarut metanol dibandingkan dengan air.

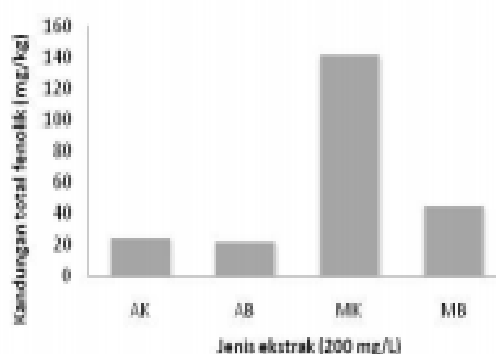
Penambahan pelarut pada suatu bahan harus didasarkan pada sifat kelarutan dari pelarut yang digunakan dan sifat dari komponen yang akan dilarutkan. Komponen fenolik dapat diekstraksi dari bahan tumbuhan dengan menggunakan pelarut seperti air, metanol, etanol, aseton, dan asetat.

3.2. Kandungan Total Fenolik

Analisis kandungan total fenolik dilakukan untuk mengetahui potensi ekstrak kulit buah manggis sebagai penangkal radikal bebas dan penstabil

oksigen singlet. Tubuh manusia menghasilkan senyawa antioksidan, tetapi jumlahnya seringkali tidak cukup untuk menetralkan radikal bebas yang masuk ke dalam tubuh. Komponen kimia yang berperan sebagai antioksidan adalah senyawa golongan fenolik dan polifenolik. Senyawa-senyawa golongan tersebut banyak terdapat di alam, terutama pada tumbuh-tumbuhan, dan memiliki kemampuan untuk menangkap radikal bebas (Ranila *et al.*, 2008).

Untuk menentukan besarnya kandungan total fenolik kulit buah manggis digunakan persamaan kurva standar asam galat. Penggunaan asam galat sebagai standar dikarenakan senyawa ini sangat efektif untuk membentuk senyawa kompleks dengan reagen Folin-Ciocalteu, sehingga reaksi yang terjadi lebih sensitif dan intensif (Jukunen-Titto dalam Kiy *et al.*, 2011). Hasil analisis kandungan total fenolik ekstrak kulit buah manggis diberikan pada Gambar 1.



Gambar 1 – Kandungan total fenolik ekstrak kulit buah manggis (AK: ekstrak air sampel kering, AB: ekstrak air sampel basah, MK: ekstrak metanol sampel kering, MB: ekstrak metanol sampel basah).

Berdasarkan Gambar 2 diketahui bahwa kandungan total fenol tertinggi dihasilkan oleh ekstrak dengan pelarut metanol sampel kering (MK) sebesar 141,837 mg/kg, hal ini dapat dilihat dari perubahan warna dari warna kuning menjadi warna biru, dengan perbedaan warna yang semakin pekat dibandingkan dengan ekstrak lainnya. Hal ini menunjukkan bahwa senyawa-senyawa fenolik pada kulit buah manggis lebih larut pada pelarut metanol.

Tingginya kandungan fenol yang terakstraksi dikarenakan pengaruh pelarut yang digunakan untuk ekstraksi. Pelarut seperti metanol dan etanol merupakan pelarut yang sangat luas digunakan dan efektif untuk ekstraksi komponen-komponen fenolik dari bahan alam (Shahid dalam Katja dan Suyarto, 2009).

Kandungan total fenolik dapat dihasilkan dari sejumlah molekul sederhana yaitu senyawa fenolik, sampai dengan molekul kompleks seperti tanin (tanin terhidrolisis dan tanin terkondensasi) (Robards *et al.*,

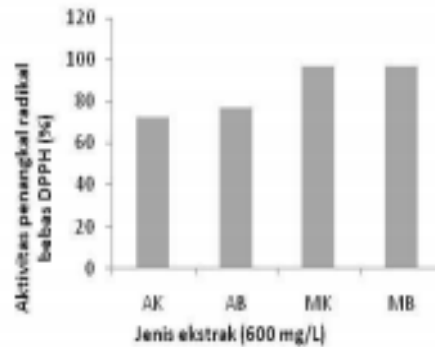
1999). Senyawa-senyawa fenolik dilaporkan dapat bereaksi dengan senyawa oksigen reaktif, hal ini disebabkan satu atau dua gugus hidroksil pada cincin aromatik yang bisa berperan sebagai donor hidrogen.

3.3. Aktivitas Penangkal Radikal Bebas DPPH

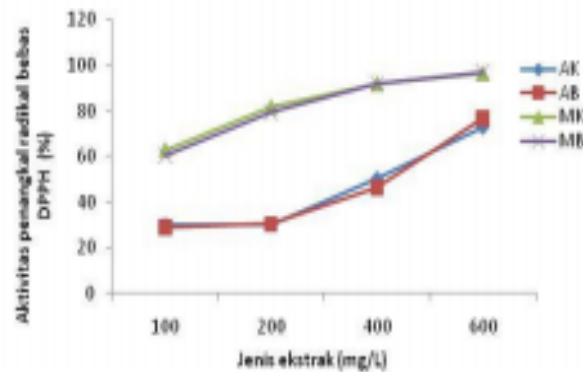
Aktivitas penangkal radikal bebas dari ekstrak kulit buah manggis dapat diukur dengan pengujian radikal DPPH yaitu dengan mereaksikan 0,5 mL ekstrak kulit buah manggis dengan 2 mL larutan DPPH dan absorbansinya diukur pada λ 517 nm yang merupakan panjang gelombang maksimum. Ekstrak kulit buah manggis memiliki kemampuan sebagai penangkal radikal bebas yang sangat baik, hal ini terlihat pada Gambar 3. Aktivitas penangkal radikal dibuktikan dengan perubahan warna ungu menjadi warna kuning, dan ketika ekstrak ditambahkan larutan DPPH, ekstrak metanol menunjukkan aktivitas penangkal yang lebih besar ditandai dengan langsung seketika berubahnya warna ungu menjadi warna kuning ketika ditambahkan DPPH.

Berdasarkan hasil analisis aktivitas penangkal radikal bebas DPPH dalam Gambar 3, ekstrak metand memiliki aktivitas paling tinggi dari ekstrak air, dengan aktivitas penangkal radikal bebas DPPH

paling besar adalah ekstrak metand sampel basah (MB) sebesar 96,91%, diikuti MK, AB, dan AK dengan kandungan fenolik berturut-turut adalah 96,61; 76,75 dan 72,65%.



Gambar 2 – Grafik aktivitas penangkal radikal bebas DPPH (AK: ekstrak air sampel kering, AB: ekstrak air sampel basah, MK: ekstrak metand sampel kering, MB: ekstrak metand sampel basah).



Gambar 3 – Grafik aktivitas penangkal radikal bebas DPPH pada berbagai konsentrasi (AK: ekstrak air sampel kering, AB: ekstrak air sampel basah, MK: ekstrak metand sampel kering, MB: ekstrak metand sampel basah).

Pada prinsipnya metode penangkal radikal bebas merupakan pengukuran penangkalan radikal bebas sintetik dalam pelarut organik polar seperti metand pada suhu kamar oleh suatu senyawa yang mempunyai aktivitas antioksidan. Proses penangkalan radikal bebas ini melalui mekanisme pengambilan atom hidrogen dari senyawa antioksidan oleh radikal bebas sehingga radikal bebas menangkap satu elektron dari antioksidan. Radikal bebas sintetik yang digunakan adalah DPPH, senyawa ini bereaksi dengan senyawa antioksidan melalui pengambilan atom hidrogen dari senyawa antioksidan untuk mendapatkan pasangan elektron. Keberadaan sebuah antioksidan dimana dapat menyumbangkan elektron kepada DPPH, menghasilkan warna kuning yang merupakan ciri spesifik dari reaksi radikal DPPH (Pokorny et al., dalam Klay et al., 2011). Senyawa yang memiliki kemampuan penangkal radikal

umumnya merupakan pendonor atom hidrogen (H), sehingga atom H tersebut dapat ditangkap oleh radikal DPPH untuk berubah menjadi bentuk netralnya.

Untuk penentuan IC_{50} dibuat persamaan regresi persentase aktivitas penangkal radikal bebas DPPH ekstrak kulit buah manggis terhadap konsentrasi ekstrak 100, 200, 400 dan 600 mg/L. Dari harga persen aktivitas penangkal radikal bebas yang diperoleh dari beberapa konsentrasi ekstrak (Gambar 3), dibuat kurva antara persen penangkal radikal bebas terhadap konsentrasi larutan uji untuk menentukan nilai IC_{50} . Nilai IC_{50} dihitung dengan menggunakan rumus persamaan regresi linear yaitu $y = ax + b$, dengan nilai y adalah 50 dan x adalah IC_{50} . Hasil perhitungan nilai IC_{50} dari masing-masing ekstrak dapat dilihat pada Tabel 2.

Tabel 2 – Persamaan regresi dan nilai IC₅₀ dari ekstrak kulit buah manggis.

No	Ekstrak	Persamaan	R ²	IC ₅₀	Konsentrasi mg/L
1	AK	y=54,18x-85,28	0,820	2,4968862	346,73
2	AB	y=57,71x-94,11	0,770	2,497141	346,73
3	MK	y=43,36x-21,47	0,966	1,648293	44,49
4	MB	y=47,35x-32,42	0,978	1,740855	54,95

Berdasarkan data pada Tabel 2, besarnya aktivitas antioksidan ditandai dengan besarnya nilai IC₅₀, yaitu konsentrasi larutan sampel yang dibutuhkan untuk menghambat 50% radikal bebas DPPH. Semakin kecil nilai IC₅₀ maka semakin besar aktivitas penangkal radikal bebas DPPH.

Berdasarkan hal tersebut maka uji aktivitas antioksidan dengan menggunakan metode DPPH terhadap ekstrak metanol dan air pada konsentrasi 100, 200, 400, dan 600 mg/L untuk penentuan nilai IC₅₀ dapat dilihat bahwa ekstrak metanol kulit buah manggis memiliki potensi penangkal radikal yang relatif besar, dengan konsentrasi yang kecil yaitu 44,49 mg/L dan 54,45 mg/L sudah dapat menangkal radikal bebas sebesar 50%. Untuk ekstrak air sampel kering dan basah, nilai konsentrasi ekstrak yang dapat menangkal 50% radikal bebas berturut-turut adalah 346,73 mg/L dan 346,73 mg/L. Artinya pada konsentrasi tersebut ekstrak air sampel kering dan basah sudah memiliki potensi sebesar 50 % dalam menangkal radikal bebas.

4. Kesimpulan

Berdasarkan hasil penelitian dapat disimpulkan bahwa ekstrak kulit buah manggis memiliki kandungan total fenolik dan aktivitas antioksidan yang besar, dengan kandungan total fenolik dan aktivitas antioksidan tertinggi pada ekstrak metanol sampel kering, diikuti ekstrak metanol sampel basah, ekstrak air sampel kering dan ekstrak air sampel basah.

Daftar Pustaka

- Droge, W. Free Radicals in The Physiological Control of Cell Function. *Physiol Rev.* **2002**, 82, 47-95.
- Ho, C. K., Huang, Chen, Gardone E, a Xanthone Derivative, Has Potent Cytotoxic Effect Against Hepatocellular Carcinoma Cell Lines. *Ranta Med.* **2002**, 68, 975-979.
- Jung, H. A., Su, B. N., Kaffer, W. J. Mahta, R. G. Kingtom, A. D. Antioxidant Xanthones from The

Pericarp of *Garcinia mangostana* (Mangosteen). *J Agric. Food Chem.* **2000**, 54, 2077-2082.

- Katja, D. G. dan Suyanto, E. Efek Peristabil Oksigen Singlet Ekstrak Powarna dari Daun Bayam Terhadap Fotooksidasi Asam Urolat, Protein, dan Asam askorbat. *Chem. Prog.* **2000**, 2,79-86
- Klay, N., Suyanto, E., Marnahit, L., Efek Lama Perendaman Ekstrak Kalamansi (*Citrus Microcarpa*) terhadap Aktivitas Antioksidan Tepung Pisang Goroho (*Musa spp.*). *Chem. Prog.* **2011**, 4, 27-33
- Mbongkardi, P., Kosem, N., Kaslungka, S., Luantana, O., Pongpan, N., Naungon, N. Antiproliferation, Antioxidation and Induction of Apoptosis by *Garcinia mangostana* (Mangosteen) on SKBR3 Human Breast Cancer Cell Line. *J Ethnopharmacol* **2004**, 90, 161-166.
- Ramli, S. F. M., Kawamura, F., Subiman, O., Hashim, R. Study on Antioxidant Activities, Total Phenolic Compound, and Antifungal Properties of Some Malaysian Timbers from Selected Hardwoods Species. *International Conference of Environmental Research and Technology.* **2008**, 473-475
- Robards, K., Prenzler, P., Tucker, D., Swatsang G., Glover, W. Phenolic Compounds and Their Role in Oxidative Process in Fruits. *Food Chem.* **1999**, 66, 401-436
- Rohdiana, D. Aktivitas Daya Tangkap Radikal Polifenol dalam Daun Teh. *Majalah Jurnal Indonesia* **2001**, 12, 53-58.
- Vecharangan, W., Opanasopit, P., Sukma, M., Ngawhinpat, T., Solanaphun, U., Siripong, P. Antioxidative and Neuroprotective Activities of Extracts from The Fruit Hull of Mangosteen (*Garcinia mangostana* Lim.). *Med Princ Pract.* **2006**, 15, 281-287.
- Windono, T., Soediman, S., Yudawati U., Emawati, E., Silelita, Erowati, T. I. Uji Peredam Radikal Bebas terhadap 1,1-Diphenyl-2-Picrylhydrazyl (DPPH) dari Ekstrak Kulit Buah dan Biji Anggur (*Vitis vinifera* L.) Probolinggo Biru dan Putih. *Antocarpus.* **2001**, 1, 34-43

Aktivitas Antioksidan dan Sifat Kestabilan Warna Campuran Ekstrak Etil Asetat Kulit Buah Manggis (*Garcinia mangostana* L.) dan Kayu Secang (*Caesalpinia sappan* L.)

MIKSUSANTI, ELFITA, DAN HOTDELINA S.

Jurusan Kimia, Universitas Sriwijaya, Sumatera Selatan, Indonesia

INTISARI: Aktivitas antioksidan dari ekstrak etil asetat kulit buah Manggis (*Garcinia mangostana* L.) dan kayu Secang (*Caesalpinia sappan* L.) serta kombinasinya telah dipelajari dengan metode 1,1 difenil-2-pikrilhidrazil (DPPH). Campuran warna terbaik adalah perbandingan 1:2 ($M_1 : S_2$) dan telah dilakukan uji stabilitas ekstrak warnanya terhadap pengaruh pH, stabilitas terhadap oksidator, sinar UV, waktu dan suhu pemanasan, serta suhu selama penyimpanan dengan mengukur absorbansinya pada λ_{max} 440 nm. Hasil pengujian menunjukkan bahwa aktivitas antioksidan ekstrak etil asetat kulit buah Manggis lebih aktif dibandingkan dengan ekstrak etil asetat kayu Secang dengan IC_{50} 14,1882 ppm. Ekstrak etil asetat kulit buah Manggis ini hampir sebanding dengan standar antioksidan asam askorbat yang memberikan IC_{50} 15,3769 ppm. Kombinasi terbaik campuran ekstrak etil asetat kayu Secang dan kulit buah Manggis yang memberikan aktivitas antioksidan tertinggi dengan persen inhibisi sebesar 96% dan IC_{50} setelah 17,6791 ppm adalah perbandingan 1:1 ($M_1:S_1$). Semua perlakuan uji kestabilan menyebabkan perubahan warna. Warna campuran berubah dari kuning menjadi kuning pucat dan jingga. Persentase perubahan serapan warna campuran berturut-turut adalah: 26% untuk pengaruh oksidator, 34% untuk pengaruh sinar UV pada botol gelap, 35% untuk pengaruh penyimpanan suhu dingin, 97% untuk pengaruh sinar UV pada botol bening, dan 93% penyimpanan pada suhu kamar. Ekstrak etil asetat kulit buah Manggis dan kayu Secang menghasilkan warna yang berfungsi sebagai antioksidan yang potensial.

KATA KUNCI: antioksidan, DPPH, warna, kulit buah Manggis, kayu Secang

ABSTRACT: Antioxidant activity of ethyl acetate extract of Mangosteen husk (*Garcinia mangostana* L.) and Secang wood (*Caesalpinia sappan* L.) and its combination have been studied by 1,1-diphenyl-2-picrylhydrazyl (DPPH) methods. The best mixture for colour was combination 1:2 ($M_1 : S_2$) and have been tested for its colour stability. The parameter were influence pH, stability to oxidator, light of UV, time and warm-up temperature, and also temperature of during depository with measuring its absorbance at λ_{max} 440 nm. The result indicate that antioxidant activity ethyl acetate extract of Mangosteen husk more active than ethyl acetate extract of Secang wood with IC_{50} 14.1882 ppm. This ethyl acetate extract Mangosteen husk is proportional almost with the standard antioxidant of ascorbat acid giving IC_{50} 15.3769 ppm. The best combination mixture ethyl acetate extract of Secang wood and Mangosteen husk is combination 1:1 ($M_1 : S_1$). At this combination radical inhibition was 96% with IC_{50} 17.6791 ppm. All the treatment effect the intensity of colour. The colour change from yellow to orange (dark orange). Percentage of absorbance colour change were 26% for oxidator effect, 34% for UV effect at dark bottle, 35% for cold temperature, 97% for UV effect at transparent bottle, and 93% at room temperature. Ethyl acetate extract of Mangosteen husk and Secang wood contain the pigment which have antioxidant potency.

KEYWORDS: antioxidant, DPPH, colour, Mangosteen husk, Secang wood

E-MAIL: ati_mik@yahoo.com

1 PENDAHULUAN

Senyawa antioksidan memiliki peran yang sangat penting bagi kesehatan. Berbagai bukti ilmiah menunjukkan bahwa senyawa antioksidan mengurangi risiko terhadap penyakit degeneratif. Antioksidan

adalah zat yang dapat menetralkan radikal bebas sehingga atom dengan elektron yang tidak berpasangan mendapat pasangan elektron^[1]. Penggunaan senyawa antioksidan semakin berkembang, baik untuk makanan maupun untuk pengobatan seiring dengan

bertambahnya pengetahuan tentang aktivitas radikal bebas^[4]. Stres oksidatif merupakan keadaan yang tidak seimbang antara jumlah molekul radikal bebas dan antioksidan di dalam tubuh^[5]. Senyawa antioksidan merupakan suatu inhibitor yang digunakan untuk menghambat autooksidasi. Efek antioksidan senyawa fenolik dikarenakan sifat oksidasi yang berperan dalam menetralkan radikal bebas^[4].

Warna merupakan salah satu faktor yang mempengaruhi penerimaan konsumen terhadap suatu produk pangan. Oleh karena itu, banyak produk pangan yang ditambahkan pewarna untuk membuat produk tersebut lebih menarik. Penyalahgunaan pewarna sintetis dapat menyebabkan kanker, stroke, dan penyakit jantung^[6]. Melihat efek samping yang cukup berbahaya, masyarakat beralih untuk menggunakan pewarna alami yang lebih sehat dan aman.

Kayu Secang merupakan sumber zat warna merah, yang dapat dipakai sebagai bahan pewarna katun, sutera dan minuman. Bagian terdahul kayu Secang (*Heartwood*) mengandung wama merah yang disebut Sappanin. Kayu Secang juga mengandung Brazin, yaitu senyawa penting penghasil warna merah benasul dari kayu brazil (*Brazilwood*). Ekstrak zat warna yang diperoleh merupakan 20% dari berat bagian dalam kayu kering^[7]. Hasil uji fitokimia menunjukkan batang bagian luar dan bagian dalam mengandung alkaloid, flavonoid, triterpen, kumarin, tanin, dan glikosida^[8]. Terdapatnya kandungan flavonoid dan senyawa fenolat lainnya pada kayu secang, mengindikasikan secang berpotensi sebagai antioksidan. Kayu Secang telah lama digunakan sebagai pewarna alami dan obat tradisional sebagai jamu dan minuman yang sangat digemari karena rasanya yang dapat diterima secara organoleptik. Buah Manggis pada umumnya dikonsumsi daging buahnya sedangkan kulitnya yang mencakup $\frac{1}{2}$ bagian dibuang. Hal ini sangat disayangkan karena peningkatan nilai ekonomis

Buah manggis dapat dilakukan dengan pemanfaatan kulitnya. Penelitian-penelitian fitokimia sebelumnya menyatakan bahwa kulit buah manggis (KBM) merupakan senyawa flavonoid dengan berbagai manfaat. Senyawa-senyawa flavonoid dapat mencegah stroke, menghambat pertumbuhan sel tumor, bersifat antiinflamasi, antiviral, dan memiliki aktivitas antimikroba^[9]. Kandungan kimia kulit Manggis adalah santon, mangostin, gasicinon, flavonoid dan tanin. Menurut hasil penelitian kulit buah Manggis memiliki aktivitas HIV tipe 1^[10], antibakteri, antioksidan, dan antimetastasis pada lentera usus^[11].

Pada penelitian ini akan dilakukan pencampuran warna ekstrak kulit buah Manggis dan kayu Secang. Ekstrak warna dari kulit buah Manggis dan kayu Secang serta campuran keduanya akan dilakukan pengujian aktivitas antioksidan dengan menggunakan metode DPPH (1,1-diphenyl-2-picrylhydrazyl). Cam-

puran warna ekstrak etil asetat kulit manggis dan kayu Secang yang optimum aktif antioksidan akan dilakukan uji kestabilan terhadap pH, oksidator, pemapasan, sinar UV dan suhu selama penyimpanan.

2 METODE PENELITIAN

2.1 Alat dan Bahan

Alat. Alat-alat yang digunakan berupa piala stainless steel, autoclave, shaker, neraca analitik, blender kering, sentrifus, Spektrometer Genosys 20, selip, batang pengaduk, botol vial gelap, plastik wrap (cling wrap), seperangkat alat distilasi, rotary vacuum evaporator, pH-meter, lampu UV, aluminium foil, labu ukur, botol kaca berwarna gelap, mikropipet dan peralatan gelas kimia.

Bahan yang digunakan. Bahan utama yang digunakan dalam penelitian ini adalah buah Manggis dan kayu Secang yang diperoleh dari pasar 16 Iir Palembang Sumatera Selatan. Bahan-bahan lain yang digunakan adalah aquadest, etil asetat teknis yang sudah didistilasi, Metanol p.a, H₂O₂, HCl, NaOH, DMSO, DPPH, dan asam askorbat.

2.2 Prosedur Kerja

Persiapan sampel. Kulit Manggis diambil dari buah Manggis yang sudah matang (5 kg) dipisahkan dari buahnya dengan menggunakan pisau stainless steel sehingga diperoleh kulit buahnya saja, lalu dibersihkan, dipotong kecil-kecil, dan dikeringkan pada suhu kamar sampai beratnya konstan. Kulit Manggis yang telah kering di blender kering untuk memperoleh serbuk kulit Manggis.

Kayu Secang yang kering (3 kg) digiling untuk memperoleh serbuk kayu Secang. Serbuk kayu Secang dan kulit Manggis disimpan dalam keadaan kering agar tidak terkena jamur sebelum digunakan selanjutnya.

Ekstraksi kulit buah Manggis dan kayu Secang. Serbuk kulit buah Manggis sebanyak 350 gram dimaserasi dengan pelarut etil asetat yang sudah didistilasi. Residu diekstrak lagi sampai filtrat yang tertampung berwarna jernih. Untuk memisahkan filtrat dan residu digunakan sentrifus dengan kecepatan 2000 rpm selama 30 menit. Filtrat yang ada ditampung dalam erlenmeyer kemudian dipisahkan dengan rotary vacuum evaporator sampai diperoleh ekstrak pekat etilasetat kulit buah Manggis. Hal yang sama juga dilakukan untuk mendapatkan ekstrak pekat etil asetat kayu Secang.

Uji aktivitas antioksidan dari kulit buah Manggis dan kayu Secang serta campurannya dengan

metode DPPH^[14]. Larutan DPPH 0,05 mM disiapkan dalam metanol. Larutan induk ekstrak etil asetat kulit buah Manggis dibuat dalam dimetil sulfolida (DMSO) dengan konsentrasi 1000 g/mL. Variasi konsentrasi dibuat dengan pengenceran larutan induk menjadi 500, 250, 125, 62,5, 31,25, 15,625 dan 0 g/mL. Kepala 0,2 mL berbagai konsentrasi larutan ditambahkan 3,8 mL larutan DPPH 0,05 mM. Campuran larutan dihomogenkan dan dibiarkan selama 30 menit di tempat gelap. Serapan diukur dengan spektrofotometer UV-Vis pada λ_{maks} 517 nm. Aktivitas antioksidan ekstrak etil asetat kulit buah Manggis ditentukan oleh besarnya hambatan serapan radikal DPPH melalui perhitungan persentase inhibisi serapan DPPH dengan rumus sebagai berikut:

$$\% \text{Inhibisi} = \frac{A_k - A_s}{A_k} \times 100$$

A_k = Absorban kontrol

A_s = Absorban sampel

Aktivitas antioksidan ekstrak etil asetat kayu Secang ditentukan dengan perlakuan yang sama seperti ekstrak etil asetat kulit buah Manggis. Untuk kontrol positif digunakan antioksidan standar (asam askorbat) dengan perlakuan yang sama seperti ekstrak tunggal. Nilai IC_{50} (inhibition concentration) didefinisikan sebagai konsentrasi sampel yang dibutuhkan untuk menghambat oksidasi sebesar 50% atau konsentrasi sampel uji yang dibutuhkan untuk menangkap 50% radikal DPPH. Grafik dibuat dengan konsentrasi sampel uji (ppm) sebagai absis (sumbu x) terhadap % inhibisi sebagai ordinat (sumbu y). Nilai IC_{50} merupakan konsentrasi dimana ekstrak dapat menangkap radikal bebas sebesar 50% yang diperoleh dengan memakai persamaan regresi linier $y = aX + b$. Secara spesifik, suatu senyawa dikatakan sebagai antioksidan yang sangat kuat bila nilai $IC_{50} < 50$ ppm, kuat bila nilai IC_{50} bernilai 50-100 ppm, sedang bila nilai IC_{50} bernilai 100-150 ppm, dan lemah bila nilai IC_{50} bernilai 151-200 ppm^[12].

Untuk menentukan kestabilan paling optimum pada variasi ekstrak etil asetat kulit Manggis dan ekstrak etil asetat kayu Secang, maka dilakukan penggabungan keduanya untuk kemudian di lakukan penggabungan pengujian terhadap kombinasinya untuk mengetahui apakah aktivitas antioksidan yang dihasilkan bersifat sinergis (aktivitas antioksidan hasil kombinasi lebih besar dari aktivitas antioksidan dari sampel tunggalnya) atau antagonis (aktivitas antioksidan hasil kombinasi sampel lebih kecil dari aktivitas antioksidan dari sampel tunggalnya). Dibuat campuran ekstrak campuran ekstrak warna kulit Manggis dan kayu Secang dengan perbandingan variasi kombinasi: 1:1 ($M_1 : S_1$), 1:2 ($M_1 : S_2$), 2:1 ($M_2 : S_1$), dengan M adalah ekstrak etil asetat kulit buah Manggis dan S adalah ekstrak etil asetat kayu Secang.

Masing-masing kombinasi konsentrasi sampel diuji absorbansinya menggunakan spektrofotometer UV-VIS pada λ_{maks} 517 nm dengan cara yang sama dengan sampel tunggal.

Uji kestabilan campuran terbaik ekstrak etil asetat kulit buah Manggis dan kayu Secang^[14]. Pengujian stabilitas terhadap oksidator, cahaya, suhu pemanasan dan penyimpanan dilakukan pada pH awal ekstrak kulit buah Manggis dan kayu Secang tunggal dan kombinasi keduanya untuk mempertahankan kestabilan warna. Kondisi pH awal dari larutan kombinasi ekstrak kulit buah Manggis dan kayu Secang selanjutnya diukur pada berbagai parameter uji kestabilan.

Pengujian stabilitas ekstrak campuran kulit buah Manggis dan kayu Secang yang terpilih dilakukan dengan melihat karakteristik terhadap beberapa variasi pH, serta mengukur kestabilannya terhadap oksidator, cahaya, suhu pemanasan, dan kondisi penyimpanan (suhu dingin dan suhu ruang). Stabilitas digambarkan dalam persen perubahan warna (%) yang dihitung dengan menggunakan persamaan: $(B - A)/A \times 100\%$ dimana A adalah nilai absorbansi warna sebelum diberi perlakuan dan B adalah nilai absorbansi setelah diberi perlakuan.

- a. Karakterisasi zat warna campuran ekstrak etil asetat kulit buah Manggis dan kayu Secang pada beberapa variasi pH

Kombinasi campuran ekstrak kulit buah Manggis dan kayu Secang yang terpilih dilarutkan dalam aquades, dibuat konsentrasi 500 ppm. Untuk melihat variasi pH, maka larutan diatur pH-nya menjadi pH 1-8 dengan 1M HCl atau 10% NaOH dan dibiarkan selama 30 menit. Spektra UV-Visibel larutan zat warna pada setiap nilai pH diukur dengan spektrofotometer pada panjang gelombang 400 sampai 700 nm untuk melihat pergeseran panjang gelombang maksimum.

- b. Stabilitas terhadap oksidator

Kombinasi campuran ekstrak yang terpilih ditambah 0,25 ml H_2O_2 (1%) (volume akhir larutan dijaga tetap 10 ml) dimasukkan ke dalam botol gelap. Hasil campuran komposisi optimum ini diukur absorbansinya dengan spektrofotometer (λ_{maks} dari perlakuan pH pada $\lambda_{100\%}$ - λ_{10}) pada setiap waktu kontak 0, 3, 6, 9, 12 dan 15 jam. Naik atau turunnya absorbansi menunjukkan terjadinya perubahan warna dan intensitas warna.

- c. Stabilitas terhadap sinar UV

Kombinasi campuran ekstrak yang terpilih dimasukkan ke dalam botol gelap dan botol bening kemudian disinari dengan lampu UV 40 watt (intensitas sinar 2500 lux) selama 3 jam/ hari selama 7 hari. Pengukuran absorbansi dilakukan

- setiap hari dengan spektrofotometer pada (λ_{max} dari perlakuan pH pada λ_{400} - λ_{700}). Naik atau turunnya absorbansi menunjukkan terjadinya perubahan warna dan intensitas warna.
- d. Stabilitas terhadap suhu dan lama pemanasan
Hasil campuran ekstrak yang terpilih dimasukkan ke dalam botol gelap dan dinkubasi pada suhu 30, 40, 50, 60, 70, 80, 90, dan 100° C, selama 90 menit. Hasil campuran komposisi optimum ini diukur absorbansinya dengan spektrofotometer pada (λ_{max} dari perlakuan pH pada λ_{400} - λ_{700}) setiap interval waktu 30 menit. Naik atau turunnya absorbansi menunjukkan terjadinya perubahan warna dan intensitas warna.
- e. Stabilitas terhadap suhu selama penyimpanan
Kombinasi campuran ekstrak yang terpilih dimasukkan ke dalam botol gelap dan disimpan pada suhu kamar (30°C) dan suhu dingin (100), selama 7 hari. Hasil campuran komposisi optimum ini diukur absorbansinya dengan spektrofotometer pada (λ_{max} dari perlakuan pH pada λ_{400} - λ_{700}) dengan interval waktu pengamatan setiap hari. Naik atau turunnya absorbansi menunjukkan terjadinya perubahan warna dan intensitas warna.

Uji organoleptik. Uji kesukaan ini dibuat untuk mengetahui tingkat kesukaan panelis terhadap campuran ekstrak etil asetat kulit buah Manggis dan kayu Secang. Uji kesukaan ini dilakukan secara visual terhadap 25 orang panelis. Campuran ekstrak etil asetat kulit buah Manggis dan kayu Secang dengan kombinasi terbaik diberikan ke panelis untuk mengamati warna dan aromanya. Para panelis menentukan tingkat kesukaan atau ketidakkesukaan mereka dengan skala penilaian 1-4, kemudian dihitung persentase terhadap kesukaan selian perlakuan masing-masing.

Analisis Percobaan. Data hasil percobaan antioksidan dan uji sifat kestabilan warna dianalisis menggunakan silik ragam pada $\alpha = 5\%$. Jika signifikan dilanjutkan dengan uji Beda Nyata Terkecil (BNT) pada $\alpha = 5\%$. Rancangan Percobaan yang digunakan dalam uji kestabilan warna ekstrak campuran terbaik adalah Rancangan Acak Lengkap (RAL) terdiri dari dua faktor dengan tiga kali ulangan. Uji statistika dianalisis berdasarkan program STATISTIKA 6.

3 HASIL DAN PEMBAHASAN

3.1 Ekstraksi zat warna kulit buah Manggis dan kayu Secang

Sebuk kering kulit buah Manggis (350 g) telah diekstraksi dengan etil asetat dan setelah dipisahkan de-

ngan rotary evaporator didapatkan ekstrak etil asetat (25,225 g). Sebuk kering kayu Secang (350 g) telah diekstraksi dengan etil asetat dan setelah dipisahkan dengan rotary evaporator didapatkan ekstrak etil asetat (8,633 g). Metode maserasi menggunakan pelarut etil asetat dimaksudkan untuk menarik senyawa senipolar dari kulit buah Manggis dan kayu Secang. Selanjutnya ekstrak etil asetat kulit buah Manggis dan kayu Secang dilakukan pengujian aktivitas antioksidan tunggal dan campuran keduanya dengan 3 variasi perbandingan.

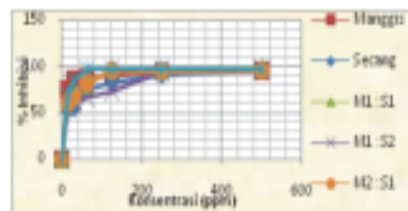
3.2 Analisis aktivitas antioksidan dengan metode DPPH^[14]

Uji antioksidan dilakukan di ruang gelap dan menggunakan peralatan gelap, dikarenakan DPPH (1,1 difenil-2- pikrilihidrazil) sangat peka terhadap cahaya. Metode DPPH menggunakan 1,1 difenil-2-pikrilihidrazil sebagai sumber radikal bebas. Prinsipnya adalah reaksi pemangkapan hidrogen oleh DPPH dari zat antioksidan. Mekanisme reaksi dari senyawa antioksidan yang terakumulasi dalam ekstrak etil asetat kulit buah manggis dan ekstrak kayu secang terhadap radikal DPPH merupakan reaksi reduksi yang menunjukkan aktivitas antiradikal. Aktivitas ini dapat diamati berdasarkan penurunan absorbansinya dengan spektrofotometer pada panjang gelombang 517 nm. Apabila DPPH direduksi maka ditunjukkan dengan penurunan warna kuning menjadi warna kuning keam adanya aktivitas antioksidan ekstrak kulit buah Manggis dan kayu Secang. Donasi proton menyebabkan radikal DPPH (berwarna ungu) menjadi senyawa non-radikal. Senyawa non-radikal DPPH tersebut tidak berwarna. Dengan demikian aktivitas pemangkapan radikal dapat dihitung dari perubahan radikal DPPH. Kadar radikal DPPH teroksidasi diukur secara spektrofotometri pada panjang gelombang 517 nm^[14]. Ekstrak etil asetat kulit buah Manggis dan kayu Secang dapat mereduksi warna ungu dari DPPH menjadi warna kuning dan tidak berwarna. Hasil penelitian menunjukkan warna tereduksi hingga konsentrasi terkecil yaitu, 15,625 ppm.

Dari analisis yang telah dilakukan, diperoleh persen inhibisi radikal bebas oleh ekstrak etil asetat kulit buah Manggis lebih tinggi dibandingkan ekstrak etil asetat kayu Secang dan hampir setara dengan reduksi asam askorbat. Adapun menurut Nuzumani dan Pursono (1979)^[14], dikatakan bahwa kulit buah Manggis mempunyai daya reduksi sebanding dengan daya reduksi asam askorbat. Pada konsentrasi 15,625 ppm persen inhibisi ketiga sampel uji mengalami penurunan, dan yang paling rendah adalah kayu Secang hanya sebesar 53%^[14]. Dengan bertambahnya konsentrasi akan meningkatkan persen inhibisi. Analisis IC₅₀ dihitung berdasarkan persamaan regresi lin-

ier yang didapatkan dengan cara memplot konsentrasi larutan uji dengan persen inhibisi DPPH sebagai parameter aktivitas antioksidan, dimana konsentrasi larutan uji (ppm) sebagai absis, dan persen inhibisi sebagai ordinat. Hasil persamaan regresi linier untuk ekstrak etil asetat kulit Manggis adalah $y = 2,784X + 10,5$, untuk kayu Secang adalah $y = 1,76X + 8,5$. Sedangkan untuk kombinasi perbandingan variasi campuran ekstrak etil asetat kulit buah Manggis dan kayu Secang yaitu, untuk perbandingan $M_1 : S_1$ adalah $y = 2,272X + 9,833$, untuk perbandingan $M_1 : S_2$ adalah $y = 1,92X + 9,333$, pada perbandingan $M_2 : S_1$ adalah $y = 2,144X + 19,0454$, dan pada asam ascorbat adalah $y = 2,688X + 8,667$.

Berdasarkan nilai IC_{50} , ternyata ekstrak etil asetat kulit buah Manggis memberikan persen inhibisi terbesar diantara keenam jenis sampel yang diuji, yaitu 14,882 ppm, lebih aktif dibandingkan dengan asam ascorbat dengan nilai IC_{50} 15,3769 ppm. Hal ini menunjukkan kemampuan ekstrak etil asetat kulit buah Manggis untuk meredam radikal bebas sangat kuat. Nilai IC_{50} ekstrak etil asetat kayu Secang lebih besar dibanding ekstrak etil asetat kulit buah manggis, dengan nilai sebesar 23,5795 ppm menunjukkan nilai aktivitas antioksidannya lebih rendah dari ekstrak etil asetat kulit buah Manggis. Untuk melihat pengaruh pencampuran kedua ekstrak ini juga telah dilakukan uji antioksidan terhadap pencampuran kedua ekstrak ini.



GAMBAR 1: Hubungan konsentrasi dengan % inhibisi dengan metode DPPH

Hasil uji silik rangam menunjukkan $F_{hitung} > F_{tabel}$ berarti menunjukkan bahwa konsentrasi yang diuji coba pada ekstrak etil asetat kulit buah Manggis menunjukkan perbedaan yang signifikan antar konsentrasi. Konsentrasi 15,825 ppm memiliki kemampuan meredam radikal bebas sebesar 75%, dan konsentrasi 500 ppm mampu meredam radikal bebas sebesar 96%. Begitu juga dengan hasil uji silik rangam yang diujicoba pada ekstrak etil asetat kayu Secang juga menunjukkan perbedaan yang signifikan antar konsentrasi. Konsentrasi 15,825 ppm hanya mampu meredam radikal bebas sebesar 53%, dan konsentrasi 500 ppm mampu meredam radikal bebas sebesar 95%.

Berdasarkan perhitungan silik rangam terdapat

persen inhibisi $M_1 : S_1$ tidak memberi perbedaan yang nyata setiap perlakuannya, besarnya konsentrasi tidak mempengaruhi persen inhibisi radikal bebas. Konsentrasi 15,825 ppm pada perbandingan, $M_1 : S_2$ dan perbandingan 2:1 $M_2 : S_1$ memberi perbedaan yang nyata, ($p < 0,05$) dimana konsentrasi mempengaruhi besarnya kemampuan dalam meredam radikal bebas. Aktivitas antioksidan yang paling rendah dibandingkan yang lainnya adalah kombinasi $M_1 : S_2$, hal ini dikarenakan secang dalam keadaan tunggal memiliki aktivitas antioksidan yang lebih rendah dibanding yang lainnya.

Senyawa-senyawa yang memungkinkan mendonasikan protonnya memiliki aktivitas pemangsaan radikal cukup kuat. Senyawa tersebut adalah golongan fenol, flavonoid, tanin, senyawa yang memiliki banyak gugus sulfida, dan alkaliol. Pada konsentrasi 125 ppm hingga 500 ppm, persen inhibisi asam ascorbat sebagai kontrol positif, masing-masing ekstrak tunggal dan campuran ekstrak menunjukkan kemampuan meredam radikal bebas hampir sama. Kemampuan antioksidatif ini dikarenakan kulit manggis dan Secang memiliki gugus fenol. Senyawa antioksidan alami tumbuhan umumnya adalah senyawa fenolik atau polifenolik yang dapat berupa golongan flavonoid, turunan asam sinamat, kumarin, toloferol dan asam organik polifungsional.

Adapun aktivitas antioksidan setelah pencampuran menurut perbandingan tertentu dari kedua ekstrak etil asetat kulit buah Manggis dan kayu Secang, ternyata tidak menunjukkan kemampuan meredam radikal bebas yang jauh lebih tinggi dari kemampuan ekstrak etil asetat kulit buah Manggis. Efek pencampuran yang terjadi hanya mampu meningkatkan aktivitas antioksidan ekstrak etil asetat kayu Secang, dimana nilai IC_{50} dari ketiga perbandingan lebih rendah dari nilai IC_{50} ekstrak etil asetat kayu Secang, tetapi ketiga perbandingan menunjukkan sifat antioksidan yang masih kuat, dimana nilai IC_{50} yang dihasilkan lebih kecil dari 50 ppm. Perbandingan $M_1 : S_1$ memberikan nilai IC_{50} sebesar 17,6791 ppm. Nilai ini merupakan nilai terendah diantara ketiga perbandingan yang ada, sehingga $M_1 : S_1$ merupakan kombinasi warna campuran ekstrak yang memiliki sifat antioksidan yang lebih tinggi.

Hasil ketiga kombinasi campuran ekstrak kulit buah Manggis dan kayu Secang memberikan tingkat kecerahan warna yang berbeda. Tab el I menunjukkan persentase kesukaan panelis terhadap aroma dan warna dari ekstrak tunggal maupun variasi kombinasi warna yang dihasilkan. Campuran warna ekstrak etil asetat kulit buah Manggis dan kayu Secang $M_1 : S_1$ merupakan campuran terbaik dalam meredam radikal bebas, tetapi tidak ditindaklanjuti untuk melihat sifat kestabilannya, karena secang uji organoleptik aroma dan warnanya kurang disukai oleh panelis. Campuran ekstrak etil asetat kulit buah Manggis dan kayu

TABEL 1: Persentase (%) kesukaan dari 25 orang panelis terhadap ekstrak tunggal dan kombinasinya

Skala Penilaian	Kombinasi									
	Secang		Manggis		1:1 ($M_1:S_1$)		1:2 ($M_1:S_2$)		2:1($M_2:S_1$)	
	A	W	A	W	A	W	A	W	A	W
1	-	-	8	8	-	4	-	-	12	-
2	28	24	84	56	28	60	28	8	68	64
3	72	36	8	36	68	36	68	76	20	32
4	-	40	-	-	4	-	4	16	-	4

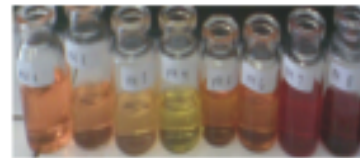
Secang perbandingan $M_1 : S_2$ ditindaklanjuti untuk melihat sifat kestabilan warnanya terhadap pengaruh pH, oksidator H_2O_2 1 %, sinar UV, waktu dan suhu pemanasan, serta suhu selama penyimpanan, karena secara uji organoleptik, warna dan aroma campuran ekstrak pada perbandingan $M_1 : S_2$ lebih disukai.

3.3 Uji kestabilan campuran terbaik ekstrak etil asetat kulit Manggis (*Garcinia mangostana L.*) dan kayu Secang (*Coccolpitia sappan L.*)^[14]

Karakterisasi warna ekstrak etil asetat kulit buah Manggis dan kayu Secang pada beberapa variasi pH. Intensitas warna ekstrak etil asetat campuran terbaik ($M_1 : S_2$) diukur menggunakan spektrofotometer. Pemilihan deretan nilai pH 1-8 dilaksanakan untuk melihat perubahan warna campuran ekstrak etil asetat kulit buah Manggis dan kayu Secang pada pH asam, netral dan basa. Pengaruh pH terhadap intensitas warna terlihat dari peningkatan dan penurunan nilai absorbansi pada panjang gelombang 400-650 nm. Nilai pH awal dari ekstrak etil asetat kulit Manggis adalah sekitar 4,27, sedangkan untuk ekstrak etil asetat kayu Secang adalah sekitar 4,53, dan setelah dicampurkan keduanya didapat nilai pH sekitar 4,37. Pencarian panjang gelombang maksimum dilakukan masing-masing terhadap ekstrak tunggal dan $M_1 : S_2$ antara panjang gelombang 400-650 nm. Ekstrak etil asetat warna kulit buah Manggis didapat panjang gelombang maksimum pada 400 nm, sedangkan untuk ekstrak etil asetat warna kayu Secang pada 440 nm, dan $M_1 : S_2$ pada 440 nm. Hasil kombinasi $M_1 : S_2$ diduga mengandung senyawa flavonoid jenis antrakuinon. Antrakuinon dalam spektrum sinar tampak berada pada panjang gelombang maksimum antara 420-460 nm^[14].

Hasil perlakuan pH pada kombinasi $M_1 : S_2$ memberikan kontribusi warna masing-masing pada deretan nilai pH 1-8. Visualisasi warna pada pH 1-4 terlihat warna kuning yang masih cerah, hal ini ditunjukkan oleh nilai absorbansi yang lebih rendah dari

nilai pH 5-8. Perlakuan pH juga menyebabkan pergeseran panjang gelombang, setiap pH memen-



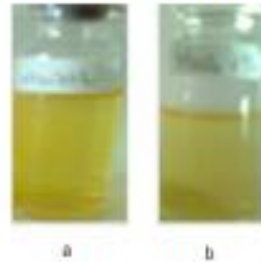
GAMBAR 2: Perubahan warna pH 1-8 campuran terbaik ekstrak etil asetat kulit buah manggis dan kayu secang

jakan setiap senyawa yang dominan dalam kontribusi warnanya. Pada pH 12,7 dan 8 yang lebih dominan adalah zat warna antosianin dan antosianidin dengan masing-masing panjang gelombang maksimum 520,510, 470, dan 540 nm, di mana menurut^[14]interval serapan spektrum UV-tampak flavonoid jenis antosianin dan antosianidin berada pada panjang gelombang 465-560 nm. Sedangkan pada pH 3,4,5 dan 6, adalah senyawa flavonoid jenis anron dengan panjang gelombang maksimum antara 400 dan 410 nm. Interval serapan spektrum UV - tampak flavonoid jenis anron berada pada panjang gelombang 380-430 nm^[14].

Pada analisis selanjutnya tentang stabilitas warna campuran ekstrak etil asetat kulit buah Manggis dan kayu Secang terhadap pengaruh oksidator, sinar UV, suhu pemanasan dan suhu selama penyimpanan dilakukan pada pH awal (4,37). Perlakuan pada pH awal adalah karena hal ini masih dalam tahap uji pendahuluan terhadap uji stabilitas warna campuran ekstrak etil asetat kulit buah Manggis dan kayu Secang, belum ada studi literatur yang menelitiinya.

Stabilitas warna ekstrak campuran terbaik terhadap oksidator. Kebondan senyawa oksidator dalam larutan yang mengandung zat warna dapat menstimulasi akumulasi senyawa hasil degradasi zat warna seperti kalkon dan turunannya yang tidak berwarna. Hal tersebut dapat menyebabkan adanya penurunan warna kuning selama waktu kontak dengan oksidator. Visualisasi perubahan warna campuran ekstrak kulit manggis dan kayu secang akibat pengaruh oksidator dapat dilihat pada Gambar

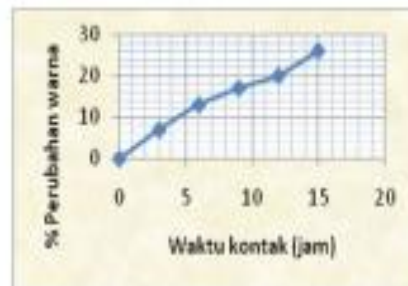
3. Hasil visualisasi terhadap intensitas warna pada



GAMBAR 3: Perubahan warna akibat pengaruh oksidator (a) Sebelum penambahan oksidator dan (b) Setelah 15 jam kontak dengan oksidator (H_2O_2 1%)

pH awal akibat pengaruh oksidasi menunjukan adanya pengurangan intensitas warna kuning larutan setelah 15 jam waktu kontak dengan oksidator. Pengukuran dengan spektrofotometer seperti disajikan pada Gambar 4 memberikan gambaran yang lebih jelas tentang lintasan antara berkurangnya intensitas warna karena pengaruh proses oksidasi.

Pengamatan stabilitas warna campuran ekstrak etil asetat kayu Secang dan kulit buah Manggis $M1 : S2$ karena pengaruh oksidasi oleh senyawa oksidator dalam hal ini H_2O_2 1 %, dilakukan selama 15 jam dengan interval waktu pengamatan 3 jam. Hasil pengamatan menunjukkan semakin meningkatnya waktu kontak H_2O_2 degradasi warna semakin tinggi, ini dapat dilihat dari persen perubahan yang diperoleh (Gambar 4).

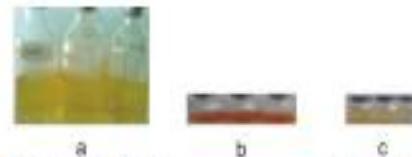


GAMBAR 4: Grafik Perubahan nilai absorbansi warna ekstrak campuran kombinasi akibat pengaruh oksidasi oleh H_2O_2 1%

Hasil analisa absorbansi dengan spektrofotometri menunjukkan adanya penurunan absorbansi setelah ditambah oksidator H_2O_2 pada pengamatan setelah 15 jam. Kontak dengan oksidator selama 15 jam menyebabkan perubahan warna sebesar 20%. Dari penelitian Lyda S. dkk. (2001), hasil pengamatan intensitas warna dari ekstrak kulit jambuan terhadap pe-

ngaruh oksidator memberikan pengaruh yang nyata, hal ini dapat dilihat dari hilangnya absorbansi maksimum pada konsentrasi yang telah disimpan selama 12 jam dan diukur absorbansinya setiap 3 jam. Akibat penambahan oksidator menyebabkan penurunan serapan atau berkurangnya kadar pewarna yang disebabkan akibat penyerangan pada gugus aktif pada pewarna oleh oksidator, sehingga gugus reaktif yang bersifat memberi warna berubah menjadi tidak memberi warna [17]. Berdasarkan uji sidik ragam diketahui bahwa penambahan oksidator berpengaruh nyata terhadap penurunan warna campuran perbandingan kombinasi $M_1 : S_2$.

Stabilitas warna ekstrak campuran terbaik terhadap sinar ultraviolet. Stabilitas warna karena pengaruh sinar UV, dilakukan dengan menyimpan larutan warna campuran ekstrak terbaik selama 3 jam/hari sampai 7 hari. Perlakuan dilakukan dalam botol bening dan botol gelap dan dilakukan pengamatan intensitas warnanya setiap hari. Visualisasi perubahan warna akibat pengaruh sinar UV dapat dilihat pada Gambar 5.

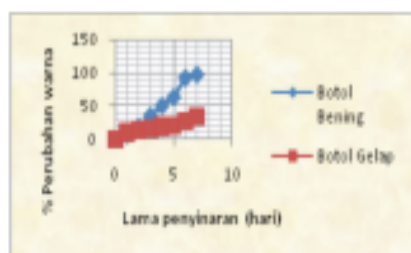


GAMBAR 5: Perubahan warna campuran ekstrak kulit buah manggis dan kayu secang

Hasil visualisasi terhadap intensitas warna campuran ekstrak pada pH awal akibat pengaruh kontak dengan sinar UV menunjukkan bahwa jenis tempat penyimpanan mempengaruhi warna. Pada botol bening (terang) langsung kontak dengan sinar UV menyebabkan terjadinya konjugasi elektron karena adanya energi yang berasal dari sinar ultraviolet sehingga warnanya menjadi lebih kecoklatan dan degradasi warna kuning orak (warna awal) meningkat, dengan berubahnya warna hingga 97%. Sedangkan pada botol gelap warnanya semakin terdegradasi oleh sinar UV ditandai dengan warnanya semakin memucat. Pada botol gelap tidak terjadi penyerapan energi dari sinar UV, sehingga tidak terjadi konjugasi elektron dan warnanya menjadi kuning bening, penurunan intensitas berubah sebesar 34%.

Hasil pengukuran dengan spektrofotometer yang disajikan dalam Gambar 6 memberikan gambaran yang jelas tentang berkurangnya intensitas warna awal (kuning orak) akibat pengaruh penyinaran sinar UV. Berdasarkan hasil uji sidik ragam $p < 0,05$ menunjukkan adanya perbedaan signifikan antara perlakuan

penyinaran sinar UV pada botol gelap maupun pada botol bening dan lama penyinaran sinar UV. Hal ini menunjukkan bahwa sinar UV mempunyai pengaruh yang besar terhadap kestabilan warna.



GAMBAR 6: Grafik hubungan pengaruh penyinaran sinar UV terhadap perubahan warna.

Zat warna memiliki kecenderungan yang kuat mengabsorpsi sinar tampak dan energi radiasi sinar menyebabkan reaksi fotokimia pada spektrum tampak dan mengakibatkan perubahan warna^[17]. Faktor utama yang mempengaruhi stabilitas warna adalah pH, temperatur, cahaya dan oksigen. Pada pengamatan terhadap stabilitas warna dari kulit jambu, adanya sinar matahari menyebabkan degradasi pigmen yang ditunjukkan penurunan absorbansi, dimana secara visual perubahan pigmen semakin bening kemudian warna merah tidak terlihat. Penurunan nilai absorbansi atau pemataman warna disebabkan karena terjadinya perubahan struktur pigmen zat warna sehingga bentuk aglikon menjadi lakton (tidak berwarna) dan akhirnya membentuk alfa diketon yang berwarna coklat^[18].

Stabilitas warna ekstrak campuran terbaik terhadap suhu dan lama pemanasan. Stabilitas warna dipengaruhi oleh temperatur. Peningkatan waktu dan suhu pemanasan dapat memstimulasi akumulasi senyawa hasil degradasi warna seperti lakton dan turunannya yang tidak berwarna. Suhu dan lama pemanasan berpengaruh nyata terhadap peningkatan degradasi warna awal. Gambar 7 merupakan visualisasi warna ekstrak etil asetat campuran terbaik yang telah dipanaskan selama 90 menit pada suhu 30 sampai 100°C.

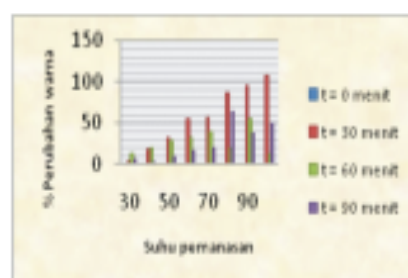
Perubahan warna akibat perubahan temperatur disebabkan energi yang ditimbulkan oleh suhu pemanasan sehingga terjadi lonjangan elektron menyebabkan perubahan warna kuning jingga menjadi coklat. Pengamatan visual stabilitas warna campuran ekstrak kulit buah Manggis dan kayu Secang $M_1 : S_2$ terhadap pemanasan yang dilakukan pada suhu 30 sampai 100°C selama 90 menit diperkuat oleh hasil pengamatan dengan spektrofotometer. Hasil pengamatan menunjukkan semakin meningkatnya suhu dan lama



GAMBAR 7: Warna ekstrak campuran terbaik (a) Sebelum pemanasan (b) Setelah 90 menit pemanasan pada suhu 30 sampai 100°C

waktu pemanasan, intensitas warna semakin tinggi dengan berubahnya warna kuning cerah menjadi warna coklat, ini dapat dilihat dari perubahan warna yang diperoleh.

Pemanasan selama 90 menit lebih nyata mengalami degradasi warna kuning cerah menjadi warna coklat. Perlakuan pemanasan 100°C mengalami perubahan warna yang paling tinggi setelah pemanasan selama 90 menit (Gambar 8). Hal ini dapat karena terjadinya hidrolisis cincin pirolin zat warna yang menghasilkan senyawa lakton, yang bertanggung jawab terhadap terjadinya perubahan warna seperti terbentuknya warna coklat pada makanan yang mengandung zat warna.



GAMBAR 8: Perubahan nilai % perubahan warna berbagai suhu pemanasan

Hasil uji sidik ragam $p < 0,05$ menunjukkan perbedaan yang signifikan antar perlakuan variasi suhu dan lama pemanasan. Hal ini diperkuat oleh hasil penelitian^[18] yang menunjukkan bahwa pemanasan

pada suhu 100°C selama 8 jam secara terus menerus dapat menurunkan stabilitas warna dari katul beras ketan hitam^[19]. Nilai intensitas warna purple corn yang dipanaskan pada suhu 90°C selama 120 menit menjadi 49%. Hal ini menunjukkan stabilitas yang semakin menurun dengan semakin meningkatnya suhu pemanasan^[20].

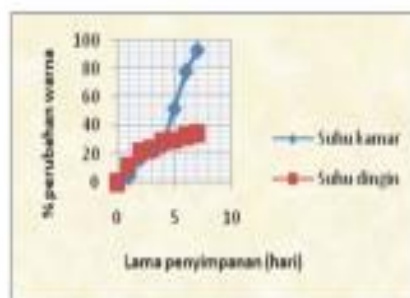
Stabilitas warna ekstrak campuran terbaik terhadap suhu selama penyimpanan. Pengamatan terhadap stabilitas warna ekstrak campuran kulit

buah Manggis dan kayu Secang pada pH awalnya dilakukan pada suhu ruang (30°C), dan suhu refrigerator (10°C) selama 7 hari. Setiap hari dilakukan pengamatan terhadap perubahan intensitas warna yang terjadi. Gambar 9 menunjukkan visualisasi warna ekstrak campuran kulit buah Manggis dan kayu Secang pada pH awal yang disimpan pada suhu ruang dan suhu refrigerator (dingin) selama 7 hari.



GAMBAR 9: Perubahan warna ekstrak campuran kulit buah manggis dan secang (a) Suhu ruang dan (b) Suhu ruang dan (c) Suhu refrigerator

Hasil visualisasi terhadap intensitas warna akibat pengaruh penyimpanan menunjukkan adanya pengurangan intensitas warna kuning cerah dengan perbedaan suhu dalam penyimpanan. Pengukuran dengan spektrofotometer seperti yang disajikan pada Gambar 10 memberi gambaran yang lebih jelas tentang hubungan antara berkurangnya warna kuning juga dengan perbedaan suhu dan lama penyimpanan. Penyimpanan pada suhu ruang terjadi perubahan warna hingga 93%, warnanya berubah dari kuning cerah menjadi warna merah jingga.



GAMBAR 10: Pengaruh suhu dan lama penyimpanan terhadap perubahan warna campuran ekstrak kulit buah Manggis dan kayu Secang

Berdasarkan hasil uji statistik ragam pengaruh suhu selama penyimpanan $p < 0,05$ menunjukkan perbedaan yang signifikan dalam perlakuan suhu dan lama penyimpanan yang mempengaruhi stabilitas warna campuran terbaik $M_1 : S_2$.

4 KESIMPULAN DAN SARAN

4.1 Kesimpulan

Aktivitas antioksidan ekstrak etil asetat kulit buah Manggis lebih tinggi dibandingkan kayu Secang dan asam askorbat pada konsentrasi terendah (15,625 ppm) dengan nilai IC_{50} sebesar 14,882 ppm. Hasil campuran ekstrak optimum aktif antioksidan yaitu perbandingan $M_1 : S_1$ dengan nilai K_{50} sebesar 17,6791 ppm, dan nilai inhibisi DPPH sebesar 97%, tetapi tidak dilanjutkan pada uji kestabilan karena warnanya kurang menarik dan kurang disukai menurut uji organoleptik, sehingga yang disarankan untuk uji kestabilan sebagai campuran terbaik adalah perbandingan kombinasi $M_1 : S_2$. Pengaruh pH, oksidator, sinar UV, waktu dan lama pemanasan, serta suhu penyimpanan menurunkan stabilitas

warna campuran ekstrak etil asetat kulit buah Manggis dan kayu Secang kombinasi $M_1 : S_2$, dengan melihat perubahan warna yang terjadi dari masing-masing perlakuan. Ketiga campuran kombinasi $M_1 : S_1$, $M_1 : S_2$, M2S1 menunjukkan sifat antioksidan yang masih kuat, dimana ketiga campuran tersebut memiliki nilai K_{50} lebih kecil dari 50 ppm.

4.2 Saran

Perlu dilakukan pengujian sifat antioksidan dari kombinasi campuran warna terbaik yang dipanaskan. Hasil penelitian ini masih memerlukan penelitian lebih lanjut untuk mengetahui perubahan molekul yang bagaimana terjadi setelah semua perlakuan yang diamati dalam penelitian ini.

DAFTAR PUSTAKA

- [1] Kosuth, dkk. 2001. *Pemanis Antioksidan Pada Laujat Ulat*. Jakarta: Pusat Kajian Nasional Masalah Laujat Ulat, hal. 68-69, 56-69 ppm
- [2] Iqbal, Y., 2000. Uji Aktivitas Antioksidan Ekstrak Kulit Buah Nangka (*Garcinia parvifolia* Miq). *Jurnal Matematika dan IPA* 1, (1) hal 25-33
- [3] Tikhonov, W. 2001. *Antioksidan: Jenis, Sumber, Mekanisme Kerja dan Peran Terhadap Kesehatan*, hal 1-12. Bogor: Institut Pertanian Bogor
- [4] Panovska, T.N., Kulevanova, S., Stofeva, 2005. In Vitro Antioxidant Activity of Some *Taraxacum* Species (Lamiaceae). *Acta Pharm*, 55: 207-214
- [5] Erni A.B. 1996. *Zat pewarna makanan dan pemanis pemakluannya. Media Teknologi Pangan* (2). Bogor: Perguruan Tinggi Teknologi Pangan Indonesia
- [6] Lemmon, R.H., (1992). "Dye and Tannin Producing Plants", *Plant Resources of East Asia*, Pako DLO, Wageningen Nederland
- [7] Suciati, D., I. Widanati, dan M.W. Winarno. 1998. Informasi Khasiat, Keamanan dan Toksin tanaman secang (*Caesalpinia seppia* L.). *Warta Tambahan Obat Indonesia* 4(3): 173
- [8] Wulandari, R. E. 2000. *Anthocyanins*. Di dalam: G. J. Lams, and F. J. Brauch, Eds. *Natural Food Colorant Science and Technology*. New York: Marcel Dekker

- ^{D1} Chen SX, Wan M, Loh HN, 1996. Active constituents against HIV-1 protease from *Garcinia mangostana*. *Planta Med.*, vol. 62(3):281-2
- ^{D2} Tumbunan, R. M., 1998. Telaah Kandungan dan Aktivitas Antimikroba Kulit Buah Manggis (*Garcinia Mangostana* L.) [Thesis Magister Farmasi]. Jurusan Farmasi, Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam. Bandung: ITB. pp. 1 dan 40
- ^{D3} Selvi, A.T, Joseph, G.S, and Jayaprakasha, G.K. 2003. Inhibitor of Growth and Aflatoxin Production in *Aspergillus flavus* by *Garcinia* indica Extract and its Antioxidant Activity. *Food Microbiology*. 20:45-60
- ^{D4} Anonim. Online 2005. *Ilmuwan Obat Indonesia*. <http://www.ipetkgs.id>
- ^{D5} Sari Pupika, A Fitriyah, K Mukhammad, Umar, F Mukhammad, L. Titiana, 2005. Ekstraksi dan Stabilitas Antiselin dari Kulit Buah Durian (*Spizum caryota*). *Jurnal Teknik dan Industri Pangan* Vol XVI No2 Th 2005
- ^{D6} Setyowati, Nur Ach. 2000. Pengaruh Peningkatan Konsentrasi Larutan Jajap Takar Terhadap Efektivitas Netralisasi Rasa Pahit Pada Produk Jelly Kulit Buah Manggis. UNNES: Fakultas Teknik
- ^{D7} Harbani, Jil. 1996. *Metode Fitokimia*. Penerbitan Cara Modern Menggunakan Tumbuhan (Penerjemah Pichaminata, K dan I. Sodikro). Bandung: ITB
- ^{D8} Mukham, K. R. 1988. *Cara Mengidentifikasi Flavourid*. Bandung: Penerbit ITB
- ^{D9} Lydia S. Wijaya, Simon B. Wijanarso, Tri Susanto. (2001). Ekstraksi dan Karakteristik Pigmen dari Kulit Buah Rambutan (*Nephelium lappaceum*). *Var. Biotek Biologi*, Vol. 1 No. 2. Hal. 42-53
- ^{D10} Huzun, T. (2000) Ekstraksi dan Stabilitas Zat Pewarna Alam dari Kandi Bore Ketan Hitam (*Oryza sativa glutinosa*). *Buletin Teknologi dan Industri Pangan XI* (1): 17- 23

Lampiran 5. Artikel 5

Skruining Fitokimia Ekstrak Etil Asetat Kulit Buah Manggis (*Garcinia mangostana* L.) Putri, W. S.,
Warditiani, N. K., Larasanty, L. P. F.

SKRINING FITOKIMIA EKSTRAK ETIL ASETAT KULIT BUAH MANGGIS (*Garcinia mangostana* L.)

Putri, W. S.¹, Warditiani, N. K.¹, Larasanty, L. P. F.¹

¹Jurusan Farmasi Fakultas Matematika Dan Ilmu Pengetahuan Alam Universitas Udayana

Korespondensi: Widyana Sagita Putri
Jurusan Farmasi Fakultas Matematika Dan Ilmu Pengetahuan Alam Universitas Udayana
Jalan Kampus Unud-Jimbana, Jimbaran-Bali, Indonesia 80364 Telp/Fax: 0361-703837
Email : dysagita@yahoo.com

ABSTRAK

Kulit buah manggis (*Garcinia mangostana* L.) telah diketahui mengandung banyak senyawa yang memiliki aktivitas farmakologi. Etil asetat merupakan pelarut yang bersifat semi polar sehingga dapat menarik senyawa yang bersifat polar maupun nonpolar, memiliki toksisitas rendah, dan mudah diuapkan sehingga dapat digunakan untuk ekstraksi kulit buah manggis. Skruining fitokimia dilakukan untuk mengetahui golongan senyawa yang terdapat dalam ekstrak etil asetat kulit buah manggis. Penelitian diawali dengan ekstraksi menggunakan metode maserasi selama 5 hari dan dilanjutkan remaserasi selama 2 hari. Ekstrak yang didapat kemudian dilakukan skruining fitokimia. Hasil skruining fitokimia menunjukkan bahwa ekstrak etil asetat kulit buah manggis mengandung senyawa golongan alkaloid, flavonoid, saponin, tanin, polifenol, dan triterpenoid.

Kata Kunci : skruining fitokimia, kulit buah manggis, etil asetat

1. PENDAHULUAN

Manggis (*Garcinia mangostana* L.) telah digunakan sebagai obat tradisional di kawasan Asia Tenggara, termasuk di Indonesia. Kulit buah manggis merupakan bagian terbesar dari buah manggis, yaitu mencapai lebih dari 50% bagian dan mengandung lebih banyak metabolit sekunder dibandingkan dengan daging buahnya (Chovanlikit *et al.*, 2012). Kulit buah manggis yang biasanya dibuang oleh masyarakat setelah mengonsumsi buahnya ternyata mengandung banyak senyawa aktif, yaitu flavonoid, tanin, dan saponin, dan triterpenoid (Nugroho, 2007). Masing-masing senyawa tersebut terbukti memiliki aktivitas farmakologi, yaitu flavonoid sebagai antioksidan dan antitumor (Ramamoorthy, 2007; Agrawal, 2011), tanin sebagai antimikroba (Min, *et al.*, 2008), saponin sebagai antifungi (Barile, *et al.*, 2007), serta triterpenoid sebagai antiinflamasi (Wu, *et al.*, 2011).

Ekstraksi diperlukan untuk mendapatkan senyawa yang diinginkan dalam kulit buah manggis. Pemilihan pelarut yang tepat dapat meningkatkan efisiensi ekstraksi. Hal-hal yang perlu diperhatikan dalam pemilihan pelarut diantaranya adalah selektivitas, toksisitas, kepolaran, kemudahan untuk diuapkan, dan harga

pelarut (Akbar, 2010). Etil asetat merupakan pelarut dengan toksisitas rendah yang bersifat semi polar sehingga diharapkan dapat menarik senyawa yang bersifat polar maupun nonpolar dari kulit buah manggis.

Skruining fitokimia perlu dilakukan untuk mengetahui golongan senyawa yang terkandung dalam ekstrak yang digunakan. Pada penelitian ini dilakukan skruining fitokimia untuk melihat golongan senyawa dalam ekstrak etil asetat kulit buah manggis sehingga dapat pula diketahui kemampuan pelarut etil asetat dalam menarik senyawa yang terkandung dalam kulit buah manggis yang berasal dari Desa Luwus Bali.

2. BAHAN DAN METODE

2.1 Bahan Penelitian

Bahan tanaman yang digunakan yaitu kulit buah manggis berwarna ungu kehitaman yang berasal dari Banjar Poyan, Desa Luwus, Baturiti, Tabunan, Bali. Pelarut yang digunakan untuk maserasi adalah etil asetat (teknis, Brataco). Bahan-bahan yang digunakan untuk skruining fitokimia yaitu asam klorida p.a. (Merck), asam sulfat p.a. (Merck), aseton P p.a. (Merck), asam borat P, asam oksalat P, eter P, asam asetat anhidrat p.a. (Merck), kloroform (Butaco),

pereaksi Dragendroff, pereaksi Mayer, larutan besi (III) klorida 10%.

2.2 Alat Penelitian

Alat yang digunakan dalam penelitian ini yaitu pipet tetes, batang pengaduk, pipet ukur, sendok tanduk, cawan porselen, gelas ukur, erlenmeyer, gelas beker, tabung reaksi, timbangan elektrik (ADAM AFP-360L), oven (BINDER).

2.3 Prosedur Penelitian

2.3.1 Pengumpulan dan Preparasi Sampel

Sampel yang digunakan adalah kulit buah manggis (*Garcinia mangostana* L.) yang diperoleh dari kawasan Banjar Poyan, Desa Luwus, Kecamatan Baturiti, Kabupaten Tabanan pada bulan Februari 2013. Sampel yang telah terkumpul dicuci dan dikeringkan dengan cara diangin-anginkan. Kulit buah manggis yang telah kering kemudian digiling hingga didapatkan serbuk dan disimpan pada tempat tertutup rapat.

2.3.2 Pembuatan Ekstrak Etanol Kulit Buah Manggis

Sejumlah 100 g serbuk kulit buah manggis kering diekstraksi dengan 750 ml. etil asetat dengan metode maserasi selama 5 hari. Residu yang diperoleh kembali diekstraksi dengan 250 ml. etil asetat selama 2 hari. Filtrat dari ekstraksi I dan II digabungkan, pelarut diuapkan menggunakan *vacuum rotary evaporator* pada suhu 40°C kemudian dilanjutkan dengan menguapkan oven pada suhu yang sama hingga terbentuk ekstrak kental. Ekstrak kental yang diperoleh kemudian ditimbang.

2.3.3 Skrining Fitokimia Ekstrak Etanol Kulit Buah Manggis

Skrining fitokimia terhadap ekstrak kulit buah manggis meliputi pemeriksaan alkaloid, steroid, triterpenoid, flavonoid, saponin, dan tanin.

a. Pembuatan larutan uji fitokimia

Pembuatan larutan uji untuk skrining fitokimia dilakukan dengan melarutkan 500 mg ekstrak etil asetat kulit buah manggis dalam 50 ml. etil asetat.

b. Pemeriksaan alkaloid

Larutan uji sebanyak 2 ml diuapkan diatas cawan poselin hingga diperoleh residu. Residu kemudian dilarutkan dengan 5 ml. HCl 2N. Larutan yang didapat di bagi ke dalam 3 tabung reaksi. Tabung pertama ditambahkan dengan asam encer yang berfungsi sebagai blanko. Tabung kedua ditambahkan 3 tetes pereaksi Dragendroff dan tabung ketiga ditambahkan 3

tetes pereaksi Mayer. Terbentuknya endapan jingga pada tabung kedua dan endapan kuning pada tabung ketiga menunjukkan adanya alkaloid (Farnsworth, 1966).

c. Pemeriksaan flavonoid

Larutan uji sebanyak 1 ml dibasahkan dengan aseton P, ditambahkan sedikit serbuk halus asam borat P dan serbuk halus asam oksalat P, dipanaskan diatas tangas air dan dihindari pemanasan berlebihan. Sisa yang diperoleh dicampur dengan 10 ml. eter P kemudian diamati dengan sinar UV 366 nm. Larutan berfluoresensi kuning intensif menunjukkan adanya flavonoid (Depkes RI, 1989).

d. Pemeriksaan saponin

Larutan uji sebanyak 10 ml dalam tabung reaksi dikocok vertikal selama 10 detik kemudian dibiarkan selama 10 detik. Pembentukan busa setinggi 1-10 cm yang stabil selama tidak kurang dari 10 menit menunjukkan adanya saponin. Pada penambahan 1 tetes HCl 2N, busa tidak hilang (Depkes RI, 1995).

e. Pemeriksaan tanin dan polifenol

Larutan uji sebanyak 2 ml dibagi kedalam 2 bagian. Tabung A digunakan sebagai blanko dan tabung B direaksikan dengan larutan besi (III) klorida 10%, warna biru tua atau hitam kehijauan menunjukkan adanya tanin dan polifenol (Robinson, 1991; Murtiani dkk, 2005).

f. Pemeriksaan glikosida

Serbuk simplisia uji dilarutkan dalam pelarut etil asetat, diuapkan diatas tangas air, dilarutkan sisanya dalam 5 ml. asam asetat anhidrat P, dan ditambahkan 10 tetes asam sulfat P. Warna biru atau hijau yang terbentuk menunjukkan adanya glikosida (Depkes RI, 1989).

g. Pemeriksaan steroid dan triterpenoid

Larutan uji sebanyak 2 ml diuapkan dalam cawan penguap. Residu dilarutkan dengan 0,5 ml. kloroform, ditambahkan 0,5 ml. asam asetat anhidrat dan 2 ml. asam sulfat pekat melalui dinding tabung. Terbentuknya cincin kecoklatan atau violet pada perbatasan larutan menunjukkan adanya triterpenoid, sedangkan bila muncul cincin biru kehijauan menunjukkan adanya steroid (Ciulei, 1984).

3. HASIL

Hasil skrining fitokimia menunjukkan bahwa ekstrak etil asetat kulit buah manggis mengandung senyawa golongan alkaloid, flavonoid, saponin, tanin dan polifenol, serta triterpenoid (Tabel 1).

Tabel 1. Hasil skrining fitokimia ekstrak kulit buah manggis (*Garcinia mangostana* L.)

No	Uji Fitokimia	Hasil	Kesimpulan
1.	Alkaloid	Dengan peraksi Dragendorff terbentuk endapan jingga	(+)
		Dengan peraksi Mayer terbentuk endapan kuning	(+)
2.	Flavonoid	Fluoresensi kuning intensif	(+)
3.	Saponin	Terbentuk busa setinggi 1,3 cm selama 30 detik	(+)
4.	Tanin dan Polifenol	Hitam kehijauan	(+)
5.	Glikosida	Coklat	(-)
6.	Steroid	Terbentuk cincin kecoklatan	(-)
	Triterpenoid	Terbentuk cincin kecoklatan	(+)

4. PEMBAHASAN

Obat tradisional telah digunakan oleh masyarakat sejak dahulu. Berbagai macam tanaman telah digunakan sebagai obat untuk mengobati suatu penyakit. Manggis merupakan salah satu tanaman yang digunakan sebagai obat tradisional di Indonesia maupun di dunia. Manggis mengandung banyak senyawa aktif yang terdapat pada kulit buahnya (Nugroho, 2007).

Ekstraksi merupakan proses pemisahan kandungan senyawa aktif dari jaringan tumbuhan menggunakan pelarut tertentu. Beberapa hal yang dapat mempengaruhi efisiensi ekstraksi, yaitu bahan tanaman yang digunakan, pemilihan pelarut, dan metode yang digunakan. Bahan tanaman yang digunakan dapat berupa bagian tanaman utuh atau yang telah melalui proses pengeringan. Pemilihan metode dan pelarut yang digunakan harus tepat untuk mendapatkan hasil yang maksimal (Rompas, dkk., 2012).

Pembuatan ekstrak kulit buah manggis dilakukan dengan metode maserasi menggunakan etil asetat sebagai pelarut. Metode maserasi digunakan karena kulit buah manggis mengandung senyawa yang tidak tahan terhadap panas, yaitu flavonoid dan tanin (Gupita, 2012). Selain itu, maserasi merupakan metode yang paling mudah dilakukan karena pengerjaannya sederhana dan alat-alat yang digunakan mudah didapat (Wandhani dan Sulistyani, 2012). Maserasi dilakukan selama lima hari karena bahan tanaman yang digunakan adalah kulit buah yang memiliki tekstur keras sehingga diperlukan waktu lebih lama untuk pelarut dalam menarik senyawa yang terkandung dalam kulit buah manggis. Selanjutnya dilakukan remaserasi selama 2 hari untuk mendapatkan ekstrak yang lebih banyak.

Pelarut yang digunakan dalam penelitian ini adalah etil asetat. Etil asetat merupakan pelarut yang baik digunakan untuk ekstraksi karena dapat dengan mudah diuapkan, tidak higroskopis, dan

memiliki toksisitas rendah (USP, 2007; Rome *et al.*, 2009; Wandhani dan Sulistyani, 2012). Etil asetat bersifat semi polar sehingga mampu menarik senyawa aglikon maupun glikon dari kulit buah manggis (Tensiska dkk., 2007). Ekstrak yang diperoleh berwarna kuning pekat kemudian diuapkan dengan menggunakan vacuum rotary evaporator untuk mendapatkan ekstrak kental. Ekstrak kental yang diperoleh menyerupai serbuk kuning sebanyak 6,01 g.

Skrining fitokimia dilakukan setelah proses ekstraksi untuk mengetahui golongan senyawa yang terdapat dalam ekstrak etil asetat kulit buah manggis. Hasil positif ditunjukkan pada uji alkaloid, flavonoid, saponin, tanin dan polifenol, serta triterpenoid. Alkaloid memiliki basa nitrogen pada rantai sikliknya dan mengandung beragam substituen sehingga alkaloid bersifat semipolar (Purba, 2001). Tanin termasuk golongan polifenol yang terbagi menjadi dua golongan, yaitu tanin terhidrolisa dan tanin terkondensasi. Hasil uji tanin berwarna hijau kehitaman menunjukkan tanin pada kulit buah manggis merupakan tanin terkondensasi yang bersifat nonpolar (Sangi, dkk., 2008; Gupita, 2012). Flavonoid memiliki gugus hidroksi yang tidak tersubstitusi sehingga bersifat polar (Albar, 2010). Saponin memiliki glikosil yang berfungsi sebagai gugus polar dan gugus steroid sebagai gugus nonpolar (Sangi, dkk., 2008). Seperti halnya saponin, triterpenoid memiliki bagian nonpolar dan polar. Triterpenoid tersusun dari rantai panjang hidrokarbon C_{30} yang menyebabkan sifatnya nonpolar dan memiliki gugus hidroksi sehingga memiliki sifat polar (Taofik dkk., 2010). Etil asetat yang merupakan pelarut semi polar mampu menarik senyawa-senyawa dengan rentang polaritas lebar dari polar hingga nonpolar.

Hasil negatif ditunjukkan pada uji steroid dan glikosida. Steroid tersusun dari isopren-isopren

dari mata panjang hidrokarbon sehingga bersifat sangat nonpolar (Taofik dkk., 2010). Glikosida merupakan senyawa yang terdiri dari bagian gula dan bukan gula, serta memiliki sifat sangat polar (Suyati, 2002). Etil asetat sebagai pelarut semi polar tidak mampu menarik senyawa yang terlalu polar maupun terlalu nonpolar.

5. KESIMPULAN

Etil asetat merupakan pelarut yang dapat digunakan untuk ekstraksi kulit buah manggis karena dapat menarik senyawa golongan alkaloid, flavonoid, saponin, tanin, polifenol, dan triterpenoid.

UCAPAN TERIMA KASIH

DAFTAR PUSTAKA

- Agrawal, A. G. 2011. Pharmacological Activities of Flavonoids: A Review. *IJPSV* Vol. 4(2): 1394-1398.
- Akbar, Hendra Rizki. 2010. *Isolasi dan Identifikasi Galangan Flavonoid Daun Dandang Gendis (Clintanhus Nutans) Berpotensi Sebagai Antioksidan* (Skripsi). Bogor: IPB.
- Barile, et al. 2007. Saponins from *Allium minutiflorum* with Antifungal Activity. *Phytochemistry* Vol. 68: 596-603.
- Chaovanalit, A. et al. 2012. Antocyanin and Total Phenolic Content of Mangosteen and Effect of Processing on the Quality of Mangosteen Products. *International Food Research Journal* Vol.19(3):1047-2053.
- Ciulei, J. 1984. *Methodology for Analysis of vegetable and Drugs*. Bucharest Rumania: Faculty of Pharmacy. p. 11-26.
- Depkes RI. 1989. *Materi Medika Indonesia*. Jilid V. Jakarta: Departemen Kesehatan Republik Indonesia.
- Depkes RI. 1995. *Farmakope Indonesia*. Edisi V. Jakarta: Departemen Kesehatan Republik Indonesia pp 6.
- Farnsworth, N. R. 1966. *Biological and Phytochemical Screening of Plants*. *J. Pharm. Sci.* 55.
- Gupita, C. N. dan A. Rahyuni. 2012. Pengaruh Berbagai pH Sari Buah dan Subu Pasteurisasi Terhadap Aktivitas Antioksidan dan Tingkat Penerimaan Sari Kulit Buah Manggis. *Journal of Nutrition College* Vol. 1(1): 67-79.
- Mufiam, S.D., V. Suryanti, Suyono. 2005. Skrining Fitokimia dan Analisis Kromatografi Lapis Tipis Komponen Kimia Buah Labu Siam (*Sechium edule* Jacq. Swartz.) dalam Ekstrak Etanol. *Biofarmasi*. 3(1): 26-31.
- Min, et al. 2008. Comparative antimicrobial activity of tannin extracts from perennial plants on mastitis pathogens. *Scientific Research and Essay* Vol. 3(2): 66-73.
- Nugroho, A. E. Manggis (*Garcinia Mangostana* L.) Dari Kulit Buah Yang Terbuang Hingga Menjadi Kandidat Suatu Obat. *MOT* Vol. 12(42).
- Purba, R.D 2001. *Analisis Komposisi Alkaloid Daun Handeuleum (Graptophyllum pictum (Linn.) Griff) yang Dibudidayakan dengan Taraf Nitrogen yang Berbeda* (Skripsi). Bogor: Institut Pertanian Bogor.
- Ramamoorthy, P. K. dan A. Bono. 2007. Antioxidant Activity, Total Phenolic And Flavonoid Content Of *Morinda Citrifolia* Fruit Extracts From Various Extraction Processes. *Journal of Engineering Science and Technology* Vol. 2(1): 70-80.
- Robinson, T. 1991. *Kandungan Organik Tumbuhan Tingkat Tinggi*. Bandung: Penebit ITB.
- Rompas, R. A., H. J. Eby, A. Yudistira. 2012. Isolasi Dan Identifikasi Flavonoid Dalam Daun Laman (*Syringodium boottifolium*). *Pharmakon* Vol. 1(2): 59-63.
- Rowe, R. C., P. J. Shekey, and M. E. Quinn. 2009. *Handbook of Pharmaceutical Excipients Sixth Edition*. USA: Pharmaceutical Press and American Pharmacist Association.
- Sangi, Dkk. 2008. Analisis Fitokimia Tumbuhan Obat di Kabupaten Mimihasa Utara. *Chem. Prog* Vol. 1(1): 47-53.
- Suyati, E dan Y. Hala. 2002. Isolasi Bioaktif Hydroxan *Lytocarpus philippinus* Sebagai Bakterisida pada Udang. *Marina Chimica Acta* Vol.1(1): 4-8.
- Taofik, dkk. 2010. Isolasi dan Identifikasi Senyawa Aktif Ekstrak Air Daun Paitan (*Thironia Diversibilia*) Sebagai Bahan Insektisida Botani Untuk Pengendalian Hama Tunggu Eriophyidae. *Alchomy* Vol. 2(1): 104-157.
- Tensiska, M. Dan S. O. N. Yudistati. 2007. Pengaruh Jenis Pelarut Terhadap Aktivitas Antioksidan Ekstrak Kasar Isoflavon dari Ampas Tahu. *Laporan Penelitian*.

- USP Convention. 2007. *United States of Pharmacopeia National Formulary, USP 30th NF 25*. Twinbrook Parkway: United States Pharmacopeial Convention.
- Wardhani, L. K. Dan N. Sulistyani. 2012. Uji Aktivitas Antibakteri Ekstrak Etil Asetat Daun Binuhong (*Anradora scandens* (L.) Moq.) Terhadap *Shigella Flexneri* Beserta Profil Kromatografi Lapis Tipis. *Jurnal Ilmiah Kefermasian*, Vol. 2(1): 1-16.
- Wu, *et al.* 2011. Triterpenoid Contents and Anti-Inflammatory Properties of the Methanol Extracts of *Ligustrum* Species Leaves. *Molecules* Vol. 16.



Contents lists available at ScienceDirect

Food Chemistry

journal homepage: www.elsevier.com/locate/foodchem



Structural diversity and antioxidant activity of condensed tannins fractionated from mangosteen pericarp

Hai-Chao Zhou^{a*}, Yi-Ming Lin^{a*}, Shu-Dong Wei^a, Nora Fung-yea Tam^b

^aKey Laboratory of the Ministry of Education for Coastal and Wetland Ecosystems, School of Life Sciences, Xiamen University, Xiamen 361005, China
^bDepartment of Biology and Chemistry, City University of Hong Kong, Hong Kong, China

ARTICLE INFO

Article history:

Received 2 March 2011
 Received in revised form 30 May 2011
 Accepted 20 June 2011
 Available online 25 June 2011

Keywords:

Mangosteen pericarp
 Condensed tannins
 Antioxidant activity
 Fractionation
 Degree of polymerization
 Structure–activity

ABSTRACT

The extract from mangosteen pericarp was separated into eight fractions, four by solvent extraction (hexane, PE; petroleum ether, PE; ethyl acetate, EA; water, FW) and the other four by fractionation on Sephadex LH-20 column (fractions F1, F2, F3, and F4). Phenolic compounds were identified as the major antioxidant components in each fraction. UV–VIS spectrum, reversed-phase HPLC–ESI–MS coupled with thiolysis, normal-phase HPLC–ESI–MS and MALDI–TOF–MS analyses complementarily showed that the phenolic-rich fractions were condensed tannins with structural heterogeneity in monomer units, degree of polymerization and interflavan linkages. Mangosteen condensed tannins predominantly contained procyanidins with a significant amount of propellagetin but much lower signals of prodelphinidin. Dicosupentamers of condensed tannin were detected by MALDI–TOF–MS. Both B-type and A-type linkages were present. Condensed tannins fractions from mangosteen pericarp, especially fractions F3 and F4, can be explored as beneficial food antioxidants because of their high yields and potent antioxidant activities.

© 2011 Elsevier Ltd. All rights reserved.

1. Introduction

Garcinia mangostana L. (Clusiaceae), commonly known as mangosteen, is a slow-growing tropical evergreen tree with leathery, glabrous leaves. The tree can attain 6–25 m in height and is mainly distributed in India, Myanmar, Sri Lanka, and Thailand (Jung, So, Koller, Mehta, & Singhorn, 2006). The edible portion of mangosteen is milky white, whereas the pericarp is dark red and composes about two-thirds of the whole fruit weight as agricultural waste (Fu, Luo, Chia, & Huang, 2007). People have used this waste pericarp as a traditional medicine for the treatment of abdominal pain, diarrhea, dysentery, infected wound, suppuration and chronic ulcer (Pedraza-Chaverri, Cardenas-Rodriguez, Omezc-Barra, & Perez-Rojas, 2008).

The secondary metabolites of mangosteen include xanthones, anthocyanins, phenolic acids and condensed tannins (Fu et al., 2007; Jung et al., 2006; Zadernowski, Czaplicki, & Naczk, 2009). Of these, xanthones, anthocyanins and phenolic acids have been extensively studied. Condensed tannins, also known as proanthocyanidins, are high structural complex oligomers or polymers of flavan-3-ol that are bound together with B-type and A-type linkages (Hageman, 2002; Hammer & Schoener, 2008).

Proanthocyanidins are powerful antioxidants, because of the complex structural diversity and related physicochemical properties, and investigations on proanthocyanidins are considered to be the final frontier of flavonoid research (Dixon, Xu, & Sharma, 2005).

Fu et al. (2007) analyzed the “total” purified fraction of oligomeric proanthocyanidins from mangosteen pericarps with 6.6 of mean degree of polymerization (DP). More recently, a modified matrix-assisted laser desorption/ionization time-of-flight mass spectrometry (MALDI–TOF–MS) method was established to analyze mangosteen pericarps condensed tannins, resulting more detailed information on monomeric units, interflavan linkages and substituents (Zhou, Wei, Li & Lin, 2010). Due to the diversity and structural complexity, however, there is limited information on the antioxidant activity of condensed tannins from mangosteen pericarps (Fu et al., 2007), and less is known regarding their structure–activity relationships.

The present study aims to provide a more comprehensive picture of the structures and the antioxidant activity of tannins from mangosteen pericarp using different solvents extraction and gel chromatographic fractionation, coupled with thiolysis, reversed-phase HPLC–ESI–MS, normal-phase HPLC–ESI–MS, and MALDI–TOF–MS analytical techniques. These antioxidant and structural properties will serve as the basis for the understanding of the chemical structure–activity relationships of tannins from mangosteen pericarp, which would help to define their possible applications as food antioxidants and/or as beneficial phytoconstituents.

* Corresponding authors. Tel.: +86 592 2187657; fax: 46 592 2181480.
 E-mail addresses: zhouhc2010@yahoo.com.cn (H.-C. Zhou), linyim1967@yahoo.com.cn (Y.-M. Lin).

2. Materials and methods

2.1. Reagents and standards

Water used was purified on a Millipore Milli-Q apparatus. All analytical grade solvents, including acetone, *n*-hexane, petroleum ether, ethyl acetate and methanol, and HPLC-grade dichloromethane, acetonitrile (CH₃CN), methanol, trifluoroacetic acid (TFA) were obtained from Sinopharm (Sinopharm, Shanghai, China). 2,2'-Azobis(3-ethylbenzothiazoline-6-sulphonic acid) diammonium salt (ABTS), 2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl (DPPH), Trolox, 2,5-dihydroxybenzoic acid (DHB), ascorbic acid (AA), Amberlite MB-3 mixed-bed ion-exchange resin, cesium chloride (CsCl), Fulin-Cincaltes reagent, 2,4,6-tripyridyl-S-triazine (TPTZ), cysteamine hydrochloride and all HPLC standards were obtained from Sigma (St. Louis, MO, USA). Sephadex LH-20 was purchased from Amersham (USA).

2.2. Plant material and sample preparation

Mangosteens (*Garcinia mangostana* L.) at commercial maturation were obtained from fruit market nearby Xiamen University in September 2010. The fruits, without any physical damage and injury from insects or fungal infections, were selected. After peeling, the pericarps were immediately washed and freeze-dried for 48 h, and then ground to pass through the 40-mesh sieve. The powder of the freeze-dried pericarps were stored at -20 °C prior to analysis.

2.3. Different solvent extraction and gel chromatographic fractionation on Sephadex LH-20

Freeze-dried pericarps (10.0 g) were ultrasonically extracted with 70% aqueous acetone containing 0.1% ascorbic acid (3 × 200 mL) and the acetone was eliminated by evaporation under vacuum (40 °C). The remaining aqueous residue was subsequently fractionated in turn with *n*-hexane (3 × 80 mL), petroleum ether (3 × 80 mL) and ethyl acetate (3 × 80 mL) to obtain the dried fractions of *n*-hexane (FH, 0.047 g), petroleum ether (FE, 0.027 g), ethyl acetate (EE, 0.552 g) and water-soluble (FW, 2.295 g).

The water-soluble fraction (FW, 1.0 g) was further fractionated by gel chromatographic fractionation on a 50 × 1.5 cm i.d. Sephadex LH-20 column (Tianjin Glass Apparatus Factory, Tianjin, China). The column was washed with 500 mL 20% methanol, followed by 400 mL 40% methanol to remove sugars, glycosides and monomeric polyphenols, then eluted with 60%, 80%, and 100% methanol (each 350 mL) to yield F1, F2 and F3, respectively. The last fraction (F4) was obtained by thoroughly eluted with 500 mL 70% acetone. Each fraction was freeze-dried after the organic solvent was eliminated under vacuum evaporation (40 °C), and their yields were calculated and listed in Table 1.

2.4. Determination of antioxidant activity and total phenolics

2.4.1. Ferric reducing antioxidant power (FRAP)

The FRAP method was conducted according to the established procedure of Benzie and Strain (1996) with minor modifications. In brief, 3 mL of the freshly prepared FRAP reagent was mixed with 0.1 mL of the test sample or methanol (for the reagent blank). The FRAP reagent, a solution of 10 mM TPTZ and 20 mM ferric chloride was diluted in 300 mM sodium acetate buffer (pH 3.6) at a ratio of 1:1:10. The absorbance of reaction mixture at 593 nm was measured spectrophotometrically after incubation at 25 °C for 10 min. The FRAP values, expressed in mmol ascorbic acid equivalents (AAE)/g fraction, were derived from a standard curve. All fractions were analyzed in three replicates.

2.4.2. Trolox equivalent antioxidant capacity (TEAC)

TEAC assay was carried out following the procedure described by Re et al. (1999). ABTS^{•+} was generated by reacting 7 mM ABTS and 2.45 mM potassium persulphate after incubation at room temperature (23 °C) in dark for 16 h until reaching a stable oxidative state. On the day of analysis, the ABTS^{•+} solution was diluted with 80% ethanol to an absorbance of 0.700 ± 0.050 at 734 nm. The tested sample (0.1 mL) was added to ABTS^{•+} solution (3.9 mL; absorbance of 0.700 ± 0.050) and mixed thoroughly. The reactive mixture was allowed to stand at room temperature for 6 min and the absorbance was immediately recorded at 734 nm using a UNICO UV-2000 spectrophotometer (UNICO, Shanghai, China). Trolox standard solutions (25–200 µg/mL) in 80% ethanol was prepared and assayed at the same conditions. The absorbance of the resulting oxidized solution was compared with that of the calibrated Trolox standards (25–200 µg/mL in 80% ethanol) which were prepared and assayed under the same condition. Results were expressed in terms of mmol Trolox equivalents (TE)/g fraction.

2.4.3. DPPH radical scavenging capacity

The effect of each fraction against DPPH radical was determined according to the method of Brand-Williams, Cuvelier, and Berset (1995) with some modifications. In brief, 0.1 mL of the sample at different concentrations (1.25, 2.5, 5.0, 10.0, 20.0 µg/mL dissolved in methanol) was added to 3.9 mL of DPPH solution (2.5 mg/L in methanol). An equal amount of methanol and DPPH served as the control. After the mixture was shaken and left at room temperature for 30 min, the absorbance at 517 nm was measured. The inhibitory percentage of DPPH was calculated according to the following equation: DPPH inhibition = [(A₁ - A₂)/A₁] × 100, where A₁ = the absorbance of the control reaction; A₂ = the absorbance in the presence of the sample. The IC₅₀ value (µg/mL) is the concentration at which the scavenging activity was 50%.

2.4.4. Total phenolics content

Total phenolics content was determined by the Folin-Ciocalteu method (Naczk & Shahidi, 2004). Briefly, 0.2 mL aliquot of the

Table 1
The yield, ferric reducing antioxidant power (FRAP), Trolox equivalent antioxidant capacity (TEAC), DPPH radical scavenging capacity (IC₅₀), total phenolic (TP) content and mean degree of polymerization (nDP) of fractions obtained by different solvents extraction and gel chromatographic fractionation from mangosteen pericarps.

Fraction	Yield (%)	FRAP (mmol AAE/g)	TEAC (µmol TE/g)	IC ₅₀ (µg/mL)	TP (mg GAE/g)	nDP
FH	0.47	0.10 ± 0.01 ^a	1.95 ± 0.02 ^a	413.38 ± 9.71 ^a	230.21 ± 2.42 ^a	-
FE	0.27	0.32 ± 0.02 ^b	1.95 ± 0.02 ^a	423.35 ± 2.21 ^a	221.28 ± 1.28 ^a	-
EE	5.52	3.60 ± 0.08 ^b	5.07 ± 0.06 ^b	94.37 ± 1.78 ^b	767.52 ± 4.61 ^b	1.91
FW	22.95	2.40 ± 0.02 ^b	3.02 ± 0.04 ^b	116.65 ± 2.38 ^b	559.75 ± 6.82 ^b	6.44
F1	0.84	3.14 ± 0.02 ^c	5.78 ± 0.02 ^c	80.87 ± 0.98 ^c	757.19 ± 4.30 ^c	2.71
F2	2.70	3.63 ± 0.02 ^b	5.87 ± 0.07 ^c	90.67 ± 1.01 ^c	798.52 ± 5.70 ^c	4.63
F3	5.95	4.29 ± 0.02 ^c	5.98 ± 0.01 ^c	85.41 ± 1.29 ^c	850.46 ± 2.11 ^c	9.27
F4	3.42	2.95 ± 0.02 ^b	4.81 ± 0.10 ^b	96.54 ± 0.82 ^c	719.77 ± 2.69 ^c	16.80

^{a–c} Values with different letters in the same column are significantly different at *P* < 0.01 level.

sample was added to a 10 mL volumetric flask containing 0.3 mL of distilled water, 0.5 mL of Folin–Ciocalteu reagent and 2.5 mL 20% Na_2CO_3 solution were added to the mixture and shaken. After incubation at room temperature for 40 min, the absorbance versus a blank was determined at 725 nm. Total phenolics content of each fraction was expressed as mg gallic acid equivalents (GAE)/g fraction.

2.5. Reversed-phase HPLC–ESI–MS analysis followed thiolysis reaction

A modified thiolysis method was carried out on tannin-rich fractions (fractions FE, FW, and F1–F4) from mangosteen pericarp (Zhou et al., 2011). Degradation products of thiolysis were analyzed by reversed-phase HPLC–ESI–MS.

Reversed-phase HPLC–ESI–MS analysis was performed using an Agilent 1200 system (Agilent, Palo Alto, CA, USA) interfaced to a QTRAP 3200 (Applied Biosystems, Foster, USA) with a Hypersil ODS column (250 × 4.6 mm i.d., 5.0- μm) (Elite, Dalian, China). Two solvents, namely A = 0.5% (v/v) TFA in aqueous and B = CH_3CN , were used. The elution system was: 0–45 min, 12–80% B (linear gradient); 45–50 min, 80–12% B (linear gradient). The column temperature was 25 °C and the flow rate was set at 1 mL/min.

The mean degree of polymerization (mDP) was calculated by comparing the peak areas based on the following equation (Gu et al., 2002).

$$\text{mDP} = \frac{(\text{total area of the extender units})}{(\text{total area of the terminal units}) + 1}.$$

This method is based on the assumption that flavan-3-ol benzylthioethers have the same molar absorptivities as their respective flavan-3-ol monomers.

2.6. Normal-phase HPLC–ESI–MS analysis

Normal-phase HPLC–ESI–MS analysis was conducted according to the method of Hellörm, Sinkkonen, Kannon, and Mäntä (2007). The HPLC equipment consisted of an Agilent 1200 liquid chromatograph system as described above. Normal-phase HPLC with a 250 × 4.6 mm i.d., 5.0- μm Silica Luna column (Phenomenex, Darmstadt, Germany) was used with the column temperature set at 35 °C. The injection volume was 20 μL . The mobile phase consisted of A = dichloromethane/methanol/water/acetic acid (41:7:1:1, v/v/v) and B = dichloromethane/methanol/water/acetic acid (5:43:1:1, v/v/v). Elution was started with 100% A, followed by 0–13.5% B, 0–20 min; 13.5–29.2% B, 20–50 min; 29.2–100% B, 50–55 min; 100% B, 55–60 min. The eluting stream (1 mL/min) coming out of the HPLC apparatus was introduced into a QTRAP 3200 mass spectrometer. Conditions for analysis in the negative ion mode included 10 mmol/L ammonium acetate as an ionization reagent, an ion spray voltage of 4.5 kV, a declustering potential of 50 V, an entrance potential of 10 V, a curtain gas of 20 psi and the source temperature at 400 °C. Spectra were scanned over a mass range of m/z 100–2000.

2.7. MALDI–TOF–MS analysis

The MALDI–TOF–MS analysis was performed using a Bruker Reflex III MALDI–TOF mass spectrometer (Bruker, Bremen, Germany). The irradiation source was a pulsed nitrogen laser with a wavelength of 337 nm and the duration of the laser pulse was 3 ns. In the process of desorption with Amberlite BB-64 cation-exchange resin and selection Cs^+ (CsCl , 1.52 mg/mL) as the cationization reagent, the MALDI–TOF mass spectra of fractions FE, FW, and F1–F4 were recorded in reflectron modes with an accelerating

voltage of 20.0 kV and a reflectron voltage of 23.0 kV (Zhou et al., 2010).

2.8. Statistical analysis

All data were expressed as means \pm standard deviation of three independent determinations. One-way analysis of variance (ANOVA) was used, and the differences were considered to be significant at $P < 0.01$. All statistical analyses were performed with SPSS 13.0 for Windows.

3. Results and discussion

3.1. Antioxidant activity and total phenolics content for each fraction

3.1.1. Antioxidant activity

The FRAP (ferric reducing antioxidant power) assay was a simple and reliable test that depends upon the reduction of Fe(III)-TPTZ to the Fe(II)-TPTZ complex by a reductant at low pH (Benzie & Strain, 1996). This method was successfully used for the routine analysis of the antioxidative activity of plant extracts (Nilsson et al., 2005). The FRAP values in fraction F3 was highest (4.29 ± 0.09 mmol AA/g), followed by the descending order of $\text{F3} > \text{F2} \approx \text{FE} > \text{F1} > \text{F4} > \text{FW} > \text{FP} \approx \text{FH}$ (Table 1).

The TEAC (Trolox equivalent antioxidant capacity) assay is based on the scavenging ability of antioxidants to the long-life radical anion $\text{ABTS}^{\cdot-}$ (Re et al., 1999). The order of TEAC in different fractions of mangosteen pericarp was: $\text{F3} \approx \text{F2} \approx \text{F1} \approx \text{FE} > \text{F4} > \text{FW} > \text{FP} \approx \text{FH}$ (Table 1).

The DPPH radical scavenging capacity assay was first reported by Brand-Williams et al. (1995), which is simple and rapid and needs only a UV–VIS spectrophotometer to perform. A direct linear relationship was found between the concentrations of each fraction in the DPPH solution and the inhibition percentages ($\text{all } R^2 > 0.9957$). The 50% inhibition concentration (IC_{50}) of each fraction was calculated using these linear equations (Table 1). The lower IC_{50} value reflects the better DPPH radical scavenging activity. The scavenging effect on the DPPH radical decreased in the order of $\text{F3} > \text{F2} > \text{FE} \approx \text{F4} > \text{F1} > \text{FW} > \text{FP} \approx \text{FH}$.

The antioxidant capacities obtained from FRAP assay, TEAC assay, and DPPH assay were well correlated with each other, the R^2 value for TEAC–DPPH, FRAP–DPPH and FRAP–TEAC were > 0.9066 , 0.9802 and 0.9470 , respectively (Fig. 1A–C). These results implied that the antioxidants in these fractions were capable of reducing oxidants (ferric ions) and scavenging free radicals ($\text{ABTS}^{\cdot-}$ and DPPH).

3.1.2. Total phenolics content

All fractions had high contents of total phenolics, except fractions FH and FP (Table 1). The significant linear relationship between total phenolics content and antioxidant activity showed that phenolic compounds were responsible for the antioxidant activity in each fraction from mangosteen pericarp (Fig. 1D–F).

The high levels of phenolics (except fractions FH and FP) suggested that the waste of mangosteen pericarp could be potential sources of natural antioxidants and deserved further explorations on their structural features and composition.

The measured UV–VIS spectrum of fractions FE, FW, and F1–F4 were similar, all had a pronounced and symmetrical maximum at around 280 nm with no band broadening beyond 300 nm. This kind of spectrum is typical for condensed tannin structures (Fu et al., 2007; Gu et al., 2002). However, fractions FH and FP had different UV–VIS spectrum that peaked at 316 nm, and were not further analyzed.

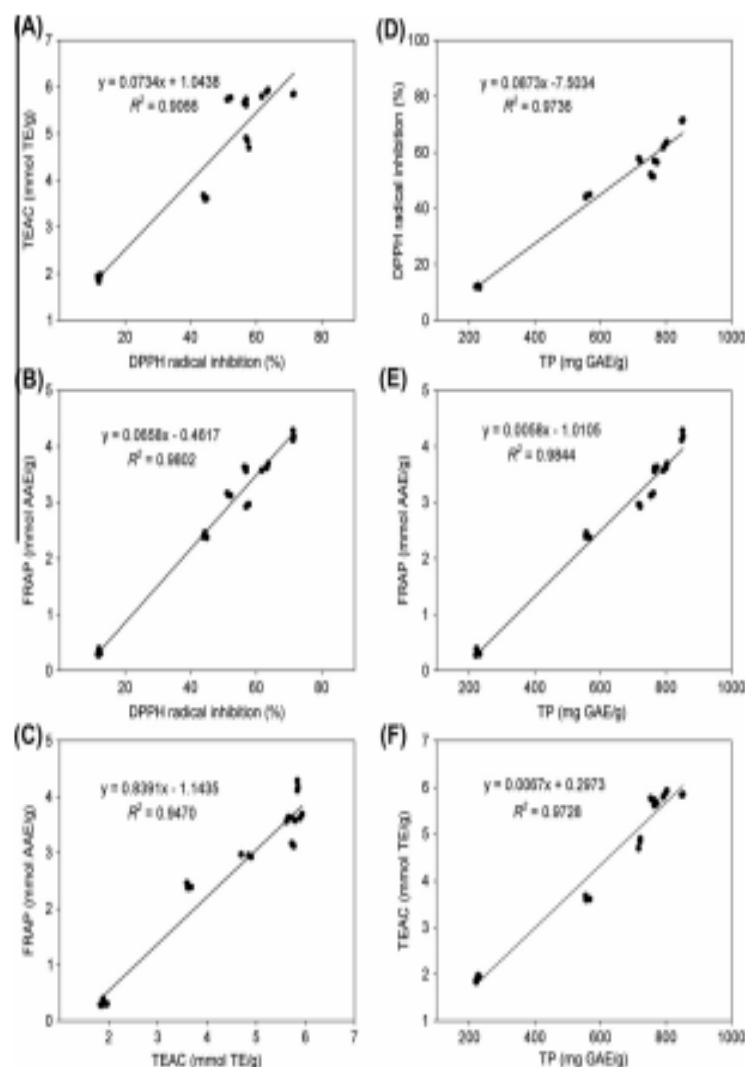


Fig. 1. Relationships among DPPH, FRAP, and TEAC (A–C), and between antioxidant activity and total phenolic content (D–F).

3.2. Reversed-phase HPLC–ESI–MS analysis followed thiolysis reaction

Depolymerization by thiolysis has been proved as an efficient method for determining the nature of the flavan-3-ol units within condensed tannins and for determining the mean degree of polymerization (mDP) (Zhou et al., 2011). The reaction products were identified by comparing of retention times and mass spectra to those of authentic standards. In the thiolysis reaction, terminal units from condensed tannins are released as free flavanoids, with (epi)catechin as the most common terminal unit. In a previous study by Fu et al. (2007), only catechin and epicatechin were observed as the terminal and extension units, other constituent units, including (epi)afzelechin, (epi)gallocatechin, flavan-3-ol gallate units and A-type linked units were not detected using the thiolysis–HPLC conditions. The chromatograms of the thiolytic products of each tannin-rich fraction from mangosteen pericarp were shown in Fig. 2. In addition to epicatechin and its benzyl ether, the two

major constituents (peaks 2 and 8), gallocatechin gallate (peak 3), (epi)afzelechin (peak 4), epicatechin gallate (peak 5), A-type dimer (peak 6) and their benzyl ether (peaks 7, 9 and 10) were firstly detected in mangosteen tannins by the thiolysis–HPLC method. The determination conditions of this method, including increasing the concentration of the sample from 2 to 6 mg/ml in the thiolysis degradation and improving the HPLC conditions described above, were further optimized in the present study. The full structural feature of mangosteen tannins, especially in the fraction FE (Fig. 2) extracted by ethyl acetate, a classic procedure to extract the oligomeric condensed tannins by ethyl acetate (Saucier, Mirabel, Daviaud, Langlois, & Glories, 2001), was obtained from this improved thiolysis–HPLC method. Terminal units of oligomers were present at higher concentrations than those of polymers in the thiolysis medium.

Additionally, the mDP values were 1.91, 6.44, 2.71, 4.63, 9.27, and 16.90 for fractions FE, FW, F1, F2, F3, and F4, respectively

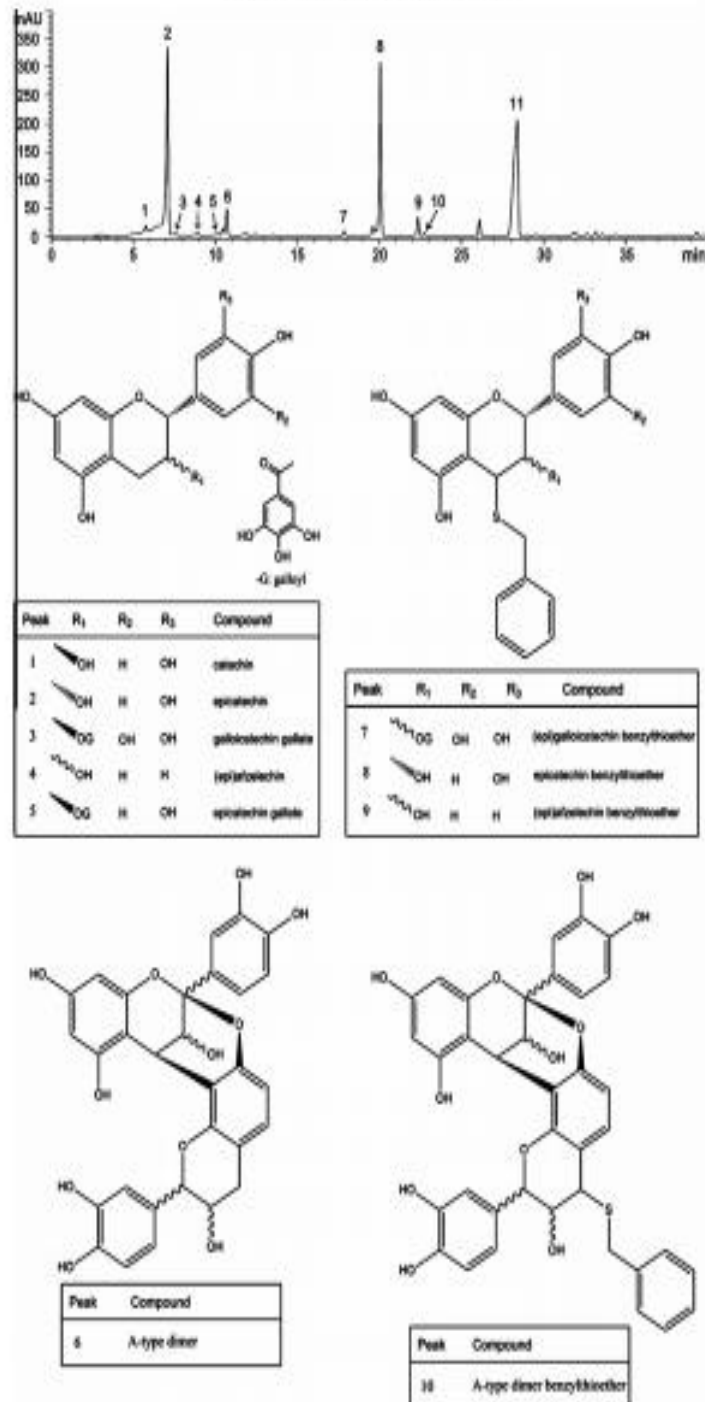


Fig. 2. Reversed-phase HPLC chromatogram of mangrove pericarp tannin hydrolysis products and their chemical structures: (1) catechin (280 Da, [M-H]⁻); (2) epicatechin (280 Da, [M-H]⁻); (3) gallocatechin gallate (467 Da, [M-H]⁻); (4) epigallocatechin (271 Da, [M-H]⁻); (5) epicatechin gallate (461 Da, [M-H]⁻); (6) A-type dimer (525 Da, [M-H]⁻); (7) epigallocatechin benzylbioether (427 Da, [M-H]⁻); (8) epicatechin benzylbioether (411 Da, [M-H]⁻); (9) epigallocatechin benzylbioether (465 Da, [M-H]⁻); (10) A-type dimer benzylbioether (607 Da, [M-H]⁻); 11, unknown-tand.

(Table 1). An increasing mDP from fractions F1–F4 were fractionated from fraction FW. The complementary techniques, including normal-phase HPLC–ESI–MS and MALDI–TOF–MS, were conducted to further analyze the structure of mangosteen tannins.

3.3. Normal-phase HPLC–ESI–MS analysis

The mDP values determined by this analysis do not reflect the heterogeneity of the condensed tannins mixture. However, an indication

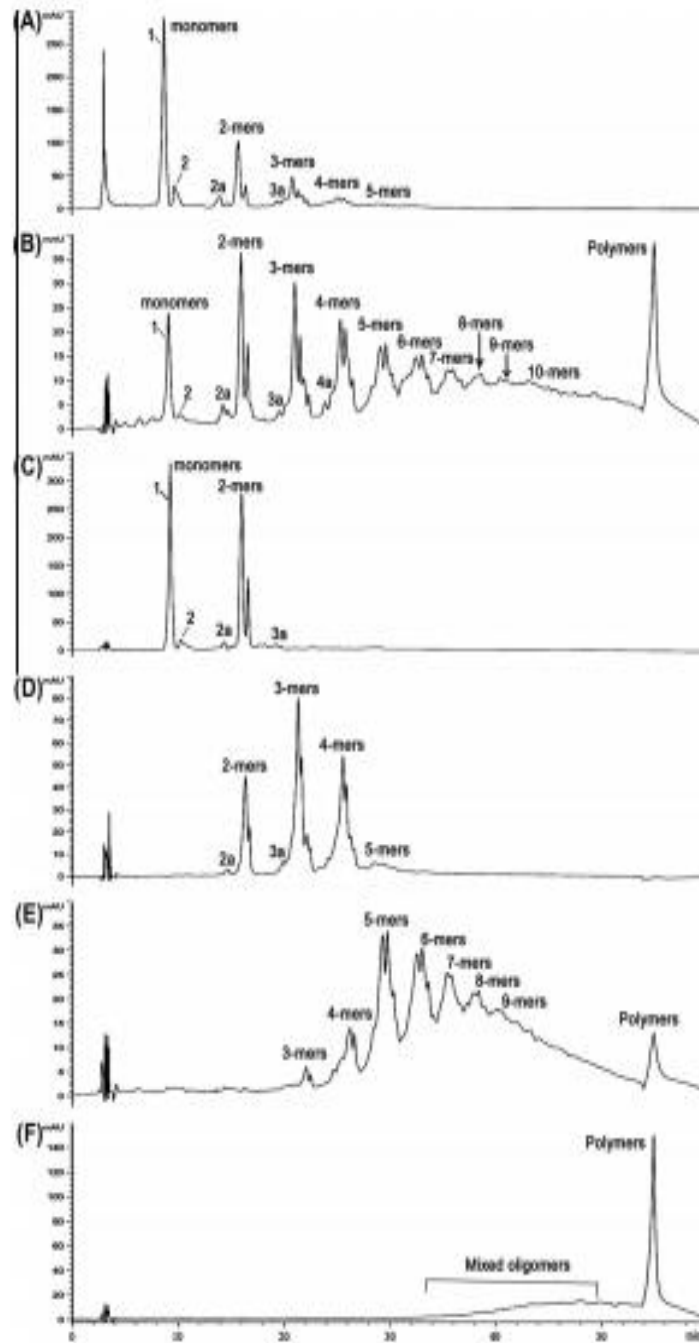


Fig. 3. Comparison of tannin-rich fractions analyzed by normal-phase HPLC–ESI–MS for fractions F0 (A), FW (B), F1 (C), F2 (D), F3 (E) and F4 (F). (1) epigallocatechin (280 Da, [M–H]⁻); (2) catechin (280 Da, [M–H]⁻); 2a–4a, A type dimer (575 Da, [M–H]⁻) to tetramer (1151 Da, [M–H]⁻).

Table 2 (continued)

Peak	Normal phase HPLC-ESI-MS		MALDI-TOF-MS						
	Molecular ion	Structural compositions	Molecular ion	Structural compositions					
			Calculated mass ^a	Observed mass ^b	QC/C	QC/QC	AQA	-G	A-type
10-mers	960	10(C/Q)	2983	2996	8	0	2	0	0
			2989	3000	9	0	1	0	0
			3015	3016	10	0	0	0	0

^a Single-charged ions $[M-H]^{-}$ in normal phase HPLC-ESI-MS analysis.

^b Double-charged ions $[M-2H]^{-2}$ in normal phase HPLC-ESI-MS analysis.

^c Triple-charged ions $[M-3H]^{-3}$ in normal phase HPLC-ESI-MS analysis.

^d Calculated mass were based on the equation $[M-C]^{-} \cdot 2 + 288A + 300B + 272C + 152D - 2E + 133$, where 2, 288, 304, 272, 152, 2 and 133 are the molecular weights of the two hydrogen atoms on terminal catechin unit, the extending unit of (epi)arbutin (C/C, A), the extending unit of (epi)gallocatechin (C/Q/C, B), the extending unit of (epi)gallocatechin (A/Q/A, C), the galloyl group (-G, D), the loss in formation of each A-type interflavan ether linkage (E) and the osone.

^e Some of the observed mass were higher than their corresponding calculated mass with 1 Da due to C, O and/or H isotope.

The normal-phase HPLC profile of fractions FE (Fig. 3A) and FW (Fig. 3B) from mangosteen pericarp indicated the presence of proanthocyanidins with different DP. By comparison with standards and ESI-MS (Table 2), peaks 1 and 2 were identified as epicatechin (289 Da, $[M-H]^{-}$) and catechin (289 Da, $[M-H]^{-}$), respectively (Fig. 3A–C). Other numbers beside the peaks indicated the DP of mangosteen tannins, i.e. 2a (575 Da, $[M-H]^{-}$), 3a (863 Da, $[M-H]^{-}$) and 4a (1151 Da, $[M-H]^{-}$) were the peak of dimer, trimer and tetramer with one A-type linkage, respectively (Fig. 3A–D). Additionally, the higher oligomers were prone to form multiple charges, such as doubly charged ions $[M-2H]^{-2}$ of *m/z* 1008 for 7-mers and triply charged ions $[M-3H]^{-3}$ of *m/z* 864 for 9-mers (Table 2).

Although the peak band became broader in higher DP and was hard to be resolved, the differences in each peak could be seen in these chromatograms (Fig. 3). The results suggested the heterogeneity of mangosteen tannins in their constituent units and the linkages between them. Fraction FW was fractionated by gel chromatographic fractionation on Sephadex LH-20, which resulted fractions F1–F4 with different DP ranges (Fig. 3C–F). The distribution of different DP in F1–F4 was consistent with the mDP obtained by thiolysis. No proanthocyanidins above 10-mers could be resolved but were eluted as one single peak at the end of the run (Fig. 3B, E, and F). It agreed well with the finding of Gu et al. (2002) on the analysis of proanthocyanidins from lowbush blueberry.

3.4. MALDI-TOF-MS analysis

To further determine the polymer chain length and the sequential succession of monomer units in individual chains, condensed tannins fractions from mangosteen pericarp were characterized by MALDI-TOF-MS. MALDI-TOF mass spectra of the chosen fractions were recorded as Cs^{+} adducts in the positive ion reflection mode (Fig. 4). The enlarged 3-mers in Fig. 4A and C demonstrated the good resolution of the spectra. The observed and calculated masses by MALDI-TOF-MS were provided in Table 2. In each fraction, a dominating series of peaks with distances of 288 Da was detected, corresponding to the mass difference of one epicatechin. Another strongly repeated pattern within each main set of peaks was the signals separated by 16 Da difference (Fig. 4C). These masses were produced by the heterogeneity of flavan-3-ol units that showing the different masses among epigallocatechin, epicatechin and epigallocatechin (Reed, Krueger, & Veal, 2005). These findings suggested the coexistence of propenolins, procyanidin and prodelphinidin units in each fraction, and confirmed the presence of epigallocatechin as the extension units according to the reversed-phase HPLC analysis. The series of peaks with more 152 Da and 132 Da were also detected (Fig. 4A), which correspond to the one galloyl group at the heterocyclic C-ring as in epicate-

chin gallate or epigallocatechin gallate (Li et al., 2010; Reed et al., 2005), and the quasimolecular ions $[M + 2Cs^{+} - H]^{+}$ generated by simultaneous attachment of two Cs^{+} and loss of a proton (Xiang et al., 2007), respectively.

Additionally, the A-type interflavan linkages with 2 Da difference were also observed in the main set of peaks (Fig. 4C). Proanthocyanidins with A-type interflavan linkages between adjacent flavan-3-ol subunits have characteristic signals 2 Da smaller than B-type linked proanthocyanidins, due to the loss of two hydrogen atoms with the formation of the ether bond (Li et al., 2010; Matsuo et al., 2010). The present MALDI-TOF-MS data showed the evidence of A-type linkages of condensed tannins in mangosteen pericarp, which agreed with the results obtained by reversed and normal-phase HPLC-ESI-MS analysis.

The overall DP ranges and predominant polymers were clearly different among fractions, and gradually increased from fractions F1–F4 that were fractionated from fraction FW (Fig. 4C–F). Supporting the results of normal-phase HPLC, MALDI-TOF mass spectra provided the evidences on structural heterogeneity and distinct DP distribution in each fraction of mangosteen proanthocyanidins. In each fraction, however, it was interesting to find that MALDI-TOF mass spectra showed a more complete picture of DP distribution, especially the larger polymers (Fig. 4). The polymeric proanthocyanidins with DP > 10 could not be resolved by normal-phase HPLC, but even 25-mers in fraction F4 could be detected by MALDI-TOF-MS (Fig. 4F). The "total purity" of mangosteen condensed tannins extending from 2-mers to 13-mers was observed by Fu et al. (2007) and from 3-mers to 11-mers by Zhou et al. (2010). In the present study, however, as high as 25-mers was shown in the spectra, which might be attributed to the improvement of fractionation in the MALDI-TOF-MS analysis as suggested by previous researchers (Monagas, Quintanilla-Lopez, Gomez-Cordoves, Bartolome, & Lebrun-Agular, 2010; Taylor, Bamfisk, Kennedy, & Deizer, 2003). An inherent problem with MALDI-TOF-MS is that the lower molecular weight oligomers saturate the detector and make it difficult to detect the larger polymers (Li et al., 2010; Monagas et al., 2010). On the contrary, fractionation of lower oligomers (fractions F1–F3) on Sephadex LH-20 column in the present study would significantly enhanced the sensitivity of the detection of large polymers (fraction F4) under MALDI-TOF-MS analysis.

3.5. Structure-activity of condensed tannins from mangosteen pericarp

Fractions F1, F2, F3 and F4, with distinguishing DP ranges, were obtained by gel chromatographic fractionation on Sephadex LH-20. They were used for surveying the structure-activity of condensed tannins, especially the relationships between DP and antioxidant

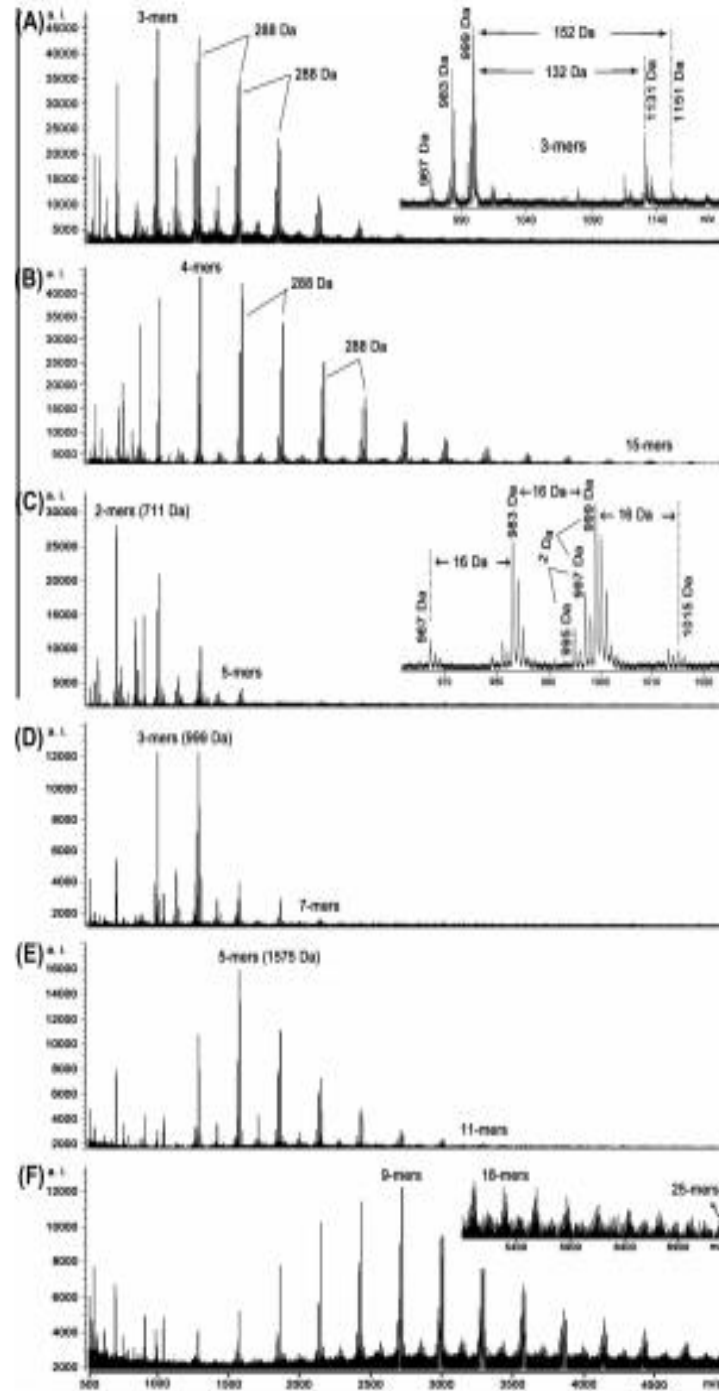


Fig. 4. Comparison of tannin-rich fractions analyzed by MALDI-TOF-MS for fractions F1 (A), F2 (B), F3 (C), F4 (D), F5 (E) and F6 (F).

activity. An increasing antioxidant activity of mangrove tannins from mDP = 2.71 (fraction F1) to 9.27 (fraction F3) was shown, but a decrease in fraction F4 with mDP = 16.90 was recorded (Table 1). Similar increase in activity for procyanidins from 1 to 4

units was also reported (de Gaudio, Vivas, de Freitas, & Bourgeois, 1999). Ariga and Hamano (1990) tested several oligomeric flavonoids and found that the ability to scavenge peroxyl radicals was proportional to DP. Jerez, Toussain, Simira, Torres, and Nunez

(2007) obtained the mDP of procyanidins from *Pinus pinaster* and *Pinus radiata* by thiolysis with cysteamine and showed an increase in antioxidant activity of procyanidins up to 6–7 mDP but from there, a decrease was found in both: *pinaster* (12–22 mDP) and *P. radiata* (9–15 mDP). In the present study, the mDP for fractions F1, F2, F3, and F4, based on the thiolysis with toluene-*o*-thiol, were 2.71, 4.63, 9.27 and 16.80, respectively, while the respective mDP for the four fractions by thiolysis with cysteamine were 1.95, 3.15, 6.70 and 11.30. These results suggested that the mDP value was underestimated when using cysteamine as the thiolysis reagent. Mangosteen condensed tannins may degrade incompletely with cysteamine and result in lower mDP.

A similar antioxidant activity pattern as described by Jerez et al. (2007) that the peak in 6–7 mDP (9.27 mDP by thiolysis with toluene-*o*-thiol) was obtained in the present study. The increase of the antioxidant power of flavanols with mDP up to 9.27 can be explained by the electron delocalisation through intramolecular links among monomers, because C4–C8 confers a very tight conformation but, at a given point, with new units the steric hindrance can be decisive (de Gaudjuc et al., 1999; Jerez et al., 2007). 9–10 mDP may therefore be considered as a dividing but also a critical point for predicting the structure-activity of the condensed tannins from mangosteen pericarp.

4. Conclusion

Condensed tannin fractions from mangosteen pericarp were obtained by different solvent extraction and gel chromatographic fractionation on Sephadex LH-20 columns. The yields and total phenolics content of eight collected fractions were determined and their antioxidant activity were evaluated by FRAP, TEAC and DPPH radical scavenging capacity methods. The phenolic compounds were the dominant antioxidant components in mangosteen pericarp. Fractions F2 and F3, especially F3, exhibited higher antioxidant activity, total phenolics content and yields than other fractions. The structural features, particularly, the structural heterogeneity of fraction F1–F4 that fractionated on Sephadex LH-20 column, were further analyzed by thiolysis, reversed-phase HPLC–ESI–MS, normal-phase HPLC–ESI–MS, and MALDI–TOF–MS. Reverse-phase HPLC followed the thiolysis analysis revealed that epicatechin predominately occurred as both terminal and extension units, and a gradual increase of mDP of 2.71, 4.63, 9.27 and 16.80 for fractions F1, F2, F3 and F4, respectively. Normal-phase HPLC–ESI–MS showed the heterogeneity of mangosteen tannins in constituent units (epi catechin), the interflavan linkages (A-type linkage) and the presence of DP < 10-mers. The distribution of DP analyzed by normal-phase HPLC–ESI–MS was consistent with the mean DP obtained by thiolysis. MALDI–TOF–MS confirmed that mangosteen tannins predominately contained procyanidin units with a significant amount of propylgallate units but much lower signals of propylgallate units. A-type linkages were also present. Further, MALDI–TOF–MS analysis exhibited high sensitivity of detection by identification of condensed tannins on Sephadex LH-20 column. Four collected fractions (F1–F4) showed distinct DP ranges and most intense polymers, especially up to 25-mers in fraction F4. The antioxidant activity of mangosteen condensed tannins increased with mDP up to 9.27 (fraction F3). Mangosteen tannins were condensed tannins with structural heterogeneity in monomer units, degree of polymerization (DP) and interflavan linkages.

Acknowledgements

Two anonymous reviewers substantially helped to improve the earlier version of the manuscript. This work was supported by the National Natural Science Foundation of China (31070522), the

Program for New Century Excellent Talents in University (NCET-07-0725).

References

- Aigo, T., & Hamano, M. (1990). Radical scavenging action and its mode in procyanidins B-1 and B-2 from araliacae to peroxyl radicals. *Agricultural and Biological Chemistry*, 54(10), 2489–2500.
- Beeche, J. F. S., & Strain, J. J. (1996). The ferric reducing ability of plasma as a measure of "antioxidant power": The FRAP assay. *Analytical Biochemistry*, 239, 70–76.
- Brand-Williams, W., Cuatrecasas, M. E., & Boveris, C. (1995). Use of a free radical method to evaluate antioxidant activity. *Life Sciences*, 57(1), 1085–1130.
- de Gaudjuc, N., Vivas, N., de Freitas, V., & Bourgeois, C. (1999). The influence of various phenolic compounds on scavenging activity assessed by an enzymatic method. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 79(9), 1881–1890.
- Dixon, R. A., Yao, D. Y., & Sharma, S. B. (2005). Proanthocyanidins – Atrial frontier in flavonoid research? *New Phytologist*, 167(1), 9–28.
- Fu, C., Luo, A. F., Chu, F. P., & Huang, D. (2007). Oligomeric proanthocyanidins from mangosteen pericarp. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 55(10), 7660–7666.
- Gu, L. W., Kuhn, M., Hammerstone, J. F., Beecher, G., Cunningham, D., Vanzetti, S., et al. (2003). Fractionation of polymeric procyanidins from lowbush blueberry and quantification of procyanidins in selected foods with an optimized normal-phase HPLC–MS fluorescence detection method. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 51(17), 4852–4860.
- Gu, L., Kuhn, M., Hammerstone, J., Beecher, G., Holden, J., Haytowitz, D., et al. (2001). Screening of foods containing proanthocyanidins and their structural characterization using LC–MS/MS and thiolysis degradation. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 49(23), 7513–7521.
- Hagerman, A. E. (2003). Tannin chemistry. <http://www.cornell.edu/food/hagerman/tannin.pdf>.
- Hellstrom, J., Sirkkunen, J., Karunen, M., & Martila, P. (2007). Isolation and structure elucidation of procyanidin oligomers from saulatoon berries (*Ampelodesmos*). *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 55(1), 157–164.
- Huemer, W., & Schuster, P. (2006). Analysis of proanthocyanidins. *Molecular Nutrition & Food Research*, 52(12), 1381–1398.
- Jerez, M., Torales, S., Sotelo, J., Torres, J. L., & Nunez, M. J. (2007). Procyanidin from pine bark: Relationship between structure, composition and antioxidant activity. *Food Chemistry*, 104(2), 518–527.
- Jiang, H., A. Su, B. N., Keller, W. J., Melara, R. G., & Kinghorn, A. D. (2006). Antioxidant xanthones from the pericarp of Garcinia mangostea (mangosteen). *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 54(6), 2077–2080.
- Kuhn, M., Johnson, J., Robbins, R., Hammerstone, J., & Schuster, H. (2006). High-performance liquid chromatography separation and purification of cacao (Theobroma cacao L.) procyanidins according to degree of polymerization using a diol stationary phase. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 54(5), 1571–1576.
- Li, C. M., Lawrence, R., Thornley, J. D., Xu, S. F., Yang, J., Tan, Y., et al. (2010). High molecular weight procyanidin (Procyanidin B1) proanthocyanidin: A highly galloylated A-linked tannin with an unusual flavonol terminal unit, myricetin. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 58(16), 9033–9042.
- Matuso, Y., Rajka, V., Ohtsuki, S., Tanaka, T., Hirahara, H., Kai, T., et al. (2010). Chemical constituents of the leaves of rabbiteye blueberry (*Vaccinium corymbosum*) and characterization of polymeric proanthocyanidins containing phenylpropanoid units and A-type linkages. *Food Chemistry*, 119(6), 1077–1079.
- Monagas, M., Quinzana-Lopez, J. E., Gomez-Cordoves, C., Barbañán, B., & Lopez-Aguilar, K. (2010). MALDI–TOF MS analysis of plant proanthocyanidins. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, 52(2), 358–372.
- Nazki, M., & Shahidi, F. (2004). Extraction and analysis of phenolics in food. *Journal of Chromatography A*, 1058(1–2), 95–111.
- Nelson, J., Hsu, D., Orsini, G., Brennon, C., Nilsson, A., & Almqvist, B. (2005). Comparison of the 2,2'-azobis(2-amidinopropane)-6-sulfonic acid (ABTS) and ferric reducing antioxidant power (FRAP) methods to assess the total antioxidant capacity in extracts of fruit and vegetables. *Molecular Nutrition & Food Research*, 49(3), 239–246.
- Pedraza-Chavez, J., Cardenas-Rodriguez, N., Ortaño-Barra, M., & Perez-Rojas, J. M. (2008). Medicinal properties of mangosteen (*Garcinia mangostana*). *Food and Chemical Toxicology*, 46(10), 1227–1239.
- Re, R., Pellegrini, N., Proteggente, A., Pannala, A., Yang, M., & Rice-Evans, C. (1999). Antioxidant activity applying an improved ABTS radical cation decolorization assay. *Free Radical Biology and Medicine*, 26(9–10), 1231–1237.
- Reed, J. D., Krueger, C. G., & Vothring, M. M. (2003). MALDI–TOF mass spectrometry of oligomeric food polyphenols. In *Fourth tannin conference held at the fall meeting of the American Chemical Society* (pp. 2268–2269). Philadelphia, PA: Pergamon-Elsevier Science Ltd.
- Sauer, C., Mirabel, M., Davidaud, E., Longueas, A., & Glories, Y. (2008). Rapid fractionation of grape seed proanthocyanidins. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 56(12), 5710–5716.
- Taylor, A. W., Rosolby, T., Kowalski, J. A., & Deiner, M. L. (2001). Hop (*Humulus lupulus* L.) proanthocyanidins characterized by mass spectrometry, acid catalysis, and gel permeation chromatography. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 49(14), 4101–4110.

- Xiang, P., Liu, Y., Liu, B., Xiang, C., Wang, Z. W., & Liu, Z. M. (2007). Effect of calcination oxygen on the matrix-assisted laser desorption/ionization time-of-flight mass spectra of Chinese ginsengs. *Journal of Applied Polymer Science*, *103*(2), 859–864.
- Zadernowski, R., Czaplicki, S., & Nacik, M. (2000). Phenolic acid profiles of mangrove fruits (*Garcinia mangostana*). *Food Chemistry*, *110*(3), 685–689.
- Zhu, H. C., Liu, Y. M., Li, Y. Y., Li, M., Wei, S. D., Cha, W. M., et al. (2011). Antioxidant properties of polymeric proanthocyanidins from fruit stems and pericarp of litchi chinensis Sonn. *Food Research International*, *46*(2), 613–620.
- Zhu, H. C., Wei, S. D., Li, M., & Liu, Y. M. (2010). Analysis of condensed tannins from mangrove pericarp by matrix-assisted laser desorption/ionization time-of-flight mass spectrometry. *Chinese Journal of Analytical Chemistry*, *38*(10), 1402–1406.