

## Uji Aktivitas Antioksidan, Kandungan Fenolik Total, dan Kandungan Flavonoid Total Buah Merah

### (Antioxidant Activity Test and Determination of Phenolic and Flavonoid Contents from *Pandanus conoideus* Lam.)

NI MADE DWI SANDHIUTAMI<sup>1\*</sup>, A.A WIWIEK INDRAYANI<sup>2</sup>

<sup>1</sup>Fakultas Farmasi Universitas Pancasila, Jl. Srengseng Sawah, Jagakarsa, Jakarta Selatan

<sup>2</sup>Fakultas Kedokteran Universitas Udayana, Jl. PB Sudirman, Denpasar, Bali

Diterima 17 Januari 2011, Disetujui 23 Maret 2011

**Abstrak:** Antioksidan merupakan senyawa yang mampu menghambat reaksi radikal bebas dalam tubuh. Penelitian ini bertujuan untuk menentukan aktivitas antioksidan ekstrak dan fraksi dari buah merah (*Pandanus conoideus* Lam.), menentukan kandungan fenolik dan flavonoid total, serta menentukan hubungan antara aktivitas antioksidan dengan kandungan fenolik total dan flavonoid totalnya. Buah merah dimaserasi dengan metanol lalu diuapkan hingga diperoleh ekstrak metanol. Ekstrak metanol dilarutkan dalam air lalu dipartisi dengan kloroform, dan etil asetat untuk memperoleh fraksi kloroform, etil asetat, dan fraksi air. Aktivitas antioksidan ditentukan dengan uji penangkapan radikal DPPH (2,2-difenil-1- pikrilhidrazil), sementara kandungan fenolik total dan flavonoid total ditentukan dengan teknik spektrofotometri. Hasil penelitian menunjukkan bahwa nilai  $IC_{50}$  fraksi air, fraksi etil asetat, fraksi kloroform, dan ekstrak metanol sebelum dipartisi buah merah masing-masing sebesar 399,06; 10,41; 1416,68 dan 186,31  $\mu\text{g/mL}$ . Aktivitas antioksidan ekstrak dan fraksi ini lebih kecil daripada vitamin E ( $IC_{50}$  8,27  $\mu\text{g/ml}$ ). Kandungan fenolik total ekstrak dan fraksi buah merah dan nilai  $IC_{50}$ -nya menunjukkan hubungan linier  $y = -13,085x + 754,91$ ; dengan nilai koefisien korelasi ( $r^2$ ) =  $r^2 = 0,3641$ ; sementara itu hubungan flavonoid total ekstrak dan fraksi buah merah dengan  $IC_{50}$ -nya mempunyai persamaan regresi linier  $y = -282,9x + 868,05$ ; dengan nilai  $r^2 = 0,4484$ .

**Kata kunci:** aktivitas antioksidan, Buah Merah, DPPH (2,2-difenil-1- pikrilhidrazil).

**Abstract:** Antioxidants are compounds which have ability to inhibit free radical reactions in the human body. Objectives of this research are to evaluate the antioxidant activities of extract and fractions from *Pandanus conoideus* Lam. fruits, to determine total phenolic and total flavonoid contents, and to correlate the total phenolic and total flavonoid contents of those fractions with their antioxidant activities. The *Pandanus conoideus* Lam. fruits or locally known as "buah merah" were extracted by methanol, then evaporated and dissolved in aquadest. This solution is subsequently partitioned using chloroform and ethyl acetate to obtain chloroform, ethyl acetate, and water fractions. The antioxidant activities were determined by radical scavenging assay using DPPH (2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl) radical. The total phenolic and total flavonoid contents were determined by mean of spectrophotometry. The results showed that fractions of water, ethyl acetate, and chloroform revealed antioxidant activities with  $IC_{50}$  values of 399.06, 10.41, 1416.68  $\mu\text{g/mL}$  respectively, whereas the methanolic extract of *Pandanus conoideus* Lam. fruits before partition has  $IC_{50}$  of 186.31  $\mu\text{g/ml}$ . The antioxidant activities of these extract and fractions are lower than that of vitamin E ( $IC_{50}$  8.27  $\mu\text{g/ml}$ ). A linier positive relationship existed between the total phenolic contents of these extract and fractions with their antioxidant activities as shown by equation of  $y = 13.085x + 754.91$ ;  $r^2 = 0,3641$ , while the correlation between the total flavonoid contents and their antioxidant activities revealed a linier regression of  $y = -282.9x + 868.05$ ;  $r^2 = 0.4484$ .

**Keywords:** antioxidant activity, *Pandanus conoideus* Lam. fruit, DPPH (2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl).

\* Penulis korespondensi, Hp. 08123888252  
e-mail: dwi\_sandhiutami@yahoo.com

## PENDAHULUAN

EKSPLORASI senyawa antioksidan dari bahan alam kini banyak dilakukan. Kecenderungan masyarakat dunia untuk kembali ke alam, yang ditunjukkan oleh data bahwa sekitar 80% penduduk dunia memanfaatkan obat tradisional yang bahan bakunya berasal dari tumbuhan, merupakan peluang besar bagi Indonesia untuk mengembangkan tumbuhan obat. Di Amerika Serikat sekitar 25% ramuan obat modern mengandung komponen bioaktif dari tumbuhan obat. Di beberapa negara, ekstrak tumbuhan tertentu digunakan untuk obat yang pemakaiannya didasarkan pada pengetahuan lokal dari masyarakat setempat atau etnis tertentu. Hal ini menunjukkan pentingnya peranan tumbuhan obat bagi perkembangan kesehatan masyarakat. Gerakan "kembali ke alam" ini timbul sebagai dampak isu lingkungan yang merupakan reaksi dari semakin besarnya dampak negatif dari produk sintetik<sup>(1)</sup>.

Obat tradisional Indonesia merupakan warisan budaya yang telah menjadi bagian integral dari kehidupan bangsa Indonesia yang terdiri dari aneka suku bangsa, diprogramkan untuk dapat dipakai dalam sistem pelayanan kesehatan formal. Oleh karena itu obat tradisional harus memenuhi persyaratan untuk pelayanan kesehatan yaitu secara medis harus dapat dipertanggung jawabkan. Guna mencapai hal itu perlu dilakukan pengujian ilmiah tentang khasiat, keamanan dan standar kualitasnya. Perkembangan tuntutan kebutuhan pemakaian obat tradisional dirasa semakin nyata, selain menyangkut aspek kesehatan juga berkaitan dengan potensi ekonomi<sup>(2)</sup>.

Salah satu tanaman obat yang cukup menarik perhatian dan banyak diteliti sejak akhir 2004 adalah buah merah (*Pandanus conoideus* Lam.). Buah merah memang masih asing bagi sebagian masyarakat. Namun bagi masyarakat Papua, terutama yang tinggal di daerah pedalaman, tanaman ini sudah lama dimanfaatkan terutama sebagai sumber pangan. Masyarakat pedalaman yang mengkonsumsi buah merah jarang ditemukan mengidap penyakit degeneratif seperti kanker, hipertensi dan diabetes. Bahkan dari data statistik setempat, mereka memiliki angka harapan hidup cukup tinggi<sup>(3)</sup>.

Penelitian kandungan senyawa aktif dalam buah merah yang berkhasiat obat telah dilakukan dan pada awalnya ditujukan untuk mengungkap kandungan gizinya. Buah merah mengandung zat-zat gizi bermanfaat atau senyawa aktif dalam kadar tinggi, diantaranya betakaroten, tokoferol, serta asam lemak seperti asam oleat, asam linoleat, asam linolenat, dan asam dekanat. Kandungan tokoferol dalam buah merah tinggi dan memiliki aktivitas biologi sebagai antioksidan<sup>(3)</sup>. Senyawa-senyawa fenol seperti tokoferol

dan flavonoid yang terdapat pada tanaman mampu berfungsi sebagai antioksidan primer<sup>(4)</sup>.

Tokoferol efektif mencegah terjadinya peroksidasi lipid dan pembentukan radikal bebas lainnya. Dalam banyak penelitian aktivitas tokoferol sebagai antioksidan diyakini kemampuannya untuk mencegah penyakit-penyakit degeneratif seperti penyakit kardiovaskular, atherosklerosis dan kanker. Data epidemiologi menunjukkan bahwa asupan tokoferol atau vitamin E dosis tinggi, berhubungan dengan penurunan resiko penyakit kardiovaskular. Vitamin E atau tokoferol juga berperan spesifik sebagai antioksidan<sup>(5)</sup>.

Penelitian tentang aktivitas antioksidan buah merah secara *in vitro* masih terbatas sehingga masih diperlukan penelitian lebih lanjut. Disamping itu juga diperlukan penentuan kandungan fenolik total dan kandungan flavonoid total untuk mengetahui hubungan antara aktivitas antioksidan dengan kandungan fenolik total dan kandungan flavonoid totalnya.

Hasil penelitian ini diharapkan dapat memberikan informasi aktivitas antioksidan buah merah yang diukur secara *in vitro* dengan metode DPPH dan hubungan aktivitas antioksidan masing-masing ekstrak dengan kandungan fenolik totalnya serta kandungan flavonoid totalnya.

## BAHAN DAN METODE

**BAHAN.** Buah merah (*Pandanus conoideus* Lam.) yang berasal dari Irian Jaya, DPPH (*2,2-diphenyl-1-picrylhidrazil*) (Sigma. Co), vitamin E (Sigma. Co), asam galat, quercetin, pereaksi Folin-Ciocalteu (E. Merck), natrium karbonat, natrium nitrit, aluminium klorida, natrium hidroksida, etanol, metanol, etil asetat, dan amonia semuanya E. Merck; heksan (Waters), aqua bidestilata (Ika Pharmindo), dan *aquades*. Alat yang digunakan adalah *Vacuum rotary evaporator* (Heidolph VV 2000), spektrofotometer UV-VIS (Genesys-5), dan alat-gelas yang lazim digunakan di laboratorium analisis.

**METODE.** Pembuatan Ekstrak. Sebanyak 10 kg buah merah diblender dengan 10 L metanol, lalu dicampur homogen sambil sesekali diaduk. Campuran didiamkan selama 4 hari, selanjutnya filtrat diambil melalui penyaringan dan diendapkan selama satu hari. Setelah diendapkan, pelarut penyari diuapkan menggunakan *vacuum rotary evaporator* hingga diperoleh ekstrak metanol. Selanjutnya ekstrak metanol dilarutkan dalam air lalu dipartisi menggunakan kloroform dan dilanjutkan dengan etil asetat. Proses penguapan masing-masing ekstrak dan fraksi dilakukan dengan menggunakan *vacuum rotary evaporator* hingga diperoleh ekstrak metanol, fraksi etil asetat, dan fraksi kloroform.

**Penentuan aktivitas antioksidan dengan metode DPPH.** Penentuan aktivitas antioksidan ditentukan dengan metode penangkapan radikal (*radical scavenging*) menggunakan radikal DPPH. Pengukuran aktivitas antioksidan dengan metode ini berdasarkan pada kemampuan suatu senyawa uji untuk bereaksi dengan radikal DPPH pada panjang gelombang 517 nm<sup>(6)</sup>. Pembuatan larutan DPPH 0,5 mM dilakukan dengan cara sebanyak 19,7 mg serbuk DPPH dimasukkan ke dalam labu takar 100 mL lalu ditambah metanol hingga tanda batas dan dimasukkan dalam alat ultrasound untuk melarutkan serbuk DPPH. Sebanyak 1,0 mL larutan DPPH 0,5 mM dimasukkan ke dalam tabung reaksi, ditambah 50 µl ekstrak buah merah dalam air dengan konsentrasi 395 µg/mL, 392,31 µg/mL, 409,88 µg/mL; fraksi etil asetat dengan konsentrasi 10,73 µg/mL, 10,46 µg/mL, 10,05 µg/mL; fraksi kloroform 1458,13 µg/mL, 1404,55 µg/mL, 1387,37 µg/mL; serta fraksi metanol dengan konsentrasi 194,5 µg/mL, 187,77 µg/mL, 176,68 µg/mL. Pada masing-masing konsentrasi tersebut kemudian ditambahkan 3,95 mL etanol dan divortex hingga tercampur merata dan didiamkan selama 30 menit. Besarnya konsentrasi ekstrak buah merah dibuat sedemikian rupa hingga memberikan nilai IC<sub>50</sub> yaitu konsentrasi yang memberikan prosentase penangkapan radikal sebanyak 50% dibanding kontrol melalui suatu persamaan garis regresi linier. Serapan larutan dibaca pada panjang gelombang 517 nm. Dilakukan pula pembacaan serapan larutan kontrol yakni tanpa penambahan ekstrak uji. Besarnya aktivitas antiradikal atau penangkapan radikal (*radical scavenging*) dihitung dengan rumus Aktivitas antioksidan (%) =

$$\frac{(\text{Abs blanko} - \text{Abs sampel})}{\text{Abs blanko}} \times 100 \%$$

**Penentuan Kandungan Fenolik Total.** Kandungan Fenolik Total ditentukan dengan metode spektrofotometri<sup>(7)</sup>. Dibuat larutan induk (Li) asam galat untuk kurva baku dengan konsentrasi 1 mg/mL. Dari larutan induk dibuat seri konsentrasi 0,1 mg/mL, 0,2 mg/mL, 0,3 mg/mL, 0,4 mg/mL, 0,5 mg/mL, 0,6 mg/mL, 0,7 mg/mL, dimasukkan dalam labu takar 10 mL, ditambah dengan 0,4 mL reagen *Folin-Ciocalteu*, dan dibiarkan selama 5-8 menit. Selanjutnya larutan ini ditambah dengan Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> 7% sebanyak 4 mL dan aqua bidestilata sampai tanda batas. Setelah 90 menit, serapannya dibaca pada panjang gelombang 750 nm. Blanko terdiri atas aquabidestilata dan reagen *Folin-Ciocalteu*. Penentuan kandungan Fenolik Total dalam ekstrak ditetapkan dengan perlakuan sebagai mana pada pembuatan kurva baku. Ekstrak metanol, fraksi etil

asetat dan fraksi kloroform yang digunakan masing-masing adalah 0,05 mg/mL, 0,63 mg/mL, 0,005 mg/mL. Kandungan fenolik total dinyatakan sebagai g ekuivalen asam galat tiap 100 gram berat kering ekstrak (g EAG/100 g) karena belum diketahui struktur kimia senyawa fenolik yang ada pada ekstrak etil asetat, kloroform, maupun fraksi-fraksinya

#### Penentuan Kandungan Flavonoid Total.

Kandungan flavonoid total ditentukan secara spektrofotometri<sup>(8)</sup>. Dibuat larutan induk (Li) dengan konsentrasi 10 mg/mL. Dari larutan induk dibuat seri konsentrasi 0,008 mg/mL, 0,01 mg/mL, 0,02 mg/mL, 0,03 mg/mL, 0,04 mg/mL, 0,05 mg/mL, 0,06 mg/mL, 0,07 mg/mL, dimasukkan dalam labu takar 10 ml, ditambah 4 mL aquades, dan 0,3 mL larutan NaNO<sub>2</sub>, biarkan selama 6 menit. Setelah itu larutan ditambah dengan 0,3 mL AlCl<sub>3</sub> 10% dan dibiarkan selama 5 menit. Selanjutnya larutan ditambah dengan 4 mL NaOH 10% dan aquades sampai 10 mL. Larutan dibiarkan selama 15 menit dan selanjutnya dibaca serapannya pada panjang gelombang 510 nm terhadap blanko. Penentuan kandungan flavonoid Total dalam ekstrak ditetapkan dengan perlakuan sebagai mana pada pembuatan kurva baku. Ekstrak metanol, fraksi etil asetat dan fraksi kloroform yang digunakan masing-masing adalah 0,01 mg/mL, 0,03 mg/mL, 0,002 mg/mL. Kandungan flavonoid total dinyatakan sebagai g ekuivalen *quercetin* tiap 100 gram berat kering ekstrak.

**Analisis data.** Hasil yang diperoleh dianalisis dengan analisis varian (ANAVA) satu arah dengan program SPSS versi 11 untuk mengetahui apakah ada perbedaan aktivitas antioksidan, kandungan fenolik total, dan kandungan flavonoid total ketiga ekstrak yang diuji.

## HASIL DAN PEMBAHASAN

**Penentuan aktivitas antioksidan buah merah.** Data yang diperoleh dari penentuan aktivitas antioksidan ekstrak Buah Merah dengan menggunakan metode DPPH disajikan pada Tabel 1. Tabel tersebut menunjukkan bahwa fraksi etil asetat mempunyai aktivitas antioksidan yang paling besar (nilai IC<sub>50</sub> paling kecil), baik dibandingkan dengan fraksi-fraksi lain atau dengan ekstrak metanol sebelum dilakukan partisi. Urutan aktivitas antioksidan dari yang paling besar yang didasarkan pada nilai IC<sub>50</sub> adalah: fraksi etil asetat (IC<sub>50</sub> = 10,41 µg/mL) > ekstrak metanol sebelum dipartisi (IC<sub>50</sub> = 186,31 µg/mL) > fraksi metanol-air (IC<sub>50</sub> = 399,06 µg/mL) > fraksi kloroform (IC<sub>50</sub> = 1416,68 µg/mL). Dari uji ANAVA satu arah dapat diketahui bahwa aktivitas antioksidan fraksi-fraksi air, etil asetat, kloroform, serta ekstrak metanol sebelum difraksinasi berbeda bermakna pada P 0,05.

Sebagai pembanding digunakan vitamin E yang

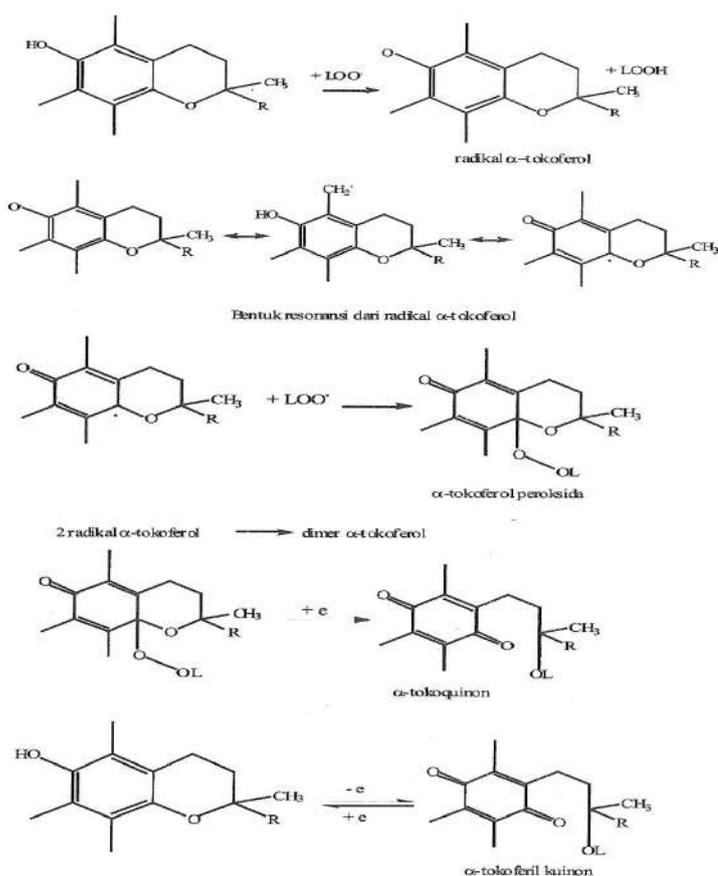
**Tabel 1.** Aktivitas antioksidan yang diekspresikan dengan nilai  $IC_{50}$  fraksi-fraksi hasil partisi ekstrak metanol Buah Merah serta ekstrak metanol (sebelum dipartisi).

Fraksi	Nilai $IC_{50}$ ( $\mu\text{g/mL}$ )			$\bar{X} \pm SD$
	1	2	3	
Air	395,00	392,31	409,88	$399,06 \pm 9,46$
Etil asetat	10,73	10,46	10,05	$10,41 \pm 0,35$
Kloroform	1458,13	1404,55	1387,37	$1416,68 \pm 36,9$
Metanol sebelum partisi	194,50	187,77	176,68	$186,31 \pm 9,00$

**Tabel 2.** Aktivitas antioksidan vitamin E dengan metode DPPH.

Kandungan vitamin E ( $\mu\text{g/mL}$ )	Serapan Sampel*	$\bar{X}$ Aktivitas antioksidan (%)	Persamaan garis regresi linier
2,5	0,792	12,43	$y = 6,588x - 4,46$
5,0	0,648	28,28	$r = 0,9995$
7,5	0,505	44,10	$IC_{50} = 8,27 \mu\text{g/mL}$
10	0,343	62,06	$x = \text{konsentrasi vitamin E}$
20	0,116	87,17	$y = \text{aktivitas antioksidan rata-rata vitamin E}$

Keterangan: \* merupakan nilai rata-rata dari 3 kali pengukuran; Serapan kontrol ( $0,904 \pm 0,014$ ).

**Gambar 1.** Mekanisme aksi vitamin E sebagai antiradikal<sup>(12)</sup>.

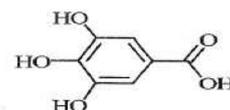
sudah diketahui sebagai antioksidan. Hasil pengukuran antioksidan vitamin E menunjukkan bahwa vitamin E mempunyai nilai  $IC_{50}$  sebesar  $8,27 \mu\text{g/ml}$  (Tabel 2).

Baik fraksi-fraksi metanol-air, etil asetat, dan kloroform atau dengan metanol sebelum dilakukan partisi mempunyai aktivitas antioksidan yang lebih kecil daripada vitamin E. Hal ini dapat diketahui dari nilai  $IC_{50}$  vitamin E yang masih lebih kecil dibandingkan dengan nilai  $IC_{50}$  ketiga fraksi dan ekstrak metanol sebelum dipartisi. Mekanisme vitamin E sebagai antioksidan ditunjukkan oleh Gambar 1.

**Penentuan Kandungan Fenolik Total.** Kandungan fenolik total ditentukan secara spektrofotometri dengan menggunakan pereaksi *Folin Ciocalteu* dengan menggunakan asam galat sebagai baku pembanding. Kandungan fenolik total diekspresikan dengan ekuivalen asam galat (EAG). Struktur molekul asam galat disajikan pada Gambar 2.

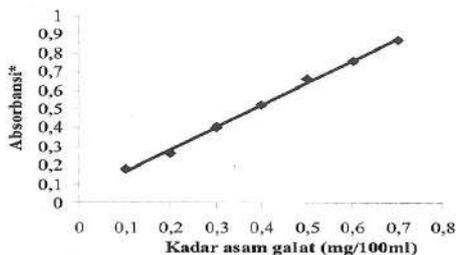
Larutan asam galat (baku pembanding) dengan berbagai konsentrasi dan serapannya pada cahaya ditunjukkan pada Tabel 3.

Hubungan antara kandungan asam galat dan absorbansinya dinyatakan sebagai persamaan  $y = 1,176x + 0,049$  dengan nilai koefisien korelasinya ( $r = 0,9988$ ). Nilai  $r$ -hitung ini lebih besar dari  $r$ -tabel (untuk  $n = 7$ ;  $P = 0,95$  sebesar  $0,775$ ); sehingga persamaan regresi linier di atas dapat digunakan untuk menghitung kandungan fenolik total baik dalam ekstrak etil asetat maupun ekstrak kloroform serta fraksi-fraksinya.

**Gambar 2.** Struktur kimia asam galat<sup>(6)</sup>.

Tabel 3. Berbagai konsentrasi larutan asam galat dan serapannya pada  $\lambda$  750 nm setelah bereaksi dengan pereaksi Folin Ciocalteu dalam suasana basa.

Konsentrasi Asam galat (mg/100 ml)	Serapan	Persamaan regresi linier
0,1004	0,179	$y = 1,176x + 0,049$ $r = 0,9988$ $x =$ Kandungan asam galat (mg/100 ml) $y =$ Absorbansi
0,2008	0,265	
0,3012	0,401	
0,4016	0,522	
0,5020	0,657	
0,6024	0,756	
0,7028	0,868	



Gambar 3. Kurva baku asam galat untuk menghitung kandungan fenolik total.

Persamaan regresi linier yang diperoleh pada Tabel 3 disajikan sebagai kurva baku asam galat (Gambar 3). Penentuan kandungan fenolik total dengan pereaksi ini digunakan panjang gelombang serapan maksimum 750 nm dan operating time 90 menit.

Operating time adalah jeda waktu yang diperlukan sebelum mengukur serapan sampel setelah terjadi pembentukan warna. Pada operating time ini absorbansi yang dihasilkan relatif stabil.

Penentuan kandungan fenolik total bertujuan untuk melihat korelasi antara aktivitas antioksidan dengan kandungan fenolik totalnya. Kandungan senyawa fenolik total diekspresikan dengan % b/b ekuivalen asam galat (% b/b EAG). Asam galat (Gambar 6) merupakan asam dengan 3 gugus hidroksi fenolik sehingga dapat digunakan sebagai senyawa baku pembandingan untuk menetapkan kandungan senyawa fenolik total. Selain itu, asam galat tersedia dalam kemurnian yang tinggi, stabil, dan harganya yang relatif lebih murah<sup>(9)</sup>. Hasil penentuan kandungan fenolik total fraksi dan ekstrak Buah Merah disajikan pada Tabel 4.

Dari Tabel 4 dapat diketahui bahwa fraksi etil asetat mempunyai kandungan fenolik total yang paling besar diantara fraksi/ekstrak uji. Hasil ini sejalan dengan aktivitas antioksidannya. Gambar 4 adalah grafik yang menunjukkan hubungan antara aktivitas antioksidan (diekspresikan dengan nilai  $IC_{50}$ ) fraksi dan ekstrak Buah Merah dengan kandungan fenolik totalnya.

Hubungan antara kandungan fenolik total (x)

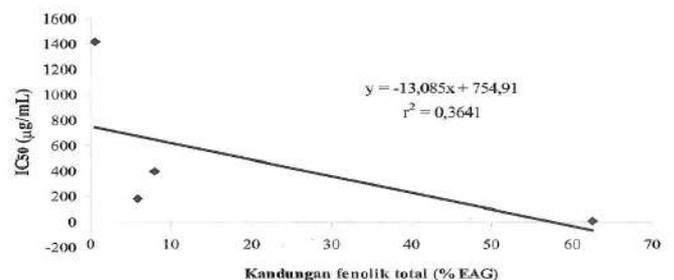
Tabel 4. Kandungan fenolik total ekstrak Buah Merah, dihitung sebagai % b/b ekuivalen asam galat (% b/b EAG).

Ekstrak/ Fraksi	Kandungan fenolik total (% b/b EAG)			$\bar{X} \pm SD$
	1	2	3	
Air	7,87	7,89	8,30	$8,02 \pm 0,24$
Etil asetat	61,04	62,58	63,94	$62,52 \pm 1,45$
Kloroform	0,46	0,50	0,52	$0,49 \pm 0,03$
Metanol*	5,87	5,94	6,02	$5,94 \pm 0,08$

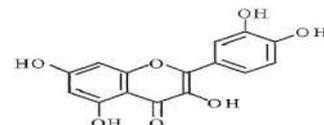
dengan  $IC_{50}$  (y) fraksi/ekstrak mempunyai koefisien korelasi  $r^2 = 0,3641$ , ( $y = -13,085x + 754,91$ ) (Gambar 4). Hasil ini menunjukkan bahwa 36,41% aktivitas antioksidan buah merah merupakan hasil kontribusi dari senyawa-senyawa fenolik<sup>(10)</sup>. Senyawa-senyawa fenolik telah dilaporkan mempunyai aktivitas antioksidan karena sifat redoksnya. Senyawa fenolik berperan sebagai agen pereduksi, pemberi hidrogen, peredam oksigen *singlet*, dan juga sebagai pengkelat logam yang potensial<sup>(11)</sup>.

**Penentuan Kandungan Flavonoid Total.** Penentuan kandungan flavonoid total yang dilakukan secara spektrofotometri dan diekspresikan dengan % b/b ekuivalen kuersetin (% b/b EK) bertujuan untuk mengetahui hubungan antara aktivitas antioksidan dengan kandungan flavonoidnya. Struktur molekul kuersetin dilukiskan pada Gambar 5.

Larutan kuersetin (baku pembandingan) dalam etanol dengan berbagai konsentrasi dan serapannya pada  $\lambda$  510 setelah direaksikan dengan pereaksinya, ditunjukkan pada Tabel 5. Dari data tersebut diperoleh persamaan regresi linier  $y = 0,856x + 0,055$ ; dengan nilai koefisien korelasinya ( $r$ -hitung = 0,995). Nilai  $r$ -hitung ini lebih besar daripada nilai  $r$ -tabel (untuk  $n = 8$ ;  $P = 0,05$ ; sebesar 0,775), sehingga persamaan di atas dapat



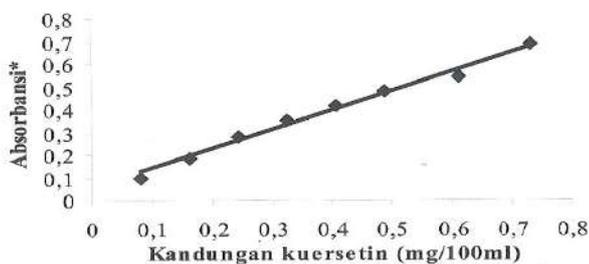
Gambar 4. Hubungan antara kandungan fenolik total fraksi/ekstrak Buah Merah dengan nilai  $IC_{50}$ -nya.



Gambar 5. Struktur kimia kuersetin<sup>(12)</sup>.

Tabel 5. Kandungan kuersetin dengan serapannya diukur pada  $\lambda$  510 nm setelah direaksikan dengan  $AlCl_3$  dalam suasana basa (NaOH).

Kandungan kuersetin (mg/100 ml)	Serapan	Persamaan regresi linier
0,0816	0,100	$y = 0,856x + 0,055$ $r = 0,995$ $x =$ Kandungan kuersetin (mg/100 ml) $y =$ Serapan
0,1632	0,188	
0,2448	0,284	
0,3264	0,353	
0,4080	0,417	
0,4896	0,484	
0,6120	0,548	
0,7344	0,685	



Gambar 6. Kurva baku kuersetin untuk menghitung kandungan flavonoid total. (\* Absorbansi kuersetin setelah direaksikan dengan  $AlCl_3$  dalam suasana basa (NaOH) dan diukur pada  $\lambda$  510 nm).

mendukung hasil penentuan aktivitas antioksidan fraksi-fraksi dan ekstrak metanol, yang menunjukkan bahwa aktivitas antioksidan ekstrak etil asetat paling tinggi diantara fraksi dan ekstrak Buah Merah yang diuji.

Gambar 8 adalah grafik yang menyatakan hubungan antara kandungan flavonoid total dengan aktivitas antioksidan yang diekspresikan dengan nilai  $IC_{50}$  fraksi/ekstrak Buah Merah.

Hubungan antara kandungan flavonoid total (x) dengan nilai  $IC_{50}$  (y) fraksi-fraksi dan ekstrak metanol sebelum dipartisi mempunyai koefisien korelasi  $r^2 = 0,4484$ , ( $y = -282,9x + 868,05$ ) (Gambar 8). Hasil ini menunjukkan bahwa 44,84% aktivitas antioksidan merupakan hasil kontribusi dari flavonoid, sedangkan 55,16% yang lain berasal dari senyawa lain selain flavonoid.

Flavonoid dapat beraksi sebagai antioksidan dengan menangkap radikal bebas melalui pemberian atom hidrogen pada radikal tersebut.

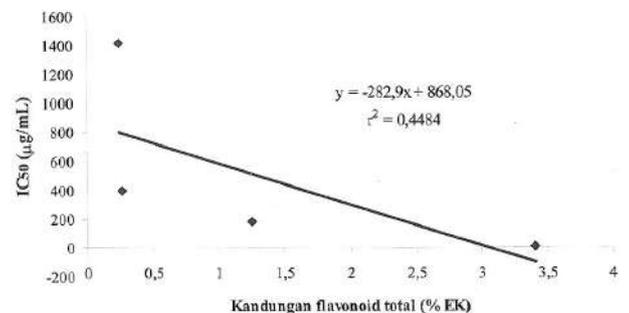
Kemampuan flavonoid untuk menangkap radikal DPPH dilukiskan sebagai reaksi yang tertera pada Gambar 9. Radikal fenoksi flavonoid ini distabilkan oleh delokalisasi elektron yang tidak berpasangan di sekitar cincin aromatis. Stabilitas radikal fenoksi flavonoid ( $RO\cdot$ ) akan mengurangi kecepatan perambatan (propagasi) autooksidasi reaksi berantai<sup>(13)</sup>. Bentuk stabilisasi radikal fenoksi flavonoid dilukiskan sebagai reaksi kesetimbangan pada Gambar 10.

digunakan untuk menghitung kandungan polifenol total baik dalam ekstrak etil asetat maupun fraksi-fraksinya. Kurva baku kuersetin disajikan pada Gambar 6.

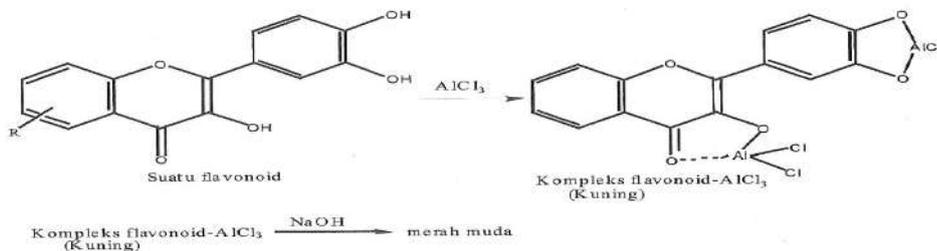
Dasar penentuan kandungan flavonoid secara spektrofotometri ini adalah adanya kemampuan flavonoid untuk membentuk kompleks dengan  $AlCl_3$  membentuk warna kuning, yang kemudian bereaksi dengan basa kuat (NaOH) membentuk warna merah muda yang diukur absorbansinya pada  $\lambda$  510 nm. Reaksi yang terjadi disajikan pada Gambar 7.

Hasil penentuan kandungan flavonoid total fraksi dan ekstrak Buah Merah disajikan pada Tabel 6.

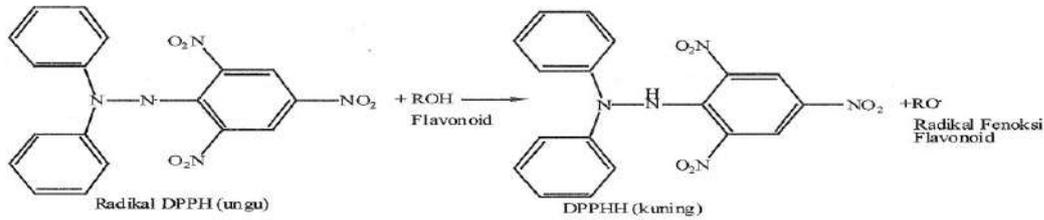
Urutan kandungan flavonoid total yang paling tinggi adalah: fraksi etil asetat > ekstrak metanol sebelum dipartisi > fraksi metanol-air > fraksi kloroform. Data ini



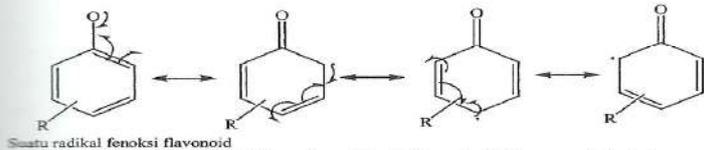
Gambar 8. Hubungan antara kandungan flavonoid total fraksi/ekstrak Buah Merah dengan nilai  $IC_{50}$  aktivitas antioksidan.



Gambar 7. Reaksi yang terjadi dalam penentuan kandungan flavonoid total dengan pereaksi  $AlCl_3$  dalam suasana basa (NaOH)<sup>(12)</sup>.



**Gambar 9. Reaksi antara radikal DPPH dengan flavonoid<sup>(12)</sup>.**



**Gambar 10. Stabilisasi radikal fenoksi flavonoid oleh resonansi<sup>(13)</sup>.**

### SIMPULAN

Penentuan aktivitas antioksidan buah merah dilakukan dengan metode penangkapan radikal DPPH. Nilai  $IC_{50}$  ekstrak metanol fraksi air, fraksi etil asetat, dan fraksi kloroform, masing-masing sebesar 399,06  $\mu\text{g/mL}$ , 10,41  $\mu\text{g/mL}$ , 1416,68  $\mu\text{g/mL}$  dan 186,31  $\mu\text{g/mL}$ . Hubungan antara kandungan fenolik total fraksi/ekstrak buah merah dengan nilai  $IC_{50}$ -nya mempunyai persamaan regresi linier  $y = -13,085x + 754,91$  dengan koefisien korelasi  $r^2 = 0,3641$ . Hal ini menunjukkan bahwa senyawa-senyawa fenolik yang terdapat dalam buah merah berkontribusi sebesar 36,41% terhadap aktivitas antioksidannya. Hubungan antara kandungan flavonoid total fraksi/ekstrak buah merah dengan  $IC_{50}$ -nya mempunyai persamaan regresi linier  $y = -282,9x + 868,05$  dengan koefisien korelasi  $r^2 = 0,4484$ ; dengan Hal ini menunjukkan bahwa senyawa-senyawa flavonoid yang terdapat dalam buah merah berkontribusi sebesar 44,84% terhadap aktivitas antioksidannya.

### DAFTAR PUSTAKA

1. Supriadi,dkk. Tumbuhan Obat Indonesia: Penggunaan dan Khasiatnya. Edisi 1. Jakarta: Pustaka Populer Obor;

2001. 11-4.  
 2. Departemen Kesehatan RI. Pedoman Pelaksanaan Uji Klinik Obat Tradisional. Edisi 1. Jakarta; 2000.1-22.  
 3. Budi M, dan Paimin FR. Buah Merah. Jakarta: Penebar Swadaya; 2004. 3-26, 47-56, 67-8.  
 4. Pokorni J, Yanishlieva N, and Gordon M. Antioxidant in Food: Practical Applications. New York: RC Press; 2001  
 5. Brigelius-Flohe R, Traber MG. Vitamin E : Function and Metabolism. The FASEB Journal.1999.13: 1145-55.  
 6. Prior RL, Wu X and Schaich K. Standardized methods for the determination of antioxidant capacity and phenolics in foods and dietary supplements. J Agric Food Chem 2005. 55:2698A-J.  
 7. Chun OK, Kim DO, and Lee CY. Superoxide Radical Scavenging Activity of The Major Polyphenols in Fresh Plums. J Agric Food Chem. 2003.51:8067-72.  
 8. Zou Y, Lu Y and Wei D. Antioxidant activity of Flavonoid-rich extract of Hypericum perforatum L in vitro. J Agric Food Chem. 2004. 52:5032-9.  
 9. Mongkolsilp M, Pongbupakit I, Sae-Lee N, and Sitthithaworn W. Radical scavenging activity and total phenolic content of medicinal plants used in primary health care. SWU. J Pharm. Sci. 2004. 9:32-5.  
 10. Javanmardi J, Stushnoff C, Locke E, and Vivanco JM. Antioxidant activity and total phenolic content of Iranian Ocimum accessions. J. Food Chem. 2003. 83:547-50.  
 11. Kahkonen MP, Hopia AI, Vuorela HJ, Rauha JP, Pihlaja K, Kujala TS, and Heinonen M. Antioxidant activity of extracts containing phenolic compounds. J Agric Food Chem.1999. 47:3954-62.  
 12. Amic DD, Beslo D, and Trinajstic. Structure-radical scavenging activity relationship of flavonoids. Croatia Chem Acta. 2003.76 (1):55-61.  
 13. Hudson BJF. Food antioxidants. London and New York Elsevier Applied Science. 990:1-8