

**ANALISIS FENOL TOTAL DAN UJI AKTIVITAS ANTIOKSIDAN DARI EKSTRAK BUAH SENTUL (*Sandoricum koetjape* Merr.)****Faizul Bayani**

Dosen D3 Farmasi STIKES Qamarul Huda Bagu

E-mail: faizulbayani0@gmail.com

**ABSTRAK:** Sentul fruit (*Sandoricum koetjape* Merr.) is representing one kind of fruit that is amount enough abundance at West Nusa Tenggara, but it hasn't been exploited in an optimal fashion and more castaway useless. Parts of sentul plant have been applied as traditional medicine. Sentul fruit can be oxidated by browning reaction when it is pared or sliced, these symptoms shown the existences of phenolic compounds so that very potential as antioxidant. To analyse total phenolic and antioxidant activity of methanol extract of sentul fruit, the Folin-Ciocalteu and DPPH methods have been used. Results of analysis for three treatment types of sampels ( A, B, and C) shown their total phenolic: 6,9 %, 12,86 %, and 9,36 % respectively and also their antioxidant activity shown by values of IC<sub>50</sub> of eachs: 43,36 ppm (1/IC<sub>50</sub> = 0,023 ppm<sup>-1</sup>); 40,53 ppm (1/IC<sub>50</sub> = 0,025 ppm<sup>-1</sup>); and 44,43 ppm (1/IC<sub>50</sub> = 0,0225 ppm<sup>-1</sup>) respectively. These results indicated that sentul fruit is very potensial as antioxidant.

**Keywords:** *Sandoricum koetjape* Merr., phenolic compound, Antioxidant, DPPH method, Folin-Ciocalteu method

**Abstrak:** Buah *sentul* (*Sandoricum koetjape* Merr.) merupakan salah satu jenis buah yang jumlahnya cukup melimpah di Nusa Tenggara Barat namun belum dimanfaatkan secara optimal dan lebih banyak terbuang sia-sia. Bagian-bagian dari tumbuhan *sentul* telah banyak digunakan sebagai obat tradisional. Buah *sentul* dapat mengalami reaksi pencokelatan bila dikupas atau diiris, gejala ini menunjukkan adanya senyawa fenolik sehingga sangat potensial sebagai antioksidan. Untuk menganalisis fenolik total dan aktivitas antioksidan buah *sentul*, dilakukan pengujian dengan metode Folin-Ciocalteu dan metode DPPH terhadap ekstrak metanolnya. Hasil pengujian terhadap tiga jenis perlakuan sampel (A, B, dan C) menunjukkan kadar fenolik total berturut-turut 6,9 %, 12,86 %, dan 9,36 % serta aktivitas antioksidannya ditunjukkan oleh nilai IC<sub>50</sub> masing-masing sebesar 43,36 ppm (1/IC<sub>50</sub> = 0,023 ppm<sup>-1</sup>); 40,53 ppm (1/IC<sub>50</sub> = 0,025 ppm<sup>-1</sup>); dan 44,43 ppm (1/IC<sub>50</sub> = 0,0225 ppm<sup>-1</sup>). Hasil ini menunjukkan bahwa buah *sentul* berpotensi sebagai antioksidan.

**Kata Kunci:** *Sandoricum koetjape* Merr., Senyawa Fenolik, Antioksidan, Metode DPPH, Metode Folin-Ciocalteu

**PENDAHULUAN**

Buah Sentul (*Sandoricum koetjape* (Burm.f.) Merr.) dikenal juga dengan sebutan buah *Kecapi*, buah *Sentol*, *Wild Mangosteen* (Inggris), *Santor* (Filifina) atau buah *Ketuat* adalah nama sejenis pohon dan buah. Buah *Sentul* diperkirakan berasal dari Indocina dan Semenanjung Malaya. Berabad-abad yang silam, tumbuhan ini dibawa dan dimasukkan ke India, Indonesia (Borneo, Maluku), Mauritius, dan Filipina, dimana tanaman buah ini kemudian menjadi populer, ditanam secara luas dan mengalami naturalisasi (Morton, 1987).

Buah *Sentul* bulat agak gepeng, 5-6 cm, kuning atau kemerahan jika masak, dan berbulu halus seperti beludru. Daging buah bagian luar tebal dan keras, menyatu dengan kulit, kemerahan, agak masam; daging buah bagian dalam lunak berair, melekat pada biji, putih, dan berasa masam sampai manis. Jumlah biji 2-5

butir, besar, bulat telur agak pipih, coklat kemerahan berkilat; keping biji berwarna merah (Morton, 1987). Warna dari buah-buahan maupun produk buah dapat dikaitkan dengan kandungan senyawa fenoliknya (Mazza dan Miniati, 1993).

Tutupoho (1988) melaporkan bahwa daun, batang, dan akar pohon *Sentul* mengandung saponin, flavonoida, dan polifenol. Secara tradisional, serbuk kulit batangnya berkhasiat untuk pengobatan cacing gelang. Akar dan daunnya berkhasiat sebagai obat keputihan, obat mulas, obat batuk, penurunan demam, obat kembung, sakit perut, diare, dan untuk penguat tubuh wanita setelah melahirkan.

Penelitian pendahuluan terhadap kandungan kimia kulit dan daging buah *Sentul* muda telah berhasil diidentifikasi adanya senyawa fenolik dan alkaloid dalam ketiga ekstrak: petrolium eter, kloroform, dan

metanolnya (Tutupoho, 1988). Senyawa fenolik memiliki manfaat cukup besar, utamanya sebagai senyawa antioksidan. Terkait dengan aktivitas antioksidannya, senyawa fenolik dan ekstrak buah-buahan telah dilaporkan memiliki efek positif terhadap pencegahan kanker, penyakit kardiovaskular, sistem kekebalan tubuh, infeksi mikroba, penyakit neurodegeneratif, dan infeksi virus/peradangan (Macheix *et al.*, 1990; Duarte *et al.*, 1993; Papas, 1999; Le-Marchand *et al.*, 2000; Xu *et al.*, 2000; Disilvestro, 2001). Hasil studi epidemiologi juga menunjukkan bahwa konsumsi buah dan sayuran dengan kandungan senyawa fenolik tinggi yang berfungsi sebagai antioksidan seperti vitamin C, A, dan E, serta senyawa polifenol dapat menekan terjadinya penyakit jantung koroner, diabetes, hipertensi, stroke, kanker, dan penyakit alzheimer (Lako, 2007).

Hal cukup menarik bahwa bila daging buah *Sentul* diiris, maka bagian tersebut seketika menjadi berwarna coklat. Fenomena ini relevan dengan pernyataan Shahidi dan Nacz (1995) bahwa reaksi pencoklatan enzimatis dapat terjadi dalam masa pematangan atau akibat gangguan (pengirisan) terhadap buah-buahan dan sayur-sayuran yang mengandung senyawa fenolik. Reaksi pencoklatan ini terkait dengan terjadinya oksidasi senyawa fenolik dengan katalis enzim polifenol oksidase menghasilkan senyawa berwarna kecoklatan.

Akhir-akhir ini penggunaan senyawa antioksidan berkembang dengan pesat baik untuk makanan dan pengobatan. Penggunaan sebagai obat makin berkembang seiring dengan makin bertambahnya pengetahuan tentang aktivitas radikal bebas terhadap beberapa penyakit degeneratif seperti penyakit jantung dan kanker (Boer, 2000). Sementara penelitian tentang buah *Sentul* baru hanya mengidentifikasi adanya senyawa fenolik dalam daging buah muda dan belum sampai menganalisis total fenolik dan aktivitas antioksidannya. Hal ini mendorong peneliti untuk melakukan analisis lebih lanjut terhadap total fenol dan aktivitas antioksidan buah *Sentul* dengan tujuan mengoptimalkan nilai manfaatnya terutama dalam bidang kesehatan sehingga dapat ditingkatkan penggunaannya sebagai obat fitofarmaka. Penelitian ini difokuskan untuk mencari jawaban atas beberapa pertanyaan mengenai karakteristik kimiawi buah *Sentul* serta khasiatnya sebagai obat fitofarmaka yang secara tradisional telah banyak dimanfaatkan masyarakat luas.

## METODOLOGI PENELITIAN

### 1. Jenis Penelitian

Penelitian ini telah dilaksanakan selama kurang lebih empat bulan di Laboratorium Seksi Kimia Analitik Universitas Mataram. Penelitian ini bersifat deskriptif, dimana setiap pengamatan dilakukan pencatatan terhadap objek yang diperlukan.

### 2. Rancangan Penelitian

Penelitian ini telah dilaksanakan selama kurang lebih empat bulan di Laboratorium Seksi Kimia Analitik Universitas Mataram. Penelitian ini bersifat deskriptif, dimana setiap pengamatan dilakukan pencatatan terhadap objek yang diperlukan.

### 3. Sampel Penelitian

Sampel penelitian ini adalah daging buah *Sentul* yang sudah matang. Sampel diambil secara langsung dari perkebunan rakyat di Dusun Bengkaung Desa Lembahsari Kabupaten Lombok Barat.

### 4. Instrumen Penelitian

Alat-alat yang digunakan dalam penelitian ini adalah alat-alat gelas yang biasa digunakan di Laboratorium, inkubator, evaporator, sentrifuge, blender dan seperangkat spektrofotometer. Sedangkan bahan-bahan yang digunakan adalah buah *Sentul*, metanol, larutan  $\text{Na}_2\text{CO}_3$ , reagen folin ciocalteu, Larutan  $\text{FeCl}_3$ , Reagen Milon, larutan fenol, air bebas ion, aquades, asam askorbat, dan DPPH.

### 5. Teknik Pengumpulan Data

#### *Persiapan Sampel/Ekstrak*

Buah *Sentul* dipetik secara langsung dari perkebunan di Dusun Bengkaung Tengah Desa Lembahsari Kecamatan Batulayar Kabupaten Lombok Barat Provinsi Nusa Tenggara Barat. Ekstrak daging buah *Sentul* akan disiapkan dengan tiga jenis perlakuan, yaitu:

- Sampel A = buah *sentul* diiris yang terlebih dahulu dikeringkan dengan pengeringan matahari kemudian dimaserasi dengan methanol 80% dan dievaporasi untuk mendapatkan ekstrak kental lalu diangin-anginkan diruang ber-AC hingga kering.
- Sampel B = buah *sentul* segar diiris yang langsung direndam dengan methanol 80%, dihaluskan dengan blender, dan dimaserasi dengan methanol 80% dan dievaporasi untuk mendapatkan ekstrak kental lalu diangin-anginkan diruang ber-AC hingga kering
- Sampel C = buah *sentul* diiris yang terlebih dahulu dikeringkan dengan pengeringan matahari kemudian diekstrak menggunakan ekstraktor soxhlet dengan methanol 80% dan dievaporasi untuk mendapatkan ekstrak

kental lalu diangin-anginkan diruang ber-AC hingga kering.

Penyiapan Pelarut dan ketiga jenis sampel uji dilakukan sebagai berikut:

1. Penyiapan Pelarut

Pelarut yang digunakan adalah larutan methanol 80%. Metanol murni diperoleh dengan cara mendestilasi ulang methanol teknis yang ada dilaboratorium. Kemudian dari methanol hasil destilasi tersebut dibuat larutan methanol 80%

2. Penyiapan sampel A

Sebanyak 4.500 gram daging kulit dan kulit buah sentul segar yang sudah diiris dikeringkan di bawah sinar matahari selama 20 jam 16 menit selama 3 hari dengan rata-rata penjemuran 6 jam 45 menit perhari hingga kadar airnya berkurang 80,89%. Hasil pengeringan diblender hingga berukuran 2 mm. sebanyak 100 gram sampel yang sudah diblender dimaserasi dengan 1000 mL methanol 80% selama 3 x 24 jam hingga dipastikan proses ekstraksi optimal. Larutan sampel-methanol 80% disaring dengan kertas saring wathman kemudian pelarut diuapkan dengan evaporator pada suhu 60°C – 65°C. Ekstrak kental yang diperoleh kemudian didiamkan dalam ruangan ber-AC selama 24 jam. Ekstrak kental disimpan dalam pendingin hingga waktu pengujian dilakukan.

3. Penyiapan sampel B

Sampel B disiapkan dengan mengiris kecil-kecil buah sentul segar dan seketika dimasukkan kedalam metanol 80% untuk mencegah oksidasi langsung. Sampel kemudian diblender dan sebanyak 75 gram sampel dimaserasi dengan 750 mL metanol 80% selama 2x 24 jam hingga ekstraksi optimal. Ekstrak metanol-sampel disaring dengan kertas saring wathman kemudian dievaporasi untuk mengeluarkan pelarut dari sampel. Ekstrak kental yang diperoleh selanjutnya didiamkan dalam ruangan ber-AC selama 24 jam. Ekstrak kental disimpan di lemari pendingin sampai waktu pengukuran dilakukan.

4. Penyiapan sampel C

Sebanyak 75 gram hasil blender sampel A yang berbentuk serbuk (butiran halus) dimasukkan ke dalam Soxhlet. Sebagai pelarutnya digunakan metanol 80% sebanyak 250 mL. Proses ekstraksi dilakukan sebanyak 7 siklus hingga dipastikan ekstraksi optimal. Ekstrak metanol-sampel yang diperoleh kemudian dievaporasi untuk menguapkan pelarut dan diperoleh ekstrak kental sampel. Ekstrak

kental sampel dibiarkan selama 24 jam dalam ruangan ber-AC hingga diperoleh ekstrak kental sebesar 11,18 gram kemudian disimpan dalam lemari pendingin hingga waktu pengujian dilakukan.

**Analisis Kuantitatif Total Fenol**

Untuk mengukur kadar fenol dalam daging buah sentul digunakan metode analisa total fenol menurut Vermerris dan Ralph (2006: 152) setelah dimodifikasi. Disiapkan sampel uji sebagai berikut:

- Sebanyak 0,5 gram sampel A dilarutkan dengan air sampai volumenya 50 mL. 50  $\mu$ L larutan induk diencerkan dengan air hingga volumenya 1 mL. Larutan hasil pengenceran ini diuji dengan reagen folin ciocalteu.
- Sebanyak 0,1 gram sampel B dilarutkan dengan air sampai volumenya 50 mL. 250  $\mu$ L larutan induk diencerkan dengan air hingga volumenya 1 mL. Larutan hasil pengenceran diuji dengan reagen folin ciocalteu.
- Sebanyak 0,1 gram sampel C dilarutkan dengan air sampai volumenya 50 mL. 250  $\mu$ L larutan induk diencerkan dengan air hingga volumenya 1 mL. Larutan hasil pengenceran diuji dengan reagen folin ciocalteu.

Tahapan pengujian total fenol dilakukan sebagai berikut:

- a. Sebanyak 150  $\mu$ L sampel uji A, B, dan C diatas masing-masing dimasukkan ke dalam tabung reaksi
- b. Menambahkan 3 mL larutan  $\text{Na}_2\text{CO}_3$  2% ke tabung reaksi yang telah disiapkan pada langkah (a) di atas dan dibiarkan selama 5 menit.
- c. Menambahkan 150  $\mu$ L Reagen Folin Ciocalteu (yang dilarutkan dalam air bebas ion dengan perbandingan 1:10 gr/mL) dan diinkubasi dalam inkubator selama 45 menit.
- d. Sampel dihomogenisasi dan diukur absorbansinya.

Sedangkan pengujian total fenol untuk larutan standar dilakukan dengan tahapan sebagai berikut:

- a. Membuat larutan induk fenol 1678 ppm
- b. Dari langkah (a) dibuat larutan dengan variasi konsentrasi 20 ppm, 30 ppm, 40 ppm, 50 ppm, dan 60 ppm.
- c. Melanjutkan prosedur seperti perlakuan sampel (mulai dari poin b sampai poin d).

Kurva kalibrasi larutan standar dibuat dengan mengalurkan nilai absorbansi terhadap konsentrasi larutan standar. Dari kurva standar, ditentukan persamaan regresi linier yang

mempunyai bentuk umum  $Y = aX$  (Sembiring, 1995).

**Analisis Kualitatif Fenol**

Analisis kualitatif ini bertujuan untuk mengetahui apakah di dalam ekstrak buah *Sentul* terdapat senyawa fenol dengan indikator perubahan warna secara spesifik. Analisis kualitatif ini dapat dilakukan menggunakan beberapa uji, antara lain:

➤ **Uji Millon**

Sebanyak 5 mL larutan sampel ditambahkan 1 mL pereaksi Millon, diamati perubahan warna yang terjadi. Pembentukan endapan putih yang jika dipanaskan berwarna merah berarti reaksi positif yang menunjukkan adanya senyawa fenolik (Poedjiadi, 1994 dan Kurnia, 1981).

➤ **Uji Kualitatif Fenol dengan FeCl<sub>3</sub>**

Cara klasik untuk mendeteksi senyawa fenol sederhana ialah dengan menambahkan 1 mL larutan FeCl<sub>3</sub> (Besi(III)klorida) 1% dalam air atau etanol dengan 5 mL larutan ekstrak, yang menimbulkan warna hijau, merah, ungu, biru, atau hitam yang kuat (Harbone, 2006 dan Vermerris dan Ralph, 2006), hijau kehitaman, dan biru kehitaman (Andayani, Djekti, dan Hakim, 2009).

**Penentuan Aktivitas Antioksidan**

Penentuan Aktivitas antioksidan ekstrak buah *Sentul* menggunakan metode DPPH mengacu pada metode Ebrahimzadeh *et al.* (2008), Green (2007), Elmastas *et al.* (2006), dan Molyneux (2004) yang telah dimodifikasi. Tahapan uji aktivitas antioksidan adalah:

- Sebanyak 13 mg DPPH dilarutkan dalam 10 mL larutan metanol 80% kemudian disimpan sebagai larutan stock.
- Sebanyak 75 µL larutan stock dimasukkan dalam 3 mL larutan metanol 80% (metanol sebagai blanko) kemudian absorbansinya diukur pada berbagai panjang gelombang dengan spektrofotometer UV-Vis untuk mengetahui  $\lambda_{maksimum}$  larutan tersebut.  $\lambda_{maksimum}$  yang diperoleh sebesar 515 nm.
- Sampel uji dengan pengenceran hingga 500 ppm (larutan sampel A, B, dan C) yang

disiapkan pada pengujian total fenol di atas, masing-masing diencerkan kembali dengan variasi pengenceran masing-masing 20 ppm, 30 ppm, 40 ppm, 50 ppm, 60 ppm, 70 ppm, 80 ppm dan 90 ppm.

- Sebanyak 3 mL larutan-larutan di atas (point c) diambil dan masing-masing ditambahkan dengan 75 µL larutan stock DPPH. Setelah 30 menit Absorbansi larutan diukur pada panjang gelombang maksimum 515 nm.
- Asam askorbat (vitamin C) digunakan sebagai kontrol positif dibuat dengan variasi konsentrasi 2 ppm, 3 ppm, 4 ppm, 5 ppm, 6 ppm, 7 ppm, 8 ppm dan 9 ppm. Masing-masing diperlakukan seperti perlakuan sampel.

Kemampuan radikal bebas DPPH dihitung dengan persamaan: (Elmastas *et al.*, 2006):

$$\% \text{ DPPH} = [(A_0 - A_1/A_0) \times 100]$$

Di mana  $A_0$  adalah absorbansi blanko dan  $A_1$  adalah absorbansi sampel ekstrak daging buah *Sentul*.

Kurva dari persen DPPH yang dialurkan terhadap konsentrasi untuk masing-masing sampel dibuat dan konsentrasi inhibisi radikal 50% ( $IC_{50}$ ) ditentukan dari persamaan regresi linier dengan koefisien korelasi  $\geq 0,91$ . Nilai  $1/IC_{50}$  menunjukkan aktivitas antioksidan dari sampel. Nilai  $1/IC_{50}$  yang lebih besar akan memiliki aktivitas anti radikal yang lebih tinggi (Green, 2007 dan Molyneux, 2004).

**HASIL DAN PEMBAHASAN**

**Deskripsi Data**

Berdasarkan pada keseluruhan proses yang telah dilakukan dalam penelitian, mulai dari penyiapan ekstrak sampel hingga ke tahap analisis, maka dalam bagian ini peneliti akan menyuguhkan segala informasi dan data yang didapat sebagai berikut:

**Data Hasil Ekstraksi Sampel**

Hasil ekstrak sampel untuk ketiga jenis perlakuan (A, B, dan C) proses ekstraksi adalah sebagai berikut:

**Tabel 1.** Ringkasan data hasil penyiapan ekstrak sampel dengan Metanol 80% dengan perbandingan pelarut 1:10 gram/mL

JENIS IDENTIFIKASI	JENIS SAMPEL	TOTAL	PERSEN
Berat Segar	Sampel A dan C	4.500 gram	-
	Sampel B	75 gram	-
Berat Kering	Sampel A dan C	860 gram	19,11%
	Sampel B	-	-
Ekstrak Kental	100 gram sampel A	19,97 gram	19,97%
	75 gram sampel B	16,37 gram	21,83%
	75 gram sampel C	11,18 gram	14,91%

Tabel di atas menunjukkan bahwa pengeringan sampel A dan C dilakukan sampai dengan pengurangan kadar air sebesar 80,89%. Hasil ekstrak terbesar dimiliki oleh sampel B diikuti sampel A dan terendah sampel C.

**Hasil Uji Kualitatif Fenolik**

Untuk mendeteksi kandungan senyawa fenolik dalam ekstrak sampel secara kualitatif digunakan 2 (dua) jenis reaksi kimia sederhana, yaitu:

❖ **Reagen Milon**

Hasil uji reagen Milon diberikan dalam Tabel berikut:

Tabel 2. Perubahan warna larutan setelah sampel direaksikan dengan reagen Milon

No.	Jenis sampel	Perubahan warna setelah reaksi
1.	Sampel dengan pengenceran 1000 ppm	Cokelat kekuningan dan Endapan saat dipanaskan menjadi merah
2.	Sampel dengan pengenceran 20.000 ppm	Cokelat muda dan endapan saat dipanaskan menjadi merah

Berdasarkan analisa terhadap perubahan warna larutan yang terjadi saat dan setelah reaksi dilakukan dengan reagen Milon, maka dapat disimpulkan bahwa ekstrak sampel memiliki kandungan senyawa fenolik.

❖ **Reagen FeCl<sub>3</sub>**

Hasil uji sampel dengan reagen FeCl<sub>3</sub> dapat dilihat pada Tabel 3 berikut:

Tabel 3. Perubahan warna larutan setelah sampel direaksikan dengan reagen FeCl<sub>3</sub>

No.	Jenis sampel	Perubahan warna setelah reaksi
1.	Sampel dengan pengenceran 1000 ppm	Hijau muda
2.	Sampel dengan pengenceran 20.000 ppm	Hijau kehitaman dan endapan hitam

Tabel 4. Hasil pengukuran absorban larutan ekstrak sampel dengan pengenceran hingga 500 ppm pada panjang gelombang 720 nm dengan Spektroskopi UV-Vis

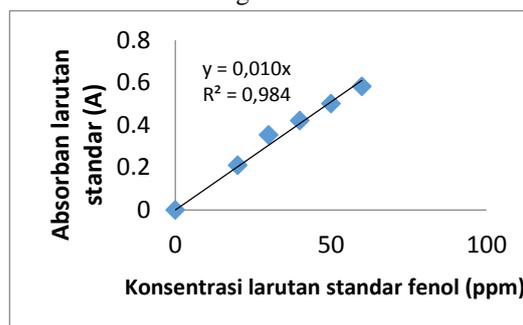
No	Larutan Sampel	Absorban I	Absorban Ulang II	Absorban Ulang III	Rata-Rata
1	A	0,344	0,345	0,347	0,345
2	B	0,641	0,643	0,645	0,643
3	C	0,468	0,468	0,469	0,468

Berdasarkan hasil pengujian tersebut, maka dapat disimpulkan bahwa larutan ekstrak sampel memiliki kandungan senyawa fenolik. Oleh sebab itu lebih lanjut dilakukan pengujian kadar total fenolik secara kuantitatif dan pengujian aktivitas antioksidannya.

**Hasil Uji Kuantitatif Fenolik**

**Penentuan Kurva Kalibrasi Larutan Standar**

Berdasarkan hasil pengukuran absorbansi larutan standar fenol dengan variasi konsentrasi 0 ppm sampai 60 ppm menggunakan spektrofotometer UV-Vis pada panjang gelombang 720 nm dibuat kurva kalibrasi standar sebagai berikut:



Gambar 1. Kurva kalibrasi standar larutan fenol dalam reagen Folin-Ciocalteu pada panjang gelombang 720 nm

Berdasarkan kurva kalibrasi larutan standar di atas diperoleh persamaan regresi linier, yaitu:

$$Y = 0,010 x$$

Dengan demikian didapat hubungan antara konsentrasi dan absorban larutan standar fenol, yaitu:

$$A = 0,010 c$$

**Penentuan Kadar Total Fenolik Ekstrak Sampel**

Metode yang digunakan pada penentuan kadar total senyawa fenolik dalam ekstrak sampel adalah metode Folin-Ciocalteu. Penentuan kadar total fenolik pada ekstrak sampel dilakukan dengan mengukur absorbansi ketiga jenis ekstrak sampel (A, B, dan C) yang diencerkan hingga 500 ppm pada panjang gelombang maksimum 720 nm dengan spektrofotometer UV-Vis. Data yang diperoleh dari pengukuran tersebut adalah sebagai berikut:

Kadar total senyawa fenolik dalam larutan ekstrak sampel didapat dengan mensubstitusikan nilai rata-rata absorban

larutan ekstrak sampel A, B, dan C. Dengan demikian diperoleh data konsentrasi masing-masing dalam Tabel berikut:

Tabel 4.5 Kadar total senyawa fenolik dalam sampel pada panjang gelombang 720 nm dengan Spektroskopi UV-Vis

No	Larutan sampel	Absorban (a)	Konsentrasi (ppm)	Kadar fenolik (mg/kg) sampel
1	A	0,345	34,5	69.000
2	B	0,643	64,3	128.600
3	C	0,468	46,8	93.600

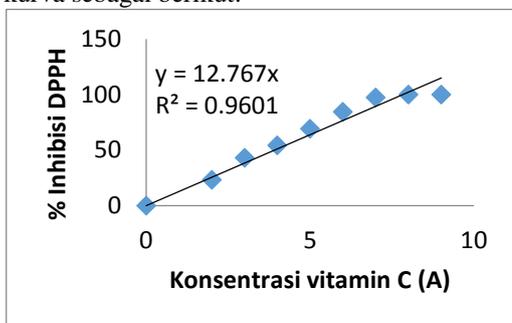
Berdasarkan persamaan (5.2) diperoleh konsentrasi senyawa fenolik ekstrak sampel B (128.600 mg/kg sampel) paling tinggi, diikuti ekstrak sampel C (93.600 mg/kg sampel), dan ekstrak sampel A (69.000 mg/kg sampel) terendah.

**Uji Aktivitas Antioksidan**

Pengujian aktivitas antioksidan dilakukan menggunakan metode DPPH untuk ketiga jenis perlakuan ekstrak sampel dengan pembandingan/kontrol positif larutan vitamin C (asam askorbat). Pengujian dilakukan pada panjang gelombang 515 nm yang merupakan panjang gelombang maksimum DPPH dengan serapan (A) = 0,405. Larutan DPPH berwarna Violet pekat, namun setelah direaksikan dengan sampel dan kontrol selama 30 menit warna larutan berubah menjadi kuning muda. Data hasil pengukuran absorban larutan kontrol dan ketiga jenis ekstrak sampel secara spektroskopis sebagai berikut:

**Aktivitas Antioksidan Vitamin C**

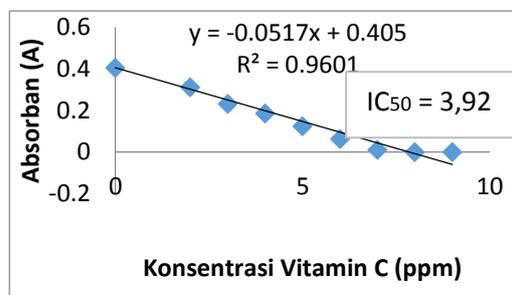
Besarnya aktivitas antioksidan vitamin C dinyatakan dalam persentase inhibisi DPPH dengan variasi konsentrasi larutan vitamin C 0 ppm, 2 ppm, 3 ppm, 4 ppm, 5 ppm, 6 ppm, 7 ppm, 8 ppm, dan 9 ppm terhadap radikal DPPH. Berdasarkan data hasil pengukuran absorban larutan vitamin C dengan metode DPPH pada panjang gelombang 515 nm (Lampiran 6) dibuat kurva sebagai berikut:



Gambar 2. Kurva hubungan absorban vs konsentrasi larutan vitamin C

Kurva di atas menunjukkan bahwa pada saat konsentrasi larutan vitamin C 0 ppm, absorban maksimum yang berarti tidak terjadi reaksi pada DPPH. Pada saat konsentrasi vitamin C bertambah terlihat bahwa absorban DPPH semakin rendah yang berarti semakin banyak DPPH yang habis bereaksi dengan vitamin C hingga semua molekul DPPH habis bereaksi (absorban yang terukur nol), selanjutnya peningkatan konsentrasi vitamin C tidak memberikan pengaruh yang berarti terhadap besarnya absorban yang terukur.

Kekuatan aktivitas antioksidan larutan vitamin C ditunjukkan oleh nilai IC<sub>50</sub>. Nilai ini diperoleh dengan memplotkan kurva hubungan antara % Inhibisi DPPH terhadap konsentrasi larutan vitamin C. Hasil perhitungan tersebut dibuat kurva sebagai berikut:

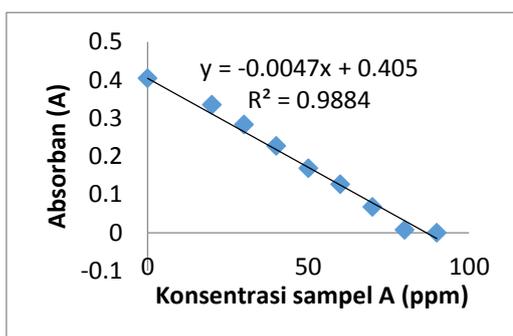


Gambar 3. Kurva aktivitas antioksidan larutan vitamin C

Dari persamaan regresi linier kurva di atas (Y = 12,76x) didapat nilai IC<sub>50</sub> larutan vitamin C sebesar 3,92.

**Aktivitas Antioksidan Ekstrak Sampel A**

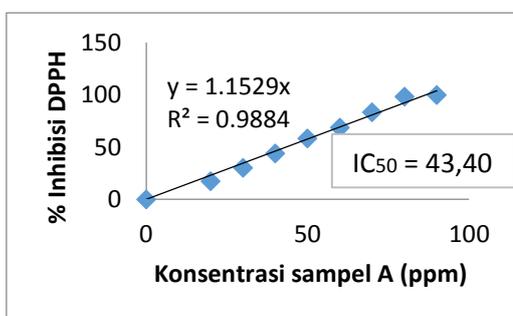
Besarnya aktivitas antioksidan sampel A dinyatakan dalam persentase inhibisi DPPH dengan variasi konsentrasi larutan sampel A 0 ppm, 20 ppm, 30 ppm, 40 ppm, 50 ppm, 60 ppm, 70 ppm, 80 ppm, dan 90 ppm terhadap radikal DPPH. Berdasarkan data hasil pengukuran absorban larutan ekstrak sampel A dengan metode DPPH pada panjang gelombang 515 nm dibuat kurva sebagai berikut:



Gambar 4. Kurva hubungan absorbansi vs konsentrasi ekstrak sampel A

Kurva di atas menunjukkan bahwa pada saat konsentrasi larutan ekstrak sampel 0 ppm, absorbansi maksimum yang berarti tidak terjadi reaksi pada DPPH. Pada saat konsentrasi ekstrak sampel A bertambah terlihat bahwa absorbansi DPPH semakin rendah yang berarti semakin banyak DPPH yang habis bereaksi dengan ekstrak sampel A hingga semua molekul DPPH habis bereaksi (absorbansi yang terukur nol), selanjutnya peningkatan konsentrasi sampel A tidak memberikan pengaruh yang berarti terhadap besarnya absorbansi yang terukur.

Kekuatan aktivitas antioksidan larutan ekstrak sampel A ditunjukkan oleh nilai  $IC_{50}$ . Nilai ini diperoleh dengan memplotkan kurva hubungan antara % Inhibisi DPPH terhadap konsentrasi larutan ekstrak sampel A. Hasil perhitungan tersebut dibuat kurva sebagai berikut:



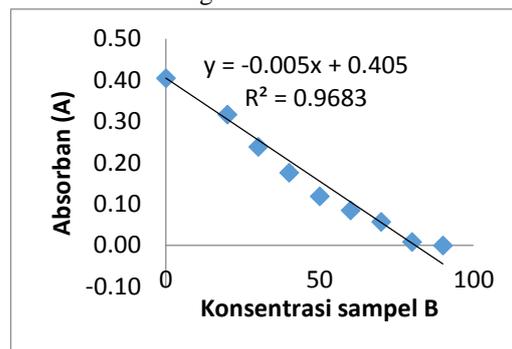
Gambar 5. Kurva aktivitas antioksidan larutan ekstrak sampel A

Dari persamaan regresi linier kurva di atas ( $Y = 1,152x$ ) didapat nilai  $IC_{50}$  larutan sampel A sebesar 43,40.

#### Aktivitas Antioksidan Ekstrak Sampel B

Besarnya aktivitas antioksidan sampel B dinyatakan dalam persentase inhibisi DPPH dengan variasi konsentrasi larutan sampel B 0 ppm, 20 ppm, 30 ppm, 40 ppm, 50 ppm, 60 ppm, 70 ppm, 80 ppm, dan 90 ppm terhadap radikal DPPH. Berdasarkan data hasil pengukuran absorbansi larutan ekstrak sampel B dengan

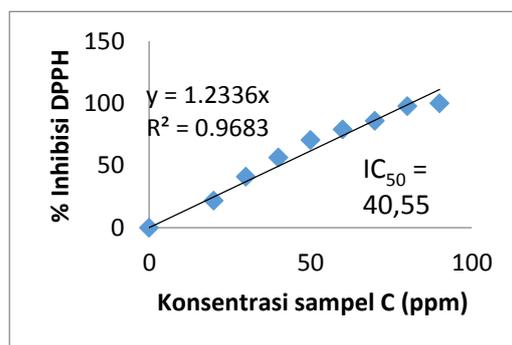
metode DPPH pada panjang gelombang 515 nm dibuat kurva sebagai berikut:



Gambar 6. Kurva hubungan absorbansi vs konsentrasi ekstrak sampel B

Kurva di atas menunjukkan bahwa pada saat konsentrasi larutan sampel 0 ppm, absorbansi maksimum yang berarti tidak terjadi reaksi pada DPPH. Pada saat konsentrasi ekstrak sampel B bertambah terlihat bahwa absorbansi DPPH semakin rendah yang berarti semakin banyak DPPH yang habis bereaksi dengan ekstrak sampel B hingga semua molekul DPPH habis bereaksi (absorbansi yang terukur nol), selanjutnya peningkatan konsentrasi sampel B tidak memberikan pengaruh yang berarti terhadap besarnya absorbansi yang terukur.

Kekuatan aktivitas antioksidan larutan ekstrak sampel B ditunjukkan oleh nilai  $IC_{50}$ . Nilai ini diperoleh dengan memplotkan kurva hubungan antara % Inhibisi DPPH terhadap konsentrasi larutan ekstrak sampel B. Persen inhibisi DPPH dapat dihitung menggunakan persamaan (3.1) (Lampiran 7) dan dari hasil perhitungan tersebut dibuat kurva sebagai berikut:



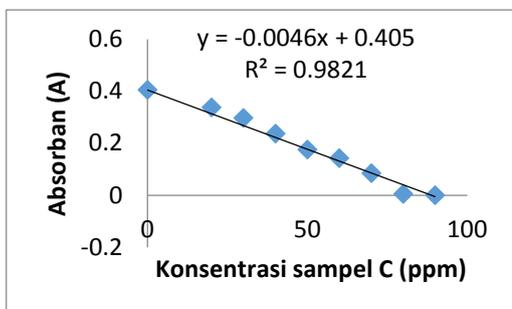
Gambar 7. Kurva aktivitas antioksidan larutan ekstrak sampel B

Dari persamaan regresi linier kurva di atas ( $Y = 1,233x$ ) didapat nilai  $IC_{50}$  larutan ekstrak sampel B sebesar 40,55.

#### Aktivitas Antioksidan Ekstrak Sampel C

Besarnya aktivitas antioksidan sampel C dinyatakan dalam persentase inhibisi

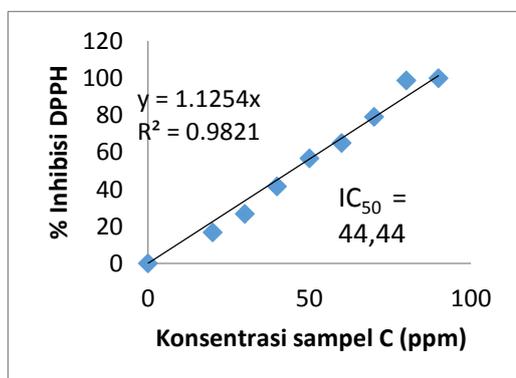
DPPH dengan variasi konsentrasi larutan sampel C 0 ppm, 20 ppm, 30 ppm, 40 ppm, 50 ppm, 60 ppm, 70 ppm, 80 ppm, dan 90 ppm terhadap radikal DPPH. Berdasarkan data hasil pengukuran absorbansi larutan sampel C dengan metode DPPH pada panjang gelombang 515 nm dibuat kurva sebagai berikut:



Gambar 8. Kurva hubungan absorbansi vs konsentrasi ekstrak sampel C

Kurva di atas menunjukkan bahwa pada saat konsentrasi larutan sampel 0 ppm, absorbansi maksimum yang berarti tidak terjadi reaksi pada DPPH. Pada saat konsentrasi ekstrak sampel C bertambah terlihat bahwa absorbansi DPPH semakin rendah yang berarti semakin banyak DPPH yang habis bereaksi dengan ekstrak sampel C hingga semua molekul DPPH habis bereaksi (absorbansi yang terukur nol), selanjutnya peningkatan konsentrasi ekstrak sampel C tidak memberikan pengaruh yang berarti terhadap besarnya absorbansi yang terukur.

Kekuatan aktivitas antioksidan larutan ekstrak sampel C ditunjukkan oleh nilai  $IC_{50}$ . Nilai ini diperoleh dengan memplotkan kurva hubungan antara % Inhibisi DPPH terhadap konsentrasi larutan ekstrak sampel C. Hasil perhitungan tersebut dibuat kurva sebagai berikut:



Gambar 9. Kurva aktivitas antioksidan larutan ekstrak sampel C

Dari persamaan regresi linier kurva di atas ( $Y = 1,125x$ ) didapat nilai  $IC_{50}$  larutan sampel C sebesar 44,44.

## PEMBAHASAN

### Estraksi Sampel

Pemilihan metode ekstraksi yang tepat sangat penting dalam mengekstrak senyawa fitokimia dari sumbernya. Sifat zat yang akan diambil dan sifat pelarut yang digunakan harus dipertimbangkan. Lipofilitas atau hidrofilitas mempengaruhi solubilitas suatu senyawa fitokimia dalam ekstraksi pelarut, secara khusus polaritas pelarut yang digunakan sangat mempengaruhi efisiensi proses ekstraksi. Banyak sekali metode ekstraksi yang dapat digunakan untuk mengekstrak senyawa fenolik, tetapi kesemuanya didasarkan pada penggunaan pelarut air, pelarut organik atau gas cair, atau kombinasinya (Oonsivilai, 2006).

Pelarut yang digunakan untuk mengekstrak sampel adalah larutan metanol 80%. Pemilihan larutan metanol 80% sebagai pelarut dalam hal ini didasarkan pada sifat dan karakteristik senyawa yang akan diekstrak yakni senyawa fenolik. Menurut Harborne dan William (2000) solubilitas senyawa fenolik sangat bergantung pada polaritas pelarut yang digunakan. Pelarut yang sering digunakan dalam ekstraksi senyawa fenolik adalah larutan metanol berair dengan kadar 60% sampai 80% (%v/v). Sistem pelarut ini akan merusak membran sel dan secara serempak melarutkan senyawa fenolik ketika dilakukan dengan kondisi ekstraksi yang sesuai (Naczka dan Shahidi, 2004). Secara khusus, larutan metanol berair merupakan pelarut yang terbanyak digunakan untuk ekstraksi senyawa fenol. Terutama sekali asam fenolik dan flavonoid dari buah dan sayuran. Hal ini disebabkan karena senyawa fenolik lebih stabil dalam metanol. Misalnya, flavon dan flavonol telah dilaporkan dapat stabil dalam larutan metanol lebih dari tiga bulan pada suhu 4°C. Larutan metanol juga menghasilkan persen *yields* ekstraksi senyawa asam fenolik dan flavonoid yang lebih tinggi. Metivier *et al.* (1980) melaporkan bahwa metanol berair 20% lebih efektif daripada larutan etanol berair dengan konsentrasi yang sama dan 70% lebih efektif dibanding air dalam ekstraksi senyawa antosianin dari anggur. Julkunen-Tito (1985) menemukan bahwa kandungan total senyawa fenolik lebih tinggi telah berhasil diekstrak dari daun dari Northern Willows dengan menggunakan larutan metanol berair jika dibandingkan terhadap larutan aseton 50% %v/v.

Proses pembuatan ekstrak yang dilakukan pada dasarnya terdiri dari 5 (lima) tahap, yaitu tahap pengeringan, pembuatan serbuk, proses ekstraksi, proses pemisahan pelarut, dan tahap pemekatan ekstrak (Andayani, 2005). Proses ekstraksi sampel

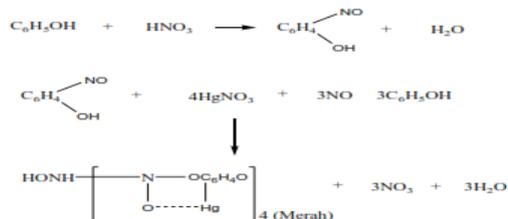
dengan maserasi dilakukan dengan perbandingan 1 gram sampel berbanding 10 mL pelarut sehingga proses ekstraksi optimal. Hasil ekstrak kental sampel yang diperoleh pada Tabel 1 menunjukkan bahwa proses ekstraksi cukup optimal dimana hasil ekstrak tertinggi didapat dari sampel B sebesar 16,37 gram atau sekitar 21,83% dari total sampel yang dimaserasi, kemudian sampel A sebesar 19,97 gram atau sekitar 19,97% dari total sampel yang dimaserasi dan terakhir sampel C yang diekstrak dengan ekstraktor Soxhlet dengan pelarut Metanol 80% dihasilkan ekstrak kental sebesar 11,18 gram atau sekitar 14,91% dari total sampel yang diekstrak.

**Uji Kualitatif Senyawa Fenolik**

Uji kualitatif senyawa fenolik dilakukan dengan 2 (dua) jenis reaksi, yaitu menggunakan reagen Milon dan reagen FeCl<sub>3</sub> sebagai berikut:

**Reagen Milon**

Uji kualitatif senyawa fenolik terhadap ekstrak sampel menggunakan reagen Millon menunjukkan reaksi positif. Hal ini ditunjukkan oleh perubahan warna larutan yaitu terbentuknya endapan putih yang setelah dipanaskan menjadi merah. Reaksi dilakukan sebanyak 2 kali: sampel dengan pengenceran hingga 1.000 ppm dan 20.000 ppm, keduanya menunjukkan hasil yang sama akan tetapi lebih jelas ditunjukkan oleh ekstrak sampel dengan pengenceran hingga 20.000 ppm. Hasil pengujian yang relevan terhadap identifikasi kualitatif senyawa fenolik dengan reagen Milon telah dilaporkan oleh Kurnia (1981) dan Mujaddid (2008). Reagen Milon adalah larutan merkuro dan merkuri nitrat dalam asam nitrat. Pada dasarnya reaksi Milon positif untuk mendeteksi keberadaan senyawa fenolik, karena terbentuknya senyawa merkuri dengan gugus hidroksifenil yang berwarna (Poedjiadi, 1994). Reaksi umum yang terjadi antara fenol dengan reagen Milon telah digambarkan oleh Gibbs (1926) sebagai berikut:



Gambar 10 Tahapan reaksi umum reagen Milon dengan fenol

**Reagen FeCl<sub>3</sub>**

Uji kualitatif senyawa fenolik berikutnya menggunakan larutan Besi(III)klorida 1%. Reaksi antara FeCl<sub>3</sub> dan

senyawa fenolik akan memberikan perubahan warna larutan menjadi hijau, merah, ungu, biru, atau hitam yang kuat (Harborne, 2006) yang berarti dalam sampel yang diuji mengandung fenol. Pereaksian sampel dengan reagen ini menunjukkan hasil positif, dimana sampel dengan pengenceran hingga 1.000 ppm setelah bereaksi memberikan perubahan warna larutan menjadi hijau muda dan dengan sampel yang diencerkan hingga 20.000 ppm terjadi perubahan warna larutan menjadi hijau kehitaman dengan ditambah endapan hitam (Lampiran 2) . Hal ini menunjukkan bahwa sampel memiliki kandungan senyawa fenolik. Lebih spesifik lagi bahwa gejala perubahan warna menjadi hijau kehitaman tersebut menunjukkan bahwa sampel mengandung tannin katekol (senyawa derivat fenol) sebagaimana dilaporkan oleh Andayani, Djekti, dan Hakim (2009) serta Vermerris dan Ralph (2006). Reaksi umum yang terjadi antara fenol dan reagen FeCl<sub>3</sub> digambarkan oleh Gibbs (1926 ) sebagai berikut:



Sehingga dapat diperkirakan bahwa endapan hitam yang terbentuk dalam reaksi adalah senyawa Fe(O-Ph)<sub>3</sub> seperti ditunjukkan persamaan reaksi di atas.

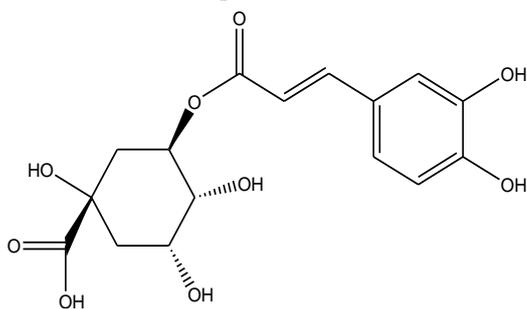
**Uji Kuantitatif Total Fenolik**

Penentuan kadar total fenol yang terdapat dalam ekstrak sampel dilakukan berdasarkan metode Folin ciocalteu oleh Vermerris dan Ralp (2006:152) dengan sedikit modifikasi. Metode Folin ciocalteu adalah metode populer yang paling banyak digunakan oleh peneliti untuk menentukan kandungan total fenol dari suatu makanan atau buah. Metode ini tidak dapat digunakan untuk menentukan senyawa fenol jenis tertentu secara spesifik, tetapi hanya akan mendeteksi semua jenis senyawa fenol yang terdapat dalam ekstrak tanaman (Waterhouse, 2005). Langkah pertama kali yang harus dilakukan untuk menentukan kadar total fenolik suatu sampel adalah membuat kurva kalibrasi standar untuk mendapatkan persamaan regresi linier hubungan antara konsentrasi dan absorban melalui pengukuran spektroskopis.

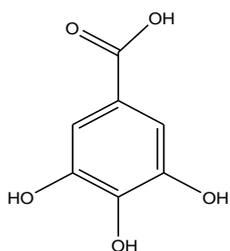
**Penentuan Kurva Kalibrasi Larutan Standar**

Metode yang digunakan pada penentuan kadar total fenolik adalah metode Folin-Ciocalteu dengan larutan fenol sebagai standar. Reagen Folin-Ciocalteu telah tersedia di Laboratorium, reagen ini pertama kali dibuat oleh Folin dan Ciocalteu pada tahun 1927 dengan cara memanaskan reagen *Phosphotungstic*(WO<sub>4</sub><sup>2-</sup>-

*phosphomolybdic* ( $\text{MoO}_4^{2-}$ ) selama 2 jam diikuti dengan penambahan Litium Sulfat ( $\text{Li}_2\text{SO}_4$ ) dan Bromin ( $\text{Br}_2$ ) diakhir pemanasan, kemudian didinginkan dan dilarutkan. Reagen yang dihasilkan digunakan untuk menentukan kadar tirosin dan triptofan dalam protein namun dapat juga digunakan untuk menentukan kadar total fenolik secara luas. Blanko yang digunakan biasanya adalah etanol, air, atau metanol tergantung pada jenis pelarut yang digunakan untuk mengekstraksi sampel. Standar yang digunakan biasanya adalah asam klorogenat (Gambar 5.2) atau asam gallat (Gambar 12) (Vermerris dan Ralph, 2006).



Gambar 11. Struktur molekul asam klorogenat

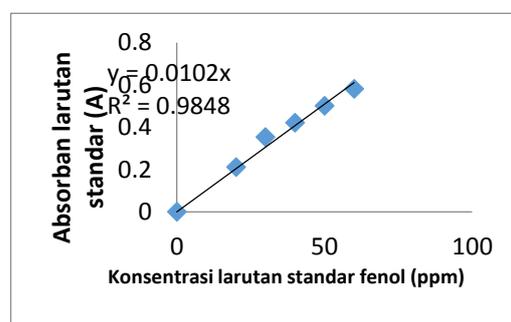


Gambar 12. Struktur molekul asam gallat

Oleh karena kedua jenis standar tersebut sulit didapatkan, maka standar yang digunakan dalam penelitian ini adalah fenol murni (Gambar 1) yang tersedia di Laboratorium dengan pertimbangan bahwa kedua standar tersebut merupakan derivat dari fenol murni (Vermerris dan Ralph, 2006). Penggunaan standar fenol murni ini juga pernah diterapkan oleh Mujaddid (2008) untuk menentukan kadar total fenol pada teh hijau.

Larutan fenol induk dibuat dengan cara sebuah kristal fenol murni dimasukkan ke dalam labu ukur 100 mL yang sudah terisi pelarut setengahnya dan sudah ditimbang, lalu labu dan larutan fenol ditimbang sehingga berat kristal fenol diketahui dan diperoleh larutan induk fenol 1.678 ppm. Kemudian larutan induk diencerkan dengan variasi konsentrasi larutan fenol 20 ppm, 30 ppm, 40 ppm, 50 ppm, dan 60 ppm. Larutan fenol tidak berwarna (bening) sedangkan reagen Folin-Ciocalteu berwarna hijau muda (agak kuning). Setelah reaksi berlangsung selama 45 menit, warna larutan

berubah menjadi ungu (Lampiran 12). Warna ungu yang terjadi semakin lama semakin pekat. Fenomena perubahan warna serupa pada pereaksian sampel dengan reagen Folin Ciocalteu dilaporkan oleh Andayani *et.al* (2008), Ebrahimzadeh *et.al* (2008), Green (2007), Soebagio *et al* (2007), Vermerris dan Ralph (2006), dan Oonsivilai (2006). Waktu reaksi antara sampel dan reagen Folin Ciocalteu minimal 30 menit, tetapi tidak boleh lebih dari 1 jam (Vermerris dan Ralph, 2006). Pengukuran Absorbansi menggunakan spektrofotometer UV-Vis pada panjang gelombang maksimum 720 nm diperoleh data hasil pengukuran dan dibuat kurva sebagai berikut:



Gambar 13. Kurva kalibrasi standar larutan fenol dalam reagen Folin-Ciocalteu pada panjang gelombang 720 nm

Berdasarkan kurva kalibrasi larutan standar di atas diperoleh persamaan regresi linier kurva melalui titik (0,0) dan nilai koefisien korelasi  $R = 0,984$ , sehingga hubungan antara konsentrasi dan absorban larutan standar fenol dapat ditentukan dengan persamaan berikut:

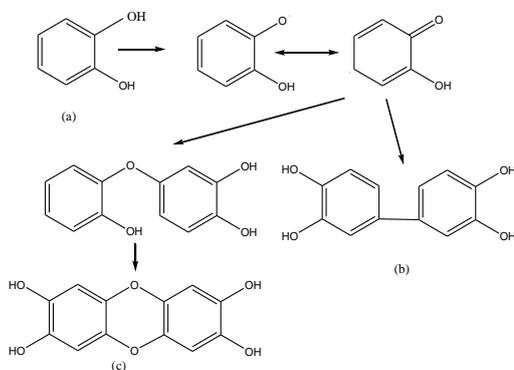
$$A = 0,010 c$$

Persamaan di atas digunakan untuk menentukan konsentrasi ekstrak sampel uji A, B, dan C dimana A adalah Absorbansi ekstrak sampel yang terukur dan c adalah konsentrasi ekstrak sampel yang terukur.

#### Penentuan Kadar Total Fenolik Ekstrak Sampel

Penentuan kadar total fenolik pada ekstrak sampel dilakukan dengan mengukur absorbansi ketiga jenis ekstrak sampel (A, B, dan C) yang diencerkan hingga 500 ppm pada panjang gelombang maksimum 720 nm dengan spektrofotometer UV-Vis. Data yang diperoleh dari pengukuran tersebut dapat dilihat pada Tabel 4.4 dan 4.5. Berdasarkan data pada Tabel tersebut terlihat bahwa ekstrak sampel B (128.000 mg/kg ekstrak sampel) memiliki kadar total fenol paling tinggi, kemudian disusul sampel C (93.600 mg/kg ekstrak sampel) dan sampel A (69.000 mg/kg ekstrak sampel). Perbedaan hasil ini tentunya sangat dipengaruhi

oleh perbedaan perlakuan pada sampel, mulai dari proses ekstraksi sampai saat pengujian dilakukan. Waktu dan lamanya proses ekstraksi berpengaruh terhadap pengambilan senyawa fenolik dari bagian tanaman, dilaporkan bahwa waktu ekstraksi berkisar antara 1 menit sampai 24 jam (Harborne, 2006). Disamping itu proses pemanasan pada saat pengeringan sampel, pemanasan pada proses ekstraksi dengan ekstraktor soxhlet, dan pemanasan pada saat penguapan pelarut dengan evaporator dapat mempengaruhi kadar total fenol yang terukur dimana senyawa fenolik dapat dengan mudah mengalami reaksi oksidasi baik secara langsung akibat pemanasan dan kontak oksigen (*Auto-oxidation*) maupun dengan bantuan enzim (*Enzymatic oxidation*). Salah satu contohnya adalah auto-oksidasi katekol sebagai berikut (Vermerris dan Ralph, 2006):



Gambar 14. Auto-oksidasi katekol dapat membentuk dimer berbeda

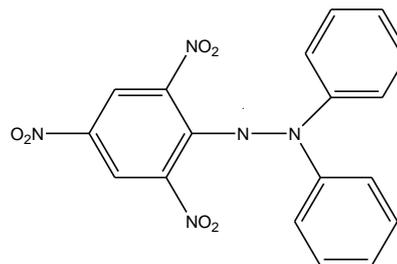
Oleh karena cincin aromatiknya, maka senyawa fenolik dapat dengan mudah mengalami reaksi auto-oksidasi. Radikal yang dihasilkan dari reaksi ini dapat bereaksi dengan radikal lainnya membentuk sebuah dimer dan karena kemampuan delokalisasi elektronnya, beberapa struktur derivat fenolik dapat terbentuk tergantung pada lokasi elektron radikal saat reaksi berlangsung. Gambar 14 menunjukkan bahwa radikal katekol (a) bereaksi lebih lanjut membentuk tetrahidroksil-bifenil (b) dan kuinin (c). Contoh lain juga ditunjukkan pada reaksi auto-oksidasi *p*-kresol (Vermerris dan Ralph, 2006).

Gambaran singkat ini menunjukkan bahwa meskipun senyawa fenolik sampel mengalami reaksi auto-oksidasi, tidak dapat disimpulkan serta merta bahwa sampel akan mengalami kerusakan total sehingga mempengaruhi hasil ukur kadar total fenolik tetapi tergantung pada hasil akhir senyawa yang dihasilkan, apakah masih bisa dioksidasi oleh reagen Folin Ciocalteu/DPPH atau tidak. Sehingga jelaslah bahwa perbedaan kadar total

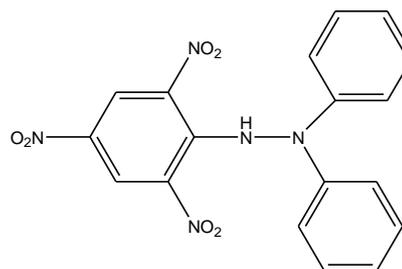
fenol yang terukur sangat dipengaruhi oleh perlakuan pada sampel mulai dari proses penyiapan hingga tahap pengujian dilakukan.

#### Uji Aktivitas Antioksidan

Pengujian aktivitas antioksidan dilakukan mengacu pada metode DPPH yang dilakukan oleh Ebrahimzadeh (2008), Green (2007), Elmastas *et al.* (2006), dan Molyneux (2004). DPPH (2,2-diphenyl-1-picrylhydrazil) merupakan radikal bebas stabil dengan rumus molekul  $C_{18}H_{12}N_5O_6$  ( $M_r = 394,33$ ) dan memiliki struktur sebagai berikut:



Gambar 15. Diphenylpicrylhydrazyl (radikal bebas)

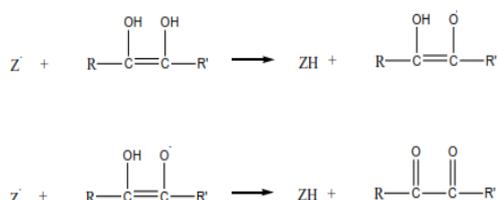


Gambar 16 *Diphenylpicrylhydrazine* (non radikal bebas)

Molekul radikal DPPH ini berwarna violet dan cukup stabil dalam larutan metanol. Ketika molekul DPPH ini direaksikan dengan zat yang bisa mendonasikan sebuah atom hidrogen atau sebuah elektronnya, maka strukturnya berubah menjadi bentuk tereduksinya (Gambar 16) dan warna violet tadi berubah menjadi kuning (Molyneux, 2004). Perubahan warna serupa juga terjadi saat reaksi antara ekstrak sampel A, B, C, dan larutan vitamin C dengan radikal DPPH dilakukan pada penelitian ini. Hal ini mengindikasikan bahwa dalam ekstrak sampel A, B, C, dan vitamin C terdapat senyawa fenolik sebagai antioksidan yang mampu mereduksi radikal DPPH. Reaksi radikal DPPH serupa juga ditunjukkan oleh Andayani *et.al* (2008), Ebrahimzadeh *et.al* (2008), Green (2007), Soebagio *et al* (2007), Elmastas *et. al* (2006), Oonsivilai (2006), dan Hanani *et.al* (2005).

Panjang gelombang maksimum DPPH yang digunakan dalam pengukuran absorbansi

oleh beberapa peneliti bervariasi dari 515 nm sampai dengan 520 nm, tergantung pada kondisi saat pengukuran dilakukan (Molyneux, 2004). Pengujian dilakukan pada panjang gelombang 515 nm yang merupakan panjang gelombang maksimum DPPH dengan serapan (A) = 0,405 (Lampiran 13). Sebagai kontrol positif peneliti menggunakan asam askorbat (vitamin C) karena telah banyak digunakan secara luas oleh peneliti lain. Reaksi antara vitamin C dengan radikal DPPH telah digambarkan oleh Molyneux (2004) dan berlangsung 2 (dua) tahap karena vitamin C memiliki dua atom hidrogen yang dapat didonorkan ke radikal DPPH pada persamaan reaksi berikut:



Dimana Z adalah radikal DPPH, ZH adalah non radikal DPPH. Reaksi ini memperlihatkan bahwa satu molekul asam askorbat dapat mereduksi dua molekul DPPH sekaligus. Reaksi serupa juga terjadi antara DPPH dan hidrokuinon (1,4-dihidroksi-benzena).

Aktivitas anti radikal DPPH (antioksidan) vitamin C termasuk sampel A, B, dan C. Kurva-kurva hubungan absorbansi dengan konsentrasi vitamin C dan ekstrak sampel tersebut memperlihatkan bahwa semakin besar konsentrasi vitamin C dan ekstrak sampel yang direaksikan dengan molekul DPPH, Absorbansi yang terukur semakin rendah sampai mencapai angka nol yang berarti bahwa tidak ada lagi residu berwarna kuning dari radikal DPPH yang tereduksi (Gambar 16) dihasilkan atau dengan kata lain penambahan atau kelebihan ekstrak sampel dalam sistem reaksi tidak memberikan kontribusi lagi terhadap nilai absorbansi yang terukur. Begitu juga halnya dengan kurva-kurva hubungan antara persen inhibisi DPPH (% DPPH) dengan konsentrasi vitamin C dan ekstrak sampel memperlihatkan bahwa konsentrasi vitamin C dan ekstrak sampel yang lebih tinggi akan memberikan persen inhibisi terhadap DPPH lebih tinggi. Hasil ini sangat relevan dengan kurva kalibrasi (*typical calibration curve*) yang ditunjukkan oleh Molyneux (2004: 213-214) yang selalu dijadikan rujukan untuk tiap penelitian yang bertujuan untuk mengukur aktivitas anti radikal DPPH suatu sampel.

Kekuatan aktivitas antioksidan vitamin C dan ekstrak sampel terhadap radikal DPPH ditunjukkan oleh nilai  $1/IC_{50}$ ,  $IC_{50}$  dihitung dari

persamaan regresi linier yang diperoleh dari kurva hubungan antara % DPPH dan konsentrasi. Nilai  $IC_{50}$  atau kadang disebut  $EC_{50}$  (*efficient concentration*) didefinisikan sebagai konsentrasi substrat yang dapat menyebabkan hilangnya 50% aktivitas/warna DPPH (Molyneux, 2004), lebih jelasnya adalah konsentrasi ekstrak sampel yang dapat bereaksi dengan 50% dari jumlah molekul DPPH yang ada dalam sistem reaksi. Nilai  $IC_{50}$  larutan vitamin C yang diperoleh dalam penelitian ini sebesar 3,92, relevan dengan nilai  $IC_{50}$  yang diperoleh oleh Hanani (2005) sebesar 3,81; Kim *et al.* (2002) sebesar 3,64 dan Andayani *et al.* (2009) sebesar 3,63. Sedangkan nilai  $IC_{50}$  untuk ekstrak sampel A sebesar 43,40; ekstrak sampel B sebesar 40,55 dan ekstrak sampel C sebesar 44,44. Terlihat bahwa ekstrak sampel memiliki aktivitas antioksidan lebih rendah dibanding vitamin C namun aktivitas antioksidan ekstrak maupun vitamin C masih dalam kategori kuat karena memiliki nilai  $IC_{50}$  di bawah 200 mg/mL (Blouis, 1958). Disamping itu, ekstrak sampel yang diuji masih berupa ekstrak kasar (*crude extract*) sehingga nilai  $IC_{50}$  untuk isolat spesifik senyawa fenoliknya diharapkan akan bernilai lebih tinggi.

## SIMPULAN

Berdasarkan hasil penelitian dapat ditarik beberapa kesimpulan, yaitu:

1. Ekstrak kental sampel A diperoleh sebesar 19,97 gram/100 gram sampel (19,97%), sampel B sebesar 16,37 gram/75 gram sampel (21,83%), dan sampel C sebesar 11,18 gram/75 gram sampel (14,91%).
2. Berdasarkan hasil uji kualitatif menggunakan reagen Millon dan reagen  $FeCl_3$  1% dapat disimpulkan bahwa dalam ekstrak sentul A, B, dan C terdapat senyawa fenolik.
3. Kadar total senyawa fenolik dalam ekstrak sentul A, B, dan C berturut-turut adalah 69.000 mg/kg, 128.600 mg/kg, dan 93.600 mg/kg.
4. Kekuatan antioksidan vitamin C serta ekstrak sentul A, B, dan C terhadap radikal DPPH ditunjukkan oleh harga  $IC_{50}$  berturut-turut adalah 3,92; 43,40; 40,55; dan 44,44.

## SARAN

Hasil analisis terhadap kadar total fenolik dan aktivitas antioksidan dari ekstrak kasar (*crude extract*) daging buah sentul matang pada penelitian ini menunjukkan hasil positif dan cukup tinggi sehingga perlu dilakukan penelitian lebih lanjut terhadap kadar total fenolik dari isolat murni senyawa fenolik

spesifik yang terdapat dalam ekstrak daging buah sentul serta dari bagian-bagian lain seperti daun, kulit batang, batang, akar, dan bijinya.

#### DAFTAR RUJUKAN

- Amirullah, Andihjeriati. 1987. *Pemeriksaan Farmakognostik Tumbuhan Kecapi (Sandoricum koetjape Merr.)*. Penelitian Tanaman Obat di Beberapa Perguruan Tinggi di Indonesia Vol. IV (1994) No. 335. Jakarta: Puslitbang Farmasi.
- Andarwulan., Shetty. 1999. *Analisa Total Fenol. Bandung: Jurnal Teknologi dan Industri Pangan*, Vol.XIII, No. 2.
- Andayani, Regina., Lovita Lisawati dan Maimunah. 2008. *Penentuan Aktivitas Antioksidan, Kadar Fenolat Total dan Likopen pada Buah Tomat (SolanumLycopersicum)*. Padang: Jurnal Sains dan Teknologi, Vol. 12, No. 1.
- Andayani, Yayuk. 2005. *Fraksinasi dan Identifikasi Senyawa Fitosterol dalam Ekstrak Buncis (Phaseolus vulgaris L)*. Makalah. Disampaikan pada Seminar Nasional dan Pameran Obat Tradisional. Mataram, 29 September 2005.
- Andayani, Yayuk., Dwi Soelistya Diah Djekti dan Alifman Hakim. 2009. *Aktivitas Anti Malaria dan Analisis Senyawa Metabolit Sekunder Dari Ekstrak Buah, Daun dan Kulit Batang Artocarpus camansi*. Mataram: Laporan Penelitian 2009.
- Aruoma, O. I. 2002. *Methodological considerations for characterizing potential antioxidant actions of bioactive components in plant foods*. Mutation Research. 523 - 524: 9 - 20.
- Boer. 2000. *Uji Aktivitas Antioksidan Ekstrak kulit Buah Kandis (Garcinia parifolia Miq)*. Journal Matematika dan IPA 1. 1: 26 - 33.
- Brand-Williams, W., Cuvelier, M.-E. and Berset, C. 1995. *Use of a free radical method to evaluate antioxidant activity*. Lebensmittel-Wissenschaft und Technologie. 28: 25 - 30.
- Cimpan, G. and Gocan, S. 2002. *Analysis of medicinal plants by HPLC: recent approaches*. Journal of Liquid Chromatography and Related Technologies. 25: 2225 - 2292.
- Disilvetto, R.A. 2001. *Flavonoids as Antioxidants*. In: *Handbook of Nutraceutical and Functional Foods*. Wildman, R.E.C. (ed). CRC Press, New York, NY. pp 127 - 142.
- Duarte, J., Perez-Vixcainom, F., Utrilla, P., Jimenez, J., Tanargo, J., and Zarzuelo, A. 1993. *Vasodilatory effects of Flavonoids in Rat Aortic Smooth Muscle. Structure-activity Relationships*. General Pharmacology. 24: 857 - 862
- Ebrahimzadeh, Mohammad Ali, Pourmorad, F., Hafezi, Samira. 2008. *Antioxidant activities of Iranian Corn Silk*. Turk J. Biol. 32: 43 - 49.
- Elmastas, M., Gulcin, I., Isildak, Kufrevioglu, O.I., Ibaoglu, K., and Aboul-Enein, H.Y. 2006. *Radical Scavenging Activity and Antioxidant Capacity of Bay Leaf Extracts*. Journal of The Iranian Chemical Society, vol.3, no. 3, pp. 258 - 266.
- Gibbs, H.D. 1926. *Phenol Tests*. Washington: Devisions of Chemistry, Higienic Laboratory, United States Public Health Service. Download from [www.jbc.org](http://www.jbc.org), 23 Januari 2008.
- Green, Richard C. 2007. *Phisicochemical Properties and Phenolics Composition of Selected Saskachewan Fruits: Buffalaloberry, Chokecherry and Sea Buckthorn*. A Thesis of University of Saskatchewan Saskatoon Canada, S7N 5A8.
- Hanani, Endang, Abdul mun'im dan Ryany Sekarini. 2005. *Identifikasi Senyawa Antioksidan dalam Spons Callyspongia sp dari Kepulauan Seribu*. Depok: Majalah Ilmu Kepermasian, Vol.2, No. 3, Desember 2005: 127-133.
- Harborne, J.B. 2006. *Metode Fitokimia Penuntun Cara Modern Menganalisis Tumbuhan*. Bandung: ITB.
- Harborne, J. B. and Williams, C. A. 2000. *Advances in flavonoid research since 1992*. Phytochemistry. 55: 481 - 504.
- Hendayana, 1994. *Kimia Analisis Instrumen*. Semarang: IKIP Semarang.
- Hernani., Raharjo, M, 2005. *Tanaman Berkhasiat Antioksidan*. Jakarta: Penebar Swadaya.
- Huang, D., Ou, D. & Prior, D. 2005. *The Chemistry Behind Antioxidant Assays*. J gric Food Chem 53:1841-1856.
- Julkunen-Titto, R. (1985). *Phenolic Constituent in The Leaves of Northern willows: Method for The Analysis of certain Phenolics*. Journal of Agricultural and Food Chemistry. 33: 213-217.
- Kumalaningsih, Sri. 2007. *Antioksidan, Sumber dan Manfaatnya*. Anti oxidant centre.

- <http://antioxidantcentre.com>. Download: 16 Desember 2007.
- Kurnia, K. 1981. *Petunjuk Praktikum Biokimia*. Bandung: Alumi.
- Lako, J., Trenerry, V.C., Wahlqvist, M., Wattanapenpaiboon, N., and Sotheeswaran, S. 2007. *Phytochemical Flavonol, carotenoids and Antioxidant Properties of Wide Selection of Fijian Fruits, Vegetables and other readily available Foods*. Food Chem. 101: 1727 – 1741.
- Lamien-Meida, Aline, Lamien, C.G., Compaore, M.M.Y., Meda, Roland N.T., Kiendrebeogo, M., Zeba, B., Millogo, J., and Nacoulma, Odile G. 2008. *Polyphenol Content and Antioxidant Activity of Fourteen Wild Edible Fruits from Burkina Faso*. Molecules. 13: 581 – 594.
- Le-Marchand, L., Murphy, S.P., Hankin, J.H., Wilkens, L.R., and Kolonel, L.N. 2000. *Intake of Flavonoids and Lung Cancer*. Journal of National Cancer institute. 92: 154 – 160.
- Lin, J.-H., Chiou, Y.-N. and Lin, Y.-L. 2002. *Phenolic glycosides from *Viscum angulatum**. Journal of Natural Products. 65: 638 - 640.
- Manach, C., Scalbert, A., Morand, C., Remesy, C. and Jime' nez, L. 2004. *Polyphenols: Food sources and Bioavailability*. American Journal of Clinical Nutrition. 79: 727 - 747.
- Mann, J. 1987. *Secondary Metabolism*. Toronto: Oxford University Press.
- Macheix, J.J., Fleuriet, A. and Billot, J. 1990. *Fruits Phenolics*. Boca Raton: CRC Press.
- Mazza, G. and Miniati, E. 1993. *Anthocyanins in Fruits, Vegetables and Grains*. London: CRC Press.
- Metivier, R.P., Francis, F.J. and Claydesdale, F.M. 1980. *Solvent Extraction of Antocyanins from Wine Pomace*. Journal of Food Science. 45: 1099-1100.
- Molyneux, Philif. 2004. *The Use of The Stable Free Radical Diphenylpicrylhydrazyl (DPPH) for Estimating Antioxidant Activity*. Original Article of Songklanakarin J. Sci. Technol., 2004, 26(2):211-219.
- Morton, J. 1987. *Santol*. In: *Fruits of warm climates*. Miami, FL. p. 199–201.
- Mujaddid, Jamilul. 2008. *Analisis Kadar Fenol dari Produk Komersil Teh Hijau ( *Camellia sinensis* L. Mataram: Skripsi Universitas Mataram.*
- Nichenametla, S. N., Taruscio, T. G., Barney, D. L. and Exon, J. H. 2006. *A review of the effects and mechanisms of polyphenolics in cancer*. Critical Reviews in Food Science and Nutrition. 46: 161 - 183.
- Oonsivilai, Ratchadaporn. 2006. *Functional and Nutraceutical Properties of rang Chuet (Thunbergia laurifolia Lindl.) Extract. A Thesis of Suranare University of Technology, Academic year 2006*.
- Papas, A.M. 1999. *Diet and Antioxidant Status*. In: *Antioxidant Status, Diet, Nutrition, and Health*. Papas, A.M. (ed). CRC Press, Boca Raton, FL. Pp 89 – 106.
- Poedjiadi, Ana. 1994. *Dasar-Dasar Biokimia*. Jakarta: UI-Press.
- Rasadah, M.A., et al. 2004. *Anti-inflammatory Agents from Saandoricum koetjape Merr*. Phytomedicine. 11:2 261-3.
- Robbins, R. J. 2003. *Phenolic acids in foods: An overview of analytical methodology*. Journal of Agricultural and Food Chemistry. 51: 2866 -2887.
- Santos-Buelga, C. and Scalbert, A. 2000. *Proanthocyanidins and tannin-like compounds - nature, occurrence, dietary intake and effects on nutrition and health*. Journal of the Science of Food and Agriculture. 80: 1094 - 1117.
- Sembiring, R.K. 1995. *Analisis Regresi*. Bandung: ITB Press
- Shahidi, F. and Nacz, M. 1995. *Food Phenolics: Sources, Chemistry, Effect, applications*. Lancaster: Technomic Publishing Company.
- Shahidi, F. and Nacz, M. 2004. *Phenolics in Food and Nutraceuticals*. CRC Press, Boca Raton, FL.
- Sugiyono. 2006. *Statistik Untuk Penelitian*. Bandung: CV Alfabeta.
- Sun, J., Chu, Y.-F., Wu, X. and Liu, R. H. 2002. *Antioxidant and Antiproliferative Activities of Common Fruits*. Journal of Agricultural and Food Chemistry. 50: 7449 - 7454.
- Soebagio, Boesro., Taufik Rusdiana, dan Ade Kurniawati. 2007. *Formulasi Gel Antioksidan dari Ekstrak Daun Jambu Biji ( *Psidium guajava* L) Dengan Menggunakan Aquapec HV-505*. Jakarta: Makalah Kongres ilmiah Ke XV ISFI, 17-19 Juni 2009.
- Tutupoho, Atty. 1988. *Analisis Pendahuluan Kandungan Kimia Kulit dan daging Buah Muda Tumbuhan Kecapi ( *Sandoricum koetjape* Merr.)*, Penelitian Tanaman Obat di Beberapa Perguruan

- Tinggi di Indonesia Vol. IV (1994) No. 336. Jakarta: Puslitbang Farmasi.
- Underwod, A.L., Day, R.A. 1999. *Analisis Kimia Kuantitatif*. Jakarta: Erlangga.
- Waterhouse, A. L. 2005. *Determination of Total Phenolics*. In: *Handbook of Food Analytical Chemistry: Pigments, Colorants, Flavors, Texture, and Bioactive Food Components*. Wrolstad, R. E., Acree, T. E., Decker, E. A., Penner, M. H., Reid, D. S., Schwartz, S. J., Shoemaker, C. F., Smith, D. and Sporns, P. (eds). John Wiley & Sons, Incorporated. Hoboken, NJ. pp 463 - 470.
- Williams, C. A. and Grayer, R. J. 2004. *Anthocyanins and other flavonoids*. Natural Products Reports. 21: 539 - 573.
- Wrolstad, R. E. 2005. *Bioactive Food Components*. In: *Handbook of Food Analytical Chemistry: Pigments, Colorants, Flavors, Texture, and Bioactive Food Components*. Wrolstad, R. E., Acree, T. E., Decker, E. A., Penner, M. H., Reid, D. S., Schwartz, S. J., Shoemaker, C. F., Smith, D. and Sporns, P. (eds). John Wiley & Sons, Incorporated. Hoboken, NJ. p 459.
- Vermerris, Wilfred and Ralph Nicholson. 2006. *Phenolic Compound Biochemistry*. Netherlands: Springer.
- Xu, H.X., Wan, M., Dong, H., But, P.P.H., and Foo, L.Y. 2000. *Inhibitory Activity of Flavonoids and Tannins Against HIV-1 Protease*. Biological Pharmacological Bulletin. 23: 1072 – 1076.
- Yulizar, Yoki. 1993. *Studi Isolasi dan Penentuan Struktur Molekul Senyawa Kimia dalam Fraksi n-heksana Kulit Batang Tanaman Kecapi (Sandoricum koetjape (Burm.f.) Merr.)*. Penelitian Tanaman Obat di Beberapa Perguruan Tinggi di Indonesia Vol. IV (1994) No. 227. Jakarta: Puslitbang Farmasi.