

## Aktivitas antioksidan, kadar fenolat dan flavonoid ekstrak buah pare belut (*Trichosanthes anguina*)

### Antioxidant activity, phenolic and flavonoid contents of snake gourd (*Trichosanthes anguina*) extract

YUANA RIKHA MARSETYA, MUDJIJONO, SRI HASTUTI

Jurusan Kimia, Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam, Universitas Sebelas Maret. Jl. Ir. Sutami 36A Surakarta 57126, Jawa Tengah

Manuskrip diterima: 3 Juni 2009. Revisi disetujui: 22 Agustus 2009.

**Abstract.** Marsetya YR, Mudjijono, Hastuti S. 2009. *Antioxidant activity, phenolic and flavonoid contents of snake gourd (Trichosanthes anguina) extract.* Biofarmasi 7: 77-86. This research was carried out to evaluate the antioxidant activity and the relationship between antioxidant activity with phenolic and flavonoid contents in snake gourd extract. The extract was prepared by a maceration using methanol, and then continued by an extraction using solvent with increasing polarity. Extract obtained was analyzed to determine the antioxidant activity, and they were compared to the synthetic antioxidant, BHT (*Butylated Hydroxytoluene*) and PG (*Propyl Gallate*). The antioxidant activity was determined using the modification of  $\beta$ -carotene-linoleic acid emulsion system. Phenolic content was measured by Folin-Ciocalteu method and the flavonoid content was determined using  $AlCl_3$  reagent. The result of this research showed that the antioxidant activity of methanol extract (29.566%) was higher than BHT (16.268%), and it was not significantly different from PG (29.452%). Chloroform extract had the highest antioxidant activity (36.384%), followed by water, hexane, butanol, and ethyl acetate extract, respectively. Phenolic contents of each extract (methanol, chloroform, ethyl acetate, butanol, and water) were 1.904, 3.547, 2.553, 3.114, and 1.776 g GAE (*Gallic Acid Equivalent*)/100 g extract, and the flavonoid contents were 4.072, 4.162, 1.751, 2.944, and 1.392 g QE (*Quercetin Equivalent*)/100 g extract, respectively. A positive relationship was found in this research, the chloroform extract that had the highest antioxidant activity contained the highest amount of phenolic and flavonoid. This study showed that snake gourd could be used as a source of natural antioxidant.

**Keywords:** Antioxidant, flavonoid, phenolic, snake gourd, *Trichosanthes anguina*

### PENDAHULUAN

Radikal bebas adalah suatu senyawa atau molekul yang mengandung satu atau lebih elektron tidak berpasangan pada orbital luarnya, yang menyebabkan senyawa tersebut sangat reaktif (Soeatmaji 1998). Radikal bebas yang bersifat reaktif tersebut dapat menimbulkan perubahan kimiawi dan merusak berbagai komponen sel hidup. Dalam tubuh manusia, radikal bebas dianggap berperan dalam proses terjadinya kanker, penyakit radiovaskuler, neurodegeneratif, diabetes, dan katarak. Penelitian di bidang gizi membuktikan bahwa antioksidan dapat melindungi jaringan tubuh dari efek negatif radikal bebas (Karyadi 1997). Antioksidan juga berperan penting dalam mempertahankan mutu produk pangan. Menurut Trilaksani (2003), berbagai kerusakan akibat reaksi oksidasi, seperti ketengikan, perubahan nilai gizi, dan perubahan warna pada lipid dan bahan pangan yang mengandung lipid, dapat dihambat dengan penambahan antioksidan. Antioksidan merupakan senyawa yang dapat menghambat reaksi oksidasi dengan cara mengikat radikal bebas dan molekul yang sangat reaktif. Antioksidan juga mampu menginaktivasi berkembangnya reaksi oksidasi dengan cara mencegah terbentuknya radikal bebas. Akibatnya, kerusakan sel dapat dihambat (Winarsi 2007). Berdasarkan sumbernya, antioksidan dibagi dalam dua kelompok, yaitu antioksidan sintetik dan antioksidan alami. Penggunaan

antioksidan sintetik dalam jangka waktu lama dan dosis yang berlebihan dapat merugikan kesehatan karena bersifat karsinogen. Senyawa fenol sintetik merupakan salah satu contoh antioksidan sintetik yang tidak baik bagi kesehatan, karena pada pemaparan yang lama diketahui dapat mempengaruhi genetika sel-sel tubuh (Amarowitz et al. 2000). Pemakaian antioksidan buatan dalam bahan pangan harus dilakukan secara hati-hati, karena banyak diantaranya yang dapat menyebabkan keracunan pada penggunaan dosis yang berlebihan (Ketaren 1986). Hal ini mendorong berbagai penelitian untuk mendapatkan antioksidan yang lebih aman dari sumber bahan alami yang banyak ditemukan dalam sayuran, buah-buahan, biji-bijian, serta kacang-kacangan.

Tumbuhan menghasilkan sejumlah senyawa kimia kompleks yang biasanya merupakan bagian dari sel yang disebut metabolit sekunder, dimana kandungannya bukan merupakan bahan dasar biokimia untuk hidup, tetapi sebagai bagian sel yang berinteraksi dengan lingkungan. Bahan kimia dari tumbuhan yang mempunyai efek biologi yang efektif sebagai antioksidan, diantaranya adalah golongan senyawa fenolat. Menurut Andayani et al. (2008), dari sejumlah penelitian pada tanaman obat dilaporkan bahwa banyak tanaman obat yang mengandung antioksidan dalam jumlah besar. Efek antioksidan tersebut terutama disebabkan karena adanya senyawa fenol seperti flavonoid dan asam fenolat. Secara *in vitro*, buah

mengkudu, daun teh, gandum, dan daun dewandaru diketahui memiliki aktivitas antioksidan seiring dengan tingginya kandungan golongan senyawa fenolat (Rohman et al. 2006; Kumar et al. 2008; Emmons dan Peterson 1999; Utami et al. 2005). Flavonoid, tanin, dan polifenol merupakan golongan senyawa yang berpotensi sebagai antioksidan (Wangesteen et al. 2004), selain itu vitamin C, vitamin E, dan karotenoid juga berpotensi sebagai antioksidan (Winarsi 2007).

Golongan senyawa yang berpotensi sebagai antioksidan tersebut dapat ditemukan dalam berbagai jenis tumbuhan. Salah satu ragam tumbuhan yang banyak terdapat di Indonesia yaitu famili Cucurbitaceae. Famili ini mencakup sekitar 800 jenis yang terbagi dalam  $\pm 100$  marga, terutama di daerah-daerah beriklim panas. Famili Cucurbitaceae merupakan salah satu famili tanaman yang banyak dimanfaatkan sebagai sayuran dan obat-obatan (Tjitrosoepomo 1989).

Beberapa penelitian mengenai aktivitas antioksidan pada famili Cucurbitaceae telah dilakukan. Salah satunya yaitu penelitian yang dilakukan oleh Soury et al. (2008), hasil penelitian tersebut menunjukkan bahwa dengan metode TBA ekstrak metanol biji mentimun (*Cucumis sativus* L.) terbukti memiliki aktivitas antioksidan dengan IC<sub>50</sub>  $1,25 \pm 0,03$   $\mu\text{g/ml}$  dan mengandung kadar fenolat total sebesar  $27,79 \pm 0,89$  mg/100 g bahan kering. Penelitian yang lain dilakukan oleh Kumar et al. (2008), yaitu bahwa ekstrak metanol *Curullus colocynthis* (L.) terbukti mampu menghambat radikal bebas dan ekstrak tersebut mengandung fenolat sebagai asam galat sebesar 0,74% (m/m) dan flavonoid sebagai katekin sebesar 0,13% (m/m). Uji aktivitas antioksidan telah dilakukan pada daun dan akar labu siam dengan menggunakan metode pemucatan  $\beta$ -karoten-asam linoleat yang menunjukkan bahwa ekstrak etanol daun serta ekstrak air daun dan akar labu siam memiliki aktivitas antioksidan lebih besar dari 90% penghambatan (Ordonez et al. 2005).

Pare belut (*Trichosanthes anguina* L.) merupakan salah satu jenis tanaman dari famili Cucurbitaceae. Menurut Kristinawati (2004), identifikasi dengan penapisan fitokimia menunjukkan bahwa ekstrak etanol buah pare belut mengandung alkaloid, tanin, polifenol, saponin, kardenolin/bufadienol, dan flavonoid. Literatur lain menyebutkan bahwa buah pare belut mengandung sejumlah vitamin, yaitu vitamin C ( $18,9 \pm 0,05$  mg/100 ml) dan vitamin A ( $347 \pm 0,02$   $\mu\text{g}/100$  ml) (Ojiako dan Igwe 2008).

Berdasarkan kandungan senyawa yang dimiliki, seperti yang telah dilaporkan oleh Kristinawati (2004) serta Ojiako dan Igwe (2008), buah pare belut mempunyai potensi sebagai antioksidan, sehingga buah pare belut juga dapat menjadi sumber antioksidan alami. Pelarut metanol dapat digunakan untuk menarik komponen dengan berbagai tingkat kepolaran, sehingga komponen kimia dengan kepolaran yang rendah sampai yang tertinggi dapat terekstrak semua. Potensi antioksidan buah pare belut dapat meningkatkan manfaat buah pare belut sebagai bahan pangan fungsional, tetapi sampai sekarang belum ada keterangan ilmiah mengenai aktivitas antioksidan dan golongan senyawa dalam buah pare belut yang berpotensi

sebagai antioksidan. Oleh karena itu, perlu dilakukan pengujian untuk mengetahui aktivitas antioksidan terhadap bahan aktif antioksidan dalam buah pare belut dengan menggunakan pelarut awal metanol.

Tujuan penelitian ini adalah: (i) Mengetahui aktivitas antioksidan ekstrak metanol buah pare belut, (ii) Mengetahui kadar fenolat dan flavonoid dalam ekstrak buah pare belut, serta (iii) Mengetahui hubungan antara ekstrak buah pare belut yang mempunyai aktivitas antioksidan tertinggi dengan kadar fenolat dan flavonoid.

## BAHAN DAN METODE

### Tempat dan waktu penelitian

Penelitian ini dilakukan di Laboratorium Kimia Dasar dan Sub-Laboratorium Pusat Biologi, Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam (FMIPA), Universitas Sebelas Maret (UNS) Surakarta, dari bulan Januari 2008 sampai Februari 2009.

### Alat dan bahan

Alat-alat yang digunakan dalam penelitian ini meliputi seperangkat alat maserasi, seperangkat alat gelas, *rotary evaporator* Bibby RE200, *vortex mixer* VM-300, spektrofotometer UV-Vis Mini-1240 (Shimadzu), spektrofotometer UV-Vis *Double Beam* (Labomed, Inc.), oven (Memmert), *batch oven*, *tray dryer* 90%, penggiling *Disk Mill* model FFD, inkubator *Selecta* (40-60°C), neraca analitik tipe *Scout Pro* OHAUS maksimal 400 g, neraca analitik TL-603 D maksimal 1 = 110 g dan maksimal 2 = 610 g, serta mikropipet 20-200  $\mu\text{l}$  dan 100-1000  $\mu\text{l}$ .

Sementara itu, bahan-bahan yang digunakan meliputi daging buah pare belut yang diperoleh dari Sukoharjo, metanol (Brataco Chemika), heksana (Brataco Chemika), kloroform (Aldrich), etil asetat (Aldrich), butanol (Aldrich), HCl (E. Merck), FeCl<sub>3</sub> (E. Merck), AlCl<sub>3</sub> (E. Merck), KI (E. Merck), I<sub>2</sub> (E. Merck), NaCl, SbCl<sub>3</sub>,  $\beta$ -karoten (E. Merck), asam oleat (E. Merck), vitamin C (E. Merck), Tween 80 (E. Merck), BHT (Aldrich), propil galat (E. Merck), reagen Folin-Ciocalteu (E. Merck), Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> (E. Merck), gelatin (E. Merck), NaNO<sub>2</sub> (E. Merck), NaOH (E. Merck), asam galat (E. Merck), kuersetin (E. Merck), amilum (E. Merck), akuabides, akuades, tip mikropipet (Eppendorf), dan kertas saring.

### Metode penelitian

Metode yang digunakan dalam penelitian ini adalah eksperimental laboratorium dengan menggunakan sampel buah pare belut. Buah pare belut diambil dari Sukoharjo. Teknik pengambilan sampel dilakukan dengan memilih salah satu petani secara acak dari 5 orang petani. Buah pare belut yang diperoleh dari petani tersebut dianggap mempunyai probabilitas yang sama, yang berarti mempunyai komponen kimia yang sama. Semua buah pare belut yang diperoleh dibuat sampel untuk analisis selanjutnya. Buah pare belut dibuat simplisia dan dimaserasi dengan pelarut metanol dan dilanjutkan dengan ekstraksi bertahap dengan pelarut heksana, kloroform, etil asetat, dan butanol. Pengujian aktivitas antioksidan

dilakukan dengan menggunakan metode sistem emulsi  $\beta$ -karoten-asam linoleat (Kumaran dan Karunakaran 2006) yang dimodifikasi, penapisan fitokimia menggunakan metode uji warna atau endapan, analisis fenolat menggunakan reagen Folin-Ciocalteu (Song dan Barlow 2004), analisis flavonoid menggunakan metode pewarnaan  $AlCl_3$  (Rohman et al. 2006), dan analisis vitamin C dengan menggunakan metode titrasi iodium (Sudarmadji et al. 1989).

### Cara kerja

#### *Determinasi dan preparasi sampel*

Determinasi sampel buah pare belut yang digunakan dalam penelitian ini dilakukan di Laboratorium Taksonomi Tumbuhan, Fakultas Biologi, UGM Yogyakarta. Determinasi dilakukan berdasarkan pengamatan ciri fisiologis tumbuhan.

#### *Persiapan simplisia*

Buah pare belut sebanyak 24 kg dikupas kulitnya, dipotong tipis-tipis dengan tebal irisan  $\pm 1$  mm untuk menghindari kerusakan pada proses pengeringan, diangin-anginkan selama  $\pm 24$  jam, kemudian dikeringkan dengan oven pada suhu  $55^\circ C$  selama  $\pm 72$  jam, dimana pada suhu yang tidak terlalu tinggi tersebut bertujuan untuk menghindari perubahan-perubahan komponen kimia yang terkandung di dalam buah pare belut. Selanjutnya, daging buah pare belut yang sudah kering digiling sampai berbentuk serbuk dengan ukuran 40 mesh, dan diperoleh serbuk simplisia sebanyak 1 kg.

#### *Ekstraksi simplisia dengan pelarut metanol*

Serbuk simplisia buah pare belut sebanyak 1 kg diekstraksi dengan metode maserasi menggunakan pelarut metanol. Metode ini dipilih karena tidak menggunakan pemanasan, sehingga perubahan terhadap senyawa-senyawa maupun vitamin yang berperan sebagai antioksidan dalam sampel dapat dihindarkan. Di samping itu, sampel yang digunakan banyak dan untuk mempercepat proses ekstraksi hanya memungkinkan dilakukan dengan metode maserasi. Proses maserasi sangat menguntungkan untuk isolasi senyawa bahan alami (Lenny 2006).

Maserasi pertama dilakukan selama 48 jam dan volume metanol yang ditambahkan sebanyak 2.200 ml. Maserasi kedua dilakukan selama 24 jam dan volume metanol yang ditambahkan sebanyak 850 ml. Maserasi ketiga dilakukan selama 24 jam dan volume metanol yang ditambahkan sebanyak 750 ml. Maserasi dilakukan dengan pengadukan setiap 1 jam, hal ini bertujuan untuk menghindari memadatnya serbuk simplisia, sehingga pelarut kesulitan untuk menembus bahan dan mengambil komponen kimia aktif, karena serbuk simplisia yang digunakan relatif banyak. Filtrat yang diperoleh diuapkan pelarutnya dengan *rotary evaporator* pada suhu  $40^\circ C$  dan kecepatan putar 4 rpm sampai tidak terdapat pelarut yang menetes lagi dan diperoleh ekstrak metanol sebesar 204 g dan berwarna hitam kehijauan dengan bau seperti kopi. Ekstrak metanol yang diperoleh ditentukan berat konstan.

#### *Penentuan berat konstan*

Botol kosong volume 10 ml ditimbang dan dioven pada suhu  $70^\circ C$  selama 1 jam, kemudian dimasukkan ke dalam eksikator selama 1 jam, selanjutnya dilakukan penimbangan kembali. Langkah tersebut diulang sampai diperoleh berat botol yang sama pada dua kali penimbangan berturut-turut.

Botol kosong yang beratnya telah konstan diisi dengan ekstrak buah pare belut sampai penuh, kemudian ditimbang berat awalnya dan dibuat konstan dengan cara yang sama seperti pada botol kosong.

#### *Pengujian aktivitas antioksidan*

Metode yang digunakan dalam pengujian aktivitas antioksidan pada buah pare belut adalah sistem emulsi  $\beta$ -karoten-asam linoleat termodifikasi, yaitu mengganti asam linoleat dengan asam oleat. Penggunaan asam oleat dikarenakan ketersediaan asam linoleat di alam sangat sedikit sehingga digunakan asam oleat. Menurut Ketaren (1986), asam oleat terdapat pada sebagian besar minyak dan lemak, sedangkan asam linoleat hanya terdapat dalam minyak biji *lin* dan *poppy*. Perbedaan struktur asam oleat dan linoleat adalah jumlah ikatan rangkapnya, dimana asam oleat mempunyai satu ikatan rangkap, sedangkan asam linoleat mempunyai dua ikatan rangkap. Ikatan rangkap pada asam lemak mempunyai peran aktif dalam proses oksidasi, semakin banyak ikatan rangkap maka semakin besar tingkat oksidasinya (Joedibrot dan Hadiwidjono 1988).

Prinsip dari metode sistem emulsi  $\beta$ -karoten-asam oleat yaitu pemucatan warna yang merupakan parameter terjadinya reaksi oksidasi pada sistem emulsi tersebut. Semakin tajam penurunan absorbansinya, semakin tinggi tingkat oksidasi lemak yang terjadi. Kemampuan ekstrak dalam menghambat reaksi oksidasi dapat diketahui dari perubahan warna sistem emulsi  $\beta$ -karoten-asam oleat dengan menggunakan spektrofotometer UV-Vis pada panjang gelombang maksimum. Panjang gelombang yang digunakan yaitu panjang gelombang maksimum dari  $\beta$ -karoten.

#### *Penentuan panjang gelombang ( $\lambda$ ) maksimum $\beta$ -karoten*

Sebanyak 1 mg  $\beta$ -karoten dilarutkan dalam 5 ml kloroform, divorteks, dan selanjutnya diambil 0,1 ml dan diencerkan sampai volume 10 ml, kemudian ditera absorbansinya dengan spektrofotometer UV-Vis pada panjang gelombang 400-550 nm.

#### *Pembuatan larutan sampel*

Ekstrak, BHT, dan PG ditimbang masing-masing sebanyak 2 mg, kemudian diencerkan dengan akuabides dalam labu ukur 10 ml.

#### *Pembuatan emulsi $\beta$ -karoten-asam oleat*

Sebanyak 1 mg  $\beta$ -karoten dilarutkan dalam 5 ml kloroform, kemudian divorteks. Sebanyak 3 ml larutan  $\beta$ -karoten dievaporasi pada suhu  $40^\circ C$  untuk menghilangkan kloroform. Selanjutnya ke dalam sampel ditambahkan 60 mg asam oleat, 600 mg Tween 80, dan 150 ml akuabides

kemudian dikocok, sehingga diperoleh emulsi  $\beta$ -karoten-asam oleat yang digunakan untuk analisis antioksidan.

#### *Pengujian aktivitas antioksidan*

Sebanyak 0,2 ml larutan sampel ditambah dengan 5 ml emulsi  $\beta$ -karoten-asam oleat, divorteks, dan ditera absorbansinya pada panjang gelombang maksimum, kemudian diinkubasi pada suhu 50°C dan ditera kembali pada menit ke-120. Sebagai kontrol negatif, emulsi sebanyak 5 ml ditambah dengan 0,2 ml akuabides, sedangkan sebagai blangko yaitu emulsi dari 60 mg asam oleat, 600 mg Tween 80, dan 150 ml akuabides (Kumaran dan Karunakaran 2006).

#### *Perhitungan aktivitas antioksidan*

Data yang diperoleh pada pengujian aktivitas antioksidan adalah absorbansi pada menit ke-0 dan ke-120. Dari data tersebut dapat digunakan untuk mengukur kecepatan degradasi dengan menggunakan persamaan 1.

$$\ln \left| \frac{a}{b} \right| \frac{1}{t} = \text{kecepatan degradasi sampel} \dots\dots\dots (1)$$

Dimana:

- a = absorbansi awal pada menit ke-0
- b = absorbansi pada menit ke-120
- t = waktu (menit)

Aktivitas antioksidan (AA) dinyatakan dalam persentase penghambatan, seperti yang dinyatakan dalam persamaan 2.

$$\Delta \Delta = \frac{Vk - Vs}{Vk} \times 100\% \dots\dots\dots (2)$$

Dimana:

- Vk = kecepatan degradasi kontrol negatif
- Vs = kecepatan degradasi sampel

#### *Penapisan fitokimia ekstrak metanol*

Golongan senyawa yang diuji antara lain fenolat, flavonoid, tanin, dan polifenol serta karotenoid. Golongan senyawa tersebut dipilih karena golongan senyawa fenolat, flavonoid, tanin, dan polifenol terbukti memiliki aktivitas antioksidan (Wangesteen et al. 2004), demikian juga karotenoid merupakan suatu golongan senyawa kimia yang memiliki aktivitas antioksidan (Ismail et al. 2004). Penapisan fitokimia dalam penelitian ini dilakukan dengan menggunakan uji warna atau pengendapan dengan beberapa pereaksi.

#### *Pengujian kandungan fenolat*

Ekstrak ditambah dengan larutan besi (III) klorida 1% dalam akuades. Fenolat positif jika terjadi perubahan warna hijau, merah ungu, atau biru/hitam (Padmawinata dan Soediro 1996).

#### *Pengujian kandungan flavonoid*

Pengujian kandungan flavonoid dilakukan dengan metode Bate-Smith dan Metcalf. Ekstrak ditambah dengan heksana kemudian diaduk, fase heksana dibuang, dan prosedur diulangi hingga larutan heksana tidak berwarna.

Residu dilarutkan dengan alkohol 80% kemudian dibagi dalam 2 tabung. Tabung 1 digunakan sebagai blangko. Adapun tabung 2 ditambah dengan 3 tetes HCl pekat, diamati perubahan warna yang terjadi, dibandingkan dengan larutan blangko, kemudian larutan dihangatkan di atas penangas air selama 15 menit dan diamati perubahan warna yang terjadi.

#### *Pengujian kandungan tanin dan polifenol*

Ekstrak ditambah dengan 3 ml akuades panas, diaduk, dan didinginkan. Setelah itu, ekstrak ditambah dengan 5 tetes NaCl 10% dan disaring. Filtrat dibagi menjadi 3 bagian, yaitu A, B, dan C. Filtrat A digunakan sebagai blangko, ke dalam filtrat B ditambah dengan 3 tetes pereaksi FeCl<sub>3</sub>, dan ke dalam filtrat C ditambahkan garam gelatin. Kemudian diamati perubahan warna yang terjadi.

#### *Pengujian karotenoid*

Pengujian karotenoid dilakukan dengan menggunakan pereaksi Carr Price. Ekstrak ditambah dengan 2-3 tetes larutan jenuh SbCl<sub>3</sub> dalam kloroform. Ekstrak mula-mula berwarna biru kemudian berubah menjadi merah (Puspitasari et al. 2007).

#### *Ekstraksi dengan kepolaran pelarut bertingkat pada ekstrak metanol*

Ekstraksi bertingkat dilakukan terhadap ekstrak metanol dengan menggunakan pelarut-pelarut organik dengan kepolaran yang semakin meningkat secara berurutan, dimulai dengan pelarut heksana, kloroform, etil asetat, dan butanol. Hal ini dilakukan untuk memisahkan golongan senyawa berdasarkan tingkat kepolaran (Diasuti et al. 2003). Proses ekstraksi ini dilakukan dengan menggunakan corong pisah.

Campuran akuabides : metanol (1:4) sebanyak 200 ml ditambahkan ke dalam ekstrak metanol 150 g. Tujuan penambahan campuran akuabides dengan metanol yaitu untuk membuat larutan encer sehingga mudah diekstraksi, dan interaksi komponen kimia dengan pelarut dalam larutan encer akan terjadi lebih mudah, sehingga komponen-komponen kimia yang ada dapat dipisahkan berdasarkan kepolarannya. Hasilnya berupa larutan dengan volume total 300 ml. Larutan kemudian dibagi ke dalam enam corong pisah, kemudian ditambah dengan heksana 50 ml untuk masing-masing corong pisah dan digojog. Proses penggojogan untuk semua ekstrak dilakukan selama 20 menit dan proses pendiaman sebelum kedua lapisan dipisahkan dilakukan selama 2 jam. Adapun proses penguapan (evaporasi) dilakukan dengan menggunakan rotary evaporator pada suhu 40°C dan kecepatan putar 4 rpm.

Lapisan heksana (bagian atas) diambil, kemudian dievaporasi dan diperoleh ekstrak heksana. Lapisan bawah ditambah dengan kloroform 50 ml untuk masing-masing corong pisah kemudian digojog. Lapisan kloroform (bagian bawah) diambil, kemudian dievaporasi dan diperoleh ekstrak kloroform. Lapisan atas ditambah dengan etil asetat 50 ml untuk masing-masing corong pisah. Lapisan etil asetat (bagian atas) diambil, kemudian dievaporasi dan diperoleh ekstrak etil asetat. Lapisan bawah sebanyak 125

ml dibagi ke dalam 2 corong pisah (60 ml dan 65 ml) dan ditambah butanol dengan perbandingan larutan : butanol = 1:1. Lapisan butanol (bagian atas) diambil, kemudian dievaporasi dan diperoleh ekstrak butanol, sedangkan lapisan air (bagian bawah) dievaporasi dan diperoleh ekstrak air.

#### *Penentuan berat konstan terhadap ekstrak*

Masing-masing ekstrak hasil ekstraksi dengan kepolaran pelarut bertingkat ditentukan berat konstannya menggunakan tahapan-tahapan kerja seperti pada penentuan berat konstan ekstrak metanol.

#### *Pengujian aktivitas antioksidan terhadap ekstrak*

Pada masing-masing ekstrak hasil ekstraksi dengan kepolaran pelarut bertingkat dilakukan pengujian antioksidan menggunakan tahapan kerja seperti pada pengujian ekstrak metanol.

#### *Penapisan fitokimia terhadap ekstrak*

Pada masing-masing ekstrak hasil ekstraksi dengan kepolaran pelarut bertingkat dilakukan penapisan fitokimia menggunakan tahapan kerja seperti pada ekstrak metanol.

#### *Analisis kadar fenolat*

Kadar fenolat dianalisis dengan menggunakan reagen Folin-Ciocalteu. Reagen tersebut digunakan karena merupakan pereaksi yang khas untuk senyawa fenolat. Standar yang digunakan dalam penelitian ini adalah asam galat. Asam galat merupakan suatu asam hidroksi benzoat alami yang banyak ditemukan dalam tumbuhan, terutama sebagai penyusun senyawa-senyawa tanin (Koensoemardiyah 1992). Asam galat merupakan standar baku senyawa fenol yang telah direkomendasikan (Prior dan Schaich 2005). Analisis kadar fenolat dilakukan dengan menggunakan spektrofotometer UV-Vis pada panjang gelombang maksimum yang telah diukur.

#### *Penentuan panjang gelombang ( $\lambda$ ) maksimum asam galat*

Sebanyak 1,6 ml (2 mg/10 ml) larutan asam galat diencerkan dengan akuabides dalam labu ukur 10 ml, selanjutnya diambil 30  $\mu$ l dan ditambah dengan reagen Folin-Ciocalteu yang telah diencerkan dengan akuabides dengan perbandingan 1:10. Lima menit kemudian sampel ditambah dengan 1,2 ml  $\text{Na}_2\text{CO}_3$  15% (pengenceran dengan akuabides) dan didiamkan selama 90 menit. Setelah itu, larutan ditera absorbansinya dengan spektrofotometri UV-Vis pada panjang gelombang 500-900 nm.

#### *Pembuatan larutan standar*

Sebanyak 5 mg asam galat (standar) dilarutkan dengan akuabides dan diencerkan dalam labu ukur 50 ml. Larutan standar kemudian diencerkan kembali dengan akuabides menjadi konsentrasi 8, 16, 32, 64, dan 128 mg/L. Variasi konsentrasi dibuat dengan menggunakan rumus:

$$V_1 \times M_1 = V_2 \times M_2.$$

Dimana:

$V_1$  = volume larutan induk yang diambil

$M_1$  = konsentrasi larutan induk (200 mg/L)

$V_2$  = volume larutan yang akan dibuat (10 ml)

$M_2$  = konsentrasi larutan yang akan dibuat

#### *Pembuatan larutan ekstrak*

Sebanyak 6 mg ekstrak dilarutkan dengan akuabides dan diencerkan dalam labu ukur 10 ml.

#### *Pengukuran absorbansi larutan standar dan ekstrak*

Larutan yang diukur yaitu larutan standar dan ekstrak, masing-masing diambil sebanyak 30  $\mu$ l dan ditambah dengan reagen Folin-Ciocalteu yang diencerkan dengan akuabides dengan perbandingan 1:10, didiamkan selama 5 menit, kemudian ditambah dengan 1,2 ml  $\text{Na}_2\text{CO}_3$  15% (pengenceran dengan akuabides), dan didiamkan lagi selama 90 menit. Setelah itu, masing-masing larutan ditera absorbansinya dengan spektrofotometer UV-Vis pada panjang gelombang maksimum. Sebagai blangko digunakan larutan tanpa larutan standar ataupun ekstrak. Penentuan konsentrasi fenolat pada ekstrak dilakukan dengan mengplotkan pada kurva standar asam galat (Song dan Barlow 2004).

#### *Penghitungan kadar fenolat*

Data yang diperoleh dalam analisis kadar fenolat adalah absorbansi asam galat dan sampel. Hasil dari absorbansi tersebut dimasukkan dalam persamaan:  $y = bx + a$  ( $y$  = absorbansi dan  $x$  = kadar fenolat, ekuivalen dalam mg.%), dimana persamaan ini diperoleh dari kurva standar senyawa fenolat dari asam galat standar. Kadar ekstrak yang digunakan dapat dihitung dengan menggunakan persamaan 3. Dari data kadar fenolat dalam larutan sampel dan kadar fenolat dalam ekstrak dapat digunakan untuk menghitung kadar fenolat menggunakan persamaan 4.

$$\text{Kadar ekstrak} = \frac{m}{V_p} \times V \times 100\% \dots\dots\dots (3)$$

$$\text{Kadar fenolat (g GAE/100 g ekstrak)} = \frac{\text{kadar fenolat}}{\text{Kadar ekstrak}} \times 100\% \dots\dots (4)$$

Dimana:

$m$  = massa ekstrak (mg)

$V_p$  = volume pengenceran ekstrak (ml)

$V$  = volume ekstrak yang diukur (ml)

#### *Analisis kadar flavonoid*

Kadar flavonoid dianalisis dengan menggunakan reagen  $\text{AlCl}_3$  dengan standar kuersetin. Kuersetin merupakan golongan flavonoid jenis flavonol dan flavon yang berpotensi sebagai antioksidan. Kuersetin dan kuersetin glikosida merupakan flavonoid yang terkandung pada buah dan sayur (Boyer et al. 2004). Hal ini yang menjadi dasar penggunaan standar baku kuersetin. Analisis flavonoid dilakukan dengan menggunakan spektrofotometer pada panjang gelombang maksimum kuersetin yang telah diukur.

#### *Penentuan panjang gelombang ( $\lambda$ ) maksimum kuersetin*

Sebanyak 7 mg kuersetin diencerkan dengan akuabides dalam labu ukur 25 ml, selanjutnya diambil sebanyak 1 ml dan dimasukkan ke dalam labu ukur 10 ml yang telah berisi

4 ml akuabides, kemudian ditambah dengan 0,3 ml NaNO<sub>2</sub> 5%. Setelah itu, sampel didiamkan selama 6 menit kemudian ditambah dengan 0,3 ml AlCl<sub>3</sub> 10% dan didiamkan selama 6 menit. Selanjutnya, sampel didiamkan selama 5 menit dan ditera absorbansinya dengan spektrofotometer UV-Vis pada panjang gelombang 200-550 nm.

#### Pembuatan larutan standar

Sebanyak 7 mg kuersetin (standar) dilarutkan dengan akuabides dan diencerkan dalam labu ukur 25 ml. Larutan standar kemudian diencerkan kembali dengan akuabides menjadi konsentrasi 6, 32, 64, 128, dan 256 mg/L. Variasi konsentrasi dibuat dengan menggunakan rumus:  $V_1 \times M_1 = V_2 \times M_2$ , seperti pada pembuatan larutan standar asam galat.

#### Pembuatan larutan ekstrak

Sebanyak 15 mg ekstrak dilarutkan dengan akuabides dan diencerkan dalam labu ukur 10 ml.

#### Pengukuran absorbansi larutan standar dan sampel

Larutan yang diukur yaitu larutan standar dan ekstrak, masing-masing diambil 1 ml dan dimasukkan ke dalam labu ukur 10 ml yang berisi 4 ml akuabides, kemudian ditambah dengan 0,3 ml NaNO<sub>2</sub> 5%. Selanjutnya, masing-masing larutan didiamkan selama 6 menit, kemudian ditambah dengan 0,3 ml AlCl<sub>3</sub> 10% dan didiamkan selama 6 menit. Setelah itu, masing-masing larutan ditambah dengan 2 ml NaOH 4% dan diencerkan dengan akuabides. Selanjutnya, masing-masing larutan didiamkan selama 5 menit dan ditera absorbansinya dengan menggunakan spektrofotometer UV-Vis pada panjang gelombang maksimum. Penentuan konsentrasi flavonoid ekstrak dilakukan dengan mengplotkan pada kurva standar kuersetin (Rohman et al. 2006).

#### Penghitungan kadar flavonoid

Data yang diperoleh dalam analisis kadar flavonoid adalah absorbansi kuersetin dan sampel. Hasil dari absorbansi tersebut selanjutnya dimasukkan ke dalam persamaan:  $y = bx + a$  ( $y$  = absorbansi dan  $x$  = kadar flavonoid, ekuivalen dalam mg.%), dimana persamaan ini diperoleh dari kurva standar senyawa flavonoid dari kuersetin standar. Kadar ekstrak yang digunakan dapat dihitung menggunakan persamaan 5. Dari data kadar flavonoid dalam larutan sampel dan kadar flavonoid dalam ekstrak dapat digunakan untuk menghitung kadar flavonoid dengan menggunakan persamaan 6.

$$\text{Kadar ekstrak} = \frac{m}{V_p} \times V \times 100\% \dots\dots\dots (5)$$

$$\text{Kadar flavonoid (g QE/100 g ekstrak)} = \frac{\text{kadar flavonoid}}{\text{kadar ekstrak}} \times 100\% \dots\dots (6)$$

#### Analisis kadar vitamin C

Vitamin C (asam askorbat) dalam penelitian ini dianalisis dengan metode titrasi langsung (iodimetri). Dasar dari metode ini adalah sifat mereduksi dari vitamin C dan titrasi dengan larutan baku iodium.

#### Standarisasi iodium

Vitamin C murni sebanyak 24 mg dilarutkan dalam 25 ml akuabides, kemudian ditambah dengan 1 ml amilum 1% dan dititrasi dengan iodium (1,26 gram I<sub>2</sub> dan 2 gram KI dilarutkan dalam 1 L akuabides) hingga warna berubah menjadi biru.

#### Penentuan kadar vitamin C

Ekstrak sampel ditimbang sebanyak 1 gram, dilarutkan dan diencerkan dengan akuabides dalam labu ukur 50 ml. Selanjutnya diambil sebanyak 25 ml larutan, kemudian ditambah dengan 2 ml amilum 1%. Setelah itu, sampel dititrasi dengan iodium yang sudah distandarisasi (Sudarmadji et al. 1989).

#### Perhitungan analisis kadar vitamin C

Data yang diperoleh pada standarisasi iodium adalah volume yang digunakan untuk mentitrasi vitamin C standar. Data tersebut selanjutnya digunakan untuk menghitung normalitas iodium dengan menggunakan persamaan 7.

$$N_{iod} = \frac{m \times e}{M_r \times V_{iod}} \dots\dots\dots (7)$$

Dimana:

- $m$  = massa vitamin C yang dititrasi (g)
- $V_{iod}$  = volume iodium untuk titrasi (L)
- $N_{iod}$  = normalitas iodium (N)
- $M_r$  = berat molekul vitamin C (g/mol)
- $e$  = valensi vitamin C

Data yang diperoleh pada pengukuran vitamin C ekstrak adalah volume iodium yang diperlukan untuk titrasi ekstrak. Data tersebut digunakan untuk menghitung massa vitamin C dengan menggunakan persamaan 8. Selanjutnya, data tersebut dapat digunakan untuk menghitung kadar vitamin C dengan menggunakan persamaan 9.

$$m \text{ vitamin C} = V_{iod} \times N_{iod} \times \frac{M_r}{e} \times FP \dots\dots\dots (8)$$

$$\% \text{ vitamin C} = \frac{m \text{ vit C}}{M} \times 100\% \dots\dots\dots (9)$$

Dimana:

- FP = faktor pengenceran
- M = massa ekstrak (g)

#### Pengumpulan data

##### Variabel untuk hipotesis a

Variabel X = ekstrak, variabel Y = aktivitas antioksidan. Aktivitas antioksidan dinyatakan sebagai persentase penghambatan relatif proses oksidasi dari  $\beta$ -karoten-asam oleat oleh ekstrak buah pare belut terhadap kontrol negatif (sistem emulsi  $\beta$ -karoten-asam oleat tanpa ekstrak antioksidan).

##### Variabel untuk hipotesis b

Variabel X = ekstrak, variabel Y<sub>1</sub> = kadar fenolat [kadar fenolat dalam ekstrak dinyatakan dalam gram asam galat per 100 gram ekstrak (GAE)], dan variabel Y<sub>2</sub> =

kadar flavonoid [kadar flavonoid dalam ekstrak dinyatakan dalam gram kuersetin per 100 gram ekstrak (QE)].

#### Variabel untuk hipotesis c

Variabel X = ekstrak, variabel  $Y_1$  = aktivitas antioksidan, variabel  $Y_2$  = kadar fenolat, dan variabel  $Y_3$  = kadar flavonoid.

X	$Y_1$	$Y_2$	$Y_3$
Ekstrak kloroform			
Ekstrak etil asetat			
Ekstrak butanol			
Ekstrak air			

#### Analisis data

Ekstrak metanol buah pare belut dinyatakan mempunyai aktivitas antioksidan jika memiliki aktivitas antioksidan dengan persentase penghambatan rata-rata  $\geq 2,5$  eror, dimana eror adalah dua kali standar deviasinya (SD). Jika tidak, kesimpulan dapat diambil, yaitu bahwa hasil penelitian ini *outlier analysis*, yang berarti ekstrak metanol tidak mempunyai aktivitas antioksidan secara bermakna.

Ekstrak buah pare belut dinyatakan mempunyai kadar fenolat dan flavonoid jika positif fenolat dan flavonoid berdasarkan hasil penapisan fitokimia. Hubungan dinyatakan positif jika  $Y_1$ ,  $Y_2$ , dan  $Y_3$  maksimum pada X yang sama, sedangkan untuk  $Y_1$ ,  $Y_2$ , dan  $Y_3$  minimum tidak diperhitungkan, karena dipengaruhi oleh adanya vitamin C.

## HASIL DAN PEMBAHASAN

#### Determinasi sampel

Hasil determinasi sampel yang dilakukan di Laboratorium Taksonomi Tumbuhan, Fakultas Biologi, UGM Yogyakarta menyatakan bahwa sampel yang digunakan pada penelitian ini adalah benar *Trichosanthes anguina* atau pare belut.

#### Aktivitas antioksidan dalam ekstrak metanol

Metode yang digunakan dalam uji aktivitas antioksidan dalam ekstrak metanol yaitu sistem emulsi  $\beta$ -karoten-asam linoleat termodifikasi. Hasil penelitian menunjukkan bahwa ekstrak metanol 2 mg/10 ml mengalami penurunan absorbansi paling lambat, diikuti oleh PG dan BHT, sedangkan absorbansi kontrol negatif menurun dalam waktu relatif lebih cepat dibanding ekstrak lainnya. Hasil uji aktivitas antioksidan dalam ekstrak metanol dapat dilihat pada Tabel 1.

Berdasarkan Tabel 1 dapat diketahui bahwa ekstrak metanol lebih tinggi dibandingkan BHT dan PG. Ekstrak metanol mempunyai aktivitas antioksidan dengan persentase penghambatan sebesar  $29,566 \geq 2,5$  eror. Jadi, dapat disimpulkan bahwa ekstrak metanol buah pare belut mempunyai aktivitas antioksidan secara bermakna.

Keberadaan antioksidan mampu menghalangi terjadinya pemucatan  $\beta$ -karoten melalui netralisasi radikal bebas asam linoleat dan radikal lainnya yang terbentuk dalam sistem

(Kumaran dan Karunakaran 2006). Antioksidan mampu mencegah reaksi oksidasi berantai radikal bebas dengan mendonorkan atom hidrogen dari gugus hidroksil fenol dan membentuk produk akhir yang stabil, yang tidak memulai ataupun memperbanyak reaksi oksidasi selanjutnya (Sherwin 1978).

Hasil penelitian pada antioksidan alami yang lain juga menunjukkan bahwa antioksidan alami memiliki aktivitas antioksidan lebih tinggi dibandingkan antioksidan sintetik. Penelitian yang dilakukan oleh Zin et al. (2002) menghasilkan bahwa ekstrak etil asetat dari akar, buah, dan daun mengkudu memiliki aktivitas antioksidan lebih tinggi dibandingkan BHT.

Kendala yang dihadapi dalam uji aktivitas antioksidan terutama disebabkan oleh pembuatan cuplikan emulsi untuk pengujian aktivitas antioksidan. Emulsi sangat tidak stabil atau cepat rusak dalam hitungan detik. Oleh karena itu, untuk penanganan cuplikan tersebut diperlukan kecepatan kerja yang tinggi.

Berdasarkan hasil penelitian ini dapat disimpulkan bahwa buah pare belut terbukti memiliki aktivitas antioksidan. Selanjutnya dilakukan penapisan fitokimia untuk mengetahui golongan senyawa kimia antioksidan dalam ekstrak metanol.

#### Penapisan fitokimia ekstrak metanol

Hasil pengamatan pada Tabel 2 menunjukkan bahwa ekstrak metanol mengandung semua golongan senyawa yang diuji yaitu fenolat, flavonoid, tanin, polifenol, karotenoid. Adanya flavonoid, tanin, dan polifenol pada ekstrak pare belut juga dinyatakan dalam Kristinawati (2004) bahwa ekstrak etanol pare belut yang diidentifikasi dengan penapisan fitokimia uji warna menunjukkan adanya golongan senyawa flavonoid, alkaloid, saponin, kardenolin/bufadienol, tanin terkondensasi, dan polifenol.

#### Aktivitas antioksidan dalam ekstrak

Aktivitas antioksidan dari masing-masing ekstrak hasil ekstraksi dengan kepolaran pelarut bertingkat dapat diketahui dengan menghitung data yang diperoleh, hasilnya dinyatakan dalam persentase penghambatan. Grafik aktivitas antioksidan ekstrak dan pembanding (BHT dan PG) ditampilkan pada Gambar 1.

Gambar 1 menunjukkan bahwa ekstrak kloroform memiliki aktivitas antioksidan tertinggi dan lebih tinggi dibandingkan BHT dan PG. Aktivitas antioksidan selanjutnya adalah PG>ekstrak air>ekstrak heksana>ekstrak butanol>ekstrak etil asetat>BHT. Kekuatan aktivitas antioksidan ekstrak tergantung pada jenis pelarut yang digunakan untuk mengisolasi, dimana pada kepolaran yang berbeda memiliki potensial komponen kimia antioksidan yang berbeda (Julkunen-Tito 1985; Marinova dan Yanishlieva 1997). Pelarut dengan perbedaan kepolaran akan menarik komponen kimia yang sesuai dan spesifik, sehingga masing-masing ekstrak akan memiliki komponen kimia yang belum tentu sama. Untuk itu, langkah selanjutnya adalah dengan melakukan penapisan fitokimia pada masing-masing ekstrak untuk mengetahui golongan senyawa yang mempengaruhi aktivitas antioksidan.

### Penapisan fitokimia ekstrak

Hasil pengamatan pada Tabel 3 menunjukkan bahwa semua ekstrak positif fenolat, kecuali ekstrak heksana. Hal ini dikarenakan pelarut heksana bersifat nonpolar, sedangkan fenolat lebih bersifat polar, sehingga golongan senyawa fenolat tidak terekstrak pada pelarut heksana. Flavonoid yang merupakan golongan terbesar dari senyawa fenolat merupakan golongan senyawa yang bersifat polar, sehingga akan larut dalam pelarut polar. Pada ekstrak kloroform diduga flavonoid yang terekstrak adalah isoflavon, flavanon, flavon, serta flavonol, hal ini dikarenakan jenis-jenis flavonoid tersebut merupakan aglikon yang kurang polar dan mudah larut dalam pelarut kloroform (Markham 1988).

Karotenoid adalah golongan senyawa selain fenolat yang diduga berperan sebagai antioksidan yang terkandung dalam ekstrak nonpolar, yaitu pada ekstrak n-heksana. Sembilan puluh persen karotenoid tersusun dari  $\beta$ -karoten dan  $\alpha$ -karoten (Silalahi 2006). Beta-karoten merupakan kelompok karotenoid yang paling umum ditemukan dalam tumbuhan (Padmawinata dan Soediro 1996). Beta-karoten adalah salah satu antioksidan yang bersifat alami (Rahardjo 1996) dan merupakan macam vitamin yang telah terbukti mempengaruhi tingginya aktivitas antioksidan (Ismail et al. 2004).

### Analisis fenolat

Pada semua ekstrak dianalisis kadar fenolatnya, kecuali ekstrak heksana, hal ini dikarenakan hasil penapisan fitokimia terhadap ekstrak heksana menunjukkan hasil yang negatif. Berdasarkan hasil yang diperoleh, reaksi positif untuk analisis fenolat ditunjukkan oleh semua ekstrak. Kadar fenolat dalam ekstrak disajikan dalam Gambar 2.

Berdasarkan Gambar 2 terlihat bahwa kadar fenolat tertinggi dimiliki oleh ekstrak kloroform, diikuti oleh ekstrak butanol, ekstrak etil asetat, ekstrak metanol, dan yang paling rendah yaitu ekstrak air. Golongan senyawa fenolat merupakan senyawa yang mengandung cincin aromatik dengan satu atau lebih gugus hidroksil, dan flavonoid merupakan salah satu golongan senyawa fenolat yang paling banyak ditemukan pada tanaman.

### Analisis flavonoid

Jenis ekstrak yang dianalisis kadar flavonoid sama dengan jenis yang dianalisis kadar fenolatnya yaitu semua ekstrak, kecuali ekstrak heksana. Berdasarkan hasil yang diperoleh, semua ekstrak menunjukkan reaksi positif untuk kadar flavonoid. Kadar flavonoid dalam ekstrak dapat dilihat pada Gambar 3.

Pengamatan pada Gambar 3 menunjukkan bahwa kadar flavonoid tertinggi dimiliki oleh ekstrak kloroform, diikuti oleh ekstrak metanol, butanol, ekstrak etil asetat, dan yang paling rendah yaitu ekstrak air. Ekstrak kloroform memiliki kadar flavonoid paling tinggi. Flavonoid yang terkandung dalam ekstrak kloroform diduga merupakan flavonoid jenis isoflavon, flavon, dan flavonol, karena menurut Markham (1988), aglikon flavonoid yang kurang polar, seperti jenis flavonoid yang telah disebutkan, akan lebih mudah larut dalam pelarut kloroform.

### Analisis kadar vitamin C

Hasil pengamatan pada Gambar 4 menunjukkan bahwa ekstrak metanol mengandung vitamin C lebih tinggi dibandingkan ekstrak air. Hal ini dikarenakan untuk mendapatkan ekstrak air melalui perlakuan yang lebih banyak dan proses yang lebih lama dibandingkan ekstrak metanol. Jadi, urutan untuk mendapatkan ekstrak metanol lebih awal dibandingkan ekstrak air, dimana ekstrak air merupakan ekstrak residu atau ekstrak yang terakhir, sehingga hanya mengandung sebagian vitamin C yang diambil dari ekstrak metanol. Alasan inilah yang menyebabkan kadar vitamin C lebih banyak pada ekstrak metanol dibandingkan dengan ekstrak air, dimana seharusnya vitamin C lebih larut di dalam pelarut polar.

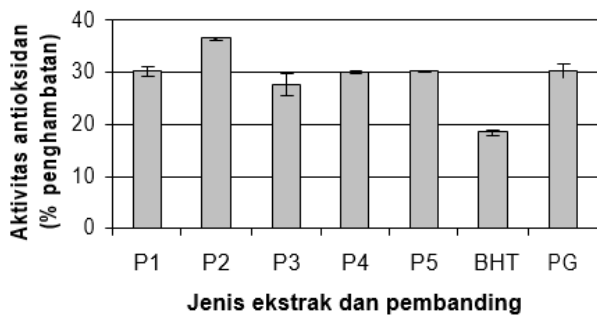
### Hubungan aktivitas antioksidan dengan kadar fenolat dan kadar flavonoid

Ekstrak heksana tidak memiliki golongan senyawa fenolat dan flavonoid berdasarkan pada hasil penapisan fitokimia, sehingga tidak dilakukan analisis kadar fenolat dan flavonoid. Ekstrak heksana yang tidak memiliki golongan fenolat yang bersifat antioksidan aktif, tetapi mempunyai aktivitas antioksidan disebabkan oleh adanya golongan senyawa karotenoid yang telah diidentifikasi dengan penapisan fitokimia. Karotenoid terbesar dalam tumbuhan adalah  $\beta$ -karoten (Padmawinata et al. 1996), dimana  $\beta$ -karoten merupakan faktor yang mempengaruhi tingginya aktivitas antioksidan (Ismail et al. 2004).

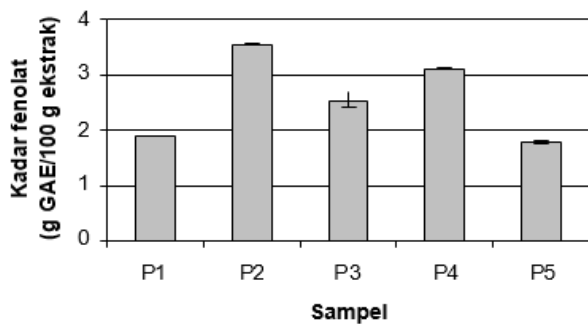
Ekstrak kloroform mempunyai aktivitas antioksidan paling tinggi dibandingkan dengan pembanding sintetik dan ekstrak yang lain. Kondisi tersebut selain dipengaruhi oleh kandungan fenolat dan flavonoid, juga dipengaruhi oleh golongan senyawa karotenoid, sedangkan pada ekstrak air selain dipengaruhi oleh kandungan fenolat dan flavonoid, juga dipengaruhi oleh kandungan vitamin C yang mengakibatkan aktivitas antioksidannya cukup tinggi. Hasil penelitian Tee et al. (1996) menunjukkan bahwa aktivitas antioksidan kubis dan bayam dipengaruhi oleh tingginya kandungan karotenoid dan asam askorbat (vitamin C) dalam sayuran tersebut.

Hasil pada Tabel 4 menunjukkan bahwa  $Y_1$ ,  $Y_2$ , dan  $Y_3$  maksimum pada X yang sama, yaitu pada ekstrak kloroform. Jadi, dapat disimpulkan bahwa hubungan aktivitas antioksidan dengan kadar fenolat dan kadar flavonoid dinyatakan positif. Ekstrak kloroform mempunyai aktivitas antioksidan tertinggi dan ternyata kandungan fenolat dan flavonoidnya juga tertinggi.

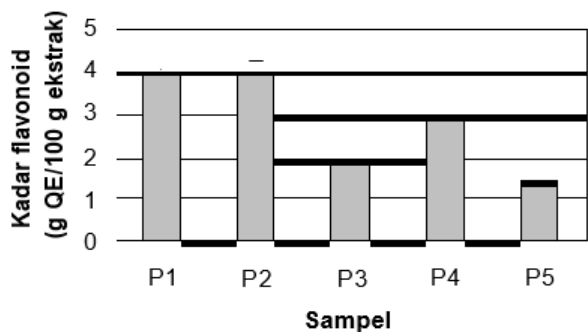
Hasil penelitian menunjukkan bahwa ekstrak kloroform buah pare belut yang mengandung kadar tertinggi untuk fenolat dan flavonoid, paling tinggi aktivitas antioksidannya. Hasil yang sama juga ditunjukkan oleh penelitian Kumar et al. (2008), yang meneliti aktivitas antioksidan, kandungan fenolat dan flavonoid pada beberapa jenis tanaman obat. Hasil penelitian tersebut menunjukkan bahwa ekstrak daun teh (*Camellia sinensis*) yang mengandung kadar fenolat dan flavonoid paling tinggi, mempunyai aktivitas antioksidan yang paling tinggi.



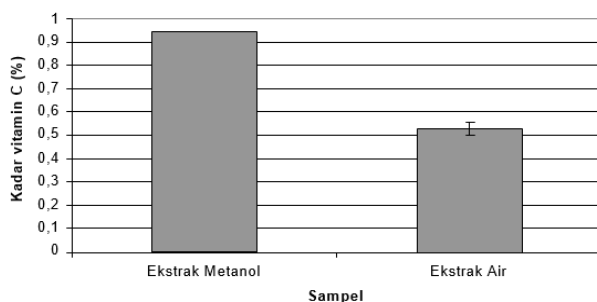
**Gambar 1.** Perbandingan aktivitas antioksidan ekstrak (P1: metanol, P2: kloroform, P3: etil asetat, P4: butanol, dan P5: air) dengan pembandingnya (BHT: butil hidoksi toluen dan PG: propil galat).



**Gambar 2.** Perbandingan kadar fenolat ekstrak: metanol, kloroform, etil asetat, butanol, dan air. Kadar senyawa fenolat paling tinggi terdapat dalam ekstrak kloroform.



**Gambar 3.** Perbandingan kadar flavonoid ekstrak: P1: metanol, P2: kloroform, P3: etil asetat, P4: butanol, dan P5: air. Kadar senyawa flavonoid paling tinggi terdapat dalam ekstrak kloroform



**Gambar 4.** Perbandingan kadar vitamin C dalam ekstrak metanol dan ekstrak air. Kadar vitamin C ekstrak metanol lebih besar dibandingkan ekstrak air

**Tabel 1.** Aktivitas antioksidan ekstrak metanol, BHT, dan PG

X (Ekstraktan)	Y (Aktivitas Antioksidan)	Standar Deviasi (SD)
BHT	16,268	0,902
PG	29,452	0,107
Ekstrak metanol	29,566	0,751

**Tabel 2.** Hasil penapisan fitokimia ekstrak metanol

Golongan Senyawa	Hasil
Fenolat	+
Flavonoid	+
Tanin* dan polifenol	+
Karotenoid	+

Keterangan: + = Mengandung golongan senyawa yang dimaksud, \*Tanin terkondensasi

**Tabel 3.** Hasil penapisan fitokimia ekstrak: Heksana, kloroform, etil asetat, butanol, dan air

Golongan senyawa	Hasil				
	Ekstrak heksana	Ekstrak kloroform	Ekstrak etil asetat	Ekstrak butanol	Ekstrak air
Fenolat	-	+	+	+	+
Flavonoid	-	+	+	+	+
Tanin* dan polifenol	-	+	+	+	+
Karotenoid	+	+	-	Tidak dilakukan	

Keterangan: - = Tidak mengandung senyawa yang dimaksud, + = mengandung senyawa yang dimaksud, \*Tanin terkondensasi

**Tabel 4.** Hubungan ekstraktan dengan kadar fenolat dan flavonoid

X (Ekstraktan)	Y <sub>1</sub> (Aktivitas Antioksidan)	Y <sub>2</sub> (Kadar Fenolat)	Y <sub>3</sub> (Kadar Flavonoid)
Ekstrak kloroform	36,384±0,004	3,547±0,014	4,162±0,109
Ekstrak etil asetat	27,684±2,096	2,553±0,111	1,751±0,145
Ekstrak butanol	29,986±0,224	3,114±0,014	2,944±0,163
Ekstrak air	30,254±0,120	1,776±0,042	1,392±0,072

Ekstrak kloroform mempunyai aktivitas antioksidan tertinggi, tetapi aktivitasnya tidak terlalu jauh dengan keempat ekstrak yang lainnya. Aktivitas antioksidan dari kelima ekstrak, yaitu ekstrak heksana, kloroform, etil asetat, butanol, dan air mempunyai rata-rata sebesar 30,911% penghambatan dengan SD=3,244. Berdasarkan rata-rata tersebut maka dapat dikatakan bahwa kelima ekstrak tersebut tidak berbeda nyata. Seluruh ekstrak yang digunakan menghasilkan aktivitas antioksidan yang tinggi, hal ini juga telah dibuktikan dengan membandingkan aktivitasnya dengan pembanding sintetikanya. Oleh karena itu, buah pare belut sangat potensial untuk digunakan sebagai sumber antioksidan alami.

## KESIMPULAN

Ekstrak metanol buah pare belut mempunyai aktivitas antioksidan sebesar 29,566%, lebih tinggi dibandingkan BHT (16,268%) dan relatif sama dengan PG (29,452%). Ekstrak metanol, kloroform, etil asetat, butanol, dan air masing-masing mengandung fenolat sebesar 1,904; 3,547; 2,553; 3,114; dan 1,776 g GAE/100 g ekstrak dan flavonoid sebesar 4,072; 4,162; 1,751; 2,944; dan 1,392 g QE/100 g ekstrak. Aktivitas antioksidan ekstrak kloroform memiliki hubungan yang positif terhadap kadar fenolat dan flavonoid, yaitu ekstrak kloroform yang mempunyai aktivitas tertinggi dengan kadar fenolat dan flavonoid tertinggi.

## DAFTAR PUSTAKA

- Amarowicz R, Naczek M, Zadernowski R, Shahid F. 2000. Antioxidant activity of condensed tannins of beach pea, canola hulls, evening primrose, and faba bean. *J Food Lipids* 7: 195-205.
- Andayani R, Lisawati Y, Maimunah. 2008. Penentuan aktivitas antioksidan, kadar fenolat total dan likopen pada buah tomat (*Solanum lycopersicum* L.). *Jurnal Sains dan Teknologi Farmasi* 13 (1): 31-37.
- Boyer J, Brown D, Liu R. 2004. Uptake of quercetin and quercetin-3-glucoside from whole onions and apple peels by Caco-2 cell monolayers. *J Agric Food Chem* 52: 7172-7179.
- Diastuti H, Achmad S, Ratnaningsih E. 2003. Fraksinasi dan uji aktivitas ekstrak akar *Piper sarmentosum* Roxb. ex Hunter terhadap jamur *Candida albicans*. *Majalah Farmasi Indonesia* 15 (2): 57-61.
- Emmons CL, Peterson DM. 1999. Antioxidant activity and phenolic contents of oat groats and hulls. *Cereal Chem* 76 (6): 902-906.
- Ismail A, Marjan ZM, Foong CW. 2004. Total antioxidant activity and phenolic content in selected vegetables. *Food Chem* 87: 581-586.
- Joedibrotro R, Hadiwidjono SWP. 1988. *Kimia organik* 2. ITB, Bandung.
- Julkunen-Tiito, R. 1985. Phenolic constituents in the leaves of northern willows, methods for the analysis of certain phenolics. *J Agric Food Chem* 33: 213-217.
- Karyadi E. 1997. Antioksidan, resep sehat dan umur panjang. [www.indonesia.com](http://www.indonesia.com). [29 Maret 2009].
- Ketaren S. 1986. *Pengantar teknologi lemak dan minyak pangan*. UI Press, Jakarta.
- Koensoemardiyah. 1992. *Biosintesis produk alami*. Edisi ke-1. IKIP Semarang Press, Semarang.
- Kristinawati D. 2004. *Isolasi dan Identifikasi Komponen Kimia Pare Belut (Trichosanthes anguina L.) dalam Ekstrak Etanol*. [Skripsi]. Universitas Sebelas Maret, Surakarta.
- Kumar AS, Mazumder A, Vanitha J et al. 2008. Evaluation of antioxidant activity, phenol and flavonoid contents of some selected Indian medicinal plants. *Pharmacogn Mag* 4 (13): 143-147.
- Kumaran A, Karunakaran RJ. 2006. Antioxidant and free radical scavenging activity of an aqueous extract of *Coleus aromaticus*. *Food Chem* 97 (1): 109-114.
- Lenny S. 2006. *Senyawa flavonoida, fenil propanoida dan alkaloida*. [library.usu.ac.id/download/fmipa/06003489.pdf](http://library.usu.ac.id/download/fmipa/06003489.pdf). [29 Maret 2009].
- Marinova EM, Yanishlieva NVI. 1997. Antioxidative activity of extracts from selected species of the family Lamiaceae in sunflower oil. *Food Chem* 58: 245-248.
- Markham KR. 1988. *Cara mengidentifikasi flavonoid*. ITB Press, Bandung.
- Ojiako OA, Igwe CU. 2008. The nutritive, anti-nutritive and hepatotoxic properties of *Trichosanthes anguina* (snake tomato) fruits from Nigeria. *Pakistan Journal of Nutrition* 7 (1): 85-89.
- Ordonez L, Gomez D, Vattuone A et al. 2005. Antioxidant activities of *Sechium edule* (Jacq.) Swartz extracts. *Food Chem* 97: 452-458.
- Padmawinata K, Soediro I. 1996. *Metode fitokimia, penuntun cara modern menganalisis tumbuhan*. Edisi ke-2. ITB Press, Bandung.
- Prior RL, Schaich K. 2005. Standardized methods for the determination of antioxidant capacity and phenolics in foods and dietary supplements. *J Agric Food Chem* 53 (10): 4290-4302.
- Puspitasari A, Gunawan D, Soegihardjo C et al. 2007. *Petunjuk praktikum kimia produk alami*. Fakultas Farmasi, Universitas Gadjah Mada, Yogyakarta.
- Rahardjo S. 1996. *Antioksidan dalam makanan dan minuman fungsional*. *Kursus Singkat Makanan Fungsional PAU Pangan dan Gizi*. Universitas Gadjah Mada, Yogyakarta.
- Rohman A, Riyanto S, Utari D. 2006. Aktivitas antioksidan, kandungan fenolik total, dan kandungan flavonoid total ekstrak etil asetat buah mengkudu serta fraksi-fraksinya. *Majalah Farmasi Indonesia* 17 (3): 136-142.
- Sherwin ER. 1978. Oxidation and antioxidants in fat and oil processing. *J Am Oil Chem Soc* 55: 809-814.
- Silalahi J. 2006. *Makanan fungsional*. Kanisius, Yogyakarta.
- Soeatmaji DW. 1998. Peran stress oksidatif dalam patogenesis angiopati mikro dan makro DM. *Medica* 5 (24): 318-325.
- Song Y, Barlow PJ. 2004. Antioxidant activity and phenolic content of selected fruit seeds. *Food Chemistry* 88: 411-417.
- Souri E, Amin G, Farsam H et al. 2008. Screening of antioxidant activity and phenolic content of 24 medicinal plant extracts. *Daru* 16 (2): 83-87.
- Sudarmadji S, Haryono B, Suhardi. 1984. *Prosedur analisis untuk bahan makanan dan pertanian*. Universitas Gadjah Mada, Yogyakarta.
- Tee ES, Rajam K, Young SI, Khor SC, Zakiah HO. 1996. *Laboratory Procedures in Nutrient Analysis of Foods*. Division of Human Nutrition, Institute for Medical Research, Kuala Lumpur, Malaysia.
- Tjitrosoepomo G. 1989. *Taksonomi tumbuhan (Spermatophyta)*. Gadjah Mada University Press, Yogyakarta.
- Trilaksani W. 2003. *Antioksidan: Jenis, sumber, mekanisme kerja, dan peran terhadap kesehatan*. [www.tumoutou.net](http://www.tumoutou.net). [29 Maret 2009].
- Utami W, Dai M, Sofiana YR. 2005. Aktivitas penangkap radikal dengan metode DPPH serta penetapan kandungan fenol dan flavonoid dalam ekstrak kloroform, ekstrak etil asetat, ekstrak etanol daun dewandaru (*Eugenia uniflora* L.). *Pharmaceutical Journal of Indonesia* 6: 5-9.
- Wangenstein H, Samuelsen AB, Materud KE. 2004. Antioxidant activity in extracts from coriander. *Food Chem* 88 (2): 293-297.
- Winarsi H. 2007. *Antioksidan alami dan radikal bebas*. Penerbit Kanisius, Yogyakarta.
- Zin ZM, Hamid A, Osman. 2002. Antioxidative activity of extracts from mengkudu (*Morinda citrifolia* L.) root, fruit, and leaf. *Food Chem* 78: 227-231.