

DPPH RADICAL SCAVENGING ACTIVITY OF AQUEOUS FRACTION FROM ETHANOLIC EXTRACT OF TALOK FRUIT (*Muntingia calabura L.*)

PENGARUH HIDROLISIS ASAM-BASA TERHADAP AKTIVITAS PENANGKAPAN RADIKAL 2-2' DIFENIL-1-PIKRIL HIDRAZIL (DPPH) FRAKSI AIR DARI EKSTRAK ETANOLIK BUAH TALOK (*Muntingia calabura L.*)

Tatang Irianti*, Yosi Bayu Murti, Damiana Nitya Kanistri, Desi Riza Pratiwi, Kuswandi
and Ratih Anggar Kusumaningtyas

Faculty of Pharmacy, Universitas Gadjah Mada, Yogyakarta, Sekip Utara 55281

ABSTRACT

*The investigation of talok fruits (*Muntingia calabura L.*) was shown the antioxidant activity of aqueous fraction of the ethanolic extract is relatively low. Hydrolysis treatment has increased the antioxidant activity by releasing the flavonoid aglycone from glycoside form. This study aims to determine the effect of acid and alkaline hydrolysis, and hydrolysis time on the antioxidant activity of aqueous fraction of calabura fruits ethanolic extract. The antioxidant activity of acid hydrolyzed aqueous fractions in 1 and 3h hydrolysis, respectively 9.5 and 1.5 times more potent than the aqueous fraction, while the alkaline in 1 and 3h hydrolysis were 2.5 and 6.5 times. Flavonoid aglycone liberated on acid hydrolysis and alkaline had different antioxidant activity. The value of IC_{50} by acid hydrolyzed aqueous fraction in 1h and 3h hydrolysis of 20.55 and 97.88 $\mu\text{g/mL}$, while the alkaline in 1h and 3h hydrolysis of 66.64 and 25.53 $\mu\text{g/mL}$. One hour acid hydrolysis had antioxidant activity greater than 3h whereas in alkaline the greatest antioxidant activity is shown in 3h.*

*Key words: talok fruits (*Muntingia calabura L.*), antioxidant, DPPH, acid hydrolysis, alkaline hydrolysis*

ABSTRAK

*Kandungan flavonoid dalam buah talok (*Muntingia calabura L.*) terbukti memiliki aktivitas antioksidan. Perlakuan hidrolisis mampu meningkatkan aktivitas antioksidan melalui pembebasan aglikon flavonoid dari bentuk glikosidanya. Penelitian ini bertujuan untuk mengetahui pengaruh hidrolisis asam dan basa serta waktu hidrolisis terhadap aktivitas antioksidan fraksi air ekstrak etanolik buah talok. Ekstrak kental etanolik buah talok difraksinasi menggunakan n-heksan, fraksi yang tak larut heksan diuapkan dan ditambah akuades kemudian dipartisi dengan etil asetat. Fase yang larut air diuapkan sehingga didapatkan fraksi air. Fraksi air ekstrak etanolik kemudian dihidrolisis menggunakan HCl dan NaOH 2N selama 1 jam dan 3 jam. Pengujian aktivitas antioksidan fraksi air dan fraksi air terhidrolisis menggunakan metode penangkapan radikal DPPH. Hasil ini selanjutnya dianalisis menggunakan uji paired-samples t-test pada SPSS for Windows 17.0. Untuk mengidentifikasi flavonoid yang memiliki aktivitas antioksidan, dilakukan analisis kualitatif kromatografi lapis tipis (KLT). Penampakan bercak dilakukan menggunakan uap amonia, pereaksi semprot anisaldehyd asam sulfat, $AlCl_3$, $FeCl_3$ dan DPPH. Aktivitas antioksidan fraksi air terhidrolisis asam 1 jam dan 3 jam berturut-turut 9,5 dan 1,5 kali lebih poten dari fraksi air, sedangkan pada basa 1 jam dan 3 jam sebesar 2,5 dan 6,5 kali. Aglikon flavonoid terbebaskan pada hidrolisis asam dan basa memiliki aktivitas antioksidan yang berbeda. Nilai IC_{50} fraksi air terhidrolisis asam 1 jam dan 3 jam sebesar 20,55 dan 97,88 $\mu\text{g/mL}$, sedangkan pada basa 1 jam dan 3 jam sebesar 66,64 dan 25,53 $\mu\text{g/mL}$. Hidrolisis asam 1 jam memiliki aktivitas antioksidan lebih besar daripada yang dihidrolisis 3 jam sedangkan pada basa aktivitas antioksidan terbesar ditunjukkan pada 3 jam.*

*Kata kunci : talok (*Muntingia calabura L.*), antioksidan, DPPH, hidrolisis asam, hidrolisis basa*

PENDAHULUAN

Penyakit-penyakit yang sering diderita oleh masyarakat modern seperti gangguan kardio-

vaskular, kanker, penurunan sistem imun dan kerusakan otak (Pervical, 1998). Penyebab penyakit tersebut distimulasi oleh adanya kerusakan dan stres oksidatif oleh radikal bebas hasil metabolisme tubuh (Balsano & Alisi, 2009; Jacob & Burri, 1996). Radikal bebas memiliki

Corresponding Author : Tatang Irianti
Email : itanti@yahoo.com

elektron tidak berpasangan sehingga bersifat sangat reaktif dan mudah bereaksi dengan molekul lain (Geckil dkk., 2005; Halliwell & Gutteridge, 1999).

Secara alami, tubuh mampu mengendalikan radikal bebas karena memiliki sistem pertahanan oksidatif. Bila radikal bebas ini jumlahnya berlebihan maka diperlukan senyawa antioksidan untuk mengatasinya (Halliwell, 2001). Antioksidan dapat menurunkan atau menghambat proses oksidasi dengan menghentikan reaksi berantai oksidatif sehingga mampu melindungi tubuh dari kerusakan oksidatif (Zengin dkk., 2010). Penggunaan antioksidan sintetis pada suplemen makanan dan minuman dapat menimbulkan efek samping apabila dikonsumsi terus menerus. Beberapa penelitian menunjukkan pemakaian antioksidan sintetis dapat memicu karsinogenik dan menyebabkan kerusakan hati (Amarowicz dkk., 2000; Osawa & Namiki, 1981).

Buah dan sayur merupakan antioksidan alami karena mengandung vitamin C dan E, karotenoid, senyawa fenolik, flavonoid dan polifenol (Sies & Stahl, 1995; Su dkk., 2003; Vinson dkk., 1999; Preethi dkk., 2010). Konsumsi antioksidan alami pada buah dan sayur mampu melindungi tubuh dari kerusakan oksidatif dan mengurangi resiko terjadinya penyakit kronis, seperti kanker (Jacob & Burri, 1996; Ghiselli dkk., 1998).

Senyawa fenolik dan flavonoid pada tanaman tersedia dalam bentuk glikosida sedangkan sangat jarang dalam bentuk bebasnya (Annegowda dkk., 2010). Dengan membebaskan aglikon dari bentuk glikosida yang bersifat polar diharapkan dapat meningkatkan aktivitas antioksidan fraksi air/polar. Pembebasan aglikon ini dapat dilakukan dengan cara hidrolisis asam atau basa (Harborne JB, 1965 dan Sani dkk 2012). Tubesha dkk. (2011) meneliti aktivitas antioksidan dari ekstrak metanol biji *Nigella sativa* meningkat setelah dihidrolisis dalam suasana basa dan Sani dkk. (2012) membuktikan aktivitas antioksidan ekstrak *Germinated Brown Rice* (GBR) dengan metode ABTS dan ferri tiosianat meningkat setelah GBR dihidrolisis basa sedangkan GBR terhidrolisis asam memiliki aktivitas antioksidan yang lebih besar dengan metode DPPH.

Irianti dkk. (2013) menunjukkan adanya perbedaan signifikan aktivitas antioksidan antara fraksi air ekstrak etanolik daun mengkudu terhidrolisis 1 jam dan 3 jam. Perbedaan ini disebabkan oleh produk hidrolisis yang dihasilkan. Kecepatan hidrolisis bergantung pada struktur aglikon, derajat hidrosilasi, jenis gula dan posisi penempelan gula (Alaniya, 1977).

Kim dan Jang (2010) juga menyatakan bahwa secara *in vitro* kemampuan penangkapan radikal hidroksil dan peroksi radikal ekstrak daun Mulberry meningkat setelah perlakuan hidrolisis. Teh yang dihidrolisis dengan bantuan enzim tannase dilaporkan memiliki aktivitas antioksidan *in vitro* lebih tinggi dibandingkan sebelum hidrolisis. Hal ini dikonfirmasi dengan menggunakan uji DPPH dan sistem ORAC (Molyneux, dkk., 2004).

Sedangkan pada ekstrak biji Mangga (*Mangifera indica* Linn.) menunjukkan peningkatan aktivitas antioksidan pada pengujian dengan metode ABTS, DPPH, dan Ferri tiosianat (Pietta, 2000). Penelitian lain dilakukan oleh Wang, dkk (2002) pada *Anoectochilus formosanus* Hayata (Orchidaceae) menyatakan bahwa prosedur hidrolisis asam dapat secara signifikan meningkatkan aktivitas antioksidan ekstrak. Oleh sebab itu, Wang, dkk.,(2002) menawarkan prosedur hidrolisis sebagai prosedur rutin untuk mengevaluasi kekuatan antioksidan dari berbagai ekstrak tanaman. Aktivitas antioksidan dievaluasi dengan menggunakan metode penangkapan radikal DPPH yang diekspresikan dengan nilai IC₅₀.

Buah talok atau *Muntingia calabura* L. tumbuh dengan baik di Indonesia, tetapi pemanfaatannya belum optimal. Berdasarkan penelitian yang dilakukan oleh Preethi dkk. (2010), buah talok memiliki aktivitas antioksidan dan ekstrak metanol memiliki aktivitas antioksidan tertinggi dibandingkan dengan ekstrak petroleum eter, kloroform, etil asetat, dan butanol. Sedangkan aktivitas antioksidan ekstrak air buah talok lebih rendah dibandingkan dengan ekstrak metanol, etanol dan aseton (Kolar dkk., 2011). Oleh karena itu, perlu adanya penelitian dengan prosedur hidrolisis pada fraksi air untuk membandingkan aktivitas antioksidannya.

METODOLOGI

Bahan

Buah talok diambil dari Banjarsari, Leses, Manisrenggo, Klaten pada bulan Desember 2013. Pelarut dalam penelitian ini adalah pelarut kualitas teknis seperti etanol 96%, heksan, etil asetat, dan kualitas pro analisis (Merck) seperti methanol, etanol, heksan, etil asetat, kuersetin (Sigma aldrich), 2,2'-difenil-1-pikrilhidrazil (DPPH), penampak bercak AlCl₃, aquadest, HCl 2 N (Laboratorium Penelitian Departemen Biologi Farmasi UGM).

Ekstraksi dan Partisi

Ekstraksi buah talok menggunakan metode Preethi, dkk. (2010) dengan berbagai modifikasi.

Sebanyak 950 gram buah talok diblender sampai halus kemudian jus talok dimaserasi menggunakan 5L etanol 96% (teknis) selanjutnya disaring untuk mendapatkan sari buah talok. Sari buah talok diuapkan sampai didapatkan ekstrak kental. Sebanyak 10g ekstrak etanolik dilarutkan dalam 25mL etanol 70% (teknis) hingga larut sempurna. Ekstrak dipartisi cair-cair menggunakan 50mL n-heksan (teknis) menggunakan corong pisah. Partisi dilakukan sampai fase heksan tak berwarna. Fase heksan dan fase non-heksan diuapkan sampai kental. Fase tak larut heksan ditambah aquadest sebanyak 25mL kemudian dipartisi cair-cair dengan etil asetat 50mL. Partisi dilakukan sampai fase etil asetat tak berwarna. Fase air dan fase etil asetat diuapkan sampai kental.

Hidrolisis

Metode hidrolisis asam dilakukan berdasarkan penelitian Wang dkk. (2002) dengan modifikasi. Sebanyak 3 gram fraksi air dilarutkan dalam 25 mL 2N HCl dan 25 mL etanol 96%. Larutan dimasukkan dalam labu alas bulat dan direfluks selama 60 menit dan 180 menit. Prosedur hidrolisis basa mengacu pada penelitian Annegowda dkk. (2010) dengan berbagai modifikasi. Fraksi air ekstrak etanol buah talok dilarutkan dalam 2N NaOH dan etanol 96% kemudian direfluks selama 60 dan 180 menit. Menggunakan metode Markham (1988), setelah larutan didinginkan dilakukan partisi cair-cair berulang dengan etil asetat (1:1 v/v). Fraksi etil asetat disaring menggunakan natrium sulfat anhidrat untuk menghilangkan tapak air. Fraksi etil asetat diuapkan di lemari asam hingga kental. Fase air tidak digunakan dalam penelitian ini.

Aktivitas penangkapan radikal DPPH

Ekstrak sebanyak 25 mg ditambah metanol 2 mL dalam vial dan disaring ke dalam labu takar kemudian ditambahkan metanol sampai 5,0 mL sehingga diperoleh konsentrasi 5mg/mL. Demikian juga pembanding kuersetin dibuat dengan konsentrasi 1 mg/mL. Larutan ini digunakan sebagai larutan induk dan nantinya akan dibuat seri kadar sesuai konsentrasi yang diinginkan.

Sebanyak kurang lebih 15,8 mg serbuk DPPH dilarutkan dengan metanol dan divortex untuk membantu kelarutan. Larutan kemudian dipindahkan ke dalam labu takar lalu metanol ditambahkan sampai 100,0 mL. Larutan disimpan dalam wadah gelap berlapis *aluminium foil* dan disimpan pada suhu -4°C.

Sejumlah larutan ekstrak direaksikan dengan 1,0 mL DPPH dan ditambah metanol sampai 5,0 mL pada labu takar. Ekstrak diukur

pada panjang gelombang maksimum DPPH dengan *operating time* tertentu. Penentuan besarnya IC₅₀ dilakukan dengan membuat 5 seri kadar ekstrak. Blangko yang digunakan adalah metanol dan sampel tanpa DPPH sebagai kontrol warna. Konsentrasi ekstrak yang digunakan pada kontrol warna sama dengan konsentrasi ekstrak pada larutan uji.

Kromatografi lapis tipis

Analisis kualitatif ekstrak dan fraksi buah talok dilakukan dengan kromatografi lapis tipis (KLT). Hasil analisis dengan KLT ini digunakan untuk mengamati bercak ekstrak buah talok. Fase diam yang digunakan adalah silika gel 60 F₂₅₄. Sebelum dilakukan analisis kromatografi fase diam plat silika gel 60 F₂₅₄ diaktifkan terlebih dahulu pada suhu 105°C selama 10 menit. Ekstrak ditotolkan pada fase diam kemudian dikembangkan sesuai dengan fase gerak yang sesuai.

Fase gerak kloroform : metanol : asam formiat (44:3,5:2,5) digunakan untuk melihat profil fitokimia ekstrak etanol, fraksi heksan, fraksi etil asetat dan fraksi air, sedangkan fase gerak toluen : etil asetat : asam formiat (7:2:1) digunakan untuk membedakan bercak fraksi air, fraksi air terhidrolisis asam 1 jam, fraksi air terhidrolisis asam 3 jam, fraksi air terhidrolisis basa 1 jam dan fraksi air terhidrolisis basa 3 jam. Bercak yang muncul kemudian dilihat pada sinar tampak, UV₂₅₄ dan UV₃₆₆. Uap amonia (NH₃), pereaksi semprot anisaldehyd asam sulfat, AlCl₃, FeCl₃ dan DPPH digunakan untuk melihat golongan senyawa.

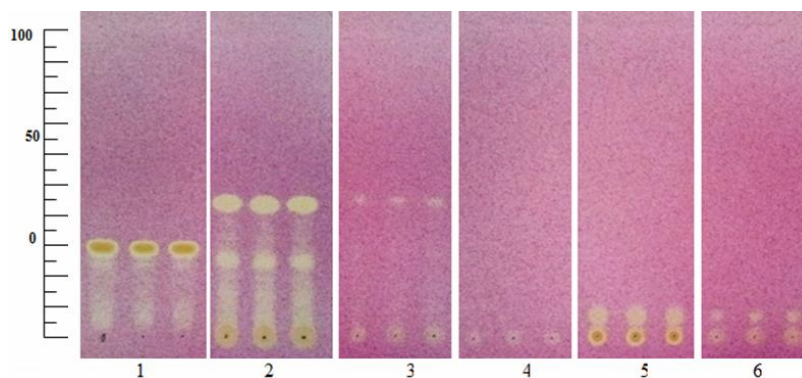
Analisis data

Data yang diperoleh dari uji kuantitatif aktivitas antioksidan metode DPPH adalah persen penangkapan radikal DPPH. Besarnya aktivitas penangkapan radikal DPPH dihitung dengan persamaan berikut :

Penangkapan radikal (%) :

$$\frac{\text{Abs kontrol} - \text{Abs sample}}{\text{Abs kontrol}} \times 100\%$$

IC₅₀ dihitung dengan analisis regresi linier antara konsentrasi sampel vs persen penangkapan radikal DPPH. Data IC₅₀ fraksi air, fraksi air terhidrolisis asam 1 jam, fraksi air terhidrolisis asam 3 jam, fraksi air terhidrolisis basa 1 jam dan fraksi air terhidrolisis basa 3 jam dianalisis statistika dengan uji *Paired-samples T Test* pada *SPSS for windows 17.0*. Adanya perbedaan yang signifikan menunjukkan adanya pengaruh hidrolisis pada aktivitas antioksidan sampel uji.



Gambar 1. Kromatogram fraksi air dan fraksi air terhidrolisis setelah disemprot DPPH dengan fase diam silika gel F254 dan fase gerak toluene:etilasetat:asam formiat (7:2:1 v/v) dilihat pada sinar tampak
Keterangan: 1. Kuersetin, 2. Fraksi air terhidrolisis basa 3 jam, 3. Fraksi air terhidrolisis basa 1 jam, 4. Fraksi air, 5. Fraksi air terhidrolisis asam 1 jam dan 6. Fraksi air terhidrolisis asam 3 jam.

HASIL DAN PEMBAHASAN

Senyawa fenolik dapat diekstraksi dari tanaman segar, dalam bentuk beku ataupun kering (Dai & Mumper, 2010). Sari etanol 96% dari buah talok segar selama 5 hari diperoleh rendemen 7,14%. Rendemen fraksi n-heksan, etil asetat dan air terhadap berat ekstrak kental adalah 19,5%, 2,5% dan 73,6 % b/b, sehingga senyawa dalam buah talok cenderung polar.

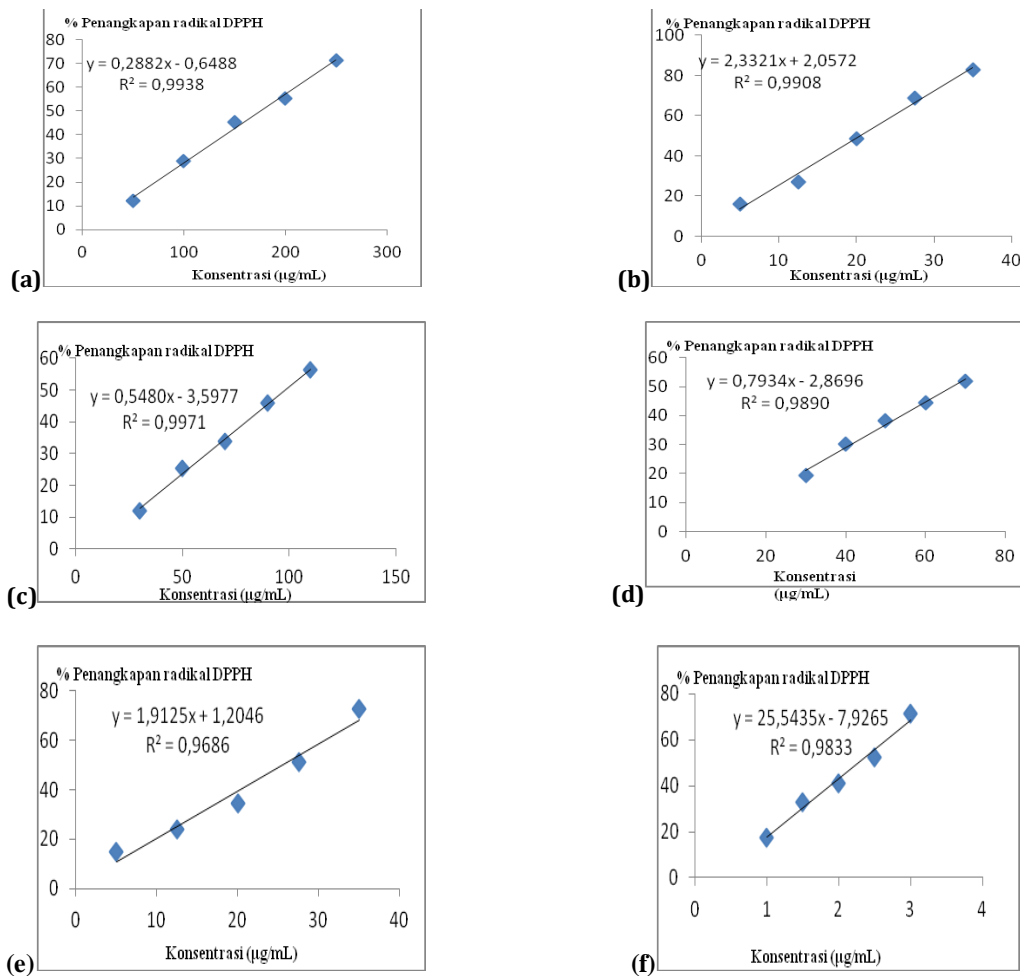
Kromatogram fraksi air dan fraksi air terhidrolisis setelah disemprot DPPH dengan fase diam silika gel F₂₅₄ dan fase gerak toluene:etilasetat: asam formiat (7:2:1 v/v) dilihat pada sinar tampak dengan masing-masing 3 kali penotolan dapat dilihat di gambar 1. Kromatogram ini menunjukkan bahwa fraksi air tidak terelusi, masih dominan pada hRf 0 sebagai senyawa polar pada fraksi air merupakan glikosida flavonoid. Fraksi air tidak muncul bercak setelah dielusi, karena mengandung senyawa polar sehingga lebih tertahan pada fase diam. Namun demikian karena rendemen terhadap ekstrak etanol tertinggi, maka diberi perlakuan hidrolisis agar terbentuk senyawa bebas yang lebih non polar seperti aglikon flavonoid. Hidrolisis dilakukan dengan tujuan untuk membebaskan aglikon flavonoid dari bentuk glikosidanya. Sebagian besar glikosida flavonoid memiliki ikatan O-glikosidik dengan gula seperti glukosa, galaktosa, ramnosa, arabinosa, xylosa dan rutinosa tetapi ada juga yang ikatannya berupa C-glikosidik (Plazonic dkk., 2009). Terdapat perbedaan tempat ikatan antara gula dan aglikon pada masing-masing flavonoid sehingga ada pengaruh terhadap aglikon flavonoid terbebaskan.

Hidrolisis pada suasana asam dan basa dapat membebaskan glikosida O-flavonoid dengan posisi pemutusan yang berbeda. Sedangkan

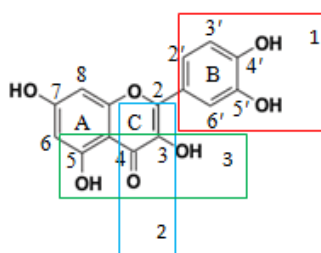
flavonoid C-glikosida tidak dapat dihidrolisis dalam suasana asam tetapi dapat diubah menjadi bentuk isomer 8-C-glikosida atau 6-C-glikosida (Nollet & Toldra, 2012). Sedangkan pada suasana basa tidak terjadi isomerisasi pada O,C-glikosida (Litvinenko & Markarov, 1969).

Aglikon flavonoid terbebaskan antara fraksi air terhidrolisis asam dan basa mempunyai perbedaan hRf, terhidrolisis asam cenderung bersifat lebih polar. Aglikon fraksi air terhidrolisis asam mengandung lebih banyak gugus hidroksi dan pada terhidrolisis basa mengandung gugus asil. Gambar 1 menunjukkan intensitas pada fraksi air terhidrolisis asam 1 dan 3 jam lebih kecil daripada fraksi air terhidrolisis basa 1 dan 3 jam. Perbedaan aglikon flavonoid terbebaskan antara hidrolisis asam dan basa, semakin banyak gugus hidroksil maka aktivitas antioksidannya meningkat. Sedangkan adanya gugus asil pada struktur flavonoid akan menurunkan aktivitas antioksidan karena strukturnya semakin sterik sehingga radikal DPPH akan semakin sulit mendekati gugus hidroksil flavonoid. Selain itu, metoksilasi mempengaruhi hidrofobisitas dan keplananaran molekul (Dugas, dkk. 2000).

Pengukuran panjang gelombang maksimum ditentukan dengan *scanning* panjang gelombang DPPH 0,4 mM dalam metanol pada λ 400-600 nm dan hasil yang menunjukkan bahwa DPPH memiliki panjang gelombang maksimum pada 516,5 nm. Literatur menyebutkan bahwa radikal DPPH bersifat stabil dan memiliki panjang gelombang maksimum antara 515-520 nm (Molyneux, 2004). Sedangkan radikal DPPH membutuhkan waktu tertentu untuk bereaksi dengan senyawa antioksidan sehingga perlu dilakukan *operating time* dan dilakukan pada tiap-tiap fraksi sehingga dapat diprediksi kestabilan



Gambar 2. Hubungan kadar senyawa uji dengan % penangkapan radikal DPPH (a) fraksi air (b) fraksi air terhidrolisis asam 1 jam (c) fraksi air terhidrolisis asam 3 jam (d) fraksi air terhidrolisis basa 1 jam (e) fraksi air terhidrolisis basa 3 jam (f) kuersetin



Gambar 3. Bagian struktur flavonoid yang berperan dalam aktivitas penangkapan radikal

kompleks antara radikal DPPH dengan senyawa antioksidan. Penelitian ini mempunyai rata-rata kestabilan absorbansi DPPH terjadi pada menit ke-30 sampai menit ke-40 setelah direaksikan dan menit ke-30 ditetapkan sebagai *operating time* untuk semua senyawa uji. Pengukuran aktivitas antioksidan metode DPPH secara umum dilakukan pada menit ke-30 (Kim dan Jang, 2010). Meskipun

pada kondisi sebenarnya, waktu reaksi antara sampel dengan DPPH sangat bervariasi tergantung pada senyawanya (Geckil dkk., 2005; Plazonic dkk., 2009).

Gambar 2 menunjukkan bahwa konsentrasi ekstrak berbanding lurus dengan aktivitas penangkapan radikal DPPH. Semakin besar konsentrasi senyawa antioksidan maka aktivitas

penangkapan radikal DPPH semakin besar. Senyawa antioksidan mampu mereduksi radikal DPPH sehingga menyebabkan penurunan absorbansi DPPH yang ditandai dengan perubahan warna ungu menjadi kuning.

Persamaan regresi linier antara hubungan konsentrasi senyawa antioksidan dan persen penangkapan radikal DPPH dapat digunakan untuk menentukan nilai IC_{50} senyawa antioksidan. Perbandingan nilai IC_{50} antara fraksi air, fraksi air terhidrolisis dan kuersetin ditunjukkan pada gambar 3. Semakin kecil nilai IC_{50} maka aktivitas antioksidannya semakin poten. Urutan kepotenan aktivitas antioksidan adalah fraksi air terhidrolisis asam 1 jam > fraksi air terhidrolisis basa 3 jam > fraksi air terhidrolisis basa 1 jam > fraksi air terhidrolisis asam 3 jam > fraksi air.

Gambar 3 memperlihatkan fraksi air memiliki aktivitas antioksidan lebih rendah daripada fraksi air terhidrolisis, karena proses hidrolisis mampu membebaskan aglikon flavonoid sehingga gugus hidroksil pada aglikon bertambah. Menurut Cao dkk. (1997) dan Pannala dkk. (2001) aktivitas antioksidan dipengaruhi oleh jumlah gugus hidroksi dan konfigurasi atau kapasitas dari reaktivitas gugus hidroksil.

Sifat-sifat kimia gula juga sangat mempengaruhi aktivitas antioksidannya terutama pada kemampuan teroksidasinya glikosida flavonoid (gambar 3). Ikatan gula pada cincin C posisi 3 akan menurunkan kecepatan oksidasi karena sifat *leaving group*-nya menurun. Selain itu, penurunan sifat *leaving group* juga dipengaruhi oleh banyaknya gula yang terikat, disakarida bersifat lebih lemah dibandingkan monosakarida (Hopia dkk., 1999). Jenis gula pada aglikon flavonoid juga berperan terhadap aktivitas antioksidan. Gula dengan gugus hidroksi bebas pada posisi 1 bersifat mereduksi (lemah) sedangkan gula tanpa gugus hidroksi bebas pada posisi 1 bukan gula pereduksi.

Flavonoid tergolong polifenol dan sifat antioksidannya kuat (Rice-Evans dkk., 1996). Flavonoid bersifat antioksidan karena dapat menyumbangkan atom hidrogennya pada radikal bebas. Menurut Bors dkk. (1990) ada 3 penentu efektivitas penangkapan radikal oleh flavonoid secara struktural (gambar 3), yaitu (1) gugus katekol atau ortohidroksi pada cincin B, (2) konjugasi cincin B pada karbonil C-4 melalui ikatan rangkap 2,3, dan (3) gugus 3 dan 5-OH dengan karbonil C-4. Gugus hidroksi merupakan gugus resonansi positif dimana elektron bebasnya masuk ke dalam cincin sehingga sifat reduktornya semakin tinggi. Gugus katekol atau ortohidroksi pada cincin B memberi stabilitas tinggi pada radikal yang terbentuk dan berperan dalam

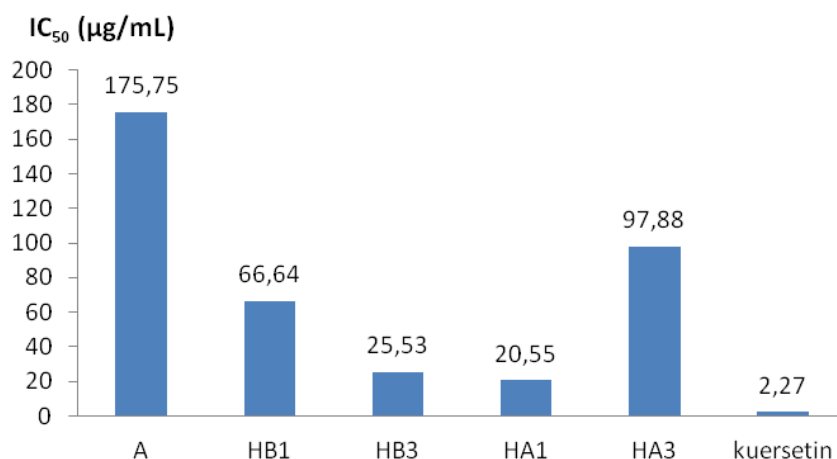
delokalisasi elektron. Konjugasi cincin B pada karbonil C-4 melalui ikatan rangkap 2,3 memastikan delokalisasi elektron pada cincin B. Gugus 3 dan 5-OH serta karbonil C-4 memungkinkan delokalisasi elektron dari kedua substituen gugus hidroksil pada gugus 4-keto

Gambar 4 menunjukkan bahwa terdapat perbedaan IC_{50} fraksi air yang terhidrolisis asam dan terhidrolisis basa. Pada waktu hidrolisis 1 jam, aktivitas antioksidan fraksi air terhidrolisis asam lebih besar daripada fraksi air terhidrolisis basa. Sedangkan pada waktu hidrolisis 3 jam aktivitas antioksidan fraksi air terhidrolisis asam lebih kecil daripada fraksi air terhidrolisis basa. Perbedaan antara fraksi air terhidrolisis asam dan fraksi air terhidrolisis basa kemungkinan disebabkan berbedanya aglikon. Fraksi air terhidrolisis basa selama 1 jam mempunyai aktivitas antioksidan lebih kecil daripada waktu hidrolisis 3 jam. Berdasarkan kategori Litvinenko & Markarov (1969) bahwa glikosida flavonoid pada fraksi air termasuk glikosida flavonoid stabil terhadap suasana basa sehingga diperlukan waktu relatif lebih lama untuk memutus ikatan gula dengan aglikon flavonoid dalam suasana basa.

Ada senyawa yang tidak mampu menyerap sinar pada daerah tampak dan mengabsorpsi panjang gelombang pendek, seperti UV (Jork dkk., 1990). Gambar 4 merupakan kromatogram pada UV254 dan fraksi air terhidrolisis asam memiliki 3 bercak yaitu pada hRf 0, 6 dan 21, serta fraksi air terhidrolisis basa 3 jam memiliki 4 bercak dengan hRf 0, 45, 57 dan 91. Fraksi air dan fraksi air terhidrolisis basa hanya memiliki 1 bercak pada hRf 0.

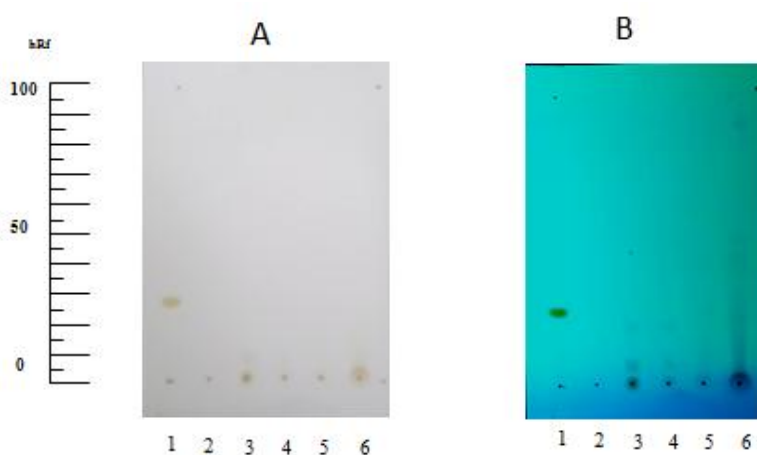
Karakterisasi golongan senyawa pada fraksi air dan fraksi air terhidrolisis didapatkan dari pengamatan perubahan warna kromatogram sebelum dan setelah diuapi amonia pada UV₃₆₆. Proses pemberian uap amonia pada kromatogram umumnya akan meningkatkan kepekaan deteksi dan menghasilkan perubahan warna sesuai dengan struktur senyawa tersebut (Markham, 1988). Hasil KLT menunjukkan bahwa senyawa yang terdapat pada fraksi air sebelum dan sesudah dihidrolisis berasal dari golongan flavonoid terbukti setelah diuapi amonia intensitas warnanya terlihat lebih jelas dilihat pada UV₃₆₆ (gambar 5).

Golongan senyawa terpenoid dan fenol bereaksi dengan anisaldehyd asam sulfat memberikan warna ungu, biru, merah, kelabu atau hijau tergantung jenis senyawanya (Bambang, 1986). Fraksi air, fraksi air terhidrolisis asam 3 jam dan fraksi air terhidrolisis basa 1 jam bereaksi dengan anisaldehyd asam sulfat dengan menghasilkan warna coklat, fraksi air terhidrolisis



Gambar 4. Histogram nilai IC₅₀ senyawa uji dengan metode DPPH

Keterangan: A: fraksi air sebelum dihidrolisis; HA1: fraksi air terhidrolisis asam 1 jam; HA3: fraksi air terhidrolisis asam 3 jam; HB1: fraksi air terhidrolisis basa 1 jam



Gambar 5. Kromatogram fraksi air sebelum dan sesudah hidrolisis buah talok dengan fase diam silika gel F254 dan fase gerak toluen : etil asetat : asam formiat (7:2:1) kromatogram dilihat pada sinar tampak (A) kromatogram dilihat pada sinar UV254 (B)

Keterangan bercak : 1 : kuersetin, 2 : fraksi air sebelum dihidrolisis; 3 : fraksi air terhidrolisis asam 1 jam, 4 : fraksi air terhidrolisis asam 3 jam; 5 : fraksi air terhidrolisis basa 1 jam, 6: fraksi air terhidrolisis basa 3 jam

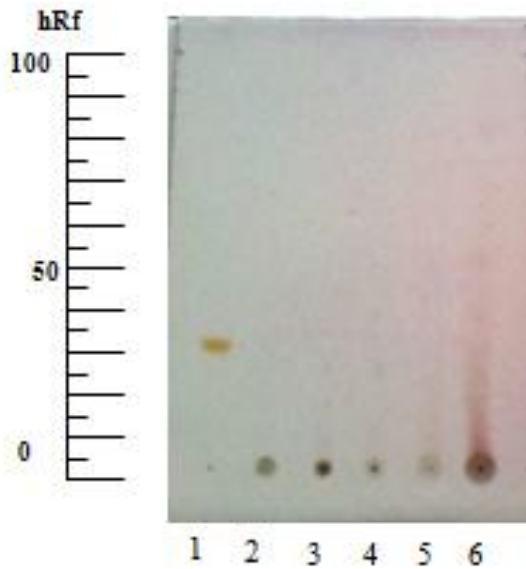
asam 1 jam menghasilkan warna coklat gelap sedangkan fraksi air terhidrolisis basa 3 jam menghasilkan warna merah-coklat (gambar 6).

Aktivitas antioksidan fraksi air terhidrolisis asam 3 jam lebih kecil daripada fraksi air terhidrolisis asam 1 jam, hal ini diperkuat dengan hasil KLT. Kromatogram pada fraksi air terhidrolisis asam 1 dan 3 jam memiliki hRf tidak terlalu berbeda (gambar 1) dan fraksi air terhidrolisis asam 1 jam mempunyai intensitas warna kuning lebih kuat serta luas area lebih besar daripada yang terhidrolisis 3 jam.

Aktivitas antioksidan ditunjukkan oleh bercak dengan hRf 0 dan 6 pada fraksi air terhidrolisis asam 1 dan 3 jam. Sedangkan bercak

dengan hRf 21 tidak menunjukkan reaksi dengan DPPH dan dapat dinyatakan tidak berpotensi sebagai antioksidan (gambar 2). Bercak tersebut juga tidak terlihat pada UV₃₆₆ dan tidak bereaksi ketika diuapi amonia serta disemprot AlCl₃ sehingga negative sebagai flavonoid.

Aktivitas antioksidan fraksi air terhidrolisis basa 3 jam lebih besar daripada fraksi air terhidrolisis basa 1 jam dapat dijelaskan dari gambar 3. Bercak antioksidan fraksi air terhidrolisis basa 1 jam ada dua yaitu pada hRf 0 dan 45 sedangkan fraksi air terhidrolisis basa 3 jam ada 3 yaitu 0, 25 dan 45. Intensitas dan luas bercak pada hRf 0 dan 45 berbeda antara fraksi air terhidrolisis basa 1 dan 3 jam.



Keterangan bercak :
 1 : kuersetin,
 2 : fraksi air sebelum dihidrolisis
 3 : fraksi air terhidrolisis asam 1 jam,
 4 : fraksi air terhidrolisis asam 3 jam
 5 : fraksi air terhidrolisis basa 1 jam,
 6 : fraksi air terhidrolisis basa 3 jam

Gambar 6. Kromatogram fraksi air sebelum dan sesudah hidrolisis dengan fase di am silika gelF254 dan fase gerak toluen : etil asetat : asam formiat (7:2:1) setelah disemprot anisaldehyd asam sulfat dilihat pada sinar tampak

Tabel I. Hasil uji statistika *paired samples t test* pada fraksi air dan fraksi air terhidrolisis

	T	Df	Sig. (2-tailed)
A-HA1	134,498	2	0,000
A-HA3	86,529	2	0,000
A-HB1	46,421	2	0,000
A-HB3	72,031	2	0,000
HA1-HB1	-28,867	2	0,001
HA3-HB3	42,343	2	0,001
HA1-HA3	-56,527	2	0,000
HB1-HB3	99,070	2	0,000

Keterangan: A: fraksi air sebelum dihidrolisis; HA1: fraksi air terhidrolisis asam 1 jam; HA3: fraksi air terhidrolisis asam 3 jam; HB1: fraksi air terhidrolisis basa 1 jam; HB3: fraksi air terhidrolisis basa 3 jam

Pada fraksi air terhidrolisis basa 3 jam intensitas warnanya lebih kuning dan lebih besar luas areanya daripada yang 1 jam.

Bercak fraksi air terhidrolisis basa 1 jam pada hRf 45 tidak dapat dideteksi setelah diuji amonia dan AlCl₃ maupun saat dilihat di bawah sinar UV₂₅₄ dan UV₃₆₆. Bercak fraksi air terhidrolisis basa 3 jam dengan hRf 25 juga tidak dapat terdeteksi, dan tidak terjadi reaksi DPPH pada bercak dengan hRf 57 dan 91 pada fraksi air terhidrolisis basa 3 jam, hal ini menunjukkan bahwa bercak tersebut tidak memiliki aktivitas antioksidan (gambar 1). Bercak dengan hRf 57 berwarna kuning saat dilihat di bawah UV₃₆₆ sebelum dan sesudah disemprot AlCl₃ dan diuji amonia tetapi intensitasnya sangat lemah. Sedangkan bercak 91 bukan flavonoid karena

tidak bereaksi ketika diuji amonia dan disemprot AlCl₃.

Menurut Jun dkk. (2003) bahwa tingkat aktivitas penangkapan radikal DPPH pada fraksi air adalah lemah (nilai IC₅₀: 150-500 µg/mL), terhidrolisis asam 3 jam dan basa 1 jam termasuk aktif (nilai IC₅₀: 50-100 µg/mL), sedangkan terhidrolisis asam 1 jam dan basa 3 jam dengan kategori sangat aktif (nilai IC₅₀: <50 µg/mL).

Uji statistik *paired samples t test* dengan software SPSS for Windows 17.0 digunakan untuk melihat hubungan antar perlakuan pada fraksi air. Uji statistik pada penelitian ini menggunakan taraf kepercayaan sebesar 95%. Berdasarkan hasil statistik *paired samples t test* antara fraksi air sebelum dan setelah dihidrolisis terdapat perbedaan yang signifikan p<0,05. Pengaruh hidrolisis asam dan basa menyebabkan adanya

perbedaan signifikan aktivitas antioksidannya, hal ini ditunjukkan pada waktu 1 jam antara hidrolisis asam dan basa serta pada waktu 3 jam antara hidrolisis asam dan basa nilai signifikansinya kurang dari 0,05.

Dilihat dari tabel I, waktu hidrolisis juga sangat mempengaruhi aktivitas antioksidan karena hasil uji menunjukkan terdapat perbedaan signifikan antara waktu hidrolisis 1 jam dengan 3 jam. Secara keseluruhan adanya perlakuan hidrolisis pada fraksi air, waktu hidrolisis dan suasana hidrolisis sangat mempengaruhi aktivitas antioksidan fraksi air ekstrak etanol buah talok.

KESIMPULAN

Perlakuan hidrolisis asam dan basa pada fraksi air buah talok dapat meningkatkan aktivitas penangkapan radikal DPPH yang ditunjukkan pada nilai IC₅₀ dari fraksi air ekstrak etanolik buah talok dan setelah di hidrolisis asam serta basa (1 jam dan 3 jam) dengan aktivitas penangkapan radikal DPPH sebesar 175,75 µg/mL pada fraksi air dan setelah hidrolisis asam 1 jam dan 3 jam sebesar 20,55 dan 97,88 µg/mL, sedangkan pada basa 1 jam dan 3 jam sebesar 66,64 dan 25,53 µg/mL.

UCAPAN TERIMAKASIH

Kepada Deutscher Akademischer Austauschdienst (DAAD), Prof. Dr. Ulrike Holzgrabe, Prof. Dr. Subagus Wahyuono, Prof. Dr. Sumali Wiryo widagdo, Prof. Dr. Agung Nugroho, Dr. Ritmaleni, Dr. Sri Mulyani Mulyadi dan semua pihak yang tidak dapat kami sebutkan satu per satu dengan selesainya tulisan juga penelitian ini atas bantuan baik dana, fasilitas laboratorium maupun doa.

DAFTAR PUSTAKA

Alaniya, M.D., 1977, Kinetics of The Alkaline Hydrolysis of Flavonoid Glycosides, *Khim. Prorodn. Soedin.*, 5, 646-649.

Amarowicz, R., Naczek, M., Shahidi, F., 2000, Antioxidant Activity of Crude Tannins of Canola and Rapeseed Hulls, *JAACS*, 77, 957-961.

Annegowda, H. V., Nee, C. W., Mordi, M. N., Ramanathan, S., Mansor, S. M., 2010, Evaluation of Phenolic Content and Antioxidant Property of Hydrolysed Extracts of *Terminalia catappa* L. Leaf, *Asian J. Plant Sci.*, 9 (8), 479-485.

Balsano, C., Alisi, A., 2009, Antioxidant Effect of Natural Bioactive Compounds, *Curr. Pharm. Design*, 15, 3063-3073.

Bambang, R., Sutrisno, 1986, *Pereaksi KLT*, Edisi I, Jakarta, Fakultas Farmasi Universitas Pancasila.

Bors, W., Heller, W., Michel, C., Saran, M., 1990, Flanonoid as Antioxidants: Determination of Radical Scavenging Efficiencies, *Methd. Enzym.*, 186, 343-355.

Cao, G., Sofic, E., Prior, R.L., 1997, Antioxidant and Prooxidant Behavior of Flavonoids: Structure-Activity Relationships, *Free Rad. Biol. Med.*, 22, 749-760.

Dai J., Mumper, R.J., 2010, Plant Phenolics: Extraction, Analysis and Their Antioxidant and Anticancer Properties., *Mol.*, 15, 7313-7352.

Dugas Jr., A.J., Castaneda-Acosta, J., Bonin, G.C., Price, K.L., Fischer, N.H., Winston, G.W., 2000, Evaluation of The Total Peroxyl Radical-Scavenging Capacity of Flavonoids: Structure-Activity Relationship, *J. Nat. Products.*, 63, 327-331.

Geckil, H., Ates, B., Durmaz, G., Erdogan, S., Yilmaz, I., 2005, Antioxidant, Free Radical Scavenging and Metal Chelating Characteristics of Propolis, *American J. Biochem. Biotech.*, 1(1), 27-31.

Ghiselli, A., Nardini, M., Baldi, A., Scaccini, C., 1998, Antioxidant Activity of Different Phenolics Fractions Separated from an Italian Red Wine, *J. Agric. Food Chem.*, 46, 361-367.

Halliwel, B., 2001, Free Radicals and Other Reactive Species in Disease, In: *Nature Encyclopedia of Life Sciences*, 1-7, Nature Publishing Group, London.

Halliwel, B., Gutteridge, J., 1999, *Free Radical in Biology and Medicine*, 23-38, Oxford University Press, New York.

Harborne, J.B., 1965, Plant Polyphenols: Characterisation of Flavonoid Glycosides by Acidic and Enzymic Hydrolysis, *Phytochem.*, 4, 107-120.

Harborne, J.B., Grayer, R.J., 1994, Flavonoids and Insects, In *Flavonoids Advances in Research Since 1986*, 589-618, Chapman & Hall, London.

Hopia, A., Heinonen, M., 1999, Antioxidant Activity of Flavonol Aglycones and Their Glycosides in Methyl Linoleate, *JAACS*, 76, 139-144.

Irianti T., Puspasari A., dan Choironi NA., 2013, Aktivitas Penangkapan Radikal 2,2-Difenil-pikrilhidrazil (DPPH) Oleh Ekstrak etanolik daun Mengkudu (*Morinda citrifolia* L.), Fraksi air dan fraksi air terhidrolisis, *Jurnal Bahan Alam Indonesia*, Vol. 8 (5): 302-309

Jacob, R. A., Burri, B. J., 1996, Oxidative Damage and Defense, *Am. J. Clin. Nutr.*, 63, 985S-990S.

- Jork, H., Funk, W., Fischer, W., Wimmer, H., 1990, *Thin-Layer Chromatography: Reagents and Detection Methods*, Volume 1a, VCH Publishing, Germany.
- Kim JK., and Jang JH., 2010, the first total synthesis of 2,3,6-tribromo-4,5-dihydroxybenzyl methyl ether (TDB) and its antioxidant activity, *Bull. Korean Chem Soc.*, 23 (5), 661-662
- Kolar, F. R., Kamble, V. S., Dixit, G. B., 2011, Phytochemical Constituents and Antioxidant Potential of Some Underused Fruits, *African J. Pharm. Pharmacol.*, 5(18), 2067-2072.
- Litvinenko, V.L., Makarov, V.A., 1969, The Alkaline Hydrolysis of Flavonoid Glycosides, *Khim. Prorodn. Soedin.*, 5(5), 366-369.
- Markham, K.R., 1988, *Cara Mengidentifikasi Flavonoid*, diterjemahkan oleh Kosasih Padmawinata, Penerbit ITB, Bandung.
- Molyneux, P., 2004, The Use of A Stable Free Radical Diphenylpicrylhydrazyl (DPPH) for Estimating Antioxidant Activity, *Songklanarin J. Sci. Technol.*, 26(2), 211-219.
- Nollet, L.M.L., Toldra, F., 2012, *Handbook of Analysis of Active Compounds in Functional Foods*, CRC Press Taylor & Francis Group, FL.
- Osawa, T., Namiki, M., 1981, A Novel Type Antioxidant Isolated from Leaf Wax of Eucalyptus Leaves, *J. Agric. Biol. Chem.*, 45, 735-739.
- Pervical, M., 1998. Antioxidants, *Biochem. J.*, 252, 649-653.
- Pietta, P.G., 2000, Flavonoids as Antioxidants, *J. Nat. Prod.*, 63, 1035-1042.
- Plazonic, A., Bucar, F., Males, Z., Mornar, A., Nigovic, B., & Kujundzic, N. 2009, Identification and Quantification of Flavonoids and Phenolic Acids in Burr Parsley (*Caucalis platycarpos* L.), Using High-Performance Liquid Chromatography with Diode Array Detection and Electrospray Ionization Mass Spectrometry, *Mol.*, 14(7), 2466-2490.
- Preethi, K., Premasudha, P., Keerthana, K., 2012, Anti-Inflammatory Activity of *Muntingia calabura* Fruits, *Phcog. J.*, 4(30), 51-56.
- Preethi, K., Vijayalakshmi, N., Shamna, R., Sasikumar, J.M., 2010, In Vitro Antioxidant Activity of Extracts from Fruits of *Muntingia calabura* Linn. From India, *Phcog. J.*, 2 (14), 11-18.
- Rice Evans CA., Miller NJ., and Paganga G., 1996, Structure-antioxidant activity relationships of flavonoids and phenolic acids, *Free Radic. Biol. Med.*, 21 (3): 417-421
- Sani, I. M., Iqbal, S., Chan, K. W., Ismail, M., 2012, Effect of Acid and Base Catalyzed Hydrolysis on the Yield of Phenolics and Antioxidant Activity of Extracts from Germinated Brown Rice (GBR), *Mol.*, 17, 7584-7594.
- Sishelli, 1998, *Antioxidants in Disease, Mechanisms, and Therapy*, Academic Press, New York.
- Sies, H., Stahl, W., 1995, Vitamins E and C, Beta Carotene and Carotenoids as Antioxidants, *Amer. J. Clin.*, 62, 1315s-1321s.
- Su, B.N., Park, E.J., Vigo, J.S., Graham, J.G., Cabieses, F., Fong, H.H.S., dkk., 2003, Activity-Guided Isolation of the Chemical Constituents of *Muntingia calabura* Using A Quinine Reductase Induction Assay, *Phyto. Chem.*, 63, 335-341.
- Tubesh, Z., Iqbal, S., Ismail, M., 2011, Effects of Hydrolysis Condition on Recovery of Antioxidants from Methanolic Extracts of *Nigella sativa* Seeds, *J. Med. Plants Res.*, 5(22), 5292-5299.
- Vinson, J. A., Proch, J., Zubik, L., 1999, Phenol Antioxidant Quantity and Quality in Foods: Cocoa Dark Chocolate and Milk Chocolate, *J. Agric. Food Chem.*, 47(12), 4821-4824.
- Wang, S.Y., Kuo, Y.H., Chang, H.N., Kang, P.L., Tsay, H.S., Lin, K.F., Yang, N.S., Shyur, N.F., 2002, Profiling and Characterization Antioxidant Activities in *Anoectochilus formosanus* Hayata, *J. Agric. Food. Chem.*, 50, 1859-1865
- Wagner, H., Bladt, S., Zgamski, E.M., 1984, *Plant Drug Analysis A Thin Layer Chromatography Atlas*, Springer Verlag, Berlin.
- Zengin, G., Cakmak, Y.S., Guler, G.O., Aktumsek, A., 2010, In Vitro Antioxidant Capacities and Fatty Acid Compositions of Three *Centaurea species* Collected from Central Anatolia region of Turkey, *Food Chem. Toxicol.*, 48, 2638-2641