

BAB I

PENDAHULUAN

A. Latar Belakang Masalah

Fakta di Indonesia menunjukkan bahwa sejak dasawarsa 1990-an telah terjadi pergeseran pola penyebab kematian atau sakit, yakni dari jenis penyakit infeksi sampai penyakit yang bersifat degeneratif, suatu proses kebalikan dari proses regenerasi. Prevalensi penyakit degeneratif seperti jantung, kanker, kencing manis, dan rematik sangat meningkat (Subeno, 2002) bahkan gastritis dan juga AIDS (Kumpulainen and Salonen, 1999; Cook and Samman, 1996). Realita ini banyak dipengaruhi oleh pencemaran lingkungan, kesalahan pola makan, gaya hidup (Fessenden and Fessenden, 1986). Polutan hasil pembakaran tidak sempurna kendaraan bermotor seperti karbon monoksida, oksida-oksida nitrogen dan hidrokarbon merupakan salah satu contoh pencemaran lingkungan. Kesalahan pola makan dapat menyebabkan munculnya nutrisi yang buruk. Tingginya stress fisik maupun psikologis, paparan berlebih dari antibiotika dan obat-obat lainnya, penggunaan senyawa sintetik organik, serta radiasi sinar ultraviolet B yang meningkat seiring menipisnya lapisan ozon, semua itu dapat menyebabkan jaringan tubuh rentan terhadap inisiasi pembentukan radikal bebas (Fessenden and Fessenden, 1986; Karyadi, 2004), sehingga radikal bebas dalam tubuh semakin banyak (Moelyono dkk, 2000). Radikal bebas di dalam tubuh manusia bersifat sangat reaktif, yang akan berinteraksi dengan bagian tubuh maupun sel-sel tertentu seperti lemak, protein, karbohidrat dan DNA sehingga menyebabkan sel tersebut menjadi tidak normal (Suzery dkk, 2004).

Radikal bebas adalah atom atau molekul yang mengandung satu atau lebih elektron-elektron yang tidak berpasangan pada orbital terluarnya. Hal ini mengakibatkan tidak stabilnya atom atau molekul tersebut. Untuk menjadi stabil, radikal memerlukan elektron yang berasal dari pasangan elektron molekul di sekitarnya, sehingga terjadi perpindahan elektron dari molekul donor ke molekul radikal untuk menjadikan radikal tersebut stabil. Akibat reaksi tersebut, molekul donor menjadi radikal baru yang tidak stabil dan memerlukan elektron dari molekul di sekitarnya untuk menjadi stabil. Demikian seterusnya, terjadi reaksi berantai perpindahan elektron-elektron. Reaksi rantai radikal bebas, antara lain terjadi pada peroksidasi lipid (oksidasi asam-asam lemak tak jenuh rantai panjang dalam membran sel dan lipoprotein), yang berdampak berkembangnya berbagai macam penyakit sebagaimana diuraikan di atas maupun gangguan lain yang mengikuti kondisi tersebut, seperti: stroke, parkinson's disease, hipertensi, penyakit jantung, penuaan dini, penyakit-penyakit kulit dan sebagainya. Jika jumlahnya sedikit, radikal bebas dapat dinetralkan oleh sistem enzimatik tubuh, namun jika berlebih akan memicu efek patologis (Middleton *et al.*, 2000).

Beberapa contoh radikal bebas antara lain: anion superoksida ($2O_2\cdot^-$), radikal hidroksi ($OH\cdot$), nitrit oksida ($NO\cdot$), hidrogen peroksida (H_2O_2), dan sebagainya (Prior *et al.*, 2005). Radikal bebas tersebut dapat terjadi di dalam tubuh, misalnya sebagai akibat kurang sempurnanya reduksi oksigen dalam rantai transpor elektron di mitokondria dengan terbentuknya superoksida, interaksi superoksida atau hidrogen peroksida dengan ion logam transisi. Radikal bebas bisa juga berasal dari luar tubuh, misalnya oleh karena polusi udara, radiasi, zat-zat kimia (obat-obatan, insektisida), makanan-makanan tertentu, dan dapat memasuki tubuh manusia (Prior

et al., 2005). Radikal bebas, baik yang eksogen maupun endogen merupakan etiologi berbagai macam penyakit degeneratif seperti jantung koroner, stroke, diabetes, dan kanker (Harish dan Shivanandappa, 2006).

Berbagai studi epidemiologi menunjukkan bahwa beberapa tanaman dan buah-buahan terbukti bermanfaat melindungi tubuh manusia terhadap bahaya radikal bebas. Hal ini disebabkan adanya aktivitas antioksidan yang terdapat dalam tanaman tersebut. Antioksidan berperan penting dalam mencegah penyakit kardiovaskuler dan kanker (Rohman dan Riyanto, 2006).

Adapun potensi Indonesia sebagai negara yang kaya akan spesies tumbuh-tumbuhan tidak dapat dipungkiri. Tidak lebih 3% dari keseluruhannya yang sudah dieksplorasi sebagai sumber obat-obatan dan pengganti makanan (Anonim, 2002). Oleh sebab itu merupakan kewajiban bagi peneliti Indonesia untuk meneliti tumbuhan asli Indonesia secara intensif tentang kandungan tumbuh-tumbuhan untuk mendapatkan alternatif senyawa antiradikal.

Salah satu tumbuhan asli Indonesia yaitu dewandaru (*Eugenia uniflora* L.) yang tumbuh tersebar di pulau Jawa (Backer and Brink, 1965) dan Sumatera (Hutapea, 1991). Dewandaru mengandung senyawa atsiri seperti sitronela, sineol, terpenin, sesquiterpen, vitamin C, saponin, flavonoid, tannin dan antosianin (Anonim, 1992; Einbond *et al.*, 2004). Aktivitas antiradikal pada bagian buah dewandaru (Einbond *et al.*, 2004) membuktikan adanya aktivitas antiradikal fraksi air-etanol dari ekstrak buah dewandaru dan antosianin adalah senyawa yang bertanggung jawab terhadap aktivitas tersebut. Sofiana (2006), membuktikan ekstrak daun dewandaru memiliki aktivitas antiradikal, terutama ekstrak etanolnya memiliki aktivitas yang paling tinggi daripada ekstrak yang lainnya, dimana nilai IC₅₀ ekstrak

etanol 8,86 µg/ml. Aktivitas antiradikal ini berkorelasi positif dengan kandungan senyawa fenolik seperti flavonoid (Sofiana, 2006).

Umumnya flavonoid merupakan senyawa yang dapat menghambat degranulasi neutrofil, pengontrol motilitas sel, dan perlekatan pada permukaan sel endotelial selain berperan pada inhibisi radikal bebas (Pezzuto and Park, 2002). Keberadaan senyawa fenol dan polifenol pada bagian daun sangat dimungkinkan sebab senyawa ini bertanggung jawab pada proses fotosintesa tumbuhan (Wijekesera, 1991). Mayoritas kandungan antioksidan pada buah-buahan dan sayur-sayuran mungkin didominasi dari senyawa seperti flavonoid, isoflavon, flavon, antosianin, katekin, isokatekin daripada vitamin C, E, atau β-karoten (Karadeniz *et al.*, 2005 *cit* Wang *et al.*, 1996; Kahkonen *et al.*, 1999). Kebanyakan fitokimia tersebut membantu melindungi sel dari serangan oksidatif yang disebabkan oleh radikal bebas (Karadeniz *et al.*, 2005; Wada and Ou, 2002). Oleh sebab itu perlu dilakukan uji aktivitas penangkap radikal kandungan daun dewandaru terhadap suatu radikal bebas pada beberapa fraksi polar dalam ekstrak etanol daun dewandaru disertai dengan penetapan kadar fenol dan flavonoidnya agar diketahui fraksi mana yang kandungannya paling efektif untuk digunakan, sehingga bermanfaat sebagai bahan obat alami yang dapat digunakan untuk menangkal radikal bebas yang membahayakan tubuh.

B. Perumusan Masalah

1. Apakah fraksi polar dari ekstrak etanol daun dewandaru memiliki aktivitas penangkap radikal dilihat dari harga IC_{50} (*Inhibitory Concentration*)-nya?
2. Fraksi berapa yang paling efektif sebagai penangkap radikal?

3. Bagaimana peranan antara kandungan fenol/flavonoid dengan aktivitas antiradikal?

C. Tujuan Penelitian

1. Mengetahui adanya aktivitas penangkap radikal dalam fraksi polar dari ekstrak etanol daun dewandaru dengan metode DPPH dilihat dari harga IC_{50} -nya.
2. Mengetahui fraksi polar ekstrak etanol yang paling efektif sebagai penangkap radikal.
3. Mengetahui peranan antara kandungan fenol/flavonoid dengan aktivitas antiradikal.

D. Manfaat

Hasil penelitian ini diharapkan dapat menambah wacana informasi tentang fraksi-fraksi ekstrak tumbuhan yang aktif sebagai penangkap radikal bebas, sehingga dapat menjadikan bahan pengembangan obat baru untuk pencegahan atau terapi terhadap berbagai macam penyakit yang disebabkan oleh radikal bebas dan segala aspeknya.

E. Tinjauan Pustaka

1. Radikal bebas

Radikal bebas adalah atom atau gugus apa saja yang memiliki satu/lebih elektron tak berpasangan yang dapat bertindak sebagai akseptor elektron (Hafid, 2003). Karena jumlah elektron ganjil, maka tidak semua elektron dapat berpasangan.

Suatu radikal bebas tidak bermuatan positif/negatif, maka spesi semacam ini sangat reaktif karena adanya elektron tak berpasangan (Fessenden and Fessenden, 1986).

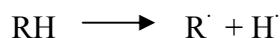
Reaksi pembentukan radikal bebas merupakan mekanisme biokimia tubuh normal yang terjadi melalui reaksi yang langsung memutuskan ikatan atau melalui transfer elektron (Halliwell & Gutteridge, 2000). Radikal bebas lazimnya hanya bersifat perantara yang bisa dengan cepat diubah menjadi substansi yang tidak lagi membahayakan tubuh. Namun, apabila radikal bebas bertemu dengan enzim atau asam lemak tak jenuh ganda, maka merupakan awal dari kerusakan sel. Radikal mampu menarik atom hidrogen dari suatu molekul disekitarnya. Pengaruh radiasi ionisasi terhadap materi biologi akan menghasilkan radikal bebas hidroksil dan radikal bebas lainnya, seperti radikal hidrogen yang siap berinteraksi dengan biomolekul-biomolekul lain yang saling berdekatan (Gitawati, 1995). Radikal bebas dapat dinetralkan oleh sistem enzimatik tubuh (Middleton *et al.*, 2000).

Sumber radikal bebas dapat berasal dari dalam tubuh kita sendiri (endogenus) yang terbentuk sebagai sisa proses metabolisme (proses pembakaran) protein, karbohidrat dan lemak yang kita konsumsi. Radikal bebas dapat pula diperoleh dari luar tubuh (eksogenus) yang berasal dari polusi udara, asap kendaraan bermotor, asap rokok, berbagai bahan kimia, makanan yang terlalu hangus (*carbonated*) dan lain sebagainya. Beberapa contoh radikal bebas antara lain: anion superoksida ($2O_2^{\cdot-}$), radikal hidroksil (OH^{\cdot}), nitrik oksida (NO^{\cdot}), hidrogen peroksida (H_2O_2) dan sebagainya (Windono dkk, 2000). Radikal bebas yang terbentuk di dalam tubuh akan merusak beberapa target seperti lemak, protein, karbohidrat, dan DNA (Halliwell *et al.*, 1995).

Radikal hidroksi adalah radikal yang sangat reaktif dan tidak stabil. Ia dapat berinteraksi dengan hampir semua substrat biologik. Karena sangat reaktif, efek radikal ini hanya berlangsung di daerah yang dekat dengan terbentuknya, dan dalam kondisi fisiologik normal tidak ditemukan radikal hidroksi dalam kadar yang besar (Gitawati, 1995).

Anion superoksid adalah salah satu jenis radikal bebas. Radikal ini sering terbentuk di dalam reaksi oksidasi sel (agen oksidasi). Radikal superoksid dapat memproduksi jenis radikal bebas yang lainnya (Wang *et al.*, 2003).

Mekanisme reaksi autooksidasi berlangsung dalam tiga tahap. Tahap pertama adalah inisiasi atau permulaan, yaitu pembentukan awal radikal-radikal bebas yang mana suatu radikal lipid terbentuk dari molekul lipid menurut reaksi:



Pengurangan atom hidrogen oleh spesies reaktif seperti radikal hidroksil berperan dalam inisiasi oksidasi lipid (Rohman dan Riyanto, 2004).

Setelah inisiasi, reaksi propagasi (perambatan). Dalam reaksi ini radikal lipid dirubah menjadi radikal lipid yang berbeda. Reaksi ini umumnya melibatkan pengurangan atom hidrogen dari molekul lipid atau penambahan atom oksigen pada radikal alkil.



(Rohman dan Riyanto, 2004).

Tahap terakhir adalah reaksi terminasi. Dalam reaksi ini radikal bebas bergabung untuk membentuk molekul dengan elektron berpasangan.





(Rohman dan Riyanto, 2004).

2. Inhibitor radikal bebas

Antiradikal merupakan senyawa dengan struktur polikonjugasi atau molekul cincin aromatik dan satu atau lebih gugus hidroksi (Everett *et al.*, 1996; Pezzuto and Park, 2002). Antioksidan secara kimiawi adalah senyawa pendonor elektron (*electron donating*) yakni senyawa yang dapat memberikan elektron (Sjahbana dan Bahalwan, 2002), walaupun dalam jumlah kecil dibanding substrat mampu menunda atau menjaga terjadinya oksidasi dari substrat yang mudah teroksidasi (Hafid, 2003). Antioksidan secara biologis dapat menghambat radikal bebas melalui mekanisme penghambatan reaksi radikal berantai, pengkhelat metal, penghambatan enzim oksidase, dan ko-faktor enzim antioksidan (Huang *et al.*, 2005).

Antioksidan juga penting bagi kesehatan tubuh karena antioksidan membantu melindungi tubuh dari kerusakan akibat serangan ROS (*reactive oksigen species*). ROS adalah gabungan dari radikal bebas oksigen seperti O_2^- , OH, RO_2 serta RO dan senyawa yang mengandung oksigen tetapi tidak merupakan radikal misalnya HOCl, H_2O_2 , O_3 , dan $ONOO^-$ (Kardono dkk, 2004). Tubuh memiliki sistem pertahanan internal terhadap radikal bebas. Sistem pertahanan tersebut dikelompokkan menjadi 3 golongan :

1. Antioksidan primer, (antioksidan endogen atau antioksidan enzimatis).
Contohnya superoksida dismutase (SOD), katalase dan glutathion peroksidase. Enzim-enzim ini mampu menekan atau menghambat pembentukan radikal bebas dengan cara memutus reaksi berantai dan mengubahnya menjadi produk lebih stabil. Reaksi ini disebut sebagai *chain-breaking-antioxidant*.

2. Antioksidan sekunder (antioksidan eksogen atau antioksidan non enzimatis). Contoh antioksidan sekunder ialah vitamin E, vitamin C, β -karoten, isoflavon, asam urat, bilirubin, dan albumin. Senyawa-senyawa ini dikenal sebagai penangkap radikal bebas (*scavenger free radical*). Kemudian mencegah amplifikasi radikal.
3. Antioksidan tersier, misalnya enzim *DNA-repair* dan metionin sulfoksida reduktase yang berperan dalam perbaikan biomolekul yang disebabkan oleh radikal bebas (Winarsi, 2005).

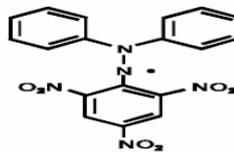
Senyawa antioksidan sintetis seperti Butil Hidroksianisol (BHA) dan Butil Hidroksitoluen (BHT) bukan merupakan solusi untuk kontrol positif yang baik, sebab pada pemaparan yang lama diketahui dapat mempengaruhi genetika sel-sel tubuh (Pourmorad *et al.*, 2006).

3. Deteksi radikal bebas

Metode analisa kuantitatif harus mengacu pada syarat akurasi, reliabilitas, sensitifitas dan spesifitas. Beberapa cara yang telah dilakukan untuk deteksi radikal bebas yaitu metode kemiluminesens, metode asam tiobarbiturat (*TBA Assay*), metode pengukuran radikal superoksid metode reduksi sitokrom c menggunakan kultur sel HL-60, dan metode ksantin/ksantin oksidase. Metode yang lainnya adalah metode penangkapan radikal bebas DPPH/AAPH yang diindikasikan dengan pengurangan absorbansi secara spektrofotometri, metode elektron spin resonansi (Pezzuto and Park, 2002 dan Prakash, 2001), pengujian ABTS, pengujian FRAP (*Ferric Reducing Antioxidant Power*), dan pengujian ORAC (*Oxygen Radical Absorption Capacity*) (Prior *et al.*, 2005).

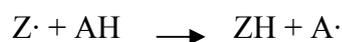
4. Metode DPPH

DPPH (*2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl*) adalah radikal bebas stabil berwarna ungu (Gambar 1). Ketika direduksi oleh senyawa antiradikal, terjadi perubahan warna menjadi berwarna kuning (*diphenylpicrylhydrazyn*). Metode DPPH berfungsi untuk mengukur elektron tunggal seperti aktivitas transfer hidrogen sekaligus juga untuk mengukur aktivitas penghambatan radikal bebas. Metode ini sangat cocok untuk skrining awal berbagai sampel terutama ekstrak tumbuhan. Campuran reaksi berupa larutan sampel dan DPPH yang dilarutkan dalam etanol absolut dan diinkubasi pada suhu 37° C selama 30 menit dan dibaca pada panjang gelombang 515 nm (Pezzuto and Park, 2002). Metode ini sering digunakan untuk mendeteksi kemampuan antiradikal suatu senyawa sebab hasilnya terbukti akurat, reliabel, relatif cepat dan praktis (Prakash, 2001).

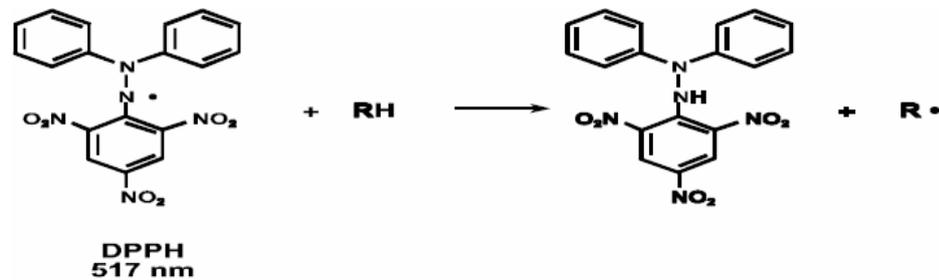


Gambar 1. Struktur Molekul DPPH (*2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl*)

Prinsip kerja dari uji aktivitas antiradikal metode DPPH yaitu berdasarkan adanya absorpsi kuat elektron ganjil radikal bebas DPPH pada λ 517 nm. Hasil perubahan warna dari ungu gelap menjadi kuning stoikiometrik dengan jumlah elektron yang ditangkap (Prakash, 2001; Sanches-Moreno, 2002). Penurunan absorbansi DPPH dari warna ungu ke kuning tersebut diukur pada λ 517 nm (Gambar 2).



Dimana ZH adalah bentuk molekul dan A \cdot bentuk radikal bebas pada tahap pertama (Sanches-Moreno, 2002).



Gambar 2. Mekanisme Penghambatan Radikal DPPH

Parameter IC_{50} (*inhibitory concentration*), yang didefinisikan sebagai konsentrasi substrat yang menangkap/menghambat 50% radikal DPPH. Parameter ini telah dikenalkan oleh Brand-Williams dan koleganya. Parameter EC_{50} (*efficiency concentration*) adalah salah satu parameter yang telah dikenal lama untuk menginterpretasikan hasil dari metode DPPH dengan satuan mg/mg DPPH (Prakash *et al.*, 2007). EC_{50} didefinisikan sebagai hasil bagi IC_{50} terhadap konsentrasi DPPH dalam mg/ml ($EC_{50} = IC_{50}/\text{konsentrasi DPPH dalam mg/ml}$). Parameter lainnya adalah ARP (*antiradical power*) yang menggambarkan kekuatan antiradikal dan didefinisikan sebagai berikut :

$$ARP = 100/EC_{50} \text{ (Prakash } et al., 2007 \text{ cit Kroyer, 2004).}$$

Pelarut yang digunakan untuk melarutkan DPPH yang baik dan konstan adalah metanol atau etanol, sedangkan pelarut yang lain akan mempengaruhi nilai reduksi. Standar atau kontrol positif yang sering digunakan adalah asam askorbat (vitamin C) (Brand-Williams *et al.*, 1995; Kim *et al.*, 2002; Lu and Foo, 2000; Sanches-Moreno *et al.*, 1998; Sanches-Moreno *et al.*, 1999) dan α -tocopherol (vitamin E) (Guo *et al.*, 2001; Lu and Foo, 2000; Sanches-Moreno *et al.*, 1998; Sanches-Moreno *et al.*, 1999). Pada metode aslinya, waktu inkubasi yang direkomendasikan adalah selama

30 menit (Kim *et al.*, 2002). Walaupun jika dilihat dalam kenyataannya waktu reaksi sangat bervariasi tergantung dari substrat yang digunakan (Brand-Williams *et al.*, 1995; Bondet *et al.*, 1997).

5. Tanaman dewandaru

a. Klasifikasi tanaman dewandaru (*Eugenia uniflora* Linn.)

Divisi	: Spermatophyta
Sub Divisi	: Angiospermae
Kelas	: Dicotyledonae
SubKelas	: Dialypetalae
Bangsa	: Mirtales
Suku	: Myrtaceae
Marga	: Eugenia
Familia	: <i>Eugenia uniflora</i> Linn. (Backer and Brink, 1965; Hutapea, 1991).

b. Nama daerah

Jawa	: Asam selong, belimbing londo, dewandaru
Sumatera	: Cereme asam

c. Morfologi

Habitus	: Perdu tegak, tahunan, tinggi \pm 5 meter
Batang	: Tegak berkayu, bulat, coklat
Daun	: Tunggal, berhadapan, berseling atau tersebar lonjong, ujung runcing, pangkal meruncing, tepi rata, pertulangan menyirip, panjang \pm 5 cm, lebar \pm 4 cm, berwarna hijau. Daun penumpu tidak ada.

- Bunga : Tunggal, beraturan, berkelamin dua; daun pelindung kecil, berwarna hijau; kelopak berdaun lekat, bertajuk tiga sampai lima; benangsari banyak putih; putik silindris; mahkota berbentuk kuku, kuning.
- Buah : Buni, bulat, batu, kotak, diameter \pm 1,5 cm, merah
- Biji : Kecil, keras, berwarna coklat,
- Akar : Tunggang, coklat

d. Kandungan kimia

Eugenia mengandung saponin, flavonoid, tannin (Hutapea, 1991), vitamin C, senyawa atsiri seperti sineol, sitronela, terpenin, sesquiterpen (Anonim, 1992) dan antosianin suatu turunan fenil benzo pirilium (Einbond *et al.*, 2004).

e. Kegunaan

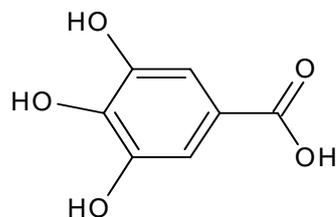
Sebagai obat diare (Hutapea, 1991), obat flu (Anonim, 1992), antiradikal (Sofiana, 2006).

6. Senyawa fenolik

Aktivitas antiradikal bebas yang terdapat dalam tanaman, baik sayur-sayuran maupun buah-buahan, disebabkan oleh kandungan fenolik dan flavonoidnya (Goli *et al.*, 2005). Senyawa fenol meliputi aneka ragam senyawa yang berasal dari tumbuhan, yang mempunyai ciri sama yaitu cincin aromatik yang mengandung satu atau dua penyulih hidroksil. Senyawa fenol cenderung mudah larut dalam air karena mereka umumnya sering kali berikatan dengan gula sebagai glikosida, dan biasanya terdapat dalam vakuola sel.

Senyawa ini diklasifikasikan dalam dua bagian yaitu fenol sederhana dan polifenol (Marinova *et al.*, 2005). Senyawa-senyawa polifenol seperti flavonoid dan galat mampu menghambat autooksidasi melalui mekanisme penangkapan radikal (*radical scavenging*) dengan cara menyumbangkan satu elektron kepada elektron yang tidak berpasangan dalam radikal bebas sehingga banyaknya radikal bebas menjadi berkurang (Pokorni *et al.*, 2001).

Pada penetapan kadar total senyawa fenolik digunakan metode Folin Ciocalteu karena metode ini lebih mudah dan bermanfaat dalam standarisasi senyawa botanikal, dengan reagen Folin Ciocalteu standar yang sangat peka terhadap asam. Sifat ini ditandai oleh perubahan visual reagen Folin Ciocalteu dari kuning ke biru dengan intensitas warna yang dapat diukur dengan spektrofotometer visibel yang dinyatakan dalam *Gallic Acid Equivalent* atau jumlah kesetaraan miligram asam galat dalam satu gram ekstrak/fraksi. Sebagai standarnya digunakan asam galat (*3,4,5-trihidroksi benzoic acid*) yang merupakan salah satu senyawa fenol yang memiliki kemampuan sitotoksik melawan sel kanker tanpa merusak sel tubuh lainnya dan antioksidan (Sohi *et al.*, 2003). Asam galat (*3,4,5-trihydroxy benzoic acid*) (Gambar 3) merupakan salah satu senyawa fenol yang memiliki aktivitas antioksidan yang kuat (Lee *et al.*, 2003).



Gambar 3. Struktur Asam Galat

Komponen fenolik memiliki kemampuan mereduksi yang berperan penting dalam menetralkan radikal bebas, pemadaman singlet dan triplet oksigen atau

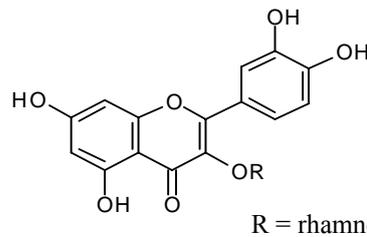
dekomposisi peroksida (Javanmardi *et al.*, 2003). Karena mempunyai peranan penting dalam menetralkan radikal bebas, maka dalam penelitian ini dilakukan penetapan kadar kandungan senyawa fenoliknya.

7. Senyawa flavonoid

Flavonoid adalah senyawa fenol alam yang terdapat dalam hampir semua tumbuhan mulai dari bangsa Algae hingga Gimnospermae (Mursi, 1998; Farkas *et al.*, 2004). Yang termasuk dalam senyawa flavonoid adalah flavon, flavonon katekin, dan antosianidin (Amić *et al.*, 2003), flavonol, dihidroflavonol dan derivat karbohidratnya, biflavon serta isoflavon (Farkas *et al.*, 2004). Flavonoid strukturnya merupakan turunan senyawa induk flavon. Jumlah derivat flavonoid lebih dari 4000 yang memiliki aktivitas antioksidan yang berbeda-beda yang mana kekuatannya tergantung jumlah dan posisi gugus hidroksi dalam molekulnya (Farkas *et al.*, 2004). Senyawa ini mengandung cincin aromatik yang terkonjugasi sehingga menunjukkan pita serapan yang kuat pada daerah spektrum UV dan sinar tampak (Harborne, 1996). Flavonoid mempunyai sejumlah gugus hidroksil yang tidak tersulih, atau suatu gula, sehingga flavonoid bersifat polar. Flavonoid umumnya larut dalam pelarut polar seperti etanol, metanol, butanol, aseton, dimetilsulfoksida, dimetilformamid dan air. Adanya gula yang terikat dengan flavonoid cenderung menyebabkan flavonoid lebih mudah larut dalam air dan dengan demikian campuran pelarut di atas, merupakan kombinasi pelarut yang lebih baik untuk glikosida (Markham, 1988).

Beberapa tahun belakangan diteliti kemampuan flavonoid sebagai antioksidan dimana flavonoid mempunyai kemampuan untuk merubah atau mereduksi radikal bebas dan juga sebagai antiradikal bebas (Giorgio, 2000). Tingginya potensi

senyawa flavonoid untuk menangkap radikal bebas dapat dijelaskan oleh kemampuannya dalam mendonorkan atom hidrogen dari gugus hidroksilnya (Amić *et al.*, 2003).



Gambar 4. Struktur Rutin (*quercetin-3-rhamnoglucoside*)

Penetapan kadar senyawa flavonoid menggunakan metode kolorimetri aluminium klorida dengan pengukuran absorbansi secara spektrofotometrik (Zhishen *et al.*, 1999) dengan rutin (*quercetin-3-rhamnoglucoside*) (Gambar 4) sebagai standarnya. Menurut Amić dan kolega (2003), flavonoid orto dihidroksi lebih berperan dalam penangkapan radikal daripada hidroksi keton. Reagen AlCl_3 membentuk kompleks dengan gugus hidroksi keton atau orto dihidroksi sehingga memperpanjang gelombang ke arah visible (efek batokromik), sedangkan NaNO_2 ditambahkan untuk mengionisasi flavonoid. Adapun NaOH akan menyerang gugus fenoksil yang terbentuk setelah penambahan NaNO_2 sehingga terbentuk garam fenolat. Garam fenolat akan menambah efek batokromik.

8. Simplisia

Simplisia adalah bahan alamiah yang dipergunakan sebagai obat yang belum mengalami pengolahan apapun juga dan kecuali dinyatakan lain simplisia merupakan bahan yang dikeringkan. Simplisia dapat berupa nabati, hewani atau mineral (Anonim, 1985). Simplisia nabati adalah simplisia yang berupa tumbuhan utuh, bagian tumbuhan atau eksudat tumbuhan atau isi sel yang dengan cara tertentu

dikeluarkan dari selnya, atau senyawa nabati lainnya yang dengan cara tertentu dipisahkan dari tumbuhannya dan belum berupa senyawa kimia murni (Anonim, 2000).

Variasi senyawa kandungan dalam produk hasil panen tumbuhan obat (*in vivo*) disebabkan aspek sebagai berikut :

- a. Genetik (bibit)
- b. Lingkungan (tempat tumbuh, iklim)
- c. Rekayasa agronomi (fertilizer, perlakuan selama masa tumbuh)
- d. Panen (waktu dan pasca panen) (Anonim, 2000).

Proses pemanenan dan preparasi simplisia merupakan proses yang dapat menentukan mutu simplisia dalam berbagai artian, yaitu komposisi senyawa, kandungan, kontaminasi dan stabilitas bahan. Namun demikian simplisia sebagai produk olahan, variasi senyawa kandungan dapat diperkecil, diatur atau diajapkan (Anonim, 2000). Untuk menjamin keseragaman senyawa aktif keamanan maupun kegunaannya, maka simplisia harus memenuhi persyaratan minimal. Persyaratan minimal tersebut, dipengaruhi oleh beberapa faktor antara lain :

- 1) Bahan baku simplisia.
- 2) Proses pembuatan simplisia termasuk cara penyimpanan bahan baku simplisia.
- 3) Cara pengepakan dan penyimpanan simplisia (Anonim, 1985).

9. Ekstraksi

Ekstraksi/penyarian adalah kegiatan penarikan zat aktif yang dapat larut dari bahan yang tidak dapat larut dengan pelarut cair. Simplisia yang disari, mengandung zat aktif yang dapat larut dan zat aktif yang tidak larut seperti serat, karbohidrat, protein, dan lain-lain. Proses penyarian yang baik diharapkan dapat melarutkan

sebagian besar senyawa aktif yang terkandung dalam tanaman seperti flavonoid, alkaloid, antrakinon, saponin, dan sebagainya. Namun struktur kimia yang berbeda-beda dari zat aktif simplisia tanaman terkadang mempersulit proses ekstraksi. Diketuainya zat aktif yang dikandung simplisia akan mempermudah dalam pemilihan cairan penyari dan metode penyarian yang tepat, sehingga proses ekstraksi akan lebih optimal (Anonim, 1986).

Cairan pelarut dalam proses pembuatan ekstrak adalah pelarut yang baik (optimal) untuk senyawa kandungan yang berkhasiat atau yang aktif, dengan demikian senyawa tersebut dapat terpisahkan dari bahan dan dari senyawa kandungan lainnya, serta ekstrak hanya mengandung sebagian besar senyawa kandungan yang diinginkan hampir semua metabolit sekunder yang terkandung. Faktor utama untuk pertimbangan pada pemilihan cairan penyari adalah sebagai berikut: selektivitas, kemudahan bekerja dan proses dengan cairan tersebut, ekonomis, ramah lingkungan serta keamanan (Anonim, 2000).

Lama waktu penyarian mengakibatkan waktu kontak antara cairan penyari dan serbuk semakin panjang. Hal ini memberi kesempatan untuk terjadinya proses difusi perpindahan zat dari dalam keluar sel. Semakin lama waktu kontak, semakin sering terjadi proses difusi, sehingga kadar zat yang tersari dalam cairan penyari akan semakin tinggi. Jenis ekstraksi dan cairan mana yang sebaiknya digunakan, sangat tergantung dari kelarutan bahan kandungan serta stabilitasnya (Voight, 1994).

Pada prosedur ekstraksi terdapat hal-hal penting yang dapat dipelajari dari pengalaman. Misalnya, bila mengisolasi kandungan dari jaringan daun yang larut dalam air, seharusnya lipid dihilangkan pada tahap sebelum pemekatan, yaitu dengan mencuci ekstrak berulang-ulang dengan eter minyak bumi (mengawal lemakkan).

Bila langsung disari dengan etanol, hampir semua klorofil dan lipid melekat pada dinding labu sehingga larutan air mengandung lipid. Dengan perlakuan tersebut, pemekatan dapat dilakukan tepat sehingga larutan air yang pekat dapat dipipet hampir tanpa mengandung cemaran minyak (Harborne, 1996).

10. Fraksinasi

Fraksinasi merupakan prosedur pemisahan yang bertujuan memisahkan golongan utama kandungan yang satu dari golongan utama yang lain. Pemisahan jumlah dan jenis senyawa menjadi fraksi yang berbeda untuk tiap tanaman berbeda-beda. Senyawa yang bersifat polar akan masuk ke pelarut polar dan senyawa yang bersifat non polar akan masuk ke pelarut non polar (Harborne, 1996).

Salah satu metode fraksinasi adalah dengan menggunakan kromatografi kolom. Kolom diisi dengan penyerap padat sebagai fase tetap dan dialiri dengan pelarut sebagai fase gerak. Sebagian kecil cuplikan yang ingin difraksi dimasukkan melalui sebelah atas dari kolom yang akan membentuk jalur-jalur serapan dari senyawa. Bila pelarut dibiarkan mengalir melalui kolom akan mengangkut senyawa-senyawa yang merupakan komponen-komponen dari campuran. Pemisahan komponen suatu campuran tergantung pada tingkat kepolaran dari fase gerak dan campuran itu sendiri (Sastrohamidjojo, 1991).

11. Spektrofotometri UV-Vis

Serapan cahaya oleh molekul dalam daerah spektrum UV-Vis tergantung pada struktur elektronik dari molekul. Spektra UV-Vis dari senyawa-senyawa organik berkaitan erat transisi-transisi diantara tingkatan-tingkatan tenaga elektronik. Dalam mempelajari serapan secara kuantitatif, berkas radiasi dikenakan pada cuplikan dan intensitas radiasi yang ditransmisikan diukur (Sastrohamidjojo, 1991).

Instrumen yang digunakan untuk mempelajari serapan atau emisi radiasi elektromagnetik sebagai fungsi dari panjang gelombang disebut spektrometer atau spektrofotometer. Komponen-komponen pokok dari spektrofotometer meliputi: sumber tenaga radiasi yang stabil, sistem yang terdiri dari lensa-lensa; cermin; dan celah, monokromator untuk mengubah radiasi menjadi komponen-komponen panjang gelombang tunggal, tempat cuplikan yang transparan dan detektor radiasi yang dihubungkan dengan sistem meter atau pencatat (Sastrohamidjojo, 1991).

Pelarut yang digunakan dalam spektrofotometri harus dapat melarutkan cuplikan dan meneruskan radiasi dalam daerah panjang gelombang yang sedang dipelajari. Beberapa pelarut yang biasa digunakan dalam daerah UV-Vis adalah aseton, benzena, karbon tetraklorida, kloroform, dioksan, diklorometan, etanol 95%, etil eter, metanol, air dan sebagainya. Hal-hal yang berkaitan dengan spektrofotometri UV-Vis adalah sebagai berikut:

a. Hukum Lambert

Hukum ini menyatakan bahwa bila cahaya monokromatik melewati medium tembus cahaya, laju berkurang sesuai medium yang homogen. Dalam penurunan ini dianggap bahwa :

- a) Radiasi yang masuk adalah monokromatik
- b) Penyerapan terjadi dalam volume yang mempunyai luas penampang yang sama
- c) Dengan radiasi tenaga cepat (tidak terjadi fluoresensi)
- d) Tidak berlaku pada konsentrasi yang tinggi (Sastrohamidjojo, 1991).

b. Hukum Beer

Umumnya hukum Beer berlaku dalam jangka lebar konsentrasi, jika struktur ion berwarna ataupun non-elektrolit berwarna dalam keadaan terlarut tidak berubah

dengan berubahnya konsentrasi. Elektrolit dalam kualitas kecil yang tidak bereaksi kimia dengan komponen berwarna, biasanya tidak mempengaruhi penyerapan cahaya sedangkan elektrolit dalam jumlah besar dapat mengakibatkan bergesernya absorbansi maksimum dan mengubah nilai koefisien ekstingsi (Basset, 1994).

F. Penelitian yang Relevan

Penelitian terkait yang pernah dilakukan, diantaranya uji aktivitas anti bakteri ekstrak kloroform dan metanol daun dewandaru (*Eugenia uniflora* L.) terhadap *Staphylococcus aureus*, *Shigella dysentriae* dan *Eschericia coli*. Hasilnya adalah bahwa daya aktivitas anti bakteri ekstrak metanol lebih poten dari ekstrak kloroform berdasarkan uji hambat pertumbuhan dilihat dari nilai MIC masing- masing ekstrak (Khotimah, 2004).

Penelitian lainnya pernah dilakukan oleh Einbond dan kolega (2004), bahwa telah terbukti adanya aktivitas antiradikal fraksi air-etanol (IC₅₀ sebesar 4,0 µg/ml) dari ekstrak buah dewandaru dan senyawa yang bertanggung jawab terhadap aktivitas tersebut adalah senyawa antosianin. Velazquez dan kolega (2002) juga telah melakukan penelitian tentang aktivitas antioksidan dengan metode DPPH dan hasilnya menunjukkan bahwa *Eugenia uniflora* efektif sebagai penangkap radikal (IC₅₀ sebesar 9,1 µg/ml) .

Penelitian yang lain mengenai kandungan fenol dan flavonoid serta uji aktivitas penangkap radikal dengan metode DPPH dalam ekstrak etanol, ekstrak etil asetat, dan ekstrak kloroform daun dewandaru (*Eugenia uniflora* L.) oleh Sofiana (2006) membuktikan bahwa ekstrak daun dewandaru memiliki aktivitas antiradikal, terutama ekstrak etanolnya memiliki aktivitas yang paling tinggi dengan IC₅₀ sebesar

8,86 µg/ml daripada ekstrak yang lainnya. Aktivitas antiradikal ini berkorelasi positif dengan kandungan senyawa fenol dan flavonoid yang dikandung oleh daun dewandaru.

Penelitian ini melanjutkan penelitian sebelumnya oleh Sofiana (2006), yaitu melakukan spesifikasi kandungan senyawa dalam daun dewandaru dengan cara fraksinasi terhadap ekstrak etanol yang memiliki aktivitas antiradikal paling tinggi. Hasil fraksinasi diharapkan dapat mengetahui senyawa yang paling efektif sebagai antiradikal yang terdapat dalam fraksi.

G. Hipotesis

Berdasarkan adanya aktivitas penangkap radikal dalam daun dewandaru, diduga fraksi polar dalam ekstrak etanol daun dewandaru memberikan potensi antiradikal. Senyawa fenol dan flavonoid diduga berperan terhadap aktivitas antiradikal.