

BAB I

PENDAHULUAN

A. Latar Belakang

Akhir-akhir ini penggunaan senyawa antioksidan berkembang dengan pesat baik untuk makanan maupun pengobatan, seiring dengan makin bertambahnya pengetahuan tentang aktivitas antiradikal bebas terhadap beberapa penyakit degeneratif seperti atherosklerosis, kanker dan katarak (Langseth, 1995). Penyakit degeneratif merupakan akibat stress oksidatif yang ditimbulkan karena terakumulasinya radikal bebas di dalam tubuh. Radikal bebas yang bersifat sangat reaktif akan berinteraksi dengan organ-organ tubuh maupun sel-sel tertentu dan menyebabkan sel tersebut menjadi tidak normal (Morteir *et al.*, 1995 *cit* Suzery dkk, 2004).

Radikal bebas adalah atom atau molekul yang mengandung satu atau lebih elektron-elektron yang tidak berpasangan pada orbital terluarnya (Windono dkk, 2001). Radikal bebas dapat berasal dari polutan lingkungan, radiasi, zat-zat kimia, racun, makanan cepat saji dan makanan yang digoreng pada suhu tinggi. Radikal dapat menyebabkan penurunan sistem imunitas, perubahan ekspresi gen dan mendorong pembentukan protein abnormal (Pourmorad *et al.*, 2006). Selain itu, radikal bebas juga terbentuk dalam tubuh akibat reaksi oksidasi reduksi oksigen yang tidak sempurna (dalam sel aerobik) (Ramanujam, 2007) dan bersifat merusak lemak dan karbohidrat (Halliwell *et al.*, 1995 *cit* Jamilah dkk, 2005).

ROS (*reactive oxygen species*) merupakan gabungan dari radikal-radikal bebas oksigen seperti $O_2^{\cdot-}$, $^{\cdot}OH$, $RO_2^{\cdot-}$ dan RO^{\cdot} serta senyawa yang mengandung oksigen tetapi tidak merupakan radikal misalnya HOCl, H_2O_2 , O_3 , dan $ONOO^-$.

Radikal-radikal bebas yang terbentuk ini akan bersifat memicu terbentuknya radikal bebas berikutnya, sehingga pembentukannya di dalam tubuh harus dihalangi atau dihambat dengan antioksidan (Halliwell *et al.*, 1995 *cit* Jamilah dkk, 2005).

Secara alamiah tubuh manusia telah dilengkapi pertahanan antioksidan dari enzim-enzim seperti katalase, superoksida dismutase (SOD), dan glutathion peroksidase. Namun demikian, antioksidan tersebut tidak dapat sepenuhnya mencegah kerusakan sel. Sistem perbaikan atau pencegahan yang efisien oleh antioksidan tetap berasal dari diet (makanan) (Kumalaningsih, 2006).

Antioksidan alami seperti α -tocopherol (vitamin E) banyak digunakan karena aktivitas antioksidannya lebih aman dan memiliki efek samping merugikan lebih kecil. Vitamin E bekerja memutus rantai radikal bebas melalui penangkapan radikal bebas (Halliwell *et al.*, 1995 *cit* Jamilah dkk, 2005). Namun aktivitas vitamin E lebih rendah daripada antioksidan sintetis (Han *et al.*, 2004) seperti BHA (*butylated hydroxy anisole*) dan BHT (*butylated hydroxy toluene*) yang diduga menyebabkan efek negatif terhadap kesehatan (Pourmorad *et al.*, 2006), yaitu meningkatkan terjadinya karsinogenesis (Amarowicz *et al.*, 2000 *cit* Rohman dan Riyanto, 2004). Oleh karena itu antioksidan sintetis tersebut perlu disubstitusi dengan antioksidan alami yang lebih aman dan memiliki aktivitas tinggi.

Beberapa penelitian menunjukkan bahwa beberapa tumbuhan dan buah-buahan terbukti bermanfaat melindungi tubuh manusia terhadap bahaya radikal bebas. Hal ini disebabkan karena adanya aktivitas antioksidan yang terdapat dalam tanaman tersebut (Soong *et al.*, 2004 *cit* Rohman dan Riyanto, 2006). Secara alami, tumbuhan yang mengandung antioksidan tersebar pada berbagai bagian tumbuhan seperti akar, batang, kulit, ranting, daun, buah, bunga dan biji. Umumnya antioksidan tersebut termasuk golongan senyawa fenol seperti flavonoid (Muchtaridi dkk, 2005).

Salah satu sumber antioksidan alami terdapat dalam tumbuhan dewandaru. Tumbuhan ini mengandung saponin, tanin, flavonoid (Hutapea dkk., 1994) seperti antosianin (Einbond *et al.*, 2004), dan minyak atsiri seperti sitronela, sineol, terpenin, dan sesquiterpen, serta vitamin C (Anonim, 1992; Walker *et al.*, 2005). Penelitian yang dilakukan oleh Utami dkk (2005) menunjukkan ekstrak etil asetat daun dewandaru mempunyai aktivitas antiradikal bebas dengan nilai IC₅₀ sebesar 12,01 µg/ml, dengan kandungan fenol dan flavonoid berturut-turut sebesar 33,77 mg/g ekstrak dan 32,66 mg/g ekstrak. Selain itu, Velàzquez *et al.* (2003) melakukan penelitian terhadap fraksi-fraksi ekstrak metanol tumbuhan dewandaru menunjukkan adanya aktivitas antioksidan.

Penelitian ini merupakan lanjutan penelitian Utami dkk (2005) dengan melakukan fraksinasi terhadap ekstrak etil asetat daun dewandaru yang sudah diketahui aktivitas antiradikalnya. Fraksinasi dilakukan dengan kromatografi kolom gravitasi secara gradien polaritas sehingga diperoleh fraksi non polar dan polar. Selanjutnya penelitian ini menggunakan fraksi non polar untuk memperoleh fraksi yang aktif sebagai antiradikal bebas daripada ekstrak kasarnya.

B. Perumusan Masalah

Berdasarkan uraian di atas, permasalahan yang diajukan yaitu:

1. Apakah fraksi non polar ekstrak etil asetat daun dewandaru (*Eugenia uniflora* L.) memiliki aktivitas antiradikal?
2. Seberapa besar aktivitas antiradikal fraksi non polar ekstrak etil asetat daun dewandaru (*Eugenia uniflora* L.) dibandingkan dengan vitamin E?
3. Apakah aktivitas antiradikal fraksi non polar ekstrak etil asetat daun dewandaru (*Eugenia uniflora* L.) disumbangkan oleh senyawa fenol dan flavonoid?

C. Tujuan Penelitian

Penelitian ini bertujuan untuk:

1. Menetapkan aktivitas antiradikal melalui nilai parameter IC_{50} (*inhibitory concentration 50%*), EC_{50} (*efficiency concentration 50%*) dan ARP (*antiradical power*) dalam fraksi non polar ekstrak etil asetat daun dewandaru (*Eugenia uniflora* L.).
2. Membandingkan aktivitas antiradikal fraksi non polar ekstrak etil asetat daun dewandaru (*Eugenia uniflora* L.) dengan vitamin E.
3. Mengetahui aktivitas antiradikal oleh fenol dan flavonoid dengan menetapkan kandungan senyawa fenol dan flavonoid dalam fraksi non polar ekstrak etil asetat daun dewandaru (*Eugenia uniflora* L.).

D. Tinjauan Pustaka

1. Simplisia

Simplisia adalah bahan alamiah yang belum mengalami pengolahan apapun juga dan kecuali dikatakan lain berupa bahan yang telah dikeringkan (Anonim, 1985). Kualitas simplisia sangat ditentukan oleh kualitas bahan tanaman meliputi faktor genetika, iklim, kesuburan tanah, teknik budidaya, waktu panen dan teknologi pasca panen antara lain meliputi cara pengeringan, sortasi dan pengepakan simplisia (Windono dkk, 2004).

2. Ekstraksi

Ekstraksi adalah kegiatan penarikan kandungan kimia yang dapat larut sehingga terpisah dari bahan yang tidak dapat larut dengan pelarut cair (Anonim, 2000). Maserasi (*macerase* = mengairi, melunakkan) adalah cara ekstraksi yang

paling sederhana. Bahan simplisia yang dihaluskan disatukan dengan bahan pengestraksi. Rendaman tersebut disimpan terlindung dari cahaya langsung untuk mencegah reaksi yang dikatalisis cahaya atau perubahan warna sambil sesekali dikocok kembali. Persyaratan rendaman harus dikocok berulang-ulang untuk menjamin keseimbangan konsentrasi bahan ekstraksi yang lebih cepat di dalam cairan. Keadaan diam selama maserasi menyebabkan turunnya perpindahan bahan aktif (Voight, 1994).

Saat proses maserasi, cairan penyari akan menembus dinding sel dan masuk ke dalam rongga sel yang mengandung zat aktif. Zat aktif tersebut akan larut dan karena adanya perbedaan konsentrasi antara larutan zat aktif di dalam sel dengan yang di luar sel maka larutan yang terpekat didesak ke luar. Keuntungan metode maserasi adalah cara pengerjaan dan peralatan yang digunakan sederhana dan mudah dilaksanakan (Anonim, 1986).

Cairan penyari yang baik harus memenuhi persyaratan yaitu:

- a. Murah dan mudah diperoleh
- b. Stabil secara fisika dan kimia
- c. Bereaksi netral
- d. Tidak mudah menguap dan tidak mudah terbakar
- e. Hanya menarik zat berkhasiat yang dikehendaki.

(Anonim, 1986)

Hasil dari maserasi diperoleh ekstrak. Ekstrak adalah sediaan kental yang diperoleh dengan mengekstraksi senyawa aktif dari simplisia nabati atau hewani menggunakan pelarut yang sesuai, kemudian semua atau hampir semua pelarut diuapkan hingga massa atau serbuk saja yang tersisa (Anonim, 2000).

3. Fraksinasi

Ekstrak kasar perlu difraksinasi untuk memisahkan golongan utama kandungan yang satu dari golongan utama lainnya (Anonim, 2000). Pemisahan dan pemurnian kandungan tumbuhan salah satunya dilakukan dengan teknik kromatografi sebagian besar bergantung pada sifat kelarutan senyawa yang akan dipisahkan (Harborne, 1987).

Salah satu metode fraksinasi adalah dengan menggunakan kromatografi kolom. Kolom diisi dengan penyerap padat sebagai fase tetap dan dialiri dengan pelarut sebagai fase gerak. Cuplikan yang akan difraksi dimasukkan ke dalam kolom dan dialiri fase gerak yang akan membentuk jalur-jalur serapan dari senyawa-senyawa yang merupakan komponen-komponen dari campuran. Pemisahan komponen suatu campuran tergantung pada tingkat kepolaran fase gerak dan campuran itu sendiri (Sastrohamidjojo, 2001).

4. Tumbuhan Dewandaru (*Eugenia uniflora* L.)

a. Klasifikasi

Divisi	: Spermatophyta
Subdivisi	: Angiospermae
Kelas	: Dicotyledoneae
Bangsa	: Myrtales
Suku	: Myrtaceae
Marga	: Eugenia
Jenis	: <i>Eugenia uniflora</i> L.
Sinonim	: <i>Eugenia michelii</i> Lamk.

(Hutapea dkk, 1994)

b. Nama Daerah

Sumatra : cereme asam (Melayu)

Jawa : asem selong, belimbing londo, dewandaru (Jawa)

(Hutapea dkk, 1994)

c. Deskripsi Tumbuhan

Tumbuhan ini berupa perdu tahunan dengan tinggi ± 5 m. Batangnya tegak, berkayu, berbentuk bulat dengan warna coklat. Daunnya berupa daun tunggal, tersebar, berbentuk lonjong dengan ujung runcing. Bagian pangkal daun meruncing, bagian tepi daun rata. Pertulangan daun menyirip. Ukuran daun ini dengan panjang ± 5 cm, lebar ± 4 cm dan berwarna hijau. Bunganya berupa bunga tunggal, berkelamin dua, memiliki daun pelindung kecil dan berwarna hijau. Kelopak bunga bertaju 3-5 buah. Mahkota bunga berbentuk kuku berwarna kuning. Buah dewandaru merupakan jenis buah buni, berbentuk bulat, diameter $\pm 1,5$ cm dengan warna merah. Bijinya berukuran kecil, keras dan berwarna coklat. Akarnya tunggang dan berwarna coklat (Hutapea dkk, 1994).

d. Kandungan Kimia Dan Kegunaan

Tumbuhan dewandaru mengandung saponin, flavonoid seperti antosianin (Einbond *et al.*, 2004), tanin (Hutapea dkk, 1994), vitamin C, dan senyawa atsiri seperti sitronela, sineol, terpenin, dan sesquiterpen (Anonim, 1992; Walker *et al.*, 2005). Daun dewandaru berkhasiat sebagai obat diare (Hutapea dkk, 1994), obat flu (Anonim, 1992).

e. Uji Aktivitas Tumbuhan Dewandaru

Penelitian mengenai potensi tumbuhan dewandaru sangat beragam, hal ini yang mendorong para peneliti untuk menggali potensi-potensi lain dari tumbuhan dewandaru. Penelitian yang dilakukan oleh Khotimah (2004) menyatakan bahwa

daun dewandaru memiliki aktivitas antibakteri terhadap *Staphylococcus aureus*, *Shigella dysenteriae*, dan *Escherichia coli*. Sedangkan Walker *et al.* (2005) menyatakan kandungan minyak atsiri dalam daun dewandaru memiliki aktivitas sitotoksik secara *in vitro* terhadap sel tumor manusia. Hasil penelitian Luize *et al.* (2005) membuktikan bahwa daun dewandaru memiliki aktivitas antihelmintik yaitu dengan menghambat pertumbuhan *Leishmania amazonensis* dan *Trypanozoma cruzi*. Selain itu, hasil penelitian Velázquez *et al.* (2003) dan Einbond *et al.* (2004) mengungkapkan bahwa tumbuhan dewandaru memiliki aktivitas antioksidan. Penelitian pendahuluan terhadap aktivitas penangkap radikal ekstrak daun dewandaru memberikan hasil ekstrak etil asetat daun dewandaru mempunyai nilai IC₅₀ sebesar 12,01 µg/ml, dengan kandungan fenol dan flavonoid berturut-turut sebesar 33,77 mg/g ekstrak dan 32,66 mg/g ekstrak (Utami dkk, 2005).

5. Radikal bebas

Radikal bebas adalah atom atau molekul yang mengandung satu atau lebih elektron yang tidak berpasangan pada orbital terluarnya. Hal ini mengakibatkan tidak stabilnya atom atau molekul tersebut. Untuk menjadi stabil akibat reaksi tersebut, molekul donor menjadi radikal baru yang tidak stabil. Demikian seterusnya terjadi reaksi berantai perpindahan elektron-elektron (Windono dkk, 2001).

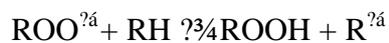
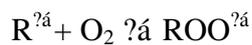
Proses metabolisme sehari-hari merupakan proses biokimia menyebabkan terbentuknya radikal bebas (Kumalaningsih, 2006). Radikal bebas terbentuk di mitokondria yang bertugas memproses glukosa dan oksigen menjadi energi melalui reaksi enzimatik. Saat pembentukan energi, terbentuk pula radikal bebas.

Radikal bebas oksigen yang dihasilkan ini merupakan hasil sampingan dari rantai pernafasan di mitokondria. Selain itu, radikal bebas juga dihasilkan dari reaksi peradangan (inflamasi) (Dalimartha dkk, 1999).

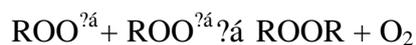
Tahapan reaksi autooksidasi adalah tahap inisiasi, propagasi dan terminasi. Pada tahap inisiasi, radikal lipid (R^{\cdot}) terbentuk dari molekul lipid (RH) dan terjadi pengurangan atom hidrogen oleh radikal reaktif misalnya radikal hidroksil (H^{\cdot}).



Selanjutnya tahap propagasi, radikal lipid (R^{\cdot}) diubah menjadi radikal lipid yang berbeda (ROO^{\cdot}) dan melibatkan pengurangan atom hidrogen dari molekul lipid atau penambahan atom oksigen pada radikal alkil.



Pada tahap terminasi, radikal bebas bergabung untuk membentuk molekul dengan elektron berpasangan (ROOR dan RR).



(Rohman dan Riyanto, 2004)

6. Antiradikal

Antioksidan merupakan senyawa yang dapat menunda atau menghambat oksidasi lipid atau molekul-molekul lainnya dengan menghambat inisiasi atau propagasi reaksi rantai oksidasi (Javanmardi *et al.*, 2003). Suatu senyawa dapat dikatakan memiliki sifat antioksidatif bila senyawa tersebut mampu mendonasikan satu atau lebih elektron kepada senyawa prooksidan, kemudian mengubah senyawa oksidan menjadi senyawa yang lebih stabil (Winarsi, 2005).

Menurut Winarsi (2005) dan Kumalaningsih (2006), antioksidan digolongkan atas dasar fungsinya sebagai berikut:

a. Antioksidan primer (antioksidan endogen/enzimatis)

Antioksidan ini berfungsi mencegah terbentuknya radikal bebas baru dengan mengubah radikal bebas yang ada menjadi molekul yang lebih stabil melalui pemutusan reaksi berantai. Contohnya: enzim superoksida dismutase, katalase dan glutathion peroksidase.

b. Antioksidan sekunder (antioksidan eksogen/non enzimatis)

Antioksidan ini berfungsi menangkap radikal bebas dan mencegah terjadinya kerusakan yang lebih parah. Contohnya: vitamin C, vitamin E, β -carotene, isoflavon, bilirubin dan albumin.

c. Antioksidan tersier

Antioksidan sekunder merupakan senyawa yang memperbaiki sel-sel dan jaringan yang rusak karena serangan radikal bebas. Misalnya: enzim *DNA repair*, metionin sulfoksida reduktase.

d. *Oxygen scavenger*

Antikosidan ini bekerja dengan mengikat oksigen sehingga tidak mendukung reaksi oksidasi, misalnya vitamin C.

e. *Chelators atau sequestrants*

Antioksidan ini mengikat logam yang mampu mengkatalisis reaksi oksidasi, misalnya asam sitrat dan asam amino.

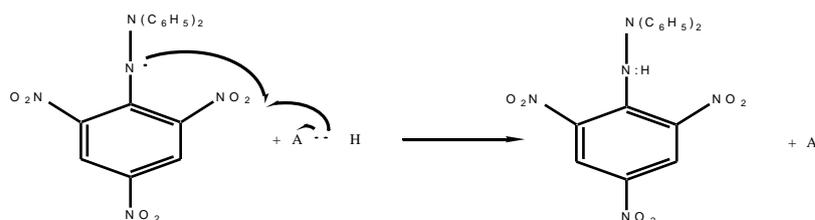
Antioksidan yang terdapat dalam tumbuhan umumnya berupa vitamin C, vitamin E, karotenoid, fitoestrogen (Prakash, 2001) dan komponen polifenol (Javanmardi *et al.*, 2003).

7. Metode Pengujian Aktivitas Antioksidan

Berikut ini beberapa metode pengujian aktivitas antioksidan:

a. Pengujian DPPH (*2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl*)

Metode dilakukan dengan mengukur penangkapan radikal DPPH[•] dalam pelarut organik polar pada suhu kamar. DPPH merupakan senyawa radikal bebas yang stabil, sehingga apabila digunakan sebagai pereaksi cukup dilarutkan dan tidak perlu dibuat baru (*recentur paratus*) (Windono dkk, 2001). Penurunan absorbansi DPPH dari warna ungu ke kuning diukur pada $\lambda = 517$ nm menurut reaksi pada Gambar (1):



Gambar 1. Reaksi Radikal DPPH dengan Antioksidan (Windono dkk, 2001)

Senyawa antioksidan akan menyumbangkan atom hidrogennya kepada radikal DPPH[•] agar menjadi stabil (Rohman dan Riyanto, 2004). Pemilihan metode ini karena pelaksanaannya mudah, sederhana, cepat, peka serta hanya membutuhkan sedikit pereaksi DPPH dan sampel (Hanani dkk, 2005).

b. Pengujian dengan asam tiobarbiturat

Pengujian ini berdasarkan adanya malonaldehid yang terbentuk dari asam lemak bebas tidak jenuh dengan paling sedikit mempunyai 3 ikatan rangkap dua. Malonaldehid selanjutnya bereaksi dengan asam tiobarbiturat membentuk produk kromogen yang berwarna merah yang dapat diukur absorbansinya pada panjang gelombang 532 nm (Rohman dan Riyanto, 2004).

c. Pengujian FRAP (*Ferric Reducing Antioxidant Power*)

Metode dilakukan dengan mengukur reaksi reduksi Fe^{3+} -TPTZ (*ferric 2,4,6-tripyridyl-s-triazine*) dalam plasma menjadi Fe^{2+} -TPTZ (kompleks *ferrous tripyridyltriazine*) yang berwarna biru. Pengukuran dilakukan pada λ 593 nm (Thaipong *et al.*, 2006). Kekuatan mereduksi berhubungan dengan derajat hidroksilasi dan konjugasi pada polifenol (Prior *et al.*, 2005).

d. Pengujian ORAC (*Oxygen Radical Absorption Capacity*)

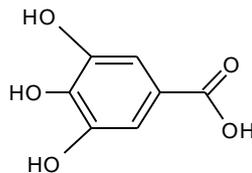
ORAC merupakan metode pengukuran fluoresensi akibat penghambatan radikal peroksil oleh antioksidan saat eksitasi pada λ 485 nm dan saat emisi pada λ 520 nm (Prior *et al.*, 2005; Thaipong *et al.*, 2006).

8. Senyawa Fenol

Fenol adalah senyawa dengan suatu gugus OH yang terikat pada cincin aromatik (Fessenden dan Fessenden, 1982). Senyawa fenol merupakan metabolit sekunder yang tersebar dalam tumbuhan. Senyawa fenol dalam tumbuhan dapat berupa fenol sederhana, antraquinon, asam fenolat, kumarin, flavonoid, lignin, dan tanin (Harborne, 1987).

Senyawa fenol telah diketahui memiliki berbagai efek biologis seperti aktivitas antioksidan melalui mekanisme sebagai pereduksi, penangkap radikal bebas, pengkelat logam, peredam terbentuknya oksigen singlet serta pendonor atom hidrogen (Karadeniz *et al.*, 2005). Polifenol juga memiliki aktivitas antitumor, antimutagenik (Marinova *et al.*, 2005), antibakteri (Bhandari *et al.*, 2004). Polifenol berperan penting dalam menstabilkan lipid teroksidasi dan berhubungan langsung dengan aksi antioksidan (Huang *et al.*, 2004).

Salah satu antioksidan alami yaitu asam galat (*3,4,5-trihydroxybenzoic acid*). Asam galat (Gambar 2) termasuk dalam senyawa fenol dan memiliki aktivitas antioksidan yang kuat (Lee *et al.*, 2003) bahkan lebih kuat dari trolox, suatu analog vitamin E yang larut dalam air (Sohi *et al.*, 2003).



Gambar 2. Struktur Asam Galat (*3,4,5-trihydroxybenzoic acid*)

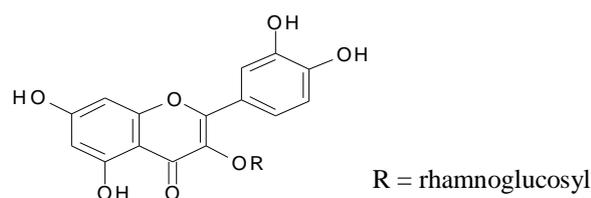
Penentuan kandungan fenol total dapat dilakukan dengan menggunakan pereaksi Folin-Ciocalteu (Lee *et al.*, 2003). Metode ini berdasarkan kekuatan mereduksi dari gugus hidroksi fenolik. Semua senyawa fenol yang terdapat dalam tumbuhan dapat terdeteksi dengan metode ini. Adanya inti aromatis pada senyawa fenol (gugus hidroksi fenolik) dapat mereduksi fosfomolibdat fosfotungstat menjadi molibdenum yang berwarna biru (Sudjadi dan Rohman, 2004). Kandungan fenol total dalam tumbuhan dinyatakan dalam GAE (*gallic acid equivalent*). Penentuannya dilakukan dalam suasana alkalis yaitu dengan penambahan Na_2CO_3 dan absorbansi diukur pada 750 nm (Lee *et al.*, 2003).

9. Senyawa Flavonoid

Flavonoid merupakan salah satu kelompok senyawa polifenolik yang biasa ditemukan secara luas dalam buah-buahan dan sayur-sayuran (Farkas *et al.*, 2004). Senyawa flavonoid terdapat pada semua bagian tumbuhan termasuk daun, akar, kayu, bunga dan biji (Harborne, 1987). Senyawa ini umumnya dalam keadaan terikat atau terkonjugasi dengan senyawa gula (Winarsi, 2005). Flavonoid terdiri dari beberapa kelompok untuk membedakan cincin C dari struktur dasar benzo-piron ($\text{C}_6\text{-C}_3\text{-C}_6$). Yang termasuk dalam flavonoid adalah flavon, flavonol, katekin, dan antosianidin (Amic! *et al.*, 2003).

Flavonoid telah diteliti memiliki berbagai aktivitas biologis. Flavonoid berperan sebagai antikanker, antiviral, antiinflamasi, mengurangi resiko penyakit kardiovaskuler, penangkapan radikal bebas (Farkas *et al.*, 2004). Selain itu, flavonoid juga dapat menghambat penggumpalan keping-keping sel darah dan melebarkan pembuluh darah (Anonim, 2006).

Rutin (Gambar 3) merupakan suatu glikosida flavonol (*quercetin-3-rhamnosylglucoside*) yang umum terdapat dalam tumbuhan (Harborne, 1987). Senyawa ini mampu menanggulangi kerapuhan pembuluh kapiler yang berhubungan dengan penyakit hemorrhagi ataupun hipertensi (Lee *et al.*, 2003).



Gambar 3. Struktur Rutin (*quercetin-3-rhamnosylglucoside*)

Kandungan flavonoid total dapat ditentukan secara kolometri dengan reagen AlCl_3 dan dinyatakan dalam RE (*rutin equivalent*) (Zhishen *et al.*, 1999 cit Karadeniz *et al.*, 2005). Prinsip penetapan berdasarkan gugus orto dihidroksi dan gugus hidroksi keton yang membentuk kompleks reagen AlCl_3 sehingga memberikan efek batokromik (Harborne, 1987; Markham, 1988).

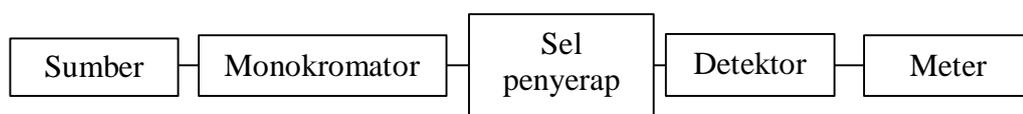
10. Metode Spektrofotometri

Spektrofotometri UV-visibel merupakan teknik spektroskopik yang memakai sumber radiasi elektromagnetik ultra violet dekat (190-380 nm) dan sinar tampak (380-780 nm) dengan memakai instrumen spektrofotometer. (Mulja dan Suharman, 1995).

Distribusi elektron didalam suatu senyawa organik secara umum, yang dikenal sebagai orbital elektron pi (π), sigma (σ), dan elektron tidak berpasangan (n). Apabila pada molekul dikenakan radiasi eletromagnetik maka akan terjadi eksitasi elektron ke tingkat energi yang lebih tinggi yang dikenal sebagai orbital elektron *anti bonding* (Mulja dan Suharman, 1995).

Penerapan spektrofotometri UV-vis pada senyawa organik didasarkan pada transisi $n-\pi^*$ ataupun $\pi-\pi^*$. Transisi ini terjadi dalam daerah spektrum sekitar 200 ke 700 nm yang digunakan dalam eksperimen dan karenanya memerlukan gugus kromofor dalam molekul itu (Day dan Underwood, 1999). Kromofor merupakan gugus tak jenuh kovalen yang dapat menyerap radiasi dalam daerah-daerah UV dan vis. Pada senyawa organik dikenal pula gugus auksokrom yaitu gugus jenuh yang terikat pada kromofor. Terikatnya auksokrom pada kromofor dapat mengubah panjang gelombang dan intensitas serapan maksimum (Sastrohamidjodjo, 2001).

Komponen penting dari spektrofotometer sebagai berikut (Gambar 4): (i) Sumber tenaga radiasi yang stabil, (ii) sistem yang terdiri atas lensa-lensa cermin, celah-celah, dan lain-lain, (iii) monokromator untuk mengubah radiasi menjadi komponen-komponen panjang gelombang tunggal, (iv) tempat cuplikan yang transparan, dan (v) detektor radiasi yang dihubungkan dengan sistem meter atau pencatat.



Gambar 4. Diagram Spektrofotometer (Sastrohamidjojo, 2001)

E. Hipotesis

Fraksi-fraksi non polar ekstrak etil asetat daun dewandaru (*Eugenia uniflora* L.) diduga mengandung senyawa yang memiliki aktivitas antiradikal yang salah satunya disumbangkan oleh senyawa fenol dan flavonoid.