

**POTENSI AKTIVITAS EKSTRAK ETANOL DAUN
DEWANDARU (*Eugenia uniflora* L.) SEBAGAI AGEN
PENGKHELAT LOGAM Fe DAN PENANGKAP
MALONALDEHID**

SKRIPSI



Oleh :
NOVA RAHMA WIDYANINGRUM
K 100 04 0168

FAKULTAS FARMASI
UNIVERSITAS MUHAMMADIYAH SURAKARTA
SURAKARTA
2008

BAB I

PENDAHULUAN

A. Latar Belakang Masalah

Salah satu kelompok senyawa organik yang terdapat dalam tumbuhan, hewan atau manusia dan yang sangat berguna bagi kehidupan manusia ialah lipid (Madhavi *et al.*, 1996; Poedjiadi, 1994). Banyak makanan yang berasal dari tumbuhan memiliki kandungan lemak tak jenuh yang tinggi, sedangkan pada hewan memiliki level yang lebih rendah (Madhavi *et al.*, 1996).

Ikatan rangkap yang terdapat pada lipid membuat lipid berada pada kondisi yang tidak jenuh, dan ini menyebabkan lipid rentan terhadap penyerangan oksigen atau mudah teroksidasi sehingga memacu terjadinya perubahan kompleks kimia pada lipid tersebut (Madhavi *et al.*, 1996). Proses oksidasi dapat terjadi karena asam lemak tidak jenuh memiliki atom H yang tidak stabil terutama yang terikat oleh atom C dekat dengan ikatan rangkap, sehingga terbentuk radikal bebas baru yang peka terhadap oksigen dan dapat membentuk radikal bebas peroksi (Astuti, 1997). Radikal bebas ini akan bereaksi dengan lemak sehingga menghasilkan hidrogenperoksida dan radikal bebas lemak yang baru. Salah satu bentuk radikal bebas adalah ROS (*reactive oxygen species*) yang dapat menginisiasi proses peroksidasi lipid (Josephy, 1997; Mullock and Snell, 1987).

Peristiwa peroksidasi lipid ini akan menghasilkan produk aldehid, keton, alkohol, asam karboksilat dan menghasilkan produk yang biasa dikenal sebagai malonaldehid, suatu aldehid (Josephy, 1997). Malonaldehid (MDA) ini dilaporkan sangat toksik sekali terhadap membran sel, karena dianggap sebagai inisiator suatu

reaksi, pelengkap karsinogen, maupun sebagai senyawa mutagen (Madhavi *et al.*, 1996). Akibatnya, sel terutama membran sel akan mengalami kerusakan dan berakibat timbulnya penyakit-penyakit degeneratif, kanker, proses penuaan, dan lain-lain (Gulciin *et al.*, 2006; Silalahi, 2001; Subeno, 2002). Astuti (1997) menuliskan kadar MDA pada penderita aterosklerosis lebih tinggi dari pada orang sehat. Semakin tua umur seseorang, kandungan MDA juga semakin tinggi dibandingkan dengan anak muda. Walaupun kadar MDA bervariasi dengan umur, namun kadarnya tidak melebihi 4 nmol/ml serum (Yagi, 1993).

Proses peroksidasi lipid ini dapat dipercepat dengan adanya logam transisi seperti besi, tembaga, kobal dan mangan yang akan mengkatalisir terbentuknya radikal bebas secara nonenzimatis (Astuti, 1997). Logam transisi memiliki elektron yang tidak berpasangan sehingga sangat reaktif dalam mengkatalisis reaksi oksidasi maupun reduksi dalam tubuh. Adanya ion logam transisi yang berlebihan dalam tubuh misalnya ferro, sangat berpotensi dalam pembentukan ROS (oksigen spesies reaktif). Ion logam juga dapat menginisiasi autooksidasi dengan bereaksi langsung dengan substrat dan atau hidroperoksida yang ada dalam sistem, sebagai pengotor atau terbentuk dalam tahap propagasi (Winarsi, 2005)

Untuk menangkal proses autooksidasi yang ditimbulkan oleh adanya ROS diperlukan suatu senyawa yang bersifat antioksidan. Senyawa antioksidan sintetis yang biasa digunakan dalam perdagangan, misalnya BHA (Butil Hidroksi Anisol), BHT (Butil Hidroksi Toluen), propil galat, tert-butil hidroksi quinon (TBHQ) dan tokoferol. Antioksidan alami berasal dari tumbuhan, pada umumnya adalah senyawa fenolik atau polifenolik yang dapat berupa golongan flavonoid, turunan asam

sinamat, kumarin, tokoferol dan asam-asam organik polifungsional (Madhavi *et al.*, 1996).

Saat ini banyak sekali penelitian ilmiah untuk mencari sumber antioksidan alami dari tanaman untuk mengganti antioksidan sintetis, dimana efek samping pada pemakaian berkepanjangan menyebabkan karsinogenik (Gulciin *et al.*, 2006). Senyawa antioksidan dari tanaman alam ini lebih aman dan selektif serta diduga tidak mengandung senyawa kimia yang berbahaya bagi kesehatan tubuh (Madhavi *et al.*, 1996).

Salah satu tanaman alam yang berpotensi sebagai antioksidan adalah dewandaru (*Eugenia uniflora* L.). Dewandaru merupakan tanaman yang hidup dan tersebar di pulau Jawa dan Sumatera (Hutapea, 1991). Tanaman ini mengandung senyawa seperti sitronela, sineol, terpenin, sesquiterpen, vitamin C, saponin, flavonoid, tannin dan antosianin (Eindbond *et al.*, 2004). Utami dkk (2005) membuktikan bahwa ekstrak kloroform, etil asetat dan etanol daun dewandaru memiliki aktivitas sebagai penangkap radikal dan diduga senyawa yang bertanggung jawab terhadap aktivitas tersebut adalah senyawa flavonoid. Kandungan senyawa flavonoid dalam ekstrak kloroform, etil asetat dan etanol daun dewandaru setara dengan rutin masing-masing 2,631 mg/g ekstrak, 32,662 mg/g ekstrak dan 28,780 mg/g ekstrak.

Fakta lain mengatakan bahwa keberadaan senyawa fenol dan polifenol pada bagian daun sangat dimungkinkan, sebab senyawa ini bertanggung jawab pada proses fotosintesis (Wijekisera, 1991) dan diduga kandungan senyawa fenol dan polifenol ini banyak terdapat dalam ekstrak etanol daun dewandaru. Untuk itu perlu

dilakukan penelitian yang berkaitan dengan aktivitas ekstrak etanol daun dewandaru (*Eugenia uniflora* L.) sebagai agen pengkhelat logam dan penangkap hasil dari peristiwa peroksidasi lipid yaitu malonaldehid.

B. PERUMUSAN MASALAH

Dari latar belakang diatas, muncul beberapa permasalahan yang perlu dirumuskan, antara lain :

1. Apakah ekstrak etanol daun dewandaru (*Eugenia uniflora* L.) memiliki potensi aktivitas sebagai pengkhelat logam ?
2. Apakah ekstrak etanol daun dewandaru (*Eugenia uniflora* L.) memiliki potensi aktivitas sebagai penangkap malonaldehid?

C. TUJUAN PENELITIAN

Penelitian ini dilakukan dengan tujuan antara lain sebagai berikut :

1. Untuk menentukan potensi aktivitas ekstrak etanol daun dewandaru (*Eugenia uniflora* L.) sebagai pengkhelat logam.
2. Untuk menentukan potensi aktivitas ekstrak etanol daun dewandaru (*Eugenia uniflora* L.) sebagai penangkap malonaldehid.

D. TINJAUAN PUSTAKA

1. Tanaman Dewandaru (*Eugenia uniflora* L)

a. Uraian Tanaman

Eugenia uniflora L. merupakan tanaman perdu yang tumbuh tahunan.

Tingginya \pm 5 meter. Batangnya tegak, berkayu, berbentuk bulat dan

berwarna coklat. Daunnya tunggal, tersebar, berbentuk lonjong, dengan ujung yang runcing dan bagian pangkalnya meruncing dengan tepi yang rata, pertulangannya menyirip, yang panjangnya ± 5 centimeter dengan lebar ± 4 centimeter dan berwarna hijau. Bunga berkeping tunggal, berkelamin dua, daun pelindung kecil, banyak, berwarna putih, putik berbentuk silindris, mahkota berbentuk kuku, berwarna kuning. Buah berbentuk bulat, dengan diameter $\pm 1,5$ centimeter, berwarna merah. Bijinya kecil, keras dan berwarna coklat. Akar tanaman merupakan akar tunggang dan berwarna coklat.

b. Klasifikasi dan Sistematika Tanaman

Divisi : Spermatophyta
Subdivisio : Angiospermae
Kelas : Dicotyledoneae
Bangsa : Myrtales
Suku : Myrtaceae
Marga : Eugenia
Jenis : *Eugenia uniflora* L
Nama Umum : Dewandaru
Nama Daerah : Cereme asam (Melayu, Sumatera), asem
selong, belimbing londo, dewandaru
(Jawa).

(Hutapea, 1994)

c. Kandungan Kimia

Eugenia uniflora mengandung saponin, tannin, vitamin C, senyawa atsiri seperti sineol, sitronella, terpenin, sesquiterpen, flavonoid dan antosianin suatu turunan fenil benzo pirilium (Einbond *et al.*, 2004; Hutapea, 1991). Kegunaan sebagai obat diare dan obat flu (Hutapea, 1991).

d. Potensi Tanaman Dewandaru

Kandungan antosianin pada bagian buah yang diteliti oleh Einbond *et al.*, (2004) sebagai antioksidan yang sangat aktif dengan nilai IC_{50} sekitar $4 \pm 0,2$ mg/ml. Utami dkk (2005) membuktikan bahwa adanya aktivitas antioksidan ekstrak kloroform, etil asetat dan etanol daun dewandaru dan diduga senyawa yang bertanggung jawab terhadap aktivitas tersebut adalah senyawa flavonoid. Kandungan senyawa flavonoid dalam ekstrak kloroform, etil asetat dan etanol daun dewandaru setara dengan rutin masing-masing 2,631 mg/g ekstrak, 32,662 mg/g ekstrak dan 28,780 mg/g ekstrak serta aktivitas antioksidannya juga hampir mendekati vitamin E, dilihat dari nilai IC_{50} nya. Sedangkan Wijekisera (1991) menyebutkan bahwa kandungan fenol dan polifenol pada daun dewandaru berperan dalam proses fotosintesis sehingga merupakan senyawa metabolit sekunder yang penting bagi tanaman itu sendiri. Diperkuat oleh penelitian Utami dkk (2005) bahwa senyawa fenol dan polifenol bertanggung jawab terhadap aktivitas antioksidan. Pada penelitian Yanuarti (2007) menyatakan bahwa ekstrak etanol daun dewandaru dapat menghambat aktivitas GST (*Glutathione S-Transferase*).

2. Proses Peroksidasi Lipid

Autooksidasi lipida berjalan dalam dua tahap, tahap pertama, oksidasi berjalan lambat dengan laju kecepatan seragam. Tahap ini sering disebut periode induksi. Oksidasi pada periode induksi ini berlangsung beberapa waktu sampai pada waktu titik tertentu dimana reaksi memasuki tahap kedua yang mempunyai laju oksidasi dipercepat. Laju pada oksidasi tahap kedua beberapa kali lebih cepat dari laju oksidasi tahap pertama. Asam lemak yang memiliki ikatan rangkap lebih banyak (misal asam linoleat) bereaksi lebih cepat dibanding yang berikatan rangkap lebih sedikit (metil oleat) sehingga periode induksinya lebih pendek (Trilaksani, 2003).

Mekanisme oksidasi lipida tidak jenuh diawali dengan tahap inisiasi, yaitu terbentuknya radikal bebas (R^*) bila lipida kontak dengan panas, cahaya, ion metal dan oksigen. Reaksi ini terjadi pada grup metilen yang berdekatan dengan ikatan rangkap $-C=C-$ (Buck, 1991). Tahap inisiasi terjadi karena bantuan sumber energi eksternal seperti panas, cahaya atau energi tinggi dari radiasi, inisiasi kimia dengan terlarutnya ion logam atau metalloprotein seperti haem (Trilaksani, 2003). Tahap selanjutnya adalah tahap propagasi dimana autooksidasi berawal ketika radikal lipida (R^*) hasil tahap inisiasi bertemu dengan oksigen membentuk radikal peroksida (ROO^*). Reaksi oksigenasi ini terjadi sangat cepat dengan energi aktivasi hampir nol sehingga konsentrasi ROO^* yang terbentuk jauh lebih besar dari konsentrasi R^* dalam sistem makanan dimana oksigen berada. Radikal peroksida yang terbentuk akan mengekstrak ion hidrogen dari lipida lain (R_1H) membentuk hidroperoksida

(ROOH) dan molekul radikal lipida baru (R_1^*). Selanjutnya reaksi autooksidasi ini akan berulang sehingga merupakan reaksi berantai (Trilaksani, 2003).

Tahap terakhir oksidasi lipida adalah tahap terminasi, dimana hidroperoksida yang sangat tidak stabil terpecah menjadi senyawa organik berantai pendek seperti aldehid, keton, alkohol dan asam (Trilaksani, 2003). Salah satu produk dari proses peroksidasi lipid adalah malonaldehid yang bersifat toksik terhadap sel endotel, sel otot polos dan mengakibatkan makrofag, berkumpul dalam lapisan subendotel dan berubah menjadi sel busa (Astuti, 1997). Malonaldehid ini dilaporkan sangat toksik sekali terhadap membran sel, karena dianggap sebagai inisiator suatu reaksi, pelengkap karsinogen, maupun sebagai senyawa mutagen (Madhavi *et al.*, 1996). Akibatnya, sel terutama membran sel akan mengalami kerusakan dan berakibat timbulnya penyakit-penyakit degeneratif, kanker, proses penuaan, dan lain-lain (Gulciin *et al.*, 2006; Silalahi, 2001; Subeno, 2002). Astuti (1997) melaporkan kadar MDA pada penderita aterosklerosis lebih tinggi dari pada orang sehat. Semakin tua umur seseorang, kandungan MDA juga semakin tinggi dibandingkan dengan anak muda. Walaupun kadar MDA bervariasi dengan umur, namun kadarnya tidak melebihi 4 nmol/ml serum (Yagi, 1993).

3. Logam Transisi dalam Peroksidasi Lipid

Logam transisi memiliki elektron yang tidak berpasangan yang dapat disebut radikal bebas. Senyawa radikal bebas sangat reaktif dalam mengkatalisis reaksi oksidasi dan reduksi (redoks). Adanya ion logam transisi yang berlebihan dalam tubuh sangat berpotensi dalam pembentukan *Reactive*

Oxygen Species (ROS) dan *Reactive Nitrogen Species* (RNS). ROS inilah yang dapat menginisiasi proses peroksidasi lipid dan diperparah lagi jika terdapat katalis berupa logam. Ion logam juga dapat menginisiasi autooksidasi dengan bereaksi langsung dengan substrat dan atau hidroperoksida yang ada dalam sistem, sebagai pengotor atau terbentuk dalam tahap propagasi (Winarsi, 2005).

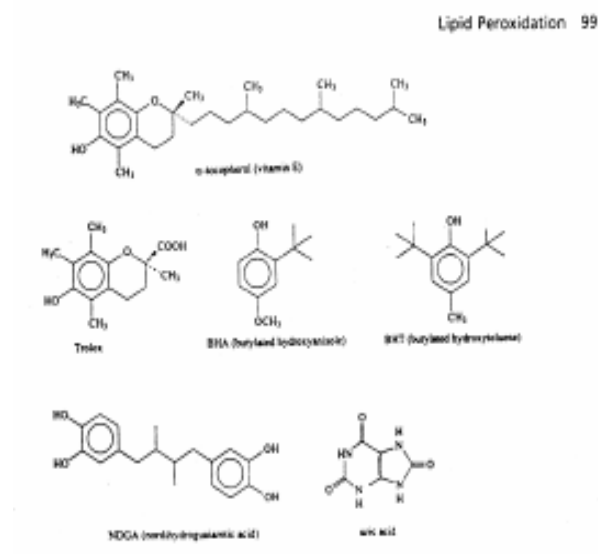
Cara yang paling efektif untuk memperlambat suatu proses oksidasi oleh oksigen atau autooksidasi adalah dengan menambah agen pengkhelat, misalnya EDTA, ferrozine, a,a-dipiridil atau asam nitriloasetat serta ortofenantrolin. Khelasi adalah reaksi keseimbangan antara ion logam dengan agen pengikat, yang dicirikan dengan terbentuknya lebih dari satu ikatan antara logam tersebut dengan molekul agen pengikat, yang menyebabkan terbentuknya struktur cincin yang mengelilingi logam tersebut. Mekanisme pengikatan Al^{+++} dan Fe^{++} oleh gugus fungsi dari komponen organik adalah karena adanya satu gugus karboksil dan satu gugus fenolik, atau dua gugus karboksil yang berdekatan bereaksi dengan ion logam. Jika suatu logam telah dikelat maka akan terbentuk suatu kompleks yang stabil dan reaksi yang dikatalisir pun dapat terhambat (Berlett *et al.*, 2001).

4. Antioksidan

Antioksidan merupakan zat yang melindungi tubuh dari efek radikal bebas yang merusak sel-sel tubuh dan menyebabkan berbagai penyakit degeneratif seperti kanker dan jantung (Anonim, 2006). Suatu senyawa 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 (Hernani, 2005; Madavi *et al.*, 1996).

Antioksidan sangat beragam jenisnya, berdasarkan sumbernya antioksidan dibagi menjadi 2 kelompok, yaitu antioksidan sintetis dan antioksidan alami. Beberapa contoh antioksidan sintetis adalah BHA (Butil Hidroksi Anisol), BHT (Butil Hidroksi Toluen), propil galat, tert-butil hidroksi quinon (TBHQ) dan tokoferol. Antioksidan alami berasal dari tumbuhan, yang pada umumnya adalah senyawa fenolik atau polifenolik yang dapat berupa golongan flavonoid, turunan asam sinamat, kumarin, tokoferol dan asam-asam organik polifungsional (Madhavi *et al.*, 1996). Tetapi akhir-akhir ini, banyak sekali penelitian ilmiah untuk mencari sumber antioksidan alami dari tanaman untuk mengganti antioksidan sintetis, dimana efek samping pada pemakaian berkepanjangan menyebabkan karsinogenik (Gulciin *et al.*, 2006).



Gambar 1. Antioksidan sintetis (Josephy, 1997)

Berdasarkan mekanisme kerjanya, antioksidan dapat dikelompokkan menjadi 3 kelompok, antara lain :

1. Antioksidan primer (antioksidan endogen atau antioksidan enzimatis).
Misalnya enzim Superoksid Dismutase, katalase dan Glutation peroksidase, enzim-enzim ini dapat 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 nonenzimatis).
Contohnya vitamin E, vitamin C, β -karoten, isoflavon, asam urat, bilirubin dan albumin. Senyawa-senyawa ini dikenal sebagai penangkap radikal bebas (*scavenger free radical*).
3. Antioksidan tersier, misalnya DNA repair, metionin sulfoksida reduktase, yang berperan dalam perbaikan biomolekul yang disebabkan oleh radikal bebas. Keseimbangan oksidan dan antioksidan sangat menentukan status kesehatan seseorang, terutama fungsi sistem imun (Hernani, 2005).

5. Metode Pengujian Aktivitas Antioksidan

Adapun pengujian antioksidan dapat dilakukan dengan beberapa metode, antara lain :

a) Metode Pengkelat Logam

Pengujian ini didasarkan adanya pembentukan kompleks antara besi (Fe^{2+}) dengan ferrozine, suatu katalis sekaligus pembentuk kompleks, dan dihambat oleh adanya senyawa antioksidan. Dengan adanya agen pembentuk kelat, seperti antioksidan, maka kompleks yang terbentuk akan

kacau, karena senyawa antioksidan akan mengikat Fe^{2+} dan kelebihan Fe^{2+} akan membentuk kompleks dengan ferrozine, menghasilkan kompleks warna pula. Hasilnya terjadi penurunan kompleks warna merah yang terbentuk, dan absorbansi diukur dengan menggunakan spektrofotometer visible pada panjang gelombang 562 nm. Kontrol pembanding yang digunakan adalah senyawa kompleks yang terbentuk antara Fe^{2+} dengan ferrozine (Gulciin *et al.*, 2006). Agen pengkhat lainnya misalnya EDTA, a,a-dipiridil atau asam nitriloasetat serta ortofenantrolin (Berlett *et al.*, 2001).

b) Metode Penangkapan Malonaldehid dengan Asam Tiobarbiturat

Malonaldehid merupakan salah satu produk degradasi dari peristiwa peroksidasi lipid (Mullock and Snell, 1987). Metode penangkapan malonaldehid menggunakan metode TBA (Tiobarbiturat Acid) (Lin dan Yen, 1999), yaitu dengan mengukur kompleks warna yang terjadi antara TBA dengan malonaldehid pada panjang gelombang 532 nm menggunakan spektrofotometer UV-Vis (Lin dan Yen, 1999). Metode ini didasarkan pada kondensasi molekul malonaldehid, yang merupakan produk dari peroksidasi lipid, dengan dua molekul dari TBA pada kondisi asam. Produk yang dihasilkan adalah produk kromogen berwarna merah dan diukur berdasarkan absorbansi pada spektrofotometer visible pada panjang gelombang 532 nm. Validitas dari metode ini didasarkan pada asumsi bahwa malonaldehid yang terbentuk pada pengujian TBA, menunjukkan adanya peroksida yang berlimpah (Josephy, 1997)

F. LANDASAN TEORI

Aktivitas antioksidan dari suatu senyawa dapat diukur dengan menggunakan banyak metode, antara lain metode pembentuk kelat dan metode TBA yang didasarkan pada penangkapan produk degradasi dari peristiwa peroksidasi lipid. Pada potensi aktivitas antioksidan ini digunakan ekstrak etanol dari daun dewandaru (*Eugenia uniflora* L.), salah satu ekstrak yang dianggap mampu membentuk kelat dengan senyawa oksidan dan menangkap malonaldehid sebagai produk dari peroksidasi lipid.

Hasil berbagai penelitian tentang aktivitas daun dewandaru, didapatkan bahwa ekstrak etanol, kloroform maupun etil asetat memiliki aktivitas sebagai antioksidan karena mengandung suatu senyawa yang mampu mengikat ion logam sekaligus menangkap malonaldehid. Senyawa tersebut diidentifikasi merupakan golongan senyawa fenolik atau polifenol dan flavonoid. Utami dkk (2005) membuktikan bahwa adanya aktivitas penangkap radikal ekstrak kloroform, etil asetat dan etanol daun dewandaru dan diduga senyawa yang bertanggung jawab terhadap aktivitas tersebut adalah senyawa flavonoid. Kandungan senyawa flavonoid dalam ekstrak kloroform, etil asetat dan etanol daun dewandaru setara dengan rutin masing-masing 2,631 mg/g ekstrak, 32,662 mg/g ekstrak dan 28,780 mg/g ekstrak.

Flavonoid dapat mengamankan sel dari senyawa oksigen reaktif (*Reactive Oxygen Species* = ROS) dan mampu mengkelat ion Fe^{2+} . Flavonoid dan senyawa polifenol juga berperan melindungi sel dari serangan oksidasi. Hal ini terjadi karena kedua senyawa tersebut mampu sebagai pengkelat ion Fe^{2+} sekaligus penstabil Fe^{2+} . Dengan cara ini, ion Fe^{2+} tidak mampu menstimulir pembentukan peroksidasi lipid

sehingga produk degradasinya dapat diminimalisir (Winarsi, 2005). Senyawa flavonoid maupun polifenol memiliki gugus hidroksil yang berdekatan dengan gugus karboksil atau 2 gugus karboksil yang berdekatan, yang memungkinkan lepasnya atom hidrogen dari hidroksil sehingga mampu mengikat logam dan menangkap malonaldehid.

G. HIPOTESIS

Ekstrak etanol daun dewandaru (*Eugenia uniflora* L.) memiliki aktivitas antioksidan sebagai agen pengkelat logam dan sebagai agen penangkap malonaldehid, hasil dari peroksidasi lipid.