

**UJI AKTIVITAS PENANGKAP RADIKAL ISOLAT A, B, DAN
C FRAKSI II EKSTRAK ETANOL DAUN DEWANDARU
(*Eugenia uniflora* L.) DENGAN METODE DPPH**

SKRIPSI



Oleh :

**RIZAL PRATAMA NUGROHO
K 100050295**

**FAKULTAS FARMASI
UNIVERSITAS MUHAMMADIYAH SURAKARTA
SURAKARTA
2009**

BAB I

PENDAHULUAN

A. Latar Belakang

Radikal bebas adalah atom atau molekul yang mempunyai satu atau lebih elektron yang tak berpasangan dan sangat reaktif (Fessenden dan Fessenden, 1986). Radikal bebas dapat dihasilkan dari hasil metabolisme tubuh dan juga dari luar tubuh seperti asap rokok, polusi lingkungan, radiasi, obat-obatan, pestisida, serta sinar ultraviolet (Langseth, 1995). Jika jumlahnya sedikit, radikal bebas dapat dinetralkan oleh sistem enzimatis dalam tubuh, namun jika jumlahnya berlebih, radikal bebas akan memicu efek patologis (Middleton *et al*, 2000). Sekitar 40 penyakit mencakup aterosklerosis, hipertensi, iskemik, *alzheimer*, *parkinson*, kanker, dan peradangan disebabkan oleh radikal bebas dan telah diselidiki secara detail (Behera *et al.*, 2004 *cit* Tripathy dan Upadhyay, 2001; Khanom *et al.*, 2000; Niki *et al.*, 1995; Toda *et al.*, 1991). Oleh karena itu, untuk mencegah atau mengurangi penyakit kronis karena radikal bebas diperlukan senyawa yang dapat menetralkan radikal bebas.

Antioksidan adalah substansi yang dapat menstabilkan radikal bebas dengan melengkapi kekurangan elektron yang dimiliki radikal bebas, dan menghambat terjadinya reaksi berantai dari radikal bebas. Aktivitas antioksidan suatu senyawa dapat diukur dari kemampuannya menangkap radikal bebas (Windono *et al*, 2001). Tubuh manusia secara alami telah dilengkapi pertahanan antioksidan dari enzim-enzim seperti *katalase*, *superoksida dismutase (SOD)*,

glutation peroksidase, dan *glutation S-transferase*. Namun demikian, antioksidan tersebut belum dapat sepenuhnya mencegah kerusakan sel. Tubuh masih memerlukan antioksidan dari luar (Vaya dan Aviram, 2001).

Beberapa antioksidan dapat dihasilkan dari produk alami seperti dari rempah, herbal, sayuran, dan buah. Herbal tanaman obat mempunyai daya aktivitas antioksidan lebih tinggi bila dibandingkan dengan buah dan sayuran (Hernani dan Raharjo, 2006).

Dewandaru (*Eugenia uniflora* L.) adalah salah satu tumbuhan yang hidup tersebar di pulau Jawa (Backer and Brink, 1965). Penelitian terdahulu membuktikan adanya aktivitas antioksidan pada bagian buah dewandaru (Einbond *et al.*, 2004), aktivitas penangkap radikal pada fraksi ekstrak etil asetat daun dewandaru (Sari, 2007; Rahayu, 2007) dan pada fraksi ekstrak etanol daun dewandaru (Rohayati, 2007; Negara, 2007). Fraksi non polar dari ekstrak etanol daun dewandaru memiliki potensi yang besar sebagai penangkap radikal dibandingkan dengan vitamin E (Rohayati, 2007; Negara, 2007). Penelitian terbaru menunjukkan aktivitas antiradikal ekstrak daun dewandaru sebagai pengkhelat logam (Nurwaini dan Utami, 2008) dan penangkap malonaldehid (MDA) (Utami dan Nurwaini, 2008). Oleh karena itu, dilakukan penelitian untuk mengisolasi senyawa aktif dalam fraksi non polar daun dewandaru yang bertanggung jawab sebagai antiradikal, dan uji aktivitas antiradikalnya dengan menggunakan metode seperti yang dilakukan pada penelitian sebelumnya, yaitu metode DPPH (1,1-difenil-2-pikrilhidrazil).

B. Perumusan Masalah

Berdasarkan latar belakang yang telah dikemukakan, dapat dirumuskan permasalahan apakah isolat yang diperoleh dari fraksi non polar ekstrak etanol daun dewandaru (*Eugenia uniflora* L.) mengandung senyawa dengan aktivitas penangkap radikal?

C. Tujuan Penelitian

Penelitian ini bertujuan untuk:

1. Mendapatkan isolat dari fraksi non polar ekstrak etanol daun dewandaru serta interpretasi data spektra IR dari isolat yang didapat.
2. Menetapkan aktivitas antiradikal melalui parameter nilai IC_{50} dalam isolat fraksi non polar ekstrak etanol daun dewandaru.

D. Tinjauan Pustaka

1. Radikal Bebas

a. Pengertian radikal bebas

Radikal bebas adalah atom atau molekul yang mempunyai satu atau lebih elektron yang tak berpasangan dan bersifat sangat reaktif (Fessenden dan Fessenden, 1986). Senyawa radikal bebas timbul akibat berbagai proses kimia kompleks dalam tubuh, berupa hasil sampingan dari proses oksidasi atau pembakaran sel yang berlangsung pada waktu bernafas, metabolisme sel, pembentukan energi di mitokondria (Vaya dan Aviram, 2001), atau ketika tubuh terpapar polusi lingkungan (Reynertson, 2007).

b. Efek radikal bebas

Kebanyakan radikal bebas tidak stabil dan sangat reaktif. Jika radikal bebas tersebut tidak dinonaktifkan, maka dapat bereaksi dengan sel makromolekul termasuk protein, karbohidrat, lemak, dan asam nukleat. Reaksi antara radikal bebas dan molekul itu berujung pada timbulnya beberapa penyakit degeneratif antara lain kanker, aterosklerosis, iskemia, katarak (Langseth, 1995).

c. Sumber radikal bebas

Sumber radikal bebas bisa berasal dari dalam tubuh kita sendiri (endogen), bisa pula dari luar tubuh (eksogen). Radikal endogen terbentuk akibat reduksi oksigen dalam mitokondria yang kurang sempurna, sehingga terbentuk superoksida, interaksi superoksida atau hidrogen peroksida dengan ion logam transisi. Sedangkan radikal bebas eksogen berasal dari polusi udara, radiasi, zat-zat kimia (obat-obatan, insektisida) dan makanan-makanan tertentu (Windono *et al.*, 2001).

Sumber radikal bebas, baik endogenus maupun eksogenus terjadi melalui sederetan mekanisme reaksi. Yang pertama pembentukan awal radikal bebas (inisiasi), lalu perambatan atau terbentuknya radikal baru (propagasi), dan tahap terakhir (terminasi), dimana radikal bebas bergabung untuk membentuk molekul dengan membentuk pasangan antar radikal (Rohman dan Riyanto, 2006).

2. Antioksidan

Antioksidan adalah zat yang mampu memberikan 1 elektron kepada radikal bebas sehingga bersifat netral. Berdasarkan mekanisme aksinya, antioksidan dibagi menjadi 4 yaitu donasi elektron, pembentukan khelat, ko-antioksidan, dan ekspresi gen (Vaya dan Aviram, 2001).

Berdasarkan prinsip kerjanya, antioksidan dibagi menjadi 2 yaitu enzimatis dan nonenzimatis (Middleton *et al*, 2000). Antioksidan enzimatis berfungsi mencegah terbentuknya radikal bebas baru dengan mengubah radikal bebas yang ada menjadi molekul yang lebih stabil melalui pemutusan reaksi berantai. Antioksidan enzimatis terdapat secara alami dalam tubuh. Sedangkan antioksidan nonenzimatis berfungsi menangkap radikal bebas dan mencegah terjadinya kerusakan yang lebih parah. Contohnya: vitamin C, vitamin E, dan β -carotene (Hernani dan Raharjo, 2006).

3. Tanaman dewandaru (*Eugenia uniflora*, L.)

a. Klasifikasi

Divisi	: Spermatophyta
Sub Divisi	: Angiospermae
Kelas	: Dicotyledonae
Bangsa	: Myrtales
Suku	: Myrtaceae
Marga	: Eugenia
Jenis	: <i>Eugenia uniflora</i> Linn.
Sinonim	: <i>Eugenia uniflora</i> Lamk.

(Backer & Brink, 1965)

b. Nama daerah

Jawa	: Asam selong, belimbing londo, dewandaru.
Sumatra	: Cereme asam.

(Hutapea, 1994)

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; benang sari banyak putih; bentuk silindris; mahkota berbentuk kuku, kuning.
- Buah : Buni, bulat, batu, kotak, diameter \pm 1,5 cm, merah
- Biji : Kecil, keras, berwarna coklat
- Akar : Tunggang, coklat

(Hutapea, 1994)

d. Kandungan kimia

Senyawa yang ditemukan dalam *Eugenia uniflora* L. antara lain flavanoid *myricitrin*, *quercetin*, *3-L-ramnoside quercitrin*, steroid, triterpenoid, tannin, antraknon, fenol, sineol (Consolini and Sarubbio, 2002, Bandoni *et al.*, 1972; Retamar, 1982; Schmeda-Hirschmann *et al.*, 1987; Alice *et al.*, 1991; Wazlawik *et al.*, 1997) saponin, flavanoid, tannin (Hutapea, 1994), antosianin (Einbond *et al.*, 2004), minyak atsiri seperti *linalool* (Galhiane *et al.*, 2006).

e. Kegunaan

Antihipertensi dan diuretik, antipiretik dan antirematik, bronkitis, influenza, dan gangguan pencernaan (Consolini and Sarubbio, 2002 *cit* Amat and Yajý'a, 1991, Alice *et al.*, 1991, Rivera and Obon, 1995).

f. Potensi tanaman dewandaru

Daun *Eugenia uniflora* L. digunakan dalam pengobatan yang populer, dalam bentuk infusanya, digunakan untuk perawatan demam, rematik, sakit perut, gangguan saluran pencernaan, hipertensi, penyakit kuning, untuk menurunkan berat badan, mengurangi tekanan darah, dan aktif sebagai diuretik (Galhiane *et al.*, 2006 *cit* Adebajo *et al.*, 1989). Bentuk infusa dari daun segar dan buah yang masih hijau digunakan untuk melawan malaria, dan ekstrak air dari daun *Eugenia uniflora* L. kering digunakan sebagai stimulan menstruasi (Galhiane *et al.*, 2006 *cit* Schmeda *et al.*, 1987).

Potensi tanaman dewandaru sebagai antiradikal dapat diketahui pada beberapa penelitian yang telah dilakukan sebelumnya. Ekstrak kloroform, ekstrak etil asetat, dan ekstrak etanol daun dewandaru mampu menangkap *malonaldehid* (MDA) (Utami dan Nurwaini, 2008). Ekstrak kloroform, ekstrak etil asetat, dan ekstrak etanol daun dewandaru mampu mengkhelat ion ferro (Nurwaini dan Utami, 2008). Selain sebagai antiradikal, dewandaru juga memiliki potensi penghambatan aktivitas *Glutathion S Transferase* (GST) pada hati tikus secara *in vitro* dengan substrat *1-chloro-2,4-dinitrobenzene* (CDNB) dan *1,2-dichloro-4-nitrobenzene* (DCNB) (Utami *et al.*, 2008) dan juga memiliki efek penghambatan aktivitas GST kelas *pi* ginjal tikus (Utami *et al.*, 2008).

4. Kandungan kimia tanaman yang berpotensi sebagai antioksidan

Studi terbaru menunjukkan bahwa flavanoid dan polifenol memiliki kontribusi yang besar terhadap total aktivitas antioksidan dari suatu buah-buahan atau sayuran (Einbond *et al.*, 2004 *cit* Luo *et al.*, 2002; Vinson *et al.*, 1999). Lebih lanjut, penelitian yang dilakukan oleh Reynertson (2007) pada 14 ekstrak buah yang meliputi genus *Eugenia*, *Myrciaria* dan *Syzygium* (famili *myrtaceae*) menunjukkan adanya kandungan sianidin 3-glukosida, delphinidin 3-glukosida, asam ellagic, kaemferol, mirisetin, kuersetin, kuersitrin, dan rutin, senyawa-senyawa tersebut memiliki aktivitas antioksidan yang tinggi.

5. Ekstraksi

Ekstrak adalah sediaan kental yang diperoleh dengan mengekstraksi senyawa aktif dari simplisia nabati atau simplisia hewani menggunakan pelarut yang sesuai, kemudian semua atau hampir semua pelarut diuapkan (Depkes RI, 1995). Untuk mendapatkan senyawa yang khas (zat aktif) dalam suatu tumbuhan, diperlukan metode ekstraksi yang cepat dan teliti (Harborne, 1987). Pemilihan metode ekstraksi tergantung pada sumber bahan alami dan senyawa yang akan diisolasi tersebut (Sarker *et al.*, 2006).

Kandungan kimia tumbuhan digolongkan berdasarkan pada asal biosintesis, sifat kelarutan dan adanya gugus fungsi tertentu (Harborne, 1987). Oleh karena itu terdapat beberapa pilihan metode penyarian, antara lain: maserasi, *boiling*, sokletasi, *supercritical fluid extraction*, sublimasi, dan destilasi uap (Sarker *et al.*, 2006).

Tipe proses ekstraksi yang biasa digunakan untuk bahan tanaman, terdiri dari: pengeringan dan penghalusan bahan tanaman atau homogenasi bagian tanaman yang masih segar (daun, bunga, dan sebagainya) atau maserasi semua bagian tanaman dengan pelarut. Pelarut yang digunakan untuk ekstraksi antara lain: pelarut untuk ekstraksi polar (air, etanol, metanol, dan sebagainya), pelarut untuk ekstraksi semi polar (etil asetat, diklormetana, dan sebagainya), dan pelarut untuk ekstraksi non polar (heksana, petroleum eter, kloroform, dan sebagainya) (Sarker *et al.*, 2006).

Metode ekstraksi yang digunakan dalam penelitian ini adalah maserasi. Maserasi adalah cara ekstraksi yang paling sederhana. Bahan simplisia yang dihaluskan sesuai dengan syarat-syarat farmakope (umumnya terpotong-potong atau berupa serbuk kasar) disatukan dengan bahan pengestraksi. Selanjutnya rendaman tersebut disimpan terlindung dari cahaya (mencegah reaksi yang dikatalisis cahaya atau perubahan warna) dan diaduk kembali. Waktu maserasi pada umumnya 5 hari. Setelah waktu tersebut, artinya keseimbangan antara bahan yang diekstraksi pada bagian dalam sel dengan yang masuk dalam cairan telah tercapai. Dengan pengadukan dijamin keseimbangan konsentrasi bahan lebih cepat dalam cairan. Keadaan diam selama maserasi menyebabkan turunnya perpindahan bahan aktif. Secara teoritis pada suatu maserasi tidak memungkinkan terjadinya ekstraksi absolut (Voight, 1994).

6. Fraksinasi

Fraksinasi merupakan prosedur pemisahan yang bertujuan memisahkan golongan utama kandungan yang satu dari kandungan yang lain.

Senyawa yang bersifat polar akan masuk ke pelarut polar dan senyawa non polar akan masuk ke pelarut non polar (Harborne, 1987).

Metode fraksinasi yang digunakan dalam penelitian ini adalah 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. Bila pelarut dibiarkan mengalir melalui kolom, ia akan mengangkut senyawa-senyawa yang merupakan komponen-komponen dari campuran. Pemisahan komponen suatu campuran tergantung pada tingkat kepolaran dari fase gerak dan senyawa yang terkandung dalam campuran tersebut (Sastrohamidjojo, 2004).

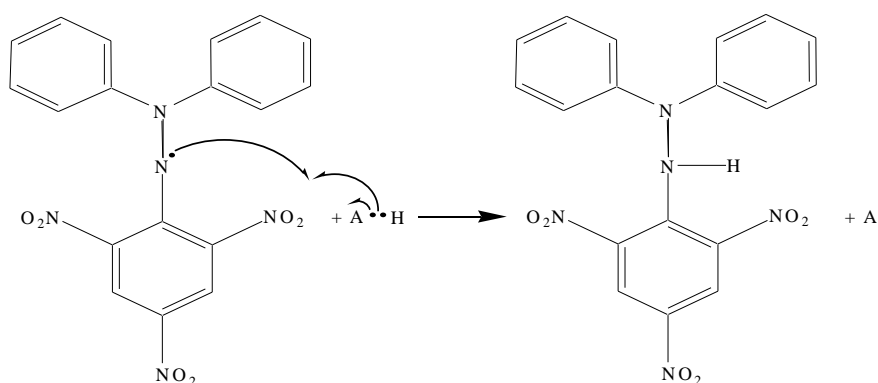
7. Isolasi

Faktor paling utama yang harus dipertimbangkan sebelum merancang sebuah prosedur isolasi adalah sifat alami senyawa target yang terdapat dalam suatu ekstrak atau fraksi. Gambaran umum molekul yang sangat membantu dalam menentukan proses isolasi meliputi kelarutan (hidrofobisitas atau hidrofilisitas), sifat asam basa, stabilitas, dan ukuran molekul. Jika mengisolasi suatu senyawa yang sudah diketahui atau dari sumber yang baru, dapat dicari informasi dari literatur mengenai sifat kromatografi senyawa target tersebut, sehingga mudah untuk menentukan metode isolasi yang sesuai. Tetapi akan lebih sulit untuk menentukan prosedur isolasi untuk ekstrak dengan kandungan senyawa yang sama sekali belum diketahui tipe senyawanya. Dalam hal ini, disarankan untuk dilakukan uji kualitatif untuk berbagai tipe senyawa seperti: fenolik, steroid,

alkaloid, flavanoid, dan sebagainya dengan menggunakan kromatografi lapis tipis atau profil kromatografi cair kinerja tinggi (Sarker *et al.*, 2006). Metode isolasi yang digunakan dalam penelitian ini adalah kromatografi kolom.

8. Uji aktivitas antiradikal

Pada percobaan ini, uji aktivitas antiradikal menggunakan metode DPPH (1,1-difenil-2-pikrilhidrazil). Uji DPPH adalah suatu metode kolorimetri yang efektif dan cepat untuk memperkirakan aktivitas antiradikal. Uji kimia ini secara luas digunakan dalam penelitian produk alami untuk isolasi antioksidan fitokimia dan untuk menguji seberapa besar kapasitas ekstrak dan senyawa murni dalam menyerap radikal bebas. Radikal DPPH adalah suatu senyawa organik yang mengandung nitrogen tidak stabil dengan absorbansi kuat pada λ_{\max} 517 nm dan berwarna ungu gelap. Setelah bereaksi dengan senyawa antioksidan, DPPH tersebut akan tereduksi, dan warnanya akan berubah menjadi kuning. Perubahan tersebut dapat diukur dengan spektrofotometer, dan diplotkan terhadap konsentrasi (Reynertson, 2007).



Gambar 1. Reaksi Radikal DPPH dengan Antioksidan (Windono *et al.*, 2001)

E. Landasan Teori

Penelitian terkait yang pernah dilakukan membuktikan adanya aktivitas antiradikal fraksi air dari ekstrak etanol buah dewandaru dan senyawa yang bertanggung jawab terhadap aktivitas antioksidan adalah senyawa antosian (Einbond *et al.*, 2004). Uji aktivitas antiradikal fraksi polar ekstrak etanol daun dewandaru dengan metode DPPH menunjukkan terdapat aktivitas antiradikal dengan nilai IC_{50} $4,57 \times 10^{-3}$ mg/mL (Rohayati, 2007). Uji aktivitas antiradikal fraksi non polar ekstrak etanol daun dewandaru dengan metode DPPH menunjukkan terdapat aktivitas antiradikal dengan nilai IC_{50} $5,00 \times 10^{-3}$ mg/mL (Negara, 2007).

Penelitian terbaru juga menunjukkan aktivitas antiradikal dari daun dewandaru. Ekstrak kloroform, ekstrak etil asetat, dan ekstrak etanol daun dewandaru mampu menangkap *malonaldehid* (MDA) dengan nilai IC_{50} berturut-turut 37,20; 36,11; dan 33,03 μ g/mL (Utami dan Nurwaini, 2008). Ekstrak kloroform, ekstrak etil asetat, dan ekstrak etanol daun dewandaru mampu mengkhelat ion ferro dengan nilai IC_{50} berturut-turut 95,37; 90,09; dan 81,90 μ g/mL (Nurwaini dan Utami, 2008).

F. Hipotesis

Isolat fraksi non polar ekstrak etanol daun dewandaru (*Eugenia uniflora* L.) memiliki aktivitas penangkap radikal terhadap radikal DPPH.