

BAB I

PENDAHULUAN

A. Latar Belakang Masalah

Reaksi oksidasi terjadi setiap saat di dalam tubuh, reaksi ini akan menimbulkan terbentuknya radikal bebas (Winarsi, 2007). Radikal bebas merupakan atom atau molekul yang mengandung satu atau lebih elektron yang tidak berpasangan pada orbital terluarnya (Fessenden dan Fessenden, 1986). Senyawa radikal bebas sangat reaktif, hal ini ditunjukkan dengan sifatnya yang akan menarik atau menyerang elektron di sekelilingnya sehingga memperoleh pasangan elektron (Winarsi, 2007). Radikal bebas yang sangat aktif dapat merusak struktur dan fungsi sel, sehingga akan menyebabkan terjadinya penyakit degeneratif, penuaan dini, kanker dan arthritis (Winarsi, 2007).

Radikal bebas dinetralkan dengan senyawa yang memiliki aktivitas antioksidan. Antioksidan adalah molekul yang dapat menetralkan radikal bebas dengan cara menerima atau mendonorkan satu elektron untuk melengkapi elektron yang tidak berpasangan. Proses menetralkan molekul radikal bebas menjadi molekul stabil (tidak radikal) (Muchtadi, 2013). Senyawa yang memiliki aktivitas antioksidan dapat diperoleh dari alam, misalnya daun petai (Buanasari, dkk., 2017).

Tumbuhan petai merupakan pohon tahunan tropika dari suku polong-polongan (*Fabaceae*), anak suku petai-petaian (*Mimosoidae*) yang banyak tersebar di Indonesia (Susilo, 2012). Daun petai mengandung senyawa fenolik (Buanasari, dkk., 2017). Menurut Butarbutar dkk. (2016) menyatakan bahwa daun

petai mengandung senyawa fenolik dan flavonoid. Flavonoid merupakan salah satu kelompok senyawa fenolik yang banyak terdapat pada jaringan tanaman dan berperan sebagai antioksidan (Redha, 2010). perbedaan metode ekstraksi dapat mempengaruhi perolehan kandungan senyawa pada suatu tumbuhan, hal ini dibuktikan dengan perolehan kadar fenolik total dan flavonoid total berturut-turut dari yang tertinggi diperoleh dengan ekstraksi pada metode perkolasi yang selanjutnya diikuti metode maserasi, sokhletasi, kemudian metode refluks (Safitri dkk., 2018). Ekstrak etanol daun petai yang diekstraksi dengan metode microwave dan ultrasonik memiliki aktivitas antioksidan rentang kuat-sangat kuat (IC_{50} = 41,39-66,00 ppm) (Buanasari, dkk., 2017). Senyawa fenolik total dan flavonoid Total dapat di korelasikan dengan nilai IC_{50} yang ditunjukkan pada hasil pengujian korelasi senyawa fenolik total pada daun *Sesbania sesban* memiliki korelasi dengan nilai IC_{50} (Fitriansyah, dkk., 2017). Uji korelasi senyawa flavonoid total pada daun *Phyllanthus emblica* terhadap nilai IC_{50} juga memiliki korelasi dengan nilai IC_{50} (Fitriansyah, dkk., 2018).

Penelitian aktivitas antioksidan dan penentuan kandungan fenolik total serta flavonoid total pada berbagai fraksi ekstrak daun petai belum pernah diteliti, sehingga perlu dilakukan penelitian lebih lanjut untuk mengetahui aktivitas antioksidan dan kandungan fenolik total serta flavonoid total pada berbagai fraksi ekstrak daun petai. Berdasarkan latar belakang tersebut, maka perlu dilakukan penelitian untuk menguji aktivitas antioksidan, penetapan kadar fenolik total dan flavonoid total fraksi *n*-heksan, etil asetat, dan air ekstrak etanol daun petai (*Parkia speciosa* Hassk.).

B. Perumusan Masalah

Berdasarkan latar belakang tersebut maka disusun rumusan masalah sebagai berikut :

1. Berapakah kadar fenolik dan flavonoid total fraksi *n*-heksan, etil asetat, dan air ekstrak etanol daun petai ?
2. Berapakah nilai aktivitas antioksidan fraksi *n*-heksan, etil asetat, dan air ekstrak etanol daun petai yang ditunjukkan dengan nilai IC_{50} ?
3. Apakah kadar fenolik dan flavonoid total pada daun petai memiliki korelasi terhadap aktivitas antioksidan ?

C. Manfaat Penelitian

Penelitian ini diharapkan dapat memberikan informasi ilmiah mengenai kandungan fenolik total, flavonoid total dan aktivitas antioksidan dari fraksi *n*-heksan, etil asetat dan air ekstrak etanol daun petai (*Parkia speciosa* Hassk.), sehingga dapat digunakan sebagai acuan untuk penelitian selanjutnya.

D. Tujuan Penelitian

Tujuan penelitian ini sebagai berikut :

1. Menentukan kadar fenolik dan flavonoid total fraksi *n*-heksan, etil asetat, dan air ekstrak etanol daun petai.
2. Menentukan nilai aktivitas antioksidan fraksi *n*-heksan, etil asetat, dan air ekstrak etanol daun petai yang di tunjukkan dengan nilai IC_{50} .
3. Mengetahui korelasi kadar fenolik dan flavonoid total daun petai terhadap aktivitas antioksidan.

E. Tinjauan Pustaka

1. Tumbuhan Petai

Tumbuhan petai merupakan pohon tahunan tropika dari suku polong-polongan (*Fabaceae*), anak suku petai-petaian (*Mimosoidae*) (Susilo, 2012). Tumbuhan petai banyak tersebar di hutan Indonesia. Tanaman petai diperkirakan berasal dari Malaysia. Akan tetapi sudah lama tanaman ini tumbuh dan dibudidayakan di Indonesia, terutama di Pulau Jawa (Endang, 1995).

Berikut merupakan taksonomi tumbuhan petai (Depkes RI, 2001) :

Kingdom	: Plantae
Divisi	: <i>Spermatophyta</i>
Sub divisi	: <i>Angiospermae</i>
Kelas	: <i>Dicotyledonae</i>
Bangsa	: <i>Rosales</i>
Suku	: <i>Mimosaceae</i>
Marga	: <i>Parkia</i>
Jenis	: <i>Parkia speciosa</i> Hassk.



Gambar 1. Daun petai (Dokumen pribadi)

Petai (Gambar 1.) tergolong pohon dengan tinggi 5-15 meter, batang berkayu, bulat, bercabang, bekas tempat duduk daun kelihatan jelas, coklat kemerahan. Daun petai berbentuk majemuk, pangkal membulat, ujung runcing, panjang 4-20 mm, lebar 2-3 mm, dan berwarna hijau. Bunga majemuk, berbentuk bongkol, menggantung, kelopak bertajuk, benang sari sepuluh, pangkal mahkota melekat pada tabung benang sari, bagian ujung berkelamin dua, tangkai sari panjang, bentuk ganda, berwarna kuning, pangkal mahkota melekat, berwarna putih kekuningan. Buah berbentuk polong, menggantung, berwarna hijau. Bentuk biji tebal, pipih, hijau. Bentuk akar tunggang dan berwarna coklat (Depkes RI, 2001). Daun petai mengandung senyawa fenolik, flavonoid, saponin, triterpenoid, dan steroid sehingga dapat berkhasiat sebagai antioksidan (Butarbutar, dkk., 2016).

2. Ekstraksi dan Fraksinasi

Ekstraksi adalah proses penarikan kandungan kimia yang dapat larut sehingga terpisah dari bahan yang tidak dapat larut dengan pelarut cair. Salah satu metode ekstraksi adalah perkolasi. Perkolasi adalah ekstraksi dengan pelarut yang selalu baru sampai sempurna yang umumnya dilakukan pada suhu ruangan (Depkes RI, 2000). Keuntungan metode perkolasi dapat menyari lebih sempurna dibandingkan metode maserasi, namun pelarut yang digunakan banyak dan waktunya lama (Verawati, dkk., 2017). Prinsip perkolasi adalah serbuk simplisia ditempatkan dalam suatu bejana silinder yang bagian bawahnya diberi sekat berpori. Cairan penyari dialirkan dari atas kebawah, sehingga melewati serbuk simplisia tersebut, kemudian cairan penyari tersebut akan masuk kedalam sel dan

menyari zat aktif dari sel yang dilalui sampai mencapai keadaan jenuh (Depkes RI, 1986). Proses terdiri dari tahapan pengembangan bahan, tahap maserasi antara, tahap maserasi sebenarnya (penetesan/penampungan ekstrak) terus-menerus sampai diperoleh ekstrak (perkolat) (Depkes RI, 2000).

Ekstrak dapat diambil secara spesifik dengan cara fraksinasi. Fraksinasi dapat dilakukan secara ekstraksi cair-cair. Ekstraksi cair-cair digunakan sebagai cara untuk pra perlakuan sampel atau *clean up* sampel untuk memisahkan analit-analit dari komponen-komponen matriks yang mungkin mengganggu pada saat kuantifikasi atau deteksi analit. Ekstraksi pelarut juga digunakan untuk memekatkan analit yang ada didalam sampel dengan jumlah kecil sehingga tidak memungkinkan atau menyulitkan untuk deteksi atau kuantifikasinya (Gandjar dan Rohman, 2016).

Ekstraksi ini merupakan proses paling sederhana. Suatu alikuot larutan air digojog dengan pelarut organik yang tidak campur dengan air. Prosedur ekstraksi cair-cair melibatkan ekstraksi analit dari fase air ke dalam pelarut organik yang bersifat non polar atau semi polar. Analit-analit yang mudah terekstraksi dalam pelarut organik adalah molekul-molekul netral yang berikatan secara kovalen dengan substituen yang bersifat non polar atau semi polar. Sementara itu, senyawa-senyawa polar dan juga senyawa-senyawa yang mudah mengalami ionisasi akan tertahan oleh fase air (Gandjar dan Rohman, 2016).

Ekstraksi cair-cair ditentukan oleh *distribusi nerst* atau hukum partisi yang menyatakan bahwa konsentrasi dan tekanan yang konstan, analit akan terdistribusi dalam proporsi yang selalu sama diantaranya dua pelarut yang saling tidak

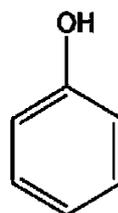
campur. Perbandingan konsentrasi pada keadaan setimbang didalam dua fase disebut dengan koefisien distribusi atau koefisien partisi. Analit yang mempunyai rasio distribusi besar (10^4 atau lebih) akan mudah terekstraksi kedalam pelarut organik meskipun proses kesetimbangan tidak pernah terjadi (Gandjar dan Rohman, 2016).

Hasil dari ekstraksi adalah ekstrak kental. 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 dan massa atau serbuk yang tersisa diperlakukan sedemikian hingga memenuhi baku yang telah di tetapkan.

3. Fenolik

Senyawa fenol meliputi aneka ragam senyawa yang berasal dari tumbuhan yang mempunyai ciri sama yaitu cincin aromatik yang mengandung satu atau dua gugus hidroksil (Harborne, 1987). Gugus OH merupakan aktivator kuat dalam reaksi substitusi aromatik elektrofilik yang terikat pada cincin aromatik (Fessenden dan Fessenden, 1986). Senyawa fenol cenderung mudah larut dalam air karena sering kali berikatan dengan gula sebagai glikosida dan biasanya terdapat dalam vakuola sel (Harborne, 1987).

Berikut adalah struktur dari senyawa fenol:



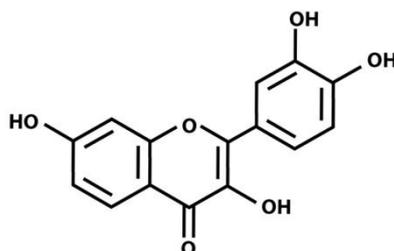
Gambar 2. Struktur dasar senyawa fenol (Vermerris dan Nicholson, 2009)

Senyawa fenol (Gambar 2.) mempunyai sifat redoks yang memungkinkan dapat bertindak sebagai agen pereduksi maupun pendonor hidrogen sehingga dapat dikatakan senyawa fenolat mempunyai sifat antioksidan (Ardekania, dkk., 2011). Oksidasi senyawa fenolik dapat menghasilkan kuinon (Balange dan Benjakul, 2009). Autooksidasi mengacu pada pembentukan struktur ikatan silang (*cross-linked*) sebagai akibat dari terpapar cahaya dan oksigen. Oksigen dapat memisahkan proton dan menghasilkan radikal karena adanya pengaruh cahaya. Hal ini mungkin terjadi apabila proton berdekatan dengan ikatan rangkap karena elektron radikal dapat terdelokalisasi sehingga menurunkan energi. Senyawa aromatik pada fenolik mudah teroksidasi secara otomatis. Radikal yang dihasilkan kemudian dapat bereaksi dengan radikal lain untuk membentuk dimer (Vermerris dan Nicholson, 2009).

4. Flavonoid

Flavonoid adalah senyawa-senyawa polifenol yang memiliki 15 atom karbon (C₆-C₃-C₆), terdiri dari dua cincin benzena yang dihubungkan menjadi satu oleh rantai linier yang terdiri dari tiga atom karbon. Flavonoid terdapat pada semua bagian tumbuhan termasuk daun, akar, kayu, kulit, tepung sari, bunga, buah, dan biji. Penyebaran jenis flavonoid pada golongan tumbuhan yang terbesar yaitu angiospermae (Markham, 1988).

Struktur dasar senyawa flavonoid dapat digambarkan sebagai berikut :



Gambar 3. Stuktur dasar senyawa flavonoid (Markham, 1988)

Flavonoid (Gambar 3.) dalam tumbuhan terdapat sebagai bentuk O-glikosida dan C-glikosida. Bentuk flavonoid O-glikosida, satu gugus hidroksil (-OH) flavonoid (lebih) terikat pada satu gula (lebih) dengan ikatan hemiasetal yang tidak tahan asam, biasanya pada posisi 3 atau 7. Sementara itu, bentuk C-glikosida memiliki gula yang terikat pada atom karbon flavonoid dan dalam hal ini gula terikat langsung pada inti benzena dengan ikatan karbon-karbon yang tahan asam, dan hanya ditemukan pada atom C nomor 6 dan 8 dalam inti flavonoid. Glukosa merupakan gula yang paling umum terlibat, selain itu juga terdapat galaktosa, ramnosa, xilosa dan arabinosa (Markham, 1988).

Flavonoid mempunyai sejumlah gugus hidroksi atau suatu gula sehingga flavonoid disebut senyawa polar. Umumnya flavonoid cukup larut dalam pelarut polar seperti air. Adanya gula yang terikat pada flavonoid mengakibatkan lebih mudah larut dalam air, dengan demikian campuran pelarut tersebut dengan air merupakan pelarut yang lebih baik untuk glikosida. Sebaliknya, aglikon yang kurang polar seperti isoflavon, flavanon, flavon serta flavonol yang termetoksilasi cenderung lebih mudah larut dalam pelarut seperti eter dan kloroform (Markham, 1988).

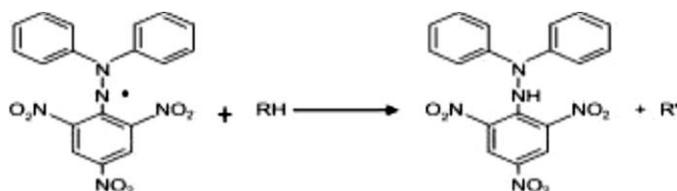
5. Senyawa DPPH (*1,1-difenil-2-pikrilhidrazil*)

Senyawa radikal bebas DPPH dapat digunakan dalam penentuan aktivitas antioksidan karena sederhana, cepat dan tidak membutuhkan banyak reagen. Hasil pengukuran menunjukkan kemampuan antioksidan sampel secara umum tidak berdasar jenis radikal yang dihambat (Juniarti, dkk., 2009). Radikal bebas merupakan suatu molekul, atom atau beberapa kelompok atom yang mempunyai satu atau lebih elektron tidak berpasangan pada orbital terluarnya. Molekul atau atom tersebut sangat labil dan mudah membentuk senyawa baru. Radikal bebas dapat berupa turunan dari karbon (C) dan nitrogen (N) (Muchtadi, 2013).

Metode uji aktivitas antioksidan menggunakan senyawa DPPH sebagai radikal bebas yang diredam oleh antioksidan dari bahan uji, sehingga DPPH akan bereaksi dengan antioksidan tersebut membentuk *1,1-difenil-2-pikril hidrazin* (Juniarti, dkk., 2009).

Radikal DPPH merupakan senyawa organik yang mengandung nitrogen tidak stabil dengan absorbansi kuat pada panjang gelombang 517 nm dan berwarna ungu gelap (Haeria, dkk., 2016). Setelah bereaksi dengan antioksidan DPPH tersebut akan tereduksi dan warnanya akan berubah menjadi kuning. Perubahan tersebut dapat diukur dengan spektrofotometer dan diplotkan terhadap konsentrasi penurunan intensitas warna yang terjadi disebabkan oleh berkurangnya ikatan rangkap terkonjugasi pada DPPH. Hal ini dapat terjadi apabila adanya penangkapan satu elektron oleh zat antioksidan, menyebabkan tidak adanya kesempatan elektron tersebut untuk beresonansi. Peredaman warna DPPH terjadi disebabkan oleh adanya senyawa yang bisa memberikan radikal

hidrogen kepada radikal DPPH sehingga tereduksi menjadi DPPH-H (*1,1-difenil-2-pikrilhidrazin*). Reduksi DPPH menjadi DPPH-H disebabkan adanya donor hidrogen dari senyawa hidroksil (Sayuti dan Yenrina, 2015).



Gambar 4. Reaksi reduksi DPPH dari senyawa peredam (Prakash, dkk., 2001)

6. Aktivitas Antioksidan

Aktivitas antioksidan dapat menetralkan radikal bebas dengan cara menerima atau mendonorkan satu elektron untuk menghilangkan kondisi elektron tidak berpasangan. Hal ini berarti bahwa dalam proses menetralkan molekul radikal bebas menjadi molekul stabil (tidak radikal) (Muchtadi, 2013).

Ciri utama antioksidan adalah kemampuannya untuk menangkap radikal bebas. Radikal bebas dapat mengoksidasi asam nukleat, protein, lipid, atau DNA dan dapat menyebabkan penyakit degeneratif. Senyawa antioksidan seperti asam fenolik, polifenol dan flavonoid mengikat radikal bebas seperti peroksida, hidroperoksida atau lipid peroxy dan demikian menghambat mekanisme oksidatif yang menyebabkan penyakit degeneratif (Prakash, 2001).

Kuat tidaknya antioksidan dapat dilihat dari IC_{50} . IC_{50} merupakan bilangan yang menunjukkan konsentrasi ekstrak ($\mu\text{g/mL}$) atau ppm yang mampu menghambat 50 % oksidasi. Nilai IC_{50} berbanding terbalik dengan aktivitas antioksidan. Semakin kecil nilai IC_{50} semakin tinggi nilai antioksidan begitu pula sebaliknya. Secara spesifik suatu senyawa dikatakan sebagai antioksidan sangat

kuat jika nilai IC_{50} kurang dari 50 ppm, kuat (50 ppm-100 ppm), sedang (101 ppm-150 ppm), dan lemah (> 150 ppm) (Haeria, dkk., 2016).

7. Spektrofotometri UV-Vis

Spektrofotometri serapan merupakan pengukuran suatu interaksi antara radiasi elektromagnetik dan molekul atau atom dari suatu zat kimia. Teknik yang sering digunakan dalam analisis farmasi meliputi spektrofotometri serapan ultraviolet, cahaya tampak, inframerah dan serapan atom (Kemenkes RI, 2009). Sinar ultraviolet dan sinar tampak merupakan salah satu radiasi elektromagnetik yang dapat dianggap sebagai energi yang merambat dalam bentuk gelombang. Keduanya memiliki panjang gelombang yang berbeda-beda. Sinar ultraviolet mempunyai panjang gelombang antara 200-400 nm, sementara sinar tampak mempunyai panjang gelombang 400-750 nm (Gandjar dan Rohman, 2016).

Hukum Lambert-Beer menyatakan bahwa intensitas yang diteruskan oleh larutan zat penyerap berbanding lurus dengan tebal dan konsentrasi larutan (Gandjar dan Rohman, 2016). Pengukuran yang baik dapat dihasilkan dari larutan yang diukur memberikan serapan sebesar 0,2-0,8 di daerah ultraviolet atau cahaya tampak. Pelarut yang digunakan harus bebas dari kontaminan yang memberikan serapan pada daerah spektra yang digunakan (Kemenkes RI, 2009).

F. Landasan Teori

Daun petai mengandung senyawa fenolik, flavonoid, saponin, dan steroid (Butarbutar, dkk., 2016). Tanaman yang mengandung senyawa metabolit sekunder berupa flavonoid dan fenol dapat berfungsi sebagai antioksidan (Nishantini, dkk., 2012). Ekstraksi dengan metode perkolasi memiliki keuntungan

dapat menyari senyawa pada simplisia lebih sempurna dibanding ekstraksi cara dingin lainnya (Verawati, dkk., 2017). Hasil penelitian Safitri dkk. (2018) melaporkan perbedaan metode ekstraksi mempengaruhi perolehan kandungan senyawa pada suatu tumbuhan, hal ini dibuktikan dengan perolehan kadar fenolik total dan flavonoid total berturut-turut dari yang tertinggi diperoleh dengan ekstraksi pada metode perkolasi yang selanjutnya diikuti metode maserasi, sokhletasi, kemudian metode refluks. Fraksinasi dilakukan untuk mendapatkan komponen aktif yang lebih spesifik (Dewi, dkk., 2010). Fraksinasi merupakan pemisahan suatu ekstrak berdasarkan tingkat polaritasnya yakni mulai dari non polar, semi polar dan polar (Saifudin, 2014).

Hasil penelitian Buanasari dkk. (2017), menyebutkan aktivitas antioksidan ekstrak etanol daun petai yang diekstraksi dengan metode mikrowave dan ultrasonik (IC_{50} = 41,39-66,00 ppm), menunjukkan ekstrak etanol daun petai memiliki aktivitas antioksidan rentang kuat-sangat kuat. Senyawa polifenol dan flavonoid pada fraksi *n*-heksan, etil asetat, dan air ekstrak etanol kulit petai memiliki aktivitas antioksidan berturut-turut dari yang tertinggi yaitu fraksi etil asetat, fraksi air, kemudian fraksi *n*-heksan (Sirumapea dan Aswardi, 2016).

Nilai kandungan fenolik total dan flavonoid total dapat dikorelasikan dengan nilai IC_{50} yang ditunjukkan dengan hasil korelasi antara kandungan fenolik total terhadap nilai IC_{50} pada daun *Sesbania sesban* (L. Merr) memiliki korelasi dengan nilai IC_{50} (Fitriansyah, dkk., 2017). Uji korelasi senyawa flavonoid total pada daun *Phyllanthus emblica* terhadap nilai IC_{50} memiliki korelasi dengan nilai IC_{50} (Fitriansyah, dkk., 2018).

G. Hipotesis

Berdasarkan landasan teori tersebut maka dapat disusun hipotesis sebagai berikut :

1. Fraksi *n*-heksan, etil asetat, dan air ekstrak etanol daun petai memiliki kandungan fenolik total dan flavonoid total.
2. Fraksi *n*-heksan, etil asetat, dan air ekstrak etanol daun petai memiliki aktivitas antioksidan.
3. Terdapat korelasi antara kandungan fenolik total dan flavonoid total fraksi *n*-heksan, etil asetat, dan air ekstrak etanol daun petai terhadap aktivitas antioksidan.

