

BAB II

TINJAUAN PUSTAKA

A. Radikal Bebas

Radikal bebas merupakan suatu molekul tunggal ataupun berkelompok yang sedikitnya memiliki satu orbit terluar yang memiliki satu elektron yang tidak berpasangan (Iorio, 2007). Radikal bebas memiliki reaktivitas yang tergolong tinggi. Hal ini ditunjukkan oleh sifatnya yang segera menarik atau menyerang elektron yang ada di sekelilingnya (Winarsi, 2007).

Menurut Halliwell *et al.* (1992), reaktivitas radikal bebas merupakan upaya untuk mencari pasangan elektron. Berdasarkan hal tersebut, akan terbentuk radikal bebas baru yang berasal dari atom atau molekul yang elektronnya diambil untuk berpasangan dengan radikal sebelumnya. Namun, jika dua senyawa radikal bertemu, elektron-elektron yang tidak berpasangan dari kedua senyawa tersebut akan bergabung dan membentuk ikatan kovalen yang stabil. Sebaliknya, bila senyawa radikal bebas bertemu dengan senyawa bukan radikal bebas, bisa terjadi tiga kemungkinan.

- a. Radikal bebas akan memberikan elektron yang tidak berpasangan (reduktor) kepada senyawa bukan radikal bebas.
- b. Radikal bebas menerima elektron (oksidator) dari senyawa bukan radikal bebas.
- c. Radikal bebas bergabung dengan senyawa bukan radikal bebas.

B. Antioksidan

Antioksidan adalah senyawa yang mampu menunda atau mencegah terjadinya oksidasi dari substrat yang mudah teroksidasi (radikal bebas). Antioksidan berperan sebagai pendonor elektron (reduktor), yaitu

mempunyai kemampuan melepas atom hidrogen sehingga dapat menurunkan reaktivitas radikal (Winarsi, 2007).

Antioksidan berdasarkan mekanisme kerja (Winarsi, 2007):

a. Antioksidan primer

Suatu senyawa dikatakan sebagai antioksidan primer apabila, dapat memberikan atom hidrogen secara tepat kepada senyawa radikal kemudian radikal yang terbentuk dapat menjadi senyawa yang lebih stabil. Antioksidan primer disebut juga *chain-breaking-antioksidant*.

b. Antioksidan sekunder

Antioksidan sekunder disebut pertahanan preventif dimana mekanisme kerjanya yaitu dengan memotong reaksi oksidasi berantai dari radikal bebas atau dengan cara menyapu radikal bebas tersebut (*free radical scavenger*). Antioksidan kelompok ini disebut juga sebagai antioksidan eksogenus atau non-enzimatis.

c. Antioksidan tersier

Antioksidan tersier meliputi sistem enzim DNA-*repair* dan metionin sulfoksida reduktase. Enzim-enzim ini berfungsi dalam perbaikan biomolekuler yang rusak akibat reaktivitas radikal bebas.

C. Putri Malu (*Mimosa pudica*, Linn.)

Sistematika taksonomi tanaman putri malu adalah sebagai berikut (Dalimartha, 2008):

Kingdom	: Plantae
Divisi	: Magnoliophyta
Kelas	: Magnoliopsida
Ordo	: Fabales
Famili	: Fabaceae
Genus	: Mimosa
Spesies	: <i>Mimosa pudica</i> , Linn.

Putri malu (Gambar 1) mempunyai nama yang berbeda-beda di beberapa daerah antara lain adalah sebagai berikut: si hirput (Sumatera); si kerput (Batak); bujang kagit, j.riyud, kucingan (Jawa); padang getap (Bali); daun kaget-kagetan (Sulawesi) (Dalimartha, 2008). Putri malu berakar tunggang berwarna putih kekuningan. Diameter akar tidak lebih dari 5 mm. Batang berbentuk bulat, berbulu, dan berduri. Bulu-bulu halus yang melekat di sepanjang batang berwarna putih dengan panjang kurang lebih 2 mm. Daunnya menyirip dan bertepi rata. Daunnya kecil-kecil tersusun secara majemuk, berbentuk lonjong dengan ujung lancip. Berwarna hijau tetapi ada juga yang kemerah-merahan. Bunga berbentuk bulat seperti bola. Berwarna merah muda dan bertangkai. Berambut dan polennya berada di ujung rambut. Putik berwarna kuning. Buah menyerupai buah kedelai dalam bentuk mini. Bedanya, pada buah kedelai terdapat bulu-bulu halus di seluruh bagian kulit buah, sedangkan pada buah putri malu, bulu-bulu halus berwarna merah hanya terdapat pada bagian tertentu (Dalimartha, 2008).



Gambar 1. Tumbuhan Putri Malu (dokumentasi 25 November 2015)

Senyawa yang terkandung dalam tanaman putri malu di antaranya adalah alkaloid, asam amino non-protein (mimosin), flavonoid c-glikosida, fenolik, sterol, terpenoid, tanin, dan asam lemak (Genest *et al.*, 2008). Tanaman putri malu berkhasiat sebagai antikonvulsan (Ngo Bum *et al.*,

2004), antidepresan (Molina *et al.*, 1999), dan mempunyai efek hiperglikemi (Amalraj dan Ignacimuthu, 2007). Valsala dan Karpagaganapathy (2004), menemukan bahwa serbuk akar dari putri malu memiliki pengaruh terhadap siklus ovarium dari mencit betina, *Rattus nowergicus*. Selain itu khasiat lainnya antara lain sebagai penenang (*transquillizer*), peluruh dahak (*ekspektorant*), peluruh kencing (diuretik), obat batuk (antitusif), pereda demam (antipiretik) dan antiradang (Dalimartha, 2008).

Pada penelitian sebelumnya, Zhang *et al.* (2011) melakukan ekstraksi putri malu, pada bagian daun, batang, biji, dan seluruh tanaman. Metode ekstraksi yang digunakan ekstraksi maserasi ultrasonik pada suhu 25 °C pelarut etanol 95%. Dimana kandungan total fenol dan total flavonoid terbanyak ada pada bagian daun. Dan setelah diuji dengan metode DPPH memiliki daya hambat yang tinggi, sehingga dapat dikatakan ekstrak daun putri malu memiliki potensi sebagai antioksidan. Das *et al.* (2014) juga telah melakukan uji aktivitas antioksidan menggunakan metode DPPH ekstrak daun putri malu pelarut metanol dan didapat nilai IC₅₀ dengan konsentrasi 126,71 ppm. Mulia (2015), telah melakukan penelitian pendahuluan terhadap fraksi metanol dari tanaman putri malu. Hasil menunjukkan bahwa fraksi metanol memiliki 8 isolat yang diperoleh melalui pemisahan dengan menggunakan KLT preparatif.

D. Ekstraksi, Fraksinasi, dan Subfraksinasi

Ekstraksi adalah kegiatan penarikan zat kimia yang dapat larut sehingga terpisah dari bahan yang tidak larut dengan pelarut cair. Senyawa aktif yang terdapat dalam berbagai simplisia dapat digolongkan ke dalam golongan minyak atsiri, alkaloid, flavonoid, dan lain-lain. Dengan diketahuinya senyawa aktif yang dikandung simplisia akan mempermudah pemilihan pelarut dan cara ekstraksi yang tepat (Ditjen POM, 2000).

Ekstraksi yang dilakukan pada penelitian ini menggunakan cara maserasi. Maserasi merupakan penyarian dengan cara merendam serbuk

simplisia dalam pelarutnya (cairan penyari). Digunakan untuk menyari zat aktif yang mudah larut dalam cairan penyari, tidak mengembang dalam penyari. Contoh cairan penyari yaitu air, etanol, air-etanol (Ditjen POM, 2000).

Fraksinasi merupakan prosedur pemisahan yang bertujuan untuk memisahkan golongan utama kandungan yang satu dari kandungan yang lain. Senyawa yang bersifat polar akan masuk ke pelarut yang polar dan senyawa yang non-polar akan masuk ke pelarut non-polar. Dari proses fraksinasi, dapat diduga sifat kepolaran dari senyawa yang akan dipisahkan. Berbagai metode kromatografi memberikan cara pemisahan yang paling kuat (Harbone, 1987).

Metode fraksinasi/pemisahan umumnya terdiri dari (Adijuwana dan Nur, 1989):

1. Ekstraksi cair-cair

Ekstraksi cair-cair adalah metode pemisahan dengan menggunakan dua cairan pelarut yang tidak saling bercampur, sehingga senyawa tertentu terpisahkan menurut kesesuaian sifat dengan cairan pelarut (prinsip *solve dissolve like*).

2. Kromatografi

Kromatografi adalah teknik pemisahan zat dari campuran berdasarkan perbedaan migrasi komponen-komponen tersebut dari fase diam oleh fase gerak. Pemisahan ini dilakukan berdasarkan sifat fisika-kimia umum dari molekul seperti:

- a. Kecenderungan molekul untuk melarut dalam cairan (kelarutan).
- b. Kecenderungan molekul untuk melekat pada permukaan serbuk halus (adsorpsi/penjerapan).
- c. Kecenderungan molekul untuk menguap atau berubah ke keadaan uap (keatsirian).

Pemurnian adalah proses pemisahan suatu komponen yang dicari dari komponen-komponen lain yang dapat mengganggu identifikasi

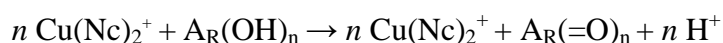
kualitatif dan penentuan kuantitatifnya. Senyawa murni yang telah didapatkan kemudian dilakukan isolasi yang disebut dengan *bioassay guide fractionation and isolation method* (Houghton, 2000).

Subfraksinasi yang dilakukan pada penelitian ini menggunakan kromatografi kolom. Kromatografi kolom digunakan untuk memisahkan senyawa-senyawa dalam jumlah yang banyak berdasarkan adsorpsi dan partisi. Kemasan adsorben yang sering digunakan adalah silika gel G-60, kieselgur, Al₂O₃, dan Diaion. Cara pembuatan ada dua macam (Gandjar, 2008):

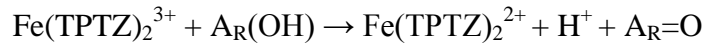
1. Cara kering yaitu silika gel dimasukkan ke dalam kolom yang telah diberi kapas kemudian ditambahkan cairan pengelusi.
2. Cara basah yaitu silika gel terlebih dahulu disuspensikan dengan cairan pengelusi yang akan digunakan kemudian dimasukkan ke dalam kolom melalui dinding kolom secara kontinyu sedikit demi sedikit hingga masuk semua, sambil kran kolom dibuka. Eluen dialirkan hingga silika gel mapat, setelah silika gel mapat eluen dibiarkan mengalir sampai batas adsorben kemudian kran ditutup dan sampel dimasukkan yang terlebih dahulu dilarutkan dalam eluen sampai diperoleh kelarutan yang spesifik. Kemudian sampel dipipet dan dimasukkan ke dalam kolom melalui dinding kolom sedikit demi sedikit hingga masuk semua, dan kran dibuka dan diatur tetesannya, serta cairan pengelusi ditambahkan. Tetesan yang keluar kemudian ditampung.

E. Metode Pengujian Aktivitas Antioksidan

Uji aktivitas antioksidan dapat dilakukan dengan beberapa metode, di antaranya adalah CUPRAC, FRAP, dan DPPH. Metode CUPRAC (Apak *et al.*, 2007) menggunakan bis(neokuproin) tembaga(II) Cu(Nc)₂⁺ yang berwarna kuning dengan reaksi:



Metode FRAP (Benzie dan Strain, 1996) menggunakan $\text{Fe}(\text{TPTZ})_2^{3+}$ kompleks besi-ligan 2,4,6-tripiridin-triazin sebagai pereaksi. Kompleks biru $\text{Fe}(\text{TPTZ})_2^{3+}$ akan berfungsi sebagai zat pengoksidasi dan akan mengalami reduksi menjadi $\text{Fe}(\text{TPTZ})_2^{2+}$ yang berwarna kuning dengan reaksi berikut:



Metode DPPH adalah metode yang paling umum digunakan. DPPH merupakan senyawa radikal bebas yang berwarna ungu, dan pada awalnya digunakan sebagai reagen kolorimetri. Selain itu, reagen DPPH juga berfungsi untuk investigasi reaksi inhibisi polimerisasi, uji antioksidan (amina, fenol dan vitamin), serta inhibisi reaksi homolitik (Kurniawan, 2011).

Metode DPPH menggunakan 2,2-difenil-1-pikrilhidrazil sebagai sumber radikal bebas. Prinsipnya adalah reaksi penangkapan hidrogen oleh DPPH dari zat antioksidan. Pengukuran aktivitas antioksidan ditandai dengan penurunan serapan larutan DPPH yang disebabkan adanya penambahan sampel. Untuk memperoleh nilai serapan DPPH terhadap sampel tersebut dihitung sebagai persen inhibisi (% inhibisi) dengan rumus:

$$\% \text{ inhibisi} = \frac{(\text{A kontrol} - \text{A sampel})}{\text{A kontrol}} \times 100\%$$

Keterangan:

A kontrol: absorbansi tidak mengandung sampel

A sampel: absorbansi sampel

Kemudian hasil yang diperoleh dimasukkan ke dalam persamaan regresi dengan konsentrasi sampel atau ekstrak (ppm) sebagai absis (sumbu x) dan nilai % inhibisi (antioksidan) sebagai ordinatnya (sumbu y). Nilai IC_{50} dari perhitungan pada saat % inhibisi sebesar 50% dengan $y = aX + b$ (Fatimah *et al.*, 2008).

F. Spektrofotometri Ultraviolet & Tampak (Visibel)

Spektrofotometri UV-Vis merupakan salah satu teknik analisis spektroskopi yang memakai sumber radiasi elektromagnetik ultraviolet dekat (190 - 380 nm) dan sinar tampak (380 - 780 nm) dengan memakai instrumen spektrofotometer (Mulja dan Suharman, 1995). Spektrofotometri UV-Vis melibatkan energi elektronik yang cukup besar pada molekul yang dianalisis, sehingga spektrofotometri UV-Vis lebih banyak dipakai untuk analisis kuantitatif ketimbang kualitatif (Mulja dan Suharman, 1995).

Komponen-komponen pokok dari spektrofotometer meliputi (Khopkar, 1990):

1. Sumber tenaga radiasi yang stabil, sumber yang biasa digunakan adalah lampu wolfram.
2. Monokromator untuk memperoleh sumber sinar yang monokromatis.
3. Sel absorpsi, pada pengukuran di daerah visibel menggunakan kuvet kaca atau kuvet kaca corex, tetapi untuk pengukuran pada UV menggunakan sel kuarsa karena gelas tidak tembus cahaya pada daerah ini.
4. Detektor radiasi yang dihubungkan dengan sistem meter atau pencatat. Peranan detektor penerima adalah memberikan respon terhadap cahaya pada berbagai panjang gelombang.

Sumber tenaga radiasi terdiri dari benda yang tereksitasi menuju ke tingkat yang lebih tinggi oleh sumber listrik bertegangan tinggi atau oleh pemanasan listrik. Monokromator adalah suatu piranti optis untuk memencilkan radiasi dari sumber berkesinambungan. Digunakan untuk memperoleh sumber sinar monokromatis. Alat dapat berupa prisma atau grating (Khopkar, 1990).