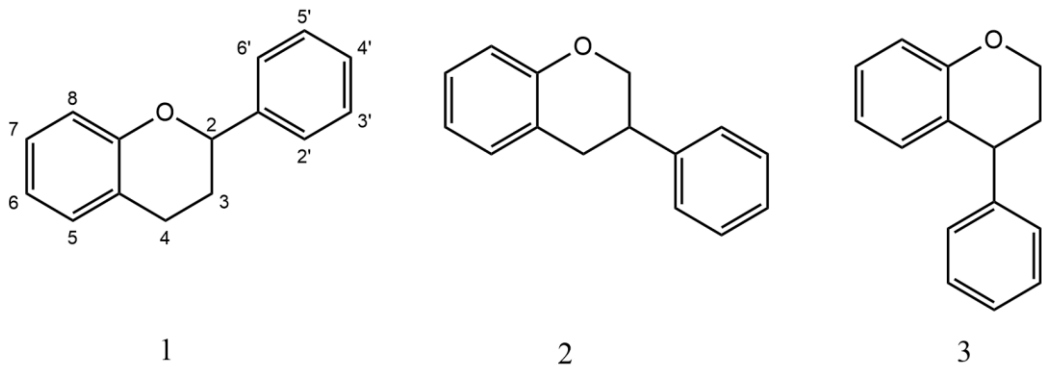


II. TINJAUAN PUSTAKA

A. Flavonoid

Kata dari “flavonoid” merupakan kata yang merujuk pada senyawa bahan alam yang mengandung dua cincin aromatik benzena yang dihubungkan oleh 3 atom karbon, atau suatu fenilbenzopiran ($C_6-C_3-C_6$). Bergantung pada posisi ikatan dari cincin aromatik benzena pada rantai penghubung tersebut, kelompok flavonoid dibagi menjadi 3 kelas utama, flavonoid, isoflavonoid, dan neoflavonoid.

Perbedaan struktur kelas utama tersebut dapat dilihat pada Gambar 1.

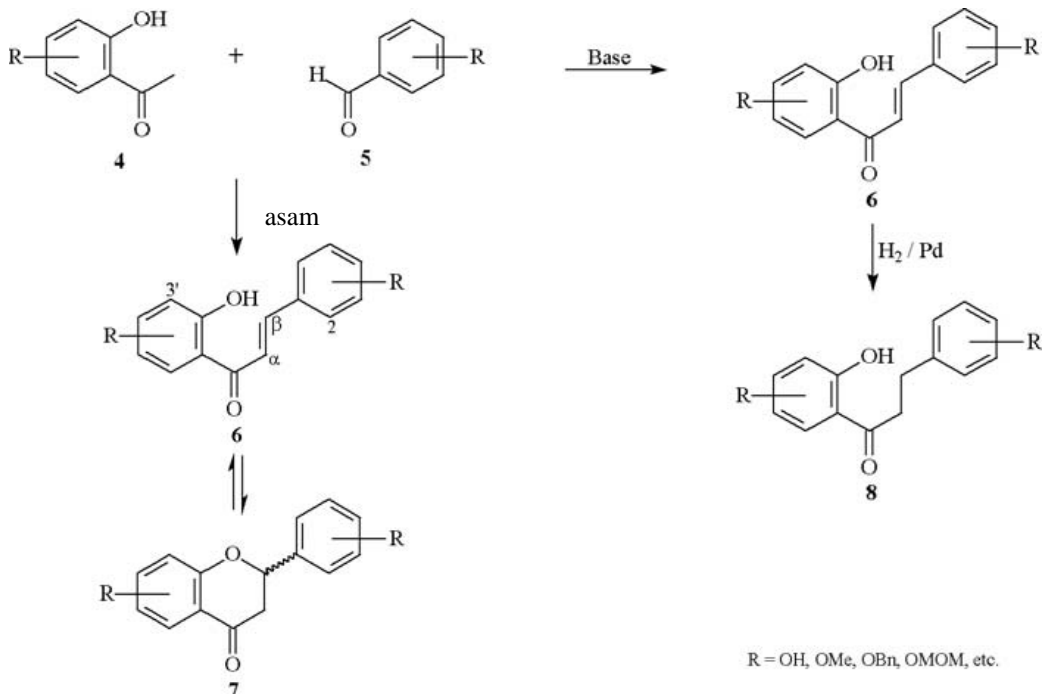


Gambar 1. Struktur umum flavonoid, isoflavonoid, dan neoflavonoid (Grotewold, 2006).

Flavonoid dapat disintesis melalui jalur fenol dengan melibatkan calkon dan dihidrocalkon sebagai senyawa antaranya. Bahan awal yang direaksikan dengan adanya asam dapat membentuk senyawa flavonoid dengan melibatkan calkon sebagai senyawa antara, sedangkan apabila direaksikan pada kondisi basa akan

membentuk suatu dehidrocalkon dengan adanya proses reduksi terlebih dahulu.

Reaksi sintesis senyawa flavonoid disajikan pada Gambar 2.



Gambar 2. Mekanisme sintesis Flavonoid dengan melibatkan calkon dan dehidrocalkon sebagai senyawa antara (Grotewold, 2006)

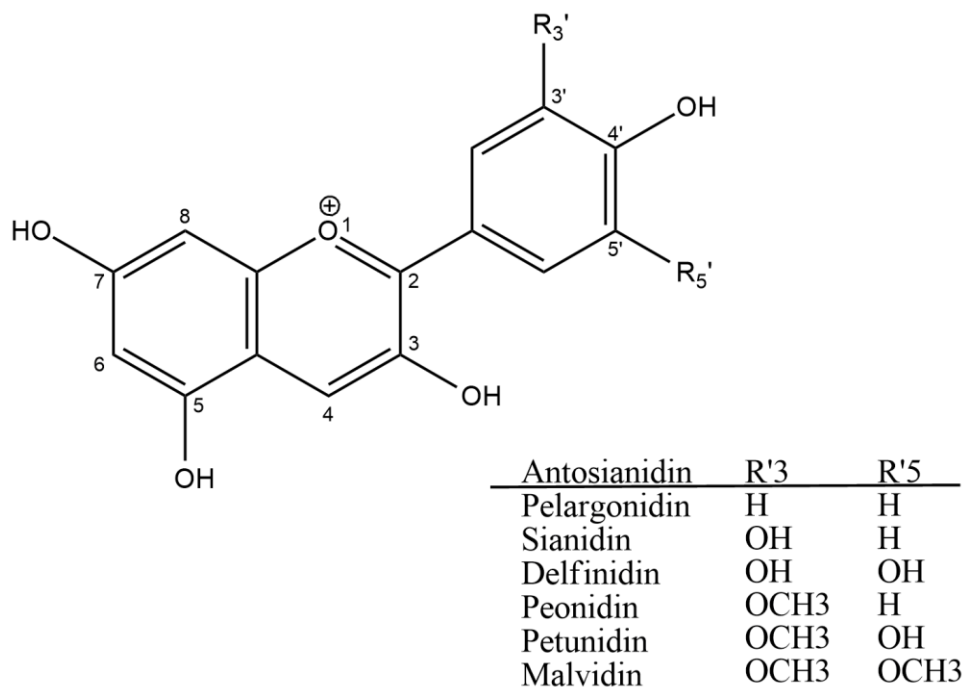
Flavonoid merupakan senyawa metabolit tumbuhan yang sangat melimpah di alam. Fungsi senyawa flavonoid sangatlah penting bagi tanaman pada pertumbuhan dan perkembangannya. Fungsi tersebut seperti penarik perhatian hewan pada proses penyerbukan dan penyebaran benih, stimulan fiksasi nitrogen pada bakteri *Rhizobium*, peningkatan pertumbuhan tabung serbuk sari, serta resorpsi nutrisi dan mineral dari proses penuaan daun. Senyawa flavonoid juga dipercaya memiliki kemampuan untuk pertahanan tanaman dari herbivora dan penyebab penyakit, serta senyawa ini membentuk dasar untuk melakukan interaksi alelopati antar tanaman (Andersen dan Markham, 2006). Selain itu,

senyawa flavonoid memiliki aktivitas antioksidan yang cukup tinggi (Zuhra dkk., 2008).

B. Antosianin

Antosianin merupakan senyawa larut dalam air turunan flavonoid yang dihasilkan dari metabolit sekunder tanaman. Senyawa ini bertanggung jawab untuk warna biru, jingga, dan merah pada banyak jaringan tumbuhan, termasuk bunga, jenis berry, dan pada sedikit bahan makanan umum seperti kubis merah, selada merah, bawang putih, kentang berkulit merah dan ubi jalar ungu. Contoh tanaman yang mengandung antosianin disajikan pada Tabel 1.

Antosianin merupakan turunan senyawa flavonoid yang bermuatan positif pada atom oksigennya. Struktur umum antosianin dan turunannya disajikan pada Gambar 3.



Gambar 3. Struktur umum Antosianin dan turunannya (Markakis, 1982).

Tabel 1. Kandungan antosianin dalam berbagai tumbuhan dan buah- buahan (Giusty dan Wrostald, 2001).

Sumber	Kandungan pigmen (mg/100 g berat segar)	Referensi
Apel	10	Mazza dan Miniati, 1993
<i>Bilberries</i>	300-320	Mazza dan Miniati, 1993
<i>Blackberries</i>	83-326	Mazza dan Miniati, 1993
<i>Black Currants</i>	130-400	Timberlake, 1988
<i>Blueberries</i>	25-495	Mazza dan Miniati, 1993
Kol merah	25	Timberlake, 1988
<i>Chokeberries</i> hitam	560	Kreamer-Schafhalter <i>et al.</i> , 1996
Ceri	4-450	Kreamer-Schafhalter <i>et al.</i> , 1996
<i>Cranberries</i>	60-200	Timberlake, 1988
<i>Elderberry</i>	450	Kreamer-Schafhalter <i>et al.</i> , 1996
Anggur	6-600	Mazza dan Miniati, 1993
Kiwi	100	Kreamer-Schafhalter <i>et al.</i> , 1996
Bawang merah	7-21	Mazza dan Miniati, 1993
Plum	2-25	Timberlake, 1988
<i>Radishes</i> merah	11-60	Giusti <i>et al.</i> , 1988
<i>Raspberries</i> hitam	300-400	Timberlake, 1988
<i>Raspberries</i> merah	20-60	Mazza dan Miniati, 1993
Strawberi	15-35	Timberlake, 1988
<i>Tradescantia</i> <i>palida</i> (daun)	120	Shi <i>et al.</i> , 1992

Di alam, biasanya senyawa antosianin akan membentuk ikatan glikosida pada karbon 5 dan 5' cincin A dan C. Glikosida tersebut dapat berupa monosakarida, disakarida, serta polisakarida (Markakis, 1982). Antosianin dapat ditemukan dalam plasma tubuh manusia sebagai bentuk utuh dari glukosida, rutinosida, sambubiosida, sophorosida, dan asam kafeat konjugat dari sophorosida (Andersen

dan Markham, 2006). Senyawa antosianin memiliki potensial sebagai suplemen nutrisi untuk manusia. Konsumsi senyawa antosianin yang terkandung dalam buah-buahan, sayur-sayuran, anggur, selai dan manisan dapat mengurangi resiko terkena penyakit yang berbahaya seperti kanker, penyakit jaringan pembuluh darah, inhibisi virus, dan penyakit alzhemeir. Antosianin dan flavonoid lain dibutuhkan karena kemampuannya sebagai antioksidan yang berpotensi dapat menyebabkan pencegahan berbagai penyakit yang berhubungan dengan tekanan oksidatif (Andersen dan Markham, 2006).

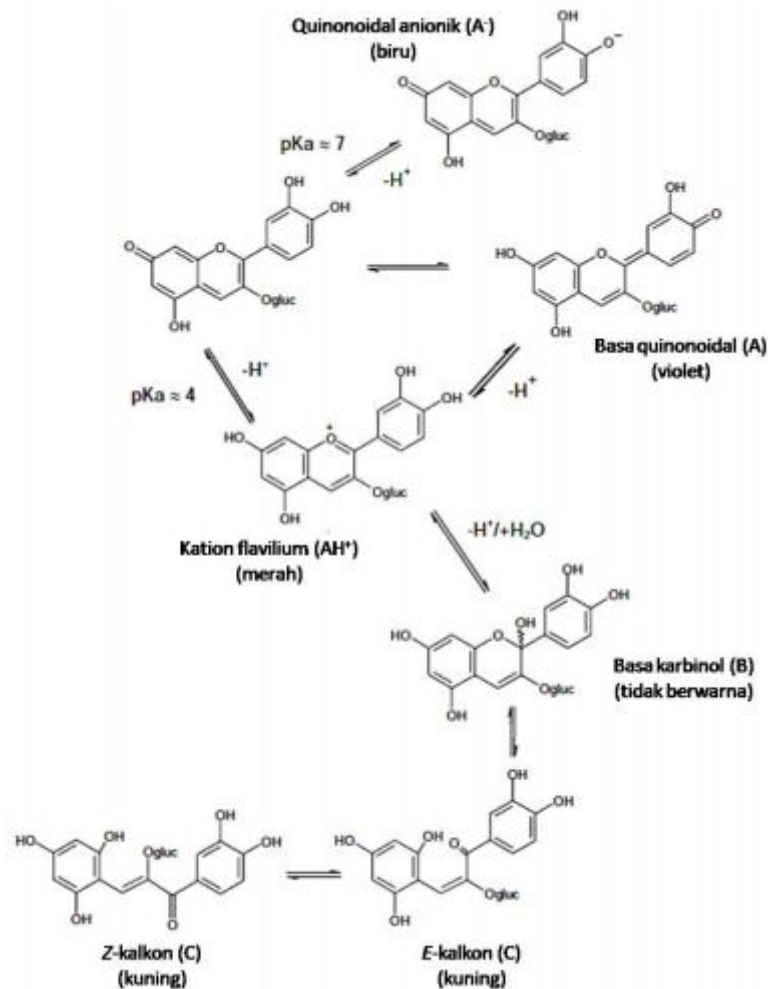
Antosianin akan membentuk keseimbangan bergantung pada pH (derajat keasaman) dari senyawa tersebut. Pada keadaan sangat asam (pH 1-2) antosianin akan dominan berbentuk kation flavilium, pada keadaan ini antosianin berada pada kondisi paling stabil dan paling berwarna. Ketika tingkat keasaman menurun (pH > 4), senyawa antosianin akan berwarna kuning (bentuk calkon), biru (bentuk quinouid), atau tidak berwarna (basa karbinol). Keseimbangan antosianin pada berbagai pH disajikan pada Gambar 4. Oleh karena itu, senyawa antosianin sebagai pigmen warna akan lebih stabil pada keadaan asam atau sangat asam (pH rendah) (Andrawulan dkk., 2012).

C. Isolasi Antosinin

Antosianin dapat diambil dari tanaman maupun buah-buahan menggunakan teknik maserasi dengan menggunakan pelarut yang bersifat polar . Antosianin dapat diekstrak dengan menggunakan 0,01% HCl (v/v) dalam aseton berair 70%, 0,01 % HCl (v/v) dalam metanol (Rodriguez-Saona dan Wrosted, 2001), dan etanol (Braunlich dkk., 2013). Pelarut yang dapat digunakan untuk mengekstraksi

antosianin dari daun adam hawa adalah pelarut etanol 95 % (Sitorus dkk., 2011).

Antosianin dalam daun adam hawa dapat juga diekstrak dengan menggunakan air (Padmaningrum, 2011).



Gambar 4. Kestimbangan antosianin pada berbagai kondisi pH (Andrawulan dkk., 2012).

D. Kromatografi

Kromatografi merupakan suatu metode pemisahan senyawa yang didasarkan atas perbedaan laju perpindahan dari komponen dalam campuran. Pemisahan dengan metode kromatografi dilakukan dengan memanfaatkan sifat fisik dari komponen

campuran tersebut, seperti kelarutan, sampel, adsorbs, dan kepolaran (Skoog, dkk., 2014). Klasifikasi kromatografi berdasarkan fasa diam dan fasa geraknya disajikan pada Tabel 2.

Antosianin dapat dimurnikan dengan metode kromatografi (Rodriguez-Sauna dan Wrostald, 2001), secara kromatografi kolom menggunakan fasa gerak sefadeks LH-20 (Lee, 2013), resin AB-8 berpori (Hua dkk., 2013), dan dapat juga menggunakan HPLC preparatif dengan menggunakan kolom C₁₈ (Syukri dkk., 2013).

1. Kromatografi Kolom

Kromatografi kolom merupakan jenis kromatografi padat cair berdasarkan serapan yang dilakukan di dalam kolom (fasa diam), metode ini merupakan metode yang paling banyak digunakan dan terbaik dalam pemisahan campuran dalam jumlah besar. Campuran yang akan dipisahkan diletakan pada bagian atas penyerap (fasa diam) yang berada dalam tabung kaca (kolom). Fasa gerak yang merupakan campuran pelarut (eluen) dibiarkan mengalir melalui kolom yang disebabkan oleh gaya gravitasi bumi. Senyawa yang terlarut akan bergerak melalui kolom dengan laju berbeda, perbedaan laju dikarenakan adanya interaksi antara senyawa terlarut, penyerap (fasa diam), dan pelarut (fasa gerak). Hasil pemisahan kemudian dikumpulkan berupa fraksi-fraksi pada saat keluar dari bawah kolom (Gritter dkk., 1991).

Dalam pemurnian antosianin yang diperoleh dari ekstrak kasar yang telah dipekatkan dapat menggunakan fasa diam silika gel atau dengan menggunakan resin sefadeks LH-20. Untuk memperoleh pemisahan yang sempurna, dapat

menggunakan sefadeks LH-20 sebagai fasa diamnya dengan menggunakan eluen metanol (Lee, 2013).

Tabel 2. Klasifikasi kromatografi dan tipe pemisahannya (Skoog, dkk., 2014).

Klasifikasi Umum	Metode spesifik	Fasa Gerak	Tipe Pemisahan
Kromatografi Gas	a. Gas-cair (GLC)	Adsorben cair atau terikat pada permukaan padat	Partisis antara gas dan cair
	b. Gas-padat	Padat	Adsorpsi
Kromatografi Cair	a. Cair-cair, atau partisi	Adsorben cair atau terikat pada permukaan padat	Partisi antara cairan yang tak bercampur
	b. Cair-padat, atau adsorpsi	Padat	adsorpsi
	c. Pertukaran ion	Resin pertukaran ion	Pertukaran ion
	d. Eksklusi ukuran	Cair dalam celah polimer padat	Partisis/penyaringan
	e. Afinitas	Kelompok cairan khusus yang terikat pada permukaan padat	Partisi antara cairan permukaan dan cairan bergerak
<i>Supercritical fluid chromatography</i> (SFC) (fasa diam: cairan super kritis)		Spesi organik yang terikat pada permukaan padat	Partisis antara cairan superkritis dan permukaan yang terikat

2. Kromatografi Lapis Tipis

kromatografi lapis tipis merupakan jenis kromatografi padat cair yang menggunakan bahan padat sebagai fasa diam dan pelarut sebagai fasa geraknya.

Fasa diam yang terdiri dari bahan berbutir-butir ditempatkan dalam penyangga

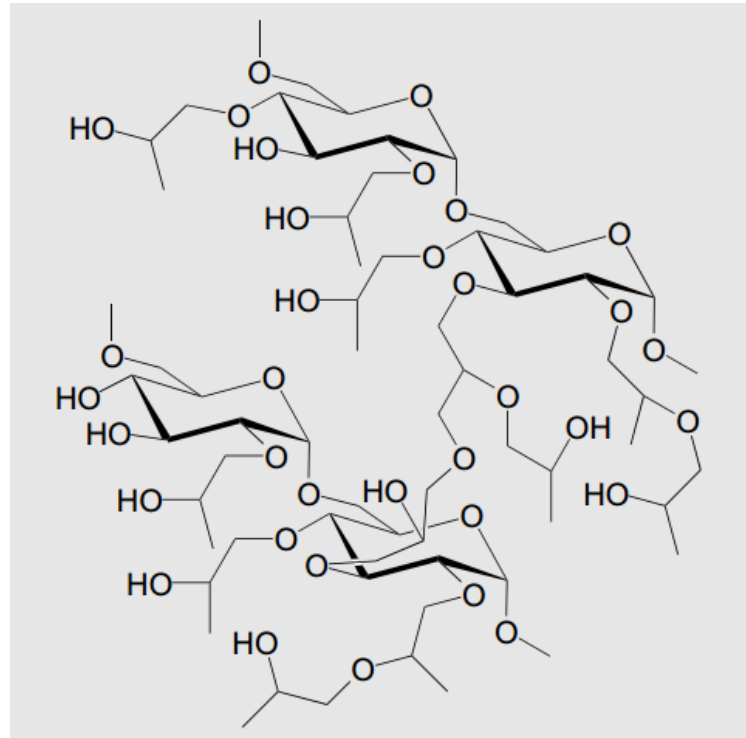
berupa pelat gelas, logam, atau lapisan yang cocok. Campuran yang akan dipisahkan, yang berupa larutan, kemudian ditotolkan pada pelat KLT (fasa diam). Kemudian pelat diletakan dalam bejana tertutup yang telah terisi larutan eluen (fasa gerak). Pemisahan terjadi berdasarkan perbedaan laju alir dari senyawa terhadap fasa diamnya. Selanjutnya, senyawa yang tidak berwarna harus ditampakan dengan disinari UV atau disemprotkan larutan kromium sulfat (Stahl, 1985). Kromatografi lapis tipis merupakan cara analisis cepat dengan penggunaan bahan yang relatif sedikit.

Untuk meneliti kandungan flavonoid dan turunannya dari suatu ekstrak, sudah menjadi kebiasaan umum untuk menggunakan eluen beralkohol pada eluen pertama kromatografi lapis tipis, misalnya butanol-asam asetat-air (Markham, 1988). Senyawa antosianin akan memisah dengan baik pada penggunaan kromatografi lapis tipis bila digunakan eluen butanol-asam asetat-air/BAA (4:1:5) (Sitorus dkk., 2011).

3. Sefadeks LH-20

Sefadeks LH-20 merupakan suatu resin yang biasa digunakan untuk memisahkan zat-zat terlarut yang terkandung dalam suatu sistem pelarut. Pemisahan menggunakan sefadeks LH-20 sama seperti pemisahan yang dilakukan pada kromatografi kolom menggunakan fasa diam silika gel. Namun, sefadeks LH-20 memisahkan berdasarkan berat molekul zat-zat terlarut. Zat-zat dengan berat molekul besar akan mengelusi (keluar) dari kolom terlebih dahulu. Ini dikarenakan molekul-molekul kecil akan masuk dalam pori-pori sefadeks LH-20 (Hagerman, 2002). Struktur sefadeks LH-20 Disajikan pada Gambar 6. Senyawa

antosianin dapat dimurnikan dengan menggunakan sefadeks LH-20 menggunakan sistem pelarut 75% aseton dalam air (Lee, 2013).

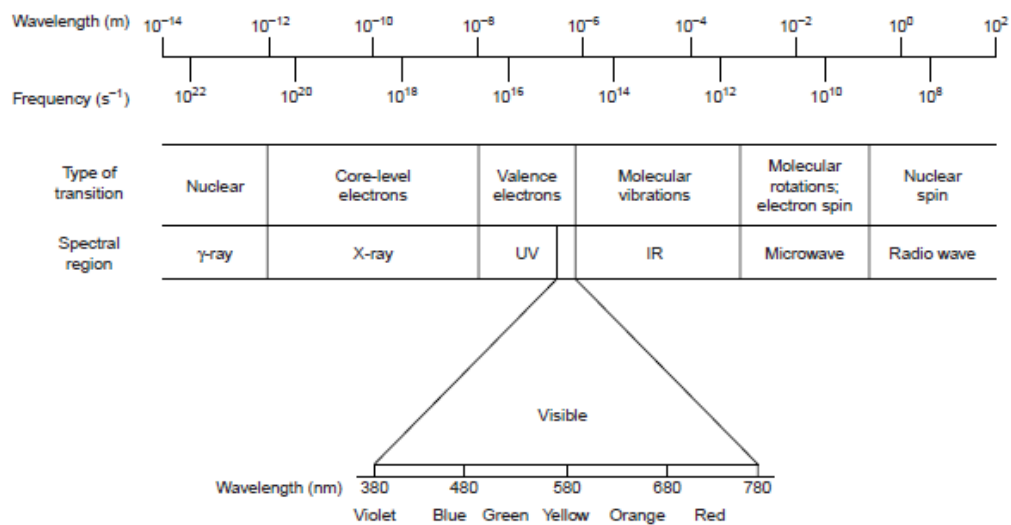


Gambar 5. Struktur sefadeks LH-20 (Hagerman, 2002).

E. Analisis Menggunakan Spektrofotometri

Spektroskopi/ spektrofotometri merupakan suatu jenis analisis kualitatif dan kuantitatif terbaru yang berdasarkan interaksi antara radiasi elektromagnetik dan materi untuk mendapatkan informasi mengenai materi tersebut (Skoog, 2014).

Radiasi elektromagnetik tersebut dapat berupa radiasi sinar γ , sinar-X (X-ray), UV-Vis (ultra ungu-tampak), infra merah (IR), gelombang mikro, dan gelombang radio (Harvey, 2000). Pembagian jenis radiasi elektromagnetik berdasarkan panjang gelombangnya disajikan pada Gambar 6.



Gambar 6. Jenis radiasi elektromagnetik dan panjang gelombangnya (Harvey, 2000).

Gelombang elektromagnetik tersebut dapat digunakan untuk analisis, baik analisis kualitatif dan kuantitatif. Dalam aplikasinya gelombang elektromagnetik dapat dihasilkan dengan berbagai sumber radiasi, bergantung pada instrumenasi dan jenis gelombang elektromagnetik yang akan digunakan. Sumber-sumber radiasi gelombang elektromagnetik disajikan pada Tabel 3.

Untuk membedakan jenis antosianin yang diperoleh dari ekstrak daun adam hawa dengan jenis antosianin yang lainnya haruslah dilakukan karakterisasi dengan menggunakan metode spektroskopi. Metode yang biasa digunakan untuk karakterisasi senyawa bahan alam adalah spektrofotometri UV-Vis untuk mengetahui serapan maksimal senyawa antosianin yang diperoleh, spektrometri IR untuk mengetahui gugus fungsi yang terdapat dalam senyawa antosianin, spektrometri LC-MS untuk mengetahui fragmentasi senyawa antosianin dan spektrometri NMR untuk mengetahui letak atom hidrogen dan atom karbon pada senyawa antosianin.

Tabel 3. Sumber radiasi gelombang elektromagnetik untuk spektroskopi optik (Skoog, 2014).

Sumber	Daerah Panjang Gelombang (nm)	Jenis Spektroskopi
Lampu arc Xenon	250-600	Molecular fluorescence
Lampu H ₂ dan D ₂	160-380	Absorpsi molekuler UV/Vis
Lampu tungsten/halogen	240-2500	Absorpsi molekuler UV/Vis/IR dekat
Lampu tungsten	350-2200	Absorpsi molekuler Vis/IR dekat
Glower Nerst	400-20.000	Absorpsi molekuler IR
Kabel Nichrome	750-20.000	Absorpsi molekuler IR
Globar	1200-40.000	Absorpsi molekuler IR

1. Spektrofotometri UV-Vis

Spektrofotometri UV-Vis merupakan instrumen analisis spektroskopi yang menggunakan gelombang elektromagnetik pada panjang gelombang 190-400 (UV) dan 400-780 (Visible/ tampak). Analisis dengan metode ini didasarkan pada absorpsi gelombang elektromagnetik yang menyebabkan terjadinya transisi elektrtronik dari keadaan dasar menjadi keadaan yang tereksitasi. Transisi terkuat adalah transisi dari $\sigma \rightarrow \sigma^*$ yang menyerap energi elektromagnetik dibawah panjang gelombang 200 nm. Contoh dari transisi ini adalah transisi pada ikatan C-C dan C-H, kedua ikatan ini memiliki elektron orbital σ . Senyawa yang tak jenuh yang memiliki sepasang elektron bebas akan mengalami transisi elektron dari $n \rightarrow \sigma^*$ yang akan menyerap energi pada panjang gelombang 150-250 nm. Pada analisis spektrofotometri UV-Vis didasarkan pada transisi elektron $n \rightarrow \pi^*$ atau

$\pi \rightarrow \pi^*$ yang merupakan orbital pada ikatan senyawa tak jenuh (Gauglitz dan Vo-Dinh, 2003).

Panjang gelombang maksimum untuk setiap senyawa akan berbeda dengan senyawa lainnya bergantung pada jenis transisi yang terjadi pada senyawa tersebut. Semakin banyak ikatan rangkap yang terdapat pada zat tersebut, maka panjang gelombang maksimum zat tersebut akan lebih besar (bergeser ke kanan). Seperti benzena akan memiliki panjang gelombang maksimum yang lebih rendah daripada suatu naftalena. Serapan maksimal beberapa senyawa organik disajikan pada Tabel 4 (Gauglitz, dan Vo-Dinh, 2003).

Antosianin akan menyerap spektra UV-Vis pada panjang gelombang sekitar 500-560 nm untuk berbagai macam pelarut. Pelarut yang biasa digunakan dalam analisis antosianin menggunakan UV-Vis adalah 0,1% HCl dalam etanol; 0,1% HCl dalam metanol; larutan buffer pH 0,9; HCl 0,1 N; serta 0,1 N HCl/etanol (15:85) (Giusty dan Wrosta, 2001).

F. Uji Aktivitas Antioksidan

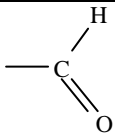

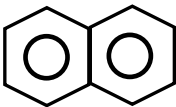
Senyawa antioksidan memiliki kapasitas antioksidan yang berbeda-beda.

Kapasitas antioksidan dapat diukur dengan berbagai cara, salah satu yang paling sering digunakan adalah dengan metode DPPH (2,2-difenil-1-pikrilhidrazil).

DPPH merupakan senyawa yang dapat membentuk radikal dan elektron radikal tersebut akan memberikan serapan maksimal pada panjang gelombang 517 nm dan akan berwarna ungu. Setelah elektron radikal mengikat hidrogen dari suatu antioksidan menjadi keadaan tereduksi DPPH-H, akan menyebabkan absorptivitas molar dari senyawa DPPH turun dari 9660 menjadi 1640 dan warna larutan akan berubah menjadi kuning. Hasil perubahan warna setara dengan banyaknya

elektron yang ditangkap. Besarnya nilai dari aktivitas antioksidan suatu sampel dinyatakan setara dengan mikromol trolox (TE) per 100g sampel (Prakash dkk., 2013).

Tabel 4. Panjang gelombang maksimum beberapa senyawa organik (Gauglitz, dan Vo-Dinh, 2003).

Kromofor	Panjang gelombang maksimum
	175 nm
-C=C-	195 nm
	225 nm
>C=C<	175 nm
	160 nm
>C=O	185 nm
	280 nm
	210 nm
	280 nm
	184 nm
	205 nm
	255 nm
	220 nm
	275 nm
	310 nm
R-NO ₂	205 nm
R-ONO	225 nm

Persentasi dari aktivitas antioksidan dapat dilakukan dengan menyiapkan radikal DPPH yang stabil dalam pelarut etanol. Kemudian 0,5 mL sampel, 3 mL etanol absolut (> 99%), dan larutan radikal DPPH dalam etanol 0,5 mM dicampurkan. Dengan bereaksinya radikal DPPH dan antioksidan akan menyebabkan perubahan warna dari ungu menjadi kuning terang. Kemudian diuji absorbansinya pada panjang gelombang 517 nm setelah larutan bereaksi selama 100 menit. Campuran kedua antara 3,3 mL etanol absolut dan 0,5 mL sampel sebagai larutan blanko, dan campuran ketiga antara 3,5 mL etanol absolut dan 0,3 mL larutan radikal DPPH dalam etanol sebagai control. Persentase aktivitas antioksidan (AA%) ditentukan dengan rumus:

$$AA\% = 100 - \left[\frac{(Abs_{sample} - Abs_{blank}) \times 100}{Abs_{control}} \right] \quad (\text{Garcia dkk., 2012}).$$

G. Tanaman Adam Hawa

Tanaman adam hawa (*Rhoeo discolor* L. Her) atau tumbuhan Nanas Kerang (Jawa) merupakan sejenis tumbuhan liar yang hidup di hutan atau di pekarangan rumah. Tumbuhan ini memiliki daun tunggal yang berbentuk panjang melebar, tepinya merata atau bergigi kasar yang tak teratur, rapuh, meruncing pada bagian ujungnya, permukaan atas daun berwarna hijau dan merah pada permukaan bawahnya, serta meliki permukaan yang licin dan berambut.

Tanaman ini berbunga pada bagian ketiak daunnya. Tanaman ini juga memiliki batang yang merambat serta memiliki tinggi sekitar 10-20 cm. Gambar tumbuhan adam hawa disajikan pada Gambar 7.

Kedudukan tumbuhan adam hawa pada taksonomi tumbuhan adalah sebagai berikut :

Kingdom : Plantarum
Divisio : Spermatophyta
Kelas : Monocotyledoneae
Ordo : Rhizophorales
Famili : Rhizophoraceae
Genus : *Rhoeo*
Spesies : *Rhoeo discolor* (Kadowangko dkk., 2011)



Gambar 7. Tanaman adam hawa

Ekstrak air dan alkohol dari daun tanaman adam hawa dapat digunakan sebagai indikator pada titrasi asam basa. Perubahan warna yang terjadi pada senyawa dalam ekstrak daun tumbuhan adam hawa merupakan indikator dua warna yang

berubah warna dari coklat ke hijau atau merah ke hijau. Ekstrak air daun tanaman adam hawa memiliki trayek pH (derajat keasaman) antara 7,0-8,6, sedangkan ekstrak alkohol memiliki trayek pH antara 6,3-7,0. Indikator dari ekstrak daun tumbuhan Adam Hawa memiliki ketepatan dan kecermatan yang cukup tinggi bila digunakan pada proses titrasi asam cuka dengan natrium hidroksida (Padmaningrum, 2011).

Daun tanaman adam hawa memiliki kandungan senyawa flavonoid jenis antosianidin, yang ditunjukkan dengan hasil kromatogram KLT yang dihasilkan memiliki nilai Rf (*retention factor*) 0,09 (merah jingga); 0,36 (merah jingga); 0,71 (merah muda); dan 0,64 (kuning). Noda yang berwarna merah pada kromatogram KLT menunjukkan adanya senyawa antosianin (Sitorus, 2011).

Ekstrak daun adam hawa memiliki berbagai manfaat bagi kesehatan manusia. Tanaman ini telah digunakan oleh masyarakat Meksiko sebagai tanaman obat untuk mengatasi berbagai penyakit (Rosales-Reyes dkk., 2007). Ekstrak etanol daun adam hawa memiliki kemampuan sebagai antigenotoksik, antimutagenik, dan memiliki aktivitas antioksidan yang mirip dengan α -tokoferol serta lebih tinggi dari asam askorbat (Gonzalez-Avila, 2002). Sedangkan, ekstrak air dari daun adam hawa memiliki kemampuan sebagai antikanker pada hati tikus (Rosales-Reyes, 2007).