

UNIVERSITAS INDONESIA

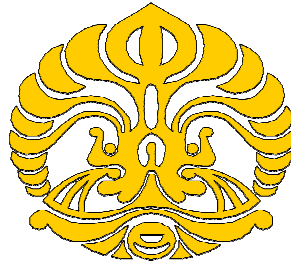
**EKSTRAKSI ANNONACEOUS ACETOGENIN DARI DAUN
SIRSAK, *ANNONA MURICATA*, SEBAGAI SENYAWA
BIOAKTIF ANTIKANKER**

SKRIPSI

MONICA WIJAYA

0806340132

**FAKULTAS TEKNIK
PROGRAM STUDI TEKNOLOGI BIOPROSES
UNIVERSITAS INDONESIA
DEPOK
JANUARI 2012**



UNIVERSITAS INDONESIA

**EKSTRAKSI *ANNONACEOUS ACETOGENIN* DARI DAUN
SIRSAK, *ANNONA MURICATA*, SEBAGAI SENYAWA
BIOAKTIF ANTIKANKER**

SKRIPSI

Diajukan sebagai salah satu syarat untuk memperoleh gelar Sarjana Teknik

MONICA WIJAYA

0806340132

FAKULTAS TEKNIK

PROGRAM STUDI TEKNOLOGI BIOPROSES

UNIVERSITAS INDONESIA

DEPOK

JANUARI 2012

vii

Universitas Indonesia

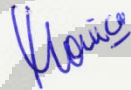
HALAMAN PERNYATAAN ORISINALITAS

Skripsi ini adalah hasil karya saya sendiri,
dan semua sumber baik yang dikutip maupun dirujuk
telah saya nyatakan dengan benar.

Nama : Monica Wijaya

NPM : 0806340132

Tanda Tangan :



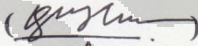
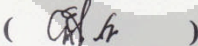
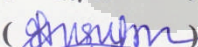


Tanggal : 17 Januari 2012

HALAMAN PENGESAHAN

Skripsi ini diajukan oleh :
Nama : Monica Wijaya
NPM : 0806340132
Program Studi : Teknologi Bioproses
Judul Skripsi : Ekstraksi *Annonaceous Acetogenin* dari Daun
Sirsak, *Annona muricata*, sebagai Senyawa
Bioaktif Antikanker

Telah berhasil dipertahankan di hadapan Dewan penguji dan diterima sebagai bagian persyaratan yang diperlukan untuk memperoleh gelar Sarjana Teknik pada Program Studi Teknologi Bioproses, Fakultas Teknik, Universitas Indonesia

DEWAN PENGUJI

Pembimbing 1 : Kamarza Mulia, Ph.D ()
Pembimbing 2 : Elsa Krisanti, Ph.D ()
Penguji : Dr. Ir. Praswasti PDK Wulan, M.T. ()
Penguji : Bambang Heru Susanto, S.T., M.T. ()
Penguji : Dr. Ing. Donni Adinata, S.T., M.Eng, Sc ()

Ditetapkan di : Departemen Teknik Kimia, Universitas Indonesia, Depok

Tanggal : 18 Januari 2012

KATA PENGANTAR

Puji dan syukur kepada Tuhan Yesus karena melalui berkat dan pertolongan-Nya, sehingga saya dapat menyelesaikan skripsi ini dengan sebaik mungkin. Dalam penulisan skripsi ini, saya banyak memperoleh bantuan yang tak ternilai harganya dari berbagai pihak. Oleh karena itu, saya ingin mengucapkan terima kasih kepada:

1. Pak Kamarza Mulia, Ph.D dan Ibu Elsa Krisanti, Ph.D selaku dosen pembimbing yang telah membimbing, memberi masukan, mengarahkan, dan tak henti-hentinya mendukung pembuatan skripsi ini;
2. Segenap dosen Departemen Teknik Kimia UI yang telah mengajar dan memberi saya pengetahuan dan wawasan tentang program studi Teknologi Bioproses yang baru, khususnya kepada Pak Setiadi dan Pak Sahlan yang membantu menjawab pertanyaan-pertanyaan mengenai skripsi;
3. Seluruh teman dari Departemen Teknik Kimia, khususnya program studi Teknologi Bioproses yang senantiasa saling membantu dan mendukung dalam perkuliahan, khususnya untuk Agung dan Chandra yang membantu penulis dalam analisa sampel;
4. Mbak Dewi dan Shufi yang telah membantu dalam penelitian sehingga penelitian dapat berlangsung dengan baik dan sukses, untuk Dedy Lim yang membantu mencarikan data dan senyawa untuk penelitian;
5. Kedua orang tua saya, Gunawan Wijaya dan Regina Laurensia, serta kakak dan adik, Stephanie, Yohanna, dan Anthony, yang telah senantiasa mendorong dan memberi masukan hingga terselesaikannya skripsi ini;
6. Terakhir saya juga menyampaikan terima kasih secara khusus kepada Luky Kurniawan, Claudia, dan Rudy yang telah senantiasa menemani dan mendukung dalam penulisan skripsi ini hingga selesainya.

Akhir kata saya meminta maaf apabila dalam skripsi ini ada kata-kata yang kurang berkenan. Semoga skripsi ini memberikan manfaat, terutama ilmu pengetahuan para pembaca.

Depok, 2 Januari 2012

Penulis

HALAMAN PERNYATAAN PERSETUJUAN PUBLIKASI TUGAS AKHIR UNTUK KEPENTINGAN AKADEMIS

Sebagai sivitas akademik Universitas Indonesia, saya yang bertanda tangan di bawah ini:

Nama : Monica Wijaya
NPM : 0806340132
Program Studi : Teknologi Bioproses
Departemen : Teknik Kimia
Fakultas : Teknik
Jenis Karya : Skripsi

demi pengembangan ilmu pengetahuan, menyetujui untuk memberikan kepada Universitas Indonesia **Hak Bebas Royalti Noneksklusif (*Non-exclusive Royalty Free Right*)** atas karya ilmiah saya yang berjudul :

"EKSTRAKSI ANNONACEOUS ACETOGENIN DARI DAUN SIRSAK, ANNONA MURICATA, SEBAGAI BAHAN BIOAKTIF ANTIKANKER"

beserta perangkat yang ada (jika diperlukan). Dengan Hak Bebas Royalti Noneksklusif ini Universitas Indonesia berhak menyimpan, mengalihmedia/formatkan, mengelola dalam bentuk pangkalan data (*database*), merawat, dan memublikasikan tugas akhir saya selama tetap mencantumkan nama saya sebagai penulis/pencipta dan sebagai pemilik Hak Cipta.

Demikian pernyataan ini saya buat dengan sebenarnya.

Dibuat di : Depok

Pada Tanggal : 2 Januari 2012

Yang menyatakan



(Monica Wijaya)

vi

ABSTRAK

Nama : Monica Wijaya
Program Studi : Teknologi Bioproses
Judul : Ekstraksi *Annonaceous Acetogenin* dari Daun Sirsak, *Annona muricata*, sebagai Senyawa Bioaktif Antikanker

Senyawa bioaktif yang berasal dari tanaman sirsak atau *Annona muricata* telah lama diteliti dan terbukti bersifat antikanker, selain itu juga bersifat antiparasit, insektisida, anticacing, antibakteri, dan antivirus. Senyawa bioaktif, yang diekstrak dari daun sirsak, bernama *annonaceous acetogenin* dan telah berhasil dilakukan analisa secara kualitatif. Penelitian bertujuan untuk mendapatkan ekstrak yang kaya akan *annonaceous acetogenin* melalui maserasi daun sirsak yang sudah kering dengan pelarut etanol 95%, fraksinasi, dan kolom kromatografi. Senyawa *annonaceous acetogenin* yang terbukti larut dalam fraksi metanol 90% (Fraksi F005) dari tahapan fraksinasi dianalisis dengan LC-MS (*Liquid Chromatography-Mass Spectroscopy*) dengan adanya senyawa yang berat molekulnya 612 dan BST (*Brine Shrimp Lethality Test*) dengan nilai LC_{50} (*Lethal Concentration*) di bawah 1000 ppm. Dari kolom kromatografi terhadap fraksi F005 didapatkan 12 botol di antara 15 botol yang terbukti mengandung *annonaceous acetogenin* dari analisis TLC (*Thin Layer Chromatography*), LC-MS, dan BST, dan selanjutnya dianalisis dengan HPLC untuk mengetahui banyaknya campuran senyawa yang terkandung di dalamnya.

Kata kunci :

Daun sirsak, *Annona muricata*, antikanker, *annonaceous acetogenin*, ekstraksi

ABSTRACT

Name : Monica Wijaya
Study Program : Bioprocess Technology
Title : Extraction of Annonaceous Acetogenin from Soursop Leaves, *Annona muricata*, as an Anticancer Bioactive Compound

Bioactive compound from soursop plants or *Annona muricata* has been investigated for a long time and proven to act as an anticancer, furthermore as parasiticidal, insecticidal, antibacterial, and antiviral. This bioactive compound, which is extracted from soursop leaves, is annonaceous acetogenin and succeeded in qualitative analysis. This aim of research is to get a rich content of annonaceous acetogenin by macerate the soursop leaves with ethanol 95%, fractionate, and isolate with column chromatography. Annonaceous acetogenin is proven to be soluble in methanol 90% fraction (Fraction F005) from fractionation step which analyzed using LC-MS (Liquid Chromatography-Mass Spectroscopy) with 612 for its molecular weight and BST (Brine Shrimp Lethality Test) with LC_{50} below 1000 ppm. From column chromatography for fraction F005, it gave 12 bottles among all 15 bottles which are proven to contain *annonaceous acetogenin* by analyzing them using TLC (Thin Layer Chromatography), LC-MS, and BST, furthermore by HPLC to give knowledge about the mixture of compounds contained in them.

Key words :

Soursop leaves, anticancer, *Annona muricata*, annonaceous acetogenin, extraction

DAFTAR ISI

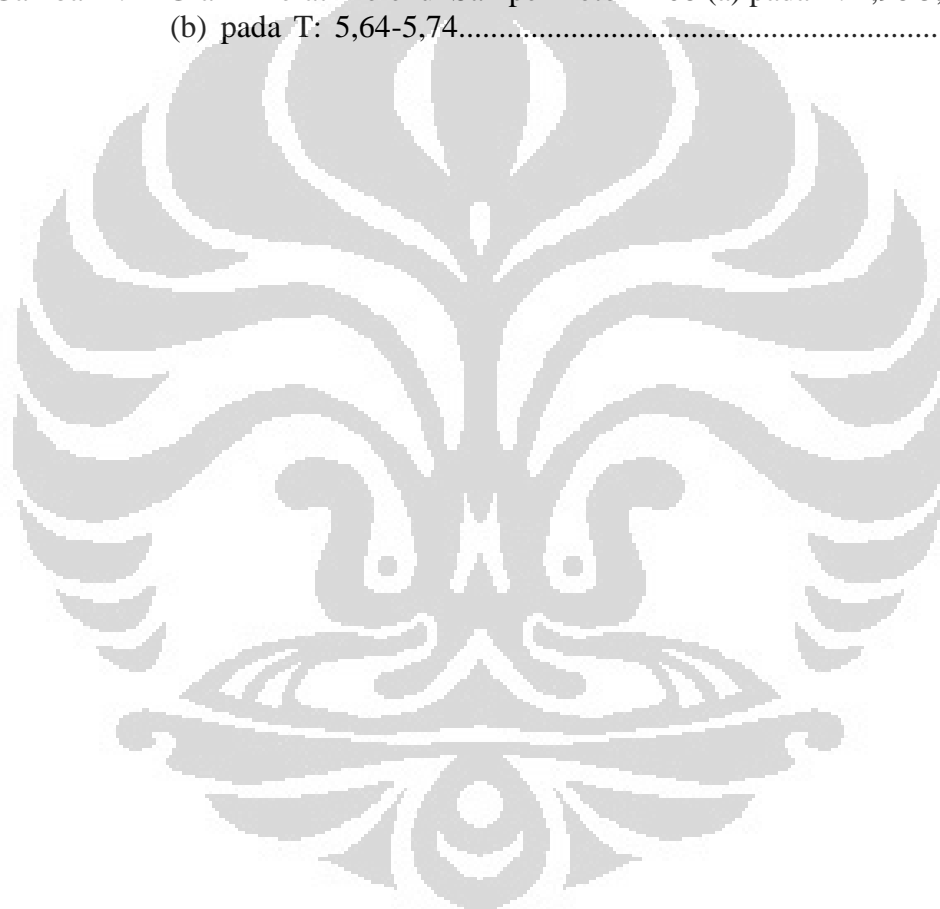
HALAMAN JUDUL.....	i
HALAMAN PERNYATAAN ORISINALITAS.....	ii
HALAMAN PENGESAHAN.....	iii
LEMBAR PENGESAHAN.....	iv
KATA PENGANTAR.....	v
LEMBAR PERSETUJUAN PUBLIKASI KARYA ILMIAH.....	vi
ABSTRAK.....	vii
ABSTRACT.....	viii
DAFTAR ISI.....	ix
DAFTAR GAMBAR.....	xi
DAFTAR TABEL.....	xiii
DAFTAR LAMPIRAN.....	xiii
1. PENDAHULUAN.....	1
1.1 Latar Belakang.....	1
1.2 Rumusan Masalah.....	6
1.3 Tujuan Penelitian.....	6
1.4 Batasan Masalah.....	6
1.5 Sistematika Penulisan.....	7
2. TINJAUAN PUSTAKA.....	8
2.1 Kanker.....	8
2.1.1 Penyebab Kanker.....	8
2.1.2 Jenis Kanker.....	9
2.2 Perawatan dan Pengobatan terhadap Kanker.....	10
2.2.1 Pengobatan Lokal pada Kanker.....	10
2.2.2. Kemoterapi.....	11
2.2.3 Antibodi Monoklonal dan Imunoterapi.....	11
2.3 Pengetahuan tentang <i>Annonaceous Acetogenin</i>	12
2.3.1 Famili <i>Annonaceae</i>	12
2.3.2 <i>Annonaceous Acetogenin</i>	13
2.3.3 Klasifikasi <i>Annonaceous Acetogenin</i> Berdasarkan Struktur.....	15
2.3.4 <i>Annonaceous Acetogenin</i> dari <i>Annona Muricata</i>	16
2.4 Aktivitas Biologi <i>Annonaceous Acetogenin</i>	18
2.4.1 Menginhibisi Kompleks I Mitokondria.....	18
2.4.2 Potensial sebagai Pestisida dan Insektisida.....	21
2.5 Ekstraksi dan Fraksinasi <i>Annonaceous Acetogenin</i>	22
2.6 Kromatografi Hasil Ekstraksi.....	25
2.7 Analisis Hasil Ekstraksi.....	29
2.7.1 <i>Thin Layer Chromatography</i> (TLC).....	29
2.7.2 HPLC / <i>High Performance Liquid Chromatography</i>	31
2.7.3 LC-MS / <i>Liquid Chromatography–Mass Spectroscopy</i>	33
2.7.4 <i>Brine Shrimp Lethality Test</i> (BST).....	35

3. METODOLOGI PENELITIAN.....	38
3.1 Rancangan Penelitian.....	38
3.2 Alat dan Bahan Penelitian.....	39
3.2.1 Alat.....	39
3.2.2 Bahan.....	41
3.3 Prosedur Penelitian.....	41
3.3.1 Ekstraksi.....	41
3.3.2 Fraksinasi.....	42
3.3.3 Isolasi.....	43
3.3.4 Metode Analisa.....	44
4. HASIL DAN PEMBAHASAN.....	48
4.1 Ekstraksi.....	48
4.2 Fraksinasi.....	52
4.3 Isolasi.....	54
4.4 Metode Analisa.....	58
4.4.1 TLC.....	58
4.4.2 Analisa LC-MS.....	64
4.4.3 Analisa HPLC (<i>High Performance Liquid Chromatography</i>).....	70
4.4.4 Uji BST (<i>Brine Shrimp lethality Test</i>).....	71
4.5 Pembahasan Hubungan Hasil Analisis Kimiawi dan Biologis.....	73
5. KESIMPULAN DAN SARAN.....	75
5.1 Kesimpulan.....	75
5.2 Saran.....	76
DAFTAR PUSTAKA.....	77
LAMPIRAN.....	81

DAFTAR GAMBAR

Gambar 1.1 Angka Kejadian dan Mortalitas Kanker untuk Semua Jenis Kelamin.1	
Gambar 1.2 Tanaman Sirsak (a) buah sirsak (b) daun sirsak.....	4
Gambar 2.1 Struktur Umum dari <i>Annonaceous Acetogenin</i>	13
Gambar 2.2 <i>Uvaricin</i> , <i>Annonaceous Acetogenin</i> Pertama.....	14
Gambar 2.3 Klasifikasi <i>Annonaceous Acetogenin</i>	15
Gambar 2.4 <i>Annonaceous Acetogenin</i> Linear.....	16
Gambar 2.5 Model McLaughlin dalam Sifat Inhibisi Acetogenin pada Kompleks I Mitokondria.....	19
Gambar 2.6 Struktur <i>Bullatacin</i> dan <i>Rolliniastatin</i>	20
Gambar 2.7 Grafik Inhibisi antara <i>Bullatacinone</i> dan <i>Adriamycin</i>	21
Gambar 2.8 Efek <i>Annonaceous Acetogenin</i> pada Serangga Kecoak <i>Jwax</i> (a) dan <i>Mucien</i> (b).....	22
Gambar 2.9 Diagram Elusi pada Kromatografi Kolom.....	26
Gambar 2.10 Hasil Monitor TLC pada ekstraksi dan purifikasi <i>A. muricata</i> dengan menyemprotkan (A) p-anisaldehyde (B) reagen Kedde.....	30
Gambar 2.11 Bagian Peralatan HPLC.....	31
Gambar 2.12 Aliran Sampel pada HPLC.....	32
Gambar 2.13 Sistem pada HPLC.....	32
Gambar 2.14 Jenis Metode LC.....	33
Gambar 2.15 Sumber Ion <i>Electrospray</i>	34
Gambar 2.16 <i>Quadrupole mass analyzer</i>	35
Gambar 3.1 Diagram Alir Penelitian Ekstraksi <i>Annonaceous Acetogenin</i> dari Daun Sirsak atau <i>Annona muricata</i> sebagai Bahan Bioaktif Antikanker.....	39
Gambar 3.2 Diagram alir uji BST.....	47
Gambar 4.1 Pengeringan Daun Sirsak.....	48
Gambar 4.2 Pengecilan Ukuran (a) Blender (b) Daun Sirsak yang Sudah Halus..	49
Gambar 4.3 Ekstraksi (a) Maserasi atau Cara A (b) Ultrasonic Bath atau Cara B dan C.....	49
Gambar 4.4 Filtrasi.....	50
Gambar 4.5 Hasil Filtrasi.....	51
Gambar 4.6 <i>Rotary evaporator</i> (a) labu (b) alat secara keseluruhan.....	52
Gambar 4.7 Fraksinasi dengan labu kocok.....	52
Gambar 4.8 Hasil Fraksinasi (a) F002 (b) F003 (c) F004 (d) F005.....	53
Gambar 4.9 Kromatografi Kolom (a) sebelum dimasukkan sampel (b) setelah dimasukkan sampel (c) setelah sampel mulai turun.....	54
Gambar 4.10 Hasil T-01 sampai T-15.....	55
Gambar 4.11 Hasil penguapan pada T-01 sampai T-15.....	57
Gambar 4.12 Proses TLC (a) T-01 sampai T-06 (b) T-07 sampai T-12 (c) T-13 sampai T-15.....	59
Gambar 4.13 TLC Percobaan 1 (a) sebelum (b) setelah diberi larutan	

p-anisaldehyd.....	60
Gambar 4.14 TLC Percobaan 2 (a) sebelum (b) setelah diberi larutan p-anisaldehyd.....	61
Gambar 4.15 TLC Percobaan 3 (a) sebelum (b) setelah diberi larutan p-anisaldehyd.....	62
Gambar 4.16 Kurva Kromatografi untuk F005.....	64
Gambar 4.17 Grafik Berat Molekul Sampel F005 (a) pada T: 8,53-8,63 (b) pada T: 9,53-9,63.....	65
Gambar 4.18 Kurva Kromatografi untuk Sampel Botol T-05.....	66
Gambar 4.19 Grafik Berat Molekul Sampel Botol T-05 pada (a) T: 5,79-5,94 (b) T: 6,82-6,87.....	66
Gambar 4.20 Kurva Kromatografi untuk Sampel Botol T-08.....	67
Gambar 4.21 Grafik Berat Molekul Sampel Botol T-08 (a) pada T: 4,96-5,05 (b) pada T: 5,64-5,74.....	67



DAFTAR TABEL

Tabel 1.1 Jumlah Daun Sirsak dan Stadium Kanker.....	3
Tabel 1.2 Beberapa Bahan Herbal Antikanker dan Senyawa Aktifnya.....	4
Tabel 2.1 Jenis dan Contoh Karsinogen Manusia.....	8
Tabel 2.2 Stadium Kanker, Pengobatan, dan Prognosis.....	10
Tabel 2.3 <i>Annonaceous Acetogenin</i> dari <i>A. muricata</i>	17
Tabel 2.4 Jenis <i>Annonaceous Acetogenin</i> dalam Daun <i>A. muricata</i>	18
Tabel 2.5 Klasifikasi Metode Kromatografi Kolom.....	27
Tabel 3. Alat yang Digunakan dalam Penelitian.....	40
Tabel 4.1 Jumlah Senyawa, Berat Molekul, dan Waktu Retensi Pada Sampel F005.....	68
Tabel 4.2 Jumlah Senyawa, Berat Molekul, dan Waktu Retensi Pada Sampel Botol T-05.....	68
Tabel 4.3 Jumlah Senyawa, Berat Molekul, dan Waktu Retensi Pada Sampel Botol T-08.....	68
Tabel 4.4 Hasil Uji BST pada Fraksi dan Botol.....	72

DAFTAR LAMPIRAN

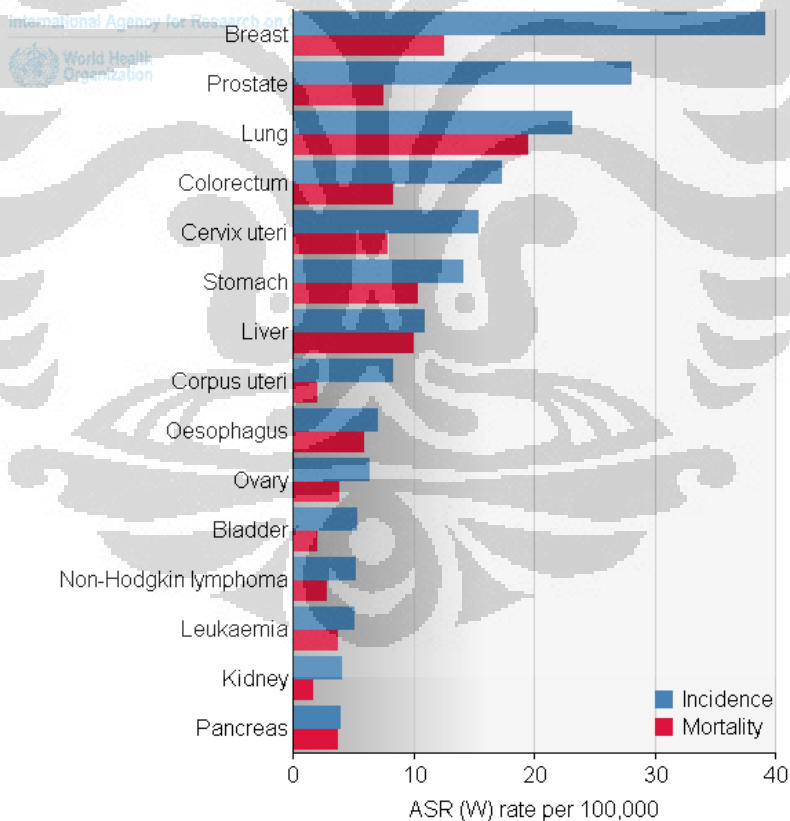
Lampiran 1. Spesifikasi LC-MS.....	81
Lampiran 2. Hasil Analisa LC-MS Sampel F005.....	82
Lampiran 3. Hasil LC-MS Sampel T-05.....	94
Lampiran 4. Hasil LC-MS Sampel T-08.....	103
Lampiran 5. Daftar Tabel Probit.....	110
Lampiran 6. Hasil Uji BST.....	111
Lampiran 7. Hasil HPLC Botol T-03 hingga T-12.....	125

BAB 1

PENDAHULUAN

1.1 Latar Belakang

Angka kematian di dunia yang disebabkan oleh kanker mencapai 13% atau mencapai 7,4 juta pada tahun 2008, dimana kasus kanker terbanyak yang terjadi adalah kanker paru-paru, perut, hati, usus, dan payudara. Jenis kanker terbanyak yang terjadi berbeda untuk setiap jenis kelamin (Ferlay *et al*, 2010). Kasus dan angka mortalitas kanker dapat dilihat pada Gambar 1 di bawah dimana ASR (W) atau *Age-standardised rate* adalah angka dari populasi yang umurnya distandardisasi yang menunjukkan kasus baru atau kematian untuk setiap 100.000 orang per tahun.



Gambar 1.1 Angka Kejadian dan Mortalitas Kanker untuk Semua Jenis Kelamin

Sumber : Ferlay *et al*, 2010

Secara mengejutkan, hampir 70% dari angka kematian tersebut terjadi pada negara berpenghasilan rendah dan menengah, termasuk negara-negara sedang berkembang di daerah Asia Tenggara. Angka kematian di Asia pada tahun 2002 adalah sebesar 3,5 juta dan akan mencapai 8,1 juta kematian pada tahun 2020 (Alwan *et al*, 2010).

Belakangan ini banyak cara yang dilakukan untuk mengobati kanker dengan jalan medis maupun tradisional. Melalui medis, dapat dilakukan dengan cara operasi, radiasi, dan kemoterapi. Namun pengobatan melalui kemoterapi yang paling banyak diterapkan pada pasien kanker ini memiliki efek samping pada pasien penderita kanker karena obat antikanker selain membunuh sel kanker juga membunuh sel tubuh yang normal lainnya yang cepat bertumbuh, seperti jaringan rambut, sehingga pasien seringkali mengalami kerontokan rambut dan menurunnya imunitas tubuh.

Penggunaan daun sirsak yang telah dilakukan oleh para herbalis dan dokter di Indonesia adalah dengan cara mengeringkan daun sirsak, merebus air hingga mendidih, memasukkan daun sirsak yang telah dikeringkan hingga mendidih selama 15 menit, kemudian terakhir adalah menyaring air rebusan dan dikonsumsi oleh pasien. Beberapa dokter di Indonesia mulai menggabungkan pengobatan medis dan tradisional. Salah satunya adalah dengan menggunakan kombinasi antara kemoterapi dan ekstraksi dari bahan bioaktif yang berasal dari daun sirsak (*Annona muricata*) dan herbal lainnya.

Dosis yang disarankan oleh dr Paulus Wahyudi Halim berdasarkan stadium kanker dalam Tabel 1.1 di bawah. Dosis yang dikonsumsi oleh pasien sesuai dengan keadaan pasien dan berbeda satu sama lainnya. Dalam menentukan dosis berupa jumlah daun sirsak, maka dokter atau herbalis harus memperhatikan fungsi ginjal, hati, dan empedu karena apa yang dikonsumsi berupa cairan akan diproses melalui ginjal dan lever yang mengolah khasiat daun sirsak (Trubus no. 498, 2011).

Tabel 1.1 Jumlah Daun Sirsak dan Stadium Kanker

Stadium Kanker	Jumlah Daun Segar	Keterangan
Pemula	10 daun	Tiap satu bulan jumlah daun dinaikkan 3-5 lembar. Pada bulan ketiga maksimal 21 lembar rebus dalam 3 gelas air hingga mendidih dan tersisa 1 atau 1,5 gelas.
1-3	15 daun	Tiap satu bulan tambahkan 3-5 lembar daun sirsak. Pada bulan ketiga maksimal 31 lembar, rebus dalam 4 gelas air hingga mendidih dan tersisa 3 gelas
Di atas 3	21 daun	Pada bulan ketiga daun sirsak yang digunakan 41-50 lembar rebus dalam 5 gelas air hingga mendidih dan tersisa 3 gelas. Penggunaan daun sirsak maksimal 70 lembar jika tidak dicampur herbal lain.

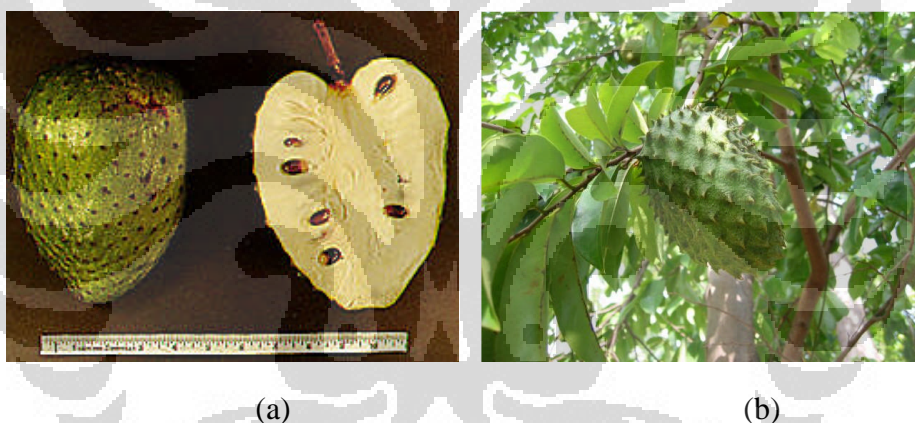
(Sumber : Majalah Trubus terbitan nomor 498 bulan Mei 2011/XLII)

Selain daun sirsak, terdapat beberapa bahan herbal lain yang ditemukan bersifat antikanker. Beberapa tanaman herbal selain daun sirsak yang diteliti memiliki sifat antikanker, dan di antaranya dapat dilihat pada Tabel 1.2 di bawah, seperti kunyit, jahe, keladi tikus, sarang semut, mahkota dewa dan lainnya. Bahan herbal ini memiliki kekhususan regional dan tidak tersedia secara umum sehingga dipilih digunakan daun sirsak yang akan diekstraksi di dalam penelitian ini. Daun sirsak telah lama diteliti dan digunakan oleh para herbalis di Indonesia termasuk dr. Paulus Wahyudi Halim seperti ulasannya pada Tabel 1.1 di atas, dan bahannya juga lebih ekonomis karena daunnya juga mengandung senyawa aktif dan mudah ditemukan di seluruh negara Indonesia karena tanaman sirsak dapat tumbuh pada iklim tropis. Gambar buah sirsak dan daun sirsak dapat dilihat pada Gambar 1.2 di bawah.

Tabel 1.2 Beberapa Bahan Herbal Antikanker dan Senyawa Aktifnya

Bahan Herbal	Senyawa Aktif
Kunyit	Kurkumin
Jahe	Capsaicin
Keladi tikus	Triterpenoid
Tapak Dara	Vincristine dan Vinblastine
Jamur Ling Zhi	Polisakarida
Sarang semut papua	Flavonoid, Tokoferol, dan Polifenol
Mahkota dewa	Flavonoid
Pinang	Arkeolin (< 4 gram)

(Sumber : <http://unipost.com/29575/5-herbal-pembasmi-kanker/> diakses tanggal 19 Januari 2012 pukul 13.49; <http://kampus.okezone.com> diakses tanggal 19 Januari 2012 pukul 13.48)



Gambar 1.2 Tanaman Sirsak (a) buah sirsak (b) daun sirsak

(Sumber: www.daunsirsakobatkanker.com diakses tanggal 19 Januari 2012 pukul 13.52)

Senyawa bioaktif yang ditemukan dalam sirsak ini bernama *annonaceous acetogenin*. *Annonaceous acetogenin* telah ditemukan lebih dari 400 jenis strukturnya dan terus berkembang sampai sekarang (Fang *et al*, 1993 ; Zeng *et al*, 1996). Pada sirsak khususnya, telah ditemukan 50 jenis *annonaceous acetogenin* dari biji, kulit batang, daging buah, dan daun sirsak. Pada daun sirsak, telah ditemukan 18 jenis *annonaceous acetogenin* dan telah terbukti secara *in vitro* bersifat sitotoksik. (Zeng *et al*, 1996). Bahan bioaktif ini terbukti memiliki sifat antibakteri, antijamur, antikanker, melawan berbagai parasit/cacing, menurunkan

tekanan darah tinggi, depresi, stres, dan menormalkan sistem saraf yang kurang baik (Zeng, L *et al* , 1996; McLaughlin, J. *Et al*, 1997 ; Cave, A *et al*, 1997 ; Oberlies, N.H *et al*, 1997 ; Oberlies, N.H. *et al*, 1995). *Annonaceous acetogenin* terbukti secara *in vitro* memiliki kemampuan sitotoksik 10.000 kali lebih kuat daripada terapi kemoterapi. (Rieser MJ, Fang XP dan McLaughlin, 1997).

Sifatnya yang sitotoksik ini sangat berguna untuk menyerang sel kanker yang pertumbuhannya sangat cepat di dalam jaringan tubuh. Walaupun sifatnya sitotoksik, yaitu bersifat beracun terhadap sel, namun *Annonaceous acetogenin* relatif tidak menyerang sel normal, dan hanya menyerang sel kanker secara spesifik (Oberlies *et al*, 1995). Contoh *annonaceous acetogenin* yang berasal dari daun sirsak adalah *annopentocins A* yang secara selektif sitotoksik terhadap sel karsinoma pankreas, *annopentocins B* dan *C* yang sitotoksik terhadap sel karsinoma paru-paru, *cis-* dan *trans-annonuricin-D-ones* yang campurannya sitotoksik terhadap sel kanker paru-paru, usus besar, dan pankreas dengan potensi yang sama atau melebihi *adriamycin* yang merupakan obat antikanker (Lu Zeng *et al*, 1996). Potensi sitotoksik terhadap sel kanker ini juga diteliti oleh peneliti lain dan ditemukan bahwa pada sel kanker payudara mengandung tujuh kali reseptor insulin dan sepuluh kali reseptor IGF (*Insulin Growth like Factor*) daripada sel normal sehingga dapat mengambil glukosa tujuh belas kali lebih cepat (Papa *et al*, 1990 ; Cullen *et al*, 1990). Reseptor ini diperkirakan menjadi salah satu alasan mengapa *annonaceous acetogenin* dapat bersifat selektif sitotoksik terhadap sel kanker dan tidak menyerang sel normal.

Penelitian mengenai *annonaceous acetogenin* ini ditemukan oleh Prof. Jerry McLaughlin sejak tahun 1982 dari buah *paw paw* dan diteliti mekanisme sitotoksiknya. Mekanisme sitotoksiknya adalah menghambat sistem transpor elektron dan oksidasi NADH dari metabolisme sel kanker sehingga menghambat pembentukan ATP dan akibatnya jumlah ATP berkurang dan akhirnya sel kanker mati (McLaughlin *et al*, 2003).

Ekstraksi terhadap daun sirsak ini perlu dilakukan untuk mendapatkan *annonaceous acetogenin* dalam jumlah banyak dan terkonsentrasi sehingga dapat digunakan sebagai salah satu bahan baku dalam obat-obatan tradisional. Bahan

herbal tidak menggunakan paten untuk dapat menjualnya, sehingga perkembangan ekstraksi herbal masih berkembang luas untuk dapat menjangkau masyarakat luas. Untuk itulah, penulis melakukan penelitian untuk melakukan ekstraksi *annonaceous acetogenin* dari daun sirsak yang harganya lebih ekonomis daripada buahnya. Selanjutnya, penulis akan melakukan analisis terhadap hasil ekstrak *annonaceous acetogenin* yang diekstraksi dari daun sirsak.

1.2 Rumusan Masalah

Rumusan masalah penelitian ini adalah pada awalnya masyarakat banyak mengonsumsi ekstrak daun sirsak dengan merebus daunnya dan meminum air rebusan yang masih mengandung banyak campuran senyawa-senyawa yang tidak semuanya berguna untuk mengobati kanker, sehingga penelitian ini melakukan ekstraksi *annonaceous acetogenin* dari daun sirsak dan kemudian dianalisis untuk memastikan keberadaan senyawa aktifnya.

1.3 Tujuan Penelitian

Tujuan penelitian ekstraksi *annonaceous acetogenin* dari daun sirsak sebagai senyawa bioaktif antikanker adalah sebagai berikut :

- Untuk membuktikan adanya kandungan *annonaceous acetogenin* secara kualitatif di dalam ekstrak daun sirsak
- Untuk mendapatkan ekstrak *annonaceous acetogenin* yang kaya di dalamnya sehingga nantinya dapat dilakukan untuk penelitian lebih lanjut
- Untuk menguji keaktifan dari fraksi-fraksi hasil ekstraksi *annonaceous acetogenin* dari daun sirsak sebagai senyawa bioaktif antikanker

1.4 Batasan Masalah

Batasan masalah dalam penelitian ini adalah jenis *annonaceous acetogenin* yang ingin didapatkan tidak ditentukan jenisnya secara struktural dan analisisnya dilakukan secara kualitatif untuk mendeteksi keberadaan kandungan *annonaceous acetogenin* dari berat molekul maupun dari keaktifannya.

1.5 Sistematika Penulisan

Sistematika penulisan dalam proposal penelitian ini akan dilakukan dengan membagi tulisan menjadi 5 bab, yaitu :

BAB 1 : **PENDAHULUAN**

Bab ini berisi tentang latar belakang penelitian dan penulisan, perumusan masalah yang dibahas, tujuan dilakukannya penelitian, serta sistematika penulisan.

BAB 2 : **TINJAUAN PUSTAKA**

Bab ini berisi tinjauan pustaka yang dijadikan dasar penelitian.

BAB 3 : **METODOLOGI PENELITIAN**

Bab ini berisi diagram alir penelitian, prosedur penelitian, teknik pengambilan data, dan teknik analisa.

BAB 4 : **HASIL DAN PEMBAHASAN**

Bab ini berisi tentang hasil penelitian yang didapatkan beserta perhitungan dan analisa.

BAB 5 : **KESIMPULAN**

Bab ini berisi kesimpulan tentang penelitian ini.

BAB 2 TINJAUAN PUSTAKA

2.1 Kanker

Kanker merupakan suatu keadaan dimana sel abnormal melakukan pembelahan diri tidak terkontrol, menyerang ataupun merusak jaringan di dekatnya, dan terkadang bermetastasis atau dapat menyebar ke jaringan lain. Sel kanker dapat meyebar ke bagian lain dari tubuh melalui sistem darah dan sistem limfa. Sifat-sifat inilah yang membedakan kanker dengan tumor yang tidak berbahaya karena tidak merusak jaringan ataupun bermetastasis. Ilmu yang mempelajari kanker disebut onkologi.

2.1.1 Penyebab Kanker

Genetika hampir tidak berubah pada manusia, maka lingkungan diduga menjadi penyebab utama kanker. Kanker disebabkan oleh bahan karsinogen kimia, bahan fisika, ataupun biologis. Berbagai tipe dan contoh karsinogen pada manusia dapat dilihat pada Tabel 2.1.

Tabel 2.1 Jenis dan Contoh Karsinogen Manusia

Jenis Karsinogen	Contoh
Karsinogen kimia	Nikel, kadmium, arsen, <i>nitrosamines</i> , trikloroetilen, <i>arylamin</i> , spesies oksigen reaktif
Karsinogen fisika	Iradiasi UV (terutama UV B), radiasi ion
Karsinogen biologi	Virus <i>Human papilloma</i> (contohnya strain 16), virus Epstein-Barr, virus hepatitis B,dll
Proses endogen	Reaksi metabolik yang menghasilkan spesies oksigen reaktif, inflamasi kronis

(Sumber : Schulz, 2005)

2.1.2 Jenis Kanker

Kanker bukan merupakan suatu jenis penyakit melainkan terdiri dari ratusan jenis penyakit. Kebanyakan kanker dinamai sesuai dengan organ atau jenis sel dimana kanker dimulai, seperti kanker yang berasal dari usus besar disebut kanker usus besar, kanker yang dimulai pada sel basal pada kulit disebut karsinoma sel basal.

Jenis kanker dapat dikelompokkan menjadi kategori yang lebih besar (*National Cancer Institute, 2010*). Kategori utama dari kanker adalah:

➤ **Karsinoma**

Karsinoma merupakan kanker yang dimulai dari jaringan kulit atau di dalam jaringan yang berbaris maupun menutupi organ dalam.

➤ **Sarkoma**

Sarkoma merupakan kanker yang dimulai pada tulang, kartilago, lemak, otot, pembuluh darah maupun jaringan penghubung atau pendukung lainnya.

➤ **Leukemia**

Leukemia merupakan kanker yang dimulai pada jaringan pembentuk darah seperti sumsum tulang dan menyebabkan jumlah produksi sel darah abnormal meningkat dalam jumlah besar dan memasuki sistem sirkulasi darah.

➤ **Limfoma dan myeloma**

Limfoma dan myeloma merupakan kanker yang terjadi pada sel yang termasuk dalam sistem imun atau kekebalan tubuh.

➤ **Kanker pada sistem saraf pusat**

Kanker ini merupakan kanker yang dimulai pada jaringan otak dan tulang belakang.

2.2 Perawatan dan Pengobatan terhadap Kanker

Tujuan pengobatan adalah untuk membuang atau merusak seluruh sel kanker dan semua daerah yang terekspos oleh tumor. Sekarang ini, pengobatan bervariasi dari perawatan standar sejak beberapa dekade ini yaitu operasi, radiasi, kemoterapi sampai ke pengobatan baru termasuk agen biologi, imunoterapi, dan molekul kecil yang sangat spesifik. Pengobatan juga bergantung dari stadium kanker yang dapat dilihat pada Tabel 2.2 berikut.

Tabel 2.2 Stadium Kanker, Pengobatan, dan Prognosis

Stadium	Deskripsi	Pengobatan	Prognosis
I	- Ukuran kecil - Tidak melibatkan kelenjar getah bening - Tidak terjadi metastase	Operasi dan/atau Radioterapi dan terkadang terapi sistem.	Seringkali baik
II	- Ukuran kecil atau sedang - Melibatkan kelenjar getah bening - Tidak terjadi metastase	Terapi sistem operasi dan terkadang terapi sistem primer.	Kadang baik
III	- Berkembang secara lokal - Tidak terjadi metastase	Terapi sistem primer dan radioterapi.	Biasanya jelek
IV	- Terjadi metastase	Mengurangi dengan terapi sistem dan/atau radioterapi dan/atau operasi.	Jelek

(Sumber : Knowles, 2005)

2.2.1 Pengobatan Lokal pada Kanker

Pengobatan kanker secara lokal meliputi operasi dan radioterapi. Operasi merupakan pengobatan paling tua yang diterapkan pada kanker. Tujuan dari operasi adalah untuk membuang kanker dan juga menentukan stadium kanker dengan menghilangkan pembuluh getah bening dari tumor. Namun, operasi ini

dapat menimbulkan kerusakan pada jaringan normal dan pada banyak kasus dapat dihindari dengan kombinasi yang baik antara operasi dan radioterapi.

Untuk radioterapi, tembakan sinar-X berenergi tinggi memiliki tingkat energi tertentu dan dapat masuk ke jaringan dengan kedalaman tertentu. Radiasi membuat pilinan ganda pada DNA rusak pada sel kanker. Pada radioterapi, sinar-X atau sinar *gamma* ditembakkan pada bagian tumor untuk merusak dan membunuh, namun tidak dapat dihindarkan bahwa jaringan normal di sekelilingnya juga terkena efek samping dari radioterapi. Pengobatan dibagi beberapa kali untuk membatasi dosis yang diberikan pada setiap kali perawatan dan untuk meminimalkan kerusakan jangka panjang dan efek buruk pada jaringan tubuh yang normal di sekelilingnya, selain itu juga memungkinkan tumbuhnya sel kanker kembali.

2.2.2 Kemoterapi

Kemoterapi merupakan obat-obatan yang bersifat sitotoksik, sering dengan efek samping yang signifikan, ke pasien sebagai bagian dari pengobatan dari penyakit berbahaya. Cara kerja obat kemoterapi ini ada banyak cara yaitu di antaranya adalah obat berinteraksi dengan DNA secara langsung dan masuk ke antara pasangan basanya (contohnya *anthracyclines*, *actinomycin D*), mengubah secara kimia struktur DNA yang rusak (contohnya adalah agen alkilasi, *mitomycin C*, senyawa platinum). Kelemahan dari kemoterapi adalah efek sampingnya buruk terhadap jaringan normal yang beregenerasi secara cepat seperti rambut, kulit, dan sel pada usus besar, selain itu tingkat keberhasilannya juga tidak tinggi.

2.2.3 Antibodi Monoklonal dan Imunoterapi

Perkembangan antibodi monoklonal spesifik yang secara selektif membunuh sel berbahaya seperti kanker telah mulai dilakukan dan juga telah diuji secara klinis pada manusia, seperti contohnya *Rituximab* yang merupakan antibodi monoklonal pertama yang disetujui untuk pengobatan limfoma sehingga sel kanker mengalami apoptosis (Reff *et al*, 1994; Shan *et al*, 1998; Cragg *et al*, 2003). Imunoterapi potensial bukan hanya untuk membunuh tumor namun juga menimbulkan imunitas sepanjang hidup. Imunoterapi ini adalah melalui

pemberian vaksin yang spesifik, contohnya dengan terapi bakteri, vaksin peptida, dan vaksin sel-T yang dikombinasikan dengan pengobatan kanker pada umumnya.

Walaupun antibodi monoklonal dan imunoterapi merupakan pengobatan yang menjanjikan untuk kanker, namun terdapat beberapa masalah yang membatasi keberhasilannya. Tumor biasanya berdiam di antara jaringan yang sangat padat dan tidak masuk ke dalam pembuluh limfa. Faktor ini menyebabkan sulitnya penyampaian antibodi monoklonal secara efektif ke target. Penargetan yang jelek dari antibodi monoklonal akan membatasi respon pengobatan dan mungkin menyebabkan kekebalan.

2.3 Pengetahuan tentang *Annonaceous Acetogenin*

Dari berbagai pengetahuan mengenai kanker dan pengobatannya, maka dapat diketahui bahwa penyakit ini terus berkembang pengobatannya, namun pengobatan medis memiliki kelemahannya masing-masing. Pengobatan secara herbal dengan *Annonaceous acetogenin* ini sangat luas dan merupakan senyawa aktif yang ditemukan pada tanaman dengan famili *Annonaceae*. Senyawa aktif ini kemudian ditelusuri dan telah diteliti strukturnya, aktivitasnya, dan bagaimana cara mengekstrak senyawa aktif ini dari famili *Annonaceae* terutama dari *Annona muricata* atau yang dikenal dengan nama sirsak.

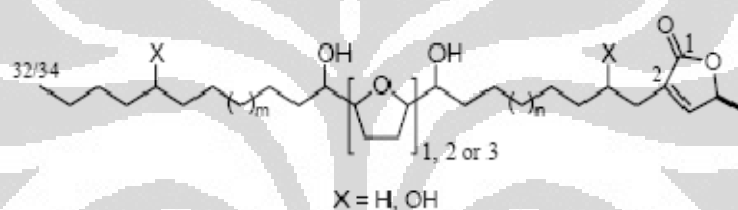
2.3.1 Famili *Annonaceae*

Annonaceae merupakan famili terbesar dari Ordo *Magnoliales* yang menghasilkan berbagai tumbuhan buah seperti sirsak, *paw-paw*, *ylang-ylang*, *cherimoya*, dan *lancewood*. *Annonaceae* memiliki lebih dari 2100 spesies dan tumbuh di sepanjang negara tropis yang berupa dataran rendah pada hutan hujan tropis di Asia dan Afrika. Tanaman ini memiliki hama yang sedikit dan spesifik, hal ini dikarenakan kandungan *acetogenin* yang cukup tinggi dan beracun sehingga tanaman ini dapat melindungi diri mereka sendiri. Salah satu jenis hama ini adalah kupu-kupu berjenis *Eurytides marcellus* dimana larvanya memakan daun yang mengandung *annonaceous acetogenin* ini kemudian diambil dari daun *Asimina triloba*. Studinya menunjukkan bahwa kupu-kupu ini memiliki pertahanan diri secara kimia terhadap predator burung karena memakan

kandungan daun yang mengandung *annonaceous acetogenin* (Villo, 2008; Martin *et al*, 1999).

2.3.2 *Annonaceous Acetogenin*

Annonaceous acetogenin merupakan kelompok dari produk alami poliketida yang diisolasi dari tanaman famili *Annonaceae*. Sifat umum dari molekul ini adalah berupa rantai panjang asam lemak sepanjang 35 atau 37 karbon yang diakhiri oleh sebuah γ -lakton. Secara biogenetik, *annonaceous acetogenin* diturunkan dari asam lemak dengan 32 atau 24 karbon yang kemudian ditambahkan dua unit 2-propanol untuk membentuk lakton pada ujung molekul (Zeng *et al*, 1996). Gambar struktur umumnya dapat dilihat pada Gambar 2.1 di bawah ini.



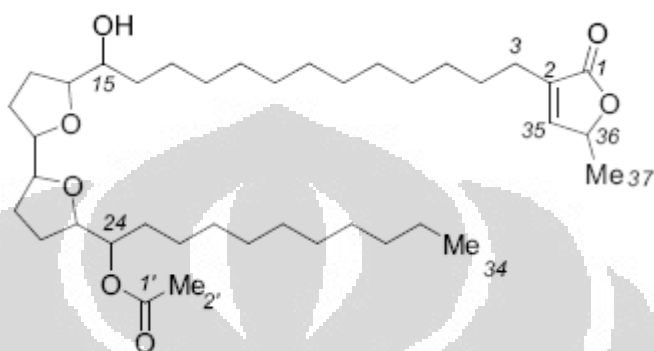
Gambar 2.1 Struktur Umum dari *Annonaceous Acetogenin*

(Sumber : Gorman, 2008)

Tambahan lainnya seperti ikatan ganda atau tripel, olefin, hidroksil, keton atau separuh epoksida seperti cincin tetrahidrofuran (THF) atau tetrahidropiran (THP) (Gallimore, 2008; Villo, 2008). *Annonaceous acetogenin* dihipotesis diturunkan dari poliketida, dimana cincin THF, THP dan epoksida berasal dari ikatan ganda yang terisolasi karena reaksi epoksidasi dan reaksi siklik (Alali *et al*, 1999).

Studi mengenai *annonaceous acetogenin* ini mulai dikembangkan sejak tahun 1982 dimana *acetogenin* pertama berhasil diisolasi, yaitu *uvaricin*. *Uvaricin* didapatkan dari ekstrak akar yang mendemonstrasikan difat antitumor yang tinggi pada sel leukemia pada tikus secara *in vivo*. Kemudian strukturnya dianalisa menggunakan spektroskopi IR, NMR, dan ditunjukkan bahwa *uvaricin* merupakan turunan asam lemak C₃₄ dengan diakhiri cincin lakton tak jenuh dan

dua cincin THF yang berdekatan yang diapit oleh grup hidroksil sepanjang rantai panjang alifatik. Struktur *uvaricin* dapat dilihat pada Gambar 2.2 di bawah berikut ini (Jolad *et al*, 1982; Villo, 2008). Setelah penemuan *uvaricin*, penelitian terus dikembangkan dan sampai sekarang telah berkembang hingga lebih dari 400 jenis *annonaceous acetogenin* (Bermejo *et al*, 2005).



Gambar 2.2 *Uvaricin*, *Annonaceous Acetogenin* Pertama

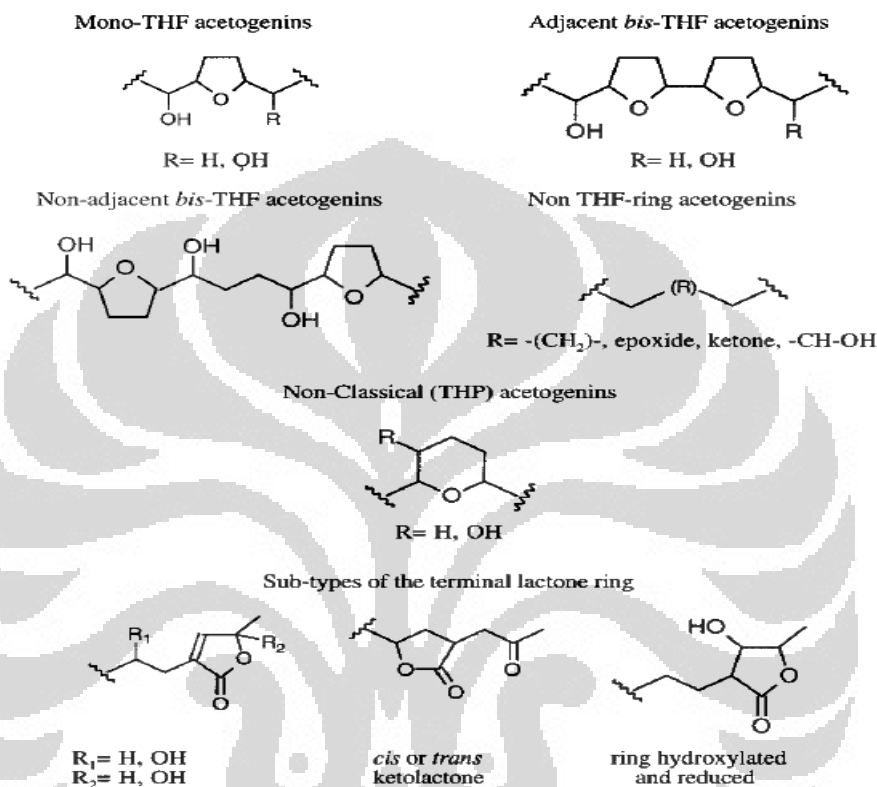
(Sumber: Villo, 2008)

Mayoritas *annonaceous acetogenin* yang ditemukan memiliki sifat sitotoksik terhadap sel kanker yang telah teruji secara *in vitro* dan juga bersifat antitumor, antimikroba, antiparasit, antimalaria, pembunuh serangga (insektisida), *antifeedant* (sifat dimana dapat menghentikan serangga untuk memakan), juga menunjukkan aktivitas immunosupresif (menghambat sistem kekebalan terhadap obat). Karena sifat-sifat inilah, *annonaceous acetogenin* berkembang dengan sangat cepat dan dapat dijadikan sebagai salah satu kemoterapi untuk antitumor dan agen pestisida yang menjanjikan (Bermejo *et al*, 2005; Villo, 2008; Alali *et al*, 1999).

Studi untuk sifat antibakteri dan antivirus telah diselidiki dan ditemukan cukup signifikan. Sifat antibakteri telah diteliti dan menunjukkan sifat antibakteri terhadap bakteri gram positif dan gram negatif seperti *Staphylococcus aureus*, *Vibrio cholerae*, *Escheria coli*, dan *Salmonella Enteritidis* (Vieira *et al*, 2010). Selain terhadap bakteri, *annonaceous acetogenin* juga memiliki sifat antivirus dan telah diteliti bahwa hasil ekstraksi *Annona muricata* dengan etanol bersifat antivirus terhadap virus herpes simplex (Padma *et al*, 1998).

2.3.3 Klasifikasi *Annonaceous Acetogenin* Berdasarkan Struktur

Terdapat banyak klasifikasi terhadap *annonaceous acetogenin*, namun pembagiannya menjadi rumit hingga mencapai 22 kelompok, sehingga klasifikasi dikembangkan dengan lebih sederhana.



Gambar 2.3 Klasifikasi *Annonaceous Acetogenin*

(Sumber : Alali *et al*, 1999)

Klasifikasi *annonaceous acetogenin* dibagi berdasarkan stereostruktur cincin THF, dan pembagiannya adalah sebagai berikut (Villo *et al*, 2008; Alali *et al*, 1999):

- *Annonaceous acetogenin* linear
- *Annonaceous acetogenin* epoksi
- Cincin THF tunggal (*mono-THF*)
- Cincin THF ganda (*bis-THF*)
- Cincin THF tripel (*tri-THF*)
- Acetogenin THP

Ada subklasifikasi selanjutnya dari γ -lakton, disubstitusi oleh γ -lakton atau variasi ketolakton. Untuk menggambarkan salah satu klasifikasinya, maka pembagian jenis *annonaceous acetogenin* oleh Alali *et al* dapat dilihat gambar contohnya pada Gambar 2.3 di atas.

Untuk senyawa *acetogenin* dengan jenis linear hanya terdapat empat jenis sampai saat ini yang telah diisolasi dan dapat dilihat strukturnya pada Gambar 2.4 di bawah.

	Hydroxyl positions	Relative configuration*	Molecular formula	M ⁺	Annonaceae species† [reference]	
I—Linear acetogenins						
1—Hydroxylated and ketonic linear acetogenins, 'giganin type':						
1.1	Giganin (C ₁₃ =C ₁₄)	4,10,17,18	<i>c-th</i>	C ₃₃ H ₆₄ O ₆	580	<i>G. giganteus</i> [9]
1.2	Venezin (C ₂₁ =C ₂₂)	4,17,18 (CO, 10)	<i>th-c</i>	C ₃₇ H ₆₆ O ₆	606	<i>X. aromatica</i> [10]
1.1 : R = OH; C ₁₃ =C ₁₄						
1.2 : R = (=O); C ₂₁ =C ₂₂						
1.3	Reticulatamol	15	—	C ₃₃ H ₆₆ O ₃	534	<i>A. reticulata</i> [11]
1.4	Reticulatamone	(CO, 15)	—	C ₃₃ H ₆₄ O ₃	532	<i>A. reticulata</i> [12]
1.3 : R = OH						
1.4 : R = (=O)						

**th*: threo; *c*: cis.

†*G*: *Goniothalamus*; *X*: *Xylopi*a; *A*: *Annona*.

Gambar 2.4 *Annonaceous Acetogenin* Linear

(Sumber : Zafra-Polo *et al*, 1996)

2.3.4 *Annonaceous Acetogenin* dari *Annona Muricata*

Annona muricata atau dikenal sebagai sirsak tumbuh secara komersial di berbagai daerah di daerah tropis. Tanaman sirsak telah digunakan sebagai pengobatan tradisional yang dikenal karena sifatnya yang antidiare, antidiabetik, obat penenang, pembasmi cacing, larvasida, anti serangga dan parasit. Berbagai studi kimia dan biologi telah dilakukan pada bagian berbeda dari tanaman ini, seperti pada buah, batang, biji, akar dan telah dilaporkan akan aktivitasnya yang

beragam, yaitu sebagai antiparasit, antidepresif, dan sitotoksik (Luna *et al*, 2005). Dalam tanaman sirsak ini telah ditemukan lebih dari 50 jenis *annonaceous acetogenin* dan 18 jenis di antaranya ditemukan pada bagian daun sirsak (Geum Soog *et al*, 1998). *Annonaceous acetogenin* dari daun ini telah diteliti sifat sitotoksiknya oleh peneliti luar negeri dan dalam negeri. Sifatnya yang sitotoksik terhadap beberapa jenis sel kanker, seperti kanker paru-paru, usus besar, pankreas, dan prostat telah diteliti dan diterapkan pada berbagai pengobatan tradisional terutama di Indonesia (Lu Zeng *et al*, 1996; Geum Soog *et al*, 1998; Geum Soog *et al*, 1997; Sudjari *et al*, 2005). Beberapa contoh penemuan *annonaceous acetogenin* dari daun sirsak dapat dilihat pada Tabel 2.3 dan Tabel 2.4 berikut ini.

Tabel 2.3 *Annonaceous Acetogenin* dari *A. muricata*

Sumber	Nama
Biji	<i>Epomuricenin-A (or epoxymurin-A)</i>
	<i>Epomuricenin-B</i>
	<i>Diepomuricanin-A</i>
	<i>Corepoxylone</i>
	<i>Solamin</i>
	<i>Murisolin</i>
	<i>Corossolin</i>
	<i>Corossolone</i>
	<i>Gigantetrocin-B</i>
	<i>Muricatetrocin-A/B</i>
	Kulit kayu
<i>Epoxymurin-B</i>	
<i>Muricatin-C</i>	
<i>Muricatin-A</i>	
Daun	<i>Muricatin-B</i>
	<i>Annomuricin-A</i>
	<i>Annomuricin-B</i>

(Sumber: Zafra-Polo *et al*, 1996)

Tabel 2.4 Jenis *Annonaceous Acetogenin* dalam Daun *A.muricata*

No	Nama	Rumus Molekul	Berat Molekul
1	Annmutacin	$C_{37}H_{68}O_7$	624
2	Annomuricin-A	$C_{35}H_{64}O_8$	612
3	Annomuricin-B	$C_{35}H_{64}O_8$	612
4	Muricatocin-A	$C_{35}H_{64}O_8$	612
5	Muricatocin-B	$C_{35}H_{64}O_8$	612
6	Annomuricin-C	$C_{35}H_{64}O_8$	612
7	Annohexocin	$C_{35}H_{64}O_9$	628
8	Annomuricin-E	$C_{35}H_{64}O_8$	619
9	Muricapentocin	$C_{35}H_{64}O_8$	619
10	Murihexocin-A	$C_{35}H_{65}O_9$	635
11	Murihexocin-B	$C_{35}H_{65}O_9$	635
12	Annopentocin-A	$C_{35}H_{64}O_8$	613
13	Annopentocin-B	$C_{35}H_{64}O_8$	613
14	Annopentocin-C	$C_{35}H_{64}O_8$	613
15	Muricoreacin	$C_{35}H_{65}O_9$	635
16	Murihexocin-C	$C_{35}H_{65}O_9$	635
17	Cis- Annomuricinone-D	$C_{35}H_{64}O_8$	613
18	Trans- Annomuricinone-D	$C_{35}H_{64}O_8$	613

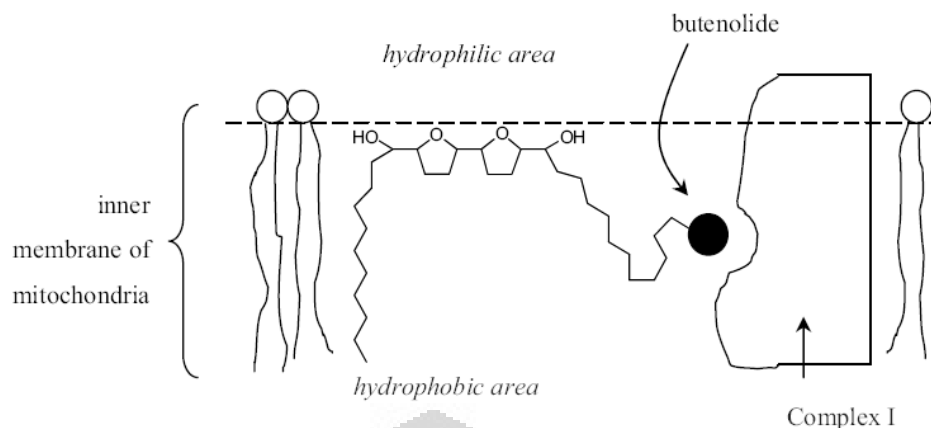
(Sumber : dirangkum dari Bermejo *et al*, 2005)

2.4 Aktivitas Biologi *Annonaceous Acetogenin*

Aktivitas biologi dari *annonaceous acetogenin* ini intinya adalah sifatnya yang menghambat kompleks I mitokondria sehingga dapat bersifat sitotoksik terhadap sel kanker dan terbukti sifatnya berlaku secara spesifik. Aktivitas biologi lainnya yang telah diteliti adalah penelitian sifat pestisida dan insektisida dari *annonaceous acetogenin*.

2.4.1 Menginhibisi Kompleks I Mitokondria

Annonaceous acetogenin merupakan inhibitor NADH pada enzim *ubiquinone oxidoreductase*. Enzim ini merupakan enzim esensial dalam sistem transpor elektron yang memimpin ke proses selanjutnya yaitu fosforilasi oksidatif di dalam mitokondria. Sumber utamanya aktivitas biologi untuk aktivitas *annonaceous acetogenin* melibatkan interaksi dengan kompleks I mitokondrial (NADH:*ubiquinone oxidoreductase*).



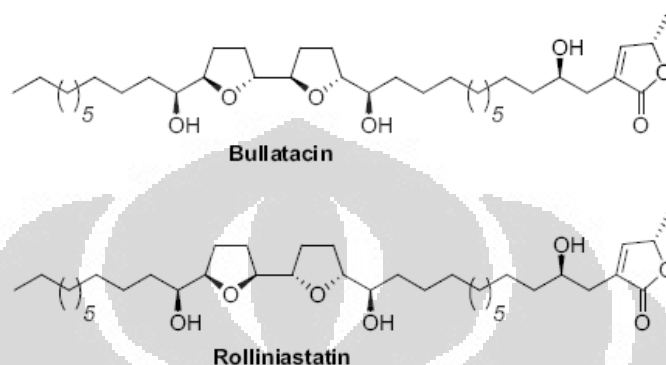
Gambar 2.5 Model McLaughlin dalam Sifat Inhibisi Acetogenin pada Kompleks I Mitokondria

(Sumber : Villo, 2008)

Kompleks I merupakan sistem protein yang rumit di dalam mitokondria (Zeng *et al*, 1996). Senyawa ini dihubungkan dengan transfer elektron terminal antara bagian Fe-S dan *ubiquinone*. Hasilnya gradien proton antar membran yang diciptakan oleh kompleks I selama reduksi NADH oleh *ubiquinone* dan transfer elektron yang memungkinkan untuk reduksi pernafasan dari O_2 ke H_2O dihambat, sehingga mengurangi level ATP secara signifikan. Memang terdapat beberapa kesamaan secara struktural antara *annonaceous acetogenin* dengan inhibitor kompleks I biasa, seperti *rotenone*, *piericidin-A*, *fenpyroximate*, dan *pyridaben* (Villo, 2008). Peristiwa sebenarnya dalam interaksi dengan kompleks I dan lokasi dari tempat pengikatannya masih harus ditemukan, namun gambaran perkiraan bagaimana *annonaceous acetogenin* menghambat dapat dilihat pada Gambar 2.6.

McLaughlin memberikan gagasan bahwa bagian tengah yang hidrofilik dari *acetogenin* bertindak sebagai jangkar pada bagian gliserol dari *phosphatidylcholine* pada permukaan membran, sedangkan cincin lakton bercabang alkil berdifusi pada interior membran dan berinteraksi dengan *binding site* dari enzim. Inhibisi kompleks I membuat sel kekurangan ATP, menghambat pertumbuhan sel dan mengganggu kinerja sel sehingga akhirnya sel mengalami apoptosis. Salah satu cara sel dapat mengalami apoptosis adalah dengan diinisiasi oleh inhibisi kompleks I mitokondria (Villo, 2008).

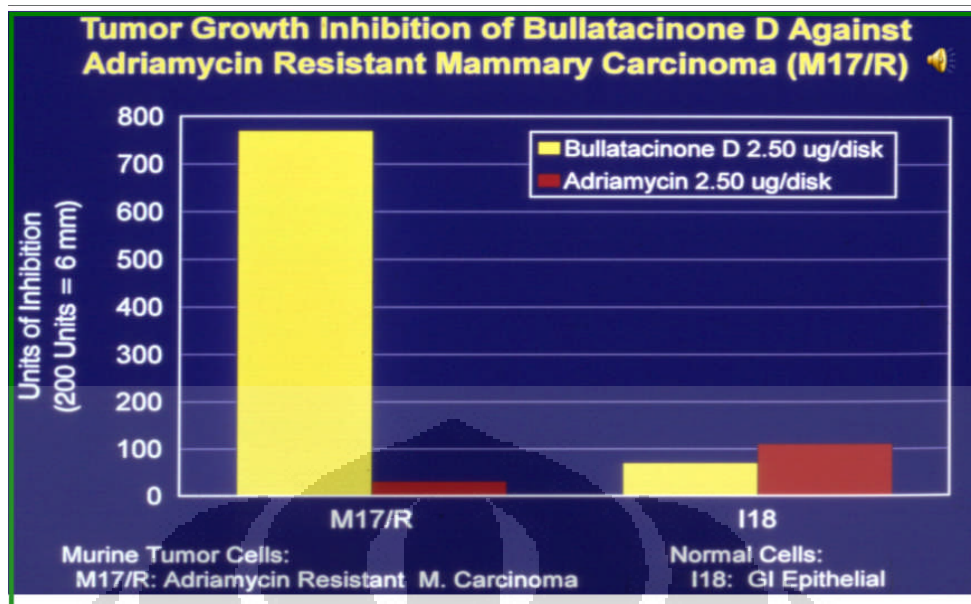
Pengurangan ATP ini telah dihubungkan dengan efisiensi *annonaceous acetogenin* dalam melawan jaringan sel kanker (Gorman, 2006). Studi lebih lanjut menunjukkan bahwa *bullatacin* dan *rolliniastatin-1* merupakan inhibitor pada kompleks I mitokondria yang telah diidentifikasi paling berpotensi sampai saat ini. Gambar strukturnya dapat dilihat pada Gambar 2.6.



Gambar 2.6 Struktur *Bullatacin* dan *Rolliniastatin*

(Sumber : Villo, 2008)

Aktivitas inhibisi oleh *annonaceous acetogenin* ini memberi bukti bahwa *annonaceous acetogenin* bersifat sitotoksik dan ditemukan bersifat sitotoksik yang spesifik pada sel tumor tertentu sehingga dapat dikatakan bersifat antitumor. Studi terhadap *annonaceous acetogenin* terhadap sel tumor pada tikus telah membuktikan bahwa *annonaceous acetogenin* dapat bersifat sebagai antitumor secara *in vitro* bahkan terhadap sel kanker yang telah resisten terhadap *adriamycin* dimana efek *annonaceous acetogenin* ini minimal terhadap sel epitel yang normal. Lebih jauh lagi, sifat inhibitorynya membuat *annonaceous acetogenin* juga bersifat sitotoksik pada sel kanker *multidrug resistant* (MDR). Sifat MDR disebabkan oleh peningkatan ekspresi P-glikoprotein, sebuah transmembran 170 kDa yang merupakan pompa obat yang dependen (bergantung) pada energi (Alali *et al*, 1999). Hal tersebut dapat dilihat pada Gambar 2.7 di bawah ini.



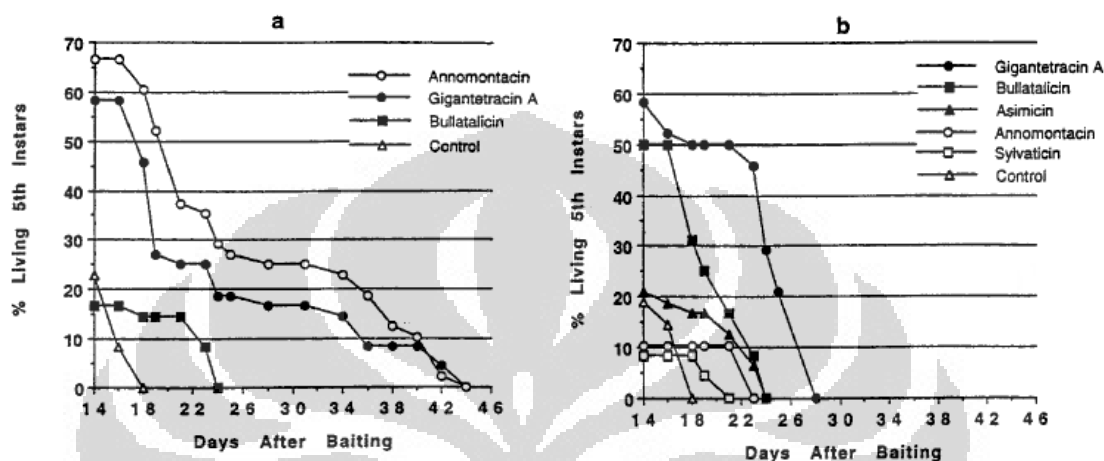
Gambar 2.7 Grafik Inhibisi antara *Bullatacinone* dan *Adriamycin*

(Sumber : Bahan presentasi “PawPaw and Cancer” oleh Prof. Jerry McLaughlin, Purdue University tahun 2006)

2.4.2 Potensial sebagai Pestisida dan Insektisida

Enam senyawa *annonaceous acetogenin* yang mewakili mono-THF (*gigantetrocin A*, *annomontacin*) dan bis-THF (*asimicin*, *parviflorin*, *sylvaticin*, *bullatalicin*) dibandingkan dengan insektisida sintetik seperti *amidinohydrazone* (*hydramethylnon*), *carbamate* (*propoxur*, *bendiocarb*), *organophosphate* (*chlorpyrifos*), dan *pyrethroid* (*cypermethrin*) untuk menentukan toksisitas terhadap serangga yang resisten khususnya serangga kecoak Jerman, *Blattella germanica*. Sebagai serangga yang tersebar di seluruh dunia, kecoak biasanya dikontrol dengan menggunakan insektisida sintetik konvensional yang cepat dan efisien untuk mengurangi populasi kecoak. Kebanyakan insektisida ini mengganggu fungsi sistem saraf atau proses fisiologi lainnya setelah memasuki badan melalui kontak langsung, terpapar karena uap atau pencernaan. Penggunaan berulang dari insektisida ini menyebabkan pengembangan resistensi pada insektisida sintetik tersebut. Pengembangan insektisida baru dengan mekanisme biokimia baru dibutuhkan untuk membasmi serangga tersebut.

Annonaceous acetogenin telah dijelaskan dalam banyak literatur bersifat toksik terhadap larva *tomosquito*, *European corn borer*, tungau, kumbang kecil penghisap melon, kumbang kacang Meksiko, kumbang daun kacang, kumbang timun, larva *blowfly*, kumbang kentang Colorado, dan nematoda atau cacing yang hidup bebas.



Gambar 2.8 Efek *Annonaceous Acetogenin* pada Serangga Kecoak *Jwax* (a) dan *Mucien* (b)

(Sumber: Alali *et al*, 1999)

Kemudian dilakukan studi antara penggunaan *annonaceous acetogenin* dan insektisida sintetik terhadap dua jenis strain kecoak, yaitu *Jwax* dan *Muncie*, dimana *Muncie* merupakan kecoak yang resisten. Nilai kecepatan membunuh (LT_{50}) antara *annonaceous acetogenin* dan insektisida sintetik menunjukkan bahwa *annonaceous acetogenin* dengan jenis bis-THF memiliki persentase mortalitas tertinggi dan dapat dilihat pada Gambar 2.8 di atas.

2.5 Ekstraksi dan Fraksinasi *Annonaceous Acetogenin*

Dalam melakukan ekstraksi terhadap tanaman, terdapat beberapa cara ekstraksi yang dapat dilakukan di antaranya adalah dengan menggunakan:

➤ *Soxhlet*

Ekstraksi menggunakan soxhlet merupakan ekstraksi yang menggunakan pemanasan dan menggunakan pelarut yang menguap dan terkondensasi kembali sehingga lebih hemat, namun tidak dapat diterapkan karena ekstrak rentan terhadap suhu yang tinggi, dan tidak boleh melewati suhu sebesar 60°C (Haijun Yang *et al*, 2010)

➤ Maserasi

Maserasi merupakan istilah yang digunakan dalam dunia farmasi dimana ekstraksi dilakukan dengan merendam sejumlah bahan tanaman yang akan diekstrak menggunakan pelarut tertentu dalam jangka waktu tertentu. Maserasi cocok untuk digunakan untuk mengekstraksi *annonaceous acetogenin* walaupun memakan waktu 24 jam.

➤ Maserasi dengan bantuan *ultrasonic bath*

Maserasi ini sama seperti sebelumnya, hanya saja saat maserasi, ekstrak diletakkan dalam *ultrasonic bath* yang akan menggetarkan molekul pelarut dan kemudian membuat senyawa aktif dapat lebih cepat berpindah ke pelarut. Namun kelemahannya adalah setiap 30 menit, suhu air akan meningkat, sehingga harus diganti airnya.

➤ *Supercritical fluid extraction*

Teknik ini merupakan teknik ekstraksi pada suhu rendah bertekanan tinggi yang biasanya menggunakan karbondioksida dengan modifikasi pelarut yang sedikit namun teknik ini memakan biaya yang tinggi.

Ekstraksi etanol dari biomassa tanaman dengan famili *Annonaceae* untuk mendapatkan *acetogenin* merupakan metode umum yang digunakan. Hampir semua *acetogenin* dapat dengan mudah larut dalam pelarut organik, seperti kloroform atau diklorometana. Ekstraksi etanol dari material tanaman yang dikeringkan dan diikuti dengan fraksinasi pelarut untuk mengosentrasikan senyawa masih merupakan metode yang dipilih dalam laboratorium.

Ekstraksi yang dilakukan bertujuan untuk mendapatkan sebanyak-banyaknya kandungan *annonaceous acetogenin* dalam hasil ekstraksi. Karena *annonaceous acetogenin* bersifat sedikit polar dan mudah larut dalam pelarut

organik pada umumnya sehingga pada awalnya diekstraksi dengan etanol untuk mendapatkan senyawa organik sebanyak-banyaknya dari daun sirsak.

Tahapan dalam melakukan ekstraksi bahan medis dari tanaman adalah (Handa *et al*, 2008) pengurangan ukuran, ekstraksi, filtrasi, konsentrasi, dan pengeringan.

➤ **Pengurangan Ukuran**

Bahan tanaman yang telah dikeringkan dimasukkan ke dalam mesin penghalus. Tujuan dari penepungan bahan tanaman ini adalah untuk menghancurkan organ, jaringan dan struktur sel sehingga bahan medisnya terekspos dalam pelarut ekstraksi. Pengurangan ukuran ini juga memaksimalkan luas permukaan sehingga meningkatkan transfer massa dari bahan tanaman ke pelarut. Ukurannya yang optimal adalah sebesar 30-40 *mesh*, karena partikel yang lebih kecil dari ini akan menjadi sangat kecil selama ekstraksi dan sulit saat difiltrasi.

➤ **Filtrasi**

Setelah ekstraksi didapatkan, maka dipisahkan dari *marc* dengan melewatkannya dalam ekstraktor yang dilapisi oleh kain filter. Kemudian *marc* tertahan pada bagian dasar dan ekstraksi didapatkan pada hasil filturnya

➤ **Konsentrasi**

Hasil ekstraksi dari perkolator atau ekstraktor dikenal dengan *miscella* dimasukkan ke dalam evaporator untuk mengkonsentrasikan ekstraksi menjadi tinggi. Ekstraksi yang telah dikonsentrasikan ini kemudian dimasukkan ke dalam *vacuum dryer* untuk memproduksi padatan yang bebas dari pelarut. Pelarut ini kemudian digunakan kembali untuk perkolator atau ekstraktor untuk proses selanjutnya. Padatan kering ini kemudian dapat digunakan untuk formulasi ataupun untuk diisolasi dan dianalisa.

➤ **Pengeringan**

Hasil ekstraksinya yang telah difilter dilakukan *spray drying* dengan pompa bertekanan tinggi pada laju umpan masuk dan suhu tinggi untuk mendapatkan tepung kering. Ukuran partikel yang diinginkan dapat dikontrol dengan suhu dalam *chamber* dan dengan memvariasikan tekanan dalam pompa. Tepung kering ini dicampur dengan eksipien lain yang sesuai dan dicampur dengan *mixer* untuk mendapatkan tepung homogen yang dapat langsung digunakan, misalnya untuk dimasukkan dalam kapsul atau dibuat tablet.

Fraksinasi dilakukan berulang dengan pelarut berbeda bertujuan untuk mendapatkan *annonaceous acetogenin* yang sedikit polar. Fraksinasi pertama menggunakan campuran antara diklorometana dengan air, dan air akan larut dengan senyawa yang polar dan diklorometana akan melarutkan senyawa organik non polar. Fraksinasi kedua dilakukan dengan menggunakan campuran antara metanol dengan heksana. Melihat dari struktur kimia dari *annonaceous acetogenin*, walaupun bentuknya rantai panjang, namun terdapat ikatan rangkap dan lakton yang membuat sifatnya menjadi sedikit polar, sehingga larut dengan mudah pada metanol dibandingkan oleh heksana.

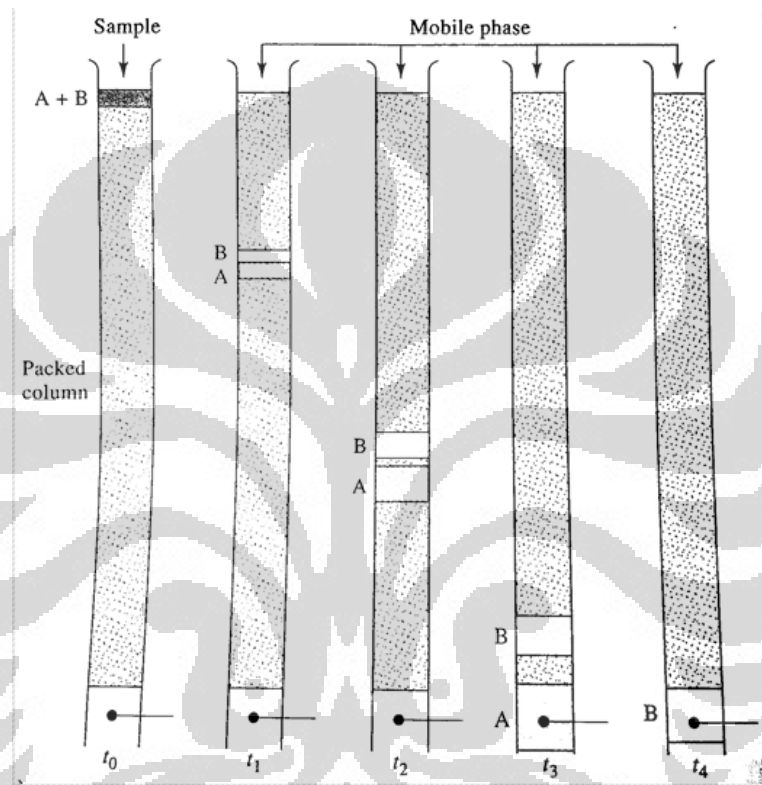
Kandungan dalam daun kemudian dapat dilarutkan dan dipisahkan dengan fraksinasi, yaitu sebagai berikut (Souza *et al*, 2009):

- Serat
- Netral (lemak)
- Organik (terpenoid dan senyawa fenol)
- Basa (alkaloid)
- Polar (alkaloid *quarternary* dan n-o-ksida)

2.6 Kromatografi Hasil Ekstraksi

Kromatografi adalah metode pemisahan yang sangat baik, dan metode ini ditemukan oleh ahli botani bernama Mikhail Tswett pada akhir abad 20. Pada semua metode kromatografi, sampel dilarutkan dalam fase bergerak yang bisa berupa gas, cairan, atau fluida superkritis. Fase bergerak ini kemudian melewati

suatu fase diam yang tidak larut yang diletakkan pada sebuah kolom atau pada permukaan padatan. Dua fase ini dipilih dengan tujuan agar sampel dapat terdistribusi antara fase diam dan fase bergerak. Komponen yang terikat pada fase diam akan bergerak dengan pelan mengikuti aliran fase bergerak. Sebaliknya, komponen yang tidak terikat dengan fase diam akan bergerak dengan cepat (Skoog *et al*, 2007). Hal ini dapat dilihat pada Gambar 2.9 di bawah ini.



Gambar 2.9 Diagram Elusi pada Kromatografi Kolom

(Sumber : Skoog *et al*, 2007)

Pada awalnya, larutan sampel yang mengandung hasil ekstrak dimasukkan pada bagian atas kolom sebagai t_0 kemudian komponen tersebut akan terdistribusi di antara fase dan ditambahkan lagi larutan fase bergerak sehingga larutan sampel dapat turun ke bawah seperti t_1 . Semakin bertambahnya pelarut, maka akan terpisah seperti pada t_2 . Isolasi dari spesi yang terpisah kemudian dikumpulkan dan dapat dideteksi pemisahannya pada t_3 dan t_4 .

Terdapat dua jenis kromatografi apabila diklasifikasi berdasarkan bentuknya secara fisik, yaitu kromatografi kolom dan planar. Pada kromatografi

kolom, fase diam terletak pada suatu tabung sempit dimana fase bergerak akan lewat melalui fase diam sehingga terjadi kontak yang terjadi dengan gravitasi atau dengan pemberian tekanan. Klasifikasi berdasarkan jenis fasenya pada kromatografi kolom dapat dilihat pada Tabel 2.5.

Tabel 2.5 Klasifikasi Metode Kromatografi Kolom

Jenis Kromatografi	Metode Spesifik	Fase Diam	Jenis Kesetimbangan
1. Kromatografi gas	Kromatografi gas-cair	Cairan teradsorpsi atau terikat pada permukaan padatan	Partisi antara gas dan cairan
	Kromatografi gas-padatan	Padatan	Adsorpsi
2. Kromatografi cair	Partisi cairan-cairan	Cairan teradsorpsi atau terikat pada permukaan padatan	Partisi antara cairan yang tidak saling larut
	Cairan-padatan atau adsorpsi	Padatan	Adsorpsi
	Pertukaran ion	Resin pertukaran ion	Pertukaran ion
	<i>Size exclusion</i>	Cairan pada padatan polimer	Partisi berdasarkan ukuran
	Afinitas	Jenis cairan spesifik yang terikat pada permukaan padatan	Partisi antara cairan permukaan dan cairan bergerak
3. Kromatografi fluida superkritis		Spesi organik yang terikat pada permukaan padatan	Partisi antara cairan superkritis dan permukaan terikat

(Sumber : Skoog *et al*, 2007)

Untuk klasifikasi kromatografi planar adalah kromatografi lapis tipis atau TLC atau *Thin Layer Chromatography* dan kromatografi kertas. Masing-masing menggunakan lapisan tipis material kaca, logam, atau plastik yang dilapisi, sehingga fase bergerak akan mengalir fase diam dengan gaya kapiler atau dengan pengaruh gravitasi atau potensial elektroda. Metode TLC lebih umum digunakan karena lebih sensitif daripada kromatografi kertas.

Sebenarnya kromatografi cairan dan TLC cara kerjanya sama karena jenis fase diam dan fase bergerak sama dan biasanya TLC digunakan untuk mendeteksi pemisahan dari kromatografi cairan. Pada industri obat-obatan, teknik ini sudah

digantikan oleh kromatografi cairan yang sudah otomatis dan lebih cepat. Namun, TLC masih digunakan pada pembelajaran biokimia dan biologi.

Fase diam dari TLC ini dapat dibuat sendiri dengan menempelkan silika pada piringan aluminium atau kaca. Namun, fase diam TLC berupa kertas alumina yang sudah dilapisi silika juga sudah banyak ditemukan dan lebih efisien digunakan. Piringan komersial ini terbagi menjadi 2 jenis, yaitu konvensional dan kinerja tinggi dimana kinerja tinggi memiliki piringan yang lebih tipis dan diameter partikel silika yang lebih kecil atau halus.

Dalam pengaplikasiannya, sampel diletakkan sebagai titik dengan jarak 1 sampai 2 cm dari bawah piringan dengan diameter sekitar 5 mm. Titik larutan sampel ini dibantu dengan menggunakan pipa kapiler kaca yang tipis. Setelah itu, sampel akan bergerak melalui fase diam karena terbawa oleh fase bergerak, dimana fase bergerak adalah larutan tertentu di dalam suatu gelas atau tempat tertutup pada saat uapnya sudah jenuh. Setelah fase bergerak mencapai satu setengah atau dua per tiga dari panjang piringan, maka piringan diangkat dan dikeringkan.

Posisi komponen yang terpisah dapat dilihat dengan beberapa metode. Dua metode umum yang digunakan adalah menyemprotkan dengan larutan tertentu atau meletakkan piringan pada suatu ruang yang diberi sinar atau uap tertentu. Reagen ini akan bereaksi dengan senyawa organik pada piringan dan menghasilkan warna pada silika piringan.

Isolasi dilakukan dengan jalan melewati hasil ekstraksi pada kromatografi kolom terbuka yang kemudian diperiksa hasil kolom dengan menggunakan TLC.

Kromatografi kolom yang digunakan adalah kromatografi cairan-padatan atau kromatografi adsorpsi. Padatan atau fase diam yang digunakan adalah silika sebagai penjerap. Silika bersifat sedikit asam dengan perkiraan pemakaian sebanyak 90% dan merupakan penjerap paling serba guna dalam kromatografi kolom. Silika bersifat polar sehingga akan mengikat komponen yang polar juga dan melewati senyawa yang non polar (Johnson, 1991).

Daun biasanya kaya akan lemak dan sebagian besar kandungannya adalah *triacylglycerol* atau TAG. Perbandingan kandungan senyawa *triacylglycerol* dan *annonaceous acetogenin* dalam ekstraksi biasanya adalah lebih dari 90% adalah TAG yang merupakan minyak tak jenuh dan tidak berbahaya apabila dikonsumsi, sedangkan *annonaceous acetogenin* berkisar di bawah 0,1%. Ekstrak ini membutuhkan partisi dengan kolom kromatografi oleh *silica gel* untuk memperkaya dan mendapatkan fraksi *annonaceous acetogenin* dalam fraksi yang lebih murni (Fontana *et al*, 1998). *Annonaceous acetogenin* bersifat sedikit non polar, maka eluen yang digunakan heksana, campuran heksana dan aseton, dan aseton. Heksana akan mengikat komponen non polar terlebih dahulu kemudian campurannya akan membawa komponen yang tidak terlalu polar tapi juga tidak terlalu non polar, dan *annonaceous acetogenin* akan berada pada campuran ini. Saat kromatografi kolom berlangsung, semua larutan yang keluar dari kolom ditampung pada botol dan kemudian setiap botol dapat dianalisa dengan TLC.

Kepolaran fase bergerak ditingkatkan sebanyak dua kali untuk mendapatkan hasil kromatografi yang lebih baik, sehingga senyawa-senyawa lainnya akan terbawa lebih dahulu menurut kepolarannya, dan senyawa non polar akan terbawa oleh larutan heksana, selanjutnya senyawa yang sedikit polar akan terbawa oleh larutan campuran heksana dan aseton dengan perbandingan 1:1. Senyawa polar akan terbawa oleh aseton sekaligus mencuci silika yang terikat dengan senyawa polar.

2.7 Analisis Hasil Ekstraksi

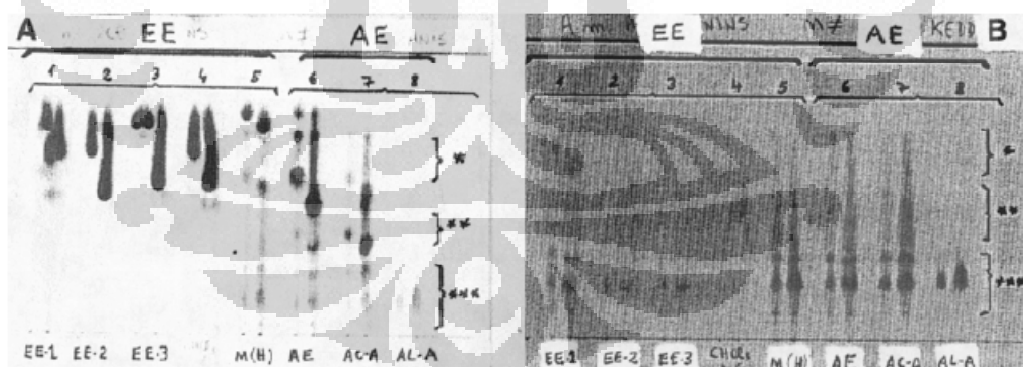
Analisa dilakukan terhadap fraksi ekstraksi dan kromatografi dilakukan dengan menggunakan TLC, HPLC, dan LC-MS, sedangkan untuk uji aktivitas sitotoksik dari *annonaceous acetogenin* dilakukan dengan menggunakan metode BST.

2.7.1 Thin Layer Chromatography (TLC)

TLC dilakukan dengan menggunakan eluen campuran heksana dan aseton sebagai fase bergerak dan kemudian disemprotkan dengan larutan 1% p-anisaldehyd dalam asam sulfat pekat dengan perbandingan 5:95 dengan pelarut

metanol. Larutan ini dapat mendeteksi kandungan *triacylglycerol* dan *phytosterol* yang berwarna ungu hingga warna *wine*, sedangkan untuk *annonaceous acetogenin* dapat terdeteksi dengan warna kuning hingga *olive* setelah dipanaskan pada 105°C selama 5 menit (Fontana *et al*, 1998). *Phytosterol* merupakan senyawa steroid yang secara umum berfungsi sebagai zat aditif yang dapat menurunkan kadar kolesterol pada manusia. Larutan p-anisaldehyd biasanya digunakan untuk memvisualisasikan hampir semua gugus fungsional, terutama gugus yang memiliki sifat nukleofilik, dan larutan ini cenderung tidak sensitif terhadap alkana, alkena, dan senyawa aromatik kecuali terikat dengan gugus fungsional lain yang ada pada molekul yang dianalisa (Jork *et al*, 1990).

Penyemprot lain terhadap *annonaceous acetogenin* adalah reagen Kedde yaitu 3-5-dinitrobenzoic acid dalam metanol, yang diikuti oleh KOH dalam metanol. Kedua pelarut memiliki konsentrasi dengan perbandingan 5:95 dengan pelarut metanol. Reagen Kedde spesifik dengan kandungan laktone yang terdapat pada *annonaceous acetogenin*. Gambar untuk hasil TLC yang disemprotkan dengan pelarut p-anisaldehyd dan reagen Kedde dapat dilihat pada Gambar 2.10 di bawah ini.

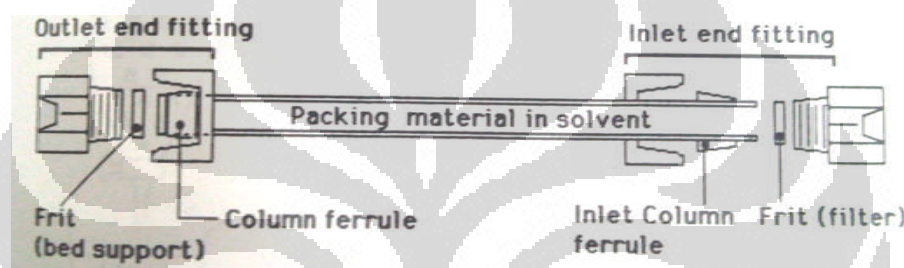


Gambar 2.10 Hasil Monitor TLC pada ekstraksi dan purifikasi *A. muricata* dengan menyemprotkan (A) p-anisaldehyde (B) reagen Kedde

(Sumber : Fontana *et al*, 1998)

2.7.2 HPLC / *High Performance Liquid Chromatography*

Penggunaan HPLC meningkat sejak tahun 1960-an. Ukuran material partikel fasa diam atau *stationary phase* mengecil dan yang digunakan sekarang disebut sebagai mikropartikel. Kolom mikropartikel ini biasanya terdiri dari partikel silika yang seragam, berpori, dengan bentuk bulat atau tidak teratur, dan diameternya 10, 5 atau 3 μm . Kolom pada fasa diam juga dapat divariasikan dengan mengikat permukaan partikel silika dengan gugus kimia lain, dan sekitar 75% penggunaan HPLC menggunakan gugus alkil C_{18} yang terikat pada permukaan silika (Sandie, 1992).



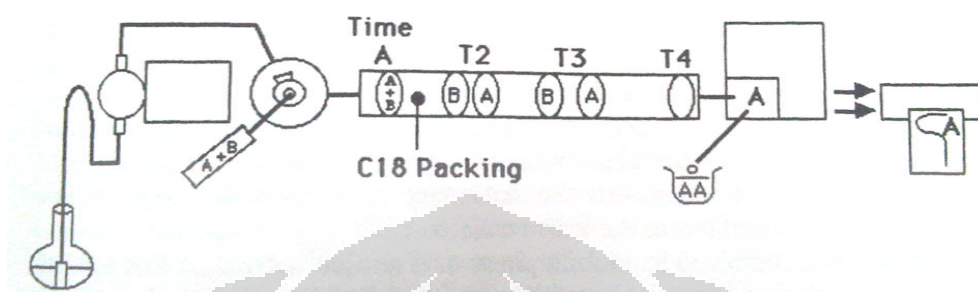
Gambar 2.11 Bagian Peralatan HPLC

(Sumber : McMaster, 1994)

Proses HPLC merupakan proses pemisahan yang terjadi ketika menginjeksikan sampel yang terlarut ke dalam aliran eluen yang dipompa menuju kolom yang terisi dengan material padatan pemisah. Interaksi yang terjadi adalah pemisahan cairan-padatan, dan terjadi ketika sebuah campuran dalam senyawa dapat larut ke dalam eluen atau tinggal di dalam eluen atau terikat pada *packing* di kolom. Pada kolom *reversed-phase*, yang akan digunakan pada penelitian ini, pemisahan terjadi karena setiap senyawa memiliki laju partisi yang berbeda antara eluen dengan material *packing*. Hasilnya adalah komponen dengan afinitas tertinggi pada *packing* akan menempel paling lama dan keluar paling akhir (McMaster, 1994).

Komponen yang terpisah atau terpisah sebagian larut di dalam eluen yang berjalan sepanjang kolom secara pelan sehingga bergerak menjauh dan terelusi dari kolom menuju detektor. Senyawa yang terpisah ini akan muncul pada

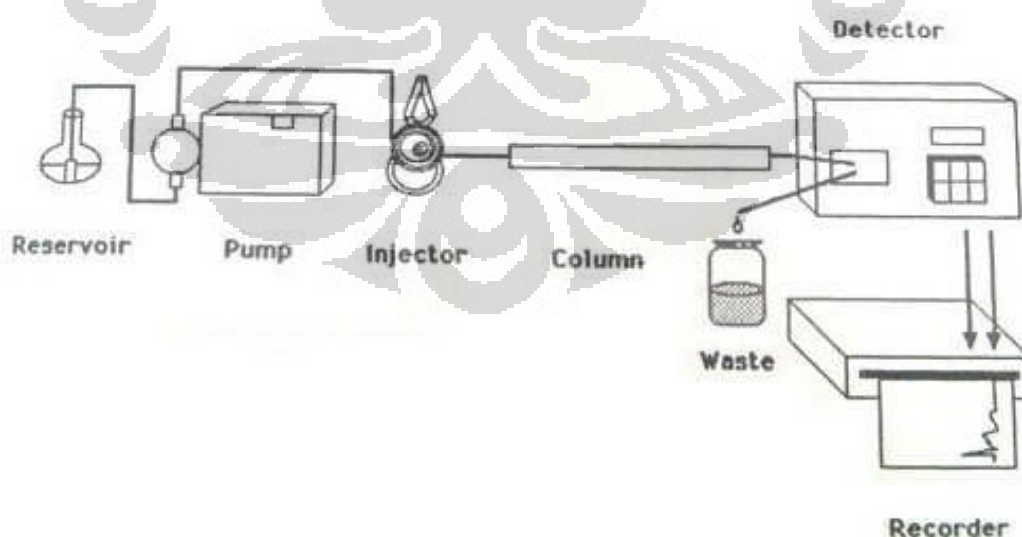
detektor akan muncul sebagai puncak yang naik dan turun ketika sinyal detektor dikirimkan ke komputer (McMaster, 1994).



Gambar 2.12 Aliran Sampel pada HPLC

(Sumber : McMaster, 1994)

Sistem HPLC secara sederhana terdiri dari pompa eluen bertekanan tinggi, injektor, kolom, detektor, dan rekorder data, seperti yang terlihat pada Gambar 2.13 di bawah. Tekanannya berkisar antara 2.000 hingga 6.000 psi. Pada awalnya eluen dimasukkan ke dalam masukan eluen menuju pompa, kemudian dipompa menuju injektor kemudian menuju kolom dan menemui titik kesetimbangan dengan fasa diam dan keluar menuju detektor ke buangan.



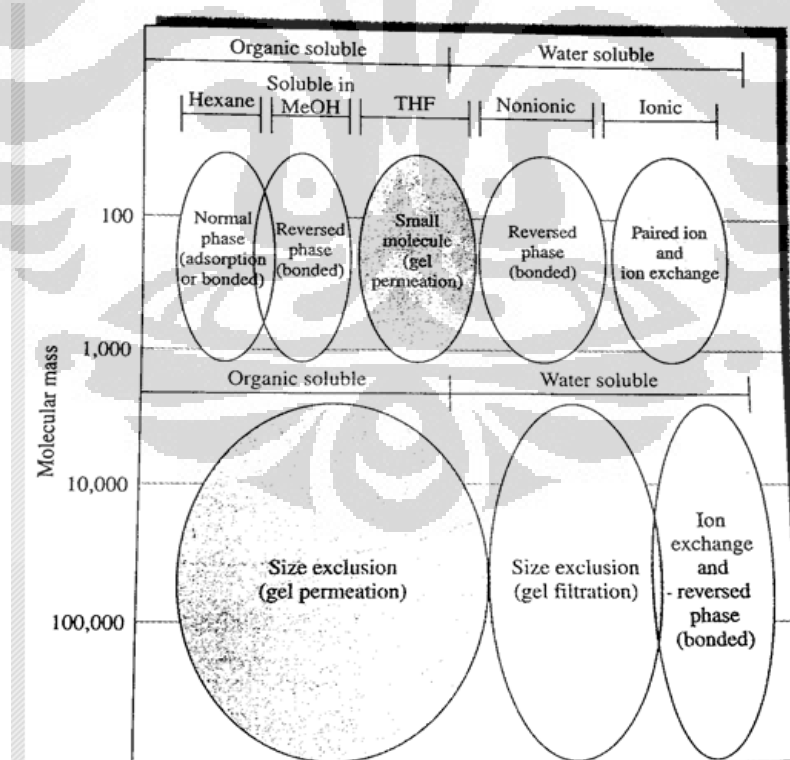
Gambar 2.13 Sistem pada HPLC

(Sumber : McMaster, 1994)

Sampel yang telah dilarutkan dalam fasa bergerak atau eluen yang mirip, kemudian dimasukkan ke dalam tempat sampel dan diinjeksikan menuju aliran eluen yang bertekanan. Eluen baru kemudian dipompa melalui injektor tempat sampel membawa sampel menuju kolom. Selanjutnya detektor membaca perubahan konsentrasi yang berubah sejalan dengan sinyal tegangan. Perubahan tegangan dengan waktu akan melalui rekorder melalui kabel sinyal dan tercetak pada kertas yang disebut sebagai kromatogram.

2.7.3 LC-MS / *Liquid Chromatography – Mass Spectroscopy*

LC merupakan teknik yang sering digunakan karena sensitivitasnya, kemudahannya, kemampuan untuk memisahkan spesi yang tidak menguap atau yang tidak tahan suhu. Kombinasi antara LC dan MS menghasilkan suatu hasil analisis berupa berat molekul. Pemilihan jenis LC yang benar juga menjadi suatu pertimbangan dalam analisa, karena terdapat beberapa jenis LC yang dapat dilihat pada Gambar 2.14.



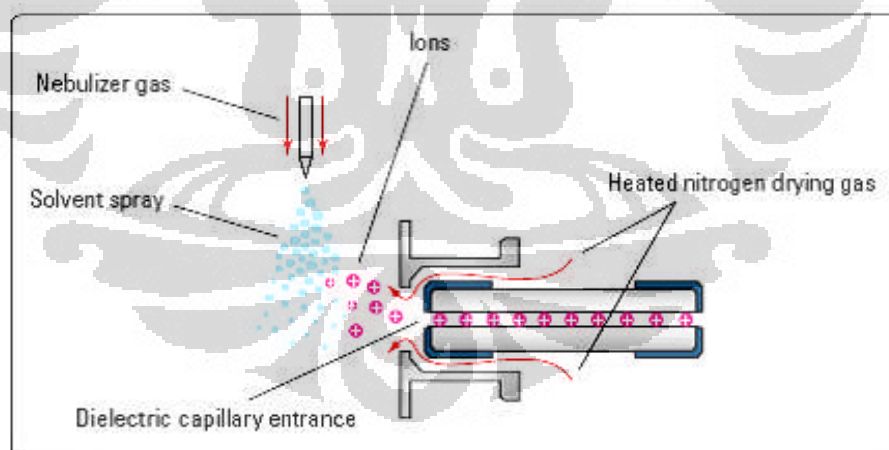
Gambar 2.14 Jenis Metode LC

(Sumber : Skoog *et al*, 2007)

Dari gambar tersebut, dapat diketahui bahwa jenis LC yang sesuai adalah dengan menggunakan LC dengan *reverse phase* karena fraksi *annonaceous acetogenin* larut dalam metanol dengan berat molekul di bawah 1000.

Penggunaan LC-MS sendiri telah digunakan oleh para peneliti untuk mengisolasi dan mendeteksi adanya *annonaceous acetogenin* sejak tahun 1997 yang telah dapat mendeteksi lebih dari 40 jenis *annonaceous acetogenin* dari ekstrak *Rollinia mucosa*. Kehadiran dari senyawa aktif dapat terdeteksi dengan menggunakan *electrospray ionization* atau ESI dan dengan ion positif (Zhe-Ming Gu *et al*, 1997).

Electrospray ionization diperkenalkan pertama kali pada tahun 1984 dan menjadi teknik yang sesuai untuk menganalisa biomolekul, seperti polipeptida, protein, dan lainnya. ESI terjadi pada tekanan dan suhu atmosfer, dimana larutan sampel dipompa menuju jarum kapiler dengan laju beberapa mikroliter per menit, sehingga dihasilkan semprotan melewati kapiler dimana penguapan eluen dan penempelan muatan molekul terjadi. ESI dapat langsung digunakan setelah HPLC sehingga ESI menjadi sesuai untuk digunakan untuk analisis.

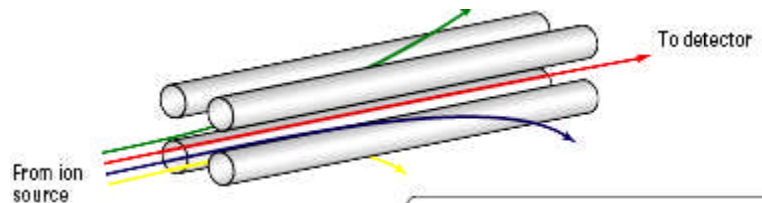


Gambar 2.15 Sumber Ion *Electrospray*

(Sumber : *Agilent Technologies*, 2001)

Setelah diionisasi, maka menganalisa massa molekul dapat dilakukan dengan menggunakan *quadrupole* dengan empat batang paralel pada sebuah segi empat. Ion yang akan dianalisa diarahkan menuju pusat segi empat dan tegangan

diberikan pada batang untuk menghasilkan medan elektromagnetik yang menentukan perbandingan ion yang dapat melewati filter pada waktu yang diberikan.



Gambar 2.16 *Quadrupole mass analyzer*

(Sumber : *Agilent Technologies*, 2001)

2.7.4 *Brine Shrimp Lethality Test (BST)*

BST merupakan tes *lethality* (mematikan) secara *in vivo* terhadap *brine shrimp* atau udang air laut (*Artemia salina*). Tes ini mulai dilakukan sejak tahun 1956 dan terus berkembang untuk menjadi metode analisa aktivitas pada lingkungan dan khususnya pada senyawa bioaktif dari tanaman. Pada tahun 1982, tes ini sudah digunakan untuk hasil isolasi dari agen antitumor aktif secara *in vivo* dan pestisida karena udang *Artemia* ini terbukti memiliki korelasi positif dengan daya sitotoksik senyawa antikanker dengan tingkat kepercayaan sebesar 95% (McLaughlin *et al*, 1998).

Uji aktivitas dengan BST ini tergolong dalam uji toksisitas akut dimana hewan dibiarkan dalam suatu konsentrasi tertentu selama 24 jam dan kemudian dihitung berapa kematian pada kondisi akhirnya. Setiap pengujian diberikan ragi dalam jumlah kecil yang bertujuan sebagai sumber makanan bagi larva udang *Artemia*. Uji ini seringkali ini dilakukan pada ekstrak tanaman. Hasil dari uji BST ini adalah berupa angka konsentrasi larutan dimana organisme mati sebanyak 50% atau disingkat dengan LC_{50} .

Uji BST ini memiliki keuntungan dibandingkan uji antitumor secara *in vivo* dan *in vitro* karena lebih cepat, yaitu selama 24 jam, lebih murah, sederhana karena tidak diperlukan teknis aseptis, dan semua peneliti dapat melakukan uji ini

di masing-masing laboratorium. Udang *Artemia salina* juga dapat hidup dalam air laut dengan salinitas tinggi. Selain itu, penggunaan udang *Artemia* sebagai bahan uji sitotoksik tidak dilarang oleh badan hukum.

Cara melakukan BST adalah dengan menetasakan telur udang *Artemia* yang berupa kista dalam air laut, kemudian memasukkan sejumlah udang air laut ke dalam larutan hasil ekstraksi tanaman ke dalam labu percobaan yang konsentrasinya divariasikan dengan 1, 10, dan 1000 ppm. Selanjutnya adalah menghitung jumlah udang yang masih hidup ataupun sudah mati dalam 24 jam. Semakin banyak udang yang mati dalam ekstrak tersebut maka semakin kuat sifat bioaktivitas dari ekstrak (Hayden, 2003).

Parameter sitotoksitas dari uji BST ini adalah apabila hasil ekstrak memiliki nilai LC_{50} lebih kecil dari 1000 ppm, maka ekstrak dikatakan aktif sebagai antikanker (Mayer dan Ferrigni, 1982). Ditemukan hubungan antara nilai LC_{50} dan ED_{50} memiliki korelasi, dimana nilai ED_{50} adalah sepersepuluh dari nilai LC_{50} . Lebih dari 300 jenis antitumor dan produk alami diisolasi dengan menggunakan bantuan metode BST. Semakin rendah nilai LC_{50} maka senyawa aktif dikatakan semakin bersifat sitotoksik.

Perhitungan nilai LC_{50} dapat dilakukan dengan 3 metode, yaitu:

➤ Analisa data

Analisa dilakukan dengan membuat grafik log konsentrasi terhadap persen kematian atau mortalitas, kemudian menarik garis 50% hingga memotong sumbu grafik dan menarik turun pada sumbu log konsentrasi, sehingga didapatkan nilai konsentrasi LC_{50}

➤ Analisa probit

Analisa probit dilakukan dengan menjumlahkan kematian, kemudian menghitung persen kematian setiap konsentrasi. Setelah didapatkan persen kematian, maka persen kematian dikonversi dengan nilai probit pada lampiran 3. Apabila nilainya sedikit berbeda, maka dilakukan interpolasi antar dua nilai yang berdekatan. Setelah itu, dibuat grafik yang dilinearisasi antara log konsentrasi sebagai sumbu x dan nilai

probit sebagai sumbu y. Nilai LC_{50} didapatkan dengan memasukkan nilai probit sebesar 5,000 atau merupakan nilai probit untuk persen kematian sebesar 50%.

- Analisa dengan bantuan *software*
Software yang dapat digunakan untuk menganalisa BST adalah program SPSS untuk sistem operasi *windows*.

Pada penelitian ini, nilai LC_{50} akan dihitung dengan menggunakan analisa probit, dikarenakan perhitungan dengan menggunakan analisa probit memberikan hasil yang lebih akurat dibandingkan dengan menggunakan nilai-nilai dari data, dan analisa probit memiliki nilai yang tidak jauh berbeda dengan menggunakan *software*.

Perhitungan LC_{50} dapat dikoreksi dengan menggunakan rumus *Abbot* yang mengoreksi persen kematian apabila ada binatang yang mati pada kontrol (Finney, 1947). Rumusannya adalah :

$$\text{Mortalitas/Kematian Terkoreksi (\%)} = \frac{\text{M}_{\text{obs}} - \text{M}_{\text{control}}}{1 - \text{M}_{\text{control}}} \times 100$$

Dimana :

M_{obs} = persen kematian pada sampel

M_{control} = persen kematian pada kontrol

BAB 3

METODOLOGI PENELITIAN

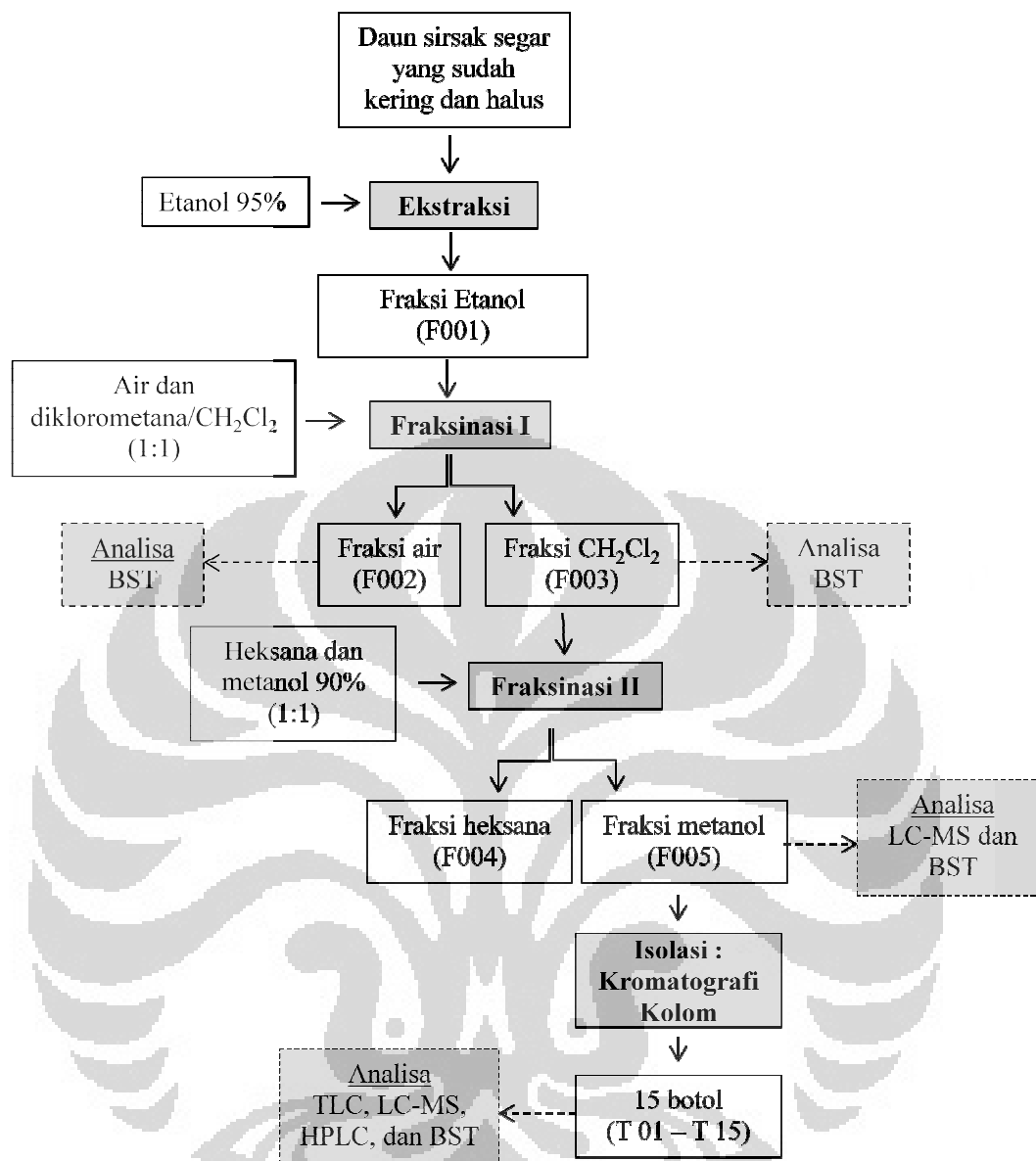
Untuk mendapatkan *annonaceous acetogenin* dari daun sirsak, maka daun sirsak harus diekstraksi, difraksinasi dan diisolasi dengan prosedur metodologi penelitian tertentu untuk mendapatkan hasil yang diinginkan. Berikut ini adalah penjelasan lengkap dari bagian-bagian tersebut.

3.1 Rancangan Penelitian

Penelitian dilakukan di Laboratorium Dasar Proses Kimia Departemen Teknik Kimia Universitas Indonesia, Depok. Prosedur penelitian ini mengacu pada penelitian yang dilakukan oleh Profesor Soelaksono Sastrodihadjo yang diadaptasi dari peneliti Jerry McLaughlin dari jurnal produk alami. Perbedaan pada metode ekstraksi paling awal yang menggunakan perkolasi (Zeng *et al*, 1996), sedangkan penelitian ini menggunakan maserasi dan maserasi dengan bantuan *ultrasonic bath* (Souza *et al*, 2009) sebagai metode ekstraksi.

Penelitian yang dilakukan dimulai dari mengekstraksi daun sirsak yang telah kering dan diblender dengan etanol 95% yang menghasilkan fraksi etanol (F001), selanjutnya difraksinasi menggunakan pelarut air dan diklorometana dengan perbandingan volume sebesar 1:1 menghasilkan fraksi air (F002) dan fraksi diklorometana (F003). Fraksinasi kedua menggunakan pelarut heksana dan metanol 90% dengan perbandingan volume sebesar 1:1 menghasilkan fraksi heksana (F004) dan fraksi metanol (F005). Fraksi ini semuanya dikonsentrasikan dengan menguapkan pelarutnya dengan menggunakan *rotary evaporator*, kecuali fraksi air (Zeng *et al*, 1996). Semua percobaan dilakukan pada suhu ruang karena *annonaceous acetogenin* dapat rusak pada suhu di atas 60⁰C (Haijun Yang *et al*, 2010).

Diagram alir penelitian ekstraksi daun sirsak sebagai bahan bioaktif antikanker dapat dilihat pada Gambar 3.1 berikut. Untuk langkah-langkah pelaksanaan penelitian lebih lengkapnya dapat dibaca pada sub-bab 3.3 mengenai prosedur penelitian di bawah.



Gambar 3.1 Diagram Alir Penelitian Ekstraksi *Annonaceous Acetogenin* dari Daun Sirsak atau *Annona muricata* sebagai Bahan Bioaktif Antikanker

(Sumber : Zeng *et al*, 1996; Souza *et al*, 2009; Haijun Yang *et al*, 2010)

3.2 Alat dan Bahan Penelitian

Penelitian ini menggunakan alat dan bahan sebagai fasilitas ekstraksi daun sirsak untuk mendapatkan senyawa *annonaceous acetogenin*.

3.2.1 Alat

Alat yang digunakan dalam penelitian ekstraksi *annonaceous acetogenin* dari daun sirsak dapat dilihat pada Tabel 3 berikut ini.

Tabel 3. Alat yang Digunakan dalam Penelitian

No.	Alat	Fungsi
1.	Gelas kimia	Sebagai wadah untuk ekstraksi, hasil ekstraksi, dan analisis
2.	Kaca arloji	Wadah untuk menimbang
3.	Timbangan digital	Untuk menimbang bahan
4.	<i>Beaker glass</i>	Untuk tempat pelarut dan hasil fraksi
5.	Spatula kaca	Alat untuk mengaduk
6.	Spatula <i>stainless steel</i>	Untuk membantu memindahkan bahan
7.	Pipet tetes	Untuk meneteskan/memindahkan larutan
8	Tabung plastik	Untuk tempat melakukan uji BST
9.	Kertas saring	Untuk memisahkan daun sirsak dari pelarut
10.	Botol kaca kecil	Untuk menampung hasil kromatografi kolom
11.	Botol kaca besar	Untuk tempat melakukan maserasi dan menetasakan telur udang <i>Artemia salina</i>
12.	Corong	Alat untuk membantu menuangkan larutan agar tidak tumpah serta untuk membantu proses penyaringan.
13.	Kolom kromatografi	Alat untuk melakukan kromatografi kolom
14.	Pipa kapiler	Untuk meneteskan sampel ke kertas TLC
15.	Labu Kocok	Alat untuk melakukan fraksinasi
16.	Aerator	Alat untuk mengaerasi saat penetasan telur udang <i>Artemia salina</i>
17	LC-MS	Alat untuk menganalisa hasil fraksinasi dan isolasi
18	HPLC	Alat untuk menganalisa hasil isolasi

3.2.2 Bahan

1. Daun sirsak
2. Etanol 95%
3. Diklorometana (CH_2Cl_2)
4. Air aquades (H_2O)
5. Metanol 90%
6. Heksana (C_6H_{14})
7. Aseton
8. Larva udang *Artemia salina*
9. Garam laut
10. Kertas saring
11. Kertas TLC
12. *Silica gel*
13. Kapas
14. P-Anisaldehyd
15. Asam Sulfat pekat
16. Asetonitril

3.3 Prosedur Penelitian

Prosedur penelitian ini dilakukan dengan terlebih dahulu melakukan studi literatur untuk menetapkan prosedur ekstraksi, isolasi, dan analisis kimia dan biologi dari penelitian *annonaceous acetogenin*. Selanjutnya akan lebih dijelaskan sebagai berikut ini.

3.3.1 Ekstraksi

Pada tahap ini, terdapat lima tahapan percobaan, yaitu:

➤ Pencucian dan pengeringan

Daun sirsak yang telah dipetik, dicuci terlebih dahulu dengan bilasan air dan dikeringkan selama 10 hari pada suhu ruangan namun tidak terkena cahaya matahari langsung hingga daun mengering.

➤ Pengecilan ukuran

Daun sirsak yang sudah kering diblender halus.

➤ Ekstraksi/Maserasi

Ekstraksi/Maserasi dilakukan dengan 3 varian yang divariasikan metode dan waktu yang akan dijelaskan lebih lanjut di bawah. Tiga variasi dari ekstraksi ini adalah:

- 1) Cara A : Daun sirsak sebanyak 20 gram dimaserasi atau direndam dalam larutan etanol 95% sebanyak 450 mL dan dibiarkan selama 24 jam.
- 2) Cara B : Daun sirsak sebanyak 20 gram dilarutkan dalam etanol 95% sebanyak 450 mL kemudian dibiarkan selama 1,5 jam pada *ultrasonic bath*.
- 3) Cara C : Daun sirsak sebanyak 20 gram dilarutkan dalam etanol 95% sebanyak 150 mL kemudian dibiarkan selama 30 menit pada *ultrasonic bath*. Penggantian pelarut dan *ultrasonic bath* dilakukan sebanyak tiga kali kemudian dikumpulkan hasilnya.

➤ Filtrasi

Hasil ekstraksi/maserasi disaring menggunakan kertas saring Whattman hingga tidak tersisa residu atau padatan.

➤ Konsentrasi

Pengonsentrasian dilakukan dengan menguapkan pelarut hingga didapatkan fraksi yang kental (**F001**) dengan menggunakan *rotary evaporator*.

Variabel bebas dari penelitian ini adalah lama waktu ekstraksi dan metode ekstraksi sedangkan variabel terikatnya adalah banyaknya ekstrak *annonaceous acetogenin* yang didapatkan dari sampel hasil ekstraksi daun sirsak. Selanjutnya, ketiga hasil ekstraksi ini digabung menjadi satu untuk selanjutnya difraksinasi.

3.3.2 Fraksinasi

Fraksinasi dilakukan sebanyak dua kali dengan campuran pelarut yang berbeda, yaitu sebagai berikut ini (Zeng *et al*, 1996) :

- 1) Pelarut I : Pelarut air (H_2O) dan diklorometana (CH_2Cl_2) dengan perbandingan volume 1:1. Volume pelarut yang digunakan masing-masing 100 mL sehingga totalnya adalah 200 mL.
- 2) Pelarut II : Pelarut heksana (C_6H_{14}) dan metanol 90% (CH_3OH) dengan perbandingan volume 1:1. Volume pelarut yang digunakan masing-masing 100 mL sehingga totalnya adalah 200 mL.

Tahapan fraksinasi adalah :

- Memasukkan pelarut I ke dalam labu kocok hingga terlihat terpisah, kemudian masukkan fraksi **F001**
- Mengaduk labu kocok hingga pelarut I terpisah menjadi dua fasa
- Mengeluarkan fraksi yang larut dalam H_2O atau **F002** dan fraksi yang larut dalam CH_2Cl_2 atau **F003**
- Mengonsentrasikan fraksi **F003** dengan jalan diuapkan dengan *rotary evaporator*
- Memasukkan pelarut II ke dalam labu kocok hingga terlihat terpisah, kemudian masukkan fraksi **F003**
- Mengaduk labu kocok hingga pelarut II terpisah menjadi dua fasa
- Mengeluarkan fraksi yang larut dalam heksana (C_6H_{14}) atau **F004** dan fraksi yang larut dalam metanol 90% (CH_3OH) atau **F005**
- Mengonsentrasikan fraksi **F004** dan **F005** dengan jalan diuapkan dengan *rotary evaporator*

3.3.3 Isolasi

Isolasi sebanyak-banyaknya senyawa aktif dilakukan dengan melakukan kolom kromatografi terbuka dengan menggunakan fase diam berupa *silica gel* dan pelarut heksana sebanyak 50 mL, heksana dan aseton dengan perbandingan volume 1:1 sebanyak 50 mL, dan aseton sebanyak 50 mL sebagai fasa bergerak (Zeng *et al*, 1996).

Tahapan isolasi adalah :

- Memasukkan sedikit kapas ke dalam kolom kromatografi

- Memasukkan *silica gel* secukupnya yang telah dibasahi oleh heksana ke dalam kolom dengan bantuan corong hingga lebih dari setengah kolom kromatografi
- Memastikan tidak ada udara di dalam kolom dengan mengaduk *silica gel* dan heksana dengan kuat
- Memasukkan fraksi **F005** yang telah dilarutkan dengan campuran heksana : aseton (1:1) ke dalam kolom kromatografi
- Memasukkan pelarut heksana : aseton (1:1) sebagai eluen sebanyak 50 mL ke dalam kolom
- Memasukkan eluen aseton sebanyak 50 mL ke dalam kolom
- Memasukkan eluen heksana : aseton (1:1) sebanyak 30 mL ke dalam kolom
- Menampung hasil kromatografi kolom ke dalam 15 botol kaca dengan volume sekitar 9 mL (T-1 sampai T-15)
- Menguapkan eluen pada botol T-1 sampai T-15 pada suhu ruang

3.3.4 Metode Analisa

Analisa dilakukan terhadap hasil ekstraksi meliputi TLC, LC-MS, dan HPLC. Analisa aktivitas antitumor dilakukan dengan uji BST.

1. Uji TLC (*Thin Layer Chromatography*)

Hasil isolasi dari kromatografi kolom menghasilkan 15 botol dan dideteksi pemisahannya dengan menggunakan TLC. Tahapan melakukan pendeteksian dengan TLC adalah :

- Mempersiapkan *beaker glass* besar berisi campuran heksana : aseton (1:1) sebanyak 50 mL
- Mempersiapkan larutan pemberi warna (1% p-anisaldehyd dalam asam sulfat pekat dan metanol) dengan cara memasukkan 0,05 mL p-anisaldehyd, 4,95 mL asam sulfat, kemudian menuangkan metanol sebanyak 95 mL kemudian diaduk di dalam *beaker glass* berisi air untuk mendinginkan larutan.

- Menutup *beaker glass* tersebut dengan kertas aluminium dan membiarkannya hingga jenuh selama 30 menit atau lebih
 - Mempersiapkan kertas TLC sebesar 6 x 13,5 cm sebanyak 3 lembar dan menomori dengan pensil dengan jarak 1 cm setiap sampel
 - Meneteskan sampel T-1 sampai T-15 dengan menggunakan pipa kapiler ke atas kertas TLC
- Memasukkan kertas TLC ke dalam *beaker glass* namun eluen tidak sampai mengenai batas bawah tempat meneteskan sampel
- Membiarkan sampel terbawa oleh eluen hingga batas yang ditetapkan di dalam *beaker glass* selama lebih kurang 3 jam
 - Mengangkat kertas TLC dan dibiarkan hingga kering
 - Mencelupkan kertas TLC ke dalam larutan pemberi warna
 - Memanaskan kertas TLC yang telah dicelupkan di dalam oven bersuhu 105°C selama 5 menit
 - Mengamati perubahan warna yang ditimbulkan

2. LC-MS (*Liquid Chromatography-Mass Spectroscopy*)

Analisa LC-MS dilakukan oleh analis di LIPI Serpong pada bulan Desember 2011 dan Januari 2012. Analisa LC-MS dilakukan terhadap sampel F005, T-05, dan T-08. Metode LC-MS adalah:

- Menyiapkan larutan fasa bergerak dengan mengatur fasa gerak asetonitril dan air dengan perbandingan 9:1 sebanyak 100 mL
- Mempersiapkan kolom dengan menuangkan larutan *buffer* ke dalam kolom hingga tercapai kesetimbangan
- Mengatur laju alir fasa bergerak sebesar 1 mL/menit
- Mengalirkan larutan fasa bergerak sebagai eluen ke dalam kolom LC-MS
- Menyuntikkan sampel ekstrak ke dalam kolom LC-MS
- Mengalirkan fasa bergerak hingga tidak ada lagi sampel yang tersisa atau terikat di dalam kolom
- Mendapatkan hasil berupa grafik kromatogram dari LC dan grafik berat molekul dari MS

3.HPLC (*High Performance Liquid Chromatography*)

Analisa dengan HPLC dilakukan sendiri menggunakan HPLC di SMAK Kimia Analisis di Bogor. Analisa HPLC dilakukan terhadap sampel T-03 hingga T-13. Metode untuk melakukan HPLC sama dengan LC-MS, hasil yang didapatkan berupa kromatogram.

4. Uji BST (*Brine Shrimp lethality Test*)

Uji BST dilakukan terhadap **F002, F003, F005**, dan T-3 hingga T-13. Tahapan melakukan BST adalah menetasakan telur *Artemia salina* hingga berumur 48 jam kemudian memasukkan masing-masing 10 larva udang ke dalam sampel yang telah diencerkan hingga didapatkan konsentrasi sebesar masing-masing 1000 ppm, 100 ppm, 10 ppm, dan 1 ppm. Tahapan dalam melakukan uji BST adalah (McLaughlin *et al*, 1998) :

A. Menetasakan telur udang *Artemia salina*

- Memasukkan 38 gram garam laut ke dalam 1 liter air aquades kemudian mengaduk hingga larut sempurna di botol kaca
- Memasukkan 1 sendok teh telur udang *Artemia salina* ke dalam air laut yang telah dibuat
- Mengaerasi air laut dengan aerator
- Setelah 24 jam diaerasi, maka telur akan menetas
- Membiarkan telur yang sudah menetas selama 2 hari dengan kondisi air laut terus diaerasi

B. Mempersiapkan larutan sampel dan ragi

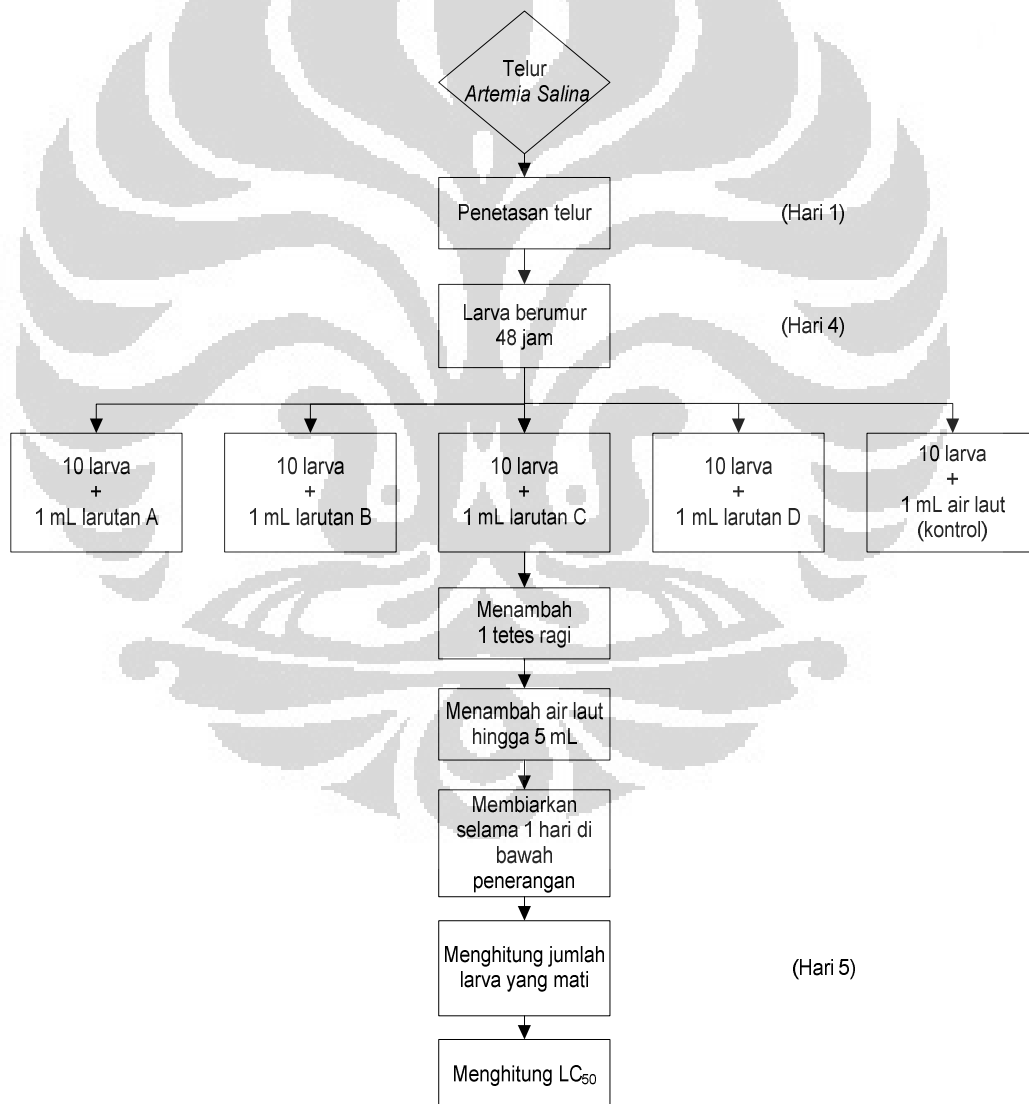
Larutan sampel dibuat dengan cara :

- Larutan A (5000 ppm) : 500 mg ekstrak ditambah 10 mL air laut
- Larutan B (500 ppm) : 1 mL larutan A ditambah 9 mL air laut
- Larutan C (50 ppm) : 1 mL larutan B ditambah 9 mL air laut
- Larutan D (5 ppm) : 1 mL larutan C ditambah 9 mL air laut
- Larutan ragi : 3 mg ragi di dalam 5 mL air laut

C. Memasukkan larva ke dalam sampel

- Memasukkan 10 larva ke dalam setiap botol yang berisi 1 mL larutan A, B, C, D, dan kontrol untuk setiap sampel
- Meneteskan 1 tetes ragi ke dalam setiap botol
- Menambahkan air laut hingga 5 mL
- Membiarkan sampel di bawah penerangan selama 1 hari
- Menghitung jumlah larva yang mati atau larva yang tidak bergerak
- Menghitung nilai LC_{50}

Diagram alir untuk melakukan uji BST dapat dilihat di bawah ini :



Gambar 3.2 Diagram alir uji BST

BAB 4

HASIL DAN PEMBAHASAN

Pada bab ini akan dibahas mengenai hasil yang didapatkan dari metodologi penelitian ekstraksi *annonaceous acetogenin* dari daun sirsak mulai dari ekstraksi, fraksinasi, isolasi dan hasil dari analisis yang dilakukan terhadap hasil ekstraksi.

4.1 Ekstraksi

Tahapan ekstraksi meliputi beberapa tahap, mulai dari pencucian dan pengeringan, pengecilan ukuran, ekstraksi, filtrasi dan konsentrasi. Untuk melihat hasil tiap tahapan, maka dapat dilihat dari gambar berikut ini.

➤ Pencucian dan pengeringan

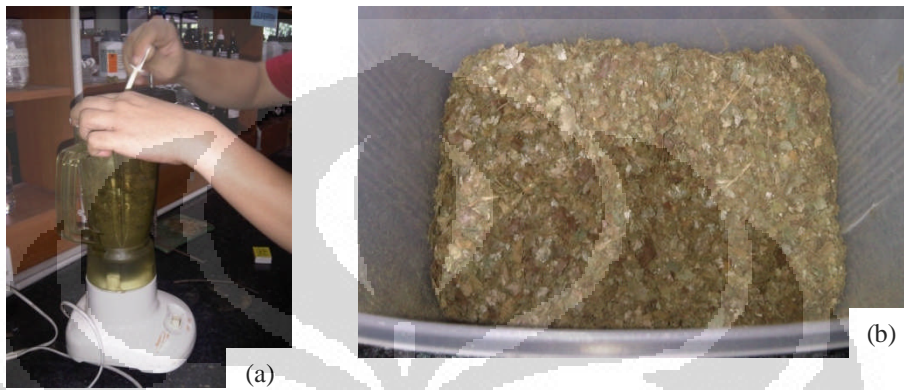
Setelah dicuci dengan bersih, maka daun dikeringkan hingga hasilnya adalah daun yang berwarna sedikit kecokelatan seperti pada Gambar 4.1.



Gambar 4.1 Pengeringan Daun Sirsak

➤ Pengecilan ukuran

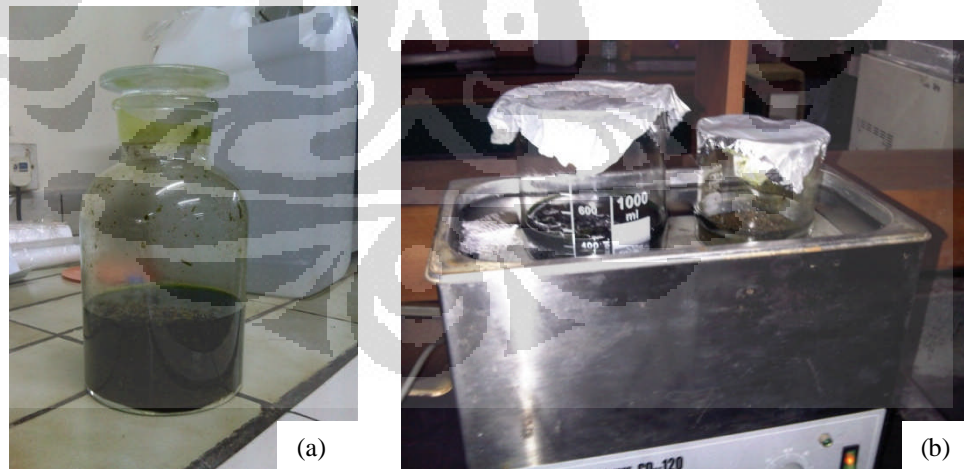
Pengecilan ukuran dilakukan dengan memblender daun sirsak yang sudah kering. Karena daun sirsak sudah kering, maka dapat dengan mudah diblender dihasilkan padatan dan serbuk daun sirsak yang lebih halus seperti pada Gambar 4.2 di bawah.



Gambar 4.2 Pengecilan Ukuran (a) Blender (b) Daun Sirsak yang Sudah Halus

➤ Ekstraksi

Ekstraksi dilakukan dengan 3 cara, maka proses dan hasil yang didapatkan dapat dilihat dari Gambar 4.3.



Gambar 4.3 Ekstraksi (a) Maserasi atau Cara A (b) Ultrasonic Bath atau Cara B dan C

Setelah dilakukan maserasi, ekstraksi dengan bantuan *ultrasonic bath* baik yang pelarutnya diganti maupun yang tidak diganti, maka hasilnya adalah perubahan warna menjadi berwarna hijau pada pelarutnya. Ini menandakan keberhasilan zat yang terekstraksi oleh etanol 95% seperti yang terlihat pada Gambar 4.3 di atas.

Selama proses ekstraksi dengan menggunakan *ultrasonic bath*, air harus diganti setiap 30 menit karena airnya akan menjadi panas. Hal ini dilakukan untuk menghindari pemanasan terhadap hasil ekstraksi karena *annonaceous acetogenin* akan berubah strukturnya apabila suhunya melebihi 60°C (Haijun Yang *et al*, 2010).

➤ Filtrasi

Filtrasi dilakukan dengan menggunakan kertas saring dan didapatkan pelarut yang bebas padatan. Pelarut harus dipastikan bebas dari padatan untuk memastikan tidak adanya zat yang tersumbat di labu kocok saat fraksinasi ataupun tersumbat di kolom saat isolasi. Gambar filtrasi dapat dilihat pada Gambar 4.4 di bawah ini.



Gambar 4.4 Filtrasi

Filtrasi dilakukan sebanyak dua hingga tiga kali untuk memastikan pelarut bebas padatan. Hal ini dikarenakan ukuran daun sirsak yang sangat halus menyebabkan lolosnya serbuk daun ke dalam filtrat sehingga filtrasi satu kali tidak cukup untuk mendapatkan pelarut yang bebas padatan.. Setelah itu, didapatkan hasil filtrasi seperti pada Gambar 4.5 berikut ini.



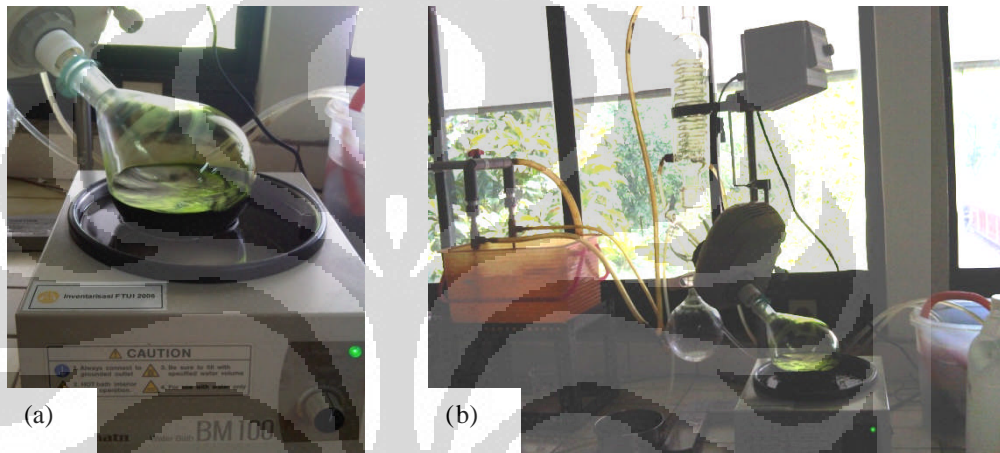
Gambar 4.5 Hasil Filtrasi

Setelah difiltrasi, maka dapat terlihat hasil dari ketiga jenis cara untuk ekstraksi. Secara kualitatif, atau melalui warnanya lebih tua, maka terlihat bahwa ekstraksi dengan cara maserasi selama 24 jam lebih baik hasilnya, kemudian ekstraksi dengan mengganti pelarut baru saat *ultrasonic bath* setiap 30 menit lebih baik dibandingkan dengan ekstraksi yang dilakukan dengan *ultrasonic bath* selama 1,5 jam tanpa penggantian pelarut. Jadi, dengan kata lain maka urutan hasil ekstraksi yang paling baik adalah Cara A >> Cara C >> Cara B. Selanjutnya, ketiga hasil ekstraksi digabung untuk memperkaya senyawa *annonaceous acetogenin* hasil ekstraksi untuk selanjutnya dikonsentrasikan sehingga dapat dianalisis. Selain itu, alasan pemilihan maserasi adalah metodenya yang sederhana dan tidak memerlukan tambahan energi dan suhunya juga stabil tidak seperti *ultrasonic bath* yang suhu airnya

akan naik sehingga menyebabkan tingginya kemungkinan rusaknya senyawa aktif karena pemanasan.

➤ Konsentrasi

Pengonsentrasian dilakukan dengan menggunakan *rotary evaporator*. Suhu air pemanas diatur pada suhu sekitar 40-45°C untuk mempercepat laju penguapan pelarut etanol 95%. Pengonsentrasian dilakukan selama 3 sampai 4 jam hingga didapatkan hasil ekstraksi yang lebih kental.



Gambar 4.6 *Rotary evaporator* (a) labu (b) alat secara keseluruhan

4.2 Fraksinasi

Fraksinasi selanjutnya dilakukan untuk lebih mendapatkan *annonaceous acetogenin* yang diinginkan dengan menggunakan labu kocok seperti pada Gambar 4.7 di bawah. Fraksinasi dilakukan dengan cara yang sama, hanya pelarut yang berbeda. Selanjutnya setelah itu, setiap fraksi diuapkan untuk mendapatkan fraksi yang lebih murni, kecuali F002. Fraksi yang didapatkan dari fraksinasi ini ada 4 fraksi, yaitu :

- Fraksi F002 atau fraksi yang larut dalam air
- Fraksi F003 atau fraksi yang larut dalam CH_2Cl_2
- Fraksi F004 atau fraksi yang larut dalam heksana
- Fraksi F005 atau fraksi yang larut dalam metanol 90%



Gambar 4.7 Fraksinasi dengan labu kocok



(a)



(b)



(c)

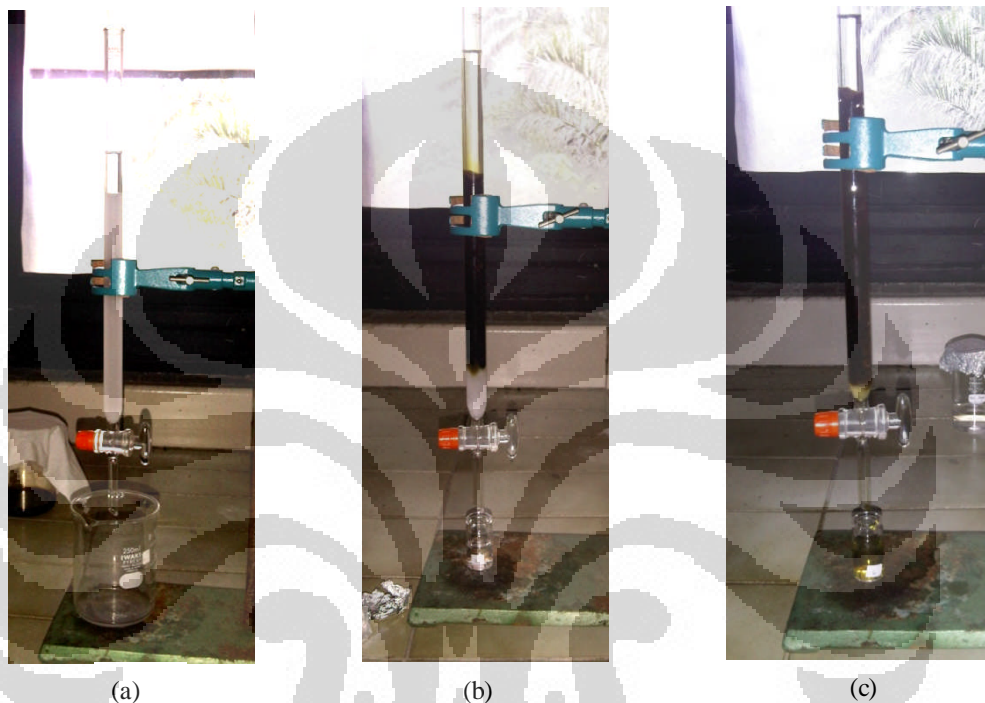


(d)

Gambar 4.8 Hasil Fraksinasi (a) F002 (b) F003 (c) F004 (d) F005

4.3 Isolasi

Isolasi dilakukan dengan jalan memasukkan kapas pada bagian bawah dan mengisi kolom dengan *silica gel* terlebih dahulu. Kolom yang digunakan berdiameter 1,5 cm dengan panjang kolom 30 cm.



Gambar 4.9 Kromatografi Kolom (a) sebelum dimasukkan sampel (b) setelah dimasukkan sampel (c) setelah sampel mulai turun

Pada kromatografi kolom, awalnya sampel dilarutkan terlebih dahulu dengan pelarut heksana : aseton, dikarenakan sifatnya yang sedikit polar, dan kemudian dimasukkan ke dalam kolom yang sudah terisi oleh *silica gel* yang sudah terbasahi oleh pelarut heksana. *Silica gel* dijaga tetap basah oleh pelarut, dan apabila pelarut sudah mau mendekati batas atas *silica gel* maka harus segera diisi dengan pelarut selanjutnya. Hal ini dilakukan untuk menghindari masuknya gelembung udara ke dalam *silica gel* yang akan mempengaruhi pemisahan menjadi kurang baik.

Sampel pada awalnya dimasukkan setelah silika gel yang terbasahi oleh pelarut heksana, kemudian sejalan dengan ditambahkan pelarut, maka sampel

berjalan ke bawah seperti pada Gambar 4.9 (b) namun masih belum keluar dari kolom. Gambar 4.9 (c) menunjukkan bahwa sampel sudah mulai turun.

Setelah dilakukan kromatografi kolom dengan menggunakan fasa bergerak eluen heksana, campuran heksana dan aseton (1:1), dan aseton, didapatkan 15 botol kaca dengan warna yang berbeda-beda. Hasil warna cairan yang ditampung botol dapat dilihat pada Gambar 4.10 di bawah ini.



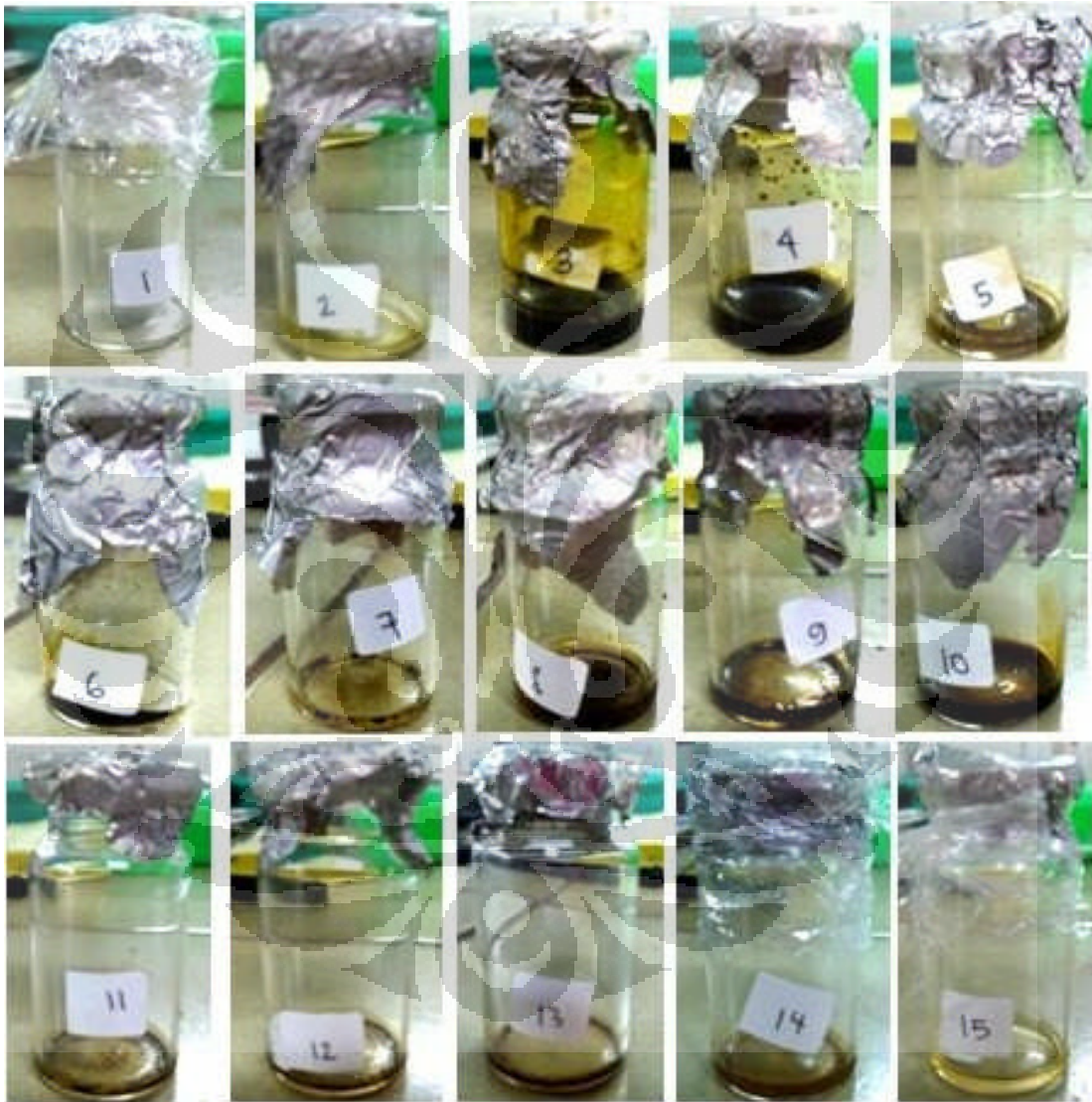
Gambar 4.10 Hasil T-01 sampai T-15

Dari gambar 4.10 di atas, maka dapat terlihat bahwa pada botol T-01 dan T-15 warnanya sangat terang, ini menunjukkan bahwa pada T-01 dan T-15 belum ada senyawa yang terelusi. Pada T-02, terlihat sedikit berwarna kehijauan menunjukkan sampel F005 sudah mulai turun. Pada T-03 dan T-04 didapatkan warna coklat yang sangat pekat, ini menunjukkan banyaknya fraksi F005 bersifat sedikit polar yang terbawa oleh eluen aseton:heksana (1:1) dan ini menunjukkan zat yang non polar yang terelusi. Pada T-05, T-06, dan T-07, senyawa yang terelusi warnanya yang hampir sama, yaitu kehijauan dengan perkiraan senyawa yang terelusi bersifat sedikit non polar dan sedikit polar sudah mulai ada. Pada T-08, T-09, T-10, T-11, T-12, T-13 dan T-14 terjadi gradasi warna berbeda dari sebelumnya, yaitu berwarna kecoklatan hingga coklat muda pada T-13. Ini menunjukkan bahwa pada T-08 dan T-09 yang berwarna paling gelap mengandung senyawa yang paling banyak dibandingkan dengan T-10 sampai T-14 yang lebih banyak eluennya.

Setelah itu, semua botol dengan sengaja diuapkan untuk mendapatkan hasil sampel yang lebih murni dari eluennya. Gambar 4.11 menunjukkan botol T-01 sampai T-15 yang telah diuapkan selama 3 hari pada suhu ruangan. Eluen heksana dan aseton merupakan eluen yang mudah menguap dengan *flash point* $-23,3^{\circ}\text{C}$ dan eluen aseton dengan *flash point* -17°C . Hal ini menyebabkan penguapan tidak perlu dilakukan dengan pemanasan melainkan hanya dibiarkan pada suhu ruang, sehingga hasil kolom juga tidak rusak akibat pemanasan.

Dari gambar 4.11 di bawah, dapat terlihat botol T-01 sampai T-15. Pada botol T-01 terlihat bahwa tidak ada sama sekali senyawa/fraksi yang terelusi ataupun yang tersisa, sehingga dapat disimpulkan bahwa pada botol T-01 belum ada fraksi F005 yang terelusi pada kolom. Pada botol T-02 terlihat hanya terdapat sedikit fraksi yang menempel pada dinding botol, dan jumlahnya sangat kecil, sehingga fraksi pada botol ini tidak dianalisis lebih lanjut dengan BST dan HPLC. Pada botol T-03 dan T-04, sangat banyak padatan dan warnanya coklat kehitaman, sehingga kedua botol ini akan dianalisis lebih lanjut. Pada botol T-05, T-06 dan T-07, jumlah padatan semakin menurun, namun tetap berwarna coklat tua. Pada botol T-08, jumlah padatan cukup

banyak dan dari sini dapat terlihat bahwa mulai dari botol T-08, terdapat pergantian senyawa yang terekstraksi karena eluennya berbeda. Mulai botol T-08 hingga botol T-13 diduga merupakan fraksi F005 yang terelusi oleh aseton, sedangkan botol T-14 dan T-15 merupakan fraksi F005 yang terelusi oleh heksana : aseton (1:1) dan terlihat sangat sedikit padatan yang tersisa pada kedua botol.



Gambar 4.11 Hasil penguapan pada T-01 sampai T-15

4.4 Metode Analisa

Metode analisa yang dilakukan adalah TLC, LC-MS, HPLC, dan uji aktivitas dengan uji BST.

4.4.1 TLC

Botol T-01 hingga T-15 diujikan dengan TLC untuk pemisahan dengan warna menjadi dasar untuk mendeteksi komponen-komponen yang terdapat di dalam setiap botol. Seperti pada sub-bab 2.7.1, warna yang ditunjukkan oleh larutan p-anisaldehyd adalah warna ungu dan warna kekuningan (Fontana *et al*, 1998) :

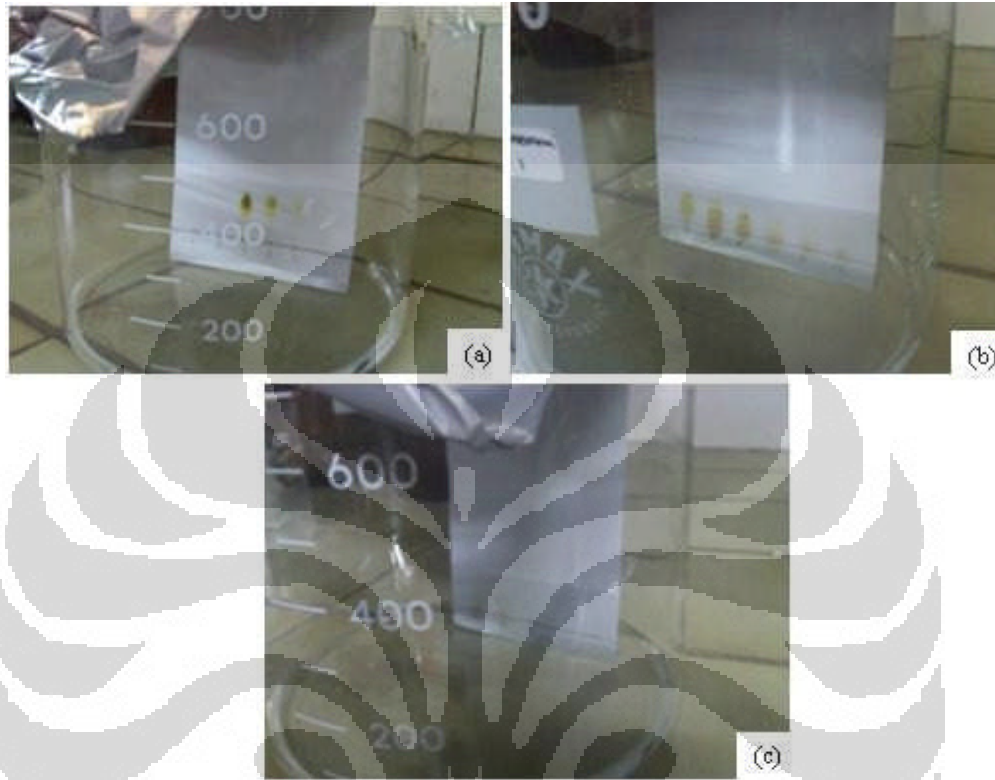
- Warna ungu menunjukkan kandungan *triacylglycerol* dan *phytosterol*
- Warna kuning hingga kuning kehijauan menunjukkan kandungan *annonaceous acetogenin*.

Phytosterol adalah senyawa mirip dengan kolesterol yang terdapat pada tanaman dan larut dalam alkohol, senyawa ini dapat menurunkan kolesterol pada manusia sejak tahun 1953 (Pollak, 1953). *Triacylglycerol* adalah minyak dari tanaman yang sifatnya tidak jenuh dan dapat larut dalam alkohol.

Oleh sebab itu, dari hasil TLC maka akan ditentukan botol mana yang memiliki kandungan *annonaceous acetogenin* dengan kemurnian paling baik karena terpisah dari *triacylglycerol* dan *phytosterol*. Proses TLC dilakukan 3 kali untuk mendapatkan hasil yang lebih akurat. Pada TLC percobaan pertama, sampel setelah hasil kolom langsung diteteskan ke TLC, sedangkan untuk TLC percobaan kedua dan ketiga, sampel yang dicobakan sudah diuapkan terlebih dahulu, sehingga terlihat perbedaan yang mencolok, dimana hasil pewarnaan setelah diuapkan lebih jelas dibandingkan sampel yang belum diuapkan eluennya.

Kondisi tempat berlangsungnya TLC harus dijenuhkan terlebih dahulu untuk mendapatkan hasil pemisahan yang lebih baik. Kondisi uap yang jenuh di dalam tabung akan membuat eluen heksana : aseton (1:1) dapat naik ke atas hingga batas yang telah ditetapkan. Apabila kondisi uapnya tidak jenuh, maka eluen tidak dapat

naik sampai ke atas dikarenakan eluennya menguap sebelum mengalir ke atas. Proses dan hasil TLC dapat dilihat pada Gambar 4.12 berikut ini.



Gambar 4.12 Proses TLC (a) T-01 sampai T-06 (b) T-07 sampai T-12 (c) T-13 sampai T-15

Selanjutnya, Gambar 4.13 akan menunjukkan gambar TLC percobaan 1, Gambar 4.14 untuk gambar TLC percobaan 2, dan gambar 4.15 untuk gambar TLC percobaan 3. Percobaan dilakukan sebanyak 3 kali untuk mendapatkan hasil yang lebih baik dan memberikan perbandingan yang baik karena hasil TLC ini akan menunjukkan ada tidaknya kandungan *annonaceous acetogenin* pada botol T-01 hingga T-15 berdasarkan warna yang dihasilkan dengan larutan p-anisaldehid kemudian dipanaskan selama 5 menit pada suhu 105°C untuk membiarkan reaksi dapat berlangsung dan memberikan warna pada kertas TLC. Setelah dipanaskan, warnanya terlihat dan difoto seperti pada Gambar 4.13 hingga Gambar 4.15.

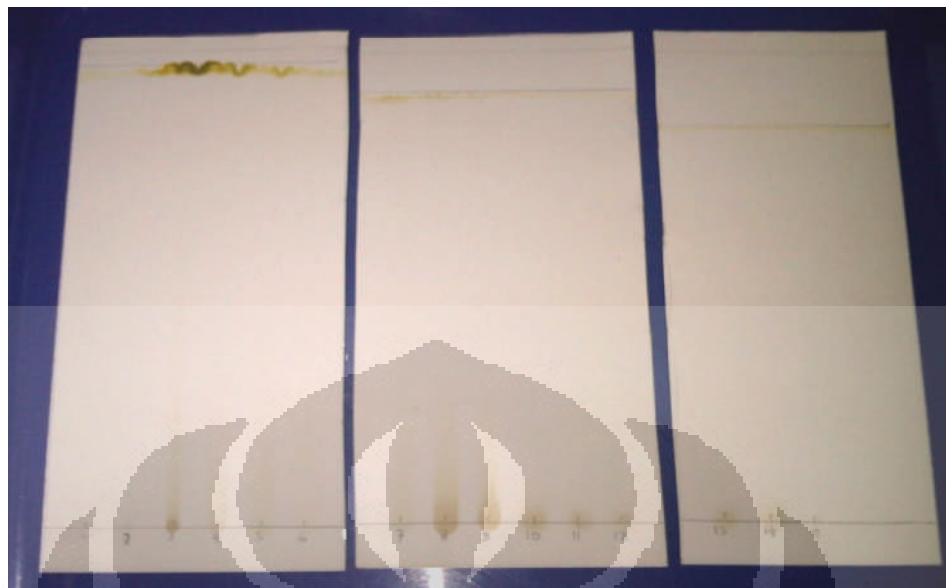


(a)



(b)

Gambar 4.13 TLC Percobaan 1 (a) sebelum (b) setelah diberi larutan p-anisaldehyd

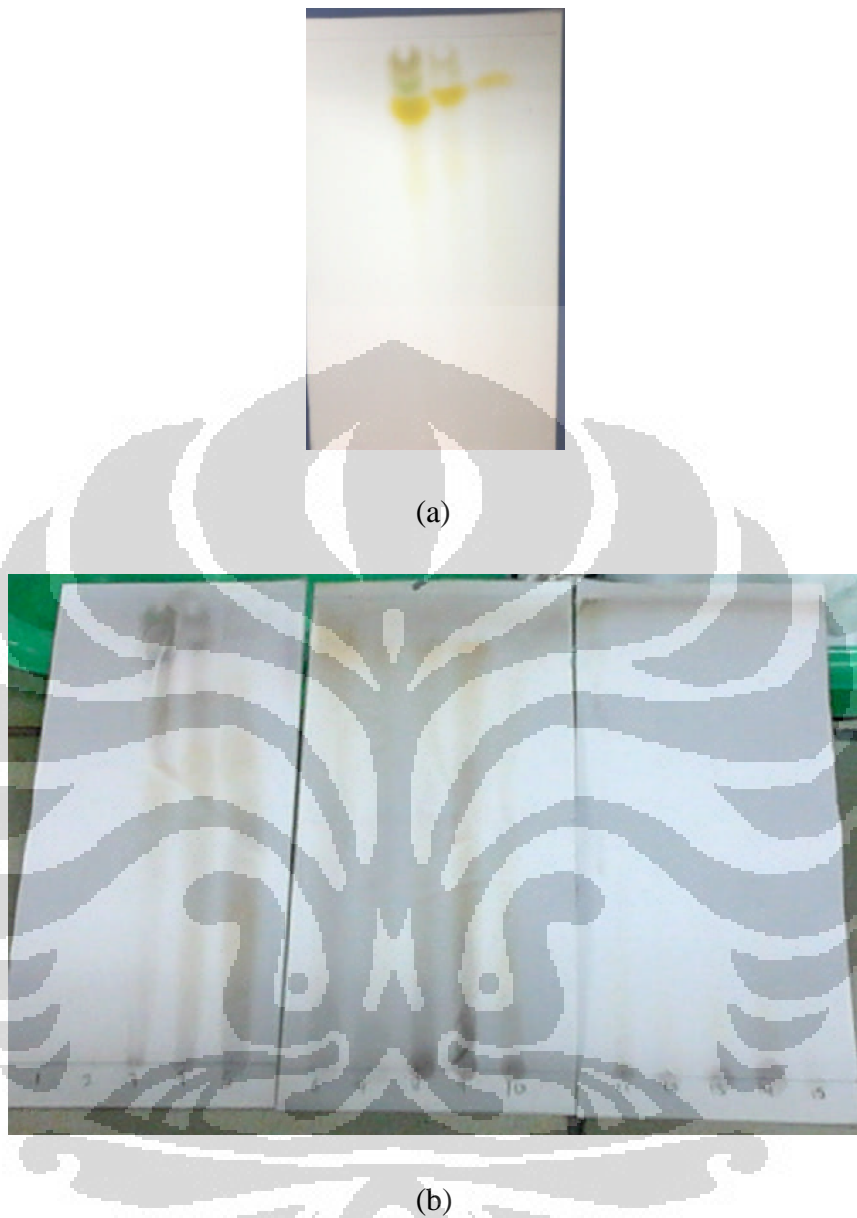


(a)



(b)

Gambar 4.14 TLC Percobaan 2 (a) sebelum (b) setelah diberi larutan p-anisaldehyd



Gambar 4.15 TLC Percobaan 3 (a) sebelum (b) setelah diberi larutan p -anisaldehid

Dari Gambar 4.13 sampai Gambar 4.15 maka dapat terlihat gambar hasil TLC pada botol T-01 hingga T-15. Sebelum diberi larutan p-anisaldehyd, hanya terlihat warna kuning dan kehijauan pada bagian bawah sampel dan paling atas, namun setelah diberi larutan p-anisaldehyd, maka terlihat adanya warna pada bagian tengah kertas TLC. Warna yang menunjukkan adanya *annonaceous acetogenin* adalah warna kuning hingga kuning tua seperti warna pada minyak zaitun. Untuk botol T-01 dan

T-02 terlihat tidak ada warna, hal ini menunjukkan bahwa pada botol ini belum ada fraksi F005 yang terelusi.

Selanjutnya dimasukkan eluen heksana dan aseton dengan perbandingan volume 1:1 yang mengelusi fraksi F005 dan menghasilkan botol T-03 hingga T-07. Pada botol-botol ini dapat terlihat adanya warna kuning di tengah yang terkadang diselingi dengan warna ungu pada bagian bawah, tengah dan di bagian akhir. Warna kuning yang terlihat banyak adalah pada botol T-05. Warna ungu banyak terlihat pada botol T-03 dan T-04. Dari hasilnya, maka campuran heksana dan aseton (1:1 v/v) dapat mengelusi *annonaceous acetogenin* yang sifatnya sedikit polar, karena *silica gel* akan menahan senyawa yang polar.

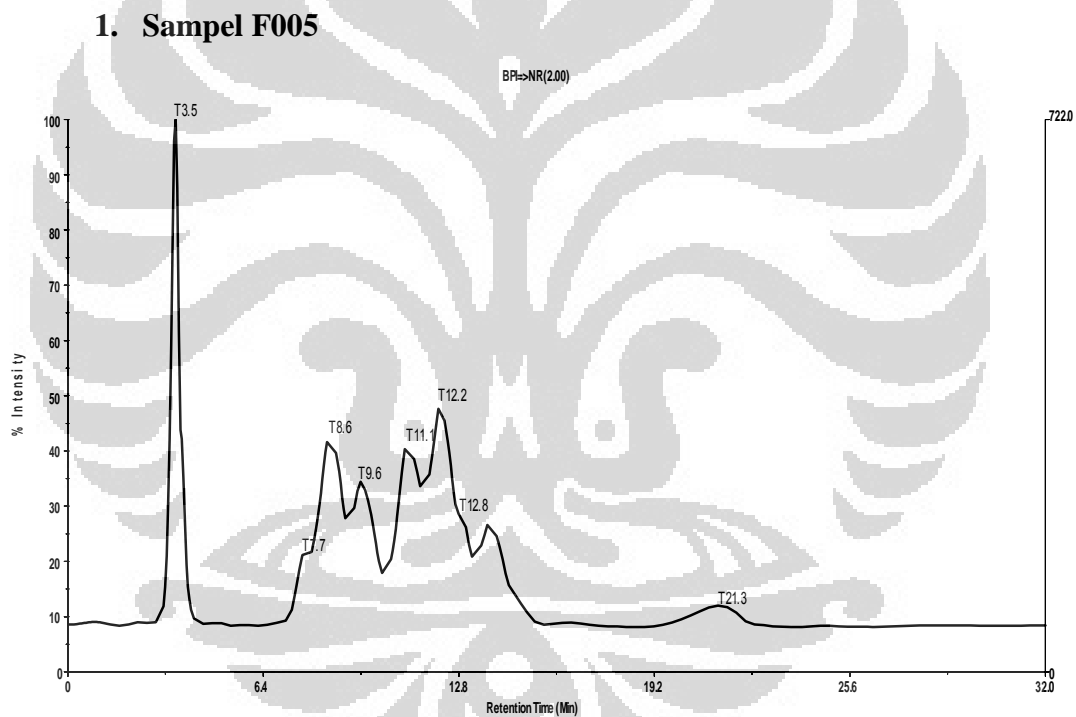
Eluen selanjutnya adalah aseton untuk botol T-08 hingga T-13, dan terlihat warna ungu pada bagian bawah yang dilanjutkan dengan warna kekuningan pada semua botol. Hal ini menunjukkan aseton juga dapat mengelusi *annonaceous acetogenin* dan paling banyak terdapat pada botol T-09.

Eluen selanjutnya adalah campuran heksana dan aseton yang menghasilkan botol T-14 dan T-15, dan terlihat warnanya semakin pudar dan semakin sedikit senyawa yang terelusi oleh eluen ini. Pada botol T-15 hampir tidak ada warna kuning yang terlihat pada kertas TLC.

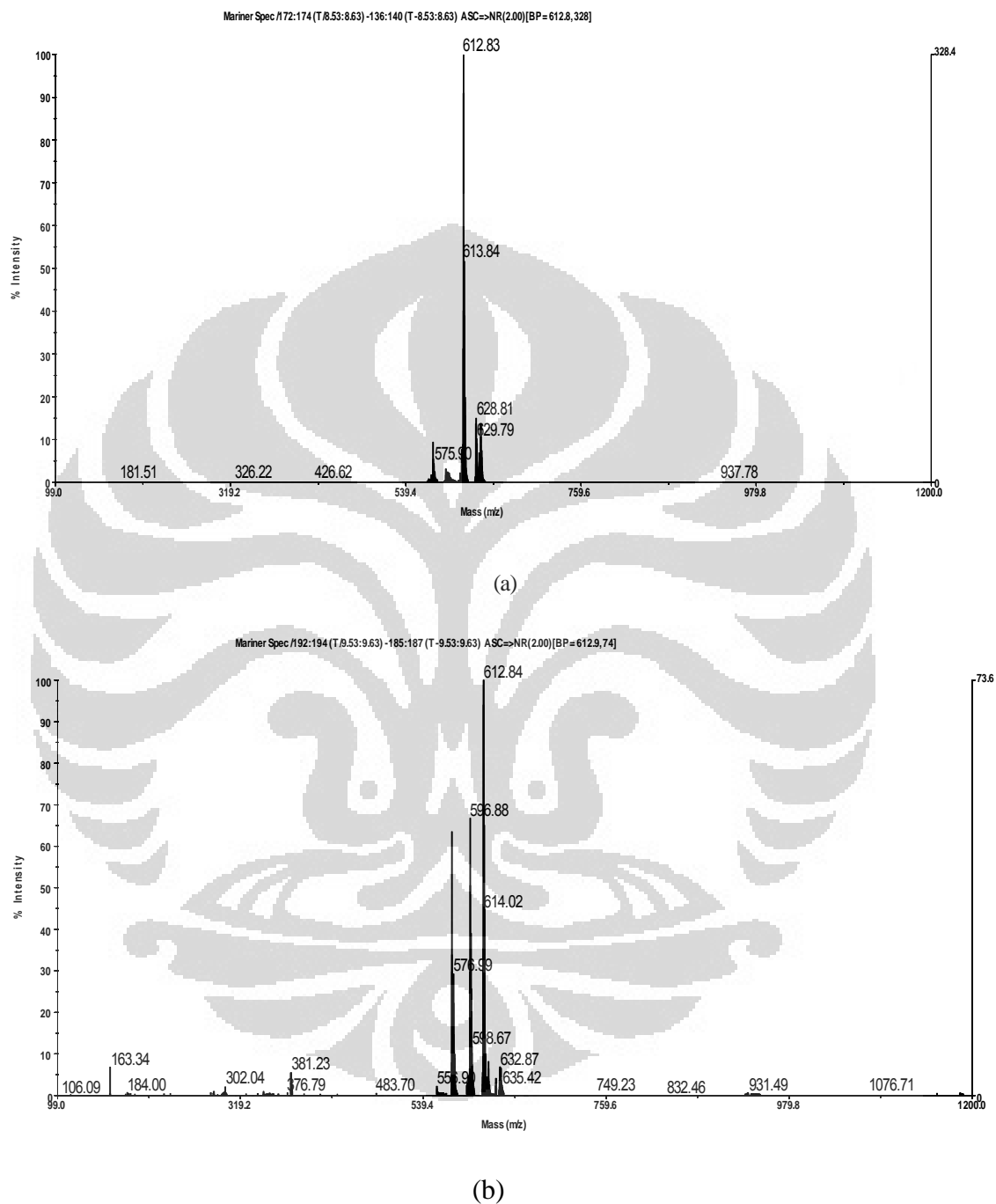
Dengan demikian dapat disimpulkan bahwa eluen yang paling banyak mengelusi *annonaceous acetogenin* adalah eluen campuran heksana dan aseton dengan terlihatnya warna kekuningan pada kertas TLC. Maka melalui HPLC dapat dibuktikan dan dapat dipastikan bahwa puncak pertama yang keluar bukanlah *annonaceous acetogenin* karena *annonaceous acetogenin* atau warna kekuningan muncul setelah warna ungu, yaitu senyawa *phytosterol* dan *triacylglyceride* pada bagian dasar kertas TLC. Botol yang paling banyak mengandung warna kekuningan dari yang paling banyak adalah botol T-03, T-04, T-05 dan T-09 berdasarkan intensitas warna dan persebarannya pada kertas TLC pada Gambar 4.13 hingga 4.15.

4.4.2 Analisa LC-MS

Analisa LC-MS dilakukan terhadap sampel **F005**, botol T-05 dan botol T-08. Hasil yang didapatkan dari LC-MS adalah berupa kurva kromatografi dari LC dan grafik berat molekul dari MS untuk waktu retensi. Untuk grafik berat molekul secara lengkap dapat dilihat pada lampiran 1,2 dan 3, dimana setiap grafik berat molekul terdapat banyak fragmentasi. Pada sub-bab ini ditampilkan grafik yang menunjukkan adanya kandungan *annonaceous acetogenin*, yaitu berat molekulnya sebesar 612 dan 613 seperti yang terlihat pada Tabel 2.4 pada bab 2. Spesifikasi alat LC-MS juga dapat dilihat pada Lampiran 1.

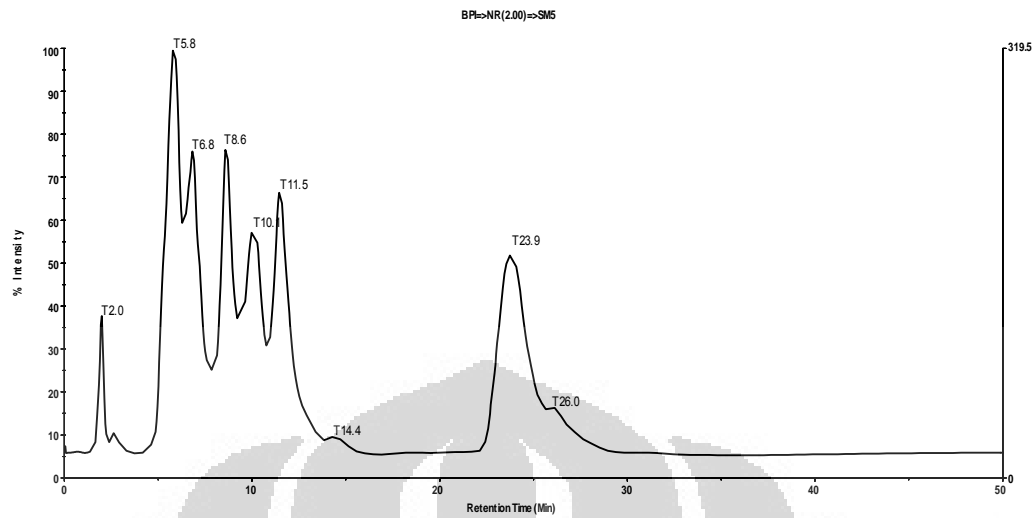


Gambar 4.16 Kurva Kromatografi untuk F005

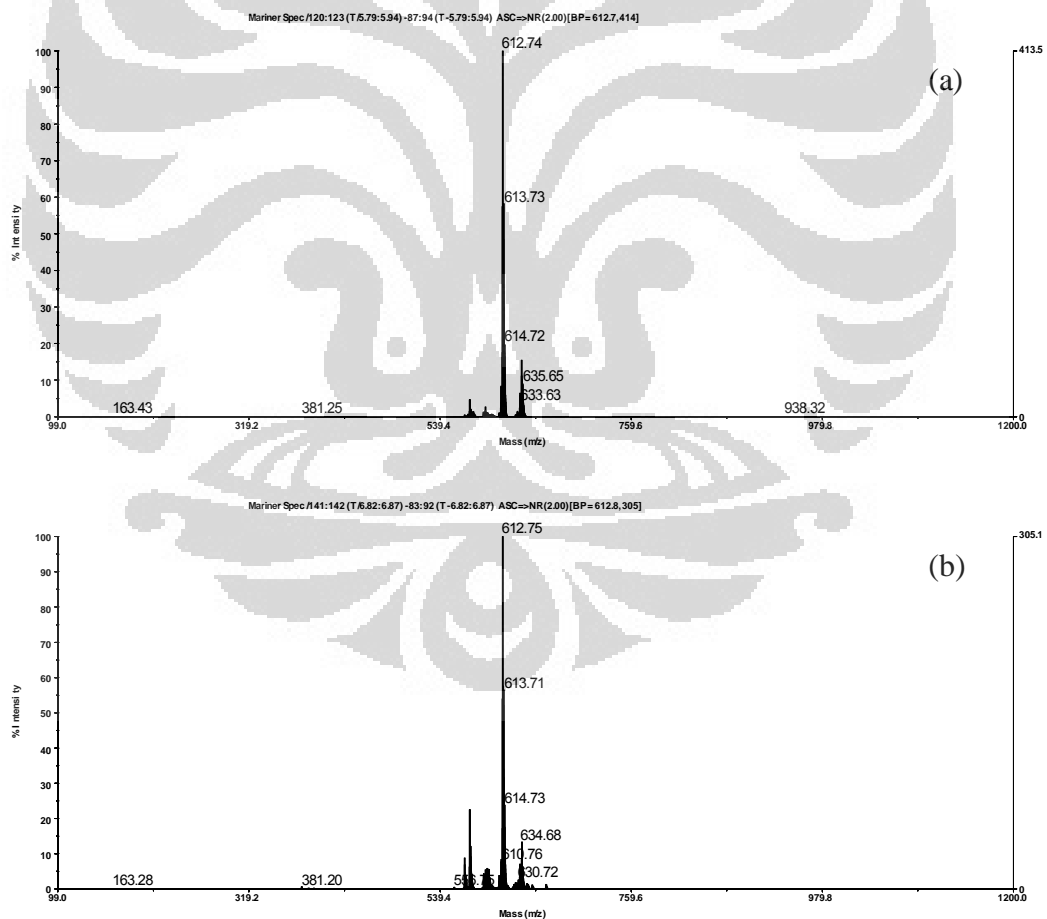


Gambar 4.17 Grafik Berat Molekul Sampel F005 (a) pada T: 8,53-8,63
(b) pada T: 9,53-9,63

2. Sampel Botol T-05

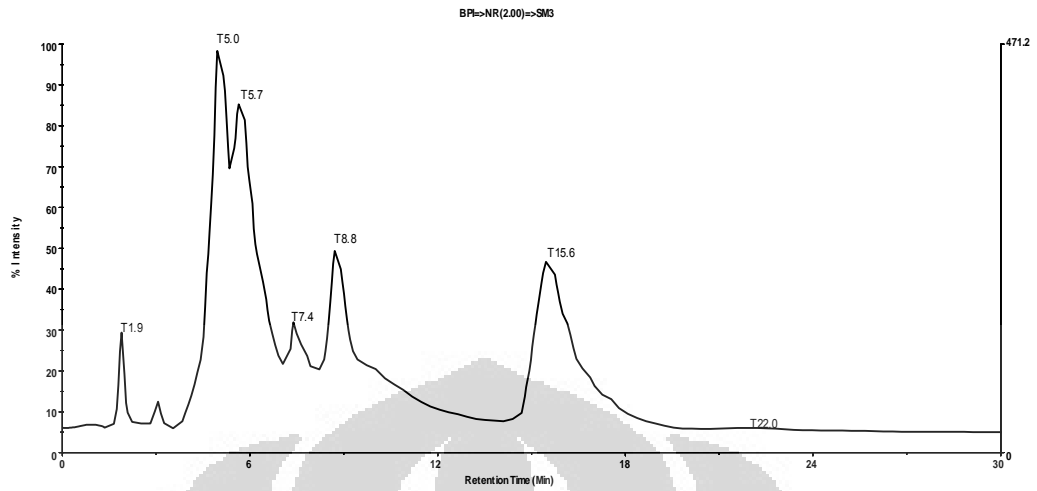


Gambar 4.18 Kurva Kromatografi untuk Sampel Botol T-05

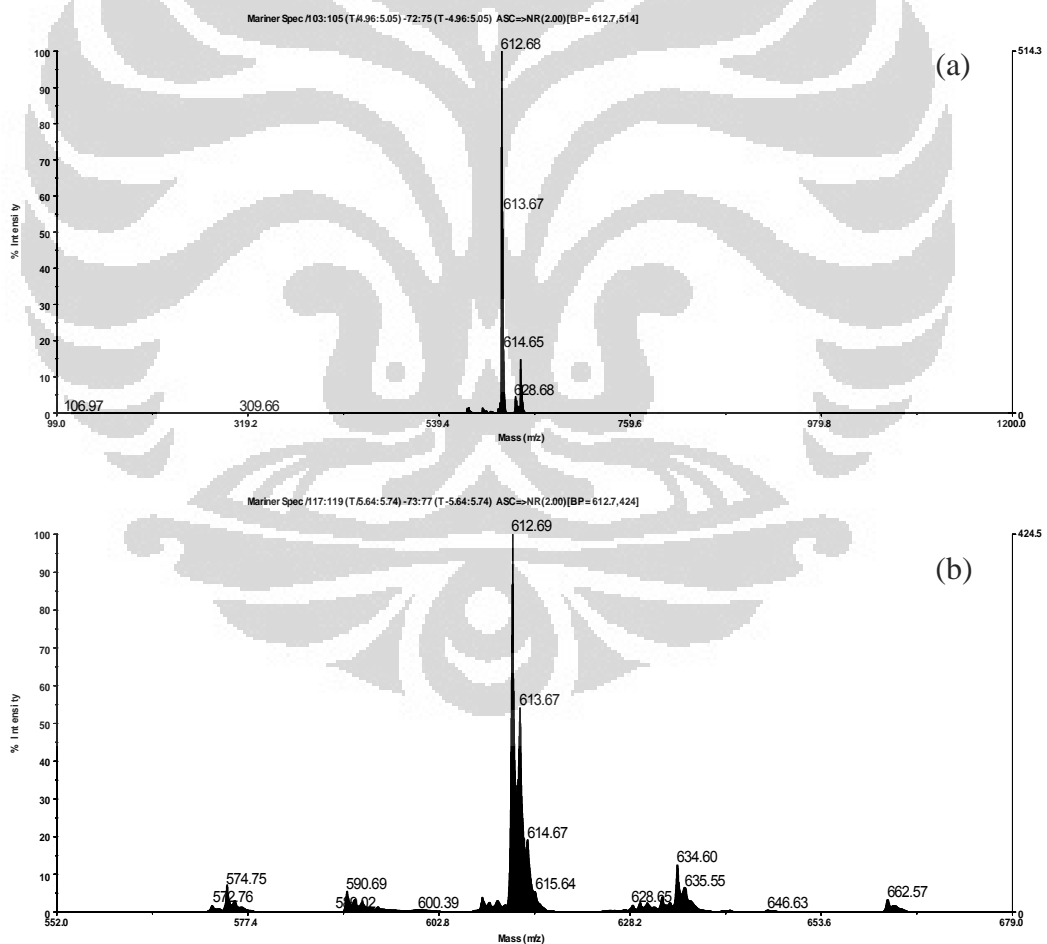


Gambar 4.19 Grafik Berat Molekul Sampel Botol T-05 pada (a) T: 5,79-5,94 (b) T: 6,82-6,87

3. Sampel Botol T-08



Gambar 4.20 Kurva Kromatografi untuk Sampel Botol T-08



Gambar 4.21 Grafik Berat Molekul Sampel Botol T-08 (a) pada T: 4,96-5,05 (b) pada T: 5,64-5,74

Tabel 4.1 Jumlah Senyawa, Berat Molekul, dan Waktu Retensi Pada Sampel F005

No	Berat Molekul	Waktu Retensi (menit)
1	296,16	3,53-3,53
2	122,36	3,73-3,73
3	628,81	7,73-7,83
4	612,83	8,53-8,63
5	381,23	9,53-9,63
6	596,88	11,08-11,18
7	1191,9	211,08-11,18
8	282,34	12,84-12,99
9	594,86	12,84-12,99
10	578,92	21,23-21,64

Tabel 4.2 Jumlah Senyawa, Berat Molekul, dan Waktu Retensi Pada Sampel Botol T-05

No	Berat Molekul	Waktu Retensi (menit)
1	274,3	1,94-1,99
2	342,08	2,67-2,77
3	612,74	5,79-5,94
4	596,79	8,57-8,67
5	1192,64	8,57-8,67
6	338,25	23,51-24,14

Tabel 4.3 Jumlah Senyawa, Berat Molekul, dan Waktu Retensi Pada Sampel Botol T-08

No	Berat Molekul	Waktu Retensi (menit)
1	274,28	1,89-1,94
2	306,03	3,01-3,06
3	612,68	4,96-5,05
4	282,27	7,35-7,44
5	596,72	8,76-8,86
6	338,22	15,41-15,71

Setelah melihat Gambar 4.16 hingga 4.21 maka dapat dijelaskan bahwa fraksi F005, botol T-05 dan T-08 mengandung *annonaceous acetogenin* dengan berat molekul 612 yang masing-masing secara berurutan ada pada waktu retensi 8,6 dan 9,6 menit untuk fraksi F005, waktu retensi 5,79-5,94 menit dan 6,82-6,87 menit untuk botol T-05, dan waktu retensi 4,96-5,05 menit dan 5,64-5,74 menit untuk botol T-08.

Terlihat dari Tabel 4.1 untuk F005, Tabel 4.2 untuk sampel T-05, dan Tabel 4.3 untuk sampel T-08 bahwa kromatogram fraksi F005 memiliki 10 buah senyawa terlihat dari jumlah senyawanya dengan berat molekul tertentu, lebih banyak dibandingkan dengan sampel T-05 dan T-08 yang berjumlah 6 buah senyawa. Hal ini menunjukkan bahwa isolasi dengan menggunakan kolom berhasil dilakukan dan menyebabkan jumlah senyawa yang lebih sedikit dan tetap mengandung *annonaceous acetogenin* pada sampel T-05 dan T-08.

Analisa menggunakan LC-MS mendukung hasil TLC yang menunjukkan adanya kandungan *annonaceous acetogenin* pada botol T-05 dan T-08. Hal ini menunjukkan bahwa warna kuning yang keluar setelah warna ungu pada TLC adalah benar *annonaceous acetogenin* karena dari kromatogram puncak yang mengandung fraksi ini keluar setelah puncak senyawa lain.

Selanjutnya dilakukan analisa dengan menggunakan HPLC yang dapat memperkirakan jumlah senyawa yang terdapat pada botol T-03 hingga T-12 karena analisa dengan LC-MS tidak dapat menunjukkan berapa banyak senyawa yang terdapat dalam setiap sampel F005, botol T-05, dan T-08

4.4.3 Analisa HPLC (*High Performance Liquid Chromatography*)

Analisis HPLC dilakukan terhadap sampel botol T-03 hingga T-12, dan didapatkan kromatogram yang dapat dilihat pada Lampiran 7.

Dari hasil analisa HPLC yang didapatkan untuk botol T-03 hingga T-12, maka kita dapat memperkirakan jumlah senyawa yang ada dengan melihat jumlah puncak pada kromatogram. Hasil untuk jumlah puncak secara berurutan dari yang paling banyak adalah sebagai berikut:

- Botol T-03 terdapat 32 puncak
- Botol T-04 memiliki 24 puncak
- Botol T-06 memiliki 21 puncak
- Botol T-10 dan T-11 memiliki 19 puncak
- Botol T-05, T-08, dan T-09 memiliki 18 puncak
- Botol T-12 memiliki 15 puncak
- Botol T-07 memiliki 14 puncak.

Kromatogram botol T-03 dan kromatogram botol T-04 sangat mirip secara keseluruhan, namun pada waktu retensi pada 5,3 hingga 8,1 menit botol T-04 lebih tinggi intensitasnya.

Kromatogram botol T-05 pada dan botol T-06 pada sangat mirip, namun terdapat 3 puncak pada botol T-06 yang tidak terdapat pada botol T-05, yaitu pada waktu retensi 2,1 menit, 10,1 menit, dan 16 menit.

Kromatogram botol T-07 memiliki jumlah puncak yang lebih sedikit yaitu berjumlah 14 puncak, namun dengan intensitas yang juga sangat kecil, menunjukkan jumlahnya yang lebih sedikit apabila dibandingkan dengan botol T-06 sebelumnya.

Kromatogram botol T-08, T-09, dan T-10 juga sangat mirip namun terdapat sedikit perbedaan jumlah puncak pada T-10 yang memiliki 19 puncak. Perbedaannya terletak pada waktu retensi ke 3,3 menit yang terdapat pada T-10.

Kromatogram botol T-11 dan T-12 mirip secara keseluruhan dan intensitasnya, perbedaannya terletak pada jumlah puncak T-12 yang lebih sedikit dengan waktu retensi 1,5 menit, 1,6 menit, dan 9,2 menit yang tidak ada.

Dari jumlah puncaknya, maka terlihat bahwa sampel T-07 dan T-12 merupakan fraksi yang paling sedikit campurannya. Namun seperti yang terlihat pada Gambar 4.11 pada sub-bab 4.3, fraksi padatan yang terdapat pada botol T-07 dan T-12 sangat sedikit dibandingkan dengan botol T-05, T-08, dan T-09, maka dapat ditetapkan bahwa pada botol T-05, T-08 dan T-09 adalah botol yang fraksinya paling terisolasi dan mengandung *annonaceous acetogenin* dalam jumlah yang lebih banyak.

Analisa dengan HPLC yang dilakukan juga kualitatif. Hal ini disebabkan karena tidak adanya standar yang tersedia dan dijual di pasaran. Para peneliti biasanya mengisolasi sendiri senyawa *annonaceous acetogenin* yang dibuktikan dengan NMR kemudian menjadikan senyawa isolasinya sendiri sebagai standar, sedangkan penelitian ini belum mendapatkan isolasi berupa hanya satu jenis senyawa *annonaceous acetogenin* murni karena dapat dilihat dari hasil HPLC di atas terdapat banyak puncak yang menunjukkan adanya senyawa lain dalam fraksi.

4.4.4 Uji BST (*Brine Shrimp lethality Test*)

Uji BST dilakukan terhadap fraksi F002, F003, F005, botol T-03 hingga T-13. Untuk fraksi F002, F003, dan F005, pengujian dilakukan tiga kali untuk mendapatkan hasil yang lebih presisi dan akurat, sedangkan untuk botol T-03 hingga T-13 dilakukan satu kali. Untuk menghitung nilai LC_{50} dengan menggunakan metode analisa dengan probit, maka nilai LC_{50} ditentukan dengan mengambil nilai y sebesar 5,00 ke dalam persamaan linear yang didapatkan sehingga didapatkan nilai x yang merupakan nilai log konsentrasi LC_{50} . Setelah itu, dari nilai log konsentrasi LC_{50} maka didapatkan nilai konsentrasi. Hasil perhitungan uji BST ini secara lengkap dapat dilihat pada Lampiran 6.

Hasil perhitungan uji BST terangkum dalam Tabel 4.4 di bawah. Percobaan F002, F003, dan F005 dilakukan tiga kali untuk memberikan hasil

yang lebih baik, dan ditemukan F005 merupakan senyawa aktif dari uji BST ini sedangkan F002 bukan merupakan fraksi yang aktif. Nilai LC_{50} fraksi F005 sangat baik karena mencapai 3,062 ppm sehingga hanya dibutuhkan konsentrasi sebesar 3,062 ppm untuk membunuh 50% jumlah makhluk hidup dalam waktu 24 jam.

Tabel 4.4 Hasil Uji BST

Sampel	LC50 (ppm)	Keaktifan
F002	38.844.602,20	Tidak
F003	-	Tidak
F005	3,062	Ya
T-03	0,001	Ya
T-04	13,804	Ya
T-05	10,0674	Ya
T-06	5,90373	Ya
T-07	5,90373	Ya
T-08	13,804	Ya
T-09	4,6416	Ya
T-10	5,0863	Ya
T-11	2,04516	Ya
T-12	7,8999	Ya
T-13	1,5252	Ya

Uji BST untuk botol T-03 hingga T-13 dilakukan sekali untuk memastikan bahwa fraksi dalam setiap botol merupakan senyawa yang aktif, dan semuanya mengandung *annonaceous acetogenin* karena nilai LC_{50} berada di bawah 1000 ppm. Karena penelitian dilakukan sekali untuk botol T-03 hingga T-13, maka hasil penelitian memberikan koefisien regresi yang kurang baik, namun hasilnya mengindikasikan bahwa semua sampel botol T-03 hingga T-13 merupakan senyawa yang aktif.

Percobaan BST dengan hasil LC_{50} di bawah 1000 ppm mengindikasikan adanya sifat sitotoksik yang antikanker yang dimiliki oleh *annonaceous acetogenin*. Hal ini ditunjukkan dari hasil uji BST pada fraksi F005, botol T-03 hingga T-13.

4.5 Pembahasan Hubungan Hasil Analisis Kimiawi dan Biologis

Analisa kimia yang dilakukan terhadap hasil ekstraksi adalah TLC, LC-MS, dan HPLC. Setiap analisis dilakukan secara kualitatif, dan memberikan informasi mengenai adanya senyawa aktif *annonaceous acetogenin* di dalam sampel hasil ekstraksi memberikan warna kekuningan pada hasil TLC dan memiliki berat molekul 612 dan 613.

Analisa kimia ditinjau dari TLC terhadap botol T-01 hingga T-15 yang direndam dengan pemberi warna, larutan 1% p-anisaldehyd, maka terlihat bahwa botol T-03 hingga T-10 menunjukkan adanya warna kekuningan dan paling banyak terdapat pada botol T-03, T-04, T-05, dan T-09.

Analisa kimia ditinjau dari LC-MS memberikan hasil bahwa pada ekstrak F005, T-05, dan T-08 memberi informasi bahwa terdapat kandungan *annonaceous acetogenin* pada ketiga sampel yang diuji dari hasil LC-MS yang ditunjukkan dengan adanya kandungan senyawa dengan berat molekul 612 yang merupakan berat molekul *annonaceous acetogenin*.

Analisa hasil HPLC dapat terlihat bahwa puncak pada T-05, T-08, dan T-09 merupakan fraksi yang memiliki paling sedikit campuran senyawa dan dipastikan mengandung *annonaceous acetogenin* dari TLC dan LC-MS.

Dari ketiga analisa kimia berupa TLC, LC-MS, dan HPLC, maka hasilnya saling mendukung dan menunjukkan bahwa botol T-05 dan T-09 yang paling terisolasi dan mengandung *annonaceous acetogenin*.

Kandungan senyawa *annonaceous acetogenin* terdeteksi secara kualitatif pada analisa LC-MS, HPLC, dan TLC, namun tidak dapat dianalisa secara kuantitatif karena belum ada standar yang tersedia yang berupa isolasi murni *annonaceous acetogenin* dari daun sirsak.

Keaktifannya kemudian dianalisa dengan menggunakan uji BST yang memberikan hasil seperti pada Tabel 4.2, dimana pada fraksi F005 merupakan fraksi yang aktif. Kemudian setelah dipisahkan dengan menggunakan kolom kromatografi menjadi botol T-1 hingga T-15, maka fraksi F005 dan botol T-03

hingga T-13 memiliki sifat keaktifan karena memiliki nilai LC_{50} di bawah 1000 ppm.

Analisa secara kimia dan biologi mendukung bahwa sampel F005, botol T-05 dan T-09 mengandung *annonaceous acetogenin* yang aktif dan memiliki sifat sitotoksik yang berkorelasi positif dengan sifat antikanker.

Setelah dianalisa secara kimia dan biologi, maka fraksi F005 yang merupakan fraksi yang paling awal didapatkan sebelum diisolasi menjadi botol T-01 hingga T-15 dapat dikatakan mengandung *annonaceous acetogenin* yang paling banyak karena tidak dipisah-pisahkan dan bersifat aktif dengan nilai LC_{50} sebanyak 3,062 ppm.

Maka ekstraksi *annonaceous acetogenin* dapat dilakukan sampai pada tahap fraksinasi, yaitu fraksi F005, tanpa perlu dilanjutkan dengan tahapan isolasi yang lebih rumit dengan waktu dan biaya yang lebih tinggi. Suatu bahan herbal biasanya berupa campuran senyawa-senyawa baik itu senyawa aktif maupun senyawa tambahan yang dapat saling mendukung di dalamnya. Senyawa lainnya yang terdapat seperti *phytosterol* juga ternyata terbukti dapat menurunkan kolesterol pada darah dan minyak *triacylglycerol* juga tidak berbahaya karena sifatnya yang tidak jenuh. Hal ini menyebabkan hasil ekstraksi secara teknis dapat langsung menggunakan fraksi F005 yang berupa campuran yang memiliki konsentrasi *annonaceous acetogenin* paling tinggi karena belum dipisahkan oleh kromatografi kolom. Selain itu, tujuan penelitian adalah untuk mendapatkan ekstrak yang kaya akan *annonaceous acetogenin* sehingga fraksi F005 merupakan fraksi yang paling kaya dan sesuai dengan kebutuhan untuk penelitian selanjutnya.

BAB 5

KESIMPULAN DAN SARAN

Setelah melakukan penelitian ekstraksi *annonaceous acetogenin* dari daun sirsak, maka ada beberapa kesimpulan dan saran yang dapat dituliskan sebagai berikut ini.

5.1 Kesimpulan

Kesimpulan dari penelitian ini adalah:

- Senyawa *annonaceous acetogenin* yang memiliki berat molekul 612 dan 613 dapat diekstraksi dari daun sirsak dengan menggunakan metode ekstraksi, fraksinasi, dan isolasi yang telah dilakukan dan dibuktikan keberadaannya dengan analisa kimiawi dan biologis.
- Ekstraksi dilakukan menggunakan cara maserasi dan maserasi dengan bantuan *ultrasonic bath*. Kedua metode ini dilakukan dan didapatkan bahwa metode ekstraksi dengan maserasi yang paling sesuai untuk diaplikasikan karena lebih sederhana, tidak memerlukan peralatan yang rumit, tidak membutuhkan energi, dan tidak ada suhu yang menaik seperti pada *ultrasonic bath* yang dapat merusak senyawa aktif. Maserasi juga secara teknis lebih menguntungkan sehingga dapat dilakukan dengan skala besar.
- Analisa kimiawi yang dilakukan terhadap senyawa ini dilakukan secara kualitatif, yaitu dengan menggunakan TLC, LC-MS, dan HPLC. Analisa tidak dapat dilakukan secara kuantitatif karena tidak ada standar yang berupa isolasi *annonaceous acetogenin* murni dari daun sirsak yang tersedia.
- Dari hasil analisa kimiawi yang dilakukan, maka kandungan *annonaceous acetogenin* dapat dipastikan terdapat pada fraksi F005, botol T-03 hingga T-12 yang berhasil diekstraksi dan diisolasi. Walaupun masih ada senyawa lainnya, namun ekstraksi dan isolasi telah berhasil mendapatkan

kandungan *annonaceous acetogenin* dengan lebih baik daripada hanya direbus tanpa melakukan ekstraksi.

- Analisa biologis yang dilakukan melibatkan larva udang memiliki korelasi positif terhadap aktivitas antikanker, yaitu uji BST. Hasilnya adalah fraksi F005 dan botol T-03 hingga T-13 memiliki nilai LC_{50} di bawah 1000 ppm dan memiliki sifat sitotoksik antikanker.
- Fraksi F005 hasil fraksinasi paling akhir sebelum diisolasi akan lebih efektif dan secara teknis lebih baik digunakan untuk penelitian selanjutnya karena banyak kandungan senyawa tambahan lainnya yang berguna untuk kesehatan dan telah dibuktikan memiliki sifat antikanker dari BST sebesar 3,062 ppm yang nilainya berada di bawah 1000 ppm.

5.2 Saran

Beberapa saran yang dapat diberikan setelah penelitian ini dilakukan adalah:

- Fraksi F005 sudah cukup dan cocok untuk dijadikan sebagai bahan bioaktif antikanker karena analisa dari LC-MS dan BST membuktikan bahwa fraksi F005 sudah aktif walaupun ada campuran senyawa lainnya. Penelitian lebih lanjut diperlukan untuk meneliti apakah ada bahan berbahaya yang tidak diinginkan pada fraksi F005, namun secara kualitatif, fraksi F005 sudah dapat langsung digunakan sebagai bahan bioaktif antikanker.
- Mencari bahan pelarut yang tidak beracun bagi manusia dan mencari metode ekstraksi yang lebih efisien, baik dari segi waktu dan biaya.
- Mengaplikasikan ekstrak yang didapatkan dengan melakukan enkapsulasi, penyalutan, ataupun modifikasi lainnya yang mendukung dunia kesehatan untuk penelitian selanjutnya.

Daftar pustaka

- Schulz, Wolfgang Arthur. 2005. *Molecular Biology of Human Cancer*. United States of America : Springer Science.
- Knowles, Margaret A dan Peter J. Selby. 2005. *Introduction to the Cellular and Molecular Biology of Cancer*. New York : Oxford University Press.
- National Cancer Institute. 2010. "What is Cancer?" <http://www.cancer.gov>. Diakses pada tanggal 15 Mei 2011 pada pukul 21.15.
- Zeng, L., Ye, Q., Oberlies, N. H., Shi, Guoen, Gu, Zhe-Ming, He, Kan, and McLaughlin, Jerry L. Recent Advances in Annonaceous Acetogenins. *Natural Products Reports*, 1996, 275-306.
- Geum-soog Kim, Lu Zeng, Feras Alali, Lingling L. Rogers, Feng-E. Wu, Jerry L. McLaughlin, and Soelaksono Sastrodihardjo. *Journal of Natural Product*, 1998, 62, 432-436.
- Martin, J.M, Madigosky, S.R., Gu, Zh-M., Zhou, D., Wyu, J., McLaughlin, J.L. Chemical Defence in the Zebra Swallowtail Butterfly, *Eurytides marcellus*, Involving Annonaceous Acetogenin, *J. Nat. Prod.*, 1999, 62, 2-4.
- Villo, Piret, Vares, L., Toom, L. 2008. *Synthesis of Acetogenin Analogues*. Master Thesis in Organic Chemistry, University of Tartu.
- Gorman, J.S.T. 2006. *Transition Metal-Mediated Cyclizations and Synthesis of Annonaceous Acetogenin Analogs*. Doctor of Philosophy, University of Texas.
- Jolad, S.D., Hoffman, J.J, Schram, K.H., Cole, J.R., Tempesta, M.S., Kriek, G.R., Bates, R.B. Uvaricin, a New Antitumor Agent from *Uvaria accuminata* (Annonaceae). *J. Org.Chem.*, 1982, 47, 3151-53.

- Bermejo, A., Figadere, B., Zafra-Polo, M.C., Barrachina, I., Estornell, E., Cortes, D. Acetogenin from Annonaceae : Recent Progress in Isolation, Synthesis, and Mechanism of Action. *Nat. Prod. Rep.*, 2005, 22, 269-303.
- Vieira, G. H. F., Mourao, J.A., Angelo, A.M., Costa, R. A., Vieira, R.H.S. F. Antibacterial Effect (in vitro) of *Moringa oleifera* and *Annona Muricata* Against Gram Positive and Gram Negative Bacteria. *Rev. Inst. Med. Trop. Sao Paulo*, 2010, 52(3), 129-32.
- Padma, P., Pramod, N.P., Thyagarajan, S.P., Khosa, R.L. Effect of the Extract of *Annona muricata* and *Petunia nyctaginiflora* on Herpes Simplex Virus. *Journal of Ethnopharmacology*, 1998, 61, 81-83.
- Luna, J. De S., Carvalho, J.M., Lima, M.R.F., Bieber, W., Bento, Edson S., Franck, X., Sant'ana, A.E.G. Acetogenins in *Annona muricata* L. (Annonaceae) Leaves are Potent Molluscicides. *Natural Product Research*, 2006, 20(3), 253-57.
- Sudjari, Kalsum, U., Prasetya, C.A. 2005. Efek Biji Sirsak (*Annona muricata* L) sebagai Larvasida *Aedes* sp. Malang : Fakultas Kedokteran Universitas Brawijaya.
- Kim, Geum S., Lu Zeng, Alali, F., Rogers, L.L., Wu, Feng E., McLaughlin, Jerry L. *Phytochemistry*, 1998, Vol 49, No.2, pp 565-571.
- Lu Zeng, Wu, Feng E., Oberlies, Nicholas H., McLaughlin, Jerry L., Sastridihadjo, Soelaksono. . *Journal of Natural Product*, 1996, 59, 1035-1042.
- McLaughlin, Jerry L, Gina B. Benson, and James WF. 2003. *A Novel Mechanism for the control of clinical cancer : Inhibition of the Production of Adenosine Triphosphate (ATP) with a Standardized Extract of Paw Paw (Asimincz triloba, Anonaceae).*
- Hayden, Cori. 2003. *When Nature Goes Public : The Making and Unmaking of Bioprospecting in Mexico.* New Jersey : Princeton University Press.

- Handa, S.S., Khanuja, S.P.S., Longo, G., Rakesh, D.D. 2008. *Extraction Technologies for Medicinal and Aromatic Plants*. http://www.unido.org/fileadmin/user_media/Publications/Pub_free/Extraction_technologies_for_medicinal_and_aromatic_plants.pdf (Diakses pada tanggal 26 Mei 2011 pk. 13.24.)
- Ferlay, J., Shin, H.R., Bray, F., Forman, D., Mathers, C., and Parkin, D.M. Estimates of worldwide burden of cancer in 2008: GLOBOCAN 2008. *Int. J. Cancer*, 2010, 127, 2893-2917.
- Alwan, A., MacLean, D.R., Riley, L.M., d'Espaignet, E.T., Mathers, C.D., Stevens, G.A., Bettcher, D. Monitoring and surveillance of chronic non-communicable diseases: progress and capacity in high-burden countries. *The Lancet*, 2010, 376, 1861-1868.
- Souza, E.B.R., Silva, R.R., Afonso, S., Scarminio, I.S. Enhanced extraction yields and mobile phase separations by solvent mixtures for the analysis of metabolites in *Annona muricata* L. leaves. *J. Sep. Sci.*, 2009, 32, 4176-4185.
- Syarief, E. 2011, Mei. "Daun Sirsak : Olah Tepat dan Dosis Aman." *Trubus* 498, 10-27.
- Johnson, Stevenson. 1991. *Dasar Kromatografi Cair, terjemahan Kosasih Padmawinata*. Bandung : Penerbit ITB.
- Skoog, Douglas A., James Holler, dan Stanley R. Crouch. 2007. *Principles of Instrumental Analysis, 6th edition*. United States : Brooks/Cole Cengage Learning.
- Fontana, J.D *et al.* Selectivity Polarity- and Adsorption-Guided Extraction / Purification of *Annona* sp. Polar Acetogenins and Biological Assay against Agricultural Pests. *Applied Biochemistry and Biotechnology*, 1998, 70, 67-76.

- H. H. Jork, W. Funk, W. Fischer, and H. VHC, Weinheim, Germany, 1990.
- Jork, H.H, W. Funk and H. Wimmer. 1990. Wimmer *Thin-Layer Chromatography Reagents and Detection Methods, Vol. 1a: Physical and Chemical Detection Methods: Fundamentals, Reagents I*. Weinhem : VHC.
- Zhe-Ming Gu, Dawei Zhuo, and Jinn Wu. Screening for Annonaceous Acetogenin in Bioactive Plant Extracts by Liquid Chromatography/Mass Spectroscopy. *J. Nat. Prod*, 1997, 60, 242-248.
- Agilent Technologies. 2001. *Basics od LC/MS*. USA : Author.
- McLaughlin, Jerry L., Linling L. Rogers, and Jon E. Anderson. 1998. The Use of Biological Assays to Evaluate Botanicals. *Drug Information Journal*, 32, 513-524.
- Meyer B. and Ferrigni ML. 1982. Brine shrimp, a convenient general bioassay for active plant constituents. *J Planta Med Res*, 45, 31-34.
- McMaster, Marvin C. 1994. *HPLC, a Practical User's Guide*. New York : John Wiley & Sons, Inc
- Lindsay, Sandie. 1992. *High Performance Liquid Chromatography 2nd edition*. London : John Wiley & Sons, Ltd
- Finney, David John. 1947. *Probit Analysis : A Statistichal Treatment of the Sigmoid Response Curve*. California : Univ. Press.
- Haijun Yang, Nin Zhang, Qingqi Zeng, Qiping Yu, Shihuai Ke, and Xiang Li. 2010. HPLC Method for the Simultaneous Determination of Ten Annonaceous Acetogenins after Supercritical Fluid CO₂ Extraction. *Int J Biomed Sci*, vol 6 no.3, 202-207.

LAMPIRAN

Lampiran 1 : Spesifikasi LC-MS

Sample
Vol injection 20 ul
Flow rate 1 ml/min
Eluent ACN+Water = 90+ 10
LC-MS : Mariner Biospectrometry
LC: Hitachi L 6200
System ESI (Electrospray Ionisation)
Positive ion mode
Kolom C18 (RP 18) Supelco
Column length : 250 mm
ID : 2 mm
Particle size : 5 µm
Analysis by : Puspa .D. Lotulung, Pusat Penelitian Kimia – LIPI

BPI = Base Peak Intensity
BP = Base Peak
TIC = Total Ion Current
NR = NoiseRemoval
BC = Base Correction
MC = Mass Calibration
BP = Base Peak
CT = Centroiding
SM = Gaussian smooth

Temperatur kolom = temp ruangan ;
isokratik, Detector massa

Lampiran 2 : Hasil Analisa LC-MS Sampel F005

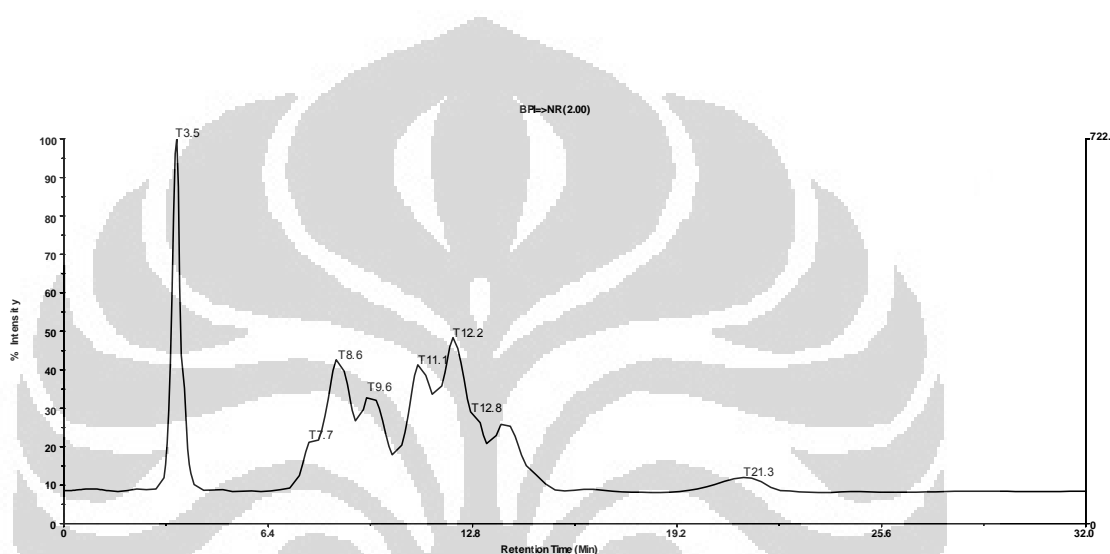
MW ES 0008

LC MS –ESI pos ion

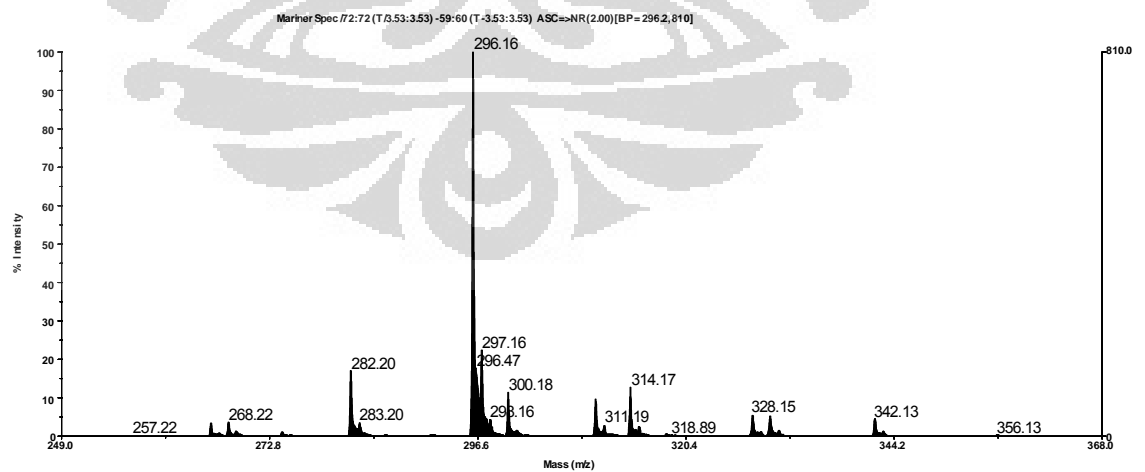
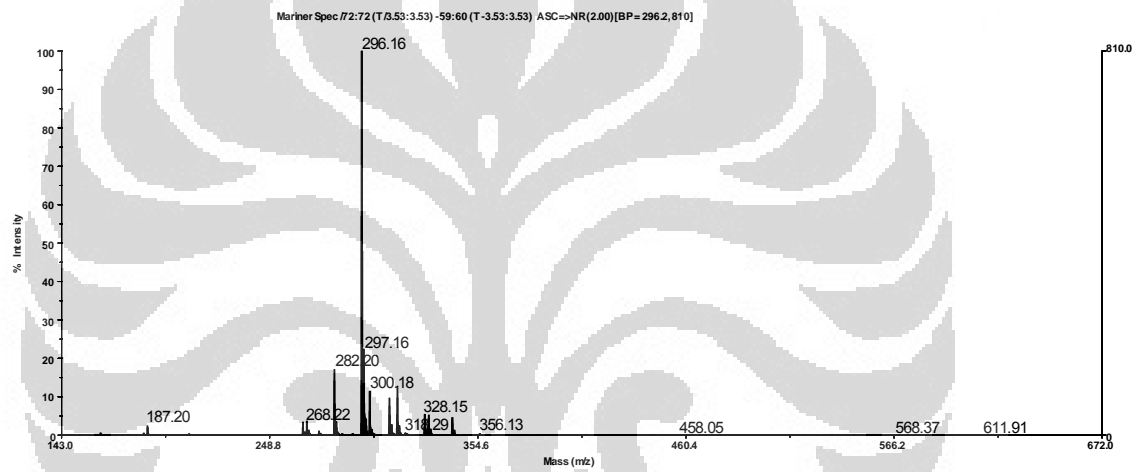
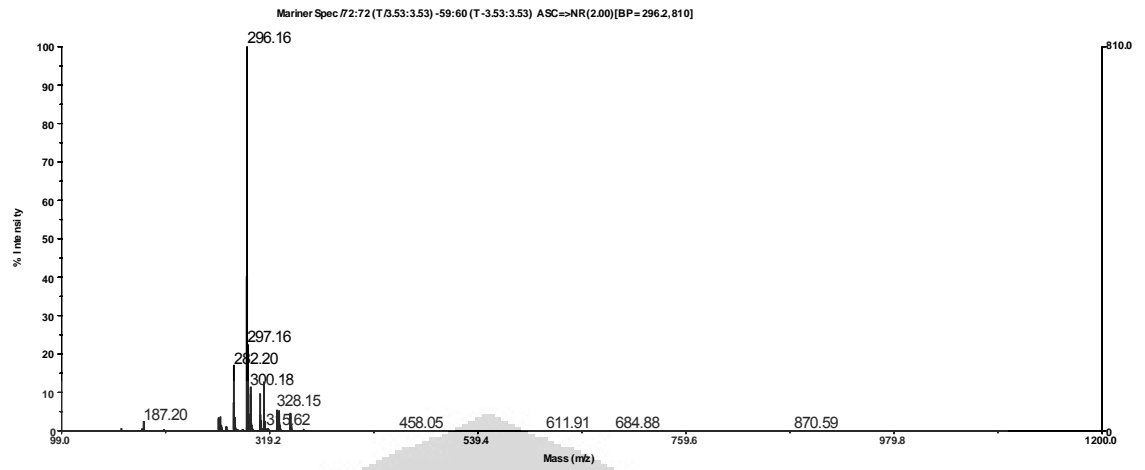
Vol injection 20 ul

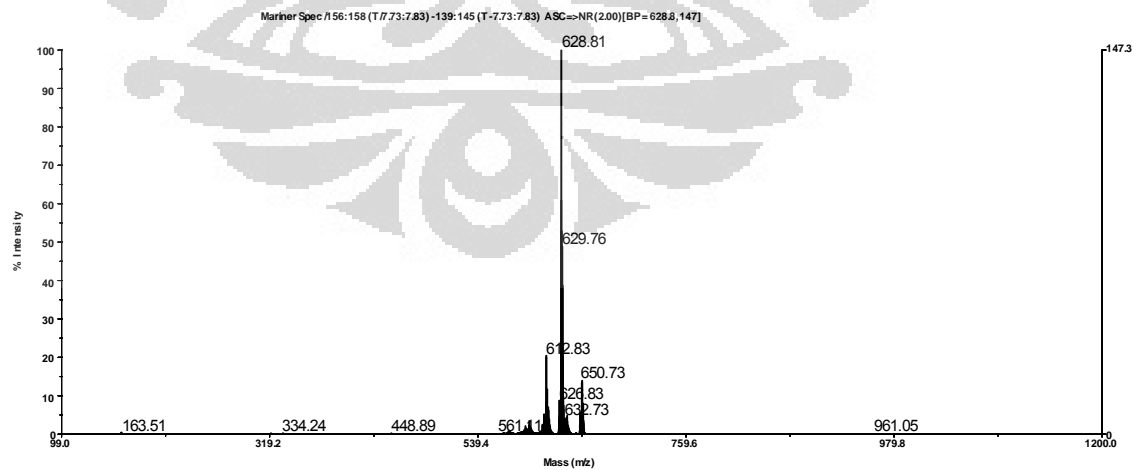
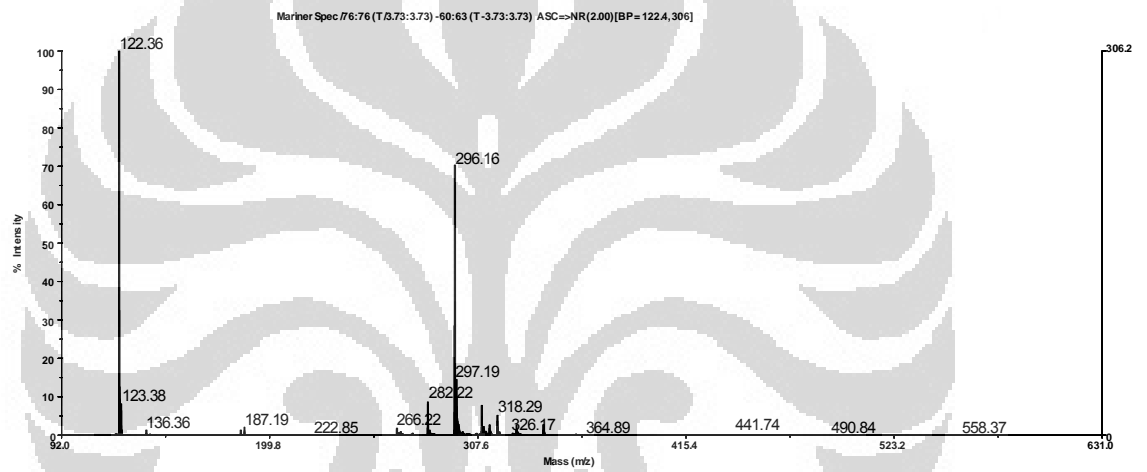
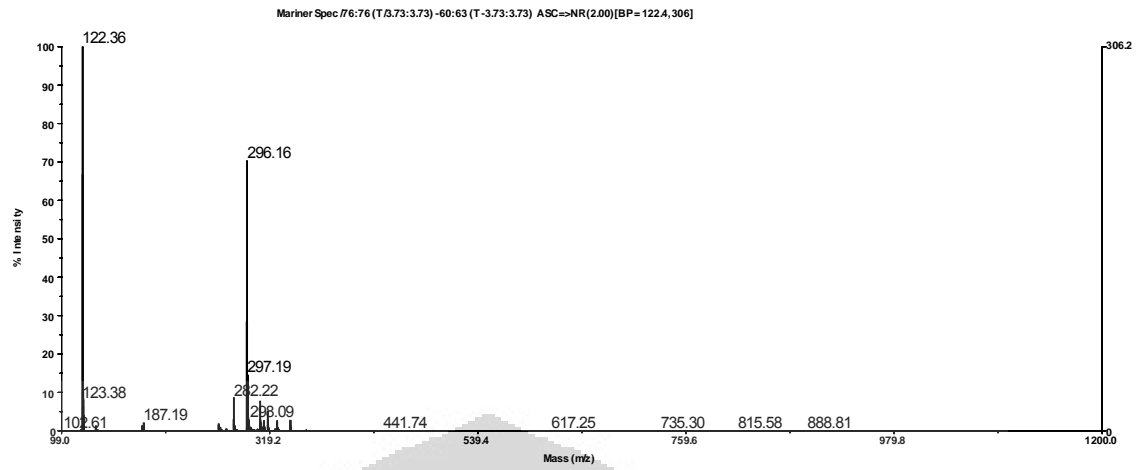
Flow 1 ml/min

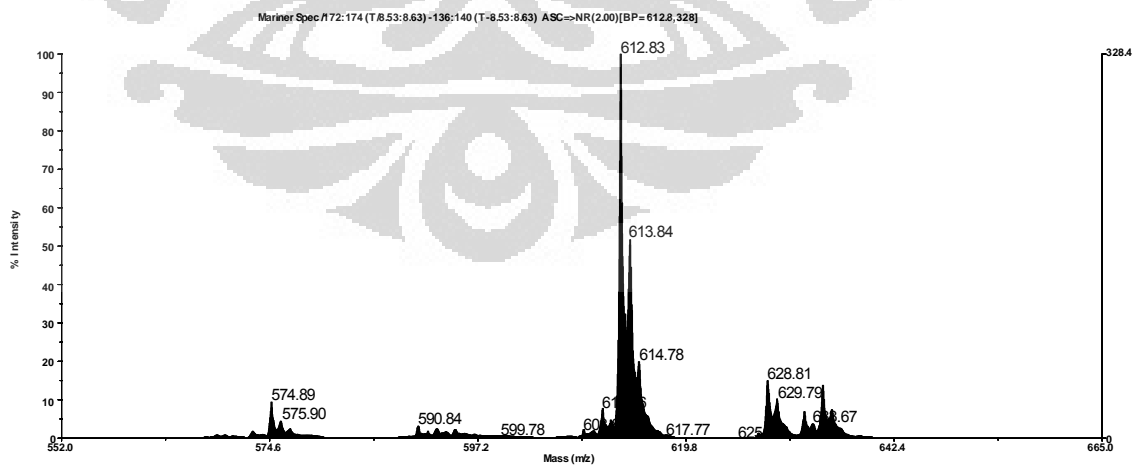
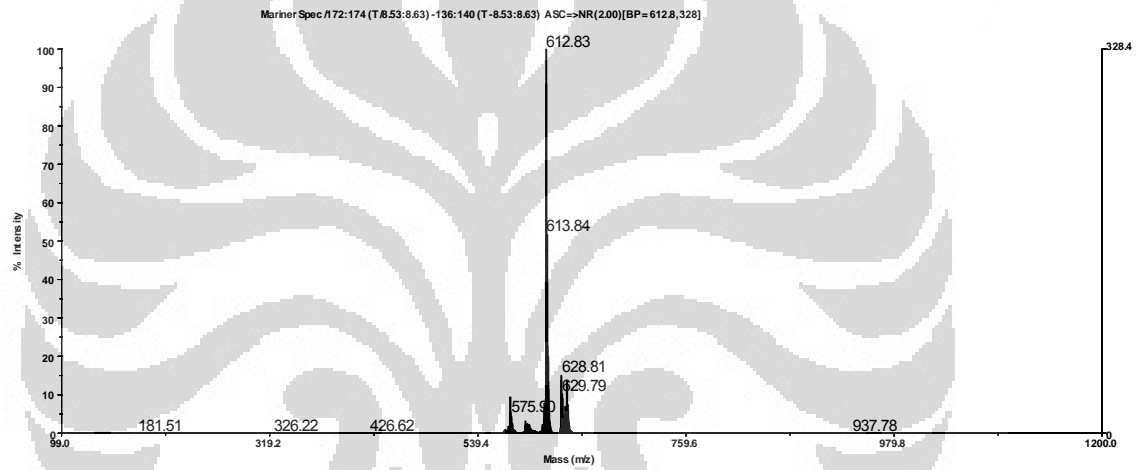
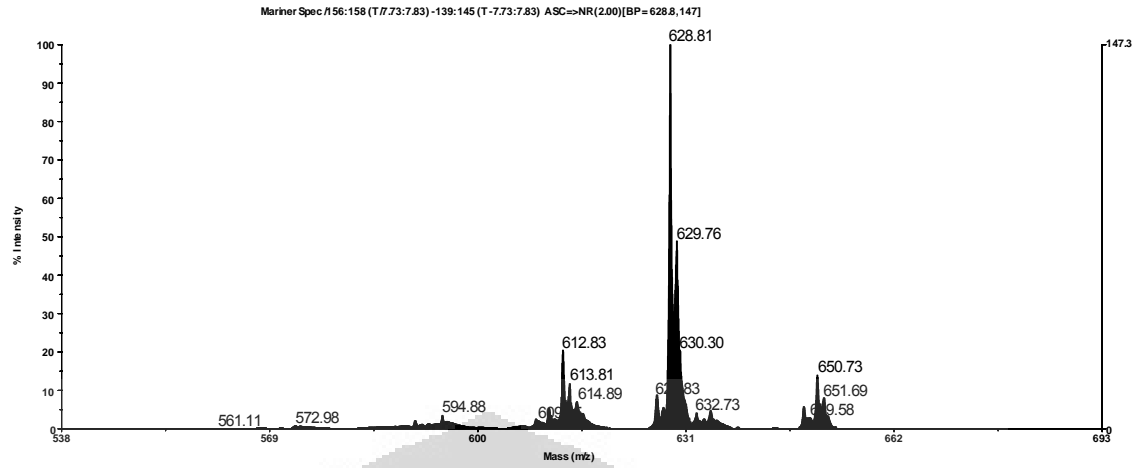
Eluent Acetonitrile +Water = 90+10

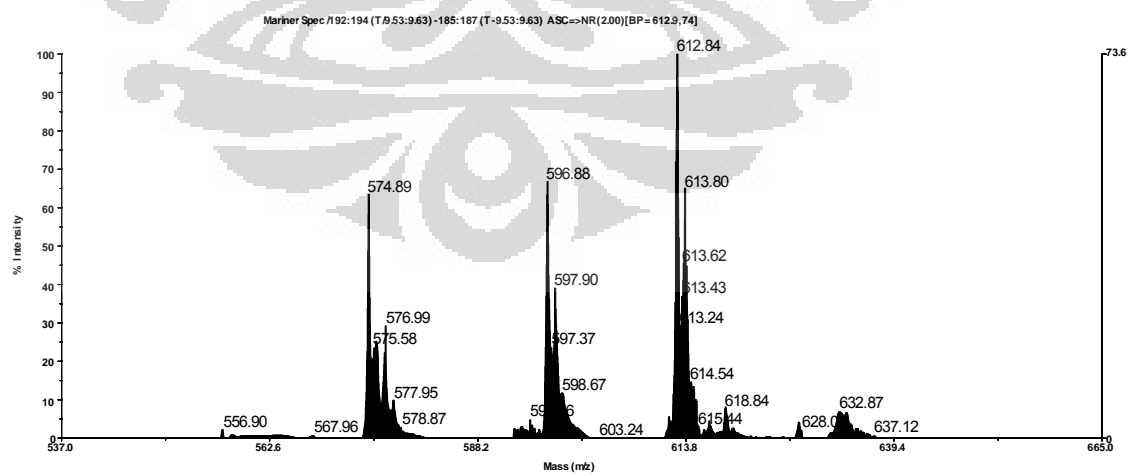
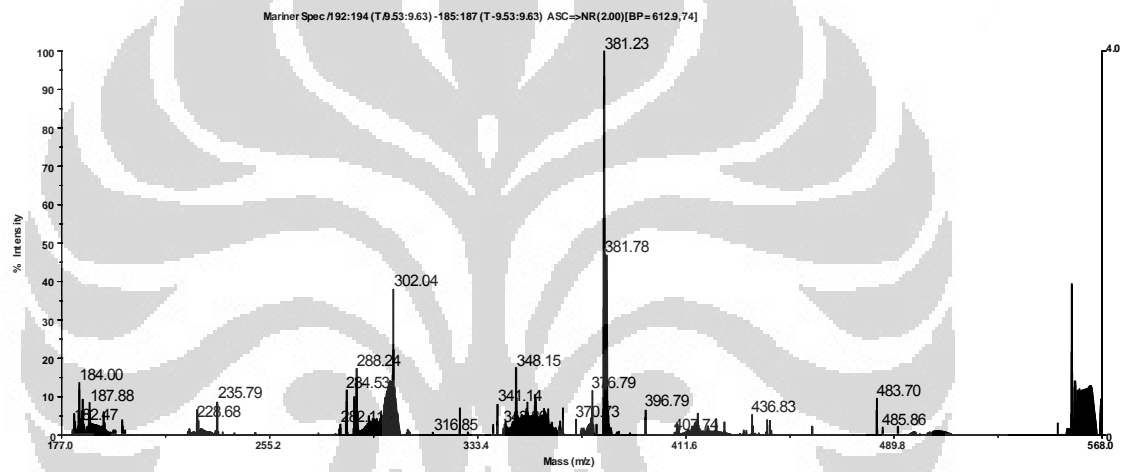
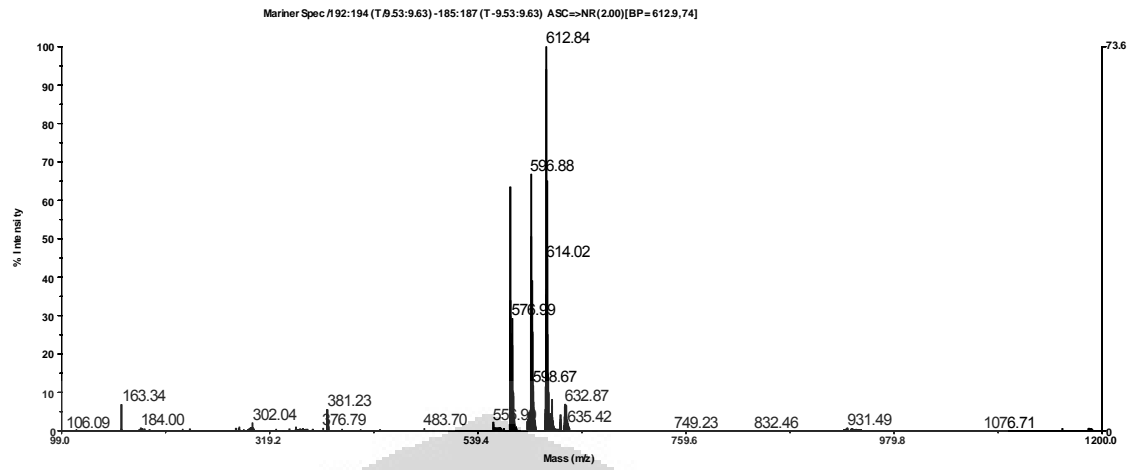


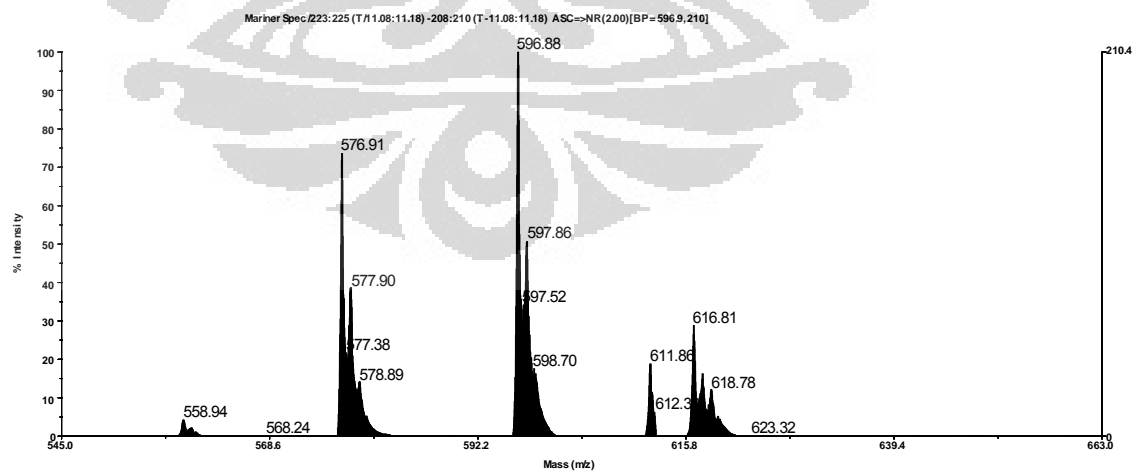
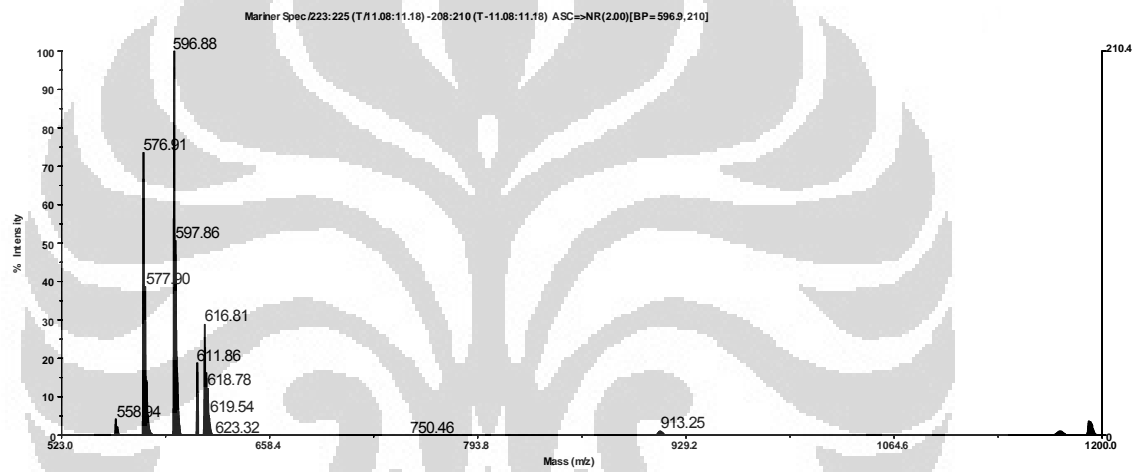
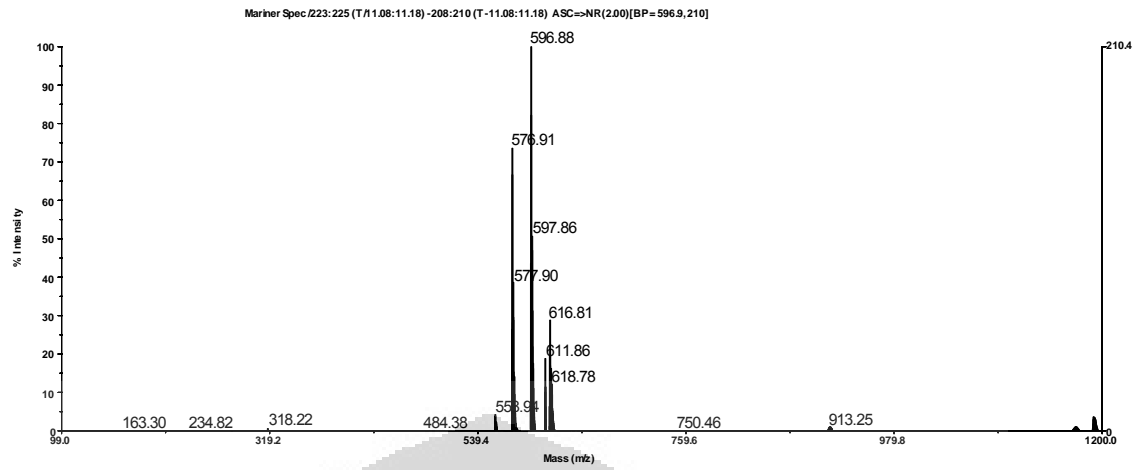
Index	Time	Lower Bound	Upper Bound	Height	Area
1	3.534.583	2.736.283	4.281.667	722	4706.44
2	7.729.950	6.280.033	7.830.933	156	812.91
3	8.581.683	7.931.083	9.130.966	309	2233.41
4	9.581.616	9.231.117	10.332.866	248	1709.10
5	11.134.350	10.432.850	11.584.000	299	2507.26
6	12.185.200	11.684.983	12.735.317	349	1669.35
7	12.835.300	12.735.317	13.235.200	208	421.30
8	13.784.834	13.335.184	15.532.850	195	2791.49
9	21.334.184	18.930.566	22.384.033	86	967.26

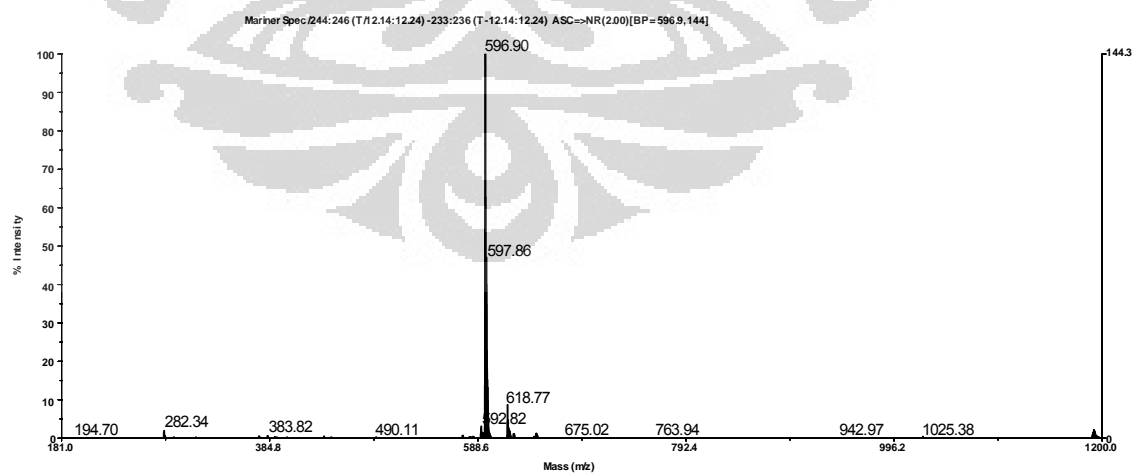
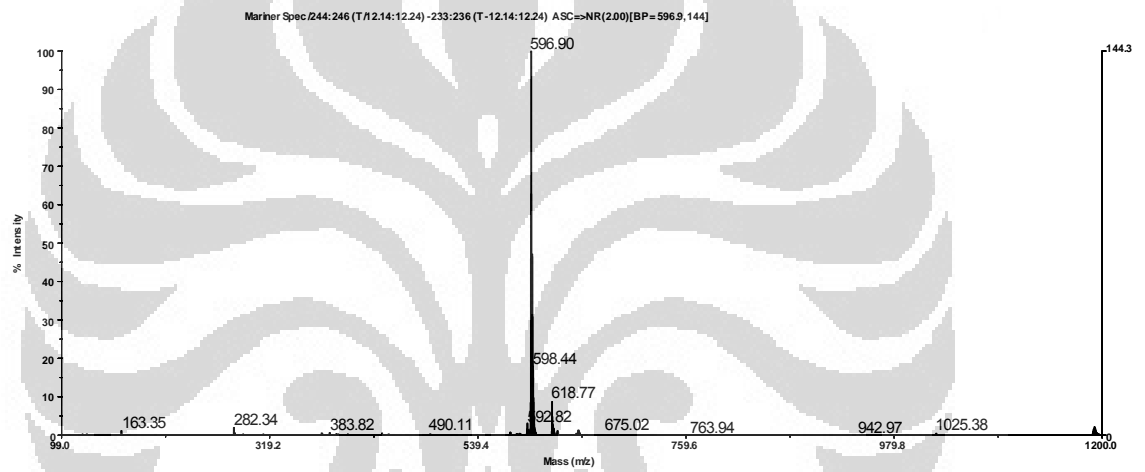
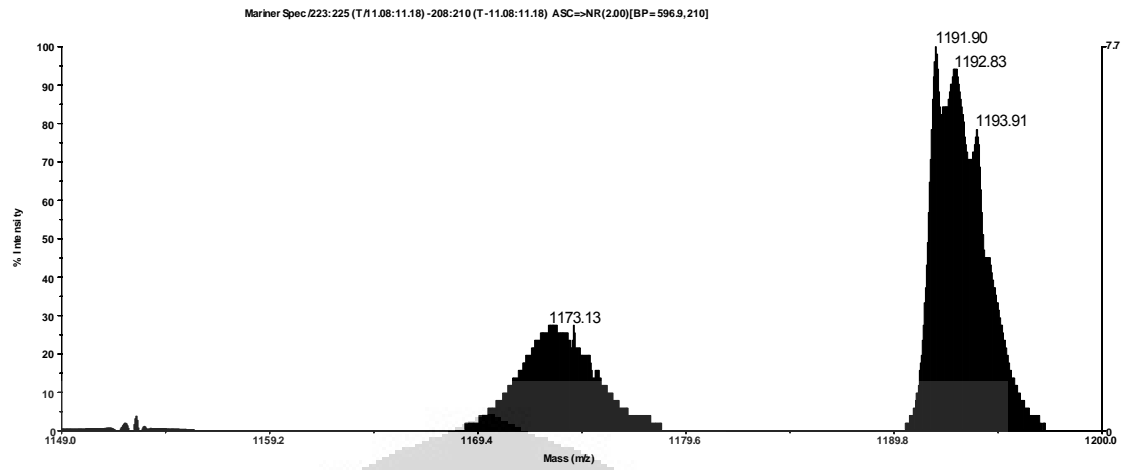


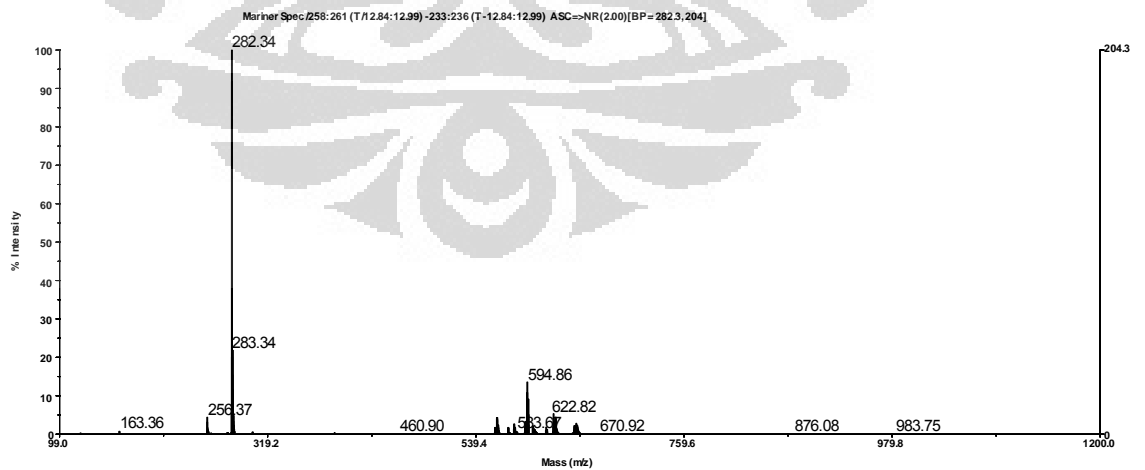
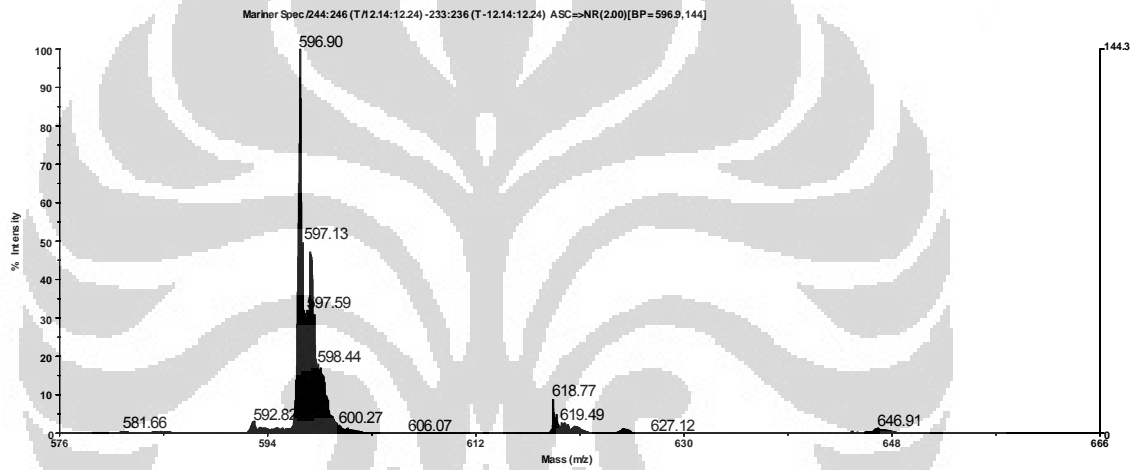
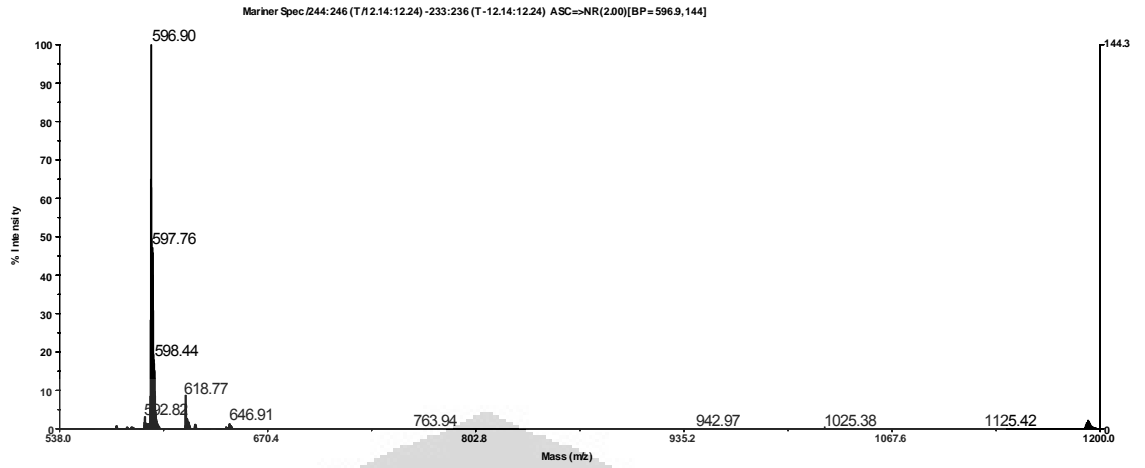


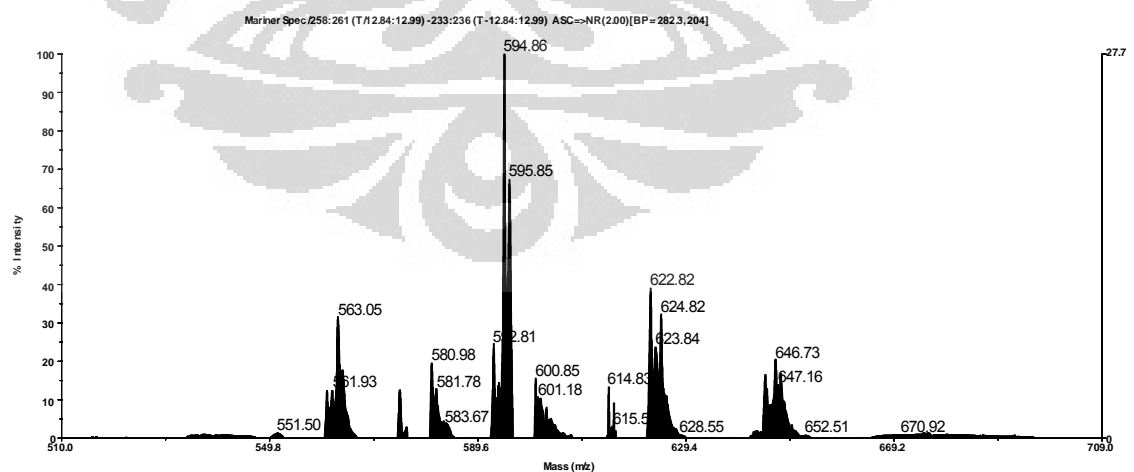
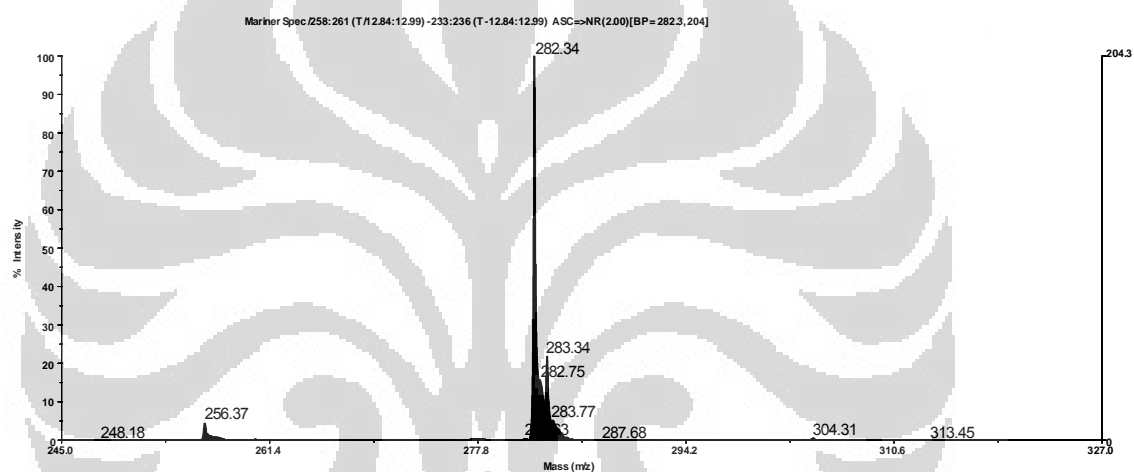
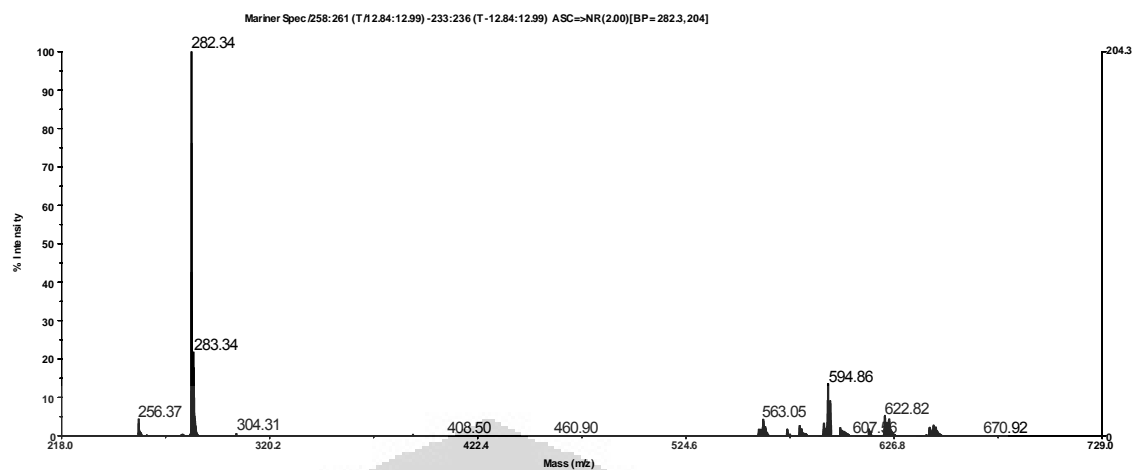


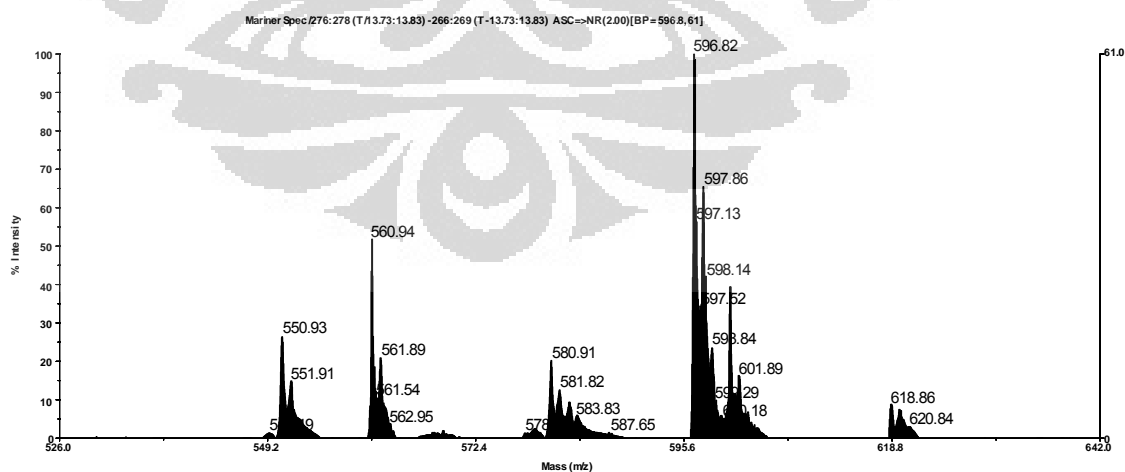
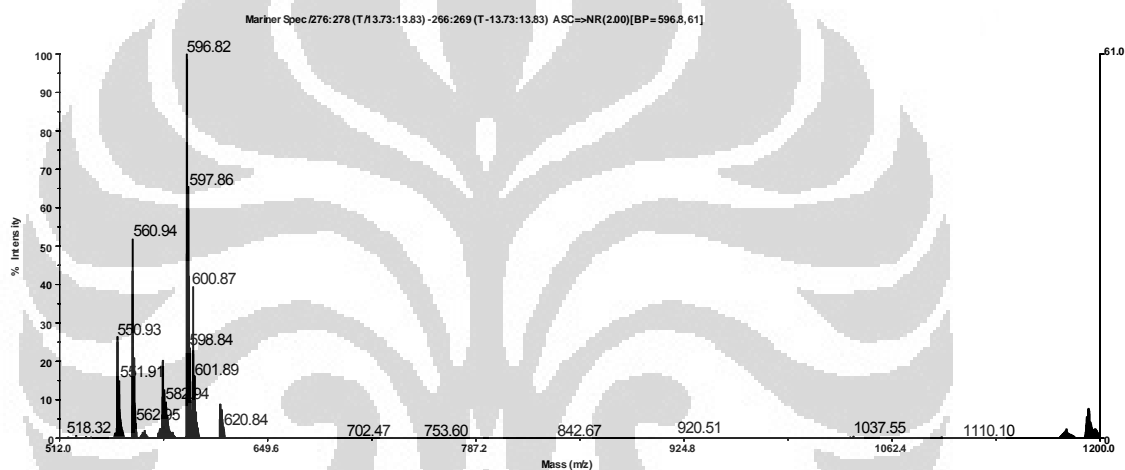
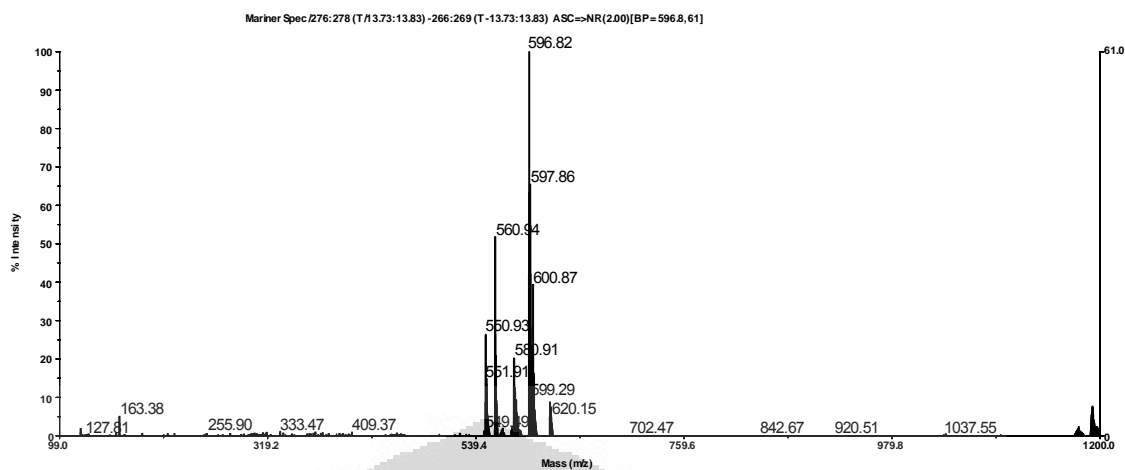


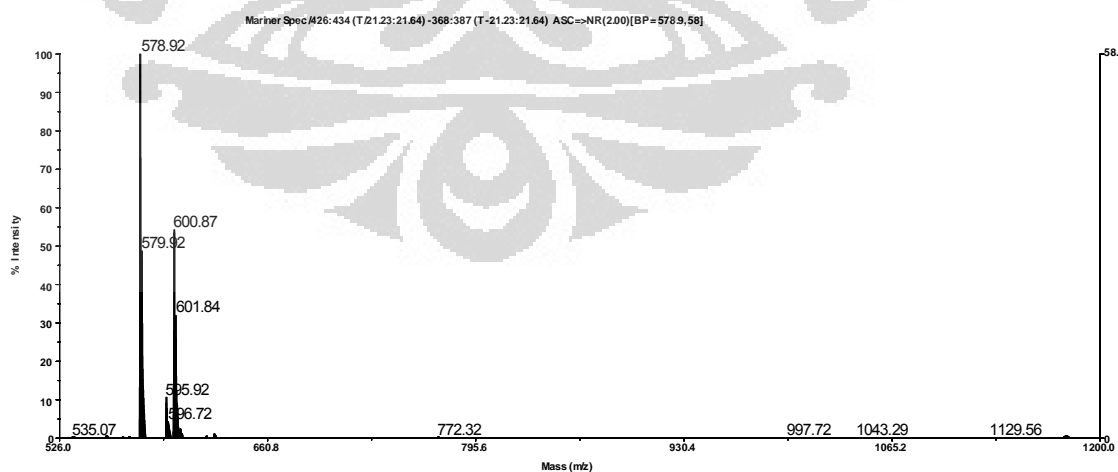
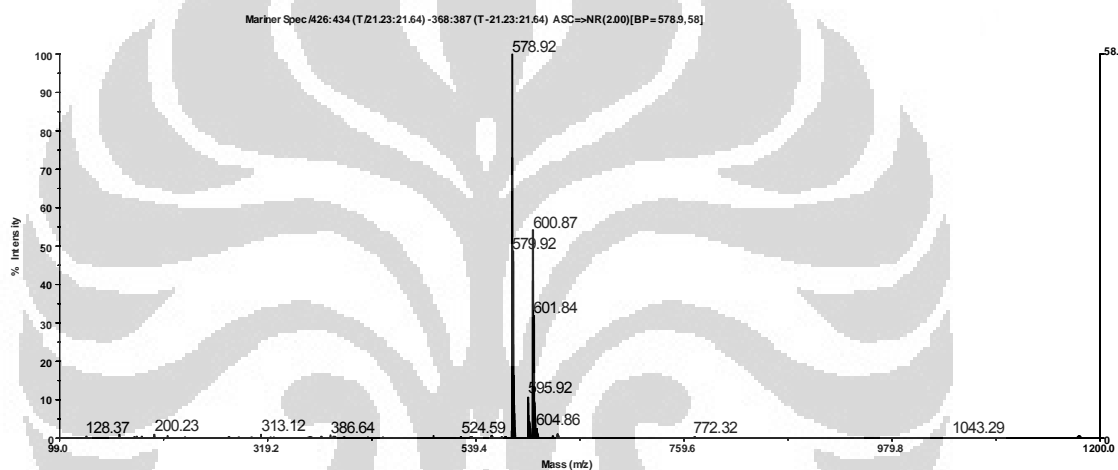
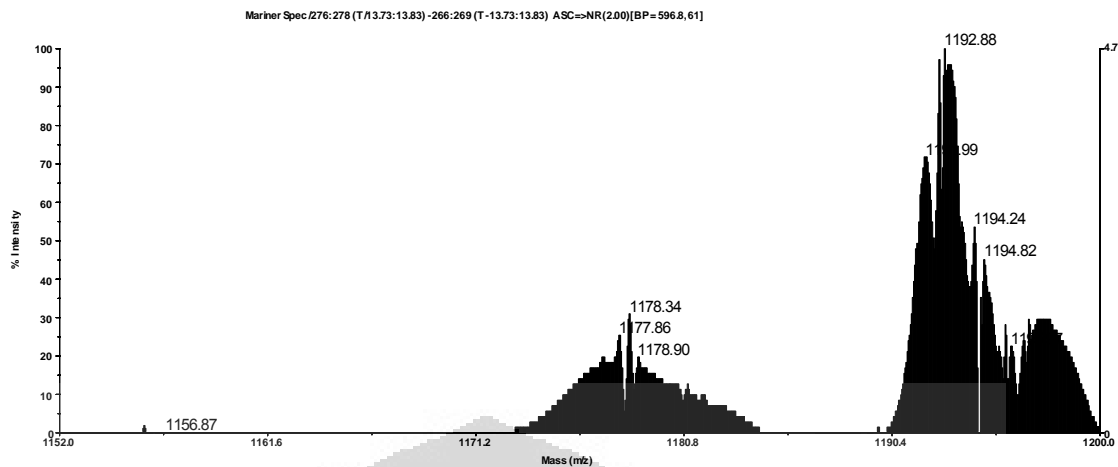


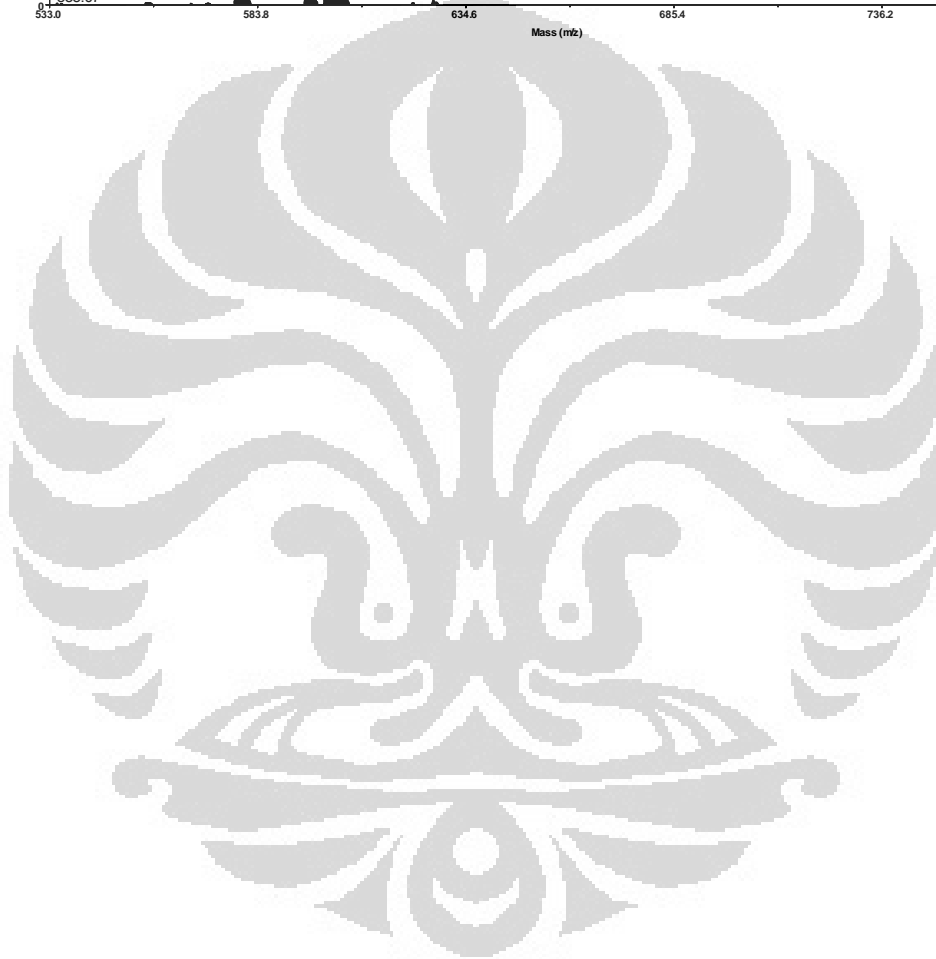
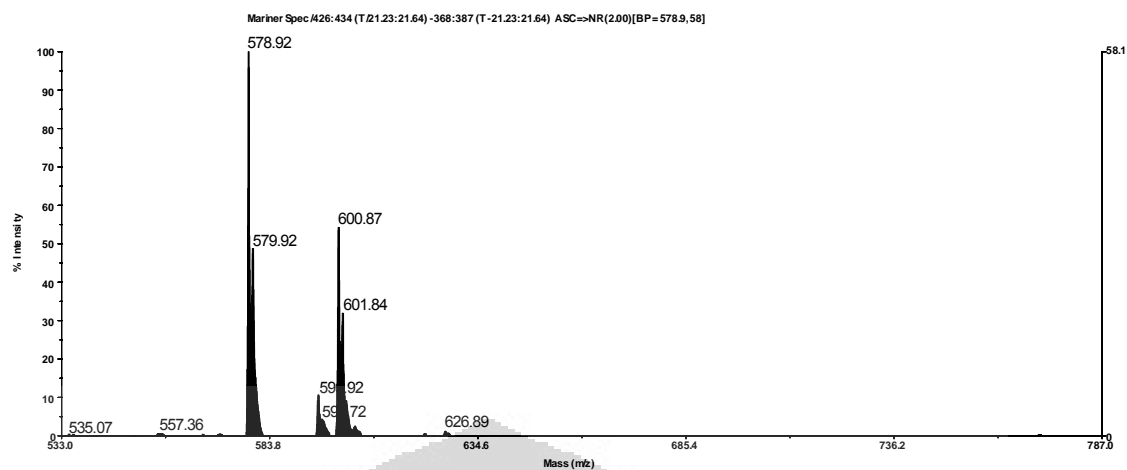


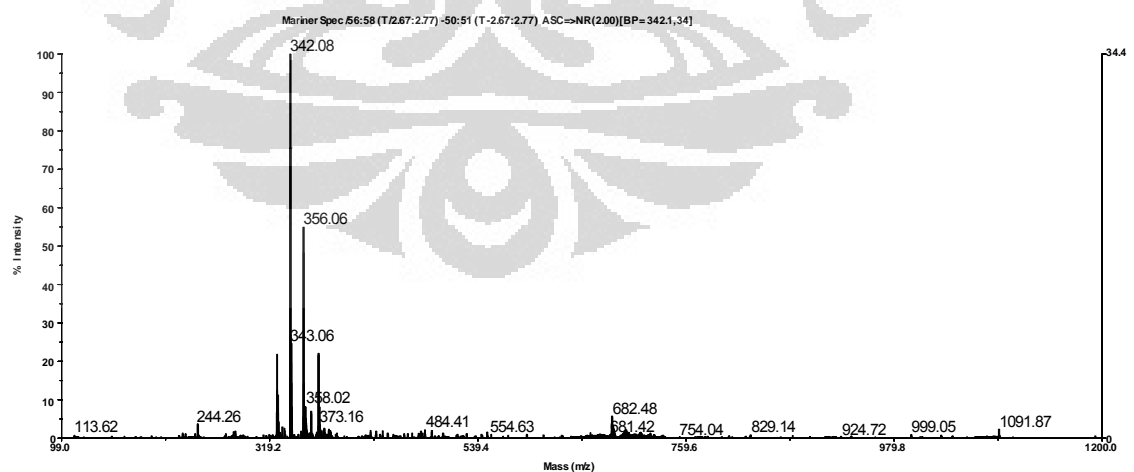
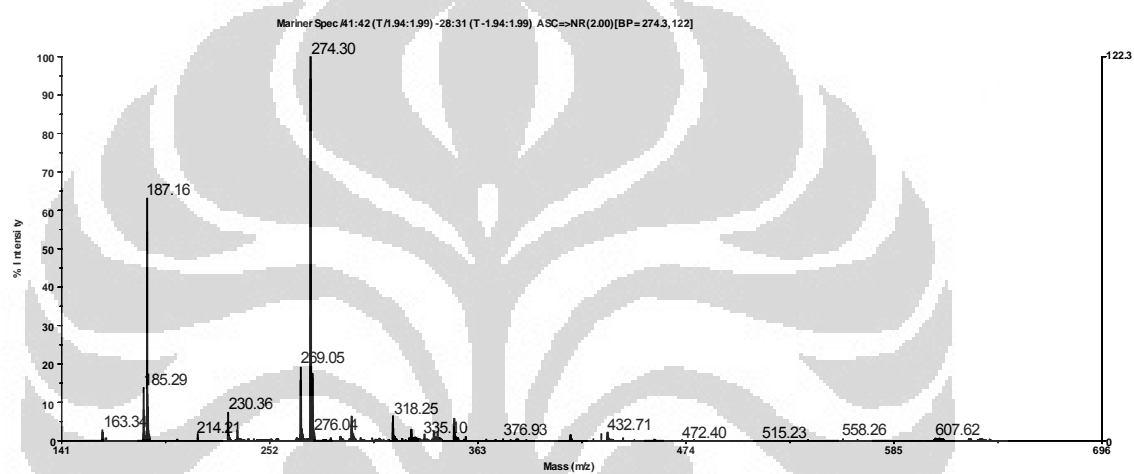
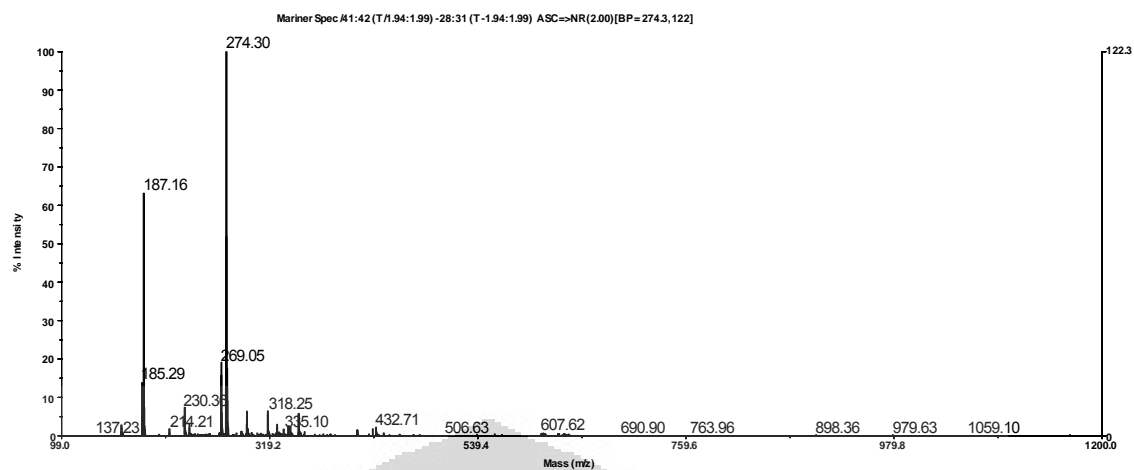


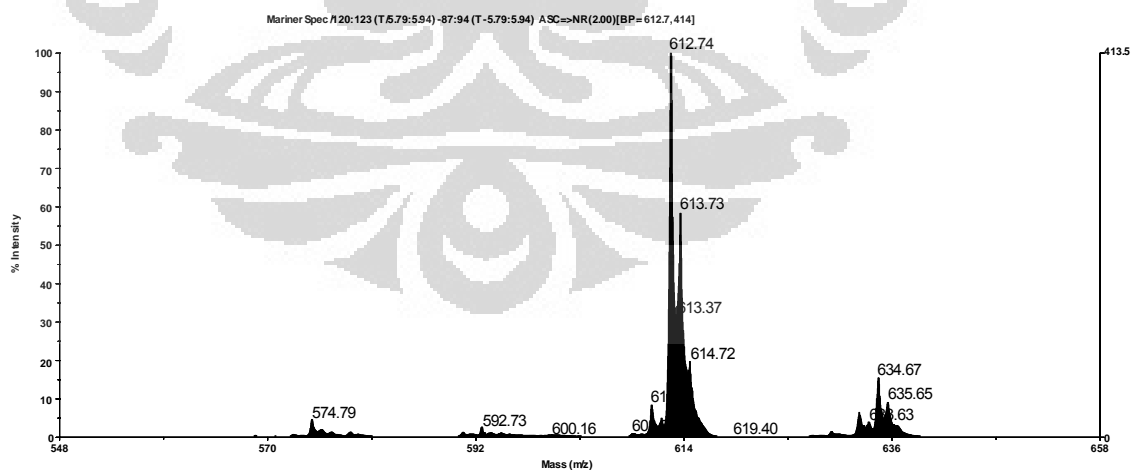
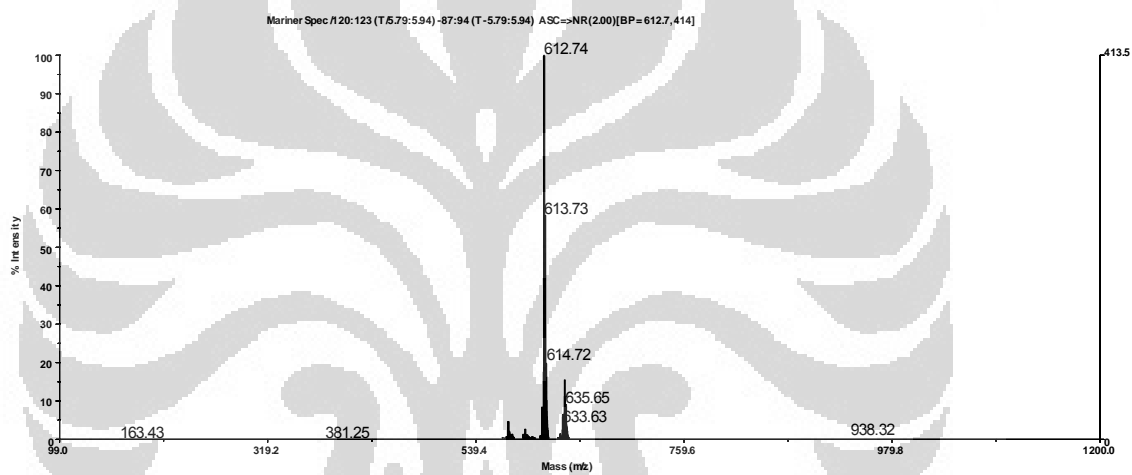
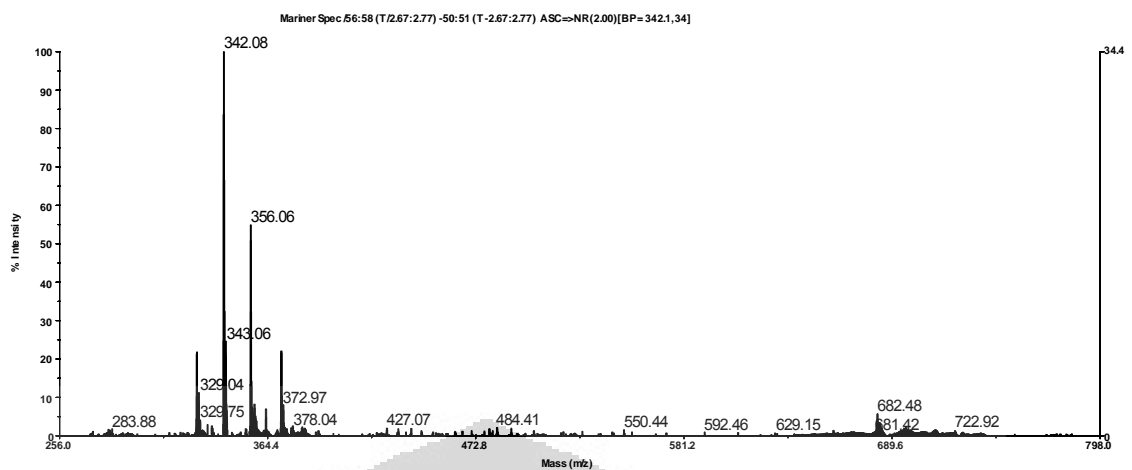


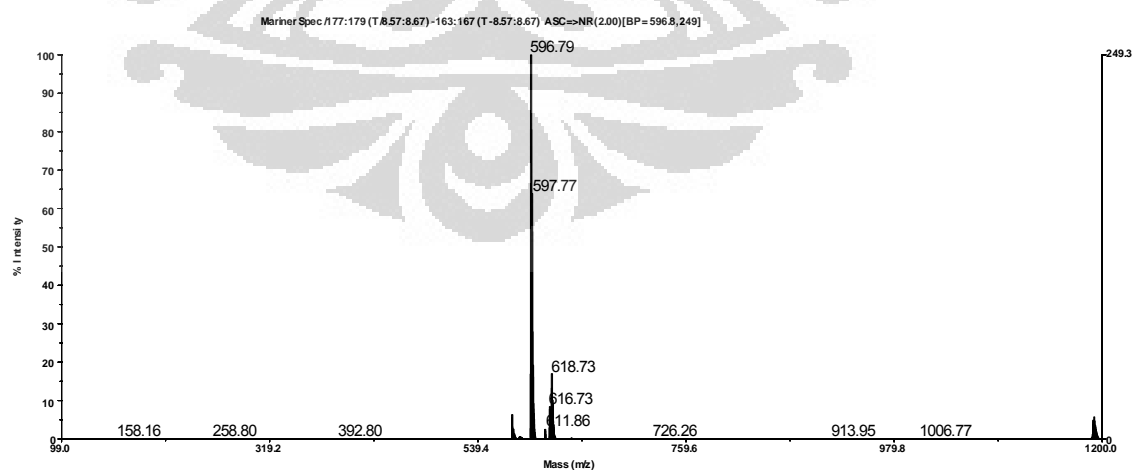
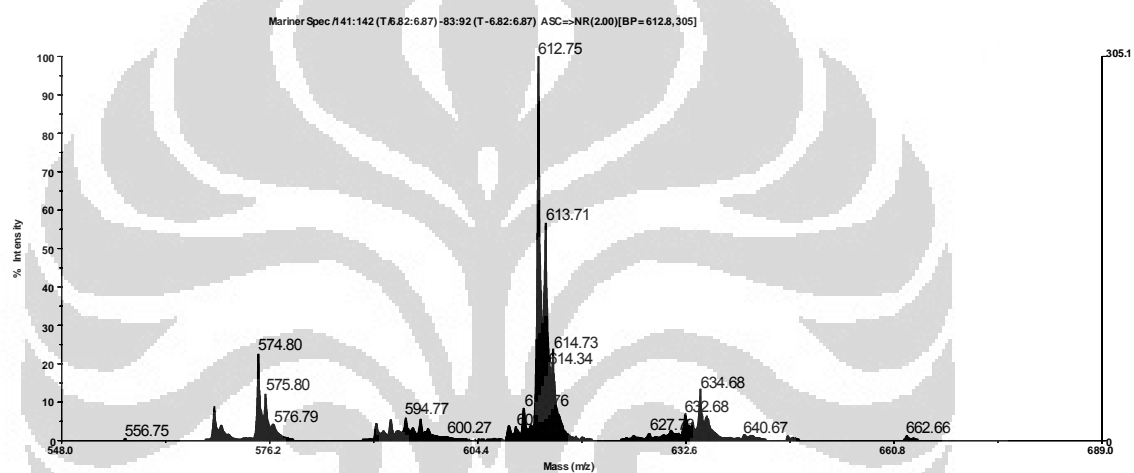
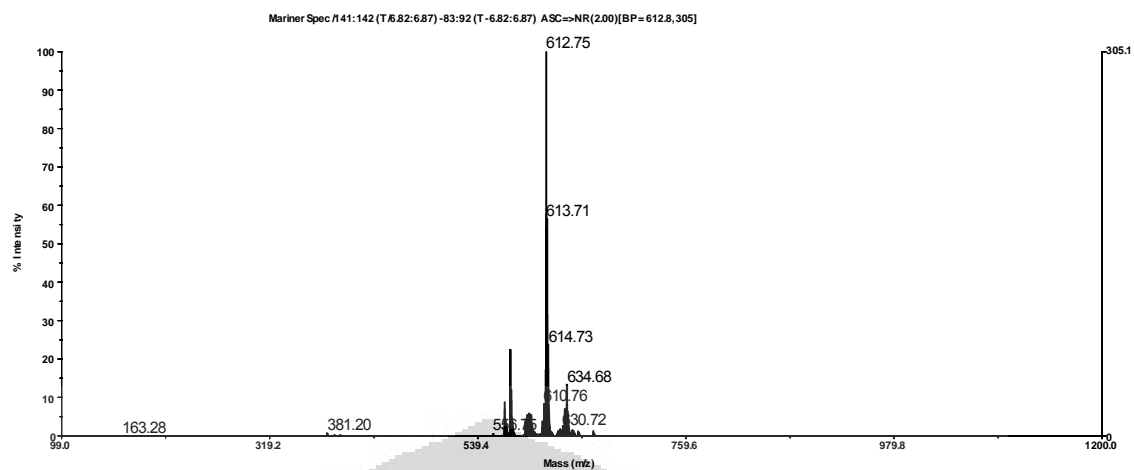


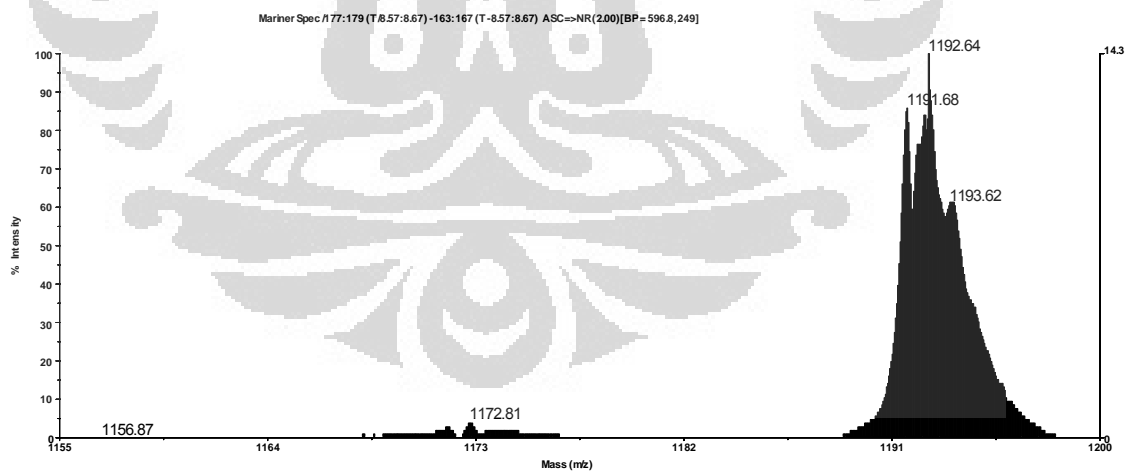
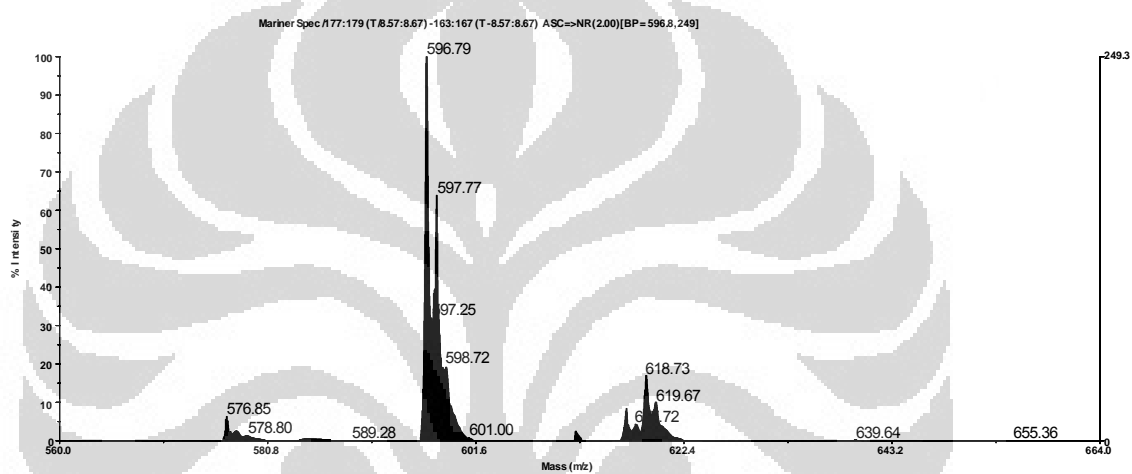
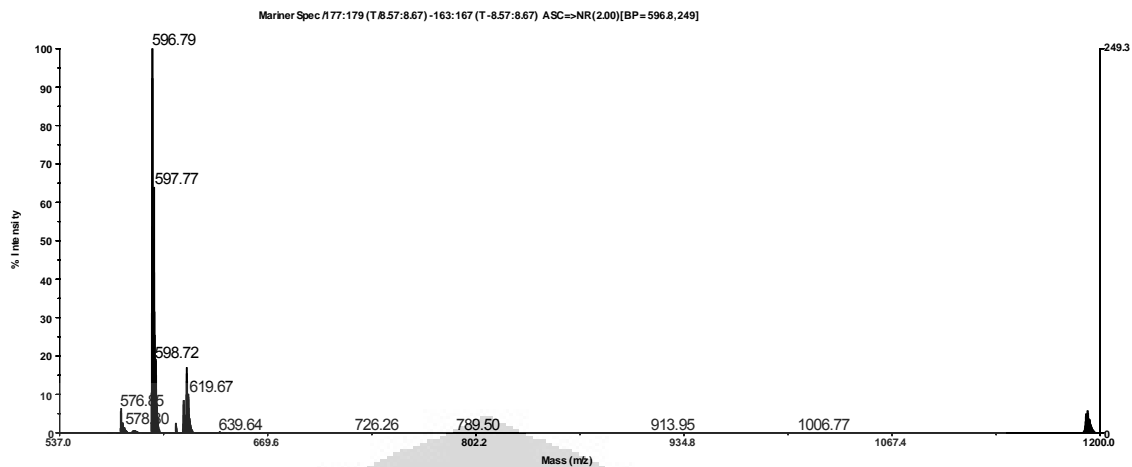


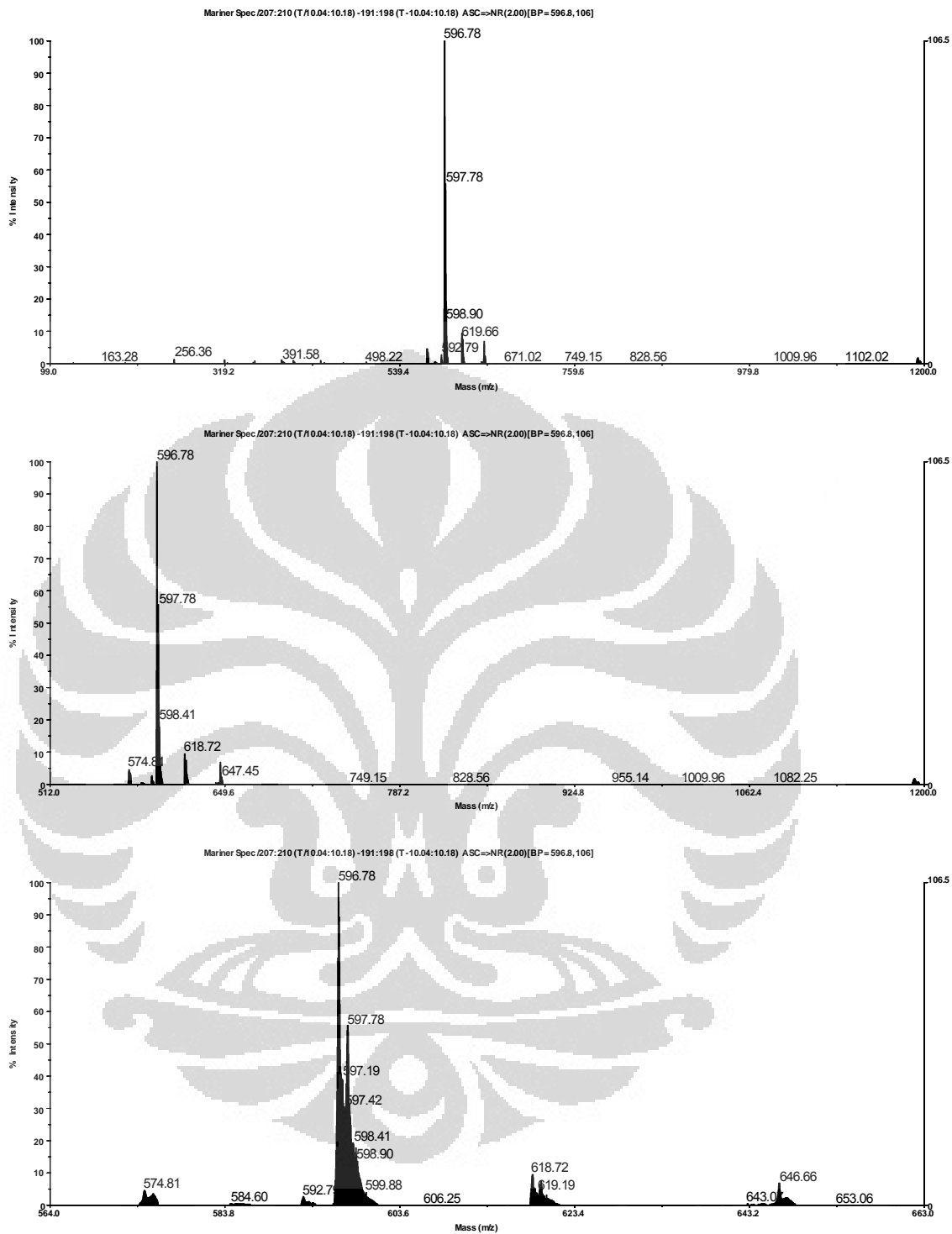


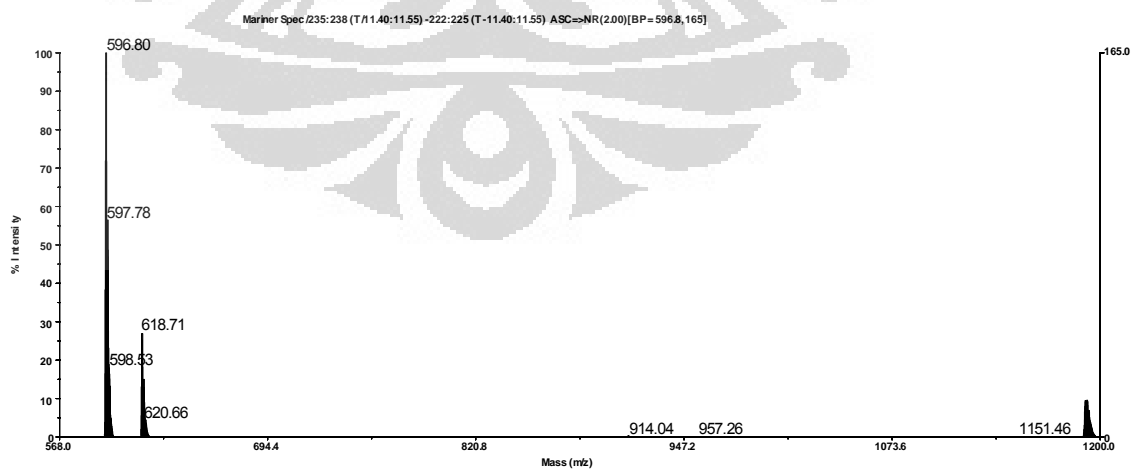
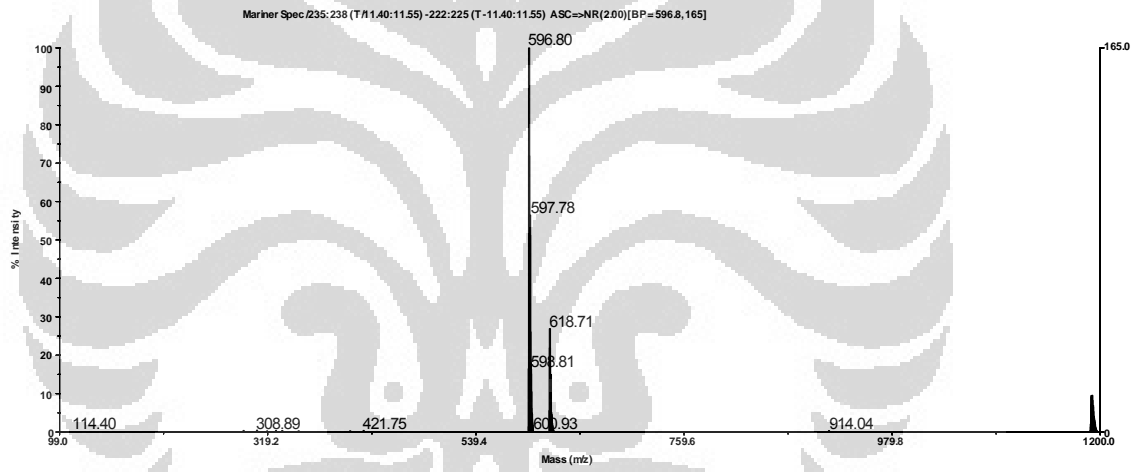
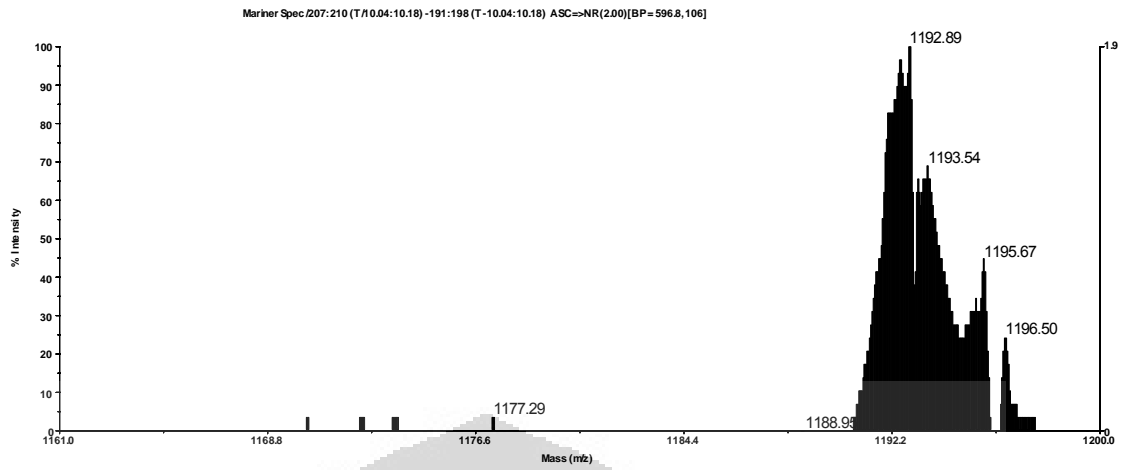


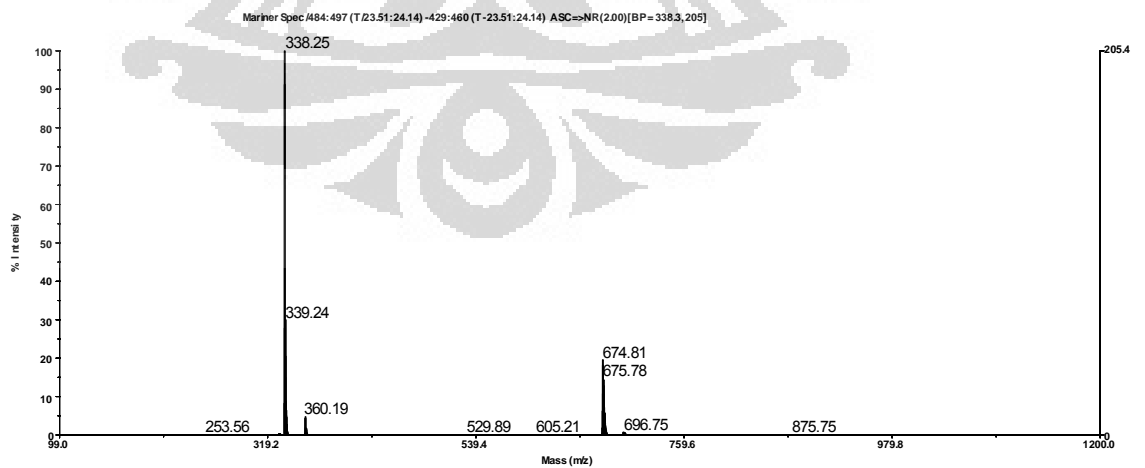
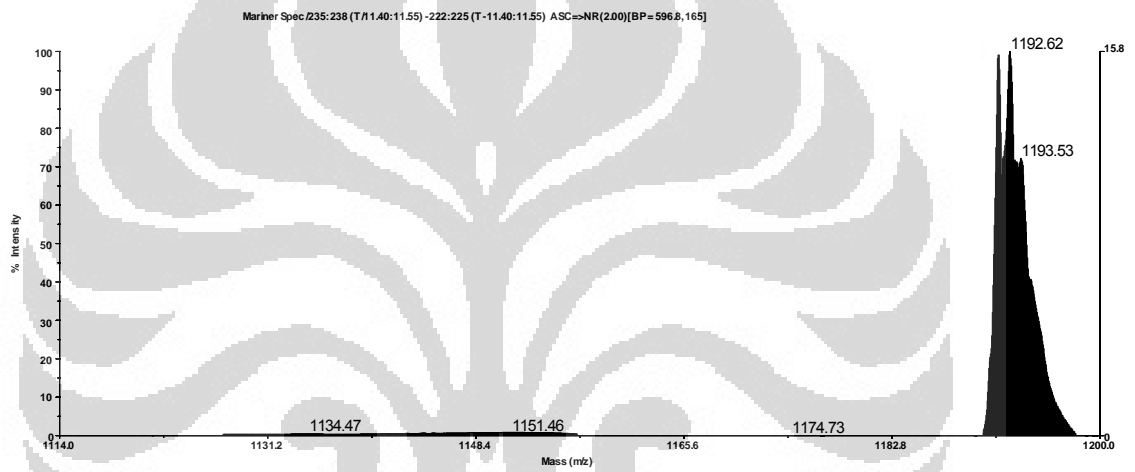
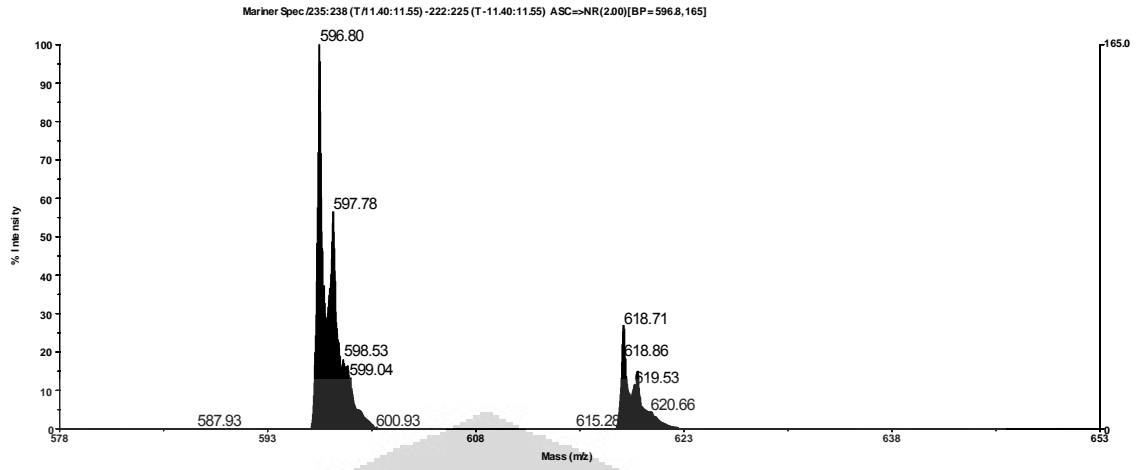


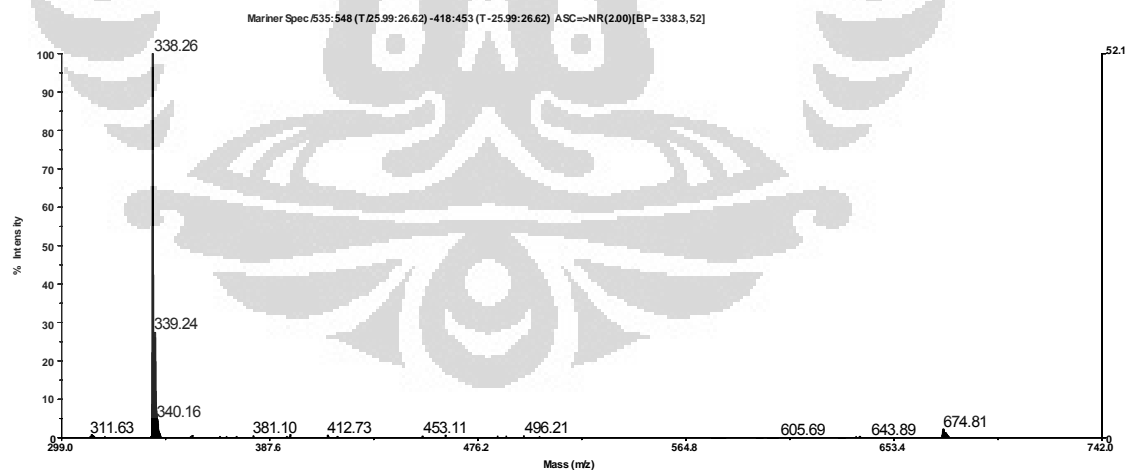
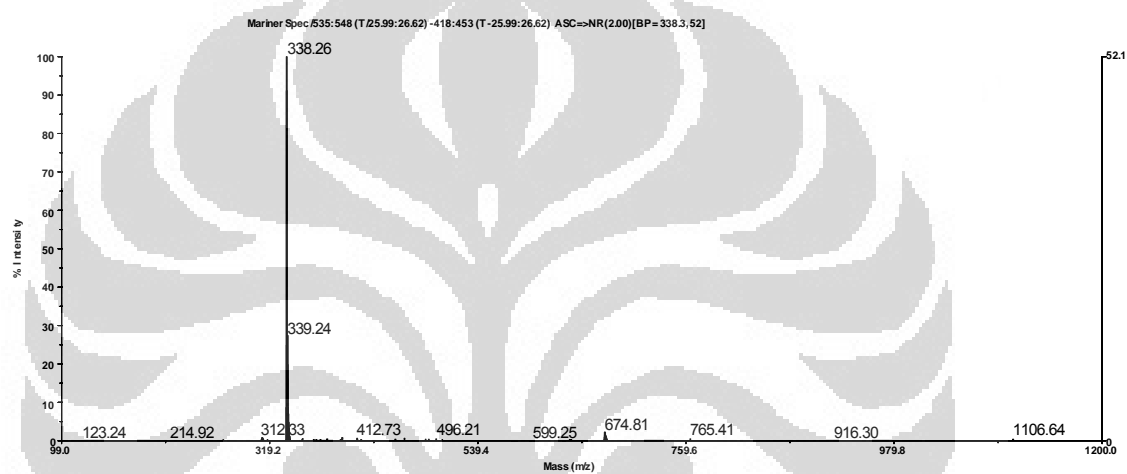
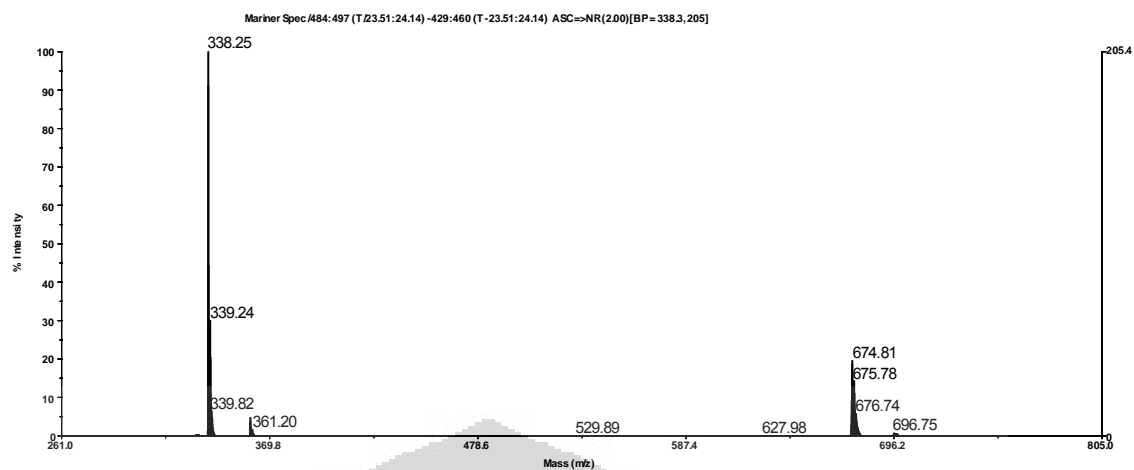


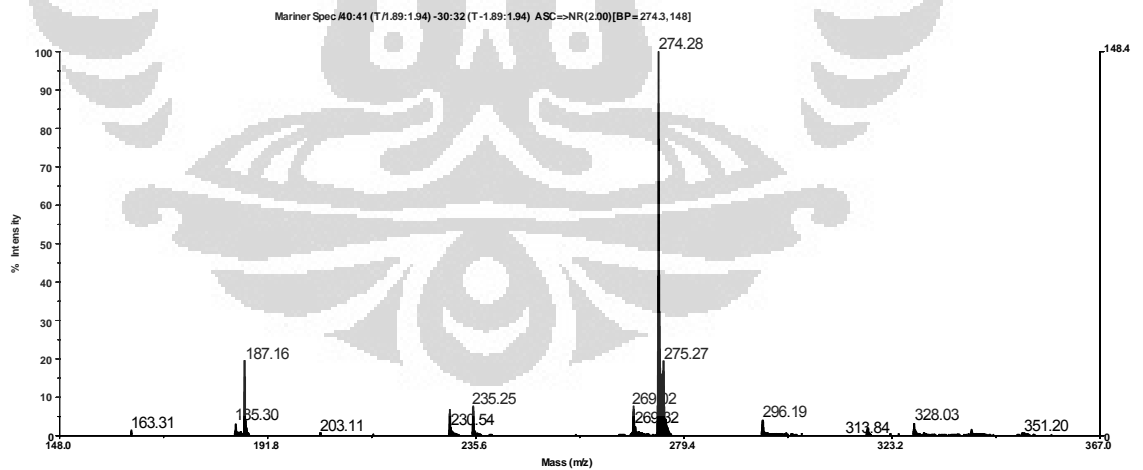
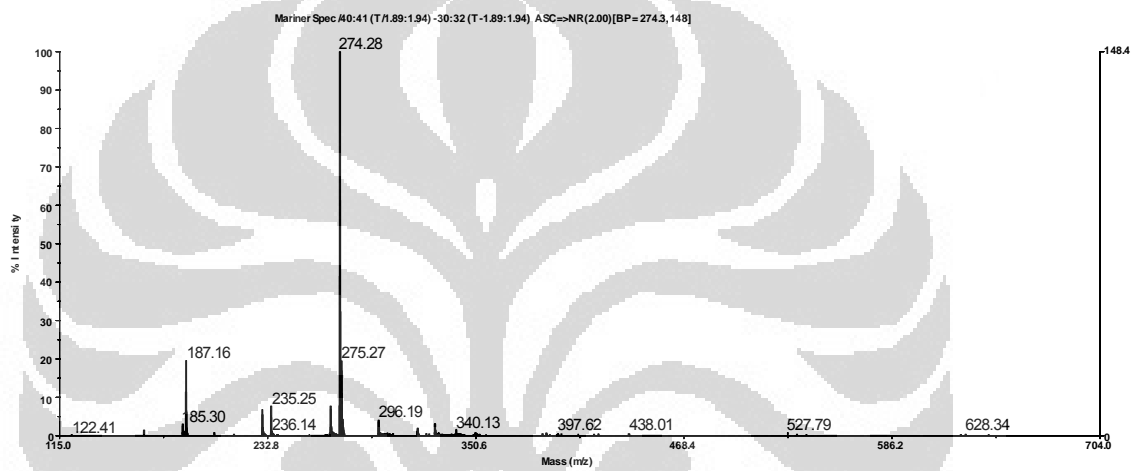
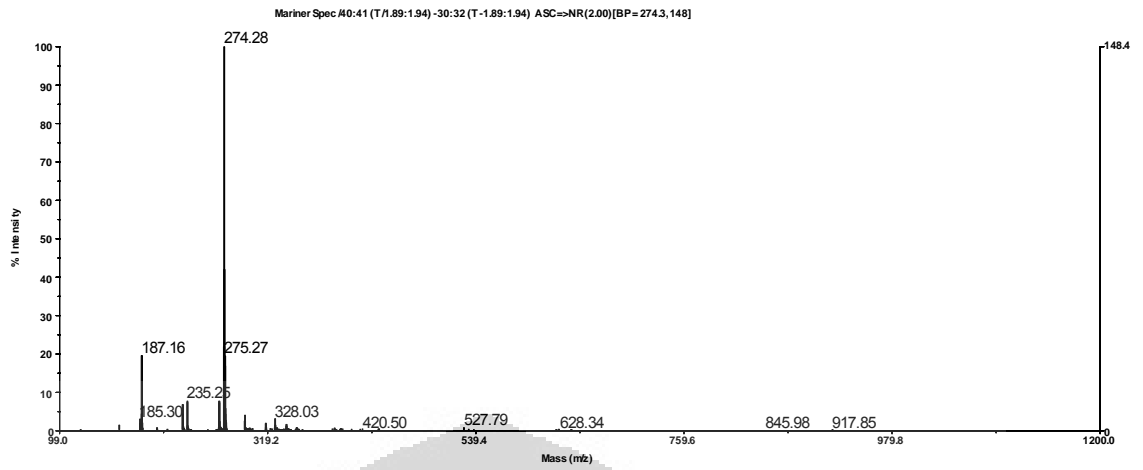


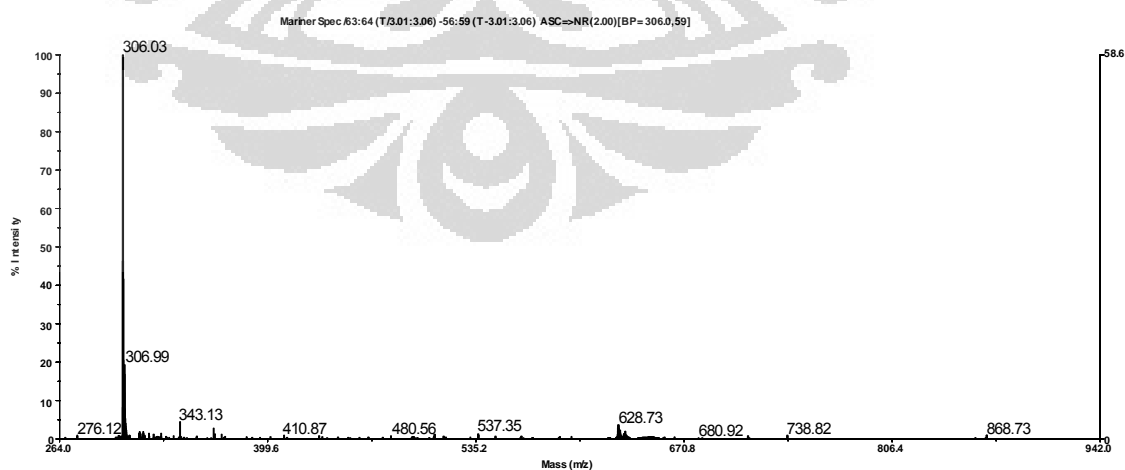
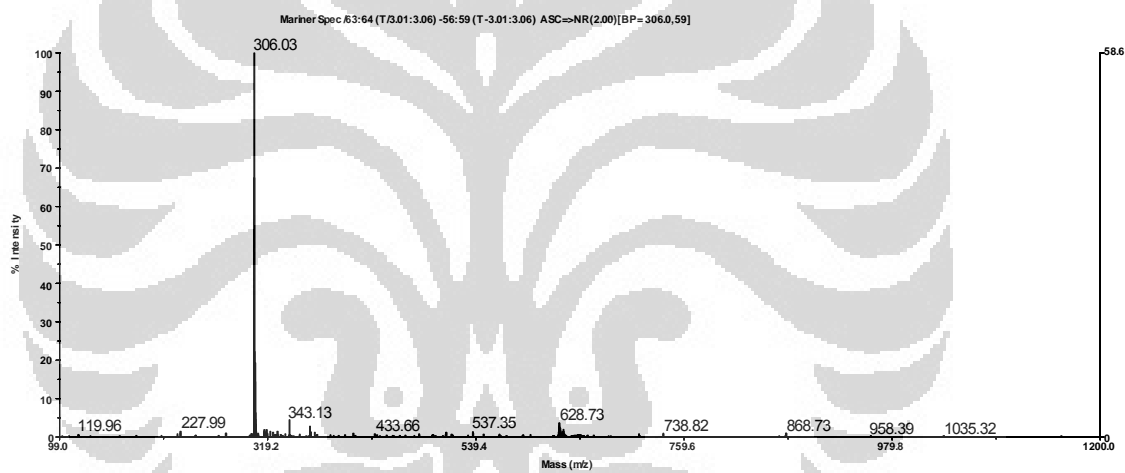
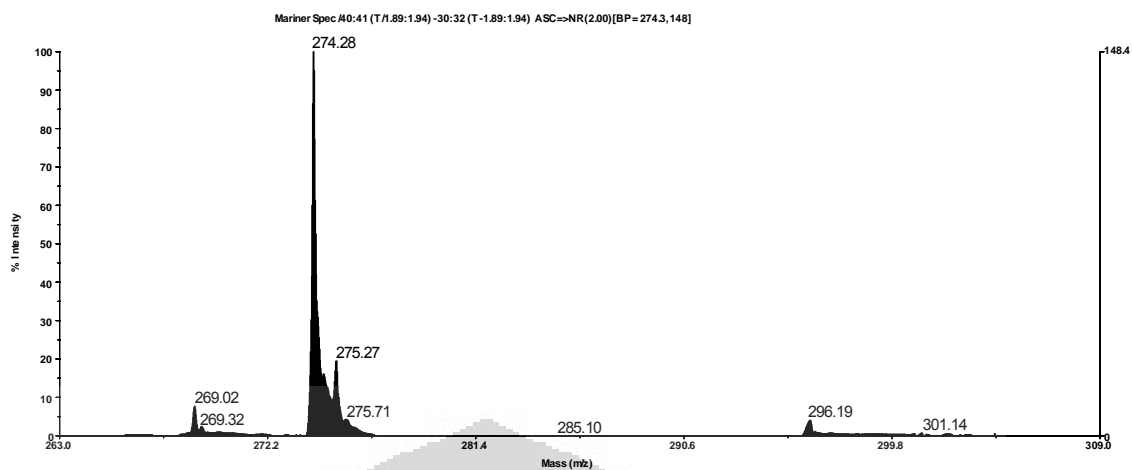


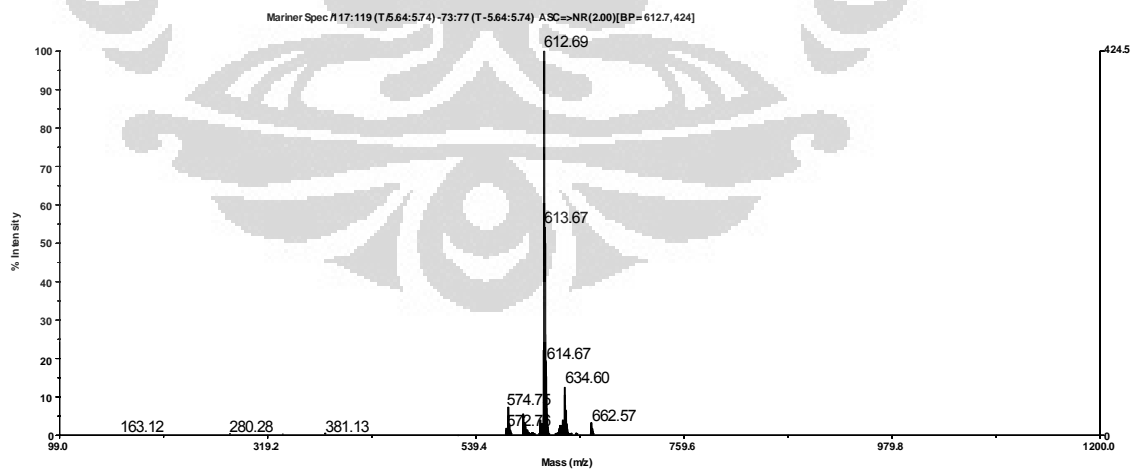
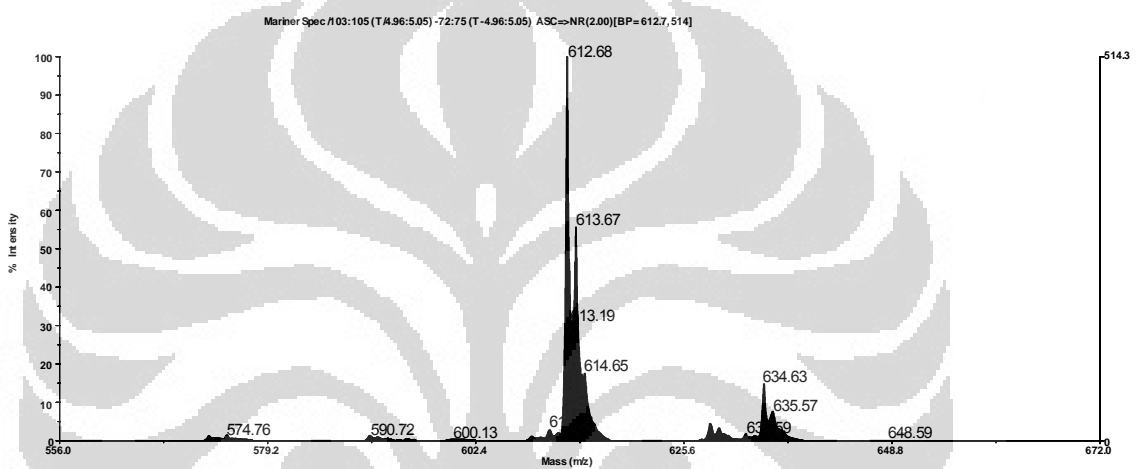
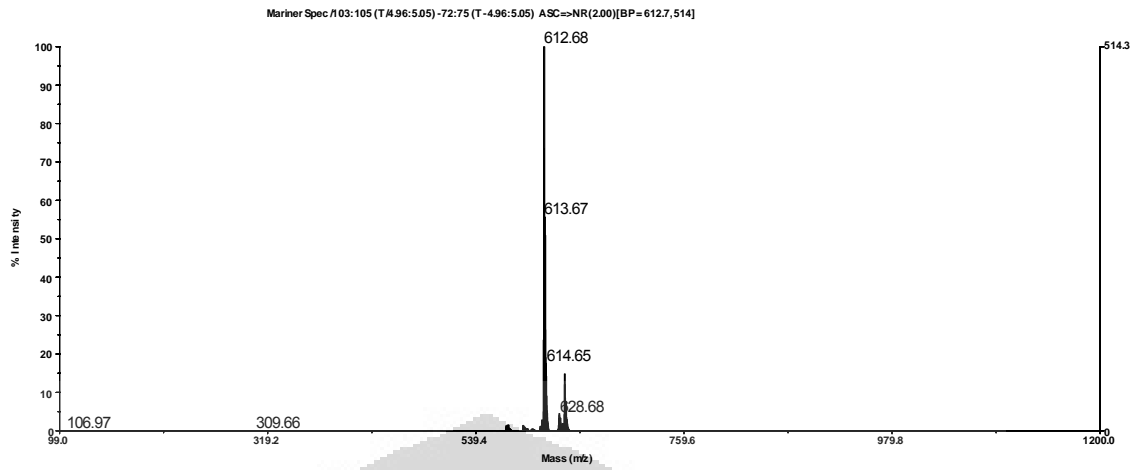


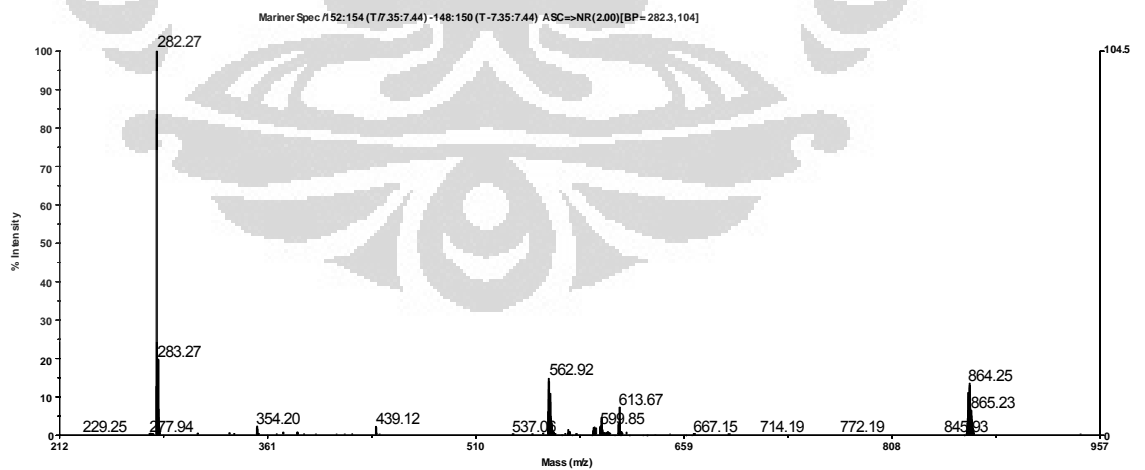
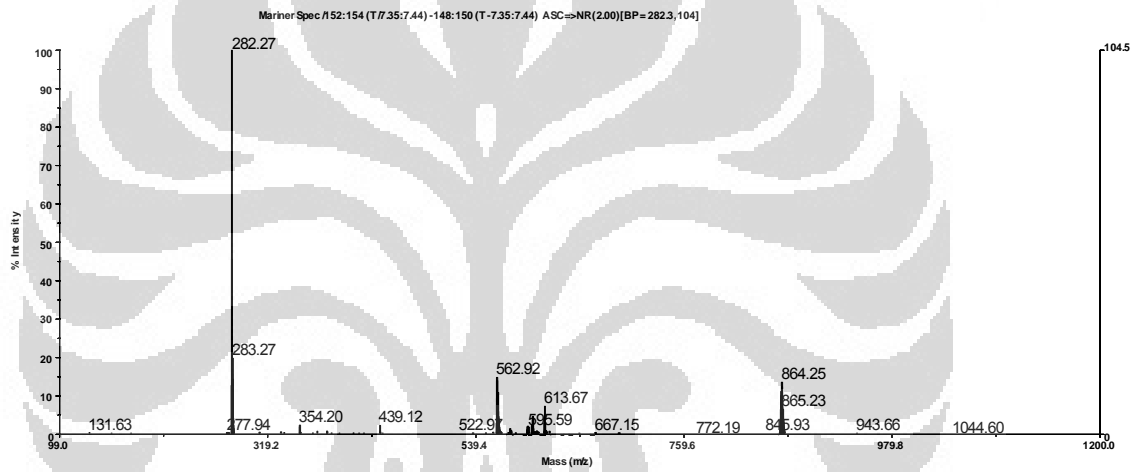
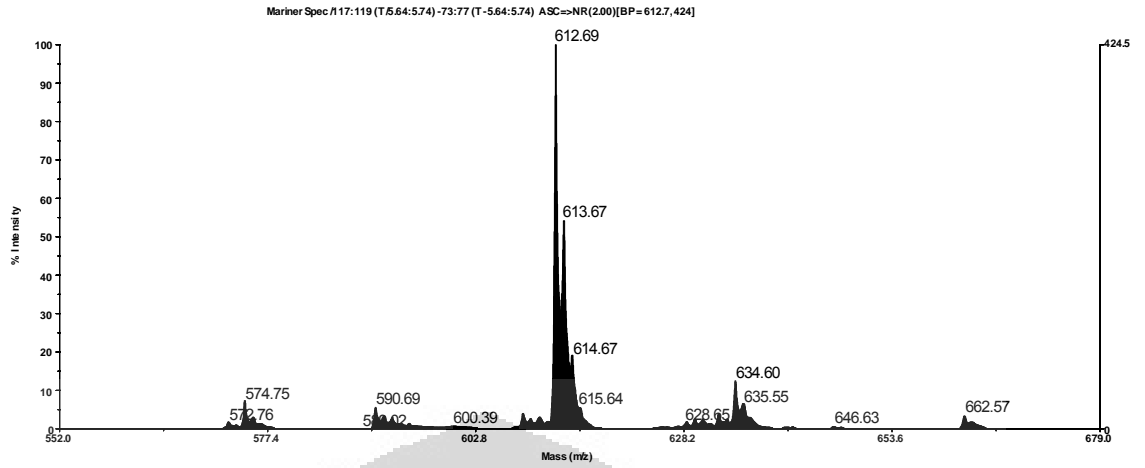


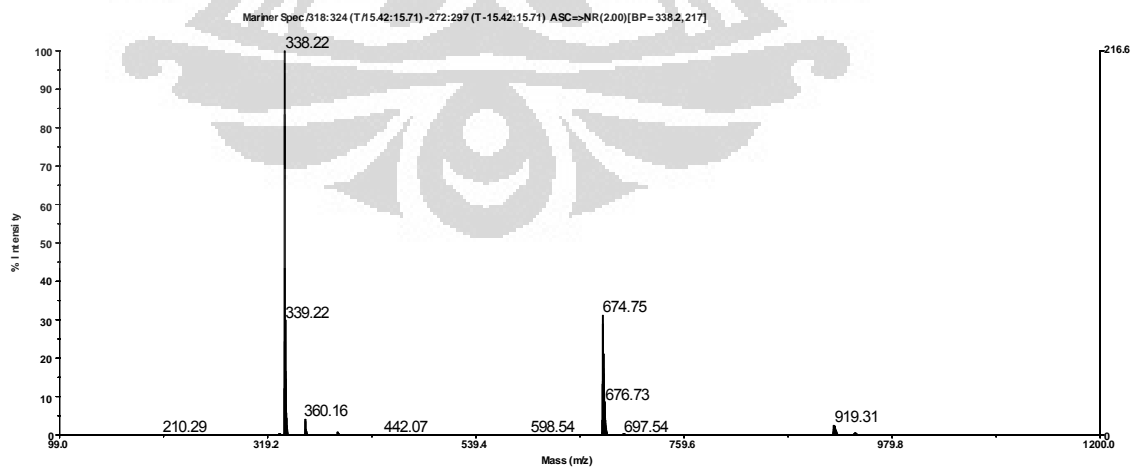
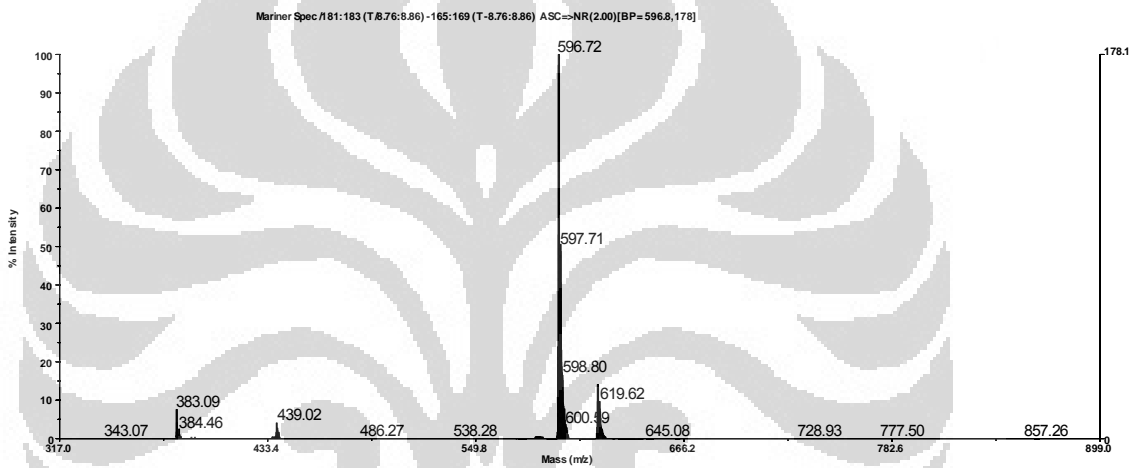
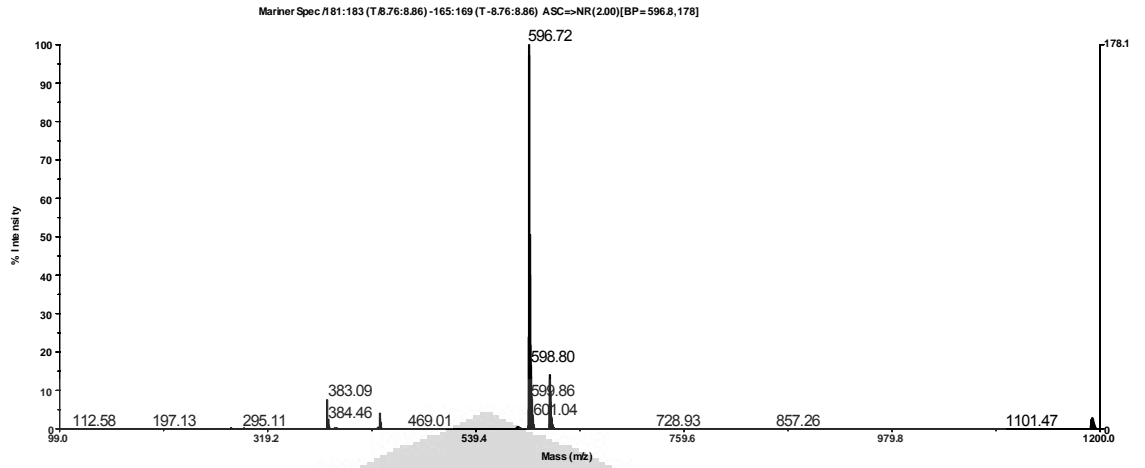


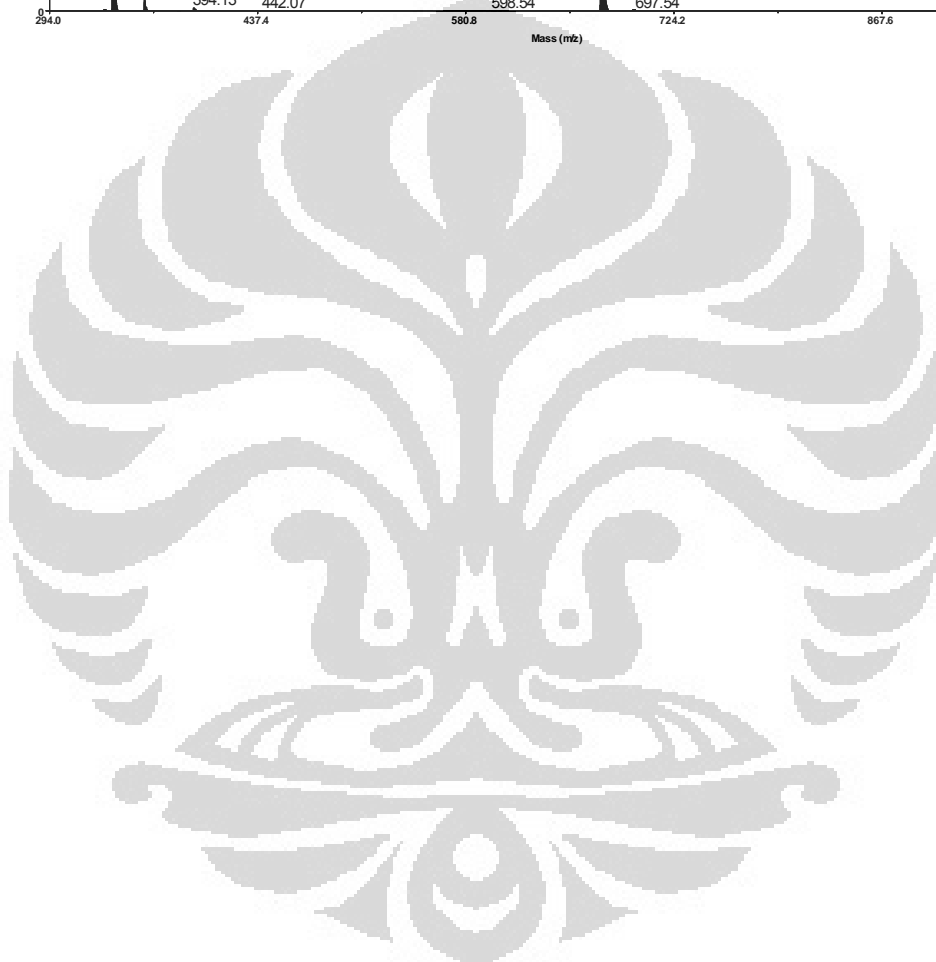
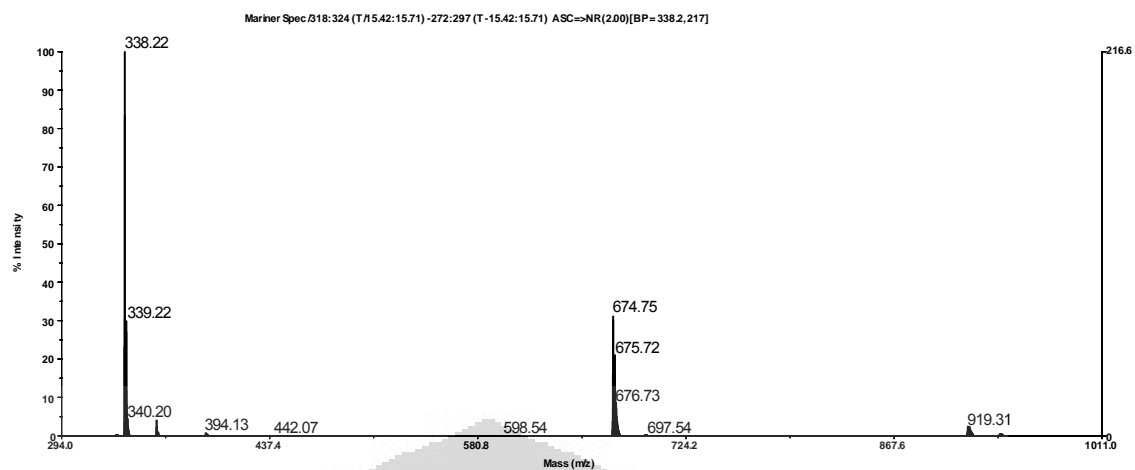












Lampiran 5 : Daftar Tabel Probit

Persentase	Probit									
	0	1	2	3	4	5	6	7	8	9
0	-	2,67	2,95	3,12	3,25	3,35	3,44	3,52	3,59	3,66
10	3,72	3,77	3,82	3,87	3,92	3,96	4,01	4,05	4,08	4,12
20	4,16	4,19	4,23	4,26	4,29	4,33	4,36	4,39	4,42	4,45
30	4,48	4,5	4,53	4,56	4,59	4,61	4,64	4,67	4,69	4,72
40	4,75	4,77	4,8	4,82	4,85	4,87	4,9	4,92	4,95	4,98
50	5,00	5,03	5,05	5,08	5,10	5,13	5,15	5,18	5,20	5,23
60	5,25	5,28	5,31	5,33	5,36	5,39	5,41	5,44	5,47	5,50
70	5,52	5,55	5,58	5,61	5,64	5,87	5,71	5,74	5,77	5,81
80	5,84	5,88	5,95	5,95	5,99	6,04	6,08	6,13	6,18	6,23
90	6,28	6,34	6,41	6,48	6,55	6,64	6,75	6,88	7,05	7,33
99	0,0	0,1	0,2	0,3	0,4	0,5	0,6	0,7	0,8	0,9
	7,33	7,37	7,41	7,46	7,51	7,58	7,65	7,75	7,89	8

Lampiran 6 : Gambar dan Tabel Perhitungan Uji BST

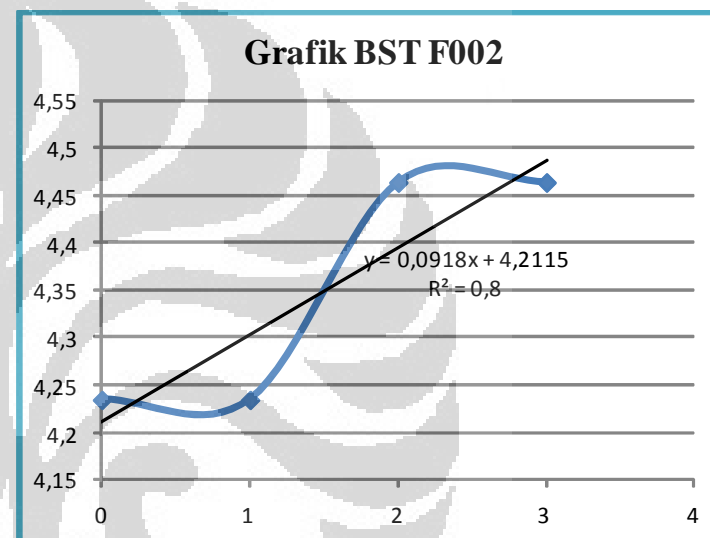
➤ Fraksi F002 atau fraksi air

Konsentrasi (ppm)	Jumlah Kematian Larva Udang		
	i	ii	iii
Kontrol	1	1	1
1000	7	2	2
100	5	3	3
10	4	3	2
1	3	3	3

Persamaan : $y = 0,0918x + 4,2115$,
dimana $y = 5,00$ maka $x = 8,589$

$$LC_{50} = 10^{(8,589)} = 38.844.602,2\text{ppm}$$

$LC_{50} > 1000$ ppm atau tidak aktif



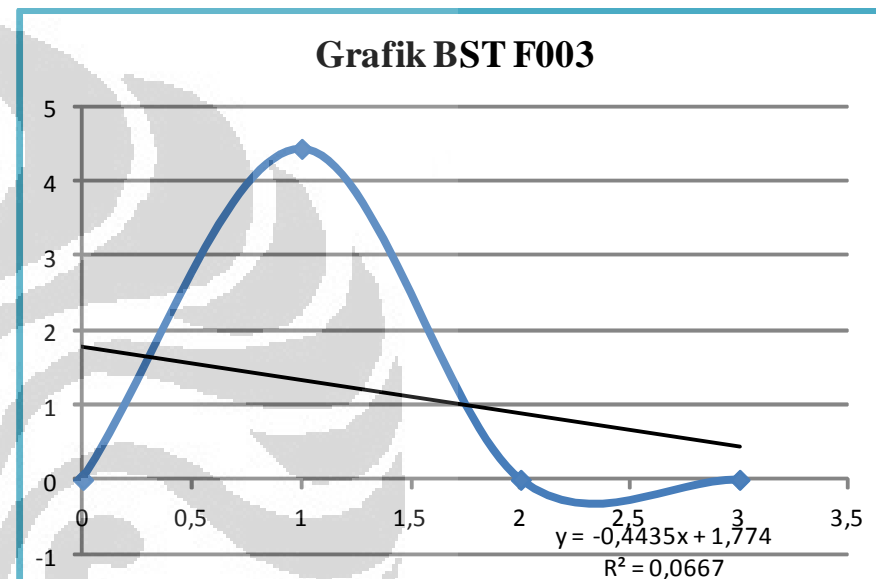
Konsentrasi (ppm)	Log Konsentrasi	Jumlah Larva yang Mati			Jumlah kematian	Persen Kematian	Persen Terkoreksi	Probit (sb-y)
		Percobaan i	Percobaan ii	Percobaan iii				
1000	3	7	2	2	11	36,67	29,63	4,4641
100	2	5	3	3	11	36,67	29,63	4,4641
10	1	4	3	2	9	30,00	22,22	4,2345
1	0	3	3	3	9	30,00	22,22	4,2345

➤ **Fraksi F003 atau fraksi heksana**

Konsentrasi (ppm)	Jumlah Kematian Larva Udang		
	i	ii	iii
Kontrol	9	7	7
1000	10	7	6
100	9	7	7
10	10	8	7
1	9	7	7

Persamaan : $y = -0,4435x + 1,774$
 dimana $y = 5,00$ maka nilai x akan minus, selain itu nilai probit tidak mencapai angka 5 dan semuanya berada di bawah, sehingga nilainya tidak menunjukkan adanya aktivitas sitotoksik atau antikanker.

$LC_{50} > 1000$ ppm atau tidak aktif



Konsentrasi (ppm)	Log Konsentrasi (sb-x)	Jumlah Larva yang Mati			Jumlah kematian	Persen Kematian	Persen Terkoreksi	Probit (sb-y)
		Percobaan i	Percobaan ii	Percobaan iii				
1000	3	10	7	6	23	76,67	0,00	-
100	2	9	7	7	23	76,67	0,00	-
10	1	10	8	7	25	83,33	28,57	4,4349
1	0	9	7	7	23	76,67	0,00	-

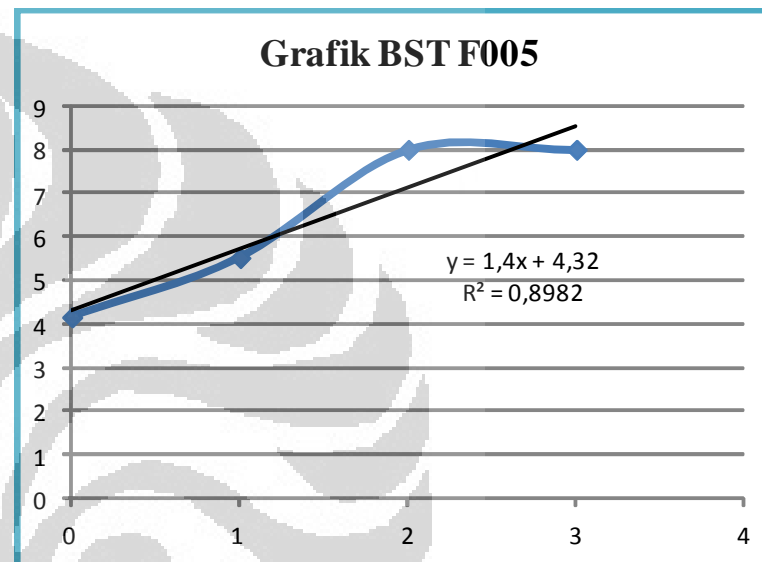
➤ **Fraksi F005 atau fraksi metanol**

Konsentrasi (ppm)	Jumlah Kematian Larva Udang		
	i	ii	iii
Kontrol	8	6	6
1000	10	10	10
100	10	10	10
10	9	9	9
1	8	8	6

Persamaan : $y = 1,4x + 4,32$,
dimana $y = 5,00$ maka $x = 0,486$

$$LC_{50} = 10^{(0,486)} = 3,062 \text{ ppm}$$

$LC_{50} < 1000 \text{ ppm}$ atau Aktif



Konsentrasi (ppm)	Log Konsentrasi	Jumlah Larva yang Mati			Jumlah kematian	Persen Kematian	Persen Terkoreksi	Probit (sb-y)
		Percobaan i	Percobaan ii	Percobaan iii				
1000	3	10	10	10	30	100,00	99,90	8
100	2	10	10	10	30	100,00	99,90	8
10	1	9	9	9	27	90,00	70,00	5,52
1	0	8	8	6	22	73,33	20,00	4,16

➤ Botol T-03

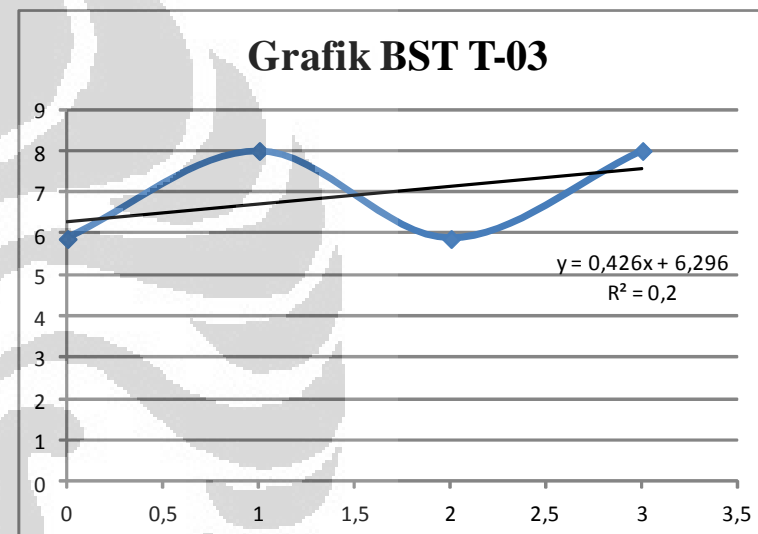
Konsentrasi (ppm)	Jumlah Larva Udang yang Mati
Kontrol	6
1000	10
100	9
10	10
1	9

Persamaan : $y = 0,426x + 6,296$,
dimana $y = 5,00$ maka $x = -3,042$

$$LC_{50} = 10^{(-3,042)} = 0,001 \text{ ppm}$$

$LC_{50} < 1000$ ppm atau Aktif

Konsentrasi (ppm)	Log Konsentrasi (sb-x)	Jumlah kematian	Persen Kematian	Persen Terkoreksi	Probit (sb-y)
1000	3	10	100,00	99,90	8
100	2	9	90,00	75,00	5,87
10	1	10	100,00	99,90	8
1	0	9	90,00	75,00	5,87



➤ Botol T-04

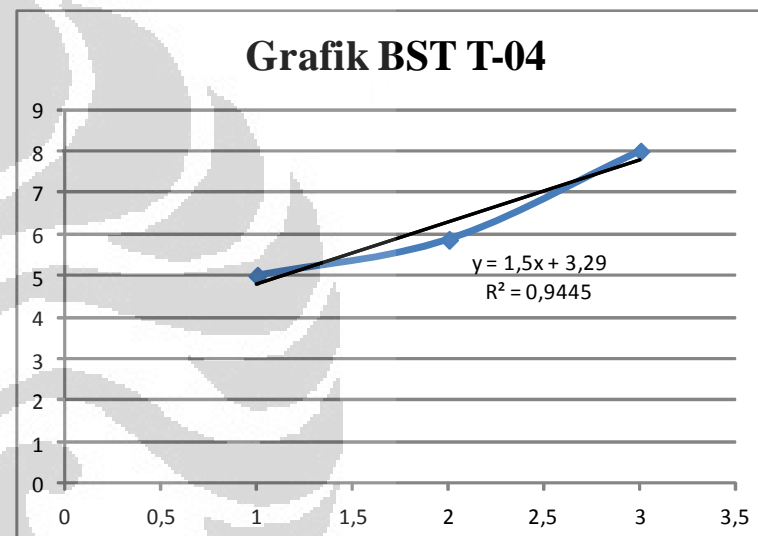
Konsentrasi (ppm)	Jumlah Larva Udang yang Mati
Kontrol	6
1000	10
100	10
10	9
1	8

Persamaan : $y = 1,5x + 3,29$,
dimana $y = 5,00$ maka $x = 1,14$

$$LC_{50} = 10^{(1,14)} = 13,804 \text{ ppm}$$

$LC_{50} < 1000 \text{ ppm}$ atau Aktif

Konsentrasi (ppm)	Log Konsentrasi (sb-x)	Jumlah kematian	Persen Kematian	Persen Terkoreksi	Probit (sb-y)
1000	3	10	100,00	99,90	8
100	2	10	100,00	99,90	8
10	1	9	90,00	75,00	5,87
1	0	8	80,00	50,00	5



➤ Botol T-05

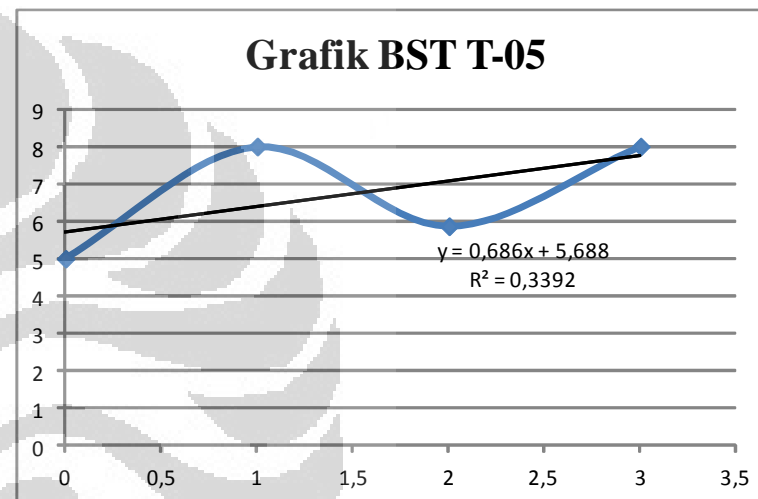
Konsentrasi (ppm)	Jumlah Larva Udang yang Mati
Kontrol	6
1000	10
100	9
10	10
1	8

Persamaan : $y = 0,686x + 5,688$,
dimana $y = 5,00$ maka $x = 1,00292$

$$LC_{50} = 10^{(1,00292)} = 10,0674 \text{ ppm}$$

$LC_{50} < 1000$ ppm atau Aktif

Konsentrasi (ppm)	Log Konsentrasi (sb-x)	Jumlah kematian	Persen Kematian	Persen Terkoreksi	Probit (sb-y)
1000	3	10	100,00	99,90	8
100	2	9	90,00	75,00	5,87
10	1	10	100,00	99,90	8
1	0	8	80,00	50,00	5



➤ **Botol T-06**

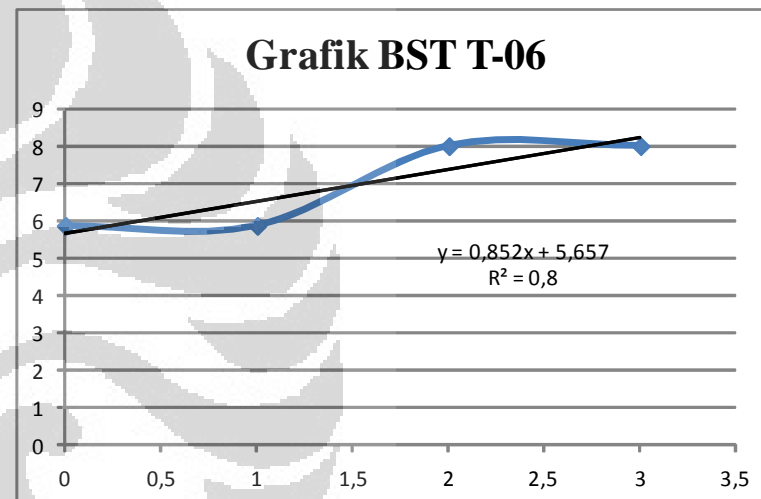
Konsentrasi (ppm)	Jumlah Larva Udang yang Mati
Kontrol	6
1000	10
100	10
10	9
1	9

Persamaan : $y = 0,852x + 5,657$
dimana $y = 5,00$ maka $x = 0,77113$

$$LC_{50} = 10^{(0,77113)} = 5,90373 \text{ ppm}$$

$LC_{50} < 1000$ ppm atau Aktif

Konsentrasi (ppm)	Log Konsentrasi (sb-x)	Jumlah kematian	Persen Kematian	Persen Terkoreksi	Probit (sb-y)
1000	3	10	100,00	99,90	8
100	2	10	100,00	99,90	8
10	1	9	90,00	75,00	5,87
1	0	9	90,00	75,00	5,87



➤ Botol T-07

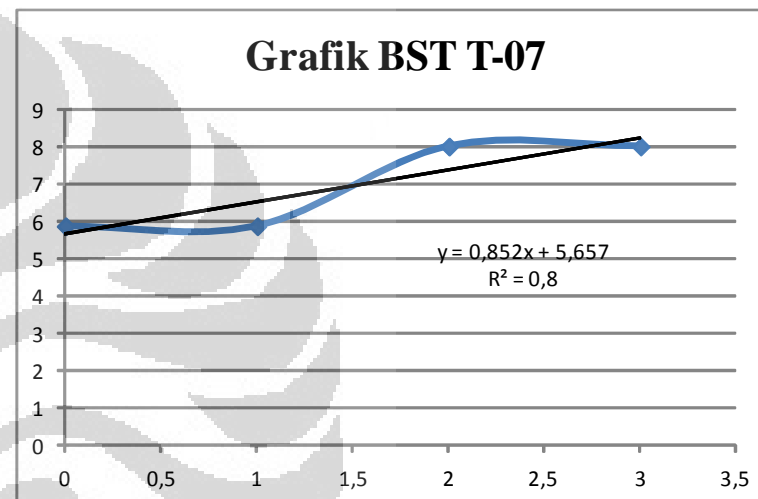
Konsentrasi (ppm)	Jumlah Larva Udang yang Mati
Kontrol	6
1000	10
100	10
10	9
1	9

Persamaan : $y = 0,852x + 5,657$
dimana $y = 5,00$ maka $x = 0,77113$

$$LC_{50} = 10^{(0,77113)} = 5,90373 \text{ ppm}$$

$LC_{50} < 1000 \text{ ppm}$ atau Aktif

Konsentrasi (ppm)	Log Konsentrasi (sb-x)	Jumlah kematian	Persen Kematian	Persen Terkoreksi	Probit (sb-y)
1000	3	10	100,00	99,90	8
100	2	10	100,00	99,90	8
10	1	9	90,00	75,00	5,87
1	0	9	100,00	99,90	5,87



➤ **Botol T-08**

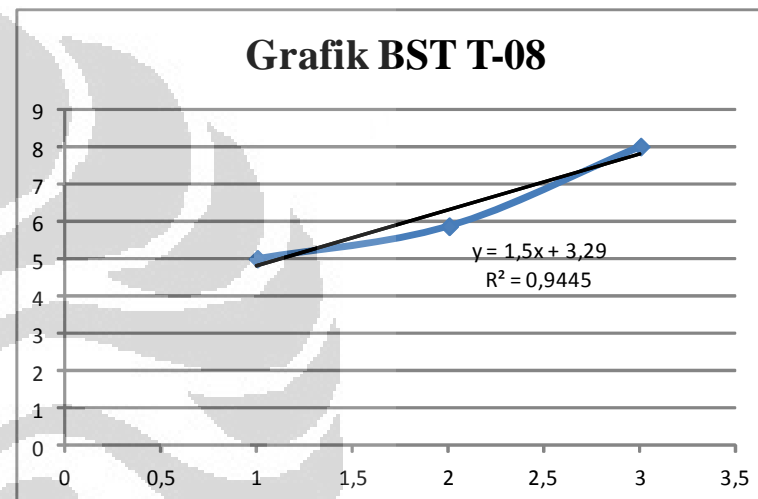
Konsentrasi (ppm)	Jumlah Larva Udang yang Mati
Kontrol	6
1000	10
100	10
10	9
1	8

Persamaan : $y = 1,5x + 3,29$,
dimana $y = 5,00$ maka $x = 1,14$

$$LC_{50} = 10^{(1,14)} = 13,804 \text{ ppm}$$

$LC_{50} < 1000$ ppm atau Aktif

Konsentrasi (ppm)	Log Konsentrasi (sb-x)	Jumlah kematian	Persen Kematian	Persen Terkoreksi	Probit (sb-y)
1000	3	10	100,00	99,90	8
100	2	10	100,00	99,90	8
10	1	9	90,00	75,00	5,87
1	0	8	80,00	50,00	5



➤ Botol T-09

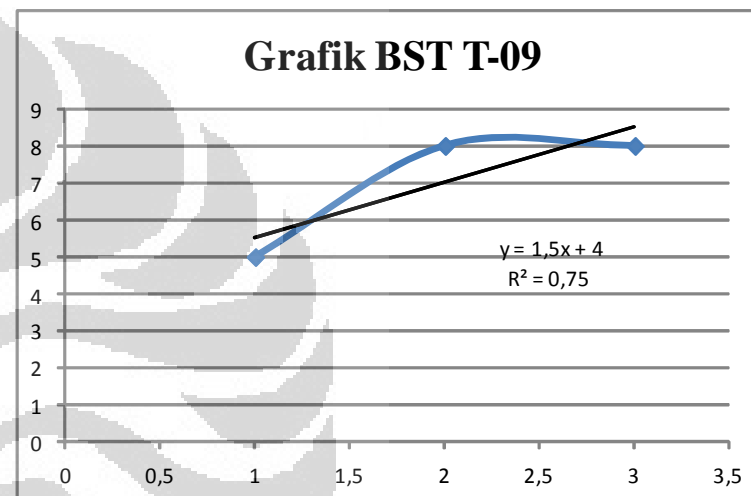
Konsentrasi (ppm)	Jumlah Larva Udang yang Mati
Kontrol	6
1000	10
100	10
10	8
1	6

Persamaan : $y = 1,5x + 4$,
dimana $y = 5,00$ maka $x = 0,667$

$$LC_{50} = 10^{(0,667)} = 4,6416 \text{ ppm}$$

$LC_{50} < 1000 \text{ ppm}$ atau Aktif

Konsentrasi (ppm)	Log Konsentrasi (sb-x)	Jumlah kematian	Persen Kematian	Persen Terkoreksi	Probit (sb-y)
1000	3	10	100,00	99,90	8
100	2	10	100,00	99,90	8
10	1	8	80,00	50,00	5
1	0	6	60,00	-	-



➤ Botol T-10

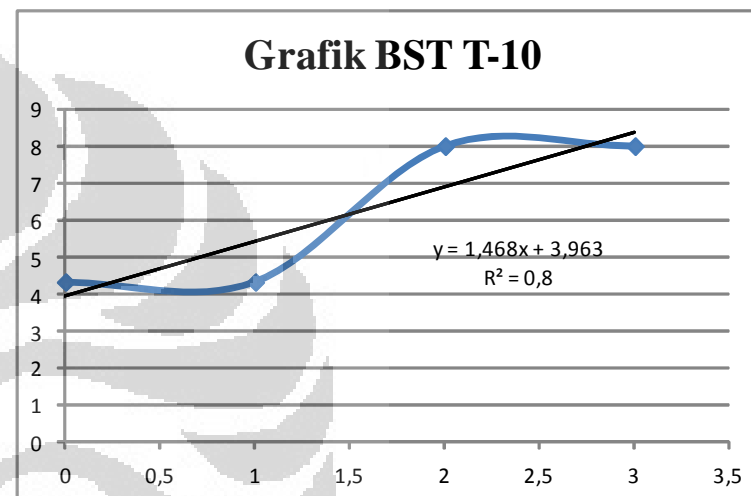
Konsentrasi (ppm)	Jumlah Larva Udang yang Mati
Kontrol	6
1000	10
100	10
10	7
1	7

Persamaan : $y = 1,468x + 3,963$
dimana $y = 5,00$ maka $x = 0,7064$

$$LC_{50} = 10^{(0,7064)} = 5,08632 \text{ ppm}$$

$LC_{50} < 1000 \text{ ppm}$ atau Aktif

Konsentrasi (ppm)	Log Konsentrasi (sb-x)	Jumlah kematian	Persen Kematian	Persen Terkoreksi	Probit (sb-y)
1000	3	10	100,00	99,90	8
100	2	10	100,00	99,90	8
10	1	7	70,00	25,00	4,33
1	0	7	70,00	25,00	4,33



➤ Botol T-11

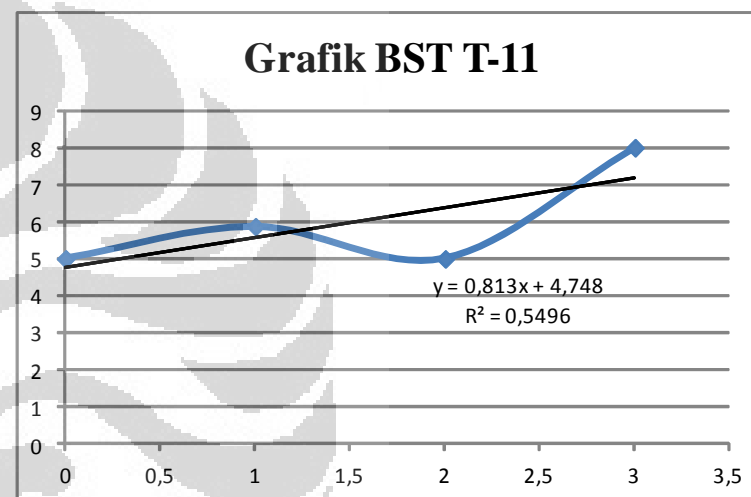
Konsentrasi (ppm)	Jumlah Larva Udang yang Mati
Kontrol	6
1000	10
100	8
10	9
1	8

Persamaan : $y = 0,813x + 4,748$
dimana $y = 5,00$ maka $x = 0,30996$

$$LC_{50} = 10^{(0,30996)} = 2,04156 \text{ ppm}$$

$LC_{50} < 1000 \text{ ppm}$ atau Aktif

Konsentrasi (ppm)	Log Konsentrasi (sb-x)	Jumlah kematian	Persen Kematian	Persen Terkoreksi	Probit (sb-y)
1000	3	10	100,00	99,90	8
100	2	8	80,00	50,00	5
10	1	9	90,00	75,00	5,87
1	0	8	80,00	50,00	5



➤ Botol T-12

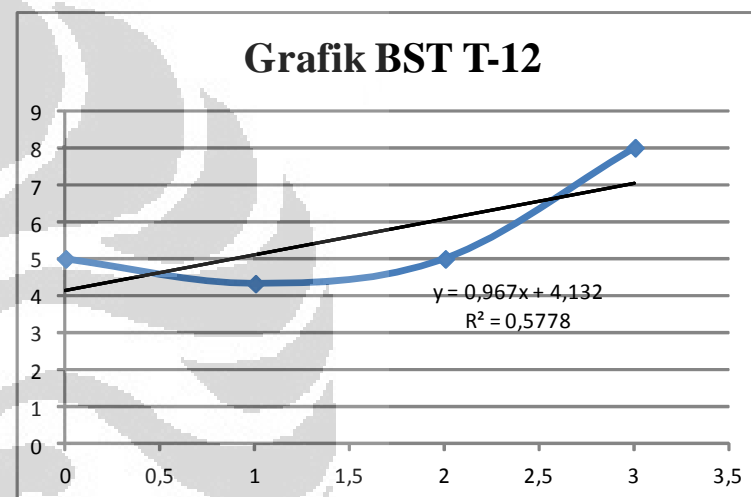
Konsentrasi (ppm)	Jumlah Larva Udang yang Mati
Kontrol	6
1000	10
100	8
10	7
1	8

Persamaan : $y = 0,967x + 4,132$
dimana $y = 5,00$ maka $x = 0,89762$

$$LC_{50} = 10^{(0,89762)} = 7,8999 \text{ ppm}$$

$LC_{50} < 1000 \text{ ppm}$ atau Aktif

Konsentrasi (ppm)	Log Konsentrasi (sb-x)	Jumlah kematian	Persen Kematian	Persen Terkoreksi	Probit (sb-y)
1000	3	10	100,00	99,90	8
100	2	8	80,00	50,00	5
10	1	7	70,00	25,00	4,33
1	0	8	80,00	50,00	5



➤ **Botol T-13**

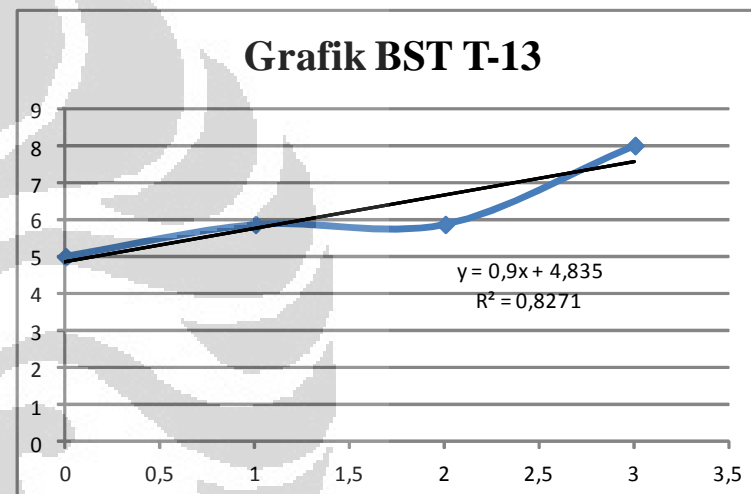
Konsentrasi (ppm)	Jumlah Larva Udang yang Mati
Kontrol	6
1000	10
100	9
10	9
1	8

Persamaan : $y = 0,9x + 4,835$
dimana $y = 5,00$ maka $x = 0,1833$

$$LC_{50} = 10^{(0,1833)} = 1,5252 \text{ ppm}$$

$LC_{50} < 1000$ ppm atau Aktif

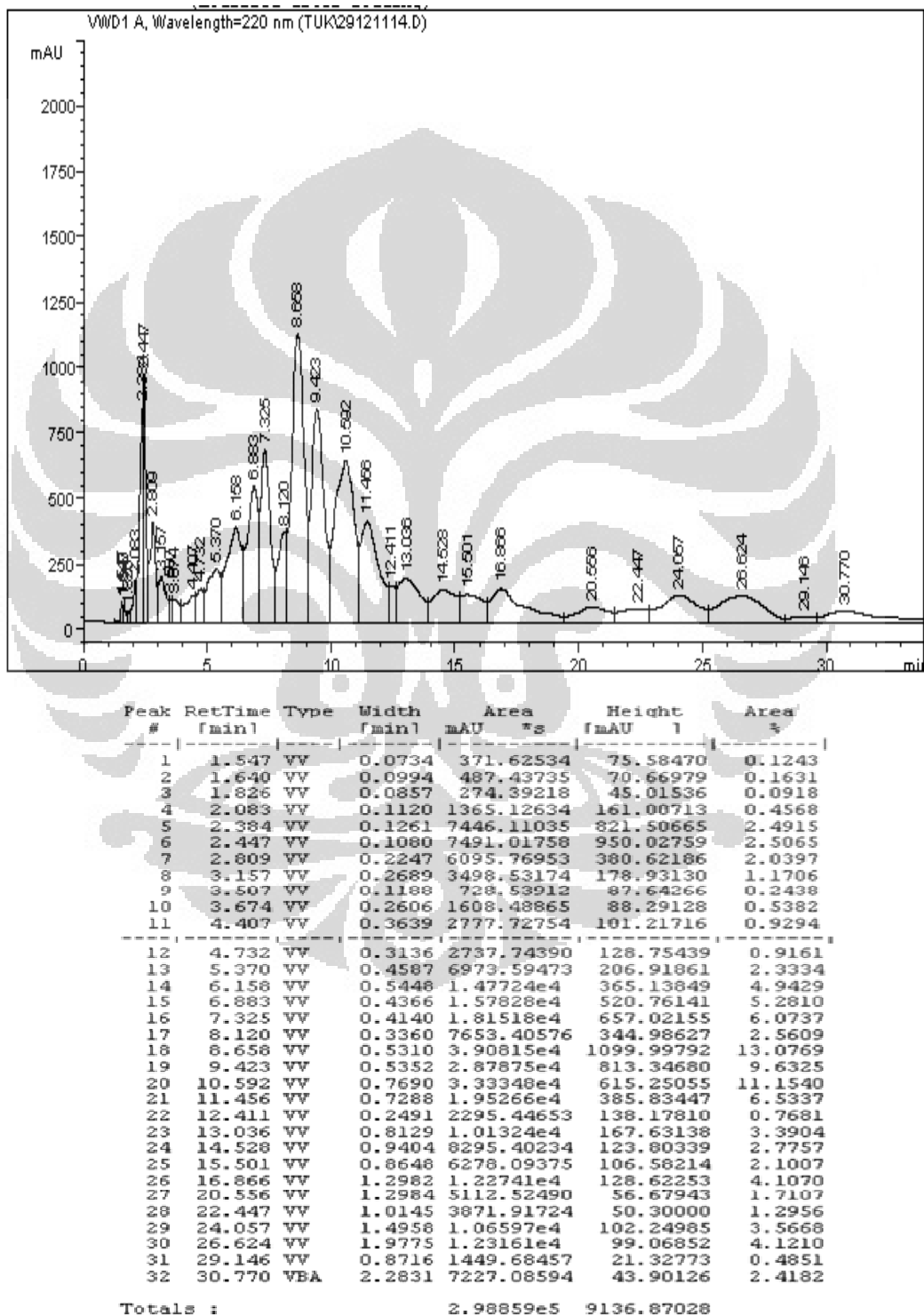
Konsentrasi (ppm)	Log Konsentrasi (sb-x)	Jumlah kematian	Persen Kematian	Persen Terkoreksi	Probit (sb-y)
1000	3	10	100,00	99,90	8
100	2	9	90,00	75,00	5,87
10	1	9	90,00	75,00	5,87
1	0	8	80,00	50,00	5



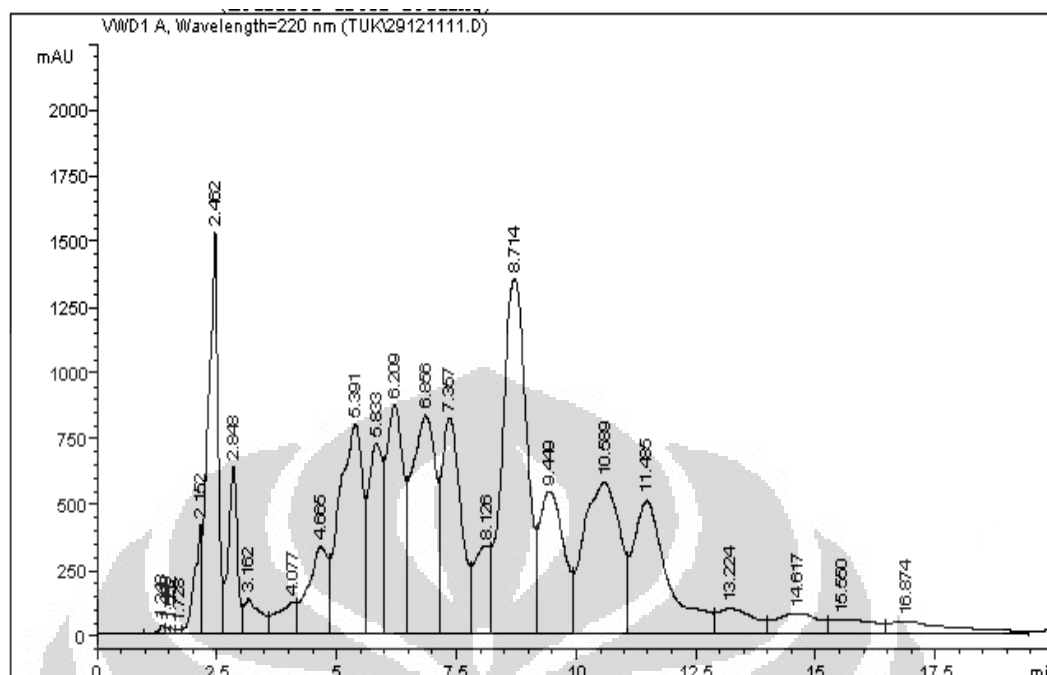
Lampiran 7 : Hasil HPLC Botol T-03 hingga T-12

Spesifikasi kolom : kolom *reverse phase* C₁₈, panjang 250 mm, diameter 4 mm merek Agilent 1100 series.

➤ Botol T-03



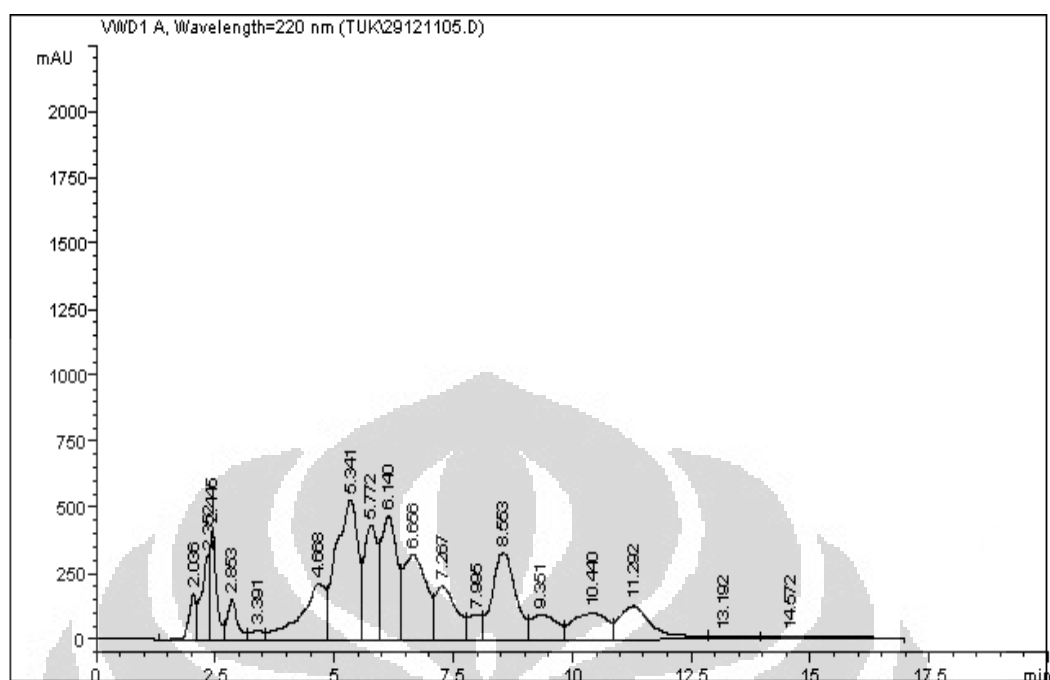
➤ **Botol T-04**



Peak #	RetTime [min]	Type	Width [min]	Area mAU *s	Height [mAU]	Area %
1	1.348	PV	0.1111	238.75882	29.30718	0.0763
2	1.449	VV	0.0801	131.89690	24.00664	0.0421
3	1.552	VV	0.0947	132.55313	20.02473	0.0424
4	1.728	VV	0.1105	128.91156	17.54551	0.0412
5	2.152	VV	0.1351	4301.01025	411.21606	1.3745
6	2.462	VV	0.1923	2.15127e4	1524.70142	6.8747
7	2.848	VV	0.2010	8349.99512	630.96997	2.6684
8	3.162	VV	0.3103	3047.13281	130.47600	0.9738
9	4.077	VV	0.3793	3336.31958	117.51373	1.0662
10	4.665	VV	0.3934	9496.25684	331.95984	3.0347
11	5.391	VV	0.4584	2.67502e4	794.29675	8.5484
12	5.833	VV	0.2980	1.44317e4	724.29474	4.6119
13	6.209	VV	0.3612	2.16700e4	872.33527	6.9250
14	6.856	VV	0.4885	2.84113e4	829.40802	9.0793
15	7.357	VV	0.4211	2.31824e4	821.18457	7.4083
16	8.126	VV	0.3291	7329.72461	331.76199	2.3423
17	8.714	VV	0.5313	4.78073e4	1344.62366	15.2776
18	9.449	VV	0.5350	1.91708e4	540.00574	6.1264
19	10.589	VV	0.6955	3.02652e4	576.49365	9.6717
20	11.485	VV	0.7466	2.54850e4	505.76022	8.1442
21	13.224	VV	0.7978	5051.65137	93.70609	1.6143
22	14.617	VV	0.9382	4754.81738	76.14510	1.5195
23	15.550	VV	0.9848	3354.08325	51.05579	1.0719
24	16.874	VV	1.3641	4584.39160	45.29941	1.4650

Totals : 3.12924e5 1.08441e4

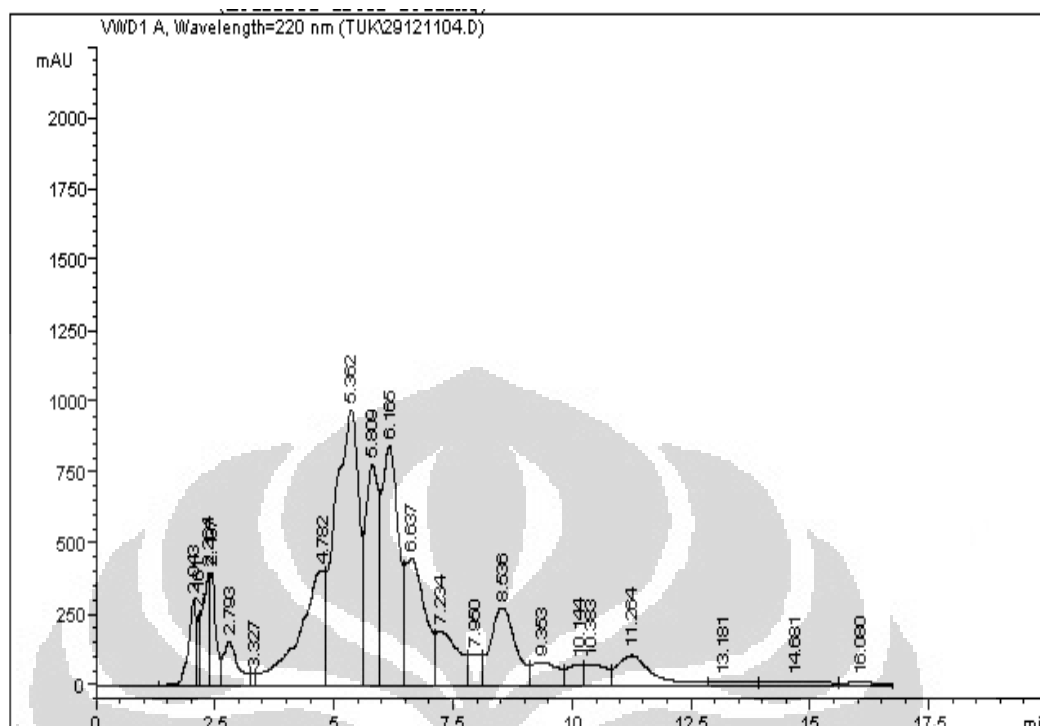
➤ **Botol T-05**



Peak #	RetTime [min]	Type	Width [min]	Area mAU *s	Height [mAU]	Area %
1	2.036	VV	0.1358	1723.95117	172.03934	1.6875
2	2.352	VV	0.1468	3281.91821	317.54794	3.2125
3	2.445	VV	0.1328	4150.26611	419.71902	4.0625
4	2.853	VV	0.2248	2255.56567	148.86440	2.2079
5	3.391	VV	0.2718	636.30988	32.75720	0.6229
6	4.668	VV	0.4983	7642.52246	211.71175	7.4809
7	5.341	VV	0.4370	1.66993e4	528.63562	16.3461
8	5.772	VV	0.2837	8264.51563	433.27756	8.0898
9	6.140	VV	0.3418	1.08292e4	467.05676	10.6003
10	6.656	VV	0.4677	1.05996e4	319.04932	10.3755
11	7.267	VV	0.4535	6126.01221	199.16348	5.9965
12	7.995	VV	0.3107	1912.60388	91.54250	1.8722
13	8.553	VV	0.5140	1.11887e4	327.21518	10.9522
14	9.351	VV	0.5553	3474.09399	93.91192	3.4006
15	10.440	VV	0.7045	4963.53809	99.45921	4.8586
16	11.292	VV	0.7215	6206.78564	125.10532	6.0755
17	13.192	VV	0.7922	763.94482	13.87868	0.7478
18	14.572	VBA	1.5997	1441.31311	11.98443	1.4108

Totals : 1.02160e5 4012.91961

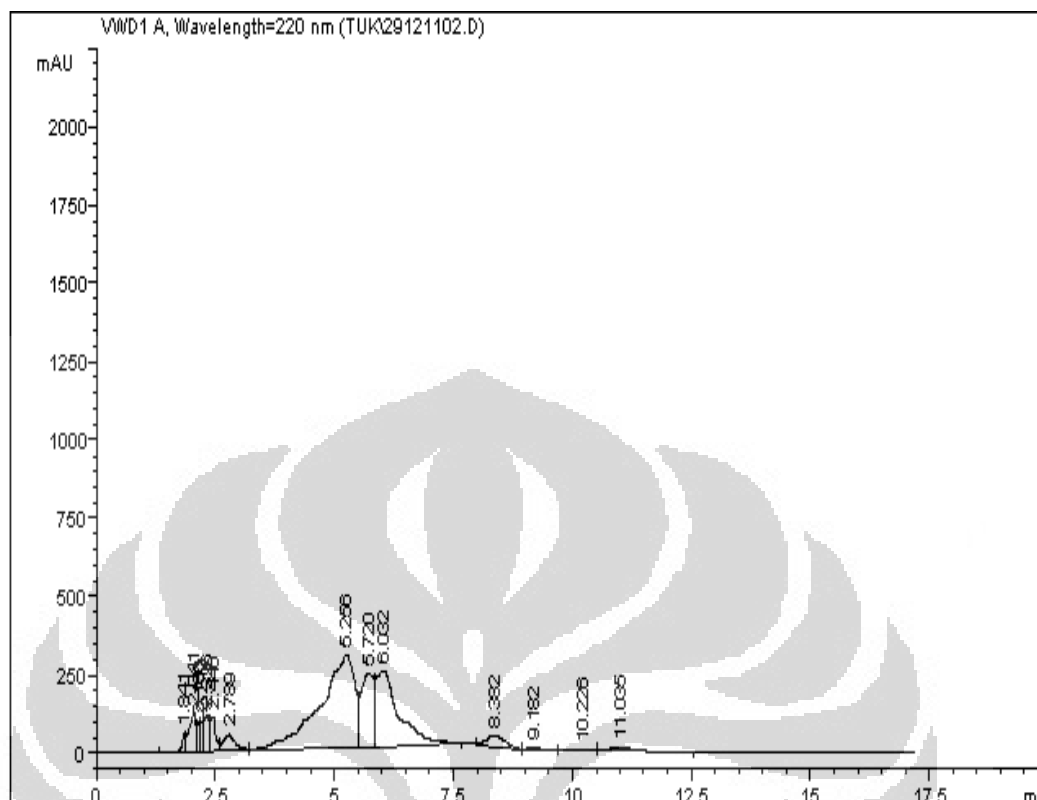
➤ **Botol T-06**



Peak #	RetTime [min]	Type	Width [min]	Area mAU	Area %	Height [mAU]	Area %
1	2.043	VV	0.1496	3308.11816	2.2877	302.02554	2.2877
2	2.161	VV	0.0555	968.72992	0.6699	249.48692	0.6699
3	2.364	VV	0.1395	4191.90918	2.8989	396.15936	2.8989
4	2.437	VV	0.1067	3080.59473	2.1304	396.22147	2.1304
5	2.793	VV	0.3078	3265.81909	2.2585	150.93486	2.2585
6	3.327	VV	0.0980	265.17441	0.1834	39.11290	0.1834
7	4.782	VV	0.4664	1.54696e4	10.6981	403.36981	10.6981
8	5.362	VV	0.4651	3.31252e4	22.9079	970.65350	22.9079
9	5.809	VV	0.2866	1.50116e4	10.3814	776.91095	10.3814
10	6.165	VV	0.3543	2.04414e4	14.1364	842.90814	14.1364
11	6.637	VV	0.4083	1.28973e4	8.9192	446.58084	8.9192
12	7.234	VV	0.4782	6219.29785	4.3010	189.86760	4.3010
13	7.950	VV	0.3004	2098.33447	1.4511	106.87408	1.4511
14	8.536	VV	0.5357	9838.24219	6.8037	271.87363	6.8037
15	9.353	VV	0.5692	3079.49585	2.1296	80.12856	2.1296
16	10.144	VV	0.3226	1615.28577	1.1171	72.90390	1.1171
17	10.383	VV	0.4905	2356.35181	1.6295	73.79459	1.6295
18	11.264	VB	0.7546	5336.34912	3.6904	102.95921	3.6904
19	13.181	BV	0.7974	649.76941	0.4494	11.37583	0.4494
20	14.681	VV	1.0446	928.21564	0.6419	10.69513	0.6419
21	16.080	VBA	0.8157	454.72333	0.3145	7.61845	0.3145

Totals : 1.44601e5 5902.45526

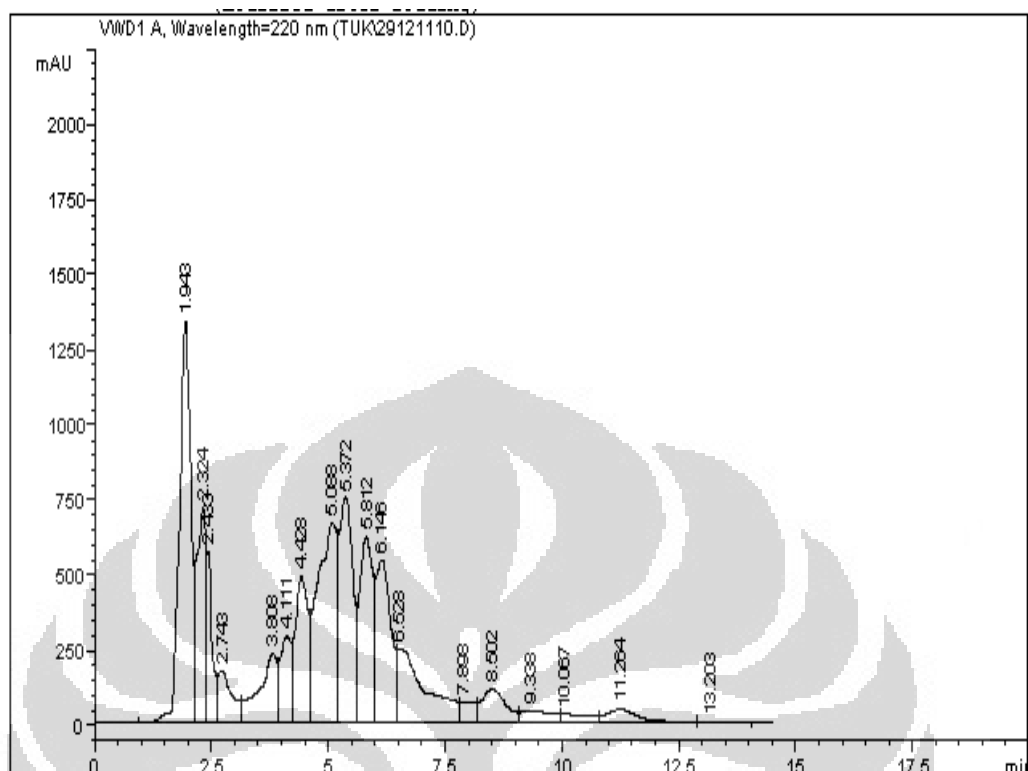
➤ **Botol T-07**



Peak #	RetTime [min]	Type	Width [min]	Area mAU *s	Height [mAU]	Area %
1	1.841	VV	0.0757	285.33035	54.46961	0.8458
2	2.041	VV	0.1358	1253.00073	122.01523	3.7141
3	2.160	VV	0.0533	368.44568	96.53777	1.0921
4	2.213	VV	0.0424	291.86615	96.92004	0.8651
5	2.326	VV	0.1108	935.10358	115.13010	2.7718
6	2.446	VV	0.1251	935.60162	110.40783	2.7733
7	2.789	VV	0.2502	911.24274	50.06667	2.7010
8	5.256	VV	0.6628	1.48842e4	293.57730	44.1187
9	5.720	VV	0.2720	4283.60059	235.43930	12.6972
10	6.032	VB	0.4750	8120.59717	240.80016	24.0706
11	8.382	BP	0.4369	861.07739	31.78865	2.5524
12	9.182	VP	0.4252	63.86354	2.47164	0.1893
13	10.226	VV	0.4754	132.04800	3.71912	0.3914
14	11.035	VP	0.5857	410.67572	11.33753	1.2173

Totals : 3.37366e4 1464.68093

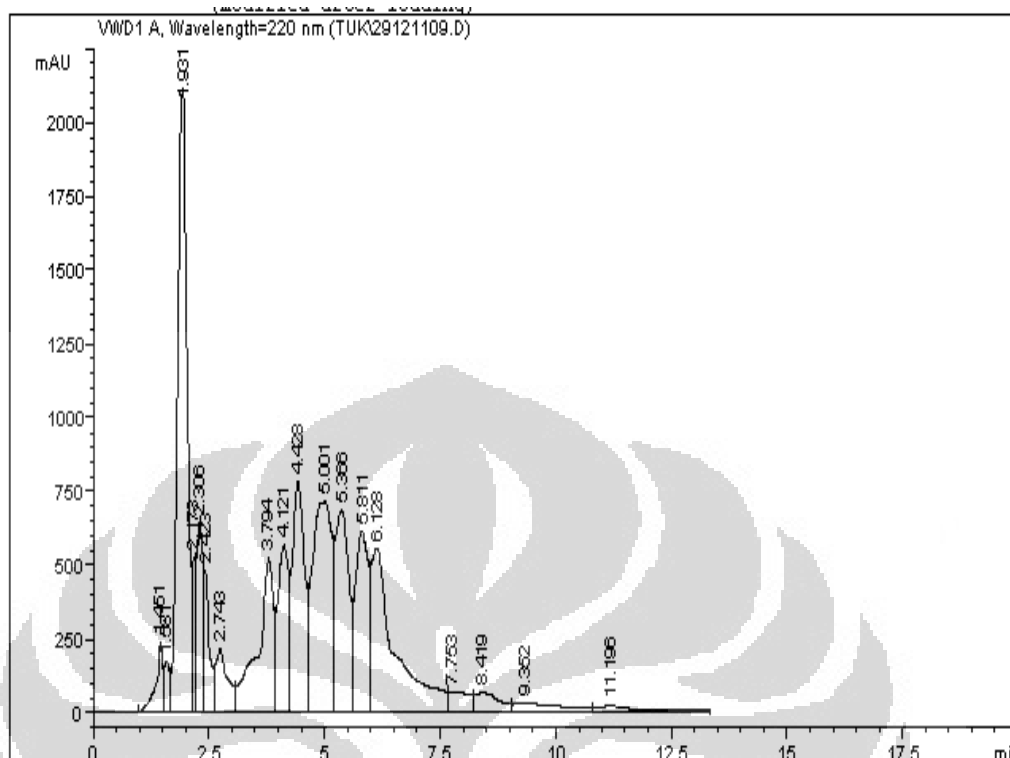
➤ **Botol T-08**



Peak #	RetTime [min]	Type	Width [min]	Area mAU *s	Height [mAU]	Area %
1	1.943	PV	0.2329	2.22155e4	1338.53491	15.7636
2	2.324	VV	0.1872	1.01873e4	718.89557	7.2287
3	2.433	VV	0.1037	4228.42871	572.41608	3.0004
4	2.743	VV	0.2768	3783.80225	175.14510	2.6849
5	3.808	VV	0.3648	6266.99707	231.88823	4.4469
6	4.111	VV	0.2298	4558.49854	290.30493	3.2346
7	4.428	VV	0.2773	9230.46875	485.06866	6.5497
8	5.088	VV	0.3888	1.95091e4	667.95044	13.8432
9	5.372	VV	0.2957	1.48768e4	749.34961	10.5562
10	5.812	VV	0.2943	1.22720e4	617.94037	8.7079
11	6.146	VV	0.3230	1.18739e4	541.06842	8.4254
12	6.528	VV	0.5821	1.05748e4	245.74182	7.5037
13	7.898	VV	0.3333	1518.14502	69.93441	1.0772
14	8.502	VV	0.5372	4050.85815	111.18803	2.8744
15	9.338	VV	0.6584	1870.92566	41.50174	1.3276
16	10.067	VV	0.5919	1252.11145	26.78616	0.8885
17	11.264	VV	0.7646	2346.38477	44.43243	1.6649
18	13.203	VV	0.7245	313.04672	5.16565	0.2221

Totals : 1.40929e5 6933.31255

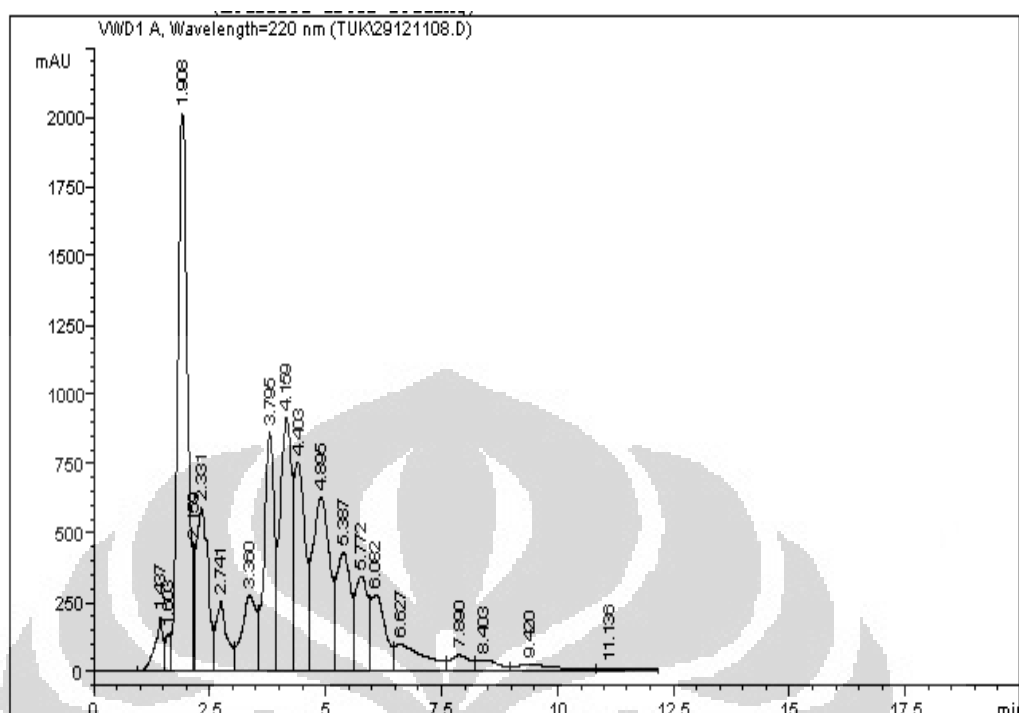
➤ **Botol T-09**



Peak #	RetTime [min]	Type	Width [min]	Area mAU *s	Height [mAU]	Area %
1	1.451	PV	0.1270	2223.96680	230.69699	1.3925
2	1.581	VV	0.1222	1452.33484	168.90788	0.9094
3	1.931	VV	0.2190	3.01298e4	2109.96118	18.8658
4	2.173	VV	0.0636	2331.23706	523.81390	1.4597
5	2.306	VV	0.1399	6723.97070	640.84442	4.2102
6	2.423	VV	0.0980	3315.57935	471.76715	2.0761
7	2.743	VV	0.2437	3870.23340	209.00789	2.4234
8	3.794	VV	0.3294	1.24293e4	518.06586	7.7826
9	4.121	VV	0.2382	9026.42188	562.52429	5.6519
10	4.428	VV	0.2666	1.39410e4	775.29047	8.7292
11	5.001	VV	0.3867	2.10133e4	711.59320	13.1575
12	5.366	VV	0.2967	1.35338e4	678.64514	8.4742
13	5.811	VV	0.2897	1.18479e4	608.74792	7.4186
14	6.128	VV	0.4919	2.00918e4	553.57477	12.5805
15	7.753	VV	0.4282	2050.87036	67.05257	1.2842
16	8.419	VV	0.5389	2327.81909	63.63581	1.4576
17	9.352	VV	0.9825	2055.25537	27.04965	1.2869
18	11.196	VBA	1.0299	1341.18945	17.60736	0.8398

Totals : 1.59706e5 8938.78646

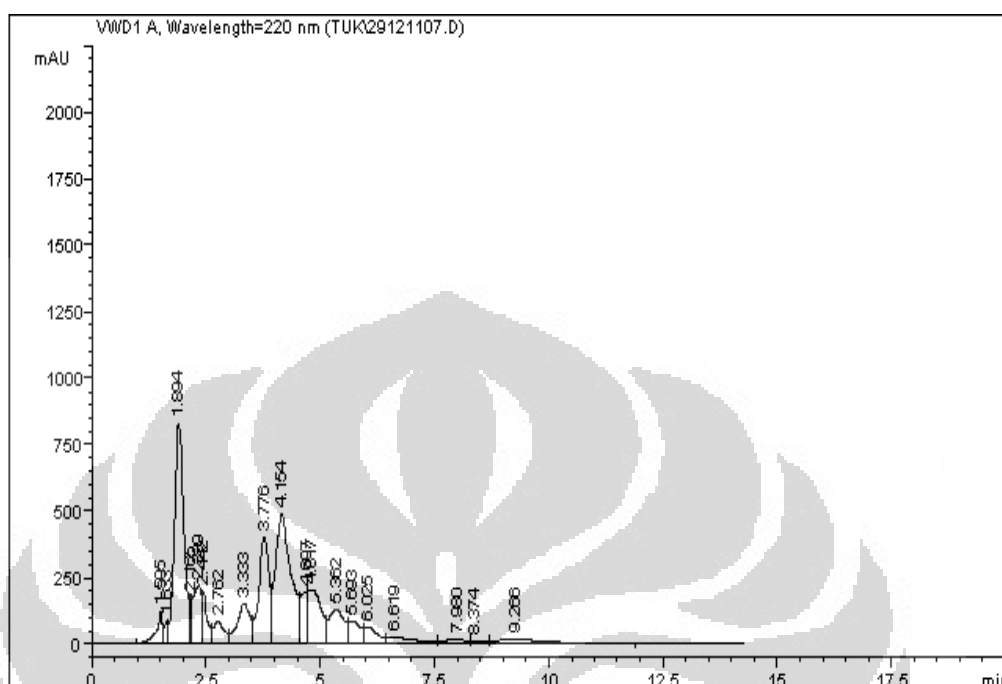
➤ **Botol T-10**



Peak #	RetTime [min]	Type	Width [min]	Area mAU	Area %	Height [mAU]	Area %
1	1.437	BV	0.1591	2332.62207	1.6215	194.12215	1.6215
2	1.603	VV	0.1060	1023.12073	0.7112	137.11108	0.7112
3	1.908	VV	0.2196	2.92984e4	20.3662	2008.99890	20.3662
4	2.159	VV	0.0519	1626.81396	1.1309	455.47693	1.1309
5	2.331	VV	0.2215	1.01186e4	7.0338	587.07153	7.0338
6	2.741	VV	0.2173	4169.35303	2.8983	252.57553	2.8983
7	3.360	VV	0.3052	5816.48779	4.0432	273.15994	4.0432
8	3.795	VV	0.2335	1.33861e4	9.3051	862.31744	9.3051
9	4.159	VV	0.2640	1.60013e4	11.1230	913.52173	11.1230
10	4.403	VV	0.2405	1.21632e4	8.4550	754.56677	8.4550
11	4.895	VV	0.3767	1.62471e4	11.2939	629.76837	11.2939
12	5.387	VV	0.3181	9036.46094	6.2815	427.32156	6.2815
13	5.772	VV	0.2852	6656.31494	4.6270	344.38171	4.6270
14	6.082	VV	0.3126	5844.83740	4.0629	276.02112	4.0629
15	6.627	VV	0.5968	4471.91504	3.1086	95.57997	3.1086
16	7.890	VV	0.4443	1751.26697	1.2174	56.77430	1.2174
17	8.403	VV	0.5139	1370.44312	0.9526	39.50367	0.9526
18	9.420	VV	1.1027	1865.28320	1.2966	23.26874	1.2966
19	11.136	VBA	0.8939	677.96021	0.4713	10.38868	0.4713

Totals : 1.43858e5 8341.93015

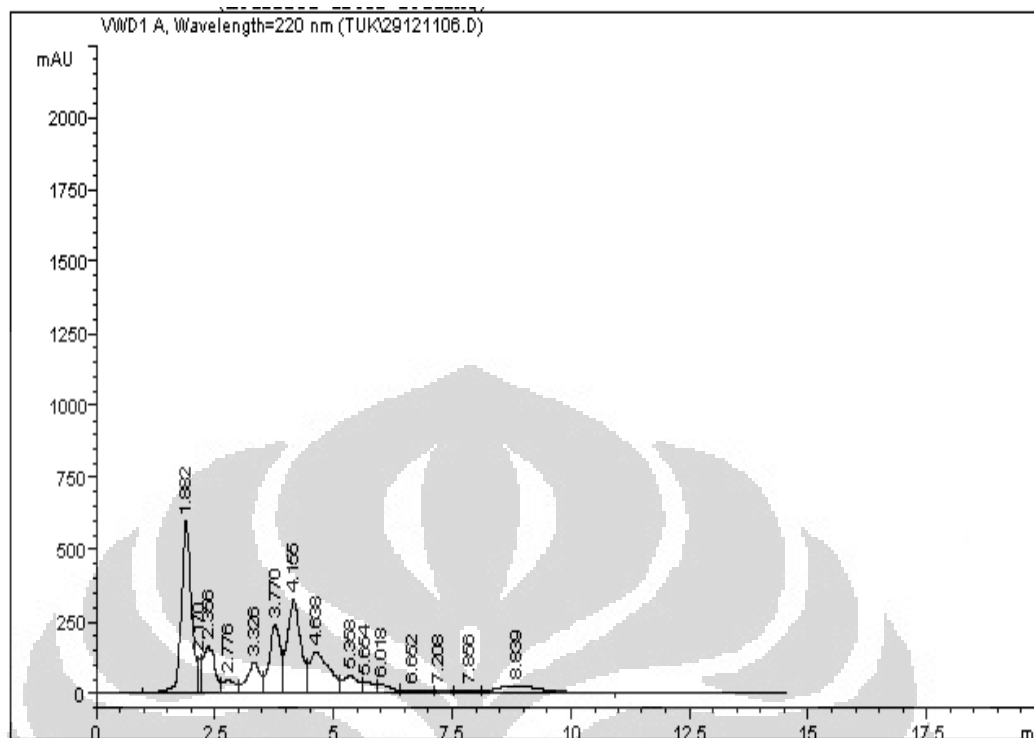
➤ **Botol T-11**



Peak #	RetTime [min]	Type	Width [min]	Area mAU	Area %	Height [mAU]	Area %
1	1.437	BV	0.1591	2332.62207		194.12215	1.6215
2	1.603	VV	0.1060	1023.12073		137.11108	0.7112
3	1.908	VV	0.2196	2.92984e4		2008.99890	20.3662
4	2.159	VV	0.0519	1626.81396		455.47693	1.1309
5	2.331	VV	0.2215	1.01186e4		587.07153	7.0338
6	2.741	VV	0.2173	4169.35303		252.57553	2.8983
7	3.360	VV	0.3052	5816.48779		273.15994	4.0432
8	3.795	VV	0.2335	1.33861e4		862.31744	9.3051
9	4.159	VV	0.2640	1.60013e4		913.52173	11.1230
10	4.403	VV	0.2405	1.21632e4		754.56677	8.4550
11	4.895	VV	0.3767	1.62471e4		629.76837	11.2939
12	5.387	VV	0.3181	9036.46094		427.32156	6.2815
13	5.772	VV	0.2852	6656.31494		344.38171	4.6270
14	6.082	VV	0.3126	5844.83740		276.02112	4.0629
15	6.627	VV	0.5968	4471.91504		95.57997	3.1086
16	7.890	VV	0.4443	1751.26697		56.77430	1.2174
17	8.403	VV	0.5139	1370.44312		39.50367	0.9526
18	9.420	VV	1.1027	1865.28320		23.26874	1.2966
19	11.136	VBA	0.8939	677.96021		10.38868	0.4713

Totals : 1.43858e5 8341.93015

➤ **Botol T-12**



Peak #	RetTime [min]	Type	Width [min]	Area mAU	Area %	Height [mAU]	Area l	Area %
1	1.882	BV	0.2191	8705.11523	25.4144	593.63019		
2	2.170	VV	0.0618	504.31693	1.4723	117.34566		
3	2.356	VV	0.2280	2892.05298	8.4433	163.64890		
4	2.776	VV	0.2415	829.22528	2.4209	45.87624		
5	3.326	VV	0.2714	1954.63098	5.7065	105.54816		
6	3.770	VV	0.2421	3851.30444	11.2438	236.89474		
7	4.155	VV	0.2874	6457.51367	18.8526	322.56796		
8	4.638	VV	0.3902	4043.00977	11.8035	141.45789		
9	5.358	VV	0.3474	1305.74438	3.8121	56.37706		
10	5.654	VV	0.2606	615.79095	1.7978	35.24849		
11	6.018	VV	0.3197	565.67834	1.6515	26.26512		
12	6.652	VV	0.4915	388.77676	1.1350	10.75889		
13	7.208	VV	0.3656	197.49779	0.5766	7.90823		
14	7.856	VV	0.4525	274.25769	0.8007	8.86813		
15	8.839	VP	1.1625	1667.72852	4.8689	22.86506		

Totals : 3.42526e4 1895.26070