



UNIVERSITAS INDONESIA

**PENENTUAN KANDUNGAN *ANNONACEOUS ACETOGENIN*
PADA DAUN SIRSAK MENGGUNAKAN METODE
SPEKTROFOTOMETRI GUGUS LAKTON**

SKRIPSI

**SHUFI RAMADIANI SWARI
0906604432**

**FAKULTAS TEKNIK
PROGRAM STUDI EKSTENSI TEKNIK KIMIA
DEPOK
JUNI 2012**

Universitas Indonesia



UNIVERSITAS INDONESIA

**PENENTUAN KANDUNGAN *ANNONACEOUS ACETOGENIN*
PADA DAUN SIRSAK MENGGUNAKAN METODE
SPEKTROFOTOMETRI GUGUS LAKTON**

SKRIPSI

Diajukan sebagai salah satu syarat untuk memperoleh gelar Sarjana Teknik

**SHUFI RAMADIANI SWARI
0906604432**

**FAKULTAS TEKNIK
PROGRAM STUDI EKSTENSI TEKNIK KIMIA
DEPOK
JUNI 2012**

HALAMAN PERNYATAAN ORISINALITAS

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

Nama : Shufi Ramadiani Swari

NPM : 0906604432

Tanda Tangan : 

Tanggal : 27 Juni 2012

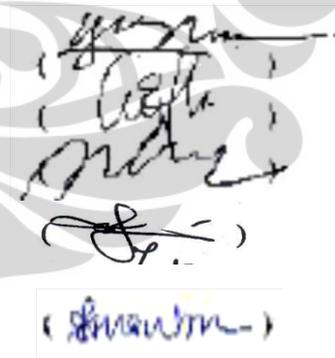
HALAMAN PENGESAHAN

Skripsi ini diajukan oleh :
Nama : Shufi Ramadiani Swari
NPM : 0906604432
Program Studi : Ekstensi
Judul Skripsi : Penentuan Kandungan *Annonaceous Acetogenin* pada Daun
Sirsak menggunakan Metode Spektrofotometri Gugus
Lakton,

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 II : Elsa Krisanti, Ph.D
Penguji 1 : Dr.rer. Nat. Ir. Yuswan M, MT
Penguji 2 : Dr. Ing. Ir. Misri Gozan, M.Tech
Penguji 3 : Dr. Ir. Praswasti PDK Wuln, MT



(
(
(
(
(
(

Ditetapkan di : Depok
Tanggal : 27 Juni 2012

KATA PENGANTAR

Segala puji syukur kehadiran Allah SWT atas nikmat-Nya dan karunia-Nya sehingga penulis dapat menyelesaikan skripsi yang berjudul **“Penentuan Kandungan *Annonaceous Acetogenin* pada Daun Sirsak menggunakan Metode Spektrofotometri Gugus Lakton”** tepat waktu seperti yang diharapkan. Hal ini dilakukan sebagai salah satu syarat untuk mencapai gelar Sarjana Teknik pada Departemen Teknik Kimia Fakultas Teknik Universitas Indonesia. Penulis menyadari bahwa, tanpa bantuan dan bimbingan dari berbagai pihak, sangat sulit bagi penulis untuk menyelesaikan skripsi ini. Oleh karena itu, penulis mengucapkan terima kasih kepada:

1. Bapak Kamarza Mulia, Ph.D dan Ibu Elsa Krisanti, Ph.D., sebagai dosen pembimbing yang telah menyediakan waktu, tenaga dan pikiran untuk mengarahkan dalam menyelesaikan penulisan ini.
2. Kedua orang tua penulis yang selalu memberikan bantuan dukungan material, moral dan mendoakan kelancaran penulis di setiap waktu juga kakak penulis yang memberikan motivasi pada penulis.
3. Prof. Dr. Ir. Widodo Wahyu Purwanto, DEA selaku Ketua Departemen Teknik Kimia FTUI dan Ir. Yuliusman, M. Eng selaku koordinator mata kuliah spesial.
4. Para dosen Departemen Teknik Kimia FTUI yang memberikan ilmu dan wawasannya.
5. Billy, Ibnu, Wika, Dewi, rekan satu grup riset dan teman-teman yang telah menjadi teman diskusi, membantu dalam penelitian, saling bertukar wawasan dan saling menyemangati.
6. Semua pihak yang telah membantu penyusunan skripsi ini secara langsung maupun tidak langsung.

Akhir kata, saya berharap Tuhan Yang Maha Esa berkenan membalas segala kebaikan semua pihak yang telah membantu. Semoga skripsi ini membawa manfaat bagi pengembangan ilmu.

Depok, 27 Juni 2012

Shufi Ramadiani Swari

HALAMAN PERNYATAAN PERSETUJUAN PUBLIKASI TUGAS AKHIR UNTUK KEPENTINGAN AKADEMIS

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

Nama : Shufi Ramadiani Swari
NPM : 0906604432
Program Studi : Ekstensi
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:

PENENTUAN KANDUNGAN ANNONACEOUS ACETOGENIN PADA DAUN SIRSAK MENGGUNAKAN METODE SPEKTROFOTOMETRI GUGUS LAKTON

beserta perangkat yang ada (jika diperlukan). Dengan Hak Bebas Royalti Noneksklusif ini Universitas Indonesia berhak menyimpan, mengalih media/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 : 27 Juni 2012

Yang Menyatakan

(Shufi Ramadiani Swari)

ABSTRAK

Nama : Shufi Ramadiani Swari
Judul : Penentuan Kandungan *Annonaceous Acetogenin* pada Daun Sirsak Menggunakan Metode Spektrofotometri Gugus Lakton.

Senyawa bioaktif *Annonaceous acetogenin* yang berasal dari tanaman sirsak (*Annona muricata*) ditemukan memiliki sifat sitotoksik dan antitumor secara spesifik terhadap beberapa jenis kanker, di antaranya adalah kanker usus, payudara, paru-paru, pankreas, dan ginjal. *Acetogenin* yang diperoleh dari proses ekstraksi daun sirsak, kemudian dianalisis secara kualitatif (TLC, BST, FTIR) dan kuantitatif (Spektrofotometri UV-Vis). Hasil ekstraksi terbagi menjadi lima fraksi yang diberi nama F001, F002, F003, F0004, F005, dan diduga bahwa F005 mengandung *acetogenin*. F005 kemudian diisolasi dan terpisah ke dalam 13 bagian dengan bagian 6-9 mengandung *acetogenin*. Analisis kuantitatif dilakukan dengan menghitung kandungan gugus lakton *acetogenin*, menggunakan senyawa standar *andrographolida*. Penggunaan *andrographolida* sebagai senyawa standar dikarenakan senyawa murni *acetogenin* sulit didapat, dan *andrographolida* memiliki gugus lakton yang hampir sama dengan *acetogenin*, selain itu pada daun sirsak hanya *acetogenin* yang memiliki gugus lakton sehingga penentuan berdasarkan gugus lakton dapat dilakukan. Berdasarkan analisis kualitatif, hasil ekstraksi dan isolasi positif mengandung senyawa aktif *acetogenin* dan dari hasil analisis kualitatif diketahui F005 mengandung *acetogenin* paling banyak dibandingkan dengan hasil isolasi. Besarnya kandungan *acetogenin* pada F005 adalah 14.2% sedangkan untuk hasil isolasi berkisar antara 7% - 12%.

Kata kunci : daun sirsak, kanker, *annonaceous acetogenin*, gugus lakton.

ABSTRACT

Nama : Shufi Ramadiani Swari
Judul : Determination of Content of Annonaceous Acetogenin on Soursop Leaves Using Spectrophotometric Method of Lactone Group.

Bioactive substance *annonaceous acetogenin* which is originated/derived from soursop plant (*Annona muricata*) has been found to possess specific cytotoxic and anti-tumor properties to several cancers including colon, pancreatic, lung, and breast cancers. The acetogenin extracted from soursop leaves was analyzed qualitatively using TLC, BST, FTIR and quantitatively using UV-Vis spectrophotometry. The extracts were divided into 5 (five) fractions and F005 fraction was found to contain *acetogenin*. The F005 was isolated, producing 13 bottles in which bottles 6 to 9 contained *acetogenin*. Quantitative analysis was performed by measuring acetogenin lactone group using standard *andrographolida* compound. The use of this standard compound was due to the difficulty in finding pure acetogenin compound, and by the fact that *andrographolida* compound have similar lactone group with that of *acetogenin*. In addition, in soursop leaves there was only acetogenin which had lactone group so that the determination based on lactone group could be carried out. On the basis of qualitative analysis, the result of extraction and isolation were positively confirmed to contain the active acetogenin ingredient, while the quantitative analysis showed that F005 produced more acetogenin than the isolation.

Kata kunci : soursop leaves, cancer, *annonaceous acetogenin*, lactone group.

DAFTAR ISI

Halaman Judul	i
Lembar Pernyataan Orisinalitas	ii
Lembar Pengesahan	iii
Kata Pengantar	iv
Lembar Persetujuan Publikasi	v
Abstrak	vi
Daftar Isi	viii
Daftar Gambar	ix
Daftar Tabel	xi
Daftar Lampiran	xi
BAB 1 PENDAHULUAN	1
1.1 Latar Belakang	1
1.2 Rumusan Masalah	2
1.3 Tujuan Penelitian	3
1.4 Batasan Masalah	3
1.5 Sistematika Penulisan	3
BAB 2 TINJAUAN PUSTAKA	4
2.1 Kanker	4
2.1.1 Penyebab Kanker	4
2.2 Perawatan dan Pengobatan terhadap Kanker	5
2.2.1 Pengobatan Lokal pada Kanker	6
2.2.2 Kemotrapi	6
2.2.3 Radioterapi	6
2.2.4 Pengobatan Alternatif	7
2.3 Daun Sirsak (<i>Annona Muricata</i>)	8
2.3.1 Sistematika Tumbuhan	8
2.3.2 Morfologi	8
2.3.3 Senyawa-senyawa pada Daun Sirsak	9
2.4 <i>Annonaceous Acetogenin</i>	10
2.5 <i>Annonaceous Acetogenin</i> dari <i>Annona Muricata</i>	12
2.5.1 Aktivitas Biologi <i>Annonaceous Acetogenin</i>	13
2.5.1.1 Menghambat Kinerja Kompleks I Mitokondria	13

2.5.1.2 Potensial sebagai Pestisida dan Insektisida.....	15
2.6 Ekstraksi.....	16
2.6.1 Metode Umum dalam Ekstraksi Tanaman Herbal.....	16
2.6.2 Ekstraksi <i>Annonaceous Acetogenin</i>	16
2.7 Kromatografi.....	18
2.8 Analisa Hasil Ekstraksi	21
2.8.1 Uji TLC.....	21
2.8.2 FT-IR.....	21
2.8.3 <i>Brine Shrimp Test</i> (BST).....	23
2.8.4 Spektrofotometer.....	23
BAB 3 METODOLOGI PENELITIAN	25
3.1 Rancangan Penelitian.....	25
3.2 Alat dan Bahan.....	26
3.2.1 Alat.....	26
3.2.2 Bahan.....	27
3.3 Prosedur Penelitian	27
3.3.1 Ekstraksi	27
3.3.2 Fraksinasi.....	28
3.3.3 Isolasi.....	29
3.3.4 Analisa	29
BAB 4 HASIL DAN PEMBAHASAN	32
4.1 Ekstraksi.....	32
4.2 Fraksinasi	35
4.3 Isolasi	38
4.4 Analisa Hasil Ekstraksi	40
4.4.1 <i>Thin Layer Cromatography</i> (TLC).....	41
4.4.2 Uji BST.....	42
4.4.3 FT-IR	44
4.4.4 Uji LC-MS.....	48
4.4.5 Uji Spektrofotometri UV-Vis.....	50
4.5 Pembahasan Hubungan Hasil Analisa	53
BAB 5 KESIMPULAN DAN SARAN	57
5.1 Kesimpulan	57
5.2 Saran.....	57
DAFTAR PUSTAKA.....	58
LAMPIRAN.....	60

DAFTAR GAMBAR

Gambar 2.1 Daun Sirsak	9
Gambar 2.2 Struktur Umum <i>Annonaceous Acetogenin</i>	10
Gambar 2.3 Model McLaughlin dalam Sifat Inhibisi Acetogenin Kompleks I Mitokondria	13
Gambar 2.4 Struktur <i>Bullatacin</i> dan <i>Rolliniastatin</i>	14
Gambar 2.5 Prosedur Umum Maserasi	17
Gambar 2.6 Diagram Elusi pada Kromatografi Kolom	18
Gambar 3.1 Diagram Alir Penelitian	25
Gambar 4.1 Proses Preparasi Sampel Daun Sirsak	33
Gambar 4.2 Proses Ekstraksi Maserasi	34
Gambar 4.3 Proses Filtrasi	34
Gambar 4.4 Proses Pengonsentrasian menggunakan <i>Rotary Evaporator</i>	35
Gambar 4.5 Proses Fraksinasi	37
Gambar 4.6 Fraksi F004 dan F005	37
Gambar 4.7 Proses Isolasi	39
Gambar 4.8 Hasil Isolasi	40
Gambar 4.9 Analisa TLC	41
Gambar 4.10 Spektrum IR pada F005	45
Gambar 4.11 Spektrum IR pada Botol 6	45
Gambar 4.12 Spektrum IR pada Botol 7	46
Gambar 4.13 Spektrum IR pada Botol 8	46
Gambar 4.14 Spektrum IR pada Botol 9	47
Gambar 4.15 Perbandingan Spektra <i>Acetogenin</i> Standar dan Sampel	47
Gambar 4.16 Hasil LC-MS	49
Gambar 4.17 Struktur Kimia <i>Andrographolida</i>	50

Gambar 4.18 Struktur Kimia *Acetogenin*..... 50
Gambar 4.19 Linearitas Lakton dalam Standar *Andrographolida*..... 52
Gambar 4.20 Grafik Batang Hasil Uji BST 54
Gambar 4.21 Grafik Batang Bobot *Acetogenin* dalam Sampel 55



DAFTAR TABEL

Tabel 2.1 Jenis dan Contoh Karsinogen Manusia.....	5
Tabel 2.2 Stadium Kanker, Pengobatan, dan Prognosis	5
Tabel 2.3 <i>Annonaceous Acetogenin</i> dari <i>Annona Muricata</i>	12
Tabel 2.4 Klasifikasi Metode Kromatografi Kolom.....	19
Tabel 2.5 Warna dan Panjang Gelombang Spektrum Tampak.....	24
Tabel 3.1 Alat yang Digunakan dalam Penelitian dan Kegunaannya.....	26
Tabel 4.1 Jumlah Larva yang Mati pada Uji BST	40
Tabel 4.2 Hasil Uji BST dan Keaktifannya	44
Tabel 4.3 Daerah Serapan Gugus Fungsi IR.....	48
Tabel 4.4 Hasil Pengukuran Spektrofotometri.....	50
Tabel 4.5 Konsentrasi Lakton dalam Standar <i>Andrographolida</i>	50
Tabel 4.6 Konsentrasi Larutan dalam Sampel	52

DAFTAR LAMPIRAN

Lampiran 1. Perhitungan Hasil Uji BST.....	60
Lampiran 2. Perhitungan Kandungan Lakton dalam Sampel	71

BAB 1

PENDAHULUAN

1.1 Latar Belakang

Tumbuhan telah lama diketahui sebagai sumber yang sangat penting dalam upaya mempertahankan kesehatan masyarakat. Data dari badan kesehatan dunia (WHO), sebanyak 80% penduduk dunia masih menggantungkan hidup sehat pada penggunaan obat tradisional yang berasal dari tumbuhan dan 25% dari obat-obat modern yang beredar di dunia berasal dari bahan aktif yang diisolasi dan dikembangkan dari tumbuhan sampai saat ini. Indonesia dikenal sebagai salah satu dari tujuh negara dengan keanekaragaman hayati terbesar, fakta ini tentu memiliki potensi dalam pengembangan obat herbal yang berbasis pada tumbuhan obat dalam usaha kemandirian di bidang kesehatan. Tumbuhan tersebut menghasilkan senyawa metabolit sekunder dengan struktur molekul dan aktivitas biologi yang beraneka ragam. Beberapa senyawa yang telah terbukti memiliki aktivitas sebagai antikanker, antara lain golongan asetogenin, alkaloid, terpenoid, flavonoid, santon, dan kumarin (Lisdawati, 2007).

Salah satu tumbuhan yang digunakan sebagai tumbuhan obat-obatan adalah tumbuhan Sirsak (*Annona muricata* L) karena memiliki manfaat yang besar bagi kehidupan manusia, salah satunya adalah sebagai anti tumor/kanker yang sangat kuat, dan terbukti secara medis menyembuhkan segala jenis kanker (Sajuthi, 2001). Bahan bioaktif yang ditemukan dalam sirsak ini bernama *annonaceous acetogenin*. *Annonaceous acetogenin* telah ditemukan lebih dari 250 jenis strukturnya dan terus berkembang sampai sekarang (Fang, 1993; Zeng, 1996). Pada sirsak khususnya, telah ditemukan 50 jenis *annonaceous acetogenin* dari biji, kulit batang, daging buah, dan daun sirsak. Dimana 19 jenis diantaranya terdapat pada bagian daun dan telah terbukti secara *in vitro* bersifat sitotoksik 10.000 kali lebih kuat daripada terapi kemoterapi (Zeng, 1996; 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 racun terhadap sel, namun *annonaceous acetogenin* relatif tidak menyerang sel normal, dan hanya menyerang sel kanker secara spesifik (Oberlies, 1995). Penelitian mengenai *annonaceous acetogenin* ditemukan oleh Prof. Jerry McLaughlin sejak tahun 1982 dari buah paw-paw dan diteliti mekanisme sitotoksiknya. Mekanisme sitotoksiknya adalah menginhibisi 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 dilakukan untuk mendapatkan senyawa *annonaceous acetogenin* sehingga dapat digunakan sebagai salah satu bahan baku dalam obat-obatan tradisional. Dan untuk menggunakannya sebagai bahan baku obat, perlu diketahui banyaknya kandungan *annonaceous acetogenin* dalam daun sirsak. Oleh karena itu penulis melakukan penelitian untuk mengetahui banyaknya kandungan *annonaceous acetogenin* dalam daun sirsak yang telah diekstrak. Dikarenakan senyawa murni *annonaceous acetogenin* yang akan digunakan sebagai pembanding sulit diperoleh karena harganya yang sangat mahal, sehingga diperlukan metode lain untuk mengetahui banyaknya kandungan *annonaceous acetogenin* yaitu dengan cara menentukan banyaknya kandungan lakton dalam daun sirsak. *Annonaceous acetogenin* diketahui mengandung gugus lakton, dan pada daun sirsak tidak ada senyawa kimia lain yang mengandung gugus lakton selain *annonaceous acetogenin* sehingga banyaknya kandungan lakton dapat menggambarkan banyaknya *annonaceous acetogenin*.

1.2 Rumusan Masalah

Berdasarkan latar belakang yang disampaikan di atas, maka rumusan masalah yang ditetapkan adalah bagaimana cara menganalisis *annonaceous acetogenin* dari daun sirsak secara kuantitatif berdasarkan gugus lakton.

1.3 Tujuan Penelitian

1. Menguji penentuan metode *acetogenin*.
2. Menentukan kandungan *acetogenin* berdasarkan metode spektrofotometri gugus lakton.

1.4 Batasan Masalah

1. Jenis *annonaceous acetogenin* yang ingin didapatkan masih secara umum dan tidak spesifik untuk jenis *annonaceous acetogenin* tertentu.
2. Standard yang digunakan untuk analisa kuantitatif *annonaceous acetogenin* adalah senyawa *andrographolida*.

1.5 Sistematika Penulisan

Sistematika penulisan dalam laporan penelitian ini terdiri atas:

BAB 1 PENDAHULUAN

Bab ini menerangkan permasalahan secara umum, terutama yang menyangkut latar belakang masalah, perumusan masalah, tujuan penelitian, batasan masalah dan sistematika penulisan.

BAB 2 TINJAUAN PUSTAKA

Bab ini berisikan informasi dan teori-teori yang melandasi dan mendukung penelitian.

BAB 3 METODE PENELITIAN

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

BAB 4 HASIL DAN PEMBAHASAN

Bab ini berisi tentang hasil dan juga pembahasan penelitian yang telah dilakukan.

BAB 5 KESIMPULAN

Bab ini berisi kesimpulan dari penelitian yang telah dilakukan.

BAB 2

TINJAUAN PUSTAKA

2.1 Kanker

Kanker merupakan suatu keadaan di mana sel abnormal melakukan pembelahan diri tidak terkontrol, menyerang ataupun merusak jaringan di dekatnya, dan terkadang bermetastasis atau dapat menyebar 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 bermestastasis.

Kanker pada manusia dibedakan melalui tempat terjadinya, misalnya kanker yang awalnya muncul dari usus besar maka disebut sebagai kanker usus besar, begitu pula dengan organ lain. Kanker dapat dibagi menjadi lima kategori, yaitu kanker yang terjadi pada jaringan epitel atau kulit (karsinoma), kanker yang terjadi pada tulang (sarkoma), kanker pada jaringan darah (leukemia), kanker yang terjadi pada sel kekebalan tubuh (limfoma dan myeloma).

Banyak hal yang menyebabkan tumbuhnya kanker baik pada orang dewasa maupun pada anak-anak baik itu dari faktor genetik maupun lingkungan. Pengaruh dari lingkungan adalah sebesar 90-95% sedangkan faktor genetik hanya 5-10%. Pengaruh dari lingkungan ini contohnya adalah kanker yang disebabkan oleh tembakau sebesar 25-30%, diet dan obesitas sebesar 30-35%, infeksi sebesar 15-20%, dan sisanya adalah disebabkan oleh radiasi, stres, kurangnya aktivitas fisik dan terpapar oleh bahan polutan dari lingkungan (Anand, 2008).

2.1.1. Penyebab Kanker

Seperti telah dijelaskan sebelumnya, kanker dapat disebabkan oleh faktor genetik maupun lingkungan. Adapun dari faktor lingkungan dapat 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	Radiasi UV, radiasi ion
Karsinogen Biologi	Virus <i>Human papilloma</i> , virus Epstein-Barr, virus hepatitis B, dll.
Proses Endogen	Reaksi metabolik yang menghasilkan spesies oksigen reaktif, inflamasi kronis.

(Schulz, 2005)

2.2 Perawatan dan Pengobatan terhadap Kanker

Tujuan dari pengobatan yaitu untuk membuang atau merusak seluruh sel kanker dan semua daerah yang terekspos oleh kanker. Terdapat berbagai macam pengobatan baik secara medis maupun tradisional. Pengobatan medis secara standar yang telah diterapkan sejak beberapa dekade yang lalu terdiri atas operasi, radiasi, kemoterapi, hingga ke pengobatan baru termasuk agen biologi, imunoterapi, dan molekul kecil yang spesifik. Pengobatan yang diberikan juga tergantung dari stadium kanker seperti yang terlihat pada Tabel 2.2.

Tabel 2.2 Stadium Kanker, Pengobatan, dan Prognosis

Stadium	Deskripsi	Pengobatan	Prognosis
1	- Ukuran Kecil - Tidak melibatkan kelenjar getah bening - Tidak terjadi metastase - Ukuran kecil atau sedang	Operasi dan atau Radioterapi dan juga terkadang terapi sistem	Seringkali baik
2	- Melibatkan kelenjar getah bening - Tidak terjadimetastase	Terapi sistem operasi dan terkadang terapi sistem primer	Kadang baik
3	- Berkembang secara lokal - Tidak terjadi metastase	Terapi sistem primer dan radioterapi	Biasanya jelek
4	- Terjadi metastase	Mengurangi dengan terapi sistem dan atau radioterapi dan atau operasi	Jelek

(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. Pengobatan dibagi menjadi beberapa kali untuk membatasi dosis yang diberikan pada setiap kali perawatan dan untuk meminimalisir kerusakan jangka panjang serta efek buruk pada jaringan tubuh yang normal.

2.2.2. Kemotrapi

Kemotrapi merupakan obat-obatan yang bersifat sitotoksik, sering diiringi dengan efek samping yang signifikan. Ada banyak cara kerja obat kemotrapi, diantaranya yaitu obat berinteraksi dengan DNA secara langsung dan masuk ke antara pasangan basanya, mengubah secara kimia struktur DNA yang rusak, atau mengganti basa dengan struktur analog. Obat juga dapat mengurangi basa yang dibutuhkan untuk sintesis DNA atau RNA.

2.2.3. Radioterapi

Radioterapi adalah penggunaan radiasi mengionisasi untuk mengobati penyakit berbahaya dengan cara merusak dan membunuh sel tumor, untuk penyembuhan tumor atau untuk melemahkan gejala. Pada radioterapi, sinar-X atau sinar *gamma* ditembakkan pada bagian tumor untuk merusak dan membunuh, namun tidak dapat dihindari bahwa jaringan normal di sekelilingnya juga terkena efek samping dari radioterapi.

2.2.4. Pengobatan Alternatif

Pengobatan alternatif kanker meliputi pengobatan dengan herbal anti kanker, akupunktur, akupresur, homeopati, aromaterapi, dan lain-lain. Pengobatan kanker dengan ramuan herbal adalah suatu pengobatan dengan menggunakan berbagai macam ekstrak dari tumbuh-tumbuhan, contohnya, ekstrak dari daun sirsak.

Berdasarkan penelitian, diketahui bahwa daun sirsak memiliki kemampuan mengobati kanker 10.000 kali lebih kuat bila dibandingkan dengan kemoterapi konvensional. Hal ini dikarenakan adanya zat aktif *annonaceous acetogenin* pada daun sirsak. Zat aktif ini secara efektif dan selektif memilih target dan membunuh sel jahat dari 12 tipe kanker yang berbeda, di antaranya kanker usus besar, payudara, prostat, paru-paru, dan pankreas.

Annonaceous acetogenin bekerja menghambat dan membunuh sel kanker dalam dua tahap. Pertama *annonaceous acetogenin* mendeteksi dan membedakan mana sel normal dan yang mana sel kanker. *Annonaceous acetogenin* menyerang sel secara selektif, artinya hanya sel yang diidentifikasi sebagai sel kanker saja yang diserang sementara sel normal tidak diserang. Ini sangat berbeda dengan cara kerja obat-obatan kemoterapi yang menyerang sel kanker dan juga sel normal. Akibatnya sel normal ikut rusak dan mati yang berakibat pada timbulnya berbagai macam efek samping. Cara *annonaceous acetogenin* dalam membedakan sel kanker dan sel normal adalah dari kebutuhan sel akan ATP (*Adenosine Trifosfate*). ATP adalah sumber energi bagi sel untuk tumbuh dan berkembang serta menjalankan berbagai fungsinya sebagai sel. Karena sel kanker bergerak, tumbuh dan berduplikasi lebih cepat dan aktif dibandingkan sel normal untuk itu sel kanker membutuhkan energi ATP dalam jumlah yang lebih banyak. *Annonaceous acetogenin* mendeteksi kebutuhan ATP yang lebih tinggi sebagai sel kanker. Tahap kedua *annonaceous acetogenin* masuk ke dalam sel kanker dan menempel di dinding sebelah dalam mitokondria yang merupakan organ di dalam sel yang berfungsi sebagai tempat memproduksi energi ATP bagi sel. Karbohidrat yang kita makan akan berakhir di mitokondria yang selanjutnya akan dirubah menjadi energi. Selanjutnya *annonaceous acetogenin* memblok produksi energi ATP di dalam mitokondria sel kanker.

Akibatnya suplai energi untuk sel kanker akan terputus, sel kanker menjadi lemah dan akhirnya mati.

2.3 Daun Sirsak (*Annona Muricata*)

Sirsak dapat tumbuh pada semua jenis tanah dengan derajat keasaman (pH) antara 5-7. Jadi, tanah yang sesuai adalah tanah yang agak asam sampai agak alkalis. Ketinggian tempat antara 100- 1000 m di atas permukaan laut lebih cocok untuk tanaman sirsak. Pada daerah dengan ketinggian 1000 di atas permukaan laut tanaman sirsak enggan tumbuh dan berbuah. Suhu udara yang sesuai untuk tanaman sirsak adalah 22-32°C. Curah hujan yang dibutuhkan tanaman sirsak antara 1500- 3000 mm/tahun (Sunarjono, 2005).

2.3.1. Sistematika Tumbuhan

Sistematika dari tumbuhan sirsak adalah sebagai berikut:

Kingdom	: Plantae
Divisi	: Spermatophyta
Sub divisi	: Angiospermae
Kelas	: Dicotyledonae
Ordo	: Polycarpiceae
Famili	: Annonaceae
Genus	: <i>Annona</i>
Spesies	: <i>Annona muricata</i> L. (Sunarjono, 2005)

2.3.2. Morfologi

Secara morfologis, tanaman sirsak terdiri dari daun berbentuk bulat panjang, daun menyirip, berwarna hijau muda sampai hijau tua, ujung daunnya menyirip dan permukaan daunnya mengkilap. Merupakan bunga tunggal, di mana dalam satu bunga terdapat banyak putik sehingga dinamakan bunga berpistil majemuk. Bagian bunga tersusun secara hemicyclis, yaitu sebagian terdapat dalam lingkaran dan yang lain spiral atau terpecah. Mahkota bunga yang berjumlah 6 sepalum terdiri atas dua

lingkaran, bentuknya hampir segitiga, tebal dan kaku berwarna kuning keputih-putihan, dan setelah tua akan mekar serta lepas dari dasra bunganya. Putik dan benang sari lebar dengan banyak karpel (bakal buah). Bunga umumnya sempurna (hermaprodit), tapi terkadang hanya bunga jantan dan bunga betina saja yang terdapat pada satu pohon. Bentuk daun sirsak dapat dilihat pada Gambar 2.1 di bawah ini (Sunarjono, 2005).



Gambar 2.1. Daun Sirsak

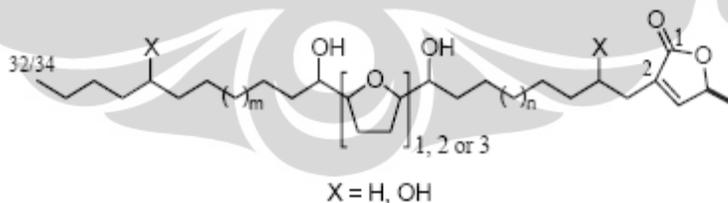
2.3.3. Senyawa-senyawa pada Daun Sirsak

Berdasarkan penelitian yang dilakukan pada tahun 2010 oleh Pathak, ekstrak metanol daun sirsak mengandung metabolit sekunder seperti *tanin* dan steroid. Menurut penelitian yang dilakukan Takahashi pada tahun 2006, ekstrak etanol daun sirsak mengandung senyawa flavanoid. Senyawa flavanoid ini terdapat dalam sel-sel yang sedang melakukan fotosintesis sehingga banyak tersebar pada kingdom *Plantae* (Cushnie dan Lamb, 2005). Lebih lanjut, daun sirsak juga mengandung senyawa kimia alkaloid seperti *reticuline*, *coreximine*, *coclarine*, dan *anomurine*, serta minyak esensial seperti *β -caryophyllene*, *δ -cadiene*, *epi- α -cadinol*, dan *α -cadinol*. Daun, batang, kulit kayu dan biji *annona muricata* mengandung sejumlah bahan kimia yang dipercaya sebagai senyawa bioaktif yang *annonaceous acetogenins* (Noller, 2005). *Annonaceous acetogenins* memiliki potensi sitotoksik. Senyawa sitotoksik adalah senyawa yang dapat bersifat toksik untuk menghambat dan menghentikan pertumbuhan sel kanker (Mardiana, 2011).

2.4 *Annonaceous Acetogenins*

Annonaceae merupakan famili terbesar dari Ordo *Magnoliales* yang menghasilkan berbagai tumbuhan buah seperti sirsak, *paw-paw*, *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 sendiri. Salah satu jenis hama ini adalah kupu-kupu berjenis *Eurytides Marcellus* dimana larvanya memakan daun yang mengandung *annonaceous acetogenin* ini, kemudian diambil dari *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, 1999).

Annonaceous acetogenin merupakan kelompok dari produk alami poliketida yang diisolasi dari tanaman famili *Annonaceae*. Sifat umum dari molekul ini berupa rantai panjang asam lemak sepanjang 35 atau 37 karbon yang diakhiri oleh sebuah γ -lakton. Secara bigenetik, *annonaceous acetogenin* diturunkan dari asam lemak dengan 32 atau 34 karbon yang kemudian ditambahkan dua unit 2-propanol untuk membentuk lakton pada ujung molekul (Zeng, 1996). Gambar struktur umumnya dapat dilihat pada Gambar 2.2 di bawah ini.



Gambar 2.2. Struktur Umum *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, 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 sifat 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. Setelah penemuan *uvaricin*, penelitian terus dikembangkan dan sampai sekarang telah berkembang hingga lebih dari 400 jenis *annonaceous acetogenin* (Bermejo, 2005).

Mayoritas *annonaceous acetogenin* yang ditemukan memiliki sifat sitotoksik terhadap sel kanker secara *in vitro* dan juga bersifat antitumor, antimikroba, antiparasit, antimalaria, 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 kemotrapa untuk antitumor dan agen pestisida yang menjanjikan (Bermejo, 2005; Villo 2008; Alali, 1999).

Annonaceous acetogenin ditemukan sebagai inhibitor paling kuat yang ditemukan terhadap kompleks I (NADH : *ubiquinone oxidoreducteace*) pada sistem transport electron di mitokondria mamalia dan serangga. Tambahan lagi, bahwa *annonaceous acetogenin* juga inhibitor yang sangat potensial terhadap oksidasi NADH pada membran plasma sel kanker, sehingga aksi ini akan menurunkan reaksi oksidasi dan sehingga berakibat pada menurunnya produksi ATP. Penurunan produksi ATP ini sangat merugikan sel kanker dan berakibat fatal mengakibatkan sel kanker berapoptosis dan mati. *Annonaceous acetogenin* juga ditemukan menginhibisi sel kaker yang juga bersifat *multidrug resistant* (MDR), dan dapat membunuh serangga yang juga telah kebal pada pestisida, seperti contohnya kecoak Jerman (Alali, 1999).

2.5 *Annonaceous acetogenin* dari *Annona Muricata*

Annona muricata atau dikenal sebagai sirsak tumbuh secara komersial di berbagai daerah di daerah tropis. Tanaman sirsak ini telah digunakan sebagai pengobatan tradisional yang dikenal karena sifatnya yang antidiare, antidiabetik, obat penenang, pembasmi cacing, lavarsidan 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, 2005). Dalam tanaman sirsak ini telah ditemukan lebih dari 50 jenis *annonaceous acetogenin* dan lebih dari 19 di antaranya ditemukan pada bagian daun sirsak (Geum Soog, 1998). Beberapa contoh penemuan *annonaceous acetogenin* dari daun sirsak dapat dilihat pada Tabel 2.3

Tabel 2.3. *Annonaceous Acetogenin* dari *Annona Muricata*

Sumber	Nama
Biji	<i>Epomuricenin-A (or epoxy-muricin-A)</i>
	<i>Epomuricenin-B</i>
	<i>Diepomuricenin-A</i>
	<i>Corepoxyllone</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>Epoxy-muricin-A (or epomuricerin-A)</i>
	<i>Epoxy-muricin-B</i>
	<i>Muricatin-C</i>
	<i>Muricatin-A</i>
Daun	<i>Annomuricin-A</i>
	<i>Annomuricin-B</i>

(Zafra-Polo, 1996)

Annonaceous acetogenin dari daun ini telah diteliti sifat sitotoksiknya oleh peneliti luar dan dalam negeri. Sifatnya yang sitotoksik terhadap beberapa jenis sel kanker, seperti kanker paru-paru, usus besar, pankreas dan prostat telah diteliti dan

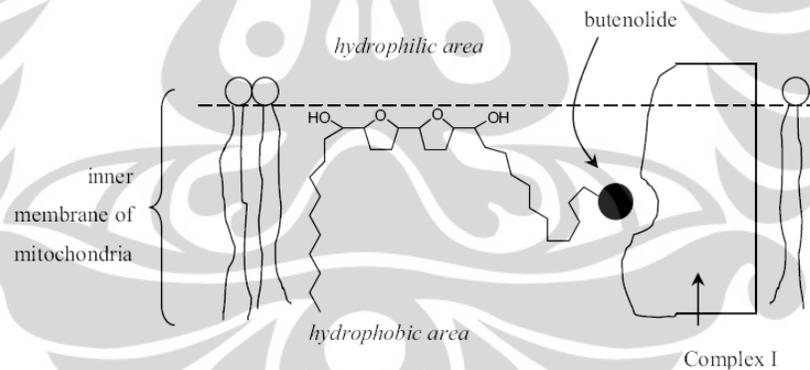
diterapkan pada berbagai pengobatan tradisional terutama di Indonesia (Lu Zeng, 1996; Geum Soog, 1997; Sudjari, 2005).

2.5.1. Aktivitas Biologi *Annonaceous Acetogenin*

Inti dari aktivitas *annonaceous acetogenin* 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*.

2.5.1.1 Menghambat Kinerja Kompleks I Mitokondria

Annonaceous acetogenin merupakan inhibitor NADH pada enzim *ubiquinone oxireductase*. Enzim ini merupakan enzim esensial dalam sistem transport elektron yang memimpin ke proses selanjutnya yaitu fosforilasi oksidatif di dalam mitokondria. Sumber utama aktivitas biologi *annonaceous acetogenin* melibatkan interaksi dengan kompleks I mitokondria.



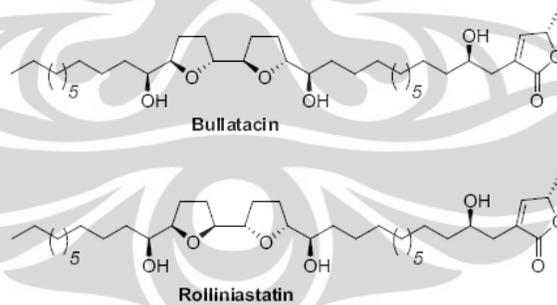
Gambar 2.3. Model McLaughlin dalam Sifat Inhibisi Acetogenin pada Kompleks I Mitokondria (Villo, 2008)

Kompleks I merupakan sistem protein yang rumit di dalam mitokondria (Zeng, 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. 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 2.3.

McLaughlin memberikan gagasan bahwa bagian tengah yang hidrofilik dari *acetogenin* bertindak sebagai jangkar pada bagian gliserol dari *phosphatidycholine* 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, hal ini menyebabkan pertumbuhan sel terhambat 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-I* merupakan inhibitor pada kompleks I mitokondria yang telah diidentifikasi paling berpotensi sampai saat ini. Gambar strukturnya dapat dilihat pada Gambar 2.4.



Gambar 2.4. Struktur *Bullatacin* dan *Rolliniastatin*
(Villo, 2008)

Struktur aktivitas inhibisi oleh *annonaceous acetogenin* ini memberi bukti bahwa *annonaceous acetogenin* bersifat sitotoksik dan ditemukan bersifat sitotoksik secara spesifik pada sel tumor tertentu sehingga dapat dikatakan bersifat antitumor. Studi mengenai *annonaceous acetogenin* terhadap sel tumor tikus telah membuktikan

bahwa *annonaceous acetogenin* dapat bersifat antitumor secara *in vitro* bahkan terhadap sel kanker yang telah resisten terhadap *adriamycin* di mana efek *annonaceous acetogenin* ini minimal terhadap sel epitel yang normal. Lebih jauh lagi, sifat inhibitorynya membuat *annonaceous acetogenin* juga bersifat sitotoksik pada sel kanker bersifat *multidrug resistant* (MDR). Sifat MDR disebabkan oleh peningkatan ekspresi P-glikoprotein, sebuah transmembran 170 kDa yang merupakan pompa obat yang dependen (bergantung) pada energy (Alali, 1999).

2.5.1.2 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 sintesis 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.

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

2.6 Ekstraksi

Ekstraksi adalah suatu proses pemisahan suatu senyawa dengan bantuan pelarut. Pelarut yang digunakan harus dapat mengekstrak substansi yang diinginkan tanpa melarutkan material lainnya. Ekstraksi padat cair atau leaching adalah transfer difusi komponen terlarut dari padatan inert ke dalam pelarutnya. Proses ini merupakan proses yang bersifat fisik karena komponen terlarut kemudian dikembalikan lagi ke keadaan semula tanpa mengalami perubahan kimiawi. Ekstraksi dari bahan padat dapat dilakukan jika bahan yang diinginkan dapat larut dalam solven pengestraksi. Ekstraksi berkelanjutan diperlukan apabila padatan hanya sedikit larut dalam pelarut. (Howard, 1959).

2.6.1. Metode Umum dalam Ekstraksi Tanaman Herbal

Ada beberapa teknik tradisional yang digunakan untuk mengekstrak senyawa tertentu dari tanaman untuk tujuan medis. Tujuan dasar dari ekstraksi ini adalah untuk mendapatkan porsi atau dosis terapi yang diinginkan dari obat mentah dan mengeliminasi material lainnya dengan diberi larutan tertentu yang diberi nama *menstruum*. Jenis teknik ekstraksi ini berperan tinggi dalam menentukan komposisi kualitatif dan kuantitatif ekstraksi. Ekstraksi ini juga digunakan untuk mengisolasi dan mengkarakterisasi bahan kimia aktif yang terdapat di dalam obat-obatan tersebut.

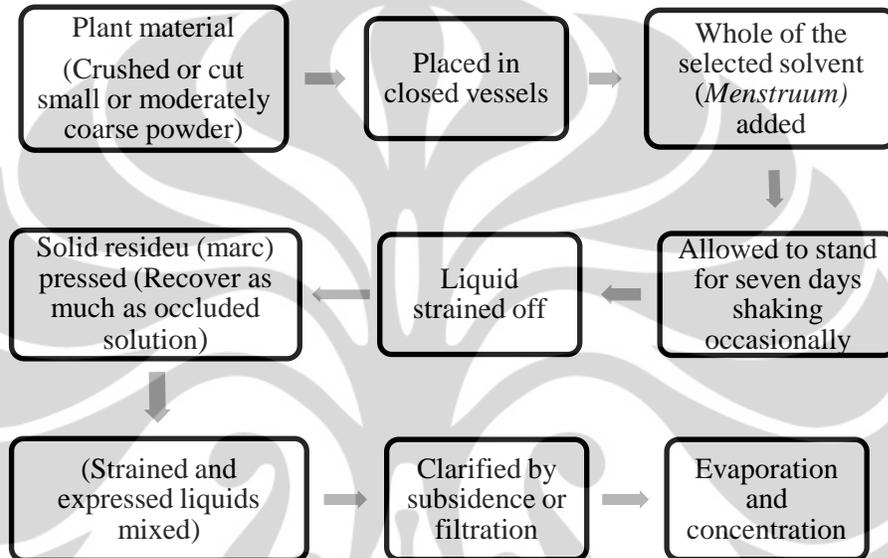
Berbagai metode yang lazim digunakan adalah *maceration*, *infusion*, *digestion*, *decoction*, *percolation*, ekstraksi kontinyu panas (*soxhlet*), ekstraksi larutan alkohol dengan fermentasi ekstraksi *counter-current*, ekstraksi ultrasound (sonikasi), dan ekstraksi *supercritical fluid*.

2.6.2. Ekstraksi *Annonaceous Acetogenin*

Ekstraksi etanol dari biomassa tanaman akan 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 partisi 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. Tahapan dalam melakukan ekstraksi bahan medis dari tanaman adalah pengurangan ukuran, ekstraksi, filtrasi, konsentrasi, dan pengeringan. (Handa, 2008)

Teknik ekstraksi yang selanjutnya akan digunakan dalam penelitian ini adalah ekstraksi dengan cara maserasi.



Gambar 2.5. Prosedur Umum Maserasi
(Singh, 2007)

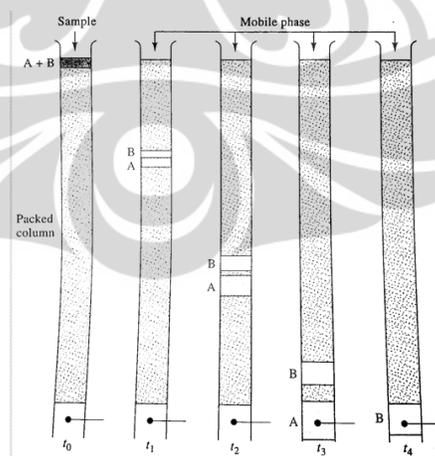
Prosedur umum untuk proses maserasi dapat dilihat pada bagan alir di Gambar 2.5. di atas. Setelah proses maserasi, dilakukan proses fraksinasi untuk memisahkan senyawa *annonaceous acetogenin* dari senyawa lain yang terdapat pada daun sirsak. Fraksinasi ini dilakukan berulang menggunakan pelarut yang berbeda-beda. Fraksinasi pertama menggunakan campuran etil asetat dan air, senyawa polar pada filtrat akan larut dalam air dan senyawa organik akan larut dalam etil asetat. Fraksi kedua menggunakan campuran metanol dan heksana. Bila dilihat dari struktur kimia *annonaceous acetogenin*, walau memiliki rantai yang panjang, namun pada rantai tersebut terdapat ikatan rangkap dan lakton yang membuat sifatnya menjadi sedikit polar sehingga mudah larut dalam metanol bila dibandingkan dengan heksana.

Kandungan dalam daun yang dapat dipisahkan dengan proses fraksinasi adalah sebagai berikut (Souza, 2009)

- Serat
- Lemak
- Senyawa organik (terpenoid dan senyawa fenol)
- Basa (alkaloid)

2.7 Kromatografi

Kromatografi merupakan metode pemisahan yang sangat baik, metode ini ditemukan oleh ahli botani bernama Mikhail Tsweet pada akhir abad 20. Pada semua metode kromatografi, sampel dilarutkan dalam fase bergerak yang bisa berupa gas, cairan, atau fluida superkritikal. 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, 2007). Hal ini dapat dilihat pada Gambar 2.6. di bawah ini.



Gambar 2.6. Diagram Elusi pada Kromatografi Kolom
(Skoog, 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 2.4.

Tabel 2.4 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
	<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

(Skoog dkk, 2007)

Untuk klasifikasi kromatografi planar adalah kromatografi lapis tipis atau *Thin Layer Chromatography* (TLC) 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.

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 melewatkan senyawa yang non polar (Johnson, 1991).

Daun biasanya kaya akan lemak dan sebagian besar kandungannya adalah *triacylglycerol*. Perbandingan kandungan senyawa *triacylglycerol* dan *annonaceous acetogenin* dalam ekstraksi biasanya adalah lebih dari 90% adalah *triacylglycerol*, 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).

2.8 Analisa Hasil Ekstraksi

Analisa dilakukan secara kualitatif dan kuantitatif. Untuk analisa kualitatif digunakan metode uji TLC (*Thin Layer Chromatography*), LC-MS, FT-IR, dan juga uji BST (*Brine Shrimp Test*) untuk mengetahui sifat sitotoksik dari *annonaceous acetogenin*, sedangkan untuk analisa kuantitatif digunakan spektrofotometer yang dapat digunakan dalam penentuan kadar sampel.

2.8.1. Uji TLC

TLC dilakukan dengan menggunakan pelarut campuran heksana dan aseton sebagai fase bergerak dan kemudian diberi larutan *kedde reagent*. Larutan ini terdiri dari 3-5-dinitrobenzoic acid dalam alkohol, diikuti oleh KOH dalam metanol. Reagen Kedde spesifik dengan kandungan laktone yang terdapat pada *annonaceous acetogenin*, ketika hasil ekstrak diberi larutan pewarna ini maka akan timbul warna ungu violet bila hasilnya positif.

2.8.2. FT-IR

Spektrum inframerah terletak pada daerah panjang gelombang 0,78 sampai 1000 μm atau bilangan gelombang 12800-10 cm^{-1} . Dilihat dari segi aplikasi dan instrumentasi spectrum inframerah dibagi ke dalam tiga jenis radiasi yaitu infra

merah dekat, inframerah pertengahan, dan inframerah jauh. Spektrum inframerah akan menghasilkan plot antara transmittansi dengan bilangan gelombang/frekuensi. Spektrum polisterina biasanya digunakan untuk kalibrasi karena menunjukkan banyak puncak tajam yang mempunyai frekuensi tepat dan telah diketahui. Aplikasi spektrum inframerah sangat luas baik untuk analisis kualitatif atau kuantitatif. Penggunaan yang paling banyak adalah daerah pertengahan $4000 - 600 \text{ cm}^{-1}$ atau dengan panjang gelombang 2,5 sampai $15 \mu\text{m}$. Kegunaan paling penting dari spektroskopi inframerah adalah untuk identifikasi senyawa organik, karena spektrumnya sangat kompleks dan terdiri dari banyak puncak-puncak. Spektrum inframerah mempunyai sifat karakteristik yang khas, artinya senyawa yang berbeda akan mempunyai spectrum yang berbeda, dan kemungkinan dua senyawa mempunyai spectrum yang sama sangat kecil (Hayati, 2007).

Senyawa organik juga menyerap energi elektromagnetik pada daerah inframerah. Radiasi inframerah tidak mempunyai energi yang cukup untuk mengeksitasi elektron, tapi dapat menyebabkan senyawa organik mengalami rotasi dan vibrasi. Penyerapan radiasi inframerah merupakan proses kuantisasi. Hanya frekuensi (energi) tertentu dan radiasi inframerah akan diserap oleh molekul. Dalam proses penyerapan, maka energi yang diserap akan menaikkan amplitude gerakan vibrasi ikatan dalam molekul (Hayati, 2007).

Pada dasarnya Spektrofotometer FTIR (*Fourier Transform Infra Red*) adalah sama dengan Spektrofotometer IR dispersi, yang membedakannya adalah pengembangan pada sistem optiknya sebelum berkas sinar infra merah melewati contoh (Giwangkara, 2007). Spektrofotometer IR dispersi menggunakan prisma (*grating*) sebagai pengisolasi radiasi, sedangkan spektrofotometer FTIR menggunakan interferometer yang dikontrol secara otomatis dengan komputer. Spektrofotometer FTIR (*Fourier Transform Infra Red*) dapat digunakan untuk analisis kualitatif dan kuantitatif (Hayati, 2007). Secara umum lebih baik digunakan bagan korelasi (*correlation chart*) untuk mengidentifikasi gugus fungsi hasil analisis IR (Khopkar, 1990).

2.8.3. Brine Shrimp Test (BST)

BST merupakan test *lethality* (mematikan) secara *in vivo* terhadap larva udang air laut *Artemia salina*. Tes ini mulai dilakukan sejak tahun 1956 dan terus berkembang menjadi metode aktivitas pada lingkungan dan khususnya pada senyawa bioaktif dari tanaman. Pada tahun 1982, tes ini digunakan untuk hasil isolasi dari agen antitumor aktif secara *in vivo* dan pestisida karena udang *Artemia* ini terbukti memiliki korelasi positif dengan daya sitotoksik sebyawa anti kanker dengan tingkat kepercayaan sebesar 95% (McLaughlin, 1998). Uji ini tergolong dalam uji toksisitas akut dimana hewan dibiarkan dalam suatu konsentrasi tertentu selama 24 jam dan kemudian dihitung berapa jumlah kematian pada kondisi akhir. Hasil dari uji BST ini berupa angka konsentrasi larutan dimana organism mati sebanyak 50% atau disingkat dengan LC_{50} . Uji BST memiliki keuntungan dibandingkan uji antitumor secara *in vivo* dan *in vitro* karena waktunya lebih cepat, yaitu 24 jam, lebih murah, dan sederhana karena tidak diperlukan teknik aseptis, serta semua penguji tidak perlu melakukannya di laboratorium khusus. Penggunaan udang *Artemia salina* ini tidak dilarang oleh badan hukum. Parameter sitoktositas dari uji BST ini adalah apabila hasil ekstrak memiliki nilai LC_{50} lebih kecil dari 1000 ppm, sehingga ekstrak dikatakan memiliki sifat aktif sebagai antikanker (Mayer dan Ferrigni, 1982). Lebih dari 300 jenis antitumor dan produk alami diisolasi dengan menggunakan bantuan metode BST, semakin rendah nilai LC_{50} maka senyawa aktif dikatakan bersifat semakin toksik.

2.8.4. Spektrofotometer

Spektrofotometer sesuai dengan namanya adalah alat yang terdiri dari spectrometer dan fotometer. Spektrometer menghasilkan sinar dari spectrum dengan panjang gelombang tertentu dan fotometer adalah alat pengukur intensitas cahaya yang ditransmisikan atau yang diabsorpsi. Jadi spektrofotometer digunakan untuk mengukur energi secara relative jika energy tersebut ditransmisikan, direfleksikan atau diemisikan sebagai fungsi panjang gelombang. Suatu spektrofotometer terdiri dari sumber spectrum tampak yang kontinyu, monokromator, sel pengabsorpsi untuk

larutan sampel atau blanko dan satu alat untuk mengukur perbedaan absorbs antara sampel dengan blanko ataupun pembanding. Spektrofotometer dapat dikelompokkan secara manual dan merekam (berkas tunggal dan berkas rangkap). Pengelompokan lain didasarkan daerah spektral yang biasa disebut dengan spektrofotometer inframerah, ultraviolet, serapan sinar tampak dan lain sebagainya (Khopkar, 2003).

Spektrofotometer serapan sinar tampak dan ultraviolet memanfaatkan sinar dengan panjang gelombang 400-700 nm untuk daerah sinar tampak dan 100-400 nm untuk daerah sinar ultraviolet. Perkiraan panjang gelombang dari berbagai warna dapat dilihat pada Tabel 2.5.

Tabel 2.5 Warna dan Panjang Gelombang Spektrum Tampak

Warna	Panjang Gelombang
Ultraviolet	< 400 nm
Violet	400 - 450 nm
Biru	450 – 500 nm
Hijau	500 -570 nm
Kuning	570 -590 nm
Oranye	590 – 620 nm
Merah	620 – 760 nm
Infra merah	>760 nm

(Fitriyana, 2009)

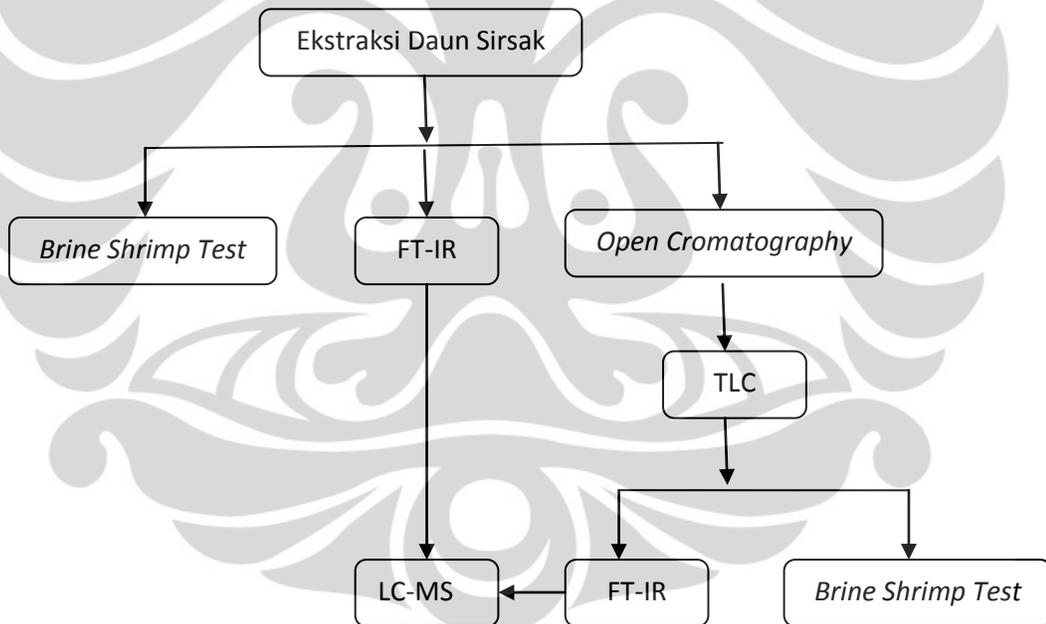
Prinsip kerja alat spektrofotometer UV-Vis adalah sumber radiasi yang merupakan sinar polikromatis yang dilewatkan melalui monokromator, kemudian sinar ini oleh monokromator diteruskan melalui sel yang berisi sampel. Sinar sebagian diserap oleh sel dan sebagian diteruskan ke fotosel yang berfungsi untuk mengubah energi cahaya menjadi energi listrik. Energi listrik yang dihasilkan oleh fotosel memberikann sinyal pada detektor yang kemudian dirubah menjadi nilai serapan dari zat yang dianalisis (Day dan Underwood, 1989).

BAB 3 METODE PENELITIAN

Annonaceous acetogenin dari daun sirsak diperoleh dengan cara diekstraksi menggunakan prosedur tertentu untuk mendapatkan hasil yang diinginkan. Setelah hasil ekstraksi diperoleh, ekstrak tersebut akan dimikroenkapsulasi menggunakan kitosan sebagai bahan penyalut.

3.1 Rancangan Penelitian

Penelitian dilakukan di Laboratorium Dasar Proses Kimia Departemen Teknik Kimia Universitas Indonesia, Depok. Diagram alir penelitian ini ditunjukkan oleh Gambar 3.1.



Gambar 3.1 Diagram Alir Penelitian.

3.2 Alat dan Bahan

Penelitian penentuan kadar *acetogenin* pada daun sirsak ini menggunakan sejumlah alat dan bahan. Adapun alat dan bahan tersebut adalah sebagai berikut :

3.2.1 Alat

Alat-alat yang digunakan dalam penelitian ini yaitu :

Tabel 3.1 Alat yang Digunakan dalam Penelitian dan Kegunaannya

No.	Alat	Kegunaan
1.	Beaker Glass	Wadah untuk ekstraksi, hasil ekstraksi dan analisis.
2.	Gelas Ukur	Wadah untuk mengukur larutan yang akan digunakan
3.	Timbangan	Menimbang bahan
4.	Kertas Saring	Menyaring daun sirsak dari pelarut
5.	Pipet Tetes	Meneteskan larutan.
6.	Corong Pisah	Melakukan proses fraksinasi
7.	<i>Rotary Evaporator</i>	Untuk proses pengonsentrasian
8.	Buret	Kolom kromatografi pada proses isolasi
9.	Kertas TLC	Analisis TLC
10.	Spatula	Memindahkan bahan dan mengaduk
11.	Kapas	Digunakan pada proses isolasi.
12.	Corong	Alat bantu pada saat menuangkan larutan supaya tidak tumpah dan dapat digunakan juga pada proses penyaringan
13.	Botol kaca kecil	Menampung hasil isolasi
14.	LC-MS	Menganalisa hasil ekstraksi
15.	Aerator	Mengaerasi pada proses penetasan larva <i>Artemia salina</i> .

3.2.2 Bahan

1. Daun sirsak
2. Etanol 95%
3. Metanol 96%
4. Etil Asetat
5. Heksana
6. Air
7. Aseton
8. 3,5-dinitrobenzoic acid
9. Asetonitril
10. Larva udang *Artemia salina*
11. Aquades
12. Garam laut
13. Silica gel
14. DMSO

3.3 Prosedur Penelitian

Prosedur lengkap dari masing-masing bagian yang terdapat pada diagram alir penelitian di Gambar 3.1 akan dijelaskan di bawah ini:

3.3.1 Ekstraksi

Penelitian ini bertujuan untuk mendapatkan hasil ekstraksi berupa *annonaceous acetogenin* dari daun sirsak dan kemudian dilakukan analisis kualitatif terhadap fraksi yang didapatkan dari ekstraksi.

Pada awalnya daun sirsak sebanyak 2 kg dikeringkan dan dihancurkan hingga sangat halus dengan cara diblender kering. Selanjutnya, daun sirsak diperkolasi selama 24 jam oleh etanol 95% sehingga dihasilkan ekstrak (F001). Kemudian ekstrak etanol (F001) dipartisi jadi dua larutan, yaitu antara etil asetat dan H₂O dengan perbandingan 1:1. Fraksi yang larut dalam H₂O dikeringkan dengan *freeze dryer*, sementara fraksi yang larut dalam etil asetat dikonsentrasikan dengan *rotary*

evaporator untuk menghasilkan residu (F003). Residu F003 ini kemudian dipartisi lagi dalam larutan metanol 90% dan heksana dengan perbandingan 1:1. Dua fasa ini kemudian dikeringkan dengan menggunakan *rotary evaporator* untuk menghasilkan fraksi yang larut dalam heksana (F006) dan fraksi yang larut dalam metanol (F005). (Geum-soog, 1997).

Lama waktu perkolasi dapat divariasikan dan dihubungkan dengan hasil konsentrasi yang didapatkan

Variabel bebas dari penelitian ini adalah lama waktu perkolasi, sedangkan variabel terikatnya adalah *annonaceous acetogenin* yang didapatkan dari sampel hasil ekstraksi daun sirsak.

3.3.2 Fraksinasi

Proses fraksinasi dilakukan dalam 2 tahap menggunakan pelarut yang berbeda-beda, yaitu :

- a. Pelarut 1 : Air (H₂O) dan etil asetat dengan perbandingan volume yang digunakan adalah 1:1.
- b. Pelarut 2 : Heksana dan metanol dengan perbandingan volume yang digunakan adalah 1:1

Adapun tahapan-tahapan yang ada pada proses fraksinasi ini adalah :

- Memasukkan pelarut 1 ke dalam corong pisah, kemudian masukkan **F001**. Selanjutnya campuran ini dikocok hingga terlihat terdapat 2 lapisan.
- Pisahkan fraksi atas (**F003**) dan fraksi bawah (**F002**) pada campuran tersebut.
- **F003** yang diperoleh kemudian dikonsentrasikan (diuapkan pelarutnya) menggunakan *rotary evaporator*.
- Masukkan pelarut 2 ke dalam corong pisah, kemudian masukkan fraksi **F003** yang telah diuapkan. Selanjutnya campuran ini dikocok hingga terlihat 2 lapisan.
- Pisahkan fraksi atas (**F004**) dan fraksi bawah (**F005**) pada campuran tersebut.
- **F005** yang telah diperoleh kemudian dikonsentrasikan menggunakan *rotary evaporator*.

3.3.3 Isolasi

Proses ini dilakukan untuk memperoleh senyawa aktif *annonaeous acetogenin* sebanyak - banyaknya dengan metode kromatografi kolom terbuka. Fasa diam pada proses ini adalah *silica gel*, sedangkan fasa geraknya adalah 50 mL heksana, 50 mL heksana : aseton (1:1), dan 50 mL aseton.

Tahapan isolasi yaitu sebagai berikut :

- Siapkan larutan heksana, heksana:aseton, dan aseton dalam beaker glass
- Memasukkan sedikit kapas ke ujung kolom kromatografi
- Memasukkan silica gel yang telah dibasahi oleh heksana sedikit demi sedikit ke dalam kolom kromatografi
- Pastikan tidak ada udara di dalam kolom dengan cara mengaduk *silica gel* dalam kolom dengan kuat.
- Memasukkan fraksi **F005** yang telah dilarutkan dalam campuran heksana:aseton (1:1) ke dalam kolom kromatografi.
- Memasukkan pelarut heksana ke dalam kolom
- Memasukkan campuran pelarut heksana:aseton (1:1) ke dalam kolom
- Memasukkan pelarut aseton ke dalam campuran
- Menampung hasil kromatografi kolol ke dalam botol kaca yang memiliki volum ± 9 mL
- Menguapkan pelarut pada masing-masing botol kaca pada suhu ruang.

3.3.4 Analisa

Hasil ekstraksi dan isolasi yang telah diperoleh selanjutnya dianalisis menggunakan TLC, LC-MS, spektrofotometer, dan juga uji aktivitas dari hasil ekstrak dengan cara uji BST.

- **Uji TLC (*Thin Layer Chromatography*)**

Hasil isolasi dari kromatografi kolom akan dianalisis menggunakan metode TLC dengan tahapan sebagai berikut :

- Mempersiapkan campuran heksana : aseton (1:1) sebanyak 50 mL sebagai fasa gerak.

- Mempersiapkan larutan pemberi warna *kedde reagent* dengan cara
 - Mendinginkan larutan tersebut hingga jenuh selama ± 30 menit.
 - Mempersiapkan kertas TLC dengan ukuran 6 x 13.5 cm sebanyak 3 lembar, beri garis batas atas dan bawah pada kertas dan buat beberapa titik untuk sampel pada garis batas tersebut dengan jarak 1 cm untuk setiap sampel.
 - Meneteskan sampel hasil isolasi pada masing-masing titik menggunakan pipa kapiler
 - Memasukkan kertas TLC ke dalam *beaker* yang berisi fasa gerak (jangan sampai fasa gerak mengenai batas bawah kertas TLC)
 - Mendinginkan kertas TLC tersebut hingga fasa gerak mencapai batas atas kertas
 - Mengangkat kertas TLC dari fasa gerak dan didiamkan hingga kering
 - Mencelupkan kertas TLC ke dalam larutan pemberi warna dan memanaskannya dalam oven bersuhu 105°C selama 5 menit, amati perubahan warna yang timbul.
- **Uji BST (*Brine Shrimp Test*)**

Uji BST ini dilakukan terhadap F002, F004, F005 dan juga pada botol 4,5,6,7,8,9, dan 10 hasil isolasi. Tahapan-tahapan dalam melakukan uji ini adalah sebagai berikut :

 - **Persiapan dan Penetasan Larva Udang *Artemia Salina Leach***
Melarutkan 38 gram garam laut ke dalam 1L air, selanjutnya larva udang dimasukkan ke dalam air laut sintetik tersebut. Kemudian dilakukan aerasi selama 4 hari pada larutan tersebut supaya larva dapat menetas.
 - **Pembuatan Larutan Kontrol**
Larutan kontrol ini berfungsi sebagai pembanding larutan uji. Adapun larutan kontrol yang dibuat adalah 5 ml larutan air laut + 2 tetes DMSO
 - **Pembuatan Larutan Sampel**
 - a. Menimbang 0.01 gram sampel, dilarutkan dalam 10 mL larutan A
 - b. Mengambil larutan A sebanyak 1 mL kemudian ditambahkan 9 mL air laut (larutan B)

- c. Mengambil larutan B sebanyak 1 mL kemudian ditambahkan 9 mL air laut (larutan C)
- d. Mengambil larutan C sebanyak 1 mL kemudian ditambahkan 9 mL air laut (larutan D)

Setelah larutan selesai disiapkan, kemudian pada masing-masing larutan dimasukkan 10 larva udang *Artemia Salina Leach* yang sudah menetas dan didiamkan selama 24 jam. Pada keesokan harinya dilihat berapa banyak udang yang mati pada masing-masing larutan.

- **LC-MS**

Analisa LC-MS ini dilakukan terhadap **F005** dan botol 4-10 hasil isolasi. Adapun langkah-langkah dalam metode ini adalah :

- Menyiapkan larutan fasa gerak berupa campuran metanol-air (9:1) sebanyak 100 mL
- Menyiapkan kolom dengan cara menuangkan *buffer* ke dalam kolom hingga tercapai kesetimbangan
- Mengatur laju alir fasa gerak sebesar 1 mL/min

- **Analisa Kandungan Lakton**

- Buat larutan 0.24% b/v standar *andrographolida* dalam alkohol
- Membuat Larutan I : 2% larutan *dinitrobenzoic acid* dalam metanol
- Membuat Larutan II : 5.7% larutan KOH dalam alkohol
- 8.4 mg sampel dilarutkan menggunakan 10 mL alkohol dalam labu takar.
- 3 mL larutan sampel dan 3 mL larutan standar dimasukkan ke dalam kuvet
- Ditambahkan 0.5 mL Larutan I ke dalam masing-masing kuvet
- Ditambahkan 0.5 mL Larutan II ke dalam masing-masing kuvet
- Dilakukan scanning dari 400-700 nm untuk larutan standard untuk mendapat panjang gelombang maksimum.
- Sampel diukur menggunakan spektro UV-Vis pada panjang gelombang maksimum yang diperoleh dari hasil *scanning*.

BAB 4

HASIL DAN PEMBAHASAN

Pada bab ini akan dibahas mengenai hasil yang didapatkan dari penelitian ekstraksi *annonaceous acetogenin* dari daun sirsak mulai dari ekstraksi, fraksinasi, isolasi dan hasil dari analisis yang dilakukan terhadap hasil ekstraksi. Sampel yang berupa daun sirsak diperoleh dari pohon sirsak yang berada di kawasan Perumahan Mutiara Depok.

4.1 Ekstraksi

Proses ekstraksi ini terdiri atas beberapa tahapan, yaitu preparasi sampel, proses ekstraksi itu sendiri, proses filtrasi dan proses pengonsentrasian. Di bawah ini akan dijelaskan secara satu persatu mengenai tahapan tersebut.

- Preparasi Sampel.

Sebelum proses ekstraksi, dilakukan proses preparasi pada sampel. Adapun tahapan dalam proses preparasi ini adalah :

1. Proses pengeringan daun sirsak.

Sampel daun sirsak yang telah diperoleh dicuci menggunakan air bersih untuk menghilangkan kotoran yang terdapat pada daun tersebut. Setelah itu, daun dikeringkan dengan cara dijemur di udara terbuka selama 3 hari hingga daun menjadi kering dan berubah warna menjadi kecoklatan.

2. Proses pengecilan daun sirsak.

Proses pengecilan ini dilakukan untuk mempermudah proses ekstraksi, pada penelitian ini metode ekstraksi yang digunakan adalah maserasi (merendam sampel dalam suatu pelarut). Pengecilan dilakukan dengan cara memblender kering daun sirsak. Dari proses pengeringan dan pengecilan ini diperoleh daun sirsak sebanyak 215 gram.



Gambar 4.1 Proses Preparasi Sampel Daun Sirsak

(a) Proses penjemuran daun sirsak, (b) Daun sirsak yang sudah kering, (c) Proses pengecilan ukuran daun sirsak, (d) Daun sirsak yang sudah diperkecil.

- Proses Ekstraksi

Setelah proses preparasi selesai dilakukan, maka tahap selanjutnya yaitu proses ekstraksi, dimana seperti telah disebutkan sebelumnya metode ekstraksi yang digunakan adalah maserasi, yaitu sampel direndam dalam suatu pelarut. Pada penelitian ini pelarut yang digunakan adalah etanol 95%. Sampel daun sirsak ditimbang sebanyak 100 gram dan kemudian direndam dalam 1425 mL etanol 95% selama 4 hari sambil karena selama waktu tersebut keseimbangan antara bahan yang diekstraksi pada bagian dalam sel dengan yang masuk dalam cairan telah tercapai. Dengan disertai pengadukan dapat mempercepat tercapainya keseimbangan tersebut.



Gambar 4.2. Proses Ekstraksi Maserasi

- Proses 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 ekstraksi saat proses fraksinasi ataupun tersumbat di kolom saat isolasi.



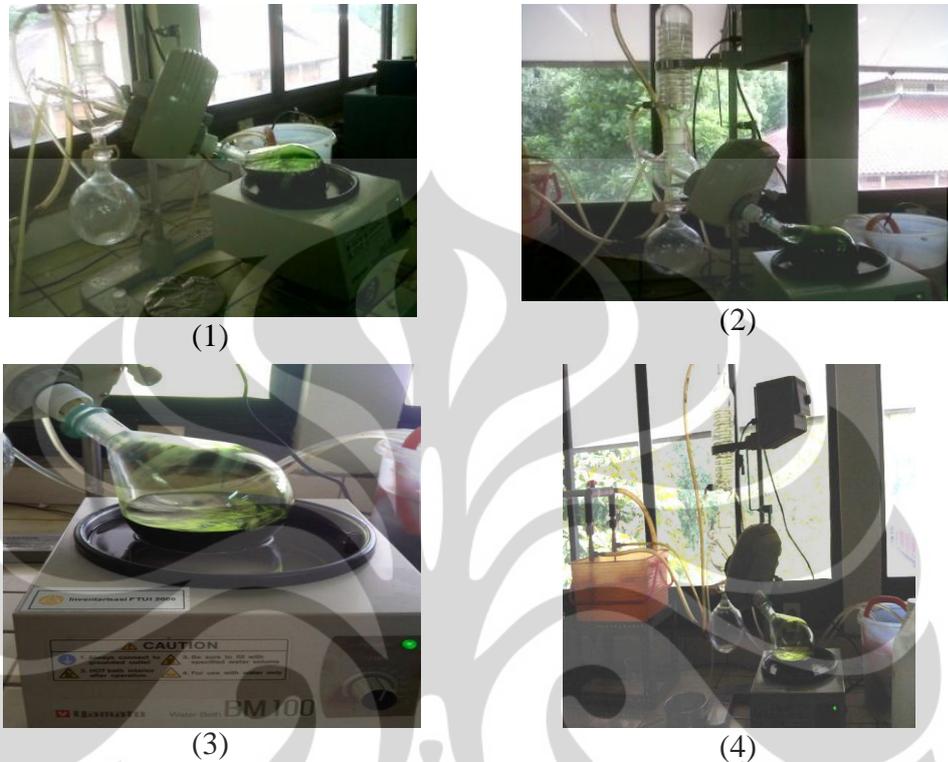
Gambar 4.3 Proses Filtrasi

Filtrasi dilakukan sebanyak dua hingga tiga kali untuk memastikan pelarut bebas padatan. Hal ini dikarenakan filtrasi satu kali tidak cukup untuk mendapatkan pelarut yang bebas padatan. Ukuran daun sirsak yang sangat halus menyebabkan lolosnya serbuk daun ke dalam filtrat, sehingga filtrasi harus dilakukan berulang.

- Proses Pengonsentrasian

Pengonsentrasian dilakukan dengan menggunakan *rotary evaporator*. Suhu air pemanas disetel pada suhu sekitar 45-50°C untuk mempercepat laju penguapan pelarut etanol 95% tanpa merusak jaringan *annonaceous acetogenin*. Hasil ekstrak dimasukkan ke dalam labu yang kemudian berputar

dengan pemanas air di bawahnya, selanjutnya pelarut etanol diuapkan dan dikondensasikan kembali. Pengonsentrasian dilakukan selama 5-6 jam hingga didapatkan hasil ekstraksi yang lebih kental (F001) sebanyak 105 gram.



Gambar 4.4 Proses Pengonsentrasian menggunakan *Rotary Evaporator*

4.2 Fraksinasi

Proses fraksinasi ini dilakukan untuk memisahkan *annonaceous acetogenin* dari senyawa lain menggunakan corong pisah. Pada tahap ini, fraksinasi dilakukan secara bertingkat menggunakan pelarut yang berbeda dengan tujuan proses fraksinasi senyawa aktif dapat berlangsung secara maksimal. Pada fraksinasi yang pertama digunakan pelarut air dan etil asetat. Etil asetat digunakan untuk menggantikan pelarut diklorometana atau kloroform yang seharusnya digunakan pada fraksinasi tahap pertama. Alasan dilakukannya penggantian pelarut yaitu dikarenakan diklorometana ataupun kloroform bersifat karsinogenik terhadap tubuh, walaupun pada proses selanjutnya diklorometana tersebut akan diuapkan tetapi dikhawatirkan larutan tersebut masih tertinggal di dalam F003. Maka digunakanlah etil asetat sebagai pelarut pengganti karena etil asetat telah dinyatakan aman oleh FDA serta telah banyak penelitian yang menggunakan etil

asetat dalam proses ekstraksi, selain itu etil asetat juga memiliki kepolaran yang berbeda dengan air sehingga proses fraksinasi dapat dilakukan. Pada proses fraksinasi ini terbentuk dua lapisan pada corong pemisah, bagian atas merupakan fraksi etil asetat dan bagian bawah merupakan fraksi air, karena berat jenis etil asetat lebih kecil bila dibandingkan dengan berat jenis air yaitu 0.897 g/cm^3 . Terbentuknya dua lapisan ini juga disebabkan adanya perbedaan konstanta dielektrikum dari air dan etil asetat. Konstanta dielektrikum dari air adalah $80.37 (D)^2$ dan etil asetat $6.02 (D)^2$. Semakin besar konstanta dielektrikum maka akan semakin polar sifat suatu zat, begitu juga sebaliknya. Perbedaan konstanta dielektrikum dari kedua larutan inilah yang menyebabkan keduanya tidak saling campur.

Hasil dari fraksinasi tahap pertama yaitu F002 dan F003, dimana F002 merupakan fraksi yang larut dalam air dan F003 merupakan fraksi yang larut dalam etil asetat. Pada saat dilakukan proses fraksinasi tahap pertama ini terdapat sedikit kesulitan, yaitu antara air dan etil asetat sulit terpisah. Maka dilakukan modifikasi dalam proses ini, yaitu pada F002 difraksinasi ulang dengan etil asetat (1:1) karena dikhawatirkan ada fraksi yang seharusnya larut dalam etil asetat ikut terbawa dalam air. Setelah dilakukan fraksinasi ulang, diperoleh F002 yang lebih jernih bila dibandingkan dengan F002 sebelum difraksinasi ulang. Dari proses fraksinasi tahap pertama ini diperoleh F003 sebanyak 22.7 gram.



(a)

(b)

Gambar 4.5 Proses Fraksinasi

(a) Sesaat setelah dikocok, (b) Setelah larutan terpisah.

Selanjutnya dilakukan fraksinasi tahap 2, dimana F003 yang telah diperoleh dilarutkan dalam campuran heksana dan metanol (1:1) untuk kemudian difraksinasi menggunakan corong pisah. Hasil dari fraksinasi tahap 2 ini adalah F004(fraksi larut heksana) dan F005 (fraksi larut metanol). Karena berat jenis metanol lebih berat dibandingkan heksana, maka metanol ada di bagian bawah corong pisah. Sama seperti pada fraksinasi tahap 1, setelah diperoleh F005, kemudian fraksi ini dikonsentrasikan menggunakan *rotary evaporator* sehingga diperoleh F005 sebanyak 20 gram.

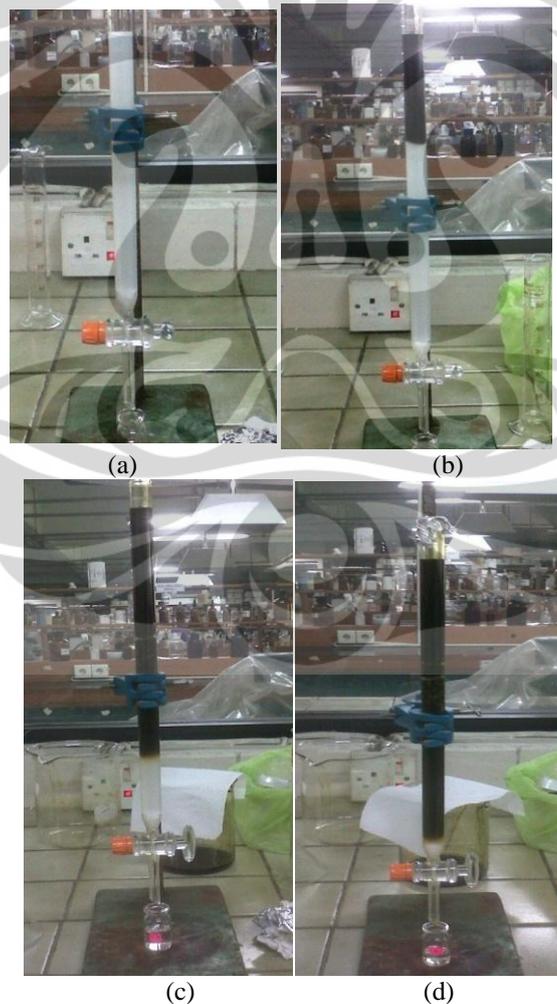


(a) (b)
Gambar 4.6 (a) Fraksi F004 , (b) Fraksi F005

4.3 Isolasi

Isolasi dilakukan terhadap fraksi **F005** dengan tujuan memisahkan *annonaceous acetogenin* dari kandungan-kandungan lain yang terdapat pada daun sirsak sehingga diperoleh *annonaceous acetogenin* yang lebih murni. Proses ini dilakukan dengan cara melewati sampel ke dalam kolom yang diikuti dengan fasa gerak. Pada awalnya, sampel dilarutkan menggunakan heksana : aseton, hal ini dilakukan karena sifat dari sampel yang agak polar, setelah itu sampel dimasukkan ke dalam kolom yang telah terisi *silica gel* yang sudah dibasahi menggunakan heksana. *Silica gel* yang berfungsi sebagai fasa diam dijaga supaya tetap basah dengan tujuan tidak ada gelembung udara yang masuk ke dalam kolom sehingga menyebabkan proses pemisahan menjadi kurang baik. Sejalan dengan dimasukkannya sampel, tutup kolom pada bagian bawah sehingga pelarut heksana yang ada pada kolom mulai turun sedikit demi sedikit hingga sampel juga turun dan tercampur dengan pelarut heksana yang ada pada kolom. Setelah pelarut heksana mulai habis, maka sampel mulai keluar dari kolom,

seiring dengan proses ini dimasukkan pula pelarut aseton ke dalam kolom. Sama seperti sebelumnya, saat sampel mulai keluar, maka pelarut aseton juga ikut turun dan saat sampel mulai habis maka yang ada pada kolom hanyalah pelarut aseton yang berguna untuk membilas kolom. Proses isolasi dapat dilihat pada gambar 4.7 bawah. gambar (a) merupakan saat dimana kolom hanya berisikan pelarut heksana, gambar (b) adalah saat dimana sampel mulai dimasukkan ke dalam kolom dan di dalam kolom tersebut masih banyak terdapat pelarut heksana, gambar (c) merupakan saat di mana sampel mulai bercampur dengan sisa pelarut heksana yang ada di dalam kolom, sedangkan gambar (d) merupakan saat di mana kolom hanya berisikan sampel.

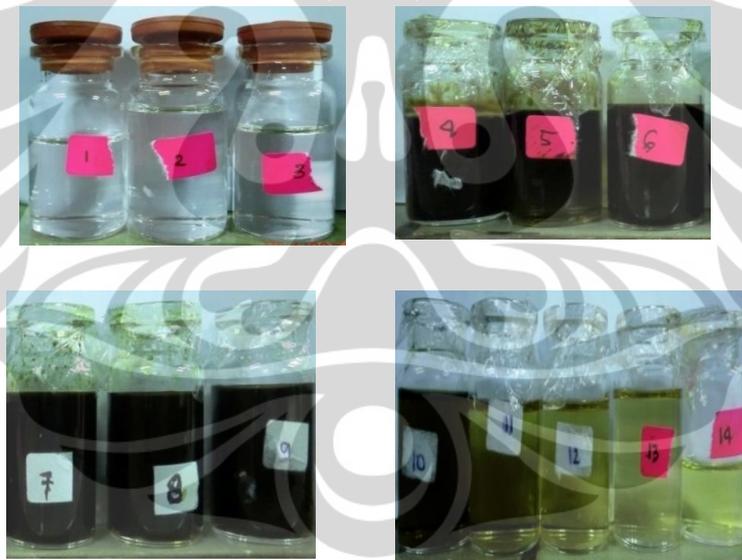


Gambar 4.7 Proses isolasi

Annonaceous acetogenin bersifat sedikit non polar, maka pelarut 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.

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.

Hasil dari isolasi ini ditampung di dalam botol kecil yang semuanya berjumlah 14 botol, masing-masing botol tersebut berisikan cairan dengan warna yang berbeda seperti yang terlihat pada Gambar 4.8 di bawah ini.



Gambar 4.8. Hasil isolasi

Pada botol 1-3 terlihat warna bening karena botol ini hanya berisikan pelarut heksana saja, pada botol 4-6 yang berisikan campuran pelarut heksana dengan sampel terlihat warna hijau yang menandakan sampel dalam kolom sudah mulai, pada botol 6-9 terlihat warna hijau yang lebih pekat dibandingkan dengan botol sebelumnya karena pada botol ini hanya terdapat sampel saja, sedangkan untuk

botol 10-14 terlihat warna hijau mulai memudar menuju bening karena botol ini berisikan campuran sisa sampel dengan pelarut aseton.

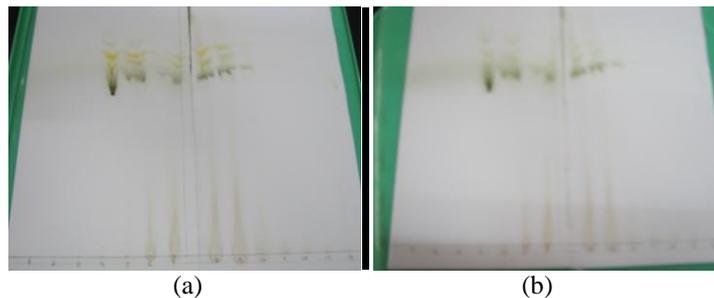
4.4 Analisa Hasil Ekstraksi

Setelah tahap preparasi, fraksinasi dan isolasi dilakukan, maka langkah selanjutnya adalah analisa. Analisa ini dilakukan secara kualitatif dan kuantitatif, adapun untuk analisa kualitatif digunakan metode uji *Thin Layer Chromatography* (TLC) untuk mengetahui keberadaan fraksi *annonaceous acetogenin* di dalam ekstrak daun sirsak yang dipastikan kembali dengan uji LC-MS, dan juga dilakukan metode uji BST untuk mengetahui uji aktivitas dari ekstrak tersebut. Sedangkan untuk analisa kuantitatif dilakukan menggunakan spektrofotometer UV-Vis untuk mengetahui kadar lakton dalam daun sirsak.

4.4.1 Thin Layer Chromatography (TLC)

Uji TLC ini dilakukan untuk menguji keberadaan *annonaceous acetogenin* hasil isolasi dengan menggunakan *kedde reagent* yang akan menghasilkan warna ungu violet apabila sampel mengandung *annonaceous acetogenin*. Sebenarnya warna violet ini tidak spesifik menandakan adanya *annonaceous acetogenin*, melainkan spesifik terhadap gugus lakton. Dikarenakan *annonaceous acetogenin* mengandung gugus lakton, maka saat dilakukan uji TLC menggunakan *kedde reagent* akan timbul warna ungu violet. Untuk memastikan keberadaan *annonaceous acetogenin* tersebut dilakukanlah uji LC-MS. Uji TLC ini dilakukan dua kali untuk mendapatkan hasil yang lebih akurat. Pada percobaan pertama, sampel hasil isolasi langsung diuji, sedangkan pada percobaan kedua pelarut pada botol-botol hasil isolasi telah diuapkan sehingga yang tersisa hanyalah endapan pada dasar botol.

Kondisi sekitar tempat berlangsungnya proses TLC ini harus dijenuhkan terlebih dahulu supaya pelarut yang digunakan dapat naik hingga batas yang telah ditentukan, apabila kondisi tidak jenuh aka menyebabkan pelarut sulit untuk naik sehingga dibutuhkan waktu yang jauh lebih lama untuk proses TLC ini. Hasil analisa TLC dapat dilihat pada gambar 4.9 di bawah ini.



(a) sebelum diberi *kedde reagent* (b) setelah diberi *kedde reagent*
Gambar 4.9 Analisa TLC

Analisa menggunakan TLC ini dilakukan sebanyak 2 kali, berdasarkan percobaan pertama diduga *annonaceous acetogenin* ada pada botol hasil isolasi nomor 5,6,7,8,9 sedangkan pada percobaan kedua diduga *annonaceous acetogenin* ada pada botol 6,7,8,9. Hal ini ditunjukkan dengan timbulnya warna keunguan pada spot-spot tersebut saat diberi larutan pewarna *kedde reagent*. Dari kedua data tersebut maka disimpulkan *annonaceous acetogenin* diduga terdapat pada botol 6,7,8, dan 9.

4.4.2 Uji BST

Uji BST dilakukan terhadap fraksi F002, F004, F005, dan botol 4 hingga botol 10 hasil isolasi. Tujuan dilakukannya pengujian ini adalah untuk mengetahui keaktifan masing-masing sampel pada berbagai macam konsentrasi. Pada pengujian ini, sampel yang telah diupkan pelarutnya kemudian dilarutkan kembali menggunakan DMSO (*dimethyl sulfoxide*) yang tidak bersifat toksik terhadap larva udang sehingga tidak mempengaruhi hasil pengujian karena larva udang mati bukan karena pengaruh dari pelarut yang digunakan melainkan karena senyawa aktif yang diujikan. Sifat toksik dari senyawa aktif ini dapat diketahui melalui nilai LC_{50} yang diperoleh lewat perhitungan berdasarkan jumlah larva udang yang mati akibat senyawa yang diujikan. Semakin tinggi nilai LC_{50} maka semakin rendah sifat toksisitas dari suatu zat, sebaliknya apabila semakin rendah nilai LC_{50} maka akan semakin tinggi pula sifat toksisitasnya (Ak'yunin, 2008). Sampel yang akan diujikan terbagi menjadi beberapa konsentrasi, mulai dari 1 ppm hingga 1000 ppm, tujuannya adalah untuk melihat sifat toksik dari sampel pada masing-masing konsentrasi. Semakin tinggi konsentrasi sampel yang digunakan, maka akan semakin banyak larva udang yang mati pada pengujian ini. Proses pengujian dilakukan dengan 2 kali pengulangan, sehingga akan diperoleh 3

data untuk masing-masing konsentrasi pada satu sampel dan akan diperoleh rata-rata kematian udang untuk masing-masing konsentrasi pada satu sampel. Dengan dilakukannya pengulangan pada pengujian ini, data yang didapat akan lebih pasti

Hasil pengujian berupa jumlah larva udang yang mati dapat dilihat pada Tabel 4.1. di bawah ini.

Tabel 4.1 Jumlah Larva yang Mati pada Uji BST.

Botol	Konsentrasi (ppm)			
	1	10	100	1000
Blanko	2	2	3	3
F002	2	3	4	5
	2	3	2	4
	2	2	2	2
F004	6	7	7	8
	6	6	7	7
	7	7	8	7
F005	7	8	9	10
	7	9	9	9
	7	9	9	9
4	6	7	8	8
	7	7	8	8
	7	8	7	8
5	7	7	8	8
	7	8	8	8
	6	8	8	8
6	7	7	7	8
	6	7	8	8
	7	7	8	8
7	7	8	8	9
	7	8	9	9
	8	8	9	9
8	8	8	9	9
	7	8	8	9
	7	7	8	8
9	7	8	8	8
	7	7	8	9
	7	8	8	8

Dari data-data tersebut diperoleh nilai LC_{50} yang merupakan parameter toksisitas sampel. LC_{50} merupakan konsentrasi zat aktif yang dibutuhkan untuk membunuh 50% hewan uji. Nilai LC_{50} diperoleh dari perhitungan regresi linear, contoh perhitungannya dapat dilihat pada Lampiran 1. Persamaan garis linear tersebut diperoleh dari log konsentrasi sampel sebagai sumbu x dan persen

kematian larva udang sebagai sumbu y. Setelah diperoleh persamaan garis linear, masukkan nilai $y=50$ ke dalam persamaan tersebut sehingga diperoleh nilai x, nilai LC_{50} diperoleh dari 10 pangkat x. Hasil perhitungan dan keaktifan dari seluruh sampel dapat dilihat pada tabel 4.2. Berdasarkan tabel di bawah, terlihat bahwa blanko dan fraksi F002 tidak aktif atau tidak bersifat toksik terhadap larva udang,. Hal ini dikarenakan blanko yang berisikan DMSO yang berfungsi untuk melarutkan sampel saat pengujian dilakukan terbukti tidak bersifat toksik terhadap larva udang, sehingga bila digunakan sebagai pelarut pada sampel tidak akan mempengaruhi hasil pengujian.

Tabel 4.2 Hasil uji BST dan keaktifannya

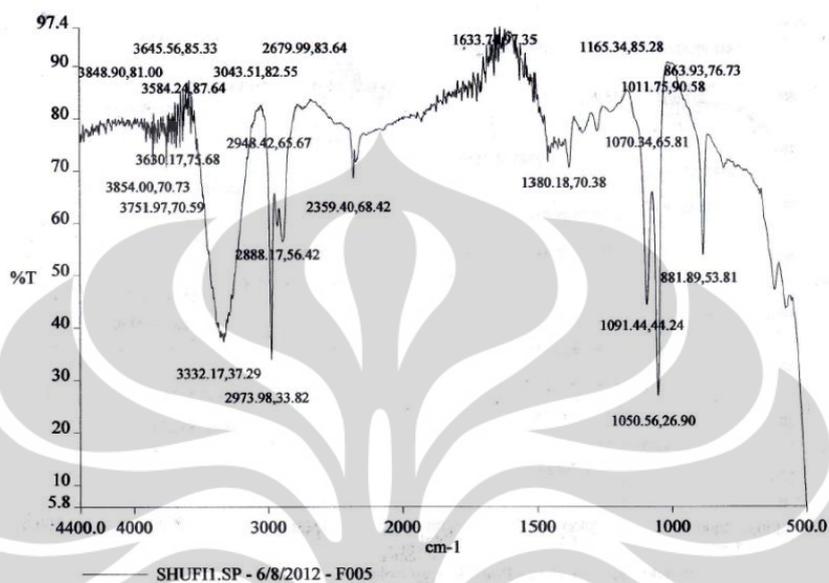
Sampel	LC_{50} (ppm)	Keaktifan (Ya/Tidak)
Blanko	56234133	Tidak
F002	1000000	Tidak
F004	0.00019	Ya
F005	0.000013	Ya
4	0.00001	Ya
5	0.000035	Ya
6	0.000015	Ya
7	0.000016	Ya
8	0.000015	Ya
9	0.000014	Ya

. Sedangkan pada F002, hasil uji yang ditunjukkan adalah tidak aktif, karena F002 merupakan fraksi air yang berasal dari fraksinasi tahap pertama, sehingga fraksi ini tidak mengandung senyawa aktif ataupun bahan kimia yang bersifat toksik terhadap larva udang *Artemia Salina*. Untuk F004, F005, dan botol 4 hingga botol 9 hasil isolasi, diperoleh hasil bahwa semua botol tersebut bersifat aktif terhadap larva udang *Artemia Salina* dan fraksi F005 bersifat paling aktif dibandingkan yang lainnya karena nilai LC_{50} pada fraksi ini paling rendah.

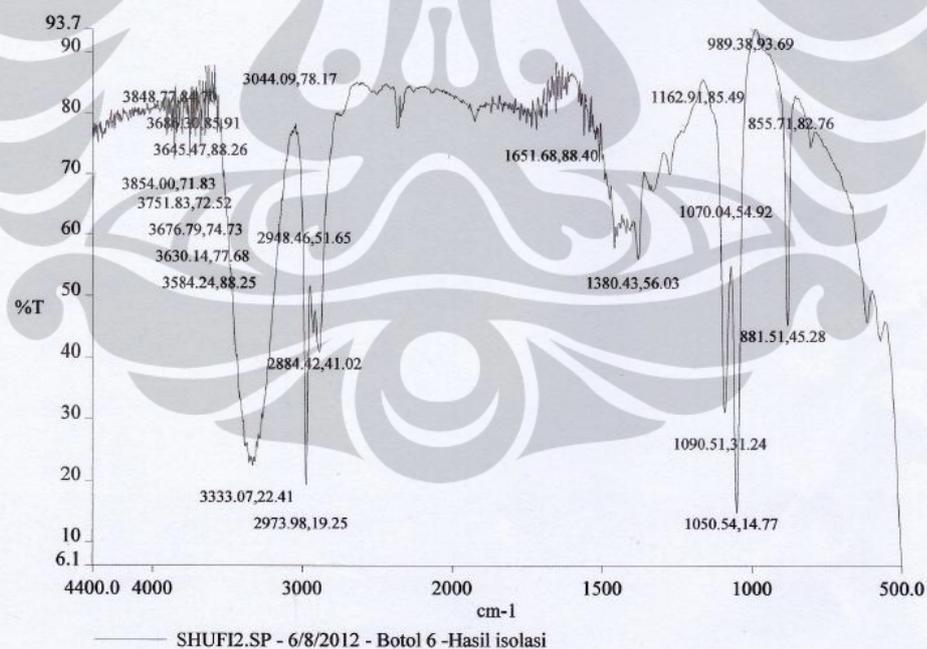
4.4.3 Uji FT-IR

Spektrofotometer FTIR merupakan suatu metode identifikasi gugus fungsi dari suatu senyawa berdasarkan perbedaan momen dipol. Molekul yang memiliki perbedaan momen dipol yang dapat bervibrasi dan dapat terbaca oleh sinar FTIR. Bilangan gelombang yang sering digunakan dalam analisis senyawa bahan alam

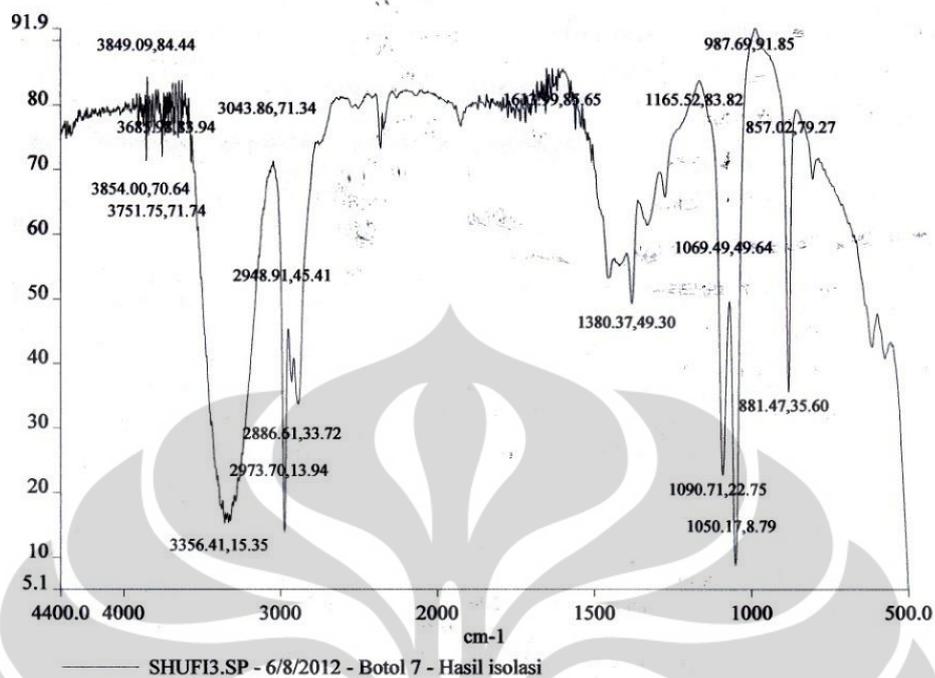
yaitu di daerah IR tengah ($4000 - 400 \text{ cm}^{-1}$). Hasil identifikasi senyawa *annonaceous acetogenin* pada fraksi F005 menggunakan spektrofotometer FTIR dapat dilihat pada gambar 4.10 di bawah ini



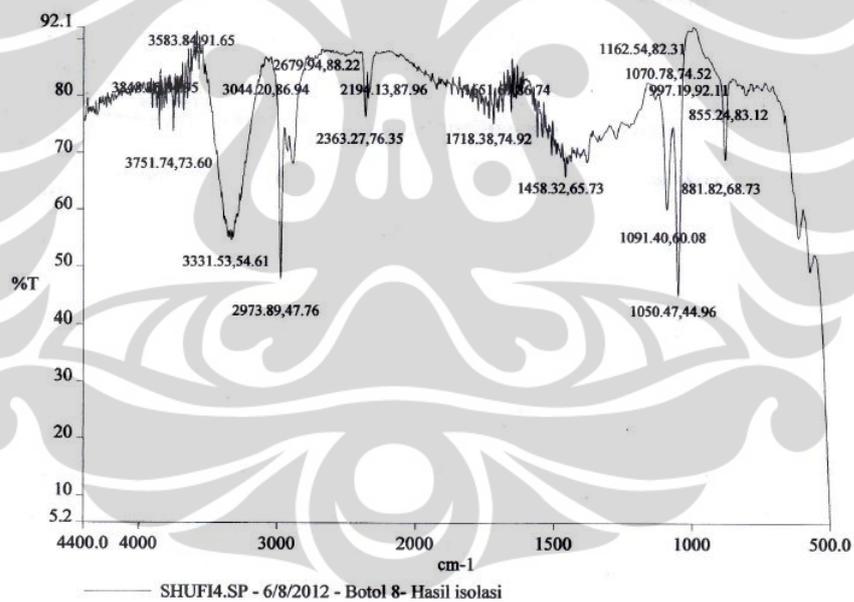
Gambar 4.10. Spektrum IR pada F005



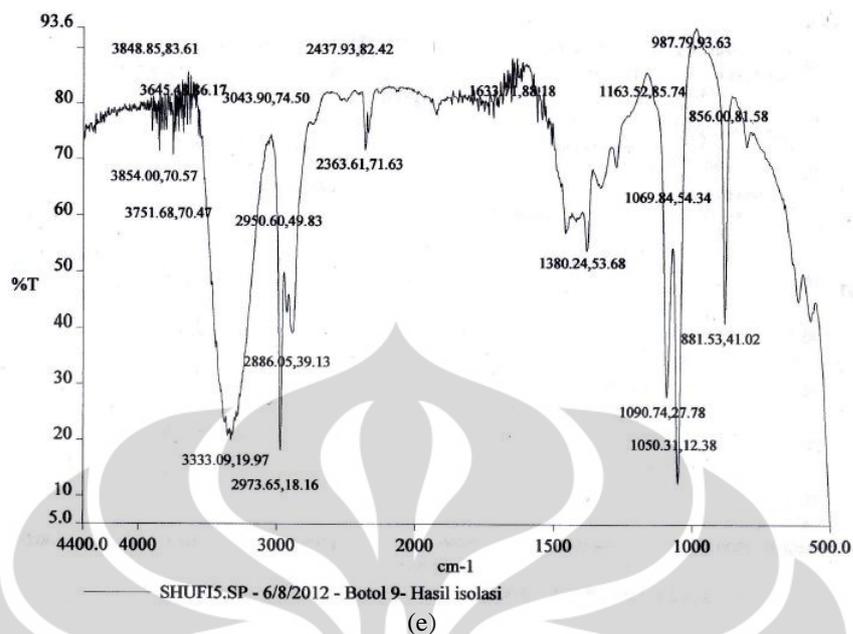
Gambar 4.11. Spektrum IR pada Botol 6 Hasil Isolasi



Gambar 4.12. Spektrum IR pada Botol 7 Hasil Isolasi

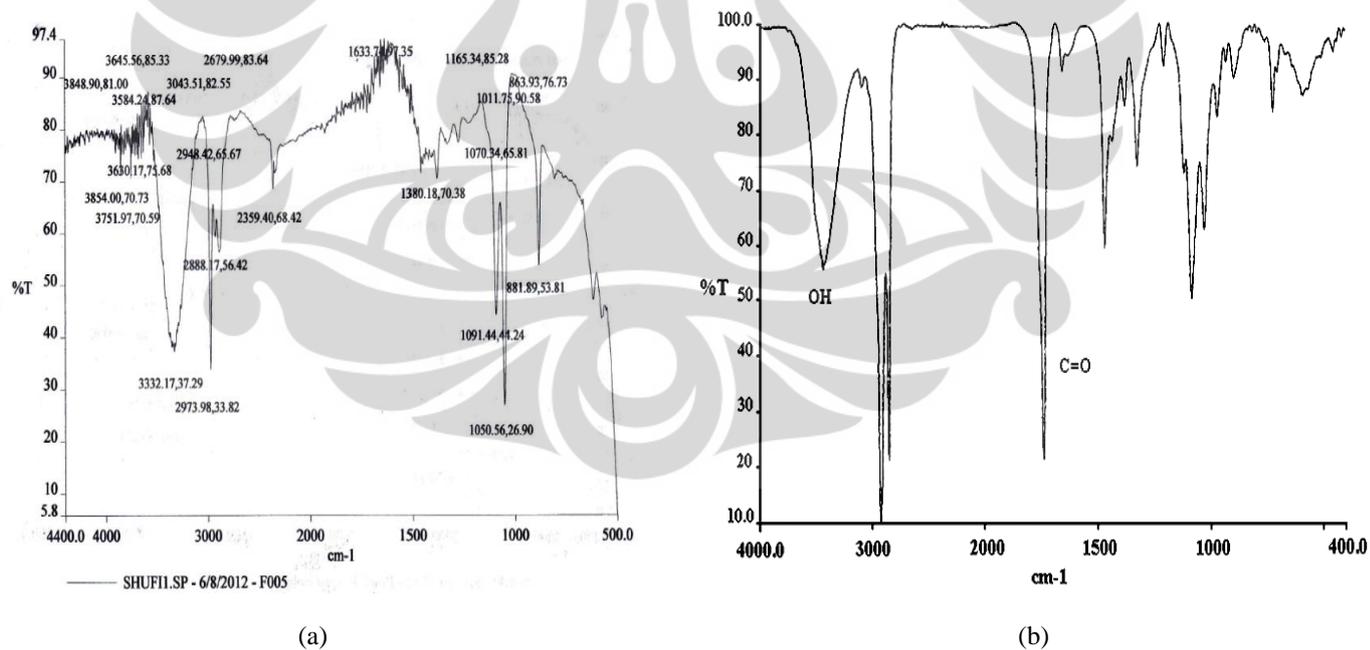


Gambar 4.13. Spektrum IR pada Botol 8 Hasil Isolasi.



Gambar 4.14. Spektrum IR pada Botol 9 Hasil Isolasi.

Untuk dapat menganalisis spektrum IR pada gambar di atas, diperlukan grafik standar *acetogenin* pada umumnya yang terdapat pada gambar 4.15 di bawah ini.



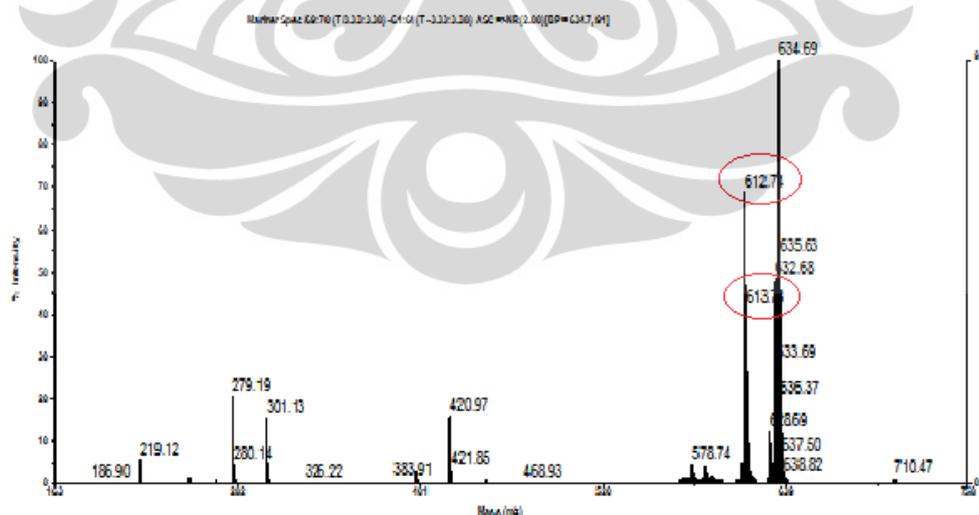
Gambar 4.15. Perbandingan spectra *acetogenin* standar dengan sampel

Hasil FT-IR pada sampel hasil ekstraksi dan isolasi ini yang terlihat pada gambar 4.15 (a) memiliki pola yang sama dengan pola *annonaceous acetogenin*

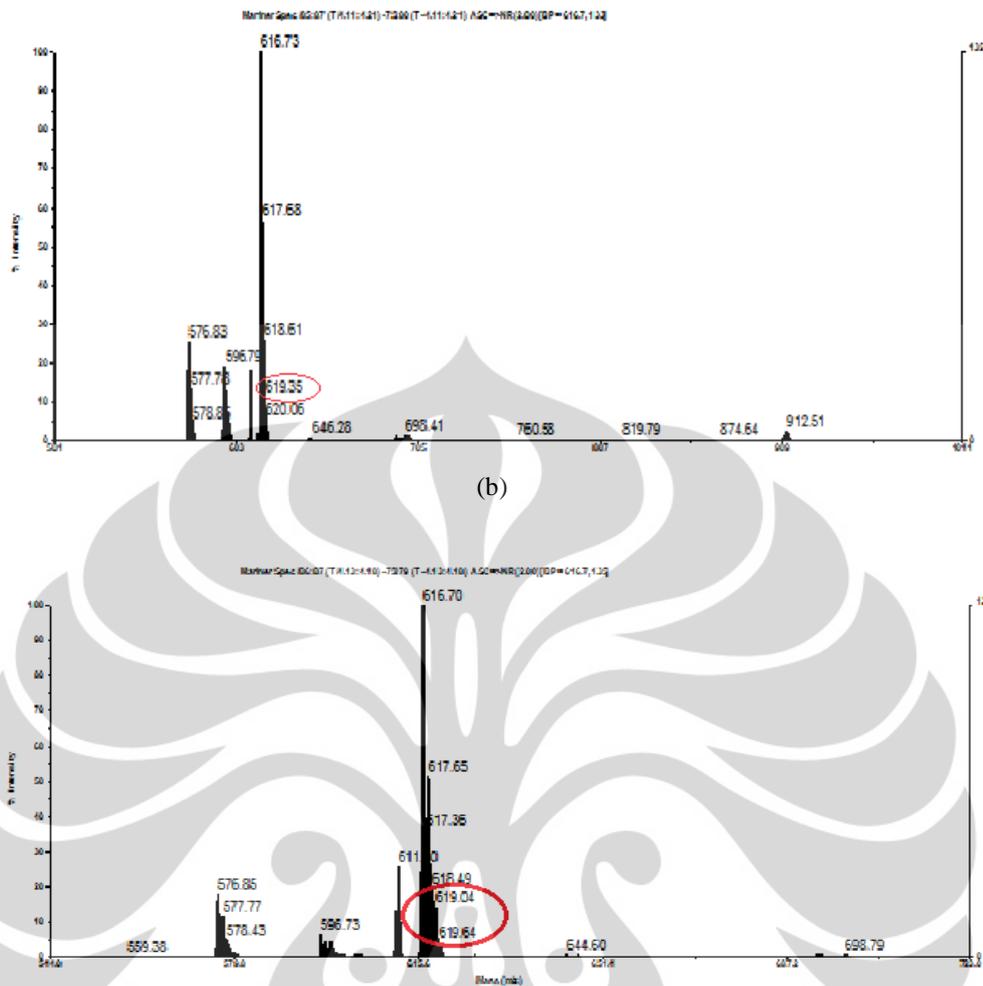
pada umumnya seperti pada Gambar 4.15 (b), hanya saja pada hasil ekstraksi ini terjadi pergeseran frekuensi. Terjadinya frekuensi bisa dikarenakan jenis sampel yang diujikan berbeda dari sampel *annonaceous acetogenin* yang biasanya diuji menggunakan FT-IR dalam bentuk pelet. Pada penelitian ini, sampel diujikan dalam keadaan cair sehingga pelarut yang terdapat pada sampel mempengaruhi proses pengujian, yaitu pelarut menyebabkan energi pada IR akan menurun sehingga frekuensi akan turun dan panjang gelombang bergeser ke kiri. Pada gambar 4.10, terlihat spektrum lemah pada bilangan gelombang sekitar 2359 cm^{-1} yang diduga menggambarkan bilangan gelombang C=O dari gugus lakton tak jenuh. Walaupun frekuensi yang ada di luar dari frekuensi gugus C=O pada umumnya, namun pola yang dimiliki serupa. Lakton tak jenuh ini juga merupakan gugus yang selalu terdapat pada struktur senyawa *annonaceous acetogenin*. Sehingga disimpulkan bahwa pada fraksi F005 dan botol 6 hingga botol 9 hasil isolasi mengandung *annonaceous acetogenin*.

4.4.4. Uji LC-MS

Uji LC-MS dilakukan untuk memperkuat hasil uji FT-IR. Pada uji ini akan diperoleh hasil yang terdiri dari berat molekul senyawa-senyawa yang terdapat pada hasil ekstrak dan hasil isolasi. Hasil uji LC-MS dapat dilihat pada Gambar 4.16 di bawah ini.



(a)

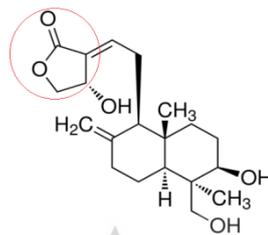


Gambar 4.16. (a) dan (b).Hasil LC-MS pada F005 ; (c) Hasil LC-MS pada fraksi hasil isolasi

4.4.5. Uji Spektrofotometri UV-Visible

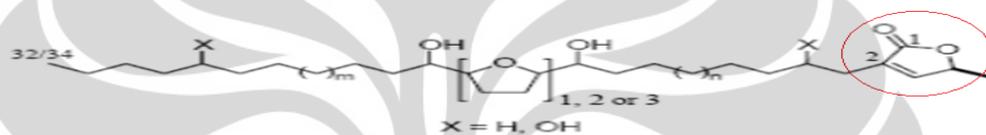
Pengujian menggunakan spektrofotometri UV-Vis ini tujuannya adalah mengetahui besarnya kandungan *annonaceous acetogenin* yang terdapat pada daun sirsak. Senyawa murni *annonaceous acetogenin* masih sulit diperoleh, sehingga untuk menentukan kandungannya di dalam ekstrak daun sirsak digunakanlah metode penentuan kandungan lakton pada *annonaceous acetogenin*. Karena *annonaceous acetogenin* identik dengan gugus lakton, dan diketahui bahwa pada daun sirsak, senyawa kimia yang memiliki gugus lakton hanya *annonaceous acetogenin* sehingga penentuan kandungan *annonaceous acetogenin* pada daun sirsak dapat ditentukan dengan cara menentukan besarnya kandungan lakton. Senyawa *andrographolida* murni digunakan dalam penentuan ini sebagai senyawa pembanding saat proses pengukuran menggunakan

spektrofotometer. Struktur kimia dari *Andrographolida* dapat dilihat pada Gambar 4.17. di bawah ini.



Gambar 4.17. Struktur Kimia *Andrographolida*.

Pada gambar di atas, terlihat bahwa senyawa *Andrographolida* memiliki gugus lakton yang hampir mirip dengan gugus lakton yang terdapat pada *annonaceous acetogenin* yang terlihat pada Gambar 4.18 di bawah ini.



Gambar 4.18. Struktur Kimia *Acetogenin*.

Berdasarkan kedua gambar di atas, pada lingkaran merah terlihat bahwa kedua senyawa memiliki kemiripan struktur gugus lakton, berat molekul kedua gugus ini pun tidak berbeda jauh. Hal inilah yang menjadi dasar penggunaan senyawa *andrographolida* dalam penentuan kandungan lakton yang terdapat pada *annonaceous acetogenin*. Selain itu, senyawa *Andrographolida* sudah sering digunakan untuk menentukan kandungan lakton pada suatu ekstrak tanaman.

Panjang gelombang yang digunakan pada pengujian ini adalah 400 nm, dikarenakan saat dilakukan scanning panjang gelombang dari 400 nm – 700 nm, absorbansi maksimum terdapat pada panjang gelombang 400 nm. Hasil pengukuran standar *andrographolida* maupun sampel dapat dilihat pada Tabel 4.4.

Tabel 4.3 Hasil Pengukuran Spektrofotometri

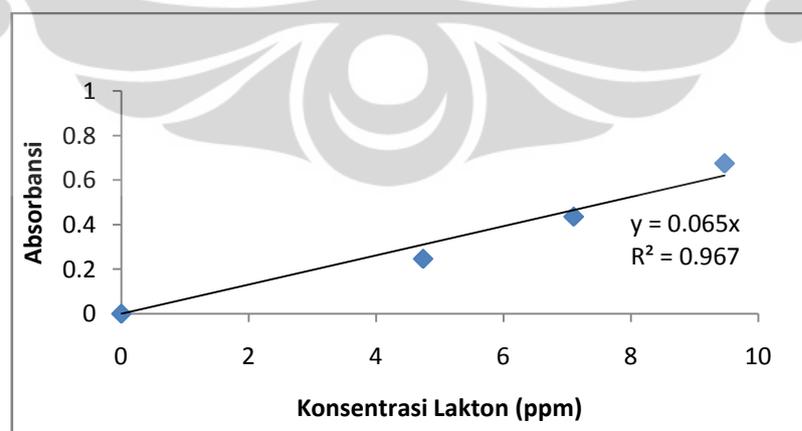
Standar	Absorbansi
Standar <i>Andrographolida</i> 20 ppm	0.246
Standar <i>Andrographolida</i> 30 ppm	0.435
Standar <i>Andrographolida</i> 40 ppm	0.674
F005	0.512
Botol 6 hasil isolasi	0.413
Botol 7 hasil isolasi	0.256
Botol 8 hasil isolasi	0.379
Botol 9 hasil isolasi	0.355

Konsentrasi standar yang terdapat pada tabel di atas merupakan konsentrasi *andrographolida*, sedangkan absorbansi yang diperoleh dari pengukuran merupakan absorbansi lakton yang terdapat pada *andrographolida*. Sehingga untuk menghitung kandungan lakton di dalam sampel, perlu diketahui konsentrasi lakton yang ada pada standar *andrographolida*. Konsentrasi lakton dihitung menggunakan perbandingan berat molekul gugus lakton yang terdapat pada *andrographolida* terhadap berat molekul *andrographolida* dikalikan dengan konsentrasi *andrographolida* yang digunakan saat pengukuran, hasil dapat dilihat pada Tabel 4.5

Tabel 4.4 Konsentrasi Lakton dalam Standar *Andrographolida*

Konsentrasi Standar <i>Andrographolida</i> (ppm)	Konsentrasi Lakton dalam Standar (ppm)
0	0
20	4.737
30	7.105
40	9.474

Dari tabel di atas diperoleh hasil bahwa pada saat konsentrasi standar *andrographolida* 20 ppm, maka konsentrasi lakton yang terdapat dalam standar itu adalah 4.737 ppm. Dan dari data-data tersebut akan diperoleh persamaan garis linear antara konsentrasi lakton dalam standar *andrographolida* dengan absorbansi seperti yang terlihat pada gambar 4.19 di bawah ini.



Gambar 4.19 Linearitas Lakton dalam Standar *Andrographolida*.

Persamaan garis linear yang diperoleh yaitu $y = 0.065x$, berdasarkan persamaan ini maka konsentrasi lakton dalam sampel dapat diketahui dengan cara memasukkan absorbansi sebagai nilai y , sehingga diperoleh nilai x sebagai konsentrasi lakton. Hasil perhitungan konsentrasi lakton dalam ekstrak daun sirsak dan hasil isolasi dapat dilihat pada Tabel 4.6

Tabel 4.6. Konsentrasi Lakton dalam Sampel

Sampel	Bobot sampel (mg)	Absorbansi sampel	Total bobot lakton dalam 10 mL sampel (mg)	Konsentrasi lakton dalam sampel (mmol/ml sampel)	Bobot <i>acetogenin</i> dalam sampel (mg)	% berat <i>acetogenin</i> dalam sampel (mg/mg)
F005	8.4	0.512	1.58	1.92	1.18	14.02
Botol 6	8.4	0.413	1.37	1.67	1.02	12.18
Botol 7	8.4	0.256	0.89	1.08	0.66	7.89
Botol 8	8.4	0.379	1.27	1.54	0.95	11.25
Botol 9	8.4	0.355	1.19	1.45	0.89	10.59

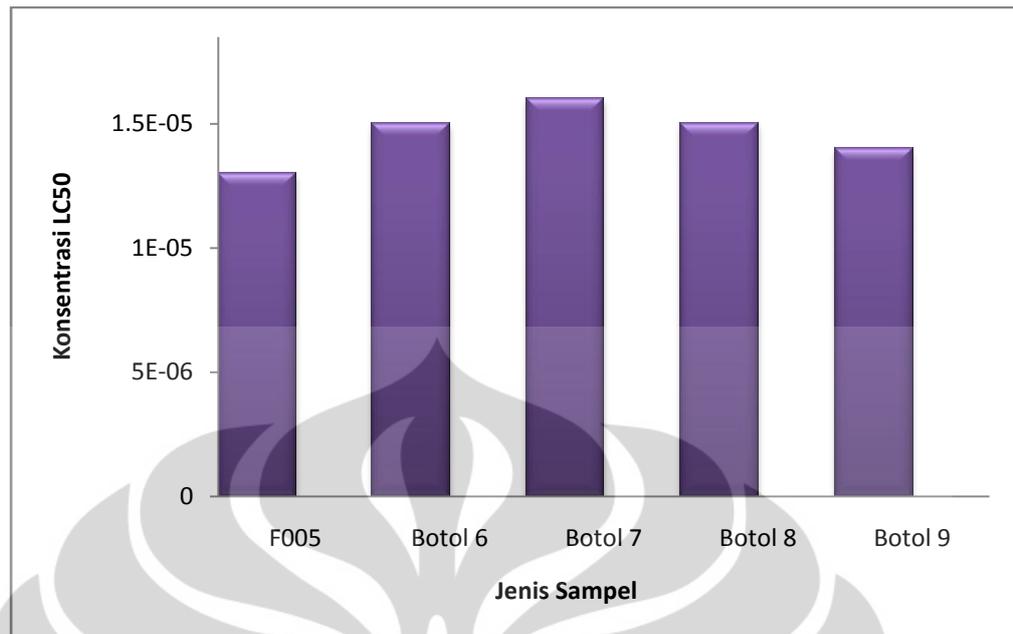
Setelah konsentrasi lakton diketahui, maka bobot lakton dalam sampel dapat dicari dengan cara mengalikan konsentrasi lakton dengan banyaknya volume yang digunakan untuk melarutkan sampel. Setelah besarnya bobot lakton dalam sampel diketahui, maka dengan data yang ada dapat diperoleh konsentrasi lakton dalam satuan mmol lakton per mL sampel. Hasil tersebut diperoleh dengan cara membagi bobot lakton yang dikalikan dengan berat molekul gugus lakton *annonaceous acetogenin* terhadap banyaknya volume sampel. Diasumsikan bahwa 1 mmol lakton sama dengan 1 mmol *annonaceous acetogenin* karena gugus lakton yang ada menggambarkan keberadaan *annonaceous acetogenin* sehingga berdasarkan tabel di atas dapat diketahui konsentrasi *annonaceous acetogenin* pada setiap sampel. Setelah diperoleh mmol lakton per mL sampel maka bobot *annonaceous acetogenin* dapat diketahui dengan cara mengalikan mmol lakton per mL sampel dengan berat molekul dari *annonaceous acetogenin*. Berat molekul rata-rata dari *annonaceous acetogenin* yang terdapat pada daun sirsak adalah 613. Bobot *annonaceous acetogenin* terbanyak terdapat pada fraksi F005 yang merupakan campuran senyawa hasil ekstrak kasar dari daun sirsak, di mana pada fraksi ini *annonaceous acetogenin* belum dipisahkan melalui proses

isolasi sehingga jumlahnya masih banyak. Sedangkan botol 6 hingga botol 9 kandungan *annonaceous acetogenin*-nya lebih sedikit dari F005 karena botol ini merupakan hasil isolasi sehingga *annonaceous acetogenin* telah terpisah.

4.5 Pembahasan Hubungan Hasil Analisis

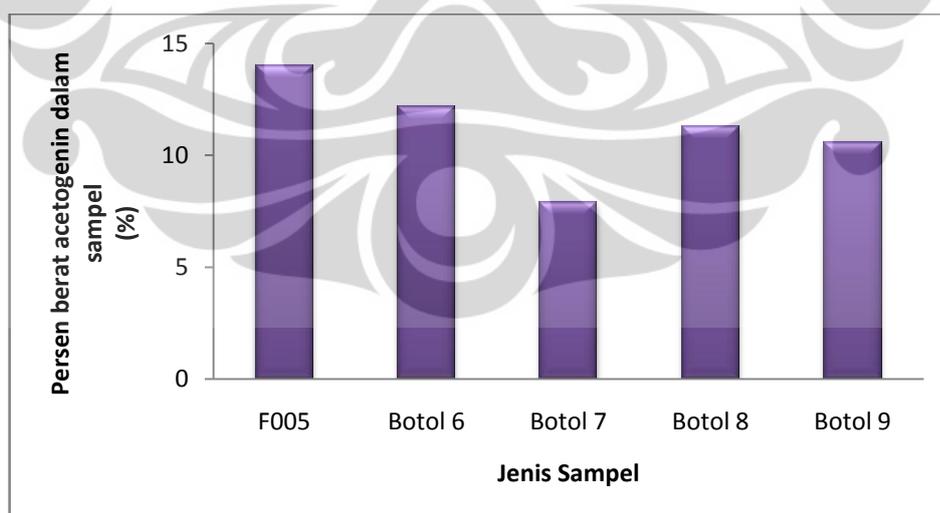
Berdasarkan analisis kualitatif dan kuantitatif yang telah dilakukan, dapat diketahui bahwa daun sirsak yang telah diekstrak mengandung senyawa *annonaceous acetogenin* baik pada hasil ekstrak kasar F005 maupun hasil ekstrak yang telah diisolasi. Dari hasil analisa TLC terhadap botol 4 hingga botol 10 yang diberi larutan pewarna *kedde reagent* diketahui bahwa senyawa *annonaceous acetogenin* terdapat pada botol 6 hingga botol 9 karena setelah dilakukan pengujian ulang, keempat botol tersebut stabil memberi warna ungu ketika ditambahkan larutan pewarna, sedangkan untuk botol 5 dan botol 10 memberikan hasil yang berbeda pada pengulangan pertama dan kedua, dan pada botol 4 tidak timbul warna ungu pada percobaan pertama maupun saat dilakukan pengulangan. Analisis kualitatif menggunakan FTIR memberikan hasil bahwa pada F005 dan botol 6 hingga botol 9 mengandung *annonaceous acetogenin*, hal ini dapat terlihat pada hasil spektrum yang memiliki pola yang sama dengan pola spektrum *annonaceous acetogenin* yang dijadikan acuan walaupun terjadi pergeseran frekuensi pada pola F005 dan botol 6 hingga botol 9. Hasil dari analisis FT-IR diperkuat dengan analisis LC-MS, pada analisis ini diperoleh berat molekul 612, 613, 619 yang merupakan berat molekul dari *acetogenin*. Sehingga berdasarkan analisis LC-MS ini, penulis yakin bahwa pada ekstrak daun sirsak yang digunakan pada penelitian ini terkandung senyawa aktif *acetogenin*.

Berdasarkan hasil analisis BST diketahui bahwa F005 dan botol 6 hingga botol 9 hasil isolasi bersifat toksik terhadap larva udang *Artemia Salina*. Pada grafik di bawah ini terlihat bahwa fraksi F005 memiliki sifat toksik yang lebih tinggi bila dibandingkan dengan yang lainnya. Sedangkan yang sifat toksiknya sangat rendah adalah botol 7 hasil isolasi karena nilai LC_{50} pada botol ini paling tinggi. Berdasarkan proses isolasi menggunakan kromatografi kolom, botol 6, 7, 8 dan 9 merupakan fraksi yang dilewati oleh fasa gerak heksana-aseton. Perbedaan sifat toksik pada botol ini bisa dikarenakan pemisahan *annonaceous acetogenin* pada masing-masing botol tidak merata.



Gambar 4.20. Grafik Batang Hasil Uji BST.

Sedangkan untuk analisis kuantitatif menggunakan metode spektrofotometer gugus lakton, apabila digambarkan menggunakan grafik batang pada Gambar 4.21 di bawah, terlihat bahwa dalam bobot dan volume sampel yang sama untuk fraksi F005 dan hasil isolasi, fraksi F005 memiliki %berat acetogenin paling besar bila dibandingkan dengan botol-botol hasil isolasi.

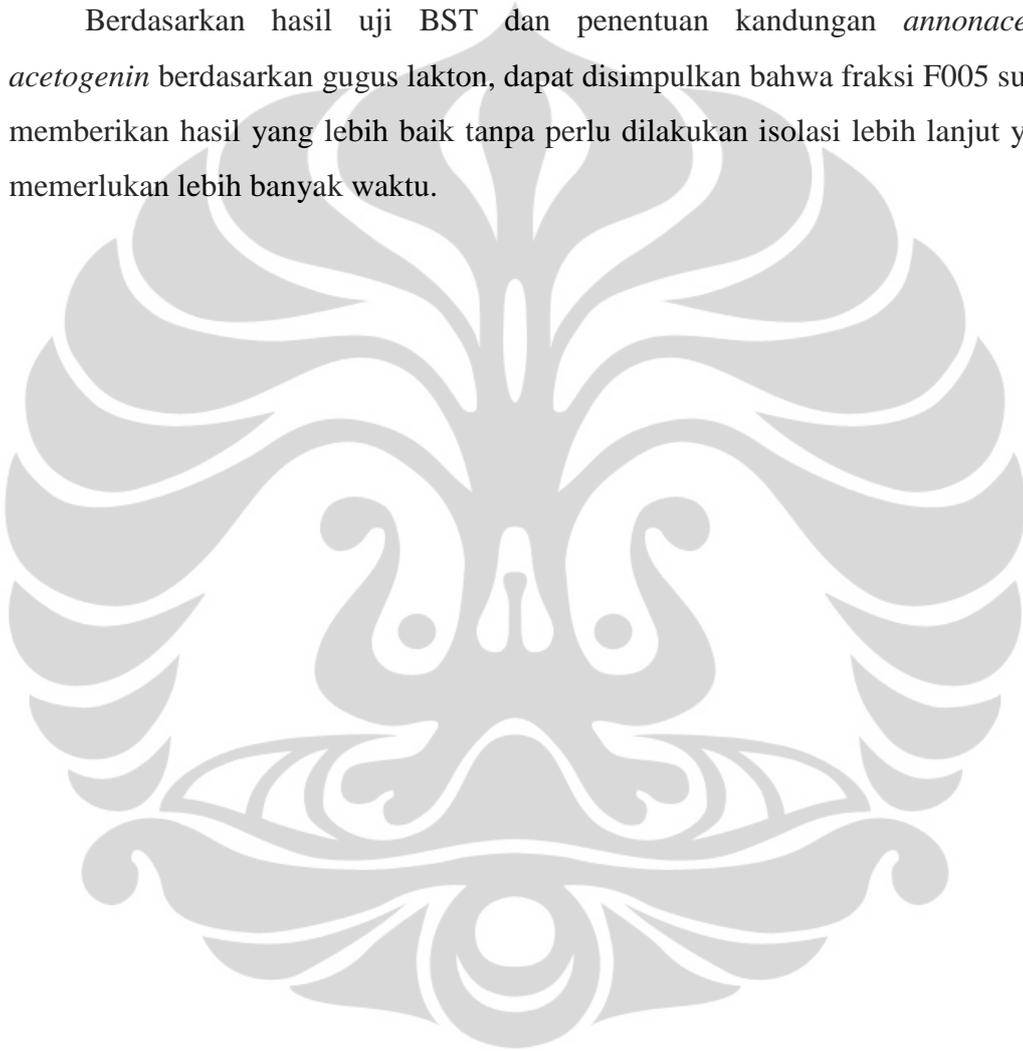


Gambar 4.21. Grafik Batang Bobot *acetogenin* dalam Sampel

Pada Gambar 4.21, terlihat bahwa grafik batang F005 paling tinggi dibandingkan hasil isolasi yang rata-rata memiliki tinggi yang sama. Berdasarkan

diagram batang dari hasil isolasi yang rata-rata hampir sama, disimpulkan bahwa F005 banyak mengandung *annoseous acetogenin*, karena apabila F005 banyak mengandung senyawa lain selain *annonaceous acetogenin* maka botol hasil isolasi akan memiliki diagram batang yang lebih tinggi dari diagram batang F005 karena kandungan *annonoaceous acetogenin* pada botol hasil isolasi terpisahkan dari senyawa-senyawa lain yang terdapat pada F005.

Berdasarkan hasil uji BST dan penentuan kandungan *annonaceous acetogenin* berdasarkan gugus lakton, dapat disimpulkan bahwa fraksi F005 sudah memberikan hasil yang lebih baik tanpa perlu dilakukan isolasi lebih lanjut yang memerlukan lebih banyak waktu.



BAB 5

KESIMPULAN DAN SARAN

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

5.1 Kesimpulan

Kesimpulan dari penelitian ini adalah:

- a. Ekstrak daun sirsak dan hasil isolasi hasil ekstrak berdasarkan analisa kimiawi dan biologis terbukti memiliki senyawa *annonaceous acetogenin*.
- b. Analisa biologis (uji BST) memberi hasil positif terhadap aktivitas antitumor. Hasilnya fraksi F005 dan botol 6 hingga 9 memiliki nilai LC50 di bawah 1000 ppm sehingga diketahui memiliki sifat sitotoksik.
- c. Analisa kuantitatif berdasarkan gugus laktone menunjukkan bahwa F005 mengandung gugus laktone lebih banyak dibandingkan hasil isolasi dengan persen berat *acetogenin* sebesar 14.02%.
- d. Fraksi F005 sudah cukup dan cocok untuk dijadikan sebagai bahan bioaktif tradisional karena lebih efisien dari segi waktu, teknis, dan biaya.

5.2 Saran

Penelitian ekstraksi daun sirsak ini tentu saja masih memiliki kekurangan, saran yang dapat diberikan adalah :

- a. Penelitian ini dilakukan dengan peralatan yang lebih teliti dan lebih baik supaya hasil yang diperoleh lebih maksimum.
- b. Mencari metode analisa kuantitatif yang lebih baik, dan jika bisa standar yang digunakan adalah senyawa murni *annonaceous acetogenin*.
- c. Mengaplikasikan ekstrak yang diperoleh dengan melakukan enkapsulasi, penyalutan, ataupun modifikasi lainnya yang mendukung dunia kesehatan.

DAFTAR PUSTAKA

- Benita, S., B. Magenheim, and P. Wehrli. 1996. *The use of factorial design in the development of nanoparticulate dosage forms. Microencapsulation, Methods and Industrial Applications*. Mercel Ed. S. Benita. Marcel Dekker Inc. New York. Chap. 5, pp. 93-132.
- 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.
- Bohlin, L., and Jan G. Bruhn. 1999. *Bioassay Method in Natural Product Research and Drug Development*. Belanda : Kluwer Academic Publishers.
- Dubey, Rajesh R., and Rajesh H. Parikh. 2003. Two-Stage Optimization Process for Formulation of Chitosan Microspheres. *AAPS PharmSciTech* 2004; 5 (1) Article 5 (<http://www.aapspharmscitech.org>). AR College of Pharmacy & GH Patel Institute of Pharmacy, Vallabh Vidyanagar, Gujarat, India. Page 1-8.
- 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
- Gorman, J.S.T. 2006. *Transition Metal-Mediated Cyclizations and Synthesis of Annonaceous Acetogenin Analogs*. Doctor of Philosophy, University of Texas.
- Handa, S.S., Khanuja, S.P.S., Longo, G., Rakesh, D.D. 2008. *Extraction Technologies for Medicinal and Aromatic Plants*.
- Helmenstine, Ph.D., Anne Marie. 2011. Glutaraldehyde Chemical Structure. <http://chemistry.about.com/od/factsstructures/ig/Chemical-Structures---G/Glutaraldehyde.htm>

- Knowles, Margaret A and Peter J. Selby. 2005. *Introduction to the Cellular and Molecular Biology of Cancer*. New York : Oxford University Press.
- Kusumastuti, Felisita Anesti dan Nyoman Valida Lendra. 2009. Pelepasan Zat Aktif Obat. Farmakoterapi-Info. <http://yosefw.wordpress.com/2009/03/20/557/>. Diakses tgl. 10 Oktober 2011 jam 09:47.
- 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.
- 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.
- McLaughlin, Jerry L, Gina B. Benson, and James WF. 1997. *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)*.
- Park, K., Shalaby & W. S. W., Park, H. 1993. *Biodegradable Hidrogel for drug delivery*. Technomic Publishing Co. Inc. Basel.
- Schulz, Wolfgang Arthur. 2005. *Molecular Biology of Human Cancer*. United States of America : Springer Science
- Singh, J. 2007. *Maceration, Percolation and Infusion Techniques of Extraction of Medicinal and Aromatic Plants (MAPs)*.
- Sudjari, Kalsum, U., Prasetya, C.A. 2005. Efek Biji Sirsak (*Annona muricata* L) sebagai Larvasida *Aedes sp.* Malang : Fakultas Kedokteran Universitas Brawijaya.

Swarbrick, James, James C Boylon. 1994. *Encyclopedia of Pharmaceutical Technology*. Vol 9. New York : Marcell Dekker, Inc. Page 423-439.

Zeng, L., Ye, Q., Oberlies, N. H., Shi, Guoen, Gu, Zhe-Ming, He, Kan, and McLaughlin, Jerry L. Recent Advances in Annonaceus Acetogenin. *Natural Products Reports*, 1996, 275-306.

Villo, Piret, Vares, L., Toom, L. 2008. *Synthesis of Acetogenin Analogues*. Master Thesis in Organic Chemistry, University of Tartu.

