



Hak Cipta Dilindungi Undang-Undang

1. Dilarang mengutip sebagian atau seluruh karya tulis ini tanpa mencantumkan dan menyebutkan sumber:

- a. Pengutipan hanya untuk kepentingan pendidikan, penelitian, penulisan karya ilmiah, penyusunan laporan, penulisan kritik atau tinjauan suatu masalah.
- b. Pengutipan tidak merugikan kepentingan yang wajar Unand.

2. Dilarang mengumumkan dan memperbanyak sebagian atau seluruh karya tulis ini dalam bentuk apapun tanpa izin Unand.

ISOLASI TRITERPENOID DAN UJI ANTIOKSIDAN EKSTRAK DAUN SIRSAK (*Annoma muricata* Linn)

SKRIPSI



**MUHAMMAD IRVAN
0810411002**

**JURUSAN KIMIA
FAKULTAS MATEMATIKA DAN ILMU PENGETAHUAN ALAM
UNIVERSITAS ANDALAS
PADANG 2012**

ABSTRAK

ISOLASI TRITERPENOID DAN UJI ANTIOKSIDAN DARI EKSTRAK DAUN SIRSAK (*Annona muricata* Linn)

Oleh

Muhammad Irvan

0810411002

Dibimbing Prof. Dr. H. Yunazar Manjang dan DR. H. Adlis Santoni, MS

Isolasi triterpenoid dan uji antioksidan dari ekstrak daun sirsak (*Annona muricata* Linn) telah dilakukan. Hasil isolasi berupa kristal putih dengan rentang titik leleh $195,1 - 197^{\circ}\text{C}$ yang memberikan noda tunggal terhadap beberapa eluen dengan berbagai perbandingan. Spektrum spektroskopi UV memberikan serapan pada λ_{maks} 205,80 nm. Dari data spektrum inframerah memberikan beberapa pita serapan penting pada bilangan gelombang $3436,53\text{ cm}^{-1}$, $2927,41\text{ cm}^{-1}$, $1726,94\text{ cm}^{-1}$, $1644,72\text{ cm}^{-1}$, $1460,81\text{ cm}^{-1}$, $1382,75\text{ cm}^{-1}$, $1247,72\text{ cm}^{-1}$, dan $1035,59\text{ cm}^{-1}$ yang mempunyai gugus fungsi hidroksi (-OH), C=O, C-O, -CH₃ serta serapan khas senyawa triterpenoid yaitu serapan geminal dimetil. Dari uji Liebermann-Burchard senyawa murni memberikan warna merah yang merupakan senyawa triterpenoid. Hasil uji antioksidan masing-masing ekstrak memiliki persen inhibisi ekstrak metanol 90,12%, etil asetat 74,30%, dan heksan 43,60%.

ABSTRACT

ISOLATION OF TRITERPENOID AND ANTIOXIDANT TEST FROM LEAVES EXTRACT OF SIRSAK (*Annona muricata* Linn)

By

Muhammad irvan

0810411002

Advised Prof. Dr. H. Yunazar Manjang dan Dr. H. Adlis Santoni, MS

Isolation of triterpenoid and antioxidant test from leaves extract of sirsak (*Annona muricata* Linn) have been done. The purified compound is a white solid which have range of melting point at 195,1 – 197°C that give single spot at some comparable eluent. Due UV spectroscopy which give absorption point at λ max 205,80 nm. Due infrared spectroscopy which give some important band of absorption at wavenumber 3436,53 cm^{-1} , 2927,41 cm^{-1} , 1726,94 cm^{-1} , 1644,72 cm^{-1} , 1460,81 cm^{-1} , 1382,75 cm^{-1} , 1247,72 cm^{-1} , and 1035,59 cm^{-1} that have fuctional group hydroxi (–OH), C=O, C-O, –CH₃ and have specific absorption of triterpenoid group geminal dimethyl. From Liebermann-Burchard test the purified compound give red color which show the compound is triterpenoid. In the antioxidant test for each other extract have inhibition percent from methanol extract 90,12 %, ethyl acetate 74,30 %, hexane 43,60 %

KATA PENGANTAR



Alhamdulillahirabbil'alamin atas rahmat, kasih sayang, petunjuk dan tarbiyah-Nya penulis dapat menyelesaikan penulisan skripsi yang berjudul **"Isolasi Triterpenoid dan Uji Antioksidan Ekstrak daun sirsak (*Annona muricata* Linn)"**. Shalawat dan salam semoga senantiasa tercurahkan kepada tokoh intelektual legendaris dunia, Rasulullah Muhammad SAW.

Skripsi ini disusun berdasarkan hasil penelitian di Laboratorium Kimia Organik Bahan Alam Jurusan Kimia FMIPA Universitas Andalas Padang, berkat bimbingan dan bantuan dari berbagai pihak. Maka pada kesempatan ini penulis mengucapkan terima kasih dan penghargaan yang tulus kepada :

1. Orang tua dan kakak-kakak yang selalu memberikan motivasi untuk terus "bergerak dan berbuat".
2. Pembimbing I dan II, Prof. Dr. H. Yunazar Manjang dan Dr. Adlis Santoni, MS yang telah memberikan ilmu serta saran yang tidak ternilai harganya, sehingga penelitian ini berjalan lancar dan sesuai dengan yang diharapkan.
3. Pembimbing Akademik, Prof. Dr. Hermansyah Aziz yang selalu membantu dan memotivasi penulis selama kuliah.
4. Ibu Dr. Suryati, MS yang telah membantu hingga penelitian ini selesai.
5. Staf dosen pengajar yang telah memberikan ilmunya kepada penulis.
6. Ibu Mitralena, analis laboratorium Kimia Organik Bahan Alam yang telah memfasilitasi penulis selama penelitian.
7. Uda Kiki Kurniawan, M.Si yang telah bersedia membantu dan memberi masukan selama penelitian dan Dedy Eka Saputra, S.si.
8. Rekan-rekan laboratorium Koba (Wendy, miko, beni, aldi, andi, manda, ayu, niar, soim, tia, fani, nining, fatur, elga, S.Si, yurna, ridhia, ismail yang selalu menemani dan memberikan motivasi selama penelitian.
9. Senior-senior dan rekan-rekan kimia 2008, tanpa terkecuali, serta nama-nama yang tidak dapat disebutkan satu persatu.

Semoga bantuan yang telah diberikan mendapatkan balasan dari Allah SWT. Penulis menyadari bahwa makalah ini masih jauh dari kesempurnaan. Untuk itu penulis mengharapkan kritikan dan saran agar makalah ini dapat berguna bagi perkembangan ilmu pengetahuan dan bagi kita semua.



DAFTAR ISI

HALAMAN PENGESAHAN

ABSTRAK	i
KATA PENGANTAR	iii
DAFTAR ISI	v
DAFTAR TABEL	vii
DAFTAR GAMBAR	viii
DAFTAR LAMPIRAN	ix

BAB I PENDAHULUAN

1.1 Latar Belakang	1
1.2 Perumusan Masalah	2
1.3 Tujuan Penelitian	2
1.4 Manfaat Penelitian	2

BAB II TINJAUAN PUSTAKA

2.1 Tinjauan Botani.....	3
2.1.1 <i>Annona muricata</i> Linn.....	3
2.2 Tinjauan Umum Terpenoid.....	4
2.2.1 Triterpenoid.....	5
2.3. Kandungan Kimia Famili Annonaceae.....	6
2.4 Isolasi Senyawa Bahan Alam.....	9
2.5 Pemisahan dan Pemurnian Senyawa Bahan Alam.....	9
2.6 Karakterisasi Senyawa Hasil Isolasi.....	10
2.7 Metode Pengujian Aktivitas Antioksidan dengan Metode Penangkapan Radikal DPPH (<i>DPPH Radical Scavenging</i>).....	12

BAB III METODE PENELITIAN

3.1. Waktu dan Tempat Penelitian.....	13
3.2 Alat dan Bahan.....	13
3.2.1. Alat.....	13
3.2.2 Bahan.....	13

3.3. Pengambilan dan Persiapan Sampel.....	13
3.4. Pembuatan Reagen Untuk Uji Fitokimia.....	14
3.5 Uji Profil Fitokimia.....	14
3.6 Ekstraksi, Pemurnian dan Karakterisasi Triterpenoid.....	16
3.6.1 Ekstraksi.....	16
3.6.2 Pemisahan dan Pemurniaan Ekstrak Etil Asetat.....	17
3.6.3 Karakterisasi Senyawa Triterpenoid.....	17
3.7 Metode Pengujian Aktivitas Antioksidan.....	18
BAB IV HASIL DAN PEMBAHASAN	
4.1 Uji Pendahuluan.....	20
4.2 Isolasi Senyawa.....	20
4.3 Karakterisasi Senyawa Hasil Isolasi.....	26
4.4 Spektroskopi Ultra Violet (UV) dan Infra Merah (IR).....	27
4.5 Uji Antioksidan.....	29
BAB V KESIMPULAN DAN SARAN	
5.1 Kesimpulan.....	30
5.2 Saran.....	30
DAFTAR KEPUSTAKAAN.....	31
LAMPIRAN.....	33

DAFTAR TABEL

	Halaman
1. Tabel 1. Profil fitokimia.....	19
2. Tabel 2. Ekstrak pekat hasil maserasi daun sirsak.....	20
3. Tabel 3. Hasil KLT ekstrak EtOAc dengan berbagai perbandingan eluen.....	20
4. Tabel 4. Hasil pemisahan dengan kromatografi kolom dengan elusi bergradient EtOAc.....	21
5. Tabel 5. Hasil penggabungan fraksi dari kromatografi kolom berdasarkan pola noda yang sama.....	22
6. Tabel 6. Hasil KLT larutan filtrat heksan, endapan EtOAc.....	23
7. Tabel 7. Hasil penggabungan fraksi dari re-kromatografi kolom berdasarkan pola noda yang sama.....	24
8. Tabel 8. Hasil KLT senyawa hasil isolasi dengan berbagai eluen.....	24
9. Tabel 9. Hasil uji aktifitas antioksidan ekstrak metanol, n-heksan, dan EtOAc dengan metode <i>penangkapan radikal DPPH</i>	28
10. Tabel 10. Absorban larutan sampel dan larutan kontrol.....	35

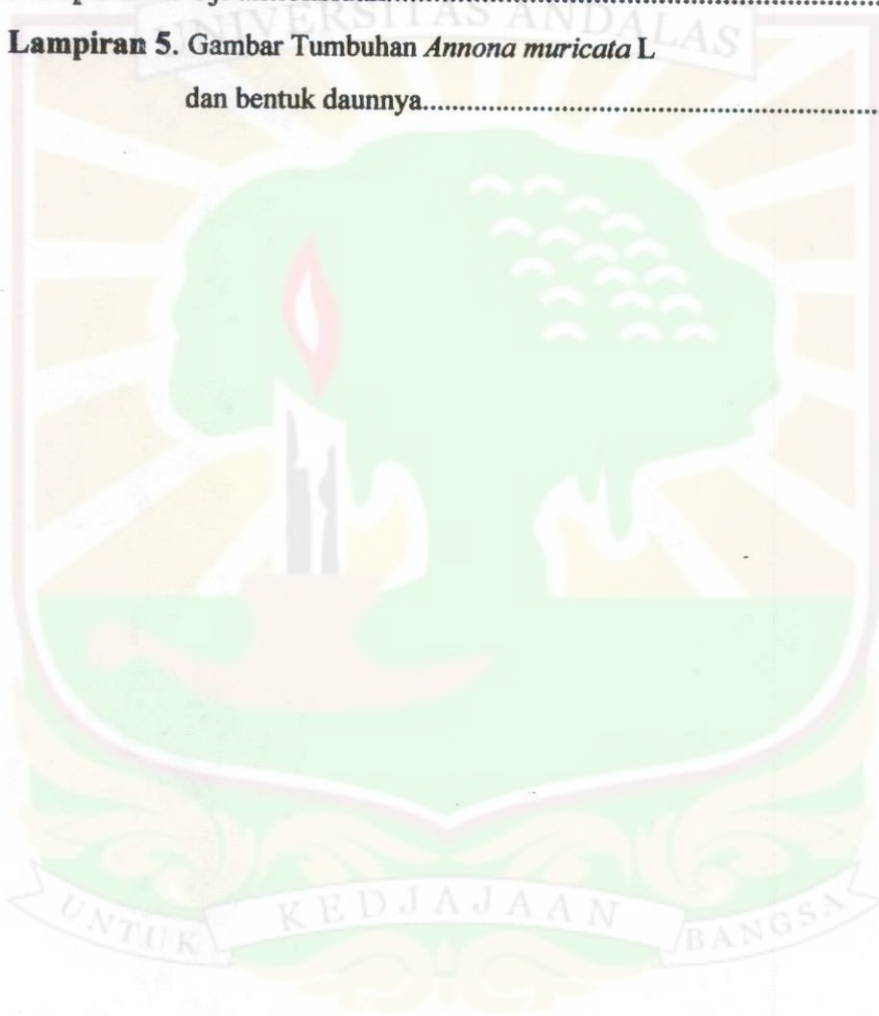
DAFTAR GAMBAR

	Halaman
1. Gambar 1. Struktur umum triterpenoid.....	5
2. Gambar 2. Senyawa triterpenoid yang memiliki gugus fungsi –OH C=O, C-O. (a) (+)-22-hydroxy-30-nor-gamman-21-one (ketohakonanol) (b) (+)-3-methoxy-13-serratene-21-ol.....	6
3. Gambar 3. Struktur triterpenoid dari biji <i>Annona muricata</i>	6
4. Gambar 4. Struktur triterpenoid dari tanaman <i>Unonopsis guatterrioides</i> r. <i>E. Fr.</i> (Annonaceae).....	7
5. Gambar 5. Struktur triterpenoid dari <i>Polyalthia debilis</i> (Annonaceae).....	8
6. Gambar 6. Struktur senyawa flavonoid dan alkaloid dari tanaman <i>Saccopetalum horsfieldii</i> Benn (Annonaceae).....	8
7. Gambar 7. Struktur senyawa alkaloid yang diisolasi dari tanaman <i>Annona squamosa</i>	9
8. Gambar 8. Pola noda KLT senyawa hasil isolasi dengan berbagai eluen....	25
9. Gambar 9. Pola noda senyawa hasil isolasi pada Uji KLT dua dimensi.....	26
10. Gambar 10. Hasil uji Liebermann-Burchard terhadap senyawa hasil isolasi.....	26
11. Gambar 11. Spektrum UV senyawa hasil isolasi dengan pelarut MeOH.....	27
12. Gambar 12. Spektrum IR senyawa hasil isolasi.....	28

DAFTAR LAMPIRAN

Halaman

1. **Lampiran 1.** Skema kerja ekstraksi senyawa triterpenoid
dari daun sirsak (*Annona muricata* Linn).....32
2. **Lampiran 2.** Skema kerja pemisahan ekstrak etil asetat.....33
3. **Lampiran 3.** Skema pemurnian vial 58-64 (Fraksi VIII).....34
4. **Lampiran 4.** Uji antioksidan.....35
5. **Lampiran 5.** Gambar Tumbuhan *Annona muricata* L
dan bentuk daunnya.....37



BAB I

PENDAHULUAN

1.1 Latar Belakang

Indonesia merupakan negara tropis yang kaya dengan keanekaragaman hayati yang melimpah, baik tumbuhan tingkat tinggi maupun tingkat rendah. Diperkirakan 17 % dari seluruh spesies yang ada di permukaan bumi terdapat di Indonesia. Kekayaan ini telah dimanfaatkan oleh nenek moyang bangsa Indonesia baik sebagai sumber bahan pangan, pakaian, pewarna, kosmetik, obat-obatan dan lain-lain yang tidak disadari memiliki nilai ekonomis yang tinggi.

Mengingat semakin banyaknya kebutuhan terhadap obat-obatan dan juga semakin meningkatnya penggunaan obat-obatan tradisional, maka penelitian kearah tersebut perlu ditingkatkan untuk memberikan penjelasan secara ilmiah mengenai komponen aktif yang dikandung oleh tumbuhan dan penjelasan terhadap pengaruh fisiologisnya. Sampai saat ini semakin banyak data yang dikumpulkan bahwa tumbuhan merupakan salah satu sumber senyawa kimia baru yang penting dalam pengobatan. Hal ini disebabkan oleh pendekatan yang dilakukan dengan langkah inventarisasi tumbuhan dan semakin berkembangnya metoda analisa kimia tumbuhan yaitu suatu metoda yang merupakan bidang kajian ilmu fitokimia¹.

Salah satu tumbuhan yang digunakan sebagai tumbuhan obat-obatan adalah tumbuhan sirsak (*Annona muricata* Linn). Khasiat dari buah sirsak memberikan efek anti tumor/kanker yang sangat kuat, dan terbukti secara medis menyembuhkan segala jenis kanker. Selain menyembuhkan kanker, buah sirsak juga berfungsi sebagai anti bakteri, anti jamur (fungi), efektif melawan berbagai jenis parasit/cacing, menurunkan tekanan darah tinggi, depresi, stress, dan menormalkan kembali sistem syaraf yang kurang baik.²

Daun sirsak dari suku Annonaceae, kemungkinan mengandung golongan senyawa steroid/triterpenoid. Karena pada tanaman srikaya (*Annona Squamosa* Linn.) mengandung senyawa metabolit sekunder antara lain steroid/triterpenoid yang dapat digunakan sebagai bahan kontrasepsi. Oleh karena kedua tumbuhan ini mempunyai genus yang sama, kemungkinan memiliki senyawa kimia dan khasiat

yang sama pula. Golongan senyawa steroid/triterpenoid merupakan komponen aktif dari tumbuhan yang telah digunakan untuk mengobati beberapa penyakit dan digunakan dalam bidang farmasi untuk pembuatan obat-obat kontrasepsi, anabolik, dan antiinflamasi.^[3] Berdasarkan pengujian tersebut serta kandungan senyawa aktif yang telah dilaporkan, maka penelitian ini difokuskan untuk mengisolasi salah satu metabolit sekunder yaitu triterpenoid.

Penelitian ini dilakukan dengan metoda ekstraksi secara maserasi menggunakan pelarut heksan, etil asetat (EtOAc), dan metanol, pemisahan dan pemurnian komponen kimia dengan kromatografi, uji aktivitas antioksidan menggunakan metode penangkapan radikal bebas (*free radical scavenging*) 2,2-difenil-1-pikrilhidrazil (DPPH) serta karakterisasi senyawa dengan melakukan pemeriksaan secara konvensional dan spektrofotometri.

1.2. Perumusan Masalah

Dalam upaya menggali informasi tersebut pertanyaan yang dapat diajukan adalah apakah kandungan senyawa metabolit sekunder khususnya triterpenoid pada tumbuhan *Annona muricata* Linn dapat diisolasi dan ekstrak daun sirsak dapat berperan sebagai antioksidan alami.

1.3. Tujuan

Penelitian ini bertujuan untuk mengisolasi senyawa triterpenoid dan uji antioksidan ekstrak daun sirsak (*Annona muricata* Linn).

1.4. Manfaat Penelitian

Hasil penelitian diharapkan dapat memberikan informasi tentang adanya senyawa triterpenoid dan aktifitas antioksidan alami yang terkandung dalam daun sirsak. Sehingga menambah perkembangan ilmu pengetahuan kimia khususnya di bidang Kimia Organik Bahan Alam.

BAB II

TINJAUAN PUSTAKA

2.1 Tinjauan Botani

Berdasarkan hasil determinasi tumbuhan yang dilakukan di Herbarium jurusan Biologi F.MIPA Universitas Andalas dengan mempelajari karakteristik daun, bunga, dan buah dari tumbuhan ini, maka disimpulkan bahwa tumbuhan tersebut adalah :

Famili : Annonaceae
Genus : Annona
Kelas : Dicotyledoneae
Spesies : *Annona muricata* Linn

Tumbuhan sirsak (*Annona muricata* Linn) atau Durian Belanda nama internasional Graviola. Tumbuhan ini mempunyai nama lain, yaitu Soursop, Brazillian Paw Paw, Durian Benggala, Durian Baland, Nangka Belanda, Durian Jawa. Merupakan tanaman dengan pohon tegak berdaun hijau tinggi kira-kira 10-15 kaki, daun bunga pada awalnya berwarna hijau kemudian berwarna kekuningan sampai kuning tua. Jumlah kelopak bunga 4 buah dengan banyak benang sari yang panjangnya kira-kira 4-5 mm dan buahnya berbentuk oval sering melengkung.¹

2.1.1 *Annona muricata* Linn

Merupakan tanaman yang tumbuh di semak-semak dengan pohon tegak dengan daun besar, mengkilap, yang berwarna hijau tua. Bentuk daun sederhana memanjang (oblongatus), berwarna hijau, permukaan daun bagian atas licin, dengan tulang daun menyirip, tangkai daun pendek (3-5 mm) dan panjang daun 8-10 cm, lebar daun 3-5 cm, ujung daun runcing. Daun bunga pada awalnya tumbuh berwarna hijau, kemudian berwarna kekuningan sampai kuning tua, daun bunga bagian luar memiliki panjang 3 ½ - 5 cm, tidak memiliki "imbricate" bagian dalam memiliki "obtuse" dengan panjang 2 ½ - 3 ½ cm, benang sari panjangnya 4-5 mm, jarak penampilan 2-3 mm, bunganya terdapat pada kayu lama, buahnya berbentuk oval atau melengkung, dikelilingi dengan pelindung buah yang halus berwarna hijau, bagian dalamnya putih, panjangnya berkisar 15-35 cm. Kulitnya

berduri, tangkai buah menguning, aromanya harum dan rasanya manis agak asam. Tumbuhan ini merupakan tumbuhan khas daerah tropis yang paling hangat di Amerika Selatan, Amerika Utara, termasuk Amazon. Di Indonesia tumbuhan ini juga terdapat dipulau Sumatera, Jawa, Bali, Kalimantan dan Irian Jaya¹.

Semua bagian dari tumbuhan *Annona muricata* Linn digunakan sebagai obat-obatan alami di daerah tropis. Umumnya buah dan sari buahnya digunakan untuk mengobati cacingan, parasit, untuk menurunkan demam, untuk meningkatkan asi, serta pereda diare dan disentri. Bubuk bijinya juga digunakan sebagai obat cacing dan parasit serta kutu kepala. Kulit batang, daun dan akarnya digunakan sebagai obat penenang, antipasmodial, hipotensi, anti kanker dan obat syaraf (nerfin). Kulit akar dan daunnya juga digunakan untuk mengobati diabetes^{1,3}.

2.2. Tinjauan Umum Terpenoid

Terpenoid adalah senyawa yang hanya mengandung atom karbon, hidrogen dan oksigen yang tersusun dari beberapa unit isopren. Senyawa ini paling banyak tersebar luas pada dunia tumbuhan, terutama yang mengandung klorofil dan sedikit sekali diperoleh dari bakteri dan hewan.

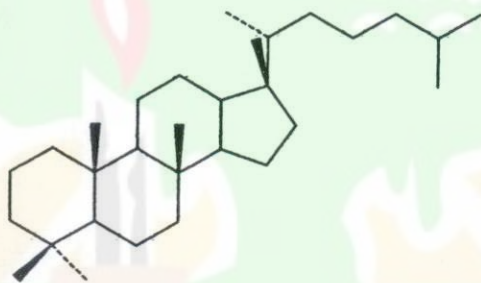
Sebagian besar terpenoid mempunyai kerangka karbon yang dibangun oleh beberapa unit isoprena yang bergabung secara kepala dan ekor. Berdasarkan jumlah unit isoprena yang membangunnya, senyawa terpenoid dapat dibagi menjadi beberapa golongan yaitu monoterpenoid ($C_{10}H_{16}$), seskuiterpenoid ($C_{15}H_{24}$), diterpenoid ($C_{20}H_{32}$), triterpenoid ($C_{30}H_{50}$), tetra terpenoid ($C_{40}H_{64}$) dan politerpenoid (C_5H_8)_n.⁴

Secara kimia, terpenoid umumnya larut dalam lemak dan terdapat didalam sitoplasma sel tumbuhan. Kadang-kadang minyak atsiri terdapat didalam kelenjer khusus pada permukaan daun, sedangkan karotenoid terutama berhubungan dengan kloroplas di dalam daun dan dengan kromoplas di dalam daun bunga. Terpenoid memiliki peranan yang bermacam-macam. Absidin yang berasal dari golongan seskuiterpen dan giberelin yang berasal dari golongan diterpenoid memiliki sifat yang dapat mengatur pertumbuhan.⁴

2.2.1 Triterpenoid

Triterpenoid adalah senyawa yang berasal dari 6 unit isopren dengan jumlah atom karbon sebanyak 30 atom karbon. Senyawa ini merupakan komponen aktif dalam tumbuhan obat yang telah digunakan untuk penyakit diabetes, gangguan menstruasi, beberapa senyawa triterpenoida menunjukkan aktivitas antibakteri atau antivirus.⁴

Triterpenoid di alam kebanyakan ditemukan memiliki gugus fungsi berupa alkohol, aldehida, atau asam karboksilat yang merupakan senyawa tidak berwarna, berbentuk kristal dan sering kali bertitik leleh tinggi. Pengujian yang banyak dilakukan untuk mendeteksi senyawa triterpenoid adalah dengan menggunakan pereaksi Liebermann-Burchard (anhidrida asetat dan asam sulfat pekat) yang memberikan warna merah-ungu. Kerangka dari senyawa triterpenoid pada Gambar 1 :

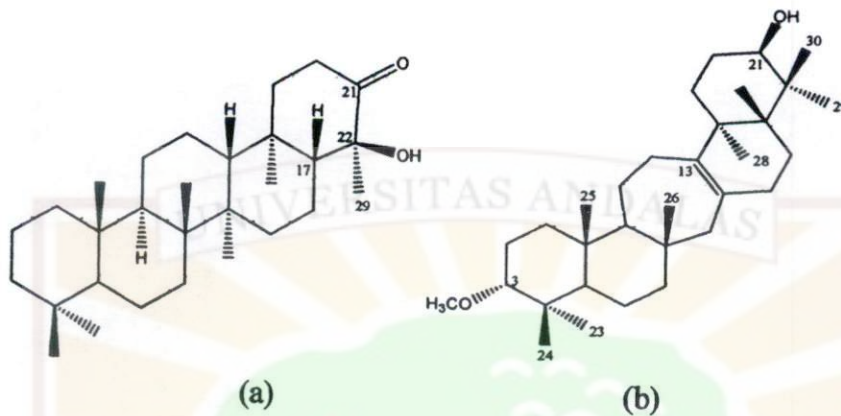


Gambar 1. Struktur umum triterpenoid

Berdasarkan jumlah cincin yang terdapat dalam struktur molekulnya triterpenoid sebenarnya dapat dibagi atas:

1. Triterpenoid asiklik yaitu triterpenoid yang tidak mempunyai cincin tertutup.
2. Triterpenoid trisiklik adalah triterpenoid yang mempunyai tiga cincin tertutup pada struktur molekulnya.
3. Triterpenoid tetrasiklik adalah triterpenoid yang mempunyai empat cincin tertutup pada struktur molekulnya.
4. Triterpenoid pentasiklik adalah triterpenoid yang mempunyai lima cincin tertutup pada struktur molekulnya.

Sebagai contoh senyawa triterpenoid yang memiliki gugus fungsi $-\text{OH}$, $\text{C}=\text{O}$, dan $\text{C}-\text{O}$ eter adalah (+)-22-hydroxy-30-nor-gamman-21-one (ketohakonan-21-ol) dan (+)-3-methoxy-13-serratene-21-ol. Struktur senyawanya dapat dilihat pada Gambar 2 :⁴

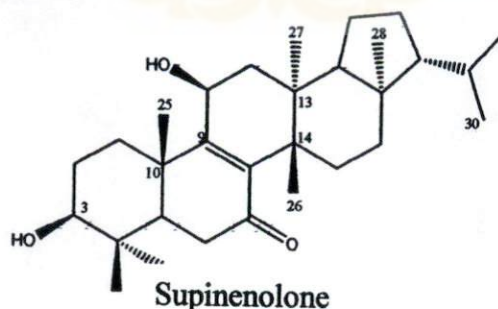


Gambar 2. Senyawa triterpenoid yang memiliki gugus fungsi $-\text{OH}$, $\text{C}=\text{O}$, $\text{C}-\text{O}$.
(a) (+)-22-hydroxy-30-nor-gamman-21-one (ketohakonan-21-ol) (b)
(+)-3-methoxy-13-serratene-21-ol

2.3 Kandungan Kimia Famili Annonaceae

Telaah fitokimia telah mengungkapkan bahwa tumbuhan yang tergolong Annonaceae mengandung bermacam-macam senyawa metabolit primer seperti karbohidrat, lipid, asam amino, protein dan senyawa metabolit sekunder seperti polyphenol, minyak esensial, terpen, dan senyawa aromatic.³

Thomas Jurgens melaporkan bahwa terdapat senyawa triterpenoid pada biji tanaman *Annona muricata* yang memiliki bioaktivitas sebagai antibakteri. Triterpenoid yang di isolasi memberikan serapan maksimum pada spektroskopi UV pada panjang gelombang λ_{maks} 275,1 nm. Struktur triterpenoid yang diisolasi dapat dilihat pada Gambar 3 :⁵

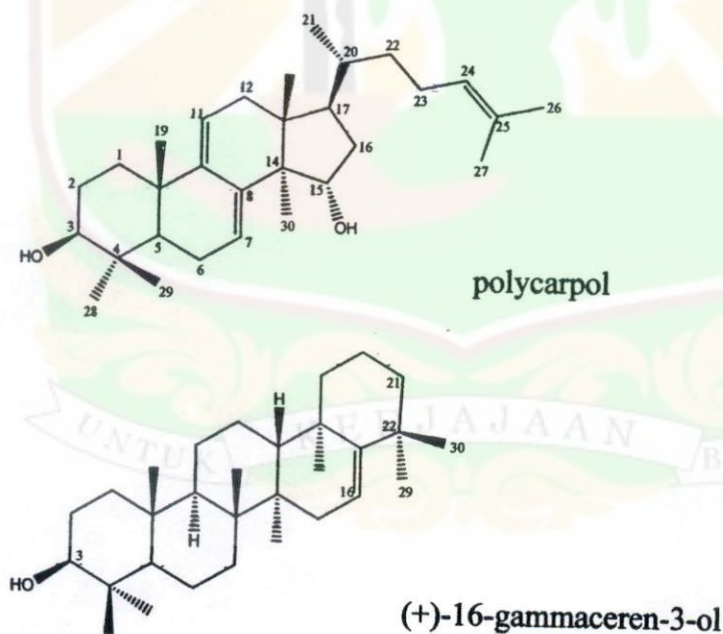


Gambar 3. Struktur triterpenoid dari biji *Annona muricata*.

Isolasi triterpenoid dari fraksi EtOAc ekstrak kulit batang (*Annona muricata* L) dan skrining awal aktifitas toksik dari fraksi heksana, EtOAc, dan MeOH ekstrak kulit batang *Annona muricata* Linn dengan metoda "Brine Shrimps Lethality Bioassay" juga telah membuktikan bahwa ekstrak *Annona muricata* Linn mengandung senyawa bioaktifitas yang sangat bermanfaat. Triterpenoid yang berhasil diisolasi memberikan serapan pada λ_{maks} 282,6 nm dan terdekomposisi pada suhu 119-120 °C.⁶

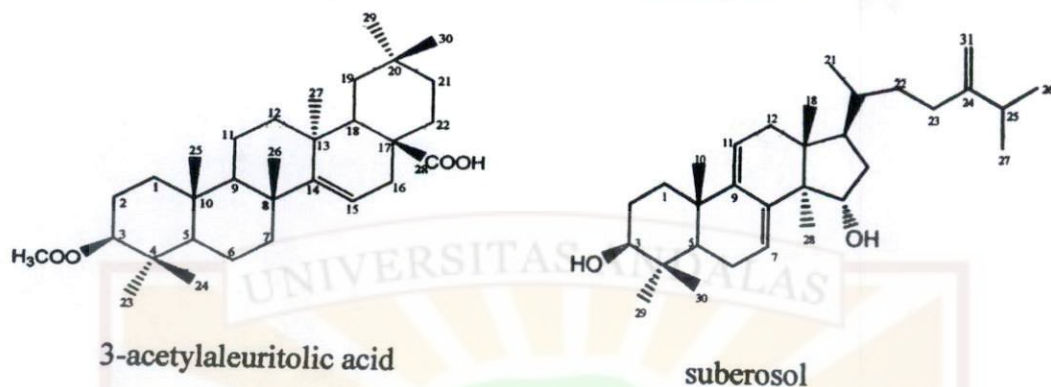
Dari tumbuhan sirsak juga telah dilakukan beberapa isolasi senyawa kimia antara lain adalah : Isolasi steroid dari fraksi EtOAc ekstrak daun sirsak (*Annona muricata* Linn) dan skrining awal aktifitas toksisitas dari fraksi MeOH, n-heksan, dan EtOAc dengan metoda "Brine Shrimps Lethality Bioassay".⁷

Pada bulan Desember 2011 Felipe.A.M.Silva dkk melaporkan telah berhasil mengisolasi senyawa triterpenoid dari tanaman *Unonopsis guatteroides* r. E. Fr.(Annonaceae). Tanaman ini merupakan jenis tanaman neotropical yang tumbuh di sekitar Amazon. Struktur senyawa yang telah diisolasi dapat dilihat pada Gambar 4:⁸



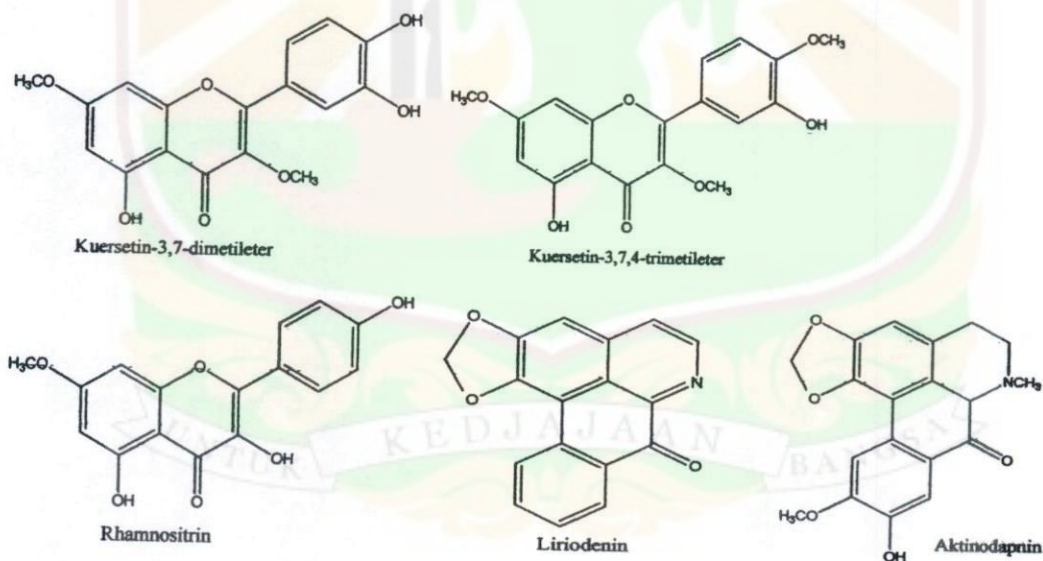
Gambar 4. Struktur triterpenoid dari tanaman *Unonopsis guatteroides* r. E. Fr.(Annonaceae)

Tahun 2009, Ketkaew Buttrawong,dkk dari jurusan kimia Universitas Srinakharinwirot Thailand berhasil mengisolasi 2 senyawa triterpenoid dari *Polyalthia debilis* (Annonaceae). Struktur dapat dilihat pada Gambar 5:⁹



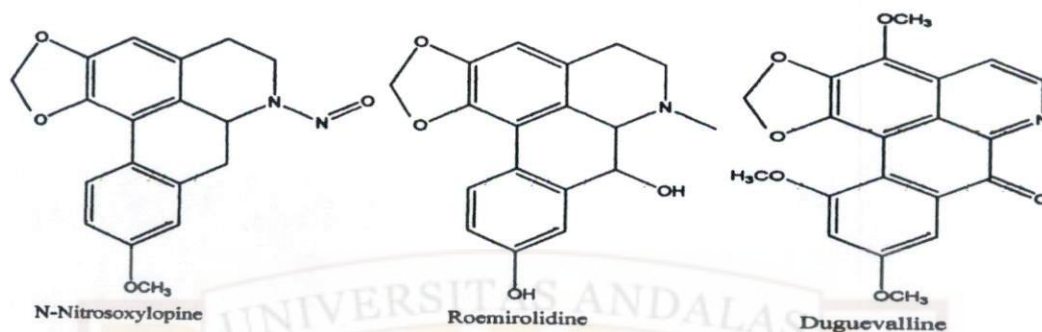
Gambar 5. Struktur triterpenoid dari *Polyalthia debilis* (Annonaceae)

Saccopetalum horsfieldii Benn merupakan tanaman endemik indonesia yang termasuk famili Annonaceae. Dan pada tahun 2008 telah berhasil diisolasi senyawa flavonoid dan alkaloid dari tanaman ini. Strukturnya dapat dilihat pada Gambar 6:¹⁰



Gambar 6 : Struktur senyawa flavonoid dan alkaloid dari tanaman *Saccopetalum horsfieldii* Benn (Annonaceae).

Alkaloid antimalaria diisolasi dari *Annona squamosa* oleh Tylor Johns,dkk didapatkan 3 senyawa alkaloid yang terdapat pada pada Gambar 7: ¹¹



Gambar 7. Struktur senyawa alkaloid yang diisolasi dari tanaman *Annona squamosa*.

2.4 Isolasi Senyawa Bahan Alam

Penarikan komponen dari bahan alam dapat dilakukan dengan ekstraksi menggunakan pelarut, sehingga komponen-komponen kimia yang diinginkan akan tertarik keluar bersama pelarut. Metoda ekstraksi dapat dilakukan dengan berbagai cara yaitu maserasi, sokletasi, dan perkolasi. Pemilihan metoda yang akan digunakan terlebih dahulu dipertimbangkan, sehingga komponen kimia yang diinginkan tidak mengalami perubahan sifat dan struktur. ¹²

2.5 Pemisahan dan Pemurnian Senyawa Bahan Alam

Isolasi metabolit sekunder dari bahan alam melibatkan pemisahan menggunakan metoda kromatografi. Kromatografi lapisan tipis (KLT) berguna untuk menentukan jumlah komponen yang terdapat dalam suatu senyawa. Sebagai fasa diam digunakan silika gel yang ditempatkan pada suatu plat dan sebagai fasa gerak digunakan pelarut yang ditempatkan pada suatu wadah. Komponen yang akan dipisahkan ditotolkan pada plat silika, kemudian dimasukkan kedalam wadah yang berisi pelarut. Sebagai pengungkap noda digunakan ammonia, sinar ultraviolet (UV). ¹³

Kromatografi merupakan teknik pemisahan yang didasarkan pada perpindahan masing-masing komponen melalui fasa diam dan di bawah pengaruh eluen sebagai fasa gerak. Pemisahan terjadi karena adanya perbedaan interaksi masing-masing komponen terhadap fasa diam. Komponen yang berinteraksi lemah dengan fasa diam akan keluar lebih cepat pada proses pengoloman. Sistem elusi pada kromatografi kolom diklasifikasikan sebagai sistem isokratik

(komposisi campuran eluen tetap) dan sistem step gradien polarity (SGP) yaitu teknik elusi dengan peningkatan kepolaran eluen.^{13,14}

Senyawa kimia yang didapat dari hasil kromatografi kolom belum tentu dalam keadaan murni, untuk itu perlu dilakukan proses pemurnian. Pemurnian dapat dilakukan dengan teknik rekristalisasi yang didasarkan kepada kemampuan pelarut untuk melarutkan suatu senyawa dalam keadaan panas dan mengkristal kembali dalam keadaan dingin, sedangkan pengotornya tetap larut.¹⁴

2.6. Karakterisasi Senyawa Hasil Isolasi

Karakterisasi senyawa hasil isolasi meliputi pemeriksaan kimia dan fisika. Untuk pemeriksaan fisika yaitu dengan pengukuran titik leleh, sedangkan pemeriksaan kimia meliputi pengujian fitokimia, pengukuran dengan spektroskopi ultraviolet (UV-Vis) dan Inframerah.

a. Pemeriksaan Fisika

Pengujian Titik Leleh

Suhu saat mulai senyawa meleleh sampai senyawa telah meleleh keseluruhan dicatat sebagai jarak titik leleh. Senyawa yang murni akan memberikan rentang leleh yang tajam berkisar 0 - 2 °C.

b. Pemeriksaan Kimia

1. Dengan melakukan uji profil fitokimia untuk mengetahui senyawa metabolit sekunder yang didapat.
2. Pengukuran dengan Spektroskopi Ultraviolet (UV-Vis).

Dari spektrum UV-Vis kita dapat mengidentifikasi senyawa yang mengandung ikatan rangkap terkonyugasi, senyawa aromatik, serta untuk mengetahui jenis kromofor dan ausokrom yang terdapat dalam senyawa hasil pemurnian. Umumnya senyawa yang mempunyai transisi $\sigma - \sigma^*$ mengabsorpsi cahaya pada panjang gelombang 150 nm, senyawa yang mempunyai transisi $\pi - \pi^*$ (tidak berkonjugasi) mengabsorpsi cahaya pada panjang gelombang 190 nm, sedangkan senyawa yang mempunyai transisi $n - \pi^*$ mengabsorpsi cahaya pada panjang gelombang 300 nm. Serapan ikatan C=C biasanya menyerap pada panjang gelombang 165 nm dan tidak terdeteksi pada pengukuran spektroskopi ultraviolet karena panjang gelombang maksimum yang digunakan 200 nm-400 nm.¹⁵

3. Pengukuran dengan Spektroskopi Inframerah

Pengukuran pada spektrum inframerah dilakukan pada daerah cahaya inframerah tengah (mid-inframerah) yaitu pada panjang gelombang 2.5 – 50 μm atau bilangan gelombang 4000 – 200 cm^{-1} . Energi yang dihasilkan oleh radiasi ini akan menyebabkan vibrasi atau getaran pada molekul. Pita absorpsi inframerah sangat khas dan spesifik untuk setiap tipe ikatan kimia atau gugus fungsi. Jadi dari spektrum inframerah ini kita akan mengetahui gugus fungsi yang terdapat dalam struktur senyawa yang kita dapatkan. Seperti gugus fungsi $-\text{OH}$ pada serapan 3550-3200 cm^{-1} , $\text{C}=\text{O}$ karbonil pada 1870-1540 cm^{-1} , $\text{C}-\text{O}$ eter pada serapan 1150-1085 cm^{-1} .^{15,16}

2.7. Metode Pengujian Aktivitas Antioksidan dengan Metode Penangkapan Radikal DPPH (*DPPH Radical Scavenging*)

Antioksidan adalah senyawa-senyawa yang mampu menghilangkan, membersihkan, menahan pembentukan ataupun memadukan efek spesies oksigen reaktif. Penggunaan senyawa antioksidan juga anti radikal saat ini semakin meluas seiring dengan semakin besarnya pemahaman masyarakat tentang peranannya dalam menghambat penyakit degeneratif seperti penyakit jantung, arteriosclerosis, kanker, serta gejala penuaan. Masalah-masalah ini berkaitan dengan kemampuan antioksidan untuk bekerja sebagai inhibitor (penghambat) reaksi oksidasi oleh radikal bebas reaktif yang menjadi salah satu pencetus penyakit-penyakit di atas.¹⁷

Fungsi utama antioksidan digunakan sebagai upaya untuk memperkecil terjadinya proses oksidasi dari lemak dan minyak, memperkecil terjadinya proses kerusakan dalam makanan, memperpanjang masa pemakaian dalam industri makanan, meningkatkan stabilitas lemak yang terkandung dalam makanan serta mencegah hilangnya kualitas sensori dan nutrisi. Lipid peroksidasi merupakan salah satu faktor yang cukup berperan dalam kerusakan selama dalam penyimpanan dan pengolahan makanan. Antioksidan tidak hanya digunakan dalam industri farmasi, tetapi juga digunakan secara luas dalam industri makanan, industri petroleum, industri karet dan sebagainya.¹⁷

Berdasarkan fungsinya antioksidan dibagi menjadi:

a. Antioksidan Primer

Antioksidan ini berfungsi untuk mencegah terbentuknya radikal bebas baru karena antioksidan primer dapat merubah radikal bebas yang ada menjadi molekul yang berkurang dampak negatifnya yaitu sebelum sempat bereaksi. Antioksidan primer yang ada dalam tubuh yang sangat terkenal adalah enzim superoksida dismutase. Enzim ini sangat penting sekali karena dapat melindungi hancurnya sel-sel dalam tubuh akibat serangan radikal bebas. Bekerjanya enzim ini sangat dipengaruhi oleh mineral-mineral seperti mangan, seng, tembaga dan selenium yang harus terdapat dalam makanan dan minuman.

b. Antioksidan Sekunder

Antioksidan sekunder merupakan senyawa yang berfungsi menangkap radikal bebas serta mencegah terjadinya reaksi berantai sehingga tidak terjadi kerusakan yang lebih besar. Contohnya adalah vitamin E, vitamin C, dan betakaroten yang dapat diperoleh dari buah-buahan.

c. Antioksidan Tersier

Antioksidan tersier merupakan senyawa yang memperbaiki sel-sel dan jaringan yang rusak karena serangan radikal bebas. Biasanya yang termasuk kelompok ini adalah jenis enzim misalnya metionin sulfoksidan reduktase yang dapat memperbaiki DNA dalam inti sel. Enzim tersebut bermanfaat untuk perbaikan DNA pada penderita kanker.

Aktivitas antioksidan pada sampel ditentukan oleh besarnya hambatan serapan radikal bebas melalui perhitungan persentase inhibisi serapan 2,2-difenil-1-pikrilhidrazil dengan menggunakan rumus.^{18,19}

$$\text{Inhibisi} = \frac{\text{Absorban kontrol} - \text{Absorban sampel}}{\text{Absorban kontrol}} \times 100 \%$$

BAB III

METODE PENELITIAN

3.1. Waktu dan Tempat Penelitian

Penelitian dilaksanakan mulai bulan Januari 2012 sampai dengan Mei 2012 bertempat di Laboratorium Kimia Organik Bahan Alam Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam Universitas Andalas.

3.2. Alat dan Bahan

3.2.1. Alat

Alat yang digunakan adalah seperangkat alat distilasi, rotary evaporator Heidolph WB 2000, oven, kertas saring Whatman no.42, kolom kromatografi, peralatan gelas yang umum digunakan dalam laboratorium, chamber, plat KLT, pembakar spiritus, lampu UV $\lambda = 254$ dan 356 nm, Fisher melting point apparatus, spektrofotometer ultraviolet Secoman S1000 PC dan FTIR Perkin Elmer 1600 series.

3.2.2. Bahan

Bahan-bahan yang digunakan adalah daun tanaman sirsak yang telah dikeringanginkan, serta bahan kimia berupa pelarut organik seperti metanol teknis yang didistilasi, etil asetat teknis yang didistilasi, heksan teknis didistilasi, dan bahan kimia lainnya seperti amonia 5%, klorofom, asam klorida pekat, logam magnesium, besi (III) klorida, anhidrida asetat, asam sulfat pekat, pereaksi Meyer, akuades, DPPH, alumunium foil, dan silika gel 60 (0,063-0,200 mm) keluaran Merck.

3.3. Pengambilan dan Persiapan Sampel

Sampel yang diperlukan untuk penelitian diperoleh di daerah Bukit Lampu kelurahan Gates, kecamatan Lubuk begalung. Bagian yang akan diteliti adalah daun yang telah dikeringanginkan pada udara terbuka selama 2 minggu dan tidak terkena cahaya matahari secara langsung sampai kering. Untuk persiapan sampel, sampel kering tersebut kemudian digiling halus sampai berbentuk serbuk lalu ditimbang.



3.4 Pembuatan Reagen untuk Uji Fitokimia

a. Pembuatan Besi (III) Klorida 5%

Sebanyak 5 gram besi (III) klorida di larutkan dengan air suling hingga volume 100 mL.

b. Pembuatan Pereaksi Meyer

Sebanyak 2,266 gram raksa (II) klorida dilarutkan dengan air suling hingga volume 100 mL (menjadi larutan I). Pada wadah lain, dilarutkan 50 gram kalium iodide kedalam air suling hingga volume 100mL (larutan II). Kemudian 60 mL larutan I dicampurkan dengan 10 mL larutan II dan ditambahkan dengan air suling hingga volume 100mL.

c. Pembuatan Asam Sulfat 2N

Sebanyak 5,6mL asam sulfat pekat diencerkan dengan air suling hingga volume larutan dicukupkan menjadi 100mL.

3.5. Uji Profil Fitokimia

Metode pemeriksaan kandungan flavonoid, triterpenoid, steroid, dan senyawa fenolik dimana sampel bubuk kering sebanyak 2 gram dimasukkan ke dalam tabung reaksi, kemudian dimaserasi dengan metanol yang telah dipanaskan (di atas penangas air) selama 15 menit. Kemudian disaring dalam keadaan panas ke dalam tabung reaksi lain dan ditambahkan kloroform dan air suling dengan perbandingan 1:1 masing-masingnya sebanyak 5 mL, kocok dengan baik, kemudian dipindahkan ke dalam tabung reaksi, biarkan sejenak hingga terbentuk dua lapisan kloroform-air. Lapisan kloroform di bagian bawah digunakan untuk pemeriksaan senyawa triterpenoid dan steroid, sedangkan lapisan asam atau lapisan air di bagian atas digunakan untuk pemeriksaan senyawa flavonoid, fenolik dan saponin.

1. Pemeriksaan Flavonoid (Sianidin Tes)

Sebagian dari lapisan air diambil dan dipindahkan dengan menggunakan pipet ke dalam tabung reaksi, kemudian tambahkan asam klorida pekat dan beberapa butir bubuk magnesium, terbentuknya warna orange sampai merah menunjukkan adanya flavonoid.

2. Pemeriksaan Fenolik

Sebagian dari lapisan air diambil dan dipindahkan dengan pipet ke dalam tabung reaksi kecil, kemudian tambahkan FeCl_3 5 %, terbentuknya warna biru/ungu menandakan adanya kandungan senyawa fenolik.

3. Pemeriksaan Saponin

Dari lapisan air, kocok kuat-kuat dalam sebuah tabung reaksi, terbentuknya busa yang tidak hilang dengan penambahan beberapa tetes HCl pekat menunjukkan adanya saponin.

4. Pemeriksaan Triterpenoid dan Steroid (Lieberman-Burchard)

Dari lapisan kloroform diambil sedikit dan dimasukkan ke dalam tiga lubang plat tetes, biarkan hingga kering. Ke dalam satu lubang plat tetes ditambahkan asam sulfat pekat, ke dalam lubang plat tetes lainnya ditambahkan setetes anhidrida asetat dan setetes asam sulfat pekat. Terbentuknya warna hijau atau hijau biru menandakan adanya steroid, sedangkan bila terbentuknya warna merah atau merah ungu menandakan adanya triterpenoid.

5. Pemeriksaan Alkaloid

Sampel sebanyak 2 – 4 gram dipotong kecil-kecil, kemudian dihaluskan dalam lumpang dengan penambahan sedikit pasir dan 10 mL kloroform-amoniak 0,05 N, kemudian diaduk/digerus perlahan. Larutan disaring dengan corong kecil, di dalamnya diletakkan kapas sebagai penyaring dan hasil saringan dimasukkan ke dalam sebuah tabung reaksi, kemudian tambahkan 10 tetes asam sulfat 2 N dan kocok secara perlahan. Biarkan sejenak sampai terbentuk pemisahan lapisan asam dan kloroform. Lapisan asam diambil dengan bantuan pipet dan dipindahkan ke dalam sebuah tabung reaksi. Kemudian tambahkan pereaksi Meyer, reaksi positif ditandai dengan adanya endapan putih (+4), kabut putih tebal (+3), kabut putih tipis (+2), kabut putih sangat tipis (+1).

6. Pemeriksaan Kumarin

Sampel sebanyak 2 – 5 gram dirajang halus dan diekstrak dengan pelarut metanol. Hasil ekstrak ditotolkan pada batas bawah plat KLT dengan menggunakan pipa kapiler, dibiarkan kering pada udara terbuka. Kemudian dielusi dalam bejana yang berisi 10 mL eluen etil asetat 100%. Noda yang dihasilkan dimonitor di bawah lampu UV (365 nm). Hasil KLT kemudian

disemprot dengan larutan natrium hidroksida 1% dalam etanol : air (1 : 1), dan selanjutnya dilihat dibawah lampu UV (365 nm). Adanya fluoresensi yang bertambah terang setelah disemprot dengan natrium hidroksida 1% menandakan adanya senyawa kumarin.

3.6. Ekstraksi, Pemurnian dan Karakterisasi Triterpenoid

3.6.1. Ekstraksi

Ekstraksi merupakan metode yang biasa digunakan untuk menarik komponen-komponen kimia di dalam tumbuhan dengan menggunakan pelarut, sehingga komponen kimia yang diinginkan tertarik keluar bersama pelarut.

Sebanyak 2,8 kg daun tanaman sirsak yang telah dikering anginkan dan dihaluskan hingga menjadi serbuk, diambil 1,5 kg untuk diekstraksi dengan menggunakan metoda maserasi. Proses maserasi dilakukan dengan merendam serbuk menggunakan pelarut di dalam botol gelap yang dibagi menjadi 3 botol dimana masing-masing botol berisikan 0,5 kg serbuk. Pelarut pertama yang digunakan untuk maserasi adalah heksan, pelarut dimasukkan ke dalam botol hingga ketinggian permukaan pelarut berada pada ± 2 cm di atas permukaan serbuk. Penggantian pelarut dilakukan setiap 3 hari sekali sampai pelarut tidak mampu lagi untuk mengekstrak senyawa pada serbuk. Ini ditandai dengan tidak adanya noda (bercak) setelah pelarut diteteskan pada kaca arloji.

Filtrat hasil maserasi ditampung pada botol gelap, sedangkan bagian ampas diekstrak dengan menggunakan pelarut etil asetat (EtOAc) dengan perlakuan yang sama pada penggunaan pelarut heksan selama proses maserasi sampai diperoleh filtrat hasil ekstraksi. Bagian ampas setelah proses maserasi dengan pelarut EtOAc kemudian diekstrak dengan menggunakan pelarut metanol, perlakuan maserasi juga sama dengan proses ekstraksi menggunakan pelarut heksan dan EtOAc sampai diperoleh filtrat. Masing-masing filtrat hasil maserasi menggunakan pelarut heksan, EtOAc dan metanol kemudian dipekatkan dengan menggunakan *rotary evaporator* sampai diperoleh ekstrak kental.

Teknik maserasi dipilih karena sifat senyawa yang terdapat dalam sampel belum diketahui dengan jumlah sampel yang cukup banyak. Di samping itu pengerjaan dengan teknik ini lebih mudah dan sederhana. Masing-masing ekstrak pekat hasil maserasi tadi dikumpulkan dan ditimbang beratnya dimana untuk

ekstrak n-heksana yang berwarna hijau tua dan, ekstrak EtOAc yang berwarna hijau kecoklatan, ekstrak metanol berwarna coklat kemerahan. Skema kerja terdapat pada Lampiran 1.

3.6.2. Pemisahan dan Pemurniaan Ekstrak Etil Asetat

Ekstrak EtOAc dipisahkan menggunakan kromatografi kolom yang bertujuan untuk menyederhanakan pemisahan komponen metabolit sekunder yang terdapat di dalam sampel. Ekstrak EtOAc yang akan di kromatografi kolom ditimbang sebanyak 8 gram dan dicampur dengan silika gel dengan perbandingan 1 : 1 dan digerus dengan lumpang sampai terbentuk bubuk (membuat prekolom). Kemudian dimasukkan secara hati-hati kedalam kolom yang sebelumnya telah disiapkan. Selanjutnya dilakukan pengelusian menggunakan eluen heksan dan EtOAc dengan peningkatan kepolaran pelarut.

Pengelusian dilakukan secara bergradient dimulai dari pelarut heksan dan EtOAc kemudian fraksi-fraksi yang keluar ditampung dalam vial 20 mL yang kemudian dianalisa pola pemisahan nodanya dengan KLT. Fraksi yang memiliki pola noda dan nilai R_f (*retention factor*) yang sama digabung sehingga didapatkan fraksi yang lebih sederhana. Selanjutnya, semua fraksi yang telah didapatkan pada kromatografi kolom ini diperiksa kandungan triterpenoidnya dan dilihat juga pola pemisahan komponennya pada plat KLT.

Fraksi yang positif triterpenoid dan mempunyai pemisahan yang baik dapat langsung dimurnikan dengan menggunakan metode rekristalisasi dan re-kromatografi kolom. Skema kerja dapat dilihat pada Lampiran 2 dan 3.

3.6.3 Karakterisasi Senyawa Triterpenoid

Karakterisasi senyawa hasil isolasi meliputi pemeriksaan kimia dan fisika. Untuk pemeriksaan fisika yaitu dengan melakukan pengukuran titik leleh, sedangkan pemeriksaan kimia meliputi pengujian fitokimia, pengukuran dengan spektroskopi ultraviolet (UV-Vis) dan Inframerah.

a. Pemeriksaan Fisika

Pengukuran titik leleh dilakukan dengan alat Fisher Melting Point Apparatus. Beberapa kristal senyawa diletakkan pada alat pemanasnya diantara dua kaca objek yang bersih. Kenaikan suhu diamati dengan termometer yang terhubung dengan lempeng pemanas. Suhu saat mulai meleleh sampai senyawa habis

meleleh dicatat sebagai jarak leleh senyawa. Senyawa yang murni akan memberikan rentang leleh yang tajam berkisar 0 - 2 °C.

b. Pemeriksaan Kimia

1. Pengujian Fitokimia

Dengan menggunakan pereaksi Liebermann Burchard yaitu asetat anhidrida dan asam sulfat pekat.

2. Pengukuran dengan Spektroskopi Ultraviolet (UV-Vis).

Dari spektrum UV-Vis kita dapat mengidentifikasi senyawa yang mengandung ikatan rangkap terkonjugasi, senyawa aromatik, serta untuk mengetahui jenis kromofor dan ausokrom yang terdapat dalam senyawa hasil pemurnian.

3. Pengukuran dengan Spektroskopi Inframerah

Pengukuran pada spektrum inframerah dilakukan pada daerah cahaya inframerah tengah (mid-inframerah) yaitu pada panjang gelombang 2.5 – 50 μm atau bilangan gelombang 4000 – 200 cm^{-1} . Energi yang dihasilkan oleh radiasi ini akan menyebabkan vibrasi atau getaran pada molekul. Pita absorpsi inframerah sangat khas dan spesifik untuk setiap tipe ikatan kimia atau gugus fungsi. Jadi dari spektrum inframerah ini kita akan mengetahui gugus fungsi yang terdapat dalam struktur senyawa yang kita dapatkan.

3.7. Metoda Pengujian Aktivitas Antioksidan

Pembuatan larutan 2,2-difenil-1-pikrilhidrazil dengan cara ditimbang sebanyak 1,97 mg 2,2-difenil-1-pikrilhidrazil dan dilarutkan dengan metanol di dalam labu ukur sampai 100 mL sehingga diperoleh larutan dengan konsentrasi 50 μM . Penentuan absorban dari larutan DPPH dilakukan dengan dipipet sebanyak 3,8 mL larutan 2,2-difenil-1-pikrilhidrazil 50 μM dan ditambahkan dengan 0,2 mL metanol. Setelah dibiarkan selama 30 menit ditempat gelap, serapan larutan diukur dengan spektrofotometer UV-Vis pada panjang gelombang 515 nm dan digunakan sebagai absorban kontrol.¹⁹

Pemeriksaan Aktivitas Antioksidan, dilakukan dengan ditimbang ekstrak sebanyak 50 mg, kemudian larutkan sampai 50 mL metanol dalam labu ukur 50 mL, maka didapatkan konsentrasi 1 mg/mL. Kemudian untuk penentuan aktivitas antioksidan dipipet sebanyak 0,2 mL larutan sampel dengan pipet mikro dan

dimasukan ke dalam vial, kemudian ditambahkan 3,8 mL larutan 2,2-difenil-1-pikrilhidrazil 50 μ M. Campuran dihomogenkan dan dibiarkan selama 30 menit ditempat gelap, serapan diukur dengan spektrofotometer UV - Vis pada panjang gelombang 515 nm, absorban digunakan sebagai absorban sampel. Aktivitas antioksidan sampel ditentukan oleh besarnya hambatan serapan radikal bebas melalui perhitungan persentase inhibisi serapan 2,2-difenil-1-pikrilhidrazil.²⁰ Skema kerja dapat di lihat pada **Lampiran 4**.



BAB IV

HASIL DAN PEMBAHASAN

4.1 Uji Pendahuluan

Pada bagian daun dari tumbuhan sirsak (*Annona muricata* Linn) dilakukan uji pendahuluan kandungan kimia (fitokimia), hasil yang didapatkan tercantum pada Tabel 1.

Tabel 1. Profil fitokimia

No	Kandungan Kimia	Pereaksi	Pengamatan	Hasil Uji
1.	Alkaloid	Meyer	Tidak ada endapan putih	-
2.	Flavonoid	Sianidin	Warna orange	+
3.	Fenolik	FeCl_3	Warna biru	+
4.	Saponin	Air	Timbul busa	+
5.	Triterpenoid	Liebermann-Burchard	Warna merah	+
6.	Steroid	Liebermann-Burchard	Warna hijau	+
7.	Kumarin	NaOH 1%, fluoresensi UV	Berfluoresensi terang	+

Keterangan : (+) = positif (-) = negatif

Berdasarkan Tabel 1 dapat diketahui bahwa daun sirsak mengandung senyawa metabolit sekunder, diantaranya saponin, flavonoid, fenolik, triterpenoid, steroid, dan kumarin.

4.2 Isolasi Senyawa

Sampel daun sirsak dikering anginkan selama 14 hari bertujuan untuk mengurangi kadar air yang terdapat pada sampel. Karena kandungan air yang terdapat di dalam sampel dapat mempengaruhi proses isolasi yang akan dilakukan. Tahapan selanjutnya yaitu sampel di haluskan menjadi seperti bubuk menggunakan grinder yang bertujuan untuk memperbesar luas permukaan dari sampel, menyebabkan interaksi antara sampel dengan pelarut semakin besar sehingga mempercepat proses pelarutan senyawa yang diinginkan. Setelah didapatkan berat sampel segar 4,5 kg dan berat sampel setelah kering 2,8 kg,

Proses ekstraksi diawali dengan maserasi menggunakan pelarut heksan, EtOAc dan metanol. Teknik maserasi dipakai karena proses penyariannya

sederhana, cara ini dipilih karena jumlah sampel yang banyak dan sifat dari senyawa belum diketahui apakah stabil terhadap panas atau tidak. Ekstrak heksan, EtOAc, dan metanol hasil maserasi disaring dan dipekatkan menggunakan *rotari evaporator* pada suhu 40 °C sehingga diperoleh ekstrak pekat heksan, EtOAc dan metanol seperti yang terlihat pada Tabel 2 :

Tabel 2. Ekstrak pekat hasil maserasi daun sirsak.

No	Ekstrak	Profil	Berat
1	Heksan	Bewarna hijau	126 g
2	EtOAc	Berwarna hijau kecoklatan	54,26 g
3	Metanol	Berwarna merah kecoklatan	19,84 g

Masing-masing ekstrak diuji kandungan triterpenoid dengan menggunakan pereaksi Liebermann-Burchard (LB) dan didapatkan positif triterpenoid pada ekstrak heksan dan ekstrak EtOAc yang menunjukkan warna merah, sedangkan ekstrak metanol negatif triterpenoid. Selanjutnya dilakukan pengerjaan pada ekstrak EtOAc (ekstrak semi polar) karena hampir semua jenis senyawa metabolit sekunder terkandung di dalamnya dari yang bersifat polar sampai non polar. Dan juga kandungan triterpenoid pada ekstrak EtOAc ini lebih besar kuantitasnya dibandingkan dengan ekstrak heksan.

Terhadap ekstrak EtOAc dilakukan pengujian KLT menggunakan berbagai perbandingan eluen. Dari hasil pengujian KLT tersebut, didapatkan pola noda yang lebih sederhana seperti terlihat pada Tabel 3 :

Tabel 3. Hasil KLT ekstrak EtOAc dengan berbagai perbandingan eluen.

No.	Eluen	Pola Noda	Rf
1.	100% heksana	tidak naik	-
2.	heksan : EtOAc (9 : 1)	1 noda terpisah, 3 tailing	0,52
3.	heksan : EtOAc (8 : 2)	2 noda terpisah, 2 tailing	0,34; 0,46
4.	heksan : EtOAc (7 : 3)	Tailing	-
5.	heksan : EtOAc (6 : 4)	1 noda terpisah, 1 tailing	0,835
6.	heksan : EtOAc (5 : 5)	Tailing	-
7.	heksan : EtOAc (4 : 6)	Tailing	-
8.	heksan : EtOAc (3 : 7)	1 noda terpisah, 1 tailing	0,18
9.	heksan : EtOAc (2 : 8)	Tailing	-

10.	heksan : EtOAc (1 : 9)	Tailing	-
11.	100% EtOAc	Tailing	-
12.	EtOAc : MeOH (9 : 1)	Tailing	-
13.	EtOAc : MeOH (8 : 2)	Tailing	-
14.	EtOAc : MeOH (7 : 3)	Tailing	-
15.	EtOAc : MeOH (6 : 4)	Tailing	-
16.	EtOAc : MeOH (5 : 5)	Tailing	-

Uji kromatografi lapis tipis (KLT) yang dilakukan tidak diperoleh pemisahan noda yang baik, oleh sebab itu dilakukan kromatografi kolom dengan menggunakan fasa diam silika gel 60 (0,063-0,200 mm) sebanyak 110 gram dan sampel yang digunakan sebanyak 8 gram dengan menggunakan sistem elusi pelarut bergradien atau *Step Gradien Polarity* (SGP) dengan pelarut heksan dan EtOAc diperoleh 301 fraksi, seperti yang terlihat pada Tabel 4:

Tabel 4. Hasil pemisahan dengan kromatografi kolom dengan elusi bergradien ekstrak EtOAc.

No	Perbandingan Volume Eluen		Volume terpakai	No Vial
	heksan	EtOAc		
1	10	0	500 mL	1-3
2	9,5	0,5	500 mL	4-19
3	9	1	500 mL	20-46
4	8,5	1,5	500 mL	47-69
5	8	2	500 mL	70-92
6	7	3	500 mL	93-119
7	6	4	500 mL	120-147
8	5	5	500 mL	148-178
9	4	6	500 mL	179-209
10	3	7	500 mL	210-234
11	2	8	500 mL	235-260
12	1	9	500 mL	261-283
13	0	10	500 mL	284-301

Hasil kromatografi kolom diuji kromatografi lapis tipis untuk mengetahui pola pemisahan masing-masing fraksi yang telah didapatkan, dan fraksi yang memiliki pola noda dan Rf yang sama di gabungkan seperti yang tercantum pada Tabel 5 :

Tabel 5. Hasil penggabungan fraksi dari kromatografi kolom berdasarkan pola noda yang sama

No Vial	Fraksi	Profil	Kandungan Triterpenoid
1 - 18	I	larutan bening	-
19 - 25	II	larutan kuning muda	-
26 - 37	III	larutan kuning	-
38 - 41	IV	Larutan kuning tua	+
42 - 48	V	larutan kuning orange	+
49 - 54	VI	laruan kuning kecoklatan	-
55 - 57	VII	Larutan orange	++
58 - 64	VIII	Larutan orange muda	+++
65 - 70	IX	Larutan kuning kemerahan	++
71 - 77	X	larutan orange	+
78 - 86	XI	larutan merah	-
87 - 112	XII	larutan hijau	-
113 - 135	XIII	larutan hijau tua	+
136 - 149	XIV	Larutan hijau kecoklatan	-
150 - 168	XV	Larutan coklat	+++
169 - 180	XVI	Larutan coklat	+
181 - 215	XVII	Larutan coklat kemerahan	-
216 - 240	XVIII	Larutan merah	++
241 - 255	XIX	Larutan merah kecoklatan	-
256 - 283	XX	Larutan hijau tua	
284 - 301	XXI	Larutan hijau kekuningan	+
Jumlah			

Keterangan : + : uji positif (ada, kuantitasnya)
- : uji negatif (tidak ada)

Berdasarkan data pada Tabel 5 diketahui ada 11 fraksi yang memberikan uji positif terhadap triterpenoid yaitu fraksi IV, V, VII, VIII, IX, X, XIII, XV, XVI, XVII, dan XXI. Dari 11 fraksi tersebut, fraksi VIII dan XV menunjukkan kuantitas triterpenoid yang besar (+++). Tetapi pengerjaan selanjutnya di fokuskan pada fraksi VIII karena fraksi ini memperlihatkan adanya kristal dalam jumlah yang relatif banyak setelah pelarutnya diuapkan dibandingkan fraksi XV.

Kemudian fraksi VIII dimonitoring dengan KLT menggunakan pelarut heksan : EtOAc (8 : 2) dan didapatkan 1 noda terpisah 3 tailing dilihat di bawah lampu UV $\lambda = 254$ nm, yaitu noda berwarna ungu.

Dari hasil KLT diketahui bahwa fraksi VIII ini belum murni, untuk itu dilakukan pemurnian dengan metoda rekristalisasi menggunakan pelarut yang berbeda kepolaran yaitu heksan dan EtOAc. Fraksi VIII yang sudah diuapkan pelarutnya, dilarutkan dengan pelarut EtOAc sehingga semua kristal larut. Kemudian ditambahkan heksan setetes demi setetes sehingga terbentuk kekeruhan yang nantinya mengendap. Akan terbentuk 2 lapisan yang kemudian dipisahkan, yaitu filtrat heksan dan endapan EtOAc. Kemudian masing-masingnya di lakukan uji KLT (adsorben silika gel) menggunakan eluen heksan : EtOAc (8 : 2). Dapat dilihat pada Tabel 6 berikut :

Tabel 6. Hasil KLT larutan filtrat heksan, endapan EtOAc

No	Larutan	Pola noda	Rf
1.	Filtrat	1 noda terpisah, 1 tailing	0,75
2.	Endapan	2 noda terpisah, 1 tailing	0,43 ; 0,27

Dari hasil KLT kedua larutan ini belum memperlihatkan noda tunggal yang dapat menyatakan senyawa telah murni. Akhirnya difokuskan untuk melanjutkan pemurnian pada filtrat heksan karena memperlihatkan noda yang sederhana yaitu 1 noda terpisah, 1 tailing. Kemudian filtrat heksan tersebut di uji kandungan triterpenoid menggunakan pereaksi Liebermann-Burchard, dan memberikan warna merah yang menandakan positif untuk triterpenoid.

Filtrat heksan ini kemudian diuapkan pelarutnya menghasilkan kristal sebanyak 47,36 mg dan dilarutkan kembali dengan EtOAc. Kemudian dilakukan re-kromatografi kolom menggunakan kolom kecil dengan diameter 0,8 cm dan panjang 15 cm dengan adsorben silika gel. Proses pengelusian secara *SGP* (*Step Gradient Polarity*) dari eluen heksan 100% sampai heksan : EtOAc (5:5). Di dapatkan lah 25 fraksi yang selanjutnya masing-masing fraksi di uji KLT menggunakan eluen heksan : EtOAc (9:1). Fraksi yang memiliki pola noda dan Rf yang sama digabungkan. Hasil penggabungan fraksi dari hasil rekromatografi dapat dilihat pada Tabel 7 dihalaman berikutnya.

Tabel 7. Hasil penggabungan fraksi dari re-kromatografi kolom berdasarkan pola noda yang sama

No Vial	Fraksi	Pola noda	Rf
1	A	1 noda terpisah, 3 tailing	0,77
2 - 6	B	1 noda tunggal	0,57
7 - 8	C	2 noda terpisah, 1 tailing	0,68; 0,46
9 - 12	D	Tailing	-
13 - 15	E	Tailing	-
16 - 21	F	Tailing	-
22 - 25	G	Tidak ada noda	-

Hasil KLT pada Fraksi B memperlihatkan 1 noda tunggal yang berwarna coklat kemerahan dengan menggunakan penampak noda H_2SO_4 2 N yang diletakkan di atas pemanas. Dengan melihat noda tunggal tersebut mengindikasikan bahwa senyawa yang didapat telah murni.

Uji kemurnian senyawa hasil isolasi dilakukan dengan KLT menggunakan beberapa eluen dan memperlihatkan noda tunggal, seperti yang terlihat pada Tabel 8 berikut :

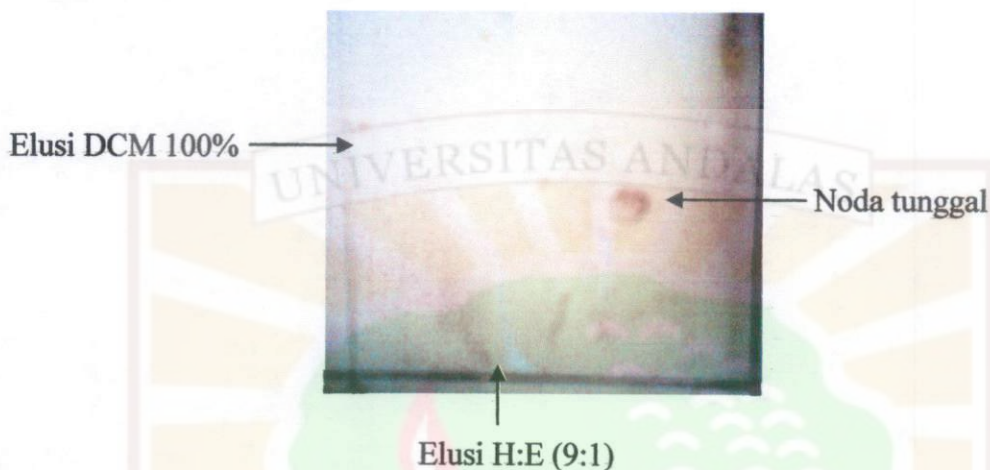
Tabel 8. Hasil KLT senyawa hasil isolasi dengan berbagai eluen.

No.	Eluen	Rf
1.	heksan : EtOAc (9 : 1)	0,57
2.	heksan : $CHCl_3$ (8 : 2)	0,26
3.	heksan : dichlorometan (8 : 2)	0,42
4	Dichlorometan 100%	0,75



Gambar 8. Pola noda KLT senyawa hasil isolasi dengan berbagai eluen

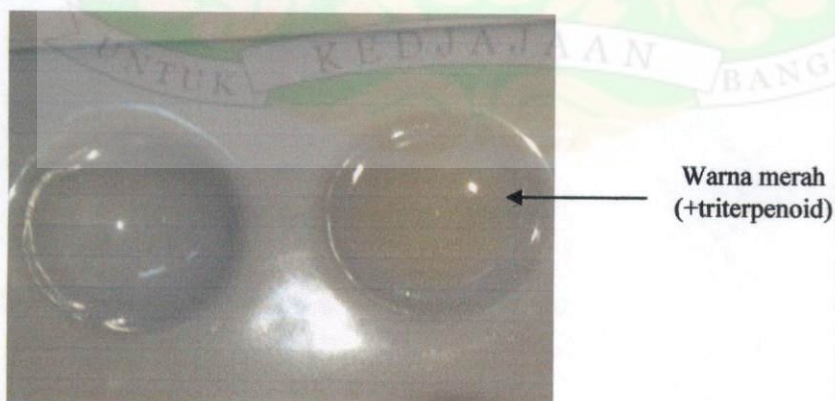
Selanjutnya dilakukan uji KLT dua dimensi dengan menggunakan eluen heksan : EtOAc (9 : 1) yang memberikan noda tunggal pada arah vertikal dengan nilai R_f 0,57 dan pada arah horizontal menggunakan eluen DCM 100% yang memberikan nilai R_f 0,75. Hal ini menunjukkan bahwa senyawa hasil isolasi telah murni, seperti yang terlihat pada Gambar 9 dibawah ini :



Gambar 9. Pola noda senyawa hasil isolasi pada Uji KLT dua dimensi.

4.3 Karakterisasi Senyawa Hasil Isolasi

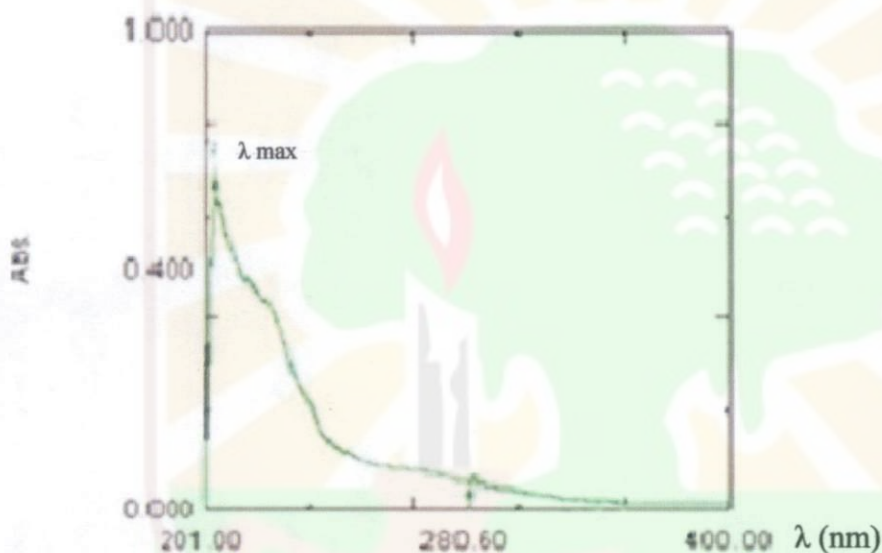
Untuk memastikan senyawa hasil isolasi yang didapatkan telah murni maka dilanjutkan dengan pengujian titik leleh. Dari hasil pengujian titik leleh, didapatkan titik leleh dari kristal ini adalah $195,1 - 197^{\circ}\text{C}$. Berdasarkan rentang titik leleh yang cukup pendek dapat diindikasikan bahwa senyawa hasil isolasi telah murni. Pengujian menggunakan pereaksi Liebermann-Burchard memberikan warna merah kecoklatan yang menunjukkan senyawa ini golongan triterpenoid. Seperti yang terlihat pada Gambar 10 :



Gambar 10. Hasil uji Liebermann-Burchard terhadap senyawa hasil isolasi

4.4 Spektroskopi Ultraviolet (UV) dan Infra merah (IR)

Karakterisasi senyawa hasil isolasi dilakukan dengan menggunakan spektrofotometer UV-1700 Series. Spekturm UV biasanya diperoleh dengan melewatkan cahaya dengan panjang gelombang tertentu melalui larutan encer senyawa tersebut dalam pelarut yang tidak menyerap cahaya pada panjang gelombang tersebut (misalnya air, metanol, etanol dan heksan). Spektrum UV yang dihasilkan oleh senyawa hasil isolasi dengan pelarut metanol memberikan serapan maksimum pada panjang gelombang 205,80 nm yang dapat dilihat pada Gambar 11 :

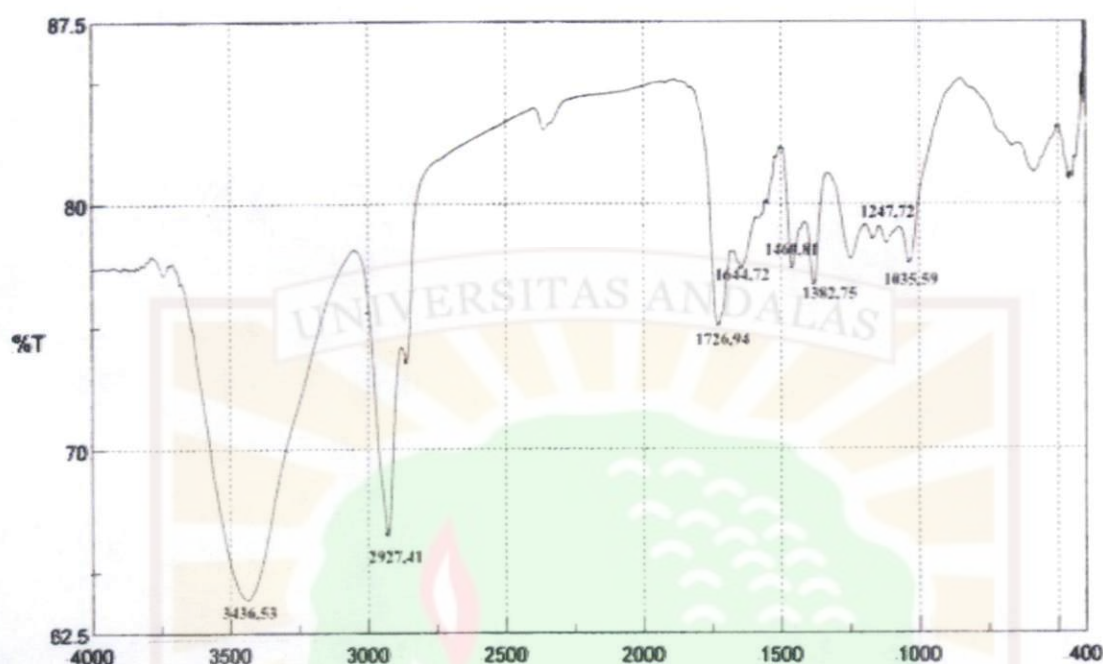


Gambar 11. Spektrum UV senyawa hasil isolasi dengan pelarut MeOH

Umumnya senyawa yang mempunyai transisi $\sigma - \sigma^*$ mengabsorpsi cahaya pada panjang gelombang 150 nm, senyawa yang mempunyai transisi $\pi - \pi^*$ (tidak berkonjugasi) mengabsorpsi cahaya pada panjang gelombang 190 nm, sedangkan senyawa yang mempunyai transisi $n - \pi^*$ mengabsorpsi cahaya pada panjang gelombang 300 nm.¹⁵

Berdasarkan penjelasan sebelumnya dan pita serapan maksimum yang diperoleh dari spektrum UV, yaitu pada λ 205,80 nm menunjukkan bahwa tidak adanya ikatan rangkap berkonjugasi yang terdapat pada senyawa hasil pemurnian.

Pada spektrum IR terdapat beberapa puncak dengan serapan penting yang terlihat pada Gambar 12 :



Gambar 12. Spektrum IR senyawa hasil isolasi.

Spektrum IR senyawa hasil isolasi memberikan informasi beberapa pita serapan penting, yaitu adanya pita serapan -OH pada angka gelombang 3436,53 cm^{-1} dan diperjelas dengan adanya vibrasi rentangan C-O alkohol pada angka gelombang 1035,59 cm^{-1} . Serapan C-O eter ditunjukkan pada angka gelombang 1300 – 1000 cm^{-1} yaitu 1247,72 cm^{-1} . Serapan gugus fungsi C=O karbonil muncul pada serapan 1726, 94 cm^{-1} . Adanya CH_3 ditunjukkan pada angka gelombang 2927,41 cm^{-1} yang didukung dengan adanya bengkokan - CH_3 pada bilangan gelombang 1460,81 cm^{-1} .^{15,16}

Geminal dimetil yang merupakan serapan khas senyawa golongan triterpenoid ditunjukkan pada daerah 1382,75 cm^{-1} (~1390 cm^{-1} dan ~1370 cm^{-1}). Serapan oleh geminal dimetil biasanya pecah menjadi dua puncak dengan intensitas yang sama, tapi kedua puncak ini tidak selalu tampak pada semua spektra, yang umum dijumpai hanya satu puncak saja.¹⁶

Berdasarkan informasi yang diperoleh dari spektrum IR, dapat diindikasikan bahwa senyawa hasil isolasi merupakan senyawa golongan triterpenoid.

4.5 Uji Antioksidan

Uji antioksidan menggunakan metode DPPH (2,2-difenil-1-pikrilhidrazil) dimana pengujian antioksidan pada ekstrak metanol, heksan, dan EtOAc. Serapan larutan diukur dengan spektrofotometer pada panjang gelombang 515 nm.¹⁸

Tabel 9. Hasil uji aktifitas antioksidan ekstrak metanol, n-heksan, dan EtOAc dengan metode *penangkapan radikal DPPH*.

No	Larutan	Inhibisi (%)
1.	Ekstrak Metanol	90,12
2.	Ekstrak EtOAc	74,30
3.	Ekstrak heksan	43,60
4.	Vitamin C	92.59

Dari data diatas dapat diketahui bahwa ekstrak metanol, EtOAc, dan heksan, berturut-turut mempunyai persen inhibisi sebesar 90,12 %, 74,30 %, 43,60 %. Hal ini menunjukan bahwa ekstrak daun sirsak (*Annona muricata* Linn) mempunyai aktivitas yang besar terhadap penghambatan radikal bebas.

BAB V

KESIMPULAN DAN SARAN

5.1 Kesimpulan

1. Dari uji fitokimia diketahui bahwa daun sirsak mengandung senyawa metabolit sekunder, diantaranya flavonoid, fenolik, triterpenoid, steroid, saponin dan kumarin.
2. Uji triterpenoid menggunakan pereaksi Liebermann-Burchard terhadap senyawa hasil isolasi memberikan warna merah, mempunyai titik leleh 195,1–197⁰C dan memberikan noda tunggal pada berbagai perbandingan eluen yaitu heksan : EtOAc (9 : 1), heksan : CHCl₃ (8 : 2), heksan : dichlorometan (8 : 2) dan dichlorometan 100% dengan pengungkap noda H₂SO₄ 2 N.
3. Pada spektroskopi ultraviolet memberikan serapan pada λ_{max} 205,80 nm diketahui senyawa hasil pemurnian tidak mempunyai ikatan rangkap yang berkonjugasi dan spektroskopi infra merah menunjukkan adanya gugus fungsi –OH, C=O keton, dan C-O eter.
4. Data uji antioksidan menggunakan DPPH (2,2-difenil-1-pikrilhidrazil) didapatkan bahwa ekstrak metanol memiliki aktivitas yang lebih baik dibandingkan ekstrak EtOAc dan ekstrak heksan, yaitu dengan nilai inhibisi 90,12 % sedangkan untuk ekstrak EtOAc dan heksan berturut-turut hanya 74,30% dan 43,60%.

5.2 Saran

1. Perlu dilakukan karakterisasi lebih lanjut untuk menentukan struktur dari senyawa hasil isolasi menggunakan spektroskopi ¹H NMR, dan ¹³C NMR.
2. Mengisolasi senyawa lain yang terdapat pada daun sirsak seperti flavonoid, fenolik, saponin, steroid dan kumarin serta uji antioksidannya.

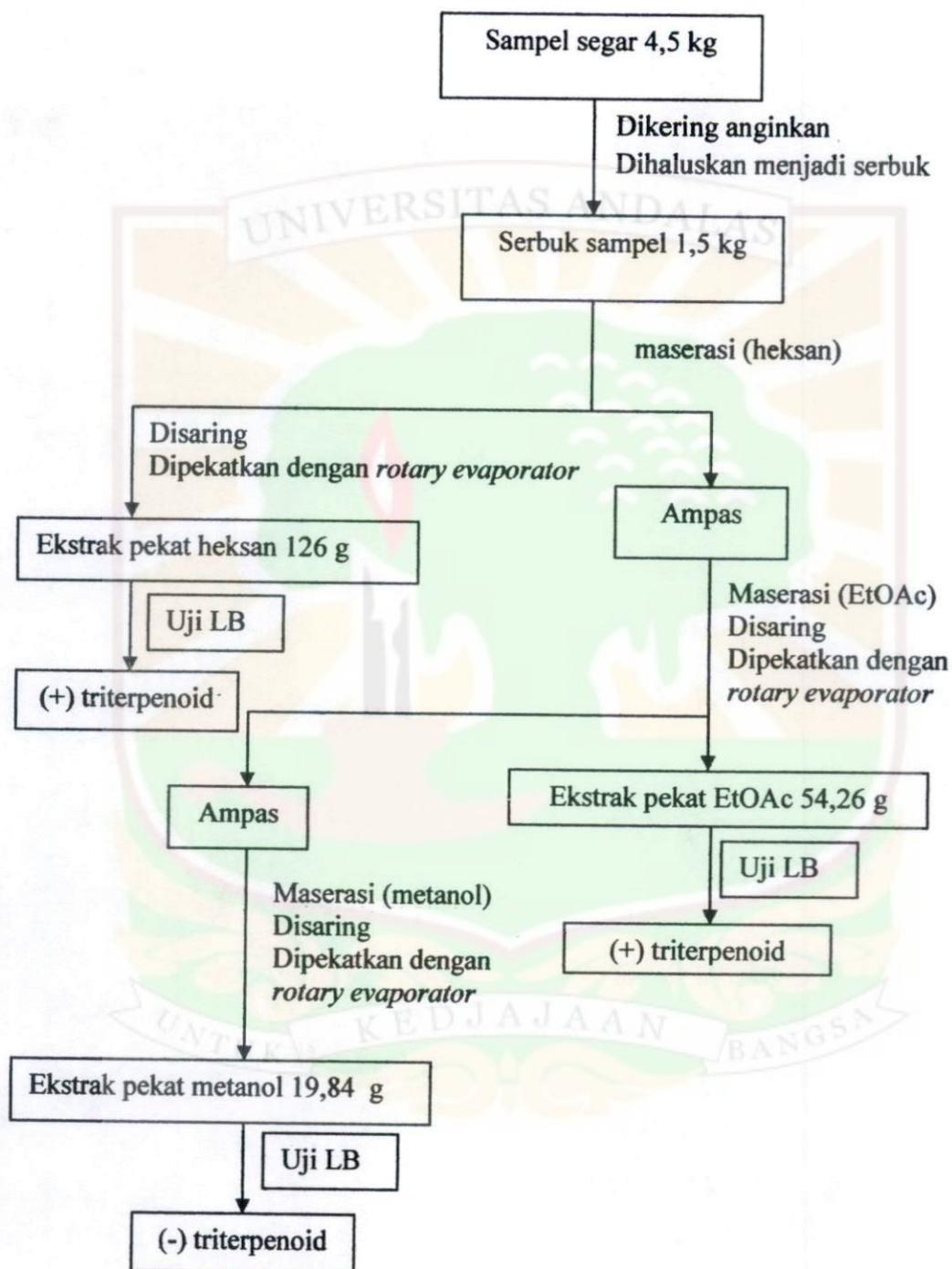
DAFTAR KEPUSTAKAAN

1. Kesuma, Widjaya. 2008. *Tanaman Sirsak dan Khasiatnya Terhadap Kesehatan*. Jilid I. Bumi Aksara : Jakarta. Hal 13-17.
2. Oktia, Dewi. 2007. *Isolasi senyawa flavonoid dari kulit batang tumbuhan sirsak (Annona muricata Linn)*. Skripsi. Jurusan Kimia :Universitas Sumatera Utara.
3. Rosalina, Lidya. 2009. *Isolasi triterpenoid dari ekstrak n-heksan daun sirsak (Annona muricata Linn)*. Skripsi. Fakultas Farmasi Universitas Padjajaran : Bandung.
4. Harborne, J.B.. 1984. *Metode fitokimia, penentuan cara modern menganalisis tumbuhan*. Padmawinata. ITB : Bandung. Hal. 3 – 9, 47 – 65, 123-158.
5. Jurgens, Thomas. 2009. Antibacterial of triterpenoid from *Annona muricata* seeds. Chemical journal. Vol 3. Hal 367-370.
6. Rika,R.P. 2007. *Isolasi triterpenoid dari fraksi EtOAc ekstrak kulit batang (Annona muricata L) dan skrining awal aktifitas toksik dari fraksi n-heksana, EtOAc, dan MeOH ekstrak kulit batang Annona muricata L dengan metoda "Brine Shrimps Lethality Bioassay*. Tesis. Universitas Indonesia : Jakarta.
7. Kurniawan, K. 2007. *Isolasi steroid dari daun sirsak (Annona muricata linn) pada fraksi aktif etil asetat terhadap uji bioaktifitas "brine shrimps lethality bioassay*. Skripsi. Universitas Andalas : Padang.
8. Silva, Felipe. 2012. *Steroids And Triterpene From The Bark Of Unonopsis Guatteroides R. E. Fr.(Annonaceae)*. Int J Pharm Pharm Sci, Vol 4. Hal 522-523.
9. Buttrawong, Ketkaew. 2009, *Isolation of Bioactive Metabolites from Root Extracts of Polyalthia Debilis*, Srinakharinwirot University, Thailand.vol 38.
10. Tanjung, Mulyadi. 2008. *Senyawa flavonoid dan alkaloid dari Saccopetalim horsfieldii Benn. sebagai apoptosis dan hubungan struktur-aktifitas antikanker*. Tesis. Fakultas Sains dan Teknologi :Universitas Airlangga.
11. Jhons, Tylor. 2011. *Antimalarial alkaloid isolated from Annona squamosa*. Inforesights Publishing UK. Vol 3. Hal 49-53.
12. Achmad, S.A. 2006. *Kimia Organik Bahan Alam*. Universitas Terbuka : Jakarta. Hal 101 -109.
13. Manito, P and Summer, P, G. 2001. *Biosenthesys of Natural Product*, John Wiley. New York. Hal 314-317.

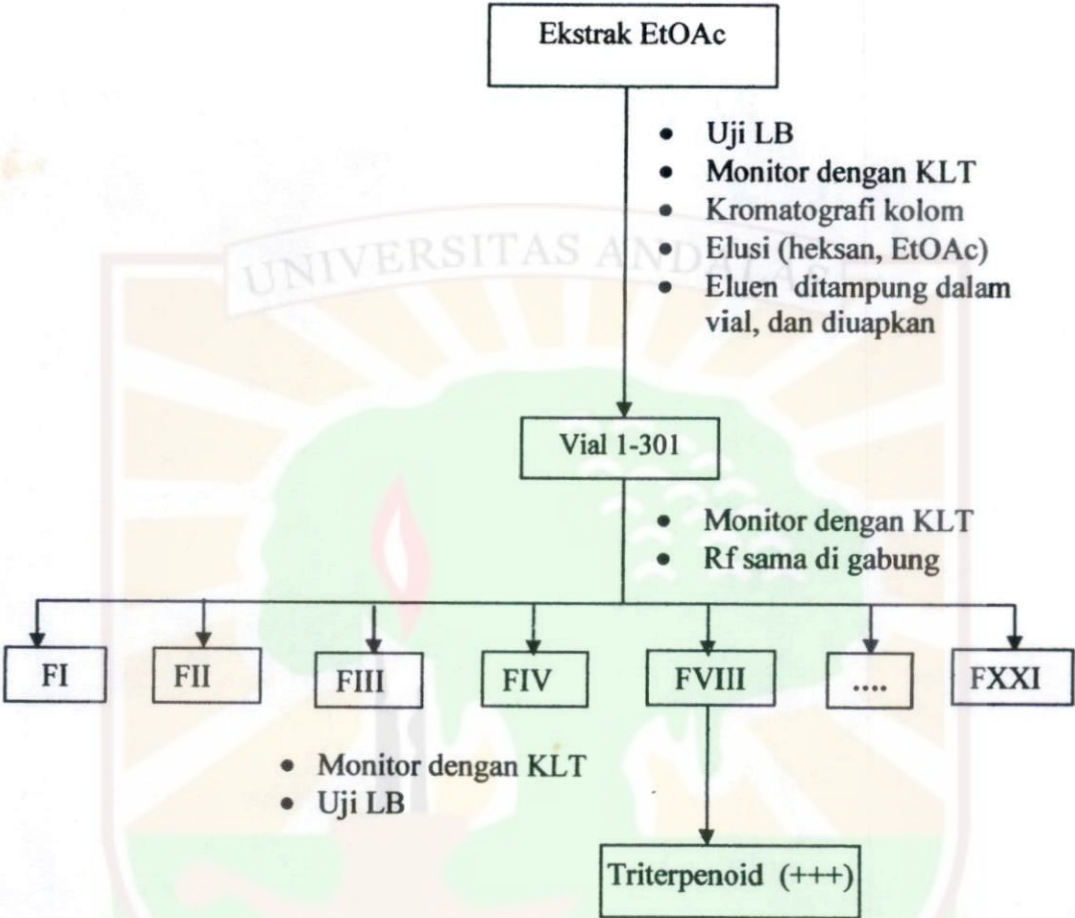
14. Manjang, Y.. 1985. *Kimia Analisa Organik*, Proyek Peningkatan Pengembangan Perguruan Tinggi Universitas Andalas : Padang. Hal 5-20.
15. Silverstein, RM., G.C. Bassler, and T.C. Morrill. 1981. *Spectrometric Identification of Organic Compounds* 4th Ed., John Wiley and Sons, Hal 136-140, 306-311.
16. Sastrohamidjojo, Hardjono. 1992. *Spektroskopi Infra Merah*, FMIPA, UGM, Edisi I. Liberti : Yogyakarta. Hal 56-58.
17. Trilaksani, W. 2003. *Antioksidan: Jenis, Sumber, Mekanisme Kerja dan Peran Terhadap Kesehatan*. Skripsi. Institute Pertanian Bogor : Bogor. Hal 1-12.
18. Ilham Kuncahyo, Sunardi. 2007. *Uji Aktivitas Antioksidan Ekstrak Belimbing Wuluh (*Averrhoa bilimbi*, L.) terhadap 1,1-Diphenyl-2-picrylhydrazil (DPPH), Seminar Nasional Teknologi*. Hal 3-4.
19. Molyneux, P. 2004. *The Use Of The Stable Free Radical Diphenyl Picrylhydrazyl (DPPH) For Estimating Antioxidant Activity*, *J. Sci. Technol.*, 26 (2), 211-219..



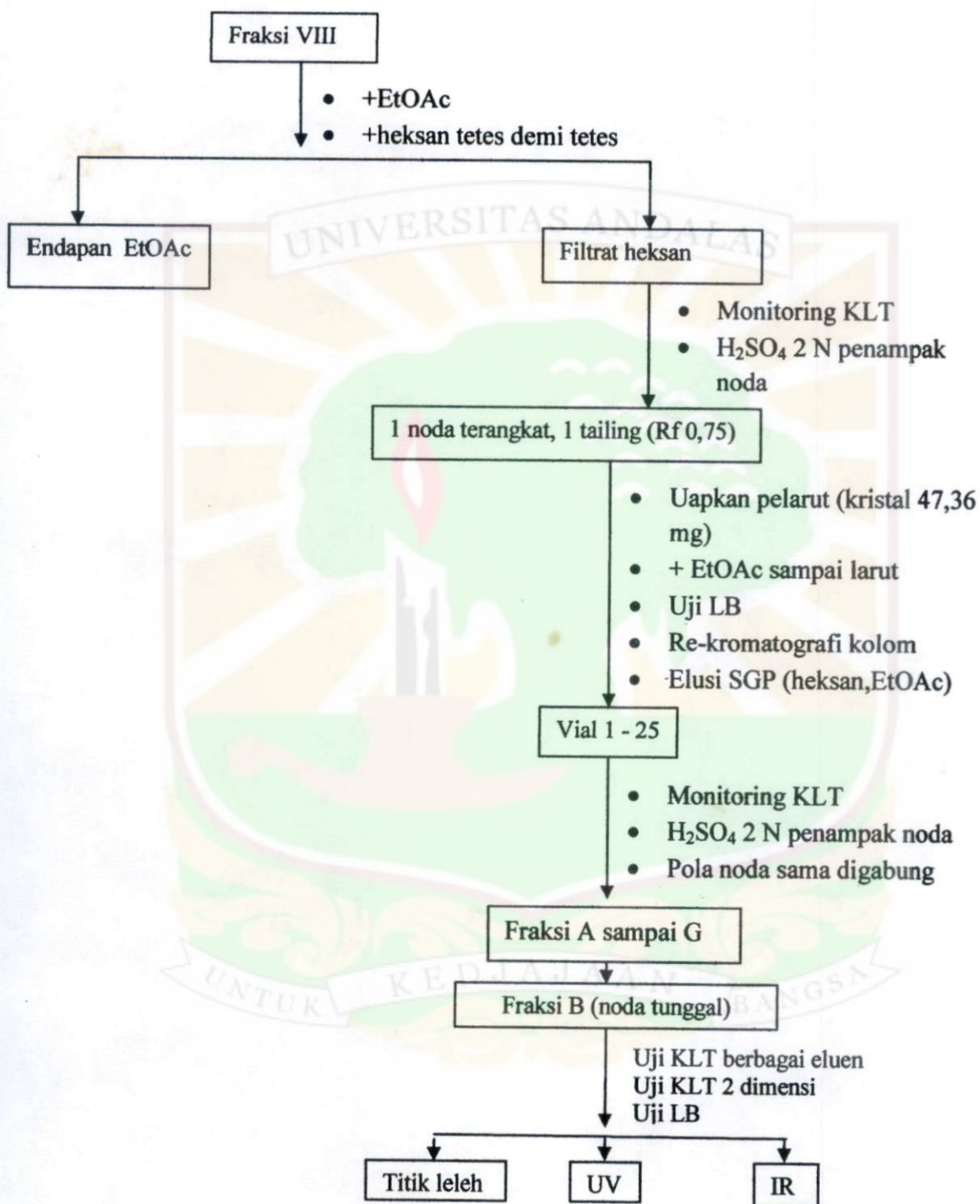
Lampiran 1. Skema kerja ekstraksi senyawa triterpenoid dari daun sirsak (*Annona muricata* Linn)



Lampiran 2. Skema kerja pemisahan ekstrak EtOAc

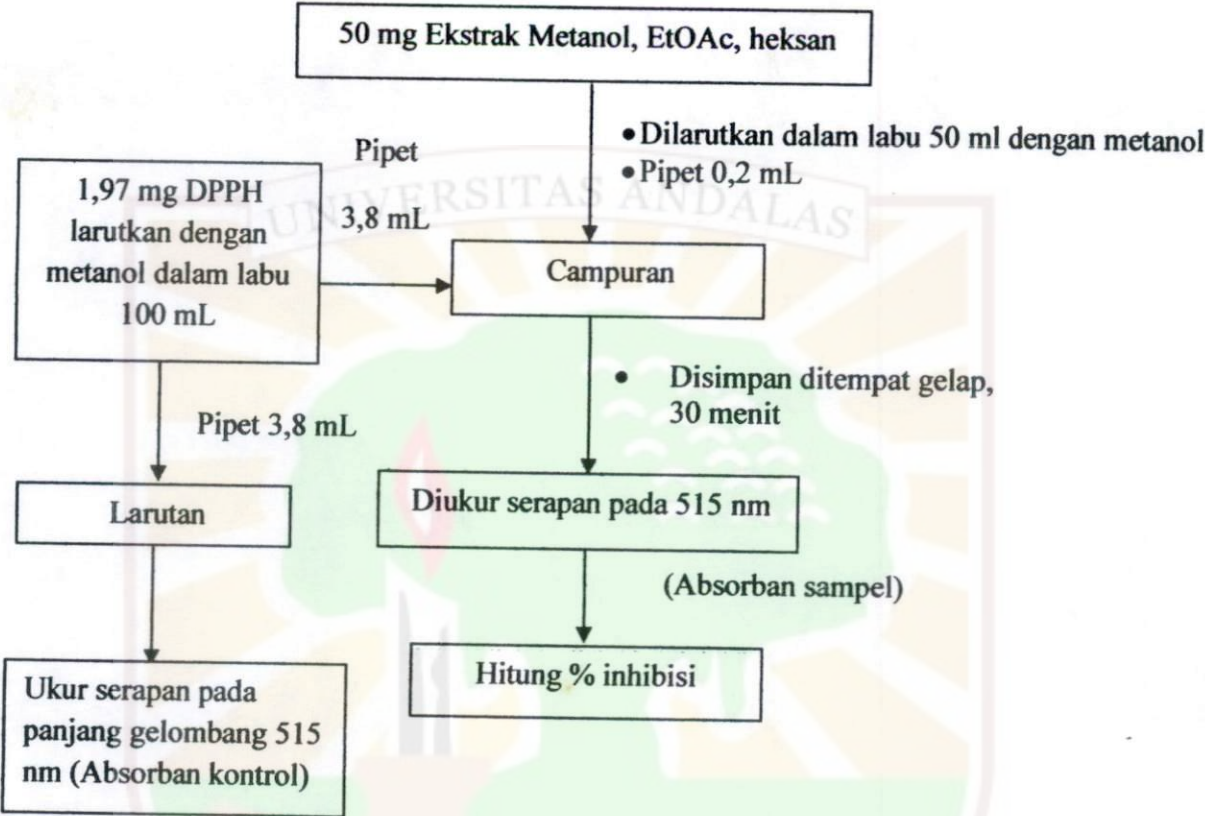


Lampiran 3. Skema pemurnian vial 58-64 (Fraksi VIII)



Lampiran 4. Uji antioksidan

Skema Kerja Uji Antioksidan Terhadap Penangkapan Radikal Bebas



$$\text{inhibisi} = \frac{\text{Absorban kontrol} - \text{Absorban sampel}}{\text{Absorban kontrol}} \times 100 \%$$

Tabel 10. Absorban larutan sampel dan larutan kontrol

No	Larutan	Absorban
1.	Larutan Kontrol (Metanol + DPPH)	0,486
2.	Ekstrak Metanol	0,048
3.	Ekstrak EtOAc	0,125
4.	Ekstrak heksan	0,274
5.	Vitamin C	0,036

$$\text{Inhibisi Ekstrak Metanol} = \frac{0,486 - 0,048}{0,486} \times 100 \% = 90,12 \%$$

$$\text{Inhibisi Ekstrak EtOAc} = \frac{0,486 - 0,125}{0,486} \times 100 \% = 74,3 \%$$

$$\text{Inhibisi Ekstrak heksan} = \frac{0,486 - 0,274}{0,486} \times 100 \% = 43,6 \%$$

$$\text{Inhibisi Vitamin C} = \frac{0,486 - 0,036}{0,486} \times 100 \% = 92,59 \%$$

$$\text{Konsentrasi Larutan DPPH} = \frac{1,97 \times 10^{-3} \text{ g}}{364 \text{ g/mol}} \times \frac{1000}{100 \text{ mL}}$$

$$\text{Konsentrasi Larutan DPPH} = 50 \mu\text{M}$$

Lampiran 5. Gambar Tumbuhan *Annona muricata* L dan bentuk daunnya.



Tumbuhan Sirsak (*Annona muricata* Linn.)



Daun sirsak segar



Daun sirsak kering