

Fraksinasi dan Identifikasi Senyawa Antioksidan pada Ekstrak Etanol Daun Sirsak (*Annona muricata* L.) secara Kromatografi Kolom

Diyan Maya Sari^(a), Sumi Wijaya^{(a)*}, Henry Kurnia Setiawan^(a)

^(a)Fakultas Farmasi, Universitas Katolik Widya Mandala, Surabaya, Indonesia

Annona muricata L. merupakan salah satu tanaman dari familia Annonaceae yang mengandung antioksidan alami yang dapat digunakan untuk pengobatan berbagai jenis penyakit. Berdasarkan kemampuannya yang memiliki daya antioksidan tersebut, maka dilakukan pemisahan senyawa antioksidan dan uji untuk membandingkan aktivitas daya antioksidan dari ekstrak etanol dengan fraksinya. Pemisahan senyawa antioksidan dengan menggunakan kromatografi kolom dan pengujian aktivitas antioksidan dengan metode DPPH (1,1-diphenyl-2-picrylhidrazyl). Berdasarkan hasil data KLT, spektrum UV-Vis dan spektroskopi IR dapat disimpulkan bahwa senyawa antioksidan mengandung flavonoid. Hasil pengujian aktivitas antioksidan menunjukkan bahwa ekstrak etanol daun sirsak memiliki aktivitas antioksidan dengan nilai $0,25 \pm 0,037$ mg/mL, sedangkan hasil dari fraksi menunjukkan bahwa aktivitas antioksidannya lebih besar dengan nilai $0,14 \pm 0,011$ mg/mL. Golongan metabolit sekunder dalam fraksi etanol daun sirsak yang dapat berfungsi sebagai senyawa antioksidan adalah flavonoid dan fraksi etanol tersebut memiliki aktivitas antioksidan yang lebih besar dibandingkan dengan aktivitas antioksidan ekstrak etanol.

Kata kunci: *Annona muricata* L., antioksidan, kromatografi kolom, DPPH.

Fractionation and Identification Antioxidant Compound from Ethanol Extract of Annona muricata Leaves using Column Chromatography

Annona muricata L. is one of the familia Annonaceae plants that have a natural source of antioxidants that can be used for treatment of various types of diseases. From this ability, the research was conducted to separate the antioxidant compound and to compare the antioxidant power from the ethanol extract with the fractions. The separation of compounds using column chromatography method and the measurement of antioxidant activity by DPPH (1,1-diphenyl-2-picrylhidrazyl) method. Based on TLC data, UV-VIS spectrophotometry and IR data, it was concluded that flavonoids is the antioxidant compound. The result of antioxidant activity assay showed that the ethanol extracts of soursop leaves has an antioxidant activity with IC50 values of $0,25 \pm 0,037$ mg/mL whereas of the fraction has the greater antioxidant activity with IC50 values of $0,14 \pm 0,011$ mg/mL. The antioxidant compounds in soursop leaf ethanol extract are flavonoids. Whereas, the result of antioxidant activity assay showed that the ethanol fraction of soursop leaves has the greater antioxidant activity than the ethanol extract itself.

Keywords: *Annona muricata* L, antioxidant, column chromatography, DPPH.

*Corresponding author: sumiwijaya@yahoo.com

PENDAHULUAN

Pesatnya perkembangan ilmu pengetahuan dan teknologi serta berubahnya pola hidup masyarakat berdampak pada munculnya berbagai penyakit degeneratif. Pola hidup yang tidak benar tersebut menyebabkan terbentuknya radikal bebas (oksidan) dalam tubuh. Oksidan ini akan menjadi racun bagi tubuh yang selanjutnya merusak fungsi sel tubuh dan dapat mengakibatkan penyakit degeneratif. Untuk mengatasi hal tersebut, tubuh memerlukan antioksidan dalam jumlah yang memadai (Hernani dan Raharjo, 2005). Daun sirsak atau *Annona muricata* L. merupakan salah satu tanaman dari familia Annonaceae yang memiliki sumber antioksidan alami yang dapat digunakan untuk pengobatan berbagai jenis penyakit. Pada penelitian sebelumnya diketahui adanya potensi antioksidan pada daun sirsak di berbagai model penelitian *in vitro* (Baskar *et al.*, 2007). Pada penelitian ini akan dilakukan fraksinasi ekstrak etanolik daun sirsak dengan metode kromatografi kolom yang selanjutnya dilakukan pengujian daya antioksidan dengan menggunakan DPPH. Fraksi yang diperoleh, dibandingkan daya antioksidannya dengan ekstrak etanol daun sirsak menggunakan metode DPPH.

METODE PENELITIAN

Alat

Perkolator, penggiling simplisia, *chamber*, kolom kromatografi, Spektrofotometer UV-Vis tipe UV-1201 (Shimadzu, Jepang), Multiscan GO (Thermoscientific, Finlandia), kuvet, timbangan analitik (Sartorius, Germany), cawan porselen, batang pengaduk, vial, mikropipet, corong pisah, mikrokapiler, *infrared moisture balance* (Kett, Germany), alat penyemprot DPPH, *infrared spectrophotometer* FTIR-8400 S (Shimadzu, Jepang), dan alat gelas yang lain.

Bahan

Daun sirsak, Etanol 96%, DPPH (Sigma, Germany), KLT silika gel 60 F254 (Merck KGaA, Germany), Silika Gel 60 70-230 mesh (0,063-0,200 mm) (Merck KGaA, Germany), metanol p.a. (pro analysis), kuersetin (Sigma, Germany), kloroform, *n*-heksan, etil asetat (*pharmaceutical grade*).

Tahapan Penelitian

Penyiapan Bahan

Daun sirsak dicuci bersih dan dikeringkan dengan diangin-anginkan, kemudian digiling sampai terbentuk serbuk simplisia. Satu kg serbuk dimaserasi selama 1 hari terlebih dahulu dengan pelarut etanol 96%. Selanjutnya serbuk dipindahkan ke dalam perkolator sampai didapat ekstrak cair. Ekstrak etanol daun sirsak dipekatkan dengan menggunakan pemanas diatas *water bath* pada suhu 50°C sampai didapatkan ekstrak kental.

Pemilihan Fase Gerak

Ekstrak kental kemudian dilakukan standarisasi

ekstrak dan dilakukan pemilihan fase gerak menggunakan beragam jenis (*n*-heksan, kloroform, etil asetat dan etanol) dan komposisi (1:9 ; 5:5 ; 9:1) eluen. Fase gerak yang terpilih digunakan pada kromatografi kolom.

Kromatografi Kolom

Untuk pemisahan komponen dengan menggunakan kromatografi kolom, dimasukkan bubuk silika gel 70-230 mesh sambil diaduk agar tidak terdapat rongga udara di tengah-tengah kolom. Timbunan bubuk silika gel dalam kolom mencapai tiga perempat tinggi kolom. Ekstrak daun sirsak dimasukkan ke dalam kolom kromatografi yang telah dilarutkan dengan sedikit larutan pengelusi sambil kran kolom dibuka, kemudian fraksi ditampung dalam vial per 10 mL. Setiap fraksi akan dianalisa daya antioksidannya secara kualitatif dengan metode KLT. Fraksi-fraksi tersebut ditotolkan pada fase diam silika gel 60 F254, dieluasi dengan fase gerak terpilih dan disemprot dengan larutan DPPH 0,2% b/v. Fraksi yang memiliki daya antioksidan akan memberikan noda berwarna kuning pada latar belakang ungu. Fraksi yang mempunyai nilai *R_f* dan daya antioksidan yang sama dikumpulkan menjadi satu dan selanjutnya akan diuji daya antioksidannya secara kuantitatif dengan metode DPPH yang dibandingkan dengan ekstrak etanolnya (Markham, 1988).

Identifikasi Golongan Senyawa

Fraksi terpilih dilarutkan dengan etanol kemudian dianalisa dengan spektrofotometri UV-Vis pada λ 200-400 nm. Identifikasi dilanjutkan dengan pereaksi geser AlCl₃ 5%, dan diidentifikasi dengan spektroskopi inframerah untuk mengetahui golongan metabolit sekunder dari ekstrak etanol daun sirsak.

Penentuan Daya Antioksidan

Fraksi yang terpilih disiapkan dengan rentang antara 0,211-103.10⁻⁶ mg/mL. Kuersetin yang digunakan sebagai kontrol positif juga disiapkan dalam tujuh rentang konsentrasi antara 1-156.10⁻⁴ mg/mL. Pipet sampel ke dalam *96-well plate* sebanyak 20 μ L kemudian ditambahkan dengan reagen DPPH sebanyak 180 μ L. Campuran didiamkan pada suhu ruang dengan kondisi gelap selama 30 menit. Selanjutnya, campuran sampel dan DPPH dicek absorbansinya pada λ 517 nm (Cavin *et al.*, 1998). Aktivitas antioksidan dinyatakan dengan nilai IC₅₀ yang didapatkan dari kurva regresi linier antara konsentrasi dengan persen aktivitas antioksidan (% AA). Aktivitas

$$\%AA = \frac{A_{kontrol} - A_{sampel}}{A_{kontrol}} \times 100\%$$

oksidan dapat dihitung dengan menggunakan rumus :

HASIL DAN PEMBAHASAN

TABEL 1. Hasil Penetapan Standardisasi Ekstrak Etanol Daun Sirsak

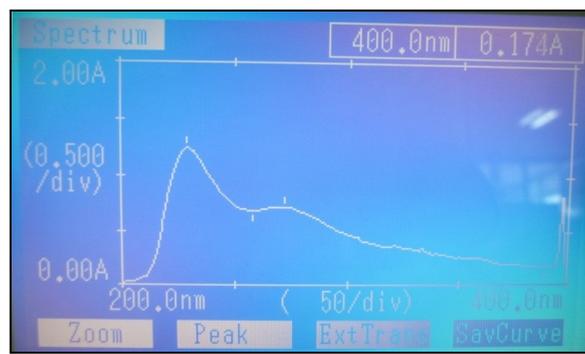
Parameter	Hasil	Keterangan
Organoleptis	Warna	Hitam Kecoklatan
	Bau	Tidak Berbau
	Tekstur	Semi Solid
Kadar Air	6,26 %	Memenuhi Persyaratan
	Kadar Abu	
Skrining	Tanin	Hijau Kehitaman
	Flavonoid	Coklat
Kualitatif	Alkaloid	Warna Merah pada Daerah Totolan
	Saponin	Tidak Timbul Busa

TABEL 2. Hasil Puncak Spektrum IR Fraksi dari Ekstrak Etanol Daun Sirsak

Gugus Fungsi	Bilangan Gelombang (cm ⁻¹)	Senyawa
OH	3390	
CH	2842	
CO	2052	
C = C	1641	

TABEL 3. Hasil Penentuan Nilai IC₅₀ Ekstrak Etanol Daun Sirsak

Sampel	IC ₅₀ (mg/ml)
Ekstrak Etanol	0,249 ± 0,037
Fraksi	0,142 ± 0,011
Pembanding (Kuersetin)	0,036 ± 0,006

**GAMBAR 1.** Profil KLT fraksi ekstrak etanol daun sirsak setelah disemprot DPPH (1,1-diphenyl-2-picrylhidrazil).**GAMBAR 2.** Spektrum UV-Vis fraksi ekstrak etanol daun sirsak.

Keterangan: fraksi dalam etanol dengan λ_{maks} 229,5 nm (pita II).

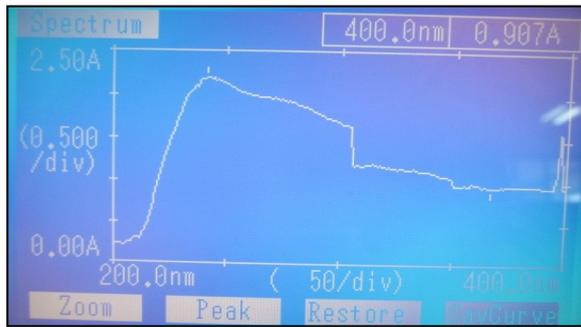
Pada hasil pemeriksaan organoleptis didapatkan warna hijau kehitaman dengan bentuk ekstrak kental. Pada pemeriksaan kadar air diperoleh hasil 6,26%. Hal ini sesuai dengan batas persyaratan yaitu kurang dari 10% (Dirjen POM RI, 2000). Pemeriksaan kadar air ini bertujuan untuk mengetahui besarnya kandungan air dalam ekstrak etanol. Pada penetapan kadar abu ekstrak diperoleh hasil 5,78%. Penetapan ini bertujuan untuk mengetahui gambaran kandungan mineral yang berasal dari simplisia kering sampai terbentuknya ekstrak. Dari hasil skrining fito-kimia menunjukkan bahwa ekstrak etanol positif mengandung tanin, flavonoid dan alkaloid. Sedangkan untuk saponin menunjukkan hasil nega-tif. Hasil tersebut sesuai dikarenakan pada penelitian lain dikatakan bahwa ekstrak daun sirsak memiliki kandungan alkaloid, flavonoid, dan ta-nin (Albuquerque *et al.*, 2010; Baskar *et al.*, 2007; De Sousa *et al.*, 2010).

Dari beberapa variasi fase gerak yang dicobakan, didapatkan hasil bahwa kloroform : etil asetat merupakan fase gerak terpilih yang dapat memberikan keterpisahan noda yang banyak dan memberikan spektrum daya antioksidan yang paling luas. Eluen yang terpilih tersebut akan digunakan untuk fraksinasi dengan metode kromatografi kolom. Dari proses pemisahan didapatkan fraksi yang kemudian ditotolkan dan diuji secara kualitatif menggunakan larutan DPPH 0,2%, sehingga didapatkan satu fraksi yang paling aktif sebagai antioksidan (**Gambar 1**).

Berdasarkan hasil identifikasi senyawa dilakukan pada fraksi menggunakan spektrofotometer UV-Vis dan spektroskopi infrared. Hasil spektrofotometer UV-Vis memberikan serapan maksimum pada panjang gelombang 229,5 nm untuk fraksi dari ekstrak etanol daun sirsak yang dapat dilihat pada **Gambar 2**. Setelah ditambahkan dengan pereaksi geser AlCl₃ menunjukkan pergeseran sebesar 12,5 nm yang dapat ditunjukkan pada **Gambar 3**. Dari penafsiran panjang gelombang yang dihasilkan, maka fraksi termasuk golongan flavonoid sesuai dengan penafsiran spektrum pada senyawa tersebut untuk panjang gelombang maksimum pita II pada flavonoid (Markham, 1988).

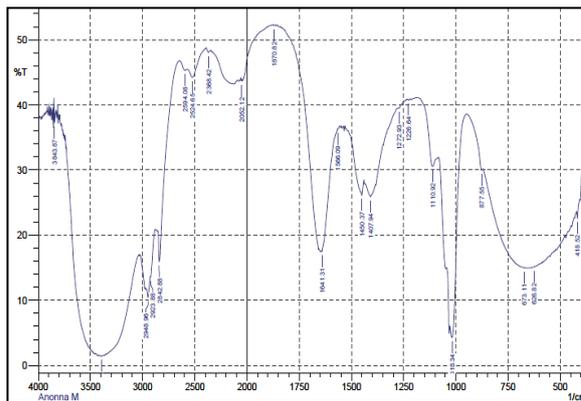
Selanjutnya, dilakukan identifikasi senyawa spektrum inframerah yang bertujuan untuk mengetahui gugus fungsi yang terdapat dalam golongan senyawa metabolit sekunder yang didapat dari hasil spektrum UV-Vis. Pada hasil analisa inframerah menunjukkan gugus fungsi dari fraksi memberikan spektrum pada gelombang 3390 nm (OH), 2842 (CH), 2052 (CO), 1641 (C=C) (**Tabel 2; Gambar 4**).

Dari hasil penentuan uji daya antioksidan dengan DPPH 0,2% diperoleh nilai IC₅₀ yang dapat dilihat pada **Tabel 3**. Dari hasil penelitian yang didapat bahwa nilai IC₅₀ dari ekstrak etanol daun sirsak dibandingkan dengan kuersetin lebih rendah kemampuannya dalam meredam radikal bebas. Untuk fraksi kemampuannya dalam me-



GAMBAR 3. Spektrum UV-Vis fraksi No. 61 ekstrak etanol daun sirsak dengan penambahan AlCl_3 .

Keterangan: fraksi dalam etanol+ AlCl_3 dengan λ_{maks} 242 nm (pita II).



GAMBAR 4. Profil analisa infrared pada fraksi dari ekstrak etanol daun sirsak.

redam radikal bebas lebih tinggi bila dibandingkan dengan ekstrak etanol daun sirsak.

KESIMPULAN

Golongan metabolit sekunder yang dapat berfungsi sebagai senyawa antioksidan pada ekstrak etanol daun sirsak adalah flavonoid. Ditinjau dari harga IC_{50} fraksi etanol ($0,14 \pm 0,011$ mg/mL) memiliki daya antioksidan lebih besar dari ekstrak etanolnya ($0,25 \pm 0,037$ mg/mL), sehingga dapat disimpulkan bahwa kemampuan antioksidan dari fraksi lebih baik daripada ekstrak etanolnya.

DAFTAR PUSTAKA

- Baskar R, Rajeswari V, dan Kumar TS, 2007, *In Vitro* Antioxidant Studies in Leave of Annona Species, **Indian J Exp Biol**, 45, 480-485.
- Cavin A, Kurt H, Wahjo D, dan Olivier P, 1998, Antioxidant and Lipophylic Constituents of *Tinospora crispa*, **Planta Med**, 64, 393-396.
- de Sousa OV, Vieira GD, de Pinho JJRG, Yamamoto CH, dan Alves MS, 2010, Antinociceptive and Anti-Inflammatory Activities of the Ethanol Extract of *Annona muricata* L. Leaves in Animal Models, **Int J Mol Sci**, 11(5), 2067-2078.
- Direktorat Jenderal POM RI** (DirJen POM RI), Depkes RI.
- Gomes de Melo J, de Sousa Araújo TA, Thijan Nobre de Almeida e Castro V, Lyra de Vasconcelos Cabral D, do Desterro Rodrigues M, Carneiro do Nascimento S, Cavalcanti de Amorim EL, dan de Albuquerque UP, 2010, Antiproliferative Activity, Antioxidant Capacity and Tannin Content in Plants of Semi-Arid Northeastern Brazil, **Molecules**, 15(12), 8534-8542.
- Hernani dan Rahardjo M, 2005, **Tanaman Berkhasiat Antioksidan**, Penebar Swadaya, Depok.