Isolasi dan Uji Bioaktivitas Senyawa Metabolit Sekunder Ekstrak Etil Asetat Kulit Batang Sirsak (*Annona Muricata* Linn.)

Isolation and Bioactivity Test of Secondary Metabolites Compound Ethyl Acetate Extract of Soursop bark (*Annona muricata* Linn.)

[1)]Sermiyanti Yasni Amsua, [2)] Maryono, [3)] Iwan Dini
[1,2,3)]Jurusan Kimia Universitas Negeri Makassar, Jl. Dg Tata Raya. No. 76
Email: antiesehwaesya@gmail.com

ABSTRAK

Penelitian ini adalah penelitian eksplorasi yang bertujuan untuk mengisolasi, mengidentifikasi dan mengetahui sifat toksisitas senyawa metabolit sekunder yang terdapat dalam ekstrak etil asetat kulit batang sirsak (*Annona muricata* Linn.) terhadap *Artemia salina.* Isolasi dilakukan dengan beberapa tahap: ekstraksi (maserasi), fraksinasi, pemurnian dan identifikasi senyawa dilakukan dengan menggunakan alat spektroskopi inframerah serta uji bioaktivitas dilakukan dengan metode Brine Shrimp Lethality Test (BLST). Hasil uji bioaktivitas terhadap *artemia salina* menunjukkan bahwa ekstrak kental etil asetat bersifat toksik dengan nilai LC_{50} = 5,822 ppm dan pada fraksi D ekstrak etil asetat dengan nilai LC_{50} = 16,688 ppm. Hasil dari pemurnian senyawa diperoleh isolat murni berupa serbuk berwarna putih dengan titik leleh 142^{o}C. Identifikasi dengan spektrum IR menunjukkan adanya serapan gugus OH, gugus karbonil C=O, CH_2 dan CH_3, ikatan rangkap C=C aromatik dan C-O. Berdasarkan data inframerah, ^{1}H, dan ^{13}C NMR disimpulkan bahwa senyawa yang diperoleh adalah 17, 18 dihidroksi montecristin.

Kata kunci: *Annona muricata* Linn., Metabolit Sekunder, BSLT

ABSTRACK

This study is exploratory research that aime to isolate, identify and toxicity of assay secondary metabolite compound from ethyl acetate extract of Soursop bark (*Annona muricata* Linn.) to Artemia salina. Isolation was done in several steps,: extraction (maceration), fractionation, purification and identification of compound were performed using an infrared spectroscopy and bioactivity test was conducted using Brine Shrimp Lethality Test (BLST) method. The result bioactivity test to Artemia salina showed that ethyl acetate extract toxic with LC50 = 5.822 ppm and the ethyl acetate extract fraction D with a value of LC50 = 16.688 ppm. The result of the purification was in pure white powder with a melting point of 142^{o}C. Identification by IR spectrum showed that OH group, carbonyl group C=O, CH_2 and CH_3, C=C double bond and aromatic C-O. Based on the infrared data, ^{1}H and ^{13}C NMR obtained that the compound is 17, 18 dihidroksi montecristin.

Keywords: *Annona muricata* Linn., Secondary Metabolites, BSLT

PENDAHULUAN

Pemanfaatan bahan alam sebagai obat tradisional saat ini sangat diminati oleh masyarakat. Hal ini disebabkan obat tradisional relatif mudah didapat dan harganya terjangkau. Di Indonesia berjuta tumbuhan dari berbagai macam spesies bahkan tumbuh subur menjadikan Indonesia gudang senyawa bahan alam dengan keanekaragaman struktur dan mempunyai aktivitas biologi yang cukup banyak. Tumbuhan dapat menghasilkan berbagai macam senyawa kimia yang dimilikinya sebagai mekanisme untuk mempertahankan kelangsungan hidupnya terhadap kondisi lingkungan, baik faktor iklim, serangga dan hama penyakit oleh karena itu mempunyai bioaktivitas yang menarik (Naphong, 2013).

Tumbuhan menghasilkan bermacam-macam golongan senyawa organik yang sebagian besar dari senyawa itu tidak tampak secara langsung dalam pertumbuhan dan perkembangan tumbuhan tersebut. Zat-zat kimia ini secara sederhana dirujuk sebagai senyawa metabolit sekunder. Senyawa-senyawa yang tergolong kedalam kelompok metabolit sekunder ini antara lain: alkaloid, flavonoid, terpenoid, steroid, kuinon, tannin dan minyak atsiri. Salah satu famili tumbuhan yang dimanfaatkan sebagai tanaman obat di berbagai negara termasuk di Indonesia adalah famili Annonaceae. Annonaceae merupakan tumbuhan yang besar yang terdiri dari 126 genus dan 2500 spesies (Barbut, 2014; Simbala, 2009).

Salah satu jenis tanaman obat dari famili Annonaceae yang sering dimanfaatkan sebagai obat tradisional oleh masyarakat adalah *Annona muricata L.* atau yang lebih dikenal dengan nama sirsak. Seiring dengan perkembangan teknologi, kandungan dan khasiat tanaman sirsak mulai terungkap. Berbagai penelitian menunjukkan bahwa tanaman sirsak mengandung banyak khasiat sebagai obat. Bagian tanaman sirsak, mulai dari daun, bunga, buah, biji, akar sampai kulit batang dapat dimanfaatkan sebagai obat. Pada umumnya bagian-bagian tanaman sirsak tersebut banyak digunakan untuk mengobati penyakit seperti hipertensi, diabetes, batuk, demam, bisul, dan berbagai penyakit lainnya (Mardiana, 2012; Yulianti, 2011).

Penelitian tentang tumbuhan ini telah banyak dilakukan, diantaranya ditemukannya senyawa alkaloid pada daun dan biji sirsak (Wullur, 2012 ; Idrus, 2012), kandungan antioksidan dan antiinflamasi pada ekstrak etanol daun sirsak (Suharyadi, 2013). Senyawa flavanoid juga ditemukan pada ekstrak kloroform daging buah sirsak dan pada ekstrak n-butanol daun sirsak merupakan senyawa aktif yang dapat menurunkan kadar asam urat (Opaladu, 2013; Artini, 2011); dari ekstrak etanol ditemukan *leucoanthocyanins* yang bersifat toksisitas terhadap larva *Aedesaegypti* sehingga dapat bermanfaat sebagai obat penyakit demam berdarah (Torres, 2014). Oleh karena itu senyawa golongan lain seperti flavanoid, steroid, dan alkaloid dapat juga ditemukan pada kulit batang. Secara teoritis senyawa kimia yang bersifat bioaktif pada tumbuhan tingkat tinggi dapat

ditemukan diseluruh bagian tumbuhan (Suhando, 2013).

Untuk mengisolasi senyawa yang memiliki sifat bioaktivitas maka biasanya dilakukan uji toksisitas. Uji toksisitas yang paling sederhana, mudah dan dapat diandalkan adalah uji toksisitas metode *Brine Shrimp Lethality Test* (BSLT) menggunakan larva udang laut *Artemia salina* Leach. Kandungan kimia aktif dapat bersifat racun jika digunakan pada dosis yang tinggi, dengan demikian secara *in vivo* kematian suatu hewan percobaan dapat dipakai sebagai alat pemantau penapisan awal kandungan kimia aktif suatu bahan alam terhadap ekstrak, fraksi maupun isolat (Meyer, 1982). Uji toksisitas dimaksudkan untuk memaparkan adanya efek toksik atau menilai batas keamanan dalam kaitannya dengan penggunaan suatu senyawa. Pengukuran toksisitas dapat ditentukan secara kuantitatif dan melihat harga LC_{50} yang dihitung berdasarkan nilai probit untuk menyatakan tingkat keamanan dan tingkat berbahaya zat tersebut. Untuk mengetahui tingkat toksik suatu senyawa dapat dilakukan dengan cara menggunakan metode Brine Shrimp Lethal Test (BSLT).

Berdasarkan uraian di atas, maka perlu diadakan suatu penelitian lebih lanjut mengenai isolasi dan uji bioaktivitas senyawa metabolit sekunder ekstrak etil asetat pada kulit batang sirsak yang menunjukkan adanya potensi ditemukan senyawa metabolit sekunder yang dapat dijadikan sebagai senyawa aktif dengan menggunakan pelarut etil asetat.

METODE PENELITIAN

A. Alat dan Bahan

1. Alat

Alat-alat yang digunakan pada penelitian ini diantaranya wadah maserasi, beberapa alat kaca seperti gelas kimia dan gelas ukur berbagai ukuran, labu Erlenmeyer 1000 mL, corong Buchner, batang pengaduk, pipet tetes, botol vial, chamber, pipa kapiler, alat kromatografi kolom cair vakum (KKCV) dan kromatografi kolom flash (KKF), gunting, spoid, statif dan klem, pompa vakum. Kemudian beberapa alat instrumen seperti evaporator Hahn Shin® HS2005VN, hot plate Stuart®, oven Memmert®, lampu UV VL-4 LC 254-356 nm, neraca analitik Cheetah® FA2204B, neraca Kris Chef®, alat penentuan titik leleh mikro dan elektrotermal Stuart® SMP11 serta spektrometer FTIR SHIMADZU Prestige-21.

2. Bahan

Bahan-bahan yang digunakan di antaranya kulit batang *A. muricata* Linn, pelarut organik teknis seperti etil asetat untuk maserasi sampel, pereaksi Liebermann-Buchard untuk uji kualitatif terpenoid dan steroid, Wagner dan Mayer untuk uji kualitatif alkaloid, besi (III) klorida 1% untuk uji kualitatif fenolik/flavanoid. Bahan-bahan lain yang digunakan yaitu serium sulfat 10% dalam asam sulfat 2 N sebagai reagen penampak noda, kertas saring Whatman No.41, aluminum foil, impregnasi sampel menggunakan silika gel Merck G 60 H nomor katalog 7733, silika gel Merck G 60 (70-230 mesh) nomor katalog 7730 untuk kromatografi kolom cair vakum (KKCV), dan silika gel Merck G 60 (230-400 mesh) nomor

katalog 7734 untuk kromatografi kolom flash (KKF), serta pelat KLT aluminium berlapis silika gel Merck G 60 GF_{254} nomor katalog 7730.

B. Prosedur Kerja

1. Ekstraksi

Sebanyak 2,5 kg serbuk halus kulit batang sirsak dimaserasi dengan etil asetat teknis sebanyak 10 L. Maserasi dilakukan selama 3 kali 24 jam disertai pengocokan atau pengadukan. Maserat etil asetat yang diperoleh kemudian didekantasi dan disaring dengan corong Buchner yang dilapisi kertas saring Whatman No. 41. Ekstrak yang diperoleh sebanyak 3 L dipekatkan menggunakan evaporator pada suhu rendah (40℃) hingga diperoleh ekstrak kental 15,48 gram. Terhadap ekstrak kental etil asetat dilakukan uji pereaksi dengan pereaksi Liebermann-Burchard untuk uji terpenoid dan steroid, $FeCl_3$ untuk uji fenolik/flavanoid, Mayer dan Wagner untuk uji alkaloid. Ekstrak etil asetat yang diperoleh diuapkan pada suhu ruang.

2. Fraksinasi

Ekstrak etil asetat yang akan difraksinasi terlebih dahulu diidentifikasi menggunakan kromatografi lapis tipis dengan menggunakan berbagai macam eluen pada berbagai perbandingan. Kemudian dideteksi di bawah lampu UV 254 dan 365 nm dan dilanjutkan dengan penyemprotan larutan serium sulfat, $CeSO_4$ 10% lalu dipanaskan.

Tahap fraksinasi pertama dilakukan dengan metode kromatografi kolom cair vakum (KKCV) menggunakan silika gel G 60 (70-230 mesh, 50 g) sebagai fasa diam, sedangkan eluennya (fasa gerak) menggunakan eluen dari hasil KLT yang ditingkatkan kepolarannya secara bergradien (*Step Gradien Polarity*). Volume eluen untuk setiap elusi sebanyak 100 mL. Fraksi yang diperoleh sebanyak 40 fraksi diidentifikasi menggunakan KLT dengan eluen yang sesuai. Fraksi-fraksi yang mempunyai profil noda yang sama digabung sehingga di peroleh 8 fraksi utama. Hasil KKCV yang diperoleh diuapkan pada suhu ruang. Selanjutnya fraksi D dengan berat 3,0113 g dipilih untuk difraksinasi menggunakan kromatografi kolom flash (KKF) dengan silika gel G 60 (230-400 mesh, 19 g) sebagai fasa diam dan eluen yang sesuai sebagai fasa gerak. Fraksi-fraksi yang diperoleh sebanyak 20 fraksi dianalisis menggunakan KLT dengan eluen yang sesuai. Fraksi-fraksi yang mempunyai profil noda yang sama digabung dan di peroleh 8 faksi utama kemudian diuapkan pada suhu ruang. Fraksi D_3 difraksinasi kembali menggunakan kromatografi kolom flash (KKF) dengan silika gel G 60 (230-400 mesh, 19 g) sebagai fasa diam dan eluen yang sesuai sebagai fasa gerak. Fraksi-fraksi yang diperoleh sebanyak 23 fraksi dianalisis menggunakan KLT dengan eluen yang sesuai. Fraksi yang mempunyai profil noda yang sama digabung dan di peroleh 9 faksi.

3. Pemurnian

Isolat $D_{3.4}$ yang diperoleh dari fraksi gabungan KKF dimurnikan (direkristalisasi) dengan pelarut yang sesuai. Kemurnian senyawa yang diperoleh ditentukan dengan melakukan KLT tiga sistem eluen. Jika hasil KLT memperlihatkan pola noda tunggal, maka senyawa tersebut

relatif murni secara KLT. Tahap pemurnian selanjutnya yaitu uji titik leleh. Senyawa tersebut dianggap murni apabila titik leleh senyawa menunjukkan trayek titik leleh yang tajam.

4. Identifikasi

Identifikasi dilanjutkan dengan menggunakan pereaksi Liebermann-Burchard untuk uji terpenoid dan steroid, $FeCl_3$ untuk uji flavanoid, Wagner dan Mayer untuk uji alkaloid untuk mengetahui golongan senyawa isolat. Identifikasi lebih lanjut dilakukan dengan alat spektrometer FTIR Shimadzu Prestige-21 untuk mengetahui gugus fungsional isolat. Data yang diperoleh diinterpretasi untuk mengkarakterisasi struktur senyawa isolat.

5. Uji Bioaktivitas

Ekstrak etil asetat diuji bioaktivitas dengan metode Brine Shirmp Lethality Test (BSLT) terhadap benur udang *Artemia salina* Leach, dengan prosedur sebagai berikut; Satu mg sampel dalam vial dilarutkan dengan DMSO (dimetil sulfoksida) sebanyak 100 µL kemudian diencerkan dengan 150 µL aquabides. Pengenceran tersebut diambil 200 µL diencerkan kembali dengan 600 µL aquabides sehingga konsentrasi sampel menjadi 1000 ppm. Selanjutnya pengenceran dilakukan dalam mikroplat dengan konsentrasi yang bervariasi (1000, 100, 10) ppm dan volume tiap lubang 100 µL. Benur udang dengan umur 48 jam di pipet sebanyak 100 µL dengan jumlah benur sekitar 30 ekor, dimasukkan kedalam mikroplat yang berisi sampel kemudian diinkubasi selama 24 jam. Selanjutnya dihitung jumlah udang yang mati dan ditentukan nilai LC_{50} (Mayer, 1982). Kontrol dibuat dengan perlakuan yang sama tanpa penambahan sampel.

HASIL DAN PEMBAHASAN

A. Hasil Penelitian

1. Isolasi dan Identifikasi Senyawa Metabolit Sekunder Ekstrak Etil Asetat Kulit Batang Sirsak

a. Uji Pendahuluan

Ekstrak kental etil asetat yang diperoleh terlebih dahulu dilakukan uji pendahuluan dengan menggunakan berbagai pereaksi untuk mengetahui golongan senyawa metabolit sekunder yang terkandung dalam sampel. Uji dilakukan dengan pereaksi Lieberman-Burchard, Besi (III) klorida ($FeCl_3$), Meyer, dan Wagner, hasilnya pengujian dapat dilihat pada Tabel 1 dan perubahan yang terjadi pada masing-masing pereaksi dapat dilihat pada Gambar 1.

Tabel 1. Hasil Uji Pendahuluan Ekstrak Etil Asetat Kulit Batang Sirsak

No	Pereaksi	Hasil	Keterangan
1	Lieberman-Burchard	Warna Hijau	+ Steroid
2	$FeCl_3$	Warna hijau kekuningan	+ Flavonoid
3	Meyer	Warna kuning	-- Alkaloid
4	Wagner	Endapan coklat	+ Alkaloid

a b c d e

Gambar 1. Hasil Uji Pendahuluan Ekstrak Etil Asetat Kulit Batang Sirsak (a)Sampel (b) $FeCl_3$ (c) Wagner (d)Meyer (e) Lieberman-Burchard

b. Fraksinasi

Proses fraksinasi dilakukan dengan metode kromatografi kolom cair vakum (KKCV). Sebelum dilakukan KKCV ekstrak kental yang diperoleh terlebih dahulu dilakukan uji KLT. Perbandingan eluen yang memiliki pola pemisahan yang baik dan memberikan penampakan noda yang jelas yaitu eluen *n*-heksana:etil asetat (7:3) sebagaimana terlihat pada Gambar 4.2.

Gambar 2. Kromatogram Lapis Tipis Ekstrak Etil Asetat

Eluen yaitu *n*-heksana:etil asetat (7;3)

Proses fraksinasi dilakukan dengan menggunakan silika gel 60 H sebagai fase diam dan larutan sebagai fase gerak. Pemisahan dilakukan berdasarkan pita-pita warna yang terdapat pada fase diamnya, dan diperoleh sebanyak 40 fraksi. Fraksi-fraksi tersebut kemudian diidentifikasi KLT untuk penggabungan fraksi dengan perbandingan eluen n-Heksan:etil asetat (7:3). Kemudian frkasi 16-40 diuji KLT kembali dengan meningkatkan kepolaran eluen yang digunakan yaitu n-Heksan:etil asetat (8:2). Kemudian dilakukan penggabungan fraksi dan diperoleh 12 fraksi gabungan. Fraksi gabungan ini kemudian di KLT kembali dengan perbandingan eluen n-Heksan:etil asetat (5:5). Berdasarkan pola noda yang terbentuk maka dihasilkan 8 fraksi gabungan utama (A-H).

Tabel 2. Penggabungan Fraksi Hasil Kromatografi Kolom Cair Vakum

Fraksi	Gabungan	Berat (g)
1-6	A	1,2935
7-12	B	2,8783
13-15	C	1,5687
16-25	**D**	**3,0113**
26	E	0,6315
27-30	F	1,2795
31-38	G	2,7463
39-40	H	5,1532

Fraksi D kemudian difraksinasi lebih lanjut dengan metode kromatografi kolom tekan. Sebelum difraksinasi lebih lanjut terlebih dahulu dilakukan KLT untuk menentukan eluen yang akan digunakan. Berdasarkan hasil pemisahan yang baik sebagaimana tampak pada gambar 3.

Hasil proses KKT diperoleh 20 fraksi. Fraksi-fraksi tersebut kemudian di uapkan dan di uji KLT untuk penggabungan fraksi. Eluen yang digunakan pada KLT yaitu perbandingan n-heksan:etil asetat (3:7) dan etil asetat 100% dan berdasarkan pola dan warna noda yang sama pada plat KLT maka dihasilkan 8 fraksi gabungan seperti terlihat pada Tabel 3.

Gambar 3 Kromatogram Lapis Tipis Fraksi D
Eluen yaitu *n*-heksana :etil asetat (7:3).

Tabel 3. Penggabungan Fraksi Hasil Kromatografi Kolom Tekan Fraksi D

Fraksi	Gabungan	Berat (g)
1-5	D_1	0,0920
6	D_2	0,2219
7	**D_3**	**1,3970**
8-9	D_4	0,9769
10	D_5	0,4674
11	D_6	0,3296
12	D_7	0,4132
13-20	D_8	0,2097

Fraksi-fraksi diuapkan pada suhu ruang. Fraksi D_3 difraksinasi lebih lanjut dengan pertimbangan telah terbentuk padatan pada dasar wadah dan memiliki bobot paling tinggi, sehingga dilakukkan uji KLT dan masih terdapat dua noda seperti terlihat pada gambar 4. Hal tersebut menunjukkan bahwa isolat tersebut belum murni sehingga dilakukan fraksinasi lebih lanjut.

Gambar 4. Kromatogram Lapis Tipis Fraksi D_3
Eluen yaitu *n*-heksana :etil asetat (6:4).

Fraksi D_3 difraksinasi dengan kromatografi kolom tekan (KKT) diperoleh 9 fraksi gabungan seperti terlihat pada Tabel 4.

Tabel 4. Penggabungan Fraksi Hasil Kromatografi Kolom Tekan D_3

Fraksi	Gabungan	Berat (gr)
1-7	$D_{3.1}$	0,0666
8	$D_{3.2}$	0,0044
9	$D_{3.3}$	0,1183
10-11	**$D_{3.4}$**	**0,5769**
12-14	$D_{3.5}$	0,3443
15-16	$D_{3.6}$	0,1491
17-19	$D_{3.7}$	0,1905
20-21	$D_{3.8}$	0,0179
22-33	$D_{3.9}$	0,0591

Fraksi gabungan dibiarkan menguap pada suhu ruang. Isolat fraksi $D_{3,4}$ dengan berat 0,5769 g dipilih untuk dilanjutkan pada tahap pemurnian karena terbentuk padatan putih pada dasar botol vial saat proses penguapan.

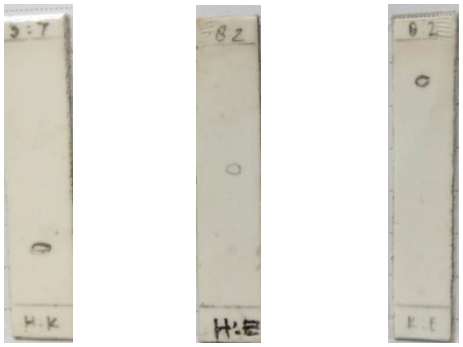
c. Pemurnian

Isolat $D_{3.4}$ dimurnikan untuk memisahkan dari pengotornya. Proses pemurnian dilakukan dengan perlahan-lahan dan berulang-ulang dengan menggunakan pelarut yang dapat melarutkan pengotor dari isolat yang diperoleh dan pelarut yang digunakan adalah methanol dan aseton. Setelah dilakukan pemurnian diperoleh isolat murni berbentuk serbuk berwarna putih.

(a) (b)

Gambar 5. Hasil KKF Fraksi $D_{3.4}$
(a) Isolat sebelum dimurnikan
(b) Isolat setelah dimurnikan

Isolat yang diperoleh dengan bobot 77,1 mg kemudian diuji kemurniannya dengan KLT tiga sistem eluen dengan menggunakan perbandingan pelarut yang berbeda. Kromatogram isolat terlihat setelah pemberian penampak noda $CeSO_4$ dan pemanasan yakni berwarna coklat. Eluen yang digunakan yaitu n-heksana: kloroform (3:7), n-heksana:etil asetat (8:2) dan kloroform:etil asetat (8:2).



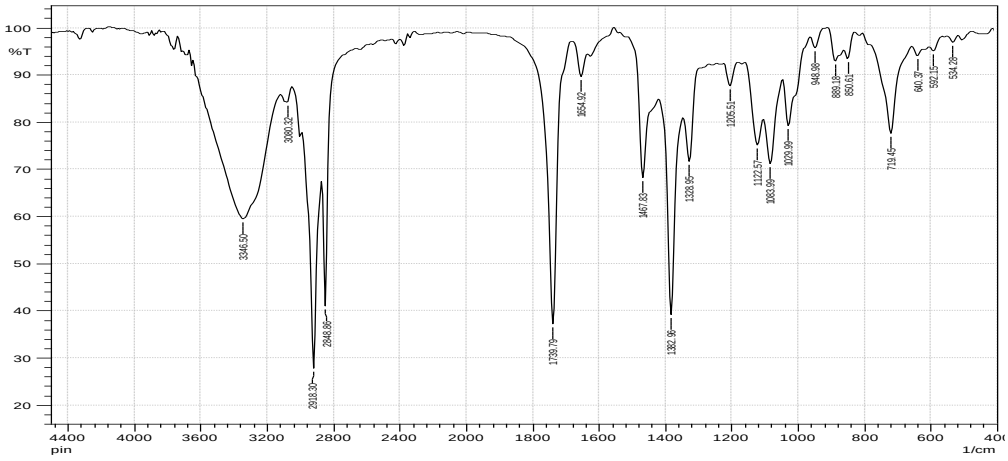
(a) (b) (c)

Gambar 6. Kromatogram Isolat Hasil KLT Tiga Sistem Eluen
(a) Eluen n-heksana: kloroform (3:7)
(b) Eluen n-heksana: etil asetat (8:2)
(c) Eluen kloroform: etil asetat (8:2)

d. Identifikasi

Isolat murni secara KLT selanjutnya diidentifikasi dengan pengujian titik leleh menggunakan Melting Point Meter dan isolat mulai meleleh pada suhu 140^{o}C dan meleleh secara keseluruhan pada suhu 142^{o}C. Berdasarkan studi pustaka bahwa senyawa murni memiliki trayek titik leleh tidak lebih dari 2℃ (Firdaus, 2011).

Identifikasi dilanjutkan dengan menggunakan spektroskopi FTIR Prestige-21 SHIMADZU yang bertujuan untuk mengidentifikasi gugus fungsional dari suatu senyawa yang diperoleh.



Gambar 8. Spektrum Infra merah isolat

Tabel 6. Interpretasi Spektrum Inframerah dari Isolat Fraksi $D_{3.4}$

Bilangan Gelombang (ν, cm^{-1})	Bilangan Gelombang Pustaka (ν, cm^{-1})*	Bentuk Pita	Penempatan Gugus Terkait	Intensitas
3346.50	3200 – 3550	Melebar	-OH (ikatan hidrogen antar molekul)	Sedang
2918,30 dan 2848,86	2850 – 2990	Tajam	-CH alifatik (gugus CH_2 dan CH_3)	Kuat
1739.79	1750-1700	Tajam	C=O	Kuat
1654.92	1680 - 1620	Tajam	C=C aromatik	Lemah
1467.83 dan 1382.96	1340 – 1480	Tajam	-CH alifatik (gugus CH_2 dan CH_3)	Kuat
1083.99	1000 – 1300	Tajam	C-O	Sedang

Sumber: Mohrig (2010)

2. Uji Bioaktivitas

Hasil uji bioaktivitas terhadap larva udang ekstrak etil asetat kulit batang *A. muricata* Linn. dapat dilihat pada Tabel 7. Berdasarkan analisis data pada ekstrak kental etil asetat diperoleh nilai LC_{50} sebesar 5,822 ppm dan pada fraksi D diperoleh LC_{50} sebesar 16.688 ppm.

Tabel 7. Hasil uji larva udang (*Artemia salina* Leach) terhadap ekstrak kental etil asetat kulit batang *A. muricata* Linn

Kons (ppm)	log Kons	Jumlah Benur				% Kematian		% Kematian terkoreksi	Probit
		Sampel		Kontrol		Sampel	Kontrol		
		awal	mati	awal	mati				
10	1.00	30	20	30	17	67	57	10	3.72
100	2.00	30	28	30	20	93	67	26	4.39
1000	3.00	30	30	30	30	100	100	0	0

Tabel 8. Hasil uji larva udang (*Artemia salina* Leach) terhadap fraksi D ekstrak etil asetat kulit batang *A. muricata* Linn

Kons (ppm)	log Kons	Jumlah Benur				% Kematian		% Kematian terkoreksi	Probit
		Sampel		Kontrol		Sampel	Kontrol		
		awal	mati	awal	mati				
10	1.00	30	30	30	17	100	57	43	4.82
100	2.00	30	30	30	20	100	67	33	4.56
1000	3.00	30	29	30	30	97	100	-3	0

B. Pembahasan

1. Isolasi dan Identifikasi Senyawa Metabolit Sekunder Ekstrak Etil Asetat Kulit Batang Sirsak

Ekstrak kental yang diperoleh pada proses ekstraksi diuji pendahuluan terlebih dahulu. Uji pendahuluan pada ekstrak kental bertujuan untuk mendapat informasi awal metabolit sekunder yang terdapat pada kulit batang sirsak. Berdasarkan hasil uji pendahuluan diketahui bahwa pada kulit batang sirsak mengandung metabolit sekunder flavonoid, alkaloid, steroid dimana uji pereksi $FeCl_3$ positif terhadap sampel dengan terbentuknya warna hijau kekuningan, uji dengan perekasi Wagner membentuk endapan cokelat dan uji LB membentuk warna hijau. Penelitian yang telah dilakukan Artini (2011), dilaporkan bahwa pada ekstrak methanol ditemukan senyawa flavanoid yaitu kaempferol. Sedangkan penelitian yang telah dilakukan Fofana (2011), dilaporkan bahwa pada daging buah sirsak ditemukan senyawa alkaloid yaitu senyawa annonain. Pada penelitian ini tidak ditemukan senyawa steroid, al ini disebabkan karena kandungan metabolit sekunder pada tumbuhan dipengaruhi oleh beberapa faktor, salah satunya yaitu faktor ekologi tumbuhan. Menurut Harborne (1987), dua bidang penelitian ekologi yang menentukan kandungan metabolit sekunder ialah antaraksi tumbuhan-hewan dan antaraksi tumbuhan-tumbuhan sehingga meskipun jenis tumbuhan yang sama akan memiliki kandungan metabolit sekunder yang berbeda bergantung kondisi lingkungan hidupnya.

Langkah berikutnya yaitu proses fraksinasi yang bertujuan untuk memisahkan senyawa-senyawa yang terdapat dalam sampel tersebut berdasarkan sifat kepolarannya. Metode KKCV merupakan metode awal untuk memisahkan sampel dalam jumlah banyak dan dilanjutkan dengan metode KKT. Pemurnian isolat dengan rekristalisasi yaitu dengan melarutkan zat warna yang masih terdapat dalam kristal, namun tidak melarutkan kristal yang sudah ada, selanjutnya diuapkan sampai diperoleh isolat murni yang ditandai dengan hasil kromatogram menujukkan noda tunggal, isolat berbentuk serbuk berwarna putih dengan bobot 77,1 mg fraksi $D_{3.4}$.

Isolat tersebut diuji kemurniannya dengan metode KLT sistem tiga eluen dengan pelarut dan perbandingan yang berbeda. Pemisahan senyawa dianggap cukup apabila telah diperoleh isolat yang menunjukkan noda tunggal pada beberapa uji KLT dengan menggunkan variasi eluen yang berbeda. Adanya noda tunggal menunjukkan sudah diperoleh senyawa dengan kemurnian yang tinggi (Atun, 2014).

Hasil uji titik leleh diperoleh isolat meleleh pada suhu 140-142^{o}C. Dari teori yang diperoleh mengatakan bahwa senyawa murni akan memiliki trayek titik leleh tajam yakni awal dari melelehnya hingga meleleh secara keseluruhan berada dalam trayek titik leleh tidak lebih dari 2^0C.

Identifikasi dilanjutkan menggunakan spektroskopi FTIR Prestige-21 SHIMADZU dengan metode pellet KBr pada rentang bilangan gelombang 4500–500 cm^{-1}.

Berdasarkan analisis spektrum infra merah terdapat beberapa gugus fungsi. Daerah serapan pada bilangan gelombang (ν)3346.50 cm^{-1} ditandai dengan pita yang lebar dengan intensitas sedang dan spesifik untuk gugus fungsi hidroksil bebas O-H (3200-3550 cm^{-1}).Vibrasi ikatan ini diduga merupakan vibrasi dari gugus OH yang mengalami ikatan hidrogen antarmolekul. Data ini didukung oleh pita serapan vibrasi ulur yang tajam dengan intensitas kuat yang menunjukkan adanya gugus fungsi C=O pada daerah gelombang 1739.79 cm^{-1}. Serapan tajam dengan intensitas sedang pada daerah (ν)1083.99 cm^{-1} diidentifikasi tekukan C-O (1300-1000 cm^{-1}).

Pada bilangan gelombang (ν)2918,30 cm^{-1} dan 2848,86 cm^{-1} terdapat serapan yang kuat dan tajam menunjukkan adanya vibrasi ulur C-H dari gugus CH alifatik gugus $–CH_2$ dan $–CH_3$ (2850-2990 cm^{-1}). Hal ini menunjukkan bahwa isolat mengandung gugus metil dan metilen alifatik. Keberadaan metilen alifatik diperkuat dengan adanya serapan pada (ν)1467.83 cm^{-1} dan (ν)1382.96 cm^{-1} yang merupakan vibrasi tekuk C-H alifatik dengan intensitas tajam. Serapan pada daerah (ν)1654.92 cm^{-1} menunjukkan adanya vibrasi ulur dari C=C aromatik (1620-1680 cm^{-1}) dengan intensitas kuat. Berdasarkan interpretasi data spektrum FTIR isolat fraksi $D_{3.4}$ ekstrak etil asetat kulit batang sirsak adalah senyawa golongan flavanoid, yang memiliki gugus OH, gugus karbonil C=O, CH alifatik, ikatan rangkap C=C aromatic dan C-O.

Analisis data spektroskopi ^{1}H-NMR memperlihatkan sinyal khas, diantaranya 3 sinyal proton alkena masing-masing pada δ 2,32 ppm (H-3, d) untuk proton alkena dalam unit siklik, dan pada δ 5,41 ppm (H-21, m) dan δ 5,36 (H-22, m) untuk proton alkena rantai terbuka. Unit sikliknya sendiri membentuk struktur γ-lakton yang ditunjukkan dengan sinyal proton pada δ 5,02 ppm (H-36, m). Untuk proton metin yang mengikat gugus oksi (C-O-) siklik. Selanjutnya terdapat 4 sinyal yaitu pada δ 2,80 ppm (H-13, m); δ 2,84 ppm (H-14, m); δ 3,24 ppm (H-17, m); dan δ 3,35 ppm (H-18, m) yang menunjukkan proton metin tersubstitusi gugus hidroksil. Dua sinyal masing-masing pada δ 0,87 ppm (H-34, t) untuk proton metil pada rantai terbuka dan pada δ 1,40 ppm (H-37, d) untuk proton metil yang terikat pada struktur siklik. 24 sinyal lainnya merupakan sinyal metilen ($-CH_2-$). Analisis data ^{13}C-NMR memperlihatkan 37 sinyal karbon, yang meliputi satu karbonil (C-1) lakton pada δ 149,88 ppm (C-35); dua karbon alkena siklik pada δ 133,15 ppm (C-2) dan δ 149,88 ppm (C-35); dua karbon alkena rantai terbuka pada δ 129,64 ppm (C-21) dan δ 129,78 ppm (C-22); empat oksi karbon pada δ 73,22 ppm pada (C-13), δ 73,34 ppm (C-14), δ 73,65 ppm (C-17) dan δ 73,75 ppm (C-18); dan dua sinyal metil pada δ 13,48 ppm (C-34) dan δ 18,57 (C-37), serta 24 sinyal metilen ($-CH_2-$). Hubungan ikatan struktur dibuktikan mlalui korlasi jarak jauh ^{13} C – ^{1}H dan spektum HMBC menunjukkan korelasi jarak jauh antara sinyal karbon dan proton, yaitu karbon karbonil pada δ 173 03 ppm (C-1) dengan proton pada δ 2,23 ppm (H-3); δ 73,22 ppm (C-13) dengan δ 1,44 ppm (H-12). Berdasarkan data

korelasi HMBC dapat disimpulkan bahwa senyawa yang dianalisis adalah 17, 18 dihidroksi montecristin. Data NMR senyawa ini mirip seperti senyawa derivet montecristin yang dilaporkan sebelumnya (C. Gleye, 1997).

2. Uji Bioaktivitas

Metode *Brine Shrimp Lethality Test* (BSLT) digunakan untuk pengujian toksisitas terhadap ekstrak etil asetat kulit batang sirsak. Metode BST menggunakan larva *Artemia salina* Leach untuk menelusuri senyawa-senyawa aktif yang terdapat dalam ekstrak tanaman. *Artemia salina* Leach merupakan general bioassay dimana semua zat dapat menembus masuk dinding sel larva tersebut. Pelarut yang digunakan adalah DMSO (dimetil sulfoksida) karena cepat meresap kedalam epitel ekstrak tanpa merusak sel-sel. Dari hasil data yang diperoleh % kematian larva pada kontrol dan sampel sama dimana semakin tinggi konsentrasi maka % kematian larva juga semakin meningkat, karena pada kontrol terdapat larva yang mati hal ini menunjukkan bahwa ada pengaruh dari pelarut yang digunakan. Adanya kematian larva pada kontrol maka persamaan yang digunakan untuk mendapatkan % kematian.

Pengujian toksisitas pada penelitian ini menunjukkan hasil positif yaitu pada ekstrak kental etil asetat diperoleh nilai LC_{50} sebesar 5,822 ppm dan pada fraksi D diperoleh nilai LC_{50} sebesar 16,688 ppm. Nilai LC_{50} yang diperoleh lebih kecil dari 1000 ppm hal ini menunjukkan bahwa ekstrak kental dan fraksi D kulit batang sirsak bersifat toksik terhadap *Artemia salina*. Penelitian yang dilakukan Wijaya (2012), tentang uji toksisitas melalui anlisis biologis yaitu uji BST, hasilnya fraksi F005 dan botol T-03 hingga T-13 memiliki nilai LC_{50} di bawah 1000 ppm dan memiliki sifat sitotoksik antikanker. Mekanisme kematian larva berhubungan dengan fungsi senyawa yang terdapat pada ekstrak kulit batang sirsak yang dapat menghambat daya makan larva (*antifeedant*/pengelak makanan). Cara kerja senyawa-senyawa tersebut adalah dengan bertindak sebagai *stomach poisoning* atau racun perut. Oleh karena itu, bila senyawa-senyawa ini masuk ke dalam tubuh larva, alat pencernaannya akan terganggu. Selain itu, senyawa ini menghambat reseptor perasa pada daerah mulut larva. Hal ini mengakibatkan larva gagal mendapatkan stimulus rasa sehingga tidak mampu mengenali makanannya sehingga larva mati kelaparan.

KESIMPULAN DAN SARAN

A. Kesimpulan

Berdasarkan hasil penelitian ini senyawa hasil isolat diproleh berupa serbuk putih, dengan titik leleh 142^{o}C, identifikasi dengan spektrum IR menunjukkan adanya serapan gugus OH, gugus karbonil C=O, CH_2 dan CH_3, ikatan rangkap C=C nonkonjugasi dan C-O, hasil analsis ^{1}H dan ^{13}C NMR maka dapat ditarik kesimpulan bahwa dalam ekstrak etil asetat kulit batang sirsak terdapat senyawa 17, 18 dihidroksi montecristin. Hasil uji BSLT Ekstrak etil asetat dan fraksi D menunjukkan ekstrak tersebut bersifat toksik dengan nilai LC_{50} = 5,822 ppm dan 16,688 ppm.

B. Saran

Adapun hal-hal yang disarankan berkaitan dengan penyempurnaan penelitian ini adalah sebagai berikut:

1. Perlu dilakukan penelitian lanjutan terhadap fraksi-fraksi yang tidak dilanjutkan.
2. Perlu dilakukan pengujian bioaktivitas lebih lanjut terhadap ekstrak etil asetat yaitu uji aktivitas antikanker serta dilakukan standarisasi untuk dikembangkan menjadi fitofarmaka sebagai usaha pengembangan obat alternatif antikanker.

DAFTAR PUSTAKA

Artini, N.R., Wahjuni, S., Sulihingtyas, W.D. 2012. *Ekstrak Daun Sirsak (Annona muricata L.) Sebagai Antioksidan Pada Penurunan Kadar Asam Urat Tikus Wistar*. Jurnal Kimia (ISSN 1907-9850). Vol. 6 No 2.

Atun, S. 2010. Pemanfaatan Bahan Alam Bumi Indonesia Menuju Riset yang Berkualitas Internasional. *Seminar Nasinal Kimia*. Yogyakarta: FMIPA Universitas Negeri Yogyakarta.

Barbut, M. 2014. *Annonaceae*. http://www. theplantlist. org/browse/ A/Annonaceae/ Annona/. Diakses pada tanggal 20 Februari 2016.

Harborne, J.B. 1987. *Metode Fitokimia Penuntun Cara Modern Menganalisa Tumbuhan.* Edisi II. Bandung: Institut Teknologi Bandung.

Idrus, R.B., Bialangi, N., Alio, L. 2012. *Isolasi Dan Karakterisasi Senyawa Alakaloid Dari Tumbuhan Sirsak (Annona muricata* L.*)*. Universitas Negeri Gorontalo: Jurusan Pendidikan Kimia Fakultas Kimia.

Mardiana, L., Juwita, R. 2012. *Ramuan dan Khasiat Sirsak.* Jakarta: Penebar Swadaya.

Meyer, B.N., Ferigni, N.R., Putnam, J.E., Jacobsen, L.B. 1982. *Brine Shrimp: A Convenient General Bioassay for Active Plant Constituents*. Planta Medica.

Mohrig, J.R. 2006. *Techniques in Organic Chemistry*. New York : W.H Freeman and Company.

Naphong, C., Pompimon, W., Sombutsiri, P. 2013. *Anticancer Activity Of Isolated Chemical Constituents From Miliusa Smithiae.* American Journal of Applied Sciences (ISSN: 1546-9239).

Opaladu, N.S. 2013. *Isolasi Dan Karakterisasi Senyawa Metabolit Sekunder Dari Daging Buah Sirsak*. Gorontalo: UNG.

Simbala, E.I. 2009. *Analisis Senyawa Alkaloid beberapa Jenis Tumbuhan Obat sebagai Bahan Aktif Fitofarmaka.* Pacific Journal, Vol 1.

Suhando, A.K. 2013. *Isolasi Terpenoid Dan Uji Antioksidan Ekstrak Kulit Batang Sirsak (Annona muricata* L.*).* Jurnal Kimia Unand (ISSN No. 2303-3401).

Suharyadi, A., Sukohar, A., Muhartono. 2013. *Pengaruh Pemberian Ekstrak Etanol Daun Sirsak Terhadap Gambaran Histopatologi Ginjal Tikus Diinduksi Dmba*. Jurnal Kesehatan (ISSN 2337-3776).

Torres, R., Manalo, C.O., Marie, R.Z., Garbo, A.G. 2014. *Characterization of the Leaf Extract of Annona muricata and Larvicidal Activity against Aedesaegypti.* Time Journal Biological Sciences and Technology Vol. 2.

Wullur, A.C., Schaduw, J., Wardhani, A.N.K. 2012. *Identifikasi Alkaloid Pada Daun Sirsak (Annona muricata* L.*).* Manado: Jurusan Farmasi Politeknik Kesehatan Kemenkes.